

Der IRF3- und IRF7-Knockout im HBs-transgenen Mausmodell

Inauguraldissertation

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

vorgelegt von

David Christian Schwarz

aus Heinebach

Gießen 2019

Aus dem Zentrum für Innere Medizin
Medizinische Klinik II
Schwerpunkt Gastroenterologie
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
Leiterin: Univ.-Prof. Dr. med. Elke Roeb MHAC

1. Gutachter: Prof. Dr. Roeb
2. Gutachter: Prof. Dr. Glebe

Tag der Disputation: 16.03.2020

Teile der vorliegenden Arbeit wurden für folgende Publikationen verwendet:

Originalarbeiten:

Abstracts:

Schwarz D, Churin Y, Roderfeld M, Roeb E. IRF3/7-Knockout führt zu verminderter Interferon Response in HBs transgenen Mäusen. Z Gastroenterol 2016; 54 - KV172. DOI: 10.1055/s-0036-1586948. Abstract Vortrag DGVS 2016.

Schwarz D, Churin Y, Mollenkopf HJ, Roderfeld M, Roeb E. IRF3 und IRF7 sind zentrale Elemente der Typ I IFN Antwort bei Hepatitis B. Der Internist, Volume 59, Issue 1 Supplement, April 2018 - PS078. ISSN: 1432-1289. Abstract/Posterpräsentation DGIM 2018.

Meinen Eltern
und meinen Geschwistern

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	1
1.1	DIE LEBER	1
1.1.1	Anatomischer Aufbau	1
1.1.2	Histologischer Aufbau	2
1.1.3	Leberfibrose	2
1.2	DAS HEPATITIS-B-VIRUS	3
1.2.1	Aufbau	4
1.2.2	Epidemiologie & Übertragung	5
1.2.3	Pathogenese & Replikationszyklus	6
1.2.4	Erkrankungsverlauf	7
1.2.5	Akute Hepatitis B	8
1.2.6	Chronische Hepatitis B	9
1.2.7	Diagnostik	10
1.2.8	Therapie	11
1.3	IRF3 & IRF7: ZENTRALE ELEMENTE DER INTERFERON IMMUNANTWORT	13
1.3.1	Die Interferon-regulierenden Faktoren	13
1.3.2	Der Interferon-regulierende Faktor 3	15
1.3.3	Der Interferon-regulierende Faktor 7	16
1.4	INTERFERONE & INTERFERON-STIMULIERTE GENE	17
1.4.1	Typ-I-Interferone	18
1.4.2	Typ-II-Interferone	19
1.4.3	Typ-III-Interferone	19
1.4.4	Interferon-stimulierte Gene	19
1.5	DIE UNFOLDED PROTEIN RESPONSE	20
1.6	DAS HBS-TRANSGENE MAUSMODELL & DER IRF3/IRF7-DOPPELKNOCKOUT	22
1.6.1	Das HBs-transgene Mausmodell	22
1.6.2	Der IRF3/IRF7-Doppelknockout	22
1.7	ZIELSETZUNG	23
2	MATERIAL UND METHODEN	24
2.1	MAUSLINIEN	24
2.1.1	Verwendete Mauslinien	24
2.1.2	Haltungsbedingungen, Probenentnahme und Lagerung	25
2.2	ALLGEMEINE GERÄTE UND MATERIALIEN	26
2.3	KLINISCHE CHEMIE	29
2.4	HISTOLOGIE	29
2.4.1	Fixierung, Paraffineinbettung, Mikrotom	29
2.4.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	30
2.4.3	Sirius-Red-Färbung	30
2.4.4	Immunhistochemie	31
2.5	GENOMIK	33
2.5.1	Microarray	33
2.5.2	RNA-Isolierung	33
2.5.3	Messen der RNA-Konzentration mittels Spektrophotometrie	34
2.5.4	Transkription von mRNA in cDNA	34
2.5.5	Real-Time-Quantitative PCR	35
2.5.6	Relative Quantifizierung mittels $\Delta\Delta C_t$	38
2.6	PROTEOMIK	39
2.6.1	<i>Proteom Profiler</i>	39
2.6.2	Western Blot	41
2.7	STATISTISCHE METHODEN	46

3.	ERGEBNISSE	48
3.1	CHARAKTERISIERUNG UND VERIFIZIERUNG DES MAUSMODELLS	48
3.1.1	Expression von HBV-Oberflächenproteinen	48
3.1.2	Überprüfung der IRF3/7-Expression	49
3.2	ÜBERPRÜFUNG PATHOLOGIE	50
3.2.1	Hepatische Schädigung	50
3.2.2	Cholestaseparameter	54
3.3	AUSWIRKUNGEN AUF IMMUNANTWORT UND ASSOZIIERTE SIGNALWEGE	56
3.3.1	Auswirkungen des Knockouts auf <i>Upstream</i> -Signaltransduktion	56
3.3.1.1	dsDNA - STING - TBK1 - IRF3 - Signalkaskade	56
3.3.1.2	RalB-Sec5-TBK1-Signalkaskade	57
3.3.2	Auswirkung des Knockouts auf <i>Downstream</i> -Signaltransduktion	57
3.3.2.1	STAT1/STAT2/IRF9-Signalkaskade	57
3.3.2.2	Interferon-stimulierte Gene	58
3.3.2.3	ISG15/USP18-Signalweg	60
3.3.2.4	Serum-Analyse mittels <i>Proteom Profiler</i>	61
3.3.3	Überprüfung durch HBs-Transgenität aktivierter Signalkaskaden	63
3.3.3.1	<i>Unfolded Protein Response</i>	63
3.3.3.2	Akute-Phase-Reaktion	66
3.3.4	Bisher nicht als Interferon-stimulierte Gene beschriebene im Knockout regulierte Gene	68
3.4	TUMORGENESE	69
4.	DISKUSSION	70
4.1	DER EINFLUSS DES IRF3/7-KNOCKOUTS AUF DIE LEBERPATHOLOGIE HBs-TRANSGENER MÄUSE	70
4.1.1	Der IRF3/7-Doppelknockout zeigt keine Hinweise für eine Verminderung der durch die HBs-Transgenität bedingten Leberschädigung	70
4.1.2	Der IRF3/7-Doppelknockout bedingt keine Gallengangsschädigungen	71
4.2	PROOF OF PRINCIPLE: DER IRF3/7-KNOCKOUT INHIBIERT DIE INTERFERON-ANTWORT IM HBs-TRANSGENEN MAUSMODELL	72
4.2.1	Der IRF3/7-Knockout inhibiert die IFN-Antwort und assoziiertes <i>ISG Signaling</i> in HBs-transgenen Mäusen	72
4.2.2	Identifikation von bisher nicht als ISGs beschriebener im IRF3/7-Knockout regulierter Gene	74
4.2.3	Der IRF3/7-Knockout reduziert Zytokine und Chemokine im Serum	77
4.3	DER EINFLUSS DES IRF 3/7-KNOCKOUTS AUF IMMUNOLOGISCHE SIGNALTRANSDUKTION	79
4.3.1	Die Verknüpfung von IRF und Akuter-Phase-Reaktion	79
4.3.2	<i>Cell Stress Signaling</i> – Assoziation von IRF und Trex1	80
4.3.3	Der IRF 3/7-Knockout zeigt keinen direkten Einfluss auf die <i>Unfolded Protein Response</i>	82
4.4	TUMORNACHWEIS	83
4.5	LIMITATIONEN DES MAUSMODELLS	83
9.	ZUSAMMENFASSUNG	86
6.	SUMMARY	88
7.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	90
8.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	94
9.	TABELLENVERZEICHNIS	95
10.	LITERATURVERZEICHNIS	96

11.	ERKLÄRUNG	109
12.	DANKSAGUNG	110

1. EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

Hepatitis B ist eine virale Erkrankung, die als eine der häufigsten globalen Infektionen auch im 21. Jahrhundert nach wie vor einen lebensbedrohlichen Verlauf nehmen kann. Verursacht durch das parenteral über Blut und Körperflüssigkeiten übertragene Hepatitis-B-Virus, kann die Erkrankung im klinischen Verlauf von einer akuten in eine chronische Hepatitis übergehen. Weltweit lag 2015 die Prävalenz der chronischen Hepatitis B bei geschätzten 257 Millionen Menschen. Verursachte Komplikationen, wie u.a. Zirrhose und hepatozelluläres Karzinom (HCC), forderten im selben Zeitraum 887.000 Menschenleben. Als virale Infektion induziert das Hepatitis-B-Virus (HBV) eine angepasste Immunantwort, welche vor allem über Interferone gesteuert wird. Die als essenzielles Element in der Interferonantwort identifizierten Interferon-regulierenden Faktoren 3 und 7 (IRF3 und IRF7) sind in dieser Arbeit von zentralem Interesse. Ein für die Oberflächenantigene des HBV transgenes Mausmodell, das in seinem Verlauf dem der chronischen Hepatitis ähnelt, wurde von uns mit einem Doppelknockout von IRF3 und IRF7 kombiniert. Dies ermöglichte uns zum einen, *in vivo* überprüfen zu können, inwieweit der IRF3/7-Doppelknockout die *Interferon Response* inhibiert. Zum anderen konnte nachvollzogen werden, welche Konsequenzen sich für den Verlauf der Pathologie der HBs-Transgenität ergeben.

1.1 DIE LEBER

Die Leber (*Hepar*) ist mit durchschnittlichen 1500 g Gewicht das größte solide Organ des menschlichen Körpers. Als eines der zentralen am Stoffwechsel beteiligten Organe ist die Leber fundamental für den Stoffwechsel von Kohlenhydraten, Proteinen und Fetten. Sie sezerniert als exokrine und endokrine Drüse Gallensäuren, Serumproteine, Gerinnungsfaktoren und Lipoproteine. Zudem ist sie über die Biotransformation wichtigstes Organ für die Entgiftung körpereigener und -fremder Stoffe [1].

1.1.1 Anatomischer Aufbau

Von einer Kapsel umgeben liegt die Leber intraperitoneal im rechten Oberbauch. Die Blutversorgung zeigt entsprechend der zentralen Rolle der Leber im Stoffwechsel einige Besonderheiten. Neben der eigentlichen Blutversorgung über die sauerstoffreiche *Arteria hepatica propria* erfolgt die Durchblutung der Leber zusätzlich zu 70% durch postkapilläres Blut der *Vena portae*. Deren sauerstoffarmes, nährstoffreiches Blut entstammt

dem Kapillargebiet von Magen-Darmtrakt, Pankreas und Milz. Intrahepatisch verlaufen Pfortaderäste, Leberarterien und Gallengänge parallel. Entsprechend der Endäste der Pfortader wird die Leber in acht Segmente unterteilt, die in ihrer Funktion mehr oder weniger unabhängig voneinander sind. Die venöse Drainage erfolgt über die Zentralvenen und die *Venae hepaticae* in die *Vena cava inferior* [2].

1.1.2 Histologischer Aufbau

Zentrales Element des Leberparenchyms sind die sogenannten Zentralvenen-Läppchen, die die Hepatozyten, Sinusoide und jeweils eine Zentralvene enthalten. Längs zu den in etwa sechseckigen Leberläppchen ziehen, von der Kapsel ausstrahlend, bindegewebige Ausläufer in das Leberparenchym. Im histologischen Schnitt stellen sich diese als sogenannte Portalfelder dar. In ihnen verlaufen, neben Lymphgefäßen und Nerven, parallel Pfortaderäste, Leberarterien und Gallengänge, die als *Glisson-Trias* bezeichnet werden. Aus Pfortader- und Leberarterienästen gelangt das Blut als Mischblut, nährstoffreich und sauerstoffreich, in die Sinusoide, die sich radiär durch die Leberläppchen zu den Zentralvenen ziehen. Die zwischen den Sinusoiden liegenden Hepatozyten sind Ort des Stoffaustausches bei der Blutpassage. In den Sinusoiden finden sich zusätzlich leberspezifische Makrophagen, als Kupffer-Zellen bezeichnet und zudem vereinzelt fett-haltige Ito-Zellen. Diese mittlerweile Sternzellen (*Hepatic Stellate Cells*, HSC) genannten Zellen sind neben ihrer Vitamin-A-Speicherfunktion vor allem für die Produktion von Bindegewebsfasern und sonstiger extrazellulärer Matrix relevant, deren vermehrte Produktion pathophysiologisch für die Entstehung einer Leberzirrhose bedeutend ist [1].

1.1.3 Leberfibrose

Die Leberfibrose ist pathologische Folge einer Reihe von chronischen Prozessen viraler, autoimmuner, medikamentös-toxischer, cholestatischer und metabolischer Genese [3]. Ursächlich ist letztlich ein Ungleichgewicht zwischen Auf- und Abbau von extrazellulärer Matrix (ECM) mit Zerstörung des physiologischen Leberparenchyms. Die Leberfibrose ist im Prinzip reversibel, eine Progredienz führt zum Stadium der nicht reversiblen Leberzirrhose, also einer kompletten Vernarbung des Organs, mit schließlich einhergehendem Leberversagen. Chronische Lebererkrankungen verursachen ein vermehrtes Anfallen von Matrixproteinen wie Elastin, Hyaluron, Proteoglycanen, Fibronectin und vor allem Fibrin-bildendes Kollagen. Der verursachte Verlust von hepatozytären Microvilli und endothelialer Fenestrierung führt über die portale Hypertension zu einer hepatozellulären Dysfunktion [4].

Eine Vielzahl von Zellen ist am Umsatz von ECM beteiligt. Zentral sind hierbei die Myofibroblasten, die sich vor allem aus den HSC ableiten, zudem spielen auch portale Fibroblasten, mesenchymale Stammzellen des Knochenmarks, sowie durch zelluläre Transition entstandene mesenchymale Zellen endo- und epithelialen Ursprungs eine Rolle [5].

Quantifizierung von Leberschädigung mittels Hepatitis-Aktivitätsindex-Score & Desmet-Score

Zur objektiven Beurteilung von histologischen Leberveränderungen existieren verschiedene semiquantitative Scoring-Systeme. Mit diesen wird in der Regel zum einen eine Beurteilung der entzündlichen Aktivität, ein *Grading*, und zum anderen eine Einschätzung des Fibrosestadiums, ein *Staging*, durchgeführt.

Der modifizierte Hepatitis-Aktivitätsindex (mHAI)-Score nach Ishak ermittelt anhand von vier mikroskopischen erhobenen Teilscores einen Gesamtscore, welcher prognostisch mit der Entwicklung einer Fibrose korreliert [6]. Die histopathologische Klassifikation mittels mHAI-Score ist mit insgesamt 18 Scorepunkten verhältnismäßig aufwendig, weshalb er vor allem im Rahmen von Studien verwendet wird.

In der Routinediagnostik wird meist das Grading und Staging nach Desmet durchgeführt [7]. Zur Quantifizierung der Entzündung erfolgt anhand von histologischen Merkmalen ein Grading in vier Stufen, von minimal bis hochgradig. Das Fibrosestaging erfolgt in fünf Stufen, von 0 bei nicht vorliegender Fibrose bis 5 beim histologischen Bild einer Zirrhose.

1.2 DAS HEPATITIS-B-VIRUS

Das Hepatitis-B-Virus (HBV) stellt vor allem aufgrund der mit einer chronischen Erkrankung einhergehenden Komplikationen eine Gefahr für die globale Gesundheit dar. Das zu den Hepadnaviridae gehörende DNA-Virus HBV ist weitestgehend hepatotrop und kaum zytopathogen. Die Entdeckung des *Australia Antigen* 1967 durch Baruch Blumberg, das später als *HBV surface Antigen* (HBsAg) identifiziert werden konnte, war der erste Schritt in der Erforschung des HBV. Seitdem 1970 das HBV, noch nach seinem Beschreiber David Dane als *Dane-Partikel* bezeichnet, entdeckt wurde, haben sich Diagnostik, Therapie und Prognose der HBV-Infektion deutlich verbessert [8].

1.2.1 Aufbau

Das HBV zählt als hepatotropes DNA-Virus zu den Hepadnaviren, genauer zum Genus der Orthohepadnaviren. Mittels Sequenzvergleichen konnte das HBV in die acht Genotypen A-H unterteilt werden, die jeweils eine unterschiedliche geographische Verteilung haben. Elektronenmikroskopisch zeigt sich das HBV-Virion im wasserfreien Zustand als eine sphärische Struktur mit einem Durchmesser von ca. 45 nm [9]. Wie alle Hepadnaviren setzt sich HBV aus einer partiell doppelsträngigen DNA, einem Kapsid und einer Virushülle zusammen (siehe Abbildung 1, A). Die Virushülle als äußerste Schicht besteht aus einer Lipidmembran, in der sich drei identifizierte Oberflächenproteine (HBs) befinden. Ihrer Größe entsprechend werden sie als S-(small)-HBs, M-(medium)-HBs und L-(large)-HBs bezeichnet. Hierbei wird SHBs aus der S-Domäne, MHBs aus S- und preS2-Domäne, und LHBs aus S-, preS1- und preS2-Domäne der viralen DNA gebildet. Das Nukleokapsid (*HBV core*=HBc) setzt sich aus 240 verschiedenen Untereinheiten zusammen, die sich in Dimeren ikosaedrisch um die DNA anordnen [10]. Die 3,2 Kilobasenpaare große, partiell doppelsträngige virale DNA liegt im Virion zirkulär vor [11]. Das Genom des HBV ist eines der kleinsten bekannten viralen Genome. Vier sich überlappende *Open Reading Frames* (ORFs) im Genom erklären die gleichzeitige Komplexität des HBVs. Die ORFs kodieren für preC/Core-, Polymerase-, preS1-/preS2-/Surface- und X-Protein [12]. Der Minusstrang der DNA kodiert dabei für die virale mRNA und die virale prägenomische RNA. Der positive Strang ist in seiner Länge variabel und kodiert nicht für virale Proteine. Am 5'-Ende beider DNA-Stränge befinden sich direkte Wiederholungssequenzen (DR1 und DR2) von 11bp, die entscheidend für die Replikation beider Stränge sind [13] (siehe Abbildung 1 B).

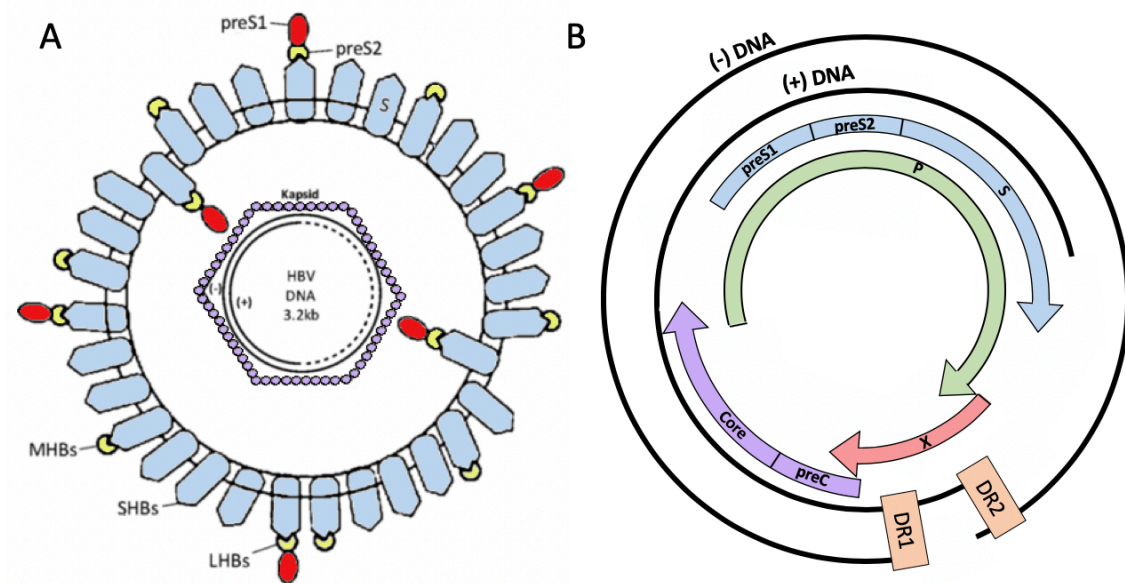


Abbildung 1) Aufbau des Hepatitis-B-Virus A) Schematischer Aufbau des HBV-Virions.

Das HBV-Virion besteht zum einen aus einer Virushülle, in deren Lipidmembran sich die drei Oberflächenproteine SHBs, MHBs und LHBs befinden. Alle drei Proteine haben das kleine Oberflächenprotein S als Bestandteil. MHBs enthält zusätzlich preS2, LHBs preS1 und preS2. Zentral befindet sich das ikosaedrische Kapsid, das sich aus den Core-Untereinheiten zusammensetzt. Im Kapsid liegt die 3,2 Kilobasenpaare große, partiell doppelsträngige, zirkuläre virale DNA **B) Schematischer Aufbau des HBV-Genoms.** Das HBV-Genom beinhaltet vier sich überlappende *Open Reading Frames*. Diese kodieren für die Virushülle (*preS1/preS2/S1*), die Core-Proteine (*preC/Core*), die virale Polymerase (P) und das HBX-Protein (X). Die am 5'-Ende des negativen und positiven DNA-Strangs lokalisierten *direct Repeats* (DR) DR1 und DR2 spielen eine kritische Rolle in der viralen Genomreifung (Abbildung modifiziert nach [14], [8])

1.2.2 Epidemiologie & Übertragung

Nahezu die Hälfte der Weltbevölkerung hatte vermutlich schon Kontakt mit dem Hepatitis-B-Virus [15]. Im Jahr 2015 lebten nach Schätzungen der WHO etwa 257 Millionen Menschen mit einer chronischen Hepatitis B-Infektion. Die Prävalenz zeigte dabei eine endemische Verteilung, 68% der chronisch Infizierten verteilten sich auf Afrika und den westpazifischen Raum. Trotz der seit 1982 zur Verfügung stehenden Impfung führten vor allem erkrankungsbedingte Komplikationen wie Zirrhose und das hepatozelluläre Karzinom zu 887.000 Toten [16]. Aktuell kommt es, bedingt durch Migration und Populationsverschiebungen, zu Veränderungen von Prävalenz und Inzidenz in bisher wenig endemischen Ländern wie unter anderem Deutschland [17].

Das Hepatitis-B-Virus kann außerhalb des Körpers für eine Woche überleben, während der es infektiös bleibt. Im Allgemeinen kann das Hepatitis-B-Virus parenteral, perinatal und sexuell durch kontaminierte Körperflüssigkeiten übertragen werden. In endemischen Regionen wird Hepatitis B vor allem perinatal von Mutter auf Kind oder horizontal durch

Exposition mit infiziertem Blut übertragen. Zudem kann es zu einer perkutanen oder mukosalen Übertragung bei Kontakt mit infektiösem Blut und anderen Körperflüssigkeiten wie unter anderem Speichel, Vaginal- oder Samenflüssigkeit kommen [18]. Aufgrund der meist extrem hohen Virämie reicht oft bereits der Kontakt mit geringsten Mengen infizierten Bluts.

1.2.3 Pathogenese & Replikationszyklus

Als hepatotropes Virus wird das HBV ausschließlich in Leberzellen repliziert. Nach einer Infektion kommt es, abhängig von der Viruslast, nach einem bis sechs Monaten zur Leberentzündung, der sogenannten Hepatitis [19]. Die frühe Phase der Immunantwort ist vor allem über das angeborene Immunsystem gesteuert. Zum einen können infizierte Hepatozyten über natürliche Killerzellen (NK-Zellen) abgebaut werden. Zum anderen ist die Induktion der Produktion von Interferon alpha (IFN α) ein zentraler Mechanismus der angeborenen Immunität [20]. Über weitere ausgeschüttete Zytokine und Chemokine findet die komplexe verknüpfte Aktivierung der spezifischen Immunantwort statt [19]. CD8⁺ zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) und CD4⁺ T-Helferzellen (TH) sind als Teil der spezifischen Immunität essenziell für die Virusabwehr. Während die genauen Prozesse noch unklar sind, ist bekannt, dass das Ausmaß der Induktion von CTL und TH mit über den akuten oder chronischen Verlauf der Erkrankung entscheidet [21]. Im Rahmen eines chronischen Verlaufes ist vor allem die Immunantwort bzw. die Zytolyse für die hepatische Schädigung verantwortlich, zudem kommt es durch die Akkumulation viraler Proteine auch zur Entstehung von Zellstress [22].

Der Mechanismus der Aufnahme des Virus in die Zelle wurde lange diskutiert, aktuell wird eine Vermittlung über Interaktionspartner angenommen. Es konnte gezeigt werden, dass nach Interaktion mit Heparansulfat-Proteoglykanen (HSPG) eine Bindung des HBV an den Gallensäurertransporter *Natrium-Taurocholate-Cotransporting-Polypeptide* (NTCP) zustande kommt, über den die Aufnahme des Virus mittels Bindung an die preS1-Domäne des großen Hüllproteins stattfindet [23]. In der Wirtszelle findet folgend das virale *Uncoating* und der Transport in den Zellkern statt. Dort wird die virale, partiell doppelsträngige DNA wahrscheinlich mittels zellulärer Reparatursmechanismen in cccDNA (*covalently closed circular DNA*) konvertiert [24]. Die cccDNA fungiert als Template für die Transkription aller viraler RNA. Mittels der RNA-Polymerase II wird im nächsten Schritt die virale mRNA transkribiert. Es entstehen dabei mehrere RNA-Stränge unterschiedlicher Größe. Darunter befindet sich ein 3,5 kb Transkript mit zwei sich am 5'-Ende unterscheidenden Varianten, der prägenomischen RNA (pgRNA) und der *precore*-RNA. Die pgRNA fungiert zum einen als Template für die reverse Transkription, kodiert

andererseits für Kapsid und virale Polymerase. Die precore-RNA kodiert für das precore-Protein. Ein 2,4 kb Transkript kodiert für LHB und Varianten eines 2,1 kb Transkripts für MHB und SHB. Zudem liegt ein für HBx translatierendes 0,7 kb Transkript vor [25]. SHB, MHB, LHB und HBe werden im endoplasmatischen Retikulum (ER) translatiert, HBe zudem über den Golgi-Apparat vesikulär sezerniert. Die virale Polymerase und HBc werden über freie zytoplasmatische Ribosomen translatiert. Aus der pgRNA erstellt die virale Reverse Transkriptase in den synthetisierten Nukleokapsiden den negativen Strang der viralen DNA, der dann wiederum als Vorlage für die Synthese des inkompletten positiven Strangs dient. Im folgenden Schritt wird, wieder im ER, das entstandene Nukleokapsid mit einer Lipiddoppelschicht umhüllt, in der die HBV-Oberflächenproteine eingelagert sind. Die Freisetzung der generierten HBV-Virionen erfolgt schließlich durch vesikuläre Exozytose [14].

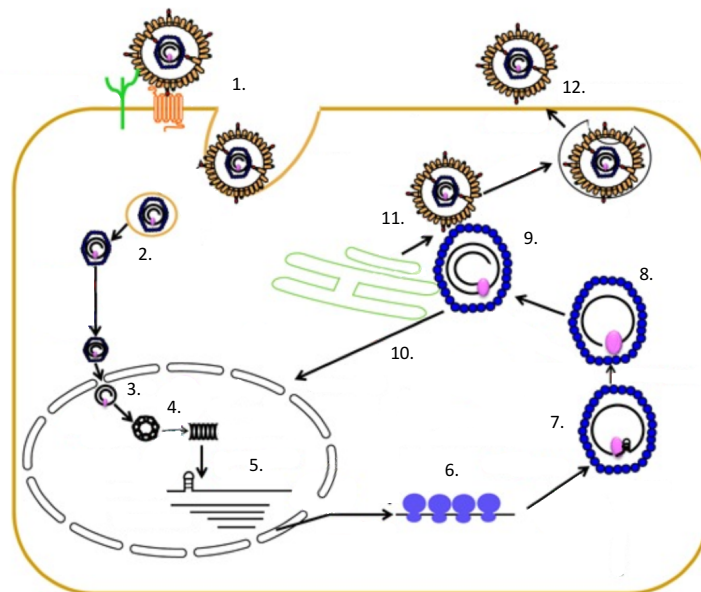


Abbildung 2) Intrazelluläre Replikation des Hepatitis-B-Virus. 1. Adsorption und Endozytose - HSPG und NTCP vermittelt 2. Freisetzung des Nukleokapsids (*Uncoating*) 3. Transport in den Zellkern 4. Erstellung der cccDNA 5. Transkription 6. Translation im ER und ribosomal 7. Enkapsidation mit HBc 8. Synthese des negativen DNA-Strangs durch die virale Polymerase 9. Synthese des inkompletten positiven DNA-Strangs 10. Transport in den Zellkern zur Erhöhung des Viruspools, oder 11. *Assembling* des Virions. Nukleokapsid wird mit Lipiddoppelmembran und HBV Oberflächenproteinen umgeben 12. Freisetzung des Virions. Modifiziert nach [14]

1.2.4 Erkrankungsverlauf

Im Rahmen einer Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus kann es nach einer Inkubationszeit zur Entwicklung einer Hepatitis B kommen. Diese wird ihrem Verlauf nach in eine akute und eine chronische HBV-Infektion unterteilt. Die klinisch hoch variable Erkrankung ist

in ihrem Progress zum einen von Immunkompetenz, Alter, Geschlecht, zum anderen vor allem auch von der Viruslast abhängig. Zur Diagnose und Differenzierung des Verlaufs steht die Bestimmung viraler Antigene und Antikörper, sowie von Leberenzymen im Serum im Fokus. Kommt es zu einer Erholung, ist vor allem im Rahmen der chronischen Hepatitis B zu beachten, dass es häufig nicht zu einer tatsächlichen Ausheilung kommt, sondern dass der Status eines gesunden Trägers vorliegen kann.

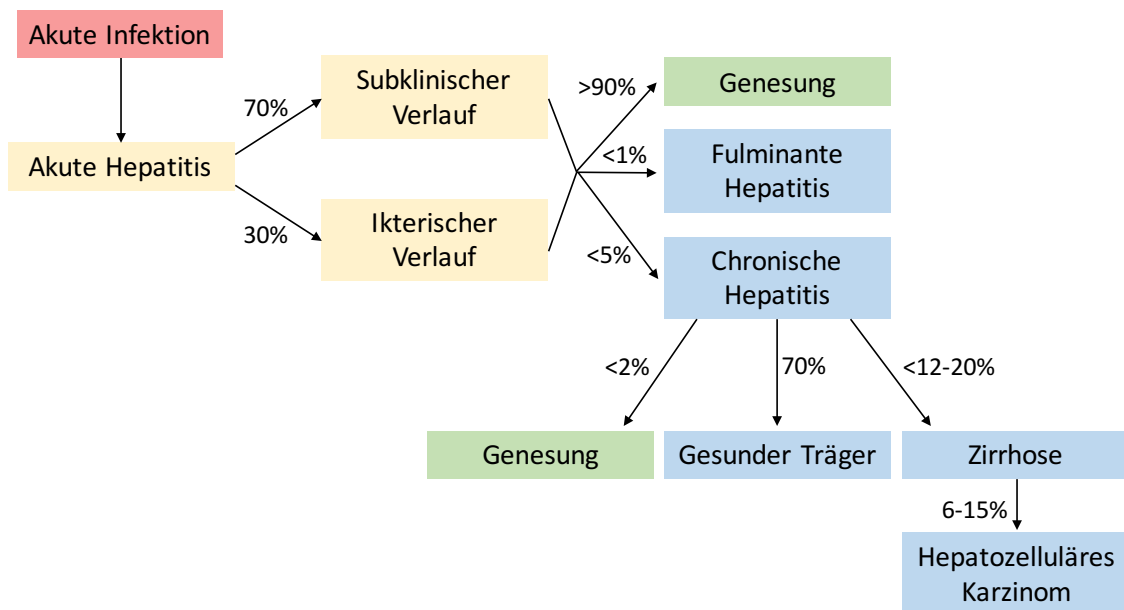


Abbildung 3) Schematischer Verlauf der Hepatitis B-Infektion. Die akute Hepatitis verläuft in ca. zwei Drittel der Fälle subklinisch, nur etwa 30% zeigen einen ikterischen Verlauf. Insgesamt kommt es bei über 90% zur Ausheilung. Zeigt sich ein chronischer Verlauf, sind mit 70% der Großteil der Erkrankten gesunde Träger, sogenannte *Carrier*. Bis zu 20% der an einer chronischen Hepatitis B Erkrankten entwickeln im Verlauf eine Leberzirrhose, aus der wiederum als Komplikation das hepatozelluläre Karzinom entstehen kann. Modifiziert nach [26]

1.2.5 Akute Hepatitis B

Im Erwachsenenalter folgt der Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus in der Mehrheit der Fälle ein subklinischer Verlauf mit anschließender Elimination des Virus und sich daraus ergebender Immunität. In nur etwa einem Drittel der Verläufe kommt es - vor allem im Rahmen hoch virämischer Infektionen - zu einem, in der klinischen Manifestation variablen, symptomatischen Verlauf der akuten Hepatitis B (AHB). In der sogenannten Prodromalphase kommt es zu relativ unspezifischen Symptomen mit grippaler Symptomatik, Oberbauch- und Gelenkschmerzen, sowie allgemeiner Müdigkeit. Hierbei kann ein Anstieg des HBs-Titers, der HBV-DNA und der Transaminasen im Blut nachgewiesen werden. In der Folge kann es zur Ausbildung eines Ikterus kommen, der sich im Laufe von

ein bis zwei Wochen zurückbildet. Letztlich heilen über 90% der durch das HBV bedingten akuten Hepatitiden folgenlos aus. Im Labor zeigt sich dies in einer Serokonversion: für HBs und HBe sind nicht mehr die Antigene, sondern die Antikörper im Serum nachweisbar. Selten, in weniger als 1% der Fälle, kommt es zu einem fulminanten Verlauf mit Leberversagen und hepatischer Enzephalopathie. Die Letalität liegt dabei bei 70% [25].

1.2.6 Chronische Hepatitis B

Eine chronische HBV-Infektion ist ein dynamischer Prozess, der vor allem von der Interaktion zwischen HBV-Replikation und Immunantwort abhängig ist. So sind nicht alle chronisch HBV-Infizierten auch an einer chronischen Hepatitis B (CHB) erkrankt [27]. Die CHB ist definiert durch eine HBV bedingte Hepatitis, die für länger als 6 Monate mit positivem HBs-Titer persistiert. Die Wahrscheinlichkeit für den Übergang in eine chronische Hepatitis B hängt dabei unter anderem stark vom Alter der Infizierten ab. Kommt es perinatal zu einer Infektion mit HBV, liegt die Wahrscheinlichkeit für einen chronischen Verlauf bei 80-90%. Bei Kindern unter 5 Jahren liegt die Rate bei 30-50%. Im Vergleich kommt es im Erwachsenenalter bei gegebener Immunkompetenz nur bei weniger als 5% der Erkrankten zu einer Chronifizierung [28]. Vor allem die assoziierten Komplikationen sind bei der CHB für die Prognose entscheidend. 20-30% der an einer CHB Erkrankten entwickeln im Verlauf eine Zirrhose und/oder Lebertumoren [18].

Die CHB kann unter Betrachtung der Parameter HBeAg, HBsAg, anti-HBc, HBV-DNA und Serum-Alanin-Aminotransferase (ALT) als Indikator für das Vorliegen einer Hepatitis, in fünf Phasen unterteilt werden. Dabei ist zu beachten, dass nicht alle Erkrankten einer der Phasen definitiv zugeordnet werden können und die Phasen zudem nicht strikt aufeinander folgen müssen. Die erste Phase, als *HBeAg-positive Infektion* bezeichnet, zeigt eine hohe HBV-Replikationsrate, einen HBs-Nachweis im Serum, sowie normwertige ALT. Sie kommt häufiger im Rahmen perinataler Infektionen vor und ist dann in ihrer Dauer verlängert [29]. Die zweite Phase, die *HBeAg-positive Hepatitis*, folgt meist einige Jahre nach Phase 1 und weist im Vergleich zusätzlich erhöhte ALT-Werte auf. Ursächlich zeigt sich dafür eine beginnende bis schwere Inflammation der Leber mit fortschreitender Fibrose. In der Folge kommt es bei den meisten Patienten zu einer Serokonversion von HBe zu anti-HBe und einer HBV-DNA-Suppression, der als *HBeAg-negative chronische Infektion* bezeichneten Phase 3. Bei einigen Patienten persistiert die HBV-DNA, dies wird als Phase 4 oder *HBeAg-negative chronische Hepatitis* bezeichnet. Die *HBs-negative Phase 5*, auch als okkulte HBV-Infektion bezeichnet, ist gekennzeichnet durch Serum-negatives HBs und gleichzeitigem Nachweis von anti-HBc. Anti-HBc kann, muss aber nicht nachweisbar sein [27].

Das Risiko im Rahmen einer progredienten CHB eine Zirrhose bzw. ein hepatozelluläres Karzinom zu entwickeln, hängt von der Immunantwort des Erkrankten ab. Die Wahrscheinlichkeit innerhalb von 5 Jahren bei unbehandelter CHB eine Zirrhose zu entwickeln liegt bei 8-20% [29]. Bei vorliegender Zirrhose besteht eine Einjahreswahrscheinlichkeit für das Entstehen eines HCC von 2-5% [30]. Trotz der seit 1982 zur Verfügung stehenden Impfung, die eine sichere Präventionsmaßnahme darstellt, ist die Mortalität der chronischen HBV-Infektion durch die assoziierte Leberzirrhose und/oder hepatozellulären Karzinome (HCCs) zwischen 1990 und 2013 um 33% gestiegen [31].

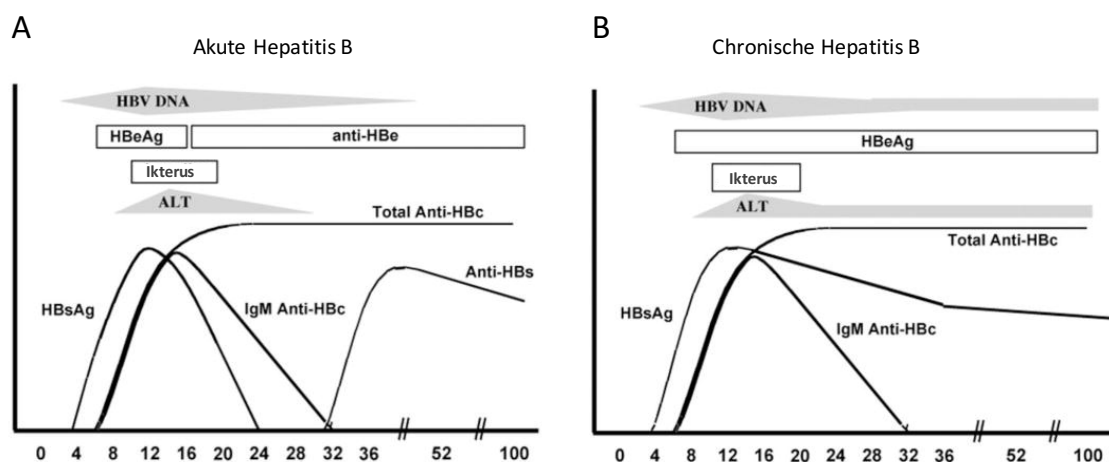


Abbildung 4) Serologischer Verlauf der HBV-Infektion. A) Akute Hepatitis B. Im Laufe der präikterischen Phase kommt es neben klinischen Symptomen zu einem Anstieg von Serum-ALT, sowie zum Nachweis von HBs und HBV-DNA. In der ikterischen Phase fallen die DNA-Level. Im Laufe der Genesung kommt es zur HBs-Serokonversion, HBV-DNA fällt unter nachweisbare Niveaus **B) Chronische Hepatitis B.** In der Anfangsphase können HBs, HBeAg und HBV-DNA in hohen Titern nachgewiesen werden. Die ALT (Alanin-Aminotransferase) ist moderat erhöht. Im Verlauf können die Marker durch die Entwicklung einer Immuntoleranz in hohem Titer nachweisbar bleiben, oder im Rahmen eines inaktiven Träger-Status abfallen. Auch eine CHB mit Verlust von HBeAg und Entwicklung von anti-HBe ist möglich. Modifiziert nach [25]

1.2.7 Diagnostik

Zur Diagnostik der Hepatitis B gehört neben einer detaillierten Anamnese und körperlichen Untersuchung die Beurteilung einer Beeinträchtigung der Leber und eine Erhebung der Serummarker der HBV-Infektion. Wichtigster Faktor in der Diagnose ist der Nachweis des *Hepatitis B Surface Antigens* (HBsAg) im Serum, dessen alleiniger Nachweis für die Diagnose einer Infektion genügt [32]. Bei Verdacht auf eine AHB sollte die serologische Untersuchung die Überprüfung von HBs und anti-HBs, gegebenenfalls von HBeAg und anti-HBe beinhalten. Besteht ein Verdacht auf eine CHB, sollte serologisch initial HBs und anti-HBc bestimmt werden, sowie der quantitative Nachweis von HBV-DNA und zudem HBeAg und anti-HBe geschehen [33]. HBeAg und anti-HBe sind hierbei

essenziell für die Bestimmung der Phase der Infektion [27]. In der Frühphase einer Hepatitis B kann der Nachweis von HBs negativ ausfallen, bei weiterhin bestehendem Verdacht einer Infektion sollte die HBV-DNA bestimmt werden. Neben der serologischen Befundung sollte zudem ein Ultraschall des Abdomens und im Rahmen der Klärung des therapeutischen Vorgehens, eine Biopsie durchgeführt werden. Hierdurch kann die entzündliche Aktivität und eine Fibrose bestimmt werden. Zur Bestimmung der Leberfibrose stehen zudem nichtinvasive Verfahren wie die Elastographie zur Verfügung. Der Goldstandard für Grading und Staging ist aber bislang die Biopsie [33]. Zur Komplettierung der Diagnostik können zudem bildgebende Verfahren durchgeführt werden. Im Allgemeinen sollten Komorbiditäten wie metabolische und autoimmune Lebererkrankungen ausgeschlossen werden, sowie virale Ko-Infektionen mit Hepatitis A, C und D.

1.2.8 Therapie

Ziel der medikamentösen Therapie einer HBV-Infektion ist das Verhindern des Fortschreitens der Hepatitis, sowie die Verbesserung der Leberfunktion im Rahmen bereits eingetretener Leberschäden. Im Allgemeinen sind die Höhe der HBV-DNA und die Lebertransaminasen zentraler Faktor zur Beurteilung einer Therapieindikation. Das Stadium der Leberschädigung, die Entzündungsaktivität, die Krankheitsdauer, das Alter des Patienten, der HBeAg-Status und die Viruslast spielen eine wichtige Rolle für die Wahl der zur Verfügung stehenden Therapieoptionen [32].

Akute Hepatitis B

Eine nachgewiesene AHB zeigt eine hohe Spontanheilungsrate. In statistisch über 90% kommt es zur Genesung, eine Therapie ist in der Regel deshalb grundsätzlich nicht indiziert. Die Gabe antiviraler Medikamente zur Verbesserung der Ausheilung wird diskutiert, nach aktueller Studienlage konnte bisher jedoch keine Empfehlung ausgesprochen werden [34], [35]. Zur Überprüfung der Genesung sollten anti-HBs-Antikörper nachgewiesen werden, deren Titer über 10 IU/l sein sollte. Sollte es zu einem fulminanten Verlauf mit Einschränkung der Leberfunktion kommen, konnten die Vorteile einer antiviralen Behandlung gezeigt werden [35], außerdem sollte hier gegebenenfalls frühzeitig mit einem Transplantationszentrum Kontakt aufgenommen werden [33].

Chronische Hepatitis B

Im Rahmen einer CHB ist grundsätzlich für alle Patienten eine antivirale Therapie möglich. Die Indikation zur Therapie ist vor allem von der Höhe der Viruslast, also der HBV-DNA, in Zusammenschau mit der Transaminasen-Aktivität und dem Fibrostatus abhängig. Niedrig-replikative Verlaufsformen der CHB mit günstiger Prognose haben meist

keine direkte Therapieindikation. Hoch-replikative Formen mit einer hohen Kopienlast von HBV-DNA haben hingegen, vor allem im Rahmen der immunaktiven Form mit hoher entzündlicher Aktivität, ein hohes Risiko für die Entwicklung einer Leberzirrhose [36]. Auch die Inzidenz eines HCC korreliert stark mit der Höhe der HBV-DNA [30]. Eine sichere Indikation für den Beginn einer Behandlung besteht bei einer Viruslast von >2000 IU/ml, bei gleichzeitig erhöhter Transaminasen-Aktivität, da hier ein hohes Risiko für die Entwicklung einer Leberzirrhose und eines HCC besteht [33]. Hauptziel aktueller Behandlungsstrategien ist die Unterdrückung der HBV-DNA-Level. Häufig mit Suppression von HBV-DNA einhergehend, aber auch unabhängiges Therapieziel, ist die Normalisierung der Transaminasen. Zudem sollte der Verlust von HBeAg angestrebt werden. Der Verlust von HBs ist optimales Therapieziel, da dies eine Suppression von Virusreplikation und Proteinexpression bedeutet [27]. Langfristig soll die Therapie der CHB einen Progress mit Leberzirrhose, hepatischer Dekompensation, Entwicklung eines HCC und damit einhergehende Mortalität verhindern [33]. Für die medikamentöse Therapie stehen aktuell drei Medikamentenklassen zur Verfügung. Dies sind zum einen die alpha-Interferone (IFN α), die Nukleosid-Analoga Lamivudin und Entecavir, sowie die Nukleotid-Analoga Adefovir und Tenofovir. Eine Interferon-alpha-basierte Therapie sollte bei allen Patienten in Erwägung gezogen werden, hierbei aktuell aber nur pegyliertes-IFN α eingesetzt werden [33]. Die Therapie mit nukleos(t)idischen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren ist von Viruslast und Stadium der Leberfibrose abhängig. Für wenige Fälle kommt als Erstlinientherapie aktuell eine Monotherapie mit pegyliertem IFN α in Frage. Mehrheitlich wird an Viruslast und Komorbiditäten angepasst eine Therapie mit einem nukleos(t)idischen Reverse-Transkriptase-Inhibitor durchgeführt.

Inhibition der Interferon-alpha-Therapie durch das Hepatitis-B-Virus

Nach inzwischen 40-jähriger Erfahrung hat IFN α auch heute noch eine Relevanz in der Therapie der Hepatitis B. Die Funktionsweise von Interferonen ist nach wie vor nicht in ihrer Gesamtheit verstanden, wobei unter anderem gezeigt werden konnte, dass IFN α die Transkription viraler cccDNA inhibiert [37]. Vorteil der Therapie mit IFN α ist, dass es die körpereigene Immunität verstärkt und die nachhaltige Auflösung einer Erkrankung beschleunigt. Dabei gilt zu beachten, dass IFN α nur bei einer Minderheit der Patienten einen kurativen Erfolg zeigt. Günstiger Prognosefaktor sind hohe Transaminasen und eine geringe Viruslast, auch der virale Genotyp spielt eine Rolle [38], [39]. Es ist bekannt, dass virale Escape-Mechanismen zur Minderung der Immunantwort auf eine Infektion existieren. Es wird dabei eine Inhibition des IFN α -Signalwegs durch das Hepatitis-B-Virus in Erwägung gezogen. Unter anderem konnte gezeigt werden, dass die viral verstärkte Expression der Protein Phosphatase 2A (PP2A) die IFN α Induktion inhibiert – ein zuvor im Rahmen der chronischen Hepatitis C entdeckter Mechanismus [39].

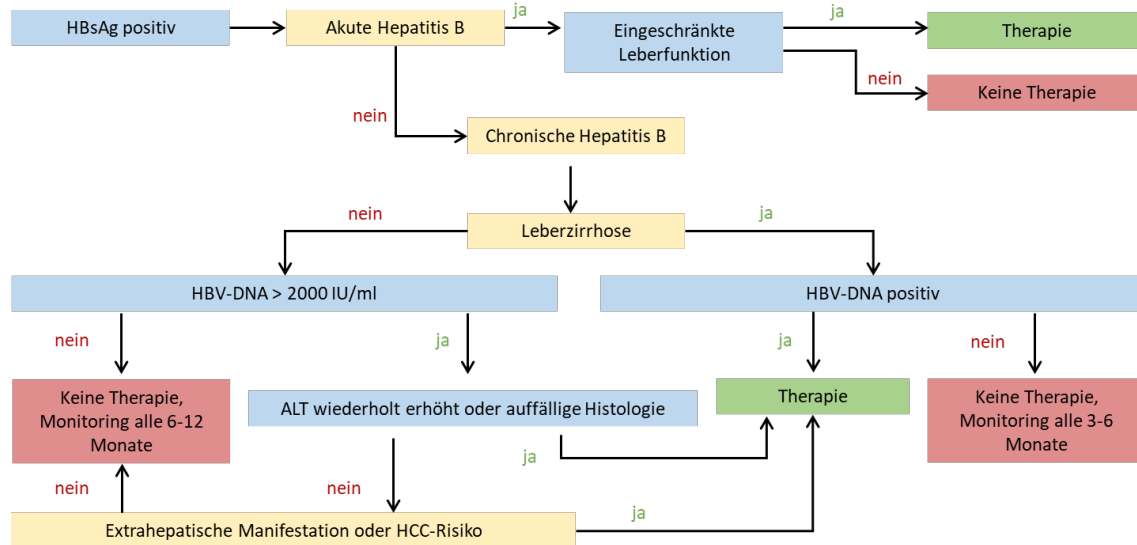


Abbildung 5) Flowchart zur Therapieindikation bei Hepatitis B. Gezeigt ist in Anlehnung an die aktuelle S3-Leitlinie das Vorgehen zur Indikationsstellung für eine Therapie bei Hepatitis B. Wie beschrieben sind hierfür vor allem der HBs-Status, die Kopienlast der HBV-DNA, sowie Transaminasen-Aktivität und Leberfunktion entscheidend. Als eingeschränkt gilt die Leberfunktion bei einem Quick-Wert von unter 50%. Modifiziert nach [33]

1.3 IRF3 & IRF7: ZENTRALE ELEMENTE DER INTERFERON IMMUNANTWORT

1.3.1 Die Interferon-regulierenden Faktoren

Hintergrund

Die Interferon-regulierenden Faktoren (IRF) sind eine Familie multifunktionaler Transkriptionsfaktoren, die im Kontext viraler Infektionen zentraler Abwehrmechanismus durch die Aktivierung Interferon-gesteuerter, antiviraler Signalkaskaden sind. IRFs modulieren die zelluläre Antwort auf virale Infektionen, indem sie die Transkription von Interferonen sowohl induzieren als auch inhibieren können. Neben ihrer kritischen Rolle in der Reaktion auf Zellstress konnte zudem eine Beteiligung der IRFs an Karzinogenese, Reproduktion und Entwicklung sowie in der Regulation des Zellzyklus, der Apoptose und Tumorsuppression nachgewiesen werden [40].

Das 1988 zuerst beschriebene IRF1 konnte als Protein identifiziert werden, das die Transkription von IFN-Genen reguliert. Neben einer Aktivierung der Expression von Interferon beta (IFN β) wurde gezeigt, dass die transkriptionelle Regulation einer Vielzahl von

Genen durch IRF1 gesteuert wird [41]. Bis heute konnten zehn IRFs identifiziert werden, von denen neun in Säugern exprimiert werden. Phylogenetische Analysen haben dabei gezeigt, dass der Ursprung der IRF-Gene mit dem Auftreten mehrzelliger Lebewesen zusammenfiel [42]. Zusammen mit der Rel/NF- κ B Familie, die einige Homologien aufweist, stellen die IRFs eine der wichtigsten Signalkaskaden der angeborenen Immunität dar. Die bisher identifizierten IRFs konnten funktionell und strukturell in vier Untergruppen unterteilt werden. Die im Folgenden untersuchten IRF3 und IRF7 stellen hierbei die Gruppe IRF3-G dar [42].

Im Aufbau zeigen alle IRFs eine starke Homologie in der N-terminal liegenden DNA-bindenden Domäne (DBD). C-terminal befinden sich für jedes IRF spezifische sogenannte IRF-Assoziationsdomänen (IAD). Die jeweiligen Funktionen der einzelnen IRFs, wie ihr intrinsisches Transaktivierungspotential und ihre Zelltyp-Spezifität, sind hierüber definiert [43].

Funktion

Die Induktion einer Typ-1-IFN-Antwort ist im Rahmen von viralen Erkrankungen zentrales Element der angeborenen Immunität [20], [44], [45]. Die IRFs sind hierbei - ihrem Namen nach - in der Transduktion von Erkennung eines Pathogens bis hin zur Expressionsmodulation der Interferone essenziell. Neben der Steuerung der Interferon-Antwort und der Expression Interferon-stimulierter Gene (ISGs) sowie von Zytokinen und Chemokinen [46] konnte außerdem gezeigt werden, dass IRFs an der erworbenen Th1-medierten Immunantwort und an der Entwicklung von NK-Zellen beteiligt sind [47].

Kommt es zu einer zellulären Auseinandersetzung mit einem Virus, erfolgt die Erkennung viraler pathogener Strukturen anhand von endosomalen und zytosolischen Mustererkennungsrezeptoren (*Pattern Recognition Receptors* - PRR). Diese erkennen konservierte strukturelle Bestandteile der Pathogene (dsRNA, dsDNA, Lipopolysaccharide, Nukleinsäuren, etc.), sogenannte *Pathogen-Associated-Molecular-Patterns* (PAMPs) [48], [49]. Beteiligte PRRs sind zum einen die membranständigen Toll-like Rezeptoren (TLR), zum anderen zytosolische Systeme, zu denen *retinoic acid-inducible gene 1* (RIG-I), *melanoma differentiation-associated gene 5* (Mda-5) und *DNA-dependent activator of interferon regulatory factors* (DAI) zählen. Für die Detektion zytosolischer DNA konnte die cGas-STING-Signalkaskade als regulierend identifiziert werden [50]. Die *cyclic GMP-AMP* (cGAMP) *Synthase* (cGas), in ihrer katalytischen Domäne der 2'-5' oligoadenylate synthetase 1A (Oas1) ähnelnd, produziert nach DNA-Detektion den *second Messenger* cGAMP. Dieser aktiviert das im ER lokalisierte transmembranöse Adaptermolekül STING welches über die *TANK-binding kinase-1* (TBK1) IRF3 aktiviert [51]. Im Allgemei-

nen erfolgt über die PRRs die C-terminale Phosphorylierung von Serin- und Threoninresten der IRFs. Diese bilden Homo- und Heterodimere und translozieren in den Nukleus, wo es über Bindung an Promotoren zur Induktion der Interferon-Antwort kommt.

IRF1, IRF3, IRF5 und IRF7 konnten im Speziellen als Regulatoren der Typ-I-IFN-Antwort identifiziert werden [40]. Für IRF1 konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression Typ-I-IFN stimuliert. Dennoch zeigte sich in Virus-infizierten IRF1^{-/-} Fibroblasten die Typ-I-IFN-Antwort unverändert [52]. IRF5 konnte eine regulatorische Funktion für inflammatorische Zytokine nachgewiesen werden, die genaue Rolle in der Typ-I-IFN-Induktion ist ungeklärt. In einem IRF5^{-/-} Mausmodell war die Interferon- (IFN α)-Antwort nicht beeinflusst [53].

Als Schlüsselemente der Steuerung der Typ-I-IFN-Antwort konnten IRF3 und IRF7 identifiziert werden. Virale Infektion führt über aktivierende Kaskaden zur Bindung von IRF3 und IRF7 sowohl an IFN β [54] als auch IFN α Promotoren [55], [56], [57]. Das Verhältnis von IRF3 zu IRF7 scheint hierbei unter anderem eine kritische Rolle in der individuellen Induktion der IFN α -Subtypen in infizierten Zellen zu spielen [58]. IFN- β , IFN- α 1, und RANTES Promotoren konnten als durch IRF3-Koexpression stimuliert gezeigt werden. IFN- α 4, - α 7, und - α 14 Promoter hingegen waren allein durch IRF7 induziert [57]. Der folgende Abschnitt soll Aufbau, die vielseitige Funktion und die zentrale Rolle in der IFN α -Induktion der beiden Transkriptionsfaktoren IRF3 und IRF7 erläutern.

1.3.2 Der Interferon-regulierende Faktor 3

Der Interferon-regulierende Faktor 3 (IRF3) ist ein in fast allen Zelltypen konstitutiv exprimiertes 55 kDa Phosphoprotein, das sich aus 427 Aminosäuren zusammensetzt [59]. In nicht stimulierten Zellen liegt IRF3 in inaktiver Form aufgrund eines *Nuclear Export Signals* (NES) vor allem im Zytoplasma vor. Die absolute zelluläre Menge von IRF3 wird in der Expression nicht durch virale Pathogene oder IFN verändert, die Regulation der Aktivität von IRF3 wird durch C-terminale Phosphorylierung gesteuert [60].

IRF3 beinhaltet strukturell eine Transaktivierungsdomäne (TAD), im gleichen Abschnitt befinden sich zudem das NES-Element, eine Prolin-reiche Region und die Interferon-Assoziationsdomäne (IAD). Auf beiden Seiten der TAD befindet sich jeweils, teilweise überlappend, eine autoinhibitorische Domäne (AID) (siehe Abbildung 6). Die beiden AIDs interagieren, maskieren dabei IAD und DBD, um IRF3 in nicht infizierten Zellen an der Translokation in den Nukleus und damit der IFN-Induktion zu hindern [15], [16].

Die Aktivierung von IRFs über C-terminale Phosphorylierung wird wie zuvor erwähnt, über TLR-abhängige und -unabhängige Signalkaskaden gesteuert. Für IRF3 scheint

zum einen zu gelten, dass virale dsRNA über die *IKK-related Kinases* TBK-1 und IKKe die Phosphorylierung C-terminaler freier Serin- und Threoninreste induzieren [43], [61]. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass das transmembranöse Protein STING zusammen mit TBK-1 im Rahmen der Immunantwort auf virale dsDNA die Phosphorylierung von IRF3 induziert [62], [63]. Die durch die Phosphorylierung verursachte Konformationsänderung von IRF3 führt folgend zu Homo- und Heterodimerisierung - unter anderem mit IRF7 - und zur Translokation in den Nukleus. Dort kommt es zur Assoziation mit dem Transkriptions-Cofaktor CBP/p300, gefolgt vom Binden an das *IFN-stimulated response element* (ISRE) und dadurch zur Induktion der Interferonantwort [60]. Für die Rolle des IRF3 in der Interferon-Induktion konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von IRF3 auch ohne induzierende virale Infektion IFN β aktiviert, während für die IFN α -Induktion zusätzlich IRF5 oder IRF7 benötigt wird [58].

1.3.3 Der Interferon-regulierende Faktor 7

Der Interferon-regulierende Faktor 7 (IRF7) ist ein 67 kDa Protein, für das *in vivo* mehrere vorliegende Transkriptionsvarianten identifiziert werden konnten. IRF7 fungiert als zentraler Transkriptionsfaktor der Typ-I-IFN-Antwort und ist essenziell für die Aktivierung der angeborenen Immunität im Rahmen von einer Auseinandersetzung mit viraler DNA und RNA. Zudem konnte gezeigt werden, dass IRF7 neben der angeborenen auch eine Funktion in der Steuerung der erworbenen Immunität hat [64]. Im Gegensatz zu IRF3 findet sich eine konstitutive Expression von IRF7 nur in lymphatischem Gewebe, vor allem in B-Lymphozyten und dendritischen Zellen. Die Expression von IRF7 kann in den meisten Zelltypen durch IFN, Lipopolysaccharide oder Viren induziert werden [55].

Der komplexe C-terminale Aufbau von IRF7 beinhaltet eine Transaktivierungsdomäne (TAD), eine konstitutive Aktivierungsdomäne (CAD), eine autoinhibitorische Domäne (AID) und außerdem ein Element, dass die basale und virusinduzierte Aktivität steuert (VAD) (siehe Abbildung 6) [65].

Die Aktivierung von IRF7 kann sowohl über eine Virus-aktivierte MyD88-unabhängige Signalkaskade als auch MyD88-abhängig mittels TLR erfolgen [66]. Über IKK und TBK-1 erfolgt die C-terminale Phosphorylierung im Sinne einer posttranslationalen Modifikation, zudem scheint eine Ubiquitinierung eine Rolle zu spielen. Im Gegensatz zu IRF3 erfolgt die Steuerung von IRF7 jedoch nicht nur durch Phosphorylierung, sondern zudem über die Induktion der Expression von IRF7 durch virale Infektionen, IFN und Lipopolysaccharide. Phosphorylierung bedingt eine Konformationsänderung der IRF7-Struktur,

ähnlich wie bei IRF3 kommt es nach dadurch verursachter Homo- oder Heterodimerisierung zur Translokation in den Nukleus und Bindung an den ISRE-Promoter. Zusammen mit Coaktivatoren wird so die Expression von IFN α , IFN β und Chemokinen induziert. Von Relevanz für eine nur transiente Induktion von IFN scheint die kurze Halbwertszeit von IRF7 von ca. 30 min zu sein.

Für IRF3 und IRF7 konnte gezeigt werden, dass sie wahrscheinlich im Komplex an der Virus-aktivierten Induktion von endogenem IFN beteiligt sind. IRF3 scheint dabei eine stärkere Funktion in der Aktivierung von IFN β zu haben, während IRF7 sowohl in der IFN α und IFN β -Induktion eine Schlüsselfunktion zu haben scheint [67], [66].

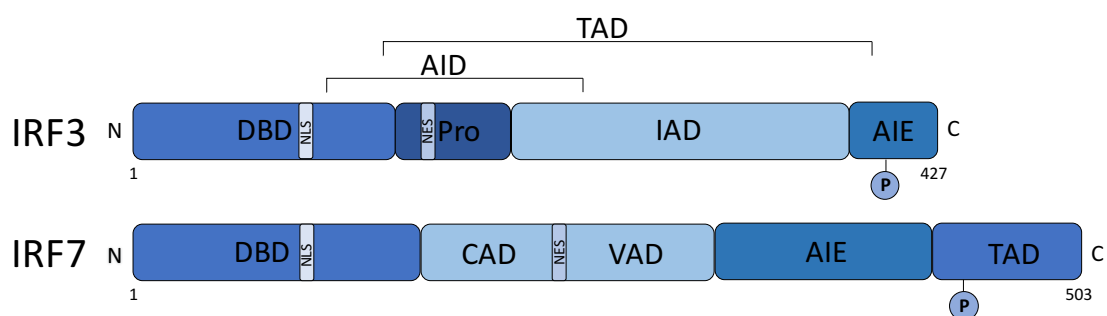


Abbildung 6) Schematische Darstellung von IRF3 und IRF7 DBD = DNA bindende Domäne, NES = nukleäre Exportsequenz, NLS = nukleäre Lokalisierungssequenz, Pro = prolinreiche Domäne, IAD = IRF-Assoziationsdomäne, AIE = autoinhibitorisches Element, AID = autoinhibitorische Domäne, CAD = konstitutiv aktive Domäne, VAD = virusinduzierte Domäne, TAD = Transaktivierungsdomäne, P = C-terminale Phosphorylierung; Schema erstellt nach [43], [68], [61], [65].

1.4 INTERFERONE & INTERFERON-STIMULIERTE GENE

Interferone (IFN) sind sekretierte Zytokine, die vor allem im Kontext von viralen Infektionen zentrales Steuerungselement der angeborenen Immunantwort und folgend auch der erworbenen Immunität sind. Zuerst 1957 beschrieben [69], werden die IFN aktuell in drei Familien, Typ I (IFN α/β), Typ II (IFN γ) und Typ III (IFN λ), unterteilt. Die IFN werden über Signalkaskaden transkriptionell aktiviert. Hierbei spielen diverse pathogen-erkennende Moleküle, Kinasen und Transkriptionsfaktoren eine Rolle. Sekretiertes IFN induziert über einen JAK-STAT-Signalweg letztlich die Transkription von Interferon-stimulierten Genen (ISGs). Diese kodieren für antivirale Effektormoleküle, die wiederum IFNs und die Immunantwort regulieren [44] (siehe Abbildung 7). Die Frage der genauen Funktion hunderter inzwischen identifizierter ISGs ist Grundlage einer Vielzahl aktueller Untersuchungen. In der Immunantwort auf virale Infektionen konnte unter anderem eine Regulation

der DNA-Integrität, des Viruseintritts, der Proteintranslation, und des Virusaustritts gezeigt werden. Für die Mehrheit der ISGs ist die konkrete Funktion aber bis heute ungeklärt.

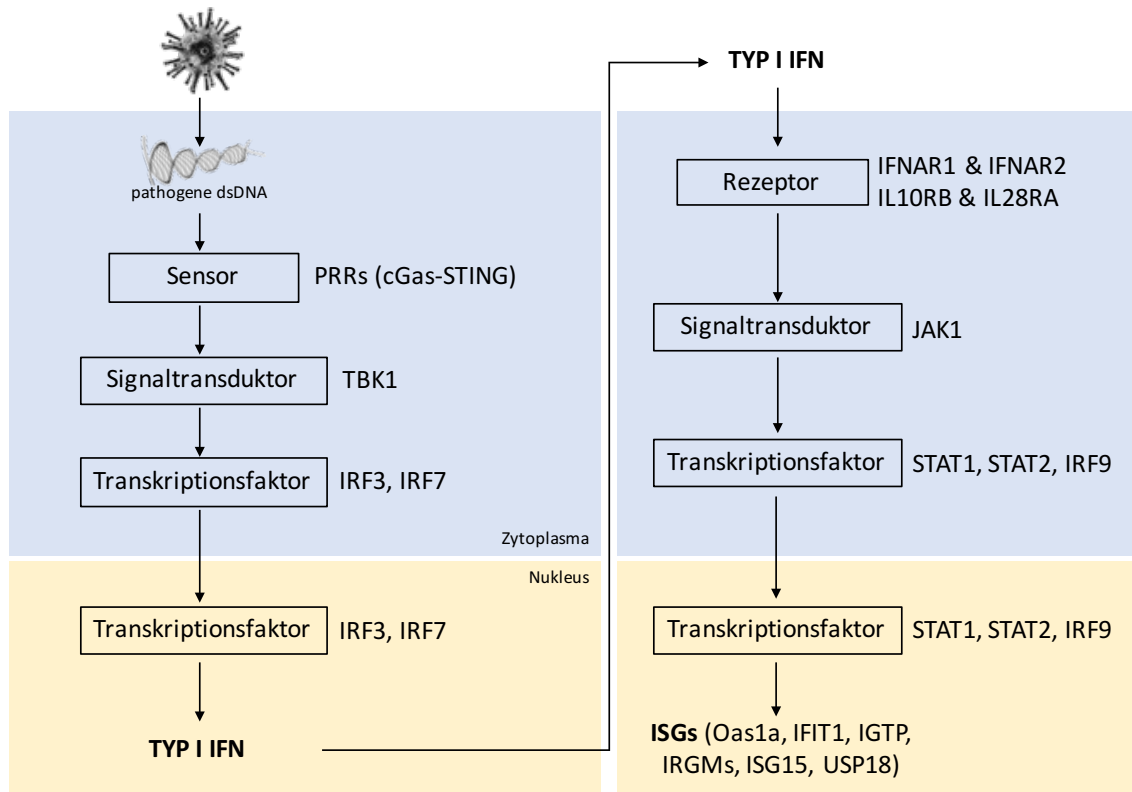


Abbildung 7) Signalkaskade ISG-Induktion. Wie in 1.3.1 beschrieben kommt es über Sensoren, auch als PRRs bezeichnet, zur Detektion viraler Pathogene. Für IRF3 und IRF7 konnten hierfür cGas-STING und das als Signaltransduktor beteiligte TBK1 identifiziert werden. Nach Translokation fungieren IRF3 und IRF7 als Transkriptionsfaktoren und induzieren die Typ-I-IFN-Synthese. IFN α als Typ-I-IFN aktiviert rezeptorvermittelt dann die JAK-STAT1-STAT2-IRF9 Signalkaskade, welche als Transkriptionsfaktoren für eine Vielzahl von ISGs agieren. Modifiziert nach [50].

1.4.1 Typ-I-Interferone

Die IFN vom Typ I werden im Allgemeinen nach zellulärem Kontakt mit einem viralen Erreger ausgeschüttet. Durch Fibroblasten und Monozyten produziert, inhibieren sie die virale Replikation. Typ-I-IFN setzt sich aus sieben Klassen zusammen, IFN- α , - β , - δ , - ϵ , - κ , - τ , - ω . Zudem sind weitere IFN-ähnliche Zytokine wie Limitin und Interleukin 28a, 28b und 29 beschrieben [70]. In humanen Zellen wird durch virale Erreger vor allem IFN- α , - β und - ω induziert, deren Verhältnis unter anderem von exprimierender Zelle und pathogenem Virus abhängig ist. Das im Rahmen der chronischen Hepatitis B therapeutisch genutzte IFN α wird in 12 Varianten durch 14 Genloci kodiert, wobei die unterschiedlichen Varianten in ihrer immunologischen Funktion variieren [70].

1.4.2 Typ-II-Interferone

Das einzige Interferon vom Typ II ist das durch Lymphozyten ausgeschüttete IFN γ . Durch direkte Inhibition und Immunmodulation ist IFN γ essenziell sowohl für die antivirale als auch die intrazelluläre antibakterielle Immunität [71].

1.4.3 Typ-III-Interferone

Zur Familie der Typ-III-IFN zählt allein IFN λ , das im Menschen in bis zu vier Unterformen vorliegt und vor allem durch epitheliale Zellen sezerniert wird. Obwohl die Signalkaskaden der IFN λ Response sich von denen der *Typ I IFN Response* unterscheiden, zeigt sich eine sehr ähnliche Zellantwort. Die abweichende antivirale Funktion ist dennoch durch eine unterschiedliche Virusspezifität gegeben. Die Signaltransduktion der Typ-III-IFN-Antwort zeigt Ähnlichkeiten zur Typ-I-IFN-Antwort, zudem scheint es eine Verknüpfungen zwischen beiden Induktionsformen zu geben [72], [73], [74].

1.4.4 Interferon-stimulierte Gene

Das virale Triggern des IFN-Systems führt letztlich zur verstärkten Transkription einer Vielzahl von ISGs. Die Produkte der ISGs wiederum fungieren schließlich als Effektoren der antiviralen Signalkaskaden. In ihrer Funktion extrem vielseitig und größtenteils noch unerforscht, gilt grundsätzlich, dass jeder Schritt viraler Replikations- und Lebenszyklen Ansatzpunkt von ISGs ist [75]. Seit der ersten Beschreibung von Interferon-stimulierten Genen bzw. Proteinen [76], [77] sind in Microarray-Studien mehrere hunderte ISGs beschrieben worden [78]. Für die meisten ist weder antivirale Potenz noch Spezifität oder genauer Mechanismus geklärt, dennoch konnte gezeigt werden, dass die Vielzahl der ISGs überlappend fungieren. In Knockoutstudien einiger bisher untersuchter ISGs konnten bei selektiver Ausschaltung weiterhin vorhandene antivirale Immunantworten nachgewiesen werden [79]. In ihrer antiviralen Potenz scheinen sie sich dabei zu unterscheiden. Es gibt Argumente dafür, dass die Kombination einer Vielzahl von ISGs die einzelnen Effekte potenziert [45]. Erregerabhängig scheinen spezifische Kombinationen von ISGs an der Immunantwort beteiligt zu sein. Die Komplexität der Funktion zeigt sich zudem darin, dass einige ISGs die virale Replikation zu verstärken scheinen [45].

1.5 DIE *UNFOLDED PROTEIN RESPONSE*

Die *Unfolded Protein Response* (UPR) bezeichnet eine zelluläre Antwort, welche im Kontext des sogenannten ER-Stress zentrale Steuerung der zellulären Homöostase ist. Im endoplasmatischen Retikulum (ER) kann es bedingt durch zelluläre Hypoxie, Hypoglykämie, oxidativen Stress und auch virale Infektionen zur Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen kommen, was zum sogenannten ER-Stress führt. Die UPR bezeichnet die Zellantwort auf diesen Zellstress. Zur Wiederherstellung der zellulären und endoplasmatischen Funktion wird zunächst die Translation von mRNA und damit die Synthese neuer Proteine inhibiert. Darüber hinaus können Chaperone, die essenziell für Proteinfaltung und Abbau fehlerhafter Proteine sind, in ihrer Expression gesteigert werden. Kann die Akkumulation von Proteinen nicht kompensiert werden, kommt es zuletzt zur Apoptose-Induktion [80].

Als Ursache des ER-Stress kommen wie erwähnt unter anderem virale Infektionen in Frage. So konnte gezeigt werden, dass einige Viren, darunter auch HBV, eine ER-Stress-Antwort induzieren [22].

Es wird vermutet, dass die virale Karzinogenese mit der UPR bzw. zellulärem ER-Stress assoziiert ist. Die genaue Genese des bei chronischer HBV entstehenden HCC ist noch nicht geklärt, ein erhöhter Zellstress scheint aber mit einer Tumorgenese zu korrelieren [81], [82].

An der UPR sind nach aktuellem Wissensstand drei Signalkaskaden beteiligt, die folgend kurz erläutert werden.

Die PERK-eIF2 α -Signalkaskade

Die akkumulierten Proteine verursachen eine Homodimerisierung und Phosphorylierung der *PRKR-like ER Kinase* (PERK). Diese wiederum phosphoryliert die alpha-Untereinheit des *eukaryotic translation initiation factors-2* (eIF2 α). Das durch die Phosphorylierung inhibierte eIF2 α führt zu einer Reduktion der Translation und somit zur Reduktion der Proteinsynthese [83], [84]. Bei weiter anhaltendem ER-Stress kann es vermittelt über den *Activating transcription factor 4* (ATF-4) zur Aktivierung des *C/EBP homologous protein* (CHOP) kommen. Dieses katalysiert unter anderem eine Dephosphorylierung von eIF2 α im Sinne eines negativen Feedbacks, zum anderen kann CHOP über die Herunterregulation des antiapoptotischen Bcl-2 eine Apoptoseinduktion herbeiführen [85].

ATF-6 Signalweg

Ebenfalls bedingt durch die Akkumulation fehlerhaft gefalteter Proteine wird das Transmembranprotein ATF-6 in den Golgi-Apparat transloziert, wo die beiden Proteasen S1P und S2P es in seine aktive Form überführen. Die aktivierte Form fungiert im Nukleus als Transkriptionsfaktor für zytoprotektive Gene [86].

IRE1 α -XBP1-Signalweg

Das Transmembranprotein *Inositol-requiring enzyme 1* (IRE1) fungiert zum einen als Endonuklease für die mRNA des *X-Box-binding Protein 1* (XBP1). Das dadurch katalysierte Splicing ermöglicht die Translation dieses Transkriptionsfaktors [80]. Als Heterodimer aktiviert XBP1 den Proteinabbau mittels *ER-assoziiierter Protein Degradation* (ERAD) [21]. Zudem wird IRE1 für die posttranslationale Degradation von mRNA benötigt und senkt somit die anfallende Proteinmenge [87]. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass IRE1 über die Phosphorylierung der *Jun-aminoterminal kinase* (JNK) die zelluläre Apoptose induzieren kann [88].

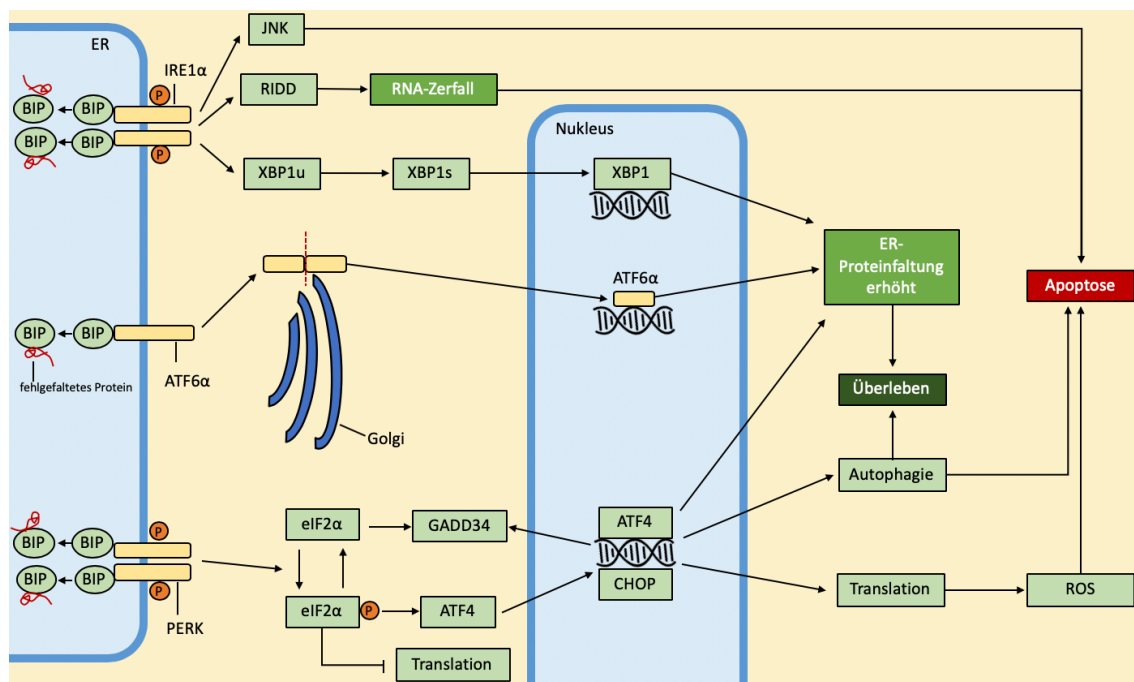


Abbildung 8) Unfolded Protein Response Signalkaskaden. Die Aktivierung der UPR-Signalkaskade wird über im ER akkumulierte fehlgefaltete Proteine initiiert, welche an das sogenannte *Immunoglobulin heavy chain binding Protein* (BIP) binden. Die regulatorische verstärkte Proteinfaltung, der Proteinabbau und die Minderung der Proteinsynthese werden in nachgeschalteten Signalkaskaden entweder über PERK-eIF2 α , ATF6 oder IRE1-XBP1/JNK/RIDD vermittelt. Kommt es weiterhin zu einer persistierendem UPR wird über Apoptoseinduktion der gesteuerte Zelltod aktiviert. GADD34, *Growth arrest and DNA damage-inducible protein 34*; XBP1u, nicht gesplittetes XBP1; XBP1s, transkriptionell aktives XBP1; RIDD=*regulated IRE1 dependent decay of mRNA*; P, Phosphoryliert. (Modifiziert nach [82])

1.6 DAS HBS-TRANSGENE MAUSMODELL & DER IRF3/IRF7-DOPPELKNOCKOUT

1.6.1 Das HBs-transgene Mausmodell

Um die Auswirkungen einer HBV-Infektion *in vivo* mit der Möglichkeit längerfristiger Beobachtung und unter möglichst physiologischen Bedingungen am lebenden Organismus durchzuführen, wurde erstmals 1985 durch *Chisari et al.* eine HBs-transgene Mauslinie geschaffen, um die zellschädigenden Einflüsse der viralen Proteine untersuchen zu können [89]. Über Mikroinjektion subgenomischer HBV-DNA Fragmente (Genotyp D, Subtyp ayw), welche die für HBs, pre-S1, pre-S2 (LHBs, MHBs, SHBs, siehe 1.2.1) und X kodierenden Regionen beinhalten, wurde eine Mauslinie geschaffen, die nachweislich HBs exprimieren [89]. Die Hepatozyten der transgenen Mäuse sind für das eingebrachte Transgen immuntolerant, da der Virus in der Immunogenese als körpereigen definiert wird. Damit ähnelt die im Mausmodell vorliegende Pathologie dem klinischen Bild eines an einer chronischen Hepatitis-B-Virus-Infektion erkrankten Menschen [89]. Im glatten ER kommt es zur verstärkten Synthese von LHB-Protein, dass sich als nicht effizient sekretierbares, bis zu 800 nm großes Filament kontinuierlich ansammelt. Bedingt durch die Proteinakkumulation kommt es zu einer Zellvergrößerung, phänotypisch den Milchgashepatozyten der CHB sehr ähnlich. Im Verlauf entstehen zunehmend zelluläre Schäden, die letztlich zum nekrotischen Untergang der betroffenen Zellen führen. Altersabhängig entwickeln die Mäuse Läsionen mit fokaler Degeneration, Nekrose und lobulärer Inflammation, die mit einer Erhöhung der Transaminasen-Aktivität einhergehen. Das hepatobiliäre System bleibt dabei unbeteiligt [90]. Die andauernde Leberzellschädigung führt progredient zur Entstehung von Neoplasien. Dabei ist die Inzidenz des HCC vom Ausmaß der Zellschädigung und damit von der HBs-Konzentration abhängig [91]. Das von *Chisari et al.* entwickelte Mausmodell dient seit seiner ersten Beschreibung als eine der wichtigsten Grundlagen für die *in vivo* Erforschung der chronischen Hepatitis B und konnte zum Verständnis der molekularen Mechanismen, der direkten viralen Pathogenität und den sich ergebenden klinischen Implikationen beitragen.

