

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Innere Medizin,
I. Medizinische Klinik und Poliklinik

Direktor: Prof. Dr. Ansgar W. Lohse

Vergleichende Analyse antiviraler Effekte verschiedener Interferone in HBV-infizierten human-chimären Mäusen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Anna Maria Günther
aus Berlin

Hamburg 2021

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 17.08.2021**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. Susanne Polywka

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Maura Dandri-Petersen

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Hepatitis-B-Virus	1
1.1.1	Epidemiologie und Klassifizierung	1
1.1.2	Virusmorphologie	2
1.1.3	Genomstruktur	4
1.1.4	Viraler Replikationszyklus	6
1.1.5	Pathogenese und Therapeutische Ansätze	10
1.2	<i>In-vivo</i>-Modellsysteme zur Untersuchung der HBV-Infektion	14
1.2.1	Das humanisierte Mausmodell	17
1.3	Die humane Immunantwort auf virale Infektionen	21
1.3.1	Das Interferon-System	22
1.3.1.1	Interferon alpha	24
1.3.1.2	Interferon gamma	25
1.3.1.3	Interferon lambda	26
1.4	Arbeitshypothese und Fragestellung	27
2	Material und Methoden	28
2.1	Material	28
2.1.1	Laborequipment	28
2.1.2	Verbrauchsmaterial	28
2.1.3	Chemikalien und Reagenzien	29
2.1.4	Puffer und Lösungen	29
2.1.5	Kits	30
2.1.6	Enzyme	30
2.1.7	Antikörper	30
2.1.8	Primer und Sonden	31
2.1.9	Software	32
2.2	Methoden	33
2.2.1	Generierung von humanisierten uPA/SCID-Mäusen und Infektion mit HBV	33
2.2.2	Behandlung mit pegyliertem Interferon- α und pegyliertem Interferon- λ	34
2.2.3	Behandlung mit Interferon- α und Interferon- γ	35
2.2.4	Serologische Analysen	36
2.2.4.1	DNA- Extraktion und Messung	36
2.2.4.2	pgRNA- Extraktion und Messung	38
2.2.4.3	Quantifizierung von HBeAg und HBsAg	39
2.2.5	Intrahepatische Analysen	39
2.2.5.1	DNA/RNA- Isolierung aus Lebergewebe	39
2.2.5.2	cccDNA Verdau	40
2.2.5.3	Messung intrahepatischer HBV-DNA und RNA	41
2.2.5.4	cDNA Umschreibung und Genexpressionsmessung	43
2.2.5.5	Immunfluoreszenzfärbung	43
2.2.6	Statistische Analysen	44
3	Ergebnisse	45
3.1	Antivirale Effekte von pegyliertem Interferon-α und pegyliertem Interferon-λ in HBV-infizierten uPA/SCID-Mäusen	45
3.1.1	Einfluss auf serologische virale Parameter	45
3.1.2	Einfluss auf intrahepatische virale Parameter	50
3.1.3	Induktion von Interferon-stimulierten Genen	55
3.1.3.1	Expression von STAT1 und zelluläre Lokalisation	61

3.1.3.2	Expression von APOBEC3-Genen	64
3.1.4	Effekt auf den SMC5/6-Komplex	66
3.2	Antivirale Effekte von Interferon-α und Interferon-γ in HBV-infizierten und uninfizierten uPA/SCID-Mäusen	69
3.2.1	Einfluss auf serologische virale Parameter.....	69
3.2.2	Einfluss auf intrahepatische virale Parameter.....	72
3.2.3	Induktion von Interferon-stimulierten Genen in HBV-infizierten und uninfizierten uPA/SCID-Mäusen	73
4	Diskussion	76
4.1	Antivirale Effekte von pegyliertem Interferon- α und pegyliertem Interferon- λ in HBV-infizierten uPA/SCID-Mäusen	76
4.2	Antivirale Effekte von Interferon- α und Interferon- γ in HBV-infizierten und uninfizierten uPA/SCID-Mäusen	84
4.3	Abschließende Schlussfolgerungen	87
5	Zusammenfassung.....	88
6	Abkürzungsverzeichnis	90
7	Literaturverzeichnis	93
8	Abbildungsverzeichnis	102
9	Tabellenverzeichnis	103
10	Danksagung.....	104
11	Lebenslauf	105
12	Eidesstattliche Erklärung	106

1 Einleitung

1.1 Das Hepatitis-B-Virus

1.1.1 Epidemiologie und Klassifizierung

Das Hepatitis-B-Virus (HBV) ist ein kleines umhülltes DNA-Virus, welches die Leber eines Menschen befällt und eine potentiell lebensbedrohliche akute oder chronische Leberentzündung verursachen kann. Obwohl es seit fast 40 Jahren einen Impfstoff gegen das HBV gibt, waren laut WHO im Jahre 2015 weltweit 257 Millionen Menschen chronisch mit dem Virus infiziert, was 3,5% der Weltbevölkerung entspricht (WHO 2017, Ward und Damme 2018, WHO 2019). Davon stammen 68% aus Afrika und dem westpazifischen Raum. Rund 887 000 der Infizierten sind 2015 an den Folgen der Virusinfektion verstorben. Damit stellt die HBV-Infektion ein bedeutendes globales Gesundheitsproblem dar (WHO 2019).

Das humane HBV gehört zur Familie der *Hepadnaviridae* (Schaefer et al. 2010). Da die *Hepadnaviridae* aufgrund ihrer biologischen Eigenschaften keiner anderen viralen Familie zugeordnet werden konnten, stellen sie eine eigene taxonomische Gruppe dar (Gust et al. 1986). Sie verdanken ihren Namen der Tatsache, dass es sich bei ihren Mitgliedern um Viren handelt, die weitgehend hepatotrop (hepar (griech.) = Leber) sind und ein DNA-Genom aufweisen (Schaefer et al. 2010). Die Vertreter sind weitgehend speziesspezifisch, das humane HBV nutzt neben dem Menschen nur noch Schimpansen als Wirt (Maynard et al. 1972, Barker et al. 1973, Schaefer et al. 2010). Innerhalb der *Hepadnaviridae* wird zwischen *Orthohepadnaviren* und *Avihepadnaviren* unterschieden (Schaefer et al. 2010). Die *Orthohepadnaviren* infizieren Säugetiere und umfassen neben dem humanen HBV unter anderem Hepatitisviren des Waldmurmeltiers (WHV) oder des Wollaffens (WMHBV) (Summers et al. 1978, Korba et al. 1989, Lanford et al. 1998). Zur Gattung der *Avihepadnaviren* gehören Viren, die Vögel infizieren, wie beispielsweise das Hepatitisvirus von Enten (DHBV), Fischreihern (HHBV) oder Schneegänsen (SGHBV) gehört (Mason et al. 1980, Sprengel et al. 1988, Chang et al. 1999).

Das menschliche HBV wird zurzeit in acht Genotypen unterteilt (A-H), die sich in ihrem Genom um mehr als 8% unterscheiden und in ihrer geographischen Verteilung variieren (Datta 2008, Lamontagne et al. 2016) (**Abbildung (Abb.) 1.1**). Während der Genotyp D weltweit zu finden ist, sind andere Genotypen auf bestimmte Kontinente beschränkt (Gerlich 2013). So ist der Genotyp E ausschließlich in Afrika, die Genotypen F und H hauptsächlich in Mittel- und Südamerika zu finden (Lin und Kao 2011). Die Genotypen B und C haben die größte Prävalenz in Asien, der Genotyp A ist hauptsächlich in Nordeuropa,

Nord- und Südamerika, sowie Afrika verbreitet (Pujol et al. 2009, Lin und Kao 2011). Der Genotyp G wurde in Frankreich, Deutschland und den USA gefunden (Lin und Kao 2011). Zusätzlich wurde über zwei weitere potentielle Genotypen (I und J) berichtet, die in Laos, Vietnam und Japan identifiziert werden konnten, deren Zuordnung als eigene Genotypen jedoch nicht unumstritten ist (Tatematsu et al. 2009, Yu et al. 2010, Lamontagne et al. 2016).

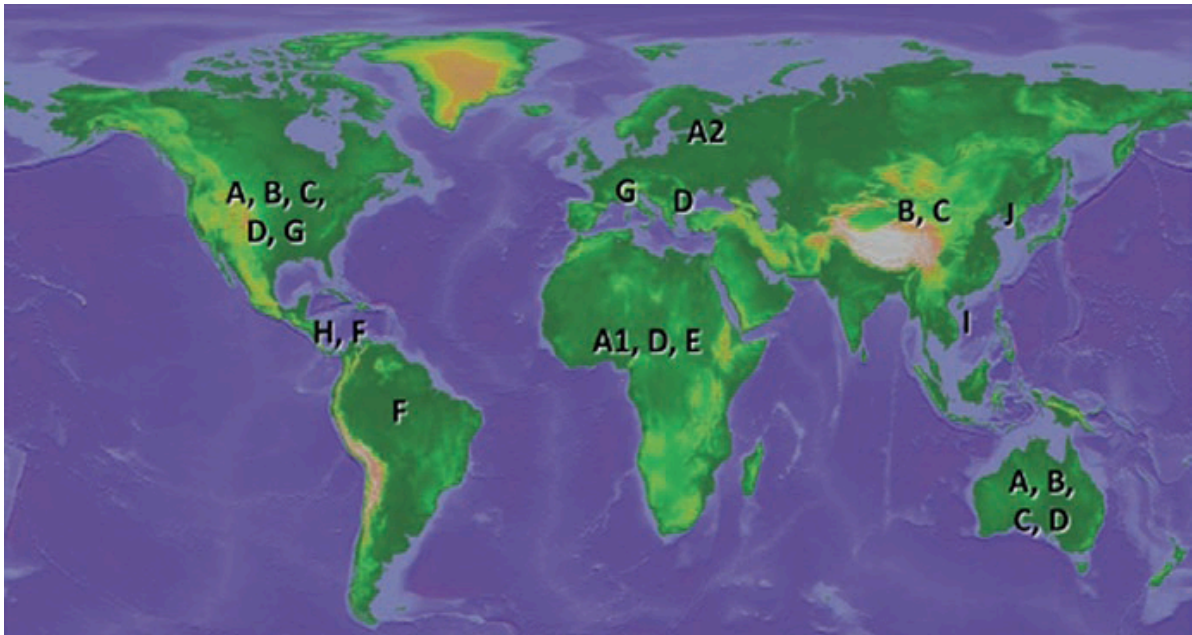


Abbildung 1.1: Globale Verteilung der HBV-Genotypen. A1 entspricht der afrikanischen, A2 der europäischen Variante des Genotyps A. Abbildung entnommen aus Yael Bogler et al. (2018). *Epidemiology and Natural History of Chronic Hepatitis B Virus Infection*. In: Kao, J.-H. & Chen, D.-S. (eds.) *Hepatitis B Virus and Liver Disease*. Springer Nature Singapore, S.73. Dort modifiziert und aktualisiert nach Liaw YF et al. *Liver Int.* 2005;25: 472–489.

1.1.2 Virusmorphologie

Das HBV produziert drei verschiedene virale Partikel, die alle im Serum eines Infizierten zu finden sind und mittels Elektronenmikroskopie visualisiert werden können (Liang 2009, Datta et al. 2012) (**Abb. 1.2**). Zwei dieser Partikel werden als subvirale Partikel bezeichnet und sind nicht infektiös, da sie kein virales Genom enthalten (Liang 2009, Gerlich 2013). Sie liegen in Form von Filamenten oder Sphären vor und bestehen ausschließlich aus dem Hepatitis-B-Oberflächen-Antigen (englisch (engl.) surface antigen, HBsAg), und Lipiden der Wirtszelle (Liang 2009). Das HBsAg umfasst drei verschiedene Proteine, die hinsichtlich ihrer Größe als kleines (SHBs, S = engl. small), mittleres (MHBs, M = engl. middle) und großes Hepatitis-B-Oberflächenprotein (LHBs, L = engl. large) bezeichnet werden (Schaefer et al. 2010). Alle drei Oberflächenproteine besitzen eine identische C-terminale Region, die in ihrer Sequenz dem SHBs entspricht. Das MHBs besitzt zusätzlich zur SHBs-

Sequenz am N-terminalen Ende eine präS2-Domäne, das LHBs neben der präS2 auch noch eine präS1-Domäne (Lamontagne et al. 2016) (**Abb.1.3**).

Das dritte virale Partikel ist das infektiöse Virion und wird nach seinem Erstbeschreiber D.S. Dane auch als „Dane-Partikel“ bezeichnet (Dane et al. 1970). Es handelt sich dabei um ein rundes doppelschaliges Partikel mit einem Durchmesser von ca. 45nm (Schaefer et al. 2010). Die äußere Virushülle ist wie die subviralen Partikel aufgebaut und besteht aus Wirtslipiden und den Proteinen des HBsAg (Liang 2009). Das innen liegende Viruskapsid besteht aus 240 viralen Core-Proteinen (engl. core antigen, HBcAg), die sich zu Dimeren zusammenlagern. Innerhalb des Kapsids befindet sich das virale Genom verbunden mit der viralen Polymerase (Liang 2009, Schaefer et al. 2010). Die virale Polymerase ist ein multifunktionales Protein mit drei für die virale Replikation notwendigen Domänen. Diese Domänen umfassen eine Primase zur Erstellung eines Primers, eine Reverse Transkriptase/DNA-Polymerase und eine Ribonuklease H (RNase H)-Domäne zum Abbau von RNA in RNA-DNA-Hybriden, die während der reversen Transkription entstehen (Radziwill et al. 1990, Wong und Locarnini 2018).

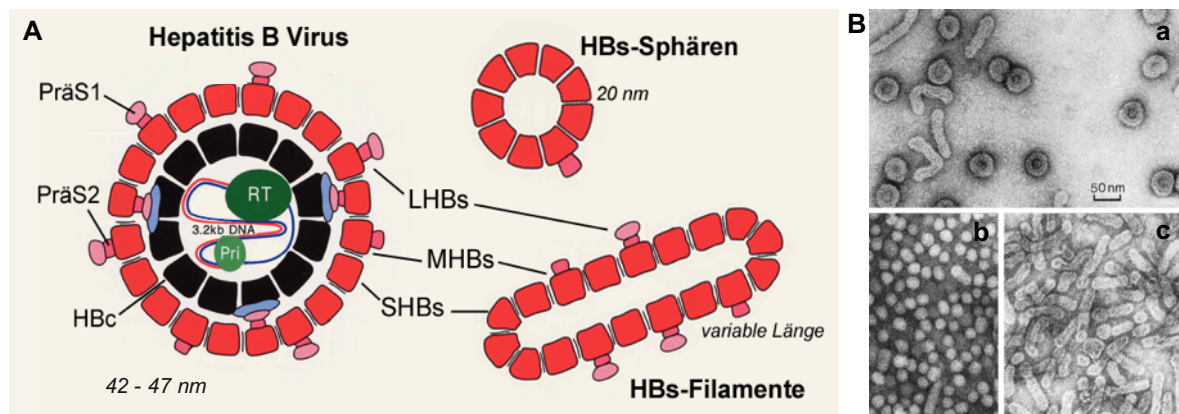


Abbildung 1.2: Morphologie von infektiösen und subviralen Partikeln des Hepatitis-B-Virus. (A) Die Oberflächenproteine SHBs, MHBs und LHBs bilden zusammen mit Wirtslipiden subvirale Partikel in Form von Sphären oder Filamenten oder formen die äußere Virushülle infektiöser Partikel. Infektiöse Partikel enthalten innerhalb der Virushülle das Nukleokapsid, welches aus HBc-Antigenen aufgebaut ist und das virale Genom zusammen mit der viralen Polymerase enthält. (B) Elektronenmikroskopische Aufnahme von infektiösen Viruspartikeln (a), subviralen Sphären (b) und Filamenten (c). (A) Abbildung von W.H. Gerlich, entnommen und adaptiert von Kraß, P. (2006). Bindung und Synthese von Hepatitis B-Virus surface Antigen durch primäre Tupaiahepatocyten. Medizinische Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen, S.8. (B) Abbildung entnommen aus Schaefer, S., et al. (2010). Hepatitis-B-Virus (Hepadnaviridae). In: Doerr, H. W. & Gerlich, W. H. (eds.) Medizinische Virologie. 2., komplett überarbeitete und erweiterte Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, S. 348.

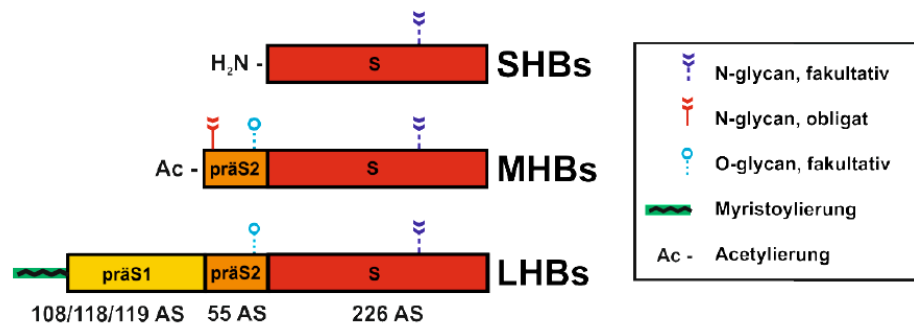


Abbildung 1.3: Die Oberflächenproteine des Hepatitis-B-Virus. Die drei Oberflächenproteine besitzen einen identischen C-terminalen Bereich aus 226 Aminosäuren (AS), der dem SHBs entspricht (rot). Das MHBs besitzt N-terminal zusätzlich eine präS2-Domäne aus 55 AS (orange). Eine weitere N-terminale Verlängerung um die präS1-Domäne (gelb) bildet das LHBs. Die präS1-Domäne variiert in ihrer Länge je nach Genotyp zwischen 108, 118 und 119 AS. Zusätzlich findet sich N-terminal am LHBs eine Myristoylierung (grün) und am MHBs eine Acetylierung (Ac). Alle HBsAg weisen außerdem obligate und fakultative N- und O-Glykosylierungen auf (lila, rot, blau). Abbildung nach Glebe, D. & Bremer, C. M. (2013) *The molecular virology of hepatitis B virus. Semin Liver Dis*, 33, S. 105, übersetzt von König, A. (2014). *Zoonotisches Potenzial neu entdeckter Orthohepadnaviren aus Fledermäusen und die Charakterisierung der Virus-Rezeptor Interaktionen des Hepatitis B Virus*. Inauguraldissertation zur Erlangung des akademischen Grades Dr. rer. nat., Justus-Liebig-Universität Gießen, S. 14 und dort entnommen.

1.1.3 Genomstruktur

Das virale Genom liegt als partiell doppelsträngige zirkuläre DNA in den Kapsiden vor und wird als entspannte zirkuläre DNA (engl. relaxed circular DNA, rcDNA) bezeichnet (Robinson et al. 1974) (**Abb. 1.4**). Das Genom besteht aus rund 3200 Basenpaaren, wobei der Plus- und der Minusstrang unterschiedliche Längen aufweisen (Summers et al. 1975). Während der Minusstrang die gesamte Sequenz enthält, ist der Plusstrang inkomplett (Summers et al. 1975, Summers 1988). Er kann zwischen 20 % und 80% des Genoms umfassen, da das 3'-Ende des Plusstrangs variabel ist (Wong und Locarnini 2018). Beide Stränge enthalten in ihrem 5'-Ende sogenannte direkte Wiederholungen (engl. direct repeats, DR) mit einer Länge von 11 Basenpaaren, die essentiell für den Prozess der viralen DNA-Replikation sind (Seeger et al. 1986). An das 5'-Ende des Minusstranges ist außerdem kovalent die virale Polymerase gebunden, am 5'-Ende des Plusstrangs befindet sich ein 18 Basen langes RNA Oligonukleotid, was die klassische Cap-Struktur von mRNAs (engl. messenger RNA) trägt (Will et al. 1987, Wong und Locarnini 2018). Der Minusstrang ist kein geschlossener Ring. Er enthält eine Lücke zwischen seinem 3' und 5'-Ende, die vom Plusstrang überbrückt wird. Die zirkuläre Form des Genoms wird durch Überlappung der 5'-Enden beider Stränge über eine Länge von 226 Basenpaaren aufrecht erhalten (Wong und Locarnini 2018).

Die genetische Information auf dem Genom kodiert für sieben virale Proteine und ist hochkondensiert. Es finden sich vier überlappende offene Leserahmen (engl. open reading frames, ORF), von denen einige für mehrere Proteine kodieren, indem innerhalb eines ORFs alternative Startcodons genutzt werden. Der größte ORF ist der P-ORF, welcher für die virale Polymerase kodiert. Der PräCore/Core-ORF kodiert für das HBcAg sowie das HBV- e- Antigen (HBcAg) (Lamontagne et al. 2016). Das HBcAg hat im Gegensatz zu den restlichen viralen Antigenen keine strukturelle Funktion, sondern wird ins Blut sezerniert, um dort immunmodulatorisch zu wirken. Die drei Oberflächenproteine S-, M- und LHbS sind auf dem PräS/S-ORF kodiert. Dieser ORF überschneidet sich komplett mit dem P-ORF (Dandri und Petersen 2018). Der letzte ORF kodiert für das HBV X-Protein (HBx), welches ein regulatorisches Protein vom HBV darstellt und essentiell für die virale Replikation ist (Tsuge et al. 2010, Lucifora et al. 2011, Livingston et al. 2017).

Allen ORFs ist gemein, dass sie ein allgemeines Polyadenylierungssignal beinhalten, sodass alle viralen mRNAs einen Poly-A-Schwanz tragen. Neben den ORFs existieren noch regulatorische Elemente in Form von vier Bindungsstellen für zelluläre Transkriptionsfaktoren (Promotoren) sowie zwei Enhancern (engl. = Verstärker) der Transkription. Im gesamten Genom gibt es nur eine Stopp-Sequenz für die Transkription, wodurch alle viralen RNAs die gleiche terminale Sequenz am 3'-Ende besitzen (Schaefer et al. 2010, Dandri und Petersen 2018).

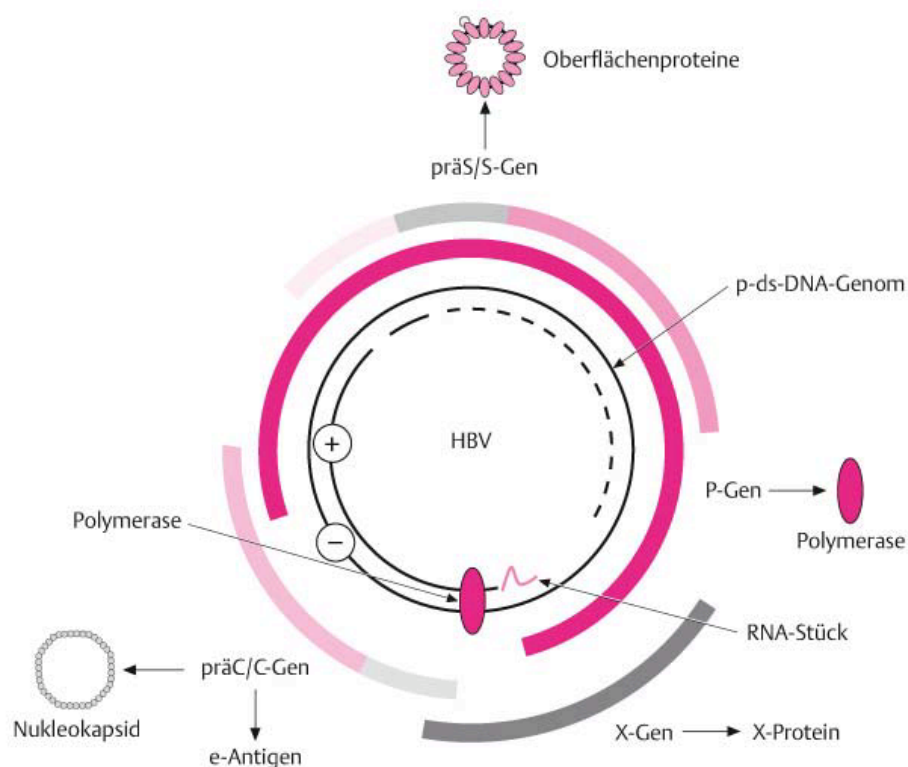


Abbildung 1.4: Genomstruktur des Hepatitis-B-Virus. Das HBV-Genom besteht aus einem ungefähr 3200 Basenpaaren umfassenden partiell doppelsträngigen Genom (p-ds-DNA-Genom) mit einem kompletten Minustrang (-) und einem inkompletten komplementären Plusstrang (+). Vier

offene Leserahmen (präS/S, präC/C, X und P) kodieren für die sieben viralen Proteine (SHBs, MHBs, LHBs, HBcAg, HBeAg, Polymerase und X-Protein). Am 5'-Ende des Minustrangs ist kovalent die Polymerase gebunden, am 5'-Ende des Plusstranges befindet sich ein 18 Basen langes RNA-Stück. Abbildung entnommen aus Sirma, H. S., et al. (2006). Molekulare Virologie von Hepatitis-B- und -D-Viren. In: Heintges, T. & Häussinger, D. (eds.) *Hepatitis B: Infektion – Therapie – Prophylaxe*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, S.6.

1.1.4 Viraler Replikationszyklus

Die virale Replikation (**Abb. 1.7**) beginnt mit der Anheftung des Virus an die Wirtszelle. Dabei geht das HB-Virus zunächst eine reversible Bindung mit Heparansulfat-Proteoglykanen der zellulären Oberfläche ein (Schulze et al. 2007). Anschließend folgt mithilfe der präS1-Domäne des LHBs die irreversible spezifische Bindung an das Natrium-Taurochlorat- Co-transportierende Polypeptid (NTCP), ein Transmembrantransporter, der ausschließlich auf der basolateralen Membran differenzierter Hepatozyten exprimiert wird und für den Transport von Gallensäuren verantwortlich ist (Yan et al. 2012, Ni et al. 2014). Durch rezeptorvermittelte Endozytose wird das Virus anschließend in das Zytoplasma der Zelle aufgenommen (Wong und Locarnini 2018).

Intrazellulär wird das Nukleokapsid freigesetzt und durch zellulären Mikrotubuli zum Zellkern der Wirtszelle transportiert (Rabe et al. 2006). Über Interaktion mit nukleären Transportrezeptoren und Proteinen des Kernporenkomplexes wird das Kapsid in den Zellkern transportiert (Kann et al. 1999, Rabe et al. 2003). Dort wird die rcDNA freigesetzt und mithilfe von zellulären Enzymen und der viralen Polymerase zu einem vollständig doppelsträngigen zirkulären supergecoilten (engl. coil = Windung) Genom ergänzt (Beck und Nassal 2007, Königer et al. 2014, Nassal 2015). Diese Form des viralen Genoms wird als kovalent geschlossene zirkuläre DNA (engl. covalently closed circular DNA, cccDNA) bezeichnet (Bock et al. 1994, Newbold et al. 1995, Nassal 2015). Der exakte Mechanismus der Bildung von cccDNA aus rcDNA ist zum aktuellen Zeitpunkt noch nicht geklärt (Allweiss und Dandri 2017). Gebunden an Histone und Nicht-Histon-Proteine bildet die cccDNA eine Chromatin-ähnliche Struktur, die als stabiles Minichromosom im Zellkern der infizierten Zellen vorliegt und nahezu resistent gegen antivirale Mechanismen und Immunantworten ist (Bock et al. 1994, Bock et al. 2001, Levrero et al. 2009, Liang 2009). Durch die Struktur eines Minichromosoms wird die cccDNA auch über epigenetische Veränderungen reguliert (Levrero et al. 2009, Koumbi und Karayiannis 2015, Hong et al. 2017). Im viralen Replikationszyklus ist sie eine stabile Komponente, die als Vorlage für die Transkription der viralen RNAs dient und somit für die virale Persistenz bei chronischen Infektionen mitverantwortlich ist (Liang 2009, Nassal 2015).

Um die Genexpression von der cccDNA zu gewährleisten, spielt das regulatorische HBx-Protein eine entscheidende Rolle (Livingston et al. 2017). Dafür interagiert HBx mit diversen Proteinen der Wirtszelle (Livingston et al. 2017). Zu diesen Proteinen gehören die „structural maintenance of chromosomes“ (SMC)-Proteine SMC5 und SMC6 (Livingston et al. 2017). SMC-Proteine übernehmen in eukaryotischen Zellen eine Schlüsselrolle als Regulatoren der Dynamik, Struktur und Funktion von Chromosomen und bilden zusammen mit Nicht-SMC-Elementen verschiedene Komplexe (Diaz und Pecinka 2018). Der Komplex aus SMC5 und SMC6 sowie sechs weiteren Nicht-SMC-Elementen wird als SMC5/6-Komplex bezeichnet und übernimmt unter anderem eine entscheidende Funktion in der Erhaltung der Genomstabilität (Diaz und Pecinka 2018). Gleichzeitig scheint der Komplex als antiviraler Restriktionsfaktor zu dienen, der die virale Transkription von der cccDNA behindert (Decorsiere et al. 2016).

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass HBx zur Degradierung dieses Komplexes führt und so die SMC-abhängige Hemmung der viralen Transkription abschwächt (Decorsiere et al. 2016, Mitra und Guo 2016, Murphy et al. 2016, Livingston et al. 2017). Für diese Degradierung interagiert HBx mit dem DNA-Schaden bindenden Protein 1 (engl. damage-specific DNA binding protein 1, (DDB1)) (Murphy et al. 2016). DDB1 wiederum bindet Cullin4 (Cul4), welches Teil eines E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexes darstellt (Murphy et al. 2016, Livingston et al. 2017). Der dadurch entstehende Cul4-DDB1-HBx-E3-Ligase-Komplex führt zur Ubiquitylierung und anschließenden Degradation von SMC5 und SMC6 im Proteasom (Murphy et al. 2016, Livingston et al. 2017). Der SMC5/6-Komplex kann damit seine Funktion als Restriktionsfaktor nicht mehr ausüben und die Transkription der viralen RNAs von der cccDNA wird ermöglicht (**Abb. 1.5**). Der genaue Ablauf des Interaktionsvorganges ist aktuell noch nicht geklärt. Es ist ebenfalls unklar, zu welchem Zeitpunkt HBx produziert wird. Möglicherweise wird HBx als frühes Gen transkribiert, um SMC5 und SMC6 zu degradieren bevor die Transkription der cccDNA behindert wird. Dies konnte jedoch noch nicht gezeigt werden.

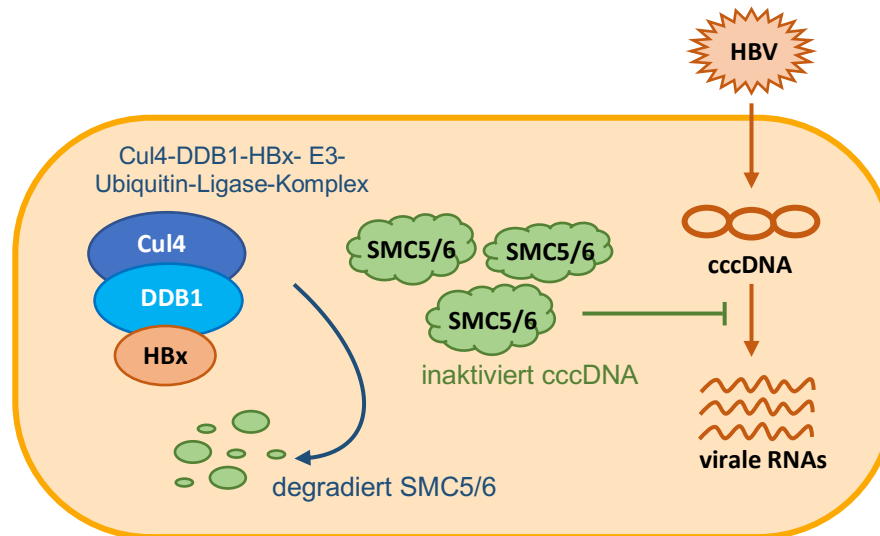


Abbildung 1.5: Interaktion von HBx mit dem SMC5/6-Komplex. Der SMC5/6-Komplex wirkt in der Zelle als viraler Restriktionsfaktor und supprimiert die virale Transkription von der cccDNA. HBx führt über Interaktion mit DDB1 zur Bildung des Cul4-DDB1-HBx-E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexes, welcher SMC5/6 ubiquitinyliert und degradiert. Damit wird die Hemmung der Genexpression von der cccDNA aufgehoben und virale RNAs können transkribiert werden. Quelle: Eigene Darstellung in Anlehnung an Livingston, C. M., et al. (2017) Identifying and Characterizing Interplay between Hepatitis B Virus X Protein and Smc5/6. *Viruses*, 9, S.3.

Bei der Transkription werden mithilfe der Wirtspolymerase II ausgehend von unterschiedlichen Startpositionen insgesamt fünf verschiedene mRNAs von den zuvor beschriebenen ORFs der viralen DNA gebildet, die alle den gleichen Terminus aufweisen (Liu et al. 2017, Wong und Locarnini 2018) (**Abb. 1.6**). Sie werden in genomische und subgenomische Transkripte unterteilt (Liu et al. 2017, Wong und Locarnini 2018). Alle Transkripte tragen einen Poly-A-Schwanz am 3'-Ende und eine Cap-Struktur (engl. = Kappe) am 5'-Ende (Liang 2009). Die subgenomischen Transkripte umfassen drei verschiedene mRNAs, zwei für die HBs-Antigene und eine mRNA für das HBx-Protein (Liu et al. 2017). Zu den genomischen RNAs gehören zwei mRNAs - die PräCore mRNA, die für das PräCore-Protein kodiert, welches nach proteolytischer Veränderung das HBeAg bildet und die prägenomische RNA (engl. pregenomic RNA, pgRNA) (Liang 2009, Lamontagne et al. 2016). Die prägenomische RNA hat zwei Funktionen. Einerseits ist sie Matrize für die Translation der viralen Polymerase und des HBcAg, andererseits dient sie als Vorlage für die reverse Transkription in die rcDNA (Liu et al. 2017). Für die Bildung der rcDNA bindet die virale Polymerase an die sogenannte Epsilon-Schleife, eine spezifische RNA Schleifen-Struktur am 5'-Ende der pgRNA. Anschließend rekrutiert die Polymerase die Core-Proteine, sodass sich das virale Nukleokapsid um den Komplex aus pgRNA und Polymerase bildet (Bartenschlager und Schaller 1992, Liu et al. 2017). Innerhalb des Kapsids wird die pgRNA von der viralen Transkriptase in den Minusstrang der rcDNA

umgeschrieben und gleichzeitig größtenteils durch die RNase H-Aktivität der Polymerase abgebaut (Loeb et al. 1991, Lamontagne et al. 2016). Die verbleibenden Basen der pgRNA dienen als Primer für den Plusstrang, der anschließend anhand des Minusstrangs inkomplett synthetisiert wird (Will et al. 1987, Loeb et al. 1991). Die fertigen rcDNA-enthaltenden Kapside werden im Folgenden als infektiöse Virionen aus der Wirtszelle freigesetzt (Datta et al. 2012). In Studien mit DHBV in Enten und WHV in Waldmurmeltieren konnte außerdem gezeigt werden, dass die rcDNA-enthaltenden Kapside zusätzlich zurück in den Zellkern transportiert werden, um dort das Reservoir an cccDNA aufrecht zu erhalten oder zu erweitern (Allweiss und Dandri 2017). Für das humane HBV scheint dieser intrazelluläre cccDNA-Amplifikationsprozess jedoch keine entscheidende Rolle zu spielen (Hantz et al. 2009).

Um freigesetzt zu werden, gelangen die Kapside zunächst in das endoplasmatische Retikulum um mit den dort translatierten Oberflächenproteinen umhüllt zu werden (Lamontagne et al. 2016, Wong und Locarnini 2018). Über späte Endosomen (engl. multivesicular bodies) werden die infektiösen Partikel schließlich aus der Zelle geschleust (Watanabe et al. 2007, Patient et al. 2009, Prange 2012). Die genomlosen subviralen Partikel hingegen entstehen über Selbstorganisation im ER und werden über den konstitutiven ER-Golgi sekretorischen Weg in den Extrazellulärraum sezerniert (Patient et al. 2009, Prange 2012).

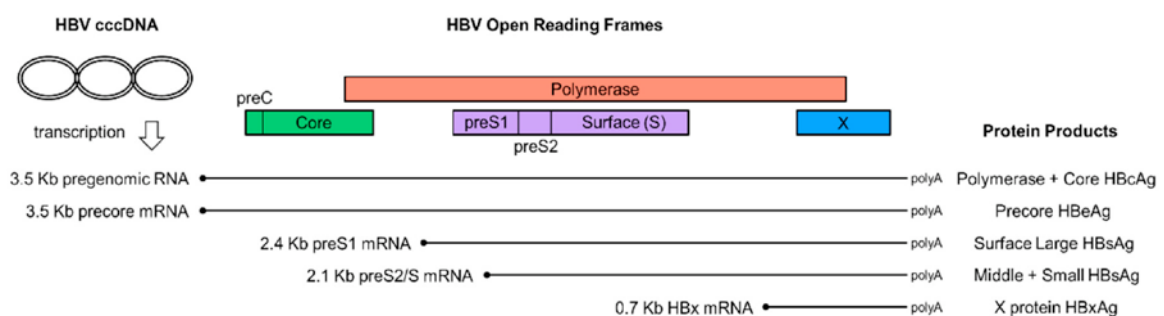


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung der viralen RNA-Transkripte und daraus gebildeter Proteine. Ausgehend von der cccDNA werden aus vier offenen Leserahmen (rot, grün, lila und blau) fünf mRNA-Transkripte abgelesen, die über alternative Nutzung von Startcodons sieben virale Proteinprodukte bilden. Entnommen aus Hadziyannis, E. & Laras, A. (2018) Viral Biomarkers in Chronic HBeAg Negative HBV Infection. *Genes*, 9, 469, S.2.

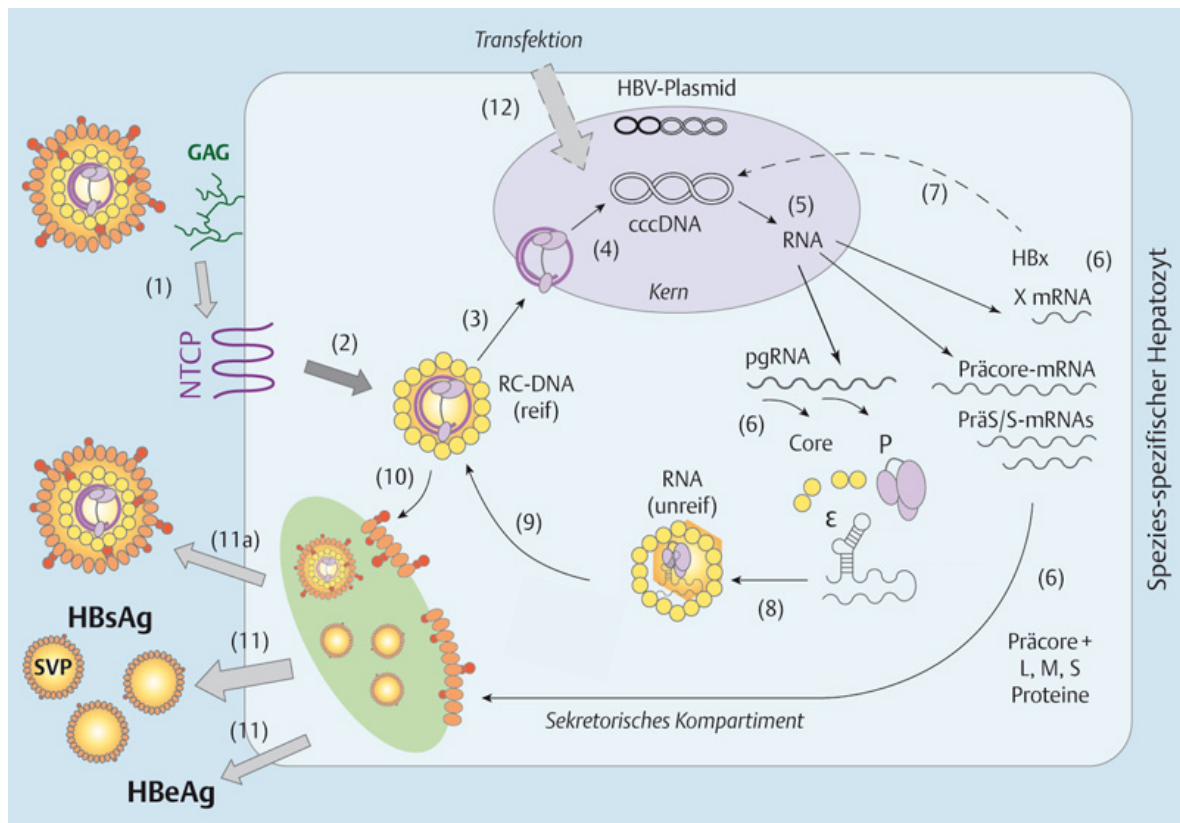


Abbildung 1.7: Replikationszyklus des Hepatitis-B-Virus. Nach der reversiblen Anheftung an zelluläre Heparansulfat-Proteoglykanen (GAG) folgt die irreversible Bindung an den spezifischen NTCP-Rezeptor und der anschließende Eintritt des Virus in die Zelle (1,2). Die viralen Nukleokapside mit der rcDNA (RC-DNA in der Abb.) werden zum Zellkern transportiert, wo die rcDNA zur stabilen cccDNA ergänzt wird (3,4). Durch Transkription von der cccDNA werden die viralen RNAs (X mRNA, Präcore-mRNA, PräS/S-mRNAs und pgRNA) erzeugt, aus denen die viralen Proteine gebildet werden (5,6). Weiterhin bilden sich neue virale Partikel durch Anlagerung der Polymerase an die Epsilon-Schleife (ϵ) der pgRNA und anschließenden Rekrutierung von Core-Antigenen. Die pgRNA innerhalb der Partikel wird über Reverse Transkription in rcDNA umgeschrieben, wodurch reife Partikel entstehen (8,9). Die reifen Partikel werden entweder zurück in den Zellkern transportiert, um weitere cccDNA-Moleküle zu bilden (DHBV und WHV), oder mit HBs-Antigen umhüllt und über späte Endosomen sezerniert (3,10,11a). Subvirale Partikel (SVP) und das HBeAg werden über das ER-Golgi-Kompartiment aus der Zelle geschleust (11). Das HBx-Protein wird nach Translation in den Zellkern transportiert, um dort die virale Transkription zu regulieren (7). Abbildung verändert nach Thimme, R., et al. (2014) Hepatitis B und C: von der molekularen Virologie zu neuen Perspektiven in der Therapie. *Dtsch med Wochenschr*, 139, S. 657.

1.1.5 Pathogenese und Therapeutische Ansätze

Eine Infektion mit dem HBV führt zu einer Hepatitis, die sowohl akut als auch chronisch verlaufen kann (Mohr et al. 2018). Der Verlauf und die Symptomatik der Erkrankung sind abhängig von der Immunantwort des Erkrankten und können sehr variabel sein (Robert-Koch-Institut 2016). Eine starke Immunantwort führt zu intensiveren Krankheitssymptomen und in den meisten Fällen zu einer Ausheilung der Erkrankung. Eine fehlende oder schwache Immunabwehr führt zu einer geringeren Symptomatik verbunden mit einer häufigen Chronifizierung der Erkrankung (Schaefer et al. 2010, Robert-Koch-Institut 2016).

Die intensivere Symptomatik bei stärkerer Immunabwehr begründet sich in der Tatsache, dass nicht das Virus selbst, sondern zytotoxische und inflammatorische Antworten des Immunsystems für die Ausbildung der Symptome verantwortlich sind (Robert-Koch-Institut 2016). Die häufigsten Symptome einer akuten Hepatitis sind Übelkeit, Erbrechen, Unwohlsein, Appetitlosigkeit und Schmerzen im rechten Oberbauch (Robert-Koch-Institut 2016, Mohr et al. 2018). Bei rund einem Drittel kommt es zusätzlich zur Ausbildung eines Ikterus (Mohr et al. 2018). Sehr selten kann es zu fulminanten Verläufen mit einem akuten Leberversagen und einer hepatischen Enzephalopathie kommen (Schaefer et al. 2010, Mohr et al. 2018). Ein weiteres Drittel der Infizierten zeigt keine Erkrankungszeichen und die Infektion ist nur über serologische virale Marker nachzuweisen (Robert-Koch-Institut 2016). Zu diesen Markern zählen die virale DNA, das HBeAg, sowie das HBsAg, welches die Aktivität der cccDNA widerspiegelt (Petersen 2018). Nach einer durchgemachten und ausgeheilten Infektion sind anstelle von viralen Antigenen Antikörper gegen das HBsAg und das HBcAg im Blut zu finden (Bogler et al. 2018, Petersen 2018). Bei über 95% der Erwachsenen heilt die akute Hepatitis vollständig aus und führt zu einer lebenslangen Immunität (Robert-Koch-Institut 2016, Mohr et al. 2018). Ein Teil der cccDNA kann jedoch unter Kontrolle des Immunsystems in der Leber persistieren und bei Immunsuppression zu einer Reaktivierung des Virus führen (Gerlich 2013, Di Bisceglie et al. 2015).

Infizierte, die das Virus nicht ausreichend eliminieren können, entwickeln eine chronische Hepatitis (Schaefer et al. 2010). Diese ist dadurch definiert, dass das HBsAg länger als sechs Monate im Serum eines Infizierten nachzuweisen ist (Schaefer et al. 2010, Gerlich 2013, Petersen 2018). Insbesondere Neugeborene, die sich perinatal infizieren, und Kleinkinder sind von einem chronischen Verlauf betroffen (Gerlich 2013, Bogler et al. 2018, Mohr et al. 2018). Bei Erwachsenen entwickelt sich bei weniger als 5 % eine chronische Erkrankung (Bogler et al. 2018, Mohr et al. 2018). In den meisten Fällen fehlt zu Beginn eine akute Phase und die chronische Infektion verläuft asymptomatisch (Schaefer et al. 2010, Mohr et al. 2018). Bei rund 40 % der chronisch erkrankten entwickelt sich jedoch bei fortschreitender Erkrankung eine Leberzirrhose, die Symptome verursachen kann (Lamontagne et al. 2016). Sobald die Leberzirrhose dekompensiert, liegt die Sterberate bei 70-85 % in fünf Jahren (Fattovich et al. 2008). Als weitere Langzeitfolge der chronischen Infektion ist die Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms (HCC) möglich, welches als eines der am häufigsten tödlich endenden Karzinome weltweit gilt (Lamontagne et al. 2016). Insgesamt ist die chronische Hepatitis Ursache für 45 % der weltweiten Fälle von HCCs und 30 % der Leberzirrhosen (Demma und Dusheiko 2015). Bei Infizierten mit einer Leberzirrhose liegt das 5-Jahres-Risiko für ein HCC bei 10-17% (Fattovich et al. 2008). Insgesamt hat eine chronische Hepatitis ein Lebenszeitrisko von rund 40-50% für Männer

und 15% für Frauen an einer Leber-assoziierten Komplikation der chronischen Infektion zu versterben (Mohr et al. 2018).

Die Übertragung des Virus erfolgt parenteral über den Austausch von Körperflüssigkeiten wie Blut, Wund- und Vaginalsekret, Sperma oder Muttermilch (Schaefer et al. 2010). Die Inkubationszeit einer akuten Infektion beträgt mehrere Wochen, in denen sich das Virus repliziert und vom Immunsystem noch nicht zurückgedrängt wird (Schaefer et al. 2010). In dieser Zeit ist der Infizierte stark infektiös ohne die Erkrankung zu bemerken, sodass eine erhöhte Gefahr der Übertragung besteht (Schaefer et al. 2010). Bedeutsam für die Neuinfektionen sind außerdem chronisch Infizierte, die dauerhafte Träger von Viruspartikeln darstellen (Schaefer et al. 2010).

Der hauptsächliche Übertragungsweg variiert nach geografischer Region (Bogler et al. 2018, Mohr et al. 2018). Während in hochendemischen Gebieten wie Afrika vor allem die perinatale Übertragung die bedeutendste Verbreitungsweise darstellt, spielt in niedrigendemischen Gebieten wie Westeuropa die Übertragung über ungeschützten Geschlechtsverkehr und intravenösen Drogenmissbrauch die wichtigste Rolle (Mohr et al. 2018). Bis zu 90 % der Neugeborenen, die sich unter der Geburt anstecken, entwickeln anschließend eine chronische Hepatitis, was vermutlich auf einer neonatalen Toleranzbildung beruht (Chisari und Ferrari 1995, Hyams 1995). In Gebieten mit einer mittleren Prävalenzrate gilt die horizontale Übertragung als wichtige Übertragungsquelle in der frühen Kindheit (Mohr et al. 2018). Innerhalb des Haushalts, der Familie oder von Kind zu Kind wird dabei das Virus über Haut- und Schleimhautverletzungen übertragen (Mohr et al. 2018). Auch Übertragungen über Bluttransfusionen oder nosokomiale Infektionen innerhalb medizinischer Einrichtungen sind möglich (Mohr et al. 2018).

Für die Behandlung der Hepatitis-B-Infektion stehen zurzeit zwei Therapieoptionen zur Verfügung (EASL 2017). Diese werden nur für die chronische Infektion eingesetzt, da die akute Hepatitis in der Regel unter symptomatischer Behandlung spontan ausheilt (Waller und Sampson 2018). Bei der chronischen Infektion wird eine Therapie begonnen, wenn Zeichen einer Leberschädigung wie hohe Serumwerte der Alanin-Transferase oder eine Leberfibrose vorliegen (EASL 2017, Waller und Sampson 2018). Auch eine hohe Menge an HBV-DNA im Serum kann Therapieindikation sein (EASL 2017). Das Hauptziel der Therapie ist das Überleben und die Lebensqualität zu verbessern, indem ein Fortschreiten der Erkrankung mit Leberzirrhose und die Entwicklung eines HCC verhindert wird (EASL 2017). Eine komplette Eliminierung des Virus ist durch die therapeutischen Maßnahmen nicht möglich (Koumbi 2015). Zur Verfügung stehen einerseits Nukleosid- beziehungsweise Nukleotidanaloga (NUCs) wie Lamivudin, Entecavir oder Tenofovir, die ausschließlich die

virale reverse Transkriptase hemmen und so zu einer Suppression der HBV-DNA bzw. des Virustiters führen (EASL 2017, van Bömmel et al. 2018). Die Menge viraler Proteine wie HBsAg oder HBeAg wird in der Regel jedoch nicht oder nur sehr schwach verringert, da NUCs keinen direkten Effekt auf die cccDNA ausüben (EASL 2017, Chen et al. 2020). Um eine effektive Langzeitkontrolle der HBV-Replikation zu erreichen, müssen NUCs langfristig eingenommen werden (EASL 2017). Zudem besteht bei einigen älteren NUCs wie beispielsweise Lamivudin das Risiko einer viralen Resistenzentwicklung (Koumbi 2015, Durantel und Zoulim 2016, EASL 2017, van Bömmel et al. 2018).

Eine zweite Therapieoption ist Interferon alpha (IFN- α), welches subkutan appliziert wird (Durantel und Zoulim 2016, EASL 2017, van Bömmel et al. 2018). Seit 2005 wird es meist in pegylierter Form angewendet, sodass es nur einmal wöchentlich injiziert werden muss (Woo et al. 2017). Bei der Pegylierung werden Ketten des Polyethylenglycols an das Interferon gekoppelt, was zu einem verzögerten Abbau im Körper führt, sodass der Wirkstoffspiegel länger anhält (Kassenärztliche Bundesvereinigung 2011). Im Gegensatz zu den NUCs ist die Behandlung mit IFN- α auf einen definierten Zeitraum von 48 Wochen beschränkt (EASL 2017, Lee und Banini 2019). Nach diesem Zeitraum ist eine Langzeitkontrolle des Virus über Jahre möglich (EASL 2017, van Bömmel et al. 2018). Zusätzlich wird eine Erniedrigung des HBsAgs und das HBeAgs häufiger erzielt als bei NUCs, da IFN- α antiviral und immunmodulatorisch wirkt (Konerman und Lok 2016, Chen et al. 2020). Sechs Monate nach Beendigung der Therapie mit IFN- α sprechen jedoch je nach Genotyp und HBeAg-Status nur rund 20 bis maximal 60 % der Patienten auf die Therapie an. Nur 23 % der chronisch Infizierten erreichen einen Verlust von HBeAg und einen HBV-DNA-Titer von <2000 IU/ml (Grenzwert für eine Therapieindikation) (EASL 2017). Außerdem führt eine Behandlung mit IFN- α oftmals zu beträchtlichen Nebenwirkungen wie grippeähnlichen Symptomen, Kopfschmerzen, Müdigkeit oder Depressionen (EASL 2017).

Ein hohes Maß an immunologischer Viruskontrolle und damit eines der höchsten Ziele der antiviralen HBV-Therapie stellt zurzeit der Verlust des HBsAgs dar (EASL 2017). Sechs bis 12 Monate nach Ende der IFN- α -Therapie ist dies nur bei unter 10 % der Fälle zu beobachten (EASL 2017). Von den Patienten, die langanhaltend auf IFN- α ansprechen, kommt es jedoch bei bis zu 30 % im Langzeitverlauf zu einem Verlust des HBsAgs (EASL 2017, Vigano et al. 2018). Insgesamt stellt IFN- α aufgrund des Nebenwirkungsprofils und Kontraindikationen wie der dekompensierten Leberzirrhose oder anderen Komorbiditäten vor allem für junge Patienten mit einer milden bis moderaten Lebererkrankung eine mögliche Behandlungsoption dar (EASL 2017, Vigano et al. 2018).

1.2 *In-vivo*-Modellsysteme zur Untersuchung der HBV-Infektion

Um die derzeitigen therapeutischen Strategien zu verbessern, ist es von großer Bedeutung die Pathogenese und komplexe Biologie des Virus besser zu verstehen (Dandri und Petersen 2017). Geeignete Modellsysteme sind daher notwendig, um den viralen Replikationszyklus, Interaktionen des Virus mit seinem Wirt oder neue antivirale Behandlungen zu untersuchen. Da sich Zellkultursysteme gegenüber Infektionen und anderen Stimuli anders verhalten können als Zellen innerhalb eines lebenden Organs, spielen Untersuchungen in *In-vivo*-Systemen eine wichtige Rolle (Dandri und Petersen 2017).

Die ausgeprägte Speziespezifität von HBV macht es schwierig, geeignete Tiermodelle für diese Untersuchungen zu finden (Lamontagne et al. 2016). Neben dem Menschen können nur Schimpansen direkt und vollständig mit dem humanen HBV infiziert werden (Dandri und Petersen 2017, Guo et al. 2018). Schimpansen entwickeln sowohl eine akute als auch eine chronische Hepatitis sowie eine Immunantwort, die vergleichbar mit der des Menschen ist (Wieland 2015). Aufgrund ethischer Bedenken, der Größe und der hohen Kosten stellen Schimpansen trotz der engen Nachahmung einer natürlichen menschlichen HBV-Infektion kein geeignetes Tiermodell dar (Dandri und Petersen 2017, Hwang und Park 2018). Tupaia, die phylogenetisch eng mit Primaten verwandt sind, können als einzige Nicht-Primaten experimentell mit dem humanen HBV infiziert werden (Kock et al. 2001, Guo et al. 2018). Eine chronische Infektion mit pathologischen Veränderungen wie Fibrose oder einem HCC kann jedoch nur bei neonataler Infektion ausgelöst werden. Erwachsene Tiere zeigen nur eine milde transiente Infektion mit einer geringen viralen Replikation (Walter et al. 1996, Wang et al. 2012, Yang et al. 2015, Allweiss und Dandri 2016). Insgesamt ist die Effektivität der Infektion *in vivo* relativ schwach. Zudem sind die Tiere groß und schwierig in der Handhabung, was ihre Nutzung limitiert (Lamontagne et al. 2016, Dandri und Petersen 2017, Guo et al. 2018, Hwang und Park 2018). Isolierte primäre Tupaia Hepatozyten stellen jedoch eine gute Alternative zu humanen primären Hepatozyten für *In-vitro*-Untersuchungen dar (Dandri und Petersen 2017).

Neben Tiermodellen, die durch das humane HBV infiziert werden können, werden Modelle genutzt, die auf der Infektion von natürlichen oder verwandten Wirten mit HBV-verwandten *Hepadnaviren* basieren. Zu diesen zählen das Enten- und Waldmurmeltiermodell (Guo et al. 2018). Küken können über das Enten Hepatitis-B-Virus infiziert werden und entwickeln eine persistierende Infektion (Guo et al. 2018). Aufgrund von Wirts- und Virusunterschieden zur humanen HBV-Infektion können Ergebnisse im Entenmodell jedoch nur eine limitierte Aussagekraft haben (Dandri und Petersen 2017). Das Waldmurmeltier-Hepatitis-Virus ist

näher mit dem humanen HBV verwandt als das Enten-Hepatitis-B-Virus und eine Infektion von neugeborenen Waldmurmeltieren führt zu einer chronischen Infektion (Dandri und Petersen 2017). Das Waldmurmeltiermodell wird unter anderem für Untersuchungen antiviraler Präparate und der Pathogenese vom HBV verwendet und spielt eine große Rolle in der Testung immuntherapeutischer Strategien (Dandri und Petersen 2017, Guo et al. 2018). Auch bei diesem Modell sind Limitationen und Unterschiede zur humanen HBV-Infektion zu bedenken (Dandri und Petersen 2017). Zusätzlich sind Waldmurmeltiere im Gegensatz zu Enten in Gefangenschaft schwierig zu züchten und nicht unproblematisch in der experimentellen Handhabung (Dandri und Petersen 2017). So halten Waldmurmeltiere natürlicherweise Winterschlaf, der mit starken Änderungen der Nahrungsaufnahme, des Körpergewichts und des Stoffwechsels einhergeht (Bellezza et al. 2015). Diese Änderungen vollziehen sich auch in experimenteller Tierhaltung trotz Verhinderung eines tiefen Winterschlafs (Bellezza et al. 2015). Weiterhin existieren nur wenige Reagenzien wie beispielsweise Antikörper, um die Immunantwort auf die HBV-Infektion zu untersuchen (Winer et al. 2016).

Das handlichste und am besten charakterisierte Tiermodell in der Laborforschung stellt die Maus dar (Dandri und Petersen 2017). Mäuse können jedoch nicht mit dem HBV infiziert werden (Allweiss und Dandri 2016). Aus diesem Grunde wurden einige spezifische Mausmodelle entwickelt, die Untersuchungen zum HBV zulassen (**Abb. 1.8**). Das erste Mausmodell, welches bereits in den 1980er Jahren entwickelt wurde, ist das HBV-transgene Mausmodell, bei dem virale DNA in das Genom embryonaler Stammzellen integriert wird (Guo et al. 2018). Dafür wurden zunächst Mäuse generiert, die einzelne virale Proteine exprimierten, um das onkogene Potential und die virologische Funktion der jeweiligen Proteine zu untersuchen (Chisari et al. 1985, Milich et al. 1990, Kim et al. 1991, Hwang und Park 2018). Später wurden transgene Mäuse entwickelt, die das gesamte virale Genom exprimieren und infektiöse Virionen produzieren, sodass auch Untersuchungen zur viralen Replikation, Pathogenese des Virus und die Testungen antiviraler Substanzen möglich wurden (Guidotti et al. 1995, Dandri und Petersen 2017). Mithilfe transgener Mäuse konnte außerdem gezeigt werden, dass das HBV selbst nicht zellschädigend wirkt, was sich in der Beobachtung begründet, dass transgene Mäuse immunologisch tolerant gegenüber viralen Proteinen sind und in der Folge keine Leberschädigung entwickeln (Hwang und Park 2018). Da Maushepatozyten jedoch keinen NTCP-Rezeptor für das HBV besitzen, ist es in diesem Modell nicht möglich, Mechanismen der Infektion oder der Ausbreitung des Virus innerhalb der Leber zu untersuchen (Hwang und Park 2018). Des Weiteren können keine Studien zur cccDNA durchgeführt werden, da sich diese in murinen Hepatozyten nicht bildet (Hwang und Park 2018).

Ein weiteres Mausmodell basiert auf der hydrodynamischen Injektion von HBV-Genomen (Hwang und Park 2018). Dabei wird den Mäusen über die Schwanzvene ein großes Volumen einer Lösung mit nackter viraler DNA injiziert. Die DNA wird anschließend von den murinen Hepatozyten aufgenommen und die viralen Gene für einen gewissen Zeitraum exprimiert (Dandri und Petersen 2017). Diese Prozedur führt allerdings zu Beginn zu einem signifikanten Leberschaden (Dandri und Petersen 2017). Für ungefähr sieben Tage bleibt die virale Replikation auf einem hohen Niveau, anschließend wird die Infektion mithilfe des adaptiven Immunsystems beseitigt (Hwang und Park 2018). Vorteil dieses immunkompetenten Modells ist, dass Pathogenese sowie die Immunantwort des Wirts gegenüber HBV untersucht werden kann (Yang et al. 2002). Durch die relativ schnelle Beseitigung des Virus ist dieses Modell für die Untersuchung der akuten, nicht jedoch der chronischen Infektion geeignet (Dandri und Petersen 2017).

Die Nutzung viraler Vektoren ist eine weitere Methode das virale Genom in immunkompetente Mäuse einzubringen und Mechanismen der immunologischen Beseitigung des Virus zu untersuchen (Dandri und Petersen 2017). Über die intravenöse Injektion von adenovirusbasierten Vektoren mit dem HBV-Genom wird die Infektion ausgelöst (Sprinzl et al. 2001). Im Gegensatz zur hydrodynamischen Injektion kann über eine Dosisanpassung neben der akuten, selbstlimitierenden Infektion auch eine chronische Infektion nachgeahmt werden (Huang et al. 2012). Durch Nutzung Adeno-assoziiierter Viren anstelle von Adenoviren als Vektoren wird deutlich schwächere Immunantwort in den Mäusen ausgelöst und erlaubt dadurch bei Infektion neonataler Tiere ebenfalls eine persistierende Infektion und die Untersuchung von Mechanismen der Immuntoleranz gegen das HBV (Yang et al. 2014, Dandri und Petersen 2017). Es ist jedoch auch mit diesen Mausmodellen nicht möglich, die cccDNA oder Infektionsmechanismen von HBV zu untersuchen (Hwang und Park 2018).

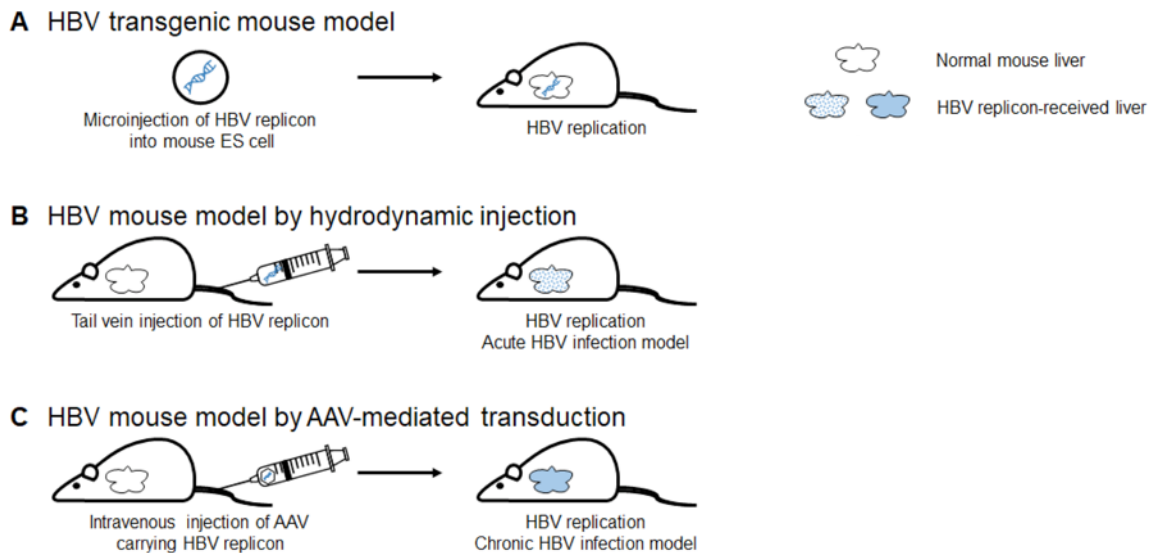


Abbildung 1.8: Schematische Darstellung von HBV-Mausmodellen. (A) Das HBV-transgene Mausmodell, bei dem das virale Genom in das Mausgenom embryonaler Stammzellen (ES) integriert wird und darüber zur Bildung viraler Bestandteile in Maushepatozyten führt. (B) Das hydrodynamische Mausmodell zur Untersuchung der akuten HBV-Infektion, bei dem das HBV-Genom über hydrodynamische Injektion in die Schwanzvene der Maus eingebracht und anschließend für einen gewissen Zeitraum von murinen Hepatozyten exprimiert wird. (C) Über die intravenöse Injektion von Adeno-assoziierten viralen Vektoren (AAV) mit dem HBV-Genom wird eine HBV-Infektion in dem Mausmodell mit AAV-vermittelter Transduktion ausgelöst. Abbildung entnommen und angepasst aus Hwang, J.-R. & Park, S.-G. (2018) Mouse models for hepatitis B virus research. *Laboratory animal research*, 34, S.89.

1.2.1 Das humanisierte Mausmodell

Allen zuvor beschriebenen Mausmodellen ist gemein, dass speziesspezifische Unterschiede nicht ausgeschlossen werden können und keine Analysen zum Viruseintritt, der Bildung von cccDNA oder der intrahepatischen Ausbreitung des Virus möglich sind, da murine Hepatozyten nicht mit dem HBV infiziert werden können. Auch bei transgenen oder genmanipulierten Mäusen, welche den humanen NTCP-Rezeptor besitzen, ist eine Infektion mit dem HBV *in vivo* nicht möglich. Zwischen murinen und humanen Hepatozyten scheinen daher möglicherweise Unterschiede in Form von bisher unbekanntem blockierenden oder fehlenden Faktoren vorzuliegen, die murine Hepatozyten resistent gegenüber dem HBV werden lassen (Dandri und Petersen 2017).

Um diese Einschränkungen zu überwinden, wurden in den letzten 15 Jahren Mausmodelle entwickelt, die darauf basieren, dass humane Hepatozyten in Mäuse transplantiert werden (Dandri und Petersen 2017). Um dies zu ermöglichen, müssen die körpereigenen Hepatozyten der Maus geschädigt werden, damit in der Mausleber Platz für exogene Hepatozyten entsteht und ein Stimulus zur Regeneration ausgelöst wird (Rhim et al. 1995, Petersen et al. 1998, Allweiss und Dandri 2016). Zum anderen muss die adaptive Immunantwort der Maus ausgeschaltet werden, damit ein Langzeitüberleben der

transplantierten Hepatozyten gewährleistet werden kann (Allweiss und Dandri 2016). Basierend auf diesen Prinzipien existieren heutzutage verschiedene sogenannte chimäre Mausmodelle (Dandri und Petersen 2017).

Eines dieser Modelle ist das homozygote uPA/SCID-Mausmodell, welches weithin als derzeitiger Goldstandard von Nagetiermodellen für die HBV-Infektion angesehen wird (Klumpp et al. 2018) (**Abb. 1.9**). Auch für die Untersuchungen dieser Arbeit wurde es in Form des USG (uPA/SCID/beige/IL-2RG^{-/-})-Mausmodells verwendet und wird im Folgenden näher ausgeführt. Das Modell beruht darauf, dass uPA-Mäuse ein Transgen für den Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator (uPA) enthalten, das durch den Albumin-Promoter kontrolliert wird. Die Überexpression von uPA ist lebertoxisch und führt in neugeborenen Tieren zu einem subakuten Leberversagen (Dandri und Petersen 2012). Die uPA-Mäuse werden mit SCID-Mäusen gekreuzt, welche aufgrund eines schweren kombinierten Immundefektes (engl. severe combined immunodeficiency, SCID) keine funktionellen B- und T-Zellen besitzen und damit keine adaptive Immunantwort ausüben können (Tateno et al. 2004, Allweiss und Dandri 2016). Eine Mutation im beige-Gen oder in der Interleukin-2-Rezeptoruntereinheit Gamma (IL-2RG) führt zu weiterer Dysfunktion von Immunzellen und bewirkt eine Hemmung der Aktivität von natürlichen Killerzellen (Perou et al. 1996, Zhao et al. 2019). Der durch uPA entstehende Leberschaden sowie der daraus resultierende starke Stimulus zur Leberregeneration wird genutzt, um lebende gesunde menschliche Hepatozyten in die Leber der immundefizienten Mäuse einzubringen (Dandri et al. 2001, Mercer et al. 2001). Dafür werden eine Million kryokonservierte und aufgetaute humane Hepatozyten in die Milz der Maus injiziert, die anschließend in die Leber migrieren, wo sie sich in das Leberparenchym der Mäuse integrieren, proliferieren und die geschädigten Maushepatozyten teilweise ersetzen (Dandri und Petersen 2012, Allweiss und Dandri 2016). Die Rekonstitution der Mausleber mit humanen Hepatozyten dauert ungefähr zwei Monate und kann über die Messung von humanem Albumin im Serum der Mäuse eingeschätzt werden (Meuleman et al. 2005, Dandri und Petersen 2012). Mäuse mit ausreichend hohen Albuminspiegeln werden anschließend mithilfe von HB-Viren aus menschlichem Serum oder Zellkultur infiziert und etablieren nach ungefähr 12 Wochen eine stabile Infektion (Dandri und Petersen 2012).

Ein weiteres häufig genutztes humanisiertes Mausmodell ist das FRG-Modell (Fah^{-/-}/Rag2^{-/-}/Il2rg^{-/-}). Hierbei werden die murinen Hepatozyten über eine Mutation im Fumarylacetoacetase-Enzym (FAH) geschädigt. Aufgrund des Ausfalls des Enzyms sammeln sich toxische Abbauprodukte von Tyrosin in der Zelle an (Allweiss und Dandri 2016). Über Mutationen des rekombinationsaktivierenden Gens 2 (Rag2) und des IL-2RG

wird die benötigte Immundefizienz der Mäuse herbeigeführt (Allweiss und Dandri 2016). Anders als bei uPA-Mäusen kann die Bildung der toxischen Abbauprodukte und damit der murine Leberschaden durch Gabe von 2-(2-Nitro-4-trifluormethyl-benzoyl)-1,3-cyclohexandion (NTBC) verhindert werden (Allweiss und Dandri 2016). Durch Beendigung der Gabe kann durch Akkumulation der toxischen Metabolite selektiv ein rascher Zelltod der murinen Hepatozyten sowie ein Regenerationsstimulus herbeigeführt und die murinen Lebern mit menschlichen Hepatozyten repopuliert werden (Strom et al. 2010).

Da das HBV in diesen Modellen die humanen Hepatozyten in der Mausleber selbstständig infiziert und im Zuge dessen cccDNA-Moleküle gebildet werden, stellt das humanisierte Mausmodell ein geeignetes Modell für die Untersuchung der viralen Infektion, der Ausbreitung des Virus und Eigenschaften der viralen cccDNA dar (Hwang und Park 2018). Des Weiteren bleiben die metabolischen Funktionen und pharmakologischen Antworten der humanen Hepatozyten auch innerhalb der Mausleber erhalten (Tateno et al. 2004). Dies ermöglicht, Auswirkungen vom HBV auf den Metabolismus von Hepatozyten zu untersuchen sowie antivirale Substanzen zu testen (Allweiss und Dandri 2016). Die humanen Hepatozyten können außerdem auf externe Stimuli wie Interferone reagieren und Signalwege der angeborenen Immunantwort induzieren, was es möglich macht, Interaktionen vom HBV mit angeborenen Signalwegen zu untersuchen (Dandri und Petersen 2012). Das Fehlen adaptiver Immunzellen macht dieses Mausmodell jedoch ungeeignet für Studien zur Untersuchung von adaptiven Immunantworten auf das HBV (Hwang und Park 2018).

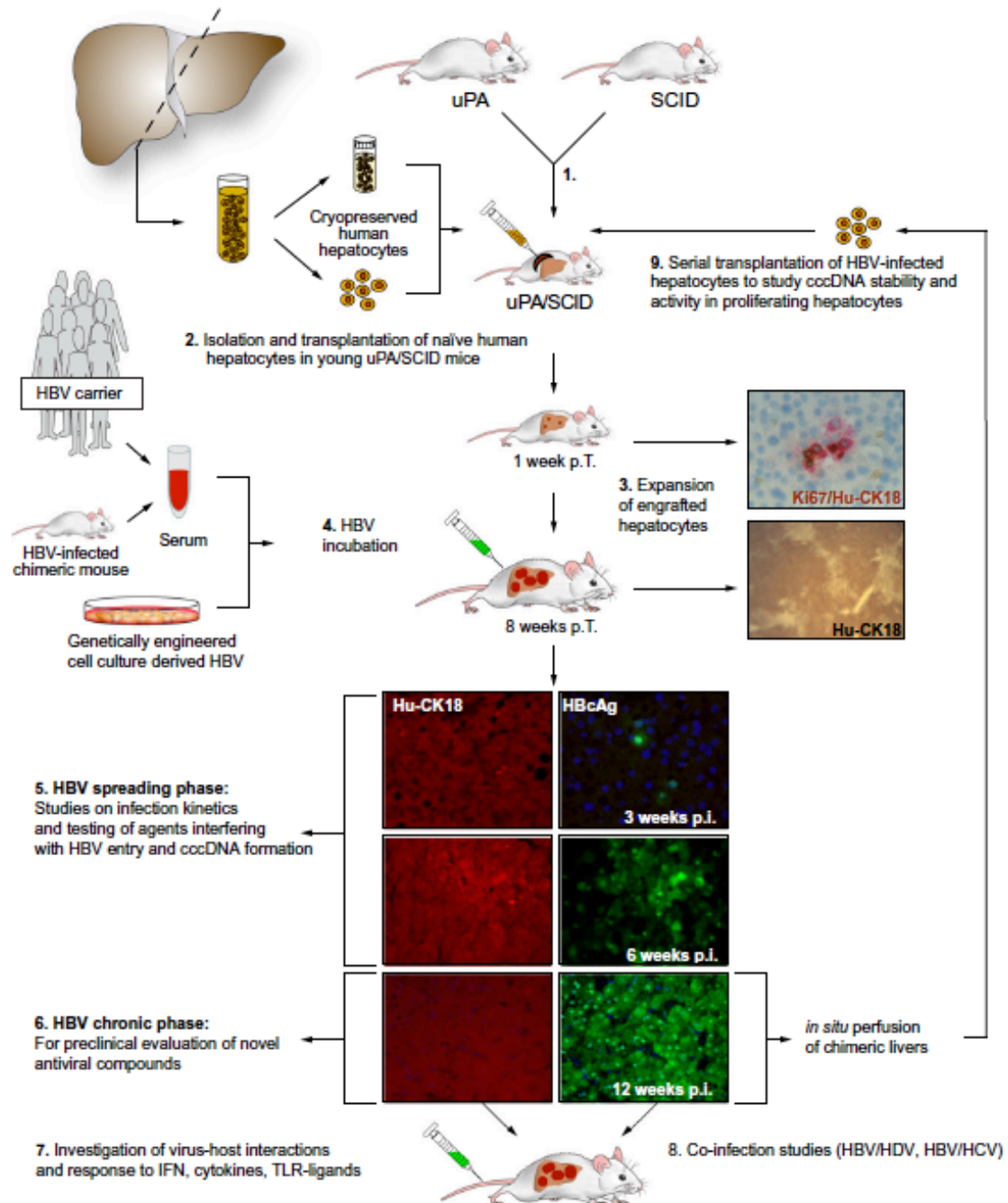


Abbildung 1.9: Generierung des HBV-infizierten humanisierten uPA/SCID-Mausmodells und Anwendungsmöglichkeiten. Zur Generierung des Mausmodells werden kryokonservierte humane Hepatozyten durch Injektion in die Milz in junge uPA/SCID-Mäusen transplantiert (1.-2.). Die eingesetzten Hepatozyten migrieren in die Mauslebern und proliferieren (3.). Die histologischen Bilder eine Woche nach Transplantation und acht Wochen nach Transplantation zeigen einen Leberschnitt mit dem human-spezifischen Zellmarker Cytokeratin-18 (CK-18) und dem Proliferationsmarker Ki67. Nach circa acht Wochen sind die Mauslebern stabil mit humanen Hepatozyten repopuliert und können mit HB-Viren aus Patientenserum, passagiertem Mausserum oder Zellkulturüberstand infiziert werden (4.). Die sechs Immunfluoreszenzfärbungen zeigen die Leberausschnitte drei, sechs und zwölf Wochen nach Infektion mit dem HBV. Der human-spezifischen Zellmarker CK18 ist in rot dargestellt, HBcAg als viraler Marker ist grün gefärbt. In dieser Zeit sind Untersuchungen zur Virusausbreitung möglich (5.) Nach ca. zwölf Wochen ist eine stabile Infektion erreicht (6.) und Untersuchungen zur Virus-Wirt-Interaktion oder zu Zytokin-Antworten (7.) sowie Co-Infektionsstudien mit anderen Hepatitis-Viren können durchgeführt werden (8.). Auch die Nutzung von transplantierten HBV-infizierten Hepatozyten für eine erneute Transplantation ist möglich (9.). Entnommen aus Dandri, M. & Petersen, J. (2012) Chimeric mouse model of hepatitis B virus infection. *J Hepatol*, 56, S. 494.

1.3 Die humane Immunantwort auf virale Infektionen

Um Virusinfektionen innerhalb eines Organismus abzuwenden, ist ein Netzwerk an Abwehrmechanismen notwendig. Diese Mechanismen werden bei Säugetieren klassischerweise in eine angeborene und eine adaptive Immunantwort unterteilt (Akira et al. 2006, Chaplin 2010). Die initiale Abwehr wird durch die angeborene Immunantwort ausgeübt, die unspezifischer ist und der schnellen Eliminierung eingedrungener Pathogene dient (Chaplin 2010). Zu einem späteren Zeitpunkt setzt die adaptive Immunabwehr ein, die jedoch spezifisch auf das individuelle Pathogen ausgerichtet ist (Chaplin 2010).

Nachdem ein Virus in den Organismus eingedrungen ist, besteht der erste Abwehrmechanismus der angeborenen Immunantwort in der Erkennung des Virus und der nachfolgenden Produktion antiviraler und proinflammatorischer Zytokine (Akira et al. 2006, Crowe 2017). Als Sensoren für die Erkennung des Virus dienen Mustererkennungsrezeptoren (engl. Pattern Recognition Receptors PRRs), die auf spezifische virale Komponenten wie einzel- oder doppelsträngige RNA, DNA oder virale Proteine reagieren und sowohl von Immunzellen als auch Nicht-Immunzellen exprimiert werden (Akira et al. 2006). Die Rezeptoren befinden entweder membrangebunden auf Endosomen und der Zelloberfläche (Toll-like Rezeptoren) oder liegen gelöst im Zytoplasma vor (Akira et al. 2006, Koyama et al. 2008). Freie Rezeptoren im Cytoplasma sind in fast allen Zelltypen zu finden (Koyama et al. 2008). Werden virale Bestandteile von den Rezeptoren gebunden, wird eine intrazelluläre Signalkaskade aktiviert, die schließlich zur Expression von Zytokinen mit inflammatorischen, antiviralen und immunmodulatorischen Wirkungen führt (Akira et al. 2006, Crowe 2017). Diese Zytokine führen unter anderem zur Rekrutierung von Immunzellen der angeborenen Immunantwort wie Makrophagen, natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) oder dendritischen Zellen (DCs). NK-Zellen erkennen infizierte Zellen und können eine Apoptose dieser Zellen einleiten sowie weitere Zytokine produzieren, die antivirale Aktivitäten in der infizierten Zelle induzieren (Guidotti und Chisari 2001). Dendritische Zellen spielen eine wichtige Rolle in der Initiierung der adaptiven Immunantwort, indem sie virales Material aufnehmen und anschließend über spezifische Rezeptoren der Zelloberfläche (Haupthistokompatibilitätskomplexe (engl. major histocompatibility complexes), MHC-Komplexe, im Menschen: humane Leukozytenantigene (HLA)) den Zellen der adaptiven Immunantwort präsentieren (Crowe 2017). Zu den Zellen der adaptiven Immunantwort gehören T- und B- Zellen, die nach der Präsentation proliferieren und anschließend spezifisch über direkte Zytotoxizität oder Antikörper gegen das Virus vorgehen (Crowe 2017).

1.3.1 Das Interferon-System

Wie im vorherigen Kapitel deutlich wird, spielen Zytokine in der Etablierung und Regulation einer Immunantwort eine essentielle Rolle (O'Shea et al. 2019). Eine wichtige Familie dieser Zytokine sind Interferone (Donnelly und Kotenko 2010, O'Shea et al. 2019). Interferone werden basierend auf strukturellen und biologischen Eigenschaften in drei verschiedene Typen (Typ I, II und III) unterteilt, die an unterschiedliche Rezeptoren binden, jedoch intrazellulär ähnliche Signalmoleküle aktivieren und eine Vielzahl gleicher Gene regulieren (Koyama et al. 2008, Donnelly und Kotenko 2010). Sie üben sowohl antivirale als auch immunmodulatorische Effekte aus (Bonjardim et al. 2009, Donnelly und Kotenko 2010). Immunmodulatorisch verstärken Interferone unter anderem die Immunantwort zytotoxischer T- Zellen, indem sie die Expression von MHC-I-Komplexen (im Menschen: HLA-A, -B, -C, -E, -F, -G) erhöhen (Goodbourn et al. 2000). Auch Proteine für den Prozess der Antigen-Präsentation werden verstärkt exprimiert, sodass das Repertoire und die Menge an präsentierten Peptiden gesteigert wird (Goodbourn et al. 2000). Typ-II-Interferone induzieren zusätzlich MHC-II-Komplexe (im Menschen: HLA-DM, -DO, -DP, -DQ, -DR), wodurch die Wirkung von T- Helferzellen verstärkt wird (Goodbourn et al. 2000). Weiterhin üben Interferone Effekte auf die Proliferation und die Antikörperproduktion von B- Zellen aus und verstärken die Zytotoxizität von NK- Zellen (Goodbourn et al. 2000). Neben antiviralen und immunmodulatorischen Effekten sind Interferone in die Kontrolle von Zellwachstum und Tumorbildung involviert (Goodbourn et al. 2000, Bonjardim et al. 2009).

Ein wichtiger Mechanismus, durch den die Wirkungen der Interferone hervorgerufen werden, ist die transkriptionelle Regulation von sogenannten Interferon-stimulierten Genen (ISGs) über den JAK/STAT-Signalweg (JAK = Januskinase, STAT = Signal Transducers and Activators of Transcription) (Song et al. 2017) (**Abb. 1.10**). Dafür binden die Interferone zunächst an ihre jeweiligen Rezeptoren auf der Zelloberfläche (Lin und Young 2014). Die Untereinheiten der Rezeptoren sind mit Januskinasen (JAK1, JAK2, TYK2 = Tyrosinkinase 2) assoziiert, die nach Bindung der Interferone aktiviert werden und Tyrosin-Reste an den Rezeptoren phosphorylieren (Lin und Young 2014). An die phosphorylierten Tyrosin-Reste binden STAT-Proteine, die anschließend ebenfalls durch die Januskinasen phosphoryliert werden (Lin und Young 2014). Die phosphorylierten STAT-Proteine bilden Homo- oder Heterodimere und translozieren in den Zellkern. Das Homodimer aus STAT1 wird als Interferon-gamma-Aktivierungsfaktor (engl. gamma-interferon activation factor, GAF) bezeichnet und bindet im Zellkern an die Gamma-aktivierte Sequenz (engl. gamma-activated sequence, GAS), wodurch die Transkription von ISGs initiiert wird (Donnelly und Kotenko 2010, Lin und Young 2014, Stanifer et al. 2019). Bei Typ I- und Typ III-Interferonen bildet sich außerdem ein Heterodimer aus STAT1 und STAT2, das den Interferon-

regulatorischen Faktor 9 (engl. Interferon regulatory factor 9, IRF9) rekrutiert und so den IFN-stimulierten Genfaktor 3 (engl. Interferon-stimulated gene factor 3, ISGF3) bildet (Lin und Young 2014, Stanifer et al. 2019). Dieser Komplex bindet im Zellkern an das Interferon-stimulierte Response Element (engl. IFN-stimulated response elements, ISRE) was ebenfalls zur Transkription von ISGs führt (Lin und Young 2014).

Die entstehenden Genprodukte der ISGs übernehmen diverse Funktionen und können innerhalb der Zelle beispielsweise als weitere Transkriptionsfaktoren, als PRRs, als Proteine der Antigenpräsentation oder auch als antivirale Proteine wirken (Sadler und Williams 2008). Insgesamt kommt es nach Interferonstimulation zur Expression mehrerer Hundert ISGs (Perng und Lenschow 2018). Einige der ISGs wurden auch in dieser Arbeit analysiert. Zu diesen zählt die MX Dynamamin-ähnliche GTPase 1 (MX1). MX-Proteine können Komplexe mit sich selbst oder viralen Proteinen bilden und die virale RNA-Synthese sowie den Transport von viralen Nukleokapsiden hemmen (Samuel 2001, Schoggins und Rice 2011). Essentiell für die antivirale Wirkung ist dabei die intrinsische GTPase-Aktivität (Samuel 2001). Das menschliche MX1, auch als MXA bezeichnet, zeigt starke antivirale Aktivität gegenüber einer großen Anzahl an verschiedenen Viren und akkumuliert normalerweise nach Interferon-Stimulation im Zytoplasma (Samuel 2001).

Ein weiteres antivirales Produkt von ISGs ist die 2'-5'-Oligoadenylatsynthetase 1 (OAS1) (Schoggins und Rice 2011). Aktiviert durch doppelsträngige RNA synthetisiert sie aus Adenosintriphosphat (ATP) ein Oligoadenylat aus drei bis fünf Adenylaten, die anstelle der normalen 3'-5'-Bindung eine 2'-5'-Bindung aufweisen (Goodbourn et al. 2000, Samuel 2001). Dieses Oligoadenylat aktiviert die Ribonuklease L, die anschließend einzelsträngige RNA innerhalb der Zelle abbaut (Goodbourn et al. 2000). Indem virale genomische RNA zerstört wird und keine virale Proteinsynthese aus mRNA mehr möglich ist, kann die Virusvermehrung in der Zelle gehemmt werden (Goodbourn et al. 2000). Insgesamt existieren drei Formen von humanem OAS (OAS 1-3), die sich in ihrer Größe unterscheiden und vermutlich durch Genduplikationen entstanden sind (Samuel 2001).

Eines der am schnellsten und am stärksten induzierten antiviralen ISGs ist das Interferon-stimulierte Gen 15 (ISG15) (Perng und Lenschow 2018). ISG15 gehört als Ubiquitin-ähnliches Protein zur Familie der Ubiquitine, die an der Regulation diverser Zellvorgänge beteiligt sind (Perng und Lenschow 2018). In einem mehrstufigen Prozess wird ISG15 kovalent an Zielproteine gebunden, was als ISGylierung bezeichnet wird (Perng und Lenschow 2018). Die funktionelle Auswirkung dieser Bindung ist zurzeit noch wenig verstanden. Die ISGylierung scheint jedoch im Gegensatz zur Ubiquitylierung nicht zum

direkten Abbau des Zielmoleküls im Proteasom zu führen (Perng und Lenschow 2018). Als antiviraler Effekt kann die ISGylierung viraler und zelleigener Proteine die Interaktion zwischen viralen Proteinen und zelleigenen für die Virusreplikation entscheidenden Signalwegen unterbrechen (Perng und Lenschow 2018). Auch die virale Geometrie, Proteinfunktion oder die Virusfreisetzung kann beeinträchtigt werden (Perng und Lenschow 2018). Neben der antiviralen Wirkung sind auch immunmodulatorische Funktionen von ISG15 beschrieben (Perng und Lenschow 2018). So kann es beispielsweise von Zellen freigesetzt werden und wie ein Zytokin auf NK-Zellen, dendritische Zellen oder neutrophile Granulozyten wirken (Perng und Lenschow 2018).

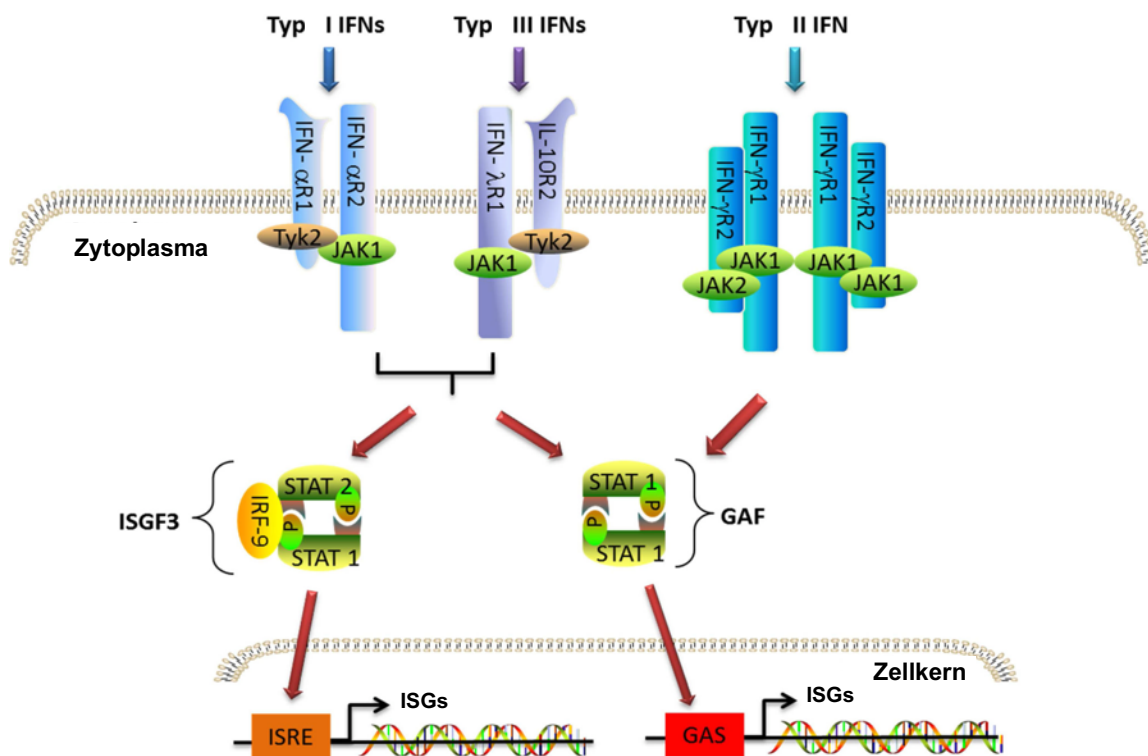


Abbildung 1.10: Signalweg der Interferone. Typ I, II und III-Interferone binden an ihre spezifischen Rezeptoren auf der Zellmembran und aktivieren den JAK/STAT-Signalweg. Über membrangebundene Tyrosinkinasen (JAK, Tyk2) werden intrazelluläre STAT-Proteine phosphoryliert und aktiviert. Typ I und Typ III-Interferone können anschließend sowohl zur Bildung des ISGF3 aus STAT1, STAT2 und IRF-9 als auch zur Bildung des GAF aus STAT1-Homodimeren führen. Der ISGF3 bindet im Zellkern an die ISRE-Promoterregion und GAF an den GAS-Promoter, um die Transkription von Interferon-stimulierten Genen (ISGs) zu initiieren. Typ II-Interferone nutzen ausschließlich den Weg über GAF um ISGs zu exprimieren. Abkürzungen der Proteine des Signalwegs werden im Fließtext erläutert. Übersetzt und angepasst von Lin, F. C. & Young, H. A. (2014) Interferons: Success in anti-viral immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev*, 25, S. 370.

1.3.1.1 Interferon alpha

Interferon alpha (IFN- α) gehört zu den Typ-I-Interferonen, die als wichtigste Zytokingruppe in der antiviralen Abwehr angesehen werden (Koyama et al. 2008). Es gibt insgesamt 13 Subtypen von IFN- α , von denen der Subtyp IFN- α 2 als besterforschter Subtyp in der Klinik

eingesetzt wird und auch für Untersuchungen dieser Arbeit genutzt wurde (Chen et al. 2020). Der Rezeptor für IFN- α besteht aus den beiden Untereinheiten IFN- α R1 und IFN- α R2 und ist ubiquitär im Organismus vorhanden (Lin und Young 2014). Außerdem sind alle kernhaltigen Zellen nach Erkennung viraler Bestandteile durch PRRs in der Lage, IFN- α zu bilden (Lin und Young 2014). Neben dem bereits beschriebenen JAK/STAT-Signalweg kann IFN- α noch weitere Signalwege aktivieren (Lin und Young 2014). Zu diesen gehören der PI3K-Signalweg mit Aktivierung der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K), der MAPK-Signalweg mit Aktivierung von MAP-Kinasen (MAP = engl. mitogen-activated protein) und ein Signalweg, bei dem der Transkriptionsfaktor NF- κ B (Kernfaktor Kappa B = engl. nuclear factor kappa- B) aktiviert wird (Lin und Young 2014).

Als Therapeutikum der chronischen HBV-Infektion wird IFN- α seit den 1980er Jahren eingesetzt, da ein inhibierender Effekt auf die Replikation des HBV festgestellt wurde (Davis und Jansen 1994, Schultz et al. 1999, Gerlich 2013). Die genaue Wirkung auf das HBV ist aktuell noch nicht geklärt (Gerlich 2013). Verschiedene *In-vitro*- und *In-vivo* -Studien konnten sowohl antivirale, immunmodulatorische sowie hemmende Effekte auf die Entstehung eines HCC identifizieren (Tur-Kaspa et al. 1990, Schultz et al. 1999, Wang et al. 2000, Wieland et al. 2000, Uprichard et al. 2003, Belloni et al. 2012, Micco et al. 2013, Allweiss et al. 2014, Lucifora et al. 2014, Yang et al. 2017). Als antivirale Wirkung beeinflusst IFN- α über die Wirkung von ISGs diverse Schritte der HBV-Replikation. Beschrieben sind unter anderem hemmende Einflüsse auf den Viruseintritt (Xia et al. 2017), die Freisetzung von viralen Partikeln (Yan et al. 2015) und die Bildung von Viruskapsiden (Hayashi und Koike 1989, Wieland et al. 2005, Nguyen et al. 2007, Li et al. 2012). Weiterhin ist eine Destabilisierung und ein beschleunigter Abbau von Viruskapsiden festgestellt worden (Schultz et al. 1999, Xu et al. 2010). Auch die Degradierung von HBV-RNA (Liu et al. 2017) sowie der Abbau und die epigenetische Veränderung von cccDNA wurde beobachtet (Belloni et al. 2012, Lucifora et al. 2014).

1.3.1.2 Interferon gamma

Interferon gamma (IFN- γ) ist das einzige Mitglied der Typ-II-Interferone (Stanifer et al. 2019). Es ist das charakteristische Zytokin aktivierter T-Zellen und wird auch nur von aktivierten T-Zellen, NK-Zellen und Makrophagen gebildet (Kang et al. 2018, Stanifer et al. 2019). Durch die ubiquitäre Verteilung des Rezeptor-Komplexes, bestehend aus zwei Ketten des IFN- γ R1 und zwei Ketten des IFN- γ R2, kann IFN- γ seine Wirkung an nahezu jeder Körperzelle entfalten (Kang et al. 2018, Stanifer et al. 2019). Neben dem JAK/STAT-Weg kann auch IFN- γ die gleichen weiteren Signalwege aktivieren wie IFN- α (Lin und Young 2014). Anders als die anderen Interferone induziert IFN- γ allerdings die ISGs im

JAK/STAT-Signalweg nur über die Bindung von STAT1- Homodimeren an das GAS-Element der DNA (Lin und Young 2014). IFN- γ werden vor allem immunmodulatorische Wirkungen zugeschrieben, antivirale Effekte sind weniger gut bekannt (Kang et al. 2018). Wie auch für IFN- α wurden hemmende Effekte von IFN- γ auf die HBV-Replikation beobachtet (Schultz und Chisari 1999). Es konnte gezeigt werden, dass IFN- γ HBV-Nukleokapside eliminiert und virale RNA destabilisiert sowie zu einem beschleunigten Abbau und einer Hemmung der Bildung von Nukleokapsiden führt (Guidotti et al. 1996b, Xu et al. 2010, Mao et al. 2011). Auch ein Abbau von cccDNA ist beschrieben (Xia et al. 2016). Kürzlich konnte weiterhin gezeigt werden, dass ein starker supprimierender Effekt auf die HBV-Transkription und Antigen-Produktion erzielt werden kann, wenn IFN- γ gemeinsam mit IFN- α wirkt (Chen et al. 2020). In Patienten mit einer chronischen HBV-Infektion konnte IFN- γ nach Langzeitgabe eine Verbesserung der Leberfibrose herbeiführen (Wu et al. 2011).

1.3.1.3 Interferon lambda

Interferon lambda (IFN- λ) liegt in vier verschiedenen Formen vor (IFN- λ 1-4), die zusammen die Gruppe der Typ-III-Interferone bilden (Stanifer et al. 2019). Sie stellen die zuletzt identifizierte Gruppe von Interferonen dar und wurden erstmalig im Jahre 2003 beschrieben (Kotenko et al. 2003, Sheppard et al. 2003). Der Rezeptor von IFN- λ besteht aus den Untereinheiten IFN- λ R1 und IL-10R2 (Stanifer et al. 2019). Während die Untereinheit IL-10R2 ubiquitär im Organismus vorhanden ist, ist die Expression von IFN- λ R1 auf eine gewisse Gruppe von Zellen epithelialen Ursprungs beschränkt. Zu diesen gehören unter anderem Hepatozyten, Zellen des Intestinums und der Lunge (Stanifer et al. 2019). NK-Zellen und dendritische Zellen können IFN- λ R1 ebenfalls exprimieren (Stanifer et al. 2019). Durch das limitierte Vorkommen der Rezeptoruntereinheit ist auch die Wirkung von IFN- λ auf bestimmte Zellen beschränkt. Allerdings kann IFN- λ , wie auch IFN- α , von fast allen Zellen nach Erkennung viraler Bestandteile durch PRRs gebildet werden (Kang et al. 2018). Neben dem JAK/STAT-Weg kann IFN- λ ebenfalls einen MAPK-Signalweg aktivieren (Stanifer et al. 2019).

In Bezug auf das HBV konnten *In-vitro*-Studien eine supprimierende Wirkung von IFN- λ auf die Replikation des HBV und antivirale Wirkungen auf die cccDNA zeigen (Robek et al. 2005, Bockmann et al. 2019). Auch klinische Studien zum HBV und IFN- λ in chronisch infizierten Patienten wurden durchgeführt. Zuvor konnte bei Patienten mit einer chronischen Hepatitis-C-Infektion eine zu IFN- α vergleichbare virologische Antwort gezeigt werden. Durch die beschränkte Rezeptorverteilung von IFN- λ wurden jedoch weniger

extrahepatische Nebenwirkungen hervorgerufen (Muir et al. 2014, Chan et al. 2016, Phillips et al. 2017). Dabei zeigten sich bei der chronischen HBV-Infektion unter einer Therapie mit IFN- λ ebenfalls etwas weniger Nebenwirkungen, jedoch konnten die Kriterien der Studie für die Nichtunterlegenheit von IFN- λ nicht erfüllt werden (Chan et al. 2016). Eine Serokonversion von HBeAg 24 Wochen nach Ende der Behandlung als primärer Endpunkt konnte nur bei 13,8 % der mit IFN- λ behandelten Patienten beobachtet werden, während dies bei IFN- α behandelten Patienten bei 30,1 % der Fall war (Chan et al. 2016). Innerhalb der Behandlungszeit waren hingegen stärkere antivirale Effekte durch IFN- λ im Vergleich zu IFN- α auszumachen. Dies wurde in einer weiteren Studie bestätigt, bei der IFN- λ bei 9 von 13 Patienten den antiviralen Effekt von Entecavir verstärkte. Die Autoren sahen diesen Effekt in immunmodulatorischen Eigenschaften von IFN- λ begründet (Phillips et al. 2017).

1.4 Arbeitshypothese und Fragestellung

Die angeborene Immunantwort stellt den ersten Verteidigungsmechanismus gegen virale Infektionen dar und nimmt auch in der frühen Phase einer HBV-Infektion eine bedeutende Stellung ein (Koyama et al. 2008, Guo 2013). Zytokine, zu denen auch Interferone gehören, spielen dabei eine essentielle Rolle (O'Shea et al. 2019). Eines dieser Interferone ist IFN- α . Bei HBV-Infektionen übt es eine supprimierende Wirkung auf das Virus aus und wird auch als Therapeutikum in der chronischen Infektion eingesetzt. Dennoch ist der genaue Wirkmechanismus bislang nicht vollständig verstanden. Neben IFN- α existieren weitere Interferone mit antiviralen Wirkungen, die eine ähnliche intrazelluläre Signalkaskade aktivieren und eine Suppression auf das HBV ausüben können (Donnelly und Kotenko 2010). Zu diesen Interferonen gehören IFN- λ und IFN- γ .

Ziel dieser Arbeit ist nun, mögliche Gemeinsamkeiten und Unterschiede bezüglich einer direkten antiviralen Wirksamkeit von IFN- λ und IFN- γ auf das HBV im Vergleich zu IFN- α *in vivo* im humanisierten uPA/SCID-Mausmodell zu finden. Weiterhin sollen zugrunde liegende Mechanismen eventueller Unterschiede untersucht werden, um gleichzeitig weitere Einblicke und ein besseres Verständnis der antiviralen Wirkung von IFN- α zu erlangen. In einem ersten Teil soll dafür zunächst durch Nutzung pegylierter Substanzen die Langzeitwirkung von IFN- λ und IFN- α auf virale Parameter sowie die Induktion von ISGs untersucht werden. Im zweiten Teil schließt sich eine Analyse über kurzfristige Effekte bei IFN- α und IFN- γ in Bezug auf virale Parameter an. Durch Verwendung des humanisierten uPA/SCID-Mausmodell ohne adaptive Immunzellen können isoliert antivirale Effekte betrachtet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborequipment

Tabelle 2.1: Laborequipment.

Instrument/Gerät	Hersteller	Land
Abbott ARCHITECT platform	Abbott Laboratories, Abbott Diagnostics	USA
ABI ViiA 7 Real-Time PCR System	Applied Biosystems	USA
Centrifuge 5415R	Eppendorf AG	Deutschland
Centrifuge 5417C	Eppendorf AG	Deutschland
Centrifuge 5810R	Eppendorf AG	Deutschland
GeneAmp® PCR System 9700 thermal cyclor	Applied Biosystems	USA
Inkubationsschüttler Thriller	PEQLAB Biotechnologie GmbH	Deutschland
Kompaktes Fluoreszenz-Mikroskop HS Modellreihe BZ-9000 (BIOREVO)	Keyence	Japan
Multipette® stream	Eppendorf AG	Deutschland
NanoDrop 2000	Thermo Scientific	USA
Pipetten	Eppendorf AG	Deutschland
PlateFuge™ Microplate Micro Centrifuge	Benchmark Scientific	USA
Qubit® 2.0 Fluorometer	Invitrogen	USA
Reagenzschüttler Reax top	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG	Deutschland
Spectrafuge™ Mini centrifuge	Labnet International Inc.	USA
Thermomixer Compact	Eppendorf AG	Deutschland
Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cyclor	Applied Biosystems	USA
VWR Galaxy Mini Centrifuge	VWR	USA

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Tabelle 2.2: Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmaterialien	Hersteller	Land
Biosphere® Filter Tips (20, 100, 200, 1000 µl)	Sarstedt AG & Co	Deutschland
Biosphere® plus SafeSeal Tube 1.5ml	Sarstedt AG & Co	Deutschland
Combitips advanced®	Eppendorf AG	Deutschland
Deckgläser 24x50mm	Th. Geyer GmbH & Co. KG	Deutschland
Eppendorf Tubes® (1,5ml/ 2ml)	Eppendorf AG	Deutschland
Falcon/Röhre (15ml/ 50ml)	Sarstedt AG & Co	Deutschland
MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate, 0.1 mL	Applied Biosystems	USA
MicroAmp™ Optical Adhesive Film	Applied Biosystems	USA
Multiply high profile	Sarstedt AG & Co	Deutschland
Objekträger SuperFrost Plus™	Thermo Scientific	USA
Petrischalen	Sarstedt AG & Co	Deutschland

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 2.3: Chemikalien und Reagenzien.

Chemikalien und Reagenzien	Hersteller	Land
5M Ammoniumacetat	Sigma-Aldrich	USA
Bovines Serumalbumin (0,5%) (BSA)	GE Healthcare	Großbritannien
CHEMSOLUTE® Aceton reinst	Th. Geyer GmbH & Co. KG	Deutschland
CHEMSOLUTE® Ethanol absolut	Th. Geyer GmbH & Co. KG	Deutschland
Dako Fluorescence Mounting Medium	Dako	Dänemark
EMPLURA® 2-Propanol	Merck Schuchardt OHG	Deutschland
EMSURE® Wasserstoffperoxid (30%)	Merck KGaA	Deutschland
Glykogen	Roche Diagnostics GmbH	Schweiz
Hoechst 33258, Pentahydrate (bis-Benzimide) (Verdünnung 1:20 000)	Invitrogen	Deutschland
Humanes Interferon alpha-2a (Roferon-A)	Hoffmann-La Roche Inc.	Schweiz
Humanes Interferon alpha-2b (Intron-A)	Schering Canada	Kanada
Humanes Interferon gamma GFH77	Cell Guidance Systems	USA
Humanes pegyliertes Interferon alpha (PEG-IFN- α 2a, Pegasys®)	Hoffmann-La Roche Inc.	Schweiz
Humanes pegyliertes Interferon lambda (PEG-IFN- λ 1)	Bristol-Myers Squibb (BMS)	USA
MPC Protein Precipitation Reagent	Epicentre	USA
PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline ohne Ca^{2+} , ohne Mg^{2+} (10X) (L18250))	Biochrom GmbH	USA
Plasmid-Safe™ 10X Reaction Buffer	Epicentre	USA
TaqMan® Fast Advanced Master Mix	Applied Biosystems	USA
TaqMan® Fast Virus 1-Step Master Mix	Applied Biosystems	USA
Tissue and Cell Lysis Solution	Epicentre	USA
Trizma® hydrochloride solution	Sigma-Aldrich	USA
UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water	Invitrogen	USA

2.1.4 Puffer und Lösungen

Zur Herstellung der Puffer und Lösungen wurde vollentsalztes Wasser (VE-Wasser verwendet).

Tabelle 2.4: Puffer und Lösungen.

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung	Hersteller	Land
TN-Puffer (Tris-HCl, NaCl), pH 7,5	0,15M NaCl	Sigma-Aldrich	USA
	0,1M Tris	Sigma-Aldrich	USA
TNB-Puffer (Tris-NaCl-blocking buffer) pH 7,5	0,15M NaCl	Sigma-Aldrich	USA
	0,1M Tris	Sigma-Aldrich	USA
	0,5% TSA Blocking reagent	PerkinElmer	USA
PBST	1X PBS	Biochrom GmbH	USA
	Tween 20	Sigma-Aldrich	USA
Paraformaldehyd (4%) (PFA)	10 ml Formaldehyd (16%)	Polysciences Inc.	USA
	30 ml 1X PBS	Biochrom GmbH	USA

2.1.5 Kits

Tabelle 2.5: Kits.

Kits	Hersteller	Land
ARCHITECT HBeAg Assay	Abbott Ireland Diagnostic Division	Irland
ARCHITECT HBsAg Assay	Abbott Ireland Diagnostic Division	Irland
Human Albumin ELISA Kit	Immunology Consultants Lab	USA
MasterPure DNA Purification Kit	Epicentre	USA
PerfeCta® DNase I (Cat.No. 95150-01K)	Quanta BioSciences, Inc.	USA
QIAamp MinElute Virus Spin Kit (50) (Cat.No. 57704)	Qiagen GmbH	Niederlande
RNeasy Mini Kit (50) (Cat.No. 74104)	Qiagen GmbH	Niederlande
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Cat.No. 04896866001)	Roche Diagnostics	Schweiz
TSA Fluorescein System	PerkinElmer	USA

2.1.6 Enzyme

Tabelle 2.6: Enzyme.

Enzyme	Hersteller	Land
DNase I	Qiagen	Niederlande
Plasmid-Safe™ ATP-Dependent DNase	Epicentre	USA
Proteinase K	Epicentre	USA
RNAse A	Epicentre	USA

2.1.7 Antikörper

Tabelle 2.7: Primärantikörper.

Primärantikörper	Verdünnung	Hersteller	Land
Anti-Cytokeratin-18 (DC-10, sc-6259) (Maus)	1:400	Santa Cruz Biotechnology	USA
Anti-HBcAg (14E11) (Maus)	1:100	Invitrogen	USA
Anti-HBcAg (B0586) (Kaninchen)	1:2000	Dako	Dänemark
Anti-ISG15 (sc-2758) (Kaninchen)	1:100	Cell Signaling Technology	USA
Anti-MxA (sc-50509) (Kaninchen)	1:100	Santa Cruz Biotechnology	USA
Anti-SMC6 (HPA042733) (Kaninchen)	1:100	Sigma-Aldrich	USA
Anti-SP100 (HPA017384) (Kaninchen)	1:1000	Sigma-Aldrich	USA
Anti-STAT1 (610115) (Maus)	1:200	Biosciences	USA

Tabelle 2.8: Sekundärantikörper.

Sekundärantikörper	Verdünnung	Hersteller	Land
Alexa Fluor® 488 Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L) (A-11034) (grün)	1:400	Life Technologies	USA
Alexa Fluor® 546 Ziege anti-Maus IgG (H+L) (A-11003) (rot)	1:800	Invitrogen	USA
Alexa Fluor® 555 Ziege anti-Maus IgG (H+L) (A-32727) (rot)	1:800	Invitrogen	USA
Peroxidase-conjugated AffiniPure Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L) (111-035-144) (grün)	1:200	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.	USA

2.1.8 Primer und Sonden

Die verwendeten Oligonukleotide für die prägenomische RNA (pgRNA) und die cccDNA stammten aus der Publikation von Malmström et al. (2012) und wurden von der Firma MWG-Biotech (Deutschland) synthetisiert (**Tabelle 2.9**). Bei der PCR für die cccDNA lag die Endkonzentration für den Vorwärtsprimer bei 100nmol/l und für den Rückwärtsprimer bei 800nmol/l. Für die pgRNA wurden für den Vorwärtsprimer und den Rückwärtsprimer jeweils Endkonzentrationen von 1000nmol/l verwendet.

Die restlichen Primer und Sonden stammten aus TaqMan Genexpressionsassays der Firma Thermo Fisher Scientific (USA) bestehend aus einem Paar unmarkierter PCR-Primer und einer TaqMan Sonde mit Farbstoffmarkierung (FAM) am 5'-Ende, einem Minor Groove Binder (MGB) und einem nicht fluoreszierenden Quencher (NFQ) am 3'-Ende (**Tabelle 2.10**).

Tabelle 2.9: Spezifische Primer und Sonden.

Primer/Sonde	Oligonukleotid
cccDNA	
Vorwärtsprimer (fw)	CCGTGTGCACTTCGCTTCA 1575–1593
Rückwärtsprimer (rv)	GCACAGCTTGGAGGCTTGA 1882–1864
Sonde	CATGGAGACCACCGTGAACGCC 1607–1629
pgRNA	
Vorwärtsprimer	GGTCCCCTAGAAGAAGAACTCCCT 2367–2390
Rückwärtsprimer	CATTGAGATTCCTGAGATTGAGAT 2454–2431
Sonde	TCTCAATCGCCGCGTCGCAGA 2408–2428

Tabelle 2.10: TaqMan Genexpressionsassays.

Gen	Assay-ID
HBV-DNA (HBV X)	Pa03453406_s1
HBV-RNA (HBV X)	Pa03453406_s1
hβ-Globin	Hs00758889_s1
hAPOBEC3A	Hs00377444_m1
hAPOBEC3B	Hs00358981_m1
hAPOBEC3C	Hs00819353_m1
hAPOBEC3F	Hs01665324_m1
hAPOBEC3G	Hs00222415_m1
hGAPDH	Hs99999905_m1
hHLA-A	Hs01058806_g1
hHLA-E	Hs03045171_m1
hIP10/ hCXCL10	Hs00171042_m1
hISG15	Hs00192713_m1
hMX1	Hs00895608_m1
hOAS1	Hs00973637_m1
hRPL30	Hs00265497_m1
hSMC6	Hs01093459_m1
hSTAT1	Hs01013989_m1
hTAP1	Hs00388675_m1
hUSP18	Hs00276441_m1
mActb	Mm00607939_s1
mEef2	Mm01171434_g1
mMx1	Mm01217998_m1
mOas1b	Mm00449297_m1

2.1.9 Software

Diese Arbeit wurde mit Microsoft Office Word Version 16.16.10 angefertigt. Die Erstellung der Graphen erfolgte mit der GraphPad Prism 5 Software. Statistische Analysen wurden mit IBM SPSS Statistics V25.0 durchgeführt. Das Literaturverzeichnis wurde mit dem Programm Endnote X8 erstellt.

2.2 Methoden

2.2.1 Generierung von humanisierten uPA/SCID-Mäusen und Infektion mit HBV

Die humanisierten uPA/SCID-Mäuse wurden erzeugt, indem uPA-transgene Mäuse (Jackson Laboratories, USA) mit SCID/beige/IL-2RG^{-/-}-Mäusen (Taconic Farms, Dänemark) gekreuzt wurden. Unter Isofluran-Betäubung wurde den drei bis vier Wochen alten homozygoten Tieren anschließend eine Million lebensfähige aufgetaute kryokonservierte menschliche Hepatozyten in die Milz injiziert. Diese Hepatozyten stammten aus Lebertransplantaten von unterschiedlichen menschlichen Spendern und wurden entweder käuflich von einer Firma (Lonza) erworben oder in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. med. J. Pollok aus Spendern mit Genehmigung der zuständigen Ethikkommission (Ethiknummern WF-021/11 und 021/12) und in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki isoliert. Für käuflich erworbene Hepatozyten ist eine Einholung der Genehmigung der Ethikkommission nicht notwendig.

Die Repopulationsraten der menschlichen Hepatozyten in der Mausleber wurden durch Messung von humanem Albumin im Mausserum mit dem Human Albumin ELISA Kit (Immunology Consultants Lab, USA) bestimmt. Acht bis 16 Wochen nach Transplantation der Hepatozyten erfolgte die Infektion mit HB-Viren.

Für die Infektion wurden Hepatitis-B-Viren (Genotyp D) genutzt, die aus HBV-positivem Patientenserum oder gentechnisch-veränderter Zellkultur stammten und zuvor in Mäusen passagiert wurden. Das infektiöse Mausserum mit 1×10^7 HBV-DNA Kopien/Maus wurde den Mäusen anschließend einmalig intraperitoneal appliziert. Die Multiplizität der Infektion (multiplicity of infection, MOI) als Maßstab für die Menge an Virusgenom, das eine Zelle infiziert (González-Jara et al. 2009), entsprach dabei rund 0,33, da sich im Mittel ungefähr 3×10^7 primäre humane Hepatozyten in jeder Mausleber befanden.

Nach entsprechender Behandlung, die weiter unten näher ausgeführt wird, wurden die Tiere zu festgesetzten Zeitpunkten getötet. Die dabei entnommenen Lebern der Mäuse wurden in flüssigem Isopentan schockgefrostet und anschließend für nachfolgende histologische und molekularbiologische Analysen bei -80°C kryokonserviert.

Die Mäuse wurden unter Einhaltung der institutionellen Richtlinien nach zugelassenen Protokollen unter spezifischen pathogen-freien Bedingungen gehalten. Alle Prozeduren wurden nach den gesetzlichen Bestimmungen des deutschen Tierschutzes durchgeführt und waren von der Hamburger Behörde für Gesundheit und Verbraucherschutz genehmigt (Tierversuchsantragsnummern 118/16, 52/15, 15/12).

2.2.2 Behandlung mit pegyliertem Interferon- α und pegyliertem Interferon- λ

Um die Wirkung von pegyliertem IFN- α (PEG-IFN- α) und pegyliertem IFN- λ (PEG-IFN- λ) zu vergleichen, wurden chimäre uPA/SCID-Mäuse mithilfe von Hepatozyten vier verschiedener menschlicher Spender erzeugt. Nach Etablierung einer stabilen HBV-Infektion (>12 Wochen nach Infektion), wurden sie in zwei Behandlungsgruppen aufgeteilt. In der ersten Gruppe bekamen Mäuse für zwei (n = 3) oder vier Wochen (n = 3) PEG-IFN- α appliziert. Kontrolltiere (n = 6) erhielten keine Behandlung. Die zweite Gruppe erhielt für zwei (n = 3) oder vier Wochen (n = 6) PEG-IFN- λ . Kontrolltiere (n = 9) erhielten keine Behandlung. Die Interferone wurden zweimal wöchentlich mit einer Dosis von 25ng/g Körpergewicht (KG) intraperitoneal injiziert. Bei der Dosis handelte es sich um eine an den Mausstoffwechsel angepasste äquivalente Dosis zur humanen Dosis. Im Gegensatz zum Menschen, denen PEG-Interferon nur einmal wöchentlich verabreicht wird, wurden die Mäuse zweimal pro Woche behandelt, um eine konstante Wirkung und Induktion von ISGs garantieren zu können. Serologische Parameter wurden vor Beginn der Behandlung (Baseline-Wert (BL)) und am Ende der Behandlung bestimmt. Bei der vierwöchigen Behandlung wurde zusätzlich nach zwei Wochen eine serologische Analyse durchgeführt. Intrahepatische Analysen fanden am Ende der Behandlung nach Tötung der Tiere statt (Abb. 2.1).

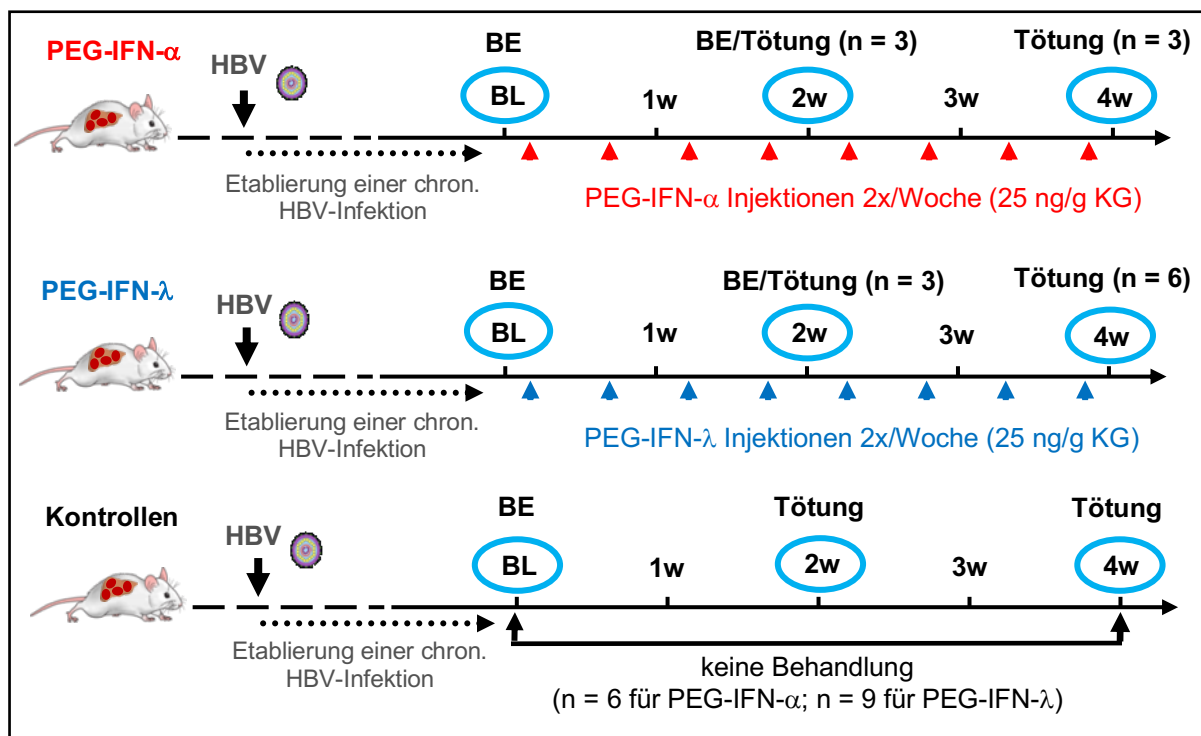


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der experimentellen Gruppen für die Behandlung mit PEG-Interferon- α und PEG-Interferon- λ . BE = Blutentnahme, BL = Baseline (Beginn der Behandlung), Dreieck = Interferoninjektion. Quelle: Eigene Darstellung.

2.2.3 Behandlung mit Interferon- α und Interferon- γ

Für den Vergleich von IFN- α mit IFN- γ wurden nicht-pegylierte Interferone genutzt. Dies liegt in der Tatsache begründet, dass IFN- γ nur in nicht-pegylierter Form als Medikament zugelassen ist und in klinischen Studien verwendet wird (National Library of Medicine at the National Institutes of Health (NIH) 2020, U. S. Food and Drug Administration (FDA) 2020). Um einen Vergleich der Wirkung in Bezug auf IFN- α zu ermöglichen, wurde auch IFN- α als nicht-pegylierte Form eingesetzt. Für die Untersuchung wurden uPA/SCID-Mäuse mit menschlichen Hepatozyten von vier unterschiedlichen Spendern repopuliert. Um eine vergleichende Analyse der Genexpressionsstärke der beiden Interferone in An- und Abwesenheit vom HBV durchzuführen, wurde für jedes Interferon eine uninfizierte und eine HBV-infizierte Behandlungsgruppe konzipiert (**Abb. 2.2**). Uninfizierte ($n = 3$) und mit dem HBV infizierte Mäuse ($n = 2$) erhielten einmalig intraperitoneal IFN- α (1350 IU/g KG). Einer weiteren Gruppe uninfizierter ($n = 2$) und infizierter Mäuse ($n = 3$) wurde einmalig IFN- γ (25 ng/g KG) verabreicht. Acht Stunden nach der Interferon-Gabe wurden die Mäuse getötet. Als Kontrollgruppe fungierten nicht-behandelte uninfizierte ($n = 7$) und infizierte ($n = 4$) Tiere. Behandelte Tiere waren vor Behandlung über eine Dauer von mindestens acht Wochen mit dem HBV infiziert.

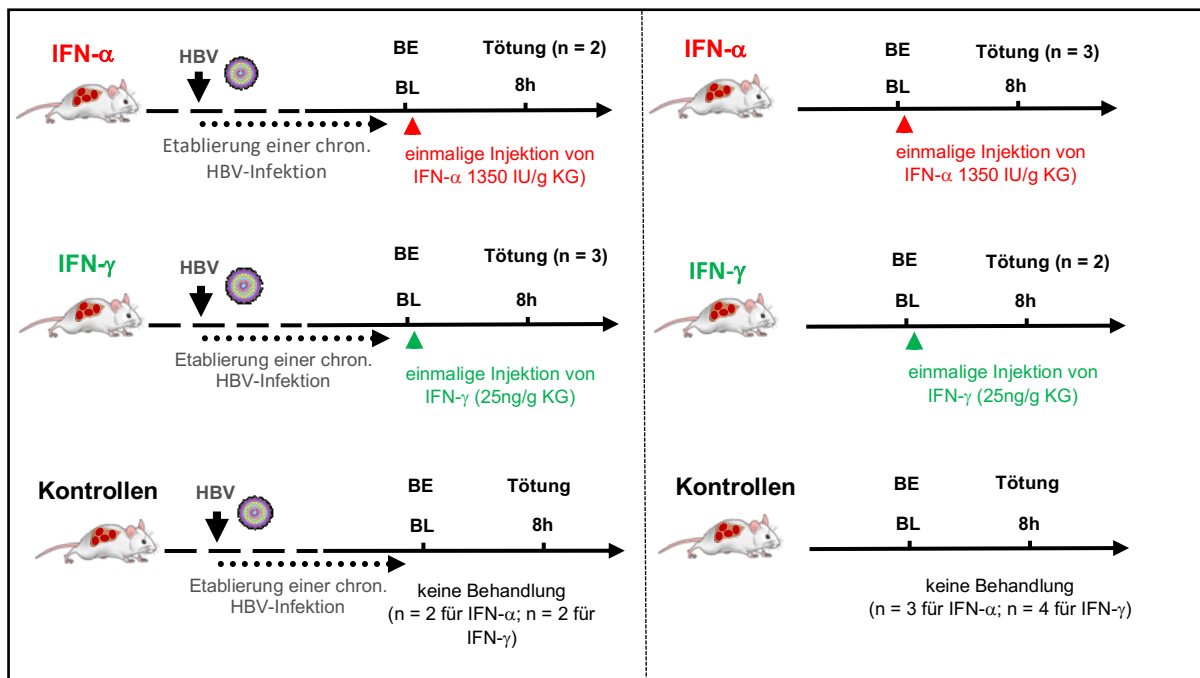


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der experimentellen Gruppen für die Behandlung mit Interferon- α und Interferon- γ . BE = Blutentnahme, BL = Baseline (Beginn der Behandlung), Dreieck = Interferoninjektion. Quelle: Eigene Darstellung.

2.2.4 Serologische Analysen

2.2.4.1 DNA- Extraktion und Messung

Die Extraktion der HBV-DNA aus dem Serum erfolgte mit dem QIAamp MinElute Virus Spin Kit (Qiagen, Niederlande). Nach Protokoll des Kits wurde die DNA aus 5µl Mausserum extrahiert und in 25µl destillierten Wasser eluiert. Die Amplifizierung und Messung der DNA erfolgte mittels quantitativer Real-Time (qRT) PCR in einem ABI ViiA 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA) mittels TaqMan-Sonden-Prinzip unter Verwendung eines für HBV-DNA spezifischen TaqMan-Assays (Applied Biosystems, USA) (**Tabelle 2.10**).

Beim TaqMan-Sonden-Prinzip wird die 5' → 3'-Exonuclease Aktivität der *Taq*-Polymerase genutzt (Holland et al. 1991). Die TaqMan-Sonde ist ein für die zu amplifizierende DNA spezifisches Oligonukleotid mit einer Farbstoffmarkierung (FAM™ oder VIC™) am 5'-Ende und einem sogenannten nicht-fluoreszierenden Quencher (NFQ) am 3'-Ende. Der Quencher unterdrückt das Signal des Fluoreszenzfarbstoffs. Nach Denaturierung der doppelsträngigen DNA lagern sich Primer und Sonde an ihre spezifischen Zielsequenzen an. Anschließend synthetisiert die *Taq*-Polymerase ausgehend von den Primern neue DNA-Stränge. Erreicht sie dabei die Sonde, entfernt sie diese durch ihre endogene 5'-Nukleaseaktivität. Dabei wird der Fluoreszenzfarbstoff vom Quencher getrennt, das Fluoreszenzsignal wird freigesetzt und kann gemessen werden. Da sich das Fluoreszenzsignal proportional zur Menge der synthetisierten DNA erhöht, können PCR-Produkte quantifiziert werden (Thermo Fisher Scientific 2019) (**Abb. 2.3**).

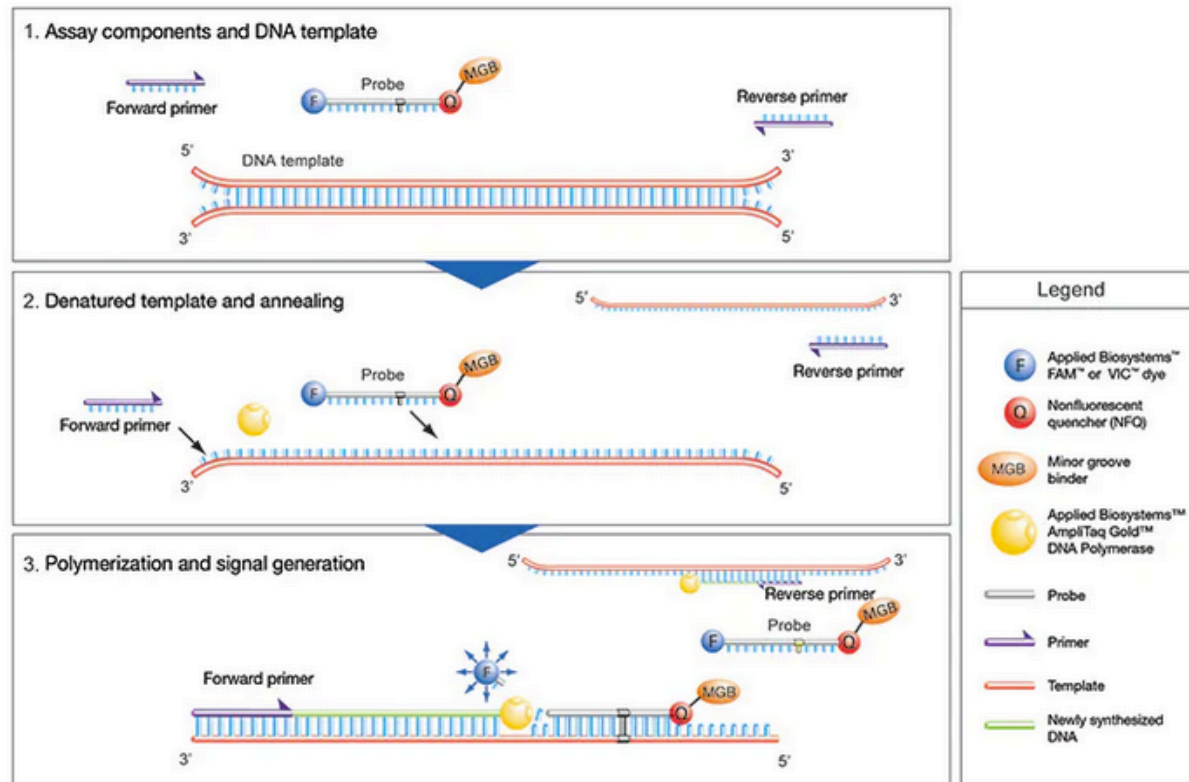


Abbildung 2.3: Ablauf eines TaqMan Genexpressionsassays. Nach Denaturierung des zu amplifizierenden DNA-Stücks (Template) lagern sich die spezifischen Primer und die mit einer Farbstoffmarkierung (F) und einem Quencher (Q) versehene TaqMan-Sonde (Probe) an die DNA an (2). Sobald die Taq-Polymerase die DNA-Stränge synthetisiert, wird die Farbstoffmarkierung freigesetzt und kann gemessen werden (3). Entnommen aus ThermoFisher Scientific (2019). So funktionieren TaqMan Assays [Online]. ThermoFisher Scientific. Verfügbar: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/how-taqman-assays-work.html> [Abgerufen am 13.12.2020].

In **Tabelle 2.11** ist der verwendete PCR-Ansatz, in **Tabelle 2.12** das Laufprogramm dargestellt. Die erhaltenen Daten wurden mit der Standardkurvenmethode absolut quantifiziert. Dafür wurde ein Standard mit bekannten DNA-Ausgangskonzentrationen in verschiedenen Verdünnungsstufen erzeugt. Die Konzentration der unbekanntenen Proben konnte daraufhin anhand dieses Standards ermittelt werden (Bustin 2000). Die erhaltenen Konzentrationen wurden anschließend mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert, um die DNA-Kopienzahl/ml zu erhalten.

Tabelle 2.11: Pipettierschema der quantitativen PCR für die Messung von HBV-DNA im Serum.

Produkt	Volumen
TaqMan® Fast Advanced Master Mix	5µl
TaqMan® Assay (Primer + Sonde)	0,5µl
Serum-Eluat (DNA)	4,5µl
Endvolumen	10µl

Tabelle 2.12: PCR-Zyklen der quantitativen Real-Time (qRT) PCR für die Messung von HBV-DNA.

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
Aktivierung der <i>Taq</i> -Polymerase	95 °C	20 Sekunden	1
Denaturierung	95 °C	1 Sekunde	40
Annealing und Elongation	60 °C	20 Sekunden	40

2.2.4.2 pgRNA- Extraktion und Messung

Prägenomische RNA wurde nach der gleichen Vorgehensweise wie HBV-DNA mittels des QIAamp MinElute Virus Spin Kits aus dem Serum extrahiert und in 25µl destillierten Wasser eluiert. Anschließend wurde bei 10µl des Eluats die DNA mithilfe des PerfeCta® DNase I-Kit verdaut (Quanta BioSciences, USA, **Tabelle 2.5**). Nach Angaben des Herstellers wurde dafür folgender Ansatz verwendet: 10µl des Eluats, 2µl 10x Reaction Buffer, 2µl PerfeCta® DNase I (Desoxyribonuklease I) und 6µl destilliertes Wasser. Nach vorsichtigem Mischen und kurzer Zentrifugation wurde der Ansatz für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 2µl 10x Stop Buffer des Herstellers zugegeben und weitere 10 Minuten bei 65°C inkubiert.

Die Messung der pgRNA erfolgte mittels qRT PCR im ABI ViiA 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA) im Ein-Schritt-Verfahren (One-step RT PCR). Bei diesem Verfahren findet der Schritt der reversen Transkription zur Bildung der cDNA unmittelbar vor der PCR-Reaktion im gleichen Ansatz statt (Wacker und Godard 2005). Für die One-step RT PCR wurde der TaqMan® Fast Virus 1-Step Master Mix sowie spezifische Primer und Sonden aus **Tabelle 2.9** verwendet. Um die Effizienz des Verdau zu beurteilen und Falschmessungen durch HBV-DNA zu verhindern, wurden zwei PCR-Ansätze konzipiert – ein Ansatz für Proben ohne DNase-Verdau und einer für Proben mit DNase-Verdau. Als Negativkontrolle wurde zusätzlich in beiden Ansätzen einmal die reverse Transkriptase im Fast Virus 1-Step Master Mix inaktiviert, indem der Mix für 10 Minuten auf 95°C erhitzt wurde. Beide Ansätze finden sich in **Tabelle 2.13**. Die erhaltenen Daten wurden mit der Standardkurvenmethode absolut quantifiziert und mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor multipliziert, um die RNA-Kopienzahl/ml zu erhalten.

Tabelle 2.13: Pipettierschema der quantitativen PCR für die Messung von pgRNA in Serum. In Ansatz A wurde ohne vorherigen Verdau durch DNase I und mit aktiver reverser Transkriptase (RTr) durch PCR-Messung sowohl HBV-pgRNA als auch HBV-DNA bestimmt. Durch Inaktivierung der RTr wurde nur noch HBV-DNA gemessen. Ansatz B enthielt ein Serum-Eluat, welches zuvor mit DNase I behandelt wurde. Mit aktiver RTr wurde die pgRNA gemessen, der Ansatz mit inaktiver RTr diente als Negativkontrolle. Ansatz A und B wurden zueinander ins Verhältnis gesetzt, um die Effizienz des DNase-Verdau zu beurteilen und auszuschließen, dass fälschlicherweise DNA-Produkte durch die PCR gemessen werden, da pgRNA und HBV-DNA die gleiche Sequenz aufweisen.

Ansatz A ohne DNase-Verdau +/- Reverse Transkriptase (RTr)		Ansatz B mit DNase-Verdau +/- Reverse Transkriptase (RTr)	
Produkt	Volumen	Produkt	Volumen
TaqMan® Fast Virus 1-Step Master Mix	2,5µl	TaqMan® Fast Virus 1-Step Master Mix	2,5µl
pgRNA Primer (fw+rv)	1µl	pgRNA Primer (fw+rv)	1µl
pgRNA Sonde	0,5µl	pgRNA Sonde	0,5µl
Serum-Eluat ohne DNase-Verdau	2,5µl	Serum-Eluat mit DNase-Verdau	2,5µl
Wasser	3,5µl	Wasser	3,5µl
Endvolumen	10µl	Endvolumen	10µl

2.2.4.3 Quantifizierung von HBeAg und HBsAg

Die Messungen von HBsAg und HBeAg im Mausserum wurden mit dem Abbott Architect Analysesystem (Abbott Diagnostics, USA) unter Nutzung des quantitativen HBsAg Assays und des HBeAg Assays (Abbott Ireland Diagnostic Division, Irland) durchgeführt. Dafür wurde das Mausserum 1:20-1:150 im Verdünnungsserum des Herstellers (Abbott) diluiert und nach anschließender Kalibrierung nach Protokoll des Herstellers quantifiziert.

2.2.5 Intrahepatische Analysen

2.2.5.1 DNA/RNA- Isolierung aus Lebergewebe

Für die Isolierung von DNA und RNA aus dem Lebergewebe der Mäuse wurden Leberstücke von 27-46 mg verwendet. Die DNA wurde mithilfe des MasterPure DNA Purification Kits (Epicentre, USA) und die RNA mithilfe des RNeasy Mini Kit (Qiagen, Niederlande) aus dem Gewebe extrahiert. Zu Beginn der Isolierung wurde das gefrorene Lebergewebe in 400µl RLT-Puffer des RNeasy Mini Kit zerkleinert und homogenisiert. Davon wurden 200µl für die Gewinnung von DNA und 200µl für die Gewinnung von RNA genutzt.

Für die DNA-Aufreinigung folgte zunächst ein Proteinverdau mit 2µl Proteinase K und 10µl Trizma® hydrochloride solution (Sigma-Aldrich, USA), der eine Stunde bei 55°C inkubierte. Anschließend wurde die RNA in den Proben durch Zugabe von 2µl Ribonuklease A (RNase A) und erneuter Inkubation für 30 Minuten bei 37°C entfernt. In den nachfolgenden Schritten

wurde die DNA nach Protokoll des Herstellers präzipitiert. Das entstehende DNA-Pellet wurde über Nacht bei 4°C in 70 µl destilliertem Wasser gelöst. Die extrahierte DNA-Menge pro Probe wurde anschließend im Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen, USA) gemessen. Werte mit einer Konzentration über 500ng/µl wurden 1:1 verdünnt, um eine Inhibition der PCR zu verhindern.

Die Aufreinigung der RNA erfolgte über Zentrifugationssäulen des RNeasy Mini Kits wie in der Anleitung des Herstellers beschrieben. Zusätzlich wurde die DNA in den Proben verdaut, indem 10µl DNase I und 70µl RDD-Puffer aus dem RNeasy Mini Kit zugegeben und der Ansatz für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Nach der Säulenaufreinigung wurde die RNA in 100µl RNase-freiem Wasser eluiert.

2.2.5.2 cccDNA Verdau

In einer infizierten Zelle finden sich neben wenigen cccDNA-Molekülen eine große Menge an partiell einzelsträngiger HBV-rcDNA und replikativen Intermediaten. Um auszuschließen, dass diese DNA-Moleküle bei der cccDNA-Messung in der PCR zu positiven Signalen führen – aufgrund der großen Ähnlichkeit dieser Intermediate mit der cccDNA kann diese nicht komplett spezifisch per PCR quantifiziert werden – wurde ein Teil der durch die obige Prozedur erhaltenen DNA mit einer DNase verdaut, die präferentiell einzelsträngige DNA verdaut. Diese Plasmid-Safe™ ATP-Dependent DNase (Epicentre, USA) wurde mit der HBV-DNA in dem **Tabelle 2.13** dargestellten Ansatz für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms wurde der Ansatz nachfolgend für 30 Minuten auf 70°C erhitzt. Anschließend wurde die intakte DNA in einem Isopropanolansatz ausgefällt. Dafür wurden 1µl Glykogen (Roche Diagnostics GmbH, Schweiz), 50µl 5M Ammoniumacetat (Sigma-Aldrich, USA), 500µl Isopropanol (Merck Schuchardt OHG, Deutschland) und 300µl Wasser für eine Stunde bei Raumtemperatur mit der DNA inkubiert. Im Anschluss wurde das Gemisch 30 Minuten bei 4°C mit maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das entstandene DNA-Pellet wurde nachfolgend 2x in 70% Ethanol (Th. Geyer GmbH & Co. KG, Deutschland) gewaschen und über Nacht in 28µl bei 4°C gelöst.

Tabelle 2.14: Pipettierschema für den Verdau mit Plasmid-Safe™ ATP-Dependent DNase.

Produkt	Volumen
Plasmid-Safe™ 10X Reaction Buffer	20µl
Plasmid-Safe™ 100mM ATP	2µl
Plasmid-Safe™ ATP-Dependent DNase	3µl
DNA	4µl
Wasser	171µl
Endvolumen	200µl

2.2.5.3 Messung intrahepatischer HBV-DNA und RNA

Intrahepatische virale DNA und RNA wurde mithilfe der qRT PCR im ABI ViiA 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA) gemessen.

Die virale DNA wurde unter Verwendung eines für HBV-DNA spezifischen TaqMan-Assays (**Tabelle 2.10**) im schnellen Standardprogramm (**Tabelle 2.12**) bei in **Tabelle 2.15** dargestellten PCR-Ansatz amplifiziert. Die Auswertung erfolgte über eine absolute Quantifizierung mit der Standardkurvenmethode. Um die DNA-Menge auf den Gehalt pro Hepatozyt zu normalisieren, wurde das humane β -Globin-Gen verwendet. Dieses wurde in gleicher Weise ebenfalls über ein spezifisches TaqMan-Assay (**Tabelle 2.10**) amplifiziert und nachfolgend absolut quantifiziert.

Die cccDNA wurde mit spezifischen Primern und Sonden aus **Tabelle 2.9** in einem gesonderten PCR-Programm gemessen (**Tabelle 2.16**), absolut quantifiziert und ebenfalls auf die β -Globin-Menge bezogen. Das Pipettierschema ist in **Tabelle 2.17** dargestellt.

Tabelle 2.15: Pipettierschema der quantitativen Real-Time PCR für die Messung von intrahepatischer HBV-DNA, cDNA und β -Globin.

Produkt	Volumen
TaqMan® Fast Advanced Master Mix	5 μ l
TaqMan® Assay (Primer + Sonde)	0,5 μ l
Wasser	3,5 μ l
DNA	1 μ l
Endvolumen	10 μ l

Tabelle 2.16: PCR-Zyklen der quantitativen Real-Time PCR für die Messung von cccDNA.

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
Aktivierung der <i>Taq</i> -Polymerase	95°C	10 Minuten	1
Denaturierung	95°C	1 Sekunde	40
Annealing und Elongation	65 °C	1 Minute	40

Tabelle 2.17: Pipettierschema der quantitativen Real-Time PCR für die Messung von cccDNA.

Produkt	Volumen
TaqMan® Fast Advanced Master Mix	10 μ l
cccDNA Primermix	1 μ l
cccDNA-Sonde	0,5 μ l
Wasser	1,5 μ l
Verdaute DNA	7 μ l
Endvolumen	20 μ l

Die intrahepatische HBV-RNA wurde mit der One-step qRT PCR unter Benutzung des TaqMan® Fast Virus 1-Step Master Mix gemessen. Für die Gesamt-RNA wurde ein spezifisches TaqMan-Assay (**Tabelle 2.10**), für die pgRNA spezifische Primer und Sonden aus **Tabelle 2.9** genutzt.

Die Auswertung erfolgte mittels relativer Quantifizierung (Pfaffl 2004). Dabei wird nicht die absolute Kopienzahl bestimmt, sondern die Transkriptmenge eines Zielgens wird auf ein weiteres ubiquitär und konstant exprimiertes „Housekeeping Gen“ bezogen. Damit wird die Expression des Zielgens normalisiert (Pfaffl 2004). Als „Housekeeping Gen“ diente die humane Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), ein Enzym der Glykolyse, für dessen Messung ebenfalls ein spezifisches TaqMan-Assay (**Tabelle 2.10**) genutzt wurde. Indem das Expressionsverhältnis (Ratio) zwischen beiden Genen berechnet wird, heben sich individuelle Probeneffekte wie beispielsweise unterschiedliche RNA-Extraktionseffizienzen zwischen den Proben wieder auf (Pfaffl 2004). Die Berechnung des Expressionsunterschieds erfolgte durch Subtraktion des Ct-Wertes (engl. Cycle Threshold = Schwellenwertzyklus) des zu untersuchenden Gens vom Ct-Wert der GAPDH.

$$\text{Formel: } \Delta\text{Ct} = \text{Ct (Gen)} - \text{Ct (GAPDH)}$$

Der Ct-Wert entspricht dabei dem PCR-Zyklus, bei dem ein definiertes Fluoreszenzniveau erreicht wird (Pfaffl 2004). Je niedriger der Ct-Wert einer Probe ist, desto größer ist die ursprüngliche Transkriptmenge.

Um das Expressionsverhältnis zu Beginn der PCR zu erhalten, musste die exponentielle Amplifikation der Gene berücksichtigt werden. Aus diesem Grund wurde der ΔCt -Wert zusätzlich potenziert, sodass schlussendlich folgende Gleichung zur Normalisierung der Expression des Zielgens verwendet wurde:

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

Die PCR-Ansätze für die virale RNA und GAPDH finden sich in **Tabelle 2.18** und **Tabelle 2.19**.

Tabelle 2.18: Pipettierschema der quantitativen Real Time PCR für die Messung von intrahepatischer HBV-RNA und GAPDH.

Produkt	Volumen
TaqMan® Fast Virus 1-Step Master Mix	2,5µl
TaqMan® Assay (Primer + Sonde)	0,5µl
Wasser	6µl
RNA	1µl
Endvolumen	10µl

Tabelle 2.19: Pipettierschema der quantitativen Real Time PCR für die Messung von intrahepatischer pgRNA.

Produkt	Volumen
TaqMan® Fast Virus 1-Step Master Mix	2,5µl
Primermix	1µl
Sonde	0,5µl
Wasser	5µl
RNA	1µl
Endvolumen	10µl

2.2.5.4 cDNA Umschreibung und Genexpressionsmessung

Die Messung der Genexpression von Interferon-stimulierten Genen (ISGs) wurde im Gegensatz zur Messung der viralen RNAs im „Zwei-Schritt-Verfahren“ durchgeführt.

Im ersten Schritt wurde die extrahierte RNA (**vgl. Kapitel 2.2.5.1**) über eine reverse Transkriptionsreaktion in cDNA umgeschrieben und im nachfolgenden Schritt durch qRT PCR amplifiziert. Für die Umschreibung wurde das Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics, Schweiz) verwendet.

Zu Beginn wurde die RNA-Menge pro Probe im NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA) gemessen. Für die Reverse Transkription wurde 1µg RNA eingesetzt und Oligo(dT)-Primer genutzt. Die Umschreibung in cDNA erfolgte anschließend nach Protokoll des Herstellers im GeneAmp® PCR System 9700 Thermal Cycler (Applied Biosystems, USA). Die entstandene cDNA wurde mit 20µl destilliertem Wasser verdünnt.

Im zweiten Schritt wurde die Genexpression durch qRT PCR im ABI ViiA 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA) gemessen. Dabei wurden für die jeweiligen Gene spezifische TaqMan-Assays (**Tabelle 2.10**) verwendet und das schnelle Standardprogramm (**Tabelle 2.12**) genutzt. Der Ansatz wurde nach dem in **Tabelle 2.15** dargestellten Schema pipettiert und die erhaltenen Daten wurden mittels relativer Quantifizierung (**vgl. Kapitel 2.2.5.3**) auf den Mittelwert aus humaner GAPDH und dem humanen ribosomalen Protein L30 (RPL30) normalisiert. Spezifische Gene der Maus wurden im gleichen Verfahren gemessen, jedoch auf den murinen Eukaryotischen Elongationsfaktor 2 (Eef2) und murines β -Actin (Actb) normalisiert.

2.2.5.5 Immunfluoreszenzfärbung

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden Schnitte der chimären Mauslebern mit einer Dicke von 12µm verwendet. Die Schnitte wurden entweder in 4% Paraformaldehyd oder Aceton fixiert und anschließend 3x mit PBS, PBST oder TN-Puffer gewaschen. Bei Fixierung mit 4% Paraformaldehyd wurde zusätzlich mit Aceton entfettet. Die Färbung mit den Primärantikörpern (**Tabelle 2.7**) erfolgte über Nacht bei 4°C. Vor einer Färbung mit anti-HBcAg (Kaninchen) und anti-Ck18 (Maus) wurde außerdem ein Peroxidaseblock mit

30%igem Wasserstoffperoxid und eine Absättigung der unspezifischen freien Proteinbindungsstellen mit TNB-Puffer durchgeführt. Bei einer Färbung mit anti-ISG15 (Kaninchen) und anti-Cytokeratin-18 (Maus) erfolgte die Absättigung mit 0,5% bovinen Serumalbumin (BSA).

Nach Inkubation der Primärantikörper wurden die Schnitte erneut 3x gewaschen und anschließend für 45 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur mit dem entsprechenden Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper (**Tabelle 2.8**) inkubiert, um das Signal zu visualisieren. Zur Verstärkung des HBcAg-Signals wurde das TSA Fluorescein System (PerkinElmer, USA) verwendet. Zellkerne wurden mit Hoechst 33258 (1:20 000, Invitrogen, Germany) gefärbt. Im Anschluss wurden die Schnitte mit Dako Fluorescence Mounting Medium (Dako, Dänemark) fixiert und im Fluoreszenz-Mikroskop BZ-9000 (BIOREVO) (Keyence, Japan) analysiert. Für die Evaluierung einer Färbung wurden jeweils die gleichen Einstellungen für alle experimentellen Gruppen verwendet.

2.2.6 Statistische Analysen

Aufgrund der geringen Stichprobengröße wurden vornehmlich deskriptive Beschreibungen der Ergebnisse vorgenommen. Um eine statistische Auswertung mit einer ausreichend großen Stichprobe für den Vergleich von PEG- IFN- α und PEG- IFN- λ zu ermöglichen, wurden die Behandlungszeiträume von zwei und vier Wochen bei statistischen Berechnungen gemeinsam in Gegenüberstellung zur jeweiligen Kontrollgruppe betrachtet. Eine statistische Aussage wurde somit allgemein bezüglich einer Behandlung mit PEG-IFN- α oder PEG- IFN- λ und unabhängig des Behandlungszeitraums im Vergleich zur Kontrollgruppe getroffen. Für die Berechnungen wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney-U-Test verwendet.

Für den Vergleich von nicht-pegyliertem IFN- α und nicht-pegyliertem IFN- γ konnten aufgrund der geringen Größe der Stichprobe keine statistischen Analysen durchgeführt werden ($n = 2$ für IFN- α , $n = 3$ für IFN- γ bei HBV-Infektion), sodass in diesem Teil die Ergebnisse rein deskriptiv analysiert wurden.

3 Ergebnisse

3.1 Antivirale Effekte von pegyliertem Interferon- α und pegyliertem Interferon- λ in HBV-infizierten uPA/SCID-Mäusen

IFN- α wird seit fast 40 Jahren als Therapeutikum bei der chronischen Hepatitis-B-Infektion eingesetzt. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* konnte gezeigt werden, dass die virale Replikation inhibiert wird (Davis und Jansen 1994, Guidotti et al. 1994, Guidotti et al. 1996a, Schultz et al. 1999, Koumbi 2015). Obwohl etliche Studien antivirale Wirkungen demonstrieren konnten, (Uprichard et al. 2003, Wieland et al. 2005, Li et al. 2010, Belloni et al. 2012, Allweiss et al. 2014, Lucifora et al. 2014) sind die genauen Mechanismen für die virale Hemmung nicht vollständig geklärt (Gerlich 2013, Woo et al. 2017, Lok 2018).

Um das Wirkprinzip von IFN- α weiter zu untersuchen, wurde im ersten Teil meiner Arbeit die antivirale Aktivität von IFN- α mit IFN- λ im humanisierten Mausmodell verglichen. Über mögliche Gemeinsamkeiten und Unterschiede in der Wirkung sollten weitere Erkenntnisse in den antiviralen Mechanismus von IFN- α gewonnen werden.

Verwendet wurden pegylierte Formen der beiden Interferone (PEG-IFN- α und PEG-IFN- λ). Für den Vergleich wurden HBV-infizierte humanisierte uPA/SCID-Mäuse mit einem viralen Titer von 3×10^7 bis 1×10^9 HBV-DNA Kopien/ml (3×10^8 Kopien/ml im Median) für zwei oder vier Wochen zweimal wöchentlich mit PEG-IFN- α ($n = 6$) oder PEG-IFN- λ ($n = 9$) behandelt oder erhielten keine Behandlung (Kontrolltiere) ($n = 6$ für PEG-IFN- α und $n = 9$ für PEG-IFN- λ) (vgl. Kapitel 2.2.2). Kontrolltiere einer Behandlungsgruppe wurden mit den gleichen Spenderhepatozyten repopuliert wie behandelte Tiere der experimentellen Gruppe und zeigten zu Behandlungsbeginn vergleichbare, nicht signifikant differierende virale Titer (Titer PEG-IFN- α vs. Kontrolltiere $p = 0,699$, Titer PEG-IFN- λ vs. Kontrolltiere $p = 0,489$).

3.1.1 Einfluss auf serologische virale Parameter

Für die Untersuchung der antiviralen Aktivität von PEG-IFN- α und PEG-IFN- λ auf das Hepatitis-B-Virus wurden zunächst Analysen im Mausserum durchgeführt. Dafür wurde den Mäusen vor Beginn der Behandlung (Baseline, BL) und nach Ende der Behandlung Blut entnommen. Bei der Behandlung über vier Wochen wurde zusätzlich nach zwei Wochen eine Blutentnahme durchgeführt (vgl. Kapitel 2.2.2). Untersucht wurde die Menge an HBV-DNA (Virämie) mittels qRT-PCR und der viralen Antigene HBsAg und HBeAg mithilfe entsprechender Kits. Diese Parameter werden auch im klinischen Alltag im Serum von Patienten mit einer chronischen Hepatitis analysiert, um den Verlauf der Erkrankung und Therapieerfolge zu beurteilen (EASL 2017). Weiterhin wurde die Menge an prägenomischer RNA (pgRNA) mittels qRT-PCR analysiert, da kürzlich gezeigt werden konnte, dass sich

neben HBV-DNA ebenfalls enkapsidierte pgRNA im Serum von chronisch infizierten Patienten befindet und die Menge an pgRNA im Serum von humanisierten Mäusen mit der Aktivität der cccDNA korreliert (Wang et al. 2016, Giersch et al. 2017a).

Die Behandlung mit PEG-IFN- α führte im Vergleich zur Baseline nach zwei Wochen zu einer medianen Reduktion der Virämie um 1,4 \log_{10} . Bei längerer Behandlungsdauer blieb diese Reduktion konstant, sodass nach vier Wochen ebenfalls eine mediane Reduktion von 1,4 \log_{10} zu verzeichnen war (**Abb. 3.1 A und B**). Bei gemeinsamer Betrachtung beider Behandlungszeiträume war diese Reduktion im Vergleich zur Baseline statistisch signifikant ($p < 0,01$). Durch Behandlung mit PEG-IFN- λ war eine leichte Reduktion der Virämie nach zwei Wochen zu verzeichnen (-0,2 \log_{10} im Median), die sich nach vier Wochen wieder aufhob (+ 0,1 \log_{10} im Median) (**Abb. 3.1 C und D**). Insgesamt ergab sich damit über beide Behandlungszeiträume keine signifikante Reduktion im Vergleich zur Baseline ($p = 0,73$).

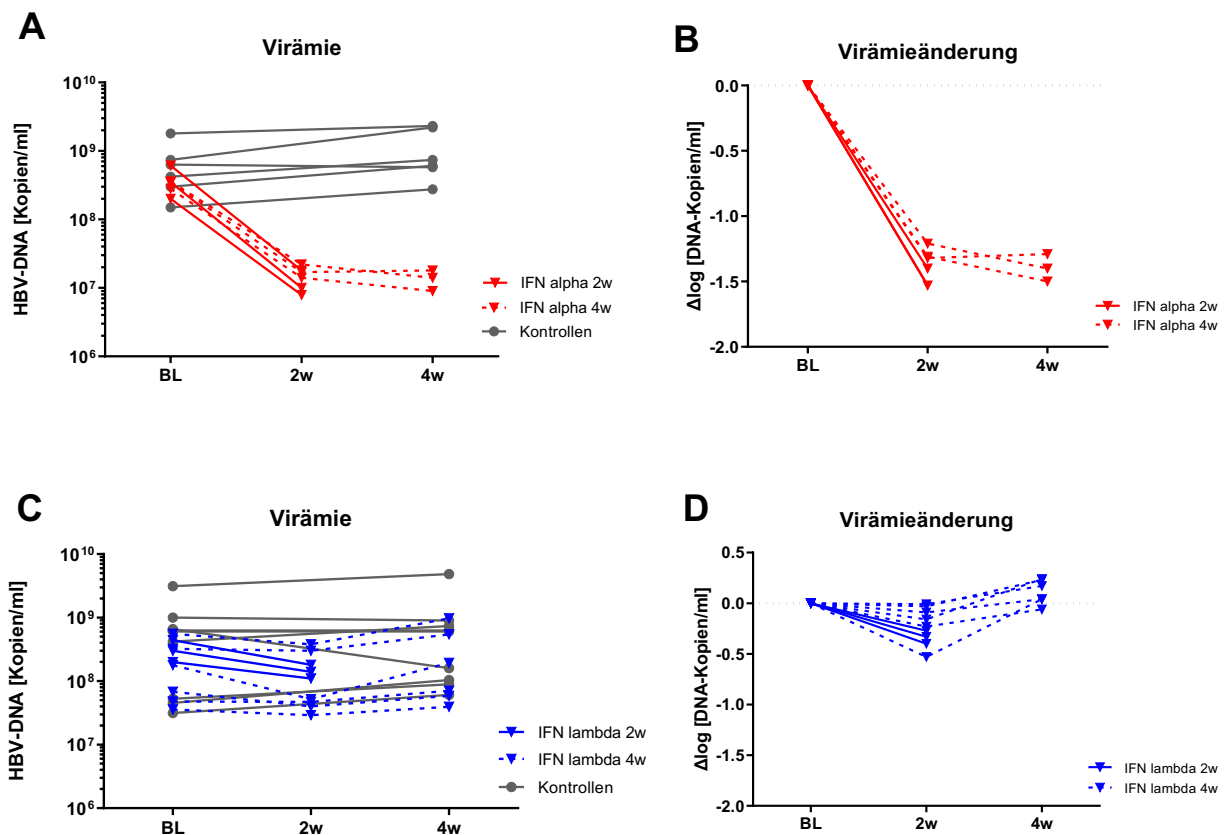


Abbildung 3.1: HBV-Virämie. Zeitliche Entwicklung der Virämie (DNA-Kopien/ml) nach zwei- (vollständige Linie) und vierwöchiger Behandlung (unterbrochene Linie) mit PEG-IFN- α (rot) (A) und PEG-IFN- λ (blau) (C) oder ohne Behandlung (graue Linie) für die einzelnen Mäuse. Die Graphen (B) und (D) zeigen die Änderung der Virämie der einzelnen Mäuse in \log_{10} in Bezug zur Baseline. Die Behandlung mit PEG-IFN- α führte zu einer Reduktion der HBV-DNA-Kopien um 1,4 \log_{10} im Median nach zwei und nach vier Wochen, die Behandlung mit PEG-IFN- λ verursachte eine mediane Reduktion der Virämie nach zwei Wochen um 0,2 \log_{10} . Nach vier Wochen war keine Reduktion mehr auszumachen.

Für die HBV-Antigene zeigten sich ebenfalls Unterschiede zwischen beiden Interferonen. Während PEG-IFN- α die Menge an Hepatitis-B-Oberflächenantigen (HBsAg) sowohl nach zwei als auch nach vier Wochen im Vergleich zur Baseline signifikant ($p < 0,05$) reduzieren konnte (im Median um $0,2 \log_{10}$) (**Abb. 3.2 A und B**), war für PEG-IFN- λ keine signifikante ($p = 0,546$) Änderung an HBsAg zu beobachten (Zunahme von $0,1 \log_{10}$ im Median) (**Abb. 3.2 C und D**). Das Hepatitis-B-e-Antigen (HBeAg) konnte durch PEG-IFN- α noch stärker verringert werden. Wie **Abbildung 3.3** zeigt, konnte nach zwei Wochen Behandlung eine mediane Reduktion zur Baseline von $0,4 \log_{10}$ und nach vier Wochen eine Reduktion von $0,5 \log_{10}$ beobachtet werden. Insgesamt zeigte sich damit auch beim HBeAg für PEG-IFN- α eine signifikante Reduktion über beide Behandlungszeiträume im Vergleich zur Baseline ($p < 0,05$). PEG-IFN- λ hingegen konnte das HBeAg nach zwei und vier Wochen im Median nur um $0,1 \log_{10}$ reduzieren, wodurch keine statistisch signifikante Reduktion erreicht wurde ($p = 0,394$) (**Abb. 3.3 C und D**).

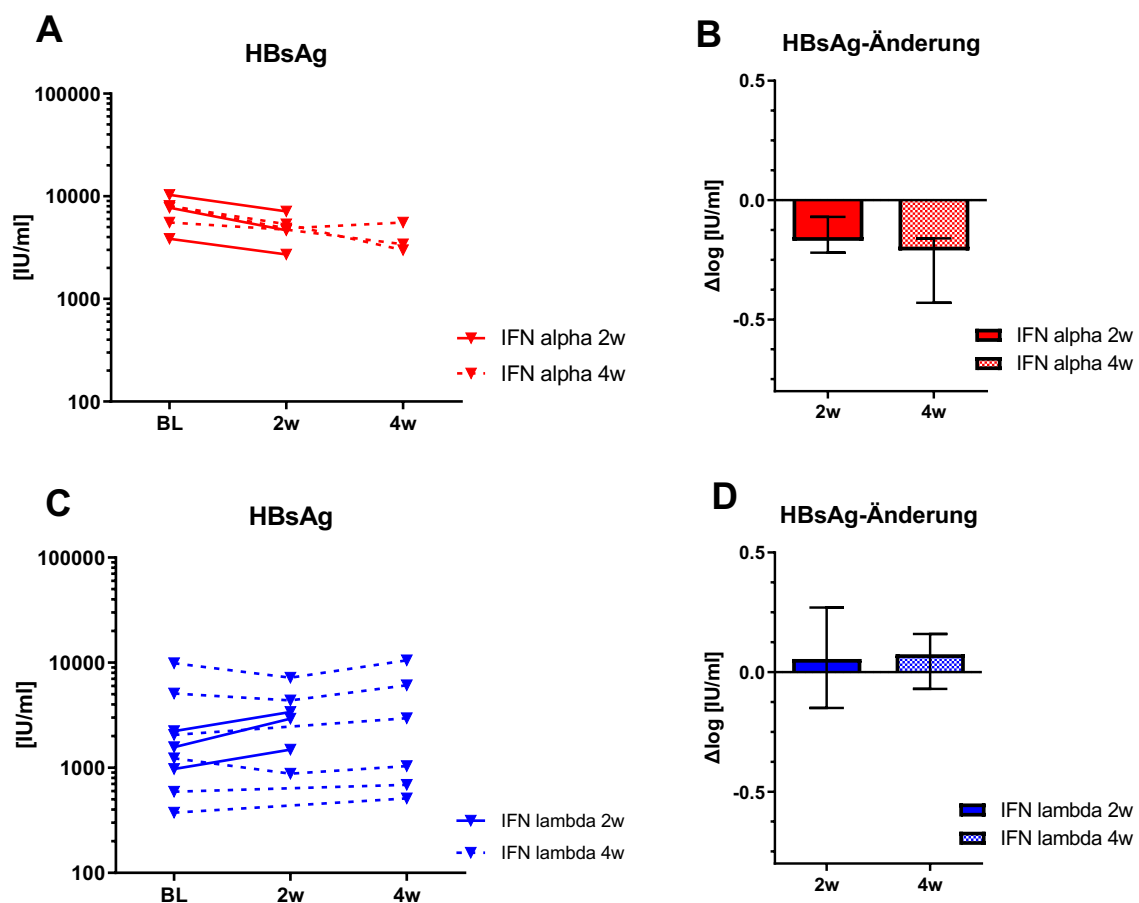


Abbildung 3.2: HBsAg im Serum. Zeitliche Entwicklung von zirkulierendem HBsAg gemessen in Units/ml nach zwei- (vollständige Linie) und vierwöchiger Behandlung (unterbrochene Linie) mit PEG-IFN- α (rot) (A) und PEG-IFN- λ (blau) (C) für die einzelnen Mäuse. Die Graphen (B) und (D) stellen die Änderung der HBsAg-Menge zur Baseline dar, die für jede Maus einzeln berechnet wurde. Die Balken entsprechen den medianen Werten der Berechnungen mit zugehöriger Spannweite für PEG-IFN- α (rot, B, $n = 6$ für zwei Wochen und $n = 3$ für vier Wochen) und für PEG-IFN- λ (blau, D,

jeweils $n = 6$ für zwei und vier Wochen). Nach zwei- und vierwöchiger PEG-IFN- α -Behandlung ergab sich eine Reduktion um $0,2 \log_{10}$ im Median. Die Gabe von PEG-IFN- λ führte zu keiner Reduktion des HBsAg.

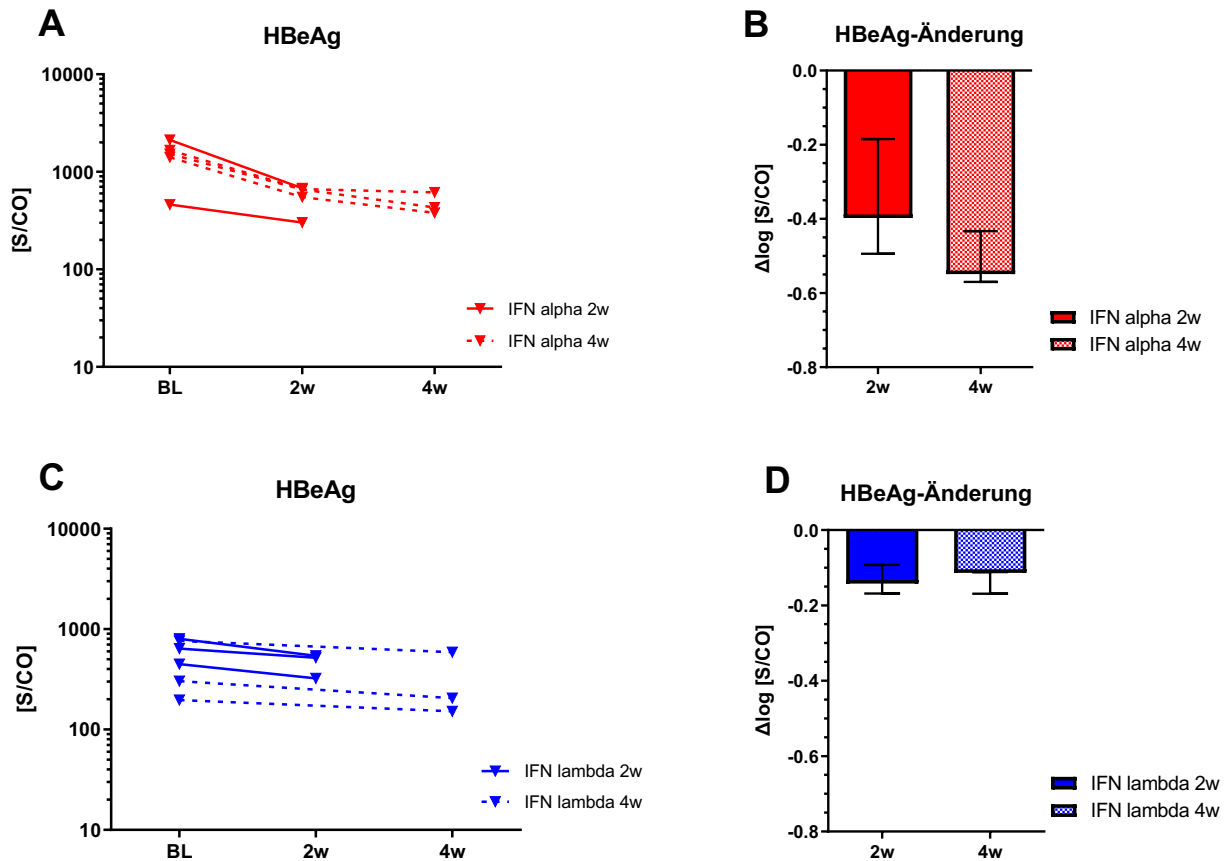


Abbildung 3.3: HBeAg im Serum. Zeitliche Entwicklung von zirkulierendem HBeAg gemessen im Verhältnis von Signal zu Grenzwert (engl. Cutoff) (S/CO) nach zwei- (vollständige Linie) und vierwöchiger Behandlung (unterbrochene Linie) mit PEG-IFN- α (rot) (A) und PEG-IFN- λ (blau) (C) für die einzelnen Mäuse. Die Graphen (B) und (D) stellen die Änderung der HBeAg-Menge zur Baseline dar, die für jede Maus einzeln berechnet wurde. Die Balken entsprechen den medianen Werten der Berechnungen mit zugehöriger Spannweite für PEG-IFN- α (rot, B, $n = 5$ für zwei Wochen und $n = 3$ für vier Wochen) und für PEG-IFN- λ (blau, D, jeweils $n = 6$ für zwei und vier Wochen). Nach zwei- und vierwöchiger PEG-IFN- α -Behandlung ergab sich jeweils eine Reduktion im Median um $0,4 \log_{10}$ und $0,5 \log_{10}$. Die Gabe von PEG-IFN- λ führte nach zwei und vier Wochen zu einer Reduktion um $0,1 \log_{10}$ im Median.

Ähnlich dem Trend der Virämie konnte PEG-IFN- α auch die Menge an pgRNA sowohl nach zwei Wochen als auch nach vier Wochen in einem ähnlichen Ausmaß reduzieren ($-0,9 \log_{10}$ im Median zur BL). Eine statistische Signifikanz wurde dabei knapp verpasst ($p = 0,056$). PEG-IFN- λ konnte die pgRNA insgesamt nur schwächer reduzieren. Zusätzlich nahm der Effekt mit Zunahme der Behandlungsdauer von zwei auf vier Wochen weiter ab (im Median $-0,4 \log_{10}$ nach zwei Wochen und $-0,2 \log_{10}$ nach vier Wochen im Vergleich zur BL) ($p = 0,485$) (**Abb. 3.4**).

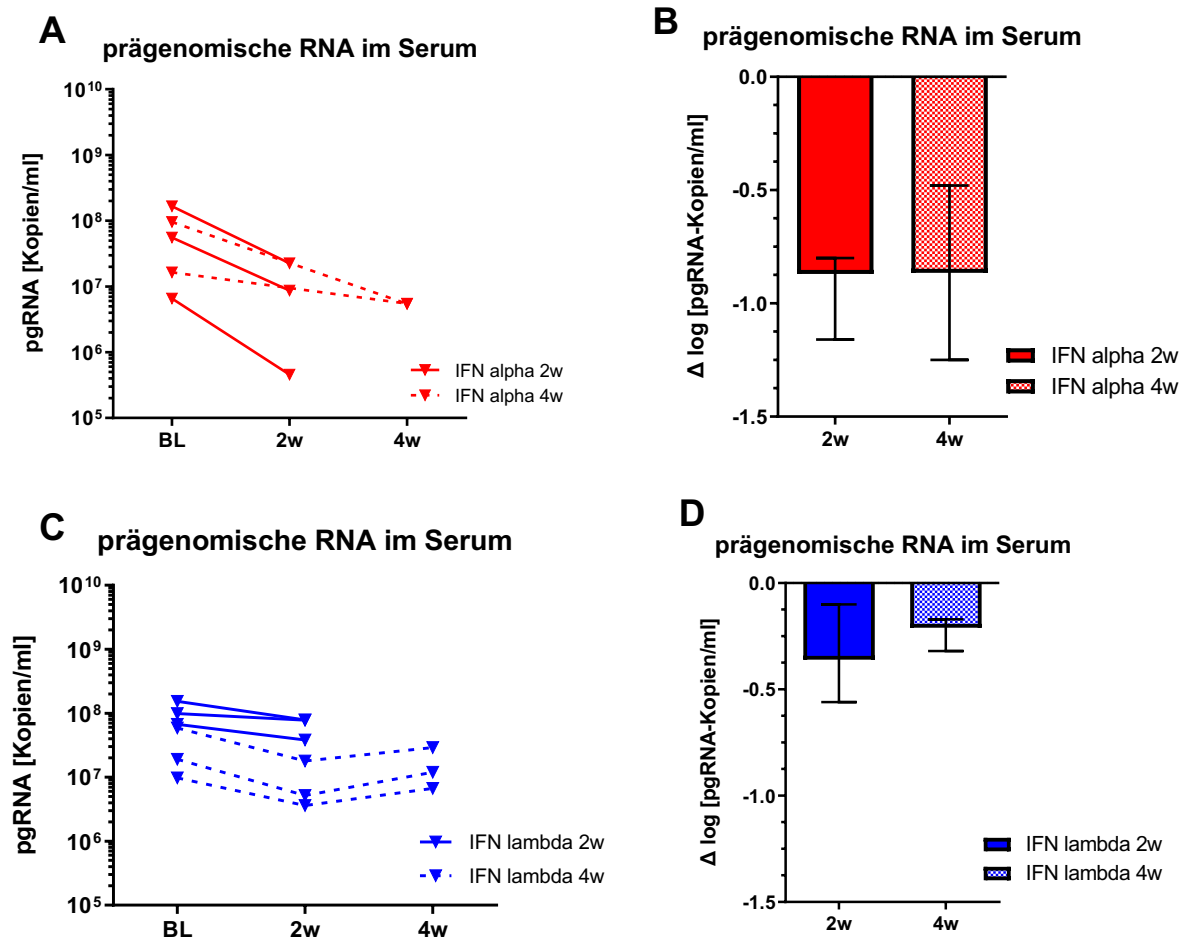


Abbildung 3.4: Prägenomische RNA im Serum. Zeitliche Entwicklung von zirkulierender pgRNA gemessen als RNA-Kopienanzahl/ml nach zwei- (vollständige Linie) und vierwöchiger Behandlung (unterbrochene Linie) mit PEG-IFN- α (rot) (A) und PEG-IFN- λ (blau) (C) für die einzelnen Mäuse. Die Graphen (B) und (D) stellen die Änderung der pgRNA-Menge zur Baseline dar, die für jede Maus einzeln berechnet wurde. Die Balken entsprechen den medianen Werten der Berechnungen mit zugehöriger Spannweite für PEG-IFN- α (rot, B, n = 3 für zwei Wochen und n = 2 für vier Wochen) und für PEG-IFN- λ (blau, D, n = 6 für zwei und n = 3 für vier Wochen). Nach zwei- und vierwöchiger PEG-IFN- α -Behandlung ergab sich jeweils eine Reduktion im Median um 0,9 \log_{10} . Die Gabe von PEG-IFN- λ führte nach zwei Wochen zu einer Reduktion um 0,4 \log_{10} und vier Wochen zu einer Reduktion um 0,2 \log_{10} im Median.

Da Mäusen Blut nur in begrenzten Mengen entnommen werden kann, ist die Menge an Serum limitiert. Aus diesem Grund konnten für einige Tiere beider Behandlungen keine Werte für die HBV-Antigene und die pgRNA bestimmt werden.

Insgesamt lässt die Analyse der serologischen Parameter annehmen, dass das HBV durch PEG-IFN- λ , im Gegensatz zu PEG-IFN- α , nur in einem deutlich geringeren Ausmaß supprimiert wird und die beobachtete Suppression eher transient zu sein scheint.

3.1.2 Einfluss auf intrahepatische virale Parameter

Um die Effekte von PEG-IFN- α und PEG-IFN- λ auf verschiedene Intermediate der viralen Replikation innerhalb der Leber zu untersuchen, wurden behandelte und nicht-behandelte Mäuse am Ende der jeweiligen Behandlungsperiode nach zwei oder vier Wochen getötet (vgl. Kapitel 2.2.2). Aus den entnommenen Lebern wurde DNA und RNA extrahiert und zunächst HBV-RNA-Mengen mittels qRT-PCR untersucht. Wie in **Abbildung 3.5** dargestellt, wurde sowohl die prägenomische RNA als auch die gesamte HBV-RNA, welche die pgRNA und subgenomischen RNAs beinhaltet, durch PEG-IFN- α -Gabe vermindert. Nach vier Wochen Behandlung führte PEG-IFN- α zu einer medianen Reduktion der Gesamt-RNA um 0,5 log₁₀ im Vergleich zum Median der Kontrolltiere. Die pgRNA wurde um 0,7 log₁₀ reduziert. Bei gemeinsamer Betrachtung der zwei - und vierwöchigen Behandlungszeiträume ergab sich dabei für PEG-IFN- α eine signifikante Verminderung der Gesamt-RNA und der pgRNA im Vergleich zu den Kontrolltieren ($p < 0,01$ für die Gesamt-RNA und die pgRNA).

Nach zwei Wochen Behandlung konnte durch beide Interferone eine vergleichbare Reduktion der viralen RNAs erzielt werden (- 0,4 log₁₀ für die Gesamt-RNA und - 0,5 log₁₀ für die pgRNA bei PEG-IFN- α vs. - 0,6 log₁₀ für die Gesamt-RNA und die pgRNA bei PEG-IFN- λ im Vergleich zum Median der Kontrolltiere). Nach vier Wochen Behandlung mit PEG-IFN- λ wiederum wurde die Gesamt-RNA im Median nur um 0,2 log₁₀ und die pgRNA um 0,3 log₁₀ im Vergleich zum Median der Kontrolltiere reduziert. Bei gemeinsamer Betrachtung beider Behandlungszeiträume ergibt sich für PEG-IFN- λ ebenfalls eine signifikante Reduktion der Gesamt-RNA und der pgRNA im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p < 0,01$ für die Gesamt-RNA und die pgRNA). Die pgRNA konnte durch PEG-IFN- α im Vergleich zu PEG-IFN- λ jedoch signifikant stärker reduziert werden ($p < 0,01$).

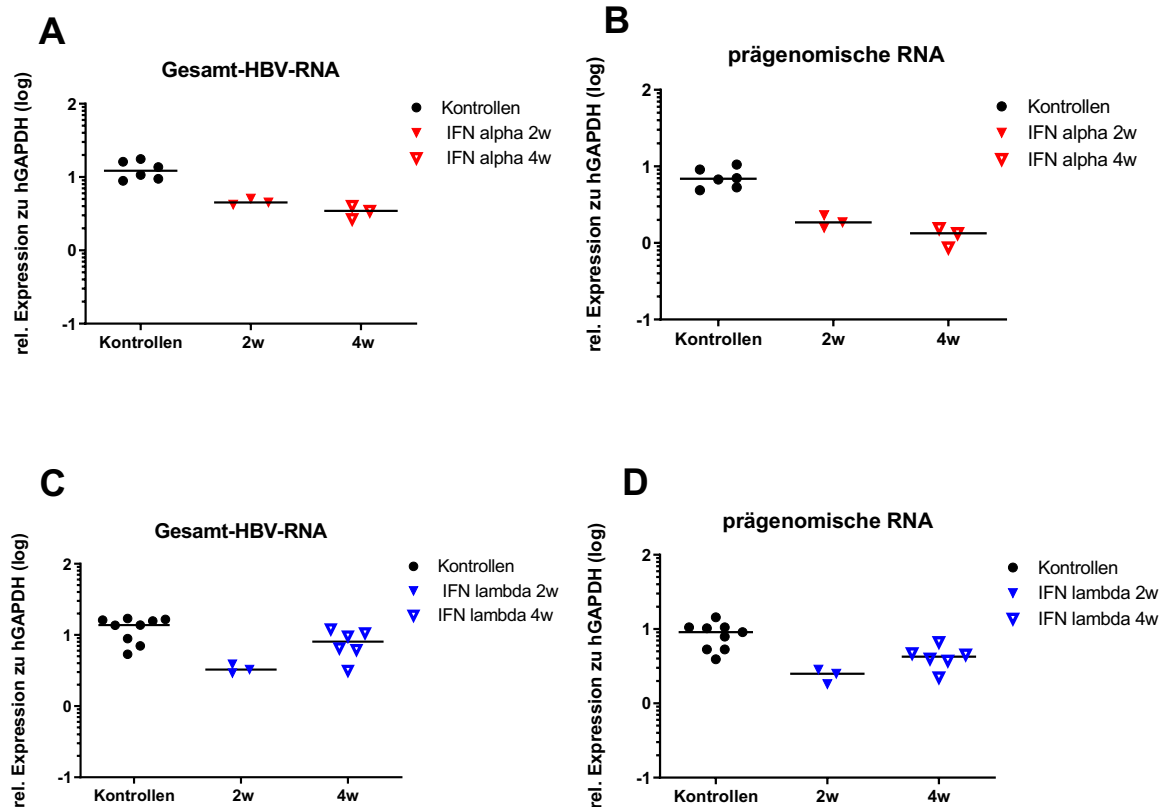


Abbildung 3.5: Intrahepatische HBV-RNA. Intrahepatische Expression der gesamten HBV-RNA (A und C) und der pgRNA (B und D) für die Behandlung mit PEG-IFN- α (rot, A und B) und PEG-IFN- λ (blau, C und D). Dargestellt sind die Expressionswerte relativ zur humanem GAPDH für die einzelnen Mäuse nach zwei Wochen (volles Dreieck) und vier Wochen (hohles Dreieck) Behandlung sowie für unbehandelte Kontrollmäuse (schwarze Kreise). Die schwarzen horizontalen Linien zeigen den Median der entsprechenden Behandlungsgruppe an. Nach zweiwöchiger PEG-IFN- α -Behandlung ergab sich eine mediane Reduktion um 0,4 \log_{10} für die Gesamt-RNA und um 0,5 \log_{10} für die pgRNA im Vergleich zum Median der Kontrolltiere. Eine Behandlung von vier Wochen mit PEG-IFN- α erzielte eine Reduktion um 0,5 \log_{10} für die Gesamt-RNA und 0,7 \log_{10} für die pgRNA. Die Gabe von PEG-IFN- λ führte nach zwei Wochen jeweils zu einer medianen Reduktion um 0,6 \log_{10} für die Gesamt-RNA und die pgRNA und nach vier Wochen zu einer Reduktion der Gesamt-RNA um 0,2 \log_{10} und der pgRNA um 0,3 \log_{10} im Vergleich zum Median der Kontrolltiere.

Weiterhin wurde der Einfluss beider Interferone auf die intrahepatische HBV-DNA Menge mithilfe der qRT-PCR untersucht. Wie in **Abbildung 3.6 A und C** dargestellt, konnte PEG-IFN- α die gesamte HBV-DNA, also rcDNA, DNA-Intermediate und cccDNA, pro humaner Zelle stärker reduzieren als PEG-IFN- λ . Die vierwöchige Gabe führte gegenüber der zweiwöchigen Gabe bei PEG-IFN- α zu einem weiteren Rückgang der HBV-DNA, der für PEG-IFN- λ nicht zu beobachten war. Nach vier Wochen konnte PEG-IFN- α die gesamte HBV-DNA im Vergleich zum Median der Kontrolltiere um 1,4 \log_{10} reduzieren, für PEG-IFN- λ zeigte sich nur ein Rückgang um 0,4 \log_{10} . Eine Behandlung für zwei Wochen führte zu einer Verminderung der HBV-DNA um 0,9 \log_{10} für PEG-IFN- α und um 0,5 \log_{10} für PEG-

IFN- λ . Bei gemeinsamer Betrachtung beider Behandlungszeiträume zeigte sich für beide Interferone eine signifikante Reduktion der gesamten HBV-DNA im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p < 0,01$ für PEG-IFN- α und PEG-IFN- λ). Im Vergleich zu PEG-IFN- λ konnte PEG-IFN- α die gesamte HBV-DNA jedoch signifikant stärker reduzieren ($p < 0,01$).

Die cccDNA wurde durch PEG-IFN- α deutlich weniger stark reduziert als die Gesamt-DNA (- 0,4 \log_{10} nach zwei Wochen und - 0,6 \log_{10} nach vier Wochen für die cccDNA). Im Gegensatz dazu wurde die cccDNA durch PEG-IFN- λ in einem ähnlichen Ausmaß verringert wie die Gesamt-DNA (cccDNA-Reduktion um 0,4 \log_{10} nach zwei Wochen und 0,3 \log_{10} nach vier Wochen) (**Abb. 3.6 B und D**). Eine signifikante Reduktion der cccDNA zeigte sich dabei lediglich für die Behandlung mit PEG-IFN- α ($p < 0,01$ für PEG-IFN- α , $p = 0,077$ für PEG-IFN- λ).

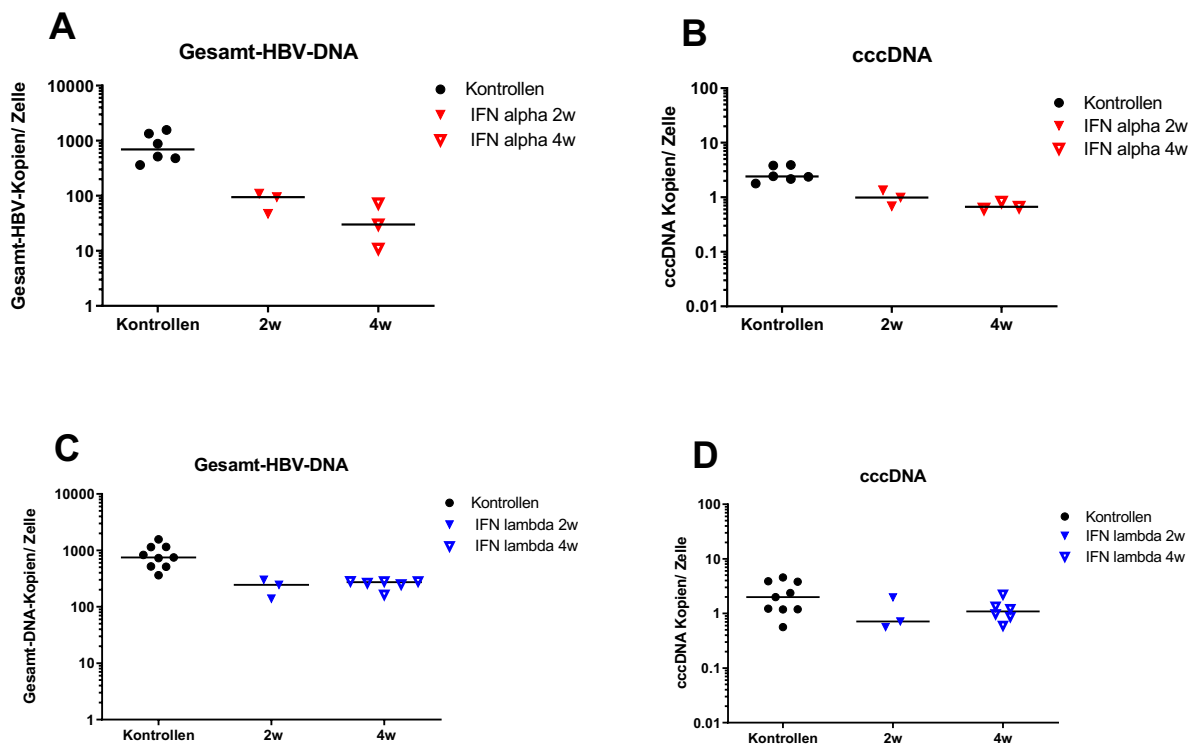


Abbildung 3.6: Intrahepatische HBV-DNA und cccDNA. Intrahepatische Mengen der gesamten HBV-DNA (A und C) und der cccDNA (B und D) für die Behandlung mit PEG-IFN- α (rot, A und B) und PEG-IFN- λ (blau, C und D). Dargestellt ist die Kopienzahl/humanem Hepatozyt normalisiert über humanes β -Globin für die einzelnen Mäuse nach zwei Wochen (volles Dreieck) und vier Wochen (hohles Dreieck) Behandlung sowie für unbehandelte Kontrollmäuse (schwarze Kreise). Die schwarzen horizontalen Linien zeigen den Median der entsprechenden Behandlungsgruppe an. Nach zweiwöchiger PEG-IFN- α -Behandlung ergab sich im Vergleich zum Median der Kontrolltiere eine mediane Reduktion um 0,9 \log_{10} für die HBV-DNA und um 0,4 \log_{10} für die cccDNA. Eine Behandlung von vier Wochen mit PEG-IFN- α erzielte eine Reduktion um 1,4 \log_{10} für die HBV-DNA und 0,6 \log_{10} für die cccDNA. Die Gabe von PEG-IFN- λ führte zu einer medianen Reduktion der HBV-DNA um 0,5 \log_{10} nach zwei Wochen und um 0,4 \log_{10} nach vier Wochen. Die cccDNA wurde

durch Behandlung mit PEG-IFN- λ im Median um 0,4 log₁₀ nach zwei Wochen und 0,3 log₁₀ nach vier Wochen reduziert.

Neben der Menge an HBV-RNA und DNA dient auch die Produktion des Hepatitis-B-Core-Antigens (HBcAg) als Parameter für die intrahepatische Virusaktivität (Allweiss et al. 2017). Um die Wirkung beider Interferone auf das HBcAg zu analysieren, wurde HBcAg zusammen mit Cytokeratin-18 (Ck-18) als Marker für humane Hepatozyten mittels Immunfluoreszenz visualisiert. In **Abbildung 3.7** wird deutlich, dass das HBcAg nach vier Wochen PEG-IFN- α -Behandlung in deutlich weniger humanen Hepatozyten nachgewiesen werden konnte als nach vierwöchiger Behandlung mit PEG-IFN- λ .

Die Ergebnisse der intrahepatischen Analyse zeigen erneut, dass eine anhaltende stabile Suppression von HBV nur durch die Behandlung mit PEG-IFN- α hervorgerufen werden konnte.

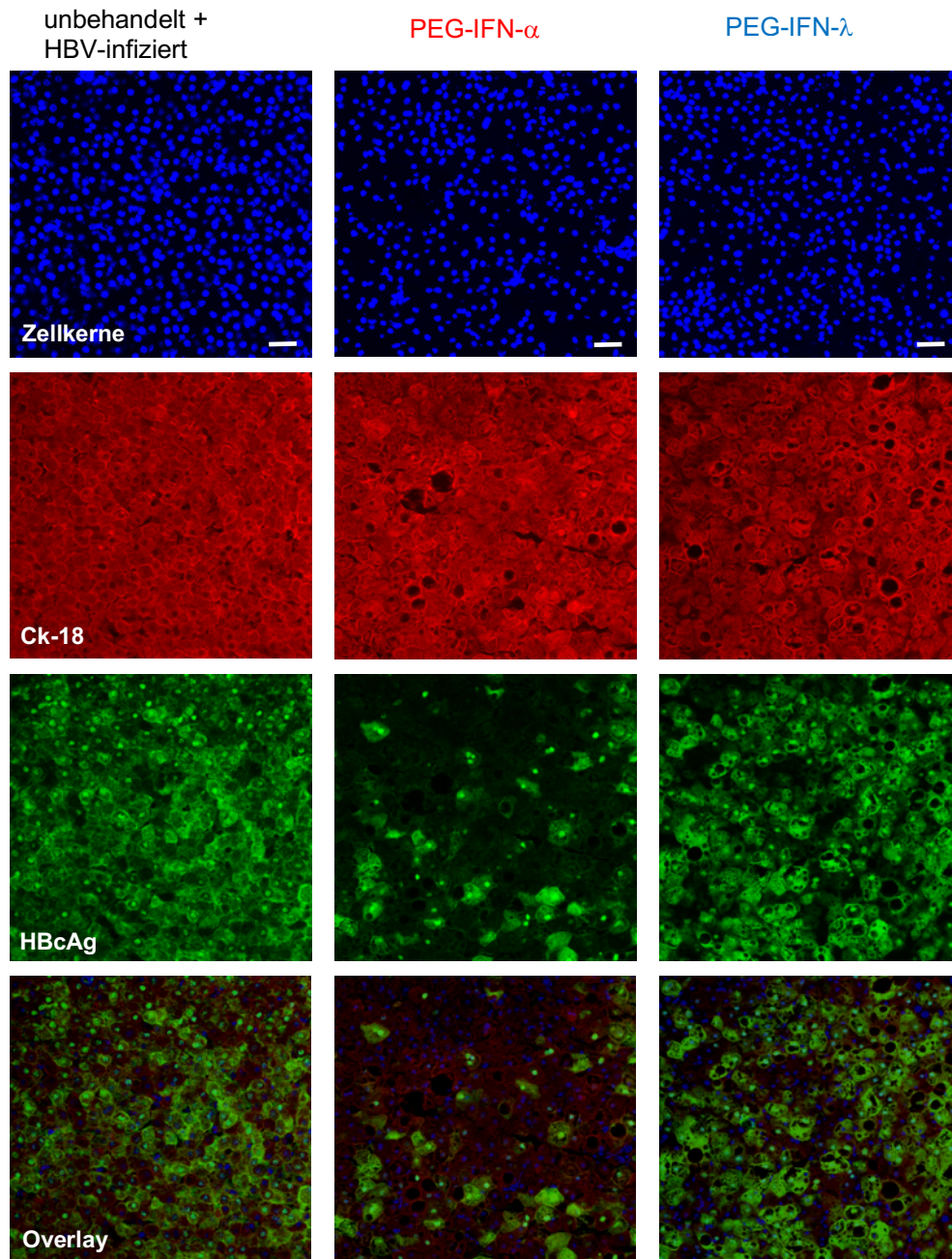


Abbildung 3.7: Immunfluoreszenz-Färbung von HBcAg. Darstellung humaner Hepatozyten über den humanen Marker Cytokeratin-18 (Ck-18) in rot, Zellkerne in blau und HBcAg in grün nach vier Wochen Behandlung (zweite und dritte Spalte) oder in unbehandelten HBV-infizierten Kontrollmäusen (erste Spalte). Im Overlay sind alle Färbungen übereinandergelegt. Der weiße Balken in der Darstellung der Zellkerne entspricht einer Länge von 50 μm . Im Vergleich zu infizierten unbehandelten Kontrolltieren zeigte sich unter PEG-IFN- α -Behandlung im Gegensatz zur Behandlung mit PEG-IFN- λ ein deutlicher Rückgang des HBcAg.

3.1.3 Induktion von Interferon-stimulierten Genen

Die Induktion Interferon-stimulierter Gene (ISGs) gilt als vorrangiger Mechanismus von Interferonen ihre antivirale Aktivität zu vermitteln. Die Transkripte dienen daher als Indikator für die Etablierung eines antiviralen Zustands innerhalb einer Zelle (Rathi et al. 2010, Ashley et al. 2019). Die Produkte der ISGs übernehmen anschließend unter anderem unterschiedliche antivirale Funktionen. Einige behindern die Virusreplikation, andere sind Komponenten des Signalwegs oder verstärken ihn (Schoggins und Rice 2011).

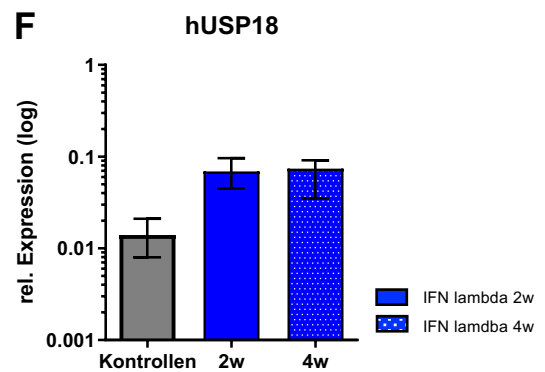
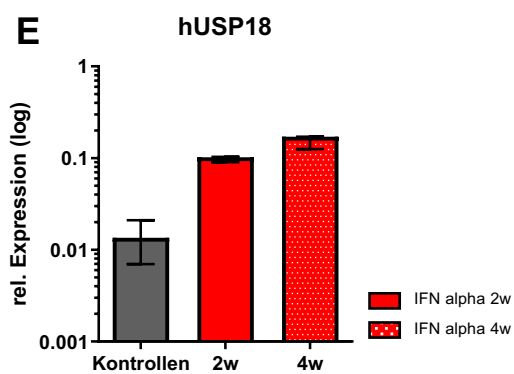
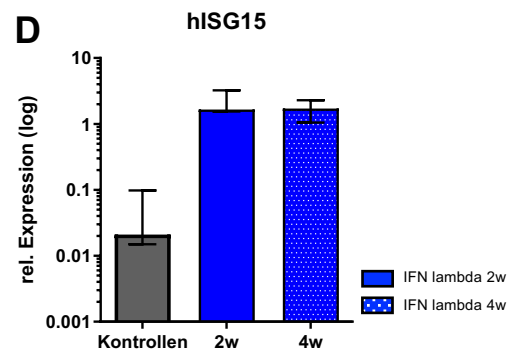
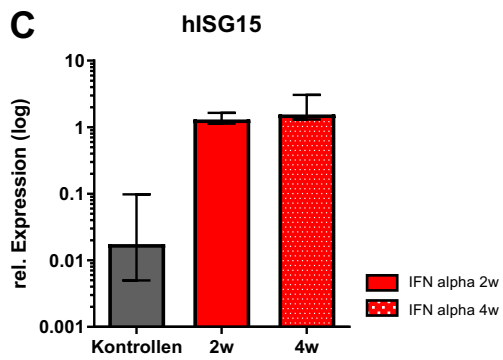
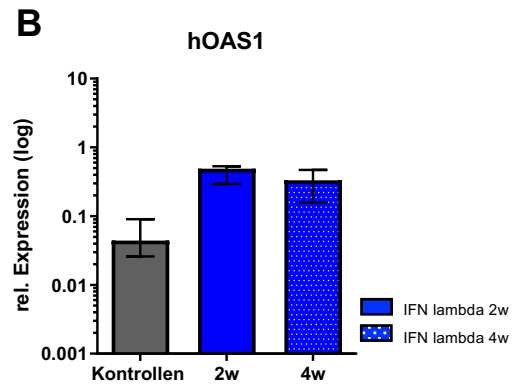
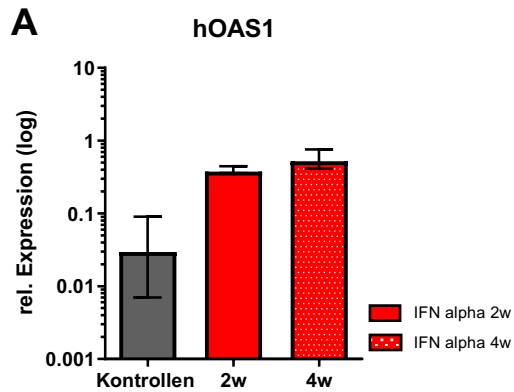
Um zu überprüfen, ob die Beobachtung, dass PEG-IFN- α und PEG-IFN- λ das HBV unterschiedlich stark supprimieren, darin begründet sein könnte, dass PEG-IFN- λ die ISGs nicht aktiviert, wurde die Expression von ISGs in beiden Gruppen mittels qRT-PCR analysiert. Um Effekte in der Höhe der Genexpression durch spenderspezifische Unterschiede zu vermeiden, wurden behandelte Mäuse und unbehandelte Kontrolltiere einer Behandlungsgruppe mit identischen Spenderhepatozyten repopuliert.

Es zeigte sich, dass sowohl eine Behandlung mit PEG-IFN- α als auch mit PEG-IFN- λ nach zwei und vier Wochen Behandlung zu einer klaren Induktion der humanen „klassischen“ ISGs führte ($\Delta 0,7-1,9 \log_{10}$ bzw. 5,2-89,5-fach im Median im Vergleich zu Kontrolltieren) (**Abb. 3.8, Tabelle 3.1**). Untersuchte Vertreter waren die 2'-5'-Oligoadenylatsynthetase 1 (hOAS1), das Interferon-stimulierte Gen 15 (hISG15), die Ubiquitin-spezifische Peptidase 18 (hUSP18) und die MX Dynamamin-ähnliche GTPase 1 (hMX1). Auch ISGs, die in die Antigen-Präsentation (humanes Leukozytenantigen A2, hHLA-A2; Antigenpeptid-Transporter 1, hTAP1) und die Verstärkung der Immunantwort (C-X-C motif chemokine 10, hCXCL10) involviert sind, waren in beiden Behandlungen induziert ($\Delta 0,7-1,9 \log_{10}$ bzw. 4,6-87,3-fach im Median im Vergleich zu Kontrolltieren) (**Abb. 3.9, Tabelle 3.1**). Insgesamt waren die Gene bei Behandlung mit PEG-IFN- λ etwas weniger induziert als mit PEG-IFN- α . Es zeigte sich jedoch für alle untersuchten Gene sowohl für PEG-IFN- α als auch für PEG-IFN- λ eine signifikante Induktion ($p < 0,01$). Zwischen der zweiwöchigen oder vierwöchigen Behandlung ergaben sich keine relevanten Unterschiede.

Tabelle 3.1: Expressionsänderung der ISGs durch Behandlung mit PEG-IFN- α oder PEG-IFN- λ .

Gen	mediane x-fache Änderung der Expression im Vergleich zum Median der unbehandelten Kontrolltiere			
	PEG-IFN- α 2 Wochen	PEG-IFN- α 4 Wochen	PEG-IFN- λ 2 Wochen	PEG-IFN- λ 4 Wochen
hOAS1	12,9x	17,8x	11,2x	7,6x
hISG15	75,6x	89,6x	78,5x	81,2x

hUSP18	7,5x	12,5x	4,9x	5,2x
hMX1	18,7x	17,2x	15,5x	11,1x
hHLA-A2	14,3x	13,0x	8,1x	6,1x
hTAP1	8,9x	15,3x	6,8x	4,6x
hCXCL10	38,7x	87,3x	16,9x	15,0x



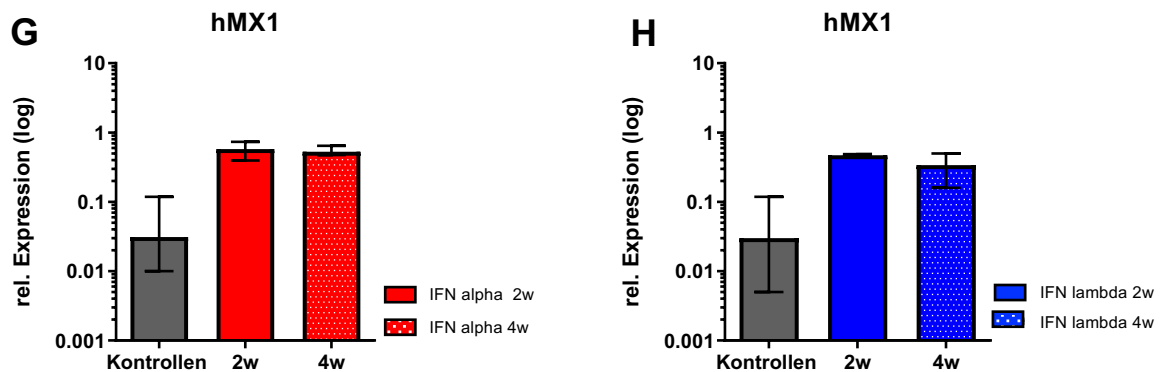
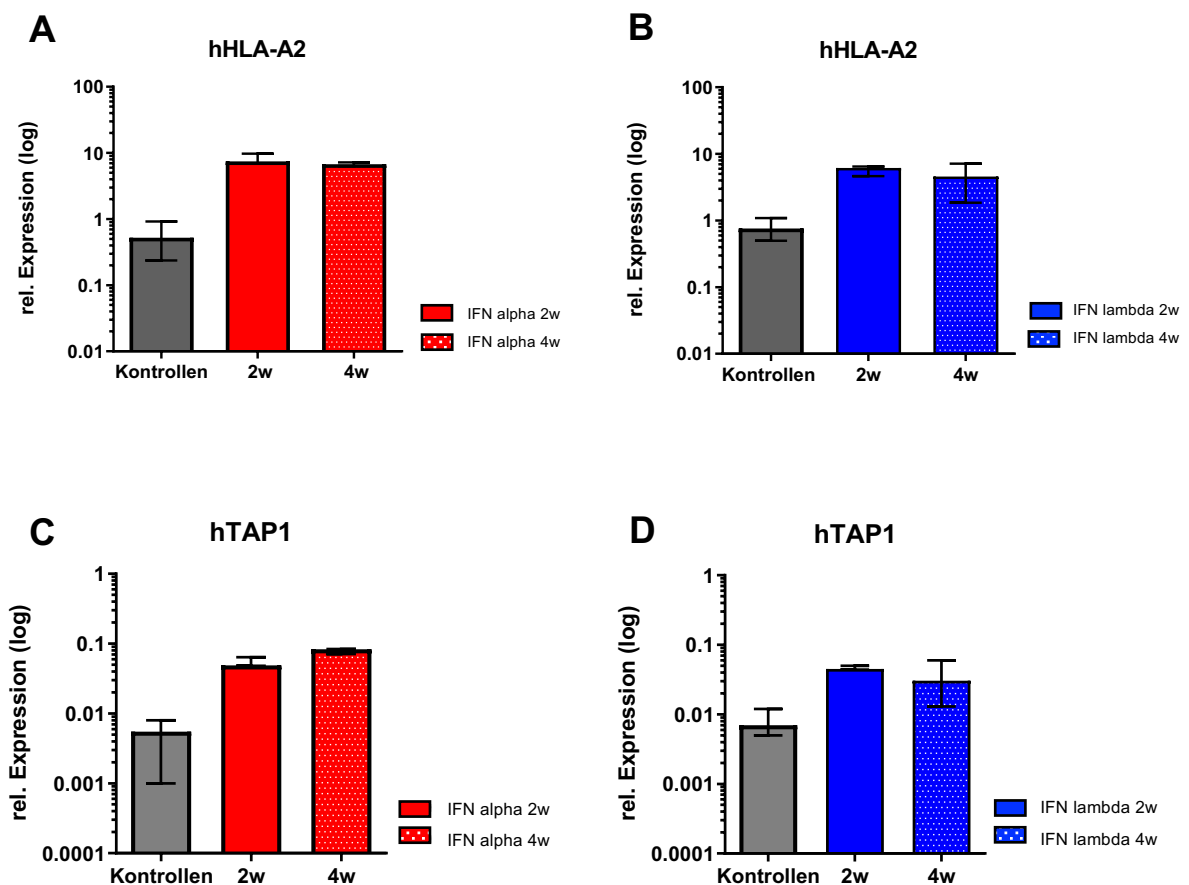


Abbildung 3.8: Induktion klassischer humaner ISGs. (A-H) RNA-Expression klassischer humaner ISGs nach Behandlung mit PEG-IFN- α (rot, A, C, E, G) für zwei und vier Wochen (jeweils $n = 3$) sowie Behandlung mit PEG-IFN- λ (blau, B, D, F, H) für zwei Wochen ($n = 3$) und vier Wochen ($n = 6$). Unbehandelte Kontrollmäuse sind grau dargestellt ($n = 6$ für PEG-IFN- α und $n = 9$ für PEG-IFN- λ). Die Darstellung der Expressionslevel ist relativ zum Mittelwert der humanen „Housekeeper-Gene“ GAPDH und RPL30 und mittels qRT PCR mit human-spezifischen Primern und Sonden gemessen. Die Balken zeigen den Median der jeweiligen Behandlungsgruppe mit zugehöriger Spannweite. Sowohl bei Behandlung mit PEG-IFN- α als auch mit PEG-IFN- λ zeigte sich eine klare Induktion klassischer humaner ISGs.



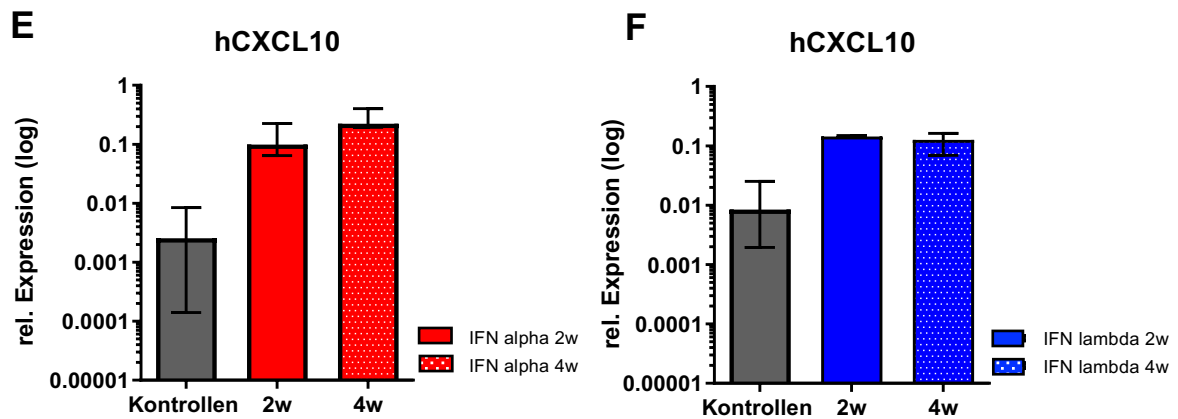


Abbildung 3.9: Induktion weiterer humaner ISGs. (A-F) RNA-Expression humaner ISGs nach Behandlung mit PEG-IFN- α (rot, A, C, E) für zwei und vier Wochen (jeweils $n = 3$) sowie Behandlung mit PEG-IFN- λ (blau, B, D, F) für zwei Wochen ($n = 3$) und vier Wochen ($n = 6$). Unbehandelte Kontrollmäuse sind grau dargestellt ($n = 6$ für PEG-IFN- α und $n = 9$ für PEG-IFN- λ). Die Darstellung der Expressionslevel ist relativ zum Mittelwert der humanen „Housekeeper-Gene“ GAPDH und RPL30 und mittels qRT PCR mit human-spezifischen Primern und Sonden gemessen. Die Balken zeigen den Median der jeweiligen Behandlungsgruppe mit zugehöriger Spannweite. Sowohl bei Behandlung mit PEG-IFN- α als auch mit PEG-IFN- λ zeigte sich eine klare Induktion humaner ISGs.

Um zu überprüfen, ob die ISG-Induktion durch beide Interferone auch eine Erhöhung der betreffenden Proteine zur Folge hat, wurden die Proteine ISG15 und MX1 mittels Immunfluoreszenzfärbung zusammen mit Ck-18 visualisiert. Gefärbt wurden behandelte Mäuse nach vier Wochen Behandlungsdauer, unbehandelte Mäuse, sowie eine uninfizierte unbehandelte Maus als Negativkontrolle. Während beide Proteine in uninfizierten unbehandelten und infizierten unbehandelten Tieren nicht zu detektieren waren, zeigte sich bei Behandlung mit beiden Interferonen eine vergleichbare Zunahme an ISG15 (**Abb. 3.10**) und MX1-Proteinen (**Abb. 3.11**)

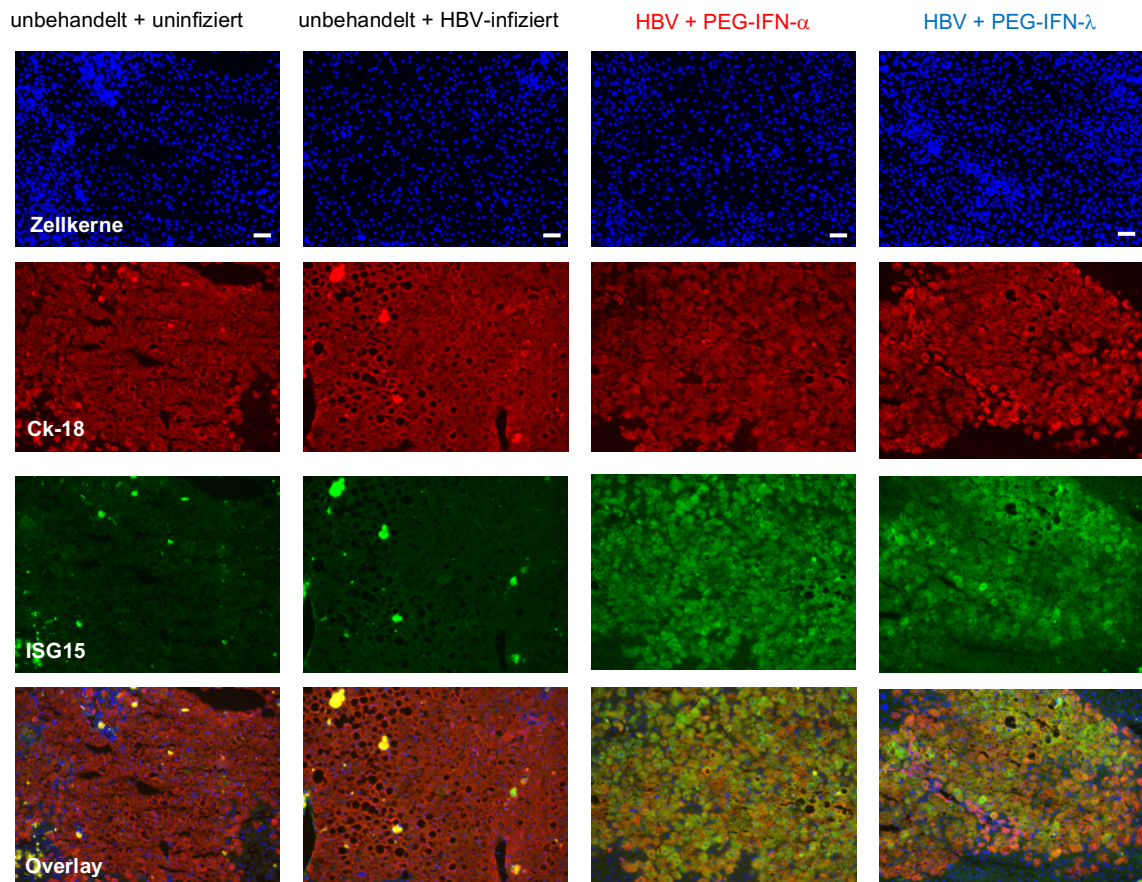


Abbildung 3.10: Immunfluoreszenz-Färbung von humanem ISG15. Darstellung humaner Hepatozyten über den humanen Marker Cytokeratin-18 (Ck-18) in rot, Zellkerne in blau und humanes ISG15 in grün nach vier Wochen Behandlung (dritte und vierte Spalte) oder in unbehandelten uninferierten (erste Spalte) oder HBV-infizierten Kontrollmäusen (zweite Spalte). Im Overlay sind alle Färbungen übereinandergelegt. Der weiße Balken in der Darstellung der Zellkerne entspricht einer Länge von 50 μ m. Im Vergleich zu uninferierten und infizierten unbehandelten Kontrolltieren zeigte sich sowohl unter PEG-IFN- α -Behandlung als auch unter Behandlung mit PEG-IFN- λ eine deutliche Induktion von ISG15.

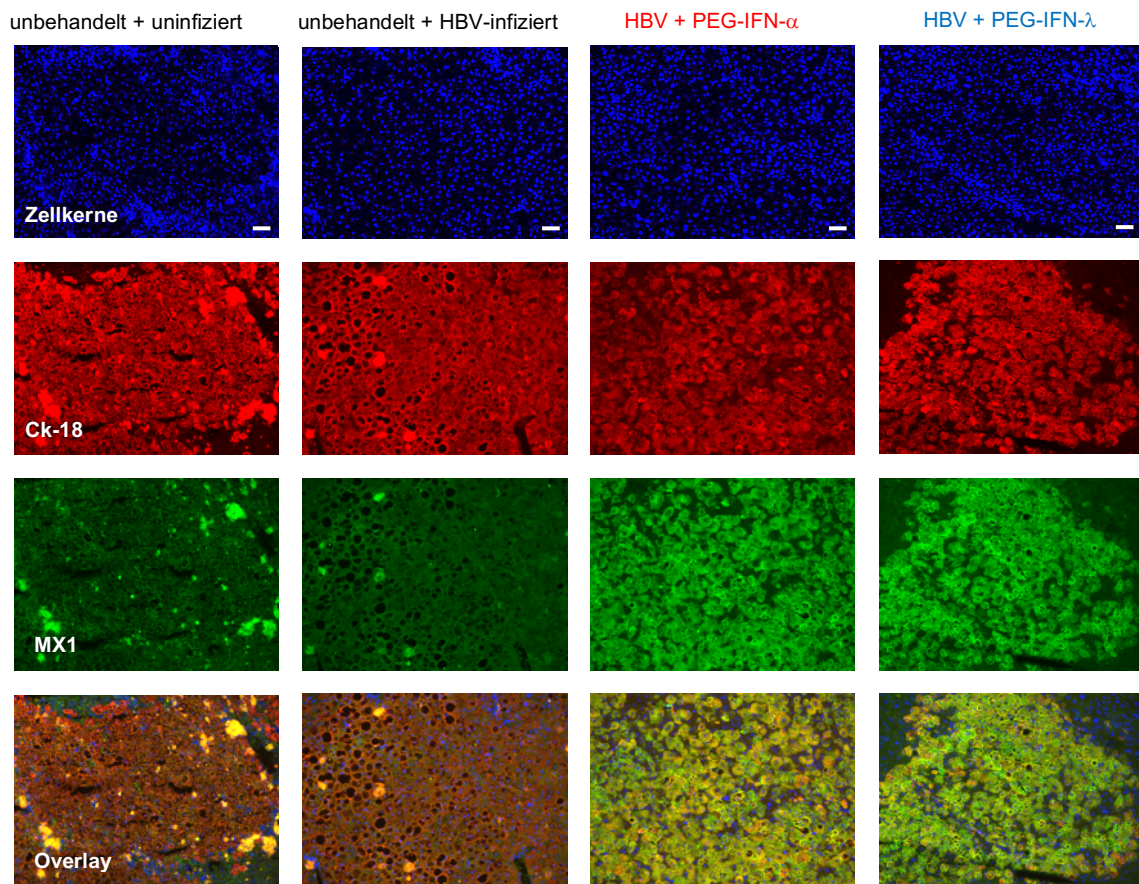


Abbildung 3.11: Immunfluoreszenz-Färbung von humanem MX1. Darstellung humaner Hepatozyten über den humanen Marker Cytokeratin-18 (Ck-18) in rot, Zellkerne in blau und humanes MX1 in grün nach vier Wochen Behandlung (dritte und vierte Spalte) oder in unbehandelten uninferierten (erste Spalte) oder HBV-inferierten Kontrollmäusen (zweite Spalte). Im Overlay sind alle Färbungen übereinandergelegt. Der weiße Balken in der Darstellung der Zellkerne entspricht einer Länge von 50µm. Im Vergleich zu uninferierten und infizierten unbehandelten Kontrolltieren zeigte sich sowohl unter PEG-IFN- α -Behandlung als auch unter Behandlung mit PEG-IFN- λ eine deutliche Induktion von MX1.

Neben humanen Hepatozyten befinden sich murine Zellen in den Lebern der chimären Mäuse. Um zu überprüfen, ob PEG-IFN- α und PEG-IFN- λ auch auf murine Zellen in der Mausleber wirken, wurde die Genexpression von den murinen ISGs mOas1b und mMx1 untersucht (**Abb. 3.12**).

Für PEG-IFN- α zeigte sich im Median für beide Gene keine signifikante Steigerung der Expression ($p = 0,31$ für mOas1b, $p = 0,94$ für mMx1). Bei der Behandlung mit PEG-IFN- λ zeigte sich eine signifikante Steigerung der Expression für mMx1 ($p < 0,01$) und mOAS1b ($p < 0,05$). Nach zwei Wochen Behandlung war für mMx1 eine 4,5-fache Erhöhung in Vergleich zum Median der Kontrolltiere auszumachen. Es ist also nicht komplett auszuschließen, dass auch murine ISGs einen Teil zu dem Effekt durch PEG-IFN- λ insbesondere nach zwei Wochen beigetragen haben könnten.

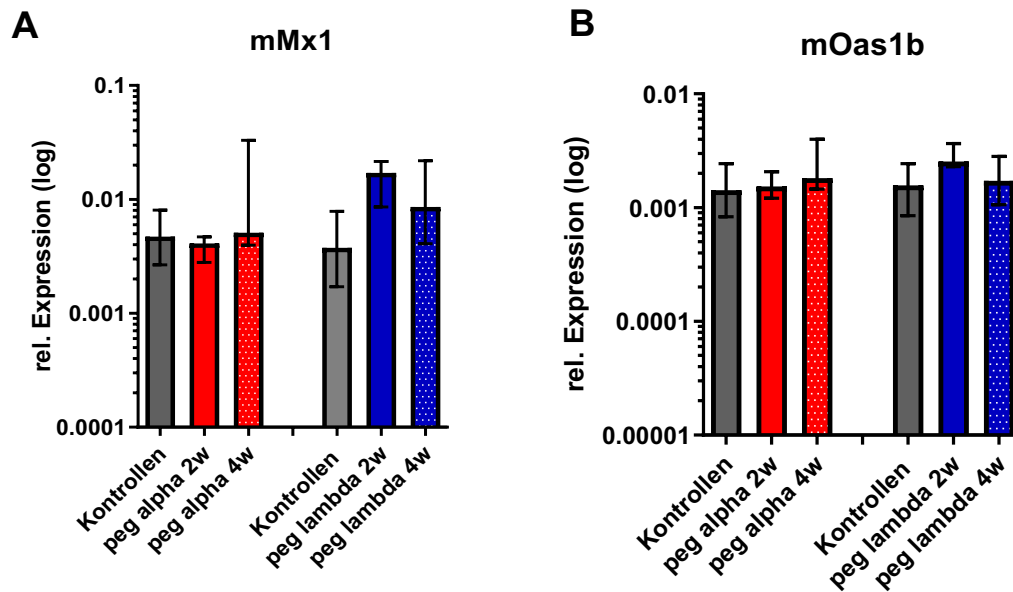


Abbildung 3.12: Induktion muriner ISGs. (A und B) RNA-Expression der murinen ISGs mOas1b und mMx1 nach Behandlung mit PEG-IFN- α (rot) für zwei (einfarbig) und vier Wochen (gepunktet, jeweils $n = 3$) sowie Behandlung mit PEG-IFN- λ (blau) für zwei Wochen (einfarbig, $n = 3$) und vier Wochen (gepunktet, $n = 6$). Unbehandelte Kontrollmäuse sind grau dargestellt ($n = 6$ für PEG-IFN- α und $n = 9$ für PEG-IFN- λ). Die Darstellung der Expressionslevel ist relativ zum Mittelwert der murinen „Housekeeper-Gene“ Actb und Eef2 und mittels qRT PCR mit Maus-spezifischen Primern und Sonden gemessen. Die Balken zeigen den Median der jeweiligen Behandlungsgruppe mit zugehöriger Spannweite.

3.1.3.1 Expression von STAT1 und zelluläre Lokalisation

Sowohl IFN- α als auch IFN- λ nutzen den JAK/STAT-Signalweg, um die ISGs zu induzieren (Lin und Young 2014). Am Ende dieses Signalwegs bilden Proteine der Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT)-Familie Dimere und translozieren in den Zellkern, um dort als Transkriptionsfaktoren die Genexpression der ISGs zu initiieren (Lin und Young 2014). Es sollte überprüft werden, ob dieser Weg von beiden Interferonen aktiviert wird und STAT-Proteine im Zellkern zu finden sind.

Die Genexpressionsanalyse zeigte, dass humanes STAT1 in beiden Behandlungsgruppen ähnlich stark und jeweils signifikant induziert wurde ($p < 0,01$ für PEG-IFN- α und PEG-IFN- λ) (**Abb. 3.13**). Um auf Proteinebene zu bestätigen, dass nach Behandlung mit PEG-IFN- α und PEG-IFN- λ vermehrt STAT-Proteine in den Hepatozyten zu finden sind und um die intrazelluläre Verteilung zu beurteilen, wurde STAT1 mit Immunfluoreszenz gefärbt. Wie bereits bei ISG15 und MX1 wurde die Färbung nach vierwöchiger Behandlung für Tiere beider Behandlungen, für unbehandelte Tiere und einer uninfizierten Negativkontrolle durchgeführt. Als humaner Marker wurde hier SP100 verwendet. Wie in **Abb. 3.14** deutlich wird, zeigte sich ein leichtes Signal in den Zellkernen uninfizierter Tiere, in unbehandelten HBV-infizierten Tieren war das Signal schwächer ausgebildet. Bei infizierten und

behandelten Tieren war für beide Interferone eine vergleichbar deutliche Zunahme des Fluoreszenzsignals und eine Akkumulation der Proteine im Zellkern zu beobachten.

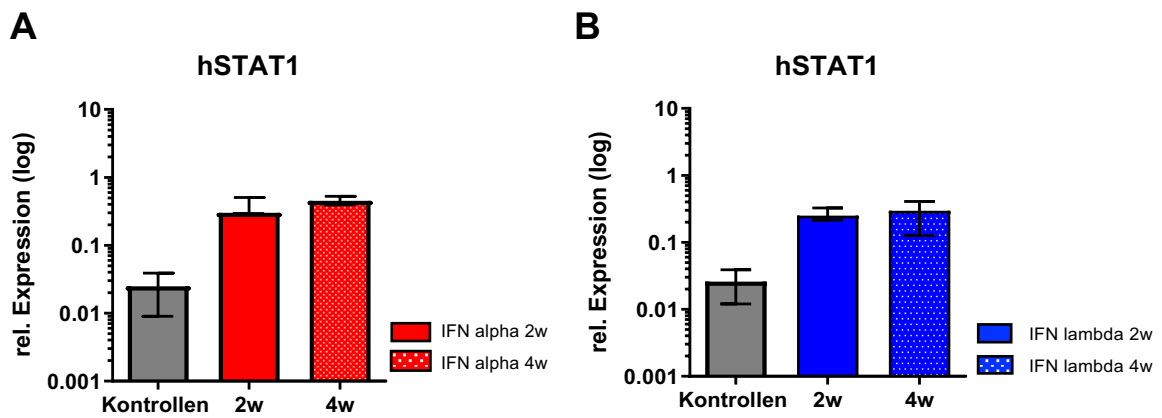


Abbildung 3.13: Induktion von humanem STAT1. (A und B) RNA-Expression des humanen STAT1 nach Behandlung mit PEG-IFN- α (rot) für zwei (einfarbig) und vier Wochen (gepunktet, jeweils $n = 3$) sowie Behandlung mit PEG-IFN- λ (blau) für zwei Wochen (einfarbig, $n = 3$) und vier Wochen (gepunktet, $n = 6$). Unbehandelte Kontrollmäuse sind grau dargestellt ($n = 6$ für PEG-IFN- α und $n = 9$ für PEG-IFN- λ). Die Darstellung der Expressionslevel ist relativ zum Mittelwert der humanen „Housekeeper-Gene“ GAPDH und RPL30 und mittels qRT PCR mit human-spezifischen Primern und Sonden gemessen. Die Balken zeigen den Median der jeweiligen Behandlungsgruppe mit zugehöriger Spannweite. Die Expression von STAT1 wurde durch Behandlung mit PEG-IFN- α im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren nach zwei Wochen 11,5-fach und nach vier Wochen 17,3-fach gesteigert. PEG-IFN- λ steigerte die Expression nach zwei Wochen 9,6-fach und nach vier Wochen 11,3-fach im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren.

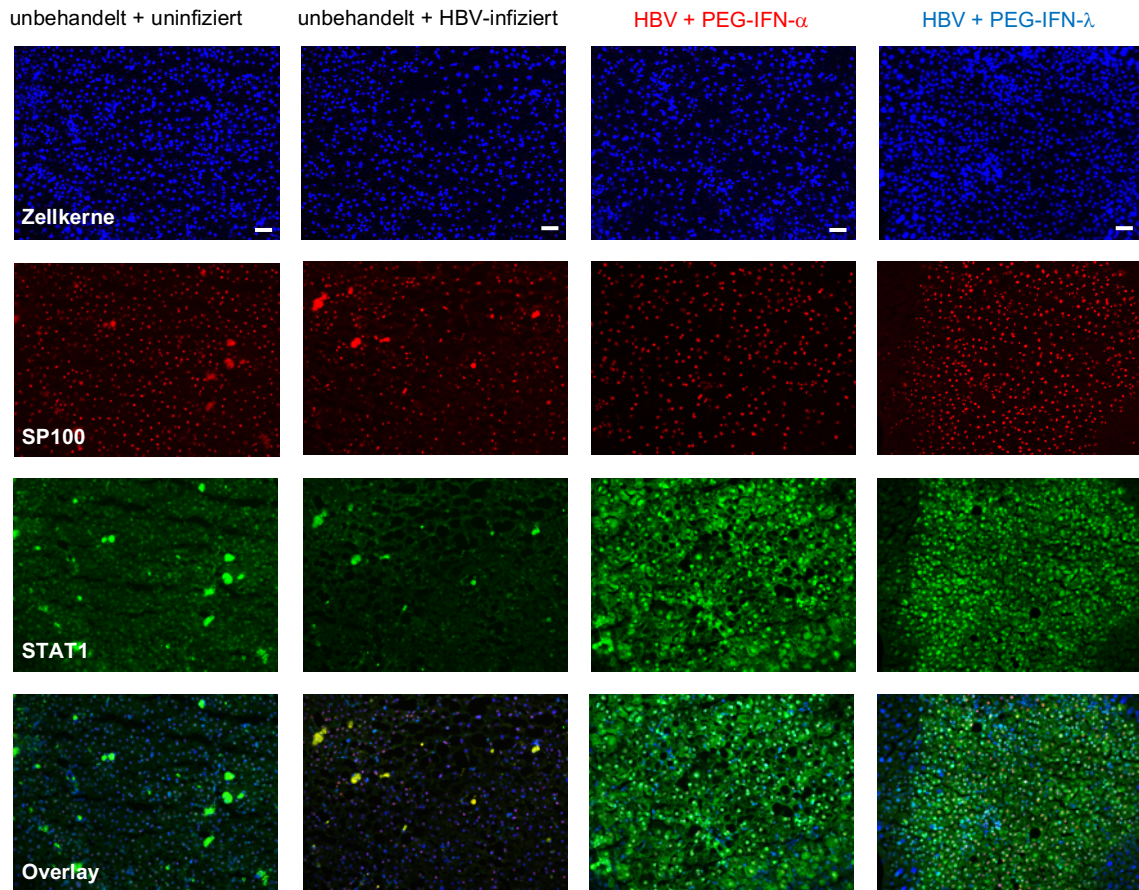


Abbildung 3.14: Immunfluoreszenz-Färbung von humanem STAT1. Darstellung humaner Hepatozyten über das Kernprotein SP100 in rot, Zellkerne in blau und humanes STAT1 in grün nach vier Wochen Behandlung (dritte und vierte Spalte) oder in unbehandelten uninfizierten (erste Spalte) oder HBV-infizierten Kontrollmäusen (zweite Spalte). Im Overlay sind alle Färbungen übereinandergelegt. Der weiße Balken in der Darstellung der Zellkerne entspricht einer Länge von 50µm. Im Vergleich zu uninfizierten und infizierten unbehandelten Kontrolltieren zeigte sich sowohl unter PEG-IFN- α -Behandlung als auch Behandlung mit PEG-IFN- λ eine deutliche Induktion von STAT1-Proteinen sowie eine Translokation in den Zellkern der Hepatozyten.

Insgesamt zeigten sich in der Analyse der ISGs im Gegensatz zu den viralen Parametern nur leichte Unterschiede zwischen PEG-IFN- α und PEG-IFN- λ . Einige Gene waren durch PEG-IFN- λ etwas schwächer induzierbar als durch PEG-IFN- α . Diese Unterschiede scheinen jedoch nicht ausreichend zu erklären, wie der deutliche Unterschied in der Suppression des HBV zu Stande kommt.

3.1.3.2 Expression von APOBEC3-Genen

Eine weitere Gruppe von ISGs sind die APOBEC3-Gene (Apolipoprotein B Editing Complex 3-Gene). Dabei handelt es sich um eine Familie von Cytidin-Deaminasen, die das Genom verschiedener Viren destabilisieren (Stavrou und Ross 2015). In Zellkultur und menschlichen Leberbiopsien konnte gezeigt werden, dass verschiedene Mitglieder der Familie durch eine Behandlung mit IFN- α induziert werden können (Lucifora et al. 2014, Li et al. 2017). Zwei der Mitglieder (APOBEC3A und APOBEC3B) sind im Zellkern lokalisiert (Warren et al. 2017). Für APOBEC3A konnte in Zellkultur gezeigt werden, dass es zu einer Degradierung der cccDNA führen kann (Lucifora et al. 2014).

Es sollte daher überprüft werden, ob die APOBEC-Gene auch in humanisierten Mäusen induziert werden und eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Wirkstärke von PEG-IFN- α und PEG-IFN- λ liefern können, auch wenn eine Reduktion der cccDNA für beide Interferone beobachtet wurde. Dazu wurde die relative Expression der APOBEC-Mitglieder wie auch bei den vorherigen ISGs mittels qRT-PCR bestimmt.

Alle untersuchten APOBEC3-Gene (A, B, C, F und G) waren nur sehr niedrig exprimiert und insbesondere innerhalb der Kontrollgruppen zeigten sich starke Schwankungen. Es ist daher nicht auszuschließen, dass Unterschiede zwischen den Gruppen durch Schwankungen hervorgerufen sein können. Zwischen einer Behandlung mit PEG-IFN- α oder PEG-IFN- λ waren keine deutlichen Unterschiede zu verzeichnen. Bei beiden Interferonen war APOBEC3A in humanen Hepatozyten nicht exprimiert und konnte auch nicht induziert werden. Für APOBEC3C zeigte sich ebenfalls keine signifikante Induktion ($p = 0,065$ für PEG-IFN- α , $p = 0,489$ für PEG-IFN- λ). Eine signifikante Steigerung der Genexpression konnte für beide Interferone bei APOBEC3F ($p = 0,015$ für PEG-IFN- α , $p < 0,01$ für PEG-IFN- λ) und APOBEC3G ($p < 0,01$ für PEG-IFN- α und PEG-IFN- λ) beobachtet werden. APOBEC3B konnte nur von PEG-IFN- λ signifikant induziert werden ($p < 0,01$) (**Abb. 3.15**).

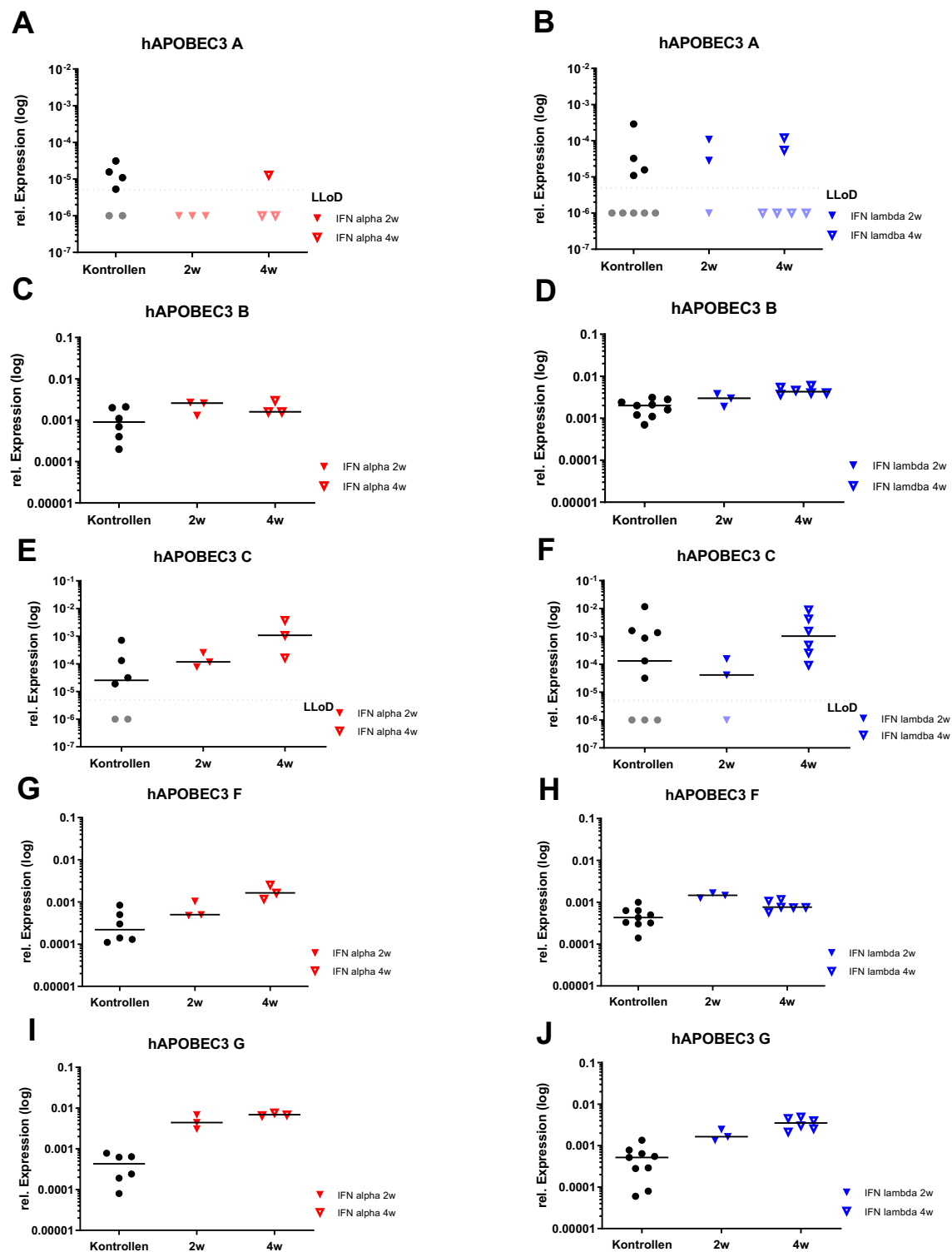


Abbildung 3.15: Expressionsanalyse der humanen APOBEC3-Gene. (A-J) RNA-Expression der humanen APOBEC3-Gene A, B, C, F und G nach Behandlung mit PEG-IFN- α (rot, A, C, E, G, I) für zwei und vier Wochen (jeweils $n = 3$) sowie Behandlung mit PEG-IFN- λ (blau, B, D, F) für zwei Wochen ($n = 3$) und vier Wochen ($n = 6$). Die Darstellung der Expressionslevel ist relativ zum Mittelwert der humanen „Housekeeper-Gene“ GAPDH und RPL30 und mittels qRT PCR mit human-spezifischen Primern und Sonden gemessen. Aufgezeigt sind die einzelnen Mäuse nach zwei (komplettes Dreieck) und vier Wochen (hohes Dreieck) Behandlung sowie unbehandelte Kontrollmäuse (schwarze Kreise). Die schwarzen horizontalen Linien zeigen den Median der entsprechenden Behandlungsgruppe an, die gestrichelte horizontale Linie gibt die untere Messgrenze (lower limit of detection, LLoD) an.

3.1.4 Effekt auf den SMC5/6-Komplex

Das HBx-Protein ist ein regulatorisches HBV Protein, welches essentiell für die virale Replikation ist (Lucifora et al. 2011, Murphy et al. 2016, Livingston et al. 2017). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass HBx über Degradation der zelleigenen Proteine SMC5 und SMC6 eine Steigerung der Transkription der viralen RNAs von der cccDNA ermöglicht (Decorsiere et al. 2016, Mitra und Guo 2016, Murphy et al. 2016, Livingston et al. 2017). Die Proteine SMC5 und SMC6 bilden in Zellen mit Nicht-SMC-Elementen einen Komplex, der wichtige Funktionen in Bezug auf die Stabilität und Dynamik der Wirtsgenoms übernimmt (Diaz und Pecinka 2018). Gleichzeitig scheint der Komplex als antiviraler Restriktionsfaktor zu dienen, der die virale Transkription von der cccDNA behindert (Decorsiere et al. 2016). Durch Interaktion mit DDB1 führt HBx zur Bildung des Cul4-DDB1-HBx-E3-Ligase-Komplex. Dieser Komplex bewirkt die Ubiquitinylierung und anschließende Degradation von SMC5 und SMC6, wodurch die virale Replikation verstärkt wird (Murphy et al. 2016, Livingston et al. 2017).

Die serologischen und intrahepatischen Analysen zeigten, dass PEG-IFN- α die Produktion viraler DNA und RNA stärker unterdrücken konnte als PEG-IFN- λ . Es stellte sich die Frage, ob sich dadurch auch Unterschiede in der Transkription von HBx und damit auf die Degradierung des SMC5/6-Komplexes ergaben.

Um diese Frage zu klären, wurde in einem ersten Schritt die Genexpression von SMC6 analysiert, um zu überprüfen, ob sich Unterschiede in der Induktion zwischen PEG-IFN- α und PEG-IFN- λ finden. Dabei zeigte sich bei gemeinsamer Betrachtung beider Behandlungszeiträume im Vergleich zu den Kontrolltieren für PEG-IFN- α eine knapp signifikante Steigerung der Expression ($p = 0,041$; 1,4-fache Steigerung nach zwei Wochen, 1,3-fache Steigerung nach vier Wochen). Für PEG-IFN- λ zeigte sich keine signifikante Induktion ($p = 0,077$; keine Expressionssteigerung nach zwei Wochen, 1,6-fache Steigerung nach vier Wochen) (**Abb. 3.17**). Zwischen beiden Behandlungen fand sich jedoch kein signifikanter Unterschied in der Induktion von SMC6 ($p = 0,181$).

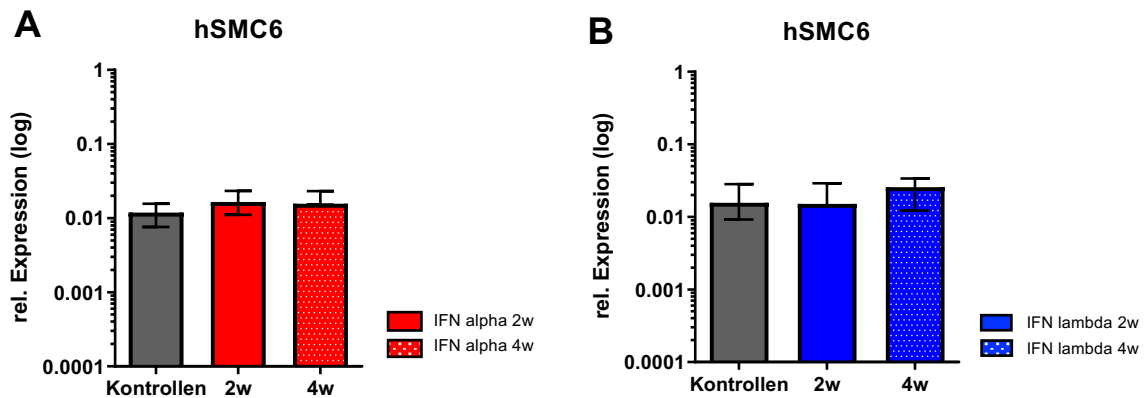


Abbildung 3.16: Induktion von humaner SMC6-mRNA. (A und B) RNA-Expression des humanen SMC6 nach Behandlung mit PEG-IFN- α (rot) für zwei (einfarbig) und vier Wochen (gepunktet, jeweils $n = 3$) sowie Behandlung mit PEG-IFN- λ (blau) für zwei Wochen (einfarbig, $n = 3$) und vier Wochen (gepunktet, $n = 6$). Unbehandelte Kontrollmäuse sind grau dargestellt ($n = 6$ für PEG-IFN- α und $n = 9$ für PEG-IFN- λ). Die Darstellung der Expressionslevel ist relativ zum Mittelwert der humanen „Housekeeper-Gene“ GAPDH und RPL30 und mittels qRT PCR mit human-spezifischen Primern und Sonden gemessen. Die Balken zeigen den Median der jeweiligen Behandlungsgruppe mit zugehöriger Spannweite. Die Expression von SMC6 wurde durch Behandlung mit PEG-IFN- α im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren nach zwei Wochen 1,4-fach und nach vier Wochen 1,3-fach gesteigert. PEG-IFN- λ führte im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren nach zwei Wochen zu keiner Steigerung der Expression. Nach vier Wochen war eine 1,6-fache Expressionssteigerung auszumachen.

In einem zweiten Schritt wurde weiterhin untersucht, ob Unterschiede in der Degradierung des Komplexes zwischen beiden Interferonen zu finden sind. Dafür wurde SMC6 zusammen mit HBcAg mittels Immunfluoreszenz gefärbt. Als Kontrollen dienten uninfizierte unbehandelte Tiere und mit dem HBV infizierte unbehandelte Tiere. SMC6 war in den uninfizierten Tieren deutlich detektierbar, HBcAg konnte hingegen nicht gefärbt werden (**Abb. 3.18 Spalte 1**). In infizierten behandelten Tieren verhielt es sich gegenteilig. Während HBcAg gut zu detektieren war, konnte Smc6 nicht nachgewiesen werden (**Abb. 3.18 Spalte 2**). Dies entspricht der kürzlich erbrachten Erkenntnis, dass HBx zur Degradierung des SMC5/6-Komplexes führt.

Für die Behandlungsgruppen zeigte sich, dass SMC6 nach vier Wochen bei Mäusen mit PEG-IFN- α Behandlung zu detektieren war, durch Gabe von PEG-IFN- λ war SMC6 jedoch nicht zu visualisieren (**Abb. 3.18 Spalte 3 und 4**). Dieses Ergebnis spricht dafür, dass der SMC5/6-Komplex unter PEG-IFN- α -Behandlung zurückkommt, das heißt nicht weiterhin degradiert wird, während er bei PEG-IFN- λ weiter abgebaut.

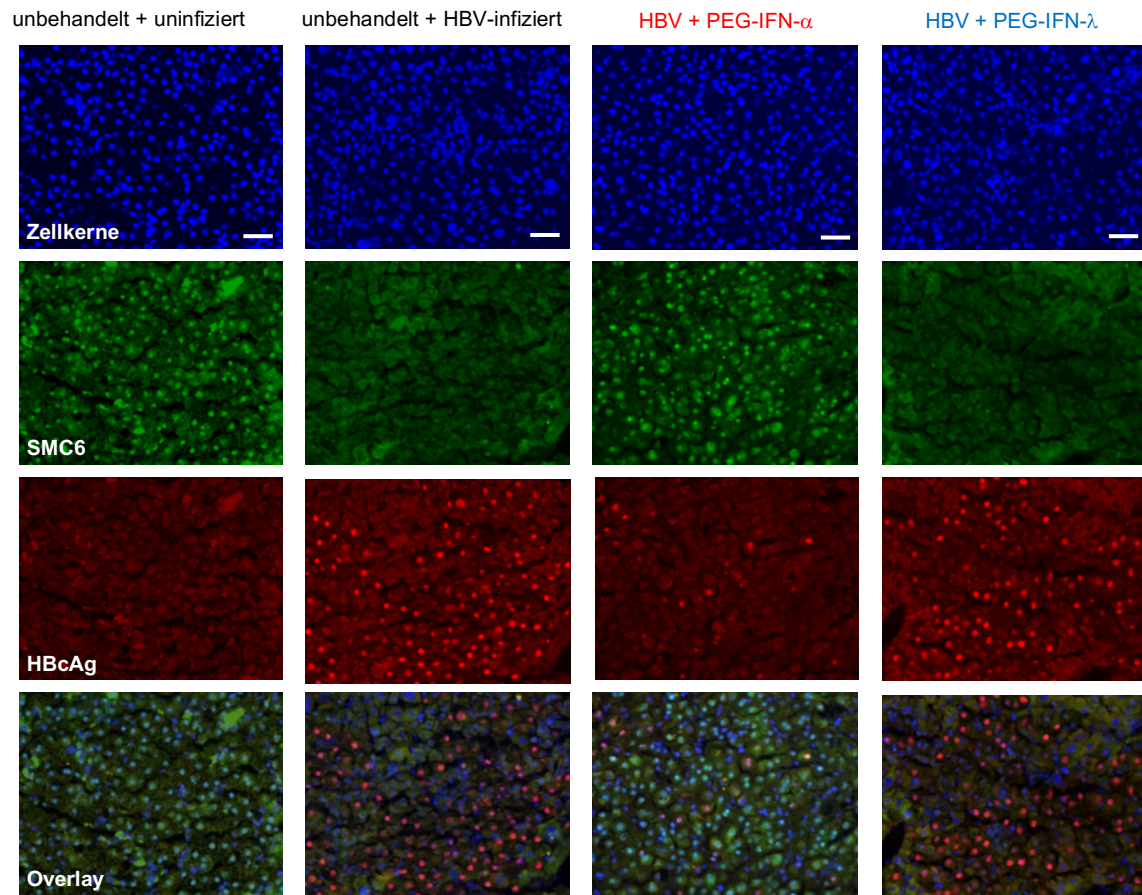


Abbildung 3.17: Immunfluoreszenz-Färbung von humanem SMC6. Darstellung von HBcAg in rot, SMC6 in grün und Zellkernen in blau nach vier Wochen Behandlung (dritte und vierte Spalte) oder in unbehandelten uninfizierten (erste Spalte) oder HBV-infizierten Kontrollmäusen (zweite Spalte). Im Overlay sind alle Färbungen übereinandergelegt. Der weiße Balken in der Darstellung der Zellkerne entspricht einer Länge von 50 μ m. SMC6 konnte sowohl in uninfizierten Tieren als auch nach Behandlung mit PEG-IFN- α nachgewiesen werden. Nach Behandlung mit PEG-IFN- λ war SMC6 nicht zu detektieren.

3.2 Antivirale Effekte von Interferon- α und Interferon- γ in HBV-infizierten und uninfizierten uPA/SCID-Mäusen

Nachdem im ersten Teil dieser Arbeit Wirkunterschiede von IFN- α und IFN- λ analysiert wurden, um nähere Einblicke in antivirale Mechanismen zu erhalten, wurde im zweiten Teil die Wirkung von IFN- γ vergleichend zu IFN- α näher untersucht. Da von IFN- γ keine pegylierte Form existiert, standen in diesem Experiment im Gegensatz zum ersten Teil kurzfristige Effekte der Interferone im Vordergrund. Es wurde analysiert, ob IFN- γ oder IFN- α in der Lage sind, bereits kurzfristig nach einer einmaligen Dosis antivirale Aktivität auszuüben. Im ersten Schritt der Untersuchung wurden dafür zunächst humanisierte uPA/SCID-Mäuse mit einem viralen Titer von 1×10^7 bis 1×10^{10} HBV-DNA Kopien/ml (8×10^8 Kopien/ml im Median) einmalig mit nicht-pegyliertem IFN- γ ($n = 3$) oder IFN- α ($n = 2$) behandelt oder erhielten keine Behandlung ($n = 4$) und wurden acht Stunden später getötet (**vgl. Kapitel 2.2.3**). Das Acht-Stunden-Fenster wurde ausgewählt, da Voruntersuchungen der Genexpressionskinetik bei uninfizierten mit IFN- α behandelten Tieren zeigten, dass nach acht Stunden eine deutliche Zunahme der Expression von ISGs zu erwarten ist (Lütgehetmann et al. 2011).

3.2.1 Einfluss auf serologische virale Parameter

Für die Untersuchung des antiviralen Effekts beider Interferone wurden zunächst serologische Analysen durchgeführt.

Wie in **Abbildung 3.18** dargestellt, konnten beide Interferone nach einmaliger Gabe die Virämie im Median zur Baseline um $0,3 \log_{10}$ reduzieren. Die Virämie der Kontrolltiere blieb stabil oder stieg weiter an. Auch die pgRNA konnte von beiden Interferonen reduziert werden, wobei der Effekt für IFN- γ stärker ausgeprägt war ($-0,5 \log_{10}$ für IFN- γ im Median; $-0,2 \log_{10}$ für IFN- α im Median) (**Abb. 3.19**). Bei den viralen Antigenen konnte weder IFN- γ noch IFN- α eine Reduktion hervorrufen (**Abb. 3.20 und 3.21**). Eine leichte Tendenz zeigte sich bei IFN- γ für das HBsAg, welches um $0,1 \log_{10}$ verringert werden konnte.

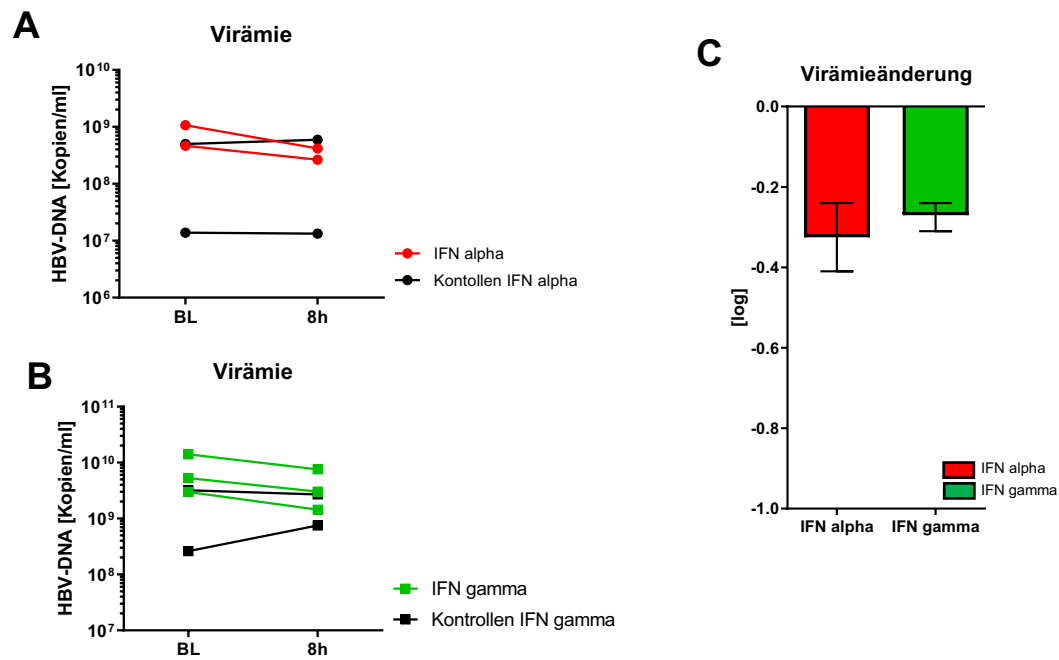


Abbildung 3.18: HBV-Virämie. Zeitliche Entwicklung der Virämie (DNA-Kopien/ml) nach achtstündiger Behandlung mit IFN- α (rot) (A) oder IFN- γ (grün) (B) oder ohne Behandlung (graue Linie in A und B) für die einzelnen Mäuse. Der Graph (C) zeigt die Änderung der Virämie in \log_{10} nach Behandlung mit IFN- α (n = 2) und IFN- γ (n = 3) in Bezug zur Baseline, die für jede Maus einzeln berechnet wurde. Die Balken zeigen den Median der jeweiligen Behandlungsgruppe (rot = IFN- α , grün = IFN- γ) mit zugehöriger Spannweite. Beide Behandlungen führten im Median zu einer Reduktion der HBV-DNA-Kopien um 0,3 \log_{10} .

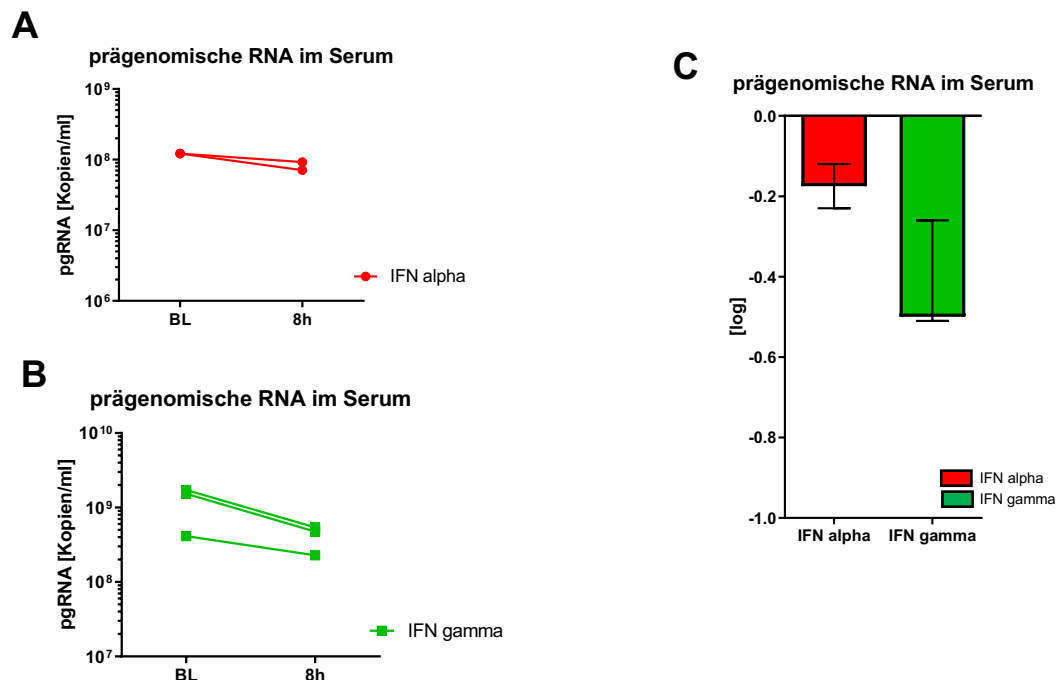


Abbildung 3.19: Prägenomische RNA im Serum. Zeitliche Entwicklung von zirkulierender pgRNA gemessen als RNA-Kopienanzahl/ml nach achtstündiger Behandlung IFN- α (rot) (A) oder IFN- γ (grün) (B) für die einzelnen Mäuse. (C) stellt die Änderung der pgRNA-Menge zur Baseline dar, die für jede Maus einzeln berechnet wurde. Die Balken entsprechen den medianen Werten der Berechnungen mit zugehöriger Spannweite für IFN- α (rot, n = 2) und IFN- γ (grün, n = 3). Eine Behandlung mit IFN- α führte zu einer medianen Reduktion um -0,2 \log_{10} , eine Behandlung mit IFN- γ zu einer Reduktion von 0,5 \log_{10} .

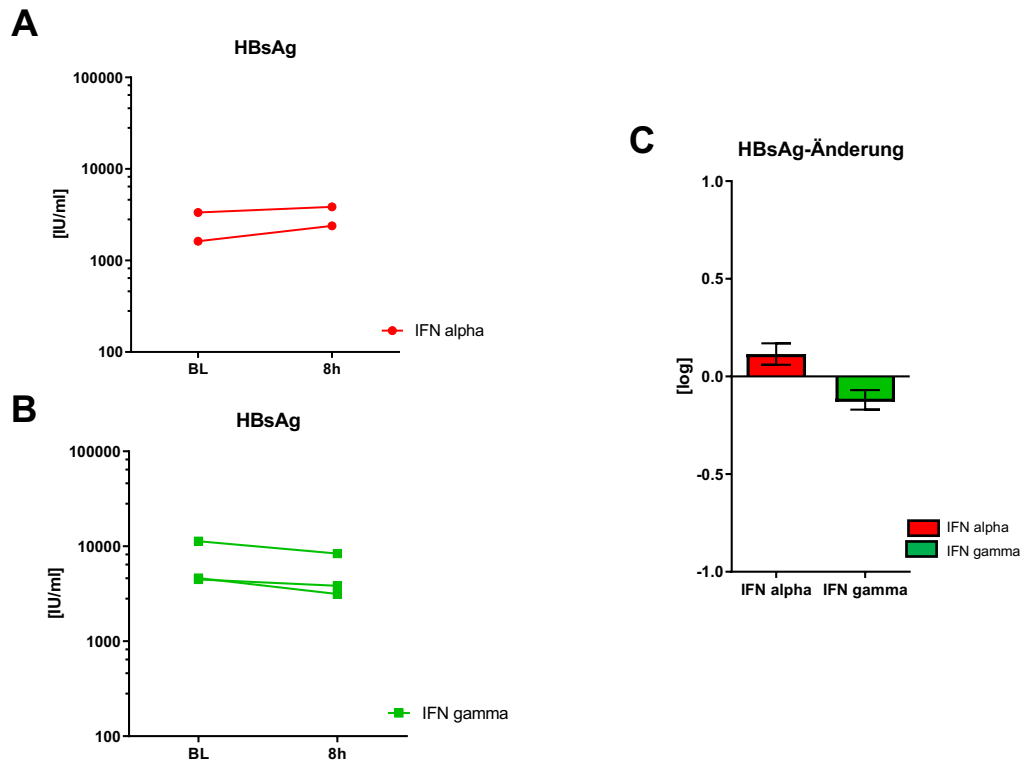


Abbildung 3.20: HBsAg im Serum. Zeitliche Entwicklung von zirkulierendem HBsAg gemessen in Units/ml nach achtstündiger Behandlung mit IFN- α (rot) (A) oder IFN- γ (grün) (B) für die einzelnen Mäuse. (C) stellt die Änderung der HBsAg-Menge zur Baseline dar, die für jede Maus einzeln berechnet wurde. Die Balken entsprechen den medianen Werten der Berechnungen mit zugehöriger Spannweite für IFN- α (rot, n = 2) und IFN- γ (grün, n = 3).

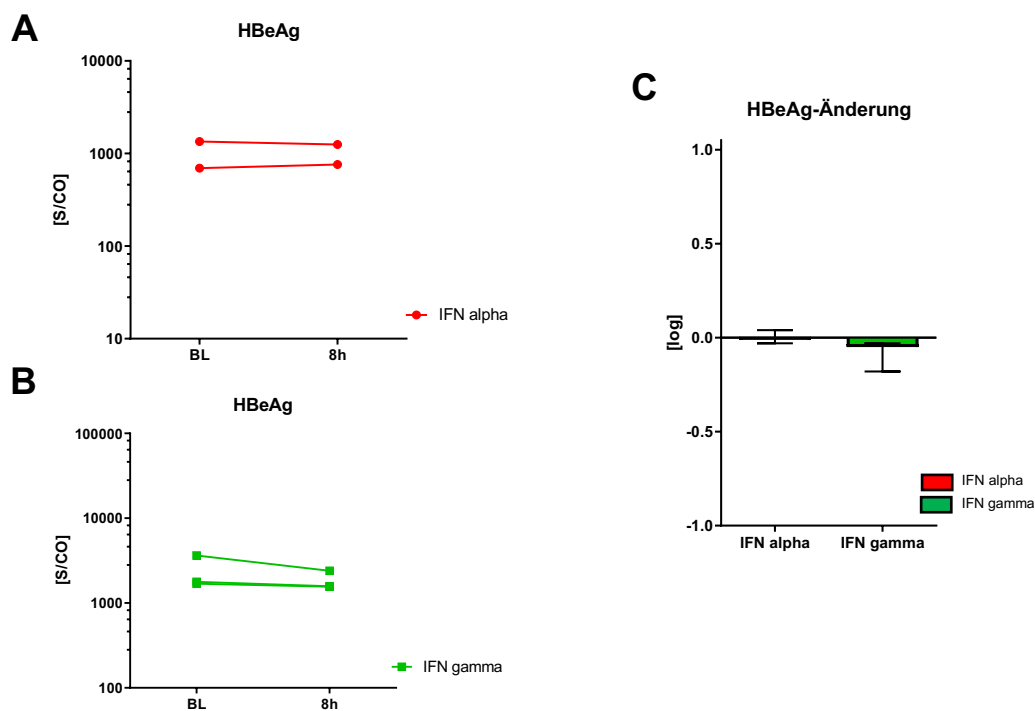


Abbildung 3.21: HBeAg im Serum. Zeitliche Entwicklung von zirkulierendem HBeAg im Verhältnis von Signal zu Grenzwert (engl. Cutoff) (S/CO) nach achtstündiger Behandlung mit IFN- α (rot) (A) oder IFN- γ (grün) (B) für die einzelnen Mäuse. (C) stellt die Änderung der HBeAg-Menge zur Baseline dar, die für jede Maus einzeln berechnet wurde. Die Balken entsprechen den medianen Werten der Berechnungen mit zugehöriger Spannweite für IFN- α (rot, n = 2) und IFN- γ (grün, n = 3).

3.2.2 Einfluss auf intrahepatische virale Parameter

Neben den serologischen Parametern wurde die virale Aktivität von HBV innerhalb der Leber untersucht. Dafür wurden die entnommenen Lebern auf HBV-DNA und RNA untersucht. Im Gegensatz zu den serologischen Analysen konnte für beide Interferone für die HBV-DNA, die gesamte RNA und die pgRNA in der Leber eine Zunahme im Vergleich zu den Kontrolltieren beobachtet werden (**Abb. 3.22**).

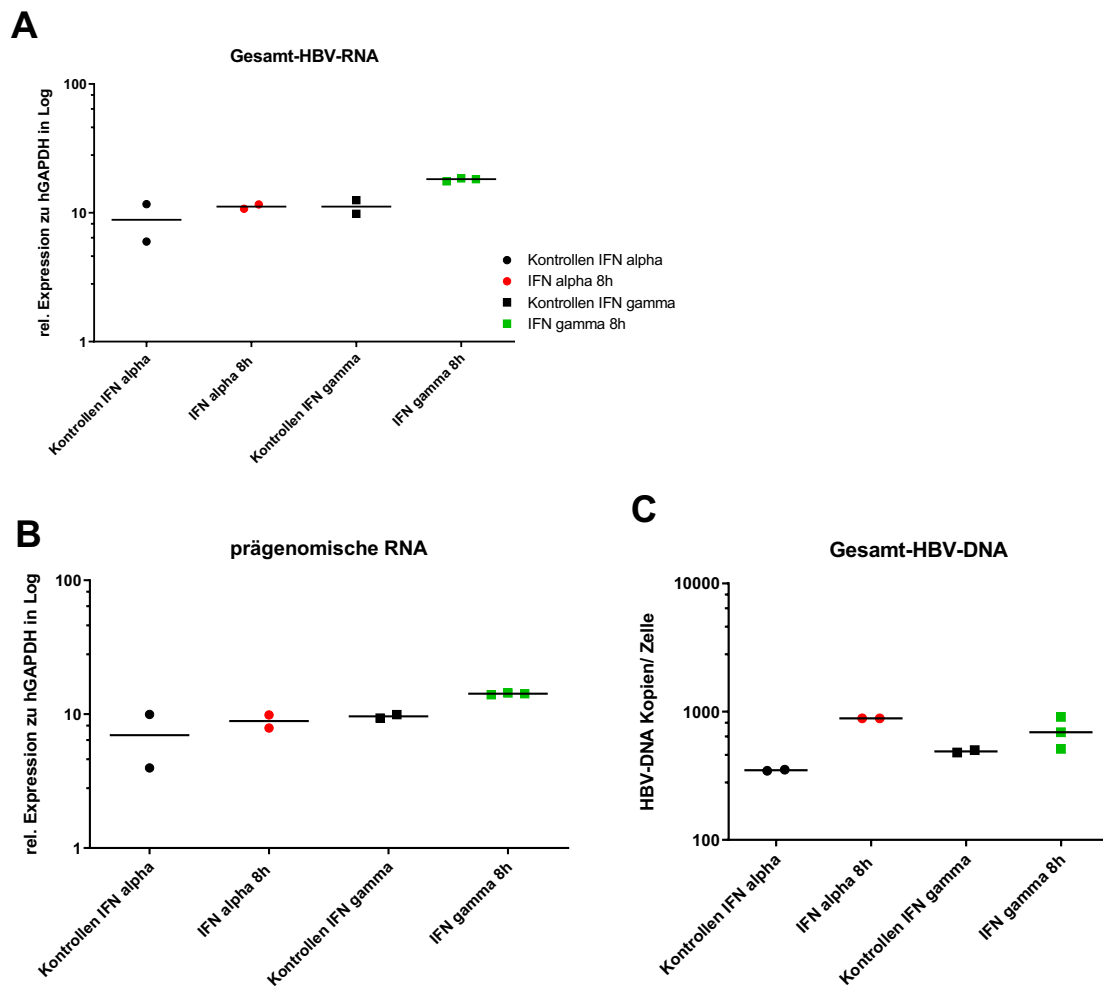


Abbildung 3.22: Intrahepatische HBV-DNA und RNA. Intrahepatische Expression der gesamten HBV-RNA (A) und der pgRNA (B) für die Behandlung mit IFN- α (rot) oder IFN- γ (grün) oder ohne Behandlung (schwarz). Dargestellt sind die Expressionswerte relativ zur humanem GAPDH für die einzelnen Mäuse nach 8h. (C) zeigt die intrahepatischen Mengen der gesamten HBV-DNA für die gleichen Gruppen nach 8h normalisiert auf die Kopienzahl/Zelle. Die schwarzen Linien geben den Median der entsprechenden Behandlungsgruppe an.

3.2.3 Induktion von Interferon-stimulierten Genen in HBV-infizierten und uninfizierten uPA/SCID-Mäusen

Um herauszufinden, ob beide Interferone einen antiviralen Status in den humanen Zellen herbeiführen und ISGs induzieren können, wurde die Genexpression von ISGs mittels qRT-PCR bestimmt. Da bereits beschrieben wurde, dass das HBV in den Signalweg von IFN- α eingreifen und die Expression einiger ISGs mindern kann, sollte gleichzeitig überprüft werden, ob dieser Effekt in diesem Experiment auch zu beobachten ist (Lütgehetmann et al. 2011). Aus diesem Grund wurden neben den HBV-infizierten Tieren auch uninfizierte Tiere mit IFN- α (n = 3) oder IFN- γ (n = 2) behandelt oder unbehandelt belassen (n = 7) und die Genexpression bestimmt (vgl. Kapitel 2.2.3). Behandelte Mäuse und unbehandelte Kontrolltiere einer Behandlungsgruppe waren mit identischen Spenderhepatozyten repopuliert, um spenderspezifische Unterschiede in der Genexpression zu verhindern.

Es zeigte sich, dass beide Interferone humane ISGs induzieren konnten. Es war jedoch bei den untersuchten klassischen ISGs (hISG15, hOAS1, hUSP18, hMX1) eine deutlich stärkere Induktion durch IFN- α als durch IFN- γ zu beobachten (**Abb. 3.23 und 3.24, Tabelle 3.2**). Von den klassischen ISGs konnten hOAS1 und hUSP18 durch IFN- γ kaum oder gar nicht induziert werden. Bei ISGs der Antigen-Präsentation konnte hHLA-A2 von beiden Interferonen nicht deutlich induziert werden, für hHLA-E und hTAP1 war die Induktion für beide Interferone vergleichbar. Ein deutlicher Unterschied in der Induktion der Gene zwischen uninfizierten und HBV-infizierten Tiere konnte für beide Interferone nur für CXCL10 festgestellt werden, welches in uninfizierten Tieren deutlich stärker exprimiert wurde als nach HBV-Infektion.

Tabelle 3.2: Expressionsänderung der ISGs durch Behandlung mit IFN- α oder IFN- γ .

Gen	mediane x-fache Änderung der Expression im Vergleich zum Median der unbehandelten Kontrolltiere			
	IFN- α ohne HBV-Infektion	IFN- α mit HBV-Infektion	IFN- γ ohne HBV-Infektion	IFN- γ mit HBV-Infektion
hISG15	70,0x	176,7x	6,8x	4,5x
hOAS1	44,9x	30,3x	2,2x	3,8x
hUSP18	11,1x	9,3x	1,0x	1,4x
hMX1	83,3x	95,1x	3,5x	5,0x
hCXCL10	163,0x	62,2x	103,4x	15,5x
hHLA-E	10,1x	11,7x	11,2x	7,5x
hHLA-A2	1,6x	2,7x	3,2x	1,5x
hTAP1	6,8x	7,6x	5,7x	2,3x

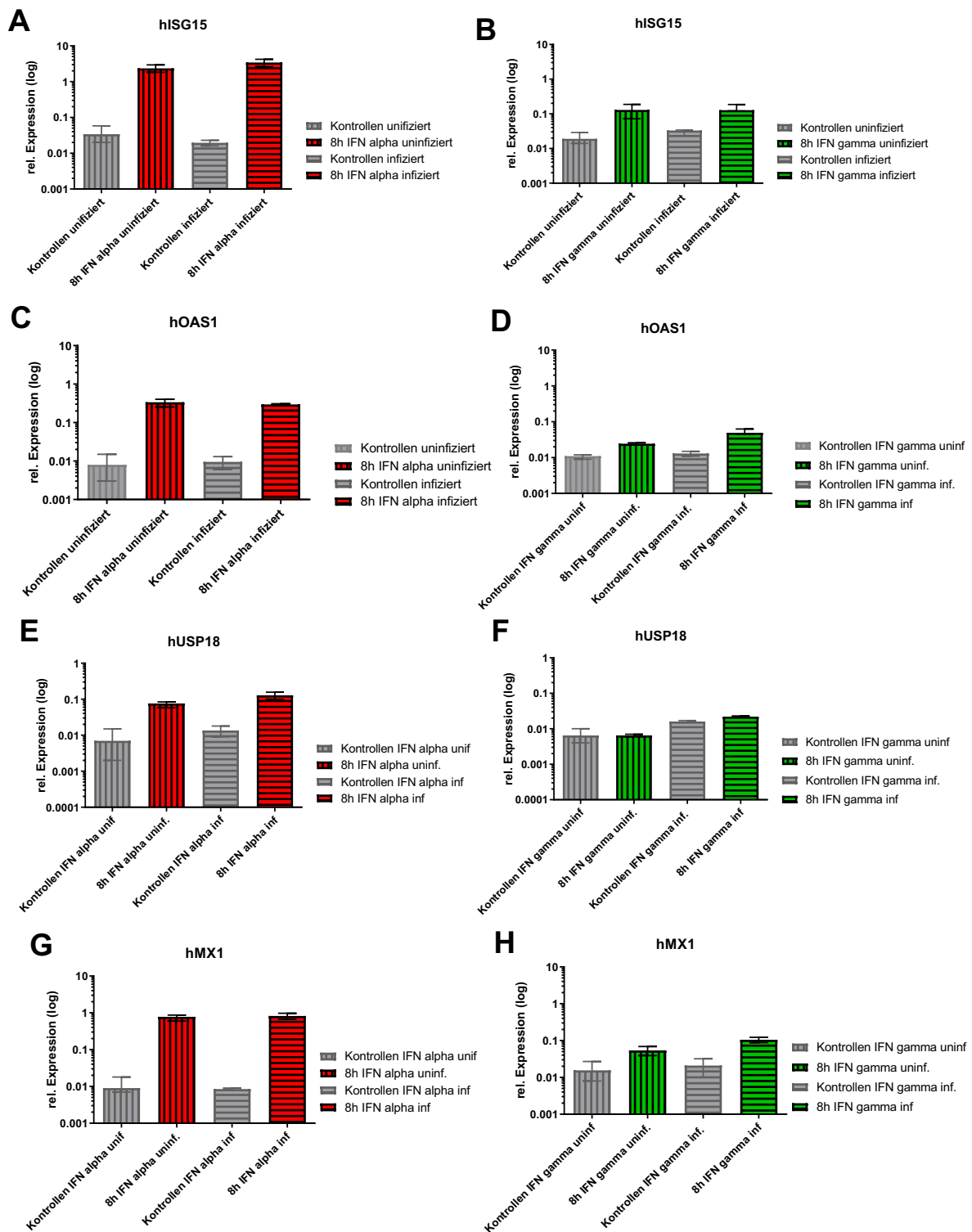


Abbildung 3.23: Induktion humaner ISGs 1. (A-H) RNA-Expression humaner ISGs nach Behandlung mit IFN- α (rot, A, C, E, G) nach 8h in uninfizierten Mäusen ($n = 3$, Balken mit Längsstreifen) und infizierten Mäusen ($n = 2$, Balken mit Querstreifen) oder nach Behandlung mit IFN- γ (grün, B, D, F, H) nach 8h in uninfizierten Mäusen ($n = 2$, Balken mit Längsstreifen) und infizierten Mäusen ($n = 3$, Balken mit Querstreifen). Unbehandelte Kontrollmäuse sind grau dargestellt ($n = 3$ uninfizierte und $n = 2$ HBV-infizierte Mäuse für IFN- α und $n = 4$ uninfizierte und $n = 2$ HBV-infizierte Mäuse für IFN- γ). Die Darstellung der Expressionslevel ist relativ zum Mittelwert der humanen „Housekeeper-Gene“ GAPDH und RPL30 und mittels qRT-PCR mit human-spezifischen Primern und Sonden gemessen. Die Balken zeigen den Median der jeweiligen Behandlungsgruppe mit zugehöriger Spannweite.

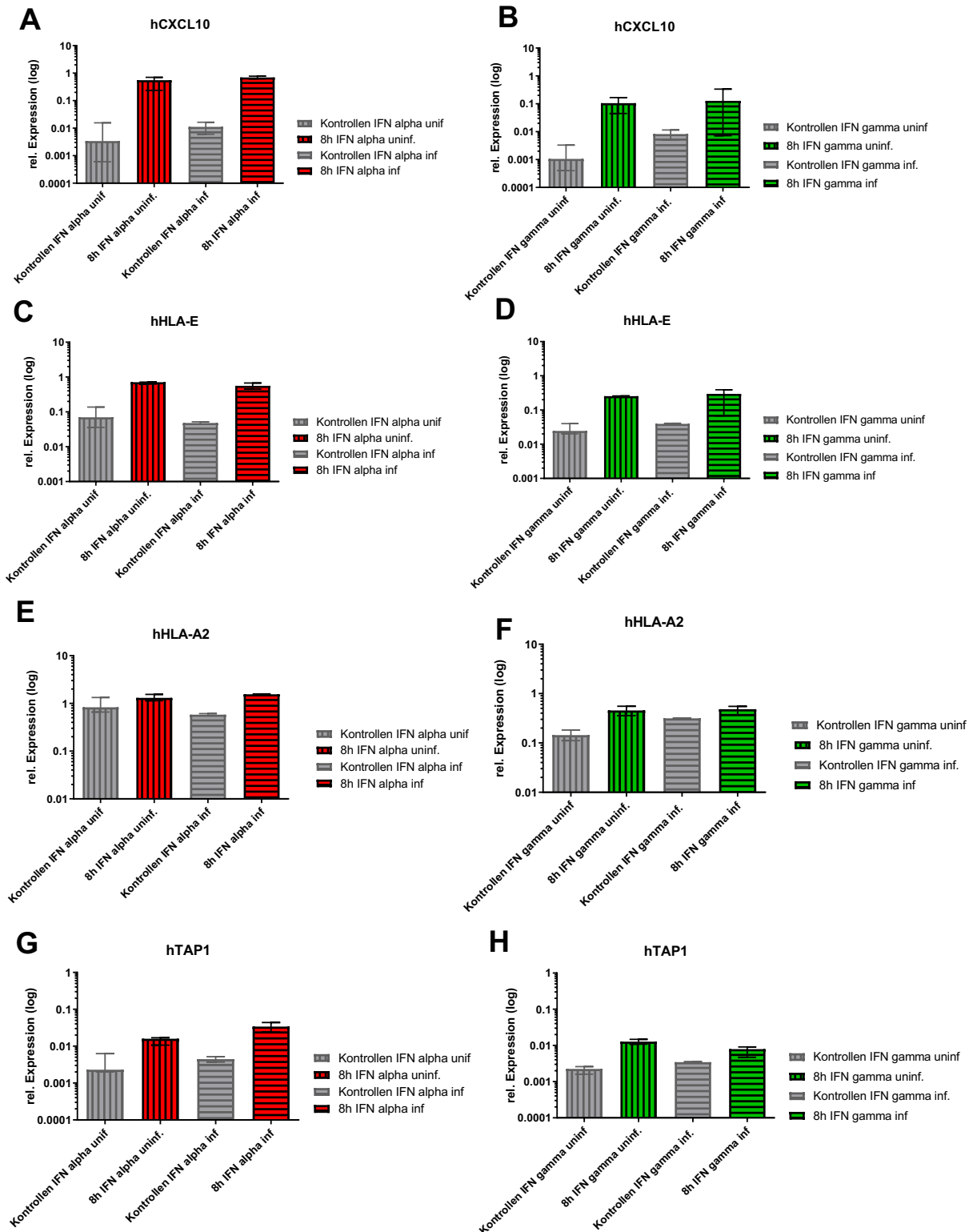


Abbildung 3.24: Induktion humaner ISGs 2. (A-H) RNA-Expression humaner ISGs nach Behandlung mit IFN- α (rot, A, C, E, G) nach 8h in uninfizierten Mäusen ($n = 3$, Balken mit Längsstreifen) und infizierten Mäusen ($n = 2$, Balken mit Querstreifen) oder nach Behandlung mit IFN- γ (grün, B, D, F, H) nach 8h in uninfizierten Mäusen ($n = 2$, Balken mit Längsstreifen) und infizierten Mäusen ($n = 3$, Balken mit Querstreifen). Unbehandelte Kontrollmäuse sind grau dargestellt ($n = 3$ uninfizierte und $n = 2$ HBV-infizierte Mäuse für IFN- α und $n = 4$ uninfizierte und $n = 2$ HBV-infizierte Mäuse für IFN- γ). Die Darstellung der Expressionslevel ist relativ zum Mittelwert der humanen „Housekeeper-Gene“ GAPDH und RPL30 und mittels qRT PCR mit human-spezifischen Primern und Sonden gemessen. Die Balken zeigen den Median der jeweiligen Behandlungsgruppe mit zugehöriger Spannweite.

4 Diskussion

Für die Abwehr von Virusinfektionen sind unterschiedliche Mechanismen des Immunsystems notwendig (Koyama et al. 2008). In der frühen Phase der Infektion spielt die angeborene Immunantwort eine entscheidende Rolle (Koyama et al. 2008). Dabei führt die Erkennung von spezifischen viralen Strukturen zur Induktion von Interferonen, die anschließend antivirale Effekte hervorrufen (Samuel 2001, Koyama et al. 2008). In dieser Arbeit wurden die antiviralen Effekte verschiedener Interferone auf das HBV-Virus untersucht. Dafür wurden vergleichende Analysen von Interferon- α , γ und λ *in vivo* im humanisierten uPA/SCID- Mausmodell durchgeführt. Da die Mäuse keine funktionellen B-, T- und NK-Zellen besitzen, wurden ausschließlich von adaptiven Immunzellen unabhängige antivirale Effekte untersucht (Allweiss und Dandri 2016). Beim Vergleich von pegyliertem IFN- α mit pegyliertem IFN- λ konnten Einblicke in längerfristige Wirkungen beider Interferone und neue Erkenntnisse in die Wirkweise von IFN- α gewonnen werden. Kurzfristige antivirale Effekte wurden im Vergleich von IFN- γ mit IFN- α analysiert.

4.1 Antivirale Effekte von pegyliertem Interferon- α und pegyliertem Interferon- λ in HBV-infizierten uPA/SCID-Mäusen

Pegyliertes IFN- α wird seit 2005 zur Behandlung der chronischen Hepatitis B eingesetzt (Woo et al. 2017). Im humanisierten Mausmodell konnte bereits gezeigt werden, dass PEG-IFN- α auch ohne Einwirkung von adaptiven Immunzellen, antivirale Aktivität gegen das HBV innerhalb der humanen Hepatozyten ausüben kann (Allweiss et al. 2014, Klumpp et al. 2018). IFN- λ wirkt über einen anderen Rezeptor, aktiviert jedoch den gleichen Signalweg wie IFN- α (Lazear et al. 2019). Es stellte sich daher die Frage, ob auch PEG-IFN- λ in der Infektion mit HBV in humanisierten Mäusen direkte antivirale Effekte ausüben kann. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit die Wirkungen von PEG-IFN- α und PEG-IFN- λ miteinander verglichen.

Dabei wurde deutlich, dass nur die Behandlung mit PEG-IFN- α zu einer effizienten Suppression von HBV führen konnte. Serologische und intrahepatische Parameter der viralen Aktivität wurden durch PEG-IFN- α deutlich reduziert, während PEG-IFN- λ nur schwächer ausgeprägte Effekte hervorrufen konnte. Dieses Ergebnis bestätigt die Beobachtung von Hong et al. (2007) in humanen Hepatomazellen, in denen ebenfalls nur eine schwache antivirale Aktivität von IFN- λ zu verzeichnen war. Pagliaccetti et al. (2010) unterstützen diese Beobachtung in humanen Hepatomazellen, konnten jedoch zuvor in immortalisierten Maushepatozyten eine mit IFN- α vergleichbare Inhibition der HBV-Replikation zeigen (Robek et al. 2005). In HBV-transgenen Mäusen konnten die Autoren

nach Gabe von murinem IFN- λ 2 wiederum nur eine moderate Suppression von HBV beobachten (Pagliaccetti et al. 2010).

Auch in der klinischen Studie von Chan et al. (2016) wurden die Kriterien für eine Nichtunterlegenheit von PEG-IFN- λ im Vergleich zu PEG-IFN- α nicht erfüllt. Obwohl bei Patienten mit einer PEG-IFN- λ -Behandlung während der ersten 24 Behandlungswochen eine schnellere und stärkere Abnahme der HBV-DNA und des HBsAg im Vergleich zu PEG-IFN- α zu beobachten war, konnte eine HBeAg-Serokonversion 24 Wochen nach Ende der Therapie bei deutlich mehr Patienten mit PEG-IFN- α -Behandlung festgestellt werden (30,1% für IFN- α vs. 13,8% für IFN- λ). Da die HBeAg-Serokonversion nach Ende der Therapie den primären Endpunkt der Studie darstellte, konnte insgesamt keine Nichtunterlegenheit für PEG-IFN- λ im Vergleich zu PEG-IFN- α gezeigt werden.

In einer weiteren, deutlich kleineren klinischen Studie konnte durch PEG-IFN- λ als Ergänzung zu einer antiviralen Therapie mit Entecavir bei 9 von 13 untersuchten Patienten eine Verstärkung der viralen Suppression beobachtet werden (Phillips et al. 2017). Die weiteren Untersuchungen der Studie zeigten, dass sich die verstärkende Wirkung in immunmodulatorischen Eigenschaften von IFN- λ auf NK-Zellen und virusspezifische T-Zell-Antworten begründete. Immunmodulatorische Eigenschaften von IFN- λ wurden in dieser Doktorarbeit allerdings aufgrund fehlender B-, T- und NK-Zellen im verwendeten Mausmodell nicht untersucht, wodurch die in Patienten festgestellten Effekte während der Behandlung mit PEG-IFN- λ in dieser Doktorarbeit möglicherweise nicht beobachtet werden konnten. Gleichzeitig ergab sich hingegen durch diesen Sachverhalt die bedeutende Möglichkeit, isoliert die direkte Wirksamkeit der Interferone auf die virale Replikation innerhalb der Hepatozyten zu untersuchen.

Interessanterweise zeigte sich nach initial leichter antiviraler Wirkung von IFN- λ in dieser Doktorarbeit mit zunehmender Behandlungsdauer eine Abschwächung des Effektes. Im Falle der Virämie war gar kein Effekt mehr festzustellen. Dagegen führte eine längere Behandlungsdauer bei IFN- α tendenziell zu einer gleichbleibenden oder sogar verstärkten antiviralen Aktivität. Es scheint also, als würde IFN- λ nur einen schwachen transitorischen supprimierenden Effekt auf das HBV ausüben. Dieser Effekt könnte möglicherweise durch die Wirkung von ISGs und anderen von IFN- λ aktivierten Zytokinen ausgelöst werden, da dies als primärer und wichtiger Mechanismus der Interferonwirkung angesehen wird (Song et al. 2017, Ashley et al. 2019). Sowohl IFN- λ als auch IFN- α konnten die in dieser Doktorarbeit untersuchten ISGs deutlich induzieren, was auch auf Proteinebene bestätigt werden konnte. Bemerkenswerterweise war die Induktion der Gene in einem vergleichbaren Ausmaß auch nach vier Wochen Behandlung noch zu beobachten.

Außerdem war der Transkriptionsfaktor STAT1 nach vier Wochen in beiden Behandlungen deutlich induziert und in den Zellkern der Hepatozyten transloziert. Dies spricht dafür, dass die Signalkaskade weder für IFN- λ noch für IFN- α gestört oder unterbrochen wurde. Trotzdem wurde der, im Vergleich zu IFN- α , ohnehin deutlich schwächer ausgeprägte suppressierende Effekt von IFN- λ nach vier Wochen weiter vermindert. Da in dieser Arbeit nur einige ISGs analysiert wurden, wäre es denkbar, dass die unterschiedliche suppressierende Wirkung in der Aktivität von weiteren ISGs begründet sein könnte, welche ausschließlich von IFN- λ oder IFN- α induziert werden. In einer Genexpressionsanalyse in humanen Hepatomazellen fanden Kohli et al. (2012) eine große Überlappung der Genexpressionsprofile von IFN- λ und IFN- α . Sie konnten jedoch einige ISGs identifizieren, die nur durch eines der beiden Interferone induziert wurden. Bei diesen individuellen Genen handelte es sich unter anderem um das Cluster of Differentiation 46 (CD46), Interleukin 32 (IL32), das Interferon-induzierte Protein 35 (IFI35) oder das Interferon-induzierte Protein 44 (IFI44) (Kohli et al. 2012). Um zu überprüfen, ob diese oder mögliche andere ISGs auch *in vivo* im Mausmodell dieser Arbeit unterschiedlich aktiviert werden, würde es sich anbieten, in weiterführenden Versuchen eine vergleichende Transkriptomanalyse über RNA-Sequenzierung durchzuführen.

Die Beobachtung, dass sich der suppressierende Effekt von IFN- λ mit zunehmender Behandlungsdauer abschwächte, obwohl die untersuchten ISGs weiterhin induziert waren, könnte eventuell dafür sprechen, dass die Induktion von ISGs in humanen Hepatozyten nicht ausreichend ist, um eine starke und anhaltende Suppression von HBV hervorzurufen. Das könnte bedeuten, dass IFN- α neben der Aktivierung von ISGs einen weiteren Mechanismus nutzt, um das HBV zu supprimieren.

Ein beschriebener direkter Mechanismus von IFN- α besteht in der Destabilisierung und dem beschleunigten Abbau von enkapsidierter pgRNA (Wieland et al. 2000, Wieland et al. 2005). Im HBV-transgenen Mausmodell sahen die Autoren einen alleinigen Rückgang von pgRNA, während die Menge der Gesamt-HBV-RNA durch IFN- α unverändert blieb und folgerten daraus, dass IFN- α in einem posttranskriptionellen Schritt der HBV-Replikation wirkt (Wieland et al. 2000). Im Gegensatz dazu wurde in den Ergebnissen dieser Arbeit sowohl die pgRNA als auch die subgenomischen RNAs durch IFN- α reduziert, was wahrscheinlich in der Folge zu einer verminderten Proteinproduktion und der Freisetzung von Viruspartikeln führte. Diese Beobachtung macht es unwahrscheinlich, dass IFN- α , wie von Wieland et al. (2000, 2005) beobachtet, lediglich zu einer posttranskriptionellen Inhibition der pgRNA führt.

Die Reduzierung der gesamten messbaren RNAs (pgRNA und präS/S RNA) könnte auf eine Wirkung von IFN- α auf Ebene der viralen Transkription hindeuten. Die HBx-RNA ist aufgrund der überlappenden Leserahmen im HBV-Genom und der geringen Expressionsmenge durch qRT-PCR nicht isoliert erfassbar. Dennoch könnte die Beobachtung, dass der SMC5/6-Komplex durch Behandlung mit IFN- α in HBV-infizierten Hepatozyten wieder detektiert werden konnte, darauf hindeuten, dass auch die HBx-RNA reduziert wurde. Der SMC5/6-Komplex scheint als antiviraler Restriktionsfaktor in der Wirtszelle zu wirken, der die Transkription der viralen RNAs von der cccDNA inhibiert (Decorsiere et al. 2016). Bei einer HBV-Infektion wird der SMC5/6-Komplex normalerweise durch das HBx-Protein degradiert, damit die viralen Gene weiter transkribiert werden können (Mitra und Guo 2016, Murphy et al. 2016, Livingston et al. 2017, Niu et al. 2017). Dass der Komplex durch Behandlung mit IFN- α wieder detektiert werden konnte, könnte bedeuten, dass HBx möglicherweise nicht mehr transkribiert wurde und daher auch kein HBx-Protein mehr entstanden ist. Nach dieser Annahme würde IFN- α alle viralen RNAs reduzieren und damit eventuell auf transkriptioneller Ebene wirken. IFN- λ hingegen scheint diesen Mechanismus nicht zu nutzen. Obwohl die messbaren viralen RNAs durch IFN- λ nach zwei Wochen Behandlung reduziert werden konnten, wurde die Reduktion längerfristig in einer Behandlung von vier Wochen nicht aufrechterhalten und auch der SMC5/6-Komplex konnte nicht detektiert werden. Dies spricht dafür, dass IFN- λ im Gegensatz zu IFN- α neben der Aktivierung von ISGs nicht direkt auf die virale Transkription wirkt.

Einen möglichen Angriffspunkt von IFN- α für die Beeinflussung der viralen Transkription stellt die cccDNA dar (Belloni et al. 2012, Liu et al. 2013, Lucifora et al. 2014, Tropberger et al. 2015). Die cccDNA dient als Vorlage für die Transkription der viralen mRNAs und ist verantwortlich für die Persistenz des HB-Virus während der antiviralen Therapie (Liang 2009, Hadziyannis und Laras 2018). Ein Hinweis auf die transkriptionelle Aktivität der cccDNA ergibt sich durch die Serummenge an HBsAg, welches durch die subgenomischen RNAs gebildet wird (Petersen 2018). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Behandlung mit IFN- α zu einer signifikanten Reduktion des HBsAg im Serum der Mäuse führte. Dies könnte dafür sprechen, dass IFN- α die transkriptionelle Aktivität der cccDNA beeinflusst. Im Gegensatz dazu bewirkte die Behandlung mit IFN- λ keine Reduktion des HBsAg, was erneut die Theorie unterstützt, dass IFN- α einen anderen Mechanismus als IFN- λ nutzt. Es ist jedoch zu bedenken, dass das HBsAg auch von HBV-DNA exprimiert worden sein könnte, welche ins Wirtsgenom integriert wurde. Eine Integration von HBV-DNA ins Wirtsgenom konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in Patienten sowie in Enten- und Waldmurmeltiermodellen beobachtet werden (Tu et al. 2017). Aufgrund des

strukturellen Aufbaus der integrierten Form der HBV-DNA wird die Expression nahezu aller viralen ORFs von der integrierten DNA beeinflusst und verändert. Nur das HBsAg-ORF kann mit seinem ursprünglichen Promotor intakt bleiben (Tu et al. 2017). Inwiefern eine Expression des HBsAg durch integrierte DNA im verwendeten Mausmodell dieser Doktorarbeit eine Rolle spielt, ist nicht bekannt. Da die cccDNA-Aktivität und die Anzahl infizierter Zellen in diesem Modell jedoch sehr hoch ist, ist dieser Mechanismus vermutlich von untergeordneter Relevanz und die Mehrzahl des Serum-HBsAgs wurde ausgehend von der cccDNA gebildet.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass neben der viralen DNA und viralen Antigenen auch pgRNA im Serum HBV-infizierter Patienten zu finden ist (Wang et al. 2016). Dabei korreliert die Menge an HBV-RNA beziehungsweise pgRNA mit der transkriptionellen Aktivität der cccDNA (Giersch et al. 2017a, Wang et al. 2017). Im Gegensatz zum HBsAg kann pgRNA nicht durch ins Wirtsgenom integrierte HBV-DNA produziert werden, da die Genomlänge der integrierten DNA dies nicht zulässt (Tu et al. 2017). Auch die pgRNA im Serum konnte in dieser Arbeit durch IFN- α wesentlich stärker reduziert werden als durch IFN- λ , was die Annahme weiter unterstützt, dass IFN- α , im Gegensatz zu IFN- λ , die Aktivität der cccDNA beeinflusst.

Ein beschriebener Effekt von IFN- α auf die cccDNA liegt darin, sie zu degradieren (Lucifora et al. 2014). In Zellkultur konnten Lucifora et al. (2014) zeigen, dass APOBEC3A, eine Cytidin-Deaminase, durch IFN- α induziert wird und an die cccDNA bindet, was nach Deaminierung schließlich zur Degradierung der cccDNA führt. Übereinstimmend mit Lucifora et al. (2014) konnte auch in dieser Arbeit ein Rückgang der cccDNA beobachtet werden. Im Gegensatz dazu konnte jedoch in anderen Untersuchungen des antiviralen Effektes von IFN- α in humanisierten uPA/SCID Mäusen keine signifikante Reduktion der cccDNA festgestellt werden (Lütgehetmann et al. 2011, Allweiss et al. 2014, Klumpp et al. 2018). Es ist außerdem verwunderlich, dass die cccDNA nicht nur für IFN- α , sondern auch für IFN- λ reduziert werden konnte, obwohl andere serologische und intrahepatische Parameter wie die HBV-DNA, RNA oder viralen Antigene darauf hindeuten, dass IFN- λ die cccDNA nicht beeinflusst. Eine mögliche Erklärung dieser Diskrepanz könnte in der Methodik der Quantifizierung der cccDNA liegen. Die Quantifizierung erfolgte mittels Plasmid-safe DNase Behandlung und anschließender Amplifikation und Quantifizierung mithilfe der qRT-PCR mit cccDNA spezifischen Primern. Durch den sehr hohen Gehalt an rcDNA und anderer Intermediate innerhalb der infizierten Hepatozyten könnte die Spezifität der Primer innerhalb der PCR eingeschränkt sein (Yang und Kao 2014). Dies könnte bedeuten, dass insbesondere in nicht-behandelten Mäusen aufgrund der größeren Menge an rcDNA zu hohe Werte für die cccDNA gemessen wurden. Außerdem wäre es möglich,

dass beschädigte cccDNA-Moleküle durch die DNase Behandlung verdaut wurden und anschließend weniger cccDNA-Moleküle gemessen wurden als ursprünglich vorhanden. Aufgrund dieser methodischen Problematiken stellt die Messung der cccDNA eine Herausforderung dar, die fundierte Aussagen über die Quantität schwierig gestaltet (Yang und Kao 2014). Es ist daher nicht auszuschließen, dass es sich bei der in dieser Arbeit gemessenen Reduktion nur um eine Pseudoreduktion handelt.

In ihrer Studie identifizierten Lucifora et al. (2014) die durch IFN- α induzierte Deaminase APOBEC3A als verantwortliches Protein für die Degradierung der cccDNA. Auch für IFN- λ konnte kürzlich in Zellkultur eine Induktion und anschließende Deaminierung und Reduktion der cccDNA durch APOBEC3A festgestellt werden (Bockmann et al. 2019). In den Untersuchungen dieser Doktorarbeit konnte APOBEC3A jedoch weder durch IFN- α noch durch IFN- λ induziert werden. Neben APOBEC3A könnte auch APOBEC3B zur Degradierung der cccDNA führen, weil es wie APOBEC3A im Zellkern der Hepatozyten zu finden ist. Allerdings war APOBEC3B in dieser Arbeit nur durch IFN- λ signifikant induziert. Diese Ergebnisse machen es unwahrscheinlich, dass IFN- α oder IFN- λ über die Deaminierung und Degradierung der cccDNA wirken. Es sind jedoch weitere Analysen notwendig, um dies zu überprüfen. Denkbar wäre dabei unter anderem eine Quantifizierung der cccDNA-Menge über eine Southern Blot Analyse.

Neben dem Abbau von cccDNA wurde auch die epigenetische Suppression der cccDNA als direkter Mechanismus von IFN- α beschrieben (Belloni et al. 2012, Liu et al. 2013, Tropberger et al. 2015). Die cccDNA liegt als Chromatin-ähnliche Struktur gebunden an Histone, Nicht-Histon-Proteine und dem HBcAg als Minichromosom im Zellkern der infizierten Zellen vor (Bock et al. 2001). Durch Rekrutierung von Co-Repressor-Proteinen und Histon-Deacetylasen stellten Belloni et al. (2012) eine reduzierte Acetylierung von Histon H4 durch IFN- α fest. Weitere Studien fanden eine Hypoacetylierung an Histon H3 unter IFN- α -Behandlung (Liu et al. 2013, Tropberger et al. 2015). Die reduzierte Acetylierung führt zu einer verminderten Zugänglichkeit der DNA für Enzyme und damit einer verminderten Transkription (Eberharter und Becker 2002, Hong et al. 2017).

Insgesamt deuten die Ergebnisse damit darauf hin, dass IFN- α im Gegensatz zu IFN- λ neben der Aktivierung der in dieser Doktorarbeit analysierten ISGs eine weitere Wirkung induziert, um das HBV zu supprimieren. Dabei wäre es denkbar, dass IFN- α über epigenetische Veränderungen an der cccDNA eine transkriptionelle Kontrolle auf das HBV ausübt, was in der Folge zu einer Reduktion aller viralen RNAs führt. Diese Kontrolle könnte möglicherweise indirekt über die Aktivität eines oder mehrerer ISGs erfolgen, die durch IFN- λ nicht exprimiert werden. Es wäre jedoch auch eine Wirkung über direkt induzierte

Signalwege oder STAT-Protein-Bindungen möglich. Die daraus folgende Suppression von HBx könnte dann dazu führen, dass der SMC5/6-Komplex nicht mehr degradiert wird und in der Zelle als Restriktionsfaktor die Transkription der cccDNA zusätzlich behindert (**Abb. 4.1**). Eine weitere Möglichkeit wäre, dass IFN- α posttranskriptionell zu einer Reduktion der viralen RNAs führt, was ebenfalls zu einer Verminderung von HBx führen könnte. Der dadurch nicht mehr degradierte SMC5/6-Komplex könnte dann in einem zweiten Schritt die Transkription von der cccDNA inhibieren.

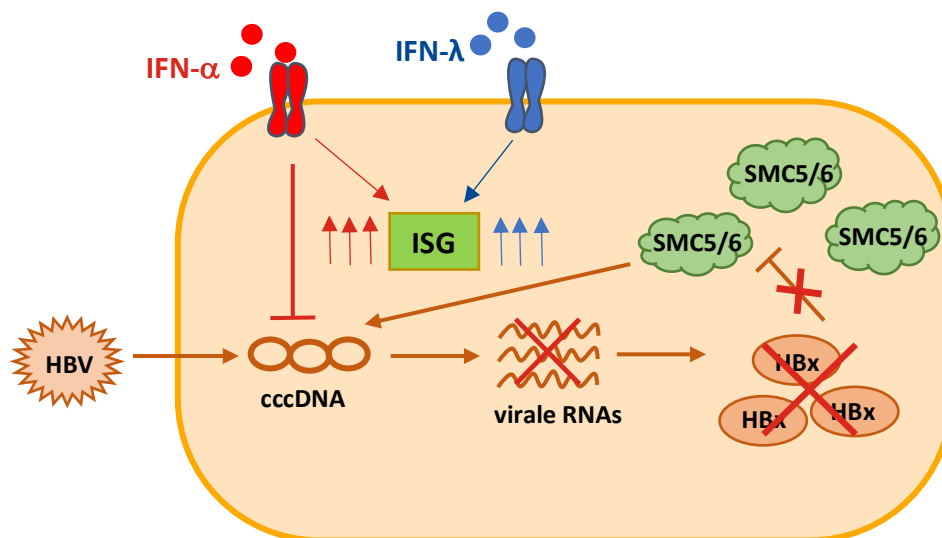


Abbildung 4.1: Mögliches Modell zur antiviralen Wirkung von IFN- α . Während IFN- λ hauptsächlich zur Induktion von ISGs führt, wirkt IFN- α ergänzend über eine Inhibition der viralen Transkription an der cccDNA, wodurch weniger virale Transkripte gebildet werden. Dies führt in der Folge zu einer Verringerung der Menge an HBx-Proteinen, sodass der SMC5/6-Komplex nicht mehr degradiert wird und zusätzlich eine hemmende Wirkung an der cccDNA ausüben kann. Quelle: Eigene Darstellung.

Weitere Analysen sind jedoch erforderlich, um diese Theorien weiter zu überprüfen. So könnte beispielsweise mithilfe einer Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) die Interaktion von Proteinen mit der cccDNA untersucht werden, um festzustellen, ob SMC5/6 nach IFN- α -Behandlung, nicht jedoch nach Behandlung mit IFN- λ an der cccDNA zu finden ist. Dies würde den Verdacht erhärten, dass IFN- α die HBx-RNA reduziert. Über die Untersuchung epigenetischer Veränderungen an der cccDNA könnte überprüft werden, ob IFN- α *in vivo* über epigenetische Regulation die virale Transkription kontrolliert. Weitere Forschung ist außerdem notwendig, um den genauen Mechanismus der epigenetischen Kontrolle durch IFN- α zu identifizieren. Interessanterweise konnte in humanisierten Mäusen, die neben HBV mit HDV superinfiziert wurden, auch durch PEG-IFN- λ nach vier Wochen Behandlung

eine starke Suppression auf das HBV und HDV beobachtet werden. Die Suppression von PEG-IFN- α auf das HBV war ebenfalls stärker als in der alleinigen HBV-Infektion (Giersch et al. 2017b). Ein Vergleich der Wirkung in der HBV/HDV-Co-Infektion und der HBV-Mono-Infektion wäre damit ebenfalls eine interessante Analyse, um weitere Erkenntnisse in direkte antivirale Wirkmechanismen zu erhalten.

Insgesamt ist zu bedenken, dass in den Untersuchungen dieser Arbeit nur eine kleine Anzahl an Mäusen analysiert wurde. Es wäre daher notwendig, die Ergebnisse dieser Arbeit mit einer größeren Stichprobe zu bestätigen. Weiterhin sind intraindividuelle Unterschiede zwischen den Tieren zu berücksichtigen, die zu Schwankungen führen können. Insbesondere bei intrahepatischen Untersuchungen können daher Interpretationen zwischen den Gruppen der zwei und vier Wochen behandelten Tiere schwierig sein. Da es sich in den jeweiligen Gruppen um individuelle Tiere handelt, kann, anders als bei den bei serologischen Werten, nicht die Entwicklung viraler Parameter innerhalb eines Tieres betrachtet werden. Dies erschwert Interpretationen zum Verlauf viraler intrahepatischer Marker über verschiedene Behandlungszeiträume.

Weiterhin ist zu beachten, dass beide Interferone neben den hier untersuchten antiviralen Wirkungen auch wichtige immunmodulatorische Wirkungen entfalten, welche im uPA/SCID-Modell nicht analysiert werden können. Um den gesamten Wirkumfang beider Interferone zu untersuchen, wäre daher ein immunkompetentes Modellsystem wünschenswert.

4.2 Antivirale Effekte von Interferon- α und Interferon- γ in HBV-infizierten und uninfizierten uPA/SCID-Mäusen

IFN- γ ist neben IFN- α und IFN- λ ein weiteres Mitglied der Interferonfamilie und einziger Vertreter der Typ II-Interferone (Kang et al. 2018). Wie auch bei IFN- α sind die Rezeptoren für IFN- γ ubiquitär im Organismus vorhanden (Kang et al. 2018). Während IFN- α ebenfalls von allen Zellen produziert werden kann, kann IFN- γ nur von aktivierten Immunzellen gebildet werden (Kang et al. 2018). Es ist bekannt, dass IFN- γ maßgeblich an der Regulierung von inflammatorischen Antworten auf Pathogene beteiligt ist. Jedoch sind antivirale Funktionen von IFN- γ noch wenig verstanden (Kang et al. 2018). Um nähere Einblicke in die Wirkung von IFN- γ auf das HBV im humanisierten Mausmodell zu gewinnen, wurde in dieser Arbeit IFN- γ mit IFN- α verglichen. Da es von IFN- γ keine pegylierte Form gibt, wurde lediglich der kurzfristige Effekt beider Interferone acht Stunden nach einmaliger Gabe untersucht.

Die Analysen dieser Arbeit zeigten, dass beide Interferone eine Reduktion in der Virämie und der pgRNA im Serum hervorrufen konnten, wobei die pgRNA durch IFN- γ etwas stärker reduziert werden konnte. Weiterhin konnte IFN- γ eine leichte Reduktion des HBsAg bewirken. Es scheint also, als könnte IFN- γ einen etwas stärkeren Effekt auf die Produktion viraler Partikel ausüben als IFN- α . Im Gegensatz dazu war für beide Interferone eine Zunahme von intrahepatischen viralen Parametern zu beobachten. Die Erklärung für diese Zunahme ist unklar. Vorherige Studien konnten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* einen Rückgang intrahepatischer RNA oder DNA beobachten (Guidotti et al. 1996b, Schultz und Chisari 1999, Schultz et al. 1999, Paschetto et al. 2002, Lütgehetmann et al. 2011, Xia et al. 2016). In Hinblick auf eine vorherige Studie in humanisierten Mäusen ist es insbesondere für IFN- α verwunderlich, dass die virale RNA und DNA nicht reduziert werden konnte. Nach fünftägiger Gabe von IFN- α sahen Lütgehetmann et al. (2011) in humanisierten Mäusen sowohl eine Reduzierung von intrahepatischer HBV-DNA als auch pgRNA. Dieser Effekt war jedoch nur von kurzer Dauer, da 24h nach der letzten Gabe keine Reduktion der viralen Transkripte mehr beobachtet werden konnte (Lütgehetmann et al. 2011). Für die fünftägige IFN- α -Gabe von Lütgehetmann et al. (2011) wäre es jedoch vorstellbar, dass die innerhalb der fünf Tage induzierten Proteine zwar nach 24h in ihrer Menge bereits so stark reduziert waren, dass der antivirale Effekt nicht mehr ausreichend war, jedoch durch eine gewissen Basismenge zu einem schnelleren Wirkeintritt bei erneuter Gabe führten. Daher konnte nach fünfmaliger Gabe bereits nach acht Stunden eine Reduktion viraler Transkripte beobachtet werden. Sollte dies der Fall sein, wäre es möglich, dass in dieser Arbeit das Zeitfenster von 8h nach einer einmaligen Gabe noch nicht ausreichend war, um genügend

antiviral wirkende Proteine zu bilden, um innerhalb der Leber einen Effekt auf virale Transkripte auszuüben.

Es wäre auch möglich, dass unterschiedliche Zeitfenster nach Gabe eines Interferons mit unterschiedlichen antiviralen Effekten vergesellschaftet sind. Das bedeutet, dass sich kurzfristig eine andere antivirale Wirkung zeigen könnte als bei einer längeren Gabe eines Interferons. Der Anstieg von intrahepatischer RNA und DNA mit einer gleichzeitigen Reduktion serologischer Parameter könnte darauf hindeuten, dass es sowohl bei IFN- γ als auch IFN- α zu einer Retention viraler Partikel innerhalb der Zelle kommt. Dies könnte bedeuten, dