

Aus dem Lehrstuhl
für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
Prof. Dr. Dr. André Gessner
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

**Isolation verschiedener Subtypen des Hepatitis-A-Virus und Bestimmung ihrer
Empfindlichkeit gegenüber Virostatika *in vitro***

Inaugural-Dissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Anouk Amelie Langer

Aus dem Lehrstuhl
für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
Prof. Dr. Dr. André Gessner
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

**Isolation verschiedener Subtypen des Hepatitis-A-Virus und Bestimmung ihrer
Empfindlichkeit gegenüber Virostatika *in vitro***

Inaugural-Dissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Anouk Amelie Langer

Dekan:

Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Jürgen Wenzel

2. Berichterstatter:

PD Dr. Florian Hitzenbichler

Tag der mündlichen Prüfung:

09.07.2026

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	IX
Symbolverzeichnis	X
1 Einleitung	1
1.1 Morphologie und Phylogenie	1
1.2 Klinik und Diagnostik	2
1.3 Epidemiologie und Transmission	3
1.4 Zugelassene Therapieoptionen gegen HAV	5
2 Materialien	8
2.1 Verbrauchsmaterialien	8
2.2 Chemikalien, Zellkulturmedien und Puffer	9
2.3 HAV-positives Material	10
2.4 Zelllinien	11
2.5 Geräte	12
2.6 Software	12
3 Methoden	13
3.1 Zellkultur	13
3.2 Virusinokulation und Passagierung	13

	IV
3.3 Isolierung der Nukleinsäure	15
3.4 HAV-RNA-Quantifizierung mittels RT-qPCR	15
3.5 Herstellung der Suspension der Virostatika	16
3.6 Virostatika-Testung.....	16
3.7 MTT-Viability-Assay nach Mosmann	18
4 Ergebnisse.....	20
4.1 Unterschiedliche Permissivitäten verschiedener Zelllinien mit schnellerer Infektion von bereits passagierten HAV-positiven Materialien im Vergleich zu den de-novo-Isolationen	20
4.2 Nachweis eines ausbleibenden zytotoxischen Effekts von DMSO in niedrigeren Konzentrationen von 0,25% auf die HAV-RNA-Konzentration	29
4.3 Spezifische Medikamentenkonzentrationen vermindern die relative HAV-Replikation bei weitestgehend erhaltener Zellviabilität	31
4.4 Zytopathischer Effekt der bereits mehrfach in der Zellkultur passagierten HAV-Stämme	35
4.5 IC50-Werte zeigen eine erhöhte Wirksamkeit von Sofosbuvir gegenüber Ribavirin bezüglich der relativen Reduktion der HAV-Replikation	39
5 Diskussion	42
6 Zusammenfassung	50
7 Summary	51
8 Anhang	52
9 Literaturverzeichnis.....	55
10 Danksagung	
11 Lebenslauf.....	

Abkürzungsverzeichnis

ACLF	akut-auf-chronisches Leberversagen (engl.: acute-on-chronic liver failure)
ALF	akutes Leberversagen (engl.: acute liver failure)
ALT	Alanin-Aminotransferase
AST	Aspartat-Aminotransferase
ATCC	American Type Culture Collection
AVH	Akute virale Hepatitis (engl.: acute viral hepatitis)
bp	Basenpaare (engl.: base pairs)
BSA	Bovines Serum-Albumin
Bzw.	beziehungsweise
c	Kopien (engl. copies)
CA	Kalifornien
ca.	circa
CCK-8	Cell Counting Kit-8 (de.: Zellzählkit-8)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CPE	cytopathischer Effekt bzw. zytopathischer Effekt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpi	Tag(e) nach Inokulation (engl.: day(s) post inoculation)
engl.	Englisch
g	Gramm
GFP	Grün fluoreszierende Protein (engl.: green fluorescent protein)
GTP	Guanosintriphosphat
HAV	Hepatitis-A-Virus
HCV	Hepatitis-C-Virus
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IMHR	Institut für Mikrobiologie und Hygiene Regensburg
MEM	Minimal Essential Medium
ml	Milliliter
mM	Millimol pro Liter (Angabe der Stoffmenge)
n.d.	nicht nachweisbar (engl.: not detected)
NK	Negativkontrolle
NM	New Mexico
NY	New York
PBSo	PBS ohne die Kationen Calcium und Magnesium
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction)
PK	Positivkontrolle
ps	Penicillin-Streptomycin
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: ribonucleic acid)
RT-qPCR	quantitative Echtzeit-PCR (engl.: real-time quantitative PCR)
sec	Sekunde (engl. second)
u.a.	Unter anderem
UK	Vereinigtes Königreich (engl.: United Kingdom)
UKR	Universitätsklinikum Regensburg
USA	Vereinigte Staaten (engl.: United States of America)

UTR	Untranslatierte Regionen (engl.:untranslated region)
VPg	Virusgebundenes Genomprotein (engl.: viral protein genome-linked)
w/	Mit (engl.: with)
w/o	Ohne (engl.:without)
WHO	Weltgesundheitsorganisation (engl. World Health Organisation)

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Belegung der TC-Platte 96 Well (Standard F) Platte. Angegeben ist hierbei die Verdünnung der Virostatika in μM	18
Abbildung 2: Inokulation der Zelllinien MRC-5, Huh-7, Caco-2 und PLC/PRF/5 mit nativem sowie bereits zellkulturadaptiertem HAV-positiven Material.	21
Abbildung 3: Inokulation der Zelllinien MRC-5, Huh-7, Caco-2 und PLC/PRF/5 mit nativem sowie bereits zellkulturadaptiertem HAV-positiven Material.	23
Abbildung 4: Inokulation der Zelllinien A549, Huh-7-Lunet BLR, HepG2/C3A und Vero mit nativem sowie bereits zellkulturadaptiertem HAV-positiven Material.	25
Abbildung 5: Die Box-Plots zeigen die zentrale Tendenz und Streuung der HAV-RNA in Kopien pro Milliliter aller verwendeten HAV-Stämme bezogen auf die untersuchten Zelllinien.	27
Abbildung 6: Vergleich der HAV-Konzentration in c/ml jeweils mit und ohne 0,25% DMSO-Behandlung an Tag 7 und 14 nach Inokulation	30
Abbildung 7: Auswirkung der 0,25% DMSO-Behandlung anhand des Zellviabilitätstests nach Mosmann an Tag 7 und 14. Angegeben ist die optische Dichte (Extinktion), gemessen bei der Wellenlänge 595 nm.	31
Abbildung 8: Relative logarithmische HAV-Replikation der HAV-positiven Materialien in Prozent unter Einfluss von verschiedenen Konzentrationen von Ribavirin und Sofosbuvir bezogen auf die mit 0,25% DMSO behandelte Positivkontrolle ohne den Einfluss von Virostatikum (schwarze Kurve) in Huh-7 Zellen. In Bezug zu setzen mit der relativen Zellviabilität in Prozent unter Einfluss von verschiedenen Virostatika, bezogen auf die mit 0,25% DMSO behandelte Positivkontrolle (grüne Kurve).	32
Abbildung 9: Relative logarithmische Replikation des HAV-IB-Isolats MBB sowie relative Zellkonfluenz in Prozent unter Einfluss von verschiedenen Konzentrationen von Ribavirin und Sofosbuvir bezogen auf die Positivkontrolle (ohne Einfluss von Virostatika, mit 0,25% DMSO).	36

Abbildung 10: Relative logarithmische HAV-Replikation des HAV-positiven Materials V18 des Genotyps IB in Prozent unter Einfluss von verschiedenen Konzentrationen von Ribavirin und Sofosbuvir bezogen auf die mit 0,25% DMSO behandelte Positivkontrolle (ohne Einfluss von Virostatika). In Bezug zu setzen mit der relativen Zellkonfluenz. 38

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien	8
Tabelle 2: Chemikalien, Zellkulturmedien und Puffer	9
Tabelle 3: HAV-positives Material.....	10
Tabelle 4: Verwendete Zelllinien.....	11
Tabelle 5: Verwendete Geräte.....	12
Tabelle 6: Verwendete Software.....	12
Tabelle 7: Temperaturprofil RT-qPCR	16
Tabelle 8: Zwischenverdünnung der Virostatika Ribavirin und Sofosbuvir in μM . Die DMSO-Konzentration beträgt 5%.	17
Tabelle 9: Viruslast in c/ml und Genotyp des sterilfiltrierten Pools des Zellkulturüberstands von Tag 21 und Tag 28 nach Inokulation von Huh-7-Zellen mit dem im vorherigen Versuch gesammelten Zellkulturüberstand	28

Symbolverzeichnis

%	Prozent
<	Kleiner-als Zeichen
≤	Kleiner-gleich Zeichen
≥	Größer-gleich Zeichen
®	Registered Trademark
°C	Grad Celsius
μM	Mikromolar
c/ml	Kopien (engl: copies) pro Milliliter
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
™	Unregistered Trademark

1 Einleitung

1.1 Morphologie und Phylogenie

Das Hepatitis-A-Virus (*Hepatitisvirus ahepa*, HAV) ist ein einzelsträngiges RNA-Virus in einem ikosaedrischen Kapsid, einer Genomlänge von 7,5 Kilobasen und einer Positivstrangorientierung. Es gehört zur Gattung *Hepatitisvirus* innerhalb der Familie *Picornaviridae* (1,2). Das faltungsabhängige Kapsid führt zu einer außergewöhnlich hohen Stabilität des Virus in der Umwelt gegenüber Einfrieren, niedrigen pH-Werten und moderater Hitze (3,4). Das 5'-Ende beinhaltet eine kovalente Verbindung zu dem viralen Protein VPg („viral protein genome-linked“). Das darauf folgende 5'-UTR-Segment macht ca. 10% des Gesamtgenoms aus (5). Der RNA-Teil des Virus enthält ein offenes Leseraster (6). Das offene Leseraster codiert ein großes Polyprotein, welches ca. 2230 Aminosäuren beinhaltet und durch eine einzige Proteinase in 10 Einzelproteine unterteilt wird (5). Flankiert ist der offene Leseraster von einem kurzen 3'-UTR Segment (7,8). Die 3'-untranslatierte Region enthält eine Polyadenylierung (5).

Das Hepatitis-A-Virus kann in zwei Formen vorliegen. Bei der nackten Form des Virus ist die Ribonukleinsäure von einer Proteinhülle umgeben, wodurch eine stabile Form entsteht. Diese ermöglicht eine Transmission über den Stuhl. Der genaue Mechanismus der Sezernierung der unbehüllten Virusform wird noch untersucht (9). Eine Theorie besagt, dass HAV in der quasi-umhüllten Form von der apikalen Membran der Hepatozyten in das Gallensystem sezerniert wird, und die hohe Konzentration der Gallensäure im proximalen Bereich der Gallengänge zu einer Entfernung der Hülle führt, wodurch es zu einer Ausscheidung der nackten Viren in den Darmtrakt kommt (9,10). Darüber hinaus existiert eine quasi-umhüllte Form, bei welcher das Virus zusätzlich zur Proteinhülle noch eine vom Wirt produzierte Hülle umgibt. Dies führt zu einer Sezernierung von Viruspartikeln ohne Zelllyse der Wirtszelle. Diese Form lässt sich im Blut von infizierten Patienten nachweisen und ist somit die übertragende Form bei den selten vorkommenden Infektionen über Blutprodukte (5,11,12).

Bisher wurde nur ein HAV-Serotyp beschrieben und das Virus ist derzeit in sechs Genotypen unterteilt. Nur die Genotypen I–III sind humanpathogen (13,14) und werden

jeweils in Subgenotypen unterteilt. HAV-Genotypen kennzeichnen eine Nukleotidsequenzvariation von >15%, während Subgenotypen mit einer Nukleotidsequenzabweichung von >7,5% definiert sind (1,15). Die verschiedenen Genotypen zeigen global unterschiedlich starke Prävalenzen. Während in Osteuropa, in den Balkanländern und China vor allem der Genotyp IA vorherrschend ist, lässt sich in Indien eine starke Verbreitung des Genotyps IIIA verzeichnen (16,17). In Nord- und Südamerika gilt Genotyp IA als am weitesten verbreitet. Zwischen 2013 und 2018 konnten jedoch auch erhöhte Fallzahlen von Genotyp IB und IIIA festgestellt werden (18). Aufgrund dieser inhomogenen globalen Verteilung der HAV-Genotypen kann bei Ausbrüchen mittels phylogenetischer Analysen des Virus eine geographische Rückverfolgung des HAV-Stamms durchgeführt werden (15,19).

1.2 Klinik und Diagnostik

Die Inkubationszeit von Hepatitis A beträgt in der Regel zwischen 15 und 50 Tagen. Das anschließende Auftreten von Symptomen unterscheidet sich stark nach dem Alter der infizierten Person. Bei Kindern verläuft die Infektion häufig asymptomatisch, bei Erwachsenen sind symptomatische, mit Ikterus einhergehende Verläufe, mit über 70% zu erwarten (13,20). Die für Hepatitis A typischen Symptome wie Müdigkeit, Fieber, Erbrechen, Appetitlosigkeit, Bauchschmerzen, Übelkeit und Gelbsucht lassen zunächst keine Unterscheidung von anderen viralen Hepatitiden zu. Serologisch können erhöhte Werte der Leberenzyme ALT und AST im Blut auf eine Lebererkrankung bzw. Schädigung der Hepatozyten hinweisen (21). Weitere Krankheitsbilder wie Pankreatitis, Mononeuritis, akutes Nierenversagen, Guillain-Barré-Syndrom, Pneumonitis, Myokarditis, Pleura- und Perikardergüsse, Arthritis, Hämolyse und aplastische Anämie wurden mit einer HAV-Infektion in Verbindung gebracht (15). Eine Infektion mit HAV ist meist selbstlimitierend und die Symptome manifestieren sich in der Regel nicht länger als zwei Monate (1,13). Außerdem sind schwere Verläufe mit akutem Leberversagen und Akut-auf-chronischem Leberversagen bis hin zu Todesfällen bekannt (17,22,23). Die World Health Organisation schätzt die Zahl der jährlichen HAV-Infektionen auf 1,5 Millionen (14). Eine Studie mit gesammelten Daten von Global Health Data Exchange aus 204 Ländern und Regionen zeigte, dass die weltweite Zahl der Hepatitis-A-Neuerkrankungen zwischen 1990 und 2019 um 13,90% von 139,54 Millio-

nen auf 158,94 Millionen gestiegen ist. Die Zahl der durch HAV verursachten Todesfällen ist jedoch im selben Zeitraum um 63,61% von 10.790 auf 3.930 gesunken (24). Auffällig ist hierbei, dass 97% der Todesfälle aufgrund von Hepatitis-A in Ländern mit niedrigem bzw. niedrig bis mittlerem Einkommen aufgetreten sind (13).

Die Diagnostik einer akuten HAV-Infektion erfolgt in der Regel durch Nachweis von IgM-Antikörpern gegen HAV. Die IgM-Antikörper werden wenige Wochen nach Infektion produziert und können mehrere Wochen nach der Infektion nachgewiesen werden. IgG-Antikörper werden zeitgleich bzw. leicht verzögert zu den IgM-Antikörpern produziert und können mehrere Jahre bis lebenslang nach der Infektion nachgewiesen werden (13–15, 1, 23, 25).

1.3 Epidemiologie und Transmission

HAV wird meist fäkal-oral übertragen. Ausschlaggebende Faktoren sind hier vor allem mangelnde Hygiene sowie die Übertragung des Virus über kontaminiertes Wasser und Lebensmittel (4). Eine hohe Resistenz des Virus gegenüber Einfrieren, niedrigen pH-Werten und moderater Hitzeeinwirkung führt zu einer hohen Widerstandsfähigkeit von HAV (4, 26). Dies hat zur Folge, dass der Erreger mehrere Stunden auf der menschlichen Haut und mehrere Tage auf Oberflächen infektiös bleiben können. Kontaminierte Handoberflächen können somit bei der Verarbeitung von Lebensmittel zu einer nachträglichen Kontamination der Lebensmittel führen (26, 27). Der Fokus liegt hierbei vor allem auf Meeresfrüchten, gefrorenen Lebensmitteln wie Beeren und Gemüse und „Ready-to-eat“ Produkten (4). Sowohl direkter Kontakt mit einer infizierten Person als auch indirekter Kontakt über kontaminierte Lebensmittel oder Wasser stellen die Hauptinfektionswege dar (4).

Ein weiterer potenzieller Übertragungsweg von HAV ist Wasser, das für Trink- und Haushaltszwecke genutzt wird. Dies verursacht vor allem in Gemeinschaftsunterkünften ein erhöhtes Infektionsrisiko. In einem Fallbericht aus Korea konnte die HAV-Infektion von 12 von 82 Bewohnern einer Pflegeeinrichtung mit großer Wahrscheinlichkeit auf kontaminiertes Wasser zurückgeführt werden. HAV-RNA konnte im Grundwasser nachgewiesen werden (28).

Vereinzelt sind auch Fälle bekannt, in denen HAV durch Blutprodukte in der virämischen Phase bei Bluttransfusionen oder durch kontaminierte Nadeln übertragen wurde. Ebenso sind Infektionen durch Organtransplantationen bekannt (4,20,29,30).

Zu den Hauptrisikogruppen für eine HAV-Infektion zählen vor allem ungeimpfte Reisende, die von nicht endemischen Ländern in endemische Länder reisen, Männer die Sex mit Männern haben, Drogenkonsumenten, obdachlose Personen, Personen mit engem Kontakt zu Menschen aus HAV-endemischen Ländern und Personen mit einer erhöhten beruflichen Exposition (4,20). In Europa zählen zusätzlich Konsumenten von Tiefkühlbeeren als eine relevante Risikogruppe (31,32).

Die Epidemiologie von HAV zeigt eine Korrelation mit den sozioökonomischen Verhältnissen mit deutlich erhöhter Belastung in Ländern mit niedrigem bzw. mittlerem Einkommen. Weltweit werden die jährlichen Neuinfektionen laut eines WHO-Reports auf ca. 1,5 Millionen geschätzt (13,14,33). Eine genaue Erhebung kann hinsichtlich einer hohen Dunkelziffer aufgrund von zahlreichen asymptomatischen Verläufen mit anschließender Immunität im jungen Alter nicht durchgeführt werden (34). Eine hohe Durchseuchungsrate in jungem Alter geht mit einem hohen Maß an Immunität in der Bevölkerung einher (15). Eine Verlagerung des Infektionsrisikos in eine höhere Altersgruppe korreliert mit einem erhöhten Risiko für einen symptomatischen bzw. schweren Krankheitsverlauf bis hin zur Entwicklung eines Leberversagens. Dies zeigt sich beispielsweise in Indien (13,17)

Im globalen Rahmen führen wirtschaftlicher Aufschwung und verbesserte hygienische Bedingungen in einigen Regionen und Ländern zu einer Verlagerung des Alters der Erstinfektion von der frühen Kindheit in das Jugend- bzw. Erwachsenenalter (13). Laut einer Studie der „Indian National Association for Study of the Liver“ von 2020 ist der Prozentsatz an akuten Leberversagen in Indien aufgrund einer HAV-Infektion in den letzten drei Jahrzehnten deutlich gestiegen, hierbei gilt jedoch zu beachten, dass zum Teil in dieser Studie nur sehr geringe Fallzahlen vorliegen (13,35). Auch in Korea lässt sich die Verlagerung der Erstinfektion in ein höheres Alter feststellen. Dies hat auch hier einen exponentiellen Anstieg an symptomatischen HAV-Infektionen zur Folge (36).

Auch innerhalb einer Bevölkerungsgruppe lässt sich dieser Effekt anhand der starken sozio-ökonomischen Korrelation bezüglich der HAV-Seroprävalenz feststellen. Dies spiegelt sich auch in einer Studie aus Indien und Bangladesch wider, die zeigt, dass in urbaneren Regionen mit einem höheren sozioökonomischen Status eine niedrigere Seroprävalenz von anti-HAV-IgG als in ländlicheren und ärmeren Gegenden gemessen werden kann (22). Ein ähnlicher Trend lässt sich auch in Saudi Arabien, Süd-Ost Asien und China beobachten (36–38).

Allgemein haben die Globalisierung und der internationale Handel mit Lebensmitteln einen Einfluss auf die Epidemiologie von HAV. Bereits in der Vergangenheit konnten HAV-Ausbrüche in nicht endemischen Ländern auf zuvor importierte Lebensmittel zurückgeführt werden (32). Bei einem 2013 bis 2014 stattgefundenen HAV-Ausbruch des Genotyps IA in mehreren europäischen Ländern konnte eine starke Korrelation zu zuvor konsumierten importierten gefrorenen Beeren festgestellt werden (31).

1.4 Zugelassene Therapieoptionen gegen HAV

Es gibt derzeit noch keine für die Therapie von HAV zugelassene Medikation. Da viele HAV-Infektionen selbstlimitierend verlaufen, beschränkt sich die Therapie meist auf die Behandlung der Symptome mit zum Beispiel fiebersenkenden Medikamenten (39).

Präventiv wird der Fokus vor allem auf die Umgebungsprophylaxe im Rahmen von sorgfältiger Lebensmittel-, Hände- und Sanitärhygiene gelegt (4). Es gibt zwei gegen Hepatitis A zugelassene Impfstoffe: einen lebend-attenuierten Impfstoff, welcher in China, Guatemala, Bangladesch, auf den Philippinen, Thailand und Indien verwendet wird und einen in Europa und den USA zugelassenen formalin-inaktivierten Impfstoff (39). Die Ständige Impfkommission (STIKO) am Robert Koch-Institut empfiehlt derzeit lediglich die Impfung von Risikopersonen. Dazu werden Personen mit Lebererkrankungen, Personen mit einem Sexualverhalten mit hoher Infektionsgefährdung, Personen mit häufiger Übertragung von Blutbestandteilen und Bewohner von psychiatrischen Einrichtungen oder vergleichbaren Fürsorgeeinrichtungen gezählt. Des Weiteren wird eine Impfempfehlung für Reisende in Regionen mit einer hohen HAV-Prävalenz und für Personen mit einem erhöhten Infektionsrisiko aufgrund ihrer beruflichen Tätigkeit ausgesprochen (40).

Neben der Prävention gegen eine HAV-Infektion wird die Impfung auch im Rahmen der Postexpositionsprophylaxe als Riegelungsimpfung verwendet. Hierfür wird eine Immunisierung mit einem monovalenten HAV-Impfstoff innerhalb von 14 Tagen nach Exposition durchgeführt (4,41).