1.6.2 Der IRF3/IRF7-Doppelknockout

Wie zuvor beschrieben sind IRF3 und IRF7 Schlüsselemente in der Steuerung der Regulation der Typ-I- und Typ-III-IFN-Antwort. In einer Reihe von Knockoutexperimenten konnte im Single- und Doubleknockout von IRF3 und IRF7 gezeigt werden, welche Rolle sie *in vivo* im Rahmen verschiedener viraler Infektionen haben. Für die Typ-I-IFN-

Induktion nach Infektion mit Herpes-Simplex-Virus 1, Encephalomyocarditis-Virus und *Vesicular Stomatitis Virus* konnte in dendritischen Zellen und Fibroblasten gezeigt werden, dass sie vollständig von IRF7, weniger von IRF3 abhängig war [66]. Auch im Mausmodell konnte nachgewiesen werden, dass nach viraler Infektion die IFN-Induktion bei IRF3-KO teilweise, bei IRF7-KO fast vollständig inhibiert war [46]. Eine Vielzahl von Knockout- und Doppelknockoutstudien zeigten eine äußerst komplexe Funktion von IRF3 und IRF7, deren Rollen zudem nicht immer dem gleichen Muster folgten und erregabhängig waren [92].

Um die Funktion von IRF3 und IRF7 im Rahmen der Hepatitis B-Erkrankung zu untersuchen, kombinierten wir das zuvor erläuterte HBs-transgene Mausmodell mit einem IRF3/7-Doppelknockout. In der vorliegenden Arbeit sollen dabei an 12 Wochen alten Mäusen anhand des HBs-transgenen Mausmodells die Funktion von IRF3 und IRF7 in der Immunantwort auf Hepatitis B-Oberflächenantigene überprüft werden.

1.7 ZIELSETZUNG

Mit der vorliegenden Arbeit sollen folgende Fragestellungen beantwortet werden:

1. *Proof of Principle*: Ermöglicht ein IRF3/7-Doppelknockout ein Ausschalten der Interferonantwort in HBs-transgenen Mäusen?
2. Verändert das Ausschalten der IRF3- und IRF7-Signaltransduktion die hepatische Pathologie der HBs-transgenen Mäuse?
3. Welche Auswirkungen hat eine IRF3/7-Doppelknockout auf die Interferonantwort und Interferon-stimulierte Gene im Gesamtorganismus?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 MAUSLINIEN

2.1.1 Verwendete Mauslinien

Zur Überprüfung der Einflüsse des IRF3/7-Knockouts bei transgener Expression der Hepatitis B-Oberflächenantigene standen insgesamt 61 Mäuse mit genetischem BALB/c-Hintergrund zur Verfügung. Die untersuchten Mäuse stammen aus der Versuchstierhaltung des Biomedizinischen Forschungszentrums, Schubertstraße 81, 35392 Gießen.

Im Versuchsaufbau verglichen wir insgesamt vier Mauslinien: einen Wildtyp (WT), einen IRF3/7-Doppelknockout (KO), eine HBs-transgene Mauslinie (TG) und eine Kombination aus IRF3/7-Doppelknockout und HBs-Transgenität (TG-KO). Die Mäuse hatten zum Zeitpunkt der Untersuchungen ein Alter von 12 Wochen, in dem bei HBs-Transgenität von einer deutlichen Hepatitis auszugehen ist.

Bei dem als Superkontrolle fungierenden Wildtyp handelte es sich um einen unbehandelten BALB/c Stamm.

Der IRF3/7-Doppelknockout, an dem direkte Effekte der IRF-Modulation überprüft werden konnten, entstammt den Arbeiten der Arbeitsgruppe von A. Krug [93]. Da er ursprünglich einen genetischen CL57BL/6-Hintergrund hatte, kreuzten wir die Mäuse über 10 Generationen auf den BALB/c-WT Hintergrund zurück. Nach Selektion der IRF3/7-KO heterozygoten Mäuse wurde diese miteinander gekreuzt und anschließend die IRF3/7-KO homozygoten Mäuse selektiert.

Die HBs-transgene Mauslinie (HBV Genotyp D, Subtyp ayw), exprimiert die drei co-carboxyterminalen HBs-Proteine und weist viele Analogien zur humanen HBV-Erkrankung auf. Sie wurde generiert, indem die LHBV-transgene Maus C57BL/6J-Tg(Alb1HBV-LHBs)44Bri/J über 10 Generationen auf den Fibrose-suszeptiblen Stamm BALB/c zurück gekreuzt wurde.

Das zentrale Tiermodell der vorliegenden Arbeit, die Mauslinie die sowohl den IRF3/7-Doppelknockout als auch die HBs-Transgenität nachweist, züchteten wir über 8-maliges Rückkreuzen des IRF3/7-Doppelknockouts mit BALB/c-WT, gefolgt von einer einmaligen Kreuzung mit der HBs-transgenen Mauslinie. Die für den IRF3/7-KO heterozygoten und HBs-positive Mäuse wurden selektiert und miteinander gekreuzt. Anschließend wurden die für IRF3/7 homozygoten und HBs-transgenen Mäuse selektiert und analysiert.

	Wildtyp		IRF3 ^{-/-} /IRF7 ^{-/-}		HBs-transgen		HBs-transgen + IRF3 ^{-/-} /IRF7 ^{-/-}	
Abkürzung	WT		KO		TG		TG-KO	
n	21		11		16		13	
Maus	399 F	429 M	495 F	481 M	151 F	154 M	475 F	476 M
	405 F	431 M	498 F	494 M	422 F	429 M	477 F	480 M
	406 F	433 M	499 F	500 M	423 F	430 M	478 F	501 M
	407 F	432 M	503 F	505 M	424 F	432 M	492 F	502 M
	4664 F	434 M	557 F	507 M	425 F	435 M	493 F	504 M
	4665 F	436 M	559 F		426 F	438 M	496 F	506 M
	4666 F	437 M			654 F	692 M	497 F	
	4676 F	4668 M			671 F	705 M		
	4677 F	4669 M						
	4680 F	4670 M						
		4679 M						

Tabelle 1) Verwendete Mauslinien. Die Tabelle zeigt die im weiteren Verlauf genutzten Abkürzungen sowie die Anzahl der für jede Gruppe zur Verfügung stehenden Mäuse. Die Ziffern wurden den entsprechenden Mäusen zu Beginn des Versuchs zur Identifikation zugeordnet. Mit „F“ für „female“ und „M“ für „male“ ist folgend das Geschlecht vermerkt.

2.1.2 Haltungsbedingungen, Probenentnahme und Lagerung

Die Mäuse wurden unter festgelegten, pathogenarmen Bedingungen (SPF) gehalten. Die Studie wurde unter Einhaltung der Verordnung zum Schutz von Versuchstieren des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt. Alle Versuche waren durch den Ethikausschuss für Tierexperimente des Regierungspräsidiums Gießen genehmigt. (Tierversuchsanträge V 54 – 19 c 20 15 h 01 GI 20/10 Nr. 128/2014 und V 54 – 19 c 20 15 c GI 20/10 Nr. A 60/2011)

Die Mäuse wurden im Alter von 12 Wochen nach einer Betäubung mit Isofluran durch CO₂-Inhalation getötet. Venös entnommenes Blut und eviszerierte Lebern wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Die beteiligten Mitarbeiter waren geschult und zu ihren Tätigkeiten durch zuvor genannte Tierversuchsanträge befugt.

2.2 ALLGEMEINE GERÄTE UND MATERIALIEN

2.2.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav	Memmert, Schwabach
Biometra Multigel System	Biometra, Göttingen
Blot-Kammer/Western Fastblot B43	Biometra, Göttingen
Dunkelkassette	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Electrophoresis power supply Consort EV243	Sigma-Aldrich, Steinheim
Feinwaage A200S	Satorius, Göttingen
Feinwaage Satorious analytic Typ 1801	Satorius, Göttingen
Gefrierschrank -20 °C	Liebherr, Ochsenhausen
Gefrierschrank -20 °C	Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe
Gefrierschrank -80 °C	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Gefrierschrank -80 °C	Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe
Homogenizer Ultra Turrax T8	IKA® Labortechnik, Staufen
Kamera Nikon Coolpix 5400	Nikon Corporation, Minato/Japan
Kühlschrank Profi Line	Liebherr-Hausgeräte GmbH, Ochsenhausen
Magnetrührer	IKA® Labortechnik, Staufen
Mikro 120, Zentrifuge	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Mikroskop DMRB DIC Fluorescence Research Microscope	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Mikrotom RM2255	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Mikrowelle Severin 900&Grill	Severin Elektrogeräte GmbH, Sundern
Millipore MQ.Biovel Anlage	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt
Photometer	Packard, Dreieich
Pipetten Eppendorf Research® plus	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetten Labmate Pro	HTL Lab Solutions
Pistille #3831.1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Reflotron®Plus	Roche, Grenzach-Wyhlen
Reibschale #3773.1.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Röntgenkassetten Reg Spezial 200	AGFA, Mortsel/Belgien
Scotsman Flockeneisbereiter AF 100	Hubbard Ice Systems, Suffolk/UK
StepOne Plus RT PCR System, Applied Biosystems	Life Technologies GmbH, Darmstadt
StepOne™ Software V2.3	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Thermocycler T3000	Biometra, Göttingen
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Trockenschrank T12	Heraeus, Hanau

Trockner für Objektträger HI1220	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Vortexer VF2	IKA® Labortechnik, Staufen
Wasserbad für histolog. Schnitte HI1210	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Wippschüttler, Rocking Platform Shaker	VWR, Dadnor, Pennsylvania/USA

2.2.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Deckgläser	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen
Filmpapier, Amersham Hyperfilm™ ECL	GE Healthcare Life Sciences/UK
Filterpapier, Whatman® gel blotting paper, Grade GB003	Sigma-Aldrich, Steinheim
Folien/Vernichtungsbeutel	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Micro Amp® Fast Reactiontubes	Life Technologies GmbH, Darmstadt
MicroAmp® Optical 8-Cap Strip	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Microtest 96 well 370 µl Clear Plate	BD Biosciences, San Jose/USA
Objektträger Super Frost Ultraplus	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
PVDF Membran, Immobilon®	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt
Reaktionsgefäße BD Falcon™	BD Biosciences, San Jose/USA

2.2.3 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien und Reagenzien	Hersteller
Ammoniumperoxodisulfate (APS) #9592.2	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
BCIP-p-Toluidinsalz	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Bromphenolblau #15375	Serva, Heidelberg
Coumaric Essay #C9008-10G	Sigma Aldrich, Steinheim
Dimethylformamid 100%	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Dimethylformamid 70%	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Eosin Y, alkoholisch 6766007	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Essigsäure 100%	Merck, Darmstadt
Ethanol 70%	Apotheke der Justus-Liebig-Universität
Ethanol 96%	Apotheke der Justus-Liebig-Universität
Ethanol 99,6%	Apotheke der Justus-Liebig-Universität
Glycin, Pufferan®	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
H2O2 Wasserstoffperoxid 30%	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt
Hämalaunlösung nach Mayer 2E-038	Waldeck GmbH 6 Co. KG, Münster
HCl	Sigma Aldrich, Steinheim
Isopropanol	Apotheke der Justus-Liebig-Universität
KH ₂ HPO ₄	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Luminol #A8511-5G	Sigma Aldrich, Steinheim
Methanol >99,8% #STBF2109V	Sigma Aldrich, Steinheim
MgCl ₂	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt
Milchpulver #T145.2	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Na ₂ HPO ₄	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
NaCl	Sigma Aldrich, Steinheim
NBT	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Paraformaldehy-Lösung 37% #1.03999.1000	Merck, Darmstadt
Pertex Eindeckmedium	Medite GmbH, Burgdorf
Pikrinsäure	Sigma Aldrich, Steinheim
Platinum SYBR Green qPCR Super Mix, #11733038	Invitrogen, Carlsbad/USA
RNase AWAY	Molecular BioProducts, Northbrook/USA
Rotiphorese Gel 3ß #3029.1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
SDS Dodecylsulfate-Na-Salt, >99,9%	Serva, Heidelberg
Sirius-Red-Farbstoff	Polysciences, Heidelberg
Stickstoff	Apotheke der Justus-Liebig-Universität
Teramethylethylendiamin (TEMED) #353925.01	Serca Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Trinatriumcitrat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Tris #4855.2	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Trockeneis	Apotheke der Justus-Liebig-Universität
Tween®20	Sigma Aldrich, Steinheim
Xylol	Apotheke der Justus-Liebig-Universität
Zitronensäure	Merck, Darmstadt
ε-Aminocapronsäure	Serca Electrophoresis GmbH, Heidelberg

2.2.4 Kommerzielle Kits

Kommerzielle Kits	Hersteller
Direct-Zol™ RNA MiniPrep Plus	Zymo Research, Irvine/USA
iScript cDNA Synthesis Kit 1708890	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Proteome Profiler™ Array Mouse Cyto- kine Array Panel A ARY006	R&D Systems Europe, Ltd., Abing- don/UK

2.3 KLINISCHE CHEMIE

Bestimmung der Leberenzyme

Zur Bestimmung der Leberenzyme ALT und alkalischen Phosphatase (AP) wurden quantitative Parametermessungen mit Hilfe des Reflotron®-Plus der Firma Roche durchgeführt. Das Messprinzip basiert auf der Reflektionsphotometrie, als Probe können Plasma, Serum und Vollblut verwendet werden.

Vor jeder Messung erfolgte die Reinigung des optischen Systems mit 70% Ethanol, gefolgt von einer Systemkalibrierung mittels zum System gehörender CHECK-Streifen.

Zur Testdurchführung wurden mit dem Reflotron® Applikator 32 µl Serum auf die Auftragezone eines Teststreifens pipettiert und dieser in den Reflotron® Plus appliziert. Das zu bestimmende Enzym wird über einen Magnetstreifen automatisiert erkannt, nach ca. zwei min wurden die Messergebnisse in U/l angezeigt. Die Messungen fanden bei 37,0 °C ± 0,1 °C statt.

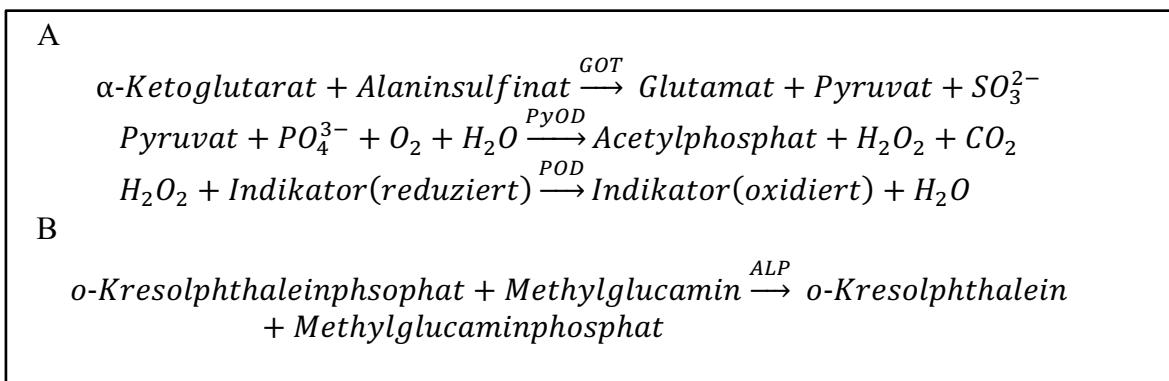


Abbildung 9) Reaktionsvorgänge zur reflektionsphotometrischen Quantifizierung der Leberenzyme. A) GOT B) ALP

2.4 HISTOLOGIE

2.4.1 Fixierung, Paraffineinbettung, Mikrotom

Für die histologischen Untersuchungen wurden Teile der entnommenen Lebern über Nacht in 1% PFA-Lösung (1 ml 37% PFA-Lösung in 36ml Aqua bidest.) inkubiert und in PBS gewaschen. Nach einer Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe (2.4.2) konnten die Lebern in Paraffin eingebettet werden. Das eingebettete Gewebe wurde gekühlt, dann mit einem Mikrotom geschnitten. Für die Immunhistochemie wurde eine Schnittdicke von 3 µm, für die Hämatoxylin-Eosin- und Sirius-Red-Färbungen eine Schnittdicke

von 5 µm gewählt. Die im Wasserbad aufgeschwommenen Schnitte wurden auf Objektträger überführt und über Nacht bei 42 °C auf einem Trockner für Objektträger getrocknet.

2.4.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Zur allgemeinen histopathologischen Beurteilung wurde eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) durchgeführt [94]. Diese färbt mittels basischem Aluminium oder Eisen-Hämatoxylin Zellkerne blau und durch den sauren Farbstoff Eosin das Zytoplasma rot. Die Paraffinschnitte wurden zweimal für 10 min und einmal für 5 min in Xylol entparaffiniert. Zur folgenden Hydratisierung wurde in einer absteigenden Alkoholreihe (2x5 min Ethanol 99,6%; 5 min Ethanol 96%; 2 min Ethanol 70%) und dann für 5 min in Leitungswasser inkubiert. Zur Blaufärbung der Zellkerne wurde für 2 min mit Hämalaunlösung sauer nach Mayer inkubiert, danach für 5 min in Aqua bidest. gewaschen. Die Färbung mit Eosin erfolgte für 15 sec, gefolgt von einem Waschschrift für 1 min in Aqua bidest. Nach der Färbung erfolgte die Dehydrierung durch eine aufsteigende Alkoholreihe (2 min Ethanol 96%, 2x5 min Isopropanol, 3x5 min Xylol). Zuletzt wurden die Schnitte mit Pertex und Deckgläsern möglichst luftfrei eingedeckt.

2.4.3 Sirius-Red-Färbung

Die Sirius-Red-Färbung eignet sich zur histologischen Untersuchung von Kollagenen und damit u.a. zur Einschätzung/Semiquantifizierung von Fibrose. Kollagenfasern werden durch die Färbung rot dargestellt, Muskelfasern und Zytoplasma gelb. Zudem eignet sich die Färbung in polarisiertem Licht zur Unterscheidung der Kollagenfibrillen nach Größe. Entparaffinierung mit Xylol und Hydratisierung mittels Ethanol erfolgen nach dem in 2.4.2 beschriebenen Prinzip. Es folgt für eine Stunde unter Vermeidung von Lichteinstrahlung die Inkubation mit Sirius-Red-Lösung (0,1 g Sirius-Red-Farbstoff, 100 ml Pikrinsäure). Nach einem kurzen Waschschrift in Aqua bidest. wird zur Differenzierung für eine Minute in Essigsäure (300 ml Aqua bidest., 1,5 ml Essigsäure) inkubiert. Es folgt zuletzt ein Waschschrift, die aufsteigende Alkoholreihe sowie das Eindecken wie in 2.4.2 beschrieben.

2.4.4 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ermöglicht eine gezielte Untersuchung von Geweben zum anti-körperbasierten Nachweis von spezifischen Strukturen. Zur Entparaffinierung und Rehydrierung der Lebergewebe wurden die in 2.4.2 beschriebenen Schritte durchgeführt. Zusätzlich wurde dann für 2 min in PBS (pH 7,4) gewaschen. Da die Einbettung von Geweben in Paraffin einen teilweisen Verlust der Immunreaktivität verursacht, wurde zur Renaturierung von Antigenen eine sogenannte Antigendemaskierung durchgeführt. Hierfür wurden die Objektträger in einer mit Citratpuffer gefüllten Küvette für 5x2 min bei 600 Watt in einer Mikrowelle erhitzt. Nach Abkühlen bei Raumtemperatur folgten 5 min Hydrierung unter fließendem Leitungswasser und 2 min Waschen in PBS (pH 7,4). Im nächsten Schritt wurde für 15 min in 3% H₂O₂-PBS (6 ml 37% H₂O₂ in 54 ml PBS) inkubiert, um gewebeeigene Peroxidase zu blockieren. Es folgten 5 min unter fließendem Leitungswasser und ein Waschschrift für 2 min in PBS. Für 60 min wurde dann mit 10% BSA + 2,5% *Normal-Horse-Serum* inkubiert, um unspezifische Bindungen zu blocken. Erneut wurde zwei Mal für zwei min in PBS gewaschen. Nun folgte über Nacht bei 4 °C die Inkubation mit dem Primärantikörper in entsprechender Konzentration, gelöst in bovinem Serumalbumin (BSA). Nach vier je fünfminütigen Waschschriften mit PBS wurde am Folgetag der Sekundärantikörper für 30 min inkubiert. Es wurde viermal für fünf min gewaschen und dann je nach Protokoll das erste Substrat hinzugegeben. Wurde mikroskopisch die gewünschte Intensität erreicht, konnte die Färbereaktion mit Aqua bidest. gestoppt werden. Als sogenanntes *Counterstaining* wurde für 2 min mit Hämalaunlösung sauer nach Mayer inkubiert und dann für eine Minute in Aqua bidest. gewaschen. Die abschließende aufsteigende Reihe, gefolgt vom Eindecken wurde wie in 2.4.2 durchgeführt.

Tabelle 2) Primärantikörper Immunhistochemie

Target	Klonalität	Ursprung	Verdünnung	Hersteller	Katalognummer
HBsAg	polyklonal	Rabbit	1:500	Fitzgerald, Acton/USA	20-HR20
GADD 153 (CHOP)	polyklonal	Rabbit	1:1000	Santa Cruz Biotechno- logy, Heidel- berg	sc-575

Tabelle 3) Sekundärantikörper Immunhistochemie

Target	Detektionsenzym	Ursprung	Hersteller	Katalognummer
Rabbit	Peroxidase	Horse	Vector Laborato- ries	MP-7401

Tabelle 4) Ansätze Immunhistochemie

PBS pH 7,4	
NaCL	80 g
KCl	2 g
Na ₂ HPO ₄	11,5 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g
Aqua bidest	ad 1 l
Citratpuffer	
Stammlösung A (pH 2,1)	
Zitronensäure 0,1M (C ₆ H ₈ O ₇)	21,01 g
Auqa bidest.	ad 1000 ml
Stammlösung B (pH 8,4)	
Trinatriumcitrat-Dihydrat 0,1M (C ₆ H ₉ Na ₃ O ₂)	29,41 g
Gebrauchslösung (pH 6,0)	
Stammlösung A	9 ml
Stammlösung B	41 ml
Aqua bidest.	ad 500 ml

2.4.4.1 Isotypkontrolle

Um die Spezifität der immunhistochemischen Färbungen zu überprüfen, wurde eine sogenannte Isotypkontrolle als Negativkontrolle durchgeführt. Hierdurch kann das Ausmaß des durch unspezifische Bindungen des Primärantikörpers bedingten Hintergrundsignals gezeigt werden. Statt des spezifischen Primärantikörpers wurde hierfür mit unspezifischen IgG Antikörpern gleicher Spezies inkubiert. In allen sonstigen Schritten der Immunhistochemie wurden die Isotypkontrollen wie in 2.4.4 beschrieben mitgeführt. Da die Kontrollen negativ ausfielen, konnte von einer spezifischen Bindung der genutzten Primärantikörper ausgegangen werden.

Tabelle 5) Antikörper Isotypkontrolle

Antikörper	Hersteller
Normal Rabbit IgG Control	R&D Systems Europe, Ltd., Abindgdon/UK

2.5 GENOMIK

2.5.1 Microarray

Für den Microarray wurden aus jeder der vier Gruppen jeweils zwei männliche und zwei weibliche Mäuse ausgewählt und jeweils 50 mg Lebergewebe in der Feinstwaage abgewogen. Die Proben jeder Gruppe wurden dann in ein gemeinsames Eppendorfgefäß überführt, sodass für jede Gruppe ein Gefäß à 200 mg Lebergewebe vorhanden war. Zur Vorbereitung der Proben wurde jeweils 1 ml *TRIzol*® hinzugefügt und für einige Sekunden mit dem *Ultra Turrax* homogenisiert. Im letzten Schritt wurden jeweils weitere 2 ml *Trizol* hinzugefügt, die Proben bei -80 °C eingefroren und an den Kooperationspartner versandt.

Die Microarray-Analyse wurde mit Gesamt-RNA durch Dr. Hans-Joachim Mollenkopf an dem Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie, Berlin durchgeführt. Es wurde das *SurePrint G3 Unrestricted GE 8x60K Microarray Kit* der Firma Agilent Technologies mit der *Amadid 028005 Mouse V1 Konfiguration* verwendet. Die Durchführung wurde wie bereits in der Literatur beschrieben vorgenommen [95].

Tabelle 6) Im Microarray verwendete Mäuse

Gruppe	WT	KO	TG	TG-KO
Mäuse	399 F	495 F	424 F	475 F
	407 F	498 F	423 F	477 F
	501 M	481 M	429 M	501 M
	502 M	505 M	435 M	502 M

2.5.2 RNA-Isolierung

Die Extraktion von Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des *Direct-zolTM RNA MiniPrep Plus Kits* durchgeführt. Sämtliche Schritte fanden unter Kühlung durch Trockeneis und flüssigen Stickstoff statt. Zur Vermeidung von Kontamination wurden autoklavierte Pipettenspitzen und *Eppendorf Tubes* verwendet.

Es wurden je 20 mg gemörsertes Lebergewebe abgewogen, je 600 µl *TRI-Reagent*, eine Mischung aus Guanidine-Thiocyanid und Phenol, hinzugefügt und mit dem *Ultra Turrax* homogenisiert. Hierdurch wurden RNA, DNA und Proteine gelöst. Für 10 min wurde bei 14.000 RPM zentrifugiert, um dann den Überstand in neue Tubes zu überführen und das Pellet zu verwerfen. Folgend wurde je 600 µl Ethanol hinzugefügt, das Gemisch dann in

das *Zymo-SpinTM* Säulensystem überführt und für eine Minute bei 14.000 RPM zentrifugiert. Die enthaltenen Nukleinsäuren waren nun an die Säule gebunden, der Durchfluss wurde verworfen. Um ebenfalls gebundene DNA zu verdauen, wurde für 15 min bei Raumtemperatur (RT) in 5 µl DNase, 75 µl DNA-Verdauungspuffer und 400 µl RNA-Waschpuffer inkubiert. Nach drei Waschschritten (1x 300 µl *PreWash*, 2x 700 µl *Wash Buffer*) wurde die an die Säule gebundene RNA zuletzt mit DNase/RNase freiem Wasser eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.5.3 Messen der RNA-Konzentration mittels Spektrophotometrie

Zur Quantifizierung der isolierten RNA wurde spektrophotometrisch die UV-Absorption gemessen. Bei reiner Probe kann die Absorption von UV-Strahlen detektiert und darüber die Konzentration bestimmt werden. Hierfür wurden die RNA-Eluate 50fach verdünnt (2 µl RNA Eluat pro 98 µl Aqua bidest.). Bei einem im Spektrophotometer eingestellten Lichtweg von 1 cm gilt nach dem Beer-Lambert'schen Gesetz:

$$RNA\ Konzentration = O.D._{260} \times Standardkoeffizient \times Verdünnungsfaktor$$

Der Standardkoeffizient für RNA-Lösungen liegt bei 40 µg/ml, der Verdünnungsfaktor war 50, womit mit folgender Formel unter Messung der *optical density* (O.D.) bei einer Wellenlänge von 260 nm die Konzentration berechnet werden konnte:

$$RNA\ Konzentration = O.D._{260} \times 40 \frac{\mu g}{ml} \times 50$$

2.5.4 Transkription von mRNA in cDNA

Da die DNA-Polymerase, die in der qPCR verwendet wird, DNA als Substrat benötigt, wurde die zuvor isolierte mRNA in cDNA umgeschrieben. Hierfür wurde das *iScript cDNA Synthesis Kit* von Biorad verwendet. Entsprechend der Herstellerangaben wurden wie folgt Reaktionsansätze erstellt, wobei das RNA-Proben-Volumen in µl entsprechend der gemessenen Konzentration so berechnet wurde, dass 1 µg mRNA im Gesamtvolumen vorlag.

Tabelle 7) Ansatz Mastermix zur Transkription von mRNA in cDNA

Component	Volume
5x <i>iScript Reaction Mix</i>	4 µl
<i>iScript Reverse Transcriptase</i>	1 µl
RNA-Probe	Konzentration = 1 µg/µl
<i>Nuclease-free water</i>	ad 15 µl
Gesamtvolumen	15 µl

Die Reaktionsansätze wurden im Thermocycler zuerst für 5 min bei 25 °C inkubiert, hierdurch wird die Anlagerung der Reversen Transkriptase an die mRNA-Matrize begünstigt. Es folgten 30 min bei 42 °C. Hier fand, bei optimaler Umgebungstemperatur für die Reverse Transkriptase, die eigentliche Erstellung der cDNA durch reverse Transkription statt. Im letzten Schritt wurde durch eine fünfminütige Erhitzung auf 85 °C die Reverse Transkriptase denaturiert. Die erstellte cDNA konnte bis zur Durchführung der qPCR bei -20 °C gelagert werden.

2.5.5 Real-Time-Quantitative PCR

Die *real-time quantitative PCR* (qPCR) ermöglicht basierend auf der Polymerasenkettenreaktion (PCR) die gleichzeitige Amplifikation und Quantifizierung von kleinsten DNA-Mengen *in vitro*.

Das Messprinzip der qPCR basiert auf der Detektion von emittierter Fluoreszenz. Das zyklische Verfahren der PCR vervielfältigt eine durch die beiden gegenläufigen Primer definierte Zielsequenz. Ein Zyklus der PCR setzt sich im Versuchsaufbau aus der Denaturierung der Doppelstränge (*Denaturation*), dem folgenden Anlagern der Primer (*Annealing*) und der dann durch die DNA-Polymerase durchgeführte Synthese der komplementären DNA-Stränge (*Elongation*) zusammen. Zur Quantifizierung wurde in der vorliegenden Arbeit der DNA-Fluoreszenzfarbstoff *SYBRTM-Green* genutzt. *SYBRTM-Green* lagert sich als sogenannter „interkalierender Farbstoff“ an doppelsträngige DNA an, wodurch die Fluoreszenz verstärkt wird. In der durchgeführten PCR verdoppelt sich die Zielsequenz mit jedem Zyklus exponentiell. Das Fluoreszenzsignal steigt dabei proportional, bis es vom System detektiert werden kann. Als Kontrollmechanismus dient das Mitführen eines Reaktionsansatzes ohne cDNA, der *Non Template Control* (NTC). DNA-Kontaminationen der Reagenzien oder eine Primerfehlfunktion würden sich als Amplifikation in der NTC zeigen.

Als endogene Kontrolle und quantitativer Bezugspunkt wird ein sogenanntes Referenzgen (*housekeeping gene*) verwendet, hier β -Actin, das in allen untersuchten Proben kon-

stant und unabhängig von äußeren Einflüssen exprimiert wird. Um methodische Ungenauigkeiten in der Probenaufarbeitung auszugleichen, wurden Doppelmessungen für jede Probe durchgeführt und zur weiteren Auswertung der Mittelwert verwendet.

Zur Durchführung der qPCR wurde ein Mastermix erstellt, der *Platinum®SYBR®Green qPCRSuperMix-UDG*, *sense-* und *antisense-Primer* der zu überprüfenden Sequenz (Tabelle 10) und RNase-freies Wasser enthielt. Der *SYBR-Green/ROX*-Cocktail beinhaltet die *Taq-DNA-Polymerase*, *SYBR-Green I*, Tris-HCl, KCl, MgCl₂, die als Substrat benötigten Desoxynukleosidtriphosphate und ROX. ROX (*carboxy-X-rhodamine*) sorgt als interner, passiver Referenzfarbstoff zu SYBR für ein konstantes Fluoreszenzsignal und korrigiert Well-zu-Well-Variationen bei der Detektion.

Je 12 µl des Mastermixes wurden in ein Well der 96-Well-Platte pipettiert, entsprechend dem Versuchsaufbau dann 0,5 µl der zuvor erstellten cDNA hinzugefügt. Die 96-Well-Platte wurde dann in das *StepOnePlus Real-Time PCR System* appliziert und ein in Tabelle 9 dargestelltes PCR-Profil gestartet. Abbildung 10 zeigt einen Screenshot des eingestellten Temperaturprofils in der verwendeten *StepOnePlus*-Software.

Während der Elongation wird die Detektion der Fluoreszenz und damit die Quantifizierung durchgeführt. Die Anregungsmaxima von *SYBR® Green I* liegen dabei bei 494 nm, die gemessenen Emissionsmaxima bei 521 nm. Zur Analyse der durchgeführten qPCR wurde an einem angeschlossenen Laptop die *StepOnePlus™* Software v2.3 verwendet.

Tabelle 8) Mastermix qPCR

Mastermix	µl je Well
<i>SYBR-Green/ROX</i>	6,25
<i>Primer sense</i>	0,5
<i>Primer antisense</i>	0,5
RNase-freies Wasser	4,75
cDNA	0,5

Tabelle 9) Temperaturprofil qPCR

	Temperatur	Dauer	Zyklen
Denaturation (Holding Stage)	95 °C	10 min	1
Annealing (Cycling)	95 °C 62,5 °C	1 min 1 min	40
Elongation (Melt Curve Stage)	72 °C 95 °C 55 °C	10 sec 1 min 30 sec	1

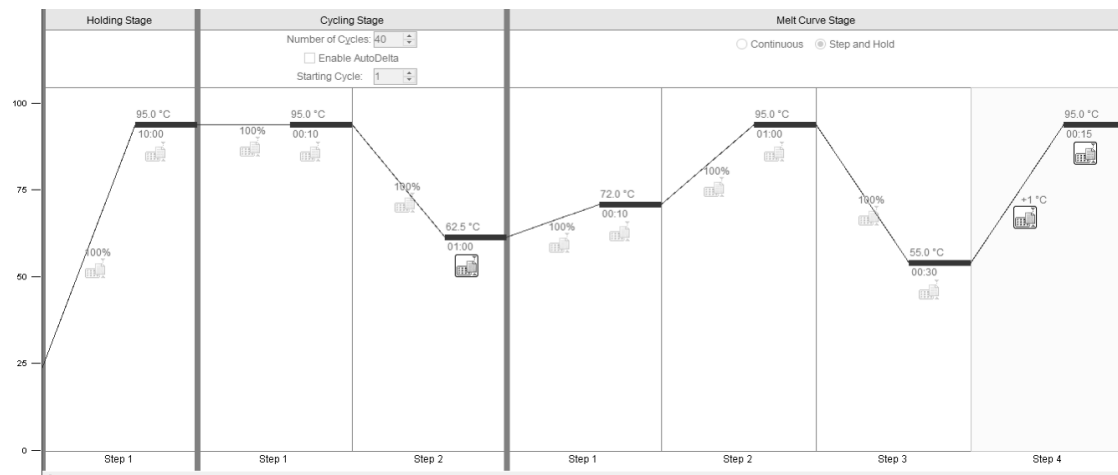


Abbildung 10) Temperaturprofil qPCR. Dargestellt ist das qPCR Temperaturprofil in dem zyklisch die *Denaturation*, das *Annealing* und die *Elongation* durchlaufen werden.

2.5.5.1 Templates

Tabelle 10) Primer Templates qPCR

DNA	AT (°C)	sense	Länge (bp)	antisense	Länge (bp)
LHB	59,4	5'-gttgatccagccttcagag-3'	20	5'-tccagctcctacctt-gttgg-3'	20
SHB	59,4	5'-cccaacctccaatcacac-3'	20	5'-gcagcaggatgaagaggaag-3'	20
Stat1	62,5	5'-cggagtcg-gaggccctaat-3'	19	5'-acagcagggtgctt-cttaatgag-3'	22
Dbp	61,8	5'-ggaaacagcaagcccaaagaa-3'	21	5'-cagcggcgcaaaaagactc-3'	19
IGTP	61	5'-ctcatca-gcccggtggtctaaa-3'	20	5'-caccgccttaccaata-tctcaa-3'	23
IRGM2	62	5'-ggcagtgagtcacctgagg-3'	20	5'-ccccttcttca-cggcagt-3'	19
USP18	60	5'-ttgggctcctgagga-aacc-3'	19	5'-cgatgttgtgtaaaccaacca ga-3'	23
ISG15	61,2	5'-ggtgtccgtgactaa-ctccat-3'	21	5'-tggaagggtgaagac-cgtcct-3'	21
IRF7	61	5'-gagactggctatt-gggggag-3'	20	5'-gaccgaaatgctt-ccagg-3'	20
IRF3	62,5	5'-gagagccgaac-gaggttcag-3'	20	5'-ctccagggtgacac-gtacg-3'	20
IRF9	61,4	5'-gccgagtggtggg-taagac-3'	19	5'-gcaaaggcgctgac-caaagag-3'	21
Trex1	62,1	5'-cagaccctcatcttctta-gacct-3'	23	5'-caggcc-tacaggctttccc-3'	19
Hbb	62,1	5'-cctgggcaggttggtatcc-3'	19	5'-ggttttcaggccctcg-taaag-3'	23
Adar	61,9	5'-tacctgaacac-caaccccgata-3'	21	5'-ga-gactggcccctgttactg-3'	20

Sucnr1	60,7	5'-tcttgtagaattggtt-ggcaa-3'	22	5'-catctcca-taggtccccttatca-3'	23
Oas1a	58,6	5'-tgagcgcccccatct-3'	16	5'-catgaccag-gacatcaaagg-3'	21
NUPR1	77,6	5'-gactaagcttcac-catggccacctgccac-caacag-3'	37	5'-gactggtac-cgcgccaggcttttcttc-3'	31
P58ipk	61,6	5'-gtggcatccaga-taattccag-3'	22	5'-cagttccaacttctgtg-gaagg-3'	22
ATF6	58,4	5'-taccaccacacaacaa-gacca-3'	20	5'-tgatgatcccggaga-taagc-3'	20
Cyp4a14	58,9	5'-tttagccctacaaggt-acttga-3'	23	5'-gcagccactgccttcg-taa-3'	19
ATF3	62,1	5'-gaggattttgtaac-ctgacacc-3'	23	5'-ttgacgg-taactgactccagc-3'	21
Ly6a	61,2	5'-aggaggcagcag-ttattgtgg-3'	21	5'-cgttgaccttag-taccagga-3'	21
Ifit1	60,7	5'-ctgagatgtcac-ttcacatggaa-3'	23	3'-gtg-catccccaatgggttct-3'	20
Ddit3	61,7	5'-ctggaagcctggtat-gag gat-3'	21	5'-cagggtaagagtagt-gaagg-3'	22
Ly6a	60,3	5'-gaggcagcagttatt-gtgat-3'	21	5'-cgttgaccttagtac-ccagga-3'	21

2.5.6 Relative Quantifizierung mittels $\Delta\Delta C_t$

Die $\Delta\Delta C_t$ -Methode ermöglicht die relative Quantifizierung von Zielgenen [96]. Hierbei wird die Expression eines Zielgens auf die Expression eines möglichst konstant exprimierten Referenzgens - dem *housekeeping gene*, hier β -Actin - bezogen. Der dafür zu bestimmende Wert ist der sogenannte C_t -Wert, der *cycle of threshold*, der dem PCR-Zyklus entspricht, bei dem das Fluoreszenzsignal zum ersten Mal detektiert werden konnte, sich also von der Hintergrundstrahlung abhebt. Folglich gilt: je niedriger der C_t Wert, desto mehr Kopien des Gens befinden sich in der Probe. Die relative Expression ergibt sich aus der Gleichung für die Kopienzahl ($x = 2^C$), die die Verdopplung der Genkopien in jedem Zyklus beschreibt. Anhand der Gleichung und des C_t -Werts wird die Expression des Zielgens, sowohl bei der Mutation, als auch beim Wildtyp mit der des Referenzgens in Relation gesetzt, danach wird wiederum die Mutation auf den Wildtyp normalisiert. Durch Umformen ergibt sich für die relative Expression:

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

wobei $\Delta C_t = C_t(\text{Zielgen}) - C_t(\text{Referenzgen})$ und $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{KO}) - \Delta C_t(\text{WT})$

Der C_t -Wert des Referenzgens wird vom C_t -Wert des Zielgens subtrahiert. $\Delta\Delta C_t$ ergibt sich, indem von ΔC_t der auf relative Regulation zu überprüfenden Gruppe, im obigen

Beispiel „KO“, der ΔC_t Wert der Kontrolle, hier „WT“, abgezogen wird. Schlussendlich ergibt sich die Ratio, also der relative Expressionsunterschied aus $2^{-\Delta\Delta C_t}$, da der gemessene C_t -Wert sich mit jedem Zyklus exponentiell verdoppelt. Die Ratio als sogenannte „fold-change“, bezieht sich somit in den im Folgenden aufgeführten Auswertungen auf den Wildtyp (WT). Der jeweils angegeben Wert für WT fungiert hierbei entsprechend als interne Kontrolle und sollte folglich bei 1 liegen.

2.6 PROTEOMIK

2.6.1 *Proteom Profiler*

2.6.1.1 *Funktionsprinzip des Assays*

Zur Überprüfung der Regulation von Zytokinen wurde das *Mouse Cytokine Array Panel A* der Firma R&D Systems verwendet, das die simultane Detektion von bis zu 40 Zytokinen und Chemokinen ermöglicht.

Auf eine Nitrozellulosemembran sind in Doppelkontrolle *Capture*-Antikörper getupft. Die zu überprüfenden Proben wurden mit einem Cocktail aus biotinylierten Antikörpern gemischt und mit den Membranen inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden Streptavidin-HRP und ein Chemiluminescent-Detektions-Reagenz hinzugefügt. Mittels Filmfolien konnte dann entsprechend der Menge gebundenen Antikörpers die relative Zytokinexpression gemessen werden (siehe Abbildung 11)

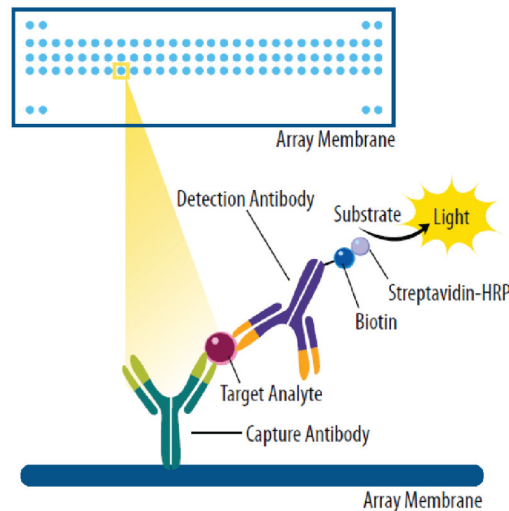


Abbildung 11) Aufbau des Proteom Profiler Assays. Über die an eine Membran gebundenen *Capture Antibodies* werden entsprechende Zytokine gebunden. Ein *Detection Antibody* mit gekoppeltem Streptavidin-HRP ermöglicht die Detektion mittels Chemilumineszenz. Quelle: <http://whitesci.co.za/brand/rnd-systems/proteome-profiler-antibody-arrays/> Aufruf am 23.09.2017

2.6.1.2 Verwendete Seren

Zur vergleichenden Analyse wurde für jede Gruppe WT, KO, TG und TG-KO je eine Membran verwendet. Aus jeder Mauslinie wurden von jeweils drei weiblichen und männlichen Mäusen je 33 µl Serum gemischt, um eine Serummengende von etwa 200 µl zu erhalten.

Tabelle 11) Verwendete Serumproben Proteom Profiler

	WT	KO	TG	TG-KO
Mäuse	399F	495F	422F	475F
	405F	498F	423F	477F
	406F	499F	424F	478F
	431M	481M	429M	502M
	433M	505M	432M	504M
	4668M	507M	434M	506M

2.6.1.3 Durchführung

Alle folgenden Inkubationsschritte fanden auf dem Wippschüttler statt. Dem Herstellerprotokoll entsprechend wurden die Membranen zuerst für eine Stunde mit einem Blockpuffer inkubiert. Ebenfalls für eine Stunde wurden bei Raumtemperatur je Gruppe eine Mischung aus 200 µl Probenserum, 500 µl *Array Buffer 4*, 800 µl *Array Buffer 6* und 15 µl des *Mouse Cytokine Antibody Cocktails* inkubiert. Der Blockpuffer wurde dann abgezogen und die Membranen mit dem Cocktail-Gemisch über Nacht bei 4 °C inkubiert. Es folgten mehrere Waschschrte und dann für 30 min die Inkubation mit Streptavidin in einer 1:2000 Verdünnung. Nach weiteren drei Waschschrten erfolgte, abweichend vom Herstellerprotokoll, die Entwicklung mittels Inkubation mit 10 ml Tris 100 mM, 2,6 µl

H₂O₂, 25 µl Coumaric Essay und 50 µl Luminol für eine Minute. Die emittierte Lumineszenz konnte anschließend in der Dunkelkammer über eine Belichtung eines Röntgenfilms detektiert werden.

2.6.1.4 Auswertung

Zur Auswertung wurde die *BioDocAnalyze* Software der Biometra GmbH verwendet. Der relative quantitative Vergleich wurde über die Ermittlung der Schwarzwerte vorgenommen.

2.6.2 Western Blot

2.6.2.1 Antikörper Western Blot

Tabelle 12) Primärantikörper Western Blot

Target	Klonalität	Ursprung	Verdünnung	Hersteller	Katalognummer
β-Actin	monoclonal	Mouse	1:400	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg	sc-47778
HBs	polyclonal	Rabbit	1:100	Fitzgerald, Acton/USA	20HR20
Oas1a	monoclonal	Mouse	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg	sc-365071
P-PERK	monoclonal	Rabbit	1:1000	Cell Signaling, Boston/USA	#3179
PERK	polyclonal	Rabbit	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg	sc-13073
P- eIF2α	polyclonal	Rabbit	1:1000	Cell Signaling, Boston/USA	#9721
eIF2α	monoclonal	Rabbit	1:1000	Cell Signaling, Boston/USA	#5324
ATF3	polyclonal	Rabbit	1:400	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg	sc-188
CHOP	polyclonal	Rabbit	1:400	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg	sc-575
ISG15	polyclonal	Rabbit	1:1000	Cell Signaling, Boston/USA	#2743
ISG15	monoclonal	Mouse	1:400	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg	sc-166755
P-STAT1	monoclonal	Rabbit	1:1000	Cell Signaling, Boston/USA	#9167
STAT1	monoclonal	Mouse	1:1000	BD Biosciences, Heidelberg	610115

STING	polyclonal	Rabbit	1:1000	Proteintech, Manchester/UK	19851-1-AP
TBK1	monoclonal	Rabbit	1:1000	Cell Signaling, Boston/USA	#3504
P-TBK1	monoclonal	Rabbit	1:1000	Cell Signaling, Boston/USA	#5483
RALB	polyclonal	Rabbit	1:1000	Proteintech, Manchester/UK	12340-1-AP
SEC5	polyclonal	Rabbit	1:1000	Proteintech, Manchester/UK	12751-1-AP

Tabelle 13) Sekundärantikörper Western Blot

Target	Enzym	Ursprung	Verdünnung	Hersteller	Katalognummer
Rabbit	HRP	Goat	1:3000	Santa Cruz Bio- technology, Hei- delberg	sc2054
Rabbit	AP	Goat	1:3000	Santa Cruz Bio- technology, Hei- delberg	sc2057
Rabbit	AP	Goat	1:3000	Santa Cruz Bio- technology, Hei- delberg	sc2007
Mouse	HRP	Goat	1:3000	Santa Cruz Bio- technology, Hei- delberg	sc2005
Mouse	AP	Goat	1:3000	Santa Cruz Bio- technology, Hei- delberg	sc2008

2.6.2.1 Herstellung von Zelllysaten

Die bei -80 °C gelagerten Leberproben wurden zur weiteren Verwendung unter Kühlung durch flüssigen Stickstoff und Trockeneis mit Stößel und Mörser zerkleinert. Zur Herstellung von Lysaten wurden auf einer Feinwaage jeweils etwa 20 µg unter kontinuierlicher Kühlung in Eppendorfgefäße abgewogen. Im Verhältnis 20:1 (ca. 400 µl) wurde *Sample Buffer* hinzugefügt, und einige Sekunden auf dem Vortex-Schüttler gemischt. Es folgten 15 min Erhitzung auf 95 °C im Thermomixer um Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine aufzubrechen. Nach einer Abkühlzeit bei Raumtemperatur von 5 min wurden die Proben für 10 min zentrifugiert, die Überstände jeweils abpipettiert und bei -20 °C gelagert.

Tabelle 14) Ansatz *Sample Buffer*

Sample Buffer (4x)	
Glycerin	40%
Dithiothreitol	20%
SDS	8%
Tris HCL pH 6,8	0,25 M
Bromphenolblau	0,02%
Aqua bidest.	ad 10 ml

2.6.2.2 SDS-PAGE

Nach der Methode von Laemmli [97] wurde eine Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgелеlektrophorese (SDS-PAGE) im *Biometra Multigel* durchgeführt. Die Gelelektrophorese macht sich zunutze, dass die Geschwindigkeit der Bewegung von Proteinen in einer Gelmatrix bei angelegter Spannung abhängig von Größe, Ladung und Konformation ist. SDS als anionisches Detergenz ermöglicht eine Auftrennung der Proteine unabhängig von deren Eigenladung, Dithiothreitol reduziert Disulfid-Brücken und löst so Proteinkonformationen auf.

Für die Auftrennung der Proteine wurden 10- und 12%ige Trenngele verwendet, die bis 2 cm unterhalb der Glasplatten aufgefüllt und mit Isopropanol beschichtet wurden. Nach der Auspolymerisation wurde das Isopropanol durch Sammelgel ersetzt und ein Kammsystem eingesteckt, durch welches Auftragsaschen gebildet werden. Für die Elektrophorese wurden ein bis zwei Gele in das Laufkammersystem gesteckt und dieses luftfrei mit Elektrophorese-Laufpuffer aufgefüllt. In die Taschen wurden dann je 5-20 µl Lysat pipettiert. Als Marker nutzten wir 5 µl *PageRuler™ Prestained Protein Ladder*. Die eigentliche Elektrophorese erfolgte dann bei angelegten 130 V und 300 mA für etwa eine Stunde.

Tabelle 15) Ansätze SDS-PAGE

Trenngel 10% SDS	
Rotiphorese-Gel 30	3,33 ml
4x Trenngelpuffer	2,5 ml
Aqua bidest.	4 ml
APS 10%	100 µl
TEMED	10 µl
Trenngel 12% SDS	
Rotiphorese-Gel 30	4 ml
4x Trenngelpuffer	2,5 ml
Aqua bidest.	3,5 ml
APS 10%	100 µl
TEMED	10 µl
Sammelgel	
Rotiphorese-Gel 30	0,66 ml
4x Sammelgelpuffer	1,66 ml
APS 10%	80 µl
TEMED	8 µl
4x Trenngelpuffer pH 6,8	
2M Tris/HCL pH 8,8	375 ml
20% SDS	10 ml
Aqua bidest.	ad 500 ml
4x Sammelgelpuffer pH 6,8	
0,5M Tris/HCl	30,25 g
20% SDS	10 ml
Aqua bidest.	ad 500 ml
10x Elektrophorese-Laufpuffer	
SDS	10 g

Tris	30 g
Glycin	144 g
Aqua bidest	ad 1 l

2.6.2.3 Semi-Dry-Blotting

Im Semi-Dry-Blot werden die im SDS-Gel aufgetrennten Proteine über das Anlegen einer Spannung auf eine zuvor in Methanol aktivierte Polyvinylidendifluorid(PVDF)-Membran übertragen. Die Schichtung im Blot wurde möglichst blasenfrei wie folgt vorgenommen. Auf zwei Filterpapiere die in Anode-1-Lösung getränkt waren folgte ein in Anode-2-Lösung getränktes Filterpapier, dann die aktivierte PVDF-Membran und das Gel, zuletzt drei in Kathode-Lösung getränkte Filterpapiere. Für den Transfer wurden für eine Stunde 1 mA/cm² Membran angelegt.

Tabelle 16) Ansätze Semi-Dry-Blotting

Anode-1-Lösung	
2 M Tris Base	75 ml
Methanol	100 ml
Aqua bidest.	ad 500 ml
Anode-2-Lösung	
2 M Tris Base	6,25 ml
Methanol	100 ml
Aqua bidest.	ad 500 ml
Kathode-Lösung	
ε-Aminocapronsäure	2,63 g
Methanol	100 ml
SDS 20%	250 µl
Aqua bidest.	ad 500 ml

2.6.2.4 Proteindetektion

Die Immundetektion ermöglicht einen gezielten qualitativen und quantitativen Nachweis von Proteinen. Primärantikörper binden dabei an für Proteine spezifische Epitope. Sekundärantikörper wiederum binden an die Primärantikörper und sind mit Enzymen gekoppelt, die eine Detektion mittels Kolorimetrie oder Chemielumineszenz ermöglichen.

Die Membran wurde nach dem Transfer zunächst für 45 min in 10 ml 5% Milchpulver in TBS-T inkubiert, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu blocken. Die Inkubation erfolgte, wie auch alle weiteren Schritte, auf einem Wippschüttler. Nach zweimaligem kurzem Waschen in TBS-T wurde die Membran über Nacht bei 4 °C mit dem jeweiligen Primärantikörper (Tabelle 12) inkubiert. Es folgten drei Waschschritte, jeweils für 10 min mit TBS-T um nicht gebundenen Antikörper zu entfernen und dann die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Tabelle 13) bei Raumtemperatur für eine Stunde (HRP-gekoppelte AK) oder für 30 min (AP-gekoppelte AK), gefolgt von erneuten drei Waschschritten wie zuvor.

Bei HRP-gekoppelten Sekundärantikörpern erfolgt der Antigennachweis über das *Enhanced-Chemilumineszenz*(ECL)-Detektionssystem (siehe 2.6.3.1). Die Membran wurde in diesem für 1 min inkubiert. Die gekoppelte Meerrettich-Peroxidase (Horseradish Peroxidase/HRP) katalysiert die Oxidation von Luminol, das Wasserstoffperoxid fungiert als Oxidationsmittel. Die bei dieser Reaktion emittierte Lumineszenz wurde anschließend in der Dunkelkammer über Belichtung eines Films detektiert. Die Exposition erfolgte je nach Signalstärke zwischen 1 Sekunde bis zu 6 Stunden. In einer automatisierten Entwicklungsmaschine wurden dann die Filme entwickelt.

Die Detektion mit Alkalische-Phosphatase(AP)-gekoppelten Sekundärantikörpern verwendet ein kolorimetrisches Nachweisverfahren. Für eine Minute wurde die Membran zur Equilibrierung in einen Inkubationspuffer gegeben. Zur Entwicklung wurde sie dann bei Raumtemperatur unter Sichtkontrolle in 10 ml Inkubationspuffer, 66 µl NBT-Stammlösung und 33 µl BCIP-Stammlösung gegeben. Zum Stoppen der Färbung wurde die Membran schließlich in Aqua bidest. überführt und konnte getrocknet ausgewertet und gelagert werden.

Tabelle 17) Ansätze Milchpulver, TBS-T, AP-Inkubationspuffer, NBT und BCIP

5% Milchpulver	
Milchpulver	2,5 g
TBS-T	50 ml
TBS-T	
Tris pH7,5	20 mM
NaCl	137 mM
Tween20	1 ml
Aqua bidest.	ad 1 l
AP-Inkubationspuffer	
NaCl	100 mM
MgCl ₂	5 mM
Tris pH9,5	100 mM
Aqua bidest.	ad 500 ml
NBT-Stammlösung	
NBT	0,5 g
70% Dimethylformamid	10 ml
BCIP-Stammlösung	
BCIP-p-Toluidinsalz	0,5 g
100% Dimethylformamid	10 ml

2.6.2.5 Membran Stripping

PDVF-Membranen, die zuvor zur Proteindetektion verwendet wurden, können erneut zum antikörperbasierten Proteinnachweis verwendet werden. Hierfür wird ein sogenanntes *Stripping* angewandt, bei dem zuvor inkubierte Primär- und Sekundärantikörper entfernt werden. Ein und derselbe Blot kann somit auf mehrere Proteine untersucht werden. Sämtliche Schritte erfolgten auf dem Wippschüttler. Erster Schritt war das Aktivieren der

Membran mit 100% Methanol. Es folgten zwei Zyklen zehnminütiger Inkubation mit *Stripping Buffer* (Tabelle 18). Danach wurde jeweils zweimal, zuerst für zehn min in PBS, dann fünf min in TBS-T gewaschen. Die Membran konnte jetzt für eine erneute Proteindetektion (siehe 2.6.2.4) verwendet werden

Tabelle 18) Ansätze *Stripping Buffer* und PBS

Stripping Buffer (pH 2,2)	
Glycine	15 g
SDS	1 g
Tween 20	10 ml
Aqua bidest	ad 1 l
PBS pH 7,4	
NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,44 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g
Aqua bidest.	ad 1 l

2.7 STATISTISCHE METHODEN

Zur statistischen Auswertung und graphischen Darstellung der erhobenen Daten wurden Microsoft Excel V.15.37 und SPSS Statistics V24.0 verwendet. Statistische Beratung erfolgte durch Helge Hudel am Institut für Medizinische Informatik der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Zur graphischen Darstellung wurden unter anderem Box-Whisker-Plot-Diagramme verwendet. Hier wird der Median graphisch durch einen zentralen Strich dargestellt, die „Box“ stellt die Streuung der mittleren 50% dar. Die Whisker wiederum entsprechen der 1,5-fachen Höhe der Box, sollten keine Werte in diesem Bereich vorhanden sein, entspricht der Whisker dem minimalen oder maximalen Wert. Ausreißer werden als Punkte dargestellt, ihre Werte liegen außerhalb der Whisker. Extreme Ausreißer mit Werten über dreimal größer als die Box werden als Sternchen dargestellt.

Die Daten der qPCR wurden der relativen Quantifizierung entsprechend als x-fache Veränderung (*Fold Change*) dargestellt.

Zur Überprüfung der Signifikanzen der in der qPCR ermittelten Werte wurde der Kruskal-Wallis-Test für unabhängige Stichproben durchgeführt. Dieser nichtparametrische Test überprüft, ob sich die zentralen Tendenzen mehrerer unabhängiger Stichproben unterscheiden. Anschließend wurde zur Überprüfung der paarweisen Signifikanz ein Dunn-Bonferroni-Test durchgeführt. Die hierbei ermittelte angepasste Signifikanz wurde graphisch als (**) bei $p < 0,001$ und (*) bei $p < 0,05$ dargestellt.

Die Bestimmung der Gallensäuren zeigt in Balkendiagrammen die Mittelwerte der Versuchsgruppen an, der Fehlerbalken entspricht mit der jeweiligen Standardabweichung der Streuung der Werte um den angezeigten Mittelwert.

Das histopathologische Scoring nach Ishak und Desmet [6], [7], [98] wurde bei Ordinalverteilung als Balkendiagramm der Mediane dargestellt.

3. ERGEBNISSE

3.1 CHARAKTERISIERUNG UND VERIFIZIERUNG DES MAUSMODELLS

3.1.1 Expression von HBV-Oberflächenproteinen

Zur Überprüfung der anhand einer initialen Genotypisierung vorgenommenen Gruppeneinteilung der Mäuse wurde im Lebergewebe die Expression des großen (*large HBV surface antigen/LHBs*) und kleinen (*small HBV surface antigen/SHBs*) HBV-Oberflächen-Antigens im Western Blot und in der qPCR untersucht.

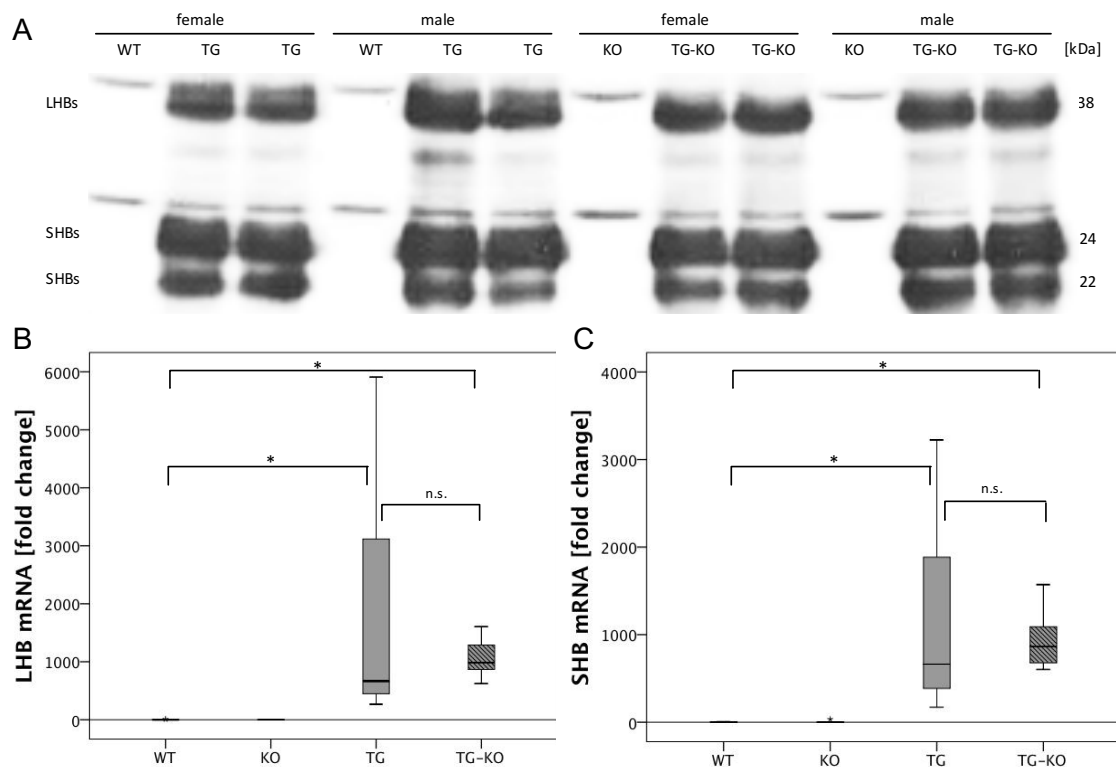


Abbildung 12) Expressionsanalyse der HBV-Oberflächenproteine. A) Expression von LHBs und SHBs im Western Blot. Die transgenen Mausstämme TG und TG-KO wiesen eine Expression des großen (LHBs) und des kleinen (SHBs) HBV-Oberflächenproteins auf. WT und KO zeigten keine Expression der HBV-Oberflächenproteine. Im Vergleich von TG-KO und TG konnten keine signifikanten Expressionsunterschiede nachgewiesen werden. Es besteht zudem in keiner der Gruppen ein Geschlechterunterschied **B), C) mRNA-Expression von LHBs und SHBs im Lebergewebe.** Mittels qPCR wurde die Regulation der mRNA bestimmt. Als Kontrolle diente dabei β -Actin. Die Regulation der Expression ist als *fold-change* – n-fache Expression – in Bezug auf den WT dargestellt. Die *fold-change* wurde mittels der $\Delta\Delta C_t$ -Methode berechnet. Weder WT noch KO zeigten eine Expression von LHBs oder SHBs mRNA. TG und TG-KO wiesen,

ohne signifikanten paarweisen Unterschied, eine im Vergleich zu WT signifikante Expression von LHBs und SHBs mRNA auf.

Zudem wurde zur Beurteilung des Einflusses des KO auf die zelluläre Akkumulation von HBs eine immunhistochemische Färbung durchgeführt.

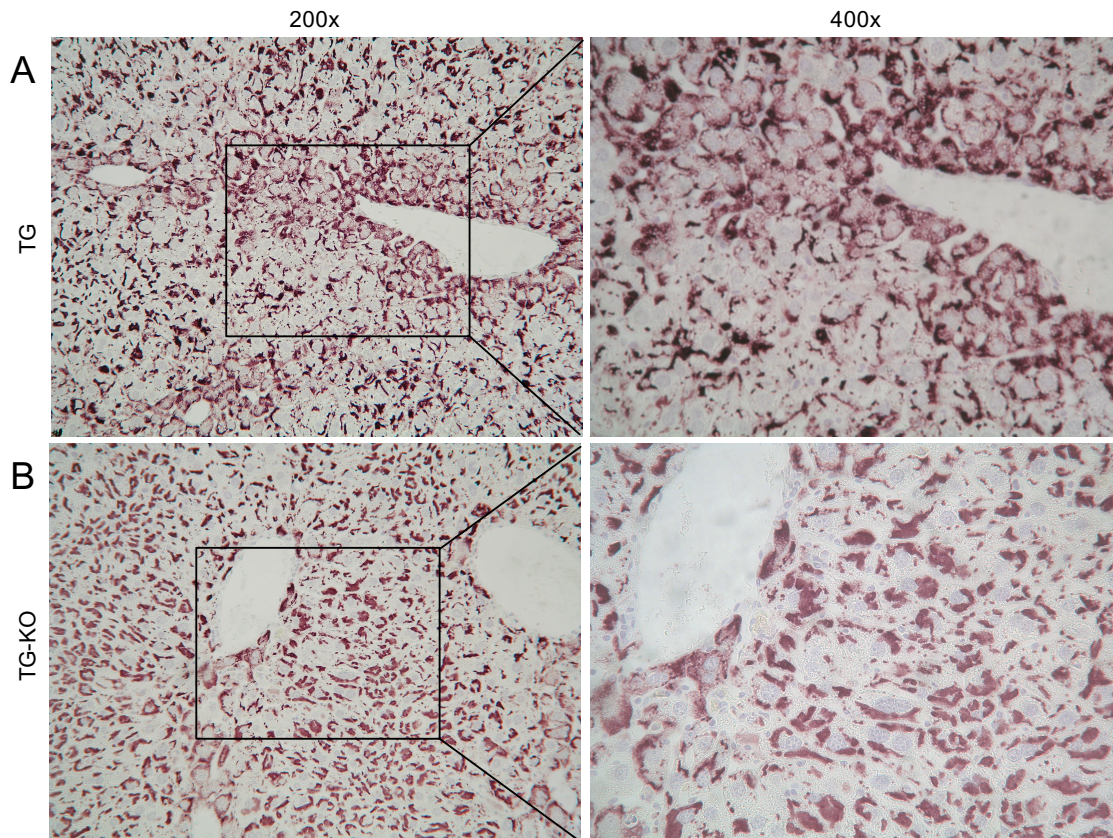


Abbildung 13) Immunhistochemische Färbung HBsAg. A) TG und B) TG-KO. Dunkelviolett = HBV-Oberflächenprotein.

Es zeigten sich dabei in der immunhistochemischen Färbung von HBsAg keine mikroskopischen Unterschiede in der hepatozellulären zytosolischen Akkumulation des HBV-Oberflächenproteins zwischen HBs-transgenen und HBs-transgenen IRF3/7-Knockout-Mäusen.

3.1.2 Überprüfung der IRF3/7-Expression

Zur Überprüfung sowohl des IRF3-, als auch des IRF7-Knockouts wurde deren Regulation im durchgeführten Microarray bestimmt und zur Verifizierung jeweils mittels qPCR überprüft.

	KO vs. WT				TG-KO vs. TG			
	Fold Change	P-value	Int1	Int2	Fold Change	P-value	Int1	Int2
IRF3	-2,86	2,09E-16	17185	5890	-2,55	1,43E-10	20862	7978
IRF7	-19,43	0	104	5	-19,41	1,55E-08	381	19

Tabelle 19) Microarray-Analyse IRF3 und IRF7. Im Microarray konnte beim Vergleich von KO gegen WT und TG-KO gegen TG eine signifikante Herunterregulation von IRF3 und IRF7 im KO nachgewiesen werden.

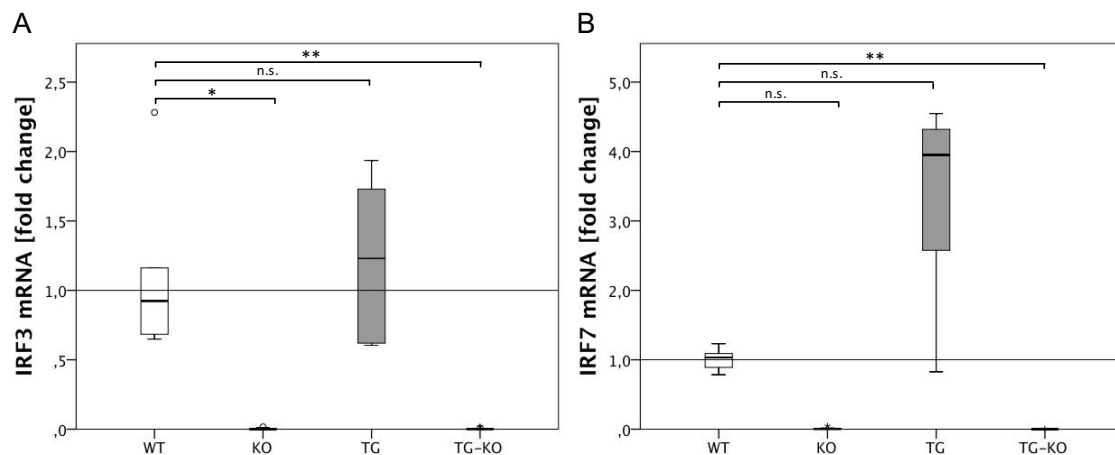


Abbildung 14) mRNA-Expression von IRF3 und IRF7 im Lebergewebe der transgenen Mäuse. Mittels qPCR wurden die vier untersuchten Gruppen auf Expression von **A) IRF3** und **B) IRF7** überprüft. Die relativen Expressionsunterschiede wurden mittels der $\Delta\Delta C_t$ -Methode in Bezug auf WT errechnet (siehe 2.5.6), als Kontrolle diente β -Actin. Sowohl in A) bei der Untersuchung von IRF3, als auch in B) bei IRF7 zeigte sich, dass auf mRNA Ebene sowohl im KO, als auch für TG-KO eine nahezu vollständige Herunterregulation von IRF3 und IRF7 vorliegt. Die HBs-Transgenität (TG) bedingte wiederum im Vergleich zu WT tendenziell eine Hochregulation von IRF3- und IRF7-mRNA, dies ließ sich jedoch nicht als signifikant bestätigen.

3.2 ÜBERPRÜFUNG PATHOLOGIE

3.2.1 Hepatische Schädigung

Um die Auswirkungen des IRF3/7-Doppelknockouts auf die durch die HBs-Transgenität bedingte Leberschädigung zu überprüfen, wurde die Serum Alanin-Aminotransferase (ALT) bestimmt, zudem Parenchymschädigung, Inflammation und Fibrose histologisch und immunhistologisch untersucht.

3.2.1.1 Klinischer Laborparameter ALT

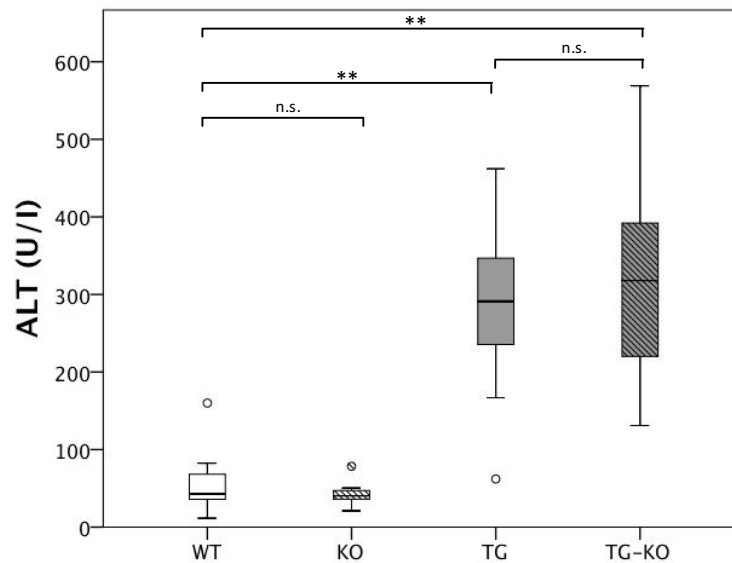


Abbildung 15) Bestimmung der Serum Alanin-Aminotransferase zur Erfassung des Leberschadens. Die für HBs-transgenen Gruppen TG und TG-KO zeigten im Vergleich zu WT signifikant erhöhte Serum Alanin-Aminotransferase (ALT)-Werte als Indikator für eine hepatozelluläre Schädigung. Zwischen TG und TG-KO konnte keine signifikante Änderung des ALT-Werts gezeigt werden. n=11-19.

Zur allgemeinen Beurteilung und Quantifizierung der Leberschädigung wurde der Serumwert der ALT bestimmt. Eine Erhöhung der ALT ist nicht nur ein sensibler Marker für die Leberzellschädigung, sondern kann klinisch bei Persistenz auch Indikator für den Übergang in eine chronische Hepatitis sein [99]. Es zeigten sich in den HBs-transgenen (TG) Mäusen und in der Kombination von TG mit dem IRF3/7-Doppelknockout (TG-KO) auf etwa gleichem Niveau signifikant erhöhte ALT-Werte. Die HBs-Transgenität ist hierbei als Ursache der Erhöhung der Serum ALT, folglich der Schädigung des Leberparenchyms, zu vermuten. Der IRF3/7-Knockout (KO) wies im Vergleich mit WT keine signifikant erhöhten ALT Werte auf, und scheint somit keinen direkten Einfluss auf die Schädigung des Leberparenchyms zu haben. In TG-KO zeigt sich kein signifikanter Unterschied zu TG. Somit liegt nahe, dass bei durch TG bedingter ALT-Erhöhung der KO weder zu einer Aggravation noch zu einer Verminderung des Parenchymschadens führt.

3.2.1.2 Histologische Analyse

Zur mikroskopischen Beurteilung der Leberschädigung führten wir folgend eine HE-Färbung der Lebern und zur Überprüfung einer Fibrosierung eine Sirius-Red-Färbung durch.

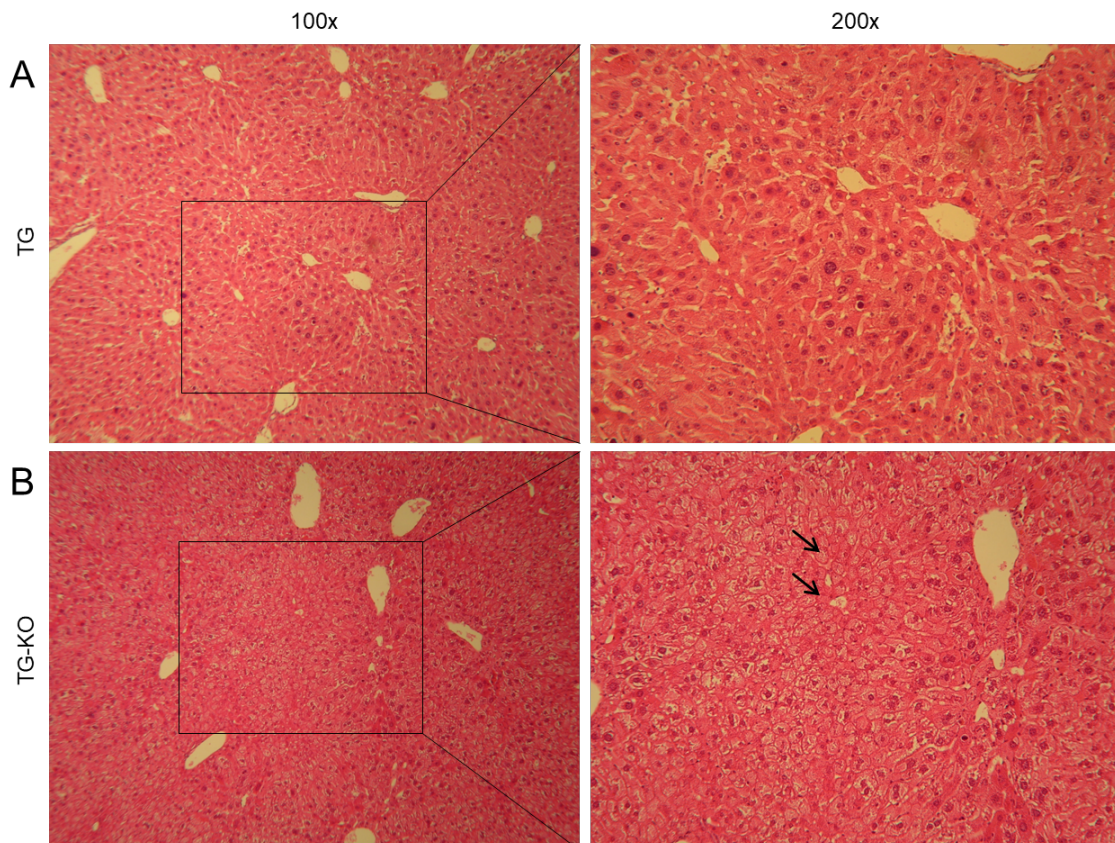


Abbildung 16) HE-Färbung. Um die Ausmaße der histologischen Schädigung darzustellen wurde eine HE-Färbung der Lebern durchgeführt. Im Vergleich der **A)** HBs-transgenen Mauslinie (TG) mit **B)** TG-KO, zeigten sich in TG-KO vermehrt *Ground Glass Hepatocytes* (Pfeile), welche histologisch pathognomonisch für eine chronische Hepatitis B sein können.

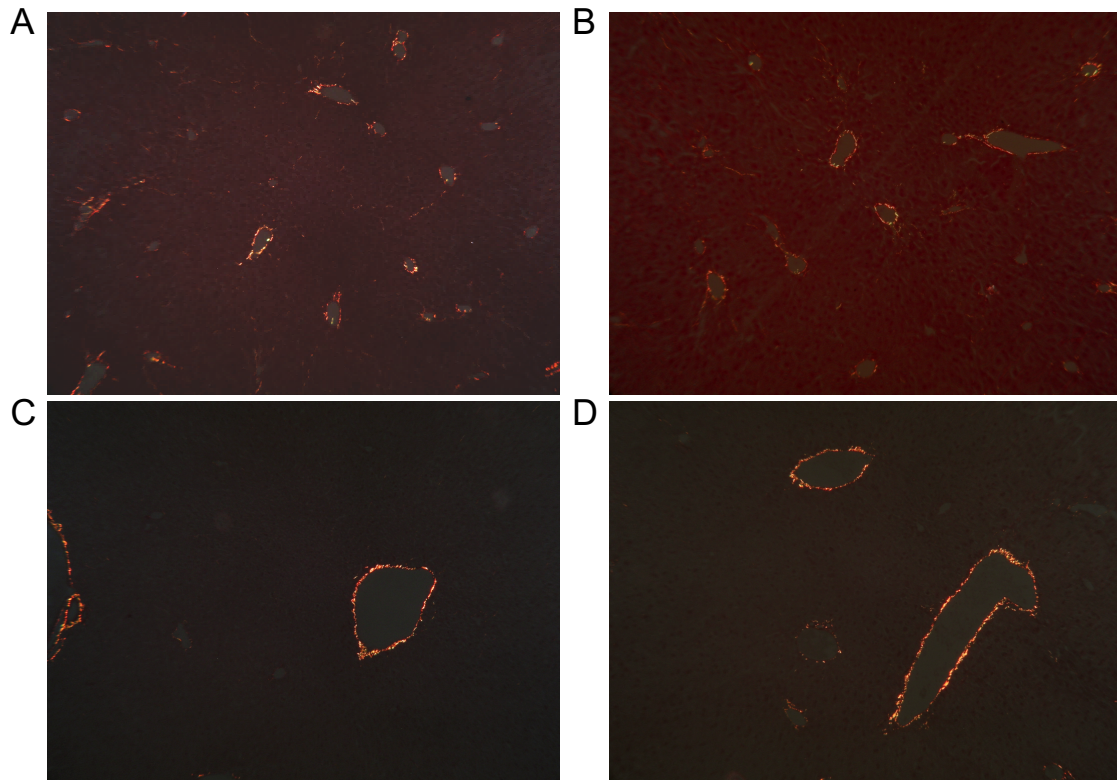


Abbildung 17) Sirius-Red-Färbung. A) WT, B) TG, C) KO, D) TG-KO Die Sirius-Red-Färbung, hier in polarisiertem Licht dargestellt, detektiert fibrilläres Kollagen. Es konnten in der mikroskopischen Beurteilung keine Vermehrung von Kollagen und keine Gruppenunterschiede nachgewiesen werden. Vergrößerung 100x.

3.2.1.3 Inflammation, Fibrose und Nekrose

Um Inflammation, Fibrose und Nekrose zu quantifizieren, wurden zum einen eine mHAI-Klassifikation nach Ishak [6] und zudem ein Grading und Staging nach Desmet [7] vorgenommen. Die histologischen Klassifikationen wurden freundlicherweise durch eine hepatologische Pathologie-Expertin, Prof. Dr. Uta Drebber, Institut für Pathologie, Uniklinik Köln, durchgeführt.

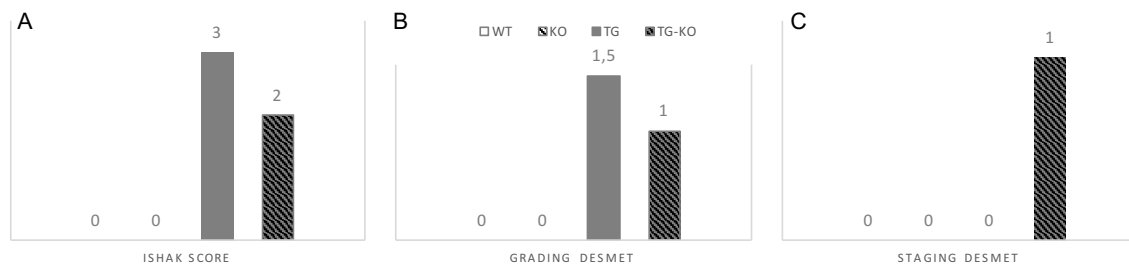


Abbildung 18) Pathologischer Befund. WT n=4, KO n=10, TG n=6 TG-KO n=13, gezeigt ist jeweils der Median bei Ordinalskalierung. **A)** Ishak Score **B)** Grading Desmet **C)** Staging Desmet

Die histopathologische Klassifikation der Inflammation nach Ishak ermittelt - anhand von vier mikroskopisch ermittelten Teilscores - einen Gesamtscore, der prognostisch mit der Entwicklung einer Fibrose korreliert [6]. Sowohl TG als auch TG-KO zeigten im Vergleich zu WT und KO Hinweise für eine beginnende Inflammation des Leberparenchyms.

Grading und Staging nach Desmet dienen zur Einteilung einer vorliegenden Hepatitis [7]. Im Grading ließen sich TG und TG-KO im Median dem Grad 1-2 nach Desmet zuordnen. Im Vergleich zu WT und KO lag somit eine beginnende Hepatitis vor. Der Knock-out bei Transgenität scheint wenig bis keinen Einfluss auf diese Entwicklung zu haben.

Im Staging nach Desmet zeigte sich allein TG-KO mit einem erhöhten Score von 1. Der KO bei Transgenität könnte somit eine Verstärkung der Fibrosierung bei HBs-Transgenität verursachen.

3.2.2 Cholestaseparameter

Zur Überprüfung der biliären Komponente der Pathologie wurde zum einen die alkalische Phosphatase (AP), die vor allem im Leberparenchym und in den Epithelien der Gallengänge zu finden ist, bestimmt. Zum anderen wurde im Serum eine Bestimmung der Gallensäuren in ihren konjugierten und unkonjugierten Formen vorgenommen.

3.2.2.1 Klinischer Laborparameter Alkalische Phosphatase

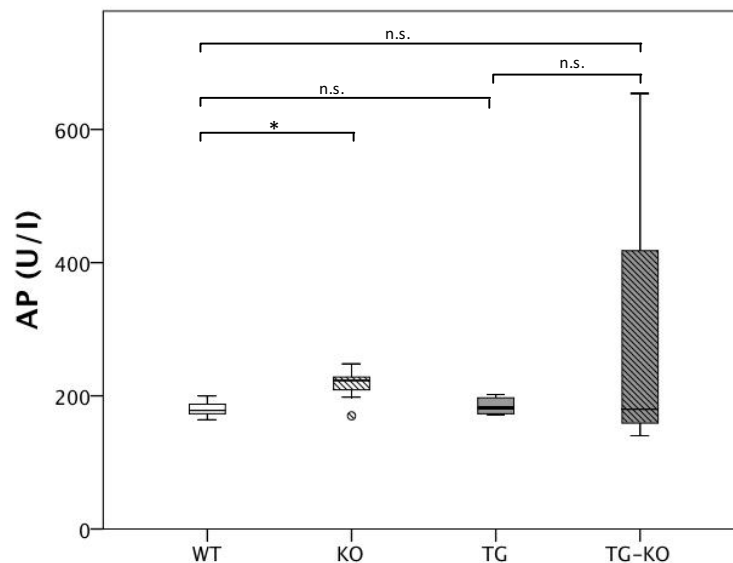


Abbildung 19) Bestimmung der Alkalischen Phosphatase im Serum zur Erfassung einer cholestatischen Schädigung. Im IRF3/7-KO zeigte sich eine leichte, aber signifikante Erhöhung der AP im Vergleich zum Wildtyp. In TG und TG-KO konnte keine signifikante Veränderung der AP im festgestellt werden. n=4-13

Die zur Überprüfung und Quantifizierung einer Cholestase durchgeführte Bestimmung der Serumspiegel der alkalischen Phosphatase (AP) zeigte eine marginale, aber signifikante Erhöhung der AP im IRF3/7-KO. Im Gesamtbild lag zum Zeitpunkt von 12 Wochen keine durch die HBs-Transgenität bedingte Erhöhung der AP im Sinne einer Gallengangsschädigung vor. Die Kombination von TG mit dem IRF3/7-KO wies zudem keinen signifikanten Einfluss auf die AP-Levels auf.

3.2.2.2 Analyse der Gallensäuren

Zur Bestimmung der Gallensäuren wurde, wie in der Literatur beschrieben [100], eine Hochleistungsflüssigkeitschromatographie in Verbindung mit einer Tandem-Massenspektrometrie (UPLC-MS/MS) angewandt. Die UPLC-MS/MS wurde freundlicherweise durch Dr. Diran Herebian und Prof. Dr. Ertan Mayatepek, tätig an der Klinik für Allgemeine Pädiatrie, Neonatologie und Kinderkardiologie der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf durchgeführt.

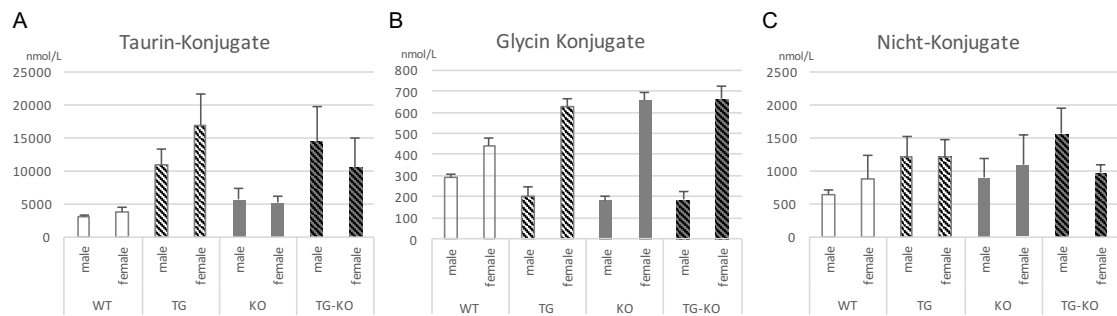


Abbildung 20) Analyse der Gallensäuren im Serum. Die Balkendiagramme entsprechen jeweils den erfassten Mittelwerten, zusätzlich ist die Standardabweichung aufgetragen. **A) Taurin-Konjugate.** In TG und TG-KO zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Taurin-Konjugate **B) Glycin-Konjugate.** Kein relevanter Unterschied zwischen den Gruppen. Deutliche geschlechtsabhängige Varianz **C) Nicht-Konjugate.** Keine Unterschiede der Expression in den Gruppen oder zwischen den Geschlechtern.

3.3 AUSWIRKUNGEN AUF IMMUNANTWORT UND ASSOZIIERTE SIGNALWEGE

3.3.1 Auswirkungen des Knockouts auf *Upstream*-Signaltransduktion

Zur Überprüfung der Auswirkungen des KO auf die aktivierenden Signalkaskaden, die *Upstream*-Transduktion, wurde von uns zum einen die Regulation der dsDNA-STING-TBK1-IRF3-Achse und zudem die der assoziierten RalB-Sec5-TBK1-Signalkaskade analysiert.

3.3.1.1 dsDNA - STING - TBK1 - IRF3 - Signalkaskade

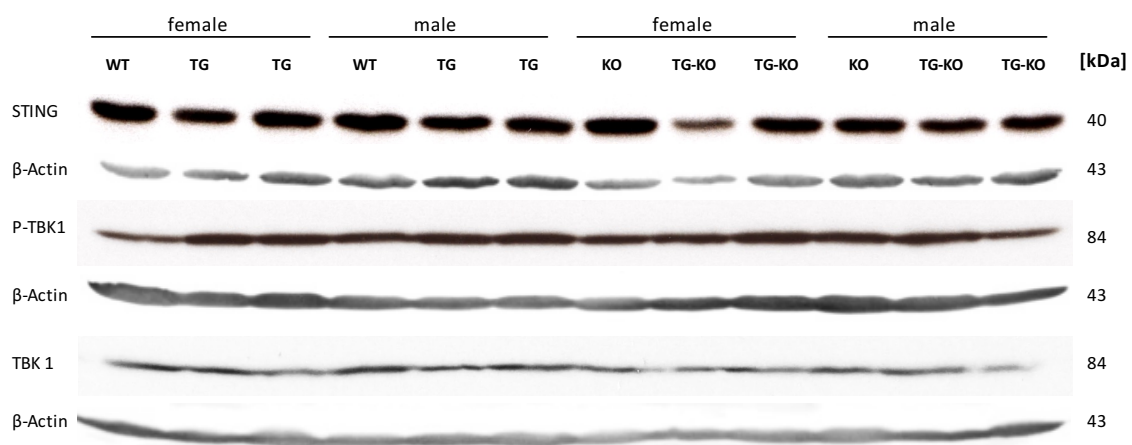


Abbildung 21) Western Blot-Analyse der STING-TBK1-IRF3-Signalkaskade. Es zeigte sich keine durch den IRF3/7-KO oder die HBs-Transgenität bedingte Änderung der Expression von STING, P-TBK1 oder TBK1.

3.3.1.2 RalB-Sec5-TBK1-Signalkaskade

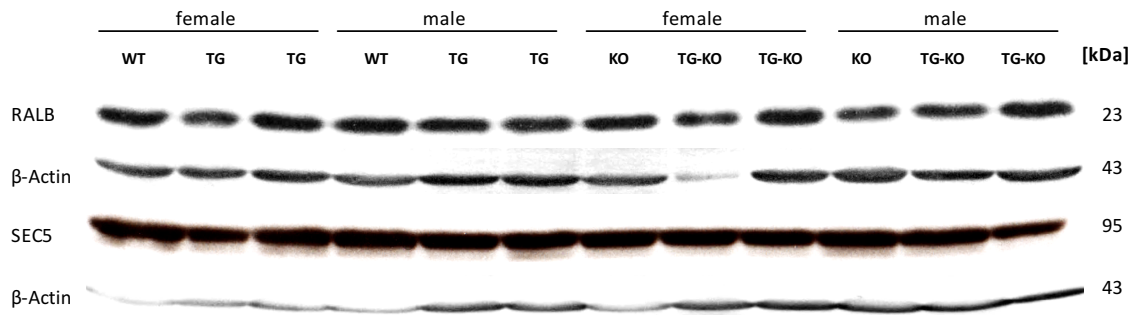


Abbildung 22) Western Blot-Analyse der RalB-Sec5-TBK1-Signalkaskade. In der Western Blot-Analyse sowohl von RalB, als auch von SEC5, zeigten sich keine Gruppenunterschiede, womit von keinem Einfluss durch HBs-Transgenität oder IRF3/7-KO ausgegangen werden kann.

3.3.2 Auswirkung des Knockouts auf *Downstream*-Signaltransduktion

Um die Auswirkungen des KO auf die *Downstream*-Signaltransduktion von IRF3 und IRF7 zu analysieren, wurden die STAT1/STAT2/IRF9-Signalkaskade, einige ausgewählte Interferon-stimulierte Gene und zudem der ISG15/USP18-Signalweg auf Regulation überprüft.

3.3.2.1 STAT1/STAT2/IRF9-Signalkaskade

	TG vs. WT				KO vs. WT				TG-KO vs. TG			
	Fold Change	P-value	Int1	Int2	Fold Change	P-value	Int1	Int2	Fold Change	P-value	Int1	Int2
STAT1	2,13	1,00E-09	36	77	-1,99	0,00927	37	18	-3,23	8,23E-06	76	23
IRF9	1,67	4,82E-06	697	1172	-2,75	0	672	244	-3,50	0	1108	318

Tabelle 20) Microarray-Analyse der STAT1- und IRF9-Expression. Sowohl STAT1 als auch IRF9 zeigten sich in Bezug auf WT in TG signifikant erhöht und in KO signifikant herunterreguliert. Im Vergleich von TG-KO mit der HBs-transgenen Gruppe TG zeigte sich, dass STAT1 und IRF9 signifikant herunterreguliert waren.

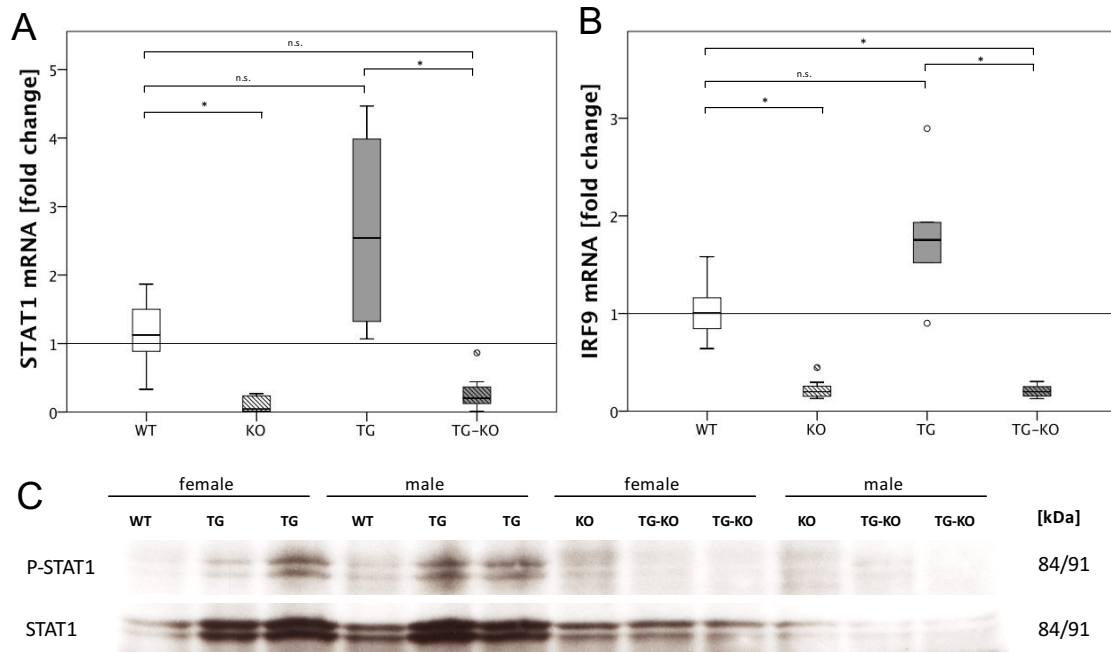


Abbildung 23) STAT1/STAT2/IRF9-Signalkaskade. A) STAT1 B) IRF9 Sowohl für STAT1 als auch für IRF9 zeigte sich, dass sich die Aussagen der Microarrays in der qRT-PCR signifikant reproduzieren ließen. In beiden war zum einen im KO, vergleichend mit WT, eine verminderte Expression der jeweiligen mRNA nachweisbar. Die Kombination von HBs-Transgenität und IRF3/7-Knockout in TG-KO führte verglichen mit TG zu einer signifikanten Senkung der mRNA-Level **C) Western-Blot STAT1** Im Western-Blot zeigte sich zum einen, dass TG im Vergleich mit WT sowohl mehr P-STAT1, als auch STAT1 aufwies. Zum anderen wiesen die beiden IRF3/7-KO Gruppen TG-KO und KO eine Verminderung von sowohl phosphoryliertem P-STAT1, als auch STAT1 auf.

3.3.2.2 Interferon-stimulierte Gene

Die Interferon-stimulierten Gene (ISGs) Oas1a, IFIT1, IGTP und IRGM2 fungieren als Bestandteil der Immunabwehr bei viralen Infektionen und sind an der Kontrolle des Zellwachstums, der Zelldifferenzierung und der Apoptose-Induktion beteiligt. In ihrer Expression durch Interferone stimuliert, dienten sie hier als indirekter Marker für die Effekte des IRF3/7-KO auf die *Interferon Response*. Die in der initial durchgeführten Microarray-Analyse erfasste Regulation wurde jeweils mittels qPCR überprüft.

	TG vs. WT				KO vs. WT				TG-KO vs. TG			
	Fold Change	P-value	Int1	Int2	Fold Change	P-value	Int1	Int2	Fold Change	P-value	Int1	Int2
Oas1a	8,92	0	3475	30987	-3,93	7,37E-36	3717	941	-22,73	0	32102	1412
IFIT1	3,58	1,07E-33	30	107	-1,42	0,24865	21	15	-13,93	5,14E-18	102	7
IGTP	2,34	5,71E-17	8421	19752	-3,05	2,58E-41	9234	3041	-6,59	0	19938	3019
IRGM2	1,97	2,83E-09	2285	4527	-2,25	2,96E-12	2603	1143	-4,27	0	3672	865

Tabelle 21) Microarray-Analyse Interferon-stimulierter Gene. Im Vergleich von TG und WT zeigte sich, dass alle vier überprüften ISGs im MA signifikant hochreguliert waren. Als am stärksten reguliert fiel mit einer *Fold Change* von 8,92 *Oas1a* auf. In der Gegenüberstellung des KO mit WT zeigte sich, dass die ISGs im KO herunterreguliert waren. Es konnte somit in der Kombination von HBs und dem IRF3/7-Doppelknockout (TG-KO) eine hoch signifikante Herunterregulation der ISGs beim Vergleich mit TG nachgewiesen werden.

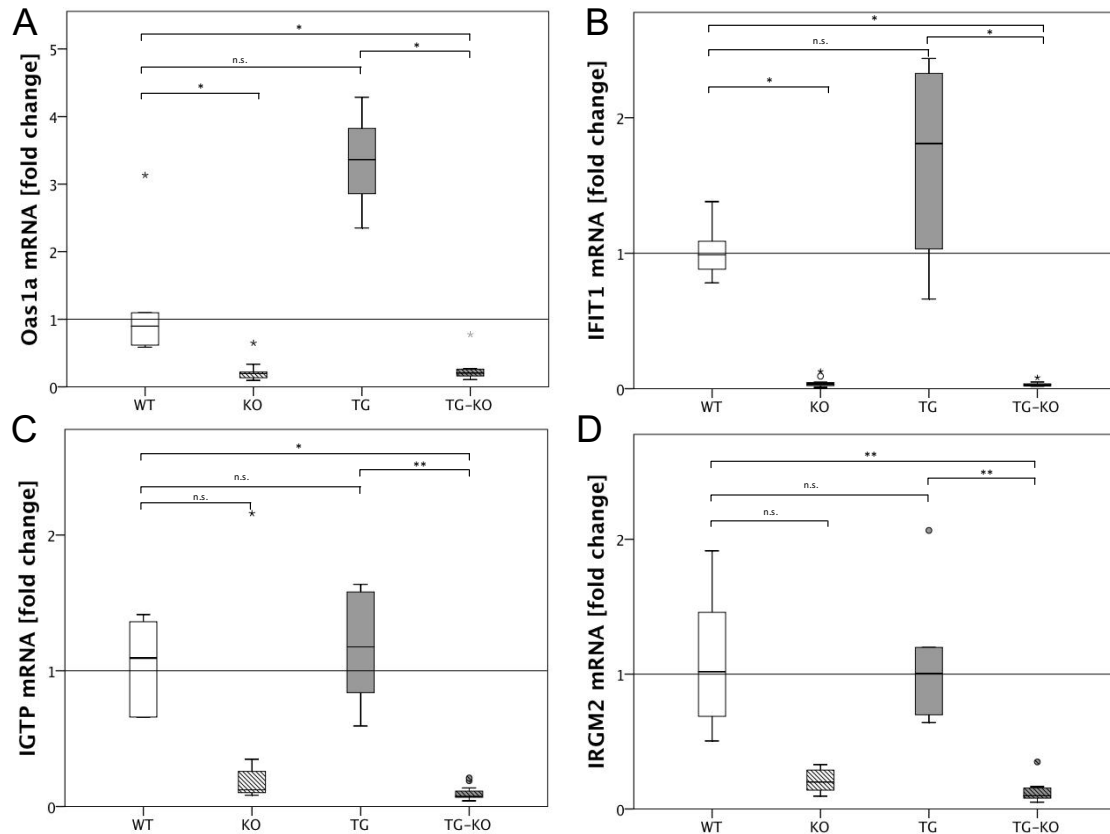


Abbildung 24) qPCR der mRNA-Expression Interferon-stimulierter Gene. Mittels qPCR wurden die vier untersuchten Gruppen auf Expression der ISGs **A) Oas1a B) IFIT1 C) IGTP** und **D) IRGM2** überprüft. In allen vier überprüften ISGs konnte eine signifikante bzw. hochsignifikante Regulation im Vergleich von TG und TG-KO nachgewiesen werden. Eine signifikante Regulation im Vergleich von WT und TG konnte nicht gezeigt werden.

Oas1a das sowohl im Microarray als auch in der qPCR am stärksten regulierte ISG wurde zusätzlich mittels semiquantitativem Western-Blot in der Proteinexpression überprüft.

3. ERGEBNISSE

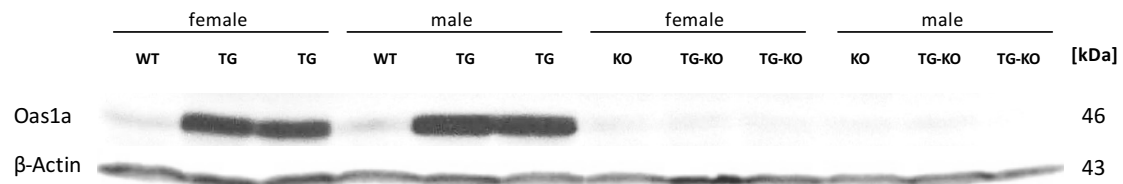


Abbildung 25) Western Blot-Analyse der Oas1a-Expression. Die HBs-transgenen Mäuse (TG) zeigten eine deutliche Expression von Oas1a, die sich sonst weder in WT noch TG-KO nachweisen ließ. Es zeigten sich keine Geschlechtsunterschiede.

3.3.2.3 ISG15/USP18-Signalweg

	TG vs. WT				KO vs. WT				TG-KO vs. TG			
	Fold Change	P-value	Int1	Int2	Fold Change	P-value	Int1	Int2	Fold Change	P-value	Int1	Int2
ISG15	3,68	0	11153	41166	-3,74	0	9449	2530	-8,57	0	42807	4957
USP18	7,58	0	1199	9142	-12,48	0	1078	86	-57,63	0	9411	165

Tabelle 22) Microarray-Analyse ISG15 und USP18. TG zeigte im Vergleich zu WT eine signifikante Heraufregulation sowohl von ISG15 als auch von USP18. Der KO wies in beiden Fällen im Vergleich zum WT eine Herunterregulation auf. Im Vergleich von TG und TG-KO konnte schließlich eine Verminderung der Expression von ISG15 um den Faktor 8,57 nachgewiesen werden. USP18 zeigte sich hier um den Faktor 57,63 reduziert.

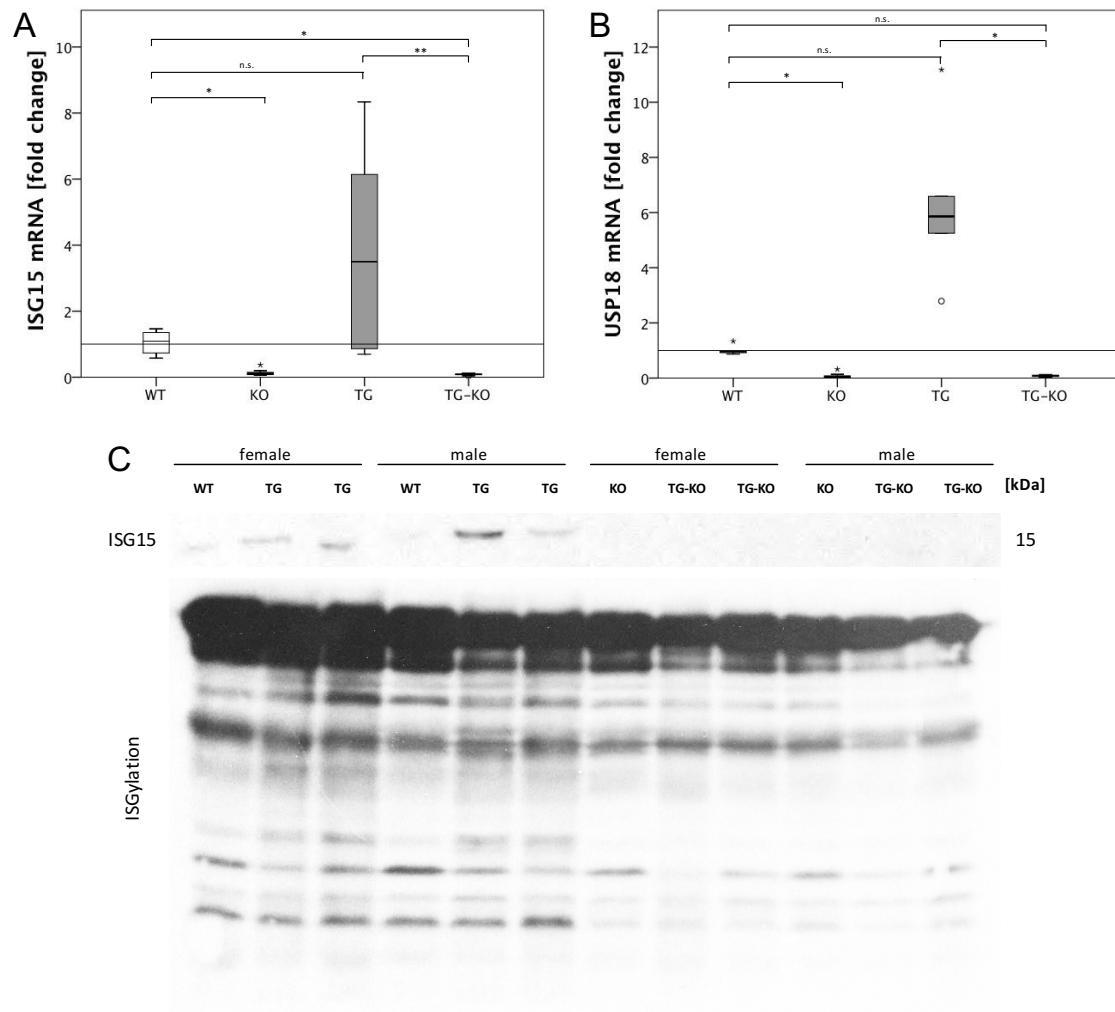


Abbildung 26) ISG15/USP18-Signalweg. In der qPCR wurden sowohl **A) ISG15** als auch **B) USP18** in den vier Gruppen in ihrer Expression überprüft. Die schon im Microarray nachgewiesene Herunterregulation von ISG15 und USP18 im Vergleich KO gegen WT konnte in der qPCR als signifikant bestätigt werden. Auch die Herunterregulation von TG zu TG-KO zeigte sich sowohl bei ISG15, als auch bei USP18 als signifikant, bzw. hoch signifikant. **C) Western Blot ISG15** Im WB konnte gezeigt werden, dass ein Knockout von IRF3/7 die Expression von ISG15 reduziert. Während sich die HBs-transgenen Mäuse (TG) geschlechtsunabhängig mit einer im Vergleich zu WT verstärkten Expression zeigten, ließ sich in den KO Gruppen kein ISG15 nachweisen. Zudem wurde die ISGylation überprüft, die ubiquitäre Proteinbindung von ISG15. Die beiden KO Gruppen KO und TG-KO zeigten auch hier eine Verminderung der ISGylation, die sich als Signalminderung in den aufgetragenen Banden äußert.

3.3.2.4 Serum-Analyse mittels *Proteom Profiler*

Zur Analyse der Regulation von Zytokinen wurde der *Proteom Profiler™* Array verwendet. Das *Mouse Cytokine Array Panel A* ermöglicht die parallele, relative Bestimmung von Zytokinen und Chemokinen im Serum.

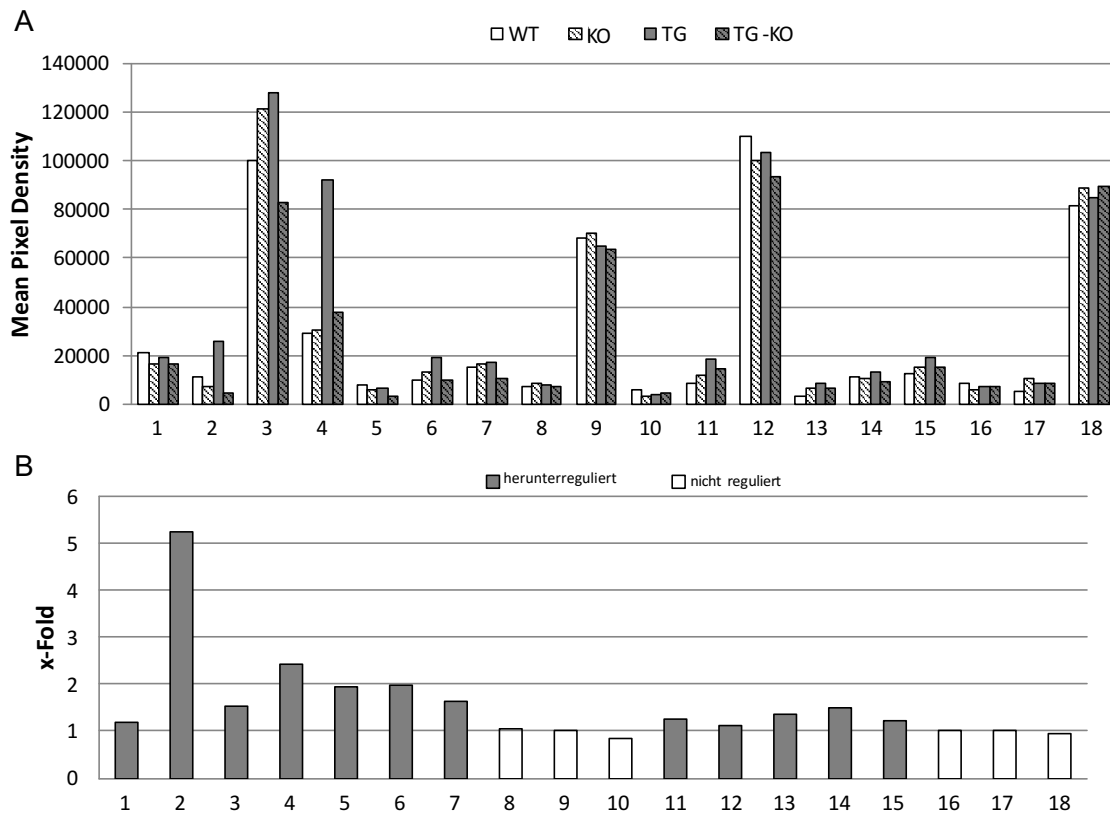


Abbildung 27) Expressionsanalyse der Zytokine im *Proteom Profiler*. A) Semiquantitativer Vergleich der untersuchten Zytokine. Eine verstärkte Expression in HBs-transgenen Mäusen (TG) und einer Verminderung in den IRF3/7 Knockout Gruppen (KO und TG-KO) konnte als Muster in 2, 3, 4, 6, 7 und 14 gezeigt werden **B) Vergleich der Regulation in TG gegen TG-KO.** Gezeigt ist die x-fache Herunterregulation von TG zu TG-KO. Die beiden am stärksten regulierten Zytokine waren IP-10 (5,7-fach) und TIMP-1 (2,4-fach). Als „herunterreguliert“ wurde ab $x\text{-Fold} \geq 1,1$ definiert; 1 – BLC, 2 – IP-10, 3 – C5/C5a, 4 – TIMP-1, 5 – G-CSF, 6 – CXCL-1, 7 – TNF- α , 8 – GM-CSF, 9 – M-CSF, 10 – TREM-1, 11 – MCP-1, 12 – sICAM-1, 13 – MIG 14 – IL-1 α , 15 – IL-16, 16 – IL-1ra, 17 – RANTES, 18 – SDF-1.

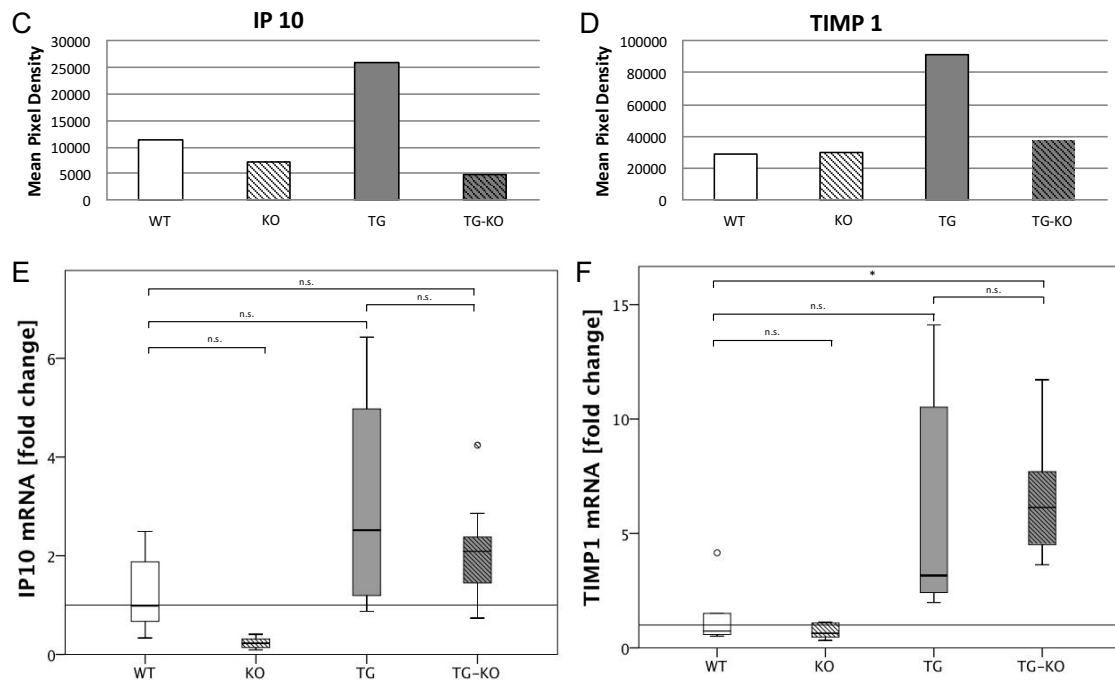


Abbildung 28) Die Regulation von IP10 und TIMP1. C) Regulation von IP10 im *Proteom Profiler*. IP10 zeigte in der Auswertung einen im KO vergleichend mit WT erniedrigten Wert. TG wies eine Hochregulation auf, die vergleichend in TG-KO herunterreguliert war. **D) Regulation von TIMP1 im *Proteom Profiler*.** TIMP1 zeigte sich im KO in etwa auf gleichem Niveau wie im WT. TG war ebenfalls hochreguliert, TG-KO im Vergleich mit TG in der Expression vermindert **E) qPCR der mRNA-Expression von IP10.** Die Überprüfung der Regulation von IP10 mRNA in der qPCR zeigte tendenziell ein den Ergebnissen des *Proteom Profilers* ähnliches Regulationsmuster, welches sich jedoch als nicht signifikant herausstellte. **F) qPCR der mRNA-Expression von TIMP1.** TIMP1 war in der qPCR in TG und TG-KO im Vergleich zu WT heraufreguliert, wobei dies nur für TG-KO als signifikant bestätigt werden konnte. Die Beobachtungen des *Proteom Profilers* ließen sich in der qPCR grundsätzlich bestätigen, waren allerdings nicht in allen Fällen signifikant.

3.3.3 Überprüfung durch HBs-Transgenität aktivierter Signalkaskaden

3.3.3.1 Unfolded Protein Response

Die *Unfolded Protein Response* (UPR) aktiviert Transkriptionsfaktoren für proinflammatorische Zytokine und steigert so die Zytokinproduktion als Antwort auf virale Infektionen. Die UPR fungiert damit als internes kostimulatorisches Signal zur Verbesserung der Spezifität der Immunantwort [101]. Um den Einfluss des KO auf über die UPR vermittelte direkte hepatotoxische Parenchymschäden zu analysieren, wurden die Signalkaskaden der UPR auf Regulation überprüft.

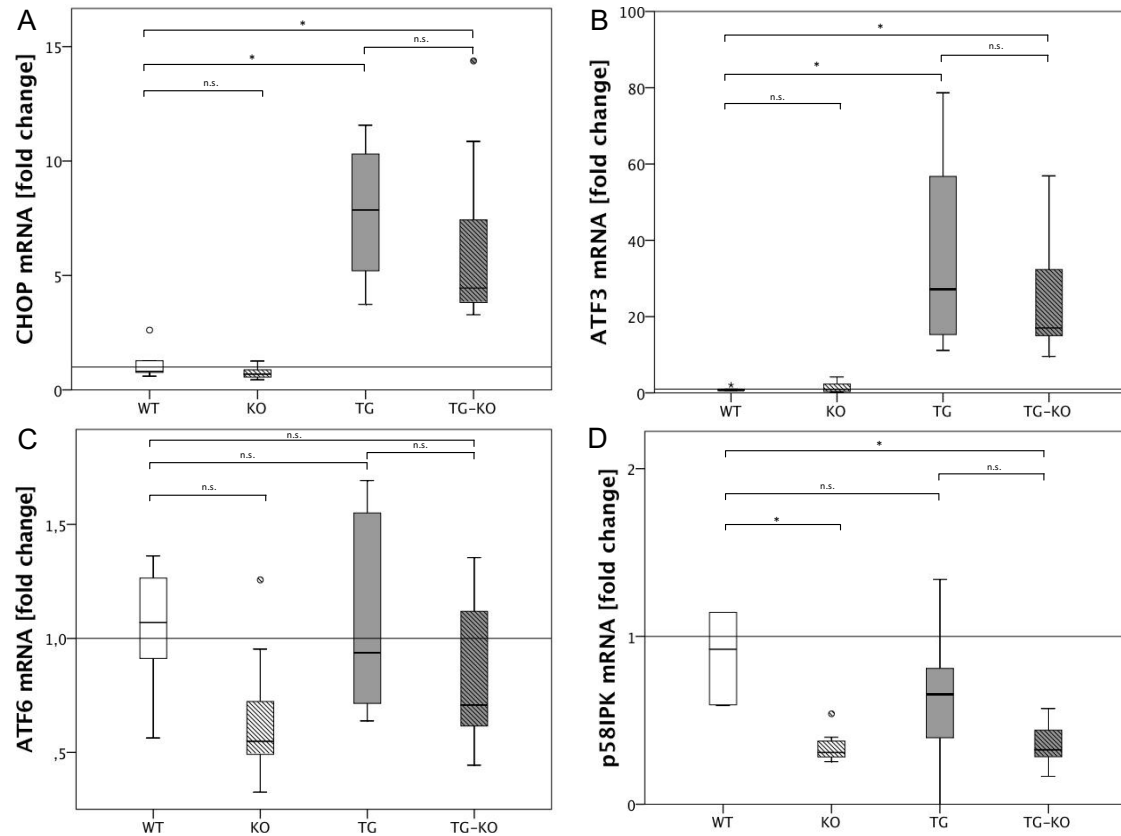


Abbildung 29) qPCR *Unfolded Protein Response*. Zur Überprüfung der Auswirkung des KO auf die UPR wurden im Lebergewebe mittels qPCR die mRNA-Regulation von CHOP, ATF3, ATF6 und p58IPK überprüft. Für **A) CHOP** und **B) ATF3** konnte gezeigt werden, dass die HBs-transgenen Gruppen TG und TG-KO eine signifikant erhöhte Expression von sowohl CHOP, als auch ATF3 aufwiesen. In TG-KO konnte im Vergleich mit TG keine relevante Herunterregulation festgestellt werden. **C) ATF6.** Die Expressionsmuster von ATF6 stellten sich in der Signifikanzanalyse als nicht signifikant heraus. **D) p58IPK.** Es zeigte sich, dass p58IPK in den IRF3/7 Knockout Gruppen KO und TG-KO im Vergleich zu WT signifikant herunterreguliert war. TG zeigte im Vergleich keine signifikante Regulation.

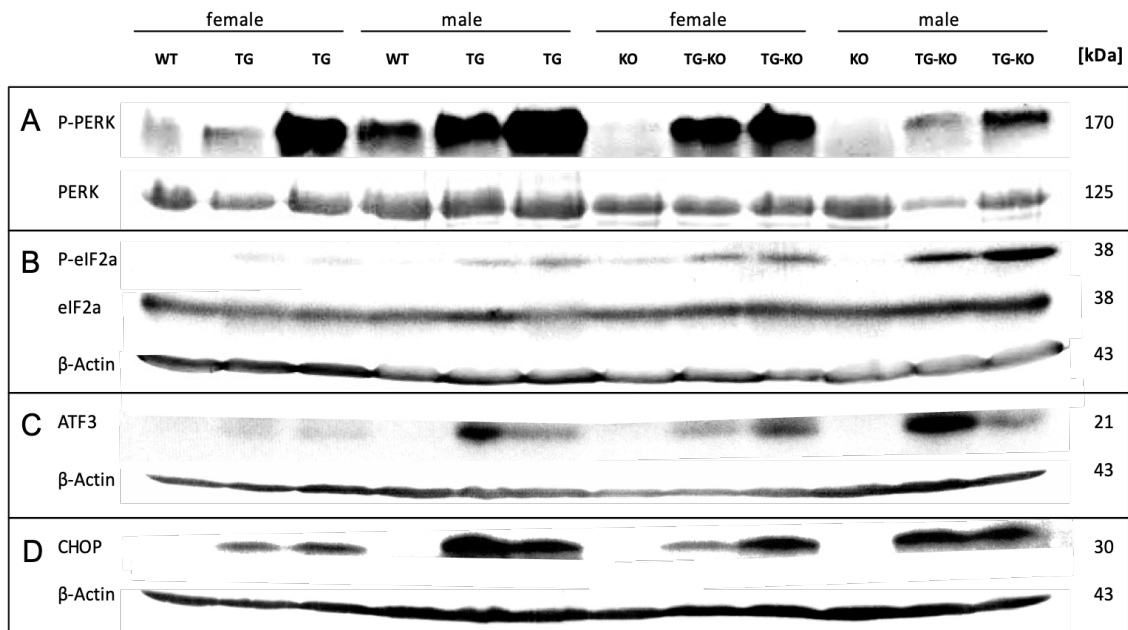


Abbildung 30) Western Blot-Analyse der UPR. A) PERK Die Phosphorylierung von PERK zeigte sich in den für HBs transgenen Gruppen (TG und TG-KO) verstärkt. Im Vergleich von TG und TG-KO fiel bei männlichen Mäusen eine verminderte Phosphorylierung auf. Die Expression von PERK zeigte in den überprüften Gruppen keinen Unterschied. **B) eIF2α** Bei der Überprüfung von eIF2α zeigte sich, dass die Phosphorylierung in gleicher Weise im Vergleich in den transgenen Gruppen verstärkt war. Im Vergleich von TG und TG-KO fiel im Gegensatz zu der Beobachtung in A) eine Verstärkung der Phosphorylierung in männlichen Mäusen auf. Zudem konnte eine Verstärkung der Phosphorylierung in den IRF3/7-KO Gruppen (KO und TG-KO) gezeigt werden. Die Expression von eIF2α wies keinen Gruppenunterschied auf. Sowohl in der Überprüfung von **C) ATF3** als auch **B) CHOP** zeigte sich, dass die HBs-transgenen Gruppen eine verstärkte Expression aufwiesen. Im Vergleich von TG und TG-KO konnten keine eindeutige Tendenz in Bezug auf eine unterschiedliche Expression nachgewiesen werden.

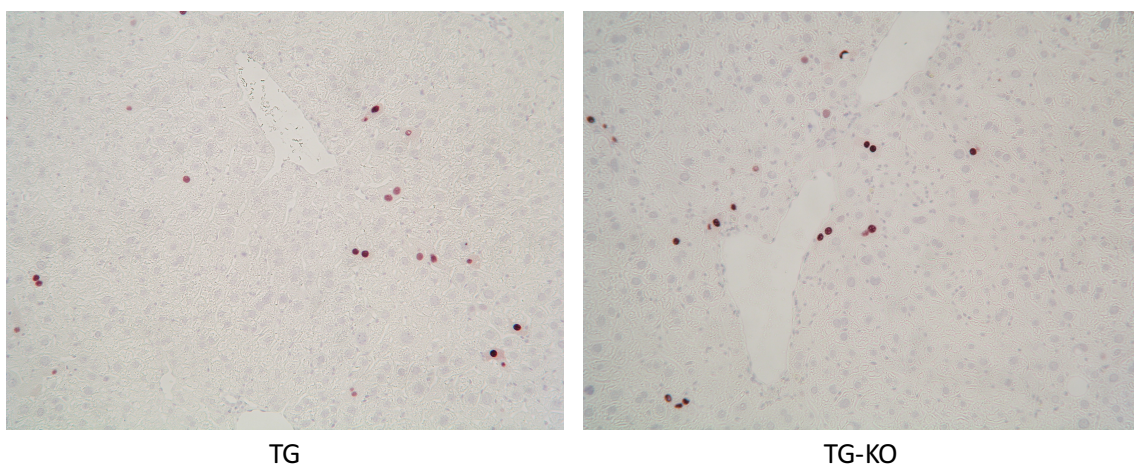


Abbildung 31) Immunhistochemische Färbung des ER-Stressmarkers CHOP. Dunkelviolett = Hepatozyt mit CHOP Färbung. In der Immunhistochemie konnte, wie schon zuvor in qPCR und Western Blot, gezeigt werden, dass die Kombination der HBs-Transgenität mit dem IRF3/7-KO keine signifikante Auswirkung auf die Expression von CHOP hat.

3.3.3.2 Akute-Phase-Reaktion

Bei der Analyse des Microarrays zeigte sich eine signifikante Regulation der Akute-Phase-Proteine Metallothionein-II (MT2) und Serum-Amyloid-A (SAA1). Um deren Regulation im Rahmen der durch den KO bedingten Reduktion der Interferonantwort zu überprüfen wurde ihre Expression mittels qPCR überprüft.

	TG vs. WT				KO vs. WT				TG-KO vs. TG			
	Fold Change	P-value	Int1	Int2	Fold Change	P-value	Int1	Int2	Fold Change	P-value	Int1	Int2
MT2	-1,26	0,02203	17714	14071	-3,42	4,12E-30	16592	4856	6,56	7,72E-18	14670	98838
SAA1	-1,50	0,00047	17306	11506	-2,62	3,13E-39	16638	6348	3,67	4,83E-31	11498	42457

Tabelle 23) Microarray-Analyse Akute-Phase-Reaktion. Während sich sowohl MT2 als auch SAA1 im KO im Vergleich zu WT reduziert zeigten, waren beide im Vergleich von TG-KO gegen TG in TG-KO signifikant erhöht.

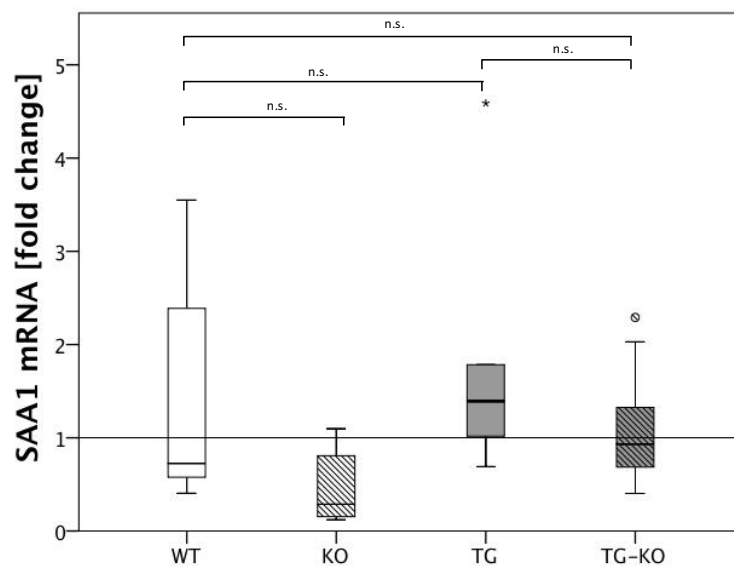


Abbildung 32) qPCR der mRNA-Expression von SAA1. Zur Verifizierung der Ergebnisse des Microarrays wurde im Lebergewebe die Expression von SAA1 mittels qPCR überprüft. Es konnten keine signifikanten Gruppenunterschiede nachgewiesen werden. Speziell TG-KO im Vergleich zu TG – im MA mit einer Heraufregulation – zeigte, nicht signifikant, aber tendenziell eine Herunterregulation.

Cell Stress Signaling

Wie schon bei der Akuten-Phase-Reaktion wurde von uns zudem die Auswirkung des KO auf *Cell Stress Signaling* durch die Überprüfung der Regulation der daran beteiligten *Nuclear Protein 1* (NUPR1), *Succinate Receptor 1* (Sucnr1) und *Three prime repair exonuclease 1* (Trex1) untersucht.

	TG vs. WT				KO vs. WT				TG-KO vs. TG			
	Fold Change	P-value	Int1	Int2	Fold Change	P-value	Int1	Int2	Fold Change	P-value	Int1	Int2
NUPR1	34,67	0	147	5111	4,69	2,80E-45	125	586	1,20	34,67	0	147
Sucnr1	-1,38	0,00001	3538	2557	1,54	3,83E-11	3758	5797	-2,84	4,33E-36	2588	912
Trex1	1,86	5,19E-14	4782	8923	-1,22	0,04858	4356	3544	-2,48	2,03E-31	9517	3832

Tabelle 24) Microarray-Analyse Cell Stress. NUPR1 zeigte sich in TG im Vergleich mit WT signifikant heraufreguliert. Auch in KO konnte eine Heraufregulation nachgewiesen werden. Sucnr1 war in keiner der überprüften Vergleiche signifikant reguliert. Trex1 wies in TG eine leichte, aber signifikante Hochregulation auf, in TG-KO zeigte sich in Bezug auf TG eine signifikante Herunterregulation

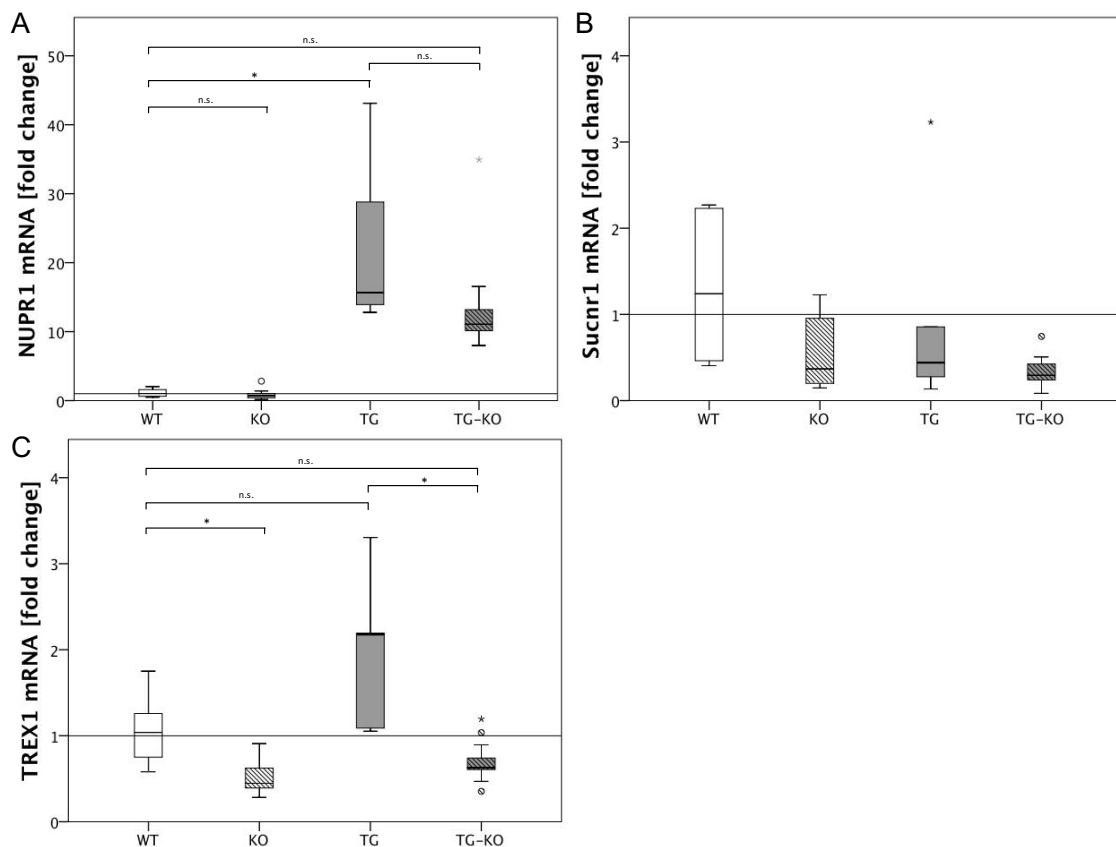


Abbildung 33) qPCR Cell Stress Signaling. Zur Überprüfung des Cell Stress Signalings wurde die mRNA-Expression von NUPR1, Sucnr1 und Trex1 im Lebergewebe überprüft. **A) NUPR1.** Die im MA gezeigte Hochregulation in TG ließ sich in der qPCR bestätigen. Im Vergleich von TG und TG-KO zeigte sich auch hier keine relevante Regulation **B) Sucnr1** wies ähnlich wie im MA keine signifikante Regulation auf **C) Trex1** zeigte sich, wie auch im MA, in TG erhöht, und TG-KO im Vergleich zu TG signifikant herunterreguliert.

3.3.4 Bisher nicht als Interferon-stimulierte Gene beschriebene im Knockout regulierte Gene

Bei der Analyse der Ergebnisse des Microarray fielen einige Gene, die bisher nicht als ISGs, als durch Interferone reguliert, definiert worden sind, durch Regulation in den Lebern von TG-KO Mäusen auf. Bei den regulierten Genen handelte es sich um *T cell lymphoma invasion and metastasis 2* (Tiam2), *D site albumin promoter binding protein* (Dbp), *Mu-crystallin* (Crym), *Cytochrome P450 omega-hydroxylase 4A14* (Cyp4a14) und *Hemoglobin beta adult minor chain* (Hbb-b2).

	TG vs. WT				KO vs. WT				TG-KO vs. TG			
	Fold Change	P-value	Int1	Int2	Fold Change	P-value	Int1	Int2	Fold Change	P-value	Int1	Int2
Tiam2	12,65	0	66	836	-5,47	0	10031	1833	-4,06	1,50E-09	108	26
Dbp	-1,17	0,01373	66356	56480	-7,58	0	1109	146	-3,75	4,08E-36	25753	6836
Crym	-1,02	0,79951	1113	1093	-3,17	2,63E-34	68555	21511	-3,01	5,04E-20	211	71
Cyp4a14	1,08	0,24947	8782	9478	-5,47	0	10031	1833	13,93	0	231	3227
Hbb-b2	1,03	0,70006	10830	11124	-11,86	0	4581	388	23,15	0	1375	59

Tabelle 25) Im Microarray reguliert. Im Microarray fielen einige bisher nicht als Interferon-stimulierte Gene durch Regulation auf. **Tiam2** war vergleichend mit WT in TG heraufreguliert und im KO herunterreguliert. Auch TG-KO zeigte im Vergleich mit TG eine Herunterregulation. **Dbp**, und **Crym** waren in TG vs. WT nicht signifikant reguliert, wiesen aber im KO eine Herunterregulation auf. Zudem zeigte TG-KO vergleichend mit TG eine Herunterregulation. Gegensätzlich in TG-KO vergleichend heraufreguliert waren **Cyp4a14** und **Hbb-b2**. Beide waren dabei im KO interessanterweise herunterreguliert.

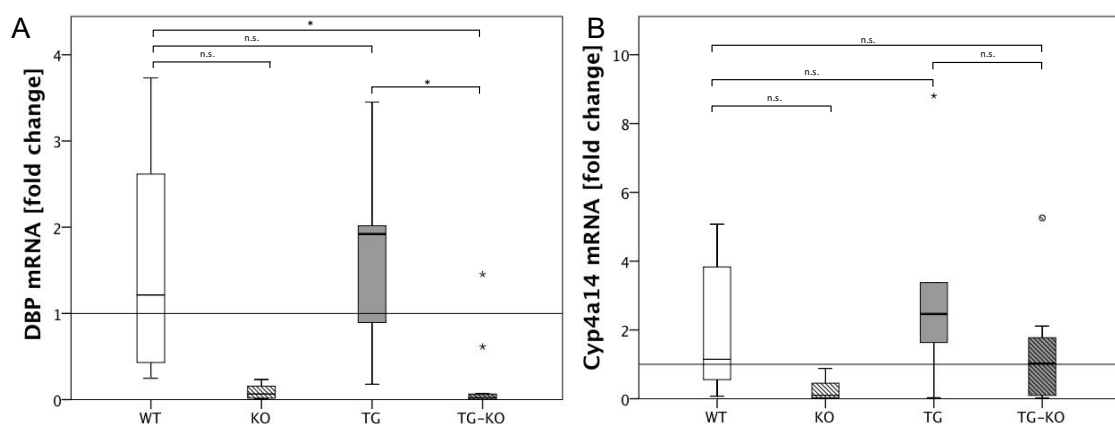


Abbildung 34) qPCR der mRNA-Expression im Microarray regulierter Gene. Zur Überprüfung der Ergebnisse des Microarrays wurden DBP und Cyp4a14 mittels qPCR überprüft. **A) DBP** zeigte eine signifikante Herunterregulation von DBP in TG-KO, dies sowohl im Vergleich mit WT als auch TG. **B) Cyp4a14** In der qPCR konnte keine signifikante Regulation von Cyp4a14 gezeigt

werden. Im speziellen konnte im Vergleich von TG-KO mit TG die im Microarray gezeigte Heraufregulation nicht bestätigt werden.

Die im MA gezeigte Regulation für DBP konnte in der qPCR bestätigt werden. Cyp4a14 war im Vergleich von KO mit WT zwar wie im MA herunterreguliert, dies konnte aber nicht als signifikant bestätigt werden. Die Heraufregulation von TG-KO im Vergleich mit KO konnte in der qPCR, wenn nur minimal und ohne Signifikanz, gezeigt werden.

3.4 TUMORGENESE

In der HE-Färbung zeigte sich in einer männlichen TG-KO Maus ein tumoröses Infiltrat. Für die TG-Mauslinien ist eine Tumorgenese beschrieben, dies aber zu wesentlich späteren Zeitpunkten als es für die hier gezeigte 12 Wochen alte Maus typisch wäre.

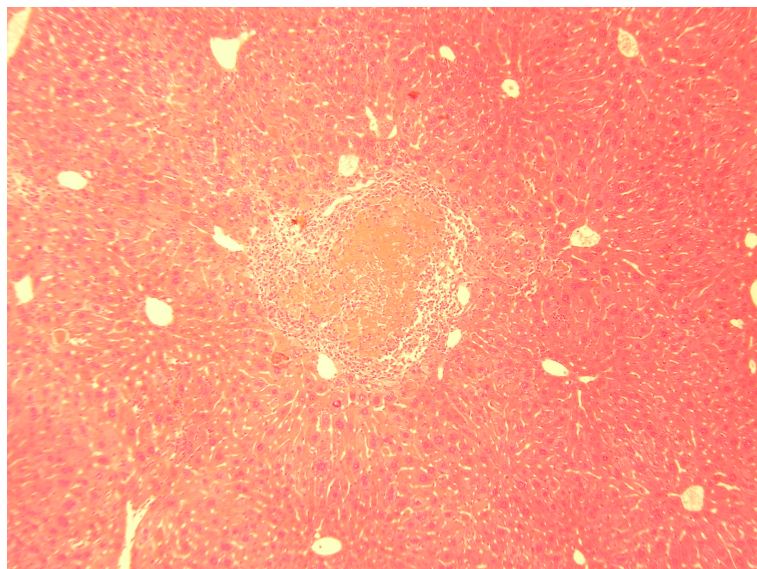


Abbildung 35) Mikroskopischer Nachweis einer hyperplastischen Struktur. In der HE-Färbung eines Leberbiopsats der TG-KO Maus 501 wurde eine tumoröse Struktur gefunden. Bei der 12 Wochen alten männlichen Maus war im Leberparenchym eine auffällige Hyperplasie zu sehen. Vergrößerung 100x

4. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit konnten erstmals die Auswirkungen einer Ausschaltung der Interferon-regulierenden Gene IRF3 und IRF7 auf die Pathologie und Immunantwort im HBs-transgenen Mausmodell beschrieben werden. Zentrale Frage war hierbei zunächst, inwieweit der Knockout von IRF3 und IRF7 im HBs-transgenen Mausmodell zu einem Ausschalten der Interferon-Antwort führen würde. Des Weiteren konnten die Auswirkungen des KO auf die Immunantwort beschrieben werden. Insbesondere aufgrund der Annahme, dass pathologische Effekte einer HBV-Infektion vor allem über die immunologischen Abwehrmechanismen verursacht werden, ist dies von Relevanz. Nicht zuletzt stellt sich die Frage, inwieweit beobachtete Ergebnisse von klinischer Bedeutung sind oder sich sogar für therapeutische Ansätze nutzen lassen.

4.1 DER EINFLUSS DES IRF3/7-KNOCKOUTS AUF DIE LEBERPATHOLOGIE HBs-TRANSGENER MÄUSE

4.1.1 Der IRF3/7-Doppelknockout zeigt keine Hinweise für eine Verminderung der durch die HBs-Transgenität bedingten Leberschädigung

In der Analyse der ALT-Aktivität im Serum konnte im Vergleich von TG und TG-KO nachgewiesen werden, dass keine signifikante Veränderung der ALT-Aktivität als Hinweis auf einen Einfluss auf Leberschädigung vorlag. Entsprechend gilt, dass zumindest im Alter von 12 Wochen der IRF-KO keine Minderung der HBs-bedingten entzündlichen Leberschädigung verursacht. Die histologische Überprüfung zeigte ebenfalls keine Indikationen für eine verminderte Leberschädigung in TG-KO, stattdessen konnten vermehrt die für eine CHB pathognomonischen GGHs nachgewiesen werden (siehe Abbildung 15). Bei chronischer HBV-Infektion führt die intrazelluläre Akkumulation von LHBs bekanntermaßen zur Bildung eben jener charakteristischen GGHs [81], [89], [91]. Die Akkumulation filamentöser HBsAg-Partikel, die nicht suffizient sekretiert werden können, führt in betroffenen Hepatozyten zum Bild hypertrophierter, eosinophiler GGHs und im weiteren Verlauf zu Leberläsionen bedingt durch zelluläre Nekrose [90]. Erstmalig von Haziyanis und Popper beschrieben [102], werden GGHs ihrem Erscheinungsbild nach in die zwei Untergruppen Typ I und Typ II unterteilt, wobei Typ II sich mikroskopisch durch gruppiertes Vorkommen sowie - mutationsbedingt – eine ausbleibende Anfärbarkeit von Pre-S2 von Typ I abgrenzt [103]. Bei vorliegender CHB konnte gezeigt werden, dass Typ II GGH

vermehrt bei vorliegendem HCC nachweisbar war, zudem zeigte sich eine Korrelation zwischen Grad der Fibrose und vorhandenen Typ II GGH [98]. Es wird zudem vermutet, dass über die Detektion von pre-S2 Mutanten und Typ II GGHs die Entwicklung eines HCCs detektiert bzw. vorhergesehen werden kann und diese folglich als Risikomarker für die Entwicklung eines HCCs dienen könnten [104]. Aufgrund der hier vorliegenden Ergebnisse ergibt sich die Fragestellung, inwieweit Interferon die Entstehung von GGH hemmen könnte. Der durch den KO bedingte Ausfall der Interferon-Antwort kann als kausal ursächlich für das vermehrte Auftreten von GGH diskutiert werden. Die histologische Darstellung der Fibrose mittels *Sirius Red*-Färbung zeigte keinen Gruppenunterschied, wenngleich hierbei ebenfalls der mit 12 Wochen noch relativ frühe Beobachtungszeitpunkt beachtet werden muss. Die Quantifizierung der Leberinflammation und -fibrose mittels Ishak- und Desmet-Score bestätigte die Annahme, dass der KO bei 12 Wochen alten Mäusen keine Veränderung der Leberschädigung verursacht. Die Einteilung der Hepatitis nach Ishak zeigte entsprechend eine beginnenden Inflammation sowohl in TG als auch in TG-KO. Das Staging der Fibrose nach Desmet wies nur in TG-KO Hinweise für eine Fibrose auf, was mit der histologischen Beschreibung vermehrter GGH in Übereinstimmung gebracht werden kann. Schlussendlich scheint der KO zum Zeitpunkt von 12 Wochen keinen deutlichen Unterschied in der zu quantifizierenden Leberschädigung zu zeigen, es kann aufgrund der vermehrt nachweisbaren GGH allerdings vermutet werden, dass der KO die Chronifizierung der HB tendenziell beschleunigt.

4.1.2 Der IRF3/7-Doppelknockout bedingt keine Gallengangsschädigungen

In der Überprüfung der hepatisch-biliären Pathologie wurden mittels Bestimmung der AP als klinischem Screeningparameter die Mausgruppen auf vorliegende Gallengangsschädigung überprüft. Ein erhöhter Wert der u.a. im Skelettsystem und in der Leber synthetisierten Enzyme ist Indikator für Erkrankungen der Leber und Gallenwege, spielt aber auch im Rahmen des Knochenstoffwechsels eine Rolle [105], [106]. Die AP ist am Transport von Lipiden, aber auch an der Knochenkalzifikation beteiligt [106]. Im Rahmen von akuten Hepatitiden finden sich meist normal bis moderat erhöhte Werte, eine signifikante Erhöhung weist auf eine Cholestase hin. Weitere relevante Differentialdiagnosen sind infiltrative Lebererkrankungen, Abszesse sowie granulomatöse Erkrankungen und Amyloidose [99]. Der Normwert für die AP in BALB/c-Mäusen liegt geschlechtsabhängig bei 55 bzw. 61 U/l [107], die hier überprüften Mäuse zeigten, vermutlich aufgrund des jungen Alters, bereits im Wildtyp wesentlich höhere Werte. In der KO-Gruppe zeigte sich eine

signifikante Erhöhung der AP, was für das Vorliegen einer durch den IRF3/7-KO bedingten beginnenden Gallengangschädigung bzw. eine Cholestase sprechen kann. Gleichzeitig zeigten die HBs-transgenen Gruppen TG und TG-KO im Vergleich mit WT keine signifikante Regulation. Es muss schlussfolgernd davon ausgegangen werden, dass zum Zeitpunkt von 12 Wochen durch HBs-Transgenität keine relevante Gallengangschädigung verursacht wird. Der KO von IRF3 und IRF7 zeigt jedoch Hinweise für eine bedingte Gallengangsschädigung. Hier sind die Untersuchungen des Mausmodells zu späteren Zeitpunkten von Interesse, um die Verknüpfung von IRF3/IRF7 und hepatobiliären Prozessen weiter zu untersuchen.

Da Lebererkrankungen die Gallensäuren-Synthese und den Stoffwechsel beeinflussen können, wurde zudem die Gallensäuren-Konzentration im Serum als prognostischer und diagnostischer Marker untersucht [108]. Die Analyse der Serum-Gallensäuren sollte überprüfen, ob IRF3 und IRF7 eine Rolle in der Synthese der Gallensäuren spielen. Es konnte dabei gezeigt werden, dass für die Konjugat-Untergruppen eine HBs- und Geschlechts-abhängige Regulation vorlag. Die Taurin-Konjugate waren in den HBs-transgenen Gruppen erhöht. Bei Glycin-Konjugaten zeigte sich eine erhöhte Akkumulation in weiblichen Mäusen, ohne dass HBs oder IRF-KO eine Regulation bedingen würden. Die nicht konjugierten Gallensäuren zeigten vergleichend kein relevantes Regulationsmuster. Folglich kann gesagt werden, dass die hepatisch synthetisierten Gallensäuren in ihrer Expression nicht durch den IRF-KO reguliert zu sein scheinen.

4.2 PROOF OF PRINCIPLE: DER IRF3/7-KNOCKOUT INHIBIERT DIE INTERFERON-ANTWORT IM HBs-TRANSGENEN MAUSMODELL

4.2.1 Der IRF3/7-Knockout inhibiert die IFN-Antwort und assoziiertes *ISG Signaling* in HBs-transgenen Mäusen

Grundsätzlich stellte sich die Frage, inwieweit die latente Aktivierung Interferon-stimulierter Gene durch HBV-Hüllproteine über IRF3 und IRF7 vermittelt wird.

Während für eine Vielzahl von viralen Erkrankungen bereits in der Zellkultur oder im Mausmodell gezeigt werden konnte, dass IRF3 und IRF7 essentiell für die Immunantwort sind, bzw. deren KO mit einer Reduktion von IFN α und IFN β einherging [46], [66], [109], [110], [66], [111] liegen bisher keine Daten zur Funktion von IRF3 und IRF7 im Rahmen eines HBs-transgenen Mausmodells vor. Für das Encephalomyocarditis-Virus und das *Vesicular Stomatitis Virus* [66], das *West Nile Virus* [110], [112] und das *Herpes Simplex*

Virus [113], [114] liegen Arbeiten zur Funktion von IRF3 und IRF7 vor, die nahe legen, dass IRF7 in der Induktion der Immunantwort eine entscheidendere Rolle spielt, dabei aber synergistisch mit IRF3 fungiert.

Im hier gezeigten neu etablierten Mausmodell konnte nachgewiesen werden, dass auch in HBs-transgenen Mäusen IRF3 und IRF7 für die Immunantwort essentiell sind. Die Überprüfung ob der IRF3/7-KO eine Ausschaltung der *Interferon Response* bedingt, wurde anhand der Regulation der ISGs als *Downstream Target* der Interferone vorgenommen. Zum einen wurden als ISGs bekannte Gene in ihrer Regulation im MA analysiert. Die überprüften ISGs Oas1a, IFIT1, IGTP und IRGM2 waren in den HBs-transgenen Mäusen wie erwartet im Sinne einer Interferonantwort heraufreguliert. Der IRF3/7-KO führte im Vergleich mit WT zu einer Herunterregulation der ISGs, womit sich die zentrale Rolle von IRF3 und IRF7 in der Induktion des *ISG Signalings* auch im „gesunden“ WT zeigt. Die im MA nachgewiesene signifikante Verminderung der ISGs durch den KO konnte in der qPCR bestätigt werden. Als am stärksten reguliert fiel dabei sowohl im MA als auch in der qPCR die *2'-5' oligoadenylate synthetase 1A* (Oas1a) auf, deren Expression - wie im Western Blot nachgewiesen - komplett ausgeschaltet war. Enzymatisch aktive OAS-Proteine spielen eine wichtige antivirale Rolle [115], [116]. Aktiviert durch virale dsRNA katalysieren OAS-Proteine die Synthese von kurzen 2'-5'-Oligoadenylaten (2-5A) aus ATP. 2-5A aktiviert die latente Endonuklease RNase L, die sowohl zelluläre als auch virale einzelsträngige RNAs abbaut [115]. Eine spezifische Funktion von Oas1a im Rahmen der HBV Erkrankung ist bisher nicht beschrieben und sollte weiter untersucht werden. In der Interpretation der Regulation von ISGs ist grundsätzlich zu beachten, dass das Ausmaß der Regulation einzelner ISGs nicht direkt mit deren Einfluss auf virale Replikation korreliert. *Schoggins et al.* diskutieren dies und zeigen beispielhaft auf, dass die häufig starke Regulation von ISGs der IFIT-Familie mit nur geringer bis keiner Regulation antiviraler Aktivität einhergeht [44].

HBs-Transgenität führte zusammen mit dem IRF-KO zu einer signifikanten Herunterregulation der angeführten ISG, die Aktivierung der Typ-I-IFN-Antwort wird somit auch im HBs-transgenen Mausmodell über IRF3 und IRF7 vermittelt. Es gilt im weiteren zu überprüfen, welche Funktion die einzelnen ISGs in der Immunantwort haben, ob eine Korrelation zwischen Ausmaß der Regulation von ISGs und deren Einfluss auf virale Immunantwort vorliegt, und inwieweit eine beschriebene Redundanz der einzelnen Effekte vorliegt [79]. Letztlich führt dies zur Fragestellung welche therapeutische Möglichkeit sich durch eine Modulation der ISGs in der Therapie einer chronischen Hepatitis B ergeben. Die Überprüfung der Auswirkungen eines Oas1a KO im HBs-transgenen Mausmodell, wofür noch keine Daten vorliegen, wäre ein möglicher nächster Schritt.

Der ISG15/USP18-Signalweg ist direkt von IRF3 und 7 abhängig

ISG15 (*interferon stimulated gene 15 kDa*) als Ubiquitin-artiges Molekül, das eine kovalente Modifikation von Proteinen - die sogenannte ISGylation - bedingt, ist stark durch Typ-I-IFN reguliert und wird als prognostischer Marker für HBV-assoziierte Karzinogenese diskutiert [117]. Es konnte bereits gezeigt werden, dass ISG15-Serumlevel bei HBV-Patienten erhöht und zudem mit dem Vorliegen von HBV-assoziierten Lebererkrankungen verknüpft waren [118]. USP18 wiederum fungiert zum einen als ISG15-spezifische Peptidase und spaltet an Proteine gebundenes ISG15. Zum anderen interagiert USP18 mit Typ-I-IFN-Rezeptoren und inhibiert deren *Downstream Signaling* [119].

Wie die zuvor beschriebenen ISGs wiesen in unserem Mausmodell auch ISG15 und USP18 im MA eine Heraufregulation in HBs-transgenen Mäusen auf, welche wiederum im KO stark herunterreguliert waren. Die Ergebnisse konnten hier ebenfalls in der qPCR bestätigt werden. Die Überprüfung von ISG15 im WB zeigte deutlich, dass auch auf Proteinebene eine Heraufregulation durch HBs-Transgenität vorliegt, und gleichermaßen im IRF-KO kein ISG15 nachweisbar ist. Ähnliches konnte für die Protein-ISGylation nachgewiesen werden. In TG-Mäusen lag vergleichend mit dem WT eine verstärkte ubiquitäre ISGylation vor, im KO war dies deutlich reduziert (Abbildung 25).

Die konkrete Funktion von ISG15 und USP18 in der Abwehr viraler Erkrankungen ist Grundlage einer Vielzahl aktueller Arbeiten [112], [114], [116], [122], [123]. Es bestehen hierbei Überlegungen für therapeutische Ansätze mittels Modulation von USP18, da gezeigt werden konnte, dass bei reduzierter USP18-Expression eine HBV-Infektion schneller beseitigt werden kann, bzw. die HBV-Replikation reduziert ist [120]. Als direkte Aktivator von ISG15 könnte die gezielte Verstärkung einer ISGylation durch IRF3 und 7 therapeutischer Ansatz im Rahmen der CHB sein. In Kombination mit der zuvor beschriebenen Modulation durch ein *Targeting* von USP18 könnte eine vermehrte bzw langfristige ISGylation zu der hierdurch bedingten Inhibition der viralen Protein-Translation, zur Verminderung der endosomalen viralen Streuung und verstärkter Virus-Elimination führen [124].

4.2.2 Identifikation von bisher nicht als ISGs beschriebener im IRF3/7-Knockout regulierter Gene

Von besonderem Interesse waren in den MA-Untersuchungen Gene, die sich in unserem Mausmodell als durch den KO reguliert darstellten und bisher nicht als durch Interferone stimuliert – also als ISGs – beschrieben worden waren [120]. Hierbei ist zum einen von

Interesse, die Funktion von ISGs in ihrer Gesamtheit und insbesondere die Rolle in der Immunität zu untersuchen. Die Analyse einzelner ISGs und ihrer erregerspezifischen und potenziell therapeutischen Funktion ist hierbei der nächste Schritt.

Zur Identifizierung bisher nicht beschriebener ISGs wurden im MA regulierte Gene mit *Interferome 2.01*, einer Datenbanken zur Erfassung Interferon-stimulierter-Gene verglichen [125]. Tiam2, Dbp, Crym, Cyp4a14 und Hbb-b2 konnten in unserem Modell in ihrer Expression als durch Interferone regulierte Gene identifiziert werden. Für diese Gene konnten in MA Übersichtsarbeiten Regulationen durch INF Typ I und II nachwiesen werden. Ihre Relevanz und Signifikanz ist bisher nicht in weiteren Schritten analysiert worden.

T cell lymphoma invasion and metastasis 2 (Tiam2/STEF), ein *guanine nucleotide-exchange factor protein*, ist spezifischer Aktivator der GTPase Rac1 und kritisch für fokale Zelladhäsion und damit Zellmigration und -morphologie [126], [127]. Durch *Chen et al.* konnte es in der Überprüfung humaner HCCs als Tumor-assoziiertes Gen identifiziert werden. Dabei konnte für Tiam2S, eine kurze Transkriptvariante von Tiam2, eine positive Assoziation mit HBV-Infektionen, sowie eine Beteiligung an der HCC-Pathogenese durch Einfluss auf Proliferation und Invasion von Leberkrebszellen nachgewiesen werden [128]. Bisher wurde Tiam2 dabei nicht explizit als durch Interferone reguliert beschrieben. Aufgrund der Ergebnisse unserer Studie ist anzunehmen, dass Tiam2 Interferon-reguliert bzw. -assoziiert ist, da sich im Microarray eine durch TG verursachte Heraufregulation zeigte, die durch den KO in TG-KO wieder herunterreguliert war.

D site albumin promoter binding protein (Dbp), ein Transkriptionsfaktor der b/ZIP Familie, ist an der Steuerung der zirkadianen Rhythmik beteiligt [129] und konnte als Regulator im Zusammenhang mit der ebenfalls zirkadianen Regulation von leberspezifischen Genen gezeigt werden [130]. Hierunter fallen unter anderem einige hepatische Cyp-Gene deren DBP-assoziierte Regulation und hepatische Dysfunktion als Ursache der *Chronic kidney disease* (CKD) diskutiert wird [131]. Auch für Dbp ist bisher keine Regulation durch Interferone diskutiert. Die in der Interferome-Datenbank aufgeführten Datensätze beziehen sich sämtlich auf in vitro Experimente und zeigen mehrheitlich eine Herunterregulation [125]. Die Ergebnisse des hier durchgeführten Microarrays wiesen zwar keine Heraufregulation durch TG auf, waren aber sowohl im TG-KO als auch im KO herunterreguliert. Die Herunterregulation durch den KO konnte in der qPCR signifikant bestätigt werden. Folglich kann auf eine Assoziation von DBP, IRF3 und IRF7 bzw. durch sie regulierte Interferone geschlossen werden. Die Relevanz von zirkadianem Rhythmus und Immunität ist Thema aktueller Forschung [132]. Unabhängig von der hier im Fokus

stehenden CHB scheint eine Interaktion von IRF3, IRF7 und DBP im Rahmen der zirkadianen Steuerung der Immunität von Relevanz zu sein.

Mu-crystallin (Crym) ist bisher als NADPH-abhängiges, zytosolisches, Triiodthyronin-bindendes-Hormon beschrieben, welches eine Ketimin-Reduktase-Aktivität besitzt [133] und zudem eine Rolle in der Entwicklung der murinen Haarfollikel hat [134]. Die im Microarray gezeigte Herunterregulation in KO und TG-KO lässt, wie auch bei DBP unabhängig von HBsAg-Transgenität, auf eine Verknüpfung mit IRF3 und IRF7 schließen. Das Verständnis für die Interaktion von IRF3 und IRF7 mit dem bisher noch wenig erforschte Crym bedarf weiterer Untersuchungen.

Cytochrome P450 omega-hydroxylase 4A14 (Cyp4a14) ist ein Homolog der humanen CYP4A-Hydroxylase und katalysiert die Omega-Hydroxylierung von mittelkettigen Triglyceriden in Mäusen [135]. Sowohl bei Patienten als auch im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass im Rahmen von Fettlebererkrankungen und Leberfibrose die Cyp4a14 Expression verstärkt war [136]. Es konnte zudem nachgewiesen werden, dass eine Inhibition von Cyp4a14 zu einer Abschwächung von hepatischem ER-Stress führt [137]. In unserem Mausmodell zeigte sich zum einen, dass der TG keinen Einfluss auf die Cyp4a14-Expression hatte. Gleichzeitig führte der KO zu einer Herunterregulation, während TG-KO im Vergleich mit TG heraufreguliert war. Die Überprüfung in der qPCR konnte den Microarray in Tendenzen bestätigen, jedoch war keiner der überprüften Paarvergleiche signifikant. Bei eventuell nur geringem Effekt könnte eine Überprüfung an größerer Gruppen Aufschluss darüber gegeben, ob für Cyp4a14 eine Regulation durch IRF3 und 7 bestätigt werden kann.

Hemoglobin beta adult minor chain (Hbb-b2), das für die murine beta-Polypeptidkette adulten Hämoglobins kodiert, stellte sich in seiner Regulation im durchgeführten MA ähnlich wie das zuvor beschriebene Cyp4a14 dar. Es zeigt sich keine Regulation durch HBs-Transgenität im Wildtyp, jedoch eine deutliche Heraufregulation durch HBs-Transgenität bei IRF3/7-KO. Daraus ergibt sich die Frage, welche Ursache die Heraufregulation von Hbb-b2 hat bzw. welche Signalkaskaden hierfür verantwortlich sind, und ob ihr eine zelluläre Funktion im Rahmen der Stressantwort zugrunde liegt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Hbb nicht nur im Rahmen der Oxygenierung von Hämoglobin eine Funktion innehat. Hbb konnte in weiteren Zellarten im Kontext von Zellstress als zytoprotektiver Faktor identifiziert werden. Für mehrere humane Tumore konnte bei zirkulierenden Tumorzellen im Kontext der Metastasierung gezeigt werden, dass beta-Globin konstant überexprimiert war und vor oxidativem Stress schützt [138]. Auch in Hepatozyten konnte die zytoprotektive Funktion von Hbb im Rahmen der nichtalkoholischen Steatohepatitis bereits nachgewiesen werden [139]. Folglich wäre eine IFN-vermittelte

Aktivierung von Hbb zur antioxidativen Zytoprotektion plausibel und sollte in weiteren Untersuchungen im Detail analysiert werden.

4.2.3 Der IRF3/7-Knockout reduziert Zytokine und Chemokine im Serum

Die allgemeine Überprüfung des Einflusses des IRF-KO auf Serumlevels von Zyto- und Chemokinen als Effektoren der Interferon-ISG-Achse zeigte, dass von 18 überprüften Zytokinen die Mehrheit in TG-KO im Vergleich zu den HBs-transgenen Mäusen herunterreguliert war. Damit konnte nachgewiesen werden, dass der IRF3/IRF7-Doppelknockout nicht nur wie in Abschnitt 4.2.1 beschrieben, effizient die *Interferon Response* ausschaltet, sondern auch, dass sich dies in den im Serum vorhandenen Zytokinen bzw. Chemokinen widerspiegelte. Die gezeigten Ergebnisse des *Proteom Profilers*, der im KO verminderte Serumspiegel von Zytokinen und Chemokinen aufwies, entsprechen der Annahme, dass diese als Mediatoren der IFN-Antwort fungieren [140], [141], [142]. Am stärksten im *Proteom Profiler* reguliert waren das proinflammatorische Chemokin *Interferon-gamma inducible protein 10 kD* (IP10) [143], [141] und der Matrix-Metalloproteinase-Inhibitor *TIMP metalloproteinase inhibitor 1* (TIMP1) [144]. Beide wurden gesondert in der qPCR auf ihre mRNA-Regulation überprüft. Die Beobachtungen im *Proteom Profilers* zeigten dabei gleiche Regulationsmuster, die in der statistischen Überprüfung jedoch das Signifikanzniveau verfehlten. Vor allem IP10, das im Rahmen viraler Erkrankungen für die primäre Immunantwort benötigt wird [142] und das direkt an der Apoptose von Hepatozyten beteiligt ist [145], zeigte eine Heraufregulation in TG und eine Herunterregulation im KO. Eine für IP10 gezeigte Induktion durch IFN α [141], scheint sich in unserem Mausmodell zu bestätigen. Hier ist grundsätzlich eine weitere Überprüfung von Nöten, um die Ergebnisse auf Proteinlevel zu validieren.

4.2.4 Der IRF3/IRF7 Knockout ist ohne Effekt auf *Upstream*-Signaltransduktion

Die STING-TBK1-IRF3-Achse, die die Typ-I-IFN Antwort der angeborenen Immunität im Rahmen der zellulären Auseinandersetzung mit viraler DNA steuert [51], [62], [146], wurde von uns im Western Blot untersucht, um Auswirkungen des KO auf die *Upstream*-Signaltransduktion zu überprüfen. Zudem wurde die Verknüpfung von STING und IRF3 als IFN-unabhängige Verknüpfung von ER-Stress im Rahmen der alkoholischen Lebererkrankung beschrieben [147], weshalb wir dessen Regulation bei ausgeschalteter Typ-I-IFN-Antwort überprüften. Außerdem wurde die RalB-Sec5-TBK1-Signalkaskade als Coaktivator von TBK1 und damit auch als potenziell an der IRF3-Aktivierung beteiligt [148] auf Regulation überprüft.

Es zeigte sich hier, dass weder in der Expression von STING und TBK1, noch in der Phosphorylierung von TBK1 im Vergleich von WT, TG und KO Unterschiede nachweisbar waren. TBK1 ist folglich im Rahmen des HBs-transgenen Mausmodells nicht durch Regulation an der Verknüpfung von Zellstress und Leberzellschädigung beteiligt und IRF3 scheint zudem für die Aktivitätskontrolle von TBK1 keine Funktion als negativer Regulator zu haben, da im KO sonst eine Hochregulation von TBK1 zu erwarten wäre.

In der Zellkultur konnte bereits gezeigt werden, dass die HBV-Replikation weder mit einer Aktivierung, noch mit einer Inhibition des cGas-STING-Signalwegs einhergeht [149]. Die Annahme, dass die HBV-bedingte Interferon-Antwort nicht über diese Signalkaskade aktiviert wird, konnte in dieser Arbeit in unserem Mausmodell bestätigt werden. In HBs-transgenen Mäusen lag keine verstärkte Expression des IRF3-Aktivators STING vor (siehe Abbildung 3.3.1.1).

RalB, dessen Rolle bisher vor allem im *Exozyst-Complex*, also der gesteuerten Zell-Migration und als solches als zentrale Komponente der Tumorinitiation und -progression gesehen wurde [150], [151], wurde von *Chien et al.* im RalB/Sec5-Komplex als direkter Aktivator von TBK1 und damit als Bestandteil virusinduzierter Aktivierung der angeborenen Immunität und zudem potentiell verknüpfendes Element zwischen Tumorzellüberleben und angeborenem *Immunsignaling* beschrieben [148].

Um zu überprüfen ob sich Gleiches im HBs-transgenen Mausmodell reproduzieren lässt, wurden RalB und Sec5 durch uns auf Regulation überprüft. Da sich keine Änderung der Expression zeigte, ist davon auszugehen, dass RalB/Sec5 im Rahmen der HBs-Transgenität keine Relevanz für die Aktivierung der IFN-Antwort haben. Mögliche Ursache hierfür könnte sein, dass *Chien et al.* ihre Ergebnisse im Rahmen von RNA-Viren nachweisen konnten und unser Mausmodell die Oberflächenproteine eines DNA-Virus exprimiert.

4.2.5 Der IRF3/IRF7-Knockout führt zu einer Ausschaltung des IFN-aktivierenden JAK-STAT-Signalwegs

Die Verknüpfung von IRF3 und IRF7 mit der Transkriptionsaktivierung von ISGs soll nach der Literatur über den JAK-STAT-Signalweg vermittelt werden [44], [50], [152], [153]. Die Januskinase JAK1 aktiviert dabei STAT1 und STAT2, als Heterodimere bilden diese mit IRF9 den Transkriptionsfaktor ISGF-3 [154] und binden an das *IFN-stimulated response elements* (ISRE), was die Transkription von ISGs ermöglicht [153].

STAT1 ist ein Transkriptionsfaktor für den sowohl in der Zellkultur, als auch im Mausmodell gezeigt werden konnte, dass ein KO mit dem Verlust der Interferon-Responsivität einhergeht. Zudem konnte im STAT1-KO eine erhöhte Sensibilität für pathogene virale Infektionen gezeigt werden [152], [155].

Dem entsprechend zeigte sich in unserem Mausmodell, dass STAT1 und IRF9 in HBs-transgenen Mäusen im Microarray und in der qPCR verstärkt transkribiert waren. Für STAT1 konnte auch im WB eine verstärkte Expression nachgewiesen werden. Die IRF-KO-Gruppen wiesen gegensätzlich sowohl im Microarray als auch in der qPCR eine signifikante Herunterregulation von STAT1 und IRF9 auf. Ebenfalls im WB konnte hier eine verminderte Expression und Phosphorylierung von STAT1 in den KO-Gruppen gezeigt werden.

Als Schlussfolgerung hieraus muss gelten, dass im HBs-transgenen Mausmodell die Aktivierung der *Interferon Response* über IRF3 und IRF7 vermittelt ist. Die zentrale Funktion von IRF3 und IRF7 ist bereits für diverse virale Erreger überprüft [66], [45], [75], [60], [156]. Im Mausmodell konnte unter anderem im Rahmen der Influenza-A-Infektion gezeigt werden, dass durch einen IRF3/IRF7-KO die IFN α und IFN β -Antwort vollständig ausgeschaltet war [109]. Im hier gezeigten Mausmodell konnte im Sinne eines *Proof of Principle* bestätigt werden, dass IRF3 und IRF7 auch im HBs-transgenen Mausmodell die zentralen Aktivatoren der JAK-STAT vermittelten ISG-Aktivierung sind.

4.3 DER EINFLUSS DES IRF 3/7-KNOCKOUTS AUF IMMUNOLOGISCHE SIGNALTRANSDUKTION

4.3.1 Die Verknüpfung von IRF und Akuter-Phase-Reaktion

Die Akute-Phase-Reaktion als orchestrierte Antwort auf Gewebsschädigung, Entzündung und Infektion findet vor allem über die Aktivierung von Akute-Phase-Proteinen statt [157]. Die Mehrzahl der akuten-Phase-Proteine wird dabei in Hepatozyten synthetisiert. Je nach Abfall oder Anstieg der Plasmakonzentration wird von positiven oder negativen Akute-Phase-Proteinen gesprochen [158]. So zeigt beispielsweise Interleukin 6 Leberzell-protective Eigenschaften, während für TNF α eine Funktion in der Apoptoseinduktion im Rahmen chronischer Lebererkrankungen nachgewiesen werden konnte [159], [160]. Grundsätzlich gilt, dass virale Infektionen im Vergleich mit bakteriellen eine relativ milde Akute-Phase-Reaktion zeigen, diese wird dann vor allem über freigesetzte Interferone gesteuert [157], [161].

In der Auswertung des Microarray zeigten sich für unser Mausmodell die beiden Akute-Phase-Proteine *Metallothionein-II* (MT2) [162] und *Serum-Amyloid-A* (SAA) [163] signifikant im KO reguliert. Sowohl MT2 als auch SAA waren im KO herunterreguliert, im TG-KO interessanterweise im Vergleich mit TG heraufreguliert. Dies lässt eine kompensatorische Induktion der akuten Phase bei Vorliegen von HBs-Transgenität und gleichzeitigem KO von IRF3/7 vermuten.

In der Überprüfung der Regulation von SAA1 in der qPCR konnten die Ergebnisse des Microarray nicht bestätigt werden. Im Vergleich von MA und qPCR ist grundsätzlich zu beachten, dass es bei der durch uns durchgeführten RNA-Isolierung zu einer Degradierung kommen kann, weshalb nur wenige vollständige Transkripte vorliegen und entsprechend weniger im MA detektiert werden kann. Gleichzeitig kann – abhängig vom Genotyp – eine unterschiedliche Stabilität der RNA vorliegen.

Die Verknüpfung von akuter Phase und *Interferon Response* legt in der Theorie einen Einfluss durch den IRF-KO nahe, weswegen eine fortführende Überprüfung mittels weiterer Methodik von Interesse sein dürfte.

4.3.2 *Cell Stress Signaling* – Assoziation von IRF und Trex1

Zur Überprüfung des Einflusses eines IRF3/7-KO auf das *Cell Stress Signaling* wurden NUPR1, *Sucnr1* und *Trex1* als Zellstress-assoziierte Gene auf Regulation überprüft.

NUPR1

Das durch Zellstress induzierbare NUPR1 (s. Abbildung 33) wird sowohl als potentieller Aktivator als auch Inhibitor maligner Prozesse beschrieben [164], [165], [166]. In der Überprüfung von MA-Datensätzen konnten *Emma et al.* zeigen, dass NUPR1-Transkript-Level in Leberzirrhose und Leberzelldysplasie im Vergleich mit normalem Lebergewebe erniedrigt waren, während sich in HCC-Geweben eine erhöhte Expression zeigte [164]. Des Weiteren wurde gezeigt, dass der NUPR1/RELB/IRF3/RUNX2-Signalweg essenziell für die Hepatokarzinogenese ist. Der im Rahmen des HCCs bereits therapeutisch angewandte Multikinaseinhibitor Sorafenib zeigt bei vorliegendem RUNX2-KO eine erhöhte Sensitivität [164]. Für einen direkten NUPR1-KO konnten zudem eine Inhibition von Zellwachstum, Migration und eine Invasion von HCC Zellen nachgewiesen werden [164].

In unserem Modell war NUPR1 wie zu erwarten im Microarray in TG und zudem auch in TG-KO stark in der Expression erhöht. Gleichzeitig war der KO im Vergleich von TG und

TG-KO ohne signifikanten Einfluss. In der Überprüfung mittels qPCR war die durch HBs-Transgenität bedingte verstärkte Expression signifikant. Die in der PCR angedeutete Herunterregulation im Vergleich von TG und TG-KO erwies sich als nicht signifikant. Grundsätzlich scheint zu gelten, dass die HBs-Akkumulation ein Aktivator der NUPR1-Expression ist, die durch HBs letztlich verursachte Zirrhose also zumindest teilweise NUPR1-vermittelt zu sein scheint [164].

Sucnr1

Sucnr1, ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor, kommt in der Leber nur in ruhenden HSC vor [167]. Eine nachgewiesene Herunterregulation von Sucnr1 bei Aktivierung der HSC [168] lässt auf eine Funktion als früher Detektor hepatischen Stresses bzw. hepatischer Gewebsschädigung schließen. Die im MA gezeigte Heraufregulation im KO konnte in der qPCR nicht bestätigt werden. Die gezeigte Herunterregulation in TG-KO konnte nur tendenziell in der qPCR nachgewiesen werden. Eine Aussage bezüglich des Einflusses von TG und KO auf Sucnr1 ist deshalb nicht zu treffen. Da Sucnr1 vor allem ein Marker des hepatischen Stresses ist, kann vermutet werden, dass ein hepatischer Schaden v.a. in TG zum Zeitpunkt der Untersuchung noch ohne detektierbare Auswirkung auf Sucnr1 ist.

Trex1

Trex1, eine Exonuklease mit negativer regulatorischer Funktion im Rahmen zytosolischer DNA-Detektion, wurde bisher vor allem in Zusammenhang mit der Degradierung zytosolischer ssDNA zur Prävention von inflammatorischer Immunaktivierung beschrieben [169]. Zudem ist eine Assoziation von Trex1-Mutationen mit autoinflammatorischen Erkrankungen bekannt [170]. Durch *Hasan et al.* wurde es als potentieller Interferon-unabhängiger Regulator antiviraler Gene beschrieben [171]. In Abhängigkeit von STING, TBK1, IRF3 und IRF7 wiesen nicht infizierte Trex1^{-/-} Zellen IFN-unabhängige Aktivierung von ISG-Untergruppen auf [171]. In unserem IRF3/7-Doppelknockout zeigte sich Trex1 im Microarray durch TG heraufreguliert, und in TG-KO herunterreguliert, was in der qPCR bestätigt werden konnte. Die in TG vorliegende zytosolische DNA kann als ursächlich für die Heraufregulation der Exonuklease Trex1 vermutet werden. Die Herunterregulation im TG-KO spricht dafür, dass wahrscheinlich eine Verknüpfung von Interferonantwort, IRF und *Cell Stress Signaling* über Trex1 vorliegt und IRF3 und IRF7 essentielle Induktoren von Trex1 sind. Die beschriebene Assoziation von IRF3 und IRF7 mit Trex1 kann somit in unserem Mausmodell bestätigt werden [171].

4.3.3 Der IRF 3/7-Knockout zeigt keinen direkten Einfluss auf die *Unfolded Protein Response*

Die *Unfolded Protein Response*, verursacht durch zytosolische Akkumulation von Protein, ist im Falle der CHB durch die Ansammlung von HBs getriggert [22]. Da für unser Mausmodell gezeigt wurde, dass durch den KO keine Änderung im HBs-Expressionsmuster nachzuweisen ist (s. Abbildung 12 und 13), sollte folglich der KO keine Veränderung der UPR bedingen. Zur Kontrolle des Einflusses wurden die UPR-assoziierten Signalkaskaden auf Regulation überprüft.

PERK-eIF2 α -Signalkaskade

In der Überprüfung der PERK-eIF2 α -Signalkaskade der UPR zeigte sich im Western Blot eine geschlechtsabhängige Aktivierung von PERK. Männliche TG-KO Mäuse wiesen eine reduzierte Phosphorylierung im Vergleich mit TG Mäusen auf. Das durch PERK phosphorylierte eIF2 α wiederum war in männlichen TG-KO Mäusen verstärkt phosphoryliert. Erklärend hierfür könnte eine geschlechtsspezifische alternative Aktivierung von eIF2 α unabhängig von PERK, mit durch negatives Feedback reduziert aktiviertem PERK sein. Eine solche geschlechtsabhängige Regulation ist bisher nicht in der Literatur beschrieben. Gleichzeitig zeigten sich für CHOP als *Downstream*-Effektor von PERK und eIF2 α keine geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Aktivierung.

Die HBs-transgenen Mausgruppen wiesen für ATF3 und CHOP eine Heraufregulation auf. Vergleichend zeigte sich kein signifikanter Einfluss durch den IRF-KO. ATF3, das zur Aktivierung von CHOP beiträgt und als Transkriptionsfaktor für die Targets der PERK-eIF2 α -Signalkaskade gilt [172], war durch den KO weder in der qPCR noch im Western Blot signifikant beeinflusst. CHOP als *Downstream*-Effektor der PERK-eIF2 α -Kaskade wurde durch TG aktiviert. Der KO wies weder in qPCR, WB noch in der IHC signifikanten Einfluss auf die Expression auf. Dies bestätigt zum einen, dass die HBs-Transgenität mit einer Aktivierung von an der UPR beteiligtem ATF3 [172], [173], [172] und CHOP einhergeht [22], [174], zum anderen aber auch, dass der KO keinen Einfluss auf die Proteinakkumulation und die dadurch bedingte Aktivierung der UPR zu haben scheint.

Bei der Überprüfung des als inhibitorischer Regulator der UPR diskutierten P58IPK (s. Abbildung 29) [175] zeigte sich zum einen, dass das HBs-Transgen keinen Einfluss auf die Inhibition der UPR hat. Gleichzeitig wies sowohl der KO als auch TG-KO eine Reduktion der Inhibition der UPR auf, aufgrund dessen inhibitorischer Funktion eine Verstärkung der UPR als Konsequenz verursacht werden muss. Dies könnte damit zusam-

menhängen, dass das durch P58IPK negativ regulierte eIF2AK2 durch Interferone induziert wird [175]. Die durch den KO bedingte Ausschaltung der *IFN Response* würde entsprechend eIF2AK2 vermindern, weswegen P58IPK als negativer Regulator von EIF2AK2 herunterreguliert wäre. Zur weiteren Verifizierung dieses Ansatzes der Regulation könnte die Aktivierung von EIF2AK2 überprüft werden.

4.4 TUMORNACHWEIS

Für die HBs-Mauslinie ist eine Tumorgenese bei fortschreitender Leberpathologie bekannt und beschrieben, *Chisari et al.* konnten zeigen, dass die durch hohe HBsAg-Spiegel verursachte hepatozelluläre Schädigung, gefolgt von Hyperplasie, schließlich zu Neoplasien führte [91]. In der histologischen Untersuchung der TG-KO Mauslinien fiel in der HE-Färbung lediglich eine Maus mit einer fokalen Hyperplasie auf. Die hier beschriebene männliche Maus ist mit einem Alter von 12 Wochen für das Auftreten eines Tumors relativ jung. Regelmäßig zeigen sich Tumoren in diesem Mausmodell meist erst zum Zeitpunkt der 38. Woche. Die in der Pathologie der TG-KO vermehrt vorgefundenen GGH wurden in der Literatur bereits als präneoplastische Läsionen beschrieben [176] und können auch hier als Ursache bzw. Tumovorläuferzellen diskutiert werden. Zur genaueren Beurteilung und Bestimmung der Dignität muss eine Bestimmung des zellulären Ursprungs durchgeführt werden. Für das Vorliegen eines Karzinoms würde dabei sprechen, dass die Untersuchungen von *Chisari et al.* ein häufigeres Auftreten von Karzinomen in männlichen Mäusen zeigen konnten, während Adenome in etwa gleich häufig verteilt waren [91].

4.5 LIMITATIONEN DES MAUSMODELLS

Der für alle Mauslinien verwendete genetische Hintergrund-Mausstamm BALB/c zeichnet sich immunologisch dadurch aus, dass er im Vergleich mit C57BL/6 zu einer stärkeren Leberschädigung und Fibrosierung neigt [22]. Da es in dem von uns verwendeten Mausmodell bereits postpartal zur Aktivierung des Promotors der HBs-Transgene kommt, werden die Antigene bereits synthetisiert bevor das Priming des Immunsystems stattfindet. Hierdurch wird das Fremdprotein als körpereigen akzeptiert, folglich keine Immunantwort auf das eigentliche Pathogen entwickelt wird. Dies ermöglicht selektiv die Erforschung direkter Effekte der HBV-Oberflächenproteine im *in-vivo* Modell. Gleichzeitig geht dies mit einer Limitierung der Aussagekraft der Ergebnisse einher, da die Über-

tragung der Ergebnisse auf den menschlichen Organismus nur bedingt möglich ist. Zudem muss kritisch bedacht werden, dass im angewandten Mausmodell nur ein Knock-in der HBV-Oberflächenproteine vorliegt. HBc ist nicht Bestandteil des Transgens, HBx wird nur im geringen Maß exprimiert.

Weiterhin relevant ist, dass es sich beim Genotyp des HBV-Knock-ins um den Genotyp D handelt, wodurch die Aussagen in Bezug auf das Mausmodell nicht ohne Weiteres auf alle HBV-Genotypen übertragen werden können. Die Wirksamkeit der IFN-Therapie ist nachweislich vom Genotyp des Virus abhängig [8], entsprechend ist die Aussagekraft bezüglich der immunologischen Auswirkungen eines IRF3/7-Doppelknockouts damit eingeschränkt.

4.6 LIMITATIONEN DER STUDIE

Die dargestellten und analysierten Ergebnisse basieren auf der Arbeit mit Mäusen, die zum Zeitpunkt der Untersuchung 12 Wochen alt waren. Zwar liegt zu diesem Zeitpunkt in HBs-transgenen Mäusen bereits eine deutliche Hepatitis vor, dennoch ist für eine aussagekräftigere Bewertung des TG-KO Mausmodells eine Untersuchung zu weiteren Zeitpunkten nötig. Die Entwicklung von signifikanter Fibrose und Neoplasien liegt erfahrungsgemäß bei einem späteren Zeitpunkt. Zur definitiven Beurteilung des Einflusses des IRF3/7-KO sind hierfür weitere Analysen mit älteren Mäusen nötig.

4.7 AUSBLICK

Bis heute sind die Infektion und vor allem der Verlauf einer Hepatitis B-Infektion nur unzureichend verstanden. Die Interferon-basierte Therapie ist dabei auch eine aktuelle leitliniengerechte Therapieoption [27], [33], zeigt sich in ihrer Effizienz aber als eingeschränkt und vom HBV-Genotyp abhängig [27]. Im Rahmen der PEG-IFN Therapie konnten bei HBeAg positiven Patienten nach 12-monatiger Behandlung eine Serokonversion für 32 % der Patienten nachgewiesen werden [177], [178]. Für HBeAg negative Patienten konnte eine Reduktion der HBV-DNA-Kopienzahl von <2000 IU/ml in 23% der Fälle 5 Jahre nach einer 48-wöchigen Therapie mit PEG-IFN gezeigt werden [179].

Das in der vorliegenden Arbeit erstmalig beschriebene Mausmodell ermöglicht über den KO der Interferon-regulierenden Faktoren 3 und 7 eine genauere Untersuchung und damit ein besseres Verständnis für die Funktion von Interferonen im HBs-transgenen Mausmodell.

Es konnte gezeigt werden, dass der IRF-KO die *Interferon Response* im HBs-transgenen Mausmodell inhibiert, Interferon-stimulierte Gene waren in ihrer Expression reguliert oder inhibiert. Hier war zudem interessant, dass eine Reihe von Genen, die bisher nicht als durch Interferon reguliert beschrieben wurden, eine durch den KO bedingte Regulation aufwiesen.

Das beschriebene Mausmodell ermöglicht somit die Identifizierung von Interferon-regulierten Genen, die an der Immunantwort im Rahmen einer HBV-Infektion beteiligt sind und in einem weiteren Schritt die Untersuchung auf deren spezifische Funktion im Hinblick auf Karzinogenese und Inflammation.

Ob durch gezielte Inhibition von ISGs ein möglicher neuer Ansatz für die Therapie der chronischen Hepatitis B besteht - unter anderem konnte eine Reduktion von der HBV-Replikation mittels Inhibition von USP18 gezeigt werden [120] - sollte die Grundlage für weitere Versuchsreihen sein.

9. ZUSAMMENFASSUNG

257 Millionen Menschen sind Schätzungen zufolge weltweit an einer chronischen Hepatitis B erkrankt. Folgeerkrankungen und deren Komplikationen (z.B. Leberzirrhose und hepatozelluläres Karzinom) führen dabei zu einem jährlichen Versterben von nahezu 900.000 Menschen. Die Immunantwort auf eine Infektion mit dem HBV wird vor allem über Interferone gesteuert. Einer der Therapieansätze zur Behandlung der chronischen Hepatitis B basiert aufgrund dessen auf Interferon-alpha, zeigt dabei aber nur bei einem Bruchteil der Behandlungen eine klinische Verbesserung in Form von Heilung bzw. Serokonversion.

In dieser Arbeit wurde im Mausmodell die Rolle der Interferon-regulierenden Faktoren 3 und 7 im Rahmen der transgenen Überexpression von HBV-Oberflächenproteinen analysiert. Als zentrale Transkriptionsfaktoren der Modulation der Interferon-Antwort sollte durch einen IRF3- und IRF7-Doppelknockout in einem HBs-transgenen Mausmodell überprüft werden, ob durch den KO die Interferon-Antwort reduziert bzw. ausgeschaltet wird und welche Konsequenzen sich daraus für Interferon-stimulierte Gene ergeben. Zudem wurde untersucht, inwieweit sich eine durch den KO bedingte Veränderung der Pathologie am Mausmodell der HBs-Überexpression (sogenannte Chisari-Maus) zeigt.

Leber- und Serumproben von 12 Wochen alten BALB/c-Mäusen der vier experimentellen Gruppen Wildtyp (WT), HBs-transgen (TG), IRF3/7 Knockout (KO) und TG-KO wurden mittels klinischer Laborparameter, Microarray-Analyse und qPCR, sowie im Western Blot und mittels Leber-Histologie vergleichend analysiert.

Es konnte im Microarray nachgewiesen werden, dass durch das Ausschalten von IRF3 und IRF7 im HBs-transgenen Mausmodell die Expression von ISGs reduziert wird. Die Ergebnisse ließen sich in der qPCR und teilweise auch im Western Blot verifizieren. Von besonderem Interesse waren dabei Tiam2, Dbp, Crym, Cyp4a14 und Hbb-b2, für die bisher keine Interferon-Stimulation beschrieben wurde und die somit eventuell neue Ansatzpunkte einer Therapie darstellen könnten. Überprüfte Serum-Marker, insbesondere IP10 und TIMP1 wiesen deutlich verminderte Konzentrationen durch den KO auf. Die Analyse der Lebertransaminasen und der Histologie zeigten in der Überprüfung der Mauslinien keinen signifikanten Unterschied, was durch den mit 12 Wochen relativ frühen Untersuchungszeitpunkt erklärbar ist.

Wir untersuchten weiter, inwieweit die Interferon-Antwort im Rahmen der HBs-Überexpression an der Pathogenese beteiligt ist, da das Ausschalten der Interferon-Antwort durch den KO keine relevante Veränderung der Leberhistologie verursachte.

Das neu etablierte Mausmodell ermöglicht schlussendlich die *in vivo* Untersuchung der Einflüsse von IRF3 und IRF7 bei HBsAg-Transgenität und somit die Überprüfung der Rolle von Interferonen im Rahmen des Verlaufes einer chronischen Hepatitis B.

Eine gezielte Antagonisierung einzelner ISGs zur Verbesserung des Outcomes einer Interferon-Therapie ist für das vorgestellte Mausmodell wegweisend. Die weitere Untersuchung der Mauslinie zu späteren Zeitpunkten (26 Wo, 52 Wo) wird zeigen, inwieweit im Rahmen der chronischen HBs-Überexpression die Inhibition von ISGs neue therapeutische Ansatzpunkte darstellen kann.

6. SUMMARY

257 Million people in the world are estimated to be living with Chronic Hepatitis B infection. Subsequent mortality rates due to associated long term consequences and complications are close to 900.000 per year. Upon infection with the Hepatitis B virus, a key element in the systemic immune response is the interferon response. Treatment of Chronic Hepatitis B therefore includes interferon-alpha as one of the available options, yet interferon-alpha therapy only leads to clinical improvement in a minority of patients.

Here we introduce a new mice model established to analyze the function of Interferon-regulating Factor 3 and 7 in Chronic Hepatitis B. Both IRF3 and IRF7 are transcription factors with a key role in modulating the interferon response; thus an IRF3/7 double knockout in HBs-transgenic mice was created to analyze if the knockout would reduce or eliminate interferon response and the subsequent influence on Interferon-stimulated Genes. Furthermore, we explored the influence on general pathology of Chronic Hepatitis B.

To compare effects, liver and serum samples of wildtype (WT), HBs-transgenic (TG), IRF3/7 KO (KO) and TG-KO mice, all 12-weeks-old and of BALB/c genetic background, were comparatively analyzed via Microarray, qPCR and Western blot, and by histological staining and liver-enzyme measurement.

Microarray results showed that the knockout of IRF3 and IRF7 in HBs-transgenic mice led to reduction of ISG expression. The results could be verified in qPCR and partially in Western blot analysis. Of special interest were *Tiam2*, *Dbp*, *Crym*, *Cyp4a14* und *Hbb-b2*, genes which until now have not been described as Interferon-regulated genes. Further investigation might reveal their role and maybe even therapeutic potential. The majority of analyzed serum cytokines, particularly IP10 and TIMP1 were also down-regulated. Concerning liver enzymes and general histological pathology, no significant influence of KO in TG was detected. As the chosen age of examination was rather early, further experiments are needed to follow up the influence of an IRF3/7 KO on HBV-related hepatic Inflammation.

We furthermore analyzed the involvement of Interferon-Response in the pathogenesis of HBs expression, as the IRF3/7 KO and its subsequent deactivation of an IFN response neither aggravated nor ameliorated hepatic pathology.

Our established mice model allows the *in vivo* exploration and analysis of the function of IRF3 and IRF7 in HBs-transgenic pathogenesis, and thus the role of interferon in the course of chronic Hepatitis B.

In Hepatitis B, antagonization of certain ISGs could already be shown to improve the outcome of interferon-therapy, which gives an impression of the potential clinical relevance of our model. Further/follow-up investigations at later times of examination will show the extent to which inhibition of ISGs might offer new therapeutic approaches.

7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
AHB	akute Hepatitis B
AID	Autoinhibitorische Domäne
AK	Antikörper
ALT/GPT	Alanin-Aminotransferase
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua bidest.	Zweifach destilliertes Wasser
ATF-3	<i>Activating transcription factor 3</i>
ATF-4	Activating transcription factor 6
ATF-6	<i>Activating transcription factor 6</i>
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
BIP	<i>Immunoglobulin heavy chain binding Protein</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
CAD	konstitutive Aktivierungsdomäne
CBP	<i>CREB-binding protein/p300</i>
cccDNA	<i>covalently closed circular DNA</i>
cDNA	komplementäre DNA, <i>complementary DNA</i>
CHB	chronische Hepatitis B
CHOP	<i>C/EBP homologous protein</i> ; auch Ddit3 DNA-damage inducible transcript 3
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
C _t	<i>Cycle of Threshold</i>
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
DAI	<i>DNA-dependent activator of interferon regulatory factors</i>
DBD	DNA-bindende Domäne
DNA	Desoxyribonukleinsäure, <i>Desoxyribonucleic acid</i>
DR	<i>Direct Repeat</i>
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	doppelsträngige Ribonukleinsäure
ECL	<i>Enhanced Chemilumineszenz</i>
ECM	Extrazelluläre Matrix, <i>Extracellular Matrix</i>
eIF2 α	<i>Eukaryotic translation initiation factor 2 α</i>
ER	Endoplasmatische Retikulum
ERAD	ER-assoziierte Protein Degradation
HE	Hämatoxylin-Eosin
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid

HBc	Hepatitis-B-Virus Kernprotein, <i>HBV Core Protein</i>
HBe	HBV Kapsidprotein, <i>HBV Envelope Protein</i>
HBs	Hepatitis B-Oberflächenantigen, <i>HBV surface Antigene</i>
HBV	Hepatitis-B-Virus
HBx	Hepatitis-B-Virus X Protein
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCL	Chlorwasserstoff/Salzsäure
HRP	Meerrettich-Peroxidase, <i>Horse Radish Peroxidase</i>
HSC	Hepatische Sternzellen, <i>Hepatic Stelate Cells</i>
HSPG	Heparansulfat-Proteoglykane
IAD	Interferon Assoziationsdomäne
IFN	Interferon
IFN α	Interferon alpha
IFN β	Interferon beta
IKKe	<i>Inhibitor of Nuclear Factor Kappa B Kinase Subunit Epsilon</i>
IRE1	<i>Inositol-requiring enzyme 1</i>
IRF	Interferon-regulierender Faktor
IRF3	Interferon-regulierender Faktor 3
IRF7	Interferon-regulierender Faktor 7
ISG15	<i>ISG15 ubiquitin-like modifier</i>
ISGs	Interferon-stimulierte Gene
ISRE	<i>IFN-stimulated response element</i>
IU	<i>International Units</i>
JNK	<i>Jun-aminoterminal kinase</i>
KCL	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KO	<i>Knockout</i>
l	Liter
LHBs	großes Hepatitis B-Oberflächenprotein, <i>large hepatitis b surface antigene</i>
Mda-5	<i>Melanoma Differentiation-associated Gene 5</i>
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHBs	mittleres Hepatitis B-Oberflächenprotein, <i>medium hepatitis b surface antigene</i>
min	Minuten
mRNA	messenger RNA
MT2	Metallothionein-II
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response 88</i>
n	Stichprobenanzahl
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NES	<i>Nuclear Export Signal</i>

NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NTC	<i>Non Template Control</i>
NTCP	Natrium-Taurocholate-Cotransporting-Polypeptide
NUPR1	<i>Nuclear Protein 1</i>
O.D.	<i>optical density</i>
Oas1a	<i>2'-5' oligoadenylate synthetase 1A</i>
ORF	<i>open reading frame</i>
PAMPs	<i>Pathogen-Associated-Molecular-Patterns</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung, <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasenkettenreaktion
PERK	<i>PRKR-like ER Kinase</i>
pgRNA	prägenomische RNA
PP2A	Protein Phosphatase 2A
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	real-time quantitative PCR
RALB	<i>RAS like proto-oncogene B</i>
RIG-I	<i>Retinoic acid-inducible Gene I</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROX	<i>Carboxy-X-rhodamine</i>
RPM	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SAA1	Serum-Amyloid-A
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
sec	Sekunden
SEC5/Exoc2	<i>Exocyst complex component 2</i>
SHBs	kleines Hepatitis B-Oberflächenprotein, <i>small hepatitis b surface antigene</i>
STAT1	<i>Signal transducer and activator of transcription 1</i>
STING/TMEM173	<i>Transmembrane protein 173</i>
Sucnr1	<i>Succinate Receptor 1</i>
TAD	Transaktivierungsdomäne
TBK-1	<i>TANK-binding kinase 1</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBS-T	<i>Tris-buffered saline with Tween20</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TG	HBsAg-transgen
TG-KO	IRF3/7-KO und HBsAg-transgen
TH	T-Helferzellen
TLR	<i>Toll-like Receptor</i>
Trex1	<i>Three prime repair exonuclease 1</i>

Tris	Tris-aminomethan
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurate
u.a.	unter anderem
UPR	<i>Unfolded Protein Response</i>
V	Volt
V.	Vena
VAD	virusinduzierte Aktivitätsdomäne
Vol	Volumen
W	Watt
WHO	World Health Organization
WT	Wildtyp
XBP1	X-Box-binding Protein 1
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

8. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1	Aufbau des Hepatitis-B-Virus	12
Abbildung 2	Intrazelluläre Replikation des Hepatitis-B-Virus	14
Abbildung 3	Schematischer Verlauf der Hepatitis B-Infektion	15
Abbildung 4	Serologischer Verlauf der HBV-Infektion	17
Abbildung 5	Flowchart zur Therapieindikation bei Hepatitis B	20
Abbildung 6	Schematisch Darstellung von IRF3 und IRF7	24
Abbildung 7	Signalkaskade ISG-Induktion	25
Abbildung 8	<i>Unfolded Protein Response</i> Signalkaskaden	29
Abbildung 9	Reaktionsvorgänge zur reflektionsphotometrischen Quantifizierung der Leberenzyme	37
Abbildung 10	Temperaturprofil qPCR	45
Abbildung 11	Aufbau des <i>Proteom Profiler Assays</i>	48
Abbildung 12	Expressionsanalyse der HBV-Oberflächenproteine.	56
Abbildung 13	Immunhistochemische Färbung HBsAg	57
Abbildung 14	mRNA-Expression von IRF3 und IRF7 im Lebergewebe der transgenen Mäuse	58
Abbildung 15	Bestimmung der Serum Alanin-Aminotransferase zur Erfassung des Leberschadens	59
Abbildung 16	HE-Färbung	60
Abbildung 17	Sirius-Red-Färbung	61
Abbildung 18	Befund Pathologie	61
Abbildung 19	Bestimmung der Alkalischen Phosphatase im Serum zur Erfassung cholestatischer Schädigung	62
Abbildung 20	Analyse der Gallensäuren im Serum	63
Abbildung 21	Western Blot-Analyse der STING-TBK1-IRF3-Signalkaskade	64
Abbildung 22	Western Blot-Analyse der RalB-Sec5-TBK1-Signalkaskade	64
Abbildung 23	STAT1/STAT2/IRF9-Signalkaskade	65
Abbildung 24	qPCR der mRNA-Expression Interferon-stimulierter Gene	66
Abbildung 25	Western Blot-Analyse der Oas1a-Expression	67
Abbildung 26	ISG15/USP18-Signalweg	68
Abbildung 27	Expressionsanalyse der Zytokine im <i>Proteom Profiler</i>	69
Abbildung 28	Die Regulation von IP10 und TIMP1	70
Abbildung 29	qPCR <i>Unfolded Protein Response</i>	71
Abbildung 30	Western Blot-Analyse der UPR	72
Abbildung 31	Immunhistochemische Färbung des ER-Stressmarkers CHOP	72
Abbildung 32	qPCR der mRNA-Expression von SAA1	73
Abbildung 33	qPCR <i>Cell Stress Signaling</i>	74
Abbildung 34	qPCR der mRNA-Expression im Microarray regulierter Gene	75
Abbildung 35	Mikroskopischer Nachweis einer hyperplastischen Struktur	77

9. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1	Verwendete Mauslinien	33
Tabelle 2	Primärantikörper Immunhistochemie	39
Tabelle 3	Sekundärantikörper Immunhistochemie	39
Tabelle 4	Ansätze Immunhistochemie	40
Tabelle 5	Antikörper Isotypkontrolle	40
Tabelle 6	Im Microarray verwendete Mäuse	41
Tabelle 7	Ansatz Mastermix zur Transkription von mRNA in cDNA	43
Tabelle 8	Mastermix qPCR	44
Tabelle 9	Temperaturprofil qPCR	44
Tabelle 10	Primer Templates qPCR	45
Tabelle 11	Verwendete Serumproben <i>Proteom Profiler</i>	48
Tabelle 12	Primärantikörper Western Blot	49
Tabelle 13	Sekundärantikörper Western Blot	50
Tabelle 14	Ansatz <i>Sample Buffer</i>	50
Tabelle 15	Ansätze SDS-PAGE	51
Tabelle 16	Ansätze Semi-Dry-Blotting	52
Tabelle 17	Ansätze Milchpulver, TBS-T, AP-Inkubationspuffer, NBT und BCIP	53
Tabelle 18	Ansätze <i>Stripping Buffer</i> und PBS	54
Tabelle 19	Microarray-Analyse IRF3 und IRF7	58
Tabelle 20	Microarray-Analyse der STAT1- und IRF9-Expression	65
Tabelle 21	Microarray-Analyse Interferon-stimulierter Gene	66
Tabelle 22	Microarray-Analyse ISG15 und USP18	67
Tabelle 23	Microarray-Analyse Akute-Phase-Reaktion.	73
Tabelle 24	Microarray-Analyse <i>Cell Stress</i>	74
Tabelle 25	Im Microarray reguliert	75

10. LITERATURVERZEICHNIS

- [1] R. Lüllmann-Rauch, *Taschenbuch Histologie*. Thieme, 2015.
- [2] M. Schünke, E. Schulte, U. Schumacher, M. Voll, and K. Wesker, *Prometheus Hals und Innere Organe: Lernatlas der Anatomie*, 4. Auflage. Thieme, 2005.
- [3] M. Cohen-Naftaly and S. L. Friedman, "Current status of novel antifibrotic therapies in patients with chronic liver disease," *Therap. Adv. Gastroenterol.*, vol. 4, no. 6, pp. 391–417, 2011.
- [4] R. F. McGuire, D. M. Bissell, J. Boyles, and F. J. Roll, "Role of extracellular matrix in regulating fenestrations of sinusoidal endothelial cells isolated from normal rat liver," *Hepatology*, vol. 15, no. 6, pp. 989–997, 1992.
- [5] G. Ö. Elpek, "Cellular and molecular mechanisms in the pathogenesis of liver fibrosis: An update," *World J. Gastroenterol.*, vol. 20, no. 23, pp. 7260–7276, 2014.
- [6] K. Ishak *et al.*, "Histological grading and staging of chronic hepatitis," *J. Hepatol.*, vol. 22, no. 6, pp. 696–699, Jul. 2017.
- [7] V. J. Desmet, M. Gerber, J. H. Hoofnagle, M. Manns, and P. J. Scheuer, "Classification of chronic hepatitis: Diagnosis, grading and staging," *Hepatology*, vol. 19, no. 6, pp. 1513–1520, Jun. 1994.
- [8] W. H. Gerlich, "Medical virology of hepatitis B: how it began and where we are now.," *Viol. J.*, vol. 10, p. 239, Jul. 2013.
- [9] D. S. Dane, C. H. Cameron, and M. Briggs, "Virus-like particles in serum of patients with australia-antigen-associated hepatitis.," *Lancet*, vol. 1, no. 7649, pp. 695–698, Apr. 1970.
- [10] B. Böttcher, S. A. Wynne, and R. A. Crowther, "Determination of the fold of the core protein of hepatitis B virus by electron cryomicroscopy," *Nature*, vol. 386, no. 6620, pp. 88–91, Mar. 1997.
- [11] W. S. Robinson, D. A. Clayton, and R. L. Greenman, "DNA of a human hepatitis B virus candidate.," *J. Virol.*, vol. 14, no. 2, pp. 384–91, Aug. 1974.
- [12] P. Tiollais, C. Pourcel, and A. Dejean, "The hepatitis B virus.," *Nature*, vol. 317, no. 6037, pp. 489–95, 1985.
- [13] S. G. Winter and G. Szulanski, "Replication as Strategy," *Organ. Sci.*, vol. 12, no. 6, pp. 730–743, Apr. 2001.
- [14] S. Ezzikouri, M. Ozawa, M. Kohara, N. Elmdaghri, S. Benjelloun, and K. Tsukiyama-Kohara, "Recent insights into hepatitis B virus-host interactions," *J. Med. Virol.*, vol. 86, no. 6, pp. 925–932, Jun. 2014.
- [15] W. H. Gerlich, M. Kann, W. H. Gerlich, and M. Kann, "Hepatitis B," in *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*, Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2010.

- [16] World Health Organization, "WHO | Hepatitis B," 2017.
- [17] A. Hampel, P. Solbach, M. Cornberg, R. E. Schmidt, G. M. N. Behrens, and A. Jablonka, "[Current seroprevalence, vaccination and predictive value of liver enzymes for hepatitis B among refugees in Germany].," *Bundesgesundheitsblatt. Gesundheitsforschung. Gesundheitsschutz*, vol. 59, no. 5, pp. 578–583, 2016.
- [18] WHO and World Health Organization, "Global hepatitis report, 2017," *Who*, p. 62, 2017.
- [19] G. Nebbia, D. Peppia, and M. K. Maini, "Hepatitis B infection: Current concepts and future challenges," *Qjm*, vol. 105, no. 2, pp. 109–113, 2012.
- [20] J. M. González-Navajas, J. Lee, M. David, and E. Raz, "Immunomodulatory functions of type i interferons," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 12, no. 2, pp. 125–135, Jan. 2012.
- [21] F. V. Chisari, M. Isogawa, and S. F. Wieland., "Pathogenesis of hepatitis B virus infection," *Pathol. Biol.*, vol. 58, no. 4, pp. 258–266, 2010.
- [22] R. Montalbano *et al.*, "Exogenous hepatitis B virus envelope proteins induce endoplasmic reticulum stress: involvement of cannabinoid axis in liver cancer cells," *Oncotarget*, vol. 7, no. 15, pp. 20312–20323, Apr. 2016.
- [23] H. Yan *et al.*, "Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus," *Elife*, vol. 1, p. e00049, Nov. 2012.
- [24] Y. Wei, C. Neuveut, P. Tiollais, and M.-A. Buendia, "Molecular biology of the hepatitis B virus and role of the X gene Biologie mole'culaire du virus de l'he'patite B et rôle dugène X," *Pathol. Biol.*, vol. 58, pp. 267–272, 2010.
- [25] T. J. Liang, "Hepatitis B: The virus and disease," *Hepatology*, vol. 49, no. SUPPL. 5, 2009.
- [26] S. A. Hoda and R. S. Hoda, *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*, 8th ed. /., vol. 12, no. 2. Philadelphia, PA : Saunders/Elsevier, c2010., 2005.
- [27] P. Lampertico *et al.*, "EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection," *J. Hepatol.*, 2017.
- [28] K. C. Hyams, "Risks of chronicity following acute hepatitis B virus infection: a review.," *Clin. Infect. Dis.*, vol. 20, no. 4, pp. 992–1000, Apr. 1995.
- [29] G. Papatheodoridis *et al.*, "EASL clinical practice guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection," *J. Hepatol.*, vol. 57, no. 1, pp. 167–185, 2012.
- [30] E. Raffetti, G. Fattovich, and F. Donato, "Incidence of hepatocellular carcinoma in untreated subjects with chronic hepatitis B: a systematic review and meta-analysis," *Liver Int.*, vol. 36, no. 9, pp. 1239–1251, Sep. 2016.
- [31] J. D. Stanaway *et al.*, "The global burden of viral hepatitis from 1990 to

- 2013: findings from the Global Burden of Disease Study 2013.," *Lancet (London, England)*, vol. 388, no. 10049, pp. 1081–1088, Sep. 2016.
- [32] T. Heintges and W. O. Böcher, *Hepatitis B: Infektion - Therapie - Prophylaxe*. Thieme, 2006.
- [33] M. Cornberg *et al.*, "Aktualisierung der S 3-Leitlinie zur Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Hepatitis-B-Virusinfektion," *Z. Gastroenterol.*, vol. 49, no. 07, pp. 871–930, 2011.
- [34] J.-W. Yu, L.-J. Sun, Y.-H. Zhao, P. Kang, and S.-C. Li, "The Study of Efficacy of Lamivudine in Patients with Severe Acute Hepatitis B," *Dig. Dis. Sci.*, vol. 55, no. 3, pp. 775–783, Mar. 2010.
- [35] H. L. Tillmann *et al.*, "Safety and efficacy of lamivudine in patients with severe acute or fulminant hepatitis B, a multicenter experience," *J. Viral Hepat.*, vol. 13, no. 4, pp. 256–263, Apr. 2006.
- [36] Y. F. Liaw, D. I. Tai, C. M. Chu, and T. J. Chen, "The development of cirrhosis in patients with chronic type B hepatitis: a prospective study.," *Hepatology*, vol. 8, no. 3, pp. 493–6, 1988.
- [37] L. Belloni *et al.*, "IFN- α inhibits HBV transcription and replication in cell culture and in humanized mice by targeting the epigenetic regulation of the nuclear cccDNA minichromosome," *J. Clin. Invest.*, vol. 122, no. 2, pp. 529–537, Feb. 2012.
- [38] J. M. Sánchez-Tapias, J. Costa, A. Mas, M. Bruguera, and J. Rodés, "Influence of hepatitis B virus genotype on the long-term outcome of chronic hepatitis B in western patients," *Gastroenterology*, vol. 123, no. 6, pp. 1848–1856, Dec. 2002.
- [39] V. Christen, F. Duong, C. Bernsmeier, D. Sun, M. Nassal, and M. H. Heim, "Inhibition of Alpha Interferon Signaling by Hepatitis B Virus," *J. Virol.*, vol. 81, no. 1, pp. 159–165, 2007.
- [40] K. Honda, A. Takaoka, and T. Taniguchi, "Type I interferon [corrected] gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors.," *Immunity*, vol. 25, no. 3, pp. 349–60, Sep. 2006.
- [41] M. Miyamoto *et al.*, "Regulated expression of a gene encoding a nuclear factor, IRF-1, that specifically binds to IFN-beta gene regulatory elements.," *Cell*, vol. 54, no. 6, pp. 903–13, Sep. 1988.
- [42] J. Nehyba, R. Hrdlickova, and H. R. Bose, "Dynamic Evolution of Immune System Regulators: The History of the Interferon Regulatory Factor Family," *Mol. Biol. Evol.*, vol. 26, no. 11, pp. 2539–2550, Nov. 2009.
- [43] J. Hiscott, "Triggering the innate antiviral response through IRF-3 activation.," *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 21, pp. 15325–9, May 2007.
- [44] J. W. Schoggins, "Interferon-stimulated genes: roles in viral pathogenesis," *Curr. Opin. Virol.*, vol. 6, pp. 40–46, 2014.
- [45] J. W. Schoggins *et al.*, "A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response," *Nature*, vol. 472, no. 7344, pp. 481–485, 2011.
- [46] B. Barnes, B. Lubyova, and P. M. Pitha, "Review: On the Role of IRF in

- Host Defense," *J. Interf. Cytokine Res.*, vol. 22, no. 1, pp. 59–71, Jan. 2002.
- [47] T. Kimura *et al.*, "Involvement of the IRF-1 transcription factor in antiviral responses to interferons," *Science*, vol. 264, no. 5167, pp. 1921–4, Jun. 1994.
- [48] S. Akira, S. Uematsu, and O. Takeuchi, "Pathogen recognition and innate immunity," *Cell*, vol. 124, no. 4, pp. 783–801, 2006.
- [49] K. M. J. Sparrer and M. U. Gack, "Intracellular detection of viral nucleic acids," *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 26, pp. 1–9, 2015.
- [50] Q. Chen, L. Sun, and Z. J. Chen, "Regulation and function of the cGAS-STING pathway of cytosolic DNA sensing," *Nature Immunology*. 2016.
- [51] T. S. Xiao and K. A. Fitzgerald, "The cGAS-STING Pathway for DNA Sensing," *Mol. Cell*, vol. 51, pp. 135–139, 2013.
- [52] T. Matsuyama *et al.*, "Targeted disruption of IRF-1 or IRF-2 results in abnormal type I IFN gene induction and aberrant lymphocyte development," *Cell*, vol. 75, no. 1, pp. 83–97, Oct. 1993.
- [53] A. Takaoka *et al.*, "Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors," *Nature*, vol. 434, no. 7030, pp. 243–249, Mar. 2005.
- [54] M. G. Wathlet, C. H. Lin, B. S. Parekh, L. V Ronco, P. M. Howley, and T. Maniatis, "Virus infection induces the assembly of coordinately activated transcription factors on the IFN-beta enhancer in vivo," *Mol. Cell*, vol. 1, no. 4, pp. 507–18, Mar. 1998.
- [55] W. C. Au, P. A. Moore, D. W. LaFleur, B. Tombal, and P. M. Pitha, "Characterization of the interferon regulatory factor-7 and its potential role in the transcription activation of interferon A genes," *J. Biol. Chem.*, vol. 273, no. 44, pp. 29210–7, Oct. 1998.
- [56] Y. T. Juang *et al.*, "Primary activation of interferon A and interferon B gene transcription by interferon regulatory factor 3," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 95, no. 17, pp. 9837–42, Aug. 1998.
- [57] R. Lin, P. Génin, Y. Mamane, and J. Hiscott, "Selective DNA binding and association with the CREB binding protein coactivator contribute to differential activation of alpha/beta interferon genes by interferon regulatory factors 3 and 7," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 20, no. 17, pp. 6342–53, Sep. 2000.
- [58] W. S. Yeow, W. C. Au, W. J. Lowther, and P. M. Pitha, "Downregulation of IRF-3 levels by ribozyme modulates the profile of IFNA subtypes expressed in infected human cells," *J. Virol.*, vol. 75, no. 6, pp. 3021–7, Mar. 2001.
- [59] W. C. Au, P. A. Moore, W. Lowther, Y. T. Juang, and P. M. Pitha, "Identification of a member of the interferon regulatory factor family that binds to the interferon-stimulated response element and activates expression of interferon-induced genes," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 92, no. 25, pp. 11657–61, Dec. 1995.

- [60] R. Lin, C. Heylbroeck, P. M. Pitha, and J. Hiscott, "Virus-dependent phosphorylation of the IRF-3 transcription factor regulates nuclear translocation, transactivation potential, and proteasome-mediated degradation.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 18, no. 5, pp. 2986–96, May 1998.
- [61] R. Lin, Y. Mamane, and J. Hiscott, "Structural and functional analysis of interferon regulatory factor 3: localization of the transactivation and autoinhibitory domains.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 19, no. 4, pp. 2465–74, Apr. 1999.
- [62] Y. Tanaka and Z. J. Chen, "STING Specifies IRF3 Phosphorylation by TBK1 in the Cytosolic DNA Signaling Pathway," *Sci. Signal.*, vol. 5, no. 214, pp. ra20-ra20, Mar. 2012.
- [63] D. B. Stetson and R. Medzhitov, "Recognition of Cytosolic DNA Activates an IRF3-Dependent Innate Immune Response," *Immunity*, vol. 24, no. 1, pp. 93–103, Jan. 2006.
- [64] M. SGARBANTI, G. MARSILI, A. L. REMOLI, R. ORSATTI, and A. BATTISTINI, "IRF-7: New Role in the Regulation of Genes Involved in Adaptive Immunity," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1095, no. 1, pp. 325–333, Jan. 2007.
- [65] R. Lin, Y. Mamane, and J. Hiscott, "Multiple regulatory domains control IRF-7 activity in response to virus infection," *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 44, pp. 34320–34327, Nov. 2000.
- [66] K. Honda *et al.*, "IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses," *Nature*, vol. 434, no. 7034, pp. 772–777, Apr. 2005.
- [67] I. Marié, J. E. Durbin, and D. E. Levy, "Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7.," *EMBO J.*, vol. 17, no. 22, pp. 6660–9, Nov. 1998.
- [68] Y. Mamane *et al.*, "Interferon regulatory factors: the next generation," *Gene*, vol. 237, no. 1, pp. 1–14, Sep. 1999.
- [69] A. Isaacs and J. Lindenmann, "Virus Interference. I. The Interferon," *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.*, vol. 147, no. 927, pp. 258–267, 1957.
- [70] S. Pestka, C. D. Krause, and M. R. Walter, "Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors," *Immunol. Rev.*, vol. 202, pp. 8–32, 2004.
- [71] J. R. Schoenborn and C. B. Wilson, "Regulation of Interferon- γ During Innate and Adaptive Immune Responses," in *Advances in Immunology*, vol. 96, 2007, pp. 41–101.
- [72] P. Hermant and T. Michiels, "Interferon- λ in the context of viral infections: Production, response and therapeutic implications," *J. Innate Immun.*, vol. 6, no. 5, pp. 563–574, 2014.
- [73] J. Vilcek, "Novel interferons," *Nat. Immunol.*, vol. 4, no. 1, pp. 8–9, 2003.
- [74] T. R. O'Brien, L. Prokunina-Olsson, and R. P. Donnelly, "IFN- λ 4: The Paradoxical New Member of the Interferon Lambda Family," *J. Interf. Cytokine Res.*, vol. 34, no. 11, pp. 829–838, Nov. 2014.
- [75] J. W. Schoggins and C. M. Rice, "Interferon-stimulated genes and their

- antiviral effector functions," *Curr. Opin. Virol.*, vol. 1, no. 6, pp. 519–525, 2011.
- [76] E. Knight and B. D. Korant, "Fibroblast interferon induces synthesis of four proteins in human fibroblast cells," *Cell Biol.*, vol. 76, no. 4, pp. 1824–1827, 1979.
- [77] A. C. Lerner, G. Jonakt, Y.-S. E. Chengt, B. Korantt, E. Knightt, and J. E. Darnell, "Transcriptional induction of two genes in human cells by β interferon," *Cell Biol.*, vol. 81, pp. 6733–6737, 1984.
- [78] M. J. de Veer *et al.*, "Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 69, no. 6, pp. 912–20, Jun. 2001.
- [79] A. Zhou, J. M. Paranjape, S. D. Der, B. R. G. Williams, and R. H. Silverman, "Interferon action in triply deficient mice reveals the existence of alternative antiviral pathways," *Virology*, vol. 258, no. 2, pp. 435–440, 1999.
- [80] I. Kim, W. Xu, and J. C. Reed, "Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 7, no. 12, pp. 1013–1030, 2008.
- [81] H. C. Wang, W. Huang, M. Der Lai, and I. J. Su, "Hepatitis B Virus pre-S mutants, endoplasmic reticulum stress and hepatocarcinogenesis," *Cancer Sci.*, vol. 97, no. 8, pp. 683–688, Aug. 2006.
- [82] M. Wang and R. J. Kaufman, "The impact of the endoplasmic reticulum protein-folding environment on cancer development," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 14, no. 9, pp. 581–597, Aug. 2014.
- [83] H. P. Harding, Y. Zhang, A. Bertolotti, H. Zeng, and D. Ron, "Perk Is Essential for Translational Regulation and Cell Survival during the Unfolded Protein Response," *Mol. Cell*, vol. 5, pp. 897–904, 2000.
- [84] M. Boyce, "A Selective Inhibitor of eIF2 Dephosphorylation Protects Cells from ER Stress," *Science (80-.)*, vol. 307, no. 5711, pp. 935–939, 2005.
- [85] S. J. Marciniak *et al.*, "CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum," *Genes Dev.*, vol. 18, no. 24, pp. 3066–3077, 2004.
- [86] J. Ye *et al.*, "ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs," *Mol. Cell*, vol. 6, no. 6, pp. 1355–64, Dec. 2000.
- [87] J. Hollien, "Decay of Endoplasmic Reticulum-Localized mRNAs During the Unfolded Protein Response," *Science (80-.)*, vol. 313, no. 5783, pp. 104–107, 2006.
- [88] F. Urano, "Coupling of Stress in the ER to Activation of JNK Protein Kinases by Transmembrane Protein Kinase IRE1," *Science (80-.)*, vol. 287, no. 5453, pp. 664–666, 2000.
- [89] F. V Chisari *et al.*, "A transgenic mouse model of the chronic hepatitis B surface antigen carrier state," *Science (80-.)*, vol. 230, no. 4730, pp. 1157–1160, 1985.

- [90] F. V Chisari *et al.*, "Structural and pathological effects of synthesis of hepatitis B virus large envelope polypeptide in transgenic mice.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 84, no. 19, pp. 6909–13, Oct. 1987.
- [91] F. V. Chisari *et al.*, "Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus transgenic mice," *Cell*, vol. 59, no. 6, pp. 1145–156, 1989.
- [92] M. A. O'Connor and W. R. Green, "Use of IRF-3 and/or IRF-7 Knockout Mice To Study Viral Pathogenesis: Lessons from a Murine Retrovirus-Induced AIDS Model," *J. Virol.*, vol. 88, no. 4, pp. 2349–2353, 2014.
- [93] C. Steinberg *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.*, vol. 39, no. 4, pp. 1007–1018, 2009.
- [94] G. Avwioro, "Histochemical uses of Haematoxylin - A review," *Jpcs*, 2011.
- [95] S. T. Reece *et al.*, "Serine protease activity contributes to control of *Mycobacterium tuberculosis* in hypoxic lung granulomas in mice.," *J. Clin. Invest.*, vol. 120, no. 9, pp. 3365–76, Sep. 2010.
- [96] K. J. Livak and T. D. Schmittgen, "Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method," *Methods*, vol. 25, no. 4, pp. 402–408, Dec. 2001.
- [97] U. K. Laemmli, "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.," *Nature*, vol. 227, no. 5259, pp. 680–5, Aug. 1970.
- [98] A. M. Mathai, J. Alexander, F.-Y. Kuo, M. Torbenson, P. E. Swanson, and M. M. Yeh, "Type II ground-glass hepatocytes as a marker of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B," *Hum. Pathol.*, vol. 44, no. 8, pp. 1665–1671, Aug. 2013.
- [99] S. Gowda, P. B. Desai, V. V Hull, A. A. K. Math, S. N. Vernekar, and S. S. Kulkarni, "A review on laboratory liver function tests.," *Pan Afr. Med. J.*, vol. 3, p. 17, Nov. 2009.
- [100] J. C. García-Cañaveras, M. T. Donato, J. V Castell, and A. Lahoz, "Targeted profiling of circulating and hepatic bile acids in human, mouse, and rat using a UPLC-MRM-MS-validated method.," *J. Lipid Res.*, vol. 53, no. 10, pp. 2231–41, Oct. 2012.
- [101] J. A. Smith, "A new paradigm: innate immune sensing of viruses via the unfolded protein response," *Front. Microbiol.*, vol. 5, p. 222, May 2014.
- [102] S. Hadziyannis, M. A. Gerber, C. Vissoulis, and H. Popper, "Cytoplasmic hepatitis B antigen in 'ground-glass' hepatocytes of carriers.," *Arch. Pathol.*, vol. 96, no. 5, pp. 327–30, Nov. 1973.
- [103] H.-C. Wang, H.-C. Wu, C.-F. Chen, N. Fausto, H.-Y. Lei, and I.-J. Su, "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.*, vol. 163, no. 6, pp. 2441–9, Dec. 2003.
- [104] I. Su, H. Wu, H. Tsai, L. Hui-ching, W. Hsieh, and C. Teng, "The

- Emerging Role of Ground Glass Hepatocytes and Hepatitis B Virus Pre-S Mutants in Anti-Viral Therapy and HBV Tumor Genesis," *Ann Clin Pathol*, vol. 2, no. 6, 2014.
- [105] D. H. Vroon and Z. Israili, *Alkaline Phosphatase and Gamma Glutamyltransferase*. 1990.
- [106] R. Buchet, J. L. Millán, and D. Magne, "Multisystemic Functions of Alkaline Phosphatases," in *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, vol. 1053, 2013, pp. 27–51.
- [107] M. J. Stechman *et al.*, "Establishing normal plasma and 24-hour urinary biochemistry ranges in C3H, BALB/c and C57BL/6J mice following acclimatization in metabolic cages."
- [108] D. Joshi, A. James, A. Quaglia, R. H. Westbrook, and M. A. Heneghan, "Liver disease in pregnancy," *Lancet*, vol. 375, no. 9714, pp. 594–605, Feb. 2010.
- [109] B. Hatesuer *et al.*, "Deletion of Irf3 and Irf7 Genes in Mice Results in Altered Interferon Pathway Activation and Granulocyte-Dominated Inflammatory Responses to Influenza A Infection," *J. Innate Immun.*, vol. 9, no. 2, pp. 145–161, 2017.
- [110] S. Daffis, M. A. Samuel, B. C. Keller, M. Gale, and M. S. Diamond, "Cell-Specific IRF-3 Responses Protect against West Nile Virus Infection by Interferon-Dependent and -Independent Mechanisms," *PLoS Pathog.*, vol. 3, no. 7, p. e106, 2007.
- [111] M. Sato *et al.*, "Distinct and Essential Roles of Transcription Factors IRF-3 and IRF-7 in Response to Viruses for IFN- α/β Gene Induction," *Immunity*, vol. 13, no. 4, pp. 539–548, 2000.
- [112] S. Daffis, M. A. Samuel, M. S. Suthar, B. C. Keller, M. Gale, and M. S. Diamond, "Interferon Regulatory Factor IRF-7 Induces the Antiviral Alpha Interferon Response and Protects against Lethal West Nile Virus Infection," *J. Virol.*, vol. 82, no. 17, pp. 8465–8475, 2008.
- [113] V. D. Menachery and D. A. Leib, "Control of herpes simplex virus replication is mediated through an interferon regulatory factor 3-dependent pathway," *J. Virol.*, vol. 83, no. 23, pp. 12399–406, Dec. 2009.
- [114] A. A. Murphy, P. C. Rosato, Z. M. Parker, A. Khalenkov, and D. A. Leib, "Synergistic control of herpes simplex virus pathogenesis by IRF-3, and IRF-7 revealed through non-invasive bioluminescence imaging," *Virology*, vol. 444, no. 1–2, pp. 71–9, Sep. 2013.
- [115] C. E. Samuel, "Antiviral Actions of Interferons," vol. 14, no. 4, pp. 778–809, 2001.
- [116] V. Hornung, R. Hartmann, A. Ablasser, and K.-P. Hopfner, "OAS proteins and cGAS: unifying concepts in sensing and responding to cytosolic nucleic acids," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 14, no. 8, pp. 521–528, Aug. 2014.
- [117] X. Qiu *et al.*, "ISG15 as a novel prognostic biomarker for hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma," *Int. J. Clin. Exp. Med.*, vol. 8, no. 10, pp. 17140–17150, 2015.

- [118] N. X. Hoan, H. Van Tong, D. P. Giang, and T. P. Velavan, "Interferon-stimulated gene 15 in hepatitis B-related liver diseases," *Oncotarget*, vol. 7, no. 42, pp. 67777–67787, 2016.
- [119] A. Basters, K.-P. Knobeloch, and G. Fritz, "How USP18 deals with ISG15-modified proteins: structural basis for the specificity of the protease."
- [120] J.-H. Kim, J.-K. Luo, and D.-E. Zhang, "The level of hepatitis B virus replication is not affected by protein ISG15 modification but is reduced by inhibition of UBP43 (USP18) expression.," *J. Immunol.*, vol. 181, no. 9, pp. 6467–6472, Nov. 2008.
- [121] P. K. Chua *et al.*, "Modulation of alpha interferon anti-hepatitis C virus activity by ISG15," *J. Gen. Virol.*, vol. 90, no. 12, pp. 2929–2939, Dec. 2009.
- [122] B. Skaug and Z. J. Chen, "Emerging Role of ISG15 in Antiviral Immunity," *Cell*, vol. 143, no. 2, pp. 187–190, 2010.
- [123] C. Scagnolari *et al.*, "ISG15 expression correlates with HIV-1 viral load and with factors regulating T cell response," *Immunobiology*, vol. 221, no. 2, pp. 282–290, 2016.
- [124] C. Villarroya-Beltri, S. Guerra, and F. Sánchezsánchez-Madrid, "ISGylation-a key to lock the cell gates for preventing the spread of threats," 2017.
- [125] S. A. Samarajiwa, S. Forster, K. Auchetl, and P. J. Hertzog, "INTERFEROME: the database of interferon regulated genes," *Nucleic Acids Res.*, vol. 37, 2009.
- [126] T. R. Shepherd, R. L. Hard, A. M. Murray, P. § Dehua, and E. J. Fuentes, "Distinct Ligand Specificity of the Tiam1 and Tiam2 PDZ Domains † NIH Public Access," *Biochemistry*, vol. 50, no. 8, pp. 1296–1308, 2011.
- [127] C. Rooney *et al.*, "The Rac activator STEF (Tiam2) regulates cell migration by microtubule-mediated focal adhesion disassembly.," *EMBO Rep.*, vol. 11, no. 4, pp. 292–8, Apr. 2010.
- [128] J.-S. Chen, I.-J. Su, Y.-W. Leu, K.-C. Young, and H. S. Sun, "Expression of T-cell lymphoma invasion and metastasis 2 (TIAM2) promotes proliferation and invasion of liver cancer," *Int. J. Cancer*, vol. 130, no. 6, pp. 1302–1313, Mar. 2012.
- [129] T. Curie, V. Mongrain, S. Dorsaz, G. M. Mang, Y. Emmenegger, and P. Franken, "Homeostatic and Circadian Contribution to EEG and Molecular State Variables of Sleep Regulation," *Sleep*, vol. 36, no. 3, pp. 311–323, 2013.
- [130] G. Shutler, T. Glassco, X. Kang, R. Korneluk, and C. R. Mueller, "Genomic Structure of the Human D-Site Binding Protein (DBP) Gene," *Genomics*, vol. 34, pp. 334–339, 1996.
- [131] K. Hamamura *et al.*, "Alterations of hepatic metabolism in chronic kidney disease via D-box-binding protein aggravate the renal dysfunction," *J. Biol. Chem.*, vol. 291, no. 10, pp. 4913–4927, 2016.
- [132] A. M. Curtis, M. M. Bellet, P. Sassone-Corsi, and L. A. J. O'Neill,

- "Circadian Clock Proteins and Immunity," *Immunity*, vol. 40, no. 2, pp. 178–186, 2014.
- [133] F. Borel, I. Hachi, A. Palencia, M.-C. Gaillard, and J.-L. Ferrer, "Crystal structure of mouse mu-crystallin complexed with NADPH and the T3 thyroid hormone," *FEBS J.*, vol. 281, no. 6, pp. 1598–1612, Mar. 2014.
- [134] N. Aoki, K. Ito, and M. Ito, "μ-Crystallin, Thyroid Hormone-binding Protein, is Expressed Abundantly in the Murine Inner Root Sheath Cells," *J. Invest. Dermatol.*, vol. 115, no. 3, pp. 402–405, Sep. 2000.
- [135] J. P. Hardwick, "Cytochrome P450 omega hydroxylase (CYP4) function in fatty acid metabolism and metabolic diseases," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 75, no. 12, pp. 2263–2275, Jun. 2008.
- [136] X. Zhang *et al.*, "Ablation of cytochrome P450 omega-hydroxylase 4A14 gene attenuates hepatic steatosis and fibrosis," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 114, no. 12, pp. 3181–3185, Mar. 2017.
- [137] E. C. Park *et al.*, "Inhibition of CYP4A Reduces Hepatic Endoplasmic Reticulum Stress and Features of Diabetes in Mice," *Gastroenterology*, vol. 147, no. 4, pp. 860–869, Oct. 2014.
- [138] Y. Zheng *et al.*, "Expression of β -globin by cancer cells promotes cell survival during blood-borne dissemination," *Nat. Commun.*, vol. 8, p. 14344, Feb. 2017.
- [139] W. Liu, S. S. Baker, R. D. Baker, N. J. Nowak, and L. Zhu, "Upregulation of Hemoglobin Expression by Oxidative Stress in Hepatocytes and Its Implication in Nonalcoholic Steatohepatitis," *PLoS One*, vol. 6, no. 9, p. e24363, Sep. 2011.
- [140] K. W. Huang, Y. C. Huang, K. F. Tai, B. H. Chen, P. H. Lee, and L. H. Hwang, "Dual therapeutic effects of interferon- α gene therapy in a rat hepatocellular carcinoma model with liver cirrhosis," *Mol. Ther.*, vol. 16, no. 10, pp. 1681–1687, Oct. 2008.
- [141] E. Padovan, G. C. Spagnoli, M. Ferrantini, and M. Heberer, "IFN- α 2a induces IP-10/CXCL10 and MIG/CXCL9 production in monocyte-derived dendritic cells and enhances their capacity to attract and stimulate CD8+ effector T cells," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 71, no. 4, pp. 669–676, Apr. 2002.
- [142] U. P. Singh, S. Singh, D. D. Taub, and J. W. Lillard Jr., "Inhibition of IFN- γ -inducible protein-10 abrogates colitis in IL-10-/- mice," *J. Immunol.*, vol. 171, no. 3, pp. 1401–1406, 2003.
- [143] X. Zhang *et al.*, "CXCL10 plays a key role as an inflammatory mediator and a non-invasive biomarker of non-alcoholic steatohepatitis," *J. Hepatol.*, vol. 61, no. 6, pp. 1365–1375, Dec. 2014.
- [144] V. Arpino, M. Brock, and S. E. Gill, "The role of TIMPs in regulation of extracellular matrix proteolysis," *Matrix Biol.*, vol. 44–46, pp. 247–254, May 2015.
- [145] K. Zhao *et al.*, "IP-10 Expression in Patients with Chronic HBV Infection and Its Ability to Predict the Decrease in HBsAg Levels after Treatment with Entecavir," *418 Mol. Cells*, vol. 40, no. 6, pp. 418–425, 2017.

- [146] H. Ishikawa, Z. Ma, and G. N. Barber, "STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity," *Nature*, vol. 461, no. 7265, pp. 788–792, 2009.
- [147] J. Petrasek *et al.*, "STING-IRF3 pathway links endoplasmic reticulum stress with hepatocyte apoptosis in early alcoholic liver disease," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 110, no. 41, pp. 16544–16549, 2013.
- [148] Y. Chien *et al.*, "RalB GTPase-mediated activation of the I κ B family kinase TBK1 couples innate immune signaling to tumor cell survival.," *Cell*, vol. 127, no. 1, pp. 157–70, Oct. 2006.
- [149] F. Guo *et al.*, "Activation of Stimulator of Interferon Genes in Hepatocytes Suppresses the Replication of Hepatitis B Virus.," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 61, no. 10, p. AAC.00771-17, Oct. 2017.
- [150] C. Rossé, A. Hatzoglou, M.-C. Parrini, M. A. White, P. Chavrier, and J. Camonis, "RalB mobilizes the exocyst to drive cell migration.," *Mol. Cell Biol.*, vol. 26, no. 2, pp. 727–34, Jan. 2006.
- [151] J. H. Camonis and M. A. White, "Ral GTPases: corrupting the exocyst in cancer cells," *Trends Cell Biol.*, vol. 15, no. 6, pp. 327–332, Jun. 2005.
- [152] M. A. Meraz *et al.*, "Targeted Disruption of the Stat1 Gene in Mice Reveals Unexpected Physiologic Specificity in the JAK–STAT Signaling Pathway," *Cell*, vol. 84, no. 3, pp. 431–442, Feb. 1996.
- [153] C. Schindler, D. E. Levy, and T. Decker, "JAK-STAT signaling: from interferons to cytokines.," *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 28, pp. 20059–63, Jul. 2007.
- [154] X.-Y. Fu, D. S. Kessler, S. A. Vealst, D. E. Levyt, and J. E. Darnell, "ISGF3, the transcriptional activator induced by interferon α , consists of multiple interacting polypeptide chains (interferon-dependent transcription factor/factor purification/interferon-stimulated response element).," 1990.
- [155] J. E. Durbin, "Targeted Disruption of the Mouse Stat1 Gene Results in Compromised Innate Immunity to Viral Disease," *Cell*, vol. 84, pp. 443–450, 1996.
- [156] H. Ikushima, H. Negishi, and T. Taniguchi, "The IRF family transcription factors at the interface of innate and adaptive immune responses," *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, vol. 78, no. 1, pp. 105–116, 2013.
- [157] E. Gruys, M. J. M. Toussaint, T. A. Niewold, and S. J. Koopmans, "Acute phase reaction and acute phase proteins.," *J. Zhejiang Univ. Sci. B*, vol. 6, no. 11, pp. 1045–56, Nov. 2005.
- [158] C. Trautwein, K. Böker, and M. P. Manns, "Hepatocyte and immune system: Acute phase reaction as a contribution to early defence mechanisms," 1994.
- [159] K. Streetz *et al.*, "Interleukin 6/gp130-dependent pathways are protective during chronic liver diseases," *Hepatology*, vol. 38, no. 1, pp. 218–229, Jul. 2003.
- [160] K. L. Streetz, T. Wüstefeld, C. Klein, M. P. Manns, and C. Trautwein, "Mediators of inflammation and acute phase response in the liver.," *Cell*.

- Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*., vol. 47, no. 4, pp. 661–73, Jun. 2001.
- [161] H. Moshage, “Cytokines and the hepatic acute phase response,” *J. Pathol.*, vol. 181, no. 3, pp. 257–266, 1997.
- [162] B. Ruttkay-Nedecky *et al.*, “The Role of Metallothionein in Oxidative Stress,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 14, pp. 6044–6066, 2013.
- [163] D. M. Steel and A. S. Whitehead, “The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein,” *Immunol. Today*, vol. 15, no. 2, pp. 81–88, Feb. 1994.
- [164] M. Emma *et al.*, “NUPR1, a new target in liver cancer: implication in controlling cell growth, migration, invasion and sorafenib resistance,” vol. 7, 2016.
- [165] A. Carracedo *et al.*, “The stress-regulated protein p8 mediates cannabinoid-induced apoptosis of tumor cells.”
- [166] T. Hamidi *et al.*, “Nuclear protein 1 promotes pancreatic cancer development and protects cells from stress by inhibiting apoptosis,” *J. Clin. Invest.*, 2092.
- [167] A. C. Ariza, P. M. T. Deen, and J. H. Robben, “The succinate receptor as a novel therapeutic target for oxidative and metabolic stress-related conditions,” *Front. Endocrinol. (Lausanne)*., vol. 3, no. FEB, 2012.
- [168] P. R. A. V Correa, E. A. Kruglov, M. Thompson, M. F. Leite, J. A. Dranoff, and M. H. Nathanson, “Succinate is a paracrine signal for liver damage.,” *J. Hepatol.*, vol. 47, no. 2, pp. 262–9, Aug. 2007.
- [169] Y.-G. Yang, T. Lindahl, and D. E. Barnes, “Trex1 Exonuclease Degrades ssDNA to Prevent Chronic Checkpoint Activation and Autoimmune Disease,” *Cell*, vol. 131, no. 5, pp. 873–886, Nov. 2007.
- [170] D. B. Stetson, J. S. Ko, T. Heidmann, and R. Medzhitov, “Trex1 prevents cell-intrinsic initiation of autoimmunity.,” *Cell*, vol. 134, no. 4, pp. 587–98, Aug. 2008.
- [171] M. Hasan *et al.*, “Trex1 regulates lysosomal biogenesis and interferon-independent activation of antiviral genes.”
- [172] H. Y. Jiang *et al.*, “Activating transcription factor 3 is integral to the eukaryotic initiation factor 2 kinase stress response,” *Mol Cell Biol*, vol. 24, no. 3, pp. 1365–1377, 2004.
- [173] M. Yoneyama, W. Suhara, Y. Fukuhara, M. Fukuda, E. Nishida, and T. Fujita, “Direct triggering of the type I interferon system by virus infection: activation of a transcription factor complex containing IRF-3 and CBP/p300,” *EMBO J.*, vol. 17, no. 4, pp. 1087–1095, 1998.
- [174] Y. Churin *et al.*, “Pathological Impact of Hepatitis B Virus Surface Proteins on the Liver Is Associated with the Host Genetic Background.”
- [175] R. Van Huizen, J. L. Martindale, M. Gorospe, and N. J. Holbrook, “P58IPK, a novel endoplasmic reticulum stress-inducible protein and potential negative regulator of eIF2 α signaling,” *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 18, pp. 15558–15564, 2003.

- [176] I.-J. Su, H.-C. Wang, H.-C. Wu, and W.-Y. Huang, "Ground glass hepatocytes contain pre-S mutants and represent preneoplastic lesions in chronic hepatitis B virus infection," *J. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 23, no. 8pt1, pp. 1169–1174, Aug. 2008.
- [177] T. Piratvisuth *et al.*, "Sustained response to peginterferon alfa-2a (40 kD) with or without lamivudine in Asian patients with HBeAg-positive and HBeAg-negative chronic hepatitis B," *Hepatol. Int.*, vol. 2, no. 1, pp. 102–110, Mar. 2008.
- [178] G. K. K. Lau *et al.*, "Peginterferon Alfa-2a, Lamivudine, and the Combination for HBeAg-Positive Chronic Hepatitis B," *N. Engl. J. Med.*, vol. 352, no. 26, pp. 2682–2695, Jun. 2005.
- [179] P. Marcellin *et al.*, "Hepatitis B surface antigen levels: association with 5-year response to peginterferon alfa-2a in hepatitis B e-antigen-negative patients," *Hepatol. Int.*, vol. 7, no. 1, pp. 88–97, Mar. 2013.

11. ERKLÄRUNG

„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.“

Hamburg, im Juni 2019

David Schwarz

12. DANKSAGUNG

An erster Stelle gilt mein ausgesprochener Dank Frau Univ.-Prof. Dr. med. Elke Roeb, die mir die Möglichkeit gab, als Teil ihrer Arbeitsgruppe diese Arbeit zu erstellen. Ohne ihr Engagement, ihre hervorragende Betreuung und ihre Hilfsbereitschaft wäre mir dies nicht möglich gewesen.

Besondere Dank gilt Dr. rer. nat. Yuri Churin, der mir in den ersten bis letzten Zügen zur Seite stand. Wie auch immer meine Fragestellung lautete, auf seine Expertise in praktischer und theoretischer wissenschaftlicher Arbeit war Verlass. Yuris Anregungen, kritische Fragen und der Fokus auf das Wesentliche waren stets hilfreich. Abseits davon habe ich unsere angeregten Diskussionen über kulturelles und politisches Tagesgeschehen sehr genossen.

Des Weiteren möchte ich mich bei PD Dr. Martin Roderfeld bedanken, der zu jeder Zeit für wissenschaftliche, organisatorische und letztlich jede Problematik zu Verfügung stand.

Für die Anleitung in technische Vorgehensweisen, Einführen in Methodik und hilfreiche Mitarbeit möchte ich mich bei Annette Tschuschner bedanken.

Mein großer Dank gilt zudem meinen mich immer in jeder Form unterstützenden Eltern. Danke für jeden Rat und den Glauben an meine Fähigkeiten. Nicht zuletzt möchte ich mich vor allem auch bei meinen Geschwistern Clara, Silas und insbesondere bei Philipp bedanken, der mich in meiner Denkstruktur versteht wie wenige andere dies tun.