

HEPATOZELLULÄRE EXPRESSION VON OBERFLÄCHENPROTEINEN DES HEPATITIS-B-VIRUS FÜHRT IN BALB/C MÄUSEN ZUR INHIBITION VON AUTOPHAGIE

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Christoph Sebastian Imiela
aus Berlin

Gießen 2025

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Zentrum für Innere Medizin
Schwerpunkt Gastroenterologie

Gutachterin: Univ.-Prof. Dr. med. Elke Roeb, MHAC

Gutachter: Prof. Dr. med. Ludger Fink

Tag der Disputation: 18.11.2025

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	DIE LEBER	2
1.1.1	Anatomischer Aufbau	2
1.1.2	Histologischer Aufbau	3
1.1.3	Leberschädigung (Inflammation/Fibrose/Zirrhose)	5
1.2	AUTOPHAGIE	5
1.2.1	Makroautophagie	7
1.2.2	Proteinchemischer Ablauf	8
1.2.3	Selektive Makroautophagie	12
1.2.4	Regulation von Autophagie	13
1.2.5	Messung von Autophagie	16
1.3	HEPATITIS B	19
1.3.1	Erreger: Hepatitis-B-Virus (HBV)	20
1.3.2	Verlauf der Hepatitis B Erkrankung	24
1.3.3	Diagnostik der Hepatitis B	26
1.3.4	Therapie und Prävention	27
1.4	INTERFERONANTWORT	28
1.5	ER-STRESS UND UNFOLDED-PROTEIN-RESPONSE	31
1.5.1	IRE1 α – Signalweg	33
1.5.2	ATF6 – Signalweg	33
1.5.3	PERK – Signalweg	34
1.5.4	ER-Stress und Tumorgenese	36
1.5.5	ER-Stress und Autophagie	36
1.6	IMMUNPRIMING DER MÄUSE	36
1.7	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	37
2	MATERIAL UND METHODEN	38
2.1	VERSUCHSTIERE	38
2.2	GERÄTE UND MATERIALIEN	41
2.3	SOFTWARE	49
2.4	METHODEN	50
2.4.1	Westernblot Analyse (WB)	50
2.4.2	mRNA-Analyse mittels qRT-PCR	53
2.4.3	Histologie, Immunhistochemie (IHC), Immunofluoreszenz (IF)	56
2.5	STATISTIK	58
3	ERGEBNISSE	59
3.1	VALIDIERUNG DES MAUSMODELLS: DIE EXPRESSION VON HBS IST UNABHÄNGIG VOM GENOTYP UND DEM IRF3/7 KO	59
3.2	DER IRF3/7 DOPPEL-KNOCKOUT VERÄNDERT DIE AGGREGATBILDUNG VON HBS	64
3.3	HBS FÜHRT ZU EINER AKTIVIERUNG DER INTERFERONANTWORT IN BALB/c	69
3.3.1	HBs führt zur vermehrten Expression von ISG15 in BALB/c	69
3.3.2	HBs führt zur vermehrten Expression von OAS1a in BALB/c	71

3.3.3	<i>HBs führt zur vermehrten Expression von IFIT1 in BALB/c</i>	73
3.4	HBs FÜHRT ZU ER-STRESS UND UPR	74
3.4.1	<i>HBs führt zur vermehrten Expression von ATF3</i>	74
3.4.2	<i>HBs führt zur vermehrten Expression von CHOP</i>	75
3.5	HBs BEEINFLUSST INTERFERONABHÄNGIG AUTOPHAGIE	78
3.5.1	<i>HBs führt zu einer p62-Akkumulation</i>	78
3.5.2	<i>HBs führt zu vermehrter LC3-II Akkumulation</i>	81
3.5.3	<i>Knockout der Typ-I-Interferonantwort führt zu vermindertem LC3-II/I Quotient</i>	82
3.5.4	<i>Dysregulation der Autophagie in unserem Modell</i>	83
3.6	DIE REAKTION AUF HBs IST ABHÄNGIG VOM GENETISCHEN HINTERGRUND	88
4	DISKUSSION	96
4.1	HBs – VERIFIZIERUNG DES MAUSMODELLS	96
4.2	HBs UND PLIN2 – AUFBAU UND VISUALISIERUNG DER MILCHGLASHEPATOZYTEN	97
4.2.1	<i>Die Bildung von GGHs ist Interferonabhängig</i>	98
4.3	DARSTELLUNG DER INTERFERONANTWORT UND DES IRF3/7 KO	98
4.3.1	<i>HBs induziert ISG15 als Marker der Interferonantwort</i>	98
4.3.2	<i>HBs induziert OAS1A als Marker der Interferonantwort</i>	99
4.3.3	<i>HBs induziert IFIT1 als Marker der Interferonantwort</i>	100
4.4	INDUKTION VON ER-STRESS UNABHÄNGIG VOM IRF3/7 KO	100
4.4.1	<i>HBs induziert ATF3 als Marker der der UPR</i>	100
4.4.2	<i>HBs induziert CHOP als Marker der der UPR</i>	102
4.5	p62 – BESTIMMUNG DES ABBAUS	103
4.6	LC3B – BILDUNG DER AUTOPHAGOSOMEN	104
4.7	DYSREGULATION DER AUTOPHAGIE IN UNSEREM MODELL	106
4.7.1	<i>Regulation von mTORC1</i>	106
4.7.2	<i>LAMP-1/2 zeigen Akkumulation von Autophagosomen</i>	106
4.7.3	<i>Regulation von Beclin-1</i>	107
4.7.4	<i>Ubiquitinierung von Proteinen</i>	107
4.8	BALB/c vs. C57BL/6 – ABHÄNGIGKEIT DER IMMUNANTWORT VOM GENOTYP	109
5	ZUSAMMENFASSUNG (DEUTSCH)	111
6	SUMMARY (ENGLISH)	112
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	113
8	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	118
9	TABELLENVERZEICHNIS	119
10	LITERATURVERZEICHNIS	120
11	ANHANG	131
11.1	PUBLIKATIONSVERZEICHNIS	131
11.3	ERKLÄRUNG ZUR DISSERTATION	132
11.4	DANKSAGUNG	133

1 Einleitung

Die Hepatitis B ist weltweit eine der häufigsten Infektionen, die auch in der heutigen Zeit einen lebensbedrohlichen Verlauf nehmen kann. Insbesondere durch die Chronifizierung der Erkrankung mit schweren Spätfolgen, wie der Leberzirrhose oder den hepatozellulären Karzinomen (HCC), hat die Hepatitis B einen relevanten Einfluss auf die globale Gesundheit.

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) geht davon aus, dass im Jahr 2022 3,5% der Weltbevölkerung chronisch an Hepatitis B erkrankt waren (254 Millionen), sich jährlich 1,2 Millionen Menschen infizieren und im Jahr 2022 1,1 Millionen Menschen an den Folgen der Infektion gestorben sind.¹⁻³

Dank verbesserter Aufklärung, Prävention, Impfung, Diagnostik und Therapie wurden zwischen 1990 und 2019 die tödlichen Verläufe der mit Hepatitis-B-Virus (HBV) assoziierten Erkrankungen um 5,9% reduziert.¹ Dennoch bedarf die chronische Hepatitis B (CHB) meist einer lebenslangen Therapie, da auch unter den aktuellen Behandlungen eine Heilung selten ist.^{1,2,4}

Ziel ist es daher, die komplexe Pathophysiologie der Krankheit und insbesondere der chronischen Infektion besser zu verstehen. Hierzu wurden ein in-vivo-Mausmodell sowie humanes Lebergewebe von Patienten mit CHB untersucht. Das verwendete transgene Mausmodell exprimiert Hepatitis-B-Oberflächenantigene (HBs) in der Leber und bildet damit zentrale Aspekte einer CHB nach.⁵⁻⁸

Ein klassischer histologischer Marker der CHB sind die Milchglashepatozyten (Ground Glass Hepatocytes, GGHs), die unter anderem durch Akkumulation von HBs im endoplasmatischen Retikulum (ER) entstehen.⁹⁻¹¹ Die Akkumulation von HBs führt zu einer zytotoxischen Reaktion und ist mit der Entstehung von Leberfibrose und hepatozellulären Karzinomen (HCC) assoziiert.¹²⁻¹⁴

Die Leberfibrose stellt einen wesentlichen prognostischen Marker chronischer Lebererkrankungen dar.¹⁵ Ihr Fortschreiten zur Leberzirrhose kann zu weiteren lebensbedrohlichen Komplikationen führen, wie einem Leberversagen, einer portalen Hypertension und weiteren Begleiterkrankungen.^{16,17} Ein besseres Verständnis der molekularen Mechanismen, die zur Fibrose führen, ist daher von hoher klinischer Relevanz.

Unter physiologischen Bedingungen werden fehlgefaltete oder übermäßig angesammelte Proteine durch zelluläre Abbauprozesse wie das Proteasom oder die Autophagie eliminiert.^{18,19} Das Auftreten von GGHs im Mausmodell deutet jedoch auf einen gestörten Abbau hin. Deshalb wurde die Rolle der Autophagie als zentrales abbauendes System näher untersucht.

Die Autophagie wird durch verschiedene zelluläre Stressmechanismen reguliert. Dazu zählen der durch Proteinakkumulation ausgelöste ER-Stress, die folgende Unfolded-Protein-Response sowie die Typ-I-Interferonantwort.^{19,20} Diese Prozesse werden im Rahmen einer HBV-Infektion aktiviert und können die Autophagie beeinflussen. Zur Differenzierung der Rolle der Interferonantwort wurde in BALB/c Mäusen die Typ-I-Interferonantwort durch einen Knockout der Transkriptionsfaktoren IRF3 und IRF7 (IRF3/7 KO) gezielt ausgeschaltet.²¹ Neben der Interferonantwort wurde auch der Einfluss des genetischen Hintergrunds untersucht. Dazu wurden BALB/c Mäuse, welche eine erhöhte Fibroseneigung zeigen, mit C57BL/6 Mäusen verglichen, welche als fibroseresistent gelten.^{8,22} Der Vergleich ermöglicht Rückschlüsse auf die Auswirkungen des Genotyps und des unterschiedlichen Immunprimings auf Fibrose, ER-Stress, Interferonantwort und Autophagie.

1.1 Die Leber

Die Leber (*Hepar*) übernimmt als zentrales Stoffwechselorgan eine bedeutende Rolle in der Verdauung, als exokrine Drüse, Speicherorgan, in der Entgiftung und in der Synthese. Insbesondere produziert die Leber zahlreiche Proteine des Blutes wie Albumin oder die Gerinnungsfaktoren.²³

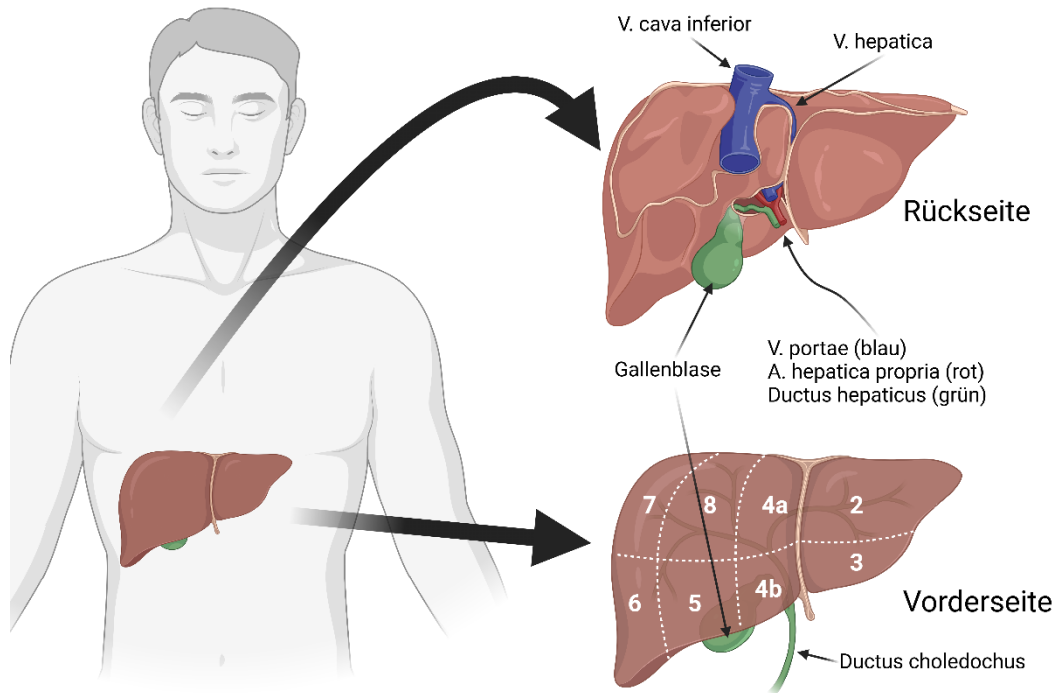
Sie erhält über die Pfortader (Vena (V.) portae) nährstoffreiches Blut vom Gastrointestinaltrakt zur Weiterverarbeitung. Dabei wird z. B. Glukose als Glykogen gespeichert, Plasmaproteine wie Albumin oder Gerinnungsfaktoren werden aus Aminosäuren synthetisiert und Lipide in Lipoproteinen gebündelt und ins Blut abgegeben. Entscheidend ist die Leber auch für die Entgiftung, um so Toxine sowie Medikamente abzubauen und über die Galle auszuschleiden. Darüber hinaus werden in der Leber zahlreiche Prodrugs durch Metabolisierung aktiviert. Die Leber ist in der Lage, ihre Produkte entweder direkt ins Blut abzugeben oder – wie im Fall der Gallenflüssigkeit – Gallensäuren für die Verdauung sowie schwer wasserlösliche Substanzen in den Darm zu sezernieren.²³

1.1.1 Anatomischer Aufbau

Die Leber des Menschen hat im Durchschnitt ein Gewicht von 1,4-1,8 kg, eine dunkel-rotbraune Farbe, eine weiche Konsistenz und sie befindet sich im rechten Oberbauch.²³ Makroskopisch wird die Leber meist in den rechten und linken Leberlappen eingeteilt.²⁴ Entscheidender ist jedoch die funktionelle Gliederung in 8 Segmente, welche durch die gemeinsame Versorgung definiert ist (siehe Abbildung 1). Dabei ziehen die Äste der Vena (V.) portae, die das nährstoffreiche und sauerstoffarme Blut vom Darm liefern, gemeinsam mit den Ästen der Arteria (A.)

hepatica propria, die die Sauerstoffversorgung sicherstellen, sowie den Ästen des Ductus hepaticus, welche die Gallenflüssigkeit sammeln und ableiten. Dem gegenüber steht der venöse Abfluss über die Vv. hepaticae, durch die das gefilterte Blut in den Körperkreislauf in die V. cava inferior zurückgeführt wird.²³ Die makroskopische Ansicht ist in der folgenden Grafik dargestellt.

Abbildung 1: Makroskopische Leberanatomie



Eigene Darstellung der Leberanatomie in Anlehnung an Aumüller²³ und weitere Quellen,^{24,25} erstellt mit BioRender.²⁶ Links ist eine Projektion auf den Körper zu sehen. Rechts oben befindet sich eine Ansicht von dorsal. Rechts unten ist eine Ansicht von ventral dargestellt, und zwar mit einer Kennzeichnung der Lebersegmente und einer Darstellung des Gallengangsystems.

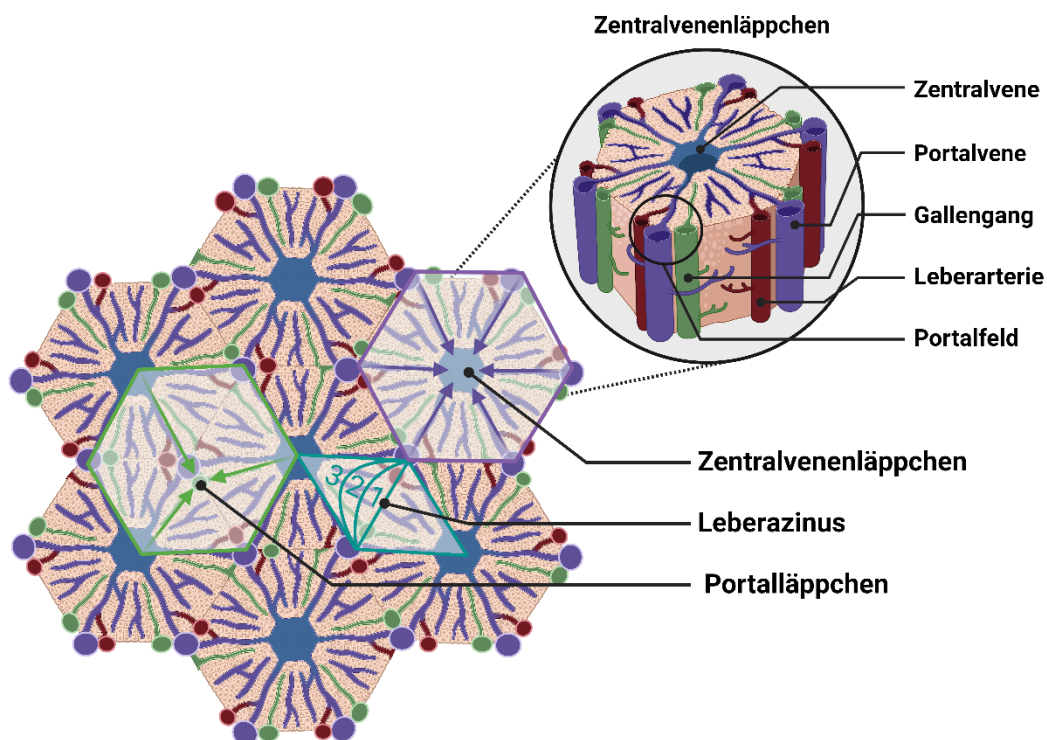
1.1.2 Histologischer Aufbau

Neben dem makroskopischen Aufbau ist insbesondere die mikroskopische Anatomie (Abbildung 2) für das Verständnis der verschiedenen Funktionen entscheidend. Dabei verlaufen die Äste der Leberarterie und V. Portae immer gemeinsam mit einem Gallengang. Dies wird als Glisson-Trias bezeichnet, welche zusammen mit einer Lebervene ein Portalfeld bildet und die Leber in ein hexagonales Muster aufteilt. Dabei wird das nährstoffreiche Blut der V. portae mit dem sauerstoffreichen Blut der A. hepatica vermischt und strömt über das Portalfeld über die Sinusoide, besondere, erweiterte Kapillaren der Leber, zu den Lebervenen. Dies bedingt, dass die stoffwechselintensiven Prozesse in den Hepatozyten der

Zone 1 des Leberazinus ablaufen, da dort das Blut die höchste Sauerstoffkonzentration hat. Diese nimmt Richtung Zentralvene stetig ab, was eine Anpassung des Leberstoffwechsels zur Folge hat. Die Sinusoide laufen dabei radiär auf die Zentralvene zu und definieren damit das zugehörige Zentralvenenläppchen. Dem entgegengesetzt laufen die Gallengangskanäle zum Portalfeld. Die Sinusoide sind besonders weite Kapillaren, welche von dünnem, perforiertem Endothel ausgekleidet sind, um eine besonders geringe Diffusionsbarriere darzustellen. Dadurch entsteht um das Endothel ein kleiner Spalt (Disse-Raum), in dem der Stoffaustausch stattfindet und sich die Leber-Sternzellen (früher Ito-Zellen) befinden. Die Sternzellen sind ruhende Myofibroblasten welche physiologische Lipide und Vitamin A speichern, jedoch auch pathologisch bei Inflammation zur Fibrosierung der Leber führen können. Ebenfalls in den Sinusoiden findet man die Kupffer-Zellen, gewebständige Makrophagen, die Fremdpartikel aus dem Blut aufnehmen und abbauen, sowie Pit-Zellen, lebespezifische Lymphozyten, als Teil der gezielten Immunabwehr.

Den Großteil der Leberzellen machen jedoch die Hepatozyten aus, welche die klassischen Leberfunktionen wie Entgiftung, Synthese von Blutkomponenten und Galle übernehmen. Dazu haben die Hepatozyten zwei Pole, einen dem Blut und einem dem Gallengang zugewandt, um beides trennen zu können.^{23,25,27}

Abbildung 2: Mikroskopischer Aufbau der Leber



Eigene schematische Darstellung der Leberhistologie, basierend auf Lüllmann-

Rauch²⁷ und weiteren Quellen,^{23,25,28} erstellt mit BioRender.²⁶ Die Lebervenen sind blau dargestellt, die Arterien rot und die Gallengänge grün. Die Einflussfelder sind transparent gekennzeichnet.

1.1.3 Leberschädigung (Inflammation/Fibrose/Zirrhose)

Bei einer chronischen Entzündung (chronischer Hepatitis), kommt es zu einer Regeneration mit Fibrosierung, die im Verlauf in eine irreversible Zirrhose übergehen kann.

Die Auslöser der Hepatitis und der folgenden Zirrhose sind vielfältig und gliedern sich überwiegend in folgende Gruppen: Noxen, infektiös, autoimmun, genetisch, biliär oder vaskulär/kardial.^{25,29} In Deutschland überwiegen als Ursachen einer Steatohepatitis das metabolische Syndrom sowie der Alkoholkonsum. Dabei liegt die Prävalenz der metabolisch assoziierten Steatose (MASLD) als Vorstufe der Steatohepatitis in Deutschland bei 23% der Allgemeinbevölkerung. Eine metabolisch assoziierte Steatohepatitis (MASH) liegt bei 4% vor.^{15,30} Die weiteren Ursachen, wie HBV- und HCV-Infektion oder Monogenetische Erkrankungen, sind in Deutschland seltener.^{25,29} Durch die anhaltende Inflammation wandeln sich vornehmlich die hepatischen Sternzellen (früher Ito-Zellen) von Fettspeicherzellen zu Myofibroblasten um, welche dann Kollagen bilden. Abhängig von der Ursache entstehen unterschiedliche Muster des Kollagens. Bei der Hepatitis B entsteht eine periportale Fibrose, die im Verlauf in eine Maschendrahtfibrose übergehen kann, wenn die Leberzellgruppe von Bindegewebe ummantelt wird.²⁵ Das Vollbild der Fibrose, die Leberzirrhose, ist durch Leberzell- und Funktionsverlust sowie Zerstörung der Organarchitektur gekennzeichnet und hat im Endstadium lediglich eine 1-Jahres-Überlebensrate von 35%, was die Schwere des Krankheitsbilds verdeutlicht.³¹ Im Gegensatz zur Zirrhose sind die Anfangsstadien der Fibrose reversibel, sodass durch Behandlung der Ursache, wie HBV, auch eine Besserung der Leberfunktion erzielt wird.^{31,32}

1.2 Autophagie

Die Autophagie (griechisch autóphagos „sich selbst verzehrend“)³³ ist ein für die zelluläre Homöostase relevanter abbauender Stoffwechselweg eukaryotischer Zellen. Dabei kann Autophagie genutzt werden, um z. B. Aminosäuren (AS) in einer Hungersituation bereitzustellen oder gezielt oder ungezielt fehlgefaltete oder defekte Proteine, Organellen wie Mitochondrien oder Pathogene wie Viren abzubauen.^{34–38} Die Zelle kann Proteine über das Proteasom, einen protein-degradierenden Proteinkomplex, oder die Autophagie abbauen. Sowohl das Proteasom als auch Autophagie bauen, Ubiquitin-vermittelt, selektiv Proteine ab.

Jedoch ist die Autophagie deutlich vielseitiger, da das Proteasom lediglich Proteine degradieren kann.³⁶ Bei dem gezielten Abbau werden Proteine mit dem kleinen Markerprotein Ubiquitin durch verschiedene Ubiquitin-Protein-Ligasen für den Abbau gekennzeichnet. Ubiquitin kann dabei sowohl als Mono-, Oligo- oder Polymer an eine oder mehrere Stellen (Multi) an das Zielprotein gebunden werden. Bei der Poly-Ubiquitinierung ist es darüber hinaus entscheidend, wie die Ubiquitin-Moleküle verknüpft sind. Ubiquitin hat mehrere Bindungsstellen, mit denen es an Proteine gebunden werden kann. Das Muster der Verbindung entscheidet über den bevorzugten Abbauweg. Die Verbindungen werden nach der Aminosäure und deren Position in der Sequenz des Ubiquitins benannt. Bei Verbindung via Lysin 48 (K48) wird das markierte Protein überwiegend über das Proteasom abgebaut. Bei Verbindung via Lysin 63 (K63) geschieht der Abbau primär über Autophagie und letztlich über das Lysosom.^{39,40}

Die Autophagie wird in drei Subtypen eingeteilt: Makroautophagie, Mikroautophagie und chaperon-vermittelte Autophagie. Klassischerweise wird unter „Autophagie“ die Makroautophagie verstanden, bei der sich eine Autophagosomenmembran um die zum Abbau markierten Zellinhalte schließt und damit ein Autophagosom bildet. Dieses fusioniert mit einem Lysosom zum Autophagolysosom.⁴¹

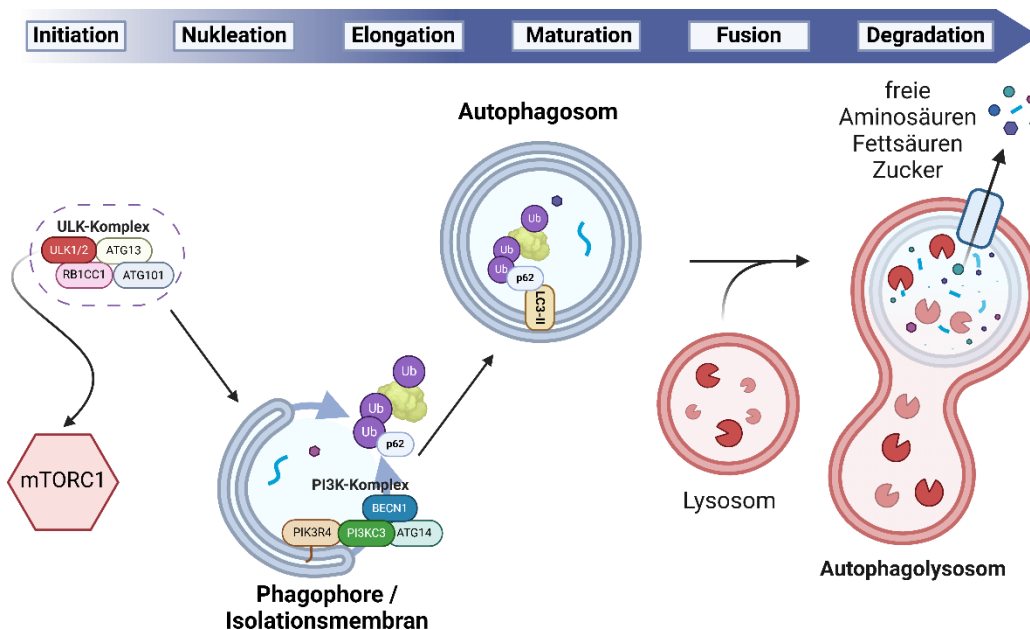
Bei der Mikroautophagie wird Zytoplasma direkt durch Ausstülpungen des Lysosoms in das Zytoplasma aufgenommen. Zwar finden sich in tierischen Zellen keine genauen Homologe der Mikroautophagie, ein vergleichbarer Prozess ist jedoch beschrieben. Dabei wird durch Ausstülpung Zytoplasma in Endosomen, die Vorstufe der Lysosomen, aufgenommen.⁴¹

Chaperone sind Proteine, welche als Faltungshelfer anderen Proteinen helfen, die richtige Sekundärstruktur zu finden. Bei der chaperon-vermittelten Autophagie (chaperone-mediated-autophagy: CMA) werden fehlgefaltete Proteine durch Chaperone, insbesondere Hitzeschockprotein 70 (Hsp70), entfaltet, zu Lysosomen transportiert und insbesondere LAMP-2A (lysosome-associated membrane protein type 2A), vermittelt durch die Membran, in das Lysosom geschleust.^{41,42} Die CMA wird bei Nährstoffmangel, oxidativem Stress und Proteotoxizität (Proteotoxicity: Toxizität durch fehlgefaltete oder aggregierte Proteine, welche ultimativ zum Zelltod führen kann.)⁴³ induziert, ist jedoch auf den Abbau von Proteinen limitiert.^{41,44} Die CMA arbeitet dabei parallel zur Makroautophagie. Wird ein System blockiert, wird das andere kompensatorisch stimuliert. Im Gegensatz zur Makro- und Mikroautophagie gibt es die CMA nur bei Säugetieren und nicht bei Hefen.^{45,46}

1.2.1 Makroautophagie

Diese Arbeit konzentriert sich auf die Makroautophagie (Abbildung 3) als wichtigstem Mechanismus der Autophagie. Dabei wird eine Doppelmembran gebildet, die als Phagophore oder Isolationsmembran (IM) bezeichnet wird. Sie umschließt Zytoplasma und bildet ein Vesikel, der als Autophagosom bezeichnet wird. Im Verlauf fusioniert es mit einem Lysosom zum Autophagolysosom, in dem der Inhalt abgebaut wird. Dabei ist als Zwischenschritt auch die Fusion des Autophagosoms mit einem Endosom möglich, das als Amphisom bezeichnet wird. Neben dem unselektiven Einschluss von Zytoplasma findet dabei jedoch auch ein selektiver Einschluss statt. Dabei werden z. B. durch Poly-Ubiquitinierung (Verlinkt über die Bindungsstelle des Ubiquitins: K63) markierte Proteine mit phosphoryliertem p62 (ubiquitin-binding protein p62 [62kDa]; SQSTM1) an LC3-II (Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3; MAP1LC3) gebunden und damit an die Innenmembran des Autophagosoms geheftet.

Abbildung 3: Schematische Darstellung der Makroautophagie



Eigene schematische Darstellung der selektiven Makroautophagie zusammengestellt aus mehreren Quellen,^{19,20,44,47} erstellt mit BioRender.²⁶ Die Initiation beginnt, wenn der mTOR-Komplex 1 (mTORC1) vom ULK-Komplex dissoziiert. mTORC1 (mechanistic Target of Rapamycin Complex 1) ist ein zentraler Regulator, der Zellwachstum und Stoffwechsel in Abhängigkeit von Nährstoffen, Energie und Wachstumsfaktoren steuert. So wird auch der ULK-Komplex (benannt nach Unc-51 like autophagy activating kinase 1/2) als wichtiges Schlüsselenzym der Initiation durch mTORC1 reguliert. In der Phase der Nukleation werden die weiteren Faktoren rekrutiert. In der Elongation wird unter anderem durch den PI3K-Komplex

die Phagophore erweitert. Ubiquitiniertes Substrat, das durch p62 markiert ist, wird durch membrangebundenes LC3-II an die Membran geheftet. In der Reifung (Maturation) schließt sich das Autophagosom (AP), wird modifiziert und entlang der Mikrotubuli zu einem Lysosom transportiert, mit dem es zum Autophagolysosom (AL) fusioniert. Die lysosomalen Enzyme benötigen ein saures Milieu. Daher werden kontinuierlich Wasserstoffionen (H^+) in das Innere der Lysosomen gepumpt, sodass in der Degradationsphase der Inhalt der AL durch die Enzyme gespalten werden kann. Die Spaltprodukte werden ins Zytosol abgegeben.

Weitere Abkürzungen: ULK1/2: Unc-51 like autophagy activating kinase 1/2; ATG13, ATG14 und ATG101: Autophagy-related protein 13, 14 und 101; RB1CC1: RB1[Retinoblastom-Protein]-inducible coiled-coil protein 1; PI3K-Komplex: phosphatidylinositol 3-kinase Komplex; BECN1: Beclin-1; PIK3C3: Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3; PIK3R4: Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit 4; p62: ubiquitin-binding protein p62; Ub: Ubiquitin; LC3: MAP1LC3: ATG8 Homolog; LC3-II: aktivierte, membranständige Form von LC3.

1.2.2 Proteinchemischer Ablauf

Die genauen Protein-Protein-Interaktionen sind Gegenstand aktueller Forschung und nicht abschließend geklärt. Im Nachfolgenden ist die Autophagie, wenn nicht anderweitig gekennzeichnet, bei der Maus bzw. bei Säugetieren beschrieben, da es trotz der starken Konservierung dennoch Unterschiede zwischen verschiedenen Spezies gibt. Zur besseren Übersichtlichkeit werden die Hauptpathways beschrieben und Autophagy-related-Gene als ATG, entsprechend der Nomenklatur, fortlaufend bezeichnet.^{48,49} In der Regel wird mit ATG jedoch meist das zugehörige funktionelle Protein gemeint, welches den gleichen ATG-Code trägt. Wenn nicht weiter angegeben, beziehen sich Bezeichnungen, wie z. B. ISG15, auf das humane Protein. Dabei werden Abkürzungen komplett großgeschrieben. Das zugehörige Gen bzw. mRNA werden entsprechend gängiger Nomenklatur kursiv geschrieben (*ISG15*).⁵⁰ Bei Mäusen werden die Proteine ebenfalls großgeschrieben (*ISG15*), bei Genen oder mRNA wird nur der erste Buchstabe als Majuskel verwendet und die Bezeichnung ebenfalls kursiv geschrieben (*Isg15*).⁵¹ Ist ein ganzer Absatz kursiv gedruckt, werden Gene/mRNA im Text als solche gekennzeichnet. Viele Proteine haben zahlreiche Synonyme, was den Vergleich mit weiterer Literatur erschwert. Es werden im Kontext der Autophagie übliche Formen verwendet und im Abkürzungsverzeichnis die Entrez-IDs der jeweiligen humanen Proteine angegeben.

Die Makroautophagie läuft in teilweise parallel verlaufenden Phasen ab: Initiation, Nukleation, Elongation, Reifung, Fusion und Degradation.

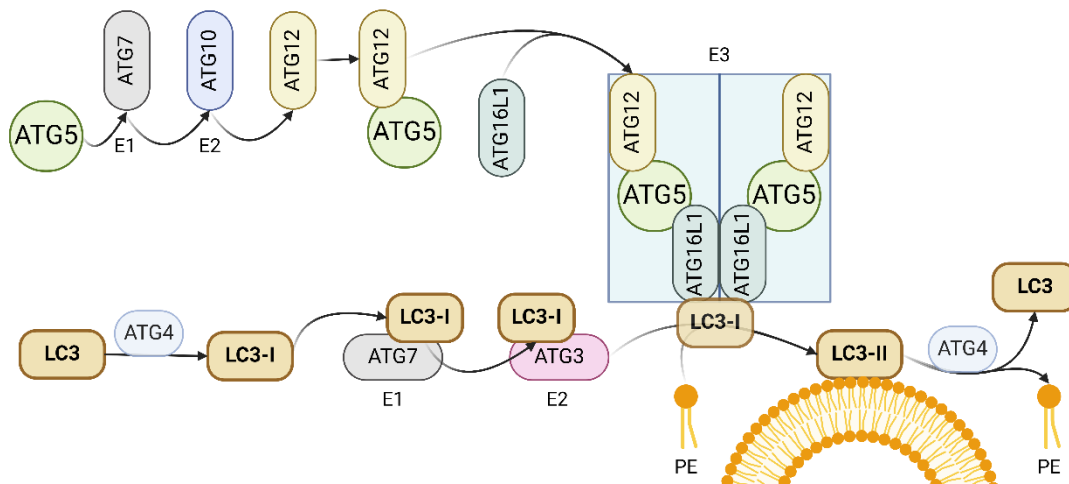
Initiation: Der ULK1/2-ATG13-RB1CC1-ATG101 Komplex (ULK-Komplex) wird via Bindung und Phosphorylierung durch mTORC1 (mechanistic target of rapamycin complex 1) konstitutiv gehemmt. Die AMPK (AMP-activated protein kinase) kann bei niedrigen ATP-Levels mTORC1 und die Bindung an den ULK-Komplex hemmen und dadurch Autophagie stimulieren.^{19,20}

Nukleation: Der PI3K (class III phosphatidylinositol 3-kinase) Komplex ist entscheidend für die Nukleation und Rekrutierung weiterer Autophagie-Mediatoren. Der PI3K-Komplex , bestehend aus ATG14-BECN1-PIK3C3-PIK3R4, wird durch verschiedene Mediatoren reguliert, die teilweise direkt an den Komplex binden, oder wie BCL2, welches freies BECN1 bindet, um die Bildung des Komplexes zu hemmen.^{19,20} Die Plasmamembran der Autophagosomen wird dabei aus dem Membran des ER rekrutiert.^{34,52} Die genaue Verbindung des ULK- mit dem PI3K-Komplex ist dabei weiter unklar.⁴⁷

Elongation: Zur Vergrößerung der Phagophore sind mehrere Proteinkomplexe notwendig. Der ATG12-ATG5-ATG16L1-Komplex besteht aus den benannten Proteinen, die mithilfe von ATG7 und ATG10 als E1- bzw. E2-Ligasen die Komplexbildung katalysieren. Dieser Komplex ist entscheidend für die Konjugation von LC3 als E3-Ligase, dargestellt in Abbildung 4.

LC3 ist ein tierisches Homolog zu ATG8. LC3 wird durch ATG4 aktiviert (zu LC3-I) und dann ähnlich wie Ubiquitin über drei Schritte mittels Ligasen auf das Zielmolekül übertragen. Im Gegensatz zu Ubiquitin wird LC3 jedoch auf ein Phosphatidylethanolamin (PE) übertragen, wodurch das LC3 an die Autophagosomenmembran gebunden wird. Dieses membranständige LC3 wird als LC3-II bezeichnet und dient auf der Innenseite der Membran als Ankerpunkt für p62-markiertes Autophagiesubstrat. ATG4 kann LC3-II auch von der Membran abspalten, wobei LC3 frei wird. Das geschieht überwiegend an der Außenseite der Membran, da die Interaktion durch die Krümmung der Membran sowie die Bindung von LC3-II an p62 stereotaktisch behindert wird.^{53,54} So wird das abzubauen Substrat selektiv an die Innenseite der Membran gebunden.^{53,54}

Abbildung 4: Das LC3-Konjugations-System



Eigene Darstellung in Anlehnung an Parzych¹⁹ und weitere Quellen,^{53,54} erstellt in BioRender.²⁶ Die Bildung von membranständigem LC3-II funktioniert ähnlich wie die Ubiquitinierung durch Ubiquitin-Ligasen. Bei Ubiquitinierung wird das Protein über drei Schritte an die Zielstruktur gebunden. Im ersten Schritt wird dabei Ubiquitin unter Spaltung von ATP an die E1-Ubiquitin-Ligase gebunden, die es an die E2-Ligase transferiert. Die E2-Ligase überträgt das Ubiquitin an die E3-Ligase, die es auf die Zielstruktur überträgt, bei Ubiquitin auf das abzubauenende Substrat. Bei der Bildung von LC3-II sind hier zwei den Ubiquitin-Ligasen ähnliche Systeme vorhanden. LC3 wird von ATG4 zu LC3-I prozessiert, um ein c-terminales Glycin freizulegen. LC3-I wird auf ATG7 übertragen, ein E1-Ubiquitin-Ligase-ähnliches Enzym. LC3-I wird dann auf die E2-like Ligase ATG3 übertragen und dann auf die E3-like Ligase Komplex (ATG12–ATG5–ATG16L1-Konjugations-Komplex). Dieser überträgt LC3-I auf ein Phosphatidylethanolamin (PE), wodurch es membranständig wird und als LC3-II bezeichnet wird. ATG4 kann auch die Spaltung von LC3-II und dem PE katalysieren, wodurch LC3 von der Membran gelöst wird.

Der ATG12–ATG5–ATG16L1-Konjugations-Komplex wird selbst durch ein Ubiquitin-Ligase-ähnliches System gebildet. Dabei wird ATG5 auf die E1-like Ligase ATG7 und dann auf die E2-like Ligase ATG10 übertragen, welche es final auf ATG12 überträgt. Der Komplex aus ATG12 und ATG5 bindet dann ATG16L1. Zwei dieser Komplexe dimerisieren zu dem als E3-like Ligase ähnlichen Komplex, der LC3-I an einen PE überträgt.

Weitere Abkürzungen: ATG3/4/5/7/10/12/16L1: Autophagy-related protein 3/4/5/7/10/12/16L1; LC3: MAP1LC3: ATG8 Homolog; LC3-I: aktivierte Form von LC3; LC3-II: aktivierte, membranständige Form von LC3, auf Autophagosomenmembran; PE: Phosphatidylethanolamin.

Stimuliert durch den ULK- und den PI3K-Komplex wird ATG9 an die Membran der Phagophore rekrutiert. ATG9 ist ein Phospholipidtranslokator (Scramblase), der Phospholipide zwischen Membranen transportieren kann und so Phospholipide aus der Membran des ER zur Phagophore transportiert, damit diese wächst.⁵²

Die wachsende Membran wird dabei durch ein komplexes Zusammenspiel der Proteine auf der Membran zu einer Kugel geformt. Vermittelt insbesondere durch die ATG8 Homologe LC3B und GABARAPL2 wird die Phagophore geschlossen und das Autophagosom gebildet.⁵⁵⁻⁵⁷

Reifung (Maturation): Die Reifung ist abhängig von Modifikationen des PI3K-Komplexes. Wird die Beclin-1-Untereinheit durch das Rubicon-Protein gebunden, hemmt dies die Reifung. Durch Bindung von UVRAG (UV irradiation resistance-associated gene) wird die GTPase Rab7 aktiviert, welche für die Fusion notwendig ist. Aktuellere Studien legen nahe, dass dabei mehrere Proteine der Rab-Familie beteiligt sind, wie Rab22 und Rab24.^{20,47}

Die Autophagosomen werden durch Kinesine entlang der Mikrotubuli zu den Lysosomen transportiert.⁵⁵ Daher hemmen Zytostatika wie Vincaalkaloide, auch den Abbau der Autophagosomen und führen zu deren Akkumulation.⁵⁸ Für den Transport bedient sich die Autophagie dabei dem ESCRT (endosomal sorting complexes required for transport). Insbesondere ESCRT III, welches den PI3K-Komplex bindet, hat dabei eine entscheidende Rolle.⁴⁷

Fusion: Das Verschmelzen des Autophagosoms mit dem Lysosom zum Autophagolysosom ist über SNARE-Proteine (soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor) vermittelt. Für Autophagie sind insbesondere die VAMP3, VAMP7, VAMP8 und VAMP9 (Vesicle-associated membrane protein) sowie Syntaxin 17 gemeinsam mit SNAP29 (Synaptosomal-associated protein 29) relevant.^{19,47,59}

Degradation und lysosomaler Abbau: Für den Abbau benötigen die Enzyme der Lysosomen ein saures Milieu. Daher werden mittels ATPasen Wasserstoffionen (H⁺) in die Lysosomen transportiert. Eine Hemmung der ATPasen, z. B. durch Bafilomycin A1, führt ebenso wie Defekte der lysosomalen Hydrolasen zur Akkumulation von Autophagosomen und zur Hemmung des Flux.⁴⁷ Der Flux (autophagic flux) ist das Maß der Degradation durch Autophagie. Der Flux ist die umfassendste Kenngröße, um die Effektivität der Autophagie zu bestimmen, da er die effektive Summe aller stimulierenden und hemmenden Faktoren einbezieht. Ein reduzierter Flux bedeutet dabei einen verminderten Abbau, ein erhöhter Flux entsprechend einen erhöhten. Folglich kann trotz einer Stimulation der Nukleation bei einer Hemmung der Fusion oder des lysosomalen Abbaus der Flux sinken.

Entsprechend gibt es diverse Messmethoden zur Bestimmung des Einflusses auf die Autophagie, auf einzelne Schritte oder den Flux als Gesamtrate des Abbaus. Der Flux hat keine Einheit und bezieht sich immer auf eine experimentelle Vergleichsgruppe.^{18,60–63}

1.2.3 Selektive Makroautophagie

Als Unterformen der Makroautophagie gibt es verschiedene selektive Pathways, mit denen gezielt Substrate via Autophagie abgebaut werden. Als (Makro-) Mitophagie wird der gezielte Abbau von Mitochondrien benannt, als Pexophagie der Abbau von Peroxisomen, als Lipophagie der Abbau von Lipid droplets (LD), als Xenophagie der Abbau exogener Pathogene, wie Viren oder Bakterien, und als Aggrephagie der Abbau insbesondere von Proteinaggregaten.^{64,65}

Bei Säugetieren gibt es dazu unterschiedliche Marker-Proteine für die Substrate sowie mehrere Ankerproteine an der Autophagosomenmembran (ATG8-Homologe).

Der wichtigste selektive Autophagie-Rezeptor ist p62 (Sequestosome 1; SQSTM1; ubiquitin-binding protein p62), welcher ubiquitinierte Substrate und LC3-II bindet und diese damit ans Autophagosom heftet. Dazu hat p62 jeweilige Domänen, nämlich die Ubiquitin bindende (UBA) und LC3-interagierende Region (LIR).⁶⁶ p62 wird gemeinsam mit dem Substrat, Ubiquitin und LC3-II im Lysosom abgebaut. Dadurch ist p62 ein indirekter Marker des Fluxes, da eine Hemmung des Fluxes zur Akkumulation von p62 führt.^{44,67,68} Ein erhöhter Flux geht primär mit einer Reduktion an p62 einher.

Bei der Interpretation von p62-Ergebnissen ist jedoch zu beachten, dass auch eine transkriptionelle Regulation durch den Nrf2-Pathway stattfindet, stimuliert durch Sauerstoffradikale (ROS).⁶⁸

Ebenfalls wird p62 durch posttranslationale Modifikationen, z. B. Phosphorylierungen, reguliert. Dabei führt die Phosphorylierung in der Regel zu einer erhöhten Affinität zu Ubiquitin oder LC3, wie z. B. Phosphorylierung an Ser407 durch ULK1. Eine Phosphorylierung an Ser349 kann hingegen durch Bindung des Nrf2 Inhibitors KEAP1 den Nrf2-Pathway stimulieren und letztlich auch darüber zu einer erhöhten Transkription von p62 führen.^{68,69} Humanes p62 unterscheidet sich leicht vom Homolog der Mäuse. So korrelieren die Phosphorylierungsstellen in humanem p62 Ser349, Ser403, Ser407 mit Ser351, Ser405, Ser409 in Mäusen.⁶⁸ Zur einheitlichen Bezeichnung werden in dieser Arbeit die Bezeichnungen für humanes p62 verwendet.

Neben p62 sind aktuell rund 20 weitere Rezeptoren (sequestosome 1-like receptors [SLRs]) bekannt, welche die Bindung von spezifischem Substrat an ATG8-Homologe wie LC3-II herstellen. Diese SLRs sind dabei meist selektiver und können mit oder ohne p62 eine Bindung an die Autophagosomenmembran vermitteln.⁶⁸

Beispielsweise bei der Mitophagie wird ein beschädigtes Mitochondrium durch PINK1 (PTEN [Phosphatase and tensin homolog] - induced kinase 1) erkannt. PINK1 lagert sich an der Außenmembran des Mitochondriums an und phosphoryliert Parkin, das wiederum umliegende Proteine der Membran ubiquitiniert. Dies führt zur Rekrutierung von SLRs, wie z. B. p62, jedoch in diesem Fall insbesondere Optineurin (OPTN) und Nuclear dot protein 52 (NDP52), welche die Degradation im Autophagosom vermitteln.

Mutationen von PINK1 und Parkin führen zu reduzierter Mitophagie und sind darüber mit einer juvenilen Form des Morbus Parkinson assoziiert.⁷⁰⁻⁷²

Im Gegensatz zu Hefen sind beim Menschen sechs Homologe zu ATG8 bekannt, die als Anker an der Membran des Autophagosoms dienen. Dazu gehören LC3A, LC3B, LC3C, GABARAP, GABARAPL1 und GABARAPL2. Die LC3-Proteine wurden dabei zuerst aufgrund ihrer Assoziation zu Mikrotubuli beschrieben (Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3; MAP1LC3), die GABARAP-Familie wegen ihrer Rolle beim Transport des GABA (A) Rezeptors (GABAAR) als GABAAR-assoziiertes-Protein.^{55,56} Aufgrund der hohen Ähnlichkeit fungieren alle als ATG8 Homologe auf der Autophagosomenmembran und haben überdies z. T. spezifische Aufgaben in der Autophagie oder z. B. dem Rezeptortransport.

Je nach Isoform haben sie eine unterschiedliche Relevanz für die selektive Bindung verschiedener Autophagiesubstrate, der Ausbildung der Autophagosomen und deren Transport.⁵⁵ Die Eigenheiten sind dabei Gegenstand aktueller Forschung.

LC3B ist dabei die am besten untersuchte Isoform und gilt als wichtigster Marker von Autophagosomen. Die Menge an lipidiertem LC3B-II korreliert sehr gut mit der Menge an Autophagosomenmembran.^{55,56}

Auch wenn alle Isoformen in freiem Zustand p62 binden können, scheint nur LC3B als lipidierte, membrangebundene Form (LC3B-II) weiterhin p62 zu binden und ist damit essentiell für die p62 vermittelte Autophagie.^{55,73} Wenn nicht weiter spezifiziert, bezeichnet daher im Folgenden LC3 die Isoform LC3B.

1.2.4 Regulation von Autophagie

Aufgrund der zahlreichen Schritte im Ablauf der Autophagie ist auch die Regulation entsprechend komplex. Eine schematische Übersicht ist in Abbildung 5 *dargestellt*.

Im Allgemeinen unterscheidet man zwischen der Beeinflussung früher Schritte, wie z. B. Induktion, Nukleation und Elongation (Upstream), sowie der späten Schritte, wie Reifung/Maturation Fusion und lysosomalem Abbau/Degradation (Downstream).^{18,44}

Die Regulation findet dabei überwiegend durch Beeinflussung der beteiligten Proteine statt. Einzelne Faktoren werden jedoch auch durch Transkription reguliert.^{19,47,61} Neben den physiologischen Regelkreisen gibt es diverse Möglichkeiten, um Autophagie zu beeinflussen. Mutationen der Autophagie-Maschinerie führen dabei überwiegend zu einer Hemmung der Autophagie und können in diversen Erkrankungen beobachtet werden, insbesondere in neurodegenerativen Erkrankungen, wie z. B. Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, Morbus Huntington und amyotropher Lateralsklerose (ALS), Alterungsprozessen sowie einigen Malignomen.^{46,70,74–78}

Diverse Chemikalien und Pharmaka können ebenfalls Einfluss auf Autophagie nehmen und werden auch in Zellkultur- und Tierversuchen entsprechend verwendet. Bekanntester Vertreter ist das als Immunsuppressivum verwendete Sirolimus auch Rapamycin genannt, das namensgebender mTOR-Inhibitor (mechanistic Target of Rapamycin) ist. Als solcher stimuliert Rapamycin Autophagie und wird entsprechend eingesetzt.^{18,44,79–81} Dabei kann bei Mäusen ein lebensverlängernder Effekt sowie eine Reduktion von Alzheimer-Symptomen gezeigt werden, weswegen auch entsprechende Studien am Menschen diskutiert werden.^{82–84}

Die Manipulation von Autophagie machen sich auch einige Infektionserreger, insbesondere Viren, zu Nutze, um ihren Abbau durch Autophagie zu verhindern und die eigene Replikation zu begünstigen. Bekannte Vertreter sind z. B. Poliomyelitis-Virus (PV), Hepatitis-B-Virus (HBV), Hepatitis-C-Virus (HCV), Humanes-Immundefizienz-Virus (HIV), Influenza-A-Virus, Masernvirus (MeV), Parvovirus B19, Rotavirus und Herpes-simplex-Virus-1 (HSV-1).^{37,85–89}

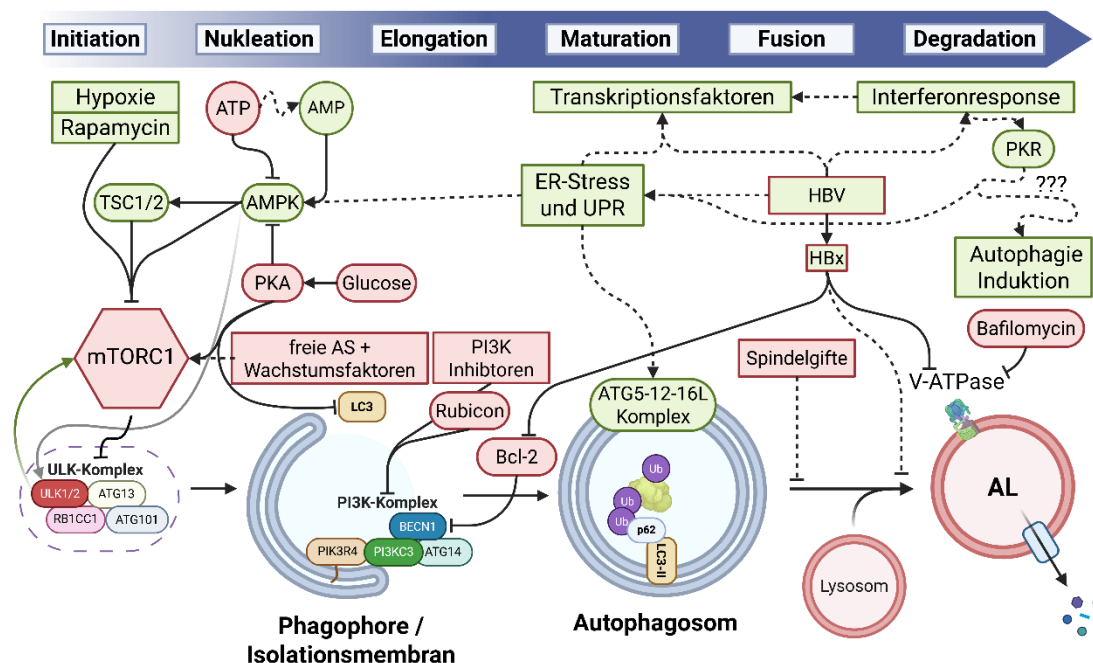
Für HBV ist die Beeinflussung von Autophagie essentiell, da es die Autophagosomenmembran zur eigenen Behüllung benötigt und um den eigenen Abbau zu verhindern.^{90–92} Daher kann HBV sowohl die frühen Schritte der Autophagie (Nukleation/Initiation/Elongation) stimulieren als auch die späten Schritte (Fusion/Degradation) hemmen. Dabei werden die meisten regulatorischen Funktionen dem HBx Protein zugesprochen, insbesondere die Hemmung der späten Schritte durch Blockade der Fusion mit Lysosomen und Hemmung der Ansäuerung der Autophagolysosomen.⁹¹ Ebenfalls wird HBx eine stimulierende Wirkung auf den ULK- und PI3K-Komplex zugesprochen.⁹¹ HBs ist primär für eine

stimulierende Wirkung der Elongation als Folge des ER-Stress bekannt, jedoch nicht für eine Hemmung von Autophagie.⁹¹

Physiologisch läuft Autophagie kontinuierlich auf einem basalen Level ab. Im Allgemeinen gibt es zwei Zustände, die Autophagie induzieren: einen Nährstoffmangel (Starvation) in der Zelle und eine Akkumulation schädlicher Substanzen, wie z. B. fehlgefalteter Proteine oder Pathogene. Dabei geht eine Induktion von Autophagie physiologisch mit einer Erhöhung des Fluxes einher.^{19,44} Ein Nährstoffmangel wird dabei durch verschiedene Sensoren detektiert. Beispielsweise stimuliert intrazelluläre Glucose die PKA (Proteinkinase A), welche die Phosphorylierung des ULK-Komplexes durch mTORC1 stimuliert und darüber die Initiation hemmt. Dabei ist mTORC1 der wichtigste Regulator der Initiation. Durch Bindung an den ULK-Komplex hemmt er Autophagie. Wird er selbst z. B. durch die AMPK (AMP-aktivierte Proteinkinase) gehemmt, gibt mTORC1 den ULK-Komplex frei, wodurch die Autophagie initiiert werden kann.¹⁹

Nach der Initiation gibt es insbesondere Bremsmechanismen. So kann der PI3K-Komplex durch chemische Inhibitoren wie das Fungizid Wortmannin oder physiologisch durch Rubicon (run domain Beclin-1-interacting and cysteine-rich domain-containing protein) gehemmt werden, um die Elongation zu hemmen.