Gerade bei Patienten mit Komorbiditäten kann eine HAV-Infektion mit schwerwiegenden Folgen einhergehen und fatal enden (4,42). Eine antivirale Therapie könnte die Krankheitsdauer verkürzen, die Symptome reduzieren und entscheidend zum Patientenwohl beitragen. Dies würde neben den positiven gesundheitlichen Aspekten auch eine ökonomische Entlastung der Gesundheitseinrichtungen bedeuten (43). Obwohl die Impfung ein effektives Mittel zur Prävention einer HAV-Infektion darstellt, sind die hohen Kosten der Herstellung ein limitierender Faktor für den Einsatz einer weltweiten und flächendeckenden Immunisierung (43). Das HAV-Antigen, welches für die Herstellung des inaktivierten Hepatitis-A-Impfstoffs benötigt wird, wird üblicherweise in menschlichen MRC-5 Zellen vermehrt, was die Hochskalierung der Impfstoffproduktion erschwert (44). Da inzwischen auch von potentiellen Impffluchtvarianten berichtet wurde, könnte eine medikamentöse Therapie gegen HAV ein wichtiges Mittel zur Eindämmung von Epidemien darstellen (43,45).

Eine retrospektive Analyse von HAV-Infektionen aus Indien zwischen Januar 2014 und Dezember 2022 hat gezeigt, dass eine gezielte Therapie gegen Hepatitis A von hoher Relevanz wäre. In einem Leberzentrum waren von 14.706 Patienten mit akuter Gelbsucht 1.144 (7,72%) anti-HAV-IgM positiv. In die Studie wurden 690 positiv getestete Patienten eingeschlossen, wobei die meisten Patienten (68,1%) eine akute virale Hepatitis aufwiesen, gefolgt von 31,4% mit akutem Leberversagen und 0,43% mit einem Akut-auf-chronischem Leberversagen. Insgesamt wurden 45 Todesfälle registriert, was einer Letalitätssrate von 6,52% entspricht (17).

Bereits in der Vergangenheit konnte eine erfolgreiche HAV-Replikation unter Verwendung von verschiedenen Zelllinien etabliert werden (46). In dieser Arbeit wurde zunächst ein Zellkultursystem etabliert, welches möglichst permissiv gegenüber unterschiedlichen HAV-Genotypen, sowohl aus nativem Patientenmaterial als auch von bereits in Zellkultur kultivierten HAV-Stämmen ist. Im Anschluss wurde ein potenzieller antiviraler Effekt von Virostatika auf die HAV-Replikation verschiedener Genotypen in-

vitro untersucht. Die aktuelle Studienlage zeigt, dass das Virostatikum Ribavirin, welches in der Vergangenheit u.a. zur Therapie von Hepatitis C und Hepatitis E eingesetzt wurde, in in-vitro-Studien zu einem Rückgang der HAV-Replikation geführt hat (47–50). Neben Ribavirin ist Sofosbuvir ein Virostatikum, das im Rahmen der Hepatitis C-Therapie eingesetzt wird. Zusätzlich wurde Sofosbuvir mehrfach off-label bei chronischer Hepatitis E-Infektion eingesetzt (51,52). In dieser Arbeit wurde untersucht, ob mögliche antivirale Effekte der Virostatika Ribavirin und Sofosbuvir auch bei den verschiedenen humanpathogenen Genotypen von HAV beobachtet werden können und ob sich Genotyp-spezifische Unterschiede zeigen.

2 Materialien

2.1 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
300µl LONG, ECO Rack of 96 GRIPTIPS	Integra Biosciences AG, Zizers, Schweiz
8 Channel Evolve Pipette	Integra Biosciences AG, Zizers, Schweiz
Desinfektionstücher Incidin™ OxyWipe S	Ecolab, Monheim am Rhein, Deutschland
MagNA Pure 96 System Fluid	Roche Diagnostics, Basel, Schweiz
EZ1&2™ Virus Mini Kit v2.0 (48)	Qiagen, Venlo, Niederlande
Handschuhe Gentle Skin® grip S	Meditrade, Kiefersfelden, Deutschland
MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit	Roche Diagnostics, Basel, Schweiz
MagNA Pure 96 Output Plate	Roche Diagnostics, Basel, Schweiz
MagNA Pure 96 Processing Cartridge	Roche Diagnostics, Basel, Schweiz
Mikroröhre PCR-PT 2,0ml, PCR Performance Tested	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
BD Microlance™ 3 Kanülen	Becton, Dickinson S.A., Franklin Lakes, New jersey, USA
Corning® Falcon® Tissue Culture Flask 25cm ²	Corning, Corning, NY, USA
Feinwaage MC 210 P	Ziegler, Isernhagen, Deutschland
MagNA Pure Sealing Foil	Roche Diagnostics, Basel, Schweiz
MagNA Pure Tip 1000 µl	Roche Diagnostics, Basel, Schweiz
Mehrkanaltransferpipette®-12 1-10 µl	Eppendorf, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Mehrkanaltransferpipette®-8 50-200 µl	Eppendorf, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Mehrkanaltransferpipette®-8 50-200 µl	Eppendorf, Hessisch Oldendorf, Deutschland
MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode (0,1 mL)	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Pipettenspitze Combitips advanced®	Eppendorf, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Pipettenspitze SafeSeal SurPhob, 10µl, extra lang	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Pipettenspitze SafeSeal SurPhob, 1250µl	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Pipettenspitze SafeSeal SurPhob, 200µl, XL	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Pipettenspitze SafeSeal-Tips professional®	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Schraubröhre 50ml, 114x28mm, PP	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipette 1 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipette 10 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipette 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipette 5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Spritze Discardit™ II 2 ml	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Spritze Discardit™ II 5 ml	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Spritzenvorsatzfilter, Filtropur S 0,2, Porengröße 0,2µm	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
TC-Platte 48 Well, Standard, F	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
TC-Platte 96 Well, Standard, F	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
TC-Platte 96 Well, Standard, K	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Transferpipette 3,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Transferpipetten 3,5ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturflasche Falcon® 12.5 cm ² , belüftet	Corning, Corning, NY USA
Zellkulturflasche Falcon® 25 cm ² , belüftet	Corning, Corning, NY USA

Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien

2.2 Chemikalien, Zellkulturmedien und Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung	Anmerkung	Hersteller
MEMM	85% MEM Eagle	mit EBSS; ohne L-Glutamin; mit 2,2 g/l NaHCO ₃	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
	10% FCS	hitzeinaktiviert bei 56 °C für 30 min	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
	1% L-Glutamin	200 mM	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
	1% MEM NEAA	100× konzentriert	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
	1% Pen/Strep	Penicillin: 10E+04 U/ml Streptomycin: 10 mg/ml	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
	1% Amphotericin B	250 µg/ml	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
	1% MgCl ₂ [3 M]	MgCl ₂ in MEM [3 M] sterilfiltriert: Membran = PES Porengröße = 0,2 µm	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
BMEM	87% MEM Eagle	mit EBSS; ohne L-Glutamin; mit 2,2 g/l NaHCO ₃	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
	10% FCS	hitzeinaktiviert bei 56 °C für 30 min	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
	1% L-Glutamin	200 mM	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
	1% MEM NEAA	100× konzentriert	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
	1% Pen/Strep	Penicillin: 10E+04 U/ml Streptomycin: 10 mg/ml	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
PBSO		Ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺	Lonza, Basel, Schweiz
AE Puffer			Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
DMSO	Dimethyl Sulfoxid		Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
Ribavirin			Hycultec GmbH, Beutelsbach, Deutschland
Sofosbuvir			Hycultec GmbH, Beutelsbach, Deutschland
MTT	5µg MTT in 1ml PBSO	([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide])	
H₂O DEPC-behandelt			Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin			PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland

Tabelle 2: Chemikalien, Zellkulturmedien und Puffer

2.3 HAV-positives Material

Probenbezeichnung	Material	HAV-RNA (c/ml)	Genotyp
V23-028876	Serum	$1,6 \times 10^7$	IA
V23-022683	Serum	$4,0 \times 10^6$	IA
V23-047758	Serum	$2,0 \times 10^7$	IA
V23-042713	Serum	$1,4 \times 10^6$	IIIA
V23-036792	Serum	$2,3 \times 10^6$	IB
V23-020758	Serum	$2,4 \times 10^6$	IB
V23-036039	Serum	$2,2 \times 10^6$	IB
V18	Zellkulturüberstand von persistent infizierten Zellen		IB
MBB	Zellkulturüberstand von persistent infizierten Zellen		IB

Tabelle 3: HAV-positives Material. Die Proben wurden vom Institut für Mikrobiologie und Hygiene am Universitätsklinikum Regensburg zu Verfügung gestellt und bis zur Weiterverwendung bei -80 Grad Celsius aufbewahrt. Die angegebenen Konzentrationen und Genotypen wurden zuvor in der virologischen Diagnostik des Instituts für Mikrobiologie und Hygiene des UKR bestimmt. Angegeben ist die Probenidentifikationsnummer, die Materialart, die Konzentration von HAV-RNA in Kopien pro Milliliter und der HAV-Genotyp.

Das HAV-positive Probenmaterial wurde vom Institut für Klinische Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikum Regensburg zur Verfügung gestellt. Die Proben wurden zuvor von der Abteilung für Diagnostik auf Hepatitis A getestet und genotypisiert. Von den zu untersuchenden Genotypen wurden aus den zu Verfügung stehenden Proben diejenigen ausgewählt, welche eine hohe Viruslast aufwiesen. Die Proben wurden bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

Für die Positivkontrolle wurden in dieser Arbeit zwei vom Institut zu Verfügung gestellte HAV-Isolate „MBB“ und „V18“ verwendet. Es handelt sich hierbei jeweils um den HAV-Genotyp IB, welcher aus Patientenmaterial gewonnen wurde.

2.4 Zelllinien

Bezeichnung	Gewebetyp	Quelle
A549	Lungenkarzinom	ATCC ® CCL-185™
HepG2/C3A	Leberzellkarzinom	ATCC ® CRL-3581™
PLC/PRF/5	Leberzellkarzinom	ATCC ® CRL-8024™
Huh-7	Leberzellkarzinom	(53)
Huh-7-Lunet BLR	Leberzellkarzinom	(53)
Vero	Nierenzelle	ATCC ® CCL-81™
MRC-5	Lungenfibroblast	ATCC ® CCL-171™
Caco-2	Kolonadenokarzinom-Epithelzelle	ATCC ® HTB-37™

Tabelle 4: Verwendete Zelllinien

Die hier angegebene Bezeichnung und Herkunft des Gewebetyps stammt von der Website der American Type Culture Association aus Manassas, Virginia, USA. Die Leberzelllinie Huh-7 und der Subklon Huh-7-Lunet BLR wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Ralf Bartenschlager, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, zur Verfügung gestellt (53).

Im Rahmen dieser Arbeit wird die quantitative Virusproduktion und anschließende Isolation von verschiedenen HAV-Genotypen auf verschiedenen Zelllinien getestet. Das beschriebene Protokoll wurde mit den in Tabelle 4 genannten Zelllinien durchgeführt (siehe Tabelle 4). Es handelt sich somit sowohl um Leberzelllinien als auch um Zelllinien eines anderen Gewebeursprungs. HAV-permissive Zelllinien wurden nach einer Literaturrecherche mit dem Bestand am Institut abgeglichen, weshalb die Zelllinien MRC-5, PLC/PRF/5, Huh-7, Caco-2 und Vero ausgewählt wurden. Zusätzlich wurden weitere am Institut verfügbare Zelllinien eingesetzt, die den Gewebetypen entsprechen, die in der Literatur als HAV-permissiv beschrieben wurden. Hier entschied man sich für Zellen der Lunge, A549, und Zellen der Leber, Huh-7-Lunet BLR und HepG2/C3A.

2.5 Geräte

Geräte	Hersteller
Brutschrank ICO240med	Memmert, Schwabach, Deutschland
EZ1 Advanced XL	Qiagen, Venlo, Niederlande
Handdispenser Multipette® plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kolbenhubpipette Reference® 0,5–10 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kolbenhubpipette Reference® 100–1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kolbenhubpipette Reference® 10–100 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kolbenhubpipette Reference® 20–200 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kühlschrank	Liebherr, Bulle, Schweiz
MagNA Pure 96 System	Roche Diagnostics, Basel, Schweiz
Mehrkanalpipette Transferpette®-12 20–200 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mehrkanalpipette Transferpette®-8 50–200 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Metallblockthermostat als LABTHERM®	Gebr. Liebisch, Bielefeld, Deutschland
Pipettierhilfe Pipetboy acu 2	Integra, Biebertal, Deutschland
SpectraMax ABS Plus microplate reader	Molecular Devices, LCC, San José, CA, USA
Tiefkühlschrank	Liebherr, Bulle, Schweiz
Ultratiefkühlschrank Innova U725	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortex-Genie 2™	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Zentrifuge 5417 C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5430	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Tabelle 5: Verwendete Geräte

2.6 Software

Bezeichnung	Hersteller
StepOne™ Software	Applied Biosystems, Waltham, MA, USA
SigmaPlot	Systat Software Inc.
Office	Microsoft Corporation
Zotero	Corporation for Digital Scholarship, Inc., Vienna, VA, USA
SoftMax® Pro Software	Molecular Devices, San Jose, CA, USA
Inkscape	Inkscape Community, Open-Source-Projekt
OpenAI GPT-5-mini (2025)	OpenAI, San Francisco, CA, USA
OpenAI GPT-3.5 (2025)	OpenAI, San Francisco, CA, USA
HIV Sequence Database des Los Alamos National Laboratory: Format Conversion	Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM, USA
Gemini 3 Flash	Google DeepMind, London, UK

Tabelle 6: Verwendete Software. Die KI-basierten Werkzeuge GPT-5-mini, GPT-3.5 und Gemini 3 Flash wurden zur Rechtschreibprüfung; Unterstützung bei Formulierungen und im Rahmen der Literaturrecherche verwendet.

3 Methoden

3.1 Zellkultur

Die Zelllinien wurden vom Institut für Klinische Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums Regensburg in einer Zellkulturflasche Falcon® 12.5 cm² kultiviert und alle drei bis vier Tage bei ausreichender Konfluenz gesplittet und in eine neue Flasche überführt. Hierfür wurde zunächst der Zellkulturüberstand vollständig mittels Transferpipette entfernt und anschließend jegliche Überstände durch kurzes Waschen mit Trypsin beseitigt. Im darauffolgenden wurden ca. 2 ml Trypsin auf den Zellrasen gegeben. Nach ca. 2 Minuten ließ sich mikro- und makroskopisch das Lösen der Zellen vom Boden der Zellkulturflasche erkennen. Das sich auf dem Zellrasen befindende Trypsin wurde bis auf ca. 0,5 ml entfernt. Durch mechanische Bewegungen wurden die Zellen in den verbleibenden 0,5 ml Trypsin in Suspension gebracht. Nachfolgend wurde das Nährmedium BMEM hinzugegeben und die Zellen je nach gewünschtem Splittingfaktor in eine entsprechende Menge Nährmedium aufgenommen. Für die Anzucht der Zellkultur im 96-Well-Format wurden je 200 µl der Zellsuspension in die entsprechenden Wells gegeben und für drei Tage bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert.

3.2 Virusinokulation und Passagierung

Vor Verwendung wurde das HAV-positive Material aufgetaut und gevortext. Die Seren wurden anschließend für 10 Minuten bei 8000 × g zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde abgenommen und in eine neue 2 ml Mikroröhre überführt. Das entstandene Material wurde mit PBS₀/BSA 0,2% auf ein Arbeitsvolumen von 2 ml aufgefüllt. Nachfolgend wurden die Proben mittels 0,2 µm Spritzenvorsatzfilter sterilfiltriert. Bis zur Inokulation wurde das HAV-positive Material erneut bei -80°C asserviert. Die Inokulation der zuvor in 96-Well-Platten kultivierten Zelllinien erfolgte drei Tage nach Splitting der Zelllinien. Die Inokulate wurden auf Raumtemperatur gebracht, gevortext und zentrifugiert. Der 200 µl Zellkulturüberstand der angezüchteten Zelllinien im 96-Well-Platten-Format wurde mittels Transferpipette entfernt und verworfen. Auf den Zellrasen wurden je 50 µl des Inokulums gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 80 min bei Raumtemperatur wurden 150 µl des Nährmediums BMEM zugegeben und

die Zellen wurden im Brutschrank bei 34,5 °C und 5% CO₂ inkubiert. Bei der Belegung der 96-Well-Platte wurden alle HAV-positiven Proben in technischen Triplikaten inokuliert, welche jeweils von einem Well mit PBS₀ unterbrochen wurden. Zudem wurde nur jede zweite Reihe belegt. Folglich waren für die zu untersuchenden Zelllinien acht 96-Well-Platten erforderlich. Dieser Versuchsaufbau verhinderte somit eine Kontamination zwischen HAV-positiven Ansätzen. 24 Stunden post Inokulation wurde der Zellkulturüberstand vollständig abgenommen und durch neues Nährmedium auf den Zellrasen ersetzt. Im Folgenden wurde alle 3-4 Tage ein kompletter Medienwechsel durchgeführt. Die BMEM Überstände wurden an Tag 1, 4, 7, 14, 21 und 28 post Inokulation asserviert und auf -80 °C gelagert.

Für den anschließenden Versuch der Medikamententestung wurde der HAV-positive Überstand des zuvor beschriebenen Versuchs verwendet. Da die Evaluation der Ergebnisse, wie im Weiteren in dieser Arbeit beschrieben, zu einer guten de-novo-Isolation der HAV-Stämme unter Verwendung der Huh-7-Zelllinie geführt hat, wurde der hierbei entstandene Zellkulturüberstand von Tag 32 und Tag 35 verwendet. Vor Weiterverwendung der Zellkulturüberstände wurde von der Abteilung für Diagnostik des Instituts für Klinische Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikum Regensburg eine Genotypisierung des HAV-positiven Materials durchgeführt, welche die Genotypen der Proben bestätigen konnte (Ergebnisse siehe Anhang Tabelle 1).

Für den Versuch der Medikamententestung wurde an Tag 32 und 35 Zellkulturüberstand aus der Anzucht HAV aus Originalmaterial im 96-Well-Format abgenommen und in eine 2 ml Mikro-Schraubröhre gegeben und anschließend bei -80 °C asserviert. Dieser wurde anschließend zunächst aufgetaut, gevortext und zentrifugiert. Zu den ca. 200 µl Zellkulturüberständen der de-novo-Isolationen wurden 500 µl BMEM ergänzt, um ein ausreichendes Arbeitsvolumen zu erhalten. Von den Positivkontrollen MBB und V18 war bereits ein ausreichendes Volumen vorhanden. Anschließend wurde der Zellkulturüberstand bei 8000 × g in der Eppi-Zentrifuge für zehn Minuten zentrifugiert. Da die Überstände aus einer sterilen Zellkultur stammen, wurde hier nicht erneut sterilfiltriert. Um genug Ausgangsmaterial für die weiteren Testungen zur Verfügung zu haben, wurde eine Passagierung in eine T 12,5 Flasche durchgeführt.

Hierfür wurde eine Zellkulturflasche T 12,5 mit Huh-7-Zellen mit einer Konfluenz von ca. 90% verwendet. Der Zellkulturüberstand wurde vollständig abgenommen und je 500 µl des zuvor vorbereiteten Inokulums wurden pro Zellkulturflasche auf den Zellrasen gegeben. Die Adsorption erfolgte bei Raumtemperatur auf einem Plattenschüttler (90 U/min) für 75 Minuten. Nach dieser Zeit wurden je 1,5 ml BMEM in jede Zellkulturflasche T 12,5 gegeben. An Tag 1 und Tag 3 nach der Inokulation fand ein vollständiger Medienwechsel statt. Anschließend wurde alle 3-4 Tage ein vollständiger Medienwechsel durchgeführt. Am Tag 21 und 28 wurde 0,5 ml des beim Medienwechsel gewonnenen Zellkulturüberstand für eine PCR Testung abgenommen und bei -80 °C asserviert. Der restliche Zellkulturüberstand wurde in ein 15 ml Falcon gegeben und ebenfalls bei -80 °C asserviert. Anschließend wurde zunächst die Nukleinsäure isoliert und eine RT-qPCR durchgeführt.

3.3 Isolierung der Nukleinsäure

Die Nukleinsäureisolierung wurde mit dem MagNA Pure 96 System durchgeführt. Verwendet wurde das MagNA Pure 96 DNA und Viral NA Small Volume Kit mit dem Viral NA Universal SV 4.0 Protokoll. Hierfür wurden 50 µl des Zellkulturüberstands mit 150 µl BMEM verdünnt. Aus 200 µl des eingesetzten Arbeitsvolumen konnten 100 µl Elutionslösung gewonnen werden.

3.4 HAV-RNA-Quantifizierung mittels RT-qPCR

Die HAV-Nukleinsäurequantifizierung wurde mittels Real-Time-qPCR durchgeführt. Der hierfür eingesetzte Mastermix je Well setzte sich zusammen aus 10,92 µl DEPC Wasser, 7,50 µl TaqPath™ 1 Step RT-qPCR MM, 1,88 µl HAV forward Primer 68 (500 nM), 1,88 µl HAV reverse Primer 240 (500 nM), 1,88 µl HAV reverse Primer 240 modifiziert (500 nM) und 0,94 µl HAV-Sonde 150_so_FAM-MGB. Alle Bestandteile wurden vor Verwendung gevortext und zentrifugiert. Es wurden je 25 µl des Mastermixes in die zu testenden Wells der Reaktionsplatte gegeben. Hierzu wurden je 5 µl des Nukleinsäureisolat gegeben, die zuvor auf Raumtemperatur erwärmt wurden. Die für standardisierten Eichkurven verwendeten Isolate wurde für drei Minuten in einen Thermoblock bei 65 °C gegeben und schließlich für eine Minute in einem zuvor bei -20 °C

gelagertem Metallständer abgekühlt. Die qPCR wurde nach dem folgendem Zeit- und Temperaturprotokoll durchgeführt.

Run Method	Temperatur	TaqPath	
RT-Schritt	50 °C	15 min	1 Zyklus
Enzymaktivierung	95 °C	2 min	1 Zyklus
Denaturierung	95 °C	5 sec	45 Zyklen
Annealing/Extension	60 °C	30 sec	
Abkühlen	4 °C	30 sec	1 Zyklus

Tabelle 7: Temperaturprofil RT-qPCR

Um eine Quantifizierung zu ermöglichen, wurde bei jeder PCR eine standardisierte Eichkurve mitbestimmt. Hierfür wurden vom Institut bereitgestellte HAV-Transkripte eingesetzt.

3.5 Herstellung der Suspension der Virostatika

Die lyophilisierten Virostatika Ribavirin und Sofosbuvir wurden in DMSO zu einer Konzentration von 80 mM rekonstituiert. Die so hergestellten Stocks wurden bei –80 °C bis zur Verwendung gelagert.

3.6 Virostatika-Testung

Vor Verwendung des HAV-positiven Materials aus dem bereits beschriebenen Pool von Tag 21 und 28 für die Inokulation von je zwei 96-Well-Platten pro Serum wurden die Proben von V18, MBB, V23-20758, V23-22683, V23-42713 und V23-47758 zunächst so verdünnt, dass alle eine normierte Viruslast von ca. 4×10^6 c/ml enthielten. Um dies zu erreichen, wurde zu den Proben eine entsprechende Menge des BMEM hinzugegeben. Es wurde gewährleistet, dass von jeder Probe ein Endvolumen von insgesamt 7,5 ml zur Weiterverarbeitung zur Verfügung stand. Die Viruslast der eingesetzten Suspension aus HAV-positivem Material und der Zellsuspension wurde mittels einer PCR-Testung bestimmt. Das eingesetzte Material aller verwendeten Virussuspensionen wies eine HAV-RNA-Konzentration zwischen $6,78 \times 10^5$ c/ml und $8,22 \times 10^5$ c/ml auf (siehe Tabelle 2 im Anhang).

Für die Anzucht des Virus wurden 100% konfluente Huh-7 mit dem Faktor 1:6 mit BMEM gesplittet. Ein Teil der Zellsuspension wurde mit dem Faktor 1:4 mit BMEM verdünnt und je 200 µl als Negativkontrolle in die 96-Well-Platte gegeben. Zu der restlichen Zellsuspension wurde anschließend HAV-positiver Zellkulturüberstand gegeben, der zuvor auf 4×10^6 HAV RNA c/ml normiert wurde. Die Suspension wurde resuspendiert und anschließend je 200 µl in die entsprechenden Wells der 96-Well-Platte entsprechend der Plattenbelegung in Abbildung 1 gegeben. Die Zellkulturplatten wurden im Brutschrank bei 34 °C und 5% CO₂ gelagert.

24 Stunden später wurden die zu untersuchenden Virostatika zu der Zellkultur gegeben. Hierfür wurde zunächst eine Verdünnungsreihe des jeweiligen Virostatikums hergestellt. Die Medikamentensuspension wurde auf Raumtemperatur gebracht, gevortext und abgefügt. Die Verdünnungsreihe wurde durch zwei Vorverdünnungsschritte, erst in DMSO und dann in BMEM, vorbereitet und auf die in Tabelle 8 gelisteten Verdünnungen eingestellt. Dabei betrug die DMSO-Konzentration 5%.

Zwischenverdünnung

4000 µM
2000 µM
1000 µM
500 µM
250 µM
125 µM
62,5 µM
31,25 µM
15,625 µM
7,8125 µM

Tabelle 8: Zwischenverdünnung der Virostatika Ribavirin und Sofosbuvir in µM. Die DMSO-Konzentration beträgt 5%.

Für die Zugabe des Medikaments wurde zunächst der Zellkulturüberstand der zwei 96-Well-Platten abgenommen. Anschließend wurde in jedes Well 190 µl frisches BMEM-Nährmedium gegeben und im darauffolgenden je 10 µl der jeweiligen Zwischenverdünnung des Medikaments. Somit ist die in Abbildung 1 aufgelistete Endver-

dünnung des Virostatikums (0,39 bis 200 μM) entstanden. Die DMSO-Endkonzentration belief sich auf 0,25%. Es wurde jede Verdünnung als technisches Triplikat erstellt, um eine Reproduzierbarkeit des Effekts innerhalb des Versuches zu gewährleisten.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,39	0,39	0,39		100	100	100		25	25	25	
B	0,78	0,78	0,78		200	200	200		50	50	50	
C	1,56	1,56	1,56		0,39	0,39	0,39		100	100	100	
D	3,13	3,13	3,13		0,78	0,78	0,78		200	200	200	
E	6,25	6,25	6,25		1,56	1,56	1,56		PK w/o D	PK w/o D	PK w/o D	
F	12,5	12,5	12,5		3,13	3,13	3,13		PK w/ D	PK w/ D	PK w/ D	
G	25	25	25		6,25	6,25	6,25		NK w/o D	NK w/o D	NK w/o D	
H	50	50	50		12,5	12,5	12,5		NK w/ D	NK w/ D	NK w/ D	

Abbildung 1: Belegung der TC-Platte 96 Well (Standard F) Platte. Angegeben ist hierbei die Verdünnung der Virostatika in μM . Die grün hinterlegten Felder beinhalten Ribavirin, die blau hinterlegten Felder Sofosbuvir. Die DMSO-Endkonzentration belief sich auf 0,25%. Die Wells E 9–11 und F 9–11 stellen die Positivkontrolle ohne Medikament dar (jeweils mit und ohne DMSO). Die Felder G 9–11 und H 9–11 stellen die Negativkontrolle ohne Virusmaterial dar (jeweils mit und ohne DMSO). Die Felder 4 A–H, 8 A–H und 12 A–H stellen Wells dar, in welchen PBSO enthalten ist. Diese Spalten dienen als Platzhalter.

Alle drei bis vier Tage wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und 190 μl frisches BMEM je Well auf die Zellen gegeben. Bei jedem Medienwechsel wurde die bereits beschriebene Medikamentenmenge zu dem Nährmedium hinzugegeben. Dies entsprach 10 μl des verdünnten Virostatikums je Well. Sieben Tage nach Inokulation wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und in eine neue 96-Well-Platte (Standard K) übertragen und für RT-qPCR Testung verwendet. In jedes Well wurde je 100 μl frisches BMEM-Nährmedium auf die Zellen gegeben. Die Nukleinsäureisolation sowie die RT-qPCR Testung fanden hier nach dem gleichen Protokoll wie zuvor beschrieben statt.

3.7 MTT-Viability-Assay nach Mosmann

Für die Testung der Zellviabilität wurde der MTT-Viability-Assay nach Mosmann im 96-Well-Format durchgeführt (54). Der Zellkulturüberstand wurde abgenommen und wie bereits beschrieben durch 100 μl frisches BMEM ersetzt. Für die MTT-Reaktion wurden 10 μl MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) in einer Konzentration von 5 mg/ml in jedes Well gegeben. Die 96-Well-Platte wurde für eine Stunde bei 34,5 °C und 5% CO_2 im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden pro Well je 100 μl des MTT-Lyse-Puffers zugegeben. Die Platte wurde bei Raumtemperatur

im Dunklen über Nacht gelagert. Die photometrische Messung erfolgte im SpectraMax ABS Plus microplate reader bei einer Wellenlänge von 595 nm.

4 Ergebnisse

4.1 Unterschiedliche Permissivitäten verschiedener Zelllinien mit schnellerer Infektion von bereits passagierten HAV-positiven Materialien im Vergleich zu den de-novo-Isolationen

Um die Permissivität verschiedener Zelllinien gegenüber unterschiedlichen HAV-Genotypen auf die de-novo-Infektion und Passagierung zu untersuchen, wurden acht verschiedene Zelllinien verwendet: A549 (ATCC ® CCL-185™), HepG2/C3A (ATCC ® CRL-3581™), PLC/PRF/5 (ATCC ® CRL-8024™), Huh-7, Huh-7-Lunet BLR, Vero (ATCC ® CCL-81™), MRC-5 (ATCC ® CCL-171™) und Caco-2 (ATCC ® HTB-37™). Diese wurden jeweils mit HAV-positiven Seren der Genotypen IA, IIIA und IB inokuliert. Neben verschiedenen Seren wurde für die Inokulation zusätzlich Zellkulturüberstand von den zellkulturadaptierten Virusstämmen V18 und MBB des Genotyps IB verwendet. Untersucht wurde jeweils die HAV-RNA-Konzentration im Zellkulturüberstand nach einem, vier, sieben, 14, 21 und 28 Tagen mittels RT-qPCR. Es wurden von jedem HAV-positivem Material technische Triplikate erstellt. Das arithmetische Mittel der ermittelten logarithmierten HAV-RNA-Konzentration pro Milliliter wurde berechnet und ist als jeweiliger Messpunkt graphisch dargestellt (siehe Abbildung 2). Der Standard Error of the Mean der Triplikate ist mittels Fehlerbalken visualisiert.

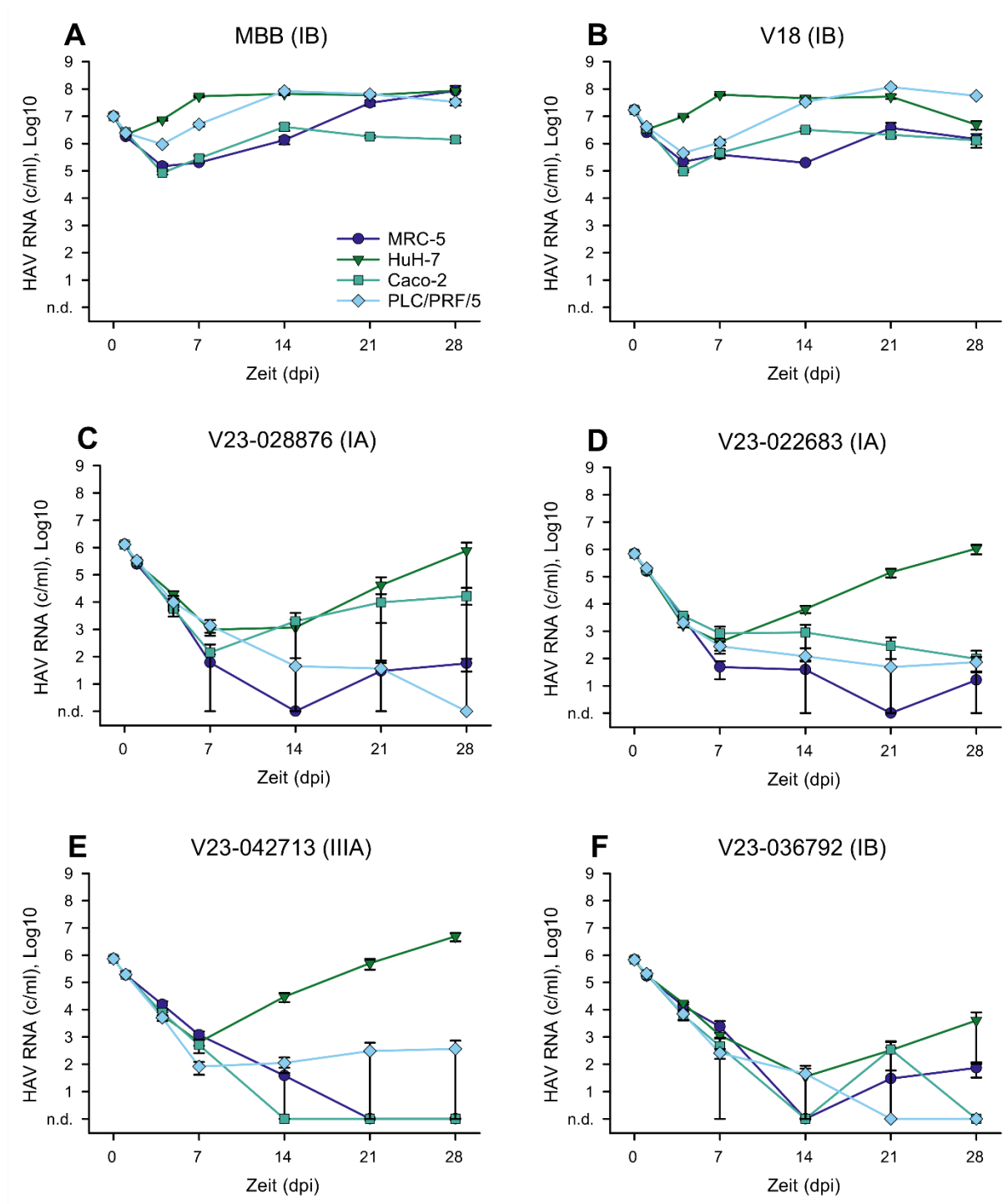


Abbildung 2: Inokulation der Zelllinien MRC-5, Huh-7, Caco-2 und PLC/PRF/5 mit nativem sowie bereits zellkulturadaptiertem HAV-positivem Material. Die Messung der HAV-RNA-Konzentration in Kopien pro Milliliter erfolgte an Tag 1, 4, 7, 14, 21 und 28 nach Inokulation der Zelllinien aus dem Überstand mittels PCR. Die Messpunkte stellen den Mittelwert der technischen Triplikate dar. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts dar. Die Zelllinien wurden mit dem **(A)** zellkulturadaptierten HAV-IB-Stamm MBB, **(B)** zellkulturadaptierten HAV-IB-Stamm V18, **(C)** HAV-IA-positiven Serum V23-028876, **(D)** HAV-IA-positiven Serum V23-022683, **(E)** HAV-IIIA-positiven Serum V23-042713 oder **(F)** HAV-IB-positiven Serum V23-036792 inokuliert.

In einem ersten Versuch wurden die Zelllinien MRC-5, Huh-7, Caco-2 und PLC/PRF/5 mit den HAV-positiven Zellkulturüberständen MBB und V18 (jeweils HAV-IB), sowie den Seren V23-028876, V23-022683 (jeweils HAV-IA), V23-042713 (HAV-IIIA) und V23-036792 (HAV-IB) inokuliert (siehe Abbildung 2).

Bei der Inokulation der Zellen mit Nativmaterial konnte ein deutlicher Abfall der Viruslast im Laufe der ersten sieben Tagen nach Inokulation bei allen Zelllinien festgestellt werden. Dieser war gefolgt von einem Anstieg der Viruslast, welcher am deutlichsten von allen Seren bei der Huh-7-Zelllinie ausgeprägt war. Bei den Seren V23-028876, V23-022683 und V23-042712 war der Anstieg bei der Huh-7-Zelllinie ab dem Tag sieben sichtbar, bei dem Serum V23-036792 war der Anstieg ab dem Tag 14 nach Inokulation ersichtlich.

Bei der Zelllinie PLC/PRF/5 war ab Tag sieben nach Inokulation eine Stagnation bis hin zu einem Abfall der HAV-RNA-Konzentration zu erkennen. Auch in den Zelllinien MRC-5 und Caco-2 zeichnete sich ein ähnlicher Trend wie in der Zelllinie PLC/PRF/5 ab. Hier waren vereinzelte Anstiege der HAV-RNA-Konzentration erkennbar, insgesamt lagen die Werte jedoch deutlich unter den bei der Zelllinie Huh-7 gemessenen Werten.

Die Infektion der Zelllinien mit den bereits passagierten HAV-IB-Isolaten V18 und MBB zeigten eine um ca. eine log-Stufe höhere Ausgangsviruslast als die Nativmaterialien. Ein leichter Abfall der HAV-RNA-Konzentration konnte bis zum Tag vier nach Inokulation gemessen werden. Anschließend stieg die Viruslast zurück auf das Ausgangsniveau, übertraf dieses oder bleibt leicht unter dem Ausgangsniveau. Insgesamt blieb die Viruslast recht konstant auf einem hohen Niveau (siehe Abbildung 2 A-B).

Bei der Abnahme des Zellkulturüberstands einen Tag nach Inokulation, konnte bei den Seren V23-028876 (HAV-IA) und V23-036792 (HAV-IB) eine Veränderung des Zellkulturüberstands in eine gallertartige Konsistenz festgestellt werden. Eine Verminderung der Konfluenz konnte mikroskopisch in den Wells mit diesen Seren bestätigt werden. Die Integrität des hierbei zu untersuchenden Zellrasens konnte somit nicht gewährleistet werden, weshalb keine definitiven Aussagen zu der quantitativen Virusproduktion getroffen werden konnten. Aus diesem Grund wurden weitere Seren derselben Genotypen identifiziert und inokuliert: V23-047758 (HAV-IA), V23-020758 (HAV-IB) und V23-036039 (HAV-IB). Die HAV-IB-positiven Seren wurden zusätzlich vorab 1:5

bzw. 1:10 vorverdünnt, um das Risiko eines potenziell toxischen Effekts vorab zu reduzieren. Als Positivkontrolle wurde der zellkulturadaptierte HAV-IB-Stamm V18 verwendet. Die graphische Darstellung findet sich in Abbildung 3.

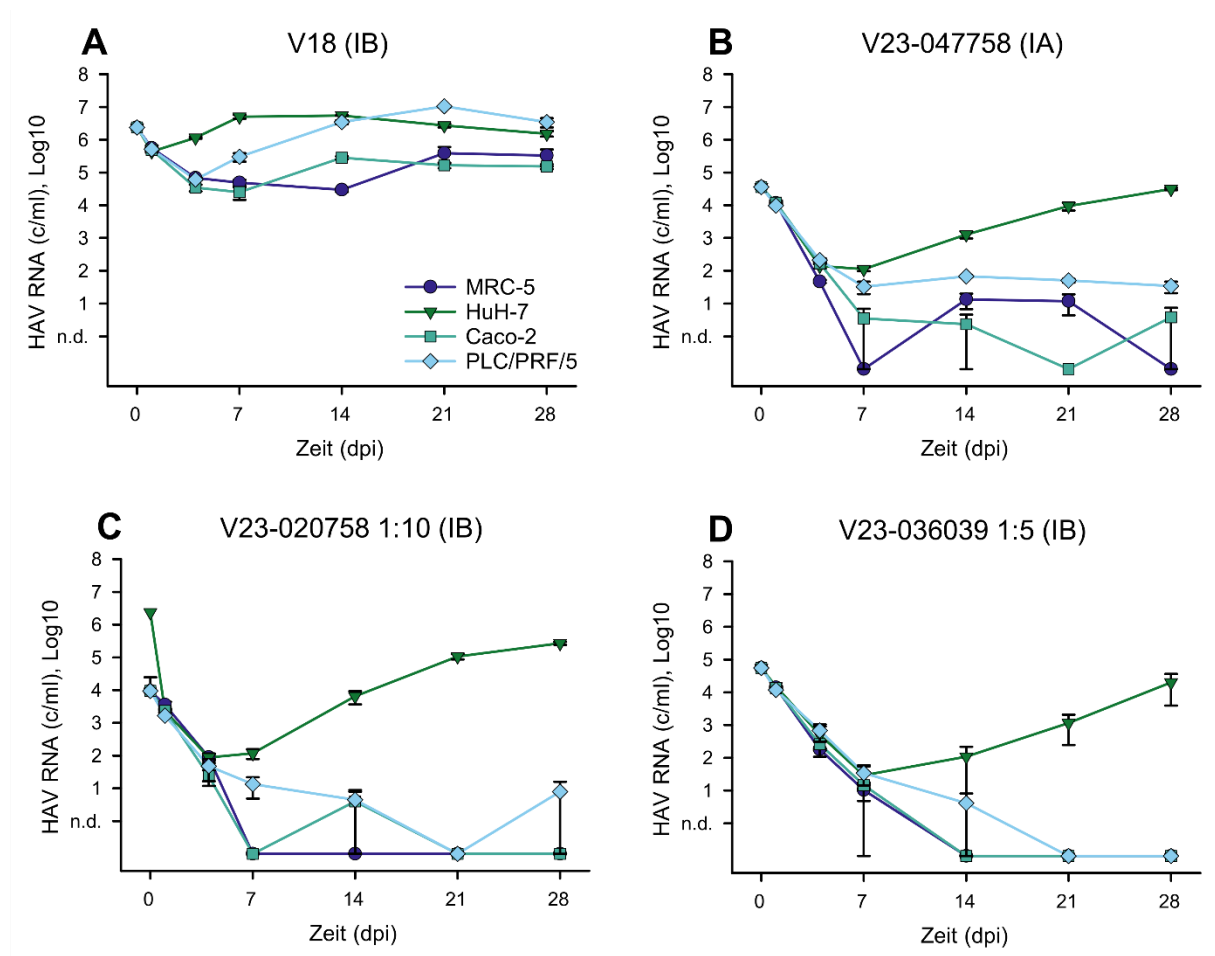


Abbildung 3: Inokulation der Zelllinien MRC-5, Huh-7, Caco-2 und PLC/PRF/5 mit nativem sowie bereits zellkulturadaptiertem HAV-positivem Material. Die Messung der HAV-RNA-Konzentration in Kopien pro Milliliter erfolgte an Tag 1, 4, 7, 14, 21 und 28 nach Inokulation der Zelllinien aus dem Überstand mittels PCR. Die Messpunkte stellen den Mittelwert der technischen Triplikate dar. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts dar. Die Zelllinien wurden mit dem **(A)** zellkulturadaptierten HAV-IB-Stamm V18, **(B)** HAV-IA-positivem Serum V23-047758, **(C)** HAV-IB-positivem Serum V23-020758 (Verdünnung 1:10) oder, **(D)** HAV-IB-positivem Serum V23-036039 (Verdünnung 1:5) inokuliert

Hier lässt sich ein ähnlicher Trend wie bei dem ersten Isolationsexperiment beobachten. Die Viruslast des HAV-adaptierten-Stamms fiel zunächst leicht ab, gefolgt war der Trend von einem Anstieg bzw. einer Stagnation. Eine Annäherung an eine maximale HAV-RNA-Konzentration konnte bei allen untersuchten Zelllinien früher festgestellt werden als bei der Infektion der Zelllinien mit nativem Probenmaterial (siehe Abbildung 3 A).

Bei den de-novo-Isolationen zeigte sich ein Abfall der HAV-Konzentration bis zum Tag sieben nach Inokulation (siehe Abbildung 3 B–D). Die Zelllinie Huh-7 zeigte anschließend einen deutlichen Anstieg der HAV-Konzentration, während es bei den anderen untersuchten Zelllinien zu einer Stagnation, einem Abfall oder nur einem sehr marginalen Anstieg kam (siehe Abbildung 3 A–D).

Auch in diesem Versuch kam es zu einer gallertartigen Veränderung des Zellkulturüberstands bei den Ansätzen, die mit dem HAV-IB-positivem Serum V23-036039 inokuliert wurden. Daher wurden die weiteren vier Zelllinien A549, Huh-7-Lunet BLR, HepG2/C3A und Vero ausschließlich mit den Seren inokuliert, die nicht zu gallertartigen Veränderungen des Zellkulturüberstands führten: V23-022683 (HAV-IA), V23-042713 (HAV-IIIA), V23-047758 (HAV-IA) und V23-020758 (HAV-IB), siehe Abbildung 4.

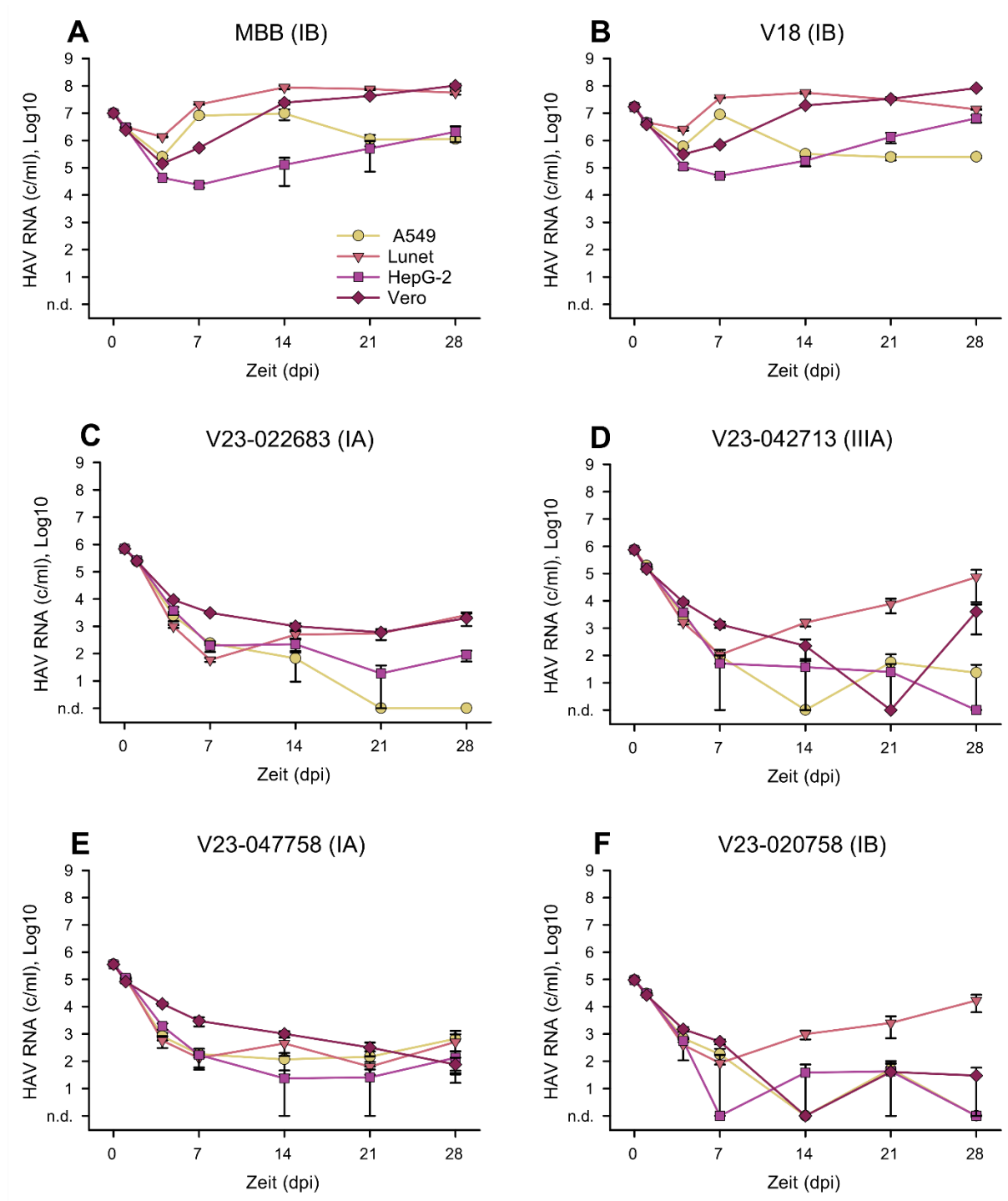


Abbildung 4: Inokulation der Zelllinien A549, Huh-7-Lunet BLR, HepG2/C3A und Vero mit nativem sowie bereits zellkulturadaptiertem HAV-positivem Material. Die Messung der HAV-RNA-Konzentration in Kopien pro Milliliter erfolgte an Tag 1, 4, 7, 14, 21 und 28 nach Inokulation der Zelllinien aus dem Überstand mittels PCR. Die Messpunkte stellen den Mittelwert der technischen Triplikate dar. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts dar. Die Zelllinien wurden mit dem **(A)** zellkulturadaptierten HAV-IB-Stamm MBB, **(B)**, zellkulturadaptierten HAV-IB-Stamm V18, **(C)** HAV-IA-positiven Serum V23-022683, **(D)** HAV-IIIA-positiven Serum V23-042713, **(E)** HAV-IA-positiven Serum V23-047758 oder **(F)** HAV-IB-positiven Serum V23-020758 inokuliert.

Bei den bereits passagierten HAV-Stämmen ließ sich auch bei den Zelllinien A549, Huh-7-Lunet BLR, HepG2/C3A und Vero ein leichter Abfall der HAV-RNA-Konzentration feststellen gefolgt von einem Anstieg und einem sich anschließenden konstanten Niveau der HAV-RNA-Konzentration. Lediglich bei der A549-Zelllinie setzte sich der Trend des generellen leichten Abfalls ab Tag sieben fort. In dem Überstand der Vero und Huh-7-Lunet BLR Zellen wurden im Vergleich zu den HepG2/C3A und A549 Zellen insgesamt höhere RNA-Konzentrationen erreicht (siehe Abbildung 4 A-B).

Bei den de-novo-Isolationen zeigte sich ein deutlicher Abfall der HAV-RNA-Konzentration in allen Zelllinien. Ein deutlicher konstanter Anstieg der HAV-RNA-Konzentration konnte hier nur bei dem Serum V23-042713 (HAV-IIIa) und dem Serum V23-020758 (HAV-IA) bei Inokulation der Huh-7-Lunet BLR Zellen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 4 C-F). Bei den anderen getesteten Seren und Zelllinien zeigte sich im generellen Trend ein Abfall der HAV-RNA-Konzentration. Vereinzelt kam es zu einer Stagnation oder einem leichten Anstieg (siehe Abbildung 4 C-F). Allgemein wurden hier niedrigere HAV-RNA-Konzentrationen erreicht als bei der Inokulation von HAV auf Huh-7-Zellen (siehe Abbildung 5). Abbildung 5 zeigt eine zusammengefasste Darstellung der drei zuvor durchgeführten Experimente. Hierbei wird die HAV-RNA-Konzentration der bereits mehrfach passagierten Stämmen V18 und MBB mit allen de-novo-Isolationen verglichen. Die Darstellung ist hierbei unterteilt nach den unterschiedlichen Zelllinien, um einen Gesamtüberblick über den Erfolg der Inokulation aller Seren auf verschiedene Zelllinien zu erhalten. Es wurden nur de-novo-Isolationen verwendet, bei welchen es im Verlauf zu keiner gallertartigen Veränderung im Versuchsaufbau kam. Die Infektion von verschiedenen Zelllinien mit bereits passagierten HAV-Stämmen MBB und V18 war in diesem Fall bei allen Zelllinien erfolgreich. Es konnte schneller eine hohe Viruslast erreicht werden als bei den de-novo-Isolationen (siehe Abbildung 5 A).

Die de-novo-Isolationen führten bei Inokulation der Huh-7-Zellen bei allen verwendeten Genotypen zu dem schnellsten Anstieg der HAV-RNA-Konzentration. Auch quantitativ konnten unter Verwendung der Huh-7-Zelllinie die höchsten Viruslasten erzielt werden (siehe Abbildung 5 B). Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurden die darauffolgenden Versuch unter Verwendung der Huh-7-Zelllinie durchgeführt.

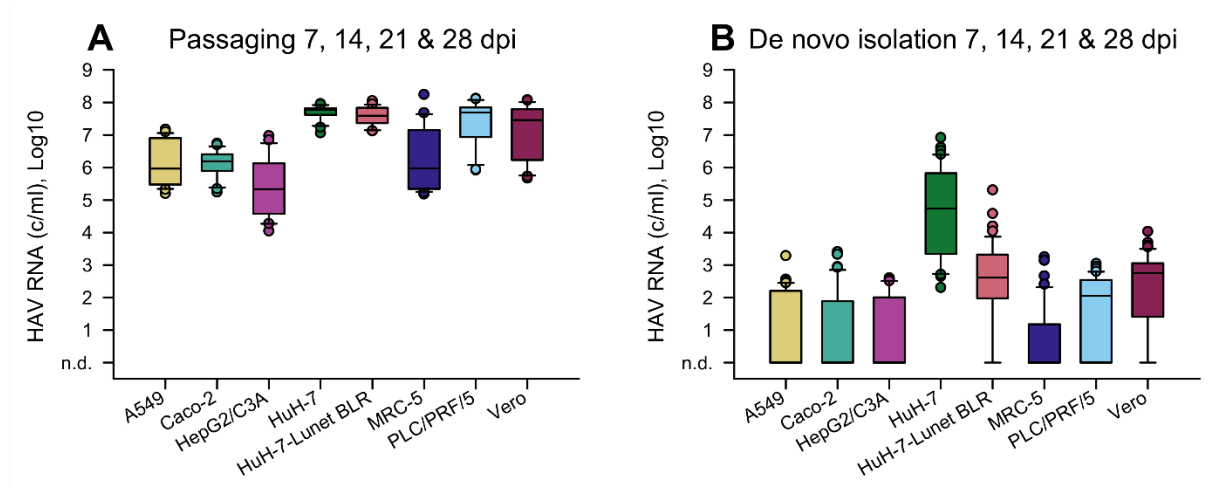


Abbildung 5: Die Box-Plots zeigen die zentrale Tendenz und Streuung der HAV-RNA in Kopien pro Milliliter aller verwendeten HAV-Stämme bezogen auf die untersuchten Zelllinien. Die Box zeigt hierbei die Spanne zwischen dem ersten Quartil (25%) und dem dritten Quartil (75%) der Werte an. Sie enthält somit 50% aller Daten. Die Whisker reichen bis zum kleinsten und größten Wert, der kein Extremwert darstellt. Ausreißende Werte sind als Punkte dargestellt. Die Linie in der Box markiert den Medianwert. **(A)** Darstellung der HAV-RNA-Konzentration der bereits passagierten Stämme V18 und MBB bezogen auf die Zelllinien A549, Caco-2, HepG2/C3A, Huh-7, Huh-7-Lunet BLR, MRC-5, PLC/PRF/5 und Vero **(B)** Darstellung der HAV-RNA-Konzentration der mit den Seren V23-022683, V23-042713, V23-047758 und V23-020758 bezogen auf die Zelllinien A549, Caco-2, HepG2/C3A, Huh-7, Huh-7-Lunet BLR, MRC-5, PLC/PRF/5 und Vero

Um genug Ausgangsmaterial für die in-vitro Medikamententestung zur Verfügung zu haben, wurde eine Passagierung des im Rahmen des Isolationsversuchs gesammelten Zellkulturüberstand wie bereits beschrieben in eine T12,5 Flasche durchgeführt. Hierbei konnte festgestellt werden, dass an Tag 7 nach der Inokulation ein leicht ausgeprägter zytopathischer Effekt (CPE) in den Positivkontrollen MBB und V18 (beide HAV-IB), sowie in der Zellkulturflasche mit dem Inokulat der Serumprobe V23-47758 (HAV-IA) mikroskopisch feststellbar war. Der CPE war durch ein Abkugeln der Zellen sowie deren Ablösung aus dem Zellverband charakterisiert. Im Rahmen des Medienwechsels wurde der Zellkulturüberstand von Tag 21 und 28 gepoolt gesammelt. Die HAV-RNA-Konzentration wurde mittel RT-qPCR bestimmt. Tabelle 9 zeigt die jeweils ermittelte Viruslast.

Probe	HAV-RNA (c/ml)	Genotyp
negativ Kontrolle	n.d.	-
MBB	$2,50 \times 10^8$	IB
V18	$3,83 \times 10^7$	IB
V23-20758	$1,68 \times 10^7$	IB
V23-22683	$4,67 \times 10^6$	IA
V23-42713	$2,82 \times 10^7$	IIIA
V23-47758	$2,36 \times 10^7$	IA

Tabelle.9: Viruslast in c/ml und Genotyp des sterilfiltrierten Pools des Zellkulturüberstands von Tag 21 und Tag 28 nach Inokulation von Huh-7-Zellen mit dem im vorherigen Versuch gesammelten Zellkulturüberstand

4.2 Nachweis eines ausbleibenden zytotoxischen Effekts von DMSO in niedrigeren Konzentrationen von 0,25% auf die HAV-RNA-Konzentration

In diesem Teil des Versuchs wurde der antivirale Effekt der Virostatika Ribavirin und Sofosbuvir auf die verschiedenen zuvor isolierten HAV-Stämme getestet. Die Anzucht des Virus erfolgte auf Basis der zuvor beschriebenen Ergebnisse unter Verwendung der Huh-7-Zelllinie auf Zellkulturplatten im 96-Well-Format. Der Zellkulturüberstand wurde an den Tagen 7 und 14 nach Inokulation der Zellen abgenommen und die HAV-RNA-Konzentration mittels RT-qPCR bestimmt. Um die Zellviabilität zu bestimmen, wurde zu den gleichen Messzeitpunkten der MTT-Test nach Mosmann (54) durchgeführt.

Als Lösungsmittel für die beiden Medikamente wurde wie bereits beschrieben DMSO verwendet. DMSO hat einen nachgewiesenen zytotoxischen Effekt. Ziel war es, die DMSO-Konzentration so gering wie möglich zu halten, damit mögliche negativen Auswirkungen auf die Zellkulturen und somit die HAV-Replikation minimiert werden. Die Endkonzentration lag bei 0,25% DMSO. Der Versuchsaufbau beinhaltete Negativkontrollen mit und ohne der Zugabe von 0,25% DMSO sowie Positivkontrollen mit dem entsprechenden Virus mit und ohne Verwendung von 0,25% DMSO. Sowohl die Positiv- als auch die Negativkontrolle wurden nicht mit den zu untersuchenden Virostatika behandelt.

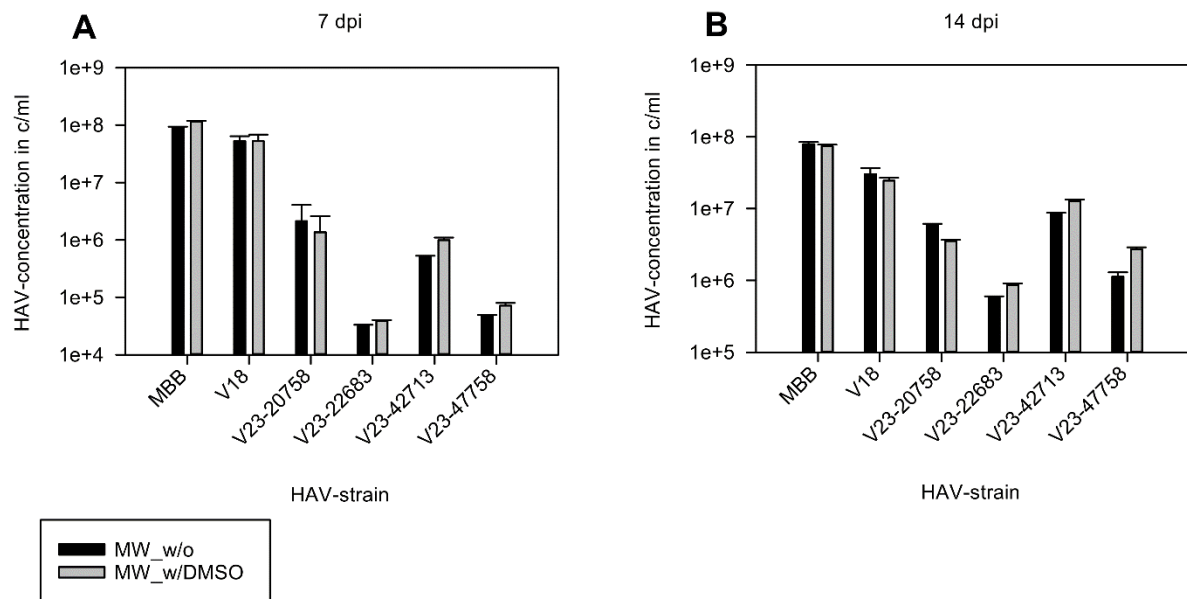


Abbildung 6: Vergleich der HAV-Konzentration in c/ml jeweils mit und ohne 0,25% DMSO-Behandlung an Tag 7 und 14 nach Inokulation

Abbildung 6 stellt die HAV-Konzentration der verschiedenen Virusstämme an Tag 7 und Tag 14 nach Inokulation dar. Der Mittelwert der HAV-RNA-Konzentration von drei technischen Replikaten der Positivkontrollen jeweils mit und ohne DMSO wurde ermittelt und graphisch dargestellt. Es zeigt sich hierbei, dass eine Konzentration von 0,25% DMSO keine Auswirkung auf die HAV-RNA-Konzentration hat (siehe Abbildung 6).

Bei der mittels MTT-Assay ermittelten Zellviabilität konnte an Tag sieben zunächst keine Differenz bezüglich der mit DMSO behandelten Wells und der ohne DMSO behandelten Wells nachgewiesen werden (Abbildung 7). Die Messung nach 14 Tagen zeigte jedoch bei allen Virusstämmen eine leichte Verminderung der Zellviabilität der mit DMSO behandelten Zellen. Zu beachten ist bei dieser Darstellung, dass eine Verminderung der Zellviabilität der bereits zellkulturadaptierten Stämme V18 und MBB auch aufgrund eines mikroskopisch sichtbaren zytopathischen Effekts (CPE) zustande gekommen sein könnte. Bereits hier wird deutlich, dass der V18-Stamm einen stärkeren CPE verursacht als der MBB-Stamm (Abbildung 7). In diesen Fällen kann somit keine Beurteilung eines negativen Effekts des DMSO in den mit den Virusstämmen infizierten Wells stattfinden. Ein negativer Effekt durch die DMSO-Konzentration von 0,25% kann nicht vollständig ausgeschlossen werden. Quantitative Effekte bezüglich der HAV-RNA-Konzentration konnten aber nicht nachgewiesen werden.

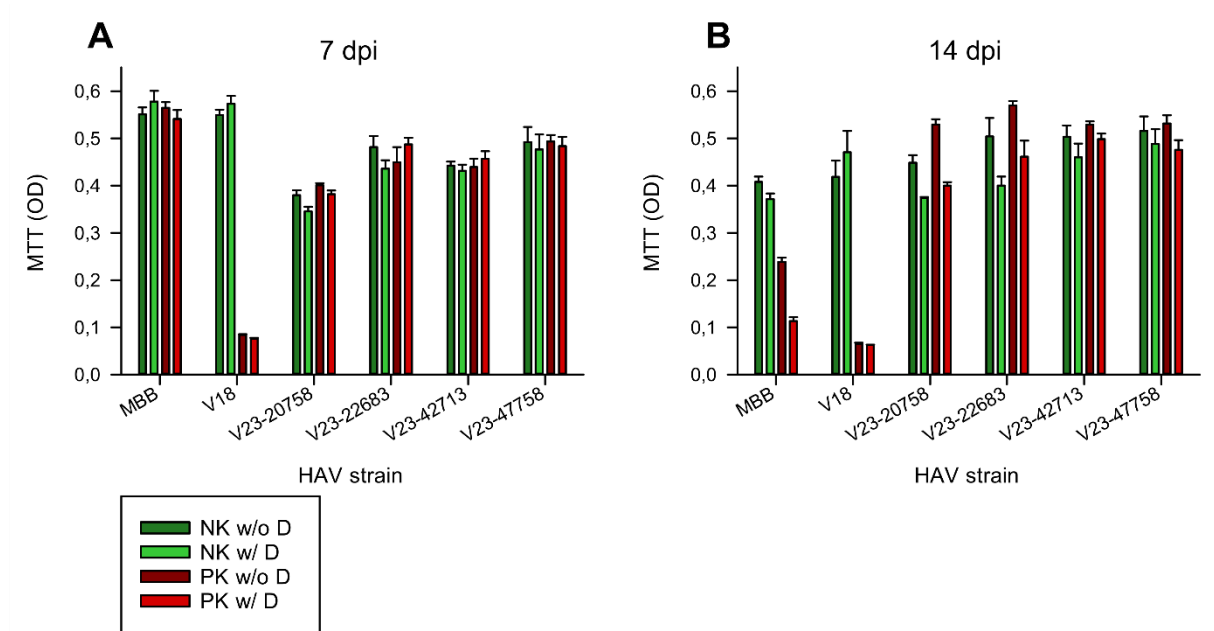


Abbildung 7: Auswirkung der 0,25% DMSO-Behandlung anhand des Zellviabilitätstests nach Mosmann an Tag 7 und 14. Angegeben ist die optische Dichte (Extinktion), gemessen bei der Wellenlänge 595 nm.

4.3 Spezifische Medikamentenkonzentrationen vermindern die relative HAV-Replikation bei weitestgehend erhaltener Zellviabilität

Untersucht wurden verschiedenen Konzentrationen der Virostatika Ribavirin und Sofosbuvir in einer 1:2 Verdünnungsreihe aufsteigend von 0,39 μM bis hin zu 200 μM . Abbildung 8 zeigt die relative logarithmische HAV-Konzentration an 7 und 14 dpi in Prozent bezogen auf die Positivkontrolle mit 0,25% DMSO. Ebenso ist die prozentuale Zellviabilität bezogen auf die Positivkontrolle abgebildet, um eine Aussage bezüglich der Zytotoxizität der Virostatika treffen zu können. Abgebildet sind die bereits zellkultadaptierten Stämme MBB und V18 des Genotyps IB sowie die de-novo-Isolationen V23-20758 (HAV-IB), V23-22683 (HAV-IA), V23-42713 (HAV-IIIA) und V23-47758 (HAV-IA).

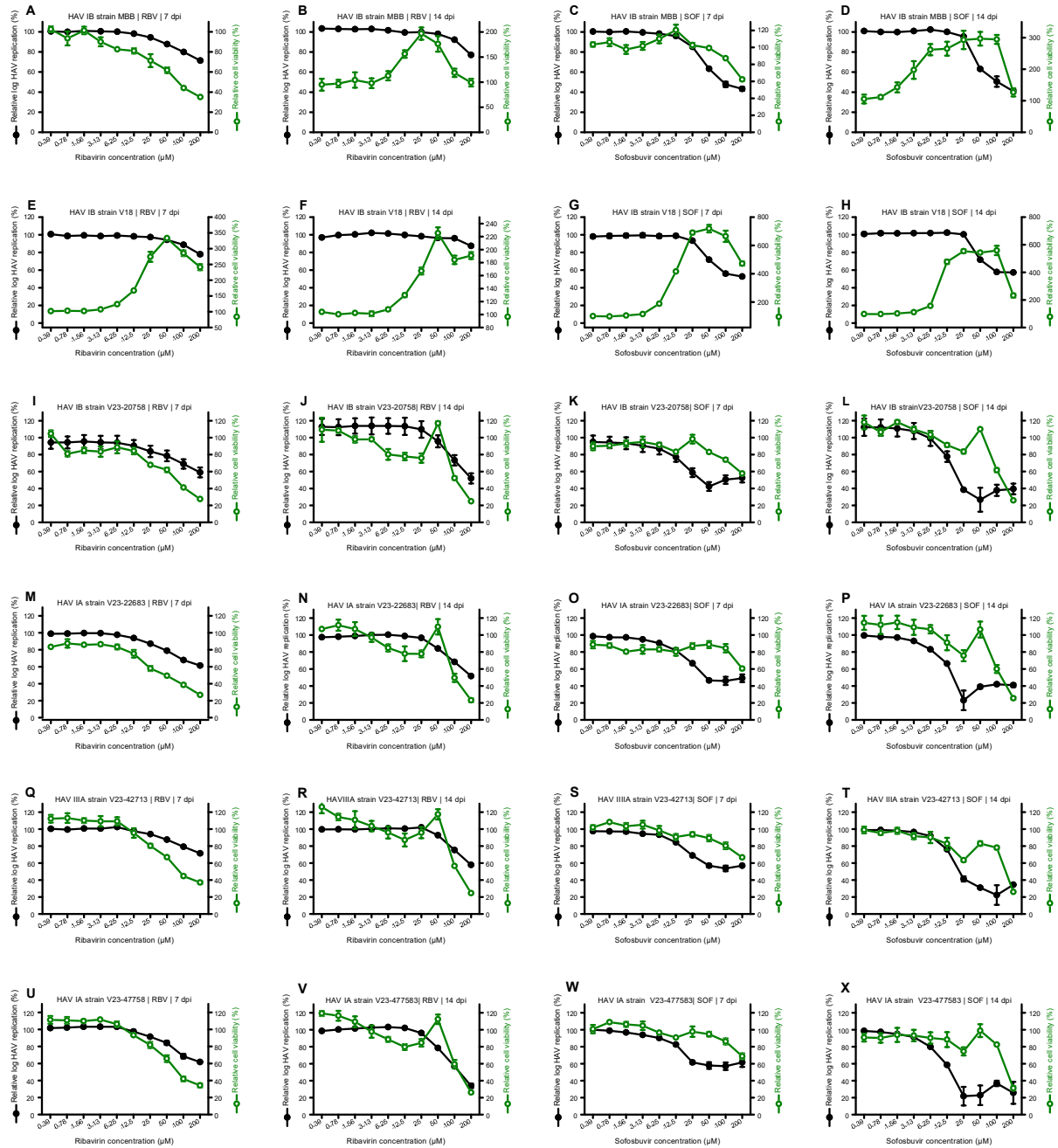


Abbildung 8: Relative logarithmische HAV-Replikation der HAV-positiven Materialien in Prozent unter Einfluss von verschiedenen Konzentrationen von Ribavirin und Sofosbuvir bezogen auf die mit 0,25% DMSO behandelte Positivkontrolle ohne den Einfluss von Virostatikum (schwarze Kurve) in Huh-7 Zellen. In Bezug zu setzen mit der relativen Zellviabilität in Prozent unter Einfluss von verschiedenen Virostatika, bezogen auf die mit 0,25% DMSO behandelte Positivkontrolle (grüne Kurve). Als Messpunkt ist hier jeweils der Mittelwert der drei Messungen der Triplikate gekennzeichnet. Die Fehlerbalken zeigen jeweils den Standardfehler des Mittelwerts an. Die Analysen erfolgten nach 7 und nach 14 Tagen nach Inokulation (**A–D**) Messung der HAV-Replikation des HAV Stamm MBB (HAV-IB) sowie die Prozentuale Zellviabilität (**E–H**) Messung der HAV-Replikation des HAV-Stamms V18 (HAV-IB) sowie die prozentuale Zellviabilität (**I–L**) Messung der HAV-Replikation des HAV Stamm V23-20758 (HAV-IB) sowie die prozentuale Zellviabilität (**M–P**) Messung der HAV-Replikation des HAV-Stamms V23-22683 (HAV-IA) sowie die prozentuale Zellviabilität (**Q–T**) Messung der HAV-Replikation des HAV-Stamms V23-42713 (HAV-IIIA) sowie die prozentuale Zellviabilität (**U–X**) Messung

der HAV-Replikation des HAV-Stamms V23-47758 (HAV-IA) sowie die Prozentuale Zellviabilität

Da bei den zellkulturadaptierten Stämmen V18 und MBB ein CPE mikroskopisch beobachtet werden konnte, erlaubt der MTT-Assay keine eindeutige Aussage bezüglich der potenziellen Zelltoxizität von Ribavirin und Sofosbuvir. Die Ergebnisse der zellkulturadaptierten Stämme werden in einem gesonderten Abschnitt dieser Arbeit diskutiert (siehe Abbildung 8 A–H).

Sieben Tage nach Inokulation zeigte die Analyse der mit Ribavirin behandelten Wells, dass bei niedrigen Konzentrationen des Medikaments zunächst keine signifikante Reduktion der HAV-Replikation nachweisbar war. Erst ab einer Ribavirin-Konzentration von etwa 12,5 μM war ein kontinuierlicher Rückgang der HAV-Replikation zu beobachten. Die relative Zellviabilität blieb bis zu einer Konzentration von 6,25 μM weitgehend stabil und nahm anschließend sukzessive ab, wobei sie auf ein Niveau von etwa 20–40 % sank (siehe Abbildung 8 I, M, Q, U)

Die Messung nach 14 Tagen zeigte einen ähnlichen Trend. Bei niedrigeren Konzentrationen des Medikaments konnte keine signifikante Reduktion der relativen logarithmischen HAV-Replikation nachgewiesen werden. Ein deutlich ausgeprägter kontinuierlicher Rückgang der HAV-Replikation wurde ab einer Konzentration von 25 bzw. 50 μM beobachtet. Die relative Zellviabilität sank zunächst kontinuierlich bis zu einer Medikamentenkonzentration von ca. 12,5 bzw. 25 μM auf ein Niveau von ca. 70–80%. Überraschenderweise zeigte sich bei einer Konzentration von 50 μM über alle untersuchten Genotypen hinweg ein deutlicher Anstieg der relativen Zellviabilität auf Werte über 100 %. Dieser Effekt wurde jedoch durch einen signifikanten Rückgang der Zellviabilität auf etwa 20–40 % bei höheren Virostatika-Konzentrationen abgelöst (siehe Abbildung J, N, R, V).

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Ribavirin einen virostatischen Effekt auf alle getesteten HAV-Genotypen hat. Es zeigte sich zunächst keine unterschiedliche Empfindlichkeit der verschiedenen HAV-Genotypen gegenüber Ribavirin. Da bei besonders hohen Medikamentenkonzentrationen eine niedrige Zellviabilität ermittelt werden konnte, lässt dies vermuten, dass Ribavirin in hohen Konzentrationen zytotoxisch wirkt. Auffällig ist hierbei jedoch die überraschend hohe Zellviabilität bei einer Ribavirin

Konzentration von 50 μM . Hierbei ist zu beachten, dass es sich bei diesen Ansätzen um Rand-Wells der 96-Well-Platte handelte.

Die Analyse der mit Sofosbuvir behandelten Wells zeigte nach sieben Tagen Inokulation einen kontinuierlichen Rückgang der relativen logarithmischen HAV-Replikation bei einer Sofosbuvir-Konzentration von 6,25 μM bzw. 12,5 μM bis zu einer Sofosbuvir-Konzentration von ca. 50 μM . Anschließend stagnierte das Niveau der relativen logarithmischen HAV-Replikation bei einem Niveau von ca. 40–60%. Beim HAV-Stamm V23-20758 des Genotyps IB konnte überraschenderweise eine leichte Zunahme der relativen logarithmischen HAV-Replikation bei Sofosbuvir-Konzentrationen von 100 bzw. 200 μM festgestellt werden (siehe Abbildung 8K). Die relative Zellviabilität verzeichnete zunächst einen sehr leichten Abfall bis zu einer Medikamentenkonzentration von 12,5 μM . Anschließend war ein leichter Anstieg bei 25 μM bzw. 50 μM zu beobachten, gefolgt von einem erneuten Abfall auf ein Niveau von ca. 60% bei Sofosbuvir-Konzentrationen von 200 μM (siehe Abbildung 8 K, O, S, W).

Die Messung nach 14 Tagen zeigte auch hier einen ähnlichen Trend. Bei Konzentrationen des Medikaments von 6,25 μM bis zu Konzentrationen von 25 μM bzw. 50 μM kam es zu einer kontinuierlichen Reduktion der relativen logarithmischen HAV-Replikation bis auf ein Niveau von ca. 20–30 %. Bei Analyse des HAV-Stamm V23-42713 (HAV-IIIA) konnte dieser Trend sogar bis zu einer Sofosbuvir Konzentration von 100 μM nachgewiesen werden (siehe Abbildung 8T). Gefolgt wurde der Trend von einem Anstieg auf ein Niveau von ca. 40%. Eine Ausnahme stellte hierbei der HAV-IA-Stamm V23-477583 dar (siehe Abbildung 8X). Die relative Zellviabilität sank zunächst kontinuierlich bis zu einer Medikamentenkonzentration von 25 μM auf ein Niveau von ca. 60–80%. Überraschenderweise zeigte sich auch hier bei einer Konzentration von 50 μM über alle untersuchten Genotypen hinweg ein deutlicher Anstieg der relativen Zellviabilität. Bei den Stämmen V23-20758 (HAV-IB) und V23-22683 (HAV-IA) folgte diesem Trend ein deutlicher Abfall der Zellviabilität auf ein Niveau von 20-40% bei einer Sofosbuvir-Konzentration von 200 μM (siehe Abbildung 8, L und P). Bei den Stämmen V23-42713 (HAV-IIIA) und V23-477583 (HAV-IA) war die Reduktion der relativen Zellviabilität bei einer Konzentration von 100 μM zunächst moderat bei ca. 80%.

Bei einer Sofosbuvir Konzentration von 200 μM sank das Niveau der Zellviabilität dann auf ca. 20–30% (siehe Abbildung 8 L, P, T, X)

Die Tatsache, dass auch hier bei Sofosbuvir-Konzentrationen von 50 μM bzw. 100 μM eine gesteigerte Zellviabilität trotz einer verminderten relativen logarithmischen HAV-Konzentration zu beobachten war, spricht gegen die Hypothese, dass die Lage in einem Randwell ursächlich war (siehe Abbildung 1). Im Allgemeinen lässt sich ein virostatistischer Effekt von Sofosbuvir vermuten, welcher ausgeprägter ist als bei Ribavirin, da es hierbei zu einer stärkeren Reduktion der relativen logarithmischen HAV-Konzentration kam. Eine unterschiedliche Empfänglichkeit der verschiedenen Subtypen ließ sich anhand dieser Datenauswertung zunächst nicht erkennen.

4.4 Zytopathischer Effekt der bereits mehrfach in der Zellkultur passagierten HAV-Stämme

Bei Untersuchung der bereits zellkulturadaptierten HAV-Stämme V18 und MBB des Genotyps IB konnte ein CPE festgestellt werden. Mikroskopisch zeigte sich eine veränderte Morphologie der Zellen. Diese stellte sich vor allem durch ein Abkugeln der Zellen sowie deren Ablösung aus dem Zellverband dar. Auch eine deutlich verminderte Konfluenz der Zellen konnte beobachtet werden. Die Einschätzung der Konfluenz stellt einen subjektiven, mittels Mikroskop festgestellten Wert dar und ist in Abbildung 9 und 10 dargestellt.

Sieben Tage nach Inokulation konnten bei dem MBB-Stamm bei Verwendung von Ribavirin- und Sofosbuvir-Konzentrationen von 0,39 bis 12,5 μM bzw. 6,23 μM ein deutlicher CPE hier noch ohne Verminderung der Konfluenz festgestellt werden. Ab einer Medikamentenkonzentration von 25 μM und höher konnte mikroskopisch bei der Behandlung mit beiden Virostatika kein CPE nachgewiesen werden. Eine Verminderung der Konfluenz war in den Wells mit einer Ribavirin- bzw. Sofosbuvir-Konzentration von 100 μM bzw. 200 μM sichtbar (siehe Abbildung 9, A, C).

In der Analyse des MBB-Stamms nach 14 Tagen konnte der CPE erneut beobachtet werden. Hier war eine morphologische Veränderung der Zellen bis zu Ribavirin-Konzentrationen von 25 μM zu beobachten, welche nun in diesem Konzentrationsbereich auch mit einer Verminderung der Konfluenz auf ca. 50-80% einher ging. Bei Ribavirin-

Konzentrationen von 100 μM bzw. 200 μM fiel die Konfluenz auf ein Niveau von 20-40% (siehe Abbildung 9, B). Bei Behandlung der Wells mit Sofosbuvir war der CPE bis zu einer Sofosbuvir-Konzentration von 3,13 μM erkennbar. Die Konfluenz lag in diesem Konzentrationsbereich bei einem Niveau von 80-90%, anschließend stieg sie bis zu einer Sofosbuvir-Konzentration von 50 μM auf 100% und fiel dann bei 100 μM bzw. 200 μM wieder ab (siehe Abbildung 9 D).

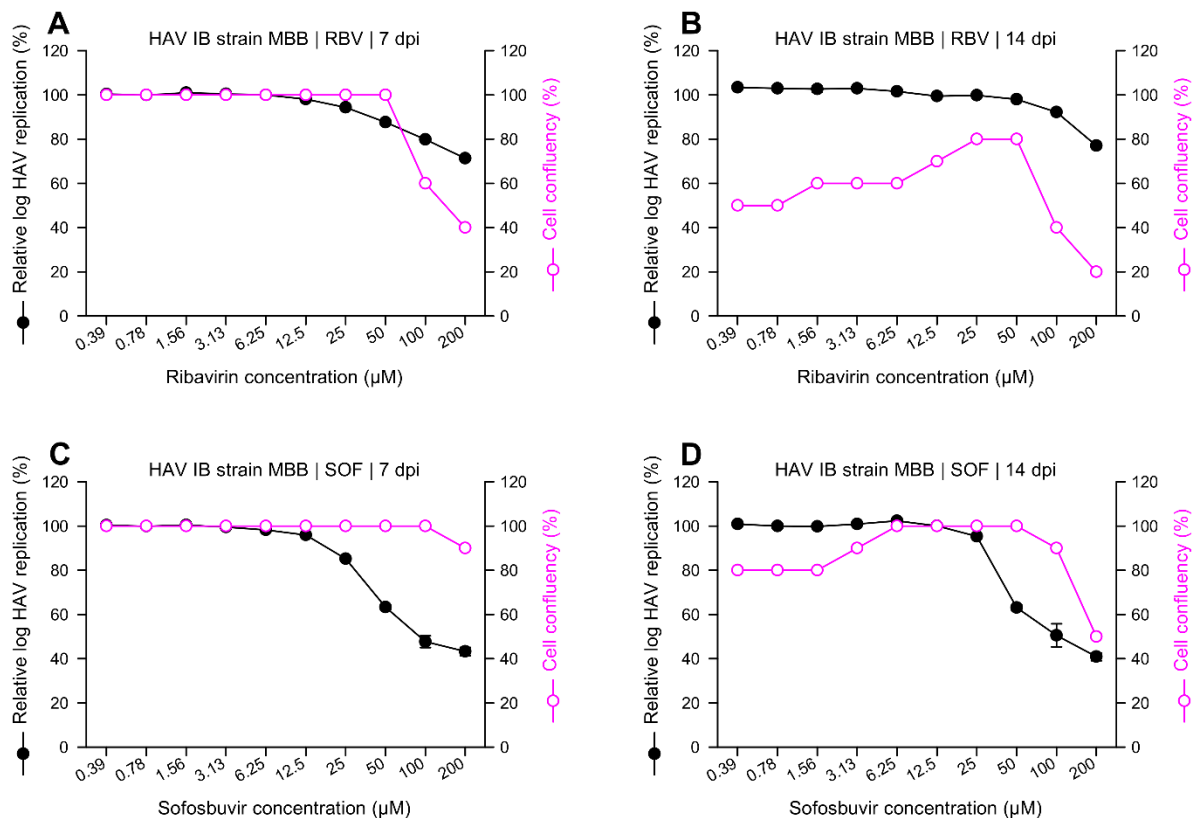


Abbildung 9: Relative logarithmische Replikation des HAV-IB-Isolats MBB sowie relative Zellkonfluenz in Prozent unter Einfluss von verschiedenen Konzentrationen von Ribavirin und Sofosbuvir bezogen auf die Positivkontrolle (ohne Einfluss von Virostatika, mit 0,25% DMSO). **(A)** Messung 7 Tage nach Inokulation der Huh-7-Zellen unter Verwendung von Ribavirin **(B)** Messung 14 Tage nach Inokulation der Huh-7-Zellen unter Verwendung von Ribavirin **(C)** Messung 7 Tage nach Inokulation der Huh-7-Zellen unter Verwendung von Sofosbuvir **(D)** Messung 14 Tage nach Inokulation der Huh-7-Zellen unter Verwendung von Sofosbuvir.

Bei Untersuchung des V18-Stammes wurden ähnliche Ergebnisse festgestellt. Hier fiel der CPE insgesamt deutlich stärker aus. Dies konnte auch anhand der deutlich reduzierten optischen Dichte im Rahmen der Zellviabilitätsmessung festgestellt werden

(siehe Abbildung 7). Bereits bei der Analyse nach 7 Tagen konnte eine deutliche Verringerung der optischen Dichte festgestellt werden, während diese bei dem MBB-Stamm erst in der Analyse nach 14 Tagen sichtbar wurde (siehe Abbildung 7).

Der CPE war bei Analyse des V18-Stamms nach 7 Tagen bis zu einer Ribavirin-Konzentration von 25 μM bzw. einer Sofosbuvir-Konzentration von 12,5 μM sichtbar. Eine Verringerung der Konfluenz war nur bei Virostatika-Konzentrationen von 100 μM bzw. 200 μM sichtbar (siehe Abbildung 10 A, C).

Die Analyse nach 14 Tagen zeigte einen CPE bei Ribavirin bis zu einer Konzentration von 50 μM sowie bei Sofosbuvir bis zu einer Konzentration von 6,25 μM . Nach 14 Tagen konnte bereits bei den niedrigsten Virostatika-Konzentrationen von 0,39 μM bis 3,13 μM eine deutliche Reduktion der Konfluenz festgestellt werden. Auffällig war hier, dass bei Konzentrationen der Medikamente von ca. 6,25 μM bis 100 μM eine Erhöhung der Konfluenz festgestellt werden konnte. Diese war bei den mit Sofosbuvir behandelten Wells stärker ausgeprägt als bei den mit Ribavirin behandelten Wells (siehe Abbildung 10 B, D). Bei den maximal in diesem Versuch verwendeten Medikamentenkonzentrationen von 100 μM und 200 μM konnte erneut eine deutliche Verringerung der Integrität des Zellrasens dokumentiert werden.

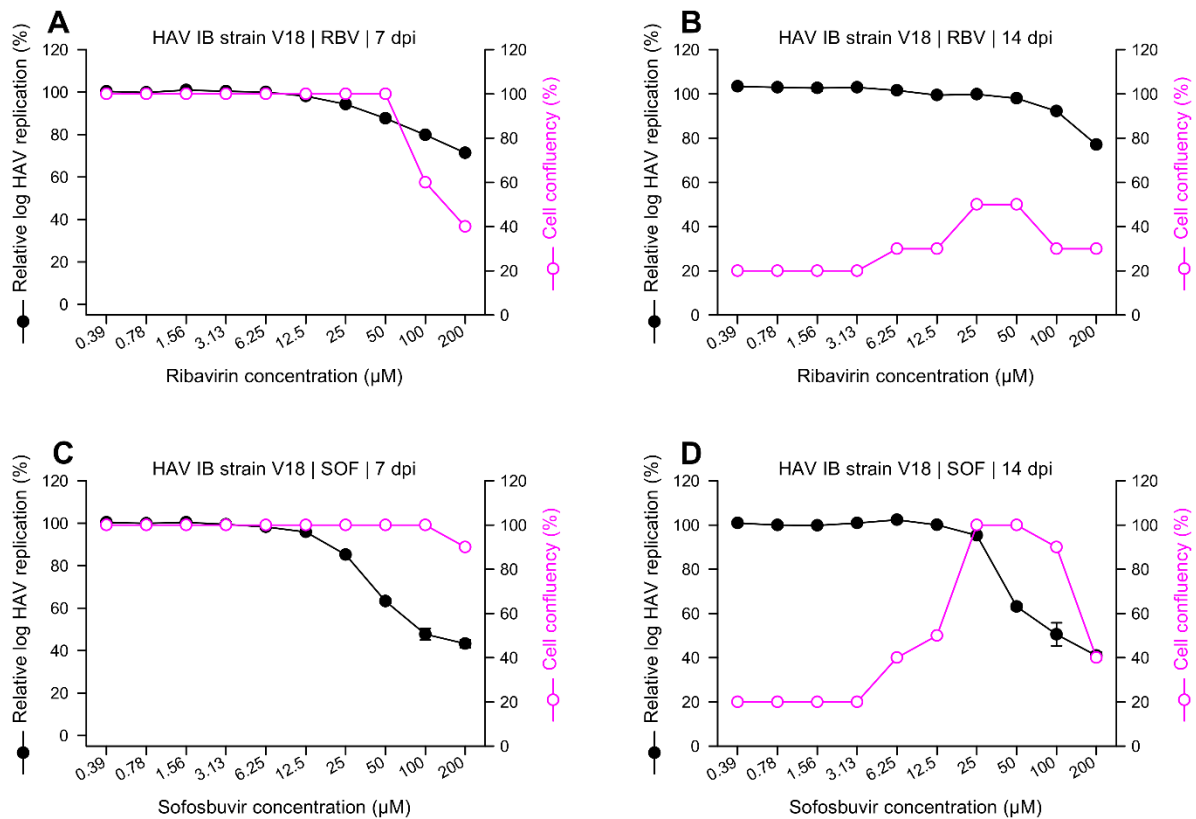


Abbildung 10: Relative logarithmische HAV-Replikation des HAV-positiven Materials V18 des Genotyps IB in Prozent unter Einfluss von verschiedenen Konzentrationen von Ribavirin und Sofosbuvir bezogen auf die mit 0,25% DMSO behandelte Positivkontrolle (ohne Einfluss von Virostatika). In Bezug zu setzen mit der relativen Zellkonfluenz. **(A)** Messung 7 Tage nach Inokulation der Huh-7-Zellen unter Verwendung von Ribavirin **(B)** Messung 14 Tage nach Inokulation der Huh-7-Zellen unter Verwendung von Ribavirin **(C)** Messung 7 Tage nach Inokulation der Huh-7-Zellen unter Verwendung von Sofosbuvir **(D)** Messung 14 Tage nach Inokulation der Huh-7-Zellen unter Verwendung von Sofosbuvir.

Bei niedrigen Medikamentenkonzentrationen lag verstärkt ein CPE vor welcher auch mit einer Verminderung der Konfluenz einher gehen kann. Des Weiteren kann bei hohen Medikamentenkonzentrationen eine Zytotoxizität des Medikaments vermutet werden, da hier der Effekt der verminderten Konfluenz überwiegt war.

In dieser Analyse wird deutlich, dass die mit Ribavirin behandelten Wells eine stärkere Verringerung der Konfluenz aufwiesen als die mit Sofosbuvir behandelten Wells. Dies führt zur Hypothese, dass Sofosbuvir einen größeren antiviralen Effekt gegenüber HAV haben könnte als Ribavirin, da eine stärkere Hemmung der HAV-Replikation in diesem Fall auch die negativen Effekte des CPE reduzieren würde. Dies könnte somit die höhere Konfluenz bei den mit Sofosbuvir behandelten Zellen begründen.

Eine Darstellung der relativen Zellviabilität nach dem Prinzip des MTT-Assays bietet keine geeignete Darstellungsform, da zwischen der verminderten Zellviabilität aufgrund des CPE oder der verminderten Konfluenz oder eines möglichen Effekts des Virostatikum nicht differenziert werden kann. Während bei geringen Konzentrationen der Virostatika ein besonders starker CPE zu beobachten waren, deutet dies darauf hin, dass der CPE durch die HAV-Stämme verursacht wurde. Des Weiteren war die Positivkontrolle stark von dem CPE betroffen. Da diese Werte jedoch den Bezugspunkt der relativen Zellviabilität des MTT-Assays darstellen, hat dies zur Folge, dass es zu einer Verzerrung der eigentlichen Werte kommt und somit Zellviabilität von über 100 % zustande kamen. Die somit genannten Werte der relativen Zellviabilität in der Abbildung 8 A-H können somit nicht als absolute Werte gewertet werden.

4.5 IC50-Werte zeigen eine erhöhte Wirksamkeit von Sofosbuvir gegenüber Ribavirin bezüglich der relativen Reduktion der HAV-Replikation

Die IC50-Werte wurden mittels Regressionsanalyse in SigmaPlot berechnet. Da bei den zellkulturadaptierten Stämmen V18 und MBB im untersuchten Zeitraum keine Annäherung an eine maximale Hemmung identifiziert werden konnte, konnten keine realistischen IC50-Werte berechnet werden. Aus diesem Grund sind in der Abbildung 11 nur die aus den Serien gewonnenen HAV-Stämme aufgelistet. Zu beachten ist hierbei, dass auch bei der Verwendung von Ribavirin die genaue Festlegung eines Plateaus der maximalen Hemmung nicht immer zu eindeutigen Ergebnissen führte. Folglich kann eine Streuung der ermittelten IC50-Werte den zugrunde liegenden Daten geschuldet sein (Abbildung 11 A).

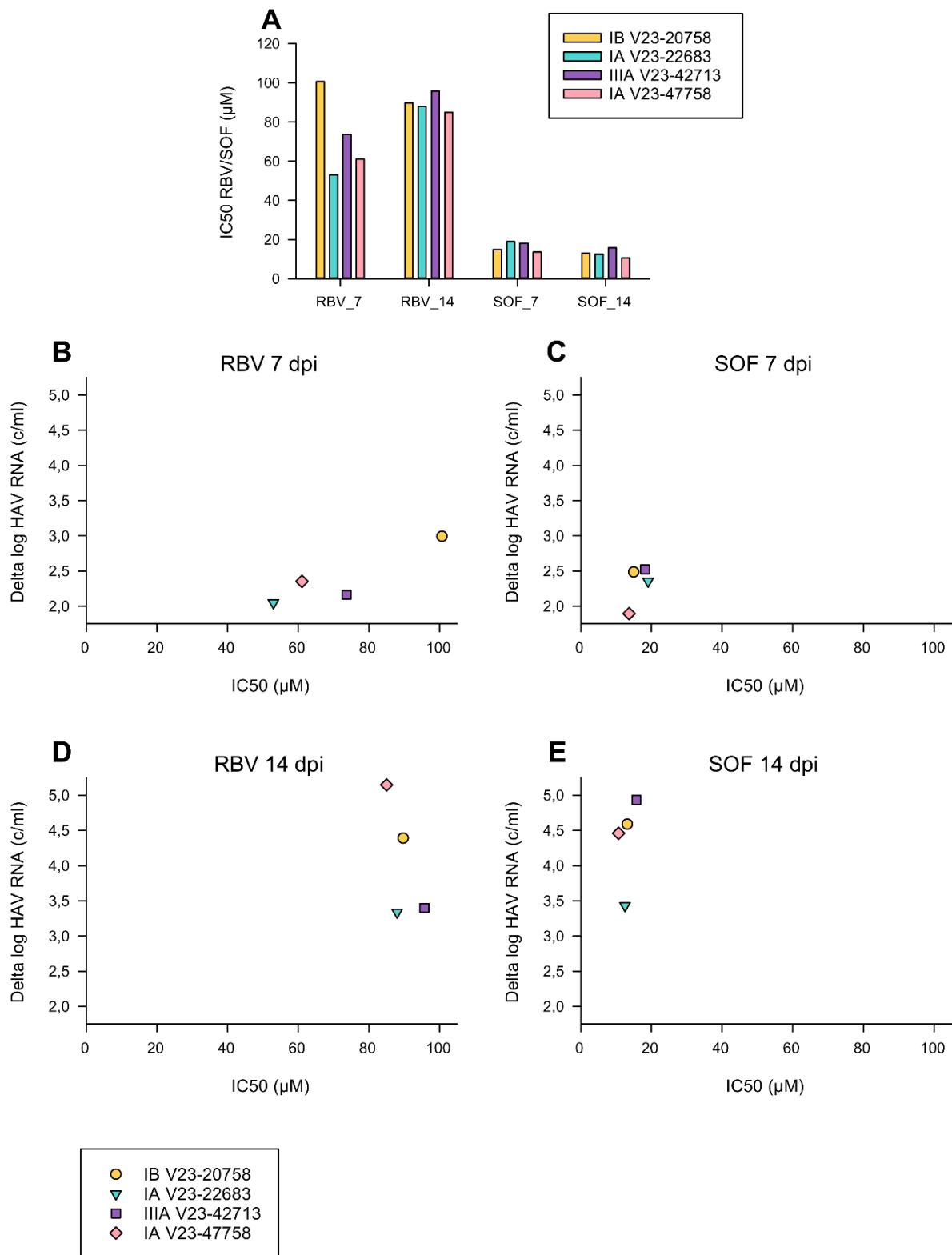


Abbildung 11: Gezeigt sind die IC₅₀-Werte von Ribavirin und Sofosbuvir der verwendeten HAV-positiven Materialien. **(A)** Das Balkendiagramm zeigt die IC₅₀-Werte der verschiedenen HAV-Genotypen nach 7 und 14 Tagen unter Behandlung mit Ribavirin bzw. Sofosbuvir. **(B)** relative HAV-RNA-Reduktion in Kopien pro Milliliter bezogen auf den IC₅₀-Wert in µM der verschiedenen Genotypen 7 Tage nach Behandlung mit unterschiedlichen Ribavirin-Konzentrationen. **(C)** relative HAV-RNA-Reduktion in Kopien pro Milliliter bezogen auf den IC₅₀-Wert

in μM der verschiedenen Genotypen 7 Tage nach Behandlung mit unterschiedlichen Sofosbuvir-Konzentrationen. **(D)** relative HAV-RNA-Reduktion in Kopien pro Milliliter bezogen auf den IC_{50} -Wert in μM der verschiedenen Genotypen 14 Tage nach Behandlung mit unterschiedlichen Ribavirin-Konzentrationen. **(E)** relative HAV-RNA-Reduktion in Kopien pro Milliliter bezogen auf den IC_{50} -Wert in μM der verschiedenen Genotypen 14 Tage nach Behandlung mit unterschiedlichen Sofosbuvir-Konzentrationen.

Auffällig ist, dass die ermittelten IC_{50} -Werte von Sofosbuvir deutlich niedriger waren als die von Ribavirin. Während bei Sofosbuvir ca. 20 μM nötigen waren, um eine halbmaximale Wirkung zu erreichen, wurde bei Analyse der mit Ribavirin behandelten Wells eine Konzentration zwischen 50–100 μM benötigt (siehe Abbildung 11A). Da der IC_{50} -Wert die quantitative Reduktion der relativen HAV-RNA-Konzentration nicht berücksichtigt, erfolgte die zweite Darstellung mittels Streudiagramm. Hier wird deutlich, dass die quantitative Reduktion durch Ribavirin und Sofosbuvir ähnlich groß ausfiel. Dies lässt somit einen Vergleich der IC_{50} -Werte zu. Folglich kann die Aussage getroffen werden, dass eine geringere Menge an Sofosbuvir benötigt wird, um eine halbmaximale Hemmung zu erreichen, als bei Ribavirin.

Bei Verwendung des Virostatikums Sofosbuvir zeigte der Genotyp 1A eine geringere quantitative Reduktion der relativen HAV-RNA-Konzentration als die anderen untersuchten Genotypen. Eine etwas geringere Empfindlichkeit gegenüber Sofosbuvir kann somit vermutet werden. Es gilt zu beachten, dass das Streudiagramm die ermittelten Zellviabilitätswerte nicht berücksichtigt. Eine Reduktion der HAV-RNA-Konzentration durch Zytotoxizität des jeweiligen Medikaments und folglich einer geringeren Anzahl an viablen Zellen kann somit nicht ausgeschlossen werden. Die vorherige Darstellung zeigte auf, dass sich diese – auf den Genotyp bezogen – nicht bedeutend unterscheidet. Folglich kann eine Vergleichbarkeit der Werte angenommen werden (Abbildung 11 B–E).

5 Diskussion

Derzeit existiert keine zugelassene Therapie gegen Hepatitis A (39). Aufgrund des zunehmenden sozioökonomischen Wandels in zahlreichen Ländern kommt es zu einer Verlagerung der Erkrankung in ein höheres Alter. Dadurch ist der Anteil an symptomatischen und schweren Krankheitsverläufen deutlich gestiegen (13,35,36). Um die in-vitro Testung der bereits gegen andere Hepatitiden eingesetzten Medikamente Ribavirin und Sofosbuvir zu testen, musste zunächst eine Zelllinie gefunden werden, welche bestmöglich die Infektion und anschließende Isolation der in Deutschland auftretenden HAV-Genotypen ermöglicht und sich für ein anschließendes Drug Testing eignet (50,55). In dieser Arbeit wurde zunächst die Permissivität der Ziellinien MRC-5, Huh-7, Caco-2, PLC/PRF/5, A549, HepG2/C3A, Huh-7-Lunet BLR und Vero-Zellen bezüglich verschiedener HAV-Genotypen untersucht und jeweils mindestens ein Stamm der in Deutschland prävalenten Genotypen IA, IB und IIIA isoliert. Anschließend wurde die antivirale Aktivität von Ribavirin und Sofosbuvir auf die zuvor isolierten HAV-Stämme unterschiedlicher Genotypen untersucht.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass (i) die Zelllinie Huh-7 sowohl bei HAV-de-novo-Isolationen als auch bereits passagierten HAV-Stämmen am permissivsten war, (ii) deutliche Unterschiede bezüglich der Infektion mittels nativer Probenmaterialien und bereits passagierter Virusstämmen bestanden, (iii) Ribavirin und Sofosbuvir eine antivirale Wirkung auf die getesteten HAV-Stämme hatten, wobei eine stärkere Empfindlichkeit gegenüber Sofosbuvir ermittelt werden konnte, (iv) es bei höheren Konzentrationen der Virostatika zu einem Zell-toxischen Effekt kam, (v) die bereits passagierten Virusstämmen MBB und V18 einen zytopathischen Effekt (CPE) hervorriefen und (vi) dass es anhand der ermittelten IC₅₀-Werte keine eindeutig genotypspezifische Empfindlichkeit der untersuchten Virostatika gab. Ein Trend zu einer niedrigeren Empfindlichkeit des Genotyps IA konnte jedoch festgestellt werden.

In dieser Arbeit konnte die Huh-7-Zelllinie als die permissivste Zelllinie bezüglich bereits passagierter und neu isolierter HAV-Stämme in dem untersuchten Zeitraum bis 28 Tage post Inokulation identifiziert werden. Keine der weiteren untersuchten Zelllinien zeigte eine mit der Huh-7-Zelllinie vergleichbare stabile Replikation der mittels

Probenmaterial neu isolierten HAV-Stämme. Die Infektion mit den bereits zellkultur-adaptierten Stämmen war zwar in allen untersuchten Zelllinien möglich, jedoch war auch hier die Huh-7-Zelllinie am vielversprechendsten. Es bleibt offen, ob ein längerer Untersuchungszeitraum über mehr als 4 Wochen bei den anderen untersuchten Zelllinien zu einer vergleichbar stabilen Infektion geführt hätte.

Eine der ersten Isolationen von HAV-Viren in einem Zellkultur-basierten System gelang Ende der 1970er Jahre unter Verwendung der FRhK-6-Zelllinie (fötale Rhesusaffen-Nierenzelllinien) und Leberzellen von Marmosetten (56). Die Replikationsfähigkeit des HAV in-vitro wurde anschließend in verschiedenen Zelllinien bezüglich der Infektionsdauer und auf einen möglichen CPE untersucht. Eine Übersichtsarbeit von Kanda et al. aus dem Jahr 2020 liefert einen Überblick über die Datenlage bezüglich der HAV-Replikation in der Zellkultur (46). Die dort betrachteten Studien zeigen auf, dass die Replikation von HAV in multiplen Zelllinien möglich ist. Des Weiteren wird deutlich, dass die Infektion sich nicht allein auf Hepatozyten beschränkt, da auch die Inokulation von Zelllinien aus anderen Ursprungsgeweben zu einer signifikanter Virusproduktion geführt haben (46). In einem großen Teil der hier genannten Studien wurde der HAV-Stamm HM175 (HAV-IB) oder dessen Derivate verwendet, welcher bereits durch serielle Passagen an die Zellkultur adaptiert ist (9,57). In diesem Virusstamm konnten multiple Mutationen im genomischen Vergleich zu einem Wildtyp-HAV-Stamm, welcher aus Stuhl oder Leber von infizierten Primaten gewonnen wurde, festgestellt werden. Diese Mutationen könnten für die verbesserte Replikation in-vitro verantwortlich sein (58). Die effizientere Replikation wird in Zusammenhang gebracht mit Mutationen in dem essenziellen nicht-strukturellen Protein 2B und Mutationen in der 5'-untranslatierten Region (5'-UTR) des Genoms (5,59). Dieser Effekt konnte auch in dieser Arbeit reproduziert werden, da die Replikation der zellkulturadaptierten Stämme MBB und V18 (beide HAV-IB) im Vergleich zum nativen Probenmaterial deutlich schneller ablief. Ob die in dieser Arbeit verwendeten zellkulturadaptierten Virusstämme MBB und V18 die genannte Mutation enthalten, wurde im Rahmen der Arbeit nicht untersucht. Eine Ganzgenomsequenzierung kann hier Aufschluss bringen.

Während die diploide menschliche Lungenzelllinie MRC-5 für die Herstellung von Hepatitis-A-Impfstoffen verwendet wird (60), werden die Zelllinien PLC/PRF/5 und Huh-7 häufig für die Forschung zu HAV-spezifischen Therapien verwendet (46). Dies wird

damit begründet, dass HAV eine IRES-Aktivität aufweist, welche aufgrund des hochkonservierten Charakters ein beliebtes Ziel bei der Entwicklung einer Hepatitis-A-Therapie unterschiedlicher HAV-Stämme darstellt (46,61). Trotz der höheren Aktivität der HAV-IRES in FRhK-4-Zellen im Vergleich zu Huh-7-Zellen wird die Huh-7-Zelle als überlegenes Modell bezüglich der Testung antiviraler Medikamente angesehen. Die Infektion von Huh-7 Zellen stellt ein natürlicheres Modell der HAV-Infektion im Vergleich zu FRhK-4-Zellen dar (46,61). Das in dieser Arbeit untersuchte Virostatikum Ribavirin hat keinen nachgewiesenen Effekt auf die HAV-IRES-abhängige Translation (62). Die Wirkung von Sofosbuvir wird auf eine Hemmung der RNA-abhängigen RNA-Polymerase zurückgeführt. Es ist kein direkter Effekt auf die HAV-IRES-abhängige Translation beschrieben (63). Die Zelllinie Huh-7 wurde für die weiteren Versuche dieser Arbeit verwendet, da bei dieser die stabilste Anzucht von HAV sowohl bei nativen als auch bei bereits passagiertem Virusmaterial festgestellt werden konnte.

Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten aufzeigen, dass sowohl Ribavirin als auch Sofosbuvir zu einem Rückgang der relativen HAV-Replikation geführt haben. Ein signifikanter Rückgang konnte in der Regel ab einer Virostatika-Konzentration von mindestens ca. 12,5 μM festgestellt werden. Generell war die Abnahme der relativen HAV-Replikation unter Verwendung von Sofosbuvir größer als bei Ribavirin. Im Allgemeinen konnte zum Rückgang der relativen HAV-Konzentration simultan eine mit steigender Medikamentenkonzentration verminderte Zellviabilität dokumentiert werden. Eine besonders ausgeprägte Verminderung der relativen Zellviabilität konnte bei hohen Medikamentenkonzentrationen, vor allem im Bereich von 100 und 200 μM festgestellt werden. Bei diesen Konzentrationen kann eine überwiegende Reduktion der HAV-Replikation aufgrund eines zytotoxischen Effekts des Medikaments angenommen werden. Eine Ausnahme war hierbei, dass es bei einer Medikamentenkonzentration von 25 μM und 50 μM zu einer deutlich reduzierten HAV-Replikation bei erhaltener Zellviabilität kam. Dieser Effekt konnte bei Sofosbuvir stärker beobachtet werden als bei Ribavirin und zeichnete sich nach 14 Tagen deutlicher ab als nach 7 Tagen. Dies lässt die Vermutung anstellen, dass es bei einem Konzentrationsspektrum der Virostatika zwischen 25 und 50 μM zu einer erhöhten Empfindlichkeit der HAV-Stämme gegenüber der Virostatika kommt. Überraschend war hierbei, dass die Verwendung von niedrigen Medikamentenkonzentrationen von ca. 6,25 μM bis 25 μM bereits mit einer leicht verminderten Zellviabilität einhergingen. Dies würde zunächst für eine beginnende Toxizität

der Virostatika sprechen. Auffällig ist außerdem, dass die Medikamentenkonzentrationen von 50 μM Ribavirin und 25 μM Sofosbuvir sich in Randwells befanden (siehe Abbildung 1). Es konnte jedoch auch bei Sofosbuvir-Konzentrationen von 50 μM eine auffällig hohe Zellviabilität bei verminderter relativer logarithmischer HAV-Replikation dokumentiert werden. Dies würde gegen die Hypothese sprechen, dass die Lage der Wells einen Einfluss auf das Ergebnis haben könnte. Dies müsste mittels einer anderen Belegung der 96-Well-Platte überprüft werden.

Ribavirin ist ein synthetisches Guanosinanalogon welches sowohl gegen DNA- als auch gegen RNA-Viren wirkt (62). Es wird zusammen mit anderen Pharmaka als antivirale Therapie gegen Hepatitis-C-Virusinfektionen eingesetzt (50). In vergangenen Studien mit FRhK-4-Zellen und Infektion mit einem bereits mehrfach passagierten HAV-Stamm konnte bereits ein inhibitorischer Effekt von Ribavirin auf die HAV-Replikation nachgewiesen werden. Es handelte sich hierbei um den H 141-Stamm, welcher aus dem Stuhl eines Patienten aus Indien gewonnen wurde (64). Der genaue Genotyp wurde nicht bestimmt, die Herkunft aus Indien lässt jedoch den Genotyp IIIA vermuten (16,65). In dieser Studie konnte bei Ribavirin-Konzentrationen von 250 μM und 500 μM eine deutliche Inhibition der HAV-Replikation beobachtet werden, ein deutlich zytotoxischer Effekt wurde jedoch auch festgestellt. Bei einer Konzentration von 100 μM war nur eine leichte Verminderung der HAV-Expression nachweisbar (65). Eine aktuelleren Studie untersuchte die HAV-IB-Stämmen HM175/p16 und HM175/18f (57) mit Huh-7.5-GA Zellen und dem GFP-Reporter-System (63). Hier konnte bei einer Ribavirin-Konzentration von 100 μM keine erkennbare Veränderung der GFP-Translokation festgestellt werden. Eine leichte Verminderung der HAV-Replikation konnte festgestellt werden. Die Zellviabilität war deutlich reduziert, konkrete Daten werden jedoch nicht genannt (63). Diese Befunde bezüglich der Zytotoxizität von Ribavirin decken sich mit den Ergebnissen in dieser Arbeit.

Zu ähnlichen Ergebnissen kam auch eine Studie in den FRhK-4-Zellen und ein aus Stuhl isolierter HAV-Stamm aus China ohne Nennung des konkreten Genotyps verwendet wurden (49). Hier konnte bei Ribavirin-Konzentrationen von 50 bzw. 100 $\mu\text{g/ml}$ eine verminderte HAV-Antigenproduktion detektiert werden. Zytopathische Veränderungen im Rahmen von Abkugeln der Zellen konnte bei einer Ribavirin-Konzentration

von 100 µg/ml festgestellt werden, von einer alleinigen verminderten HAV-Antigenproduktion aufgrund dieser Veränderungen wird jedoch in dieser Arbeit nicht ausgegangen (49).

Darüber hinaus wurde die Wirkung verschiedener Medikamente gegen ein subgenomisches HAV-IIIa-Replikon in den Huh-7- und PLC/PRF/5-Zelllinien untersucht. Bei den getesteten Substanzen Favipiravir, Ribavirin und Foscarnet-Natrium konnte bei einer Konzentration von bis zu 100 µM keine Zytotoxizität festgestellt werden. Ribavirin in einer Konzentration von 100 µM senkte die HAV-Replikation um mehr als 25%, Favipiravir (10 µM) reduzierte die HAV-RNA um 29%, Foscarnet zeigte keine Wirkung (66). Die Ergebnisse sind somit nur teilweise kongruent mit den in dieser Arbeit erlangten Resultaten. Die klinische Anwendung von Ribavirin birgt vor allem bei höheren Dosen ein hohes Risiko von unerwünschten Arzneimittel-Nebenwirkungen wie z.B. eine hämolytische Anämie. Des Weiteren wird durch die Hemmung der Inosinmonophosphat-Dehydrogenase der GTP-Haushalt beeinflusst (66).

Sofosbuvir ist ein Medikament, welches als Nukleotidanalagon-Inhibitor der HCV-Polymerase zur Behandlung der HCV-Genotypen 1–4 zugelassen ist (67). Die allgemeine Studienlage bezüglich der antiviralen Wirkung von Sofosbuvir gegen Hepatitis A ist begrenzt. Die antivirale Wirkung von Sofosbuvir gegen HAV wurde in einer Studie bereits in-vitro in einem zellbasierten fluoreszierendem Reportersystem getestet. Hierbei wurden Derivate der Huh-7 Zellen, sogenannte Huh-7.5.1-GA Zellen, mit dem HAV-Stamm HM175/p16 und HM175/18f (HAV-IB) infiziert (63). Außerdem wurde der Zellviabilitätstest mittels CCK-8 durchgeführt. Zunächst wurden die Zellen mit einer Sofosbuvir-Konzentration von 500 µM behandelt. Hierbei konnte in 20% der persistent infizierten Zellen eine Veränderung der GFP-Translokation festgestellt werden, was mit einem antiviralen Effekt von Sofosbuvir zu vereinbaren ist. Es war keine Zytotoxizität sichtbar. Anschließend wurden die Zellen mit Sofosbuvir Konzentrationen zwischen 0,4 µM und 50 µM behandelt. Auch hier konnte eine hemmende Wirkung des Sofosbuvir auf die HAV-Replikation ohne generelle Zytotoxizität des Wirkstoffes festgestellt werden. Die halbmaximale inhibitorische Konzentration wurde bei 6,3 µM mittels RT-qPCR bzw. bei 9,9 µM mittels bildgebenden Verfahren ermittelt (63). Im Rahmen dieser Studie wurden neben der Huh-7.5.1-GA Zelllinie auch die Wirkung von Sofosbuvir in den Zelllinien Huh-7, Vero und Caco-2 Zellen untersucht. Hierbei konnte evaluiert werden,

dass sich die Wirkung von Sofosbuvir auf die Leberzelllinien Huh-7 und Huh-7.5.1-GA beschränkte. Dies wird auf die Eigenschaft zurückgeführt, dass es sich bei Sofosbuvir um ein Propharmakon (Prodrug) handelt, welches intrazellulär in den Hepatozyten in die aktive Form umgewandelt wird (63). Überraschenderweise konnte in der zitierten Studie auch bei hohen Konzentrationen von 500 μM Sofosbuvir keine Zelltoxizität oder eine reduzierte Zellviabilität festgestellt werden, während in dieser Arbeit eine Zytotoxizität bei Konzentrationen ab ca. 100 μM festgestellt werden konnte. In der genannten Studie wurden zellkulturadaptierte HAV-IB-Stämme verwendet. Es können somit keine direkten Rückschlüsse gezogen werden, wie sich die antivirale Wirkung bezüglich Wildtyp Stämmen und verschiedener HAV-Genotypen verhält. Die Ergebnisse sind jedoch vergleichbar mit dem in dieser Arbeit verwendeten MBB und V18 Stämmen, da es sich auch hier um zellkulturadaptierte HAV-IB-Stämme handelt. In dem in dieser Arbeit beschriebenen Versuch konnten deutliche antivirale Effekte bei den zellkulturadaptierten Stämmen erst ab einer höheren Sofosbuvir-Konzentration von ca. 50 μM festgestellt werden. Ein konkreter Vergleich durch Zahlenwerte ist durch den in diesem Versuch eintretenden CPE nicht möglich. Auch ein IC_{50} Wert konnte aufgrund der fehlenden Annäherung an eine maximale Hemmung nicht bestimmt werden.

Überraschenderweise lösten die zellkulturadaptierten HAV-Stämme MBB und V18 des Genotyps IB einen CPE aus. Dieser war mikroskopisch durch eine veränderte Morphologie der Zellen in Form von einem Abkugeln der Zellen und der Lösung aus dem Zellverband erkennbar und spiegelte sich auch in dem dazugehörigen Viability-Assay wider. Der Effekt war bei dem V18-Stamm ausgeprägter als bei dem MBB-Stamm. Vor allem bei hohen Virostatika Konzentrationen von 100 μM bzw. 200 μM war ein ausgeprägter Effekt der verminderten Zellkonfluenz sichtbar. Dies könnte wiederum für einen toxischen Effekt der verwendeten Virostatika sprechen. Da der CPE bei höheren Virostatika-Konzentrationen von mehr als 50 μM bei Ribavirin bzw. von mehr als 12,5 μM Sofosbuvir nicht mehr zu beobachten war, lässt sich die Hypothese aufstellen, dass Ribavirin und Sofosbuvir einen antiviralen Effekt auf die getesteten HAV-Stämme haben, die benötigten Konzentrationen jedoch einen starken toxischen Effekt auslösten, welcher wiederum mit der verminderten Konfluenz einherging. Ob in einer mittleren Dosis ein Effekt des Virostatikums auf die relative HAV-RNA-Produktion beobachtet werden konnte, lässt sich somit in diesem Fall diskutieren.

Serielle Passagen des HAV-Stamms HM 175 (Genotyp IB) führten zu einem verringerten Intervall der maximalen HAV-Antigene Expression, was auf eine effizientere Replikation im zellbasierten Infektionssystem hinweist (68). Dies konnte auch im Rahmen des in dieser Arbeit durchgeführten Versuches festgestellt werden. Diese Konsequenz wird unter anderem auf Mutationen im nicht-strukturellen 2B-Protein und in der 5'-untranslatierten Region zurückgeführt (5,59). Von einem allgemeinen CPE wurde in den meisten Studien nicht berichtet (46,68). Bestimmte Derivate des HM175-Stamms, wie der HM175/18f weisen jedoch einen CPE auf. In dem HM175/18f-Derivat konnten 31 Mutationen gegenüber dem HM175/p16 Stamm nachgewiesen werden, welcher keinen CPE auslöst. Zum Wildtypstamm HM175 (dritte Marmoset-Passage) konnten insgesamt 44 Mutationen festgestellt werden (59). Eine weitere Studie aus Italien untersuchte die Entstehung eines CPE durch verschiedene Mutationen. Hierbei wurde ein HAV-IA-Stamm aus dem Stuhl eines aus Süditalien stammenden Patienten verwendet, welcher bereits ab der dritten Passage einen klaren CPE 7-9 Tage nach der Infektion auslöste (69). Es konnte beobachtet werden, dass dieser CPE nach 50 Passagen deutlich früher auftrat. Bereits nach etwa drei Tagen war eine Veränderung der in diesem Versuch verwendeten FRp/3-Zellen sichtbar. Die zwei verschiedenen Passagen des HAV-Stamms wurden fast vollständig sequenziert und auf Mutationen untersucht. Hierbei konnten mehrere Nukleotidvariationen und Aminosäureveränderungen gefunden werden. Als möglicher molekularer Schlüsselmechanismus für die Entstehung eines zytopathischen Effekts wurde in dieser Studie eine Deletion im Gen 3A genannt (69). Eine weitere Studie stellte die Hypothese auf, dass aus einer zunächst nicht-zytopathogenen HAV-Infektion Virusvarianten entstehen können, welche einen deutlichen CPE verursachen (70). Es konnten multiple Mutationen verglichen zu dem nicht-zytopathogenen HAV-Stamm HM175/p16 herausgearbeitet werden. Außerdem zeigte die Studie, dass bei persistierenden Infektionen eine andere Virusvariante bevorzugt wird als bei serielltem Passagieren, was auf einen unterschiedlichen Selektionsmechanismus hinweisen kann (70).

Es ist somit zu vermuten, dass die in dieser Arbeit verwendeten Stämme V18 und MBB Mutationen aufweisen, welche durch eine Adaptierung an die Zellkultur entstanden sind und somit zu einer beschleunigten Replikation führen. Außerdem könnte die Passagierung eine Veränderung des Genoms hin zu einem CPE bewirkt haben.

Zusätzlich wurde untersucht, ob es Unterschiede bezüglich der Empfindlichkeit der verschiedenen HAV-Genotypen gegenüber den getesteten Virostatika gibt. Anhand der ermittelten IC₅₀-Werte konnte zunächst kein Unterschied ermittelt werden. Ein antiviraler Effekt konnte bei allen untersuchten Genotypen (IB, IA und IIIA) erzielt werden. Bei genauerer Betrachtung der IC₅₀-Werte in Relation zur quantitativen Hemmung der HAV-RNA konnte bei Sofosbuvir jedoch beim Genotyp IA ein geringer Unterschied bei vergleichbarem IC₅₀-Wert dokumentiert werden. Dies würde für einen leichten Trend einer etwas weniger ausgeprägte Empfindlichkeit des Genotyps IA gegenüber Sofosbuvir sprechen. Die Studienlage bezüglich genotypspezifischer Wirksamkeit ist im Allgemeinen sehr dünn. Die vorliegende Arbeit versucht den Mangel an Daten gezielt zu adressieren. Dabei wurden außerdem HAV-Stämme verwendet, die nicht zuvor mehrfach in Zellkultur passagiert wurden und damit genetisch dem Wildtyp besonders nahekommen.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit ein zellkultur-basiertes Infektionssystem entwickelt werden, welches die effiziente Isolation von HAV-Wildtyp-Stämmen unterschiedlicher Genotypen in Huh-7 Zellen ermöglicht. Zusätzlich konnten die Unterschiede zwischen bereits passagierten HAV-Stämmen und Neuisolationen aus nativem Material herausgearbeitet werden. Bei den bereits passagierten HAV-IB-Stämmen MBB und V18 konnte eine deutlich schnellere Infektion erzielt werden verglichen mit den de-novo-Isolationen. Außerdem war die Infektion von MBB und V18 in allen getesteten Zelllinien möglich während bei den de-novo-Isolationen die Huh-7 Zelllinie eine signifikant stabilere Infektion gewährleisten konnte. Anschließend wurde die Wirkung von Ribavirin und Sofosbuvir gegenüber den HAV-Stämmen untersucht. Eine genotypunabhängige Verminderung der relativen HAV-Replikation konnte hierbei festgestellt werden. Besonders für Sofosbuvir liefert diese Arbeit weitere Evidenz, dass dieses Virostatikum potenziell für die Therapie gegen Hepatitis A in Frage kommt. Das HAV-Infektionsmodell kann für weiteren Erforschungen der antiviralen Therapie gegen Hepatitis A und der Isolation und Charakterisierung weiterer HAV-Stämme dienen.

6 Zusammenfassung

Hepatitis A ist eine Infektionskrankheit mit dem Hauptsymptom der akuten viralen Entzündung der Leber. Die jährlichen Infektionszahlen werden auf ca. 1,5 Millionen geschätzt. Die Transmission des Hepatitis-A-Virus (HAV) findet meist auf fäkal-oralem Weg statt. Eine Transmission über Blutprodukte ist ebenfalls möglich. Die Erkrankung ist in den meisten Fällen selbstlimitierend. Schwere Verläufe bis hin zum Tod sind jedoch auch bekannt. Wirtschaftlicher Aufschwung und verbesserte hygienische Bedingungen haben das Alter für eine Erstinfektion mit HAV in ein höheres Alter verschoben. Dies ist mit einem erhöhten Risiko eines symptomatischen Verlaufs verbunden. Es gibt derzeit keine antivirale Therapie gegen Hepatitis A. Im Rahmen der Prävention und Postexpositionsprophylaxe sind Impfungen im Einsatz. In dieser Arbeit wurde zunächst ein Zellkultursystem etabliert, welches die Anzucht von verschiedenen HAV-Genotypen ermöglicht. Bei den verwendeten HAV-positiven Materialien wurde sowohl auf Neuisolationen aus Probenmaterial als auch auf bereits zellkulturadaptierte Virusstämme zurückgegriffen. Die Zelllinien A549, HepG2/C3A, PLC/PRF/5, Huh-7, Huh-7-Lunet BLR, Vero, MRC-5 und Caco-2 wurden untersucht, wobei die Passagierung, als auch die Isolation von HAV mittels der Zelllinie Huh-7 am effizientesten gelang. Es folgte die Testung der etablierten Virostatika Ribavirin und Sofosbuvir gegen zellkulturadaptierte und neu isolierte HAV-Stämme unterschiedlicher Genotypen. Hierbei wurden verschiedene Konzentrationen der Virostatika verwendet und mögliche Effekte in einem Zeitrahmen von 14 Tagen beobachtet. Die Ergebnisse zeigten auf, dass ein virostatischer Effekt der Medikamente gegen HAV vorlag. Dieser konnte bei Sofosbuvir ausgeprägter festgestellt werden als bei Ribavirin. Des Weiteren konnte in hohen Medikamentenkonzentrationen ein zytotoxischer Effekt der Medikamente nachgewiesen werden. Die zellkultur-adaptierten Stämme V18 und MBB wiesen einen CPE auf. Das etablierte Infektionsmodell ermöglicht die pan-genotypische Testung weiterer antiviraler Substanzen gegen HAV.

7 Summary

Hepatitis A is an infectious disease with the primary symptom of acute viral inflammation of the liver. The annual number of infections is estimated at approximately 1.5 million. The transmission of the hepatitis A virus usually occurs via a fecal-oral route, although transmission via blood products is also possible. The disease is self-limiting in most cases. Severe courses, even death, have been reported, particularly in co-infections or patients with pre-existing conditions. Economic growth and improved hygiene conditions have pushed the age of primary infection with hepatitis A to a later age. This is associated with an increased risk of a symptomatic course. There is currently no approved medication against hepatitis A. Vaccines are used for prevention and post-exposure prophylaxis. In this study, a cell culture system was established that enables the cultivation of various HAV genotypes. The HAV-positive materials used included both newly isolated biomaterial and virus strains already adapted to cell culture. The cell lines A549, HepG2/C3A, PLC/PRF/5, Huh-7, Huh-7-Lunet BLR, Vero, MRC-5, and Caco-2 were tested. The most promising results were obtained using the Huh-7 cell line. The antivirals ribavirin and sofosbuvir were then tested against hepatitis A viruses of different genotypes. Different concentrations of the antivirals were used, and potential effects were observed over a period of 14 days. The results demonstrate that the drugs have a virostatic effect. This was more pronounced with sofosbuvir than with ribavirin. Furthermore, a cytotoxic effect of the drugs was detected at high drug concentrations. The cell culture-adapted strains V18 and MBB exhibited CPE. The results and experimental design can be used for further research into antiviral therapy against hepatitis A.

8 Anhang

Probe	Sequenzen	Genotyp
MBB	1 TAATCATTCT GATGAATATT TGTCTTTTAG TTGCTATTTG TCTGTCACAG 51 AACAAATCAGA ATTTTATTTT CCCAGAGCTC CATTGAATTC AAATGCTATG 101 TTATCCACTG AATCAATGAT GAGCAGAATT GCAGCTGGAG ACTTGGAGTC 151 ATCAGTGGAT GATCCTAGAT CAGAGGAGGA TAAAAGATT T GAGAGTCATA 201 TAGAATGCAG GAAACCCAT AAAGAATTGA GATTGGAAGT TGGGAAACAA 251 AGACTCAAGT ATGCTCAGGA AGAATTGTCA AATGAAGTGC TCCCACCCCC 301 TAGGAAAATG AAGGGGTTGT TTTCACAAGC TAAAATTTCT CTTTTTTTACA 351 CTGAGGABCA TGAAATAATG AAATTTTCTT GGAGAGGAGT GACTGCAGAT 401 ACTAGAGCTT TAAGGAGGTT TGGATTTTCT TTGGCTGCTG GCAGAAGTGT 451 GTGGACTCTT	IB
V18	1 CAATCACTCT GATGAATATT TGTCTTTTAG TTGCTATTTG TCTGTCACAG 51 AACAAATCAGA GTTTTATTTT CCCAGAGCTC CATTGAATTC AAATGCCATG 101 TTATCCACTG AATCAATGAT GAGCAGAATT GCAGCTGGAG ACTTGGAGTC 151 ATCAGTAGAT GATCCCAGAT CAGAGGAGGA CAAAAGATT T GAGAGTCACA 201 TAGAATGCAG GAAGCCATAT AAAGAATTGA GATTAGAAGT TGGGAAACAA 251 AGACTCAAGT ATGCTCAGGA AGAATTGTCA AATGAAGTAC TTCCACCCCC 301 TAGGAAAATT AAGGGACTGT TTTCACAAC CAAAATTTCT CTTTTTTTATA 351 CTGAGGACCA TGAAATAATG AAATTTTCTT GGAGAGGAGT GACTGCTGAT 401 ACTAGAGCTT TGAGGAGATT TGGATTTTCT TTGGCTGCTG GGAGGAGTGT 451 GTGGACTCTT	IB
V23-20758	1 CAATCACTCT GATGAATATT TGTCTTTTAG TTGTTATTTG TCTGTCACAG 51 AACAAATCAGA GTTTTATTTT CCCAGGGCTC CATTGAATTC AAATGCTATG 101 TTATCCACTG AATCAATGAT GAGCAGAATT GCAGCTGGAG ACTTGGAGTC 151 ATCAGTGGAT GATCCTAGAT CAGAGGAGGA TAAAAGATT T GAGAGTCACA 201 TAGAATGCAG GAAGCCATAT AAAGAATTGA GATTAGAAGT TGGGAAACAA 251 AGACTTAAGT ATGCTCAGGA AGAATTGTCA AATGAAGTAC TTCCACCCCC 301 TAGGAAAATG AAGGGATTGT TTTCACAAGC TAAAATTTCT CTTTTTTTACA	IB

351 CTGAGGAGCA TGAAATAATG AAATTTTCTT GGAGAGGAGT GACTGCTGAT
 401 ACTAGAGCTK TAAGGAGGTT TGGATTCTCT TTAGCTGCTG GGAGAAGTGT
 451 GTGGACTCTT

V23-22683

1 CAATCATTCT GATGAATATT TGTCTTTTAG CTGTTACTTG TCTGTTACAG
 51 AACAAATCAGA GTTTTATTTT CCTAGAGCTC CATTGAATTC AAATGCTATG
 101 TTGTCCACTG AGTCTATGAT GAGTAGAATT GCAGCTGGAG ACTTGAGCTC
 151 ATCAGTGGAT GATCCTAGAT CAGAGGAGGA CAGGAGATTT GAGAGTCATA
 201 TAGAATGTAG AAAACCATAC AAAGAATTGA GATTGGAGGT TGGGAAACAA
 251 AGACTCAAAT ATGCTCAGGA AGAGTTGTCA AATGAAGTGC TTCCACCTCC
 301 TAGGAAAATG AAAGGGGTCT TTTCCCAGGC TAAAATTTCT CTTTTTTATA
 351 CTGAGGAGCA TGAGATAATG AAATTTTCTT GGAGAGGAGT GACTGCTGAT
 401 ACTAGAGCTT TGAGAAGATT TGGATTCTCT ATGGCTGCTG GTAGAAGTGT
 451 GTGGACTCTT

IA

V23-42713

1 TAATCACTCA GATGAATATT TGTCTTTTAG CTGTTACTTG TCTGTGACTG
 51 AGCAGTCTGA GTTTTATTTT CCTAGAGCAC CTTTGAATAC CAATGCTATG
 101 ATGTCATCAG AAACAATGAT GGATAGAATT GCTCTTGGTG ATCTTGAATC
 151 CTCAGTTGAT GATCCTCGAT CTGAGGAGGA TCGTAAATTT GAAAGTCATA
 201 TTGAAAAGAG GAAACCTTAT AAAGAGTTAA GATTGGAGGT AGGTAAGCAA
 251 AGGCTTAAAT ATGCTCAGGA AGAATTGTCA AATGAAGTGT TGCCTCCCCC
 301 TCGTAAATTT AAGGGTGTGT TTTCACAAGC AAAAATTTCA TTATTCTACA
 351 CAGAAGATCA TGAAATCATG AAATTCTCCT GGAAAGGAAT CACTGCTGAT
 401 ACTAGAGCTT TGAGGAGATT TGGCTTTTCA TTGGCTGCTG GTAGGAGTGT
 451 GTGGACATTG

IIIA

V23-47758

1 CAATCATTCT GATGAATATT TGTCTTTTAG TTGTTATTTG TCTGTCACAG
 51 AACAGTCAGA GTTCTATTTT CCTAGAGCTC CATTAAATTC AAATGCTATG
 101 TTGTCCACTG AGTCTATGAT GAGTAGAATT GCAGCTGGAG ATTTGGAGTC
 151 ATCGGTGGAT GATCCTAGAT CAGAGGAGGA CAGAAGATTT GAGAGTCATA
 201 TAGAATGTAG GAAACCATAC AAAGAATTGA GATTGGAGGT TGGCAAACAA
 251 AGACTCAAAT ATGCTCAGGA AGAGTTGTCA AATGAAGTGC TTCCACCTCC

IA

301 TAGGAAAATG AAGGGGCTAT TTTCACAAGC TAAGATTTCT CTTTTTTAT

Tabelle Anhang 1: Sequenzen der für die Medikamententestung verwendeten Proben zur Kontrolle der untersuchten Genotypen. Die Sequenz der Proben V18, MBB, V23-20758, V23-22683 und V23-42713 stammen aus der 460-bp-VP1/2A-Region. Die Sequenz der Probe V23-47758 stammt ebenfalls aus dieser Region, ist am 3'-Ende jedoch kürzer.

Probe	HAV-RNA (c/ml)	Genotyp
MBB	$7,37 \times 10^5$	IB
V18	$7,28 \times 10^5$	IB
V23-20758	$7,68 \times 10^5$	IB
V23-22683	$7,98 \times 10^5$	IA
V23-42713	$8,22 \times 10^5$	IIIA
V23-47758	$6,78 \times 10^5$	IA

Tabelle Anhang 2: normierte HAV-Konzentrationen durch Verdünnung mit BMEM zur Testung der Suszeptibilität auf Virostatika

9 Literaturverzeichnis

1. Nainan OV, Xia G, Vaughan G, Margolis HS. Diagnosis of hepatitis a virus infection: a molecular approach. *Clin Microbiol Rev.* Januar 2006;19(1):63–79. doi:10.1128/CMR.19.1.63-79.2006 PubMed PMID: 16418523; PubMed Central PMCID: PMC1360271.
2. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Genus: Hepatovirus | ICTV Taxonomy Report [Internet]. [zitiert 17. Dezember 2025]. Verfügbar unter: <https://ictv.global/report/chapter/picornaviridae/picornaviridae/hepatovirus>
3. Costafreda MI, Pérez-Rodríguez FJ, D’Andrea L, Guix S, Ribes E, Bosch A, u.a. Hepatitis A Virus Adaptation to Cellular Shutoff Is Driven by Dynamic Adjustments of Codon Usage and Results in the Selection of Populations with Altered Capsids. *J Virol.* Mai 2014;88(9):5029–41. doi:10.1128/jvi.00087-14
4. Miguères M, Lhomme S, Izopet J. Hepatitis A: Epidemiology, High-Risk Groups, Prevention and Research on Antiviral Treatment. *Viruses.* Oktober 2021;13(10):10. doi:10.3390/v13101900
5. McKnight KL, Lemon SM. Hepatitis A Virus Genome Organization and Replication Strategy. *Cold Spring Harb Perspect Med.* Dezember 2018;8(12):a033480. doi:10.1101/cshperspect.a033480 PubMed PMID: 29610147; PubMed Central PMCID: PMC6280712.
6. Stuart DI, Ren J, Wang X, Rao Z, Fry EE. Hepatitis A Virus Capsid Structure. *Cold Spring Harb Perspect Med.* Mai 2019;9(5):a031807. doi:10.1101/cshperspect.a031807 PubMed PMID: 30037986; PubMed Central PMCID: PMC6496327.
7. Pintó RM, Pérez-Rodríguez FJ, Costafreda MI, Chavarria-Miró G, Guix S, Ribes E, u.a. Pathogenicity and virulence of hepatitis A virus. *Virulence.* Dezember 2021;12(1):1174–85. doi:10.1080/21505594.2021.1910442 PubMed PMID: 33843464; PubMed Central PMCID: PMC8043188.
8. Bender D, Glitscher M, Hildt E. Die Virushepatitiden A bis E: Prävalenz, Erregermerkmale und Pathogenese. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz.* 2022;65(2):139–48. doi:10.1007/s00103-021-03472-0 PubMed PMID: 34932130; PubMed Central PMCID: PMC8813840.
9. Hirai-Yuki A, Hensley L, Whitmire JK, Lemon SM. Biliary Secretion of Quasi-Enveloped Human Hepatitis A Virus. *mBio.* 6. Dezember 2016;7(6):e01998-16. doi:10.1128/mBio.01998-16 PubMed PMID: 27923925; PubMed Central PMCID: PMC5142623.
10. Das A, Hirai-Yuki A, González-López O, Rhein B, Moller-Tank S, Brouillette R, u.a. TIM1 (HAVCR1) Is Not Essential for Cellular Entry of Either Quasi-enveloped or Naked Hepatitis A Virions. *mBio.* 5. September 2017;8(5):e00969-17. doi:10.1128/mBio.00969-17 PubMed PMID: 28874468; PubMed Central PMCID: PMC5587907.

11. Rivera-Serrano EE, González-López O, Das A, Lemon SM. Cellular entry and uncoating of naked and quasi-enveloped human hepatoviruses. *eLife*. 25. Februar 2019;8:e43983. doi:10.7554/eLife.43983 PubMed PMID: 30801249; PubMed Central PMCID: PMC6422491.
12. McKnight KL, Xie L, González-López O, Rivera-Serrano EE, Chen X, Lemon SM. Protein composition of the hepatitis A virus quasi-envelope. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 20. Juni 2017;114(25):6587–92. doi:10.1073/pnas.1619519114 PubMed PMID: 28490497; PubMed Central PMCID: PMC5488923.
13. Immunization, Vaccines and Biologicals (IVB), Strategic Advisory Group of Experts on Immunization. Hepatitis A vaccines: WHO position paper. *Wkly Epidemiological Rec*. 7. Oktober 2022.
14. Gholizadeh O, Akbarzadeh S, Ghazanfari Hashemi M, Gholami M, Amini P, Yekanipour Z, u.a. Hepatitis A: Viral Structure, Classification, Life Cycle, Clinical Symptoms, Diagnosis Error, and Vaccination. *Can J Infect Dis Med Microbiol J Can Mal Infect Microbiol Med*. 2023;2023:4263309. doi:10.1155/2023/4263309 PubMed PMID: 36644336; PubMed Central PMCID: PMC9833905.
15. Lemon SM, Ott JJ, Van Damme P, Shouval D. Type A viral hepatitis: A summary and update on the molecular virology, epidemiology, pathogenesis and prevention. *J Hepatol*. 1. Januar 2018;68(1):167–84. doi:10.1016/j.jhep.2017.08.034
16. Ameen A, Sabeena S, Robin S, Sanjay R, Prasad V, Mevis FM, u.a. Currently circulating genotypes of Hepatitis A virus in South West, East and North East India, 2017–2018. *Med J Armed Forces India*. 1. April 2022;78(2):185–91. doi:10.1016/j.mjafi.2020.11.019
17. Grover M, Gupta E, Samal J, Prasad M, Prabhakar T, Chhabra R, u.a. Rising trend of symptomatic infections due to Hepatitis A virus infection in adolescent and adult age group: An observational study from a tertiary care liver institute in India. *Indian J Med Microbiol*. 21. Juni 2024;50:100653. doi:10.1016/j.ijmmb.2024.100653 PubMed PMID: 38906330.
18. Foster MA. Increase in Hepatitis A Virus Infections — United States, 2013–2018. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2019;68. doi:10.15585/mmwr.mm6818a2
19. Coudray-Meunier C, Fraisse A, Mokhtari C, Martin-Latil S, Roque-Afonso AM, Perelle S. Hepatitis A virus subgenotyping based on RT-qPCR assays. *BMC Microbiol*. 25. November 2014;14:296. doi:10.1186/s12866-014-0296-1 PubMed PMID: 25420941; PubMed Central PMCID: PMC4258257.
20. Nelson NP, Weng MK, Hofmeister MG, Moore KL, Doshani M, Kamili S, u.a. Prevention of Hepatitis A Virus Infection in the United States: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices, 2020. *MMWR Recomm Rep*. 3. Juli 2020;69(5):1–38. doi:10.15585/mmwr.rr6905a1 PubMed PMID: 32614811; PubMed Central PMCID: PMC8631741.
21. Wang M, Feng Z. Mechanisms of Hepatocellular Injury in Hepatitis A. *Viruses*. 8. Mai 2021;13(5):861. doi:10.3390/v13050861 PubMed PMID: 34066709; PubMed Central PMCID: PMC8151331.

22. Agrawal A, Singh S, Kolhapure S, Hoet B, Arankalle V, Mitra M. Increasing Burden of Hepatitis A in Adolescents and Adults and the Need for Long-Term Protection: A Review from the Indian Subcontinent. *Infect Dis Ther.* Dezember 2019;8(4):483–97. doi:10.1007/s40121-019-00270-9 PubMed PMID: 31679118; PubMed Central PMCID: PMC6856242.
23. Bower WA, Nainan OV, Han X, Margolis HS. Duration of viremia in hepatitis A virus infection. *J Infect Dis.* Juli 2000;182(1):12–7. doi:10.1086/315701 PubMed PMID: 10882576.
24. Cao G, Jing W, Liu J, Liu M. The global trends and regional differences in incidence and mortality of hepatitis A from 1990 to 2019 and implications for its prevention. *Hepatol Int.* 1. Oktober 2021;15(5):1068–82. doi:10.1007/s12072-021-10232-4
25. Schoch S, Wälti M, Schemmerer M, Alexander R, Keiner B, Kralicek C, u.a. Hepatitis A Virus Incidence Rates and Biomarker Dynamics for Plasma Donors, United States. *Emerg Infect Dis.* November 2021;27(11):2718–824. doi:10.3201/eid2711.204642 PubMed PMID: 34670659; PubMed Central PMCID: PMC8544996.
26. Sattar SA, Jason T, Bidawid S, Farber J. Foodborne spread of hepatitis A: Recent studies on virus survival, transfer and inactivation. *Can J Infect Dis.* 2000;11(3):159–63. PubMed PMID: 18159284; PubMed Central PMCID: PMC2094762.
27. Mbithi JN, Springthorpe VS, Boulet JR, Sattar SA. Survival of hepatitis A virus on human hands and its transfer on contact with animate and inanimate surfaces. *J Clin Microbiol.* April 1992;30(4):757–63. doi:10.1128/jcm.30.4.757-763.1992 PubMed PMID: 1315331; PubMed Central PMCID: PMC265157.
28. Shin E, Kim JS, Oh KH, Oh SS, Kwon M, Kim S, u.a. A waterborne outbreak involving hepatitis A virus genotype IA at a residential facility in the Republic of Korea in 2015. *J Clin Virol.* 1. September 2017;94:63–6. doi:10.1016/j.jcv.2017.07.006
29. Foster MA, Weil LM, Jin S, Johnson T, Hayden-Mixson TR, Khudyakov Y, u.a. Transmission of Hepatitis A Virus through Combined Liver–Small Intestine–Pancreas Transplantation. *Emerg Infect Dis.* April 2017;23(4):590–6. doi:10.3201/eid2304.161532 PubMed PMID: 28322704; PubMed Central PMCID: PMC5367420.
30. Hughes JA, Fontaine MJ, Gonzalez CL, Layon AG, Goodnough LT, Galel SA. Case report of a transfusion-associated hepatitis A infection. *Transfusion (Paris).* September 2014;54(9):2202–6. doi:10.1111/trf.12648 PubMed PMID: 24689888.
31. Severi E, Verhoef L, Thornton L, Guzman-Herrador BR, Faber M, Sundqvist L, u.a. Large and prolonged food-borne multistate hepatitis A outbreak in Europe associated with consumption of frozen berries, 2013 to 2014. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull.* 23. Juli 2015;20(29):21192. doi:10.2807/1560-7917.es2015.20.29.21192 PubMed PMID: 26227370.

32. Jacobsen KH. Globalization and the Changing Epidemiology of Hepatitis A Virus. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 1. Oktober 2018;8(10):a031716. doi:10.1101/cshperspect.a031716 PubMed PMID: 29500305; PubMed Central PMCID: PMC6169986.
33. Jefferies M, Rauff B, Rashid H, Lam T, Rafiq S. Update on global epidemiology of viral hepatitis and preventive strategies. *World J Clin Cases*. 6. November 2018;6(13):589–99. doi:10.12998/wjcc.v6.i13.589
34. World Health Organisation. WHO immunological basis for immunization series: module 18: hepatitis A. World Health Organization; 2019.
35. Anand AC, Nandi B, Acharya SK, Arora A, Babu S, Batra Y, u.a. Indian National Association for the Study of the Liver Consensus Statement on Acute Liver Failure (Part 1): Epidemiology, Pathogenesis, Presentation and Prognosis. *J Clin Exp Hepatol*. 2020;10(4):339–76. doi:10.1016/j.jceh.2020.04.012 PubMed PMID: 32655238; PubMed Central PMCID: PMC7335721.
36. Kim YJ, Lee HS. Increasing Incidence of Hepatitis A in Korean Adults. *Intervirology*. 5. Januar 2010;53(1):10–4. doi:10.1159/000252778
37. Barzaga NG. Hepatitis A shifting epidemiology in South-East Asia and China. *Vaccine*. 18. Februar 2000;18:S61–4. doi:10.1016/S0264-410X(99)00467-3
38. Tufenkeji H. Hepatitis A shifting epidemiology in the Middle East and Africa. *Vaccine*. 18. Februar 2000;18:S65–7. doi:10.1016/S0264-410X(99)00468-5
39. Gabrielli F, Alberti F, Russo C, Cursaro C, Seferi H, Margotti M, u.a. Treatment Options for Hepatitis A and E: A Non-Systematic Review. *Viruses*. 28. April 2023;15(5):1080. doi:10.3390/v15051080 PubMed PMID: 37243166; PubMed Central PMCID: PMC10221699.
40. Robert Koch Institute. Empfehlungen der Ständigen Impfkommission (STIKO) beim Robert Koch-Institut 2025 [Internet]. 2025. doi:10.25646/12971.4
41. Kling K, Külper-Schiek W, Rothe C, Alberer M, Boecken G, Bogdan C, u.a. Empfehlungen der Ständigen Impfkommission (STIKO) und der Deutschen Gesellschaft für Tropenmedizin, Reisemedizin und Globale Gesundheit e.V. (DTG) zu Reiseimpfungen [Internet]. Robert Koch-Institut; 2023 [zitiert 17. Dezember 2025]. Verfügbar unter: <https://edoc.rki.de/handle/176904/10922.4>
42. Jiang X, Kanda T, Nakamoto S, Saito K, Nakamura M, Wu S, u.a. The JAK2 inhibitor AZD1480 inhibits hepatitis A virus replication in Huh7 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 20. März 2015;458(4):908–12. doi:10.1016/j.bbrc.2015.02.058 PubMed PMID: 25704089.
43. Debing Y, Neyts J, Thibaut HJ. Molecular biology and inhibitors of hepatitis A virus. *Med Res Rev*. September 2014;34(5):895–917. doi:10.1002/med.21292 PubMed PMID: 23722879; PubMed Central PMCID: PMC7168461.
44. Sun MB, Jiang YJ, Li WD, Li PZ, Li GL, Jiang SD, u.a. A novel process for production of hepatitis A virus in Vero cells grown on microcarriers in bioreactor.

- World J Gastroenterol WJG. 1. September 2004;10(17):2571–3. doi:10.3748/wjg.v10.i17.2571 PubMed PMID: 15300909; PubMed Central PMCID: PMC4572166.
45. Pérez-Sautu U, Costafreda MI, Caylà J, Tortajada C, Lite J, Bosch A, u.a. Hepatitis A Virus Vaccine Escape Variants and Potential New Serotype Emergence. *Emerg Infect Dis.* April 2011;17(4):734–7. doi:10.3201/eid1704.101169 PubMed PMID: 21470474; PubMed Central PMCID: PMC3377408.
 46. Kanda T, Sasaki R, Masuzaki R, Matsumoto N, Ogawa M, Moriyama M. Cell Culture Systems and Drug Targets for Hepatitis A Virus Infection. *Viruses.* 12. Mai 2020;12(5):533. doi:10.3390/v12050533 PubMed PMID: 32408660; PubMed Central PMCID: PMC7291253.
 47. Aslan AT, Balaban HY. Hepatitis E virus: Epidemiology, diagnosis, clinical manifestations, and treatment. *World J Gastroenterol.* 7. Oktober 2020;26(37):5543–60. doi:10.3748/wjg.v26.i37.5543 PubMed PMID: 33071523; PubMed Central PMCID: PMC7545399.
 48. Pischke S, Hardtke S, Bode U, Birkner S, Chatzikyrkou C, Kauffmann W, u.a. Ribavirin treatment of acute and chronic hepatitis E: a single-centre experience. *Liver Int.* 2013;33(5):722–6. doi:10.1111/liv.12114
 49. Chaudhary RK, Andonov AP. Effect of ribavirin on hepatitis A virus replication in vitro. *Can J Infect Dis J Can Mal Infect.* März 1992;3(2):67–70. doi:10.1155/1992/531837 PubMed PMID: 22529734; PubMed Central PMCID: PMC3328025.
 50. Feld JJ, Jacobson IM, Sulkowski MS, Poordad F, Tatsch F, Pawlotsky J. Ribavirin revisited in the era of direct-acting antiviral therapy for hepatitis C virus infection. *Liver Int.* Januar 2017;37(1):5–18. doi:10.1111/liv.13212 PubMed PMID: 27473533; PubMed Central PMCID: PMC5216450.
 51. Kattakuzhy S, Levy R, Kottilil S. Sofosbuvir for treatment of chronic hepatitis C. *Hepatol Int.* 1. April 2015;9(2):161–73. doi:10.1007/s12072-014-9606-9
 52. Lampejo T. Sofosbuvir in the Treatment of Hepatitis E virus Infection: A Review of in vitro and in vivo Evidence. *J Clin Exp Hepatol.* 2022;12(4):1225–37. doi:10.1016/j.jceh.2022.02.003 PubMed PMID: 35814503; PubMed Central PMCID: PMC9257862.
 53. Friebe P, Boudet J, Simorre JP, Bartenschlager R. Kissing-Loop Interaction in the 3' End of the Hepatitis C Virus Genome Essential for RNA Replication. *J Virol.* Januar 2005;79(1):380–92. doi:10.1128/jvi.79.1.380-392.2005
 54. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 16. Dezember 1983;65(1–2). doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4 PubMed PMID: 6606682.
 55. Hung HY, Lai HH, Lin HC, Chen CY. The impact of sofosbuvir/velpatasvir/voxilaprevir treatment on serum hyperglycemia in hepatitis C virus infections: a systematic review and meta-analysis. *Ann Med.* Dezember 2023;55(1):463–79.

doi:10.1080/07853890.2023.2168745 PubMed PMID: 36655629; PubMed Central PMCID: PMC9858431.

56. Provost PJ, Hilleman MR. Propagation of Human Hepatitis A Virus in Cell Culture in Vitro. *Exp Biol Med*. 1. Februar 1979;160(2):213–21. doi:10.3181/00379727-160-40422
57. Sasaki-Tanaka R, Shibata T, Moriyama M, Kogure H, Hirai-Yuki A, Okamoto H, u.a. Masitinib Inhibits Hepatitis A Virus Replication. *Int J Mol Sci*. 3. Juni 2023;24(11):9708. doi:10.3390/ijms24119708 PubMed PMID: 37298659; PubMed Central PMCID: PMC10253910.
58. Jansen RW, Newbold JE, Lemon SM. Complete nucleotide sequence of a cell culture-adapted variant of hepatitis a virus: Comparison with wild-type virus with restricted capacity for in vitro replication. *Virology*. April 1988;163(2):299–307. doi:10.1016/0042-6822(88)90270-X
59. Zhang H, Chao SP, Ping LH, Grace K, Clarke B, Lemon SM. An Infectious cDNA Clone of a Cytopathic Hepatitis A Virus: Genomic Regions Associated with Rapid Replication and Cytopathic Effect. *Virology*. 1. Oktober 1995;212(2):686–97. doi:10.1006/viro.1995.1526
60. Rajendran R, Lingala R, Vuppu SK, Bandi BO, Manickam E, Macherla SR, u.a. Assessment of packed bed bioreactor systems in the production of viral vaccines. *AMB Express*. 25. April 2014;4:25. doi:10.1186/s13568-014-0025-z PubMed PMID: 24949260; PubMed Central PMCID: PMC4052670.
61. Kanda T, Imazeki F, Nakamoto S, Okitsu K, Fujiwara K, Yokosuka O. Internal ribosomal entry-site activities of clinical isolate-derived hepatitis A virus and inhibitory effects of amantadine. *Hepatol Res*. 2010;40(4):415–23. doi:10.1111/j.1872-034X.2010.00617.x
62. Kanda T, Nakamoto S, Wu S, Nakamura M, Jiang X, Haga Y, u.a. Direct-acting Antivirals and Host-targeting Agents against the Hepatitis A Virus. *J Clin Transl Hepatol*. 28. September 2015;3(3):205–10. doi:10.14218/JCTH.2015.00016 PubMed PMID: 26623267; PubMed Central PMCID: PMC4663202.
63. Jiang W, Muhammad F, Ma P, Liu X, Long G. Sofosbuvir inhibits hepatitis A virus replication in vitro assessed by a cell-based fluorescent reporter system. *Antiviral Res*. Juni 2018;154:51–7. doi:10.1016/j.antiviral.2018.04.007 PubMed PMID: 29653132.
64. Widell A, Hansson BG, Nordenfelt E. A microcarrier cell culture system for large scale production of hepatitis A virus. *J Virol Methods*. Februar 1984;8(1–2):63–71. doi:10.1016/0166-0934(84)90041-7 PubMed PMID: 6200491.
65. Widell A, Hansson BG, Öberg B, Nordenfelt E. Influence of twenty potentially antiviral substances on in vitro multiplication of hepatitis a virus. *Antiviral Res*. 1. März 1986;6(2):103–12. doi:10.1016/0166-3542(86)90030-6
66. Sasaki-Tanaka R, Shibata T, Okamoto H, Moriyama M, Kanda T. Favipiravir Inhibits Hepatitis A Virus Infection in Human Hepatocytes. *Int J Mol Sci*. 27. Februar

2022;23(5):2631. doi:10.3390/ijms23052631 PubMed PMID: 35269774; PubMed Central PMCID: PMC8910232.

67. Shi X, Zhu D, Lou J, Zhu B, Hu A rong, Gan D. Evaluation of a rapid method for the simultaneous quantification of ribavirin, sofosbuvir and its metabolite in rat plasma by UPLC-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 1. Oktober 2015;1002:353–7. doi:10.1016/j.jchromb.2015.08.038 PubMed PMID: 26363369.
68. Daemer RJ, Feinstone SM, Gust ID, Purcell RH. Propagation of human hepatitis A virus in African green monkey kidney cell culture: primary isolation and serial passage. *Infect Immun.* April 1981;32(1):388–93. doi:10.1128/iai.32.1.388-393.1981 PubMed PMID: 6260685; PubMed Central PMCID: PMC350632.
69. Beneduce F, Pisani G, Divizia M, Panà A, Morace G. Complete nucleotide sequence of a cytopathic hepatitis A virus strain isolated in Italy. *Virus Res.* 1. Mai 1995;36(2):299–309. doi:10.1016/0168-1702(95)00009-F
70. Lemon SM, Murphy PC, Shields PA, Ping LH, Feinstone SM, Cromeans T, u.a. Antigenic and genetic variation in cytopathic hepatitis A virus variants arising during persistent infection: evidence for genetic recombination. *J Virol.* April 1991;65(4):2056–65. doi:10.1128/jvi.65.4.2056-2065.1991 PubMed PMID: 1705995; PubMed Central PMCID: PMC240056.

10 Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Jürgen Wenzel, Leiter des Konsiliarlabors für Hepatitis-A-Virus und Hepatitis-E-Virus, und meinem Betreuer Dr. Mathias Schemmerer, Medizinischer Fachvirologe am Institut für Klinische Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums Regensburg, welche mir die Möglichkeit gegeben haben, diese Arbeit durchzuführen. Lieber Jürgen und lieber Mathias, vielen Dank für euer offenes Ohr, eure wissenschaftlichen Ratschläge und eure Unterstützung. Es war mir eine große Freude, das Fachgebiet der Virologie gemeinsam mit euch zu erforschen. Man kann sich keine bessere Betreuung vorstellen.

Ich danke Monika Erl, MTLA des Konsiliarlabors für Hepatitis-A-Virus und Hepatitis-E-Virus, für die große Hilfsbereitschaft, den wissenschaftlichen Input und die großartige Zusammenarbeit. Liebe Monika, die Arbeit mit dir hat mir sehr große Freude bereitet. Die Zusammenarbeit sowie die gemeinsamen Pausen bleiben mir in besonders schöner Erinnerung, deine Herzlichkeit und Hilfsbereitschaft sind für mich wirklich außergewöhnlich.

Ich möchte außerdem dem gesamten Team der Virologie danken, insbesondere der PCR-Abteilung. Vielen Dank für die gute Zusammenarbeit und die nette Aufnahme in eurem Team.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, meinen Eltern, meinen Brüdern, meinen Freundinnen und Mitbewohnerinnen. Vielen Dank für den bedingungslosen Rückhalt und die Unterstützung während meines Studiums und meiner Promotion.

11 Lebenslauf

“Ich 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. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt. Des Weiteren erkläre ich, dass ich die KI-basierten Werkzeuge GPT-5-mini, GPT-3.5 und Gemini 3 Flash zur Rechtschreibprüfung, Unterstützung bei Formulierungen und im Rahmen der Literaturrecherche verwendet habe. Ich bin als Autorin dieser Dissertation für den gesamten Inhalt allein verantwortlich und trage selbstständig dafür Sorge, dass meine Dissertation inhaltlich und formal korrekt ist, die Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis geachtet wurden und alle verwendeten Hilfsmittel korrekt angegeben wurden. Für etwaige Fehler durch den Einsatz von KI bin ich vollumfänglich verantwortlich.“

X

Regensburg, den 25.02.2026 ; Anouk Langer