Abbildung 5: Regulation der Autophagie bei Hepatitis B



Eigene, vereinfachte Darstellung der Regulation von Autophagie als Zusammenstellung mehrerer Quellen,^{19,20,93–98,38,44,46,47,80,88,90,91} erstellt in BioRender.²⁶ Stimulierende Faktoren sind in Grün, hemmende Faktoren in Rot dargestellt. Durchgehende Linien beschreiben eine direkte Interaktion, gestrichelte

Linien eine über Zwischenfaktoren vermittelte Interaktion. Spitze Pfeile (→) beschreiben eine Stimulation, stumpfe Pfeile (-) eine Hemmung. Energiereichtum (ATP, Glucose, freie Aminosäuren [AS]) vermittelt eine Hemmung der Induktion, während Mangelzustände (AMP, Hypoxie) oder z. B. ER-Stress eine Induktion vermitteln.^{19,44} Eine Regulation der Elongation kann durch den Apoptoseregulator Bcl-2, das Rubicon-Protein oder durch PI3K-Inhibitoren wie Wortmannin vermittelt werden.^{19,44,99} Eine Hemmung der Mikrotubuli durch Spindelgifte hemmt die Fusion der Autophagosomen und Lysosomen.^{44,100} Bafilomycin hemmt durch Blockade der V-ATPase den Transport von Proteinen in der Autophagolysosomen (AL) und damit die Ansäuerung den Abbau.^{44,91} Bei HBV wird sowohl eine späte Hemmung als auch eine stimulierende Wirkung beschrieben. Die Hemmung wird dabei insbesondere dem HBx-Protein durch eine Hemmung der lysosomalen Fusion zugeschrieben.^{87,97} Die Stimulation geschieht über eine Stimulation von Faktoren des ER-Stresses und der folgenden Unfolded Protein Response (UPR) sowie durch die Interferonresponse. Insbesondere die über PKR (Proteinkinase R) vermittelte Aktivierung des eIF2 α /PERK Pathways scheint dafür relevant.^{13,101} Diverse Signalkaskaden, unter anderem des ER-Stresses oder HBV, können auch die Transkription beeinflussen, insbesondere über die FOXO Transkriptionsfaktoren, welche z. B. LC3/GABARAP, ATG4 oder weitere Komponenten des PI3K-Komplex stimulieren.⁴⁷

Weitere Abkürzungen: ULK1/2: Unc-51 like autophagy activating kinase 1/2; ATG13, ATG14 und ATG101: Autophagy-related protein 13, 14 und 101; RB1CC1: RB1 [Retinoblastom-Protein]-inducible coiled-coil protein 1; PI3K-Komplex: phosphatidylinositol 3-kinase Komplex; BECN1: Beclin-1; PIK3C3: Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3; PIK3R4: Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit 4; p62: ubiquitin-binding protein p62; Ub: Ubiquitin; LC3: MAP1LC3: ATG8 Homolog; LC3-II: aktivierte, membranständige Form von LC3; PKA: Proteinkinase A; TSC1/2: Komplex aus TSC1 (Hamartin) und TSC2 (Tuberin); AMPK: AMP-aktivierte Proteinkinase; ATP: Adenosintriphosphat; AMP: Adenosinmonophosphat; HBV: Hepatitis-B-Virus; Rubicon: run domain Beclin-1-interacting and cysteine-rich domain-containing protein; Bcl-2: B-cell lymphoma 2 protein.

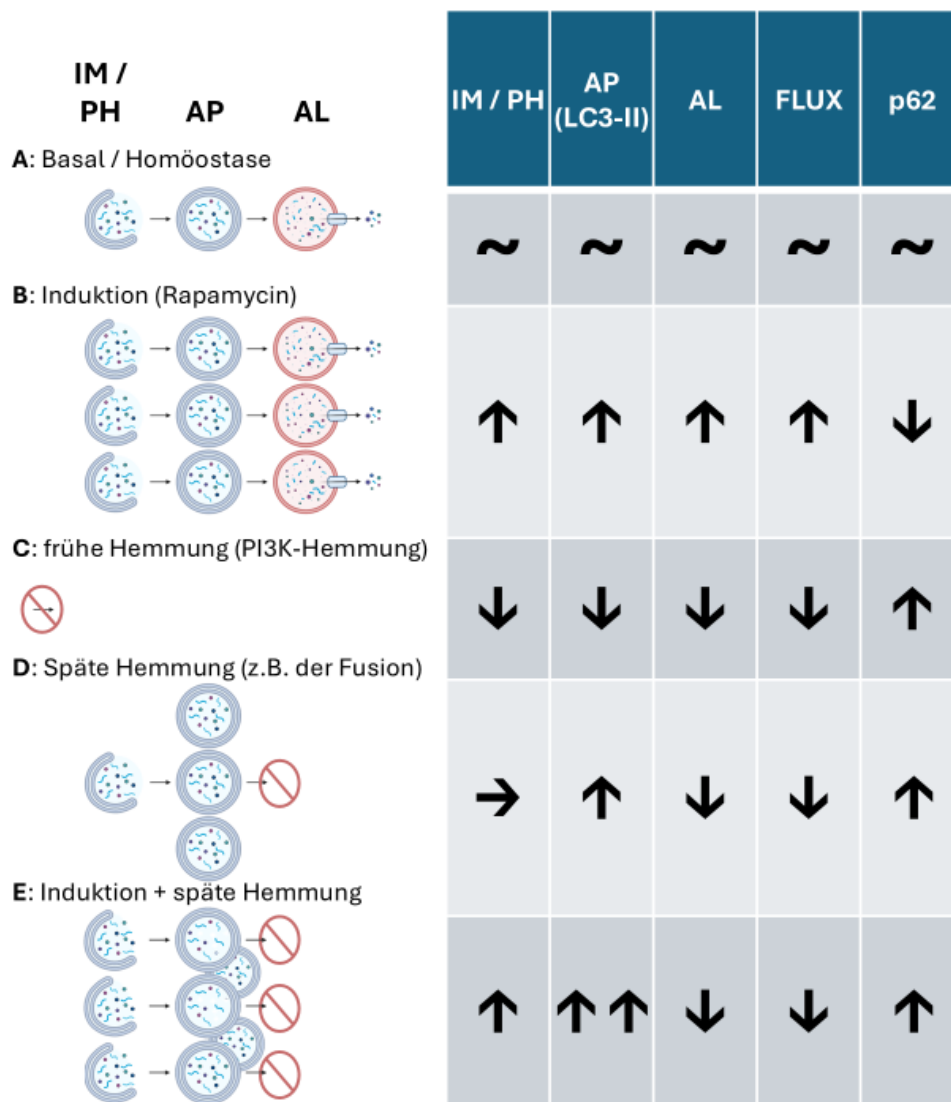
1.2.5 Messung von Autophagie

Autophagie kann über mehrere Regulationsmechanismen gleichzeitig beeinflusst werden. Daher gibt es verschiedene Ansätze, sowohl die Auswirkungen auf den Flux als auch auf die Einzelschritte in Zellkulturen oder Versuchstieren zu bestimmen. Eine Übersicht ist in Abbildung 6 dargestellt.

Zur Bestimmung des Fluxes wird im Allgemeinen die Umwandlung von Substrat gemessen. Dazu kann der Umsatz von z. B. p62 als Marker der selektiven Autophagie sowie GFP-markiertes (grün fluoreszierendes Protein) oder isotonenmarkiertes LC3 als Marker der AP-Membran bestimmt werden, da diese im Lysosom abgebaut werden.

Die Umwandlung von nativem LC3-I in LC3-II zeigt dabei auch eine vermehrte Bildung oder ein Vorhandensein von Autophagosomen an. Die Menge an LC3-II korreliert dabei gut mit der Menge und damit Anzahl an Autophagosomen. Eine Akkumulation kann dabei durch eine späte Hemmung z. B. der Fusion oder durch eine Induktion via Rapamycin entstehen. Daher kann man insbesondere in Zellkulturen gezielt einzelne Schritte der Autophagie zur Kontrolle des Effekts blockieren. Das ist z. B. durch Knockout relevanter Gene oder Behandlung mit Wortmannin zur Hemmung des PI3K-Komplexes möglich. Dadurch werden die Nukleation und Elongation gezielt unterbunden. Ebenfalls kann man durch Kombination verschiedener Messungen, z. B. von einem Substrat wie p62 und einem Marker wie LC3-II, umfassendere Schlüsse ziehen. Neben der Proteinbiochemie und der Bestimmung im Westernblot (WB) kann Autophagie auch in der Immunhistochemie (IHC), der Immunofluoreszenz (IF), Elektronenmikroskopie (EM), Durchflusszytometrie oder durch die Messung von Isotopenfreisetzung bestimmt werden.^{18,44,60–62,67,81,102,103}

Abbildung 6: Interpretation von Messwerten der Autophagie



Eigene schematische Darstellung der resultierenden Beobachtung nach Hemmung oder Induktion der Autophagie in Anlehnung an Mizushima^{44,104} und weitere Quellen,^{60–62,67,81,102} erstellt in BioRender.²⁶ Tabellarische Auflistung der resultierenden Strukturen, gegliedert nach Isolationsmembran (IM)/Phagophore (PH), Autophagosom (AP), Autolysosom (AL) sowie Flux. Rechts dargestellt Veränderung im Vergleich zur Basalrate (A), und zwar als unverändert (~), erhöht (↑) oder erniedrigt (↓). (B) Bei einer Induktion von Autophagie durch Rapamycin und Hemmung von mTORC sind alle Reifestufen vermehrt vorhanden und der Flux entsprechend erhöht. (C) Wird bereits die Initiation oder Nukleation durch Knockout oder PI3K-Hemmung verhindert, findet kaum eine oder keine Autophagie statt und entsprechend kann auch kein Substrat abgebaut werden. Der Flux sinkt, und die Abbauprodukte akkumulieren oder werden, wenn möglich, z. B. über das Proteasom abgebaut. (D) Bei einer späten Hemmung z. B. der Maturation oder Fusion kann

kein oder kaum ein Abbau im Autophagolysosom stattfinden, der Flux sinkt. Das Substrat akkumuliert dabei jedoch in Autophagosomen verpackt, da die frühen Schritte der Autophagie sowie die selektive Bindung des Substrats oft unverändert sind. (E) Finden sowohl eine Induktion (B) als auch eine späte Hemmung (D) parallel statt, sind alle Stufen der Autophagie bis hin zur Blockade, vor der sie akkumulieren, vermehrt vorhanden. Der Flux ist entsprechend zu (D) reduziert, die Menge an Isolationsmembran und Autophagosomenmembran, bestimmbar durch LC3, ist jedoch im Vergleich zu (D) deutlich erhöht.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden primär p62 als spezifisches Substrat und LC3-II bestimmt. Eine Akkumulation von p62 sowie aktiviertem P-p62 signalisiert dabei eine Hemmung des Abbaus (Flux). LC3 muss gemeinsam mit p62 interpretiert werden. Eine Erhöhung von LC3-II zeigt eine Induktion und vermehrte Bildung von Autophagosomen und/oder eine Hemmung der späten Schritte an, wie dem Abbau im Autophagosom.

Autophagie ist ein zentraler Stoffwechselweg, der eine entscheidende Rolle im Energiestoffwechsel, beim Erhalt der Homöostase, bei diversen Stressoren und der Immunabwehr spielt. Daher ist die Interaktion mit anderen zellulären Systemen komplex und vielseitig und bedarf weiterer Forschung. Da es sich um einen dynamischen Prozess handelt, ist die Messung mehrerer Zeitpunkte oder mehrerer Faktoren und Methoden notwendig, um eine sinnvolle Aussage über den Zustand der Autophagie treffen zu können.

1.3 Hepatitis B

Die Hepatitis B ist eine durch das Hepatitis-B-Virus (HBV) verursachte Infektionskrankheit, die insbesondere die Leber betrifft. Sie verläuft bei Erwachsenen in ca. 85% der Fälle als selbstlimitierende akute Form (AHB), die in einem Teil der Fälle in eine chronische Form (CHB) übergeht. Das HBV tritt weltweit auf, jedoch endemisch in Südostasien, dem Nahen Osten, Afrika sowie Südamerika. Dagegen kommt es in Europa sporadisch vor, insbesondere am Mittelmeer. Weltweit sind bei rund einem Drittel der Weltbevölkerung spezifische Antikörper als Zeichen einer ausgeheilten Infektion nachweisbar.¹⁶ Geschätzt 3,5% der Weltbevölkerung waren im Jahr 2019 chronisch erkrankt.³ Die Infektion findet durch Kontakt mit infiziertem Blut, Blutbestandteilen oder Sperma statt.^{17,32,105} In hoch endemischen Gebieten überwiegt die Übertragung von der Mutter auf das Neugeborene während der Geburt, in Gebieten mit einer niedrigen Prävalenz dominiert die Infektion über sexuellen Kontakt.^{16,32} Insbesondere in ärmeren Ländern ist ebenfalls eine Übertragung durch kontaminierte (medizinische) Instrumente, Transfusionen oder die Wiederverwendung von Injektionsnadeln

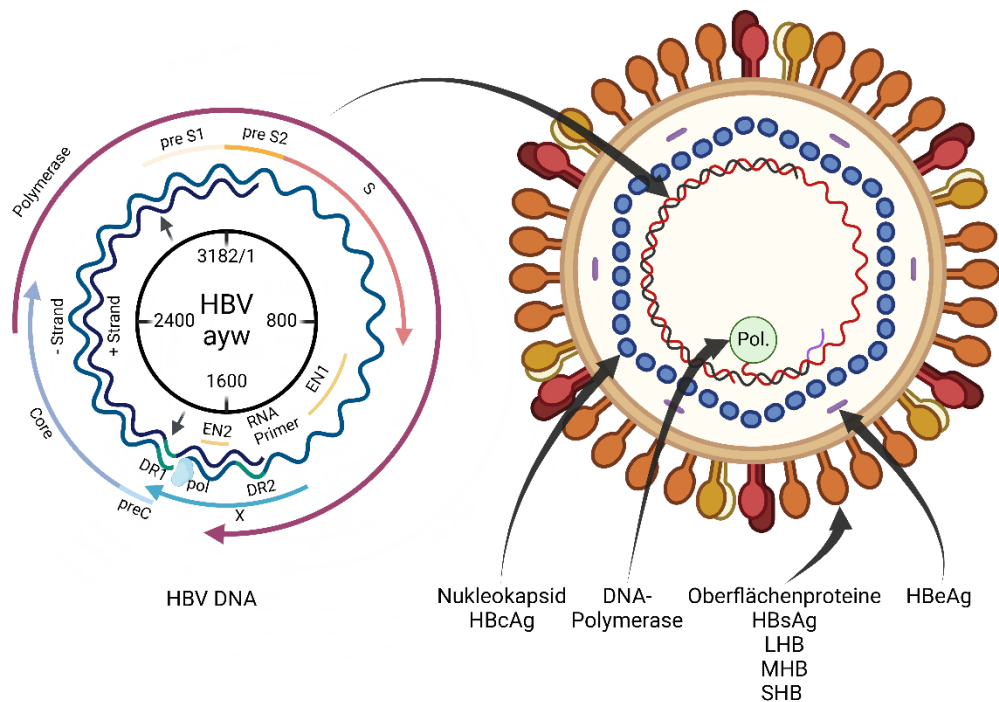
üblich.¹⁶ Gerade bei Kindern verläuft die Infektion zunächst asymptomatisch, bei Erwachsenen haben ca. 70% eine subklinische Hepatitis und nur 30% einen Verlauf mit Ikterus. Weniger als 1% haben einen fulminanten akuten Verlauf, der jedoch eine Mortalität von 80% hat. Je jünger ein Mensch bei der Infektion ist, desto höher ist sein Risiko für einen chronischen Verlauf. Bei Neugeborenen, die während der Geburt infiziert werden, entwickelt sich zu 95% ein chronischer Verlauf, während es im Kindesalter 20-30% und im Erwachsenenalter 5% sind.¹⁶ Da die cccDNA im Nucleus der Hepatozyten verbleibt und so zu einer lebenslangen Reaktivierung führen kann, ist die Prävention der Infektion essentiell.^{16,32} Daher findet mittlerweile bei Risikogruppen und allen Schwangeren ein HBV-Screening sowie mittlerweile eine Impfung aller Neugeborenen statt.^{32,106}

1.3.1 Erreger: Hepatitis-B-Virus (HBV)

Das Hepatitis-B-Virus aus der Familie der Hepadnaviridae ist ein behülltes DNA-Virus (Abbildung 7). HBV wird entsprechend der Epitope auf den Hüllproteinen in vier Serotypen (adr, adw, ayr, ayw) eingeteilt und entsprechend den genetischen Varianten in die 10 Genotypen A-J sowie deren Untergruppen.¹⁰⁷ Die unterschiedlichen Genotypen haben eine unterschiedliche regionale Verteilung und unterscheiden sich auch in Krankheitsverlauf und Komplikationsrate, sodass die Therapie- und Impfstoffwahl den regionalen Subtypen angepasst wird.¹⁰⁶⁻¹¹¹

Die teil-zyklische DNA im Inneren ist umgeben von einem ikosaedrischen Nukleokapsid und einer Lipiddoppelmembran, auf der die Oberflächenantigene (HBsAg) sitzen.

Abbildung 7: Schematischer Aufbau des Hepatitis-B-Virus



Eigene schematische Darstellung des Genoms sowie des HBV (Dane particle) als Zusammenstellung mehrerer Quellen,^{5,7,17} erstellt in BioRender.²⁶ Links: Teilweise doppelsträngiges DNA Genom des Serotyps ayw, welches in unseren Untersuchungen verwendet wird. Der codierende minus-Strang (-) und der inkomplette nichtcodierende plus-Strang (+) überlappen dabei und bilden dadurch ein zyklisches Genom. Die überlappenden Leseraster (open reading frames - ORF) sind dabei als Pfeile dargestellt. Das Oberflächengen S (surface: HBsAg) hat dabei drei Start-Codons, wodurch die drei Oberflächenproteine (HBs) gebildet werden. Die HBs-Proteine werden nach ihrer Größe benannt. Dabei wird LHB (large) ab pre-S1 Domäne translatiert. MHB (medium) wird ab der pre-S2 Domäne translatiert und SHB (small) aus der S Domäne gebildet. HBs als Bezeichnung der Oberflächenproteine und HBsAg als Bezeichnung der antikörperbindenden Region werden dabei oft als Synonym verwendet, da die HBs-Proteine die antigenbildende Region (HBsAg) enthalten. HBeAg wird aus der preC-Region gebildet, das HBcAg aus dem Core Gen, das HBx-Protein aus der X-Region. Pol zeigt den Sitz der HBV-Polymerase, die aus dem Polymerase Gen (P) gebildet wird. Die HBV-Polymerase ist eine RNA- und DNA-abhängige DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase: RT) mit RNase-H-Funktion. EN1/2: Enhancer I/II, welche die Translation modulieren. DR1/2: Direct repeat 1/2, relevant für die Replikation des Genoms. Zahlen in der Mitte geben die Region der Basenpaare im Genom an. Pfeilspitzen zeigen die

Schnittstellen des Restriktionsenzym Bgl-II, das zur Erstellung unserer transgenen Mäuse verwendet wurde. Rechts: Darstellung des Virions. Außen sitzen die Oberflächenproteine (HBs: LHB, MHB, SHB) auf der Lipiddoppelmembran. Darin befindet sich das ikosaedrische Nukleokapsid aus HBcAg sowie HBeAg. Im Inneren des Nukleokapsids finden sich die DNA und die DNA-Polymerase.

Das HBV ist aufgrund des zellulären Eintrittsmechanismus hoch spezies- und organspezifisch.¹⁷ Die Viren binden niedrig affin mit SHB an Glykosaminoglykane der Hepatozyten, insbesondere Heparansulfat, und hoch affin mit der preS1-Domäne des LHB an den Natrium-Gallensäuren-Cotransporter NTCP (Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide).^{17,112} Physiologisch transportiert der NTCP Gallensäuren aus dem Blut in die Leber, welche über den Darm zurückgewonnen wurden. Da der NTCP fast ausschließlich in der Leber exprimiert wird, ermöglicht dies die hohe Organspezifität. Pharmaka oder Substrate, die den NTCP hemmen, hemmen daher auch den Eintritt von HBV in die Zelle.¹¹²

Nach der Bindung von HBV an den NTCP kommt es zur Endozytose und zur folgenden Verschmelzung der Virushülle mit der Endosomenmembran, wodurch das Nukleokapsid in das Zytoplasma freigesetzt wird. Das Nukleokapsid wird entlang der Mikrotubuli zum Zellkern transportiert und dort zerlegt, sodass die DNA in den Zellkern überführt werden kann.¹⁷

Im Zellkern wird die rcDNA (relaxed circular) aus dem Nukleokapsid durch humane Reparaturenzyme und Polymerasen zu cccDNA (covalently closed circular) modifiziert. Die cccDNA fungiert als zyklisches Mini-Chromosom in den Hepatozyten und kann wie andere Chromosomen durch Histone und Methylierung auch epigenetisch modifiziert werden.¹⁷

Die cccDNA wird von 5 verschiedenen Startpunkten in unterschiedlich lange RNA transkribiert. Aus der pgRNA (pregenomic, 3,5kb) werden die Proteine HBcAg und die Polymerase gebildet, die als Vorlage der viralen rcDNA im Nukleokapsid dienen. Aus HBcAg wird das Nukleokapsid gebildet, während die Polymerase aus pgRNA die rcDNA bildet. Aus der precore-mRNA (3,5kb) wird HBeAg gebildet, das primär durch Exozytose ins Blut abgegeben wird und eine immunregulatorische Funktion besitzt. Aus der PreS1-RNA (2,4kb) wird LHB, aus der PreS2/S-RNA (2,1kb) wird MHB und SHB gebildet. Die Oberflächenproteine (LHB/MHB/SHB) formen einen Teil der Virushülle, insbesondere SHB bildet jedoch auch subvirale, nicht infektiöse Partikel aus, welche der Immunevasion dienen.^{17,113} Aus der X-RNA (0,7kb) wird das HBx Protein translatiert. HBx dient als Transkriptionsfaktor und stimuliert so die Replikation von HBV. HBx greift jedoch auch in das Ubiquitin-Proteasom-System

sowie den Zellzyklus ein, kann Apoptose verhindern und führt so zur Entstehung von HCCs.^{17,114–118}

Die Transkription in RNA ist fehleranfällig und kann zu Mutationen führen, durch die sich das Virus dem Immunsystem entziehen kann. Insbesondere Mutationen im S-Gen können dazu führen, dass das Virus nicht mehr von Anti-HBs-Antikörpern erkannt wird und dadurch bereits immunisierte Personen infiziert.¹¹⁹

Nachdem die viralen RNAs in das Zytosol ausgeschleust wurden, werden sie in die entsprechenden Proteine translatiert. Die HBcAg-Proteine formen ikosaedrische Nukleokapside, in denen die pgRNA durch die HBV-Polymerase in rcDNA umgeschrieben wird.⁹² HBeAg wird nach seiner Translation im ER überwiegend in das Blut sezerniert.

Die Behüllung der Nukleokapside findet durch intrazelluläre Membranen statt. Dabei wird mit Hilfe der Oberflächenproteine, insbesondere LHB und SHB, das Nukleokapsid mit einer Lipiddoppelmembran umschlossen und über die ESCRT (endosomal sorting complexes required for transport) aus der Zelle ausgeschleust. Dabei findet keine Lyse der Zelle wie bei anderen Viren statt.

Der genaue Ursprung der Virushülle ist nicht vollständig geklärt und aufgrund des Austausches von Membran zwischen dem ER, Endosomen und Autophagosomen schwierig. Dennoch scheint die Autophagosomenmembran wichtiger Ursprung der Virushülle zu sein. So zeigen Studien, dass die Nukleokapside mit der Membran der Autophagosomen assoziieren und dass eine Hemmung der Fusion der Autophagosomen mit Vesikeln der ESCRT, die Freisetzung von Viren hemmt.⁹² Auch eine Hemmung von Autophagie durch 3-Methyladenin (3-MA) hemmt die Virusreplikation deutlich, während eine Induktion von Autophagie durch Rapamycin oder Starvation die Replikation von HBV deutlich erhöht.⁹⁰ Ein Ausschalten der Autophagie durch ATG5-Knockout in vivo führt zu einer Reduktion von HBV-DNA im Serum um 90%, reduziert die Menge replikativer Intermediate der DNA auf ein nahezu nicht nachweisbares Niveau und führt zu einer diffusen Verteilung von HBcAg. Dies steht im Gegensatz zu der sonst geordneten Verteilung um den Zellkern oder Autophagosomen.⁹²

Das zeigt die Bedeutung von Autophagie für die Replikation und damit Ausbreitung des Virus. Daher kann HBV die frühen Stadien der Autophagie induzieren, um die Akkumulation von Autophagosomenmembran zu bewirken. Entscheidend ist, dass HBV auch die Fusion mit den Lysosomen verhindert, damit das Virus nicht mit den Autophagosomen abgebaut wird.^{90,91,96,120}

Es ist ein komplexes Zusammenspiel von HBV und Autophagie, das gegenwärtig erforscht wird. Ein besseres Verständnis könnte daher die therapeutischen Ansätze erweitern.⁹⁰

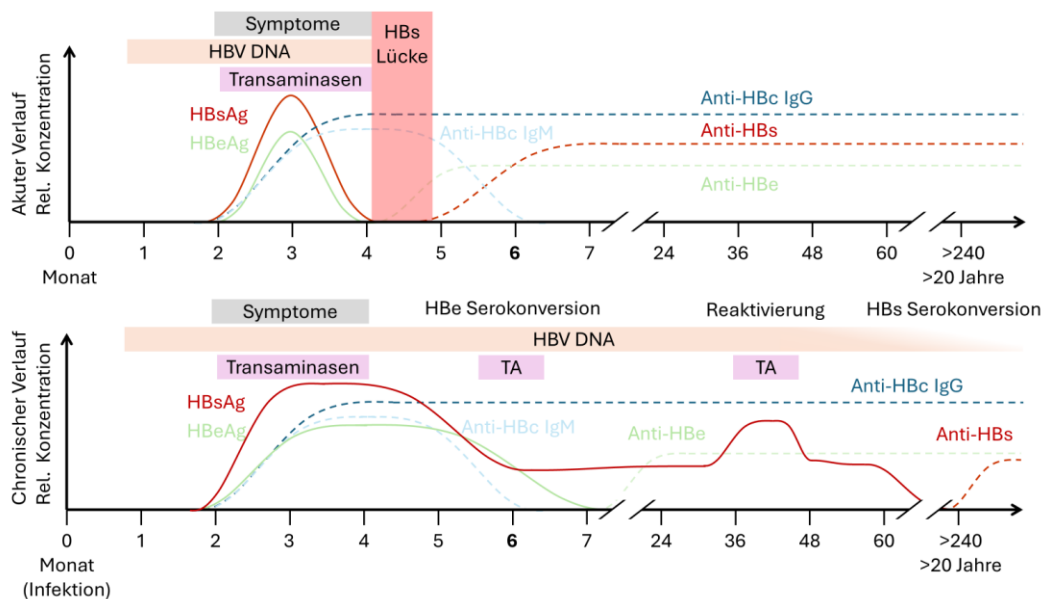
1.3.2 Verlauf der Hepatitis B Erkrankung

Der Verlauf einer HBV-Infektion hängt maßgeblich vom Alter des Patienten bei der Infektion, dem Impfstatus sowie den Begleiterkrankungen ab, z. B. Immunsuppression.¹⁶ Die Inkubationszeit beträgt etwa 90 Tage (40-180 Tage).³²

Wenn nach der akuten Infektion HBsAg nach 6 Monaten weiterhin nachweisbar ist, spricht man von einer chronischen Hepatitis B (CHB).¹⁶ Der Verlauf der Erkrankung und der Titer ist in Abbildung 8 dargestellt.

Bei Neugeborenen oder Kindern verläuft die akute Phase meist asymptomatisch. HBV erzeugt nur eine geringe Reaktion des angeborenen Immunsystems, die akute Hepatitis wird überwiegend durch das adaptive Immunsystem vermittelt.¹⁶ Da sich das adaptive Immunsystem erst im Laufe des Lebens entwickelt, ist die Reaktion des Immunsystems bei Kindern schwächer als bei Erwachsenen.¹⁶ Insbesondere Menschen mit einer starken T-Zell-Antwort haben eine höhere Chance auf eine serologische Ausheilung, während eine schwache T-Zell-Antwort eine Chronifizierung begünstigt.¹⁶ Dabei ist zu beachten, dass eine serologische bzw. funktionelle Heilung oder Ausheilung keine Heilung im klassischen Sinne bedeutet, da die cccDNA in der Zelle bleibt. Die Ausheilung einer Hepatitis B bedeutet lediglich ein erfolgreiches Unterdrücken des Virus durch das Immunsystem, jedoch keine vollständige Eliminierung des Virus und seiner DNA. Eine Unterdrückung des Immunsystems, z. B. im Rahmen einer Chemotherapie, kann daher zur Reaktivierung führen.³² Die Immunantwort kann auch negative Folgen haben. Eine übermäßige Immunantwort kann zur fulminanten Hepatitis mit hoher Mortalität führen oder im chronischen Stadium zu Exazerbationen. Exazerbationen mit einem Anstieg der Transaminasen, als Zeichen des Leberschadens, erhöhen das Risiko einer Zirrhose und eines HCC.¹⁶ Das Virus selbst galt lange als nicht zytotoxisch, da es im Gegensatz zu anderen Viren nicht selbst zur Lyse der Wirtszelle führt. Jedoch wird die Zelle durch das Immunsystem und auch durch akkumulierende Virusbestandteile geschädigt.¹⁶

Abbildung 8: Darstellung des Verlaufs der akuten und chronischen Hepatitis B



Eigene Darstellung des serologischen Verlaufs als Zusammenstellung mehrerer Quellen,^{2,16,32} erstellt in PowerPoint.¹²¹ Oben: Darstellung des akuten Verlaufs. Die Infektion findet zum Zeitpunkt 0 statt, die Skala ist in Monaten dargestellt. Aufzeigen der relativen Konzentration der Antigene mit durchgezogener Linie, zugehörige Antikörper als gestrichelte Linie. Symptome, Vorhandensein von HBV-DNA und Transaminasen (TA) im Blut als Balken im zeitlichen Verlauf. Bei Verdacht auf eine Hepatitis B muss neben dem HBsAg auch Anti-HBc bestimmt werden, um eine diagnostische Lücke zu vermeiden.³² Nach einer Infektion bleiben die Antikörper oft jahrzehntelang nachweisbar.

Unten: Darstellung des chronischen Verlaufs analog zum akuten Verlauf. Bei einer Chronifizierung findet keine Ausheilung innerhalb von 6 Monaten statt. HBV-DNA und HBsAg bleiben weiterhin nachweisbar. Im Verlauf kann es zu einer Serokonversion von HBeAg zu Anti-HBc kommen. Ebenfalls sind Reaktivierungen mit Anstieg der Transaminasen und vermehrter HBV-DNA möglich. Im Verlauf ist auch eine spontane Konversion von HBsAg zu Anti-HBsAg möglich, die meist mit einem Abfall der HBV-DNA einhergeht.^{2,16}

Bei rund 95% der Erwachsenen verläuft die akute Hepatitis ohne Therapie selbstlimitierend innerhalb von 6 Monaten.¹⁶ Entsprechend entwickeln 5% eine chronische Hepatitis, die individuell unterschiedlich durch das Ringen des Immunsystems mit dem Virus entsteht. Kennzeichnend für die CHB ist die Immuntoleranz, bei der, trotz normaler Transaminasen im Blut, sich hohe Titer von DNA, HBsAg und HBeAg finden, da das Virus nur in geringem Umfang durch das Immunsystem bekämpft wird. Prognostisch günstig ist eine HBeAg-Serokonversion

und die Ausbildung von Anti-HBe-Ak. Dies geschieht bei ca. 2-15% der Patienten pro Jahr, wobei auch 5% aller Patienten im Verlauf wieder HBeAg exprimieren.¹⁶ Ca. 20-30% der Patienten haben auch nach HBeAg-Serokonversion eine Reaktivierung der Erkrankung mit Anstieg der viralen DNA und Transaminasen. Diese aktiven Phasen treiben einen Progress der Fibrose, Zirrhose und der Entstehung eines HCC voran. Rund 1% der Patienten schaffen pro Jahr eine HBsAg Serokonversion und erreichen damit den Zustand der Ausheilung.² Ohne Behandlung sterben ca. 25% der Männer und 8% der Frauen an einer perinatal erworbenen CHB durch Zirrhose oder HCC.²

1.3.3 Diagnostik der Hepatitis B

Die Diagnostik findet in der Regel über Bestimmung des Virus, der Virusbestandteile sowie der Antikörper gegen das Virus statt. Eine Leberbiopsie kann in Einzelfällen ergänzend durchgeführt werden.

Bei Verdacht auf eine HBV-Infektion sollen HBsAg und Anti-HBc im Serum bestimmt werden. Bei positivem HBsAg ist ergänzend HBeAg, Anti-HBe, Anti-HBc-IgM und gegebenenfalls quantitative HBV-DNA zu ermitteln, während bei alleinigem Nachweis von Anti-HBc im initialen Test der Verlauf von Anti-HBs zu bestimmen ist.³² Aus der Labor constellation kann ein akuter oder chronischer Verlauf abgeleitet werden oder eine Hepatitis ausgeschlossen werden.

Bei Erstdiagnose sind zudem eine körperliche Untersuchung und Anamnese, klinisch-chemische Labortests, insbesondere mit Bestimmung der Leberparameter (inkl. Transaminasen und Gerinnung) und Ausschluss einer Koinfektion (HIV, HCV, HDV, HEV), sowie eine Sonographie des Abdomens (insbesondere der Leber) Standard.³² Mittels sonographischem Elastografieverfahren (Fibroscan) kann die Elastizität und damit der Fibrose- und Zirrhosegrad der Leber nichtinvasiv bestimmt werden.^{2,32} Eine Leberbiopsie und Histologie wird heute aufgrund der verbesserten nichtinvasiven Diagnostik nur noch in Einzelfällen ergänzend durchgeführt.³² Dennoch kann die Hepatitis B auch Immunhistochemisch nachgewiesen werden, und sie ist bereits im HE-Schnitt an den pathognomonischen Milchglashepatozyten (GGH: Ground Glass Hepatozyten) zu erkennen. Dabei gibt es die Typ I Milchglashepatozyten, die sporadisch und in der Frühphase einer Infektion auftreten, und die Typ II, welche in Clustern im späteren Verlauf auftreten.^{9,10,122} Die Typ II GGH sind mit der Entstehung von hepatozellulären Karzinomen (HCC) assoziiert.^{12,122,123}

1.3.4 Therapie und Prävention

Die AHB wird in der Regel supportiv symptomatisch behandelt und kontrolliert, bis ein HBsAg Verlust erreicht ist.³² Eine antivirale Therapie kann in Einzelfällen bei einer fulminanten Hepatitis erwogen werden, jedoch verringert eine antivirale Therapie nicht das Risiko der Chronifizierung.² Engen Kontaktpersonen, wie z. B. Partnern, soll eine HBV-Diagnostik und Impfung angeboten werden, um eine weitere Ausbreitung zu verhindern.

Die Therapie der CHB orientiert sich am klinischen Bild. Ziel der Therapie ist es, Komplikationen wie Fibrose und Zirrhose, Leberversagen und HCCs sowie die Transmission an weitere Personen zu verhindern.^{2,32}

Wenn bereits eine Zirrhose oder HBV-DNA > 2000 IU/ml mit wiederholter Erhöhung der Transaminasen vorhanden ist, soll eine Therapie eingeleitet werden, in anderen Fällen können regelmäßige Kontrollen gewählt werden.³²

Zur Therapie werden Interferon und Nukleos(t)idanaloga verwendet. PEGyliertes Interferon alfa-2a wirkt zugleich antiviral und immunmodulatorisch.² Das Therapieregime dauert ein Jahr, wobei ca. 30% der Patienten eine HBeAg- und ca. 5% eine HBsAg-Serokonversion erreichen.^{2,16,32} Zwar ist die Therapie mit Interferon nebenwirkungsreicher, aber es gibt eine höhere Heilungsrate, weswegen die Therapie insbesondere bei jungen Patienten oder Genotyp A verwendet wird, um eine meist lebenslange Therapie mit Nukleos(t)idanaloga zu vermeiden.^{2,16,32}

Die Nukleos(t)idanaloga wie Entecavir oder Tenofovir hemmen die reverse Transkription von pgRNA in HBV-DNA und haben vergleichsweise geringe Nebenwirkungen. Da nur die reverse Transkription gehemmt wird, kann zwar die Virusreplikation unterbunden werden, nach Ende der Therapie kommt es aber häufig zu einer Reaktivierung. Dennoch ist nach einem Jahr Therapie mit Entecavir die Viruslast bei ca. 90% der Patienten unter die Nachweisgrenze gesunken, eine HBeAg-Serokonversion bei 20% und eine HBsAg-Serokonversion bei 2% der Patienten eingetreten.^{2,32} Eine Kombination von Nukleos(t)idanaloga und Interferon bringt keinen Nutzen und wird daher nicht empfohlen.³²

Damit ist die CHB eine gut therapierbare, jedoch nur bedingt heilbare Erkrankung, die oft einer lebenslangen, kostspieligen Therapie bedarf, weshalb die Prävention essentiell ist.³²

Neben der Anwendung von Hygienemaßnahmen zur Vermeidung von Blutkontakt im privaten oder medizinischen Umfeld und der Verwendung von Barrieremethoden (Kondome/Dental Dams)¹²⁴ beim Geschlechtsverkehr, bietet die Impfung einen zusätzlichen effektiven, passiven Schutz des Patienten.^{1,2,16,32,119} In Deutschland sollen alle Neugeborenen ab dem 2. Monat, ungeimpfte Jugendliche sowie

Risikogruppen (medizinisches Personal, Immundefiziente, Exponierte) aktiv geimpft werden.^{32,106}

Neben der aktiven Impfung durch HBsAg steht auch eine passive Impfung durch ein spezifisches Hepatitis-B-Immunglobulin zur Postexpositionsprophylaxe zur Verfügung.³²

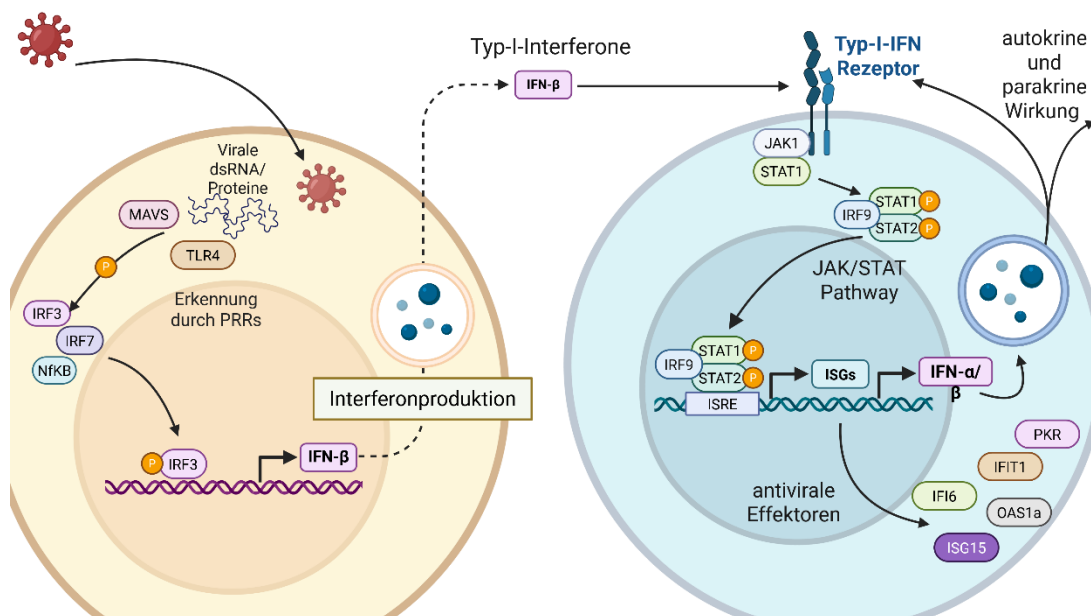
Die Hepatitis B ist eine Erkrankung, die durch ihre Komplikationen und ihre Therapie hohe menschliche und finanzielle Kosten verursacht. Die WHO schätzt, dass im Jahr 2022 weltweit 1,1 Millionen Menschen an den Folgen einer Infektion verstorben sind und lediglich 13% der Patienten je diagnostiziert werden.^{3,125} In Industrienationen stehen effektive Maßnahmen zur Prävention und Therapie zur Verfügung. Die oft lebenslange Therapie der CHB ist gerade in ärmeren Regionen oft nicht finanzierbar, weswegen die Entwicklung neuer Therapieansätze ein großes Potenzial für die Menschheit birgt.

1.4 Interferonantwort

Als Interferonantwort bezeichnet man die Antwort einer Zelle auf Signalmoleküle der Immunabwehr. Es gibt drei Hauptgruppen der Interferone (IFN): Alpha (α), Beta (β), Gamma (γ) und Lambda (λ). Alpha und Beta gehören zu den Typ-I-Interferonen, während Gamma zu Typ-II zählt und Typ-III die Lambda-Interferone beinhaltet.^{126–129} Neben dem klassischen antiviralen Effekt wirken Interferone auch immunmodulatorisch und antiproliferativ. Daher werden sie auch therapeutisch eingesetzt. So wird IFN- α bei der chronischen Hepatitis B und HCV sowie Malignomen, wie dem Malignen Melanom, dem Kaposi-Sarkom oder der chronisch myeloischen Leukämie eingesetzt, IFN- β bei der Multiplen Sklerose (MS) und IFN- γ bei der septischen Granulomatose.^{4,126,127} Die Typ-I und III Interferone wirken dabei sehr ähnlich und zum Teil über dieselben Mediatoren primär antiviral, während die Typ-II-Interferone eher immunmodulatorisch und antiproliferativ wirken. Daher ist bei HBV insbesondere die Typ-I-Interferonantwort entscheidend, welche in der vorliegenden Arbeit besonders untersucht wurde und in Abbildung 9 dargestellt ist. Wenn eine Zelle virale Bestandteile – wie Lipopolysaccharide (LPS), dsRNA oder ssRNA – über Pattern Recognition Receptors (PRRs) z. B. Toll-Like-Rezeptoren (TLRs) wie TLR4 erkennt, dann werden Interferon-regulatory-factors (IRFs) wie IRF3 oder IRF7 aktiviert. Primär IRF3 und sekundär IRF7 sind hauptverantwortlich für die Transkription und Sezernierung von Typ-I-Interferonen wie IFN- β . Daher wurde in unseren Mäusen der IRF3/7 KO verwendet, um eine Interferonantwort zu unterbinden.^{130,131} Die freigesetzten Interferone binden autokrin und parakrin an verschiedene oberflächliche Interferonrezeptoren. Dabei finden sich Rezeptoren der Typ-III-Interferone überwiegend auf Schleimhäuten, während auf Organen wie der

Leber Typ-I-Rezeptoren dominieren.¹²⁹ Die Signalweiterleitung erfolgt über die JAK/STAT-Pathways. Dabei aktiviert IFN- β über den entsprechenden Interferonrezeptor (IFNAR1/2) die Januskinasen (JAK) JAK1 und TYK2, welche STAT1 und STAT2 (signal transducer and activator of transcription) phosphorylieren. STAT1 und STAT2 führen gemeinsam mit IRF9 zu einer Transkription von IFN- α und IFN- λ sowie einer Reihe von ISGs (Interferon stimulierte Gene).^{129,132} Darunter sind neben IFIT1, OAS1a, PKR u. a. auch das ubiquitin-ähnliche ISG15.¹²⁹

Abbildung 9: Schematische Darstellung der Typ-I-Interferonantwort



Eigene Darstellung der Interferonantwort in Anlehnung an Lazear¹²⁹ und weitere Quellen,^{101,127,128,131,133–135} erstellt in BioRender:²⁶ Wird eine Zelle infiziert, wird dies durch Pattern Recognition Receptors (PRRs), z. B. TLR3, TLR4, MDA5, RIG-I, cGAS oder das peroxisomale MAVS, detektiert. Die PRRs aktivieren die IRF-Familie, wie IRF3 und IRF7, welche gemeinsam mit NFκB die Transkription von Typ-I-Interferonen, wie IFN- α und IFN- β , initiieren. Diese werden sekretiert und binden dann auto- und parakrin an den Typ-I-Interferon Rezeptor (IFNAR1/2). Dieser stößt den JAK/STAT Pathway an. Phosphoryliertes STAT1 und STAT2 dimerisieren mit IRF9 und wirken als Transkriptionsfaktor. Dadurch werden die ISGs, wie ISG15, OAS1a, IFIT1 und PKR, sowie erneut Interferone transkribiert. Die Interferone wirken dabei auch autokrin auf den Interferon-Rezeptor und führen so zu einem positiven Feedback bei einer fortbestehenden Infektion.¹²⁹ Weitere Abkürzungen: MAVS: Mitochondrial antiviral signalling protein; TLR4: Toll-Like-Rezeptor; P: Phosphat; IRF3/7: Interferon regulatory factor 3 und 7; NFκB: nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells; IFN: Interferon;

JAK1: Januskinase 1; IRF9: Interferon regulatory factor 9; ISRE: IFN-stimulated response element; ISGs: Interferon stimulierte Gene; IFIT1: Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1; IFI6: Interferon alpha-inducible protein 6; PKR: Proteinkinase R; ISG15: Interferon-stimulated gene 15.

ISG15 wird dabei wie Ubiquitin über entsprechende Ligasen an virale Proteine gebunden (ISGylation), wodurch diese in ihrer Funktion eingeschränkt und zum Abbau markiert werden.¹³⁶⁻¹³⁸ So wird direkt die Replikation, der Zusammenbau des Virus, aber auch die Knospung einiger Viren durch Hemmung der ESCRT behindert.^{136,138} ISG15 bewirkt dabei, dass die intrazellulären Vesikel (MVBs) durch die ESCRT nicht durch Exozytose ausgeschleust, sondern stattdessen via Autophagie im Lysosom abgebaut werden.¹³⁶ ISG15 kolokalisiert dabei sowohl mit p62 als auch dem lysosomalen Marker LAMP-1 als Zeichen des Abbaus der markierten Proteine.¹³⁶

IFIT1 (Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1) wird in der Regel kaum in Zellen exprimiert.¹³⁹ Durch Stimulation durch Typ-I Interferone wird die Transkription stark induziert.^{137,139-141} Die Transkription kann dabei über den JAK/STAT-Pathway oder direkt durch IRF-3/5/7 geschehen.¹⁴¹ IFIT1 erkennt non-2'-O methylierte virale RNA (ohne 5' Kappe), bindet diese und verhindert dadurch die Transkription der nicht-methylierten RNA und behindert so die virale Translation. Daher haben viele Viren Wege entwickelt, um diesen Mechanismus zu umgehen. So haben Coronaviren dafür eigene Methyltransferasen, während Influenzaviren die 5' Kappe von zellulärer mRNA stehlen. Die meisten DNA-Viren hingegen nutzen die nukleären Polymerasen der Wirtszelle. Mehrere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass die Virulenz sinkt, wenn ein Virus seine Methyltransferase-Aktivität verliert, während ein IFIT1 KO die Virulenz desselben Virus steigert.¹⁴⁰ Die Bedeutung von IFIT1 konnte auch klinisch gezeigt werden. So führen verschiedene Polymorphismen von IFIT1 zu signifikant unterschiedlichen Ansprechraten auf Interferontherapie bei der chronischen Hepatitis B.¹⁴² Die Expression und Funktion von IFIT1 haben daher auch eine klinische Relevanz für die Hepatitis B.

Ein weiterer Teil der Interferonantwort ist die OAS (interferon-induced oligoadenylate synthetase) Familie. OAS wie OAS1a erkennen virale dsRNA und binden diese. Außerdem wird die RNase L aktiviert, welche daraufhin zelluläre und virale RNA abbaut und so die virale Replikation unterbindet. Sie behindert aber auch den zellulären Stoffwechsel, wodurch die Apoptose der Zelle begünstigt wird.¹⁴³ Die Transkription von OAS wird durch STAT1 und STAT2 aus dem JAK/STAT Pathway aktiviert, um so die Resistenz der Zellen gegen Viren zu erhöhen.¹⁴⁴

Die PKR (Protein Kinase R) wird konstitutiv sowohl als Sensor für dsRNA exprimiert, als auch durch Interferon induziert.^{93,101,145} Die PKR hat dabei vielfältige antivirale, jedoch auch antiproliferative Wirkungen und greift in diverse Pathways ein, unter anderem den Zellzyklus und Autophagie. Stimuliert wird die PKR durch Zytokine (IFN/TNF), bakterielle und virale Infektionen, aber auch durch Zellschäden auf Grund von Chemo- und Strahlentherapie.⁹³ Die aktivierte PKR trägt zur Inflammation durch Eingriff in proinflammatorische Pathways (MAPK, NFκB) bei, aktiviert dabei unter anderem IRF3 und bewirkt so eine vermehrte Bildung von Typ-I Interferonen.⁹³ Entscheidend ist auch die Phosphorylierung von eIF2α und damit die Aktivierung des PERK-Pathways des ER-Stresses. Somit verbindet die PKR die Interferonantwort mit der Unfolded-Protein-Response (UPR). Durch die Phosphorylierung von eIF2α wird die Initiation der Translation gehemmt, was dazu führt, dass zelluläre und virale RNA nicht mehr in Proteine umgewandelt werden und folglich die virale Replikation gehemmt wird.^{93,145} Darüber hinaus aktiviert eIF2α auch Autophagie über eine Stimulation der LC3-Konversion.^{93,98,100,146} So kann die Interferonantwort zu einer verstärkten Autophagie führen, um fremde Proteine abzubauen. Die ausführlichen Wirkungen der eIF2α/PERK-Pathways werden im Rahmen der UPR besprochen.

Die eIF2α Phosphorylierung führt zudem zu einer Calreticulin-vermittelten Rekrutierung von dendritischen Zellen und T-Lymphozyten, um infizierte oder entartete Zellen zu beseitigen.¹⁴⁶

Aufgrund der Relevanz von eIF2α haben diverse Viren Mechanismen entwickelt, eIF2α Kinasen zu blockieren oder mittels eigener Phosphatasen phosphoryliertes eIF2α zu inaktivieren.¹⁴⁶

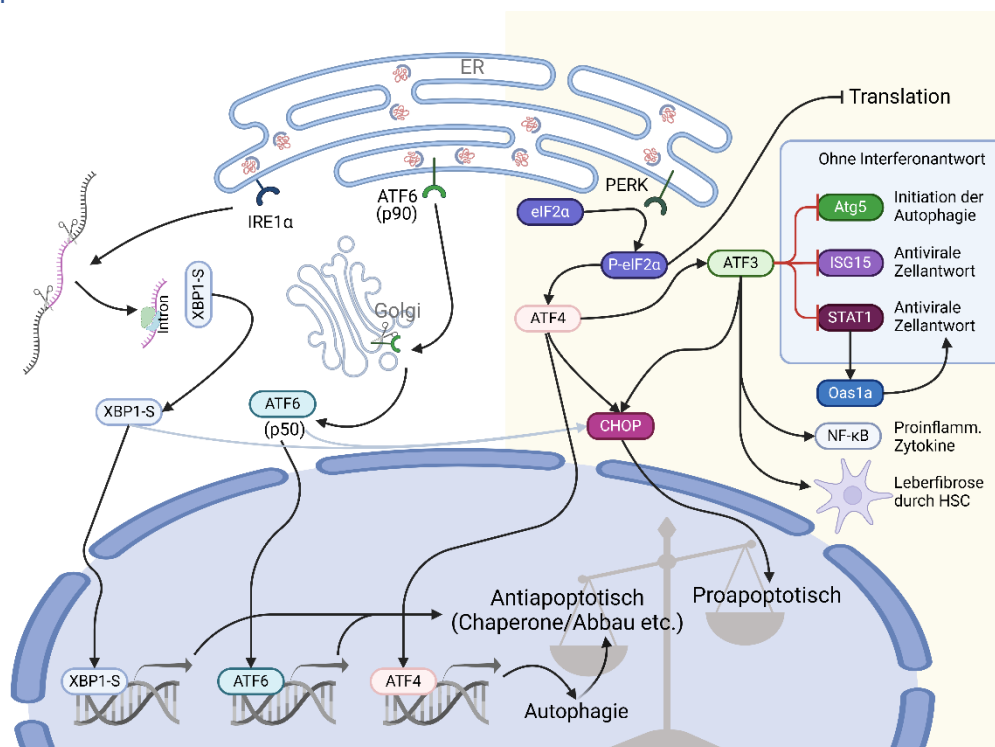
1.5 ER-Stress und Unfolded-Protein-Response

Die Unfolded-Protein-Response (UPR) ist die Antwort der Zelle auf ER-Stress, der durch fehlgefaltete Proteine oder eine Störung der Prozesse im Endoplasmatischen Retikulum (ER) entsteht. Viele Proteine werden posttranslational im ER modifiziert und gefaltet. Die korrekte Faltung der Proteine ist im Gegensatz zur DNA-Replikation, Translation und Transkription ein sehr fehleranfälliger Prozess.¹⁴⁷ Daher gibt es komplexe Kontrollmechanismen, um eine gute Qualität der finalen Proteine zu erreichen. Neben der Proteinbiosynthese ist das ER primärer Calciumspeicher der Zelle, Ort der Lipid- und Sterolsynthese, Knotenpunkt des intrazellulären Transports. Vermehrte Proteinsekretion, gestörte Faltung, z. B. bei Hitze, oder Proteinaggregate führen zu ER-Stress und zur UPR. Ziel der UPR ist es, Homöostase herzustellen. Dazu werden die Translation und der Zellzyklus

gedrosselt, um weniger neue Proteine zuzuführen. Es werden vermehrt Chaperone gebildet, um die korrekte Faltung zu begünstigen, und der Abbau von fehlgefalteten Proteinen wird stimuliert.^{90,147–149} Dabei arbeiten das Proteasom und Autophagie gemeinsam am Abbau und unterstützen sich gegenseitig. Lösliche Proteine werden dabei primär über das Proteasom abgebaut, während unlösliche Protein-Oligomere primär durch Autophagie abgebaut werden. Größere Proteinaggregate können ausschließlich durch Autophagie abgebaut werden und blockieren auch die Funktion des Proteasoms.^{36,150–154} Bei der Aggregatbildung ist daher die Autophagie unersetzlich. Wenn ER-Stress über längere Zeit nicht behoben werden kann, wird die Apoptose über den BCL-2-Pathway eingeleitet. Wann und wodurch der Wechsel von Zelladaptation zur Apoptose geschieht, ist Untersuchungsgegenstand der aktuellen Forschung. Vieles deutet darauf hin, dass die Apoptose über CHOP vermittelt wird.¹⁵⁵ Im Allgemeinen ist die UPR für die Forschung interessant, da sie sowohl in Tumorzellen, diversen neurodegenerativen Syndromen aber auch im metabolischen Syndrom relevant sind.¹⁴⁷

Die UPR wird in Säugetieren über IRE1 α , PERK und ATF6 sowie ihre jeweiligen Signalkaskaden vermittelt (Abb. 10). Diese Transmembranproteine befinden sich in der ER-Membran, erkennen direkt oder indirekt ungefaltete Proteine im ER und vermitteln auf zytosolischer Seite die entsprechende Signalkaskade.^{147,156}

Abb. 10: Schematische Darstellung des ER-Stresses und der Unfolded Protein Response



Eigene Darstellung der wichtigsten Pathways der UPR als Zusammenstellung

mehrerer Quellen,^{42,148,163–166,149,156–162} erstellt in BioRender.²⁶ In unserem Modell der HBsAg-Überexpression (siehe Abbildung 11) ist dabei nur der PERK- abhängige rechte Teil aktiviert (gelb hinterlegt).⁸ Schwarze Pfeile signalisieren eine Induktion, rote, stumpfe Enden bedeuten eine Inhibition (-).

Weitere Abkürzungen: ATF3/4/6: activating transcription factor 3/4/6; XBP1-S: X-box binding protein 1 – spliced; IRE1 α : inositol-requiring enzyme 1 α ; CHOP: C/EBP homologous protein; eIF2 α : eukaryotic translation initiation factor 2A; PERK: protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase; Atg5: autophagy related protein 5; ISG15: Interferon-stimulated gene 15; STAT1: Signal transducer and activator of transcription 1; Oas1a: 2'-5'-oligoadenylate synthase 1A; NF- κ B: nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells; HSC: Hepatische Sternzellen.

1.5.1 IRE1 α – Signalweg

IRE1 α (inositol-requiring enzyme 1 α) ist das humane Homolog von IRE1 α und befindet sich auf der ER-Membran. IRE1 α kann auf zweierlei Wegen aktiviert werden. Das Chaperon BiP (Binding immunoglobulin protein; auch GRP-78, HSPA5) bindet konstitutiv an IRE1 α .^{152,153,167} Wenn viele fehlgefaltete Proteine vorliegen, dissoziiert BiP von IRE1 α und wirkt als Chaperon der Fehlfaltung von weiteren Proteinen entgegen. Das nun freie IRE1 α homodimerisiert und wird dadurch aktiviert. Ebenso kann die Bindung von ungefalteten Proteinen direkt IRE1 α aktivieren.¹⁵³ In seiner aktivierten di- oder oligomeren Form wirkt die zytosolische Domäne als RNase, welche IXBP1 schneidet. Dabei verschiebt sie das offene Leseraster (ORF) und bildet den aktiven Transkriptionsfaktor XBP1-S. Dieser stimuliert diverse Gene, welche die Proteinfaltung, Sekretion und Abbau vermitteln.^{147,154}

Daneben spaltet IRE1 α diverse weitere mRNAs mit ähnlicher Sequenz in einem Vorgang, der als RIDD (*regulated IRE1-dependent decay*) bezeichnet wird.¹⁴⁷ Das führt zum Abbau der betreffenden mRNAs und vermindert die Expression der entsprechenden Proteine. Dies könnte zu verminderter Proteinlast für das ER führen, aber die Relevanz des RIDD ist nicht abschließend geklärt.¹⁴⁷

1.5.2 ATF6 – Signalweg

Im Gegensatz zu IRE1 α und PERK kann ATF6 (*Activating transcription factor 6*) weder durch BiP blockiert, noch durch fehlgefaltete Proteine direkt aktiviert werden. Bei ER-Stress findet sich ATF6 nicht nur auf dem ER, sondern auch auf dem Golgi-Apparat. Der genaue Mechanismus der Translokation ist noch nicht geklärt. In ER und Golgi-Apparat schneiden Proteasen (S1P und S2P) die zytosolische Domäne vom vollständigen Protein ATF6p90 ab. Das Produkt (ATF6p50) wirkt im Nukleus

als Transkriptionsfaktor und induziert, ebenso wie XBP1-S, diverse Gene, um den ER-Stress zu mindern.^{147,153}

1.5.3 PERK – Signalweg

Wie IRE1 α wird PERK (*protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase*) durch BiP gehemmt und kann überdies durch eine proteinbindende Domäne aktiviert werden, welche ungefaltete Proteine erkennt.¹⁴⁷ Dabei bilden sich Homodimere, die als Kinase die Alphaeinheit des eukaryotischen Initiationsfaktor 2 (eIF2 α) phosphorylieren.¹⁴⁷ Durch eIF2 α wird die Initiation der Translation reversibel gehemmt und es wird weniger RNA in Protein umgewandelt.¹⁴⁷ Dadurch wird der globale Zufluss von neuen Proteinen gedrosselt, und das ER hat mehr Zeit, die vorhandenen Proteine zu bearbeiten.¹⁴⁷

Unter diesen Bedingungen werden nur noch wenige mRNAs abgelesen, die zur Wiederherstellung der Homöostase dienen, insbesondere ATF4 (*Activating transcription factor 4*), der als Transkriptionsfaktor diverse Gene hinsichtlich oxidativem Stress, Proteinsynthese, Apoptose und Autophagie aktiviert.¹⁴⁷ Zudem werden auch CHOP (*C/EBP homologous protein, auch: DNA damage-inducible transcript 3 (DDIT3)*) und ATF3 (*Activating transcription factor 3*) vermehrt translatiert.¹⁴⁷ Überdies reguliert ATF4 in einem negativen Feedback-Loop die Dephosphorylierung von P-eIF2 α und damit die Wiederherstellung der normalen Proteinbiosynthese.¹⁴⁷

CHOP wirkt als Transkriptionsfaktor und bindet an das CCAAT-box Motiv in seiner aktiven, homodimeren oder heterodimeren (CHOP-ATF4) Form und aktiviert darüber diverse Gene der zellulären Stressantwort. Unter physiologischen Bedingungen findet sich nur wenig CHOP in der Zelle, da es konstitutiv ubiquitiniert und über das Proteasom abgebaut wird.¹⁵⁵ In Folge diverser zellulärer Stressoren wie DNA-Schäden, Hypoxie, Nährstoffmangel oder ER-Stress wird CHOP aktiviert. Dabei ist insbesondere der PERK-Signalweg für die Aktivierung von CHOP relevant.¹⁵⁵ Neben der Rolle als Transkriptionsfaktor ist CHOP entscheidender Faktor der über ER-Stress vermittelten Apoptose. Dabei wirkt CHOP als Mediator auf verschiedene Signalwege, wie Bcl-2/BAX oder den Death-Receptor 5 (DR5), und begünstigt bei chronischer Erhöhung die Apoptose.¹⁵⁵ Einige Studien zeigen, dass CHOP die Umwandlung von LC3-I in aktives LC3-II, welches für die Reifung von Autophagosomen notwendig ist, bei viralen Infektionen blockiert.¹⁵⁵ Diverse Studien legen eine relevante Rolle von CHOP bei der Entstehung der Leberfibrose und der Zirrhose nahe, dem Endstadium einer chronischen Hepatitis B. So konnte

gezeigt werden, dass diverse Stimuli (Cholestase, chemisch-toxisch, Steatose), die zu einer Fibrose führen, einen deutlich geringeren Effekt haben, wenn CHOP nicht vorhanden ist.¹⁵⁵ Im Einklang dazu wurde in früheren Untersuchungen gezeigt, dass eine Erhöhung von CHOP mit einer vermehrten Fibrose in HBs transgenen Mäusen einhergeht.^{8,155}

ATF3 (*Activating transcription factor 3*) ist wie ATF4 ein cAMP response element-binding protein (CREB) und wird durch verschiedene Stressoren aktiviert. Neben Zytokinen, wie Interferonen und bakteriellem LPS, wird ATF3 primär bei ER-Stress als Nebenweg der PERK-eIF2 α -ATF4-(ATF3)-CHOP Achse stimuliert.^{100,163,164,168} ATF3 wird nur in geringen Mengen basal exprimiert und steigt nach Stimulation stark an. Somit dient ATF3 als zellulärer Stressmarker insbesondere für den PERK-Pathway.¹⁶⁴ Abhängig vom Typ der Zelle hat ATF3 unterschiedliche Wirkungen. In Hepatozyten hemmt ATF3 die Gluconeogenese, hemmt in Tumoren die Zellproliferation, Migration und fördert die Apoptose.¹⁶⁴ Jedoch kann eine künstliche Überexpression auch eine Onkogenese begünstigen.¹⁶⁴ Es ist also nicht klar, ob ATF3 in unserem Modell die Onkogenese begünstigt oder hemmt.

In der Leber begünstigt ATF3 eine Leberfibrose über Stimulation der hepatischen Sternzellen (HSC) und es ist in der fibrotischen Leber verstärkt exprimiert.¹⁶⁵ Auch in unserem Modell geht eine erhöhte Expression von ATF3 in HBs-transgenen Mäusen mit einer verstärkten Fibrose einher.⁸

Darüber hinaus kann ATF3 durch Hemmung von STAT1, IRF9 und ISG15 die Interferonantwort hemmen.¹⁶⁹ Möglicherweise agiert ATF3 damit als Feedbackmechanismus.

Sood et al.¹⁶⁹ zeigen, dass ATF3 Autophagie hemmt, indem es die Initiation durch Bindung des ATG5 Promotors unterdrückt und die Elongation durch Hemmung von Beclin1 blockiert. Dabei zeigen sich diese Effekte verstärkt nach Ausschalten der Interferonantwort. Eine Suppression von ATF3 führe zu einer Stimulation der Autophagie und der Interferonantwort, und auch zu einer verminderten Virusreplikation.¹⁶⁹

Möglicherweise können Viren die Effekte von ATF3 nutzen, um die Schutzmechanismen der Zelle zu dämpfen und so die Infektion begünstigen.

Der genaue Nutzen von ATF3 für die Zelle bleibt daher unklar, partiell gegensätzlich: er ist daher Gegenstand aktueller Forschung. Auch wenn einige Studien über positive Effekte für ATF3 berichten, wie eine verbesserte Regulation von oxidativem Stress in Kardiomyozyten,¹⁷⁰ betrachten die meisten Studien ATF3 eher als Marker für einen kritischen Zellzustand.^{161,164,165,171}

1.5.4 ER-Stress und Tumorgenese

Während die Kompensationsmechanismen des ER-Stresses in einer akuten Situation der Zelle helfen, dem Stress zu widerstehen, geht eine lange andauernde Aktivierung des ER-Stresses mit einer chronischen Inflammation und Onkogenese einher.^{147,156,172} Denn auch, wenn die Zelle versucht, mittels ER-Stress zur Homöostase zurückzukehren oder die Apoptose zu beginnen, steigt die Chance der Entartung durch Andauern des Stresses.

Wenn eine Zelle entartet ist, hilft ER-Stress, den Tumor vor Stressoren wie Chemotherapeutika zu schützen¹⁷³ So gilt bei Tumoren eine ausgeprägte ER-Stressreaktion als prognostisch ungünstiger Faktor, der zu einer erhöhten Mortalität führt.¹⁷³ Daher kann ER-Stress als Pro-Survival-Tool der Zelle dem Organismus mehr schaden als nutzen.

1.5.5 ER-Stress und Autophagie

Beide Mechanismen sind essenziell für den Erhalt der zellulären Homöostase und sind daher eng verknüpft. Autophagie unterstützt die UPR durch Abbau von fehlgefalteten Proteinen, Noxen und anderen Stressoren und kann auch im Rahmen der ER-Phagie, als Sonderform der Makroautophagie, beschädigtes ER abbauen.¹⁷⁴⁻¹⁷⁶ Eine Dysregulation begünstigt eine Vielzahl von Pathologien, wie neurodegenerative Erkrankungen (z. B. Morbus Parkinson) oder maligne Entartungen. Alle drei UPR Pathways können Autophagie stimulieren, jedoch scheint die Aktivierung via PERK und ATF4 von besonderer Bedeutung zu sein.^{100,159}

1.6 Immunpriming der Mäuse

Da unsere Arbeitsgruppe initial die Fibrose der Leber unter HBV erforscht hat, wurden neben den ursprünglichen C57BL/6 (Black 6) Mäusen die Linie auf Fibrose-sensible BALB/c Mäuse gekreuzt.

Dabei geht man davon aus, dass die BALB/c Mäuse aufgrund eines unterschiedlichen Immunprimings zur Fibrose neigen.^{17,22} Die CD4+-T-Helferzellen der BALB/c Mäuse zeigen dabei primär eine Th2-Antwort, während C57BL/6 primär eine Th1-Antwort zeigen.^{8,22} Die CD4+-T-Helferzellen werden nach ihrer Differenzierung in Th1, Th2 sowie Th17 (interleukin-17-producing T helper), Tfh (follicular T helper) und regulatorische T-Zellen (Treg) eingeteilt.¹⁷⁷ Die Th1-Antwort ist primär proinflammatorisch und wird durch IFN- γ gekennzeichnet, während Th2 durch IL-4/5/13 gekennzeichnet ist.¹⁷⁷ Die Th1-Antwort wirkt dabei primär gegen intrazelluläre Erreger wie Viren, ist jedoch bei diversen Autoimmunerkrankungen vermehrt aktiv. Th2 hingegen, als Gegenspieler und Regulator der Th1-Antwort,

vermittelt primär die Abwehr von extrazellulären Parasiten (insb. Helminthen) und hat vermehrt bei atopischen Erkrankungen wie Allergien eine Relevanz.¹⁷⁷ Für ein gesundes Immunsystem ist eine Balance zwischen Th1- und Th2-Antwort wichtig. Diese Balance verändert sich im Laufe des Lebens und ist auch individuell unterschiedlich.^{177,178} Eine prolongiert verstärkte Th2-Immunantwort ist mit einer stärkeren Leberfibrose assoziiert.¹⁷⁹ Dabei werden diverse profibrogene Gene in Myofibroblasten aktiviert.¹⁷⁹ Die verstärkte Fibrose in BALB/c Mäusen im Vergleich zu C57BL/6 ist auch in früheren Publikationen der AG gezeigt worden.⁸

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die Aufklärung der ausgeprägten Unterschiede in der Pathologie von BALB/c und IRF3/7 KO Mäusen, insbesondere im Hinblick auf die Aggregatbildung. In den Mäusen ohne Interferonantwort (IRF3/7 KO) treten Milchglashepatozyten auf, wie sie auch bei Patienten mit chronischer Hepatitis B (CHB) typisch sind. Diese Hepatozyten enthalten Aggregate aus HBs und Lipiden, die nicht über das Proteasom, sondern ausschließlich über Autophagie abgebaut werden können. Sowohl ER-Stress als auch die Interferonantwort können Autophagie regulieren. Daher wurden diese Pathways sowie die Autophagie untersucht, um mögliche Unterschiede im Abbau zu erkennen und die Entstehung der Milchglashepatozyten besser zu verstehen. Aufgrund der therapeutischen Anwendung von Interferon bei chronischer Hepatitis B liefern die gewonnenen Erkenntnisse zudem Hinweise auf mögliche Effekte einer Interferontherapie.

2 Material und Methoden

Die Dissertation wurde, wie üblich, auf bestehenden wissenschaftlichen Arbeiten aufgebaut. Dabei wurden alle Grafiken selbst erstellt. Fremde Quellen und Werkzeuge wurden entsprechend durch Zitate gekennzeichnet. Dabei wurden Sinneinheiten zusammengefasst gekennzeichnet.

2.1 Versuchstiere

Im Rahmen dieser Dissertation wurden ausschließlich Proben von Tieren weitergehend untersucht, die bereits in früheren Studien^{8,13,180} gesammelt wurden.

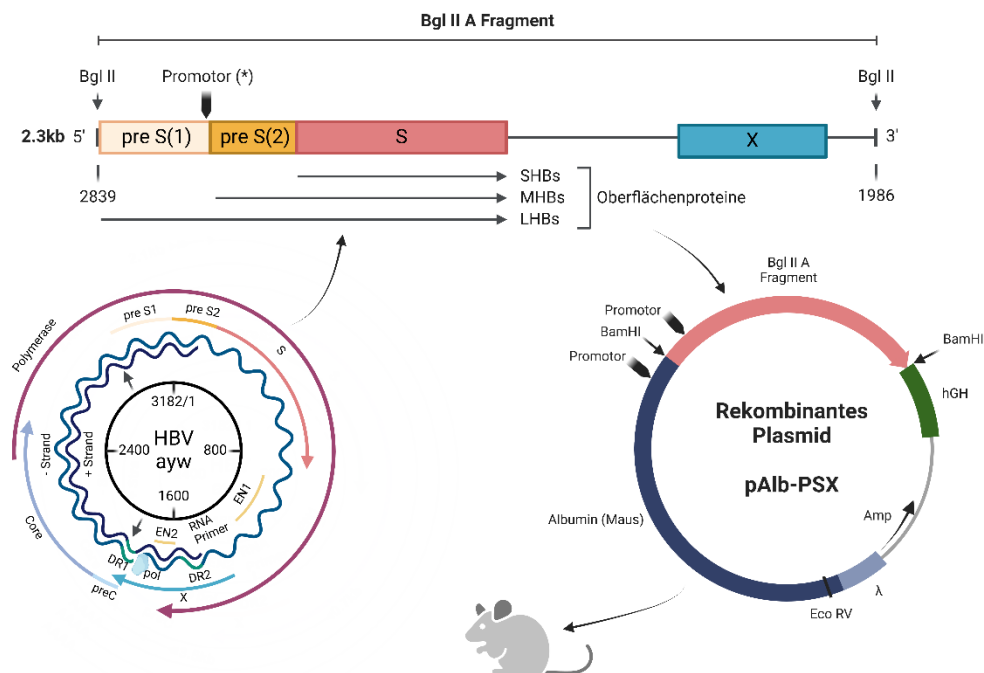
Die Geschäftszeichen der Tierversuchsanträge des Regierungspräsidiums Gießen liegen vor: V 54-19c 20 15h 01 GI 20/10 Nr. 128/2014 und V 54-19c 20 15c GI 20/10 Nr. A 60/2011.

Die Mäuse wurden in der zentralen Tierhaltung des FB11 (Leiter Dr. Daniel Zahner) der Justus-Liebig-Universität Gießen entsprechend den geltenden Gesetzen und Regularien in keimfreien Umgebungen gehalten (SPF). Die Mäuse erhielten keine Therapien oder besondere Diäten.

Die Mauslinien zur Expression von Hepatitis-B-Oberflächenproteinen entstammen transgenen Mäusen von Chisari^{6,181} (C57BL/6J-Tg(Alb1HBV)44Bri/J; RRID:IMSR_JAX:002226).¹⁸² Das Transgen und die untersuchten Mäuse sind in den folgenden Figuren (Abbildung 11, Abbildung 12) erklärt.

Die Mäuse wurden im Alter von 8 oder 12 Wochen (8W/12W) nach einer Betäubung durch Isofluran via CO₂-Inhalation getötet. Es wurden venöses Blut und die Leber entnommen. Die Lebern wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert. Die beteiligten Mitarbeiter waren entsprechend ihren Tätigkeiten geschult und durch die oben genannten Tierversuchsanträge befugt.

Abbildung 11: Hepatitis B Insert









Eigene Darstellung der eingefügten DNA nach Chisari et al.,^{6,107,180} erstellt in BioRender.²⁶ Unten links: Intaktes HBV Genom, welches durch das Restriktionsenzym Bgl II geschnitten wurde. Dabei entsteht das oben gezeigte Fragment. Dieses enthält die DNA für die Oberflächenproteine (HBs: SHB/MHB/LHB) und HBx. Die Oberflächenproteine werden aus einem überlappenden, offenen Leseraster (open-reading-frame: ORF) gebildet. Das Fragment wurde in das pAlb-PSX Plasmid eingefügt, sodass durch den Albuminpromotor auch das Bgl II Fragment abgelesen und translatiert wird. Mit diesem Plasmid wurden transgene Mäuse geschaffen, welche HBs in der Leber exprimieren. Diese von Chisari et al. erstellten Mäuse dienen als Grundlage für unsere Experimente.

Die HBs-transgene Maus basiert auf Black 6 (C57BL/6) Hintergrund und wurde durch Rückverpaarung hemizygoter, transgener Männchen mit C57BL/6 Weibchen fortgeführt (Abbildung 12: B6 TG). Zur Untersuchung der Leberfibrose und Hepatitis wurden diese C57BL/6 Mäuse mit zu Fibrose neigenden BALB/c Mäusen^{8,22} über mindestens 6 Generationen rückverpaart (BC TG). Zur Untersuchung der Typ-I-Interferonantwort wurden die HBs-transgenen BALB/c Mäuse weiter verpaart. Dabei entstammen die IRF3/7 Doppelknockoutmäuse (IRF3^{-/-}/IRF7^{-/-}) den Arbeiten der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Anne Krug.¹³¹ Diese entstammen einem C57BL/6 Hintergrund, weswegen sie über 8 Generationen mit BALB/c Mäusen auf einen BALB/c Hintergrund gekreuzt wurden. Daraus wurden die heterozygoten Mäuse

gekreuzt und die anschließend IRF3/7 KO homozygoten Mäuse selektiert und analysiert (IRF WT). Diese wurden mit den HBs-transgenen BALB/c Mäusen gekreuzt. Die entstehenden für IRF3/7 KO heterozygoten, HBs-transgenen BALB/c Mäuse wurden selektiert und verpaart. Die daraus entstehenden IRF3/7 homozygoten, HBs-transgenen BALB/c Mäuse wurden selektiert und analysiert (IRF TG).

Abbildung 12: Verwendete Mauslinien

	HBs-Wildtyp (WT) (haben KEIN HBs)	HBs-transgen (TG) (produzieren HBs in der Leber)
C57BL/6 (intakte Interferonantwort)		
↕ Vergleich: Einfluss des Genotyps ↕		
BALB/c (IRF3/7 WT) (intakte Interferonantwort)		
↕ Vergleich: Einfluss Interferonantwort ↕		
BALB/c IRF3/7 KO (KEINE Interferonantwort)		

Eigene Darstellung der verwendeten Mäuse erstellt in PowerPoint.¹²¹ Für die Hauptanalyse werden die HBs-transgenen „TG“ Mäuse verglichen (rechts). Um mögliche Unterschiede durch den Genotyp aufzudecken, wurden auch die jeweiligen HBs-Wildtypen (links) „WT“ untersucht. Diese gleichen den jeweiligen TG Mäusen bis auf die fehlende Expression von HBs. Zur Untersuchung des Einflusses der Interferonantwort wurden die BALB/c Mäuse ohne IRF3/7 Knockout (BC WT/BC TG) mit den BALB/c Mäusen mit dem IRF3/7 KO (IRF WT/IRF TG) verglichen. Zur Untersuchung des Einflusses des Genotyps wurden die C57BL/6 (B6 WT/B6 TG) mit den BALB/c Mäusen ohne IRF3/7 KO (BC WT/BC TG) verglichen.

Zur besseren Lesbarkeit wurden folgende Bezeichnungen festgelegt:

BALB/c IRF3/7 WT HBs-WT:	BALB/c WT,	kurz: BC WT
BALB/c IRF3/7 WT HBs-TG:	BALB/c TG,	kurz: BC TG
BALB/c IRF3/7 KO HBs-WT:	IRF3/7 KO WT,	kurz: IRF WT
BALB/c IRF3/7 KO HBs-TG:	IRF3/7 KO TG,	kurz: IRF TG
C57BL/6 HBs-WT:	C57BL/6 WT,	kurz: B6 WT
C57BL/6 HBs-TG:	C57BL/6 TG,	kurz: B6 TG

Wenn von transgenen Mäusen gesprochen wird, meint dies immer HBs-transgen, bei Knockout ist immer der IRF3/7 KO gemeint. Wildtyp (WT) bezeichnet immer Mäuse ohne HBs, nicht den IRF3/7 Status.

Wenn von BALB/c Mäusen gesprochen wird, sind nur die BALB/c (IRF3/7 WT) Mäuse gemeint, nicht die BALB/c IRF3/7 **KO**, diese werden als IRF3/7 KO bei Bedarf explizit mit genannt.

Für die Histochemie wurden Kryo- oder Paraffinschnitte der Leber analysiert. Für qPCR und Westernblot wurden entsprechende Lysate aus gemörsertem Lebergewebe hergestellt.

2.2 Geräte und Materialien

Tabelle 1: Verwendete Geräte

Gerät:	Hersteller:
Electrophoresis Power Supply Consort EV #243	Fisher Bioblock Scientific, Schwerte
Fastblot B44	Biometra-GmbH, Göttingen
Feinwaage A200S	Sartorius analytic, Göttingen
Gefrierschrank (-20 °C) #GNP3376	Liebherr, Ochsenhausen
Gefrierschrank (-80 °C) #907	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Homogenizer Ultra Turrax T8	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Infinite® 200 PRO #30050303	Tecan Group Ltd., Männedorf (Schweiz)
INTAS ECL ChemoStar Plus Imager HR 6.0	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
Kamera, USB Cam 051H Reprstar 3	Phytec, Mainz
Lichtmikroskop #156585	Leica Microsystems, Wetzlar
Magnetrührer #RCTB 00.084009	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Mikroskop DMIL	Leica Microsystems, Wetzlar
Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Kalifornien (USA)
Mini-PROTEAN® Tetra Handcast Systems	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Kalifornien (USA)
Motorisiertes inverses System Mikroskop #IX81S1F-3	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg

Nano Drop, Spectrophotometer ND-1000	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Neubauer Zählkammer 0,1 mm	LO - Laboroptik Ltd, Lancing (Vereinigtes Königreich)
Pipette serologisch 10 mL #607180	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster (Österreich)
Pipette serologische 5 mL #606180	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster (Österreich)
Pipetten Abimed	International Labmate Ltd, St Albans (Vereinigtes Königreich)
Pipetten Research plus	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetten Sarpette® M, 1-Kanal	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
Rocking Platform	VWR International GmbH, Darmstadt
Röntgenkassette	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Rüttler #444-0142	VWR International GmbH, Darmstadt
StepOne Plus RT PCR System	Life Technologies, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Stickstofftank #CFB-160	Taylor-Wharton Harsco GmbH, Husum-Mildstedt
Thermocycler T3000	Biometra-GmbH, Göttingen
ThermoMixer #5436	Eppendorf AG, Hamburg
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Trans-Blot® Turbo™ System #690BR028141	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
Ultra TURRAX T3	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Vortex Mixer 7-2020	neoLab, Heidelberg
Vortex Schüttler VF2	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Waage Kern #440-47	KERN & SOHN GmbH, Albstadt
Zentrifuge Micro Star 17R	VWR International GmbH, Darmstadt
Zentrifuge Mikro 120	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

Materialien:	Hersteller:
5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
70% Ethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
96% Ethanol	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Acetic Acid	Merck KGaA, Darmstadt
Agarose Broad Range Roti®garose	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
AM 1907 DNA-free	Ambion - Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Amersham Hyperfilm™ ECL	GE Healthcare Life Sciences, München
Ammoniumperoxodisulfat (APS) #9592.2	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Aqua dest.	Millipore MQ-Biocel Anlage
Biosphere® Filter Tips #70.760.211	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
Bovine Serum Albumin (BSA), pH=7 #BSA-1T	Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund
Bromphenolblau #15375	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Cellstar® Tubes	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Citronensäure #X863.2	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Collection Tubes	Qiagen, Hilden
Curix 60	AGFA Health Care, Greenville
Deckgläschen	R. Langenbrinck, Emmendingen
Dimethylsulfoxid ROTIPURAN® #4720.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Disposable Glass Pasteur Pipettes 230 mm # 612-1702	VWR International GmbH, Darmstadt
Dodecylsulfate-Na-salt in pellets #20765.03	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Essigsäure (Eisessig) 100% #1.00063.1011	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol ROTIPURAN® #9065.4	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Formaldehyd 6x Loading Dye, AM8552	Ambion - Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Gel blotting paper, GB 003, #10426892	Whatman®
Glycin PUFFERAN® #3908.2	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Hämalaun Sauer nach Mayer, # T865.2	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
HCL >37%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Hydrochloric acid (HCl) #30721-1L-M	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Immobilon®-P Transfer Membrane #IPVH00010	Merck Millipore Limited, Tullagreen, Carrigtohill ED (Irland)
Impress Reagent Kit	Vector Laboratories Inc., Burlington
iScript cDNA Synthese Kit, #170-8890	Bio-Rad, Hercules, USA
Isopropanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
KCL, #67813	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
KH2PO4, #P030.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Luminol #A8511-5G	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Methanol #32213-2.5L-M	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

MicroAmp® Fast Reaction Tubes	Life Technologies, Life Technologies GmbH, Darmstadt
MicroAmp® Optical 8-Cap Strip	Life Technologies, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Microplatte, 96 Well, UV-STAR® #655809 COC, F-BODEN, KAMINFORM, SCHWARZ	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Micro-Touch® #18074824DF	Ansell, Richmond (Australien)
Milchpulver (Blotting grade) #T145.3	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Millex-GV, 0,22 µm, PVDF, 13 mm, durch Ethylenoxid sterilisiert #SLGV013SL	Merck KGaA, Darmstadt
MOPS 99,5%, HM1245	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Mouse IgG Blocking Reagent, MBK-2213	Vector Laboratories Inc., Burlington
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamine (TE-MED), #35925.01	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Na₂HPO₄, #3904.2	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
NaCl, #31434	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumchlorid #3957.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Natriumhydroxid #6771.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Nümbrecht QIAShredder	Qiagen, Hilden
OPAL 520 Reagent Pack, Fluorophor in DMSO #FP1487001KT	Akoya Biosciences, Marlborough (USA)
OPAL 570 Reagent Pack, Fluorophor in DMSO #FP1488001KT	Akoya Biosciences, Marlborough (USA)
Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder #26619	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts (USA)
p-Cumarsäure #110M1259V	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Pertex® Eindeckmedium	Medite, Burgdorf
Pipettenpitzen 1000 µL, blau #70.762.010	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
Pipettenspitzen 10 µL, farblos #70.1130	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
Pipettenspitzen 200 µL, gelb #70.760.012	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
Platinum SYBR Green qPCR Super Mix, #11733-038	Invitrogen, Carlsbad, USA
Polyoxyethylenesorbitan #P-7949	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Reagiergefäß 1,5 mL #72.690.001	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
Reagiergefäß 2,0 mL #72.691	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
Reaktionsgefäße	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
RNase AWAY, #7002	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
RNase-freies Wasser	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Minisäulen	Qiagen, Hilden
Rotiphorese® Gel 30 (37,5: 1) #3029.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Rotiphorese® Gel 40 29:1, # A515.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
RPE Buffer	Qiagen, Hilden
RTL Buffer	Qiagen, Hilden

RW1 Buffer	Qiagen, Hilden
SDS	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Sirius-Rot-Farbstoff	Polysciences, Heidelberg
Stickstoff	Apotheke der JLU Gießen
Triglyceride Quantification Kit (ab65336)	Abcam, USA
Tris base #77-86-1	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
TRIS PUFFERAN® #4855.2	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Trockeneis	Apotheke der JLU Gießen
Tubes Falcon	Corning Science México, Tamaulipas
Tween® 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Vector® VIP Peroxidase Substrate Kit	Vector Laboratories Inc., Burlington
Vernichtungsbeutel #86.1197	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
Wasserstoffperoxid 30% #1.072.101.000	Merck KGaA, Darmstadt
Xylol	VWR International GmbH, Darmstadt
β-Mercaptoethanol #60242	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Tabelle 3: Puffer und Lösungen

Lämmli-Puffer (1x): 2 ml Lämmli-Puffer (4x), 6 ml Aqua dest.	Lämmli-Puffer (4x): 40% Glycin, 20% Mercaptoethanol, 8% SDS, 0,25 M Tris HCl pH 6,8, (Stammlösung) 0,02% Bromphenolblau
Tris-Glyzin Puffersystem: 115 ml Aqua dest., 375 ml 2M Tris pH 8,8 (=1,5M), 10 ml (4xTrenngel-Puffer, 500 mL) 20% SDS (=0,4%)	Trenngel (10%): 3,332ml Rotiphorese® Gel 30 37, 5:1, 1,950ml 2 M Tris Puffer pH 8,8, 100 µl APS 10%, 10 µl TEMED, ad 10 ml mit Aqua dest.
Milchpulver-Lösung: 2,5 mg Milchpulver, ad 50 ml mit TBS-T	Trenngel (15%): 5ml Rotiphorese® Gel 30 37, 5:1, 1,950ml 2 M Tris Puffer pH 8,8, 100 µl APS 10%, 10 µl TEMED, ad 10 ml mit Aqua dest.
4xSammelgel-Puffer: 365 ml Aqua dest., 125 ml 2M Tris pH 6,8 (=0,5M), 10 ml 20% SDS (=0,4%)	Sammelgel 3% (3,3ml für 2 Gele):330µl Rotiphorese® Gel 30 37, 5:1, 2130µl 4xSammelgel-Puffer, 40 µl APS 10%, 4 µl TEMED
Gelelektrophorese-Puffer (1x): 100 ml 10x Gelelektrophorese-Puffer, ad 1000ml Aqua dest.	Gelelektrophorese-Puffer (10x): 10g SDS, 30g Tris, 144g Glycin, ad 1000 ml Aqua dest.
Kathode Puffer (1x): 100 ml Kathode Puffer (10x), ad 1 l mit Aqua dest.	Kathode Puffer (10x): 242 g Tris Base, 358 g Tricin (9), ad 2 l mit Aqua dest. , 20 g SDS
Anode Puffer (1x): 100 ml Anode Puffer (10x) ad 1 l mit Aqua dest.	Anode Puffer (10x): 484 g Tris base, in Aqua dest. lösen (weniger als 2 l), auf pH auf 8,9 mit HCl titriert, ad 2 l mit Aqua dest.
TBS-Tween (TBS-T): 200 ml 10x TBS pH 7,5, 2 ml Tween 20 ad 2 l mit Aqua dest.	TBS (10x) pH 7,5: 200 mM Tris pH 7,5, 1,37 M NaCl ad 1 l mit Aqua dest.
PBS-Stammlösung (10x): 80g NaCl (137 mM) (16), 2g KCl (2,7 mM) (17), 2,45 g KH₂PO₄, 11,5 g Na₂HPO₄ ad 1l mit Aq. dest.	PBS (1x): 100 ml PBS-Stammlösung ad 1l Aq. dest.
ECL-Entwicklung: 10 ml Aqua dest., 0,5 ml 2M Tris pH 8,5, 2,6 µl 30% Wasserstoffperoxid, 50 µl 250 mM Luminol und 25 µl 90mM Coumeric acid	AP-Entwicklung: NBT = Nitroblau-Tetrazoliumchlorid: 66 µl + BCIP = 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat 33µl + 10 ml Inkubationspuffer
Inkubationspuffer: 10 ml 5 mM NaCl, 2,5 ml 1M MgCl₂, 50 ml 1M Tris pH 9,5, ad 500 ml Aqua dest.	Stripping Puffer: 15 g Glyzin, 1 g SDS in Aqua dest. gelöst, pH mit HCl auf 2,2 titriert , ad1 L mit Aqua dest.
	Blotpuffer (pH9,2): Tris-gepuffert 5,82 g, Glycine 2,93 g, Aqua dest 800 ml, Methanol 200 ml

Tabelle 4: Verwendete Antikörper

PROTEIN:	BESTELL- NUMMER:	HERSTELLER:
ALBUMIN	sc-50536	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, USA
ATF3	sc-188	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, USA
BECLIN-1	11306-1-AP	ProteinTech Group, Chicago, IL, USA
CHOP GADD153	NB600- 1335SS	Novus Biologicals, Littleton, Colorado, USA
GAPDH	60004-1-Ig	ProteinTech Group, Chicago, IL, USA
HBSAG	20-HR20	Fitzgerald Industries, Acton, Massachusetts, USA
HBX	ab39716	Abcam, Cambridge (England)
HBX	ab2741	Abcam, Cambridge (England)
ISG15	sc-166755	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, USA
LAMP-1	GTX634336	Genetex, Inc (Irvine, CA, USA)
LAMP-2	NB 300-591	Novus Biologicals, Littleton, Colorado, USA
LC3B	NB100-2220	Novus Biologicals, Littleton, Colorado, USA
LHB		Virology JLU, (Gießen, Germany)
OAS1A	sc-365072	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, USA
P62	PT 18420-1- AP	ProteinTech Group, Chicago, IL, USA
PHOSPHO-P70 S6 KINASE (THR389)	#9205	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
PHOSPHO-S6 RIBOSOMAL PROTEIN (SER235/236)	#4858	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA
PLIN2	15294-1-AP	ProteinTech Group, Chicago, IL, USA
P-P62SQSTM1	GTX128171	Genetex, Inc (Irvine, CA, USA)
UBIQUITIN	#3936	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA
UBIQUITIN ENRICHMENT KIT	89899	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
B-ACTIN	sc-47778	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, USA

Tabelle 5: Verwendete PCR-Primer

NCBI GEN:	GEN:	ANNEALING- TEMPERATUR	
		IN °C:	SEQUENZ:
11910	Atf3 as	61,2	5'-TTGACGGTAACTGACTCCAGC-3'
11910	Atf3 s	62,9	5'-GAGGATTTTGCTAACCTGACACC-3'
56208	Becn1 as	61.2	5'-TCCTCCTGAGTTAGCCTCT-3'
56208	Becn1 s	62.5	5'-ATGGAGGGGTCTAAGGCGTC-3'
13198	Ddit3 as (CHOP)	62,1	5'-CAGGGTCAAGAGTAGTGAAGGT-3'
13198	Ddit3 s (CHOP)	61,2	5'-CTGGAAGCCTGGTATGAGGAT-3'
UTI77694.1	HBx as	59,4	5'-TGCTGAGAGTCCAAGAGTCC-3'
UTI77694.1	HBx s	59,4	5'-GTCTGTGCCTTCTCATCTGC-3'
CAJ18434.1	lfit1 as	60,5	3'-GTGCATCCCCAATGGGTTCT-3'
CAJ18434.1	lfit1 s	60,9	5'-CTGAGATGTCACTTCACATGGAA-3'
54123	Irf7 as	59,5	5'-GACCGAAATGCTTCCAGGG-3'
54123	Irf7 s	62,5	5'-GAGACTGGCTATTGGGGGAG-3'
100038882	Isg15 as	61,2	5'-TGGAAAGGGTAAGACCGTCCT-3'
100038882	Isg15 s	61,2	5'-GGTGTCCGTGACTAACTCCAT-3'
NP_080011.1	LC3a as	60,1	5'-CTTGACCAACTCGCTCATGTTA-3'
NP_080011.1	LC3a s	61,6	5'-GACCGCTGTAAGGAGGTGC-3'
67443	LC3B as	62,9	5'-CGCCGTCTGATTATCTTGATGAG-3'
67443	LC3B s	62,9	5'-TTATAGAGCGATACAAGGGGGAG-3'
AKL79318.1	LHB as	59,4	5'-TCCAGCTCCTACCTTGTGG-3'
AKL79318.1	LHB s	59,4	5'-GTTGGATCCAGCCTCAGAG-3'
56312	Nupr1 as	60,0	5'-TCTTGGTCCGACCTTCCGA-3'
56312	Nupr1 s	60,0	5'-CCCTTCCCAGCAACCTCTAAA-3'
246730	Oas1a as	61,2	5'-CATGACCCAGGACATCAAAGG-3'
246730	Oas1a s	55,9	5'-TGAGCGCCCCCATCT-3'
NP_742083.1	Rpl32 as	59,5	5'-TTGTTCTCCATAACCGATG
NP_742083.1	Rpl32 s	59,5	5'-TTAAGCGAACTGGCGGAAAC
UNJ97001.1	SHB as	59,4	5'-GCAGCAGGATGAAGAGGAAG-3'
UNJ97001.1	SHB s	59,4	5'-CCCAACCTCCAATCACTCAC-3'
18412	Sqstm1 as (p62)	61,2	5'-TCACAGATCACATTGGGGTGC-3'
18412	Sqstm1 s (p62)	59,5	5'-AGGATGGGGACTTGGTTGC-3'
20846	STAT1 as	58.4	5'-GCTTCACCTTCTCTGTTCTG-3'
20846	STAT1 s	56.4	5'-TCAAGTCATGTGCATAGAGC-3'

2.3 Software

Zur Erstellung der Dissertation wurden folgende Softwaretools verwendet:

- Microsoft Office 365 (Word/Excel/PowerPoint):¹²¹ Textverarbeitung/
Diagrammerstellung, Fold-Change-Berechnung/Grafikerstellung
- ImageJ:¹⁸³ Grafikerstellung, Densitometrie
- SPSS Version 29.0.0.0:¹⁸⁴ Statistische Analyse
- LabImage 1D L340:¹⁸⁵ Densitometrie
- StepOnePlus Analyse Software v.2.3:¹⁸⁶ Real Time PCR Messung
- Mendeley:¹⁸⁷ Zitation
- BioRender:²⁶ Grafikerstellung von Schemata und Flowcharts

2.4 Methoden

2.4.1 Westernblot Analyse (WB)

Zur Analyse und zum Vergleich der Proteine wurde das Westernblot-Verfahren gewählt. Dabei wurden die Lysate nach Lämmli¹⁸⁸ der Mauslebern mit einem SDS-Polyacrylamid-Gel mittels Elektrophorese entsprechend der Proteingröße getrennt. Durch die Aufbereitung nach Laemmli und die Zugabe des starken Detergens SDS (sodium dodecyl Sulphate) wurden die Proteine denaturiert sowie stark negativ geladen. Deren Ladung war dann proportional zur Masse.

Mithilfe elektrischer Spannung wurden die Lysate durch das Gel gezogen. So entstanden Proteinbanden gleich großer Proteine, welche mittels Blotting auf eine Kunststoffmembran für weitere Analysen übertragen wurden.

Mit spezifischen Antikörpern konnten gezielt Proteine markiert werden. Dies erlaubte die Aussage über das Vorhandensein von bestimmten Proteinen sowie eine Einschätzung der Mengen und des relativen Vergleichs der Proteinmengen.

Die Verwendung einer Ladekontrolle mit einem Housekeeping-Protein ermöglichte eine Qualitätskontrolle und stellte sicher, dass von jeder Probe gleich viel Lysat getestet wurde.

2.4.1.1 Westernblot Lysate

Das Lebergewebe wurde bis zur Analyse bei -80 °C aufbewahrt. Die weiteren Verarbeitungsschritte erfolgten unter stetiger Lagerung auf Trockeneis und Kühlung aller Instrumente mit flüssigem Stickstoff.

Vom gemörserten Gewebe wurden mittels Feinwaage 50 mg abgewogen und mit 1000 µl Laemmli-Puffer¹⁸⁸ auf 99 °C für 10 Minuten erhitzt. Anschließend wurden die Lysate bei 140.000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen, und der Überstand wurde in neue Gefäße aliquotiert und bei -20 °C gelagert bis zur Verwendung im Westernblot.

Vor der Verwendung wurde jeweils ein Aliquot aufgetaut und kurz durchmischt.

2.4.1.2 Herstellung der Polyacrylamid-Gele

Die Polyacrylamid-Gele wurden frisch vor jedem Versuch entsprechend den Angaben des Herstellers zubereitet. Zu Beginn wurden die Trägerplatten gereinigt und zusammengebaut. Das Trenngel wurde entsprechend dem Zielprotein in geeigneter Gelfestigkeit hergestellt (siehe Tabelle 3), bis ca. 1,5 cm unter den oberen Rand gefüllt und mit Ethanol bedeckt. Nach 20 Minuten Polymerisationszeit wurde das Ethanol abgegossen und getrocknet. Dann wurde das Sammelgel gegossen und ein Taschenkamm zur Bildung der Probenkammern eingesteckt.

Nach weiteren 20 Minuten wurde das Gel aus dem Gussrahmen genommen, der Taschenkamm entfernt und in den Laufrahmen gesetzt.

2.4.1.3 Gelelektrophorese

Der Elektrodenrahmen wurde mit Gelelektrophorese-Puffer gefüllt. Je 20 µl der Westernblot-Lysate wurden in die Geltaschen pipettiert. In die erste Tasche wurden 5 µl gefärbte Größenmarkerproteine (Page Ruler) pipettiert. Die befüllten Elektrodenrahmen wurden in die mit Gelelektrophorese-Puffer gefüllten Laufkammern gestellt. Anschließend wurde für 10 Minuten eine Spannung von 100 V angelegt. Nachdem man eine erste Auftrennung sehen konnte, wurde die Spannung auf 130 V erhöht, bis der Größenmarker das Ende des Gels erreicht hatte. Das dauerte ca. eine Stunde.

2.4.1.4 Semi-Dry Blot

Zur einfacheren weiteren Handhabung wurden die Proteine aus dem Gel mittels Semy-Dry-Blotting auf eine Membran aus Polyvinylidenfluorid (PVDF) übertragen. Dazu wurde das Gel aus den Rahmen entfernt und in Blotpuffer gelagert. Die PVDF-Membran wurde 3 Sekunden in Methanol aktiviert, mit destilliertem Wasser gespült und ebenfalls in Blotpuffer gelagert. In der Blotting-Kammer wurden drei in Blotpuffer getränkte Whatman-Papiere, die PVDF-Membran, das Westernblot-Gel sowie drei weitere getränkte Whatman-Papiere blasenfrei gestapelt. Die Kammer wurde geschlossen und eine Spannung von 60 mA pro Membran für ca. eine Stunde angelegt.

2.4.1.5 Immunchemie

Zum gezielten Nachweis spezifischer Proteine wurden diese mittels geeigneter Primär-Antikörper markiert und später mittels Sekundär-Antikörper sichtbar gemacht.

Die Membranen wurden zuerst mit 5% Milchpulverlösung eine Stunde auf einem Kippschüttler geblockt, um unspezifische Bindungen zu vermeiden. Danach wurde der Primär-AK zugegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur oder 4°C über Nacht inkubiert. Der Primär-AK wurde in drei Schritten (dreimalig für 10 Minuten) mit TBS-T abgewaschen, sodass er nur dort zurückblieb, wo er an Protein gebunden war. Der Sekundär-AK wurde ebenfalls für eine Stunde inkubiert und entsprechend abgewaschen. Die biologischen Replikate (n) entsprachen immer der im Blot gezeigten Anzahl, in der Regel jeweils eine WT und drei TG Mäuse.

2.4.1.6 Chemolumineszenz – Entwicklung mittels HRP

In der Regel wurde ein Sekundär-AK mit HRP (Horseradish Peroxidase) verwendet. HRP setzte dabei Luminol des Entwicklers in Licht um, welches mit fotografischem

Film (Fujifilm) mit nachträglicher Digitalisierung oder primär digital mit einem INTAS ECL ChemoStar Plus Imager HR 6.0 dokumentiert wurde.

Dazu wurde die Membran eine Minute in der frisch zubereiteten ECL-Entwicklerlösung inkubiert. Anschließend wurde der Film in einer Dunkelkammer auf die Membran gelegt, einer ausreichenden Belichtung exponiert und anschließend entwickelt.

Im Verlauf der Arbeit wurde auf ein digitales Verfahren mit dem INTAS Imager umgestellt, welches die korrekte Belichtung deutlich vereinfachte. Dabei wurde die Membran nach Inkubation in das Gerät gelegt und mit einer Kamera aufgenommen.

2.4.1.7 Chromogener – Nachweisentwicklung mittels AP

In Teilen der Untersuchung wurde ein Sekundär-AK mit alkalischer Phosphatase (AP) verwendet. Die alkalische Phosphatase wandelte dabei BCIP (5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat) und NBT (Nitroblau-Tetrazoliumchlorid) in einen Indigofarbstoff um, welcher dauerhaft sichtbar ist. Dabei wurde die Membran in die frisch hergestellte Entwicklerlösung gegeben und so lange inkubiert, bis eine ausreichende Färbung erreicht war, und dann in destilliertem Wasser gewaschen, um die Reaktion zu beenden. Nach dem Trocknen der Membranen wurden diese gescannt.

2.4.1.8 Densitometrie

Die semiquantitative Analyse von Westernblots wurde mit der Software LabImage 1D L340 – Intas Science Imaging GmbH¹⁸⁵ entsprechend der Anleitung durchgeführt. Die Daten wurden im Verlauf mit dem Band/Peak Quantification Tool¹⁸⁹ validiert, welches eine bessere Auflösung ermöglichte. Dabei wurden die Banden auf Größe und Dunkelheit untersucht, um so einen objektiven Vergleich zwischen Banden zu ermöglichen. Hierfür wurde der Quotient aus dem Marker sowie der Ladekontrolle gebildet. Mittels univariater ANOVA (paarweise Vergleiche) wurden die zugehörigen p-Werte ermittelt.

2.4.1.9 Ladekontrollen

Zur Qualitätssicherung wurde auf jeder Membran eine Ladekontrolle bestimmt. Dazu wurden Gene gewählt, die eine hohe konstitutive Expression besitzen, wie Actin, GAPDH oder Tubulin. Dadurch konnte sichergestellt werden, dass von jeder Probe die gleiche Menge aufgetragen wurde. Abhängig vom Gewicht des untersuchten Gens wurde eine passende Ladekontrolle gewählt, welche in einem anderen Bereich lag, um Überlagerungen zu vermeiden.

2.4.1.10 Immunpräzipitation (IP)

Bei der Immunpräzipitation (IP) wurden bestimmte Proteine aus den Lysaten extrahiert, um diese getrennt zu analysieren. In unseren Versuchen wurde eine IP mit Ubiquitin durchgeführt. Dabei wurden polyubiquitinierte Proteine aus den Lysaten mittels Ubiquitin-Enrichment-Kits (Thermo Fisher Scientific: 89899) gemäß den Herstellerangaben isoliert. Mit einer mit Anti-Ubiquitin beschichteten Harzsäule wurden die an Ubiquitin gebundenen Proteine an die Säule gebunden und damit aus den Lysaten isoliert. Anschließend wurden sie mittels einer Waschlösung von der Säule getrennt. Man erhielt zwei Lysate aus jeder Probe – eines mit ubiquitinierten Proteinen und eines mit nicht-ubiquitinierten Proteinen. Die Lysate konnten dann wie die anderen Lysate im Westernblot analysiert werden.

2.4.2 mRNA-Analyse mittels qRT-PCR

Zur Analyse der mRNA wurde diese mittels RNeasy-Mini-Kit (Fa. Qiagen, Hilden) aus der Leber gewonnen und anschließend in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben, welche mittels RT-PCR analysiert wurde. Mit der mRNA-Analyse konnte die Transkription der zu untersuchenden Proteine bestimmt werden.

2.4.2.1 RNA-Isolation

Es wurden 30 mg gemörstertes Lebergewebe entsprechend dem oben genannten RNA-Extraktionskit mit den enthaltenen Lösungen und Gefäßen extrahiert. Die Extraktion wurde anschließend via Spektralphotometer (Nano-Drop 1000, Fa. Thermo Fisher Scientific/Darmstadt) auf Erfolg und Reinheit geprüft. Dabei wurde die Absorption der Probe bei 260 nm und 280 nm gemessen. Das Absorptionsmaximum von RNA lag bei 280 nm und ermöglichte die Berechnung der RNA-Konzentration. Bei 260 nm hatten Proteine ihr Absorptionsmaximum. Der Quotient aus Absorption bei 260/280 nm gab Aufschluss über die Reinheit und sollte zwischen 1,6 und 2,0 liegen.

2.4.2.2 Umschreiben in cDNA

Für die PCR wurde DNA benötigt, da die Polymerase keine RNA binden kann. Daher musste die mRNA mittels Reverser Transkriptase (RT) in cDNA umgeschrieben werden. Dafür wurde das iScript cDNA Synthesis-Kit mit entsprechendem Protokoll von BioRad verwendet.

Dabei wurde pro Ansatz 1 µg RNA mit dem Reaction-Mix auf ein Volumen auf 20 µl mit nukleasefreiem Wasser aufgefüllt und entsprechend den Herstellerangaben im Biometra Thermocycler T300 inkubiert.

Die erhaltene cDNA wurde bei -20°C bis zur Verwendung gelagert. Jede Umschreibung wurde durch eine PCR mit einem konstitutiv exprimierten Gen kontrolliert.

2.4.2.3 Quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

In der quantitativen Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) wurden bestimmte Abschnitte der DNA mithilfe spezieller Primer nachgewiesen, die sich an ihre passende Nukleotidsequenz banden. Die Primer übernahmen dabei die Funktion einer Startsequenz und lagerten sich bei einer definierten Temperatur, beispielsweise 60°C, an die cDNA an. Anschließend wurden die gebundenen Primer durch die Taq-DNA-Polymerase bei 72°C mithilfe freier Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) verlängert.

Nach dieser Elongation erfolgte eine Denaturierung bei 95°C, durch die Matrize und neu synthetisierter, komplementärer Strang voneinander getrennt wurden. Im Anschluss kam es erneut zur Primerbindung (Annealing) und einer weiteren Verlängerung. Dieser Zyklus aus Annealing, Elongation und Denaturierung führte zu einer exponentiellen Amplifikation des spezifischen Genabschnitts, da sich die DNA-Menge mit jedem Zyklus verdoppelte.

Zur Quantifizierung der amplifizierten DNA wurde während der Verlängerung der Fluoreszenzfarbstoff SYBR-GREEN in die DNA-Doppelstränge eingebaut. Der entstandene DNA-SYBR-GREEN-Komplex absorbierte Licht bei 494 nm und emittierte grünes Licht bei 521 nm. Die Intensität der emittierten Fluoreszenz stand in direktem Verhältnis zur Menge der amplifizierten DNA. Die quantitative Messung erfolgte dabei in der exponentiellen Phase der Amplifikation.

Die Amplifikation verlief zunächst exponentiell, ging dann in eine lineare Phase über und erreichte schließlich ein Sättigungsniveau. Der Zeitpunkt, zu dem ausreichend Fluoreszenz zur Detektion vorlag, wurde als Ct-Wert (Cycle threshold) bezeichnet. Die ermittelten Ct-Werte ermöglichten die Berechnung einer relativen Über- oder Unterexpression des untersuchten Markers.

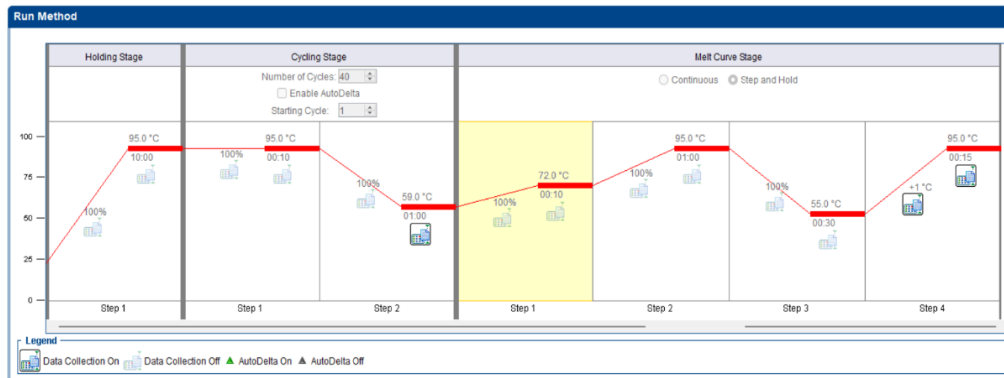
2.4.2.4 Durchführung der qRT-PCR

Die qRT-PCR wurde mithilfe des StepOnePlus® RT-PCR-Systems in 96-Well-Platten gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Jede Probe wurde in technischer Duplikation gemessen; zusätzlich wurde eine Negativkontrolle (ohne cDNA) eingesetzt. Pro Well wurden 11,5 µl Mastermix + 1 µl cDNA verwendet.

Für jeden Primer wurde ein spezifisches Temperaturprofil mit Schmelzkurve in der StepOnePlus® Software angelegt (siehe Abbildung 13). Der Ct-Wert (Cycle threshold) zeigt den Zyklus an, in dem die Fluoreszenz erstmals den Hintergrund übersteigt. Je früher dieser Schwellenwert erreicht wird, desto höher ist die

Ausgangsmenge an spezifischer DNA in der Probe. Mithilfe der Schmelzkurve wurde überprüft, ob lediglich ein spezifisches Produkt amplifiziert wurde.

Abbildung 13: Temperaturprofil des StepOnePlus



Beispielhafte Temperaturkurve für PCR und Schmelzkurve. Screenshot aus der PCR Software.¹⁸⁶

2.4.2.5 Statistische Auswertung der qRT-PCR

Die PCR-Rohdaten wurden in Windows® Excel® (Version 2203) via $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode auf ein Housekeeping Gen (Rpl32 – Ribosomal Protein L32) normiert und als Fold-Change relativ zum BALB/c WT ausgegeben. Die Berechnung folgte der Methode von Livak et al.¹⁹⁰

Da die Fold-Change-Werte linksschief verteilt waren, wurden sie durch Logarithmierung (ln, natürlicher Logarithmus) normalisiert. Die Normalverteilung wurde mithilfe eines Q-Q-Diagramms und eines trendbereinigten Q-Q-Diagramms überprüft. Die Varianzhomogenität wurde durch den Levene-Test¹⁹¹ getestet.

Die p-Werte wurden mittels univariater ANOVA (ohne Messwiederholung) und anschließender Tukey-HSD-Analyse¹⁹² bestimmt. Im Gegensatz zum Tukey-LSD korrigiert der Tukey-HSD-Test den p-Wert für multiples Testen und berechnet alle Gruppenvergleiche unabhängig von deren klinischer Relevanz. Die resultierenden p-Werte sind daher konservativ zu interpretieren. Eine weitere Korrektur für multiples Testen wurde nicht vorgenommen.

Für BALB/c Mäuse wurden alle 8 Genotypen, für C57BL/6 Mäuse alle 4 Genotypen miteinander verglichen. Die Gruppengrößen sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Anzahl der verwendeten Mäuse der PCR Analysen

Genotyp	n
BALB/c 5W WT	5
BALB/c 5W TG	5
C57BL/6 5W WT	5
C57BL/6 5W TG	5
BALB/c 8W WT	5
BALB/c 8W TG	5
IRF3/7 KO 8W WT	6
IRF3/7 KO 8W TG	4
BALB/c 12W WT	5
BALB/c 12W TG	4
IRF3/7 KO 12W WT	4
IRF3/7 KO 12W TG	6

Anzahl der für die qPCR analysierten Mäuse. In BALB/c 12 W TG wurde eine Maus aufgrund der degradierten Proben aus weiteren Analysen ausgeschlossen.

In der Regel wurde jede PCR einmalig mit der oben genannten Anzahl an Mäusen pro Gruppe durchgeführt, jeweils mit zwei technischen Duplikaten pro Maus. Der Mittelwert der technischen Duplikate diente als Grundlage für die statistische Auswertung.

2.4.3 Histologie, Immunhistochemie (IHC), Immunfluoreszenz (IF)

Zur Darstellung mikroskopischer Gewebeveränderungen kamen verschiedene histologische Methoden zum Einsatz. Für einen allgemeinen Überblick wurde eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) angewandt, zur gezielten Darstellung einzelner Proteine diente die Immunhistochemie (IHC) und zur Visualisierung von Kollokalisierungen die Immunfluoreszenz (IF).

2.4.3.1 Immunhistochemie

Die histologische Analyse wurde entsprechend den etablierten Protokollen des Labors durchgeführt. Dabei wurden die in Formalin fixierten Paraffinschnitte zunächst rehydriert und darauffolgend angefärbt. Zuerst wurden die auf Objektträger aufgetragenen Leberschnitte nach folgendem Schema durch Xylol vom Paraffin befreit, mit Ethanol gewaschen und anschließend fünf Minuten in Aqua dest. rehydriert: dreimal zehn Minuten Xylol, zweimal fünf Minuten 99,6% Ethanol, fünf Minuten 96% Ethanol, fünf Minuten 70% Ethanol. Durch die Fixierung in Formalin wurde das Gewebe denaturiert und Epitope teils so verändert, dass Antikörper nicht mehr an ihnen binden konnten. Daher wurde eine Antigendemaskierung (Antigen-

Retrieval) durchgeführt, um weitgehend die ursprüngliche Struktur wiederherzustellen. Dazu wurden die Objektträger in Citratpuffer (pH = 6) aufgekocht und anschließend in PBS (phosphate buffered saline) gewaschen.

Um eine unspezifische Reaktion mit endogenen Peroxidasen zu verhindern, wurden die Träger mit 3% Wasserstoffperoxid in PBS für 15 min geblockt und anschließend in PBS gewaschen. Zur Blockung unspezifischer Bindungen wurden die Schnitte mit 10% BSA und 2,5% Pferdeserum in PBS für eine Stunde geblockt und im Anschluss dreimal zwei Minuten in PBS gewaschen. Bei Verwendung von spezifischen Mausantikörpern wurde dabei zuvor ein Mouse-on-Mouse-Block mit Anti-Mouse-F(ab)-Fragmenten durchgeführt.

Danach wurde der primäre Antikörper oder die Isotypenkontrolle entsprechend den Herstellerangaben aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am Folgetag wurden die Schnitte dreimal fünf Minuten in PBS gewaschen, bevor der Sekundärantikörper für 30 Minuten aufgetragen und gewaschen wurde.

Bei der Immunhistochemie und Anfärbung einer Zielstruktur wurden das VIP-Substrate-Kit for Peroxidase verwendet. Die Anfärbung wurde laufend kontrolliert und durch Waschen in Aqua dest. gestoppt, sobald eine gute Färbung vorlag. Danach wurde zur besseren Abgrenzung des Gewebes eine Gegenfärbung (Counterstaining) mit Hämatoxylin für eine Minute durchgeführt, bevor die Proben gewaschen und mittels aufsteigender Reihe fünf Minuten in 96% Ethanol, zweimal fünf Minuten in Isopropanol und dreimal fünf Minuten in Xylol dehydriert wurden. Anschließend wurden die Proben wasserfrei eingedeckt.

2.4.3.2 Immunofluoreszenz

Zur Durchführung von Immunfluoreszenzanalysen wurden die vorbehandelten Schnitte eine Stunde lang mit 10% Rinderserumalbumin (#BSA-1T; PAA) blockiert und über Nacht mit spezifischen Antikörpern bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte mit den weiteren Sekundär-AK inkubiert: sekundäre Ziegen-Anti-Kaninchen-Antikörper Alexa488 [grün] (#A11008), Ziegen-Anti-Maus-Antikörper Alexa546 [rot] (#A11030) (Molecular Probes, Eugene, OR) und Ziegen-Anti-Meerschweinchen-Antikörper FITC (#90101; Progen, Heidelberg, Deutschland). Die Fotos wurden mit einem Leica DMRB-Mikroskop (Leica, Wetzlar, Deutschland) aufgenommen, das mit einer Canon EOS 600D und der Software Canon EOS Utility 2, Version 2.14 (Canon, Japan) ausgestattet war.

Nach dem Waschen des zweiten Fluorophors wurden die Schnitte mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) für fünf Minuten zur Anfärbung der Zellkerne inkubiert und danach dreimal fünf Minuten in PBS gewaschen. Abschließend wurden die Schnitte wasserfrei eingedeckt und bei 4°C dunkel gelagert.

2.4.3.3 Isotypkontrolle

Die Isotypkontrolle wurde durchgeführt, um zu prüfen, ob der Antikörper spezifisch an sein Epitop band oder ggf. Ergebnis anderer Proteininteraktionen oder einer unspezifischen Fc-Rezeptorbindung war. Die Schnitte wurden dazu analog zum Primärantikörper mit IgG derselben Spezies in gleicher Konzentration inkubiert und anschließend gleich weiterverarbeitet. Die Isotypkontrolle der für die Arbeit verwendeten Antikörper fiel stets negativ aus, sodass von einer spezifischen Bindung des Primärantikörpers ausgegangen werden konnte.

2.4.3.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE)

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) diente der allgemeinen Beurteilung histologischer Schnitte. Hämatoxylin band basophile Strukturen, wie die DNA im Zellkern, blau, während Eosin acidophile Strukturen, wie Zellplasmaproteine, rötlich anfärbte.

Die Gewebeschnitte wurden dazu analog zur Histochemie in der absteigenden Reihe gewässert, in Hämatoxylin für vier Minuten inkubiert, fünf Minuten gewaschen, 30 Sekunden in Eosin inkubiert, erneut fünf Minuten gewaschen und abschließend in der aufsteigenden Reihe entwässert und wasserfrei eingedeckt.

2.5 Statistik

Die statistische Analyse wurde mit IBM® SPSS® Statistics (Version 28.0.1.1 (15)) als explorative Analyse durchgeführt. Dementsprechend wurden freie Hypothesen ohne festes Signifikanzniveau formuliert. Daraus folgt, dass im Laufe der Arbeit nicht von signifikanten Ergebnissen gesprochen wird und die entsprechenden p-Werte angegeben werden. Zur sprachlichen Klarheit wird erst ab einem $p \leq 0,05$ von einem Unterschied gesprochen.

Die Auswertung wurde von Dr. Jörn Pons-Kühnemann und Christine Scheibelhut des Instituts für medizinische Statistik der JLU betreut und geprüft.

Die Angaben der Fehlerindikatoren für die Streuung der Einzelmessungen als Standardfehler beruht auf der Empfehlung des British Medical Journals für medizinische Publikationen.¹⁹³

Die jeweiligen statistischen Methoden sind als Teil der Analyse im entsprechenden Methodenteil beschrieben.

3 Ergebnisse

Um die Auswirkungen der Interferonantwort auf Autophagie zu untersuchen, wurde zuerst das Mausmodell validiert. Dazu wurden zunächst der HBs Knock-in sowie die veränderte Histologie beschrieben.¹¹ Im Folgenden wurde der IRF3/7 Knockout validiert und die Interferonantwort in den BALB/c Mäusen bestimmt. Anschließend wurde der ER-Stress und die Auswirkungen der beiden Pfade auf Autophagie beschrieben. Abschließend wurde die Abhängigkeit der Immunreaktion vom genetischen Hintergrund der Mäuse gezeigt.

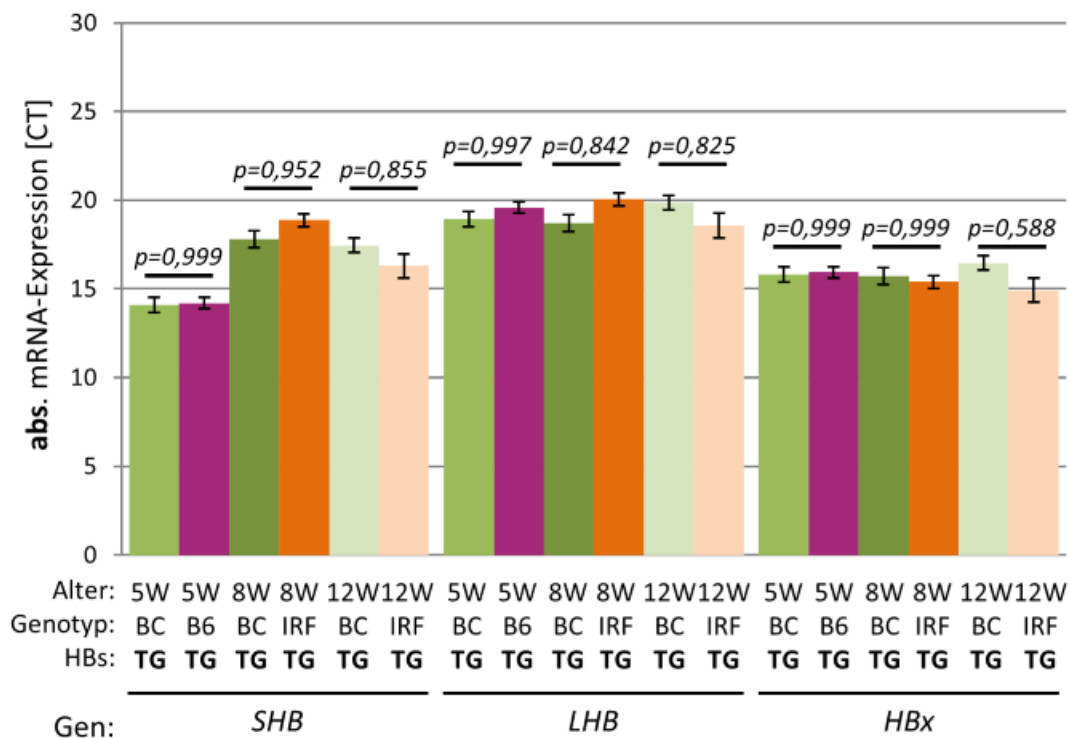
Da HBV primär die Leber betrifft, bezogen sich alle Analysen auf Lebergewebe. Neben einzelnen humanen Proben wurde primär das Lebergewebe von Mäusen der Altersgruppen 5/8/12 Wochen verwendet.

Alle Abbildungen wurden selbst erstellt, Teile dieser Dissertation wurden bereits publiziert.¹¹ In der Regel werden zuerst die mRNA Ergebnisse und dann die Protein-ergebnisse gezeigt.

3.1 Validierung des Mausmodells: Die Expression von HBs ist unabhängig vom Genotyp und dem IRF3/7 KO

Im Folgenden ist die mRNA von den HBV-Oberflächenproteinen (HBs): (small-SHB/medium-MHB/large-LHB) sowie HBx dargestellt (Abbildung 14 und Abbildung 15). Da die Wildtypmäuse keine HBV mRNA exprimieren, wurden sie nicht dargestellt, jedoch zur Kontrolle der Genotypisierung gemessen. Daher war allerdings keine Berechnung des Fold Changes im Vergleich zum Wildtyp möglich. Angegeben ist der Cycle Threshold (CT) ab dem die mRNA messbar wurde. Kleinere CT-Werte bedeuten daher mehr vorhandene mRNA.

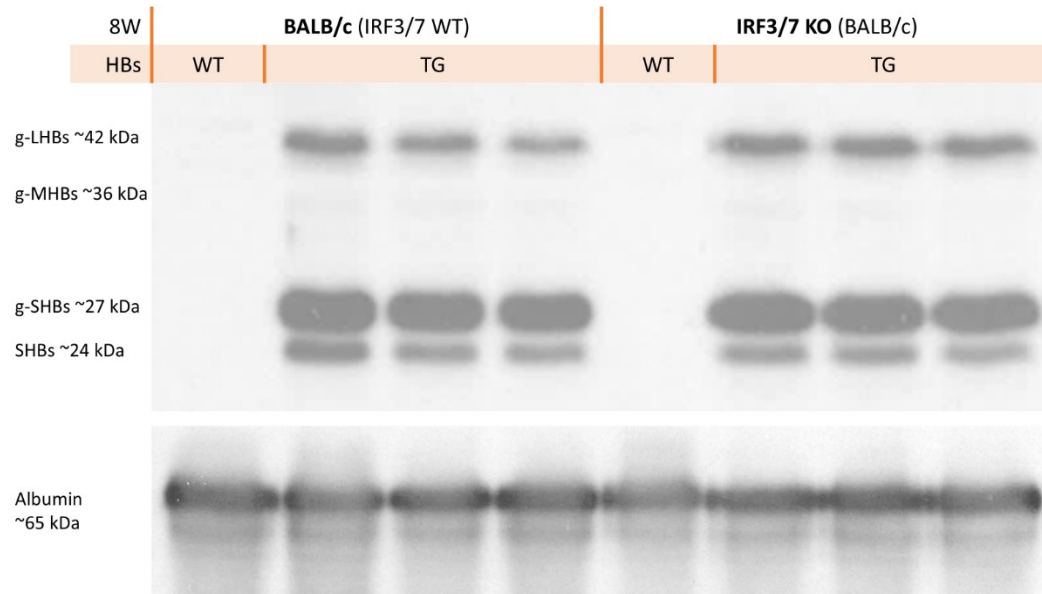
Abbildung 14: qPCR der mRNA der Oberflächenproteine



Analyse der SHB-, LHB- und HBx-mRNA aus Leber von 5, 8 und 12 Wochen (W) alten Mäusen mittels qPCR. Die Expression wurde mittels Rpl32 (Ribosomal Protein L32) als Housekeeping Gen normiert und als CT (Threshold Cycle) dargestellt. Kleinere Werte bedeuten eine höhere Expression. Transgene (TG) Mäuse exprimieren, im Gegensatz zum Wildtyp (WT), Hepatitis-B-Oberflächenproteine (HBs). Die HBs-WT Mäuse wurden ebenfalls untersucht, zeigen jedoch zur Negativkontrolle äquivalente Werte. Bei den IRF3/7 KO Mäusen, wurden Interferon Regulatory Factor 3 und 7 durch Knockout deaktiviert. Pro Gruppe wurden n=4-6 Mäuse untersucht. Alle PCR-Messungen für jegliche Marker erfolgten in Duplikaten. Die Fehlerindikatoren zeigen den Standardfehler. Berechnung der p-Werte mittels univariater ANOVA und Tukey-HSD, p-Werte > 0,05 sind kursiv gedruckt. qPCR: quantitative Real Time Polymerasekettenreaktion; BC: BALB/c Mäuse; B6: C57BL/6 Mäuse; IRF: IRF3/7 KO Mäuse.

SHBs, LHBs und HBx wurden in den HBs-transgenen Mäusen einer Altersgeneration in gleichem Maße exprimiert. Zudem variierte die Expression von SHB in Abhängigkeit vom Alter. Diese altersabhängige Veränderung beeinflusste die untersuchten Sachverhalte nicht, da stets Mäuse derselben Altersgruppe miteinander verglichen werden. Da SHBs Teil von MHBs und damit auch LHBs ist, wird mit dem Primer für SHBs auch die mRNA von MHBs und LHBs erkannt, was zu einer scheinbar höheren Expression führte.

Abbildung 15: Vergleich der HBs Proteinexpression in BALB/c und IRF3/7 KO



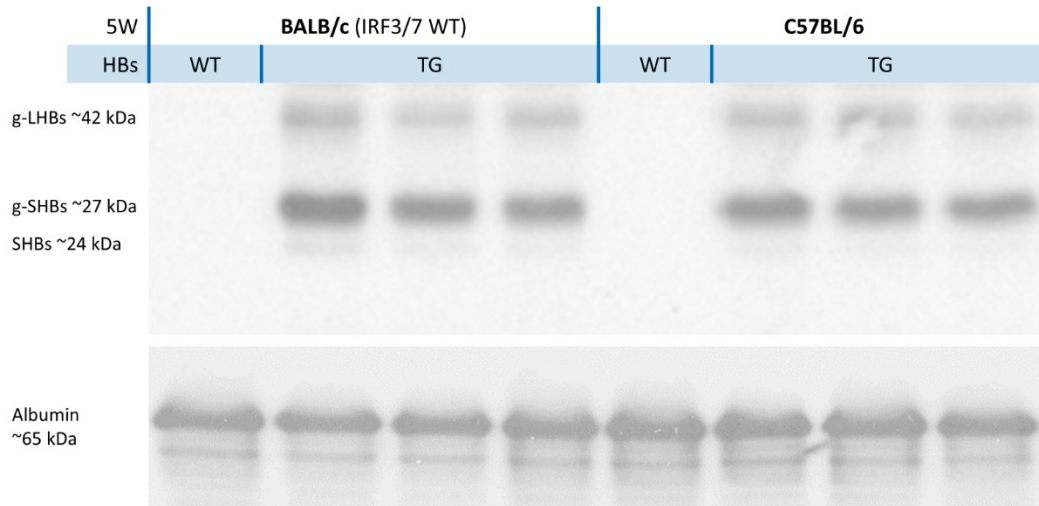
Westernblot Analyse der Proteinlysate der Leber von 8 Wochen (W) alten Mäusen. Oben die HBV-Oberflächenproteine markiert mit HBsAg-Antikörper. Die Banden g-SHBs/MHBs/LHBs repräsentieren glykosyliertes SHBs/MHBs/LHBs. Markierung der untersten Banden mittels Albumin-Antikörper zur Darstellung der Ladekontrolle. Die Expression von HBsAg ist in unserem Modell an den Albuminpromotor gebunden. Entwicklung via Chemilumineszenz. Transgene (TG) Mäuse exprimieren, im Gegensatz zum Wildtyp (WT), Hepatitis-B-Oberflächenproteine (HBs). Bei den IRF3/7 KO Mäusen, wurden Interferon Regulatory Factor 3 und 7 durch Knockout (KO) deaktiviert. Ein technisches Replikat.

In den HBs-transgenen Mäusen sind im Westernblot deutliche Banden von g-SHBs, SHBs und LHB sowie schwache Banden des MHBs Proteins sichtbar. HBs wurde nach Translation glykosyliert.^{181,194–196} Die HBs Wildtypmäuse exprimierten, wie zu erwarten, kein HBs. Sowohl BALB/c als auch IRF3/7 KO-Mäuse exprimierten vergleichbar viel HBV-Oberflächenproteine. Der Westernblot belegt exemplarisch die Ergebnisse der qPCR zur Bestimmung der mRNA-Transkripte.

Um die Auftragung gleicher Mengen an lysiertem Gewebe sicherzustellen, wurde bei jedem Westernblot eine Ladekontrolle durchgeführt. Dazu wurden Proteine untersucht, die in jeder Maus in gleicher Menge exprimiert werden.

Hier diente Albumin als Ladekontrolle, da HBs durch den Albuminpromotor gesteuert abgelesen wurden und Albumin konstitutiv exprimiert wurde. Alle Mäuse wiesen eine vergleichbare Albumin-Expression (gleiche Bandenintensität) auf. Dunklere Banden bedeuten daher, dass mehr des untersuchten Proteins bei der jeweiligen Maus vorhanden ist als bei helleren Banden.

Abbildung 16: Vergleich der HBs Proteinexpression in BALB/c und C57BL/6



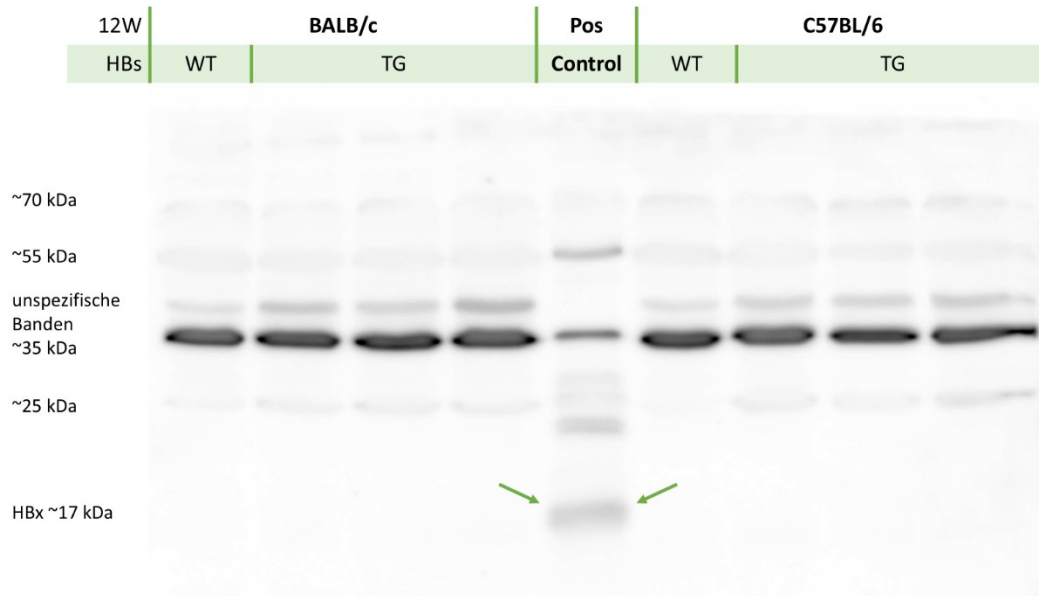
Westernblot Analyse der Proteinlysate der Leber 5 Wochen (W) alter Mäuse. Oben die HBV-Oberflächenproteine markiert mit HBsAg-Antikörper. Die Bande g-SHBs/LHBs repräsentiert glykosyliertes SHBs/LHBs. Markierung der untersten Banden mittels Albumin-Antikörper zur Darstellung der Ladekontrolle. Entwicklung via Chemilumineszenz. Transgene (TG) Mäuse exprimieren, im Gegensatz zum Wildtyp (WT), Hepatitis-B-Oberflächenproteine (HBs). Sechs technische Replikate.

In den BALB/c und C57BL/6 TG Mäusen akkumulierte HBs deutlich, insbesondere in Form des glykosylierten g-SHBs. In beiden (HBs-)Wildtypen wurde HBs erwartungsgemäß nicht exprimiert. Die Menge an HBs unterschied sich nicht zwischen BALB/c und C57BL/6 TG Mäusen.

Albumin wurde in allen Mäusen in gleicher Menge exprimiert und diente als Ladekontrolle.

Da die HBs-transgenen TG Mäuse auch das genetische Material für HBx tragen, wurde auch die Protein-Expression von HBx getestet. Da HBx späte Stadien der Autophagie blockieren kann, ist das Vorhandensein des HBx-Proteins von entscheidender Bedeutung für die Interpretation der Ergebnisse.

Abbildung 17: Vergleich der HBx Proteinexpression in BALB/c und C57BL/6



Exemplarische Westernblot Analyse der Proteinlysate der Leber von 12 Wochen (W) alten Mäusen sowie der Zelllinie HBx Huh7 N16 X21 als Positivkontrolle. Der Anti-HBx-Ak. erkennt diverse unspezifische Banden. HBx wird nur in der Positivkontrolle detektiert (grüne Pfeile). Entwicklung via Chemilumineszenz. Transgene (TG) Mäuse exprimieren, im Gegensatz zum Wildtyp (WT), Hepatitis-B-Oberflächenproteine (HBs). Sieben technische Replikate.

Obwohl das HBV-Insert, das auch HBx trägt, transkribiert wurde (Abbildung 14), war HBx nicht als Protein im Westernblot nachweisbar. Zur Verifizierung wurden drei verschiedene Antikörper gegen HBx verwendet.

Viele der untersuchten Proteine haben eine geringe Expression, sodass im Westernblot ein deutliches Hintergrundsignal vorhanden ist. Daher wurde im Rahmen der Dissertation weitgehend auf eine Verwendung der Densitometrie verzichtet und nur in sinnvollen Einzelfällen verwendet, da die Densitometrie eine übermäßige Objektivität suggerieren kann.

Wenn im Folgenden von Veränderungen durch HBs geschrieben wird, ist dabei die Wirkung der gezeigten HBs-Überexpression gemeint und nicht eine direkte Protein-Protein Interaktion des untersuchten Markers mit HBs.

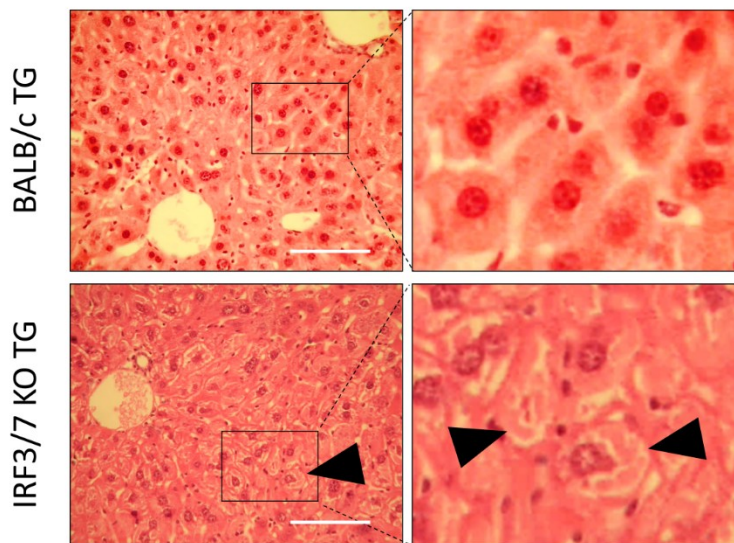
Zusammenfassend lag in den transgenen Mäusen eine erfolgreiche hepatische Expression des Transgens mit Nachweis der Isoformen SHBs, MHBs und LHBs auf mRNA- und Proteinebene vor. Alle HBs-TG Mäuse akkumulierten die Oberflächenproteine auch in glykosylierter Form. Die Wildtypen exprimierten erwartungsgemäß kein HBs.

HBx wurde als mRNA transkribiert, war als Protein jedoch nicht nachweisbar.

3.2 Der IRF3/7 Doppelknockout verändert die Aggregatbildung von HBs

Neben der hepatischen Gesamtexpression (Abbildung 14 und Abbildung 15) ist die intrazelluläre Aggregation der HBs Proteine ein wichtiges Charakteristikum der Leberpathologie in den HBs transgenen Mäusen.⁸ Im Gegensatz zu den Westernblot Analysen zeigte die Immunhistochemie eine von IRF3/7 abhängige Verteilung der HBV-Oberflächenproteine.

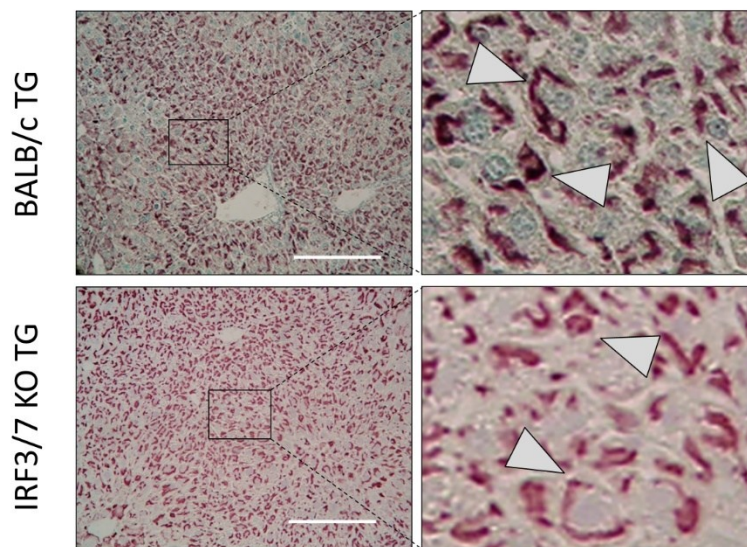
Abbildung 18: IRF3/7 abhängige Bildung von Milchglashepatozyten – HE-Färbung



Repräsentative Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) von BALB/c und IRF3/7 KO HBs-TG Mäusen. Die Pfeile kennzeichnen Ground Glass Hepatozyten (GGHs). Skalierungsbalken: 200 μ m. n = 5-10 Mäuse pro Gruppe.

In den Leberschnitten der BALB/c IRF3/7 KO HBs-TG Mäuse sind zahlreiche Milchglashepatozyten sichtbar. Diese Typ II GGHs sind klassisches histologisches Zeichen einer CHB (Abbildung 18: Pfeile). Die BALB/c IRF3/7 WT Mäuse mit intakter Interferonantwort bildeten keine GGHs und hatten ein normales histologisches Bild. Daher wurde die Verteilung von HBs in den Zellen untersucht (Abbildung 19).

Abbildung 19: intrazelluläre Verteilung der HBV-Oberflächenproteine - LHB

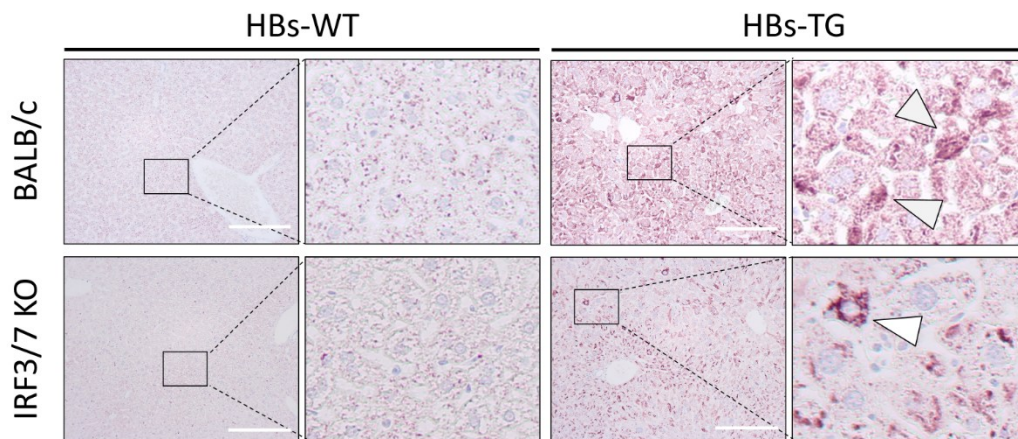


Repräsentative Immunhistochemische Anfärbung (IHC) von Paraffinschnitten der Leber von HBs-TG Mäusen. Anfärbung mit LHB-Antikörper. Die Pfeile zeigen Aggregate, die HBs enthalten. Skalierungsbalken: 200 μ m. n = 5-10 Mäuse pro Gruppe.

HBs akkumulierte sowohl in BALB/c als auch in IRF3/7 KO Mäusen intrazellulär. In beiden Gruppen sammelte sich HBs überwiegend in distinkten Bereichen der Zelle, anstatt sich diffus zu verteilen. Bei den IRF3/7 KO Mäusen war eine stärkere Aggregation von LHB angedeutet, welche jedoch nicht allein die deutliche Bildung der GGHS erklären konnte.

Daher wurden zur weiteren Analyse der Aggregate die Lipide und deren Verteilung untersucht (Abbildung 22).

Abbildung 20: IRF3/7 abhängige intrazelluläre Verteilung und Menge von PLIN2



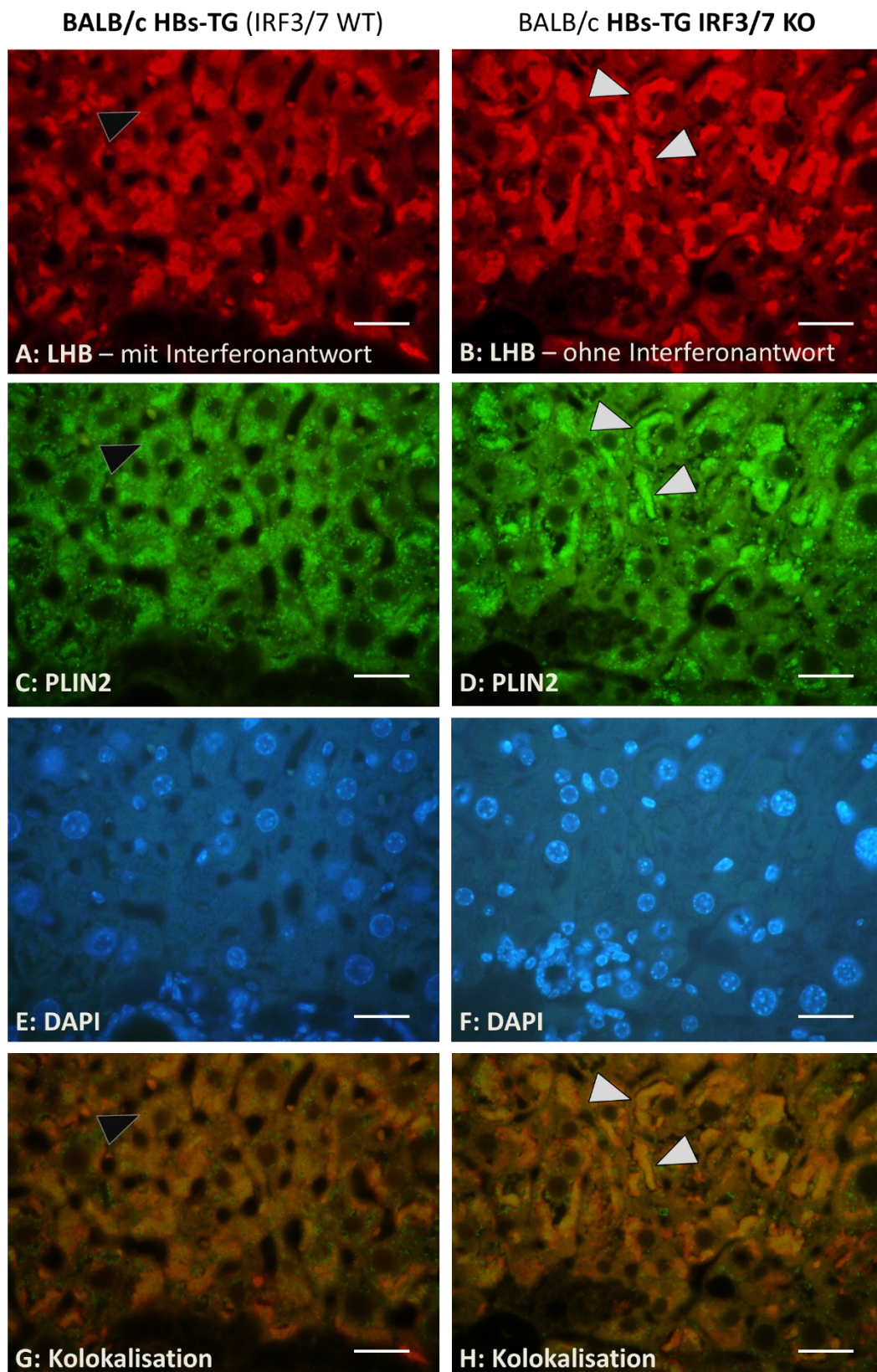
Repräsentative Immunhistochemische Anfärbung (IHC) von Paraffinschnitten der Leber von BALB/c (IRF3/7 WT) Mäusen (oben) und IRF3/7 KO Mäusen (unten). Dabei sind die HBs-WT Mäuse links und HBs-TG Mäuse rechts dargestellt. Anfärbung mit PLIN2-Antikörper. Pfeile zeigen Akkumulationen der Lipid Droplets in HBs-TG Mäusen. Skalierungsbalken: 200 μ m. n = 5-10 Mäuse pro Gruppe.

Im Rahmen unserer Studie wurde festgestellt, dass die Aggregate der GGHS reichlich Lipide enthalten.¹⁹⁷ Die immunhistochemische Anfärbung von PLIN2 (Perilipin-2), einem wichtigen Hüllprotein der Lipidtröpfchen in Hepatozyten, ermöglicht jedoch eine indirekte Darstellung der Lipide und deren intrazelluläre Verteilung.

Bei den beiden HBs-WT Mäusen war PLIN2 diffus als einzelne Lipidtröpfchen im Zytoplasma verteilt. Zudem war in den HBs-TG Mäusen mehr PLIN2 vorhanden als in den HBs-WT Mäusen.¹¹ Dabei lag bei den BALB/c Mäusen eine feinere, diffusere Verteilung vor als bei den IRF3/7 KO Mäusen, während bei den IRF3/7 KO Mäusen PLIN2 in distinkteren Arealen des Zytoplasmas akkumulierte (Abb. 21).

Zur Untersuchung der räumlichen Verteilung von HBs und PLIN2 innerhalb einer Zelle wurde eine Immunofluoreszenz angefertigt, bei der jeweils der gleiche Bereich mittels verschiedener Antikörper markiert wurden.

Abb. 21: Darstellung der Kolokalisation der HBV-Oberflächenproteine und PLIN2



Repräsentative Darstellung der Kolokalisation von HBV-Oberflächenproteinen, markiert durch LHB, und Lipid Droplets, markiert durch PLIN2. Dargestellt sind jeweils repräsentative Bildausschnitte der Immunfluoreszenz mit LHB-Antikörper

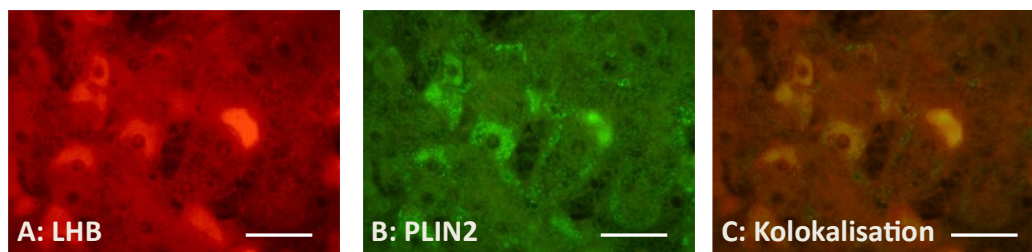
(A/B), PLIN2-Antikörper (C/D), DAPI (DNA-Anfärbung) (E/F) an Lebergewebe der HBs-transgenen Mäusen BALB/c [IRF3/7 WT – intakte Interferonantwort] (A/C/E/G) und IRF3/7 KO (B/D/F/H) sowie Kolokalisation (G/H). Ausschnitte BALB/c (A/C/E/G) und IRF3/7 KO (B/D/F/H) zeigen in beiden Fällen immer denselben Gewebeausschnitt. In der Kolokalisation zeigen sich Überlagerung gelblich. Skalierungsbalken 25 μ m. n = 5-13 Mäuse pro Gruppe.

In der Immunfluoreszenz traten deutliche Unterschiede in der intrazellulären Verteilung der HBV-Oberflächenproteine sowie der Lipide auf.

Bei fehlender Interferonantwort im IRF3/7 KO Modell bildeten sich große Aggregate der HBs Proteine mit Lipiden, die durch PLIN2 visualisiert wurden (Abb. 21: weiße Pfeile). Außerhalb der Aggregate war kaum PLIN2 zu finden.

Die BALB/c Mäusen hatten auch eine Kolokalisation von HBs und PLIN2, dabei jedoch eine deutlich aufgelockerte Struktur. Bei den BALB/c Mäusen waren im gesamten Zytoplasma Lipid Droplets mit PLIN2 angefärbt, nicht nur in den Aggregaten. Viele LDs sind gut als Ringe zu erkennen, die sich kaum in den IRF3/7 KO Mäusen finden. Bei BALB/c erschien es so, als wenn durch die LDs Löcher in die HBs Aggregate gestanzt worden wären (Abb. 21: schwarze Pfeile).

Abbildung 22: Darstellung der Kolokalisation von LHB und PLIN2 in humanen Proben



Repräsentative Immunofluoreszenz der Leberschnitte von Patienten mit chronischer Hepatitis B mit LHB (A), PLIN2 (B) und Kolokalisation (C). Skalierungsbalken 25 μ m. n=5 Patienten.

Die Typ-I-Interferon Antwort ist bei Patienten mit chronischer Hepatitis-B-Infektion häufig unterdrückt. Daher ist es bemerkenswert, dass die Aggregatbildung des HBs und gleichzeitig die Kolokalisation mit PLIN2 nicht nur im IRF3/7-knockout Mausmodell, sondern auch bei menschlichen Patienten mit chronischer Hepatitis B zu finden war (Abbildung 22).

Durch den IRF3/7 KO veränderte sich die intrazelluläre Verteilung von HBs und PLIN2. Bei den BALB/c Mäusen fand sich eine diffuse Verteilung der LDs und HBs. Die IRF3/7 KO Mäuse bildeten GGHS mit dichten Aggregaten aus PLIN2, Lipiden

und HBs. Die Bildung von Aggregaten mit PLIN2 war auch bei menschlichem HBV-Proben der CHB zu sehen.

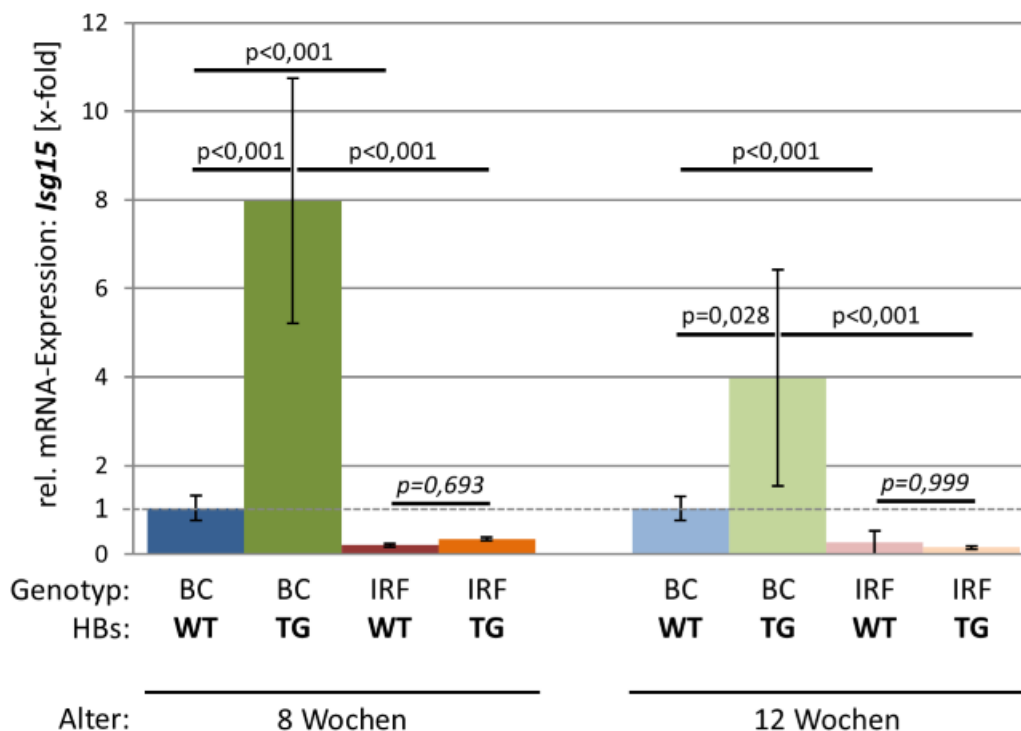
3.3 HBs führt zu einer Aktivierung der Interferonantwort in BALB/c

Hepatitis B führt im Rahmen der Immunantwort auch zu einer Interferonantwort. Diese wurde im Folgenden exemplarisch an drei Markern in unserem Modell untersucht. Um die Auswirkungen der Interferonantwort auf Autophagie und Aggregatbildung zu untersuchen, wurden auch IRF3/7 KO Mäuse untersucht, von denen eine deutlich reduzierte Interferonantwort zu erwarten war.

3.3.1 HBs führt zur vermehrten Expression von ISG15 in BALB/c

ISG15 – Interferon Stimulated Gene 15 gehört zu den klassisch am stärksten hochregulierten Markern der Typ-I-Interferonantwort.¹³⁶

Abbildung 23: Isg15-mRNA-Expression

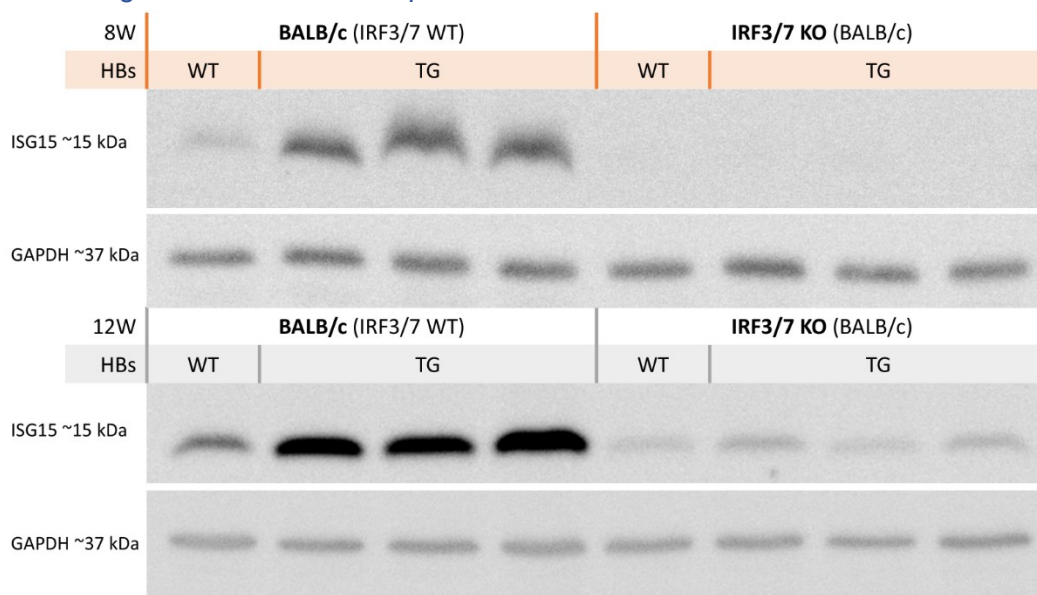


Analyse der Isg15-mRNA aus Leber von 8 und 12 Wochen (W) alten Mäusen mittels qPCR. Die Expression wurde mittels Rpl32 als Housekeeping Gen normiert und als Fold Change ($\Delta\Delta Ct$ -Methode) relativ zum jeweiligen BALB/c (BC) Wildtyp (WT) dargestellt. Transgene (TG) Mäuse exprimieren, im Gegensatz zu WT, Hepatitis-B-Oberflächenproteine (HBs). Bei den IRF3/7 KO Mäusen wurden Interferon Regulatory Factor 3 und 7 durch Knockout deaktiviert. Pro Gruppe wurden vier bis sechs Mäuse untersucht. Die Fehlerindikatoren zeigen den Standardfehler. Berechnung der p-Werte mittels univariater ANOVA und Tukey-HSD, p-Werte > 0,05 sind kursiv gedruckt. qPCR: quantitative Real Time Polymerasekettenreaktion.

Die Expression der *Isg15*-mRNA war in BALB/c TG Mäusen im Alter von 8 Wochen gegenüber dem Wildtyp um das Achtfache erhöht. Im Vergleich zu BALB/c Wildtyp-Mäusen führte der IRF3/7 Knockout zu einer deutlichen Herunterregulation der *Isg15*-mRNA. In IRF3/7 KO Mäusen blieb ein durch HBs induzierter Anstieg der *Isg15*-mRNA, wie er in BALB/c Mäusen vorliegt, aus. Dieses Muster ließ sich auch in 12 Wochen alten Mäusen nachweisen, wobei die Effekte schwächer ausgeprägt waren. In dieser Altersgruppe lag die *Isg15*-mRNA-Expression in BALB/c Mäusen nach HBs-Expression etwa vierfach über dem Niveau des Wildtyps.

Zusammenfassend induzierte HBs in BALB/c Mäusen eine erhöhte *Isg15*-mRNA-Expression, während dieser Effekt in IRF3/7 KO Mäusen ausblieb.

Abbildung 24: ISG15 Proteinexpression



Exemplarische Proteinanalyse in Leberlysaten 8 und 12 Wochen (W) alter Mäuse. ISG15 wurde mittels spezifischer Antikörper im Westernblot detektiert (jeweils obere Banden). Markierung der untersten Banden mittels GAPDH-Antikörper zur Darstellung der Ladekontrolle. Entwicklung via Chemilumineszenz. Jeweils ein technisches Replikat.

Bei den 8 Wochen alten Mäusen war ISG15 im BALB/c WT als schwache Bande vorhanden, während die Signalintensität in den BALB/c TG Mäusen deutlich stärker ausfiel. In den IRF3/7 KO WT sowie den IRF3/7 KO TG Mäusen war keine Bande nachweisbar.

Bei den 12 Wochen alten Mäusen blieb dieses Muster bestehen. ISG15 war im BALB/c WT nur schwach exprimiert, während die BALB/c TG Mäuse deutlich stärkere Banden aufwiesen. In den IRF3/7 KO Mäusen war die ISG15 Expression insgesamt nur sehr schwach ausgeprägt.

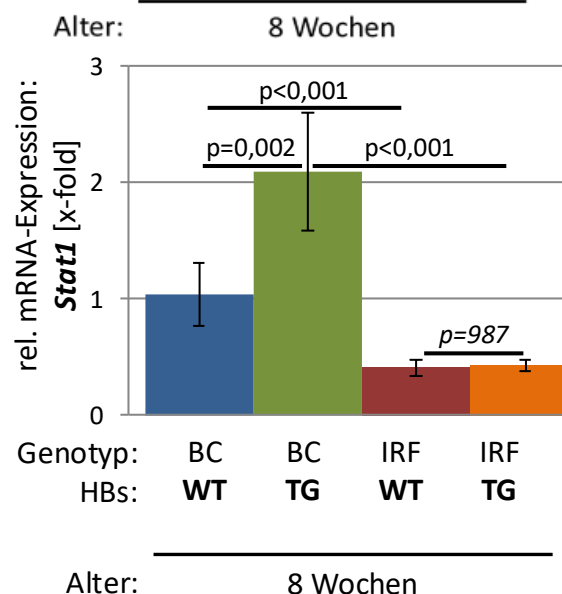
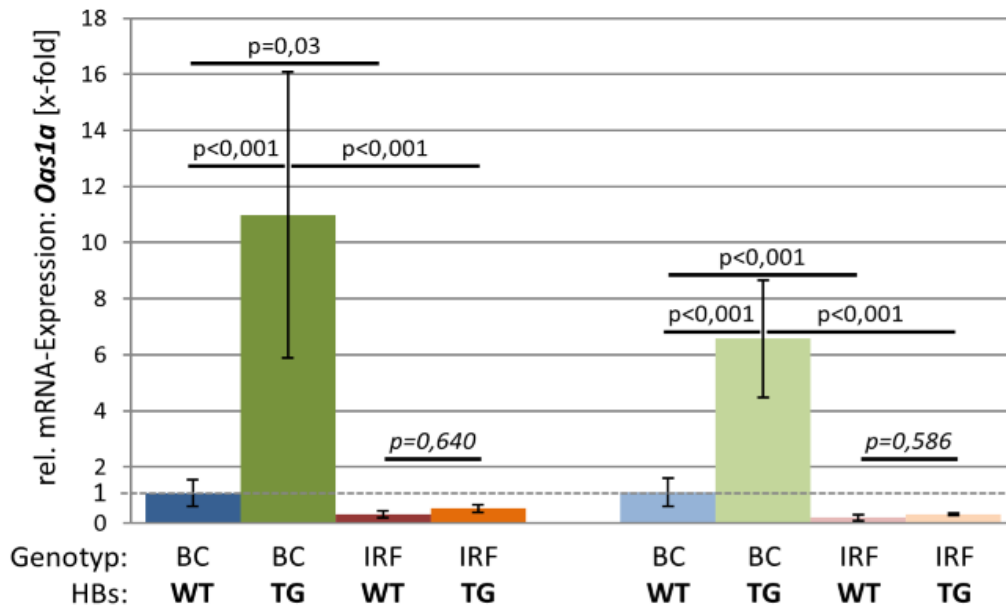
Die Ladekontrollen mittels GAPDH wiesen in allen Versuchsgruppen eine annähernd gleiche Intensität der Banden auf. Dies bestätigte die gleichmäßige Auftragung der Proben und gewährleistete die Vergleichbarkeit der Ergebnisse.

Zusammenfassend wiesen die transgenen BALB/c Mäuse eine deutlich erhöhte Expression von ISG15 sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene auf. In den IRF3/7 KO Mäusen war das ISG15 Signal deutlich schwächer als in den BALB/c Mäusen und es gab keinen Anstieg durch HBs.

3.3.2 HBs führt zur vermehrten Expression von OAS1a in BALB/c

OAS1a (2'-5' Oligoadenylate-Synthetase 1a) ist als Teil der Oligoadenylat-Synthetasen (OAS)-Familie, ein weiterer Marker der Typ-I-Interferonantwort.¹⁴⁴ OAS1a wird dabei insbesondere durch IFN-β via STAT1 aktiviert.

Abbildung 25: Oas1a- und Stat1-mRNA-Expression



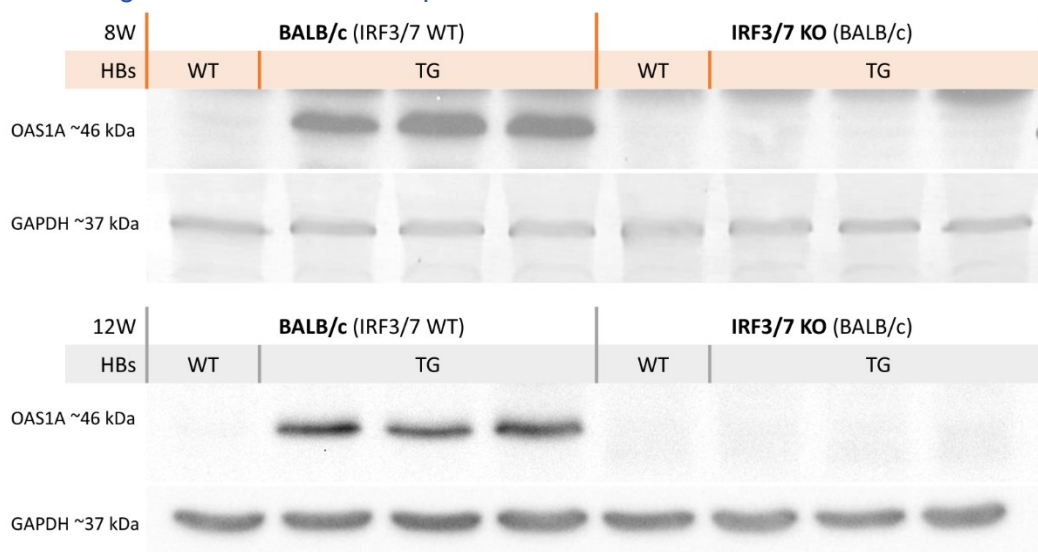
Analyse der Oas1a- und Stat1-mRNA aus Leber 8 und 12 Wochen alter Mäuse mittels qPCR. Die Expression wurde mittels Rpl32 normiert und als Fold Change ($\Delta\Delta Ct$ -Methode) relativ zum jeweiligen BALB/c WT dargestellt. Pro Gruppe wurden vier bis sechs Mäuse untersucht. Die Fehlerindikatoren zeigen den Standardfehler. Berechnung der

p-Werte mittels univariater ANOVA und Tukey-HSD, *p*-Werte > 0,05 sind kursiv gedruckt.

Die *Oas1a*-mRNA in BALB/c TG Mäusen war elffach erhöht exprimiert gegenüber dem Wildtyp. In den IRF3/7 KO Mäusen war kein Anstieg durch HBs sichtbar. Vergleich man die 12 Wochen alten Mäuse mit den 8 Wochen alten, war ein äquivalentes Muster vorhanden, jedoch eine fünffach erhöhte Expression in den BALB/c TG Mäusen.

Bei *Stat1* war das gleiche Muster sichtbar: Die BALB/c TG Mäuse exprimierten relevant mehr *Stat1*-mRNA als die WT Mäuse. Bei den IRF3/7 KO Mäusen entstand kein Anstieg der *Stat1*-mRNA durch HBs.

Abbildung 26: OAS1A Proteinexpression



Exemplarische Proteinanalyse in Leberlysaten 8 und 12 Wochen (W) alter Mäuse. OAS1A wurde mittels spezifischer Antikörper im Westernblot detektiert (jeweils obere Banden). Markierung der untersten Banden mittels GAPDH-Antikörper zur Darstellung der Ladekontrolle. Entwicklung via Chemilumineszenz lediglich GAPDH in 8W wurde via chromogenem Nachweis entwickelt. Jeweils ein technisches Replikat.

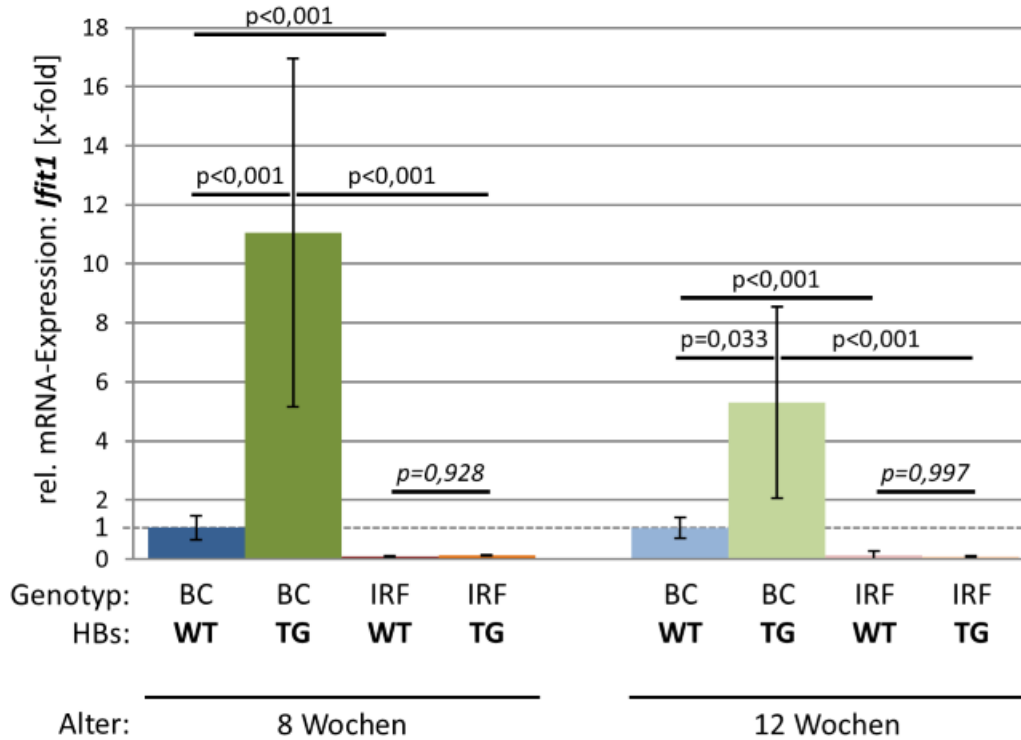
Die Intensität der OAS1A Banden in BALB/c TG erschien stärker als in den BALB/c WT sowie den IRF3/7 KO Mäusen, bei welchen keine Banden zu sehen waren. Dies traf sowohl bei 8 als auch 12 Wochen alten Mäusen zu.

Auch anhand von OAS1A und Stat1 ließ sich eine deutliche Aktivierung der Interferonantwort bei HBs-transgenen Mäusen sowie ein Ausschalten der Interferonantwort durch den IRF3/7 KO nachweisen.

3.3.3 HBs führt zur vermehrten Expression von IFIT1 in BALB/c

IFIT1 (Interferon Induced Protein With Tetratricopeptide Repeats 1) ist ein gut untersuchter viraler Restriktionsfaktor und gehört zu den klassischen Typ I ISGs. IFIT1 wirkt primär durch Hemmung der Translation und führt zur Verstärkung der Interferonantwort durch Stimulation von IFN β ¹⁹⁸.

Abbildung 27: Ifit1-mRNA-Expression



Analyse der *Ifit1*-mRNA aus Leber von 8 und 12 Wochen (W) alten Mäusen mittels qPCR. Die Expression wurde mittels *Rpl32* als Housekeeping Gen normiert und als Fold Change ($\Delta\Delta C_t$ -Methode) relativ zum jeweiligen BALB/c (BC) Wildtyp (WT) dargestellt. Transgene (TG) Mäuse exprimieren, im Gegensatz zu WT, Hepatitis-B-Oberflächenproteine (HBs). Bei den IRF3/7 KO Mäusen wurden Interferon Regulatory Factor 3 und 7 durch Knockout deaktiviert. Pro Gruppe wurden vier bis sechs Mäuse untersucht. Die Fehlerindikatoren zeigen den Standardfehler. Berechnung der p-Werte mittels univariater ANOVA und Tukey-HSD, p-Werte > 0,05 sind kursiv gedruckt. qPCR: quantitative Real Time Polymerasekettenreaktion.

In den BALB/c HBs-TG Mäusen lag ein deutlicher eifacher Anstieg der *Ifit1*-mRNA-Expression im Vergleich zum Wildtyp vor. Dieser Effekt war bei 8 Wochen alten Mäusen stärker ausgeprägt als bei 12 Wochen alten Mäusen, bei denen ein fünffacher Anstieg gemessen wurde. Der IRF3/7 Knockout führte sowohl im Wildtyp als auch in den TG Mäusen zu einer starken Herabregulation der *Ifit1*-Transkription mit Fold Change-Werten um 0,1.

HBs induzierte eine ausgeprägte *Ifit1*-Expression in BALB/c, die in 8 Wochen alten Mäusen stärker war. Als Folge des IRF3/7 KO wurde nahezu kein *ifit1* in IRF3/7 KO Mäusen exprimiert. HBs führte in IRF3/7 KO Mäusen nicht zu einem *Ifit1* Anstieg.

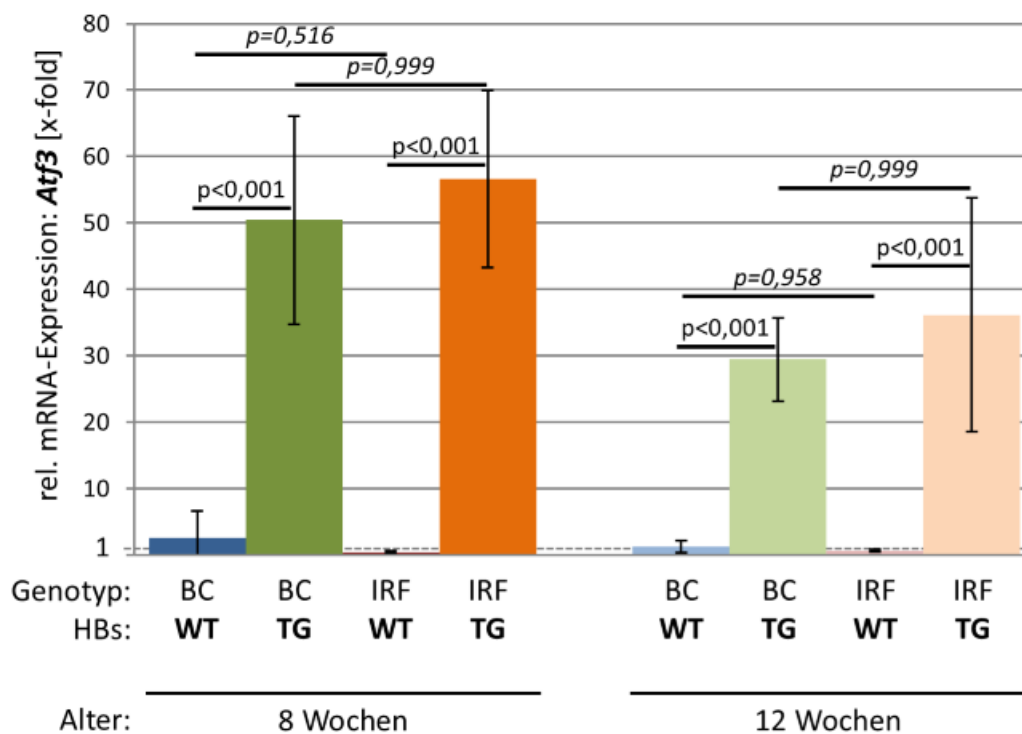
3.4 HBs führt zu ER-Stress und UPR

Virale oder fehlgefaltete Proteine können ER-Stress verursachen und in Folge die Unfolded Protein Response (UPR) auslösen. Diese Schutzreaktion soll das Gleichgewicht im ER wieder herstellen, und kann auch Autophagie induzieren.¹⁹⁹ Zur Charakterisierung der UPR wurden Marker des PERK-Signalwegs untersucht, insbesondere ATF3 und CHOP, die zentrale Rollen in der Stressantwort und Zellregulation spielen.

3.4.1 HBs führt zur vermehrten Expression von ATF3

ATF3 ist ein Protein, das als Marker der UPR dient und bei diversen Virusinfektionen induziert ist.¹⁶⁹

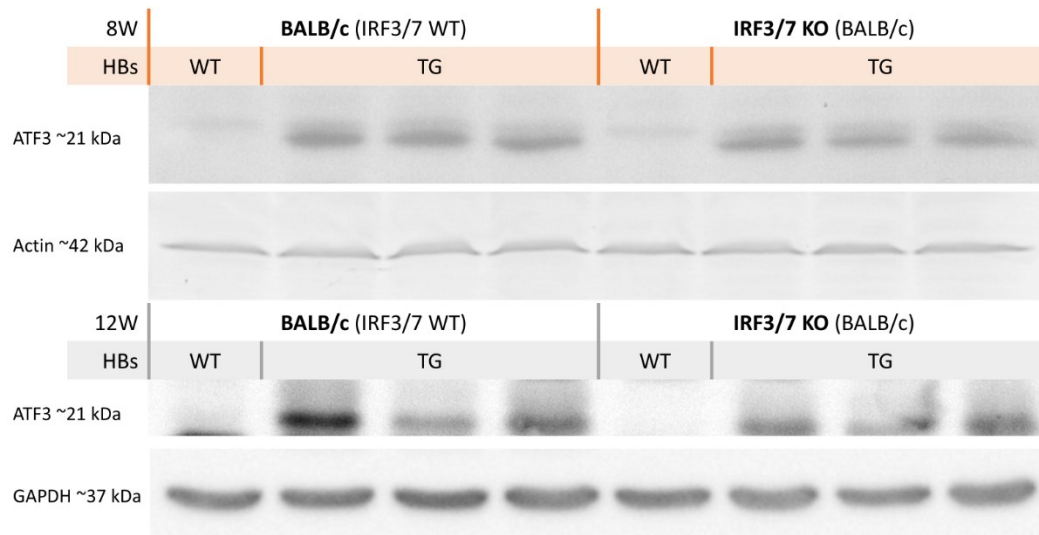
Abbildung 28: *Atf3*-mRNA-Expression



Analyse der *Atf3*-mRNA aus der Leber 8 und 12 Wochen alter Mäuse mittels qPCR. Die Expression wurde mittels *Rpl32* normiert und als Fold Change ($\Delta\Delta Ct$ -Methode) relativ zum jeweiligen BALB/c WT dargestellt. Pro Gruppe wurden vier bis sechs Mäuse untersucht. Die Fehlerindikatoren zeigen den Standardfehler. Berechnung der p-Werte mittels univariater ANOVA und Tukey-HSD, p-Werte > 0,05 sind kursiv gedruckt.

Die Expression von *Atf3* war in HBs-TG Mäusen relativ zu den jeweiligen Wildtypen sowohl in BALB/c als auch IRF3/7 KO Mäusen verstärkt. Die durch HBs verstärkte Expression von *Atf3* war gleichermaßen in 8 als auch in 12 Wochen alten Mäusen zu beobachten.

Abbildung 29: ATF3 Proteinexpression



Exemplarische Proteinanalyse in Leberlysaten 8 und 12 Wochen (W) alter Mäuse. ATF3 wurde mittels spezifischer Antikörper im Westernblot detektiert (jeweils obere Banden). Markierung der untersten Banden mittels Actin- und GAPDH-Antikörper zur Darstellung der Ladekontrolle. Entwicklung via Chemilumineszenz; lediglich Actin in 8W wurde via chromogenem Nachweis entwickelt. In 8W ein technisches Replikat, zwei Replikate in 12W.

Im Westernblot in Abbildung 29 sind in den BALB/c und IRF3/7 KO HBs-TG Mäusen im Vergleich zu den Wildtypen deutlich intensivere Banden sichtbar. Dieses Muster trat sowohl nach 8 als auch nach 12 Wochen auf, wobei die ATF3-Expression in den HBs-TG-Gruppen mit zunehmendem Alter stärker ausgeprägt war. Die Expression von ATF3 in BALB/c und IRF3/7 KO HBs-transgenen Mäusen war vergleichbar, was darauf hindeutete, dass der Knockout von IRF3/7 keinen wesentlichen Einfluss auf die Hochregulation von ATF3 unter diesen Bedingungen hatte.

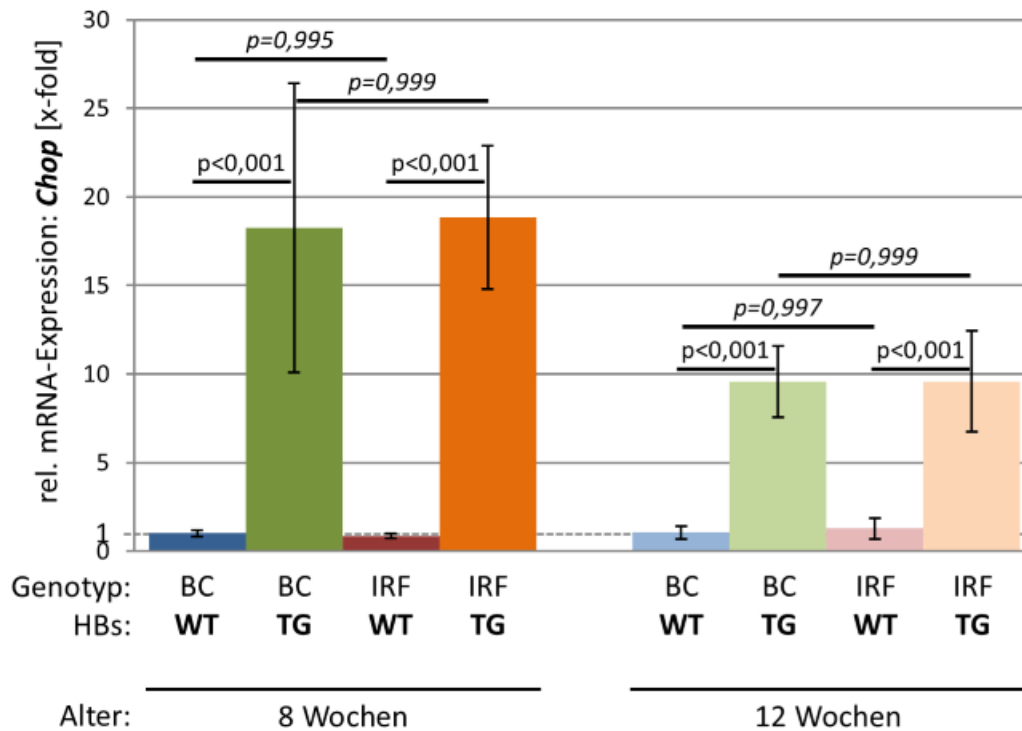
Zusammenfassend wiesen alle HBs-transgenen Mäuse (BALB/c und IRF3/7 KO) eine deutlich erhöhte Expression von ATF3 sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene auf, unabhängig vom IRF3/7 Knockout.

3.4.2 HBs führt zur vermehrten Expression von CHOP

CHOP ist ein zentrales Molekül der ER-Stress-induzierten UPR. Es spielt eine interessante Rolle bei der Regulation der Autophagie, da es die Initiation und Elongation der Isolationsmembranen der Autophagosomen fördern kann.¹⁰⁰

Darüber hinaus kann CHOP die Expression von p62 über Amino Acid Response Elements (AARE) induzieren.¹⁰⁰ Bei chronischem ER-Stress ist CHOP mit der verstärkten Expression pro-apoptotischer Gene assoziiert, was zur Apoptose beitragen kann.²⁰⁰

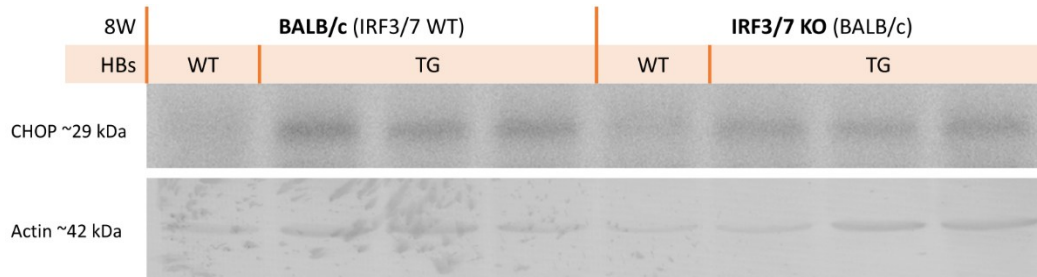
Abbildung 30: Chop-mRNA-Expression



Analyse der Chop-mRNA aus Leber 8 und 12 Wochen alter Mäuse mittels qPCR. Die Expression wurde mittels Rpl32 normiert und als Fold Change ($\Delta\Delta C_t$ -Methode) relativ zum jeweiligen BALB/c WT dargestellt. Pro Gruppe wurden vier bis sechs Mäuse untersucht. Die Fehlerindikatoren zeigen den Standardfehler. Berechnung der p-Werte mittels univariater ANOVA und Tukey-HSD, p-Werte $> 0,05$ sind kursiv gedruckt.

Chop war in den HBs-transgenen Mäusen im Vergleich zu den jeweiligen Wildtypen deutlich verstärkt exprimiert. Dieses Phänomen der Expressionssteigerung von Chop durch HBs war unabhängig vom IRF3/7 KO in 8 und 12 Wochen alten Mäusen zu beobachten.

Abbildung 31: CHOP Proteinexpression



Exemplarische Proteinanalyse in Leberlysaten 8 und 12 Wochen (W) alter Mäuse. CHOP wurde mittels spezifischer Antikörper im Westernblot detektiert (jeweils obere Banden). Markierung der untersten Banden mittels Actin-Antikörper zur Darstellung der Ladekontrolle. Entwicklung via Chemilumineszenz lediglich Actin in 8W wurde via chromogenem Nachweis entwickelt. Zwei technische Replikate in 8W.

In den 8 Wochen alten Mäusen war eine verstärkte Expression von CHOP in transgenen Mäusen nachweisbar. Dabei wiesen die BALB/c TG im Vergleich zu den IRF3/7 KO TG Mäusen eine leicht stärkere Bandenintensität auf. Innerhalb einer Gruppe zeigten die Mäuse ein einheitliches Expressionsmuster.

Bei der Analyse der 12 Wochen alten Mäuse wiesen die Western-Blot-Ergebnisse innerhalb der Gruppe der BALB/c HBs-TG deutliche Inhomogenitäten auf. Diese blieben auch nach dreimaliger Wiederholung des Experiments unverändert. Daher war anzunehmen, dass im höheren Alter interindividuelle Unterschiede zunehmen, wodurch eine zuverlässige Interpretation der Daten in dieser Altersgruppe nicht gewährleistet werden kann. Zudem konnte nicht ausgeschlossen werden, dass die beobachteten Abweichungen auf eine Beeinträchtigung der Probenqualität, beispielsweise durch Degradation, Beschädigung oder eine mögliche Kontamination, zurückzuführen waren. Aus diesem Grund wurden die entsprechenden Ergebnisse von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

Auch der UPR Marker CHOP war in den 8 Wochen alten HBs-transgenen Mäusen verstärkt exprimiert. Der IRF3/7 KO hatte keinen Einfluss auf die durch HBs verstärkte Expression von CHOP.

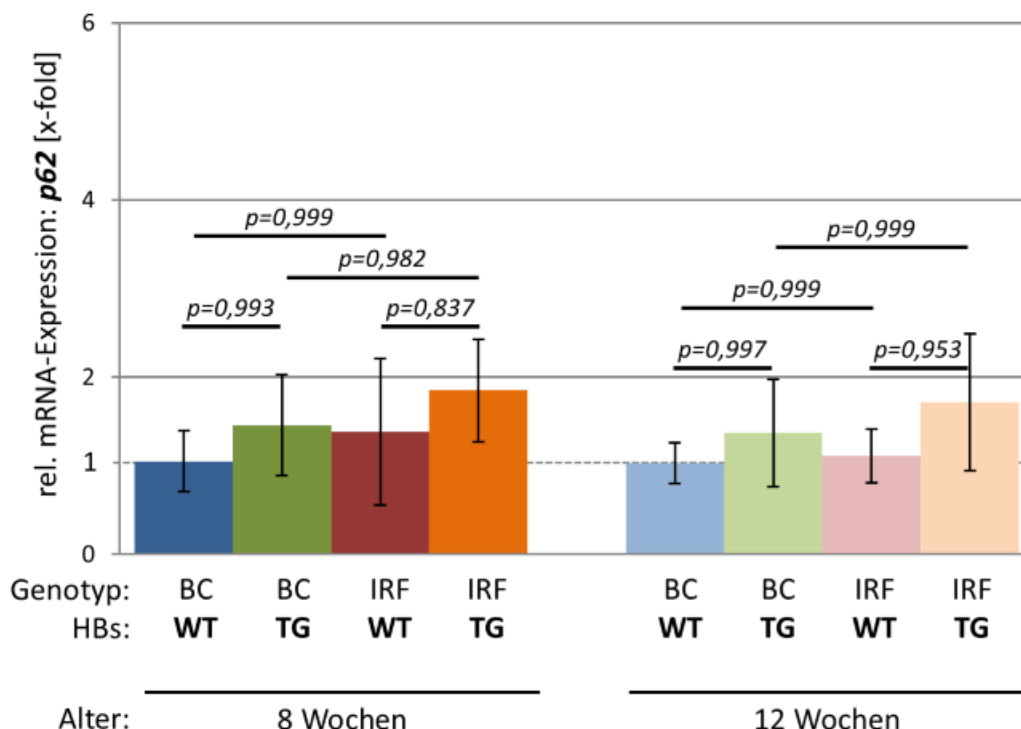
3.5 HBs beeinflusst interferonabhängig Autophagie

Es ist bekannt, dass HBx oder das gesamte Hepatitis-B-Virus Autophagie beeinflussen kann.^{87,90,97,201,202} Welche Auswirkungen die alleinige Überexpression von HBs in unserem Modell auf Autophagie hat, wurde im Folgenden analysiert. Dabei wurden insbesondere spezifische Substrate wie p62, Autophagosomen mittels LC3 und die Aktivität von Regulatoren wie mTOR betrachtet.

3.5.1 HBs führt zu einer p62-Akkumulation

p62 ist der wichtigste Adapter der selektiven Autophagie. Abzubauender zellulärer Inhalt wird durch Ubiquitin markiert und anschließend durch p62 an LC3-II auf der Innenseite des sich bildenden Autophagosoms gebunden. Dabei kann durch Phosphorylierung (P) die Affinität von p62 zu Ubiquitin und LC3-II gesteigert werden. Das Autophagosom (AP) fusioniert mit einem Lysosom zum Autophagolysosom (AL). Im Autophagolysosom wird der Inhalt inklusive p62 abgebaut. Die Abbaurrate wird dabei auch als Flux (autophagic flux) bezeichnet.^{18,81} Neben der Regulation auf Proteinebene kann auch die Translation von p62 unter anderem durch Sauerstoffradikale (ROS) stimuliert werden.⁶⁸

Abbildung 32: p62-mRNA-Expression

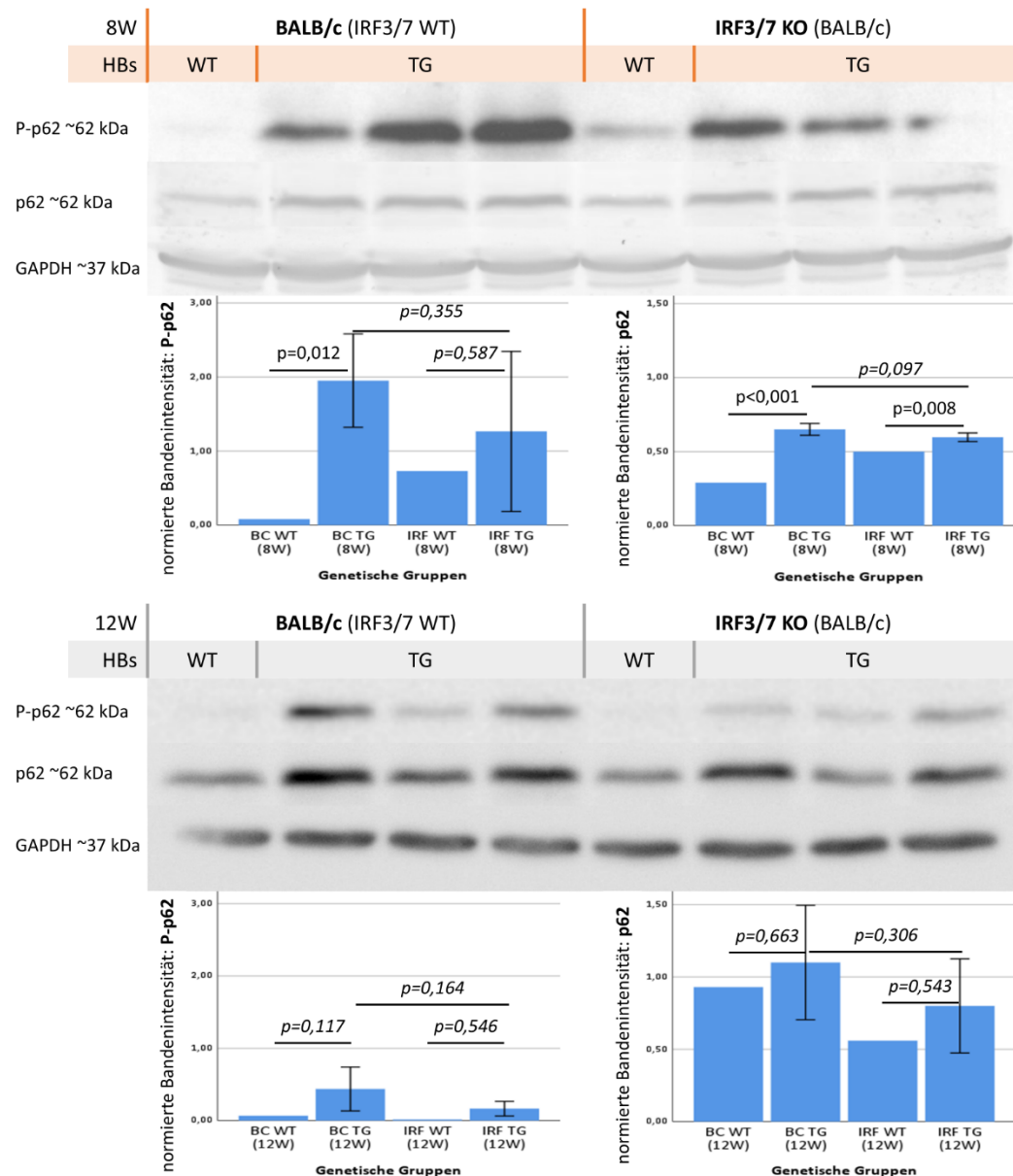


Analyse der p62-mRNA aus Leber 8 und 12 Wochen alter Mäuse mittels qPCR. Die Expression wurde mittels Rpl32 normiert und als Fold Change ($\Delta\Delta Ct$ -Methode) relativ zum jeweiligen BALB/c WT dargestellt. Pro Gruppe wurden vier bis sechs Mäuse untersucht. Die Fehlerindikatoren zeigen den Standardfehler. Berechnung

der *p*-Werte mittels univariater ANOVA und Tukey-HSD, *p*-Werte > 0,05 sind kursiv gedruckt.

p62 wurde in allen Mausgruppen in gleicher Menge exprimiert. Dies war sowohl unabhängig vom IRF3/7 KO als auch vom Alter der Mäuse. Daher war davon auszugehen, dass *p62* auf transkriptioneller Ebene in unserem Modell nicht reguliert wurde.

Abbildung 33: *p62* Proteinexpression und quantitative Analyse



Exemplarische Proteinanalyse in Leberlysaten 8 und 12 Wochen (W) alter Mäuse. *p62*- und *P-p62* [Ser403] wurden mittels spezifischer Antikörper im Westernblot detektiert (jeweils obere Banden). Markierung der untersten Banden mittels GAPDH-Antikörper zur Darstellung der Ladekontrolle. Entwicklung von *p62* und GAPDH in 8 Wochen via chromogenem Nachweis, Rest via Chemilumineszenz.

Darunter jeweils densitometrische Auswertung der gezeigten Westernblots. Darstellung von Mittelwerten der Expression, normiert auf GAPDH. Statistische Analyse mit univariater ANOVA (paarweise Vergleiche: jeweils WT n=1, TG n=3). p-Werte der Gruppen über den entsprechenden Balken, Fehlerbalken zeigen den Standardfehler. Bei 8W Mäusen für p62 vier technische Replikate, bei P-p62 ein Replikat, bei 12W Mäusen bei p62 ein Replikat, bei P-p62 zwei Replikate.

In HBs-transgenen Mäusen wurde eine Akkumulation von p62 und der aktivierten Form P-p62 beobachtet, was auf einen unvollständigen Abbau und eine Hemmung der Autophagie in einem der späten Schritte hinweist. Eine Hemmung des Abbaus in den Lysosomen oder auch eine gestörte Fusion der Autophagosomen mit den Lysosomen führte zu einer Akkumulation von p62. P-p62 deutete darauf hin, dass die Zelle aktiv p62 phosphorylierte, um den Abbau zu fördern. Die P-p62-Banden der 12 Wochen alten IRF3/7 KO TG Mäuse tendierten zu einer geringeren Intensität als die der BALB/c TG Mäuse ($p=0,164$), was auf eine verminderte Akkumulation im Alter hindeuten könnte. Die Bande der mittleren BALB/c TG Maus zeigt eine geringere Intensität, wobei diese Maus in verschiedenen Analysen von der Gruppe abwich, was zu einer erhöhten Standardabweichung innerhalb der Gruppe führte. Eine geringere Menge an P-p62 bei gleicher Menge an p62 würde die Hypothese einer verminderten Aktivierung der Autophagie bei Interferonmangel stützen. Bei 8 Wochen alten IRF3/7 KO Mäusen trat am rechten Rand des P-p62 ein Entwicklungsartefakt auf, das zu einer unvollständigen Darstellung der rechten Bande führte. Dieses führte zu einem hohen Standardfehler und resultierend hohen p-Werten.

In 8 Wochen alten Mäusen akkumulierten die TG Mäuse in gleichem Maße P-p62 und p62 unabhängig vom IRF3/7 KO. In 12 Wochen alten Mäusen war dieser Effekt schwächer ausgeprägt. Möglicherweise akkumulierte weniger P-p62 in IRF3/7 KO TG Mäusen (12W).

Da keine transkriptionelle Regulation stattfand (Abbildung 32), ist von einer Entstehung der beobachteten Unterschiede auf Proteinebene auszugehen.

In einer ebenfalls durchgeführten Immunpräzipitation (Abbildung 40) wurde demonstriert, dass der Großteil an p62 an Ubiquitin gebunden war. Dies legte nahe, dass die sekundäre Markierung von Ubiquitin mit p62 funktionierte. LHB schien jedoch nur in geringem Maße selbst an Ubiquitin gebunden zu werden, was die Akkumulation mangels funktionierenden Abbaus nahelegte.

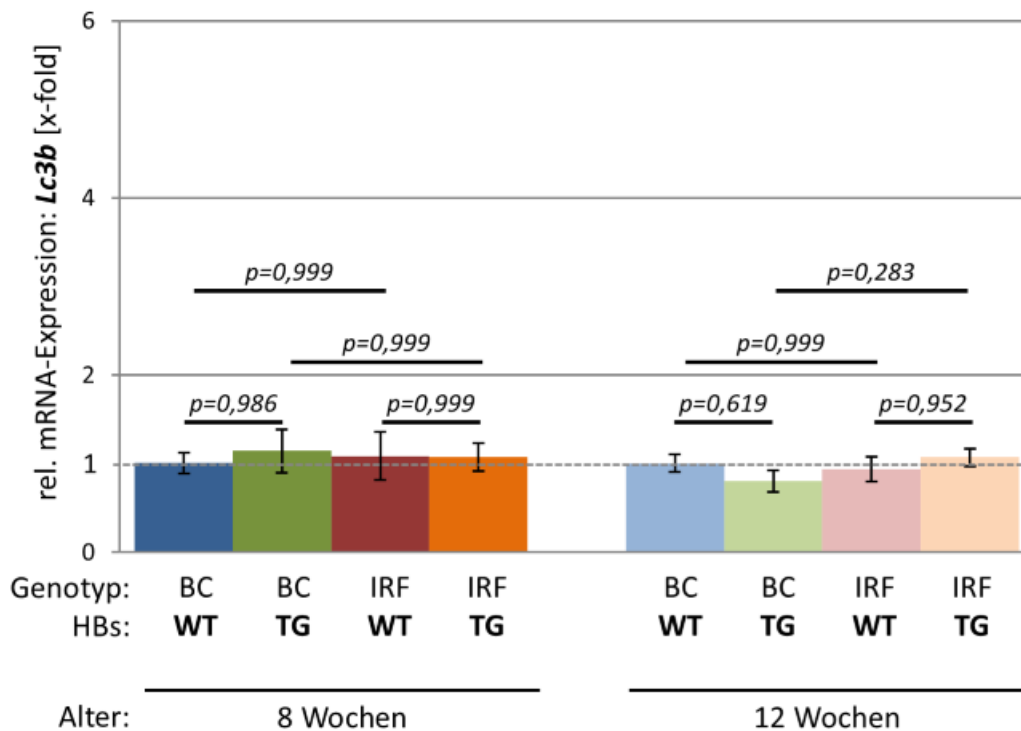
p62 als Marker für Autophagie unterlag in diesem Modell keiner Regulation auf transkriptioneller Ebene. Die beobachteten Unterschiede betrafen ausschließlich die

Proteinebene. In den HBs-transgenen Mäusen akkumulierten p62 und phosphoryliertes p62 (P-p62), was auf eine gestörte Autophagie und einen blockierten Autophagie-Flux hinwies.

3.5.2 HBs führt zu vermehrter LC3-II Akkumulation

LC3-II bindet p62 und damit die p62 markierten Zellinhalte und Proteine an die innere Membran der Autophagosomen. Dabei ist LC3-I die inaktive und LC3-II die aktivierte funktionelle Form. LC3-II korreliert gut mit der Menge an Autophagosomen und kann daher als Marker der Autophagie genutzt werden.¹⁸ Bei Induktion von Autophagie oder einer Hemmung des Abbaus im späten Stadium der Autophagie akkumulieren Autophagosomen und damit LC3-II. Normalerweise ist nur wenig LC3-II vorhanden, bei Hemmung der Autophagieinduktion oder Erhöhung des Flux kann die Menge an LC3-II auch erniedrigt sein.⁴⁴

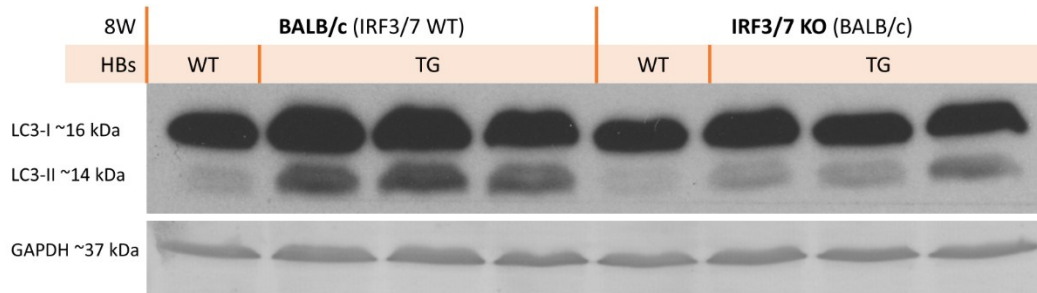
Abbildung 34: Lc3b-mRNA-Expression



Analyse der Lc3b-mRNA aus Leber 8 und 12 Wochen alter Mäuse mittels qPCR. Die Expression wurde mittels Rpl32 normiert und als Fold Change ($\Delta\Delta Ct$ -Methode) relativ zum jeweiligen BALB/c WT dargestellt. Pro Gruppe wurden vier bis sechs Mäuse untersucht. Die Fehlerindikatoren zeigen den Standardfehler. Berechnung der p-Werte mittels univariater ANOVA und Tukey-HSD, p-Werte > 0,05 sind kursiv gedruckt.

Die Expression von Lc3b war in allen Gruppen identisch, unabhängig von HBs, IRF3/7 KO und Alter.

Abbildung 35: LC3 Proteinexpression



Exemplarische Proteinanalyse in Leberlysaten 8 Wochen (W) alter Mäuse. LC3 wurde mittels spezifischer Antikörper im Westernblot detektiert (obere Bandenpaare). Bei LC3 entsteht jeweils ein Bandenpaar übereinander durch die Größenunterschiede von LC3-I (frei) und LC3-II (membranständig). Markierung der untersten Banden mittels GAPDH-Antikörper zur Darstellung der Ladekontrolle. Entwicklung von GAPDH via chromogenem Nachweis, LC3 via Chemilumineszenz. Sechs technische Replikate.

LC3 wurde als indirekter Marker für die Induktion von Autophagie genutzt.^{67,104}

Bei den 8 Wochen alten Mäusen akkumulierten sowohl LC3-I als auch LC3-II in den HBs-TG Mäusen. Die Intensität der LC3-II-Banden, die mit der Anzahl der Autophagosomen korreliert, war in den BALB/c TG Mäusen deutlich höher als in den IRF3/7-KO TG Mäusen. Zusammen mit der Akkumulation von p62 deutete dies auf eine Hemmung des Autophagie-Fluxes in HBs-TG Mäusen sowie auf eine verstärkte Akkumulation von Autophagosomen in BALB/c TG Mäusen im Vergleich zu IRF3/7 KO TG Mäusen hin.

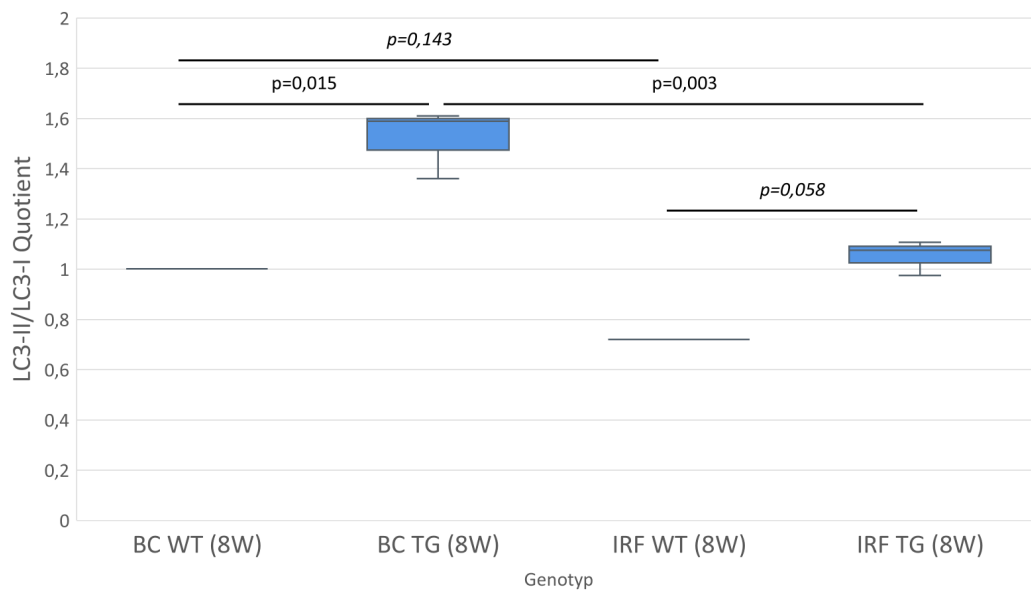
Bei der Analyse der 12 Wochen alten Mäuse wiesen die Western-Blot-Ergebnisse innerhalb der Gruppe der IRF3/7 KO HBs-TG deutliche Inhomogenitäten auf. Diese blieben auch nach dreimaliger Wiederholung des Experiments unverändert. Die Ergebnisse wurden daher aus den weiteren Analysen ausgeschlossen.

Lc3b war nicht auf transkriptioneller Ebene reguliert. In HBs-transgenen Mäusen war mehr LC3 zu detektieren als in Wildtypen. Insbesondere akkumuliert mehr LC3-II als aktive Form in BALB/c HBs-transgenen Mäusen im Vergleich zu IRF3/7 KO HBs-transgenen Mäusen.

3.5.3 Knockout der Typ-I-Interferonantwort führt zu vermindertem LC3-II/I Quotient

Zur Messung der Autophagieaktivität ist der LC3-II/LC3-I Quotient ein etablierter Parameter.¹⁰³ Dabei kann über das Verhältnis aus zur Verfügung stehenden zellulärer Maschinerie (LC3-I) und aktiver, verwendeter Maschinerie (LC3-II) die Auslastung und Aktivierung des Systems besser quantifiziert werden als durch den Vergleich von LC3-II allein.

Abbildung 36: Densitometrische Analyse der LC3 Proteinexpression im Westernblot



Darstellung des LC3-II/LC3-I Quotienten der jeweiligen Mausgruppen, welcher in der Westernblot Analyse der 8 Wochen alten Mäuse aus Abbildung 35 beobachtet wurde. Auswertung der Banden mittels Densitometrie-Software (LabImage 1D L340 - Intas Science Imaging GmbH) und statistischer Testung mittels ANOVA (paarweise Vergleiche [für BALB/c und IRF3/7 KO jeweils WT: n=1, TG: n=3]).

Der LC3-II/LC3-I Quotient war in HBs-TG Mäusen deutlich erhöht im Vergleich zu den WT Mäusen. Zudem war der Quotient in BALB/c TG deutlich höher als in IRF3/7 KO TG ($p=0,003$). Dies bedeutete, dass in BALB/c TG deutlich mehr Autophagosomen akkumulieren als in IRF3/7 KO TG.

Im Mausmodell akkumulierte der Marker LC3-II als Hinweis auf eine vermehrte Autophagosomenbildung. Die p62-Akkumulation in den transgenen Mäusen im Vergleich zum Wildtyp deutete auf eine Hemmung des Autophagie-Flux hin. In den HBs-transgenen IRF3/7 KO Mäusen lag eine deutlich geringere Akkumulation von LC3-II vor als in den BALB/c TG Mäusen, begleitet von einer reduzierten Umwandlung von LC3-I zu LC3-II. Dies bedeutete, dass weniger Autophagosomen in IRF3/7 KO TG Mäusen akkumulieren als in BALB/c TG.

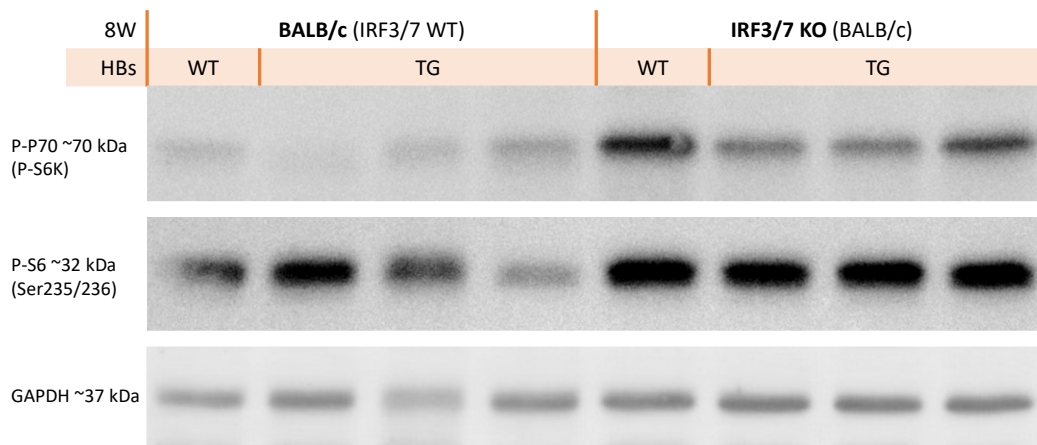
3.5.4 Dysregulation der Autophagie in unserem Modell

Um die Regulation der Autophagie in unserem Modell besser zu verstehen, wurden zentrale Regulatoren analysiert, wie mTORC1 und Beclin-1, lysosomale Markerproteine (LAMP-1/2) sowie die Polyubiquitinierung.

mTORC1 spielt als zentraler Regulator zellulärer Prozesse eine Schlüsselrolle, indem es nach Aktivierung die Kinase P70 phosphoryliert, welche wiederum S6

phosphoryliert. S6, ein ribosomales Protein mit regulatorischen Funktionen, kann dabei die Autophagie hemmen.^{203,204}

Abbildung 37: Regulation durch mTORC1 ist abhängig von der Interferonantwort



Exemplarische Proteinanalyse in Leberlysaten 8 Wochen (W) alter Mäuse. Die oberen Banden sind mit einem spezifischen Phospho-p70-S6-Kinase-(Thr389)-Antikörper markiert. Darunter ist das phosphoryliertes Substrat mittels Phospho-S6-Ribosomal-Protein-(Ser235/236)-Antikörper markiert. Markierung der untersten Banden mittels GAPDH-Antikörper zur Darstellung der Ladekontrolle. Entwicklung via Chemilumineszenz. Je ein technisches Replikat.

In den IRF3/7 KO Mäusen war die Menge des aktiven P-P70-Proteins deutlich erhöht im Vergleich zu BALB/c Mäusen, die unabhängig von HBs eine erhöhte Expression aufwiesen. Innerhalb der IRF3/7 KO Gruppe zeigten WT Mäuse eine etwas höhere P-P70-Expression als IRF3/7 KO TG Mäuse.

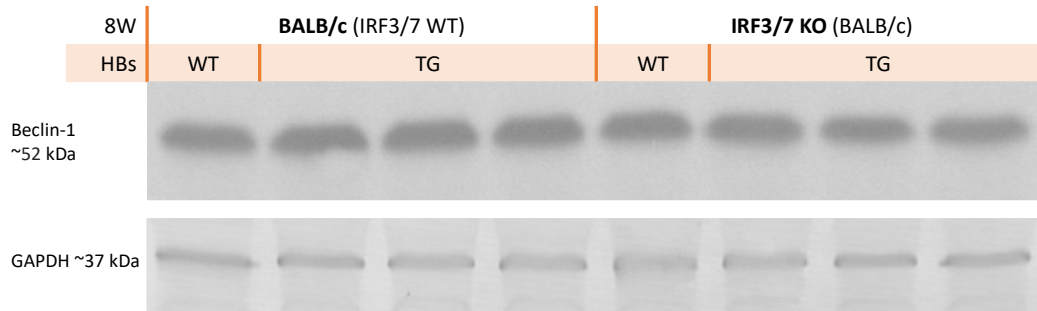
Auch die Phosphorylierung des Substrats P-S6 war in IRF3/7 KO Mäusen verstärkt im Vergleich zu BALB/c Mäusen. Letztere wiesen unabhängig von HBs eine heterogene, aber insgesamt schwächere Signalintensität auf als die IRF3/7 KO Mäuse. Dieser Effekt war unabhängig von HBs.

Die Ladekontrolle zeigte eine gleichmäßige Verteilung, mit Ausnahme einer Bande bei BALB/c TG, die möglicherweise zur beobachteten Heterogenität beitrug.

Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die Autophagie über den mTORC/P70/S6-Signalweg in IRF3/7 KO Mäusen gehemmt wurde.

Die Reifung von Autophagosomen kann durch Beclin-1 gehemmt werden.^{20,98,147} Zudem ist bekannt, dass HBx die Expression von Beclin-1 steigern kann.²⁰⁵ Da eine Blockade der Autophagie in den HBs-transgenen Mäusen vorliegt, wurde Beclin-1 bestimmt.

Abbildung 38: Beclin-1 Proteinexpression

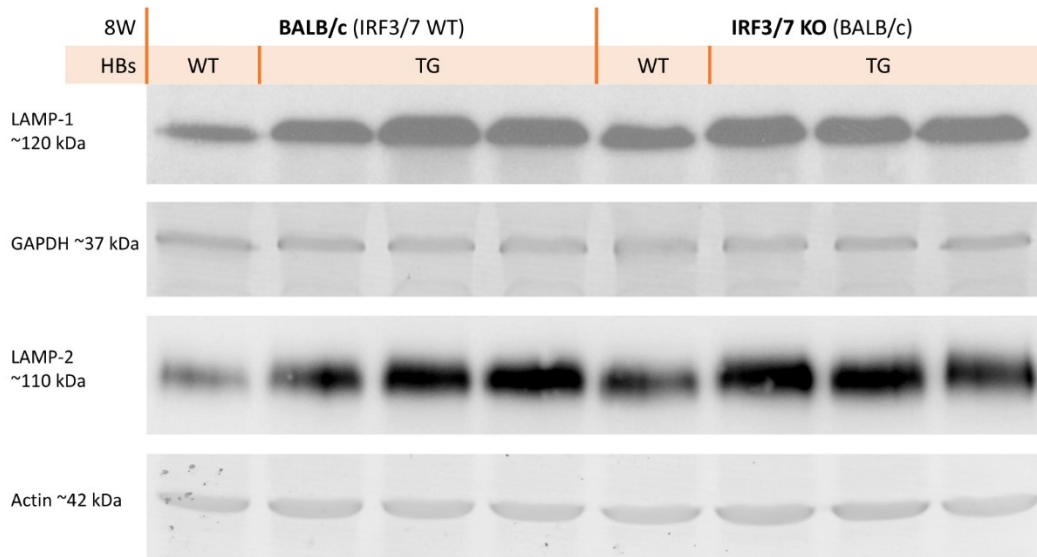


Exemplarische Proteinanalyse in Leberlysaten 5 Wochen (W) alter Mäuse. Beclin-1 wurde mittels spezifischer Antikörper im Westernblot detektiert (obere Banden). Markierung der unteren Banden mittels GAPDH-Antikörper zur Darstellung der Ladekontrolle. Entwicklung von Beclin-1 via Chemilumineszenz, Ladekontrolle via chromogenem Nachweis. Ein technisches Replikat.

Die Expression von Beclin-1 war unabhängig von HBs und Interferonantwort gleich. Die beobachteten pathologischen Veränderungen der Autophagie waren vermutlich nicht durch Beclin-1 vermittelt.

Die Membran der Lysosomen besteht aus ca. 50% LAMP-1 und LAMP-2. Diese stabilisieren die Struktur der Lysosomen und haben eine Adapterfunktion für die Chaperon-vermittelte Autophagie. LAMP akkumuliert, wenn zum Beispiel Lysosomen aufgrund eines gestörten Abbaus akkumulieren.²⁰⁶

Abbildung 39: LAMP-1 und LAMP-2 Proteinexpression



Exemplarische Proteinanalyse in Leberlysaten 8 und 12 Wochen (W) alter Mäuse. Jeweils obere Banden markiert mit LAMP-1- bzw. LAMP-2-Antikörper. Markierung der jeweils unteren Banden mittels GAPDH- bzw. Actin-Antikörper zur Darstellung der Ladekontrolle. Entwicklung (LAMP-1/2) via Chemilumineszenz, Ladekontrollen

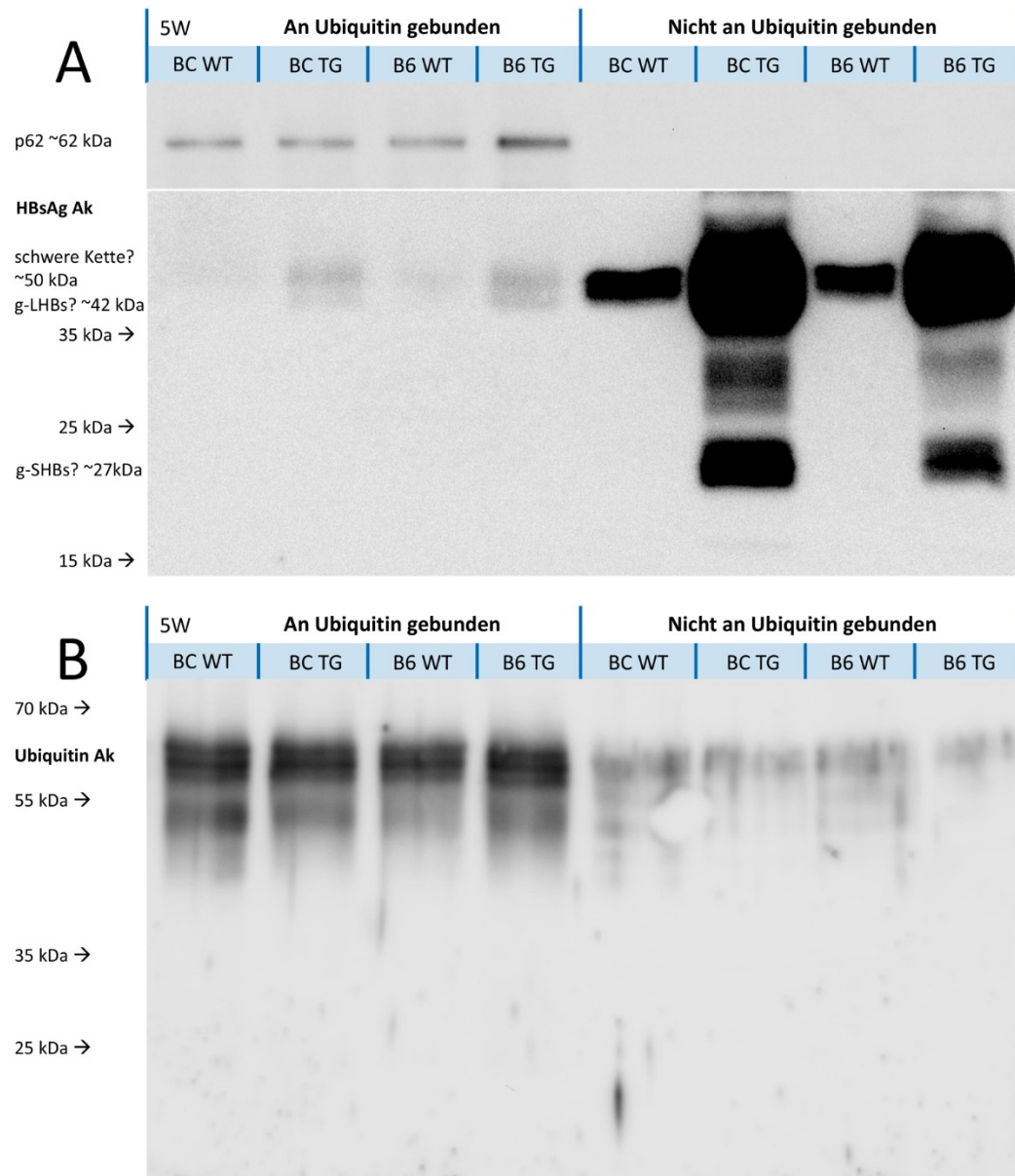
via chromogenem Nachweis. Bei LAMP-1 zwei technische Replikate, bei LAMP-2 ein technisches Replikat.

LAMP-1 und LAMP-2 waren in den HBs-transgenen Mäusen im Vergleich zum WT verstärkt exprimiert, dabei verhielten die BALB/c und IRF3/7 KO Mäuse sich gleich. Dies war ein Hinweis, dass in HBs-TG Mäusen Lysosomen unabhängig vom IRF3/7 KO akkumulierten.

Damit Proteine wie HBs mittels Autophagie oder Proteasom abgebaut werden können, müssen sie durch Ubiquitinierung zum Abbau markiert werden.^{36,77,151,207}

Mittels Immunpräzipitation wurden an Ubiquitin gebundene Proteine aus den Lysaten isoliert. So konnte analysiert werden, welche Proteine an Ubiquitin gebunden waren und in welcher relativen Menge.

Abbildung 40: Polyubiquitinierung von LHB und p62



Exemplarische Proteinanalyse aus einer Immunpräzipitation (IP) mit Ubiquitin in Leberlysaten 5 Wochen (W) alter Mäuse. Die linke Hälfte der Abbildung stellt das Immunpräzipitat dar, die rechte Hälfte den Durchfluss, also den Anteil, der nicht an Ubiquitin gebunden wurde. A) Obere Banden markiert mit p62-Antikörper (Ak). Darunter großer Ausschnitt der Membran markiert mit HBsAg-Antikörper. B) Markierung der Banden mittels Ubiquitin-Antikörper zur Kontrolle der IP-Effizienz. Die Entwicklung erfolgte über Chemilumineszenz. Dabei wurden für p62 zwei technische Replikate, für HBsAg vier Replikate und für Ubiquitin drei Replikate durchgeführt.

In Abbildung 40:A war p62 nahezu vollständig an Ubiquitin gebunden, da im Durchfluss (rechts) keine Banden nachweisbar sind. In C57BL/6 TG Mäusen wies die entsprechende Bande eine leicht erhöhte Intensität im Vergleich zu den restlichen Präzipitaten auf, während die Gesamtintensität der Banden vergleichbar blieb.

Bei HBsAg waren die Banden überwiegend im Durchfluss auf der rechten Seite lokalisiert. Die bei 50 kDa detektierten Banden, die auch in WT Mäusen vorhanden sind, waren vermutlich Artefakte. Diese könnten durch die schweren Ketten zirkulierender Antikörper im Mäuseblut entstehen, wenn sie vom sekundären Antikörper gebunden wurden. Es lassen sich allenfalls schwache Banden in Präzipitaten auf der linken Seite erahnen. Der Großteil an HBs blieb im Durchfluss gebunden.

Wie in Abbildung 40:B zu sehen ist, wurde ein Großteil des Ubiquitins durch die Immunpräzipitation erfolgreich gebunden, während im Durchfluss auf der rechten Seite lediglich schwache Banden vorhanden waren. Die polyubiquitinierten Proteine befanden sich hauptsächlich im Größenbereich von 50–70 kDa, während kleinere Proteine durch den Assay möglicherweise nicht erfasst oder in unzureichendem Maße ubiquitiniert wurden.

Zusammenfassend deuteten die Daten darauf hin, dass Autophagie über mTORC1 in IRF3/7 KO Mäusen unabhängig von HBs gehemmt wurde.

Die lysosomalen Marker LAMP-1 und LAMP-2 akkumulierten in HBs-transgenen Mäusen unabhängig vom IRF3/7 KO.

Die Regulation von Beclin-1 erfolgte in diesem Modell unabhängig von HBs und dem IRF3/7 Knockout.

Die Immunpräzipitation lieferte Hinweise darauf, dass p62 in hohem Maße Ubiquitin gebunden hat. Im Vergleich dazu weist LHB anscheinend nur eine schwache Assoziation mit Ubiquitin auf.

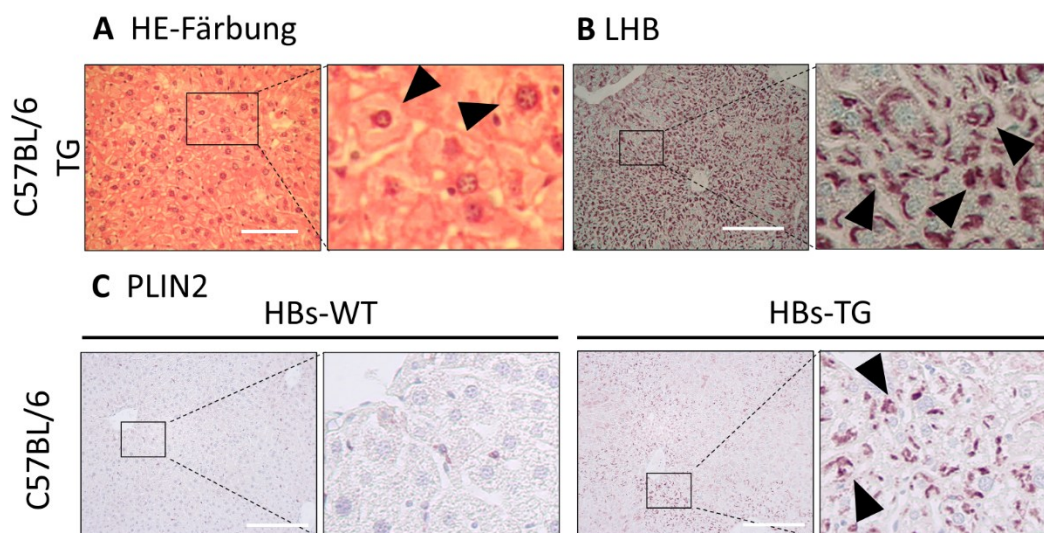
3.6 Die Reaktion auf HBs ist abhängig vom genetischen Hintergrund

Die verwendeten BALB/c Mäuse, auf denen auch der IRF3/7 KO basiert, neigen im Vergleich mit C57BL/6 Mäusen zu einer stärkeren Fibrose bei dominanter Th-2-Antwort. Bei den C57BL/6 Mäusen überwiegt hingegen die Th-1-Antwort, was zu einer geringeren Fibrosierung führte.^{8,22} Die C57BL/6 Mäuse dienten als Vergleichsgruppe zur Untersuchung des Einflusses des genetischen Hintergrunds (BALB/c vs. C57BL/6) auf Autophagie und die Bildung von Aggregaten.

Die C57BL/6 Mäuse bildeten, wie die IRF3/7 KO Mäuse, GGHs und reagierten im Gegensatz zu BALB/c nicht auf HBs mit einer Typ-I-Interferonantwort.

Im Folgenden sind Histologie, Interferonantwort, ER-Stress und Autophagie analog zu dem Vergleich BALB/c und IRF3/7 KO dargestellt.

Abbildung 41: Histologie C57BL/6 im Vergleich zu BALB/c und IRF3/7 KO Mäusen



Repräsentative histologische Darstellung der Aggregatbildung in Lebergewebe (Paraffinschnitte). Vergleich der Auswirkung des Genotyps und Interferonantwort. A) Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) von C57BL/6 HBs-TG Mäusen. Die Pfeile markieren Ground Glass Hepatozyten (GGH). B) Immunhistochemische Anfärbung (IHC) der Leber von HBs-TG Mäusen mit LHB zur Darstellung der HbsAg-Aggregate (Pfeile zeigen Aggregate). C) IHC der Lipid Droplets via PLIN2 in WT und HBs-TG Mäusen. Pfeile zeigen Aggregate in TG Mäusen, die Lipid Droplets enthalten. Skalierungsbalken in A 100 μ m B/C 200 μ m. Grafik in Ergänzung zu Abbildung 18, Abbildung 19 und Abbildung 20. n = 5-10 Mäuse pro Gruppe.

In den HE-Schnitten der C57BL/6 Mäuse erschien der Phänotyp der GGHs (Abbildung 41: A: schwarze Pfeile) wie in IRF3/7 KO-Mäusen (Abbildung 18: IRF3/7 abhängige Bildung von Milchglashepatozyten – HE-Färbung). Im Gegensatz dazu war bei den BALB/c Mäusen eine deutlich homogenere Verteilung der Proteine des

Zytoplasmas zu sehen (Abbildung 18: IRF3/7 abhängige Bildung von Milchglashepatozyten – HE-Färbung).

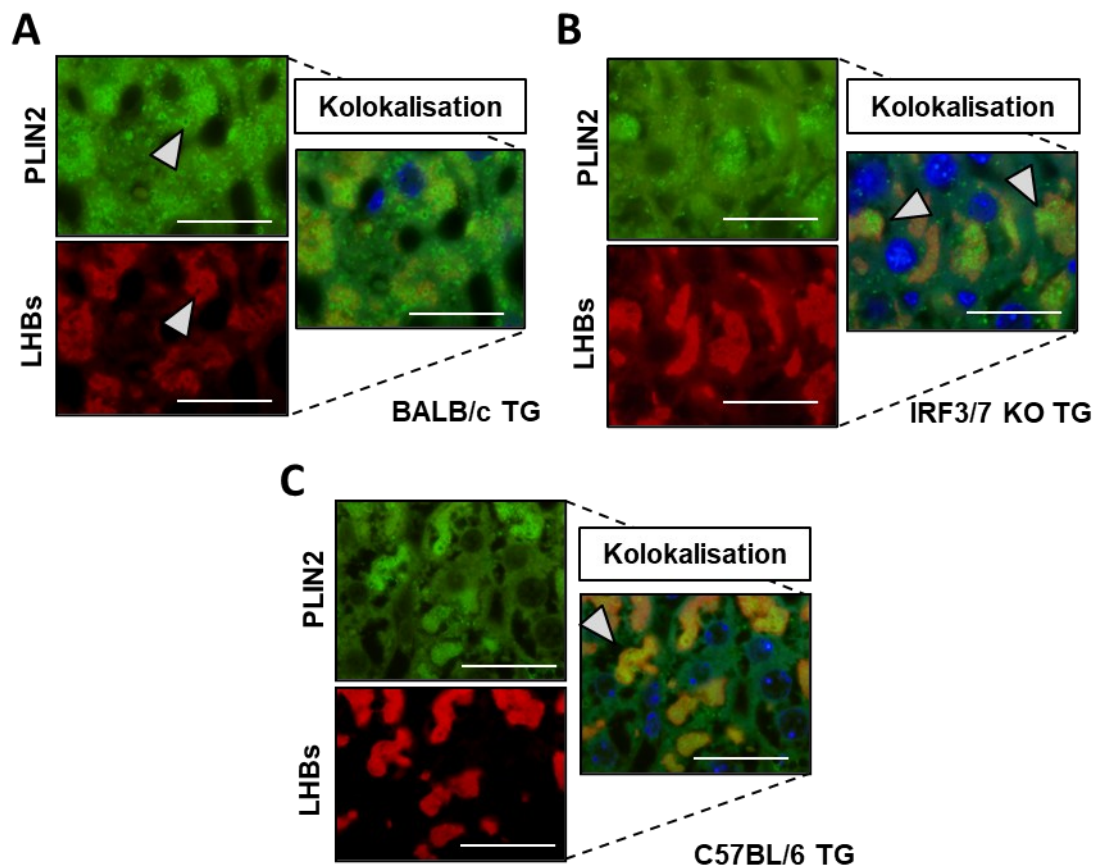
In den IRF3/7 KO wie auch bei den C57BL/6 Mäusen lag eine dezent dichtere Aggregation von LHB vor im Vergleich zu der diffuseren Verteilung in den BALB/c Mäusen (B: schwarze Pfeile).

Auch PLIN2 war durch HBs in den C57BL/6 Mäusen deutlich mehr vorhanden.¹¹

Dabei war PLIN2 in den C57BL/6 TG Mäusen stark aggregiert (C: schwarze Pfeile). Die Aggregate in C57BL/6 erschienen dichter als bei IRF3/7 KO und standen im Kontrast zur deutlich diffuseren Verteilung in BALB/c (C: weiße Pfeile).

Insgesamt war der Phänotyp der GGHS und die Verteilung von HBs und PLIN2 bei den HBs-transgenen C57BL/6 Mäusen ähnlich ausgeprägt wie bei den HBs-transgenen IRF3/7 KO Mäusen.

Abb. 42: Immunofluoreszenz HBs-TG Mäuse im Vergleich BALB/c - IRF3/7 KO - C57BL/6



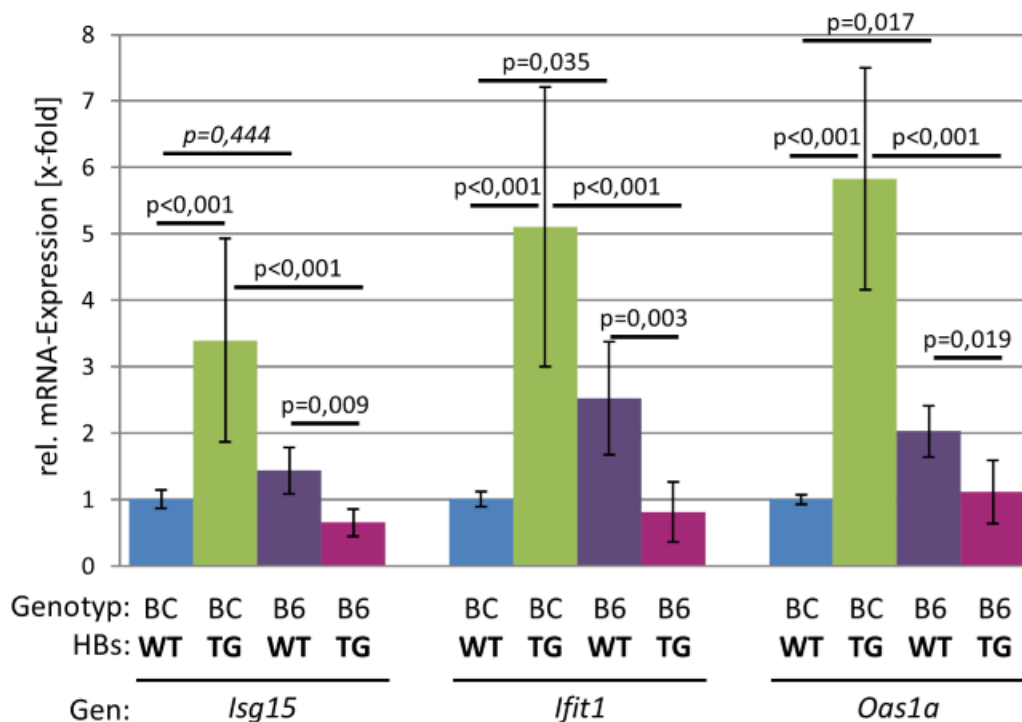
Repräsentative Immunofluoreszenz auf Paraffinschnitten der Leber HBs-transgener Mäuse. Färbung mit anti-PLIN2 (grün), anti-LHB (rot). Nuklei gefärbt mit Hoechst33342 (blau). Einzeldarstellung und Kolokalisation. Die Überlagerung von PLIN2 und LHB stellt sich dabei gelb dar. Skalierungsbalken 25 μ m. n = 5-13 Mäuse pro Gruppe. A: BALB/c TG, B: IRF3/7 KO TG, C: C57BL/6 TG

In BALB/c Mäusen erscheinen die von PLIN2 markierten Vesikel als abgegrenzte, lochartige Strukturen innerhalb der LHB-Verteilung (Abb. 42: A: weiße Pfeile), was auf eine getrennte Verteilung der beiden Proteine hindeuten könnte. Bei IRF3/7 KO und C57BL/6 Mäusen fällt stattdessen eine stärkere Überlagerung beider Signale auf, die in der Kolokalisation als gelbe Färbung erscheint. Diese Überlagerung war in C57BL/6 und IRF3/7 KO stärker als in BALB/c Mäusen, was auf eine entsprechend stärkere Aggregatbildung hinweisen könnte.

Das histologische Bild der C57BL/6 und IRF3/7 KO Mäuse war in Bezug auf GGHS und Aggregatbildung vergleichbar und steht im Kontrast zur Histologie in BALB/c Mäusen.

Analog zum Vergleich BALB/c und IRF3/7 KO wurde auch bei C57BL/6 die Interferonantwort untersucht.

Abbildung 43: mRNA-Expression: interferonstimulierter Gene im Vergleich BALB/c vs. C57BL/6

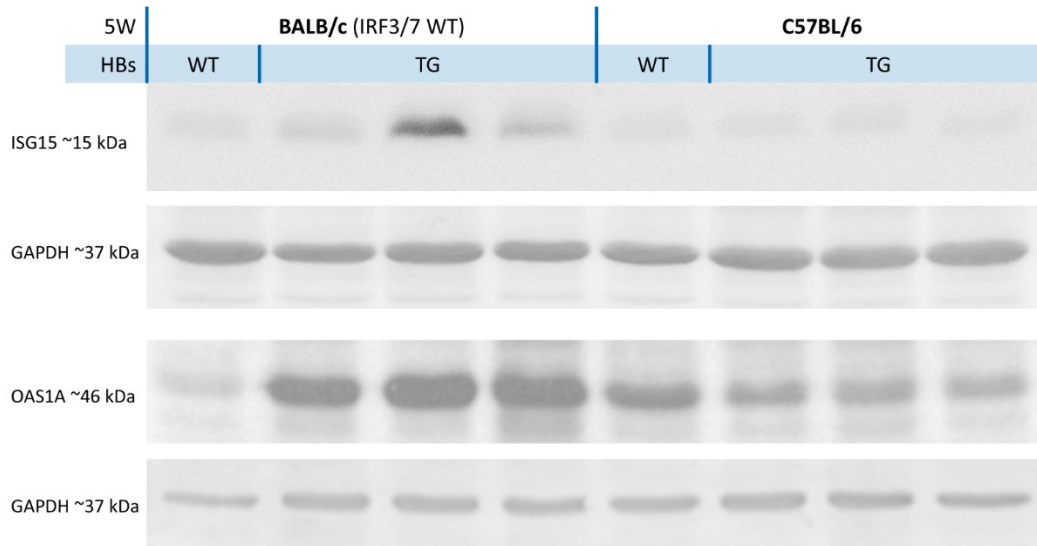


Analyse der *Isg15/Ifit1/Oas1a*-mRNA aus Leber 5 Wochen alter Mäuse mittels qPCR. Die Expression wurde mittels *Rpl32* normiert und als Fold Change ($\Delta\Delta Ct$ -Methode) relativ zum jeweiligen BALB/c WT dargestellt. Pro Gruppe wurden fünf Mäuse untersucht. Die Fehlerindikatoren zeigen den Standardfehler. Berechnung der *p*-Werte mittels univariater ANOVA und Tukey-HSD, *p*-Werte > 0,05 sind kursiv gedruckt.

Auch in den 5 Wochen alten Mäusen lag bereits ein deutlicher Anstieg an interferon-abhängigen Genen vor, wie *Isg15*, *Ifit1* und *Oas1a* in den BALB/c TG Mäusen. In

der Gruppe der C57BL/6 Mäuse war dahingegen kein Anstieg bei den HBs-transgenen Tieren, sondern sogar eine Verringerung zu sehen. In den C57BL/6 WT, verglichen mit den BALB/c Mäusen, fiel auch bei *Ifit1* und *Oas1a* ein erhöhter Basalspiegel von *Ifit1* auf. Die Verringerung der Expression interferonstimulierter Gene bei C57BL/6 TG steht konträr zum Anstieg durch HBs in BALB/c Mäusen.

Abb. 44: Proteinexpression: interferonstimulierte Gene in BALB/c vs. C57BL/6



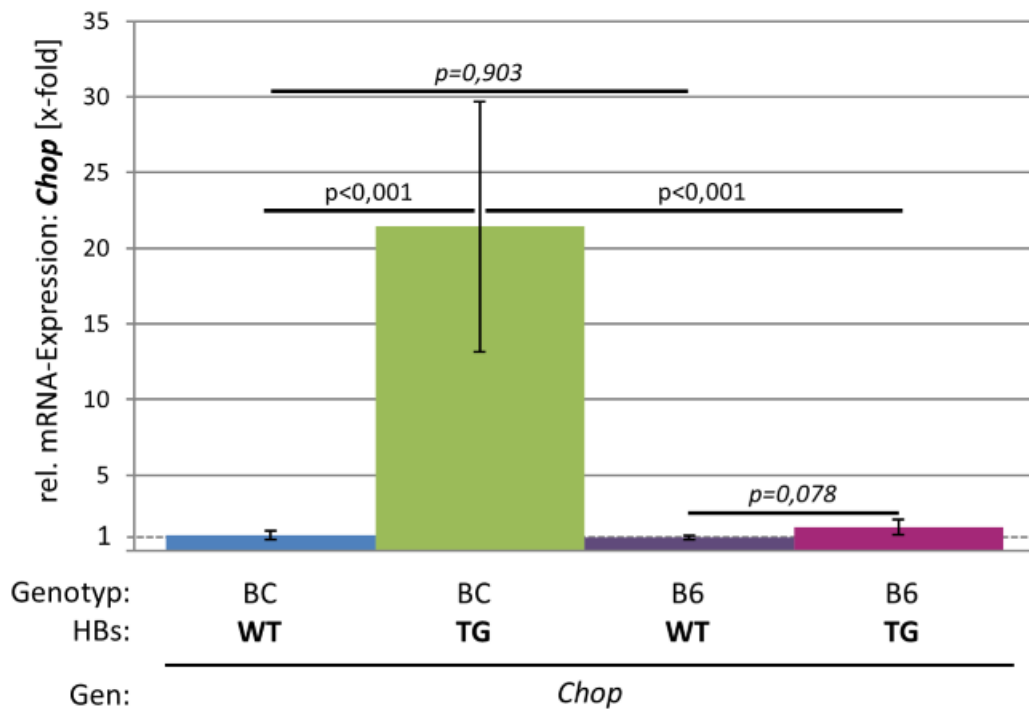
Exemplarische Proteinanalyse in Leberlysaten 5 Wochen (W) alter Mäuse. ISG15 und OAS1 wurde mittels spezifischer Antikörper im Westernblot detektiert (jeweils obere Banden). Markierung der jeweils unteren Banden mittels GAPDH-Antikörper zur Darstellung der Ladekontrolle. Entwicklung via Chemilumineszenz (ISG15; OAS1A) und chromogenem Nachweis (GAPDH). Je zwei technische Replikate.

ISG15 wurde in den HBs transgenen BALB/c Mäusen deutlich stärker exprimiert, während in den C57BL/6 Mäusen entsprechend den PCR Ergebnissen (Abbildung 43) keine erhöhte Expression nachweisbar war.

Auch OAS1A wurde in BALB/c TG stärker exprimiert als in BALB/c WT Mäusen. Entsprechend den PCR Ergebnissen ist beim C57BL/6 WT eine stärkere Bande zu sehen als beim BALB/c WT. Im Gegensatz zu BALB/c wurde durch HBs weniger OAS1A in C57BL/6 TG Mäusen exprimiert.

Ein Anstieg interferonstimulierter Gene durch HBs war in den C57BL/6 Mäusen im Gegensatz zu den BALB/c Mäusen nicht vorhanden.

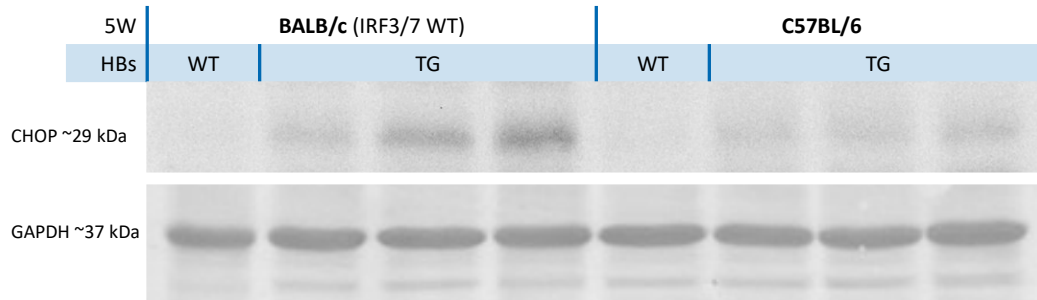
Abbildung 45: mRNA-Expression: ER-Stress im Vergleich BALB/c vs. C57BL/6



Analyse der Chop-mRNA aus Leber 5 Wochen alter Mäuse mittels qPCR. Die Expression wurde mittels Rpl32 normiert und als Fold Change ($\Delta\Delta Ct$ -Methode) relativ zum jeweiligen BALB/c WT dargestellt. Pro Gruppe wurden fünf Mäuse untersucht. Die Fehlerindikatoren zeigen den Standardfehler. Berechnung der p-Werte mittels univariater ANOVA und Tukey-HSD, p-Werte > 0,05 sind kursiv gedruckt.

Auch der ER-Stress-Marker Chop war in den BALB/c HBs-transgenen Mäusen deutlich hochreguliert. Bei den C57BL/6 Mäusen war die Expression der Chop-mRNA unabhängig von HBs gleich.

Abbildung 46: Proteinexpression: ER-Stress im Vergleich BALB/c vs. C57BL/6

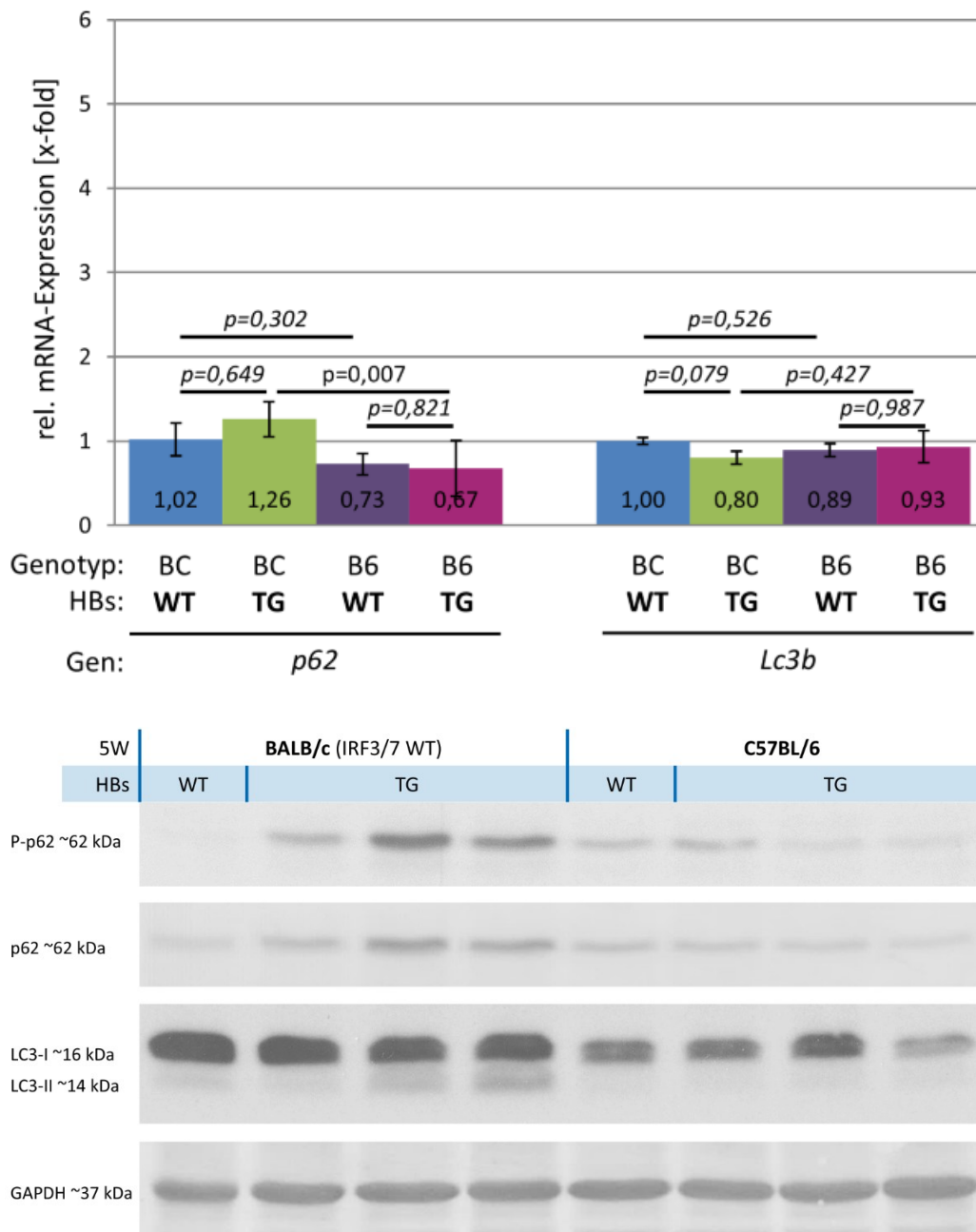


Exemplarische Proteinanalyse in Leberlysaten 5 Wochen (W) alter Mäuse. CHOP wurde mittels spezifischer Antikörper im Westernblot detektiert (jeweils obere Banden). Markierung der unteren Banden mittels GAPDH-Antikörper zur Darstellung der Ladekontrolle. Entwicklung via Chemilumineszenz (CHOP) und chromogenem Nachweis (GAPDH). Ein technisches Replikat.

CHOP war in den BALB/c HBs-transgenen Mäusen stärker exprimiert als im entsprechenden WT. Interessanterweise schienen die TG Mäuse bei BALB/c und C57BL/6 mehr unspezifische Proteine zu enthalten, die vom Sekundärantikörper gebunden wurden, sodass der Hintergrund in den entsprechenden Bahnen dunkler erscheint. Unter Berücksichtigung dieses Phänomens war allenfalls ein geringer Anstieg von CHOP in C57BL/6 TG Mäusen zu erahnen.

In BALB/c Mäusen war CHOP durch HBs sowohl in PCR als auch Westernblot verstärkt exprimiert. Dieser Effekt war bei C57BL/6 Mäusen nicht vorhanden.

Abbildung 47: mRNA- und Proteinexpression: Autophagie im Vergleich BALB/c vs. C57BL/6



Oben: Analyse der p62- und Lc3b-mRNA aus Leber 5 Wochen alter Mäuse mittels qPCR. Die Expression wurde mittels Rpl32 normiert und als Fold Change ($\Delta\Delta C_t$ -Methode) relativ zum jeweiligen BALB/c WT dargestellt. Pro Gruppe wurden fünf Mäuse untersucht. Die Fehlerindikatoren zeigen den Standardfehler. Berechnung der p-Werte mittels univariater ANOVA und Tukey-HSD, p-Werte > 0,05 sind kursiv gedruckt.

Unten: Exemplarische Proteinanalyse in Leberlysaten 5 Wochen (W) alter Mäuse. Phospho-p63 darunter p62 und LC3 wurden mittels spezifischer Antikörper im Westernblot detektiert (entsprechend untereinander dargestellt). Bei LC3 entsteht

jeweils ein Bandenpaar übereinander durch die Größenunterschiede von LC3-I (frei) und LC3-II (membranständig). Markierung der untersten Banden mittels GAPDH-Antikörper zur Darstellung der Ladekontrolle. Entwicklung via Chemilumineszenz (P-p62; p62; LC3), und chromogenem Nachweis (GAPDH). Bei P-p62 ein technisches Replikat, bei p62 sieben technische Replikate, bei LC3 vier Replikate.

Auf mRNA-Ebene exprimierten die BALB/c TG Mäuse geringfügig mehr p62-mRNA als die C57BL/6 TG Mäuse ($p = 0,007$). Der Unterschied (Δx -fold = 0,59) fällt im Vergleich zu den anderen Regulationsunterschieden gering aus. Ansonsten war die Expression von p62- und LC3-mRNA der weiteren Mäuse gleich. Es lag allenfalls eine geringe Regulation auf mRNA Ebene vor.

In den 5 Wochen alten BALB/c TG Mäusen lag ein deutlicher Anstieg von phosphoryliertem, also aktiviertem P-p62 vor. Diese Form bindet bevorzugt ubiquitinierte Proteine. Ebenfalls waren bei den BALB/c TG Mäusen schwache LC3-II Banden zu detektieren; dies ist die an Autophagosomenmembran gebundene Form. Es war das gleiche Muster wie bereits bei den 8W und 12W alten Mäusen zu sehen. Es passte zur Kombination aus Induktion von Autophagie mit inhibiertem Flux.

Die C57BL/6 TG Mäuse wiesen demgegenüber geringere Mengen an P-p62 und LC3-I auf, während LC3-II nicht nachweisbar war. Eine Akkumulation von P-p62 und p62 blieb im Vergleich zu den BALB/c TG Mäusen aus. Somit fehlten sowohl Anzeichen einer Autophagieinduktion (z. B. LC3-II-Anstieg) als auch Hinweise auf eine Flux-Inhibition (z. B. P-/p62-Akkumulation).

Die Daten legten bereits bei den 5 Wochen alten BALB/c TG Mäusen eine Induktion der Autophagie bei gleichzeitiger Inhibition des Flux nahe. Dieses Muster war in den C57BL/6 Mäusen nicht zu erkennen. Bei diesen war keine Änderung der Autophagiemarker durch HBs sichtbar.

In C57BL/6 Mäusen war keine Interferonantwort oder CHOP-Expression als Reaktion auf HBs vorhanden. Das histologische Bild der C57BL/6 Mäuse war vergleichbar mit der Pathologie der IRF3/7 KO Mäuse mit GGHs und PLIN2 Aggregaten.

In den BALB/c TG Mäusen lag eine schwache Induktion der Autophagie sowie eine Hemmung des Autophagie-Flux vor, die in den C57BL/6 Mäusen nicht vorhanden war.

4 Diskussion

4.1 HBs – Verifizierung des Mausmodells

Zusammenfassend lag in den transgenen Mäusen eine erfolgreiche hepatische Expression des Transgens mit Nachweis der Isoformen SHBs, MHBs und LHBs auf mRNA- und Proteinebene vor. Alle HBs-TG Mäuse akkumulierten die Oberflächenproteine auch in glykosylierter Form. Die Wildtypen exprimierten erwartungsgemäß kein HBs. HBx wurde als mRNA transkribiert, war als Protein jedoch nicht nachweisbar.

Wie auch in vorherigen Publikationen der Arbeitsgruppe, liegt ein etabliertes Mausmodell für die Untersuchung der HBsAg Überexpression vor.^{7,8,11,180} Darüber hinaus wurde auch der Erfolg des IRF3/7 KO bestätigt.¹³⁰

Leichte Unterschiede der HBsAg mRNA-Expression sind bei dem Vergleich der Altersgruppen zu beobachten. Wahrscheinlich entstehen diese durch eine altersabhängige Ansprache des Albuminpromotors, durch den auch HBsAg transkribiert wird.²⁰⁸ Ebenfalls wurde in Voruntersuchungen eine Regulation via DNA-Methylierung beobachtet.²⁰⁹ Dabei zeigte sich eine im Alter zunehmende Methylierung der DNA, welche die Transkription von HBsAg in einzelnen Hepatozyten blockiert.²⁰⁹

Im Westernblot lässt sich eine Expression der HBV-Oberflächenproteine (HBs) in allen HBs-transgenen Mäusen nachweisen, unabhängig vom IRF3/7 Knockout oder vom genetischen Hintergrund (BALB/c vs. C57BL/6). Dabei sind insbesondere die glykosylierten Formen g-SHBs sowie g-LHBs nachweisbar. Die Auswirkungen der posttranslationalen Glykosylierung von HBsAg sind Gegenstand aktueller Forschung. Es gibt Hinweise, dass die Glykosylierung die Immunogenität verändert und so der Immunevasion dient.^{194,195,210}

Da der Knock-In auch die Sequenz für HBx enthält und HBx als Induktor der Autophagie beschrieben ist, wurde die Expression von HBx mittels drei unterschiedlicher Antikörper und mehrfacher Replikation untersucht.^{6,205} Im Einklang mit der zugrunde liegenden Annahme wird HBx auf mRNA-Ebene transkribiert, allerdings lässt sich das entsprechende Protein in den Hepatozyten nicht nachweisen. Ein erhöhter Abbau oder ein Ausschleusen aus der Zelle ist denkbar, jedoch unwahrscheinlich. HBx ist zwar in den ORFs (2,4kb/2,1kb) von HBsAg enthalten, wird aber durch einen eigenen Promotor (XP) reguliert und in der Regel von einem eigenen RNA-Transkript translatiert, welches nur die X Region enthält (0,7kb).¹⁷ Daher ist davon auszugehen, dass der Teil der mRNA, der für HBx codiert, nie translatiert wird. Auch Chisari, der Entwickler der HBs-transgenen

Mäuse, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, hat dabei kein HBx beschrieben, und Studien die HBx untersuchen, haben ein anderes Insert verwendet, welches nur HBx enthält.^{5,6,211}

Da kein funktionales HBx Protein vorliegt, wurde in den weiteren Analysen angenommen, dass HBx nicht relevant exprimiert wird und das Modell nur die Oberflächenproteine LHB, MHB und SHB bildet.

Damit liegt ein Modell vor, welches effektiv die Auswirkungen der HBV-Oberflächenproteine demonstriert. HBx wird nicht als Protein gebildet.

4.2 HBs und PLIN2 – Aufbau und Visualisierung der Milchglashepatozyten

Durch den IRF3/7 KO veränderte sich die intrazelluläre Verteilung von HBs und PLIN2. Bei den BALB/c Mäusen fand sich eine diffuse Verteilung der LDs und HBs. Die IRF3/7 KO Mäuse bildeten GGHS mit dichten Aggregaten aus PLIN2, Lipiden und HBs. Die Bildung von Aggregaten mit PLIN2 war auch bei menschlichem HBV-Proben der CHB zu sehen.

Als Milchglashepatozyten (GGHs) beschreibt man Leberzellen, deren Zytoplasma feinkörnig, blass-eosinophil und homogen-milchglasartig erscheint.⁹

GGHs sind charakteristisch für eine CHB und gelten als Präkanzerose.^{9,12,14,122,212}

Das typische Bild lässt sich mit einer einfachen Hämatoxylin-Eosin-Färbung in der Lichtmikroskopie darstellen, wodurch die Diagnostik bereits in den 1970er Jahren weltweit auch abseits moderner Labore möglich war.⁹ Dabei unterscheidet man zwei Subtypen. Typ I GGHs sind sporadisch während der Virusreplikation im Lebergewebe zu finden.^{9,123,213} Typ II GGHs finden sich in den nichtreplikativen Phasen und zirrhotischer Leber.^{9,214}

Es konnte gezeigt werden, dass in Typ I GGHs charakteristischen Mutationen in der präS1 Domäne und in Typ II GGHs in der PräS2 Domäne vorliegen.^{9,123,213–215} Mutationen der PräS Domäne, insbesondere PräS2, können DNA-Schäden verursachen und intrazelluläre Signalkaskaden aktivieren.^{10,122} Daher gelten GGHs als Präkanzerosen des hepatozellulären Karzinoms (HCC).^{9,10,122,213,214}

Unsere Untersuchungen zeigen, dass auch in unserem Modell allein durch HBV-Oberflächenproteine Typ II GGHs entstehen.¹¹ Chisari et al.¹⁸¹ haben ebenfalls gezeigt, dass HBs im ER zu teilweise verzweigten Fila zusammengesetzt wird und damit sowohl zu einer Hyperplasie des ER als auch zu einer lokalen Verteilung führt, da die Vernetzung die Exkretion verhindert.¹⁸¹

4.2.1 Die Bildung von GGHS ist Interferonabhängig

Interessanterweise ist in den IRF3/7 KO Mäusen eine vermehrte Bildung von GGHS und eine deutlichere Aggregatbildung der Oberflächenproteine gemeinsam mit Lipiden (LDs) zu sehen. In weiteren Untersuchungen der AG wurde gezeigt, dass HBs mit integralen Proteinen des ER kolokalisiert, was eine Akkumulation von HBs im ER nahelegt.¹¹ Dieser Effekt war in den BALB/c Mäusen schwächer ausgeprägt.¹¹ Ohne Interferonantwort werden folglich große Aggregate gebildet, da HBs und LDs im ER gebunden sind. Es scheint, als ob die Typ-I-Interferonantwort GGHS und damit Aspekte des histologischen Bildes der CHB verhindern könnte.

Diese Beziehung könnte Teil der Wirkung der Hepatitis B Therapie mit Interferonen erklären. Auch wenn PEGyliertes Interferon-alpha (INF α) in der therapeutischen Anwendung aufgrund seiner zahlreichen Nebenwirkungen zunehmend von Nukleosid- und Nukleotidanaloga verdrängt wird, zeigt die Wirksamkeit der Interferontherapie die Relevanz der Interferonantwort für die Heilung der CHB.⁴

Die klinische Erfahrung und Therapie passen damit zu den Beobachtungen im Mausmodell.

Interessanterweise ist der Stoffwechsel der LDs auch eng mit der Autophagie verwoben. So ist ATG9A essenziell für den Umbau von LD und Verteilung von Fettsäuren in der Zelle.⁵² Eine Störung der Autophagie könnte damit auch eine Störung des Fettsäurestoffwechsels nach sich ziehen. Darüber hinaus kann eine Überexpression von PLIN2 auch Autophagie hemmen.⁶⁵ Möglicherweise blockieren sich so Autophagie und Fettsäurestoffwechsel gegenseitig und begünstigen eine Akkumulation von Lipiden, HBs und weiterem Material, das nicht durch Autophagie abgebaut werden kann.

Unsere Experimente haben dabei gezeigt, dass die Bildung von GGHS interferonabhängig ist. Die Aggregate bestehen aus HBV-Oberflächenproteinen und LDs. Die interferonabhängige Bildung von Aggregaten gibt Hinweise auf die therapeutischen Wirkungen von Interferon.

4.3 Darstellung der Interferonantwort und des IRF3/7 KO

Zusammenfassend lag in den HBs-transgenen BALB/c Mäusen (IRF3/7 WT) eine deutliche Induktion von ISG15, OAS1A, Stat1 und Irf1 vor. In den IRF3/7 KO Mäusen waren diese Interferon-stimulierten Gene im Vergleich zum BALB/c Wildtyp herabreguliert, wobei insbesondere keine HBs-abhängige Induktion nachweisbar war.

4.3.1 HBs induziert ISG15 als Marker der Interferonantwort

ISG15 (Interferon-stimulated gene 15) hat sowohl extrazelluläre Funktionen als Zytokin²¹⁶ sowie intrazelluläre Funktionen mittels kovalenter Bindung an Proteine

(ISGylation).¹³⁶ Intrazellulär bindet ISG15, ähnlich wie Ubiquitin, als Marker an Proteine. Im Gegensatz zu Ubiquitin werden die Proteine nicht vermehrt durch das Proteasom abgebaut. Aber ISGylierte Proteine werden verstärkt lysosomal abgebaut, sodass eine extrazelluläre Sekretion der Proteine verhindert werden kann.¹³⁸ Dabei ist insbesondere IRF3 dafür bekannt, bei Infektionen ISG15 zu stimulieren.¹³⁶ Der IRF3/7 Knockout verhindert daher erfolgreich eine vermehrte Expression von ISG15. Ohne IRF3/7 Knockout liegt in den HBs-transgenen Mäusen eine deutliche Aktivierung von ISG15 vor. Prinzipiell ist auch eine interferonunabhängige verstärkte Expression von ISG15 zum Beispiel durch oxidativen Stress möglich.¹³⁶

In den 12 Wochen alten Mäusen treten schwache ISG15-Banden auch bei den IRF3/7 KO Mäusen auf, unabhängig vom HBs-Genotyp. Dies lässt eine zellstressabhängige Aktivierung von ISG15 im Alter vermuten.

4.3.2 HBs induziert OAS1A als Marker der Interferonantwort

OAS1A ist als Mitglied der interferoninduzierten Oligoadenylatsynthetase (OAS) eines der wichtigsten Proteine der antiviralen Immunabwehr. Dabei sind insbesondere die Unterformen OAS1A und OAS1G befähigt dsRNA zu binden, was zum Abbau der zellulären und viralen RNA führt und damit die virale Replikation hindert.¹⁴³ Darüber hinaus aktiviert OAS1A die RNase L, die auch bei DNA-Viren wie HBV die Replikation hemmen kann.²¹⁷ Aktuell geht man von einer interferonvermittelten Aktivierung von OAS1A via STAT1 und STAT2 aus, die durch einen Knockout des Interferonrezeptors der Typ I Antwort verhindert werden kann.^{144,218} Unter anderem ist eine Induktion von Autophagie durch die RNase L bekannt, die durch OAS1A aktiviert wird.²¹⁹

HBs induziert eine vermehrte Expression von OAS1A in BALB/c Mäusen als Marker der Interferonantwort und als Hinweis auf eine direkte antivirale Abwehrreaktion der Zellen.

Das Ausbleiben einer Reaktion bei den IRF3/7 KO Mäusen unterstreicht dabei die Aktivierung von OAS1A via Interferon. Die mRNA-Ergebnisse von *Stat1* belegen ebenfalls eine Aktivierung in den BALB/c TG Mäusen. In den IRF3/7 KO Mäusen ist *Stat1* im Vergleich zu den BALB/c Mäusen herabreguliert, zudem fehlt eine HBs-abhängige Induktion. Diese Befunde deuten darauf hin, dass Stat1, welches als zentraler Regulator auch OAS1A aktivieren kann, durch den IRF3/7 Knockout supprimiert wird und in den BALB/c TG Mäusen die Interferonantwort vermittelt.

4.3.3 HBs induziert IFIT1 als Marker der Interferonantwort

IFIT1 ist Teil der IFIT-Familie (interferon induced proteins with tetratricopeptide repeats). Diese hat beim Menschen vier und bei der Maus drei Mitglieder, die jeweils eine Ähnlichkeit von 50-60% besitzen. Klassisch wird IFIT1 durch Typ-I-Interferone wie IFN α oder IFN β via IRF3 induziert.¹³⁹ Das erklärt unter anderem die starke Herabregulation von IFIT1 im IRF3/7 KO. Darüber hinaus kann IFIT1 jedoch auch interferonunabhängig von Pattern Recognition Receptors (PRRs), Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs) und Lipopolysacchariden (LPS) aktiviert werden.¹³⁹ IFIT1 bindet unter anderem den eukaryotic initiation Factor 3 (eIF3) und behindert so die Translation viraler RNA, insbesondere weil IFIT1 auch virale RNA anhand der fehlenden O-Methylierung am 5' Ende (Capping) erkennt und bindet, wodurch diese nicht mehr translatiert wird.¹³⁹

Zudem ist eine positive Rückkopplung durch IFIT1 bekannt, indem es selbst IFN β stimuliert und so die Interferonantwort verstärkt.¹⁹⁸

In diesem Modell induziert HBs eine deutliche Aktivierung von IFIT1 in den BALB/c Mäusen als Ausdruck der Interferonantwort und der antiviralen Reaktion. Der IRF3/7 Knockout führt zu einer starken Herabregulation von IFIT1 und bestätigt damit den erfolgreichen Knockout. Zudem fällt die Interferonantwort in 12 Wochen alten Mäusen schwächer aus. Dies ist wahrscheinlich Ausdruck der beschriebenen altersbedingten Effekte des Mausmodells.

Zusammenfassend induziert HBs eine deutliche Interferonantwort in BALB/c Mäusen (IRF3/7 WT), nachweisbar anhand der Marker ISG15, OAS1A (vermittelt über Stat1) sowie IFIT1. Der IRF3/7 Knockout unterdrückt die Interferonantwort effektiv. Die IRF3/7 KO Mäuse weisen unabhängig von HBs keine Aktivierung der Interferon-vermittelten Signalwege auf.

4.4 Induktion von ER-Stress unabhängig vom IRF3/7 KO

Es wiesen alle HBs-transgenen Mäuse eine deutlich erhöhte Expression von ATF3 und CHOP auf mRNA- und Proteinebene auf. Dieser Effekt war unabhängig vom IRF3/7 Knockout.

4.4.1 HBs induziert ATF3 als Marker der UPR

ATF3 vermittelt zahlreiche Funktionen der Immunabwehr, des Zellstress, der Onkogenese, der Fibrose und der metabolischen Homöostase.^{164,165} Es wird in gesundem Gewebe nur niedrig oder kaum detektierbar exprimiert.¹⁶³ Durch diverse extrazelluläre und intrazelluläre Stimuli kann ATF3 induziert werden. Dazu zählen insbesondere der ER-Stress und die Unfolded Protein Response (UPR), aber auch Zytokine, Chemokine und LPS.^{164,220} Aus bereits publizierter Forschung der AG ist bekannt, dass in HBs-transgenen Mäusen auf BALB/c Hintergrund die UPR aktiviert

ist und dass diese Mäuse eine Fibrose der Leber entwickeln.^{8,13,180} Interessanterweise ist dabei nur der proapoptotische PERK-P-eIF2 α Pathway aktiviert. Die antiapoptotischen Pathways via ATF6 und IRE1 sind dabei nicht aktiv.^{8,180} Daher liegt eine Aktivierung von ATF3 via PERK-eIF2 α -ATF4-Pathway in unserem Modell nahe.⁸ Sowohl ATF3 als auch ATF4 können CHOP induzieren. In den vorliegenden Daten wurde eine Aktivierung von ATF3 und CHOP durch HBs auf mRNA- sowie auf Proteinebene nachgewiesen.

In methodisch hochwertigen Flux Assays haben Jiang et al.,¹⁶¹ entgegen diverser methodisch unterlegenen Studien, gezeigt, dass ER-Stress via IRE1 Autophagie hemmt und via PERK sowie downstream ATF4 Autophagie induziert. Da in unserem Mäusen lediglich der PERK Pathway aktiviert ist,⁸ könnte dies die beobachtete Induktion von Autophagie erklären. Da ATF4 jedoch nicht einzeln analysiert wurde, bleibt es Gegenstand zukünftiger Forschung, warum die beschriebene, ATF4 vermittelte verstärkte Transkription von LC3B¹⁶¹ in unserem Modell nicht beobachtet wird. ATF3 kann auch hepatische Sternzellen aktivieren und so zu einer Fibrose der Leber führen, die in vorherigen Untersuchungen nachgewiesen wurde.¹⁶⁵ Möglicherweise ist hier ATF3 der damals noch nicht untersuchte Marker, der die Fibrose induziert.

Interessanterweise scheint die Regulation von Autophagie durch ER-Stress von Typ-I-Interferonen abhängig zu sein. So beschreiben Sood et al.¹⁶⁹ eine Hemmung von Autophagie und antiviraler Zellantwort in der Abwesenheit von Typ-I-Interferon in diversen Säugetier-Zelllinien. Durch ATF3 wurden dabei mittels Blockade des Promotors das Ablesen der antiviralen Faktoren STAT1, IRF9 und ISG15 sowie das für die Initiation von Autophagie essentielle ATG5 verhindert.¹⁶⁹ Dies könnte einen zentralen Mechanismus für die eingeschränkte Autophagie-Induktion in den IRF3/7 KO TG Mäusen darstellen und die reduzierte LC3-Aktivierung in diesen Mäusen wesentlich mitbedingen. Die vorgelegten Daten weisen auf eine reduzierte Induktion von Autophagie in den IRF3/7 KO Mäusen hin.

Typ-I-Interferone sind grundsätzlich in der Lage, über STAT1 die Autophagie zu induzieren.^{160,221} Entsprechend wird in den BALB/c TG Mäusen eine Aktivierung von STAT1 detektiert, während diese in den IRF3/7 KO Mäusen ausbleibt. Der durch ATF3 vermittelte Mechanismus zur Hemmung von STAT1 in Abwesenheit von Interferon könnte diese fehlende Aktivierung zusätzlich auf transkriptioneller Ebene erklären.

Neuere Studien weisen nicht nur auf die Überlegenheit von dynamischen Flux Assays hin, sondern auch auf die Notwendigkeit der differenzierten Betrachtung der verschiedenen Formen der Autophagie.^{18,61} Über die oben beschriebenen Einflüsse

auf die Makroautophagie hinausgehend, spielt auch die ER-Phagie eine Rolle zur Beseitigung der Proteine, die den ER-Stress verursachen.¹⁶¹ Darüber hinaus ist beschrieben, dass PERK Chaperon vermittelte Autophagie via LAMP-2 induzieren.⁴² In einer explorativen Analyse (Abbildung 39) wurde in unserem Modell eine durch HBs vermittelte Induktion von LAMP-1 und LAMP-2 im Westernblot dargestellt, die unabhängig vom IRF3/7 KO auftritt. Diese Beobachtung könnte auf einen zusätzlichen Mechanismus hindeuten, über den HBs Autophagie beeinflusst. Damit ergibt sich ein potenziell vielversprechender Ansatz für künftige Untersuchungen.

4.4.2 HBs induziert CHOP als Marker der der UPR

CHOP (DDIT3) ist ein zellulärer Stresssensor.¹⁵⁵ CHOP wird physiologisch nur in geringen Mengen produziert und kann durch ER-Stress und folgende UPR, Hungerstoffwechsel (Starvation), DNA-Schäden oder Hypoxie induziert werden.¹⁵⁵ Bei chronischem Zellstress ist der PERK Pathway der wichtigste Aktivator von CHOP. Dabei wirkt CHOP in Zusammenspiel mit weiteren Faktoren pro-apoptotisch. Die Apoptose kann CHOP über mitochondriale Pathways, der Caspase 8, den P-Akt Pathway oder Hemmung des antiapoptotischen BCL2 induzieren.¹⁵⁵ Über die Induktion der Apoptose scheint CHOP in diversen Geweben, u. a. der Leber, anti-onkogen zu wirken.¹⁵⁵ Darüber hinaus werden jedoch auch zunehmend weitere Funktionen bekannt. So vermittelt CHOP die Apoptose von β -Zellen im Pankreas und fördert so den Zelluntergang, sodass ein Prädiabetes in einen manifesten Diabetes mellitus übergeht.²²² CHOP ist zudem an neurodegenerativen Prozessen beteiligt und trägt wesentlich zum Untergang von Neuronen in verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen bei.²²³

Interessanterweise konnten Tamaki et al.²²⁴ in einer Studie mit experimenteller Cholestase zeigen, dass diese via CHOP zu einer Aktivierung der hepatischen Sternzellen und damit der Leberfibrose führt, welche auch in unseren Mäusen zu beobachten ist.²²⁴

Wie Chir et al.¹⁰⁰ zeigen konnten, bindet CHOP sowohl allein als auch im Dimer mit ATF4 an diverse Promotoren.¹⁰⁰ So bindet CHOP z. B. an die Atg Promotoren 10 und 5 sowie Gabarap. Alle sind an die Induktion und Elongation von Autophagosomen beteiligt. ATG5 ist essenziell für die Umwandlung von LC3-I in seine aktive Form LC3-II.

Der deutliche Anstieg von CHOP sowie die Aktivierung der PERK Signalkaskade in unseren transgenen Mäusen passt daher zu der Induktion von Autophagie in TG Mäusen.

Die durch HBs vermittelte Aktivierung von ATF3 und CHOP erfolgt unabhängig vom IRF3/7 Knockout und stellt einen Hinweis auf eine ausgeprägte ER-Stress-Antwort mit UPR dar. ATF3 ist in der Lage, sowohl die nachgewiesene Fibrose als auch eine interferonabhängige Autophagieinduktion zu vermitteln. Zudem kann CHOP über verschiedene Signalwege die Autophagie induzieren.

4.5 p62 – Bestimmung des Abbaus

p62 als Marker für Autophagie unterlag in diesem Modell keiner Regulation auf transkriptioneller Ebene. Die beobachteten Unterschiede betrafen ausschließlich die Proteinebene. In den HBs-transgenen Mäusen akkumulierten p62 und phosphoryliertes p62 (P-p62), was auf eine gestörte Autophagie und einen blockierten Autophagie-Flux hinwies.

Da p62 [Sqstm1/Sequestosome 1] als Autophagie-Rezeptor selbst mit abgebaut wird, gestaltet sich die Interpretation komplexer.^{18,41,44,66,67,225,226} Ubiquitin dient als primärer Marker für den Abbau. Dabei entscheidet das Muster der (Poly-) Ubiquitinierung über den Abbau primär über das Proteasom oder Autophagie.^{39,227}

Die Phosphorylierung von p62 an Ser403/407 (P-p62) erhöht die Affinität für ubiquitinierte Proteine, die über die Ubiquitin-assoziierten Areale (UBA) von p62 gebunden werden. P-p62 fungiert damit als sekundärer Marker der den Abbau via Autophagie anzeigt.⁷⁷ So markierte Proteine werden dann über die LC3-II bindende Domäne von p62 an die Innenseite der sich bildenden Autophagosomen gebunden.⁷⁷

Dabei hat p62 auch weitere Funktionen, welche teils abhängig von der Phosphorylierung sind. So führt die Phosphorylierung an Ser403 und 407 durch ULK1 [Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1] zu einem Abbau der markierten Proteine via Autophagie.²²⁸ Eine Phosphorylierung von p62 an Ser351 durch verschiedene Stressoren oder an Ser349 durch mTORC1 ermöglicht die Bindung an Keap1 und aktiviert dadurch den Nrf2-Signalweg. Das führt zur vermehrten Expression antioxidativer Faktoren wie NAD(P)H sowie zur verstärkten Translation von p62.^{77,228} Im Einklang mit weiteren Studien zu HBV bleibt diese Regulation der Translation in unserem Modell aus.⁹⁰

Mit Blick auf die Autophagie wurde in den Westernblots die Phosphorylierung von p62 an Ser403 untersucht. Dabei lässt sich eine deutliche Akkumulation durch HBs sowohl von p62 als auch von phosphoryliertem p62 (P-p62) nachweisen.

Eine Akkumulation kann dabei eine vermehrte Bildung oder einen verminderten Abbau von p62 bedeuten.^{41,44,67} Da auf transkriptioneller Ebene in diesem Modell keine Regulation von p62 nachweisbar ist, deuten die Unterschiede der Proteinmenge auf einen veränderten Flux hin. Diese Beobachtung entspricht auch den Ergebnissen anderer Studien zu HBV in Leberzellkultur.⁹⁰

Die Menge an p62 korreliert invers mit dem Flux, der Abbaurate.^{18,44,61,67} Eine Akkumulation von p62 zeigt daher einen gestörten Abbau. Dabei ist P-p62 Ser403 besonders spezifisch für selektive Autophagie.²²⁸

Dieser Effekt ist in unseren Mäusen abhängig von HBs, jedoch unabhängig vom IRF3/7 Status. Dies legt nahe, dass die Blockade des Flux interferonunabhängig ist. Da ein leichter Trend zur geringeren p62 Akkumulation in IRF3/7 KO TG Mäusen besteht, kann eine geringere Hemmung des Flux in IRF3/7 KO Mäusen nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Dennoch haben auch andere Arbeitsgruppen eine Blockade von Autophagie im Zusammenhang mit HBV gefunden,^{90,202} unter anderem auch in humanen Lebern bei chronischer HBV-Infektion.²²⁹ Interessanterweise konnte dabei gezeigt werden, dass HBV die Autophagosomenmembran zum Envelopment nutzt.⁹⁰ Daher ist es im Interesse des Virus, den Flux zu hemmen, um Autophagosomen zu akkumulieren und gleichzeitig den eigenen Abbau zu verhindern. Dies legt nahe, dass HBV einen der späten Schritte der Autophagie, wie die Fusion der Autophagosomen mit den Lysosomen, verhindern kann. Das ist zum Beispiel für Parainfluenzaviren nachgewiesen, welche die Bindung der SNARE-Proteine unterbinden.²³⁰ Aber auch für HBV ist bekannt, dass HBx die Ansäuerung der Lysosomen verhindern kann und so den Abbau des Inhalts verhindert.⁸⁷

Da unser Mausmodell keine HBx-Protein exprimiert, liegt es jedoch nahe, dass auch die Oberflächenproteine allein den Flux inhibieren können.⁶ Es stellt die Erstbeschreibung der Inhibition des Flux durch HBs-Überexpression dar. Das ist besonders interessant, weil blockierte Autophagie eine wichtige Rolle im Fortbestand einer HBV-Infektion spielt.^{11,229} Da HBV Autophagosomen als Quelle für die Virushülle nutzt, nimmt die Autophagie eine zentrale Rolle im Replikationszyklus des Virus ein.⁹⁰ Für eine Hemmung des lysosomalen Abbaus spricht auch die Akkumulation von LAMP1/2 (Abbildung 39), welche später diskutiert wird.

Zusammenfassend deuten die Daten darauf hin, dass HBs unabhängig von der Interferonantwort den autophagischen Flux hemmt. Dies ist die erste Beschreibung der Hemmung des Flux durch HBs Überexpression.

4.6 LC3B – Bildung der Autophagosomen

Im Mausmodell akkumulierte der Marker LC3-II als Hinweis auf eine vermehrte Autophagosomenbildung. Die p62-Akkumulation in den transgenen Mäusen im Vergleich zum Wildtyp deutete auf eine Hemmung des Autophagie-Flux hin. In den HBs-transgenen IRF3/7 KO Mäusen lag eine deutlich geringere Akkumulation von LC3-II vor als in den BALB/c TG Mäusen, begleitet von einer reduzierten

Umwandlung von LC3-I zu LC3-II. Dies bedeutete, dass weniger Autophagosomen in IRF3/7 KO TG Mäusen akkumulieren als in BALB/c TG.

LC3B (Microtubule Associated Protein 1 Light Chain 3 Beta) ist der meistgenutzte Marker für Autophagosomen.⁶¹ Dabei wird die inaktive zytoplasmatische Form LC3-I über Konjugation mit einem Phosphatidylethanolaminrest in LC3-II umgewandelt, das auf der Autophagosomenmembran p62 bindet.^{77,228,231} Die Menge an LC3-II korreliert gut mit der Menge vorhandener Autophagosomen.^{61,67,104}

Da LC3-II im Verlauf der Autophagie im Inneren der Lysosomen abgebaut wird, führt eine Induktion von Autophagie bei intaktem Flux zu einer Reduktion von LC3-II. Im Ruhezustand liegt der Großteil von LC3 in Form von LC3-I als zytosolische Reserve vor. Eine Akkumulation von LC3-II weist auf eine Anreicherung von Autophagosomen hin. Dies kann sowohl auf eine gesteigerte Bildung von Autophagosomen und eine vermehrte Umwandlung von LC3-I zu LC3-II hindeuten, als auch auf einen gestörten lysosomalen Abbau (gestörter Flux). Bei gestörtem Flux verbleiben die Autophagosomen in der Zelle (LC3-II akkumuliert). Kommt es gleichzeitig zur weiteren Induktion von Autophagie, steigt die Menge an Autophagosomen und damit auch an LC3-II zusätzlich an.

Durch die Akkumulation von p62 als Marker für gestörten Autophagie-Flux liegt in beiden HBs-transgenen Mauslinien eine vergleichbare Beeinträchtigung des autophagischen Abbaus vor. Dies führt konsekutiv zur Ansammlung von Autophagosomen. Um zu unterscheiden, ob es sich lediglich um eine Abbaustörung oder gar eine Induktion handelt, wurde zudem die LC3-II/LC3-I Ratio untersucht. Bei einer Induktion von Autophagie wird vermehrt LC3-I zu LC3-II umgewandelt, sodass der Anteil von LC3-II ansteigt. In unserem Modell akkumulieren Autophagosomen (LC3-II) abhängig von HBs, wobei in BALB/c Mäusen mit intakter Interferonantwort höhere Mengen an LC3-II vorliegen als in IRF3/7 KO Mäusen. Dies spricht für eine interferonabhängige Stimulation der Autophagie zusätzlich zur HBs-abhängigen Hemmung des autophagischen Flux.

Basierend auf unseren Ergebnissen wäre es interessant, die Mäuse gezielt mit einem Autophagie-Induktor wie Rapamycin oder einem PI3K-Inhibitor wie Wortmannin zu behandeln. So könnte Autophagie gezielt an- oder abgeschaltet werden, um den dynamischen Mechanismus präziser zu analysieren. Insbesondere könnte so bestätigt werden, dass die geringere LC3-II-Akkumulation in den IRF3/7 KO Mäusen auf einer reduzierten Autophagie-Induktion beruht und nicht durch eine geringere Hemmung des Flux verursacht ist. Da es sich um eine Post-mortem-Analyse handelt, waren pharmakologische Testungen nicht möglich. In Zukunft wäre daher eine Behandlung oder Kreuzung mit ATG5-Knockout-Mäusen, die keine

Autophagie-Nukleation durchführen können, ein sinnvoller Ansatz zur Vertiefung der Erkenntnisse.

Die HBs-transgenen Mäuse akkumulieren Autophagosomen (LC3-II). Dabei weisen die BALB/c Mäuse eine stärkere Akkumulation auf als die IRF3/7 KO Mäuse. Das spricht für eine interferonabhängige Induktion der Autophagie bei gleichzeitig durch HBs bedingter Hemmung des Autophagie-Flux (siehe p62).

4.7 Dysregulation der Autophagie in unserem Modell

Zusammenfassend deuteten die Daten darauf hin, dass Autophagie über mTORC1 in IRF3/7 KO Mäusen unabhängig von HBs gehemmt wurde.

Die lysosomalen Marker LAMP-1 und LAMP-2 akkumulierten in HBs-transgenen Mäusen unabhängig vom IRF3/7 KO. Die Regulation von Beclin-1 erfolgte in diesem Modell unabhängig von HBs und dem IRF3/7 Knockout.

Die Immunpräzipitation lieferte Hinweise darauf, dass p62 in hohem Maße Ubiquitin gebunden hat. Im Vergleich dazu weist LHB anscheinend nur eine schwache Assoziation mit Ubiquitin auf.

4.7.1 Regulation von mTORC1

mTORC1 ist einer der wichtigsten Regulatoren der Initiation der Autophagie.^{19,20} Wenn mTORC1 aktiv ist, wird unter anderem die Initiation von Autophagie gehemmt.¹⁹ Downstream von mTORC1 liegen P70 und S6. In den IRF3/7 KO Mäusen finden sich deutlich höhere Mengen an aktiviertem P-p70 und P-S6K im Vergleich zu BALB/c Mäusen, unabhängig von HBs. Dies legt eine Hemmung von Autophagie durch mTORC1 in den IRF3/7 KO Mäusen nahe. Bei P-P70 ist die dunkelste Bande sogar bei dem IRF3/7 KO WT. Sollte sich dies in weiteren Untersuchungen bestätigen, könnte es sogar ein Hinweis sein, dass durch den IRF3/7 KO auch ohne HBs eine Hemmung von Autophagie durch mTORC1 vorliegt. Um das sicher sagen zu können, bräuchte es jedoch weitere Analysen des mTORC1 Pathways, idealerweise auch in Zellkultur oder in vivo, und mit Behandlung mittels Rapamycin.

4.7.2 LAMP-1/2 zeigen Akkumulation von Autophagosomen

LAMP-1 und LAMP-2 geben als Marker Hinweise auf die Menge an Lysosomen.²⁰⁶ Gerade LAMP-2 hat eine wichtige Rolle in der Chaperon-vermittelten Autophagie (CMA).^{42,232} LAMP-1 und LAMP-2 akkumulieren in den HBs-transgenen Mäusen unabhängig von IRF3/7 KO. Das bedeutet auch eine Akkumulation von Lysosomen. Dies legt nahe, dass die Autophagie an einem der späten Schritte, wie der Ansäuerung der Lysosomen, gestört ist. Wäre beispielsweise ausschließlich die Fusion der Autophagosomen mit den Lysosomen gestört, wäre ein normaler Abbau von LAMP zu erwarten. Eine Hemmung des Abbaus im Lysosom hat den Vorteil für

HBV, dass nicht nur die Makroautophagie via Autophagosomen, sondern auch die Chaperon-vermittelten-Autophagie gehemmt wird, bei der die Proteine direkt ins Lysosom gelangen. So wird der gesamte lysosomale Abbau gehemmt. Dies zeigt, dass durch HBs nicht nur der Abbau des Virus gehemmt, sondern der gesamte lysosomale Abbau blockiert wird. Wahrscheinlich akkumulieren so auch diverse, z. T. toxische Stoffwechsel-produkte, die dem Zellstoffwechsel schaden und die Pathologie des HBV verstärken könnten.

4.7.3 Regulation von Beclin-1

Für die Elongation der Autophagosomenmembran ist der PI3K-Komplex entscheidend, der insbesondere durch Beclin-1 reguliert wird.²⁰ Verschiedene Viren wie HBV und HCV führen zu einer Überexpression von Beclin-1 und folglich vermehrter Autophagosomenbildung.⁸⁹ Auch HBx des HBV kann zu einer Überexpression von Beclin-1 führen.⁹⁷ Jedoch ist kein HBx in unserem Modell als Protein vorhanden. Dass Beclin-1 in allen Mäusen unabhängig von IRF3/7 KO und HBs gleichermaßen vorhanden ist, unterstreicht dies ebenfalls. Daher liegt nahe, dass im Modell der HBs-Überexpression keine Regulation via Beclin-1 vorliegt.

4.7.4 Ubiquitinierung von Proteinen

Die Markierung mit Ubiquitin ist der erste Schritt zum Abbau von intrazellulärem Material. Daher wurde die Ubiquitinierung näher betrachtet. Mit der Immunpräzipitation konnte beobachtet werden, welche Proteine an Ubiquitin gebunden sind. Unabhängig von Genotyp oder HBs liegt p62 vollständig an Ubiquitin gebunden vor. Interessant ist dabei, dass auch im WT das gesamte p62 an Ubiquitin gebunden ist, was nahelegt, dass es praktisch kein ungebundenes p62 intrazellulär gibt. Möglicherweise bindet das p62 jedoch auch erst während der IP an die ubiquitinierten Proteine, die auf der Säule gebunden werden, und erscheint deswegen nicht im Durchfluss. In jedem Falle liegt eine hochaffine Bindung zwischen p62 und Ubiquitin vor.

Die HBs-Proteine liegen überwiegend im Durchfluss als nicht an Ubiquitin gebundene Proteine vor. Da der Lysepuffer der Immunpräzipitation (IP) ein schwaches Detergens enthält, um die Bindung zwischen Ubiquitin und assoziierten Proteinen nicht zu stören, werden insbesondere größere Proteinaggregate nur unzureichend gelöst. Dies könnte erklären, weshalb HBs sich fast ausschließlich auf der Seite des Durchflusses befindet. Vielleicht verhindert die Aggregatbildung jedoch auch eine adäquate Ubiquitinierung. Das verwendete IP-Kit bindet primär polyubiquitinierte Proteine. Wenn Proteine unzureichend ubiquitiniert sind, werden

sie schwächer an die IP-Säulen gebunden und erscheinen daher eher im Durchfluss.

Dennoch weist Abbildung 40: B darauf hin, dass der Großteil des Ubiquitins erfolgreich über die IP gebunden wird. Auffällig ist jedoch, dass unter den ubiquitinierten Proteinen vor allem solche mit einer Größe von 50–70 kDa präzipitiert werden, während kleinere Proteine wie SHB kaum nachweisbar sind. Möglicherweise werden in unserem Modell kleine Proteine nicht ausreichend polyubiquitiniert oder gehen im Rahmen der Waschvorgänge der IP verloren.

Zusammenfassend ist HBs vermutlich nur in geringem Maße ubiquitiniert. Eine fehlende Markierung zum Abbau begünstigt einen Verbleib in der Zelle und eine spätere Aggregatbildung.

Die Daten deuten darauf hin, dass der IRF3/7 KO mit einer Hemmung der Autophagie über den mTORC1-Pathway einhergeht, und zwar unabhängig von HBs. Zusätzlich erfolgt vermutlich eine Blockade der Autophagie und des Abbaus in einem lysosomalen Schritt durch HBs. Eine Regulation durch Beclin-1 liegt wahrscheinlich nicht vor. p62 liegt unabhängig von Genotyp und HBs an Ubiquitin gebunden vor. HBs selbst wird vermutlich nur in geringem Maße ubiquitiniert.

4.8 BALB/c vs. C57BL/6 – Abhängigkeit der Immunantwort vom Genotyp

In C57BL/6 Mäusen war keine Interferonantwort oder CHOP-Expression als Reaktion auf HBs vorhanden. Das histologische Bild der C57BL/6 Mäuse war vergleichbar mit der Pathologie der IRF3/7 KO Mäuse mit GGhs und PLIN2 Aggregaten.

In den BALB/c TG Mäusen lag eine schwache Induktion der Autophagie sowie eine Hemmung des Autophagie-Flux vor, die in den C57BL/6 Mäusen nicht vorhanden war.

Obwohl die Signalkaskaden für den ER-Stress, für UPR und die Interferonantwort prinzipiell intakt sind, entwickeln die C57BL/6 Mäuse kaum eine inflammatorische Reaktion, jedoch eine deutliche Aggregatbildung. Zudem bleibt in C57BL/6 Mäusen, ähnlich wie in den IRF3/7 KO Mäusen, eine Interferonantwort aus. Auch wenn CHOP als ER-Stress-Marker nicht erhöht war, ist aus weiteren Untersuchungen bekannt, dass der PERK-Pathway des UPR auch in den C57BL/6 Mäusen aktiviert ist.^{8,233}

Auch im In-vivo-Modell der Phyllis Linton Group treten deutliche Unterschiede in der Autophagie in Abhängigkeit vom Mausstamm auf.¹⁸ Dabei wurden in den BALB/c Mäusen ebenfalls ein Anstieg von p62 sowie eine Inhibition des Flux beobachtet. Ebenso findet sich in BALB/c Mäusen eine stärkere Aktivierung der frühen Autophagieschritte.

Auch Martyniszyn et al.²³⁴ haben im In-vivo-Mausmodell mit Pockenviren beobachtet, dass die BALB/c Mäuse stärker Autophagie induzieren als die C57BL/6 Mäuse. Interessanterweise weisen die BALB/c Mäuse trotz intensiverer Autophagieinduktion ein schlechteres Überleben auf. Dabei bleibt unklar, ob die Autophagie selbst ursächlich zum schlechteren Outcome beiträgt oder als Reaktion auf eine stärkere Gewebsschädigung sekundär induziert wird.

Pinheiro et al.⁹⁹ haben ein ähnliches Verhalten mit *Leishmania amazonensis* beobachtet. Auch in ihrer Studie weisen die BALB/c Mäuse eine stärkere Autophagieinduktion bei gleichzeitig gestörtem Flux auf. *Leishmania amazonensis* ist dafür bekannt, auch in Autophagosomen zu reproduzieren. Eine Induktion von Autophagie durch IFN- γ oder Nahrungsdeprivation führte zu einer erhöhten intrazellulären parasitären Last. Auch eine Fusion der Autophagosomen mit Lysosomen bleibt aus.

Diese Studien legen nahe, dass in BALB/c Mäusen die Th2-dominante Immunantwort eher von Pathogenen zur besseren Replikation des Pathogens an den Autophagosomen missbraucht werden können. Daraus ergibt sich das

kontraintuitive Bild, dass die BALB/c Mäuse trotz stärkerer Autophagieinduktion meist schwerer erkranken. Vermutlich liegt dies daran, dass die Autophagie zwar aktiviert wird, aber der notwendige Abbau aufgrund des gehemmten Flux ausbleibt. Dadurch können Pathogene und schädliche Proteine trotz der Autophagieinduktion nicht entfernt werden, was möglicherweise zur Krankheitsverschlechterung beiträgt. Auch in unseren Studien weisen die BALB/c Mäuse eine ausgeprägtere Leberfibrose und vermehrte Onkogenese in Form von HCCs auf.⁸

Die C57BL/6 Mäuse weisen im Gegensatz zu den BALB/c Mäusen keine Akkumulation von p62 auf, was auf einen zumindest teilweise funktionierenden Abbau hindeutet. Dennoch bleiben Aggregate bestehen, und es finden sich GGHS als Hinweis auf einen weiterhin gestörten Abbau. Die Hemmung der Autophagie durch HBs und die interferonabhängige Induktion von Autophagie hängen vom genetischen Hintergrund der Mäuse ab. Für die Bildung der GGHS ist vermutlich das Ausbleiben einer Interferonantwort primär verantwortlich.

Die C57BL/6 Mäuse reagieren auf HBs ähnlich wie die IRF3/7 KO Mäuse, ohne Interferonantwort und mit ausgeprägter Aggregatbildung. Die Interferonantwort und die Regulation der Autophagie in Reaktion auf HBs hängen dabei vom genetischen Hintergrund ab. Bei fehlender Interferonantwort treten vermehrt Milchglashepatozyten auf.

5 Zusammenfassung (deutsch)

Autophagie ist ein zentraler kataboler Stoffwechselweg, der den Abbau von intrazellulären Komponenten wie Proteinaggregaten und Organellen vermittelt. Intrazelluläre Erreger haben Mechanismen entwickelt, um dem Abbau durch Autophagie zu entgehen. Das Hepatitis-B-Virus (HBV) nutzt solche Schutzmechanismen und rekrutiert Autophagosomen zur Bildung seiner Virushülle.

Bei chronischer Hepatitis-B-Infektion (CHB), die durch eine unzureichende Immunantwort gekennzeichnet ist, bilden sich in infizierten Hepatozyten Aggregate aus Lipiden und HBV-Oberflächenproteinen (HBsAg), bekannt als Milchglashepatozyten (GGHs). Sie sind ein typisches histologisches Merkmal der CHB.

Ziel dieser Studie ist es, Zusammensetzung und Entstehung von GGHs und die Auswirkungen von HBV auf Autophagie zu analysieren. Untersucht wurden der Einfluss der antiviralen Interferonantwort, die ER-Stress-Reaktion mit nachfolgender Unfolded Protein Response (UPR) sowie der Einfluss des genetischen Hintergrundes der Mäuse (BALB/c vs. C57BL/6). Grundlage dazu bildete das von Chisari et al. etablierte In-vivo-HBsAg-Überexpressionsmodell. Die transgenen Mäuse exprimierten die HBV-Oberflächenproteine SHBs, MHBs und LHBs in der Leber.

Zur Untersuchung der Typ-I-Interferonantwort diente der IRF3/7 Knockout (KO). Genetische Einflüsse wurden anhand von BALB/c- und C57BL/6-Mäusen geprüft. HBs führte unabhängig von Mausstamm und IRF3/7 KO zu ER-Stress und der UPR, welche Autophagie induzieren kann. Der Knockout von IRF3/7 blockiert erfolgreich die Typ-I-Interferonantwort. Allerdings induzierte HBs nur in BALB/c Mäusen eine Interferonantwort, die Autophagie initiieren kann. In IRF3/7 KO und C57BL/6 Mäusen blieben diese Reaktionen aus, verbunden mit massiver Aggregatbildung und GGH Entstehung.

HBs hemmt in Mäusen auf BALB/c Hintergrund (BALB/c und IRF3/7 KO) den Abbau durch Blockade später Stadien von Autophagie (gestörter Flux). Dies verhindert den Abbau von HBV durch Autophagie und lässt Autophagosomen akkumulieren, die HBV zur Behüllung benötigt. Ebenfalls akkumulierten durch HBs auch Lysosomen, in denen der Abbau stattfinden würde.

Dabei akkumulierten durch HBs mehr Autophagosomen in BALB/c TG als in IRF3/7 KO TG Mäusen. Das legt eine zusätzliche Induktion von Autophagie durch die Interferonantwort in BALB/c nahe. Bei intakter Interferonantwort wird die Aggregatbildung und Bildung von GGHs verhindert. Möglicherweise entsteht dieser Effekt durch eine interferonabhängige Regulation von mTORC1, einem Schlüsselregulator der Autophagieinitiation.

Unsere Ergebnisse liefern neue Einblicke in die Interaktion zwischen HBV, Autophagie und der antiviralen Immunantwort und tragen zum Verständnis der Pathogenese der CHB bei.

6 Summary (English)

Autophagy is a central catabolic metabolic pathway that mediates the degradation of intracellular components such as protein aggregates and organelles. Intracellular pathogens have developed mechanisms to evade degradation through autophagy. Hepatitis-B-Virus (HBV) utilizes such protective mechanisms and recruits autophagosomes for the formation of its viral envelope.

In chronic hepatitis B infection (CHB), characterized by an insufficient immune response, aggregates of lipids and HBV surface proteins (HBsAg) form in infected hepatocytes, known as Ground Glass Hepatocytes (GGHs). These are typical histological features of CHB.

The aim of this study was to better understand the composition and formation of GGHs. We investigated the influence of the antiviral interferon response, the endoplasmic reticulum (ER) stress response, and genetic factors of the mouse strain. For this purpose, we conducted an in-vivo analysis of a HBsAg overexpression model. The transgenic mice expressed the HBV surface proteins SHBs, MHBs, and LHBs in the liver. To analyze the influence of the interferon response, an IRF3/7 knockout (KO) was used to suppress the type I interferon signaling cascade. Genetic factors were evaluated by comparing BALB/c and C57BL/6 mice.

We demonstrated that HBsAg induces ER-stress, which can trigger autophagy, independently of mouse strain and interferon response. Additionally, we confirmed the successful knockout of the interferon response through IRF3/7 KO. However, HBsAg does not activate the interferon response in IRF3/7 KO or C57BL/6 mice, which could otherwise stimulate autophagy induction. In absence of the interferon response, we observed pronounced aggregate formation with the development of Ground Glass Hepatocytes.

In all BALB/c mice, HBsAg inhibits degradation through autophagy (impaired flux). This prevents the degradation of HBV via autophagy. Lysosomes, where autophagic degradation occurs, also accumulate.

Furthermore, we observed that the interferon response induces autophagy by stimulating its early stages. With an intact interferon response, aggregate formation, and the development of GGHs are prevented. This effect may be mediated by interferon-dependent regulation of mTORC1, a key regulator of autophagy initiation. Our findings provide new insights into the complex interaction between HBV, autophagy, and the antiviral immune response, contributing to a better understanding of the pathogenesis of chronic hepatitis B.

7 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung:	Beschreibung:	Entrez ID:
°C	Grad Celsius	
3-MA	3-Methyladenin	
A.	Arterie, lat. Arteria, Plural: Aa.: Arteriae	
ADP	Adenosindiphosphat	
Ag	Antigen	
AHB	akute Hepatitis-B-Virus Infektion	
Ak	Antikörper	
AL	Autolysosom, Mischvesikel aus Autophagosom und Lysosom	
ALS	amyotrophe Lateralsklerose	
AMP	Adenosinmonophosphat auch Adenylat	
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase	
AP	Autophagosom, Vesikel der Autophagie	
AP	Alkalische Phosphatase Reaktion zur Entwicklung von Westernblots	
APS	Ammoniumpersulfat	
AS	Aminosäuren	
ATF3	Activating transcription factor 3	
ATF4	Activating transcription factor 4	
ATF6	Activating transcription factor 6	
ATG10	Autophagy-related protein 10	83734
ATG101	C12orf44, Autophagy-related protein 101; Teil des ULK-Komplex	60673
ATG12	Autophagy-related protein 12	9140
ATG13	Autophagy-related protein 13; Teil des ULK-Komplex	9776
ATG14	Autophagy-related protein 14	22863
ATG16L1	Autophagy-related protein 16 like 1	55054
ATG3	Autophagy-related protein 3	64422
ATG4	Autophagy-related protein 4	23192
ATG5	Autophagy-related protein 9	79065
ATG7	Autophagy-related protein 7	10533
ATG8	Autophagy-related protein 8	852200
ATG9	Autophagy-related protein 9	
ATG-Gene	AuTophagy-related-Gene	
ATP	Adenosintriphosphat	
ATPase	Adenosintriphosphatase, spaltet ATP in ADP und Phosphat (P)	
BALB/c	Mäuse des BALB/c Stammes	
BCIP	5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate ptoluidine Salt	
Bcl-2	B-cell lymphoma 2; BCL2 apoptosis regulator	596
BECN1	Beclin-1; Coiled-coil myosin-like BCL2-interacting protein	8678
BiP	Binding immunoglobulin protein; auch HSPA5, GRP78	
C57BL/6	Mäuse des C57BL/6 Stammes	
ca.	circa, ungefähr, etwa	
cAMP	cyclic adenosine monophosphate	

cccDNA	covalently closed circular DNA	
CD4	cluster of differentiation 4	
cDNA	complementary DNA	
cGAS	Cyclic GMP-AMP synthase, zytosolischer DNA Sensor	115004
CHB	chronische Hepatitis-B-Virus Infektion	
CMA	Chaperone-mediated autophagy, Chaperon-vermittelte Autophagie	
CO2	Kohlendioxid	
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol - Fluoreszenzfarbstoff zur Anfärbung von DNA und damit Zellkernen	
dest.	destilliert	
DNA	Desoxyribonukleinsäure (DNS), deoxyribonucleic acid (DNA)	
DR5	Death-Receptor 5	
dsRNA	Doppelstrang-RNA, double-stranded RNA	
E1/E2/E3	Ubiquitinligasen, welche die 3 Schritte der Ubiquitinierung katalysieren.	
eIF2α	Eukaryotic Initiation Factor 2 α	
EM	Elektronenmikroskopie	
ESCRT	endosomal sorting complexes required for transport	
et al.	et alii: und andere	
Flux	Abbaurate der Autophagie, Eine Erhöhung des Flux bedeutet, dass mehr durch Autophagie abgebaut wird.	
FOXO	Forkhead-Box-Protein O, Familie mit mehreren nummerierten Proteinen	
GABAAR	GABA (A) Rezeptor	
GABARAP	GABAAR-assoziertes-Protein, humanes ATG8 homolog, mit den Isoformen: GABARAP, GABARAPL1 und GABARAPL2	
GFP	grün fluoreszierende Protein; green fluorescent protein; UniProt: P42212	
GGHs	Ground Glass Hepatocytes - Milchglashepatozyten	
H+	Nukleus des Wasserstoffatoms (H) ohne Elektron, daher ein Proton	
HBcAg	C (core, Kern) Antigen des HBV	
HBsAg	E Antigen des HBV, exkretorisch	
HBs	HBV-Oberflächenproteine bestehend aus SHB/MHB/LHB	
HBsAg	Antigen der HBV-Oberflächenproteine bestehend aus SHB/MHB/LHB	
HBV	Hepatitis-B-Virus	
HBx	X Protein des HBV	
HCC	Leberzellkarzinom, Hepatocelluläres Carcinom	
HCV	Hepatitis C Virus	
HE	Hämatoxylin-Eosin-(Färbung)	
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus	
HRP	Horseradish Peroxidase zur Entwicklung von Westernblots auf fotografischem Film.	
Hsp70	heat shock proteins 70kDa, HSPA1A	3303
HSV-1	Herpes-simplex-Virus-1	
IF	Immunofluoreszenz, histologische Methode	
IFI6	Interferon alpha-inducible protein 6	
IFIT1	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	3434
IFN	Interferon	

IFNAR1/2	interferon alpha and beta receptor subunit 1/2	3454; 3455
IHC	Immunhistochemie	
IM/PH	Isolationsmembran/Phagophore der frühen Autophagie	
IRE1α	inositol-requiring enzyme 1 α	
IRF3/7	Interferon regulatory factor 3 und 7	
IRF9	Interferon regulatory factor 9	10379
ISG15	Interferon-stimulated gene 15	9636
ISGs	Interferon stimulierte Gene	
ISRE	IFN-stimulated response element	
IU	Internationale Einheit, international unit	
JAK	Januskinasen	
JAK1	Januskinase 1	3716
kDa	Kilodalton, Masseinheit	
KEAP1	Kelch-like ECH-associated protein 1	9817
KO	Knockout, hier: Mäuse, die einen IRF3/7 Knockout tragen	
LAMP-1	lysosome-associated membrane protein type 1	
LAMP-2A	lysosome-associated membrane protein type 2A	3920
LC3	MAP1LC3: ATG8 Homolog, Bindet z. B. p62 an Autophagosomen, beinhaltet mehrere Isoformen	
LC3A	Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3A; MAP1LC3A;	84557
LC3B	Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B; MAP1LC3B;	81631
LC3C	Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3C; MAP1LC3C;	440738
LC3-I	aktivierte Form von LC3	
LC3-II	aktivierte, membranständige Form von LC3 der Autophagosomenmembran	
LD	Lipid droplets	
LHB	L (large) Protein von HBsAg des HBV	
LIR	LC3-interagierende Region des p62 Proteins	
LPS	Lipopolysaccharid	
MAPK	MAP (mitogen-activated protein) Kinase	
MASH	Metabolische Dysfunktion-assozierte Steatohepatitis (ehemals NASH)	
MASLD	Metabolische Dysfunktion-assozierte steatotische Lebererkrankung (ehemals NAFLD)	
MAVS	Mitochondrial antiviral signalling protein	57506
MDA5	melanoma differentiation-associated protein 5, ein RIG-I-like Rezeptor	64135
MeV	Masernvirus	
MHB	M (middle) Protein von HBsAg des HBV	
min	Minuten	
ml	Milliliter, entsprechend einem tausendstel Liter	
mTOR	mechanistic Target of Rapamycin	
mTORC	mechanistic Target of Rapamycin Complex	
mTORC1	mammalian target of rapamycin complex 1	2475
MVBs	multivesicular bodies	
NDP52	Nuclear dot protein 52; auch CALCOCO2: calcium binding and coiled-coil domain 2, ein Autophagierezeptor (SLR)	10241

NFκB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells, Transkriptionsfaktor	
Nrf2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2	4780
NTCP	Natrium-Gallensäuren-Cotransporter (Na ⁺ -taurocholate cotransporting polypeptide)	
OAS	interferon-induced oligoadenylate synthetase	
OAS1a	2'-5'-oligoadenylate synthetase 1, IFI-4, OIAS, OIASI, E18/E16	4938
OPTN	Optineurin, ein Autophagierezeptor (SLR)	10133
ORF	open reading frame; offener Leserahmen	
P	Phosphat, meist zur Kennzeichnung einer posttranslationalen Modifikation durch Phosphorylierung	
p62	ubiquitin-binding protein p62 [62kDa], SQSTM1, Sequestosome-1	8878
Parkin	Ubiquitin-Protein-Ligase Parkin	5071
PE	Phosphatidylethanolamin, auch Kephalinge, ein Phosphoglycerid zellulärer Membranen	
PERK	protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase	
pgRNA	prägenomische RNA (des HBV)	
PI3K-Komplex	class III phosphatidylinositol 3-kinase Komplex, bestehend aus ATG14-BECN1-PIK3C3-PIK3R4	
PIK3C3	Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3	5289
PIK3R4	Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit 4	30849
PINK1	PTEN [Phosphatase and tensin homolog]-induced kinase 1	5728
PKA	Proteinkinase A	
PKR	Proteinkinase R, auch eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2, EIF2AK2	5610
PRRs	Pattern Recognition Receptors: deutsch etwa "Mustererkennungsrezeptoren"	
PV	Poliomyelitis-Virus	
PVDF	Polyvinylidenfluorid	
qPCR	qPCR: quantitative Real Time Polymerasekettenreaktion	
Rab7/22/24	Ras-related protein Rab-7/22/24	7879; 57403; 53917
RB1CC1	RB1[Retinoblastom-Protein]-inducible coiled-coil protein 1; Teil des ULK-Komplex	9821
rcDNA	relaxed circular DNA	
RIDD	regulated IRE1-dependent decay	
RIG-I	retinoic acid-inducible gene I, zytosolischer PRR	23586
RNA	Ribonukleinsäure (RNS), ribonucleic acid (RNA)	
RNAse	Ribonuklease	
ROS	englisch: reactive oxygen species; Reaktive Sauerstoffspezies	
Rubicon	run domain Beclin-1-interacting and cysteine-rich domain-containing protein	
SDS	sodium dodecyl Sulphate	

Ser	z. B. Ser349: Serin (Aminosäure), Phosphorylierungsstelle in einem Protein bei Angabe einer Nummer	
SHB	S (small) Protein von HBsAg des HBV	
SLD	Steatotische Lebererkrankung	
SLR	sequestosome 1-like receptors, Proteine deren Funktion p62 ähnelt	
SNAP29	Synaptosomal-associated protein 29, vermittelt Vesikelfusion	9342
SPF	Specific-Pathogen-Free, besondere Versuchstierhaltung	
ssRNA	Einzelstrang-RNA, single-stranded RNA	
STAT1/2	signal transducer and activator of transcription 1/2	
STING	Stimulator of interferon genes (STING), auch transmembrane protein 173 (TMEM173) und MPYS/MITA/ERIS	340061
TA	Transaminasen, Leberenzyme die bei Schädigung der Hepatozyten freigesetzt werden	
TG	Transgen, hier: Mäuse die HBV-Oberflächenproteine exprimieren (siehe Hepatitis B Insert)	
TLR	Toll-Like-Rezeptor	
TNF	Tumornekrosefaktor	
TSC1/2	Komplex aus TSC1 (Hamartin) und TSC2 (Tuberin) welcher mTOR hemmt	7248; 7249
TYK2	Januskinase: Non-receptor tyrosine-protein kinase 2	7297
UBA	Ubiquitin-bindende Domäne des p62 Proteins	
ULK1/2	Unc-51 like autophagy activating kinase 1/2; Teil des ULK-Komplex	8408; 9706
ULK-Komplex	ULK1/2-ATG13-RB1CC1-ATG101 Komplex	
UPR	Unfolded-Protein-Response	
UVRAG	UV irradiationresistance-associated gene	
V.	Vene, lat. Vena, Plural: Vv.: Venae	
VAMP3	Vesicle-associated membrane protein 3	9341
VAMP7	Vesicle-associated membrane protein 7	6845
VAMP8	Vesicle-associated membrane protein 8	8673
VAMP9	Vesicle-associated membrane protein 9	102639 650
vs.	versus, lateinisch: gegen	
W	Wochen	
WB	Westernblot auch Western Blot	
WT	Wildtyp, hier Mäuse des Wildtyps, welche keine HBV-Oberflächenproteine exprimieren.	
z. B.	zum Beispiel	

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Makroskopische Leberanatomie	3
Abbildung 2: Mikroskopischer Aufbau der Leber.....	4
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Makroautophagie	7
Abbildung 4: Das LC3-Konjugations-System	10
Abbildung 5: Regulation der Autophagie bei Hepatitis B.....	15
Abbildung 6: Interpretation von Messwerten der Autophagie	18
Abbildung 7: Schematischer Aufbau des Hepatitis-B-Virus.....	21
Abbildung 8: Darstellung des Verlaufs der akuten und chronischen Hepatitis B	25
Abbildung 9: Schematische Darstellung der Typ-I-Interferonantwort	29
Abb. 10: Schematische Darstellung des ER-Stresses und der Unfolded Protein Response	32
Abbildung 11: Hepatitis B Insert	39
Abbildung 12: Verwendete Mauslinien.....	40
Abbildung 13: Temperaturprofil des StepOnePlus	55
Abbildung 14: qPCR der mRNA der Oberflächenproteine	60
Abbildung 15: Vergleich der HBs Proteinexpression in BALB/c und IRF3/7 KO.....	61
Abbildung 16: Vergleich der HBs Proteinexpression in BALB/c und C57BL/6.....	62
Abbildung 17: Vergleich der HBx Proteinexpression in BALB/c und C57BL/6.....	63
Abbildung 18: IRF3/7 abhängige Bildung von Milchglashepatozyten – HE-Färbung.....	64
Abbildung 19: intrazelluläre Verteilung der HBV-Oberflächenproteine - LHB	65
Abbildung 20: IRF3/7 abhängige intrazelluläre Verteilung und Menge von PLIN2	66
Abb. 21: Darstellung der Kolo-kalisation der HBV-Oberflächenproteine und PLIN2.....	67
Abbildung 22: Darstellung der Kolo-kalisation von LHB und PLIN2 in humanen Proben.....	68
Abbildung 23: Isg15-mRNA-Expression	69
Abbildung 24: ISG15 Proteinexpression	70
Abbildung 25: Oas1a- und Stat1-mRNA-Expression	71
Abbildung 26: OAS1A Proteinexpression	72
Abbildung 27: Ifit1-mRNA-Expression	73
Abbildung 28: Atf3-mRNA-Expression.....	74
Abbildung 29: ATF3 Proteinexpression	75
Abbildung 30: Chop-mRNA-Expression.....	76
Abbildung 31: CHOP Proteinexpression.....	77
Abbildung 32: p62-mRNA-Expression	78
Abbildung 33: p62 Proteinexpression und quantitative Analyse.....	79

Abbildung 34: Lc3b-mRNA-Expression	81
Abbildung 35: LC3 Proteinexpression.....	82
Abbildung 36: Densitometrische Analyse der LC3 Proteinexpression im Westernblot	83
Abbildung 37: Regulation durch mTORC1 ist abhängig von der Interferonantwort	84
Abbildung 38: Beclin-1 Proteinexpression	85
Abbildung 39: LAMP-1 und LAMP-2 Proteinexpression.....	85
Abbildung 40: Polyubiquitinierung von LHB und p62	86
Abbildung 41: Histologie C57BL/6 im Vergleich zu BALB/c und IRF3/7 KO Mäusen	88
Abb. 42: Immunofluoreszenz HBs-TG Mäuse im Vergleich BALB/c - IRF3/7 KO - C57BL/6	89
Abbildung 43: mRNA-Expression: interferonstimulierter Gene im Vergleich BALB/c vs. C57BL/6.....	90
Abb. 44: Proteinexpression: interferonstimulierte Gene in BALB/c vs. C57BL/6	91
Abbildung 45: mRNA-Expression: ER-Stress im Vergleich BALB/c vs. C57BL/6	92
Abbildung 46: Proteinexpression: ER-Stress im Vergleich BALB/c vs. C57BL/6.....	93
Abbildung 47: mRNA- und Proteinexpression: Autophagie im Vergleich BALB/c vs. C57BL/6	94

Folgende Abbildungen wurden vollständig oder teilweise mit Biorender²⁶ erstellt:
Abbildung 1, Abbildung 2, Abbildung 3, Abbildung 4, Abbildung 5, Abbildung 6,
Abbildung 7, Abbildung 9, Abb. 10, Abbildung 11.

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte.....	41
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien	43
Tabelle 3: Puffer und Lösungen.....	46
Tabelle 4: Verwendete Antikörper	47
Tabelle 5: Verwendete PCR-Primer.....	48
Tabelle 6: Anzahl der verwendeten Mäuse der PCR Analysen.....	56

10 Literaturverzeichnis

1. Sheena BS, Hiebert L, Han H, et al. Global, regional, and national burden of hepatitis B, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2022;7(9):796-829. doi:10.1016/S2468-1253(22)00124-8
2. Jeng WJ, Papatheodoridis G V., Lok ASF. Hepatitis B. *Lancet (London, England).* 2023;401(10381):1039-1052. doi:10.1016/S0140-6736(22)01468-4
3. WHO. Hepatitis B. Published 2024. Accessed April 4, 2025. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b>
4. Tseng TC, Kao JH, Chen DS. Peginterferon α in the treatment of chronic hepatitis B. *Expert Opin Biol Ther.* 2014;14(7):995-1006. doi:10.1517/14712598.2014.907784
5. Chisari F. Hepatitis B virus transgenic mice: models of viral immunobiology and pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1996;206:148-173. doi:10.1007/978-3-642-85208-4_9
6. Chisari F V, Filippi P, McLachlan A, et al. Expression of hepatitis B virus large envelope polypeptide inhibits hepatitis B surface antigen secretion in transgenic mice. *J Virol.* 1986;60(3):880-887. Accessed July 24, 2018. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3783819>
7. FV C. Hepatitis B virus transgenic mice: insights into the virus and the disease. *Hepatology.* 1995;22(4 Pt 1):1316-1325. doi:10.1016/0270-9139(95)90645-2
8. Churin Y, Roderfeld M, Stiefel J, et al. Pathological impact of hepatitis B virus surface proteins on the liver is associated with the host genetic background. Bertoletti A, ed. *PLoS One.* 2014;9(3):e90608. doi:10.1371/journal.pone.0090608
9. Pópper H. The ground glass hepatocyte as a diagnostic hint. *Hum Pathol.* 1975;6(4):517-520. doi:10.1016/S0046-8177(75)80069-4
10. Su IJ, Wang HC, Wu HC, Huang WY. Ground glass hepatocytes contain pre-S mutants and represent preneoplastic lesions in chronic hepatitis B virus infection. *J Gastroenterol Hepatol.* 2008;23(8 Pt 1):1169-1174. doi:10.1111/J.1440-1746.2008.05348.X
11. Churin Y, Irunbam K, Imiela C, et al. Lipid Storage and Interferon Response Determine the Phenotype of Ground Glass Hepatocytes in Mice and Humans. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2021;12(2):383-394. doi:10.1016/J.JCMGH.2021.03.009
12. Li Y-W. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B surface protein. *World J Gastroenterol.* 2016;22(6):1943. doi:10.3748/wjg.v22.i6.1943
13. Montalbano R, Honrath B, Wissniewski TT, et al. Exogenous hepatitis B virus envelope proteins induce endoplasmic reticulum stress: involvement of cannabinoid axis in liver cancer cells. *Oncotarget.* 2016;7(15):20312-20323. doi:10.18632/oncotarget.7950
14. Mathai AM, Alexander J, Kuo FY, Torbenson M, Swanson PE, Yeh MM. Type II ground-glass hepatocytes as a marker of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B. *Hum Pathol.* 2013;44(8):1665-1671. doi:10.1016/J.HUMPATH.2013.01.020
15. Roeb E, Canbay A, Bantel H, et al. Aktualisierte S2k-Leitlinie nicht-alkoholische Fettlebererkrankung der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) – April 2022 – AWMF-Registernummer: 021–025. *Z Gastroenterol.* 2022;60(9):1346-1421. doi:10.1055/A-1880-2283
16. Trépo C, Chan HLY, Lok A. Hepatitis B virus infection. *Lancet (London, England).* 2014;384(9959):2053-2063. doi:10.1016/S0140-6736(14)60220-8
17. Li H, Yan L, Shi Y, et al. Hepatitis B Virus Infection: Overview. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1179:1-16. doi:10.1007/978-981-13-9151-4_1
18. Gottlieb RA, Andres AM, Sin J, Taylor DPJ. Untangling autophagy measurements all fluxed up. *Circ Res.* 2015;116(3):504-514. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.303787
19. Parzych KR, Klionsky DJ. An Overview of Autophagy: Morphology, Mechanism, and Regulation. *Antioxid Redox Signal.* 2014;20(3):460. doi:10.1089/ARS.2013.5371
20. Cao W, Li J, Yang K, Cao D. An overview of autophagy: Mechanism, regulation and research progress. *Bull Cancer.* 2021;108(3):304-322. doi:10.1016/J.BULCAN.2020.11.004
21. Schwarz DC. Der IRF3- und IRF7-Knockout im HBs-transgenen Mausmodell. Published online 2019. doi:10.22029/JLUPUB-14782

22. Shi Z, Wakil AE, Rockey DC. Strain-specific differences in mouse hepatic wound healing are mediated by divergent T helper cytokine responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(20):10663. doi:10.1073/PNAS.94.20.10663
23. Aumüller G, Aust G, Conrad A, et al. Duale Reihe Anatomie. *Duale R Anat*. Published online March 20, 2020. doi:10.1055/B-007-170976
24. Riemann J FWGPMJ. *Gastroenterologie in Klinik Und Praxis*. Georg Thieme Verlag; 2008. doi:10.1055/B-002-79386
25. Kellner U, Frahm SO, Mawrin C, Krams M, Schüller S. Kurzlehrbuch Pathologie. *Kurzlehrb Pathol*. Published online September 6, 2019. doi:10.1055/B-007-167433
26. Shiz Aoki. Scientific Image and Illustration Software | BioRender. Accessed February 10, 2024. <https://www.biorender.com/>
27. Lüllmann-Rauch R, Asan E. Taschenlehrbuch Histologie. *Taschenlehrb Histol*. Published online February 22, 2019. doi:10.1055/B-006-163361
28. Geißler M. Klinische Gastroenterologie. *Klin Gastroenterol*. Published online November 27, 2020. doi:10.1055/B-006-160392
29. Suttorp N, Möckel M, Siegmund B DM. *Harrisons Innere Medizin*. 20. Auflag. ABW Wissenschaftsverlag; 2020. doi:10.1055/b000000107
30. Roeb E, Canbay A, Bantel H, et al. Amendment „Neue Nomenklatur zur MASLD (Metabolic Dysfunction Associated Steatotic Liver Disease; metabolische Dysfunktion assoziierte steatotische Lebererkrankung)“ zur S2k-Leitlinie „Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung“ (v.2.0/April 2022) der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS). *Z Gastroenterol*. 2024;62(7):1077-1087. doi:10.1055/A-2309-6052
31. Herold G. *Innere Medizin 2021.*; 2020. <https://www.herold-innere-medicin.de/>
32. Cornberg M, Sandmann L, Protzer U, et al. S3-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) zur Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Hepatitis-B-Virusinfektion – (AWMF-Register-Nr. 021-11). *Z Gastroenterol*. 2021;59(7):691-776. doi:10.1055/A-1498-2512
33. Pape W. *Handwörterbuch Der Griechischen Sprache*. bearbeitet. Vieweg & Sohn; 1914. <http://images.zeno.org/Pape-1880/K/big/Pape-1880----01-0404.png>
34. Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol*. 2010;221(1):3. doi:10.1002/PATH.2697
35. Grumati P, Dikic I, Stolz A. ER-phagy at a glance. *J Cell Sci*. 2018;131(17):jcs217364. doi:10.1242/jcs.217364
36. Lilienbaum A. Relationship between the proteasomal system and autophagy. *Int J Biochem Mol Biol*. 2013;4(1):1-26. Accessed October 29, 2018. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23638318>
37. Dong X, Levine B. Autophagy and viruses: adversaries or allies? *J Innate Immun*. 2013;5(5):480-493. doi:10.1159/000346388
38. Lazar C, Uta M, Branza-Nichita N. Modulation of the unfolded protein response by the human hepatitis B virus. *Front Microbiol*. 2014;5(AUG):433. doi:10.3389/fmicb.2014.00433
39. Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system for protein degradation. *Annu Rev Biochem*. 1992;61:761-807. doi:10.1146/ANNUREV.BI.61.070192.003553
40. Yang Q, Zhao J, Chen D, Wang Y. E3 ubiquitin ligases: styles, structures and functions. *Mol Biomed*. 2021;2(1). doi:10.1186/S43556-021-00043-2
41. Schneider JL, Cuervo AM. Liver autophagy: Much more than just taking out the trash. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2014;11(3):187-200. doi:10.1038/nrgastro.2013.211
42. Li W, Zhu J, Dou J, et al. Phosphorylation of LAMP2A by p38 MAPK couples ER stress to chaperone-mediated autophagy. *Nat Commun* 2017 81. 2017;8(1):1-14. doi:10.1038/s41467-017-01609-x
43. Wang M, Law ME, Law BK. Proteotoxicity and endoplasmic reticulum stress-mediated cell death. *Mech Cell Death Oppor Ther Dev*. Published online January 1, 2022:119-174. doi:10.1016/B978-0-12-814208-0.00006-3
44. Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in Mammalian Autophagy Research. *Cell*. 2010;140(3):313-326. doi:10.1016/j.cell.2010.01.028
45. Kaushik S, Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy: a unique way to enter the lysosome world. *Trends Cell Biol*. 2012;22(8):407. doi:10.1016/J.TCB.2012.05.006
46. Yang Z, Klionsky DJ. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling

- regulation. *Curr Opin Cell Biol.* 2010;22(2):124. doi:10.1016/J.CEB.2009.11.014
47. Mehrpour M, Esclatine A, Beau I, Codogno P. Overview of macroautophagy regulation in mammalian cells. *Cell Res* 2010 207. 2010;20(7):748-762. doi:10.1038/cr.2010.82
 48. Klionsky DJ, Baehrecke EH, Brumell JH, et al. A comprehensive glossary of autophagy-related molecules and processes (2nd edition). *Autophagy.* 2011;7(11):1273. doi:10.4161/AUTO.7.11.17661
 49. Klionsky DJ. Look people, “Atg” is an abbreviation for “autophagy-related.” That’s it. *Autophagy.* 2012;8(9):1281. doi:10.4161/AUTO.21812
 50. Bruford EA, Braschi B, Denny P, Jones TEM, Seal RL, Tweedie S. Guidelines for Human Gene Nomenclature. *Nat Genet.* 2020;52(8):754. doi:10.1038/S41588-020-0669-3
 51. MGI. MGI-Guidelines for Nomenclature of Genes, Genetic Markers, Alleles, & Mutations in Mouse & Rat. Accessed February 18, 2025. <https://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/gene.shtml>
 52. Mailler E, Guardia CM, Bai X, et al. The autophagy protein ATG9A enables lipid mobilization from lipid droplets. *Nat Commun* 2021 121. 2021;12(1):1-19. doi:10.1038/s41467-021-26999-x
 53. Zhou Y, Wang Z, Huang Y, et al. Membrane dynamics of ATG4B and LC3 in autophagosome formation. *J Mol Cell Biol.* 2021;13(12):853-863. doi:10.1093/jmcb/mjab059
 54. Satoo K, Noda NN, Kumeta H, et al. The structure of Atg4B–LC3 complex reveals the mechanism of LC3 processing and delipidation during autophagy. *EMBO J.* 2009;28(9):1341. doi:10.1038/EMBOJ.2009.80
 55. Schaaf MBE, Keulers TG, Vooijs MA, Rouschop KMA. LC3/GABARAP family proteins: autophagy-(un)related functions. *FASEB J.* 2016;30(12):3961-3978. doi:10.1096/FJ.201600698R
 56. Jatana N, Ascher DB, Pires DEV, Gokhale RS, Thukral L. Human LC3 and GABARAP subfamily members achieve functional specificity via specific structural modulations. *Autophagy.* 2020;16(2):239. doi:10.1080/15548627.2019.1606636
 57. Rogov V, Dötsch V, Johansen T, Kirkin V. Interactions between Autophagy Receptors and Ubiquitin-like Proteins Form the Molecular Basis for Selective Autophagy. *Mol Cell.* 2014;53(2):167-178. doi:10.1016/j.molcel.2013.12.014
 58. Høyvik H, Gordon PB, Berg TO, Strømhaug PE, Seglen PO. Inhibition of autophagic-lysosomal delivery and autophagic lactolysis by asparagine. *J Cell Biol.* 1991;113(6):1305-1312. doi:10.1083/JCB.113.6.1305
 59. Itakura E, Mizushima N. Syntaxin 17: The autophagosomal SNARE. *Autophagy.* 2013;9(6):917. doi:10.4161/AUTO.24109
 60. Loos B, Du Toit A, Hofmeyr JHS. Defining and measuring autophagosome flux—concept and reality. *Autophagy.* 2014;10(11):2087. doi:10.4161/15548627.2014.973338
 61. Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy.* 2012;8(4):445-544. doi:10.4161/auto.19496
 62. Gurney MA, Huang C, Ramil JM, et al. Measuring cardiac autophagic flux in vitro and in vivo. In: *Apoptosis and Cancer: Methods and Protocols: Second Edition.* Vol 1219. ; 2014:187-197. doi:10.1007/978-1-4939-1661-0_14
 63. Zois CE, Giatromanolaki A, Sivridis E, Papaiakevou M, Kainulainen H, Koukourakis MI. “Autophagic flux” in normal mouse tissues: Focus on endogenous LC3A processing. *Autophagy.* 2011;7(11):1371-1378. doi:10.4161/auto.7.11.16664
 64. Klionsky DJ, Cuervo AM, Dunn WA, Levine B, Van Der Klei I, Seglen PO. How shall I eat thee? *Autophagy.* 2007;3(5):413-416. doi:10.4161/AUTO.4377
 65. Tsai T-H, Chen E, Li L, et al. The constitutive lipid droplet protein PLIN2 regulates autophagy in liver. *Autophagy.* 2017;13(7):1130-1144. doi:10.1080/15548627.2017.1319544
 66. Moscat J, Diaz-Meco MT. p62 at the Crossroads of Autophagy, Apoptosis, and Cancer. *Cell.* 2009;137(6):1001-1004. doi:10.1016/j.cell.2009.05.023
 67. Jiang P, Mizushima N. LC3- and p62-based biochemical methods for the analysis of autophagy progression in mammalian cells. *Methods.* 2015;75:13-18. doi:10.1016/j.ymeth.2014.11.021

68. Lamark T, Svenning S, Johansen T. Regulation of selective autophagy: the p62/SQSTM1 paradigm. *Essays Biochem.* 2017;61(6):609-624. doi:10.1042/EBC20170035
69. Katsuragi Y, Ichimura Y, Komatsu M. Regulation of the Keap1–Nrf2 pathway by p62/SQSTM1. *Curr Opin Toxicol.* 2016;1:54-61. doi:10.1016/j.cotox.2016.09.005
70. Pickrell AM, Youle RJ. The Roles of PINK1, Parkin and Mitochondrial Fidelity in Parkinson's Disease. *Neuron.* 2015;85(2):257. doi:10.1016/J.NEURON.2014.12.007
71. Lazarou M, Sliter DA, Kane LA, et al. The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy. *Nature.* 2015;524(7565):309-314. doi:10.1038/nature14893
72. Kane LA, Lazarou M, Fogel AI, et al. PINK1 phosphorylates ubiquitin to activate Parkin E3 ubiquitin ligase activity. *J Cell Biol.* 2014;205(2):143-153. doi:10.1083/jcb.201402104
73. Shvets E, Abada A, Weidberg H, Elazar Z. Dissecting the involvement of LC3B and GATE-16 in p62 recruitment into autophagosomes. *Autophagy.* 2011;7(7):683-688. doi:10.4161/AUTO.7.7.15279
74. Zatloukal K, Stumptner C, Fuchsichler A, et al. p62 is a common component of cytoplasmic inclusions in protein aggregation diseases. *Am J Pathol.* 2002;160(1):255-263. doi:10.1016/S0002-9440(10)64369-6
75. Tanji K, Miki Y, Ozaki T, et al. Phosphorylation of serine 349 of p62 in Alzheimer's disease brain. *Acta Neuropathol Commun.* 2014;2(1):50. doi:10.1186/2051-5960-2-50
76. Kumar A V., Mills J, Lapierre LR. Selective Autophagy Receptor p62/SQSTM1, a Pivotal Player in Stress and Aging. *Front cell Dev Biol.* 2022;10. doi:10.3389/FCELL.2022.793328
77. Katsuragi Y, Ichimura Y, Komatsu M. P62/SQSTM1 functions as a signaling hub and an autophagy adaptor. *FEBS J.* 2015;282(24):4672-4678. doi:10.1111/febs.13540
78. Jeong SJ, Zhang X, Rodriguez-Velez A, Evans TD, Razani B. p62/ SQSTM1 and Selective Autophagy in Cardiometabolic Diseases. *Antioxid Redox Signal.* 2019;31(6):458-471. doi:10.1089/ARS.2018.7649
79. Wang K. Autophagy and apoptosis in liver injury. *Cell Cycle.* 2015;14(11):1631-1642. doi:10.1080/15384101.2015.1038685
80. Huang W, Zhao F, Huang Y, et al. Rapamycin enhances HBV production by inducing cellular autophagy. *Hepat Mon.* 2014;14(10). doi:10.5812/hepatmon.20719
81. Esteban-Martínez L, Boya P. Autophagic flux determination in vivo and ex vivo. *Methods.* 2015;75:79-86. doi:10.1016/j.ymeth.2015.01.008
82. Kaeberlein M, Galvan V. Rapamycin and Alzheimer's disease: Time for a clinical trial? *Sci Transl Med.* 2019;11(476). doi:10.1126/SCITRANSLMED.AAR4289
83. Harrison DE, Strong R, Sharp ZD, et al. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nat 2009 4607253.* 2009;460(7253):392-395. doi:10.1038/nature08221
84. Caccamo A, Majumder S, Richardson A, Strong R, Oddo S. Molecular interplay between mammalian target of rapamycin (mTOR), amyloid-beta, and Tau: effects on cognitive impairments. *J Biol Chem.* 2010;285(17):13107-13120. doi:10.1074/JBC.M110.100420
85. Dreux M, Chisari F V. Viruses and the autophagy machinery. *Cell Cycle.* 2010;9(7):1295-1307. doi:10.4161/cc.9.7.11109
86. Nguyen DH, Ludgate L, Hu J. Hepatitis B virus-cell interactions and pathogenesis. *J Cell Physiol.* 2008;216(2):289-294. doi:10.1002/jcp.21416
87. Liu B, Fang M, Hu Y, et al. Hepatitis B virus X protein inhibits autophagic degradation by impairing lysosomal maturation. *Autophagy.* 2014;10(3):416-430. doi:10.4161/auto.27286
88. Lin Y, Wu C, Wang X, et al. Hepatitis B virus is degraded by autophagosome-lysosome fusion mediated by Rab7 and related components. *Protein Cell.* 2019;10(1):60-66. doi:10.1007/S13238-018-0555-2/FIGURES/2
89. Shrivastava S, Bhanja Chowdhury J, Steele R, Ray R, Ray RB. Hepatitis C Virus Upregulates Beclin1 for Induction of Autophagy and Activates mTOR Signaling. *J Virol.* 2012;86(16):8705-8712. doi:10.1128/JVI.00616-12
90. Li J, Liu Y, Wang Z, et al. Subversion of cellular autophagy machinery by hepatitis B virus for viral envelopment. *J Virol.* 2011;85(13):6319-6333. doi:10.1128/JVI.02627-

- 10
91. Lin Y, Zhao Z, Huang A, Lu M. Interplay between Cellular Autophagy and Hepatitis B Virus Replication: A Systematic Review. *Cells*. 2020;9(9):1-17. doi:10.3390/CELLS9092101
 92. Chu JYK, Chuang YC, Tsai KN, et al. Autophagic membranes participate in hepatitis B virus nucleocapsid assembly, precore and core protein trafficking, and viral release. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2022;119(30):2201927119. doi:10.1073/PNAS.2201927119/-/DCSUPPLEMENTAL
 93. Kang R, Tang D. PKR-dependent inflammatory signals. *Sci Signal*. 2012;5(247):pe47. doi:10.1126/scisignal.2003511
 94. Pietrocola F, Izzo V, Niso-Santano M, et al. Regulation of autophagy by stress-responsive transcription factors. *Semin Cancer Biol*. 2013;23(5):310-322. doi:10.1016/j.semcancer.2013.05.008
 95. Kunanopparat A, Hirankarn N, Kittigul C, Tangkijvanich P, Kimkong I. Autophagy machinery impaired interferon signalling pathways to benefit hepatitis B virus replication. *Asian Pacific J allergy Immunol*. 2016;34(1):77-85. doi:10.12932/AP0636.34.1.2016
 96. Sir D, Tian Y, Chen W -I., Ann DK, Yen T-SB, Ou J -h. J. The early autophagic pathway is activated by hepatitis B virus and required for viral DNA replication. *Proc Natl Acad Sci*. 2010;107(9):4383-4388. doi:10.1073/pnas.0911373107
 97. Tang H, Da L, Mao Y, et al. Hepatitis B virus X protein sensitizes cells to starvation-induced autophagy via up-regulation of beclin 1 expression. *Hepatology*. 2009;49(1):60-71. doi:10.1002/hep.22581
 98. He C, Klionsky DJ. Regulation Mechanisms and Signaling Pathways of Autophagy. *Annu Rev Genet*. 2009;43(1):67-93. doi:10.1146/annurev-genet-102808-114910
 99. Pinheiro RO, Nunes MP, Pinheiro CS, et al. Induction of autophagy correlates with increased parasite load of *Leishmania amazonensis* in BALB/c but not C57BL/6 macrophages. *Microbes Infect*. 2009;11(2):181-190. doi:10.1016/j.micinf.2008.11.006
 100. B'Chir W, Maurin AC, Carraro V, et al. The eIF2 α /ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(16):7683-7699. doi:10.1093/nar/gkt563
 101. LG G, A M, H M, et al. Interferon-regulated pathways that control hepatitis B virus replication in transgenic mice. *J Virol*. 2002;76(6):2617-2621. doi:10.1128/JVI.76.6.2617-2621.2002
 102. Castillo K, Valenzuela V, Matus S, et al. Measurement of autophagy flux in the nervous system in vivo. *Cell Death Dis*. 2013;4(11):e917. doi:10.1038/cddis.2013.421
 103. Kadowaki M, Karim MR. Cytosolic LC3 ratio as a quantitative index of macroautophagy. *Methods Enzymol*. 2009;452(C):199-213. doi:10.1016/S0076-6879(08)03613-6
 104. Mizushima N, Yoshimori T. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy*. 2007;3(6):542-545. doi:10.4161/auto.4600
 105. Starling S. Hepatitis B virus infection poster. *Nat Rev Dis Prim*. 2018;4:18036. doi:10.1038/NRDP.2018.36
 106. RKI. Epidemiologisches Bulletin Empfehlungen der Ständigen Impf-k ommission beim Robert Koch-Institut 2024. *Epidemiol Bull*. Published online 2024. doi:10.25646/11892.3
 107. Al-Sadeq DW, Taleb SA, Zaied RE, et al. Hepatitis B Virus Molecular Epidemiology, Host-Virus Interaction, Coinfection, and Laboratory Diagnosis in the MENA Region: An Update. *Pathog* 2019, Vol 8, Page 63. 2019;8(2):63. doi:10.3390/PATHOGENS8020063
 108. Tong S, Revill P. Overview of hepatitis B viral replication and genetic variability. *J Hepatol*. 2016;64(1):S4-S16. doi:10.1016/j.jhep.2016.01.027
 109. Kramvis A, Kew M, François G. Hepatitis B virus genotypes. *Vaccine*. 2005;23(19):2409-2423. doi:10.1016/J.VACCINE.2004.10.045
 110. Magnius LO, Norder H. Subtypes, genotypes and molecular epidemiology of the hepatitis B virus as reflected by sequence variability of the S-gene. *Intervirology*. 1995;38(1-2):24-34. doi:10.1159/000150411
 111. Toyé RM, Loureiro CL, Jaspe RC, Zoulim F, Pujol FH, Chemin I. The Hepatitis B

- Virus Genotypes E to J: The Overlooked Genotypes. *Microorganisms*. 2023;11(8). doi:10.3390/MICROORGANISMS11081908/S1
112. Watashi K, Urban S, Li W, Wakita T. NTCP and beyond: Opening the door to unveil hepatitis B virus entry. *Int J Mol Sci*. 2014;15(2):2892-2905. doi:10.3390/ijms15022892
 113. Vaillant A. HBsAg, Subviral Particles, and Their Clearance in Establishing a Functional Cure of Chronic Hepatitis B Virus Infection. *ACS Infect Dis*. 2021;7(6):1351-1368. doi:10.1021/ACSINFECDIS.0C00638
 114. Lee YH, Yun Y. HBx protein of hepatitis B virus activates Jak1-STAT signaling. *J Biol Chem*. 1998;273(39):25510-25515. doi:10.1074/JBC.273.39.25510
 115. Ali A, Abdel-Hafiz H, Suhail M, et al. Hepatitis B virus, HBx mutants and their role in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2014;20(30):10238-10248. doi:10.3748/wjg.v20.i30.10238
 116. Li B, Gao B, Ye L, et al. Hepatitis B virus X protein (HBx) activates ATF6 and IRE1-XBP1 pathways of unfolded protein response. *Virus Res*. 2007;124(1-2):44-49. doi:10.1016/j.virusres.2006.09.011
 117. Li T, Robert El, van Breugel PC, Strubin M, Zheng N. A Promiscuous α -Helical Motif Anchors Viral Hijackers and Substrate Receptors to the CUL4-DDB1 Ubiquitin Ligase Machinery. *Nat Struct Mol Biol*. 2010;17(1):105. doi:10.1038/NSMB.1719
 118. Wen Y, Golubkov VS, Strongin AY, Jiang W, Reed JC. Interaction of hepatitis B viral oncoprotein with cellular target HBXIP dysregulates centrosome dynamics and mitotic spindle formation. *J Biol Chem*. 2008;283(5):2793-2803. doi:10.1074/JBC.M708419200
 119. Tajiri K, Shimizu Y. Unsolved problems and future perspectives of hepatitis B virus vaccination. *World J Gastroenterol*. 2015;21(23):7074. doi:10.3748/WJG.V21.I23.7074
 120. Tian Y, Sir D, Kuo C -f. C-F, Ann DK, Ou J-HJJ -h. J. Autophagy Required for Hepatitis B Virus Replication in Transgenic Mice. *J Virol*. 2011;85(24):13453-13456. doi:10.1128/JVI.06064-11
 121. Microsoft 365. Accessed February 10, 2024. <https://www.microsoft.com/de-de/microsoft-365>
 122. Wang H-CC, Wu H-CC, Chen C-FF, Fausto N, Lei H-YY, Su I-JJ. Different types of ground glass hepatocytes in chronic hepatitis B virus infection contain specific pre-S mutants that may induce endoplasmic reticulum stress. *Am J Pathol*. 2003;163(6). doi:10.1016/S0002-9440(10)63599-7
 123. Su IJ, Lai MY, Hsu HC, et al. Diverse virological, histopathological and prognostic implications of seroconversion from hepatitis B e antigen to anti-HBe in chronic hepatitis B virus infection. *J Hepatol*. 1986;3(2):182-189. doi:10.1016/S0168-8278(86)80024-1
 124. Gutierrez D, Tan A, Strome A, Pomeranz MK. Dental dams in dermatology: An underutilized barrier method of protection. *Int J Women's Dermatology*. 2022;8(1):e008. doi:10.1097/JW9.0000000000000008
 125. World Health Organization (WHO). Guidelines for the prevention, diagnosis, care and treatment for people with chronic hepatitis B infection. Published online 2024:1-272.
 126. Kalvakolanu D V., Borden EC. An overview of the interferon system: signal transduction and mechanisms of action. *Cancer Invest*. 1996;14(1):25-53. doi:10.3109/07357909609018435
 127. De Andrea M, Ravera R, Gioia D, Gariglio M, Landolfo S. The interferon system: an overview. *Eur J Paediatr Neurol*. 2002;6 Suppl A(SUPPL. 1). doi:10.1053/EJPN.2002.0573
 128. Vilček J. Novel interferons. *Nat Immunol*. 2003;4(1):8-9. doi:10.1038/NI0103-8
 129. Lazear HM, Schoggins JW, Diamond MS. Shared and Distinct Functions of Type I and Type III Interferons. *Immunity*. 2019;50(4):907. doi:10.1016/J.IMMUNI.2019.03.025
 130. Schwarz D, Churin Y, Roderfeld M, Roeb E. IRF3/7-Knockout führt zu verminderter Interferon Response in HBs transgenen Mäusen. *Z Gastroenterol*. 2016;54(08):KV172. doi:10.1055/s-0036-1586948
 131. Steinberg C, Eisenächer K, Gross O, et al. The IFN regulatory factor 7-dependent type I IFN response is not essential for early resistance against murine cytomegalovirus infection. *Eur J Immunol*. 2009;39(4):1007-1018.

- doi:10.1002/EJ.200838814
132. Rawlings JS, Rosler KM, Harrison DA. The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci.* 2004;117(8):1281-1283. doi:10.1242/JCS.00963
 133. Burke JD, Young HA. IFN- γ : A cytokine at the right time, is in the right place. *Semin Immunol.* 2019;43:101280. doi:10.1016/J.SMIM.2019.05.002
 134. Paul A, Tang TH, Ng SK. Interferon Regulatory Factor 9 Structure and Regulation. *Front Immunol.* 2018;9(AUG). doi:10.3389/FIMMU.2018.01831
 135. Kalliolias GD, Ivashkiv LB. Overview of the biology of type I interferons. *Arthritis Res Ther.* 2010;12 Suppl 1(Suppl 1). doi:10.1186/AR2881
 136. Zhang D, Zhang D-E. Interferon-stimulated gene 15 and the protein ISGylation system. *J Interferon Cytokine Res.* 2011;31(1):119-130. doi:10.1089/jir.2010.0110
 137. Schoggins JW. Interferon-stimulated genes: roles in viral pathogenesis. *Curr Opin Virol.* 2014;6:40-46. doi:10.1016/j.coviro.2014.03.006
 138. Villarroya-Beltri C, Baixauli F, Mittelbrunn M, et al. ISGylation controls exosome secretion by promoting lysosomal degradation of MVB proteins. *Nat Commun.* 2016;7. doi:10.1038/NCOMMS13588
 139. Diamond MS, Farzan M. The broad-spectrum antiviral functions of IFIT and IFITM proteins. *Nat Rev Immunol* 2012 131. 2012;13(1):46-57. doi:10.1038/nri3344
 140. Diamond MS. IFIT1: A dual sensor and effector molecule that detects non-2'-O methylated viral RNA and inhibits its translation. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2014;25(5):543. doi:10.1016/J.CYTOGFR.2014.05.002
 141. Fensterl V, Sen GC. The ISG56/IFIT1 Gene Family. *J Interf Cytokine Res.* 2011;31(1):71. doi:10.1089/JIR.2010.0101
 142. Xie DY, Wang SM, Yang JM, et al. IFIT1 polymorphisms predict interferon- α treatment efficiency for hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol.* 2016;22(44):9813-9821. doi:10.3748/WJG.V22.I44.9813
 143. Elkhateeb E, Tag-El-Din-Hassan HT, Sasaki N, Torigoe D, Morimatsu M, Agui T. The role of mouse 2',5'-oligoadenylate synthetase 1 paralogs. *Infect Genet Evol.* 2016;45:393-401. doi:10.1016/j.meegid.2016.09.018
 144. Pulit-Penalosa JA, Scherbik S V., Brinton MA. Activation of Oas1a gene expression by type I IFN requires both STAT1 and STAT2 while only STAT2 is required for Oas1b activation. *Virology.* 2012;425(2):71-81. doi:10.1016/j.virol.2011.11.025
 145. Dabo S, Meurs EF. dsRNA-dependent protein kinase PKR and its role in stress, signaling and HCV infection. *Viruses.* 2012;4(11):2598-2635. doi:10.3390/v4112598
 146. Humeau J, Bezu L, Kepp O, Kroemer G. EIF2 α phosphorylation: a hallmark of both autophagy and immunogenic cell death. *Mol Cell Oncol.* 2020;7(5). doi:10.1080/23723556.2020.1776570
 147. Hetz C, Zhang K, Kaufman RJ. Mechanism, regulation and functions of the unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020;21(8):421. doi:10.1038/S41580-020-0250-Z
 148. Kennedy D, Samali A, Jäger R. Methods for studying ER stress and UPR markers in human cells. *Methods Mol Biol.* 2015;1292:3-18. doi:10.1007/978-1-4939-2522-3_1
 149. Senft D, Ronai ZA. UPR, autophagy, and mitochondria crosstalk underlies the ER stress response. *Trends Biochem Sci.* 2015;40(3):141-148. doi:10.1016/J.TIBS.2015.01.002
 150. Bence NF, Sampat RM, Kopito RR. Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science.* 2001;292(5521):1552-1555. doi:10.1126/SCIENCE.292.5521.1552
 151. Kaganovich D, Kopito R, Frydman J. Misfolded proteins partition between two distinct quality control compartments. *Nature.* 2008;454(7208):1088-1095. doi:10.1038/nature07195
 152. Ding WX, Yin XM. Sorting, recognition and activation of the misfolded protein degradation pathways through macroautophagy and the proteasome. *Autophagy.* 2008;4(2):141-150. doi:10.4161/AUTO.5190
 153. Korennykh A, Walter P. Structural Basis of the Unfolded Protein Response. <http://dx.doi.org/101146/annurev-cellbio-101011-155826>. 2012;28:251-277. doi:10.1146/ANNUREV-CELLBIO-101011-155826
 154. Smith M, Wilkinson S. ER homeostasis and autophagy. *Essays Biochem.* 2017;61(6):625-635. doi:10.1042/EBC20170092
 155. Yang Y, Liu L, Naik I, Braunstein Z, Zhong J, Ren B. Transcription Factor C/EBP

- Homologous Protein in Health and Diseases. *Front Immunol.* 2017;8(NOV):1612. doi:10.3389/FIMMU.2017.01612
156. Hetz C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13(2):89-102. doi:10.1038/NRM3270
 157. Yoshida H, Okada T, Haze K, et al. ATF6 Activated by Proteolysis Binds in the Presence of NF-Y (CBF) Directly to the cis-Acting Element Responsible for the Mammalian Unfolded Protein Response. *Mol Cell Biol.* 2000;20(18):6755. doi:10.1128/MCB.20.18.6755-6767.2000
 158. Tian Y, Wang ML, Zhao J. Crosstalk between Autophagy and Type I Interferon Responses in Innate Antiviral Immunity. *Viruses.* 2019;11(2). doi:10.3390/V11020132
 159. Luhr M, Torgersen ML, Szalai P, et al. The kinase PERK and the transcription factor ATF4 play distinct and essential roles in autophagy resulting from tunicamycin-induced ER stress. *J Biol Chem.* 2019;294(20):8197-8217. doi:10.1074/JBC.RA118.002829
 160. Schmeisser H, Bekisz J, Zoon KC. New Function of Type I IFN: Induction of Autophagy. *J Interferon Cytokine Res.* 2014;34(2):71-78. doi:10.1089/JIR.2013.0128
 161. Jiang H-Y, Wek SA, McGrath BC, et al. Activating Transcription Factor 3 Is Integral to the Eukaryotic Initiation Factor 2 Kinase Stress Response. *Mol Cell Biol.* 2004;24(3):1365-1377. doi:10.1128/MCB.24.3.1365-1377.2004
 162. Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(7):519-529. doi:10.1038/NRM2199
 163. Hai T, Wolfgang CD, Marsee DK, Allen AE, Sivaprasad U. ATF3 and stress responses. *Gene Expr.* 1999;7(4-6):321-335. Accessed November 9, 2021. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10440233/>
 164. Ku HC, Cheng CF. Master Regulator Activating Transcription Factor 3 (ATF3) in Metabolic Homeostasis and Cancer. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2020;11:556. doi:10.3389/FENDO.2020.00556/BIBTEX
 165. Shi Z, Zhang K, Chen T, et al. Transcriptional factor ATF3 promotes liver fibrosis via activating hepatic stellate cells. *Cell Death Dis 2020 1112.* 2020;11(12):1-16. doi:10.1038/s41419-020-03271-6
 166. Lo WL, Hsu TI, Yang W Bin, et al. Betulinic Acid-Mediated Tuning of PERK/CHOP Signaling by Sp1 Inhibition as a Novel Therapeutic Strategy for Glioblastoma. *Cancers 2020, Vol 12, Page 981.* 2020;12(4):981. doi:10.3390/CANCERS12040981
 167. Chakrabarti A, Chen AW, Varner JD. A review of the mammalian unfolded protein response. *Biotechnol Bioeng.* 2011;108(12):2777-2793. doi:10.1002/bit.23282
 168. Chen BP, Wolfgang CD, Hai T. Analysis of ATF3, a transcription factor induced by physiological stresses and modulated by gadd153/Chop10. *Mol Cell Biol.* 1996;16(3):1157-1168. doi:10.1128/mcb.16.3.1157
 169. Sood V, Sharma KB, Gupta V, et al. ATF3 negatively regulates cellular antiviral signaling and autophagy in the absence of type I interferons. *Sci Rep.* 2017;7(1):8789. doi:10.1038/s41598-017-08584-9
 170. Kim W-H, Jeong M-H, Jeong Y, et al. ATF3 is required for the prevention of cardiomyopathy via the regulation of mitochondrial oxidative stress. Published online July 15, 2024. doi:10.21203/RS.3.RS-4485671/V1
 171. Liu S, Li Z, Lan S, et al. The Dual Roles of Activating Transcription Factor 3 (ATF3) in Inflammation, Apoptosis, Ferroptosis, and Pathogen Infection Responses. *Int J Mol Sci.* 2024;25(2):824. doi:10.3390/IJMS25020824/S1
 172. Jalajakumari SS, Ramesh R, Nair AS. ER stress mediated inflammation in cancer pathogenesis. *Trends Immunother.* 2024;8(1):2531. doi:10.24294/TI.V8.I1.2531
 173. Zhang W, Shi Y, Oyang L, et al. Endoplasmic reticulum stress—a key guardian in cancer. *Cell Death Discov 2024 101.* 2024;10(1):1-16. doi:10.1038/s41420-024-02110-3
 174. Lipatova Z, Segev N. A Role for Macro-ER-Phagy in ER Quality Control. *PLoS Genet.* 2015;11(7):e1005390. doi:10.1371/journal.pgen.1005390
 175. Schuck S, Gallagher CM, Walter P. ER-phagy mediates selective degradation of endoplasmic reticulum independently of the core autophagy machinery. *J Cell Sci.* 2014;127(Pt 18):4078-4088. doi:10.1242/jcs.154716
 176. Loi M, Fregno I, Guerra C, Molinari M. Eat it right: ER-phagy and recovER-phagy. *Biochem Soc Trans.* 2018;46(3):699-706. doi:10.1042/BST20170354

177. Butcher MJ, Zhu J. Recent advances in understanding the Th1/Th2 effector choice. *Fac Rev.* 2021;10(30). doi:10.12703/R/10-30
178. Berger A. Th1 and Th2 responses: what are they? *BMJ.* 2000;321(7258):424. doi:10.1136/BMJ.321.7258.424
179. Roehlen N, Crouch E, Baumert TF. Liver Fibrosis: Mechanistic Concepts and Therapeutic Perspectives. *Cells.* 2020;9(4). doi:10.3390/CELLS9040875
180. Churin Y, Roderfeld M, Roeb E. Hepatitis B virus large surface protein: function and fame. *Hepatobiliary Surg Nutr.* 2015;4(1):1-10. doi:10.3978/j.issn.2304-3881.2014.12.08
181. FV C, P F, J B, et al. Structural and pathological effects of synthesis of hepatitis B virus large envelope polypeptide in transgenic mice. 1987;84(19):6909-6913. doi:10.1073/PNAS.84.19.6909
182. 002226 - Alb-PSX transgenic line 50-4 Strain Details. Jackson Laboratory (JAX). Accessed January 2, 2024. <https://www.jax.org/strain/002226>
183. ImageJ. Accessed February 10, 2024. <https://imagej.net/ij/>
184. IBM SPSS Statistics. Accessed February 10, 2024. <https://www.ibm.com/de-de/products/spss-statistics>
185. INTAS. LabImage 1D – Gels und Western Blots - Kapelan Bio-Imaging. Accessed February 10, 2024. <https://www.kapelanbio.com/de/produkte/labimage-apps/labimage-1d-gels-und-western-blots/>
186. StepOnePlus™ Real-Time PCR System. Accessed February 10, 2024. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4376600>
187. Mendeley. Accessed February 10, 2024. <https://www.mendeley.com/>
188. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680-685. doi:10.1038/227680A0
189. Ohgane K, Yoshioka H. Quantification of Gel Bands by an Image J Macro, Band/Peak Quantification Tool v1. Published online October 1, 2019. doi:10.17504/PROTOCOLS.IO.7VGHN3W
190. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402-408. doi:10.1006/METH.2001.1262
191. Ingram Olkin et al. HL. Robust tests for equality of variances. In: *Robust Tests for Equality of Variances.* Contributi. Stanford University Press.
192. Tukey JW. Comparing Individual Means in the Analysis of Variance. *Biometrics.* 1949;5(2):99. doi:10.2307/3001913
193. Altman DG, Bland JM. Standard deviations and standard errors Rapid responses service Standard deviations and standard errors. *BMJ.* 2005;331(December 2006):903. doi:10.1136/bmj.331.7521.903
194. Yu DM, Li XH, Mom V, et al. N-glycosylation mutations within hepatitis B virus surface major hydrophilic region contribute mostly to immune escape. *J Hepatol.* 2014;60(3):515-522. doi:10.1016/J.JHEP.2013.11.004
195. Liu W, Cao Y, Wang T, et al. The N-Glycosylation Modification of LHBs (Large Surface Proteins of HBV) Effects on Endoplasmic Reticulum Stress, Cell Proliferation and its Secretion. *Hepat Mon.* 2013;13(9):e12280. doi:10.5812/hepatmon.12280
196. Hassemer M, Finkernagel M, Peiffer KH, et al. Comparative characterization of hepatitis B virus surface antigen derived from different hepatitis B virus genotypes. *Virology.* 2017;502:1-12. doi:10.1016/J.VIROL.2016.12.003
197. Irunbam K, Roderfeld M, Glimm H, et al. Cholestasis impairs hepatic lipid storage via AMPK and CREB signaling in hepatitis B virus surface protein transgenic mice. *Lab Invest.* 2020;100(11):1411. doi:10.1038/S41374-020-0457-9
198. John SP, Sun J, Carlson RJ, Song J, Smelkinson M, Fraser IDC. IFIT1 Exerts Opposing Regulatory Effects on the Inflammatory and Interferon Gene Programs in LPS-Activated Human Macrophages. Published online 2018. doi:10.1016/j.celrep.2018.09.002
199. Song S, Tan J, Miao Y, Zhang Q. Crosstalk of ER stress-mediated autophagy and ER-phagy: Involvement of UPR and the core autophagy machinery. *J Cell Physiol.* 2018;233(5):3867-3874. doi:10.1002/jcp.26137
200. B'chir W, Chaveroux C, Carraro V, et al. Dual role for CHOP in the crosstalk between autophagy and apoptosis to determine cell fate in response to amino acid deprivation. *Cell Signal.* 2014;26(7):1385-1391. doi:10.1016/J.CELLSIG.2014.03.009

201. Yang H, Fu Q, Liu C, et al. Hepatitis B virus promotes autophagic degradation but not replication in autophagosome. *Biosci Trends*. 2015;9(2):111-116. doi:10.5582/bst.2015.01049
202. Sir D, Ann DK, Ou JJ. Autophagy by hepatitis B virus and for hepatitis B virus. *Autophagy*. 2010;6(4):548-549. doi:10.4161/auto.6.4.11669
203. Magnuson B, Ekim B, Fingar DC. Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks. *Biochem J*. 2012;441(1):1-21. doi:10.1042/BJ20110892
204. Blommaert EFC, Luiken JJFP, Blommaert PJE, Van Woerkom GM, Meijer AJ. Phosphorylation of ribosomal protein S6 is inhibitory for autophagy in isolated rat hepatocytes. *J Biol Chem*. 1995;270(5):2320-2326. doi:10.1074/JBC.270.5.2320/ASSET/76A56994-2C24-4AB8-BB01-3223D84A7380/MAIN.ASSETS/FX17.JPG
205. Mao Y, Da L, Tang H, et al. Hepatitis B virus X protein reduces starvation-induced cell death through activation of autophagy and inhibition of mitochondrial apoptotic pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;415(1):68-74. doi:10.1016/j.bbrc.2011.10.013
206. Eskelinen EL. Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Mol Aspects Med*. 2006;27(5-6):495-502. doi:10.1016/J.MAM.2006.08.005
207. Schreiber A, Peter M. Substrate recognition in selective autophagy and the ubiquitin-proteasome system. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2014;1843(1):163-181. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.03.019
208. Rodgers JD, Gass GH. The effect of age on serum proteins in mice. *Exp Gerontol*. 1983;18(1):39-45. doi:10.1016/0531-5565(83)90049-9
209. Graumann F, Churin Y, Tschuschner A, et al. Genomic Methylation Inhibits Expression of Hepatitis B Virus Envelope Protein in Transgenic Mice: A Non-Infectious Mouse Model to Study Silencing of HBV Surface Antigen Genes. *PLoS One*. 2015;10(12):e0146099. doi:10.1371/journal.pone.0146099
210. Dobrica MO, Lazar C, Branza-Nichita N. N-Glycosylation and N-Glycan Processing in HBV Biology and Pathogenesis. *Cells*. 2020;9(6):1404. doi:10.3390/CELLS9061404
211. Kim CM, Koike K, Saito I, Miyamura T, Jay G. HBx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice. *Nature*. 1991;351(6324):317-320. doi:10.1038/351317A0
212. Li Y, Xia Y, Cheng X, et al. Hepatitis B Surface Antigen Activates Unfolded Protein Response in Forming Ground Glass Hepatocytes of Chronic Hepatitis B. *Viruses*. 2019;11(4). doi:10.3390/V11040386
213. Hsu H -C, Lai M -Y, Su I -J, et al. Correlation of hepatocyte HBsAg expression with virus replication and liver pathology. *Hepatology*. 1988;8(4):749-754. doi:10.1002/HEP.1840080408
214. Hadziyannis S, Gerber MA, Vissoulis C, Popper H. Cytoplasmic hepatitis B antigen in "ground-glass" hepatocytes of carriers. *Arch Pathol*. 1973;96(5):327-330.
215. Thung SN, Gerber MA, Kasambalides EJ, Gilja BK, Keh W, Gerlich WH. Demonstration of pre-S polypeptides of hepatitis B virus in infected livers. *Hepatology*. 1986;6(6):1315-1318. doi:10.1002/HEP.1840060615
216. D'Cunha J, Knight E, Jr, Haas AL, Truitt RL, Borden EC. Immunoregulatory properties of ISG15, an interferon-induced cytokine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(1):211. doi:10.1073/PNAS.93.1.211
217. Pau E, Cheung YH, Loh C, Lajoie G, Wither JE. TLR tolerance reduces IFN-alpha production despite plasmacytoid dendritic cell expansion and anti-nuclear antibodies in NZB bicongenic mice. Kanellopoulos J, ed. *PLoS One*. 2012;7(5):e36761. doi:10.1371/journal.pone.0036761
218. SG B, TR T, JA M, B K, JM K. Mice deficient in the interferon type I receptor have reduced REM sleep and altered hypothalamic hypocretin, prolactin and 2',5'-oligoadenylate synthetase expression. *Brain Res*. 2004;1027(1-2):117-125. doi:10.1016/J.BRAINRES.2004.08.041
219. Chakrabarti A, Ghosh PK, Banerjee S, Gaughan C, Silverman RH. RNase L Triggers Autophagy in Response to Viral Infections. *J Virol*. 2012;86(20):11311. doi:10.1128/JVI.00270-12
220. Schmitz M, Shaban M, Albert B, Gökçen A, Kracht M. The Crosstalk of Endoplasmic

- Reticulum (ER) Stress Pathways with NF- κ B: Complex Mechanisms Relevant for Cancer, Inflammation and Infection. *Biomedicines*. 2018;6(2):58. doi:10.3390/biomedicines6020058
221. Schmeisser H, Fey SB, Horowitz J, et al. Type I interferons induce autophagy in certain human cancer cell lines. *Autophagy*. 2013;9(5):683-696. doi:10.4161/auto.23921
 222. Oyadomari S, Koizumi A, Takeda K, et al. Targeted disruption of the Chop gene delays endoplasmic reticulum stress-mediated diabetes. *J Clin Invest*. 2002;109(4):525-532. doi:10.1172/JCI14550
 223. Zeng XS, Jia JJ, Kwon Y, Wang SD, Bai J. The role of thioredoxin-1 in suppression of endoplasmic reticulum stress in Parkinson disease. *Free Radic Biol Med*. 2014;67:10-18. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.10.013
 224. Tamaki N, Hatano E, Taura K, et al. CHOP deficiency attenuates cholestasis-induced liver fibrosis by reduction of hepatocyte injury. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol*. 2008;294(2):498-505. doi:10.1152/AJPGI.00482.2007/ASSET/IMAGES/LARGE/ZH30020850170005.JPG
 225. Zaffagnini G, Savova A, Danieli A, et al. P62 Filaments Capture and Present Ubiquitinated Cargos for Autophagy. *EMBO J*. 2018;37(5):e98308. doi:10.15252/embj.201798308
 226. Wooten MW, Hu X, Babu JR, et al. Signaling, polyubiquitination, trafficking, and inclusions: Sequestosome 1/p62's role in neurodegenerative disease. *J Biomed Biotechnol*. 2006;2006:1-12. doi:10.1155/JBB/2006/62079
 227. Shaid S, Brandts CH, Serve H, Dikic I. Ubiquitination and selective autophagy. *Cell Death Differ*. 2013;20(1):21-30. doi:10.1038/cdd.2012.72
 228. Liu WJ, Ye L, Huang WF, et al. p62 links the autophagy pathway and the ubiquitin-proteasome system upon ubiquitinated protein degradation. *Cell Mol Biol Lett*. 2016;21(1). doi:10.1186/S11658-016-0031-Z
 229. Xu Z, Yen TSB, Wu L, et al. Enhancement of hepatitis B virus replication by its X protein in transgenic mice. *J Virol*. 2002;76(5):2579-2584. Accessed July 24, 2018. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11836439>
 230. Ding B, Zhang G, Yang X, et al. Phosphoprotein of human parainfluenza virus type 3 blocks autophagosome-lysosome fusion to increase virus production. *Cell Host Microbe*. 2014;15(5):564-577. doi:10.1016/j.chom.2014.04.004
 231. Ohsumi Y. Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2(3):211-216. doi:10.1038/35056522
 232. Kotsafti A, Farinati F, Cardin R, Cillo U, Nitti D, Bortolami M. Autophagy and apoptosis-related genes in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *BMC Gastroenterol*. 2012;12:118. doi:10.1186/1471-230X-12-118
 233. Churin Y, Roderfeld M, Stiefel J, et al. Correction: Pathological impact of hepatitis B virus surface proteins on the liver is associated with the host genetic background. *PLoS One*. 2015;10(5):e0127375. doi:10.1371/journal.pone.0127375
 234. Martyniszyn L, Szulc-Dabrowska L, Boratyńska-Jasińska A, Badowska-Kozakiewicz AM, Niemiałowski MG. In vivo induction of autophagy in splenocytes of C57BL/6 and BALB/c mice infected with ectromelia orthopoxvirus. *Pol J Vet Sci*. 2013;16(1):25-32. doi:10.2478/pjvs-2013-0004

11 Anhang

11.1 Publikationsverzeichnis

Lipid Storage and Interferon Response Determine the Phenotype of Ground Glass Hepatocytes in Mice and Humans

Churin, Y; Irungbam, K; Imiela, CS; Schwarz, D; Mollenkopf, HJ; Drebber, U; Odenthal, M; Pak, O; Huber, M; Glebe, D; Roderfeld, M; Roeb, E - Cell Mol Gastroenterol Hepatol. 2021;12(2):383-394. [DOI: 10.1016/j.jcmgh.2021.03.009](https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2021.03.009). Epub 2021 Mar 23. PMID: 33766783; PMCID: PMC8255940.

Inhalte der vorliegenden Arbeit wurden in oben genannten Publikationen in Teilen vorab veröffentlicht. Entsprechende Daten und Abbildungen wurden hier modifiziert reproduziert.

Ausschalten der Typ-I-Interferonantwort führt zu verminderter Induktion von Autophagie in HBs transgenen Mäusen

Imiela, CS; Churin, Y; Roderfeld, M; Huber, M; Roeb, E - Zeitschrift für Gastroenterologie 2019; 57(01): E90

<https://doi.org/10.1055/s-0038-1677262>

Auszeichnung für den „besten Vortrag aus dem Bereich Grundlagenforschung und Theoretische Forschung“ des 2. Science Days des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, Gießen den 16.11.2018

Forschungsstipendium:

„Herr Imiela hat das Prägraduierten-Kolleg am Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen erfolgreich abgeschlossen.“ Gießen, den 21.01.2019.

Das Prägraduierten-Kolleg dient zur Förderung des wissenschaftlichen Nachwuchses.

Dabei werden besonders engagierte, interessierte und leistungsstarke Studenten ausgewählt und durch ein Ausbildungscurriculum sowie ein Stipendium über 9 Monate im Rahmen eines Forschungssemesters gefördert.

Zukünftige Publikationen - ORCID:

<https://orcid.org/0000-0001-5056-9877>

11.3 Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

11.4 Danksagung

Die vorliegende Dissertation wäre ohne die Unterstützung und Begleitung vieler Menschen nicht möglich gewesen. Ihnen allen gilt mein herzlicher Dank.

Mein besonderer Dank gilt Frau Univ.-Prof. Dr. med. Elke Roeb für die Möglichkeit, diese Arbeit in ihrer Abteilung durchzuführen, für ihre wertvolle wissenschaftliche Unterstützung sowie für ihr Vertrauen in meine Forschungsarbeit. Ihre Expertise und Förderung haben maßgeblich zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen.

Ebenso danke ich Dr. rer. nat. Yury Churin und PD Dr. rer. nat. Martin Roderfeld für ihre engagierte Betreuung, für die zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen und ihre stets konstruktiven Anregungen.

Yury Churin danke ich besonders für seinen praktischen und ehrlichen Rat sowie sein außergewöhnliches Engagement für die Forschung, das mich stets inspiriert hat.

Martin Roderfeld gilt mein besonderer Dank für seine wertvolle Unterstützung bei der Strukturierung des Schreibens; seine Hinweise haben mir sehr geholfen, meine Gedanken klar und präzise zu formulieren.

Darüber hinaus bedanke ich mich beim Prägraduiertenkolleg der Justus-Liebig-Universität Gießen, das mir durch seine Unterstützung wertvolle Rahmenbedingungen für meine wissenschaftliche Arbeit geschaffen hat.

Mein besonderer Dank gilt außerdem den Laborassistentinnen Annette Tschuschner und Heike Müller, deren wertvolle Unterstützung im Labor entscheidend zum Fortschritt meiner Experimente beigetragen hat. Ihre Sorgfalt, ihr Engagement und ihre Hilfsbereitschaft haben meine Arbeit wesentlich erleichtert.

Schließlich möchte ich meiner Familie und meinen Freundinnen und Freunden danken. Ihr wart mir eine unersetzliche Stütze – sei es durch euer Verständnis, eure Geduld oder einfach dadurch, dass ihr mich auf diesem langen Weg begleitet habt. Besonders danke ich euch für das gemeinsame Coworking, die wertvollen Diskussionen und euer ehrliches Feedback, das mir geholfen hat, meine Gedanken zu schärfen und dranzubleiben. Eure Unterstützung und euer Vertrauen haben mir die Kraft gegeben, diese Herausforderung zu meistern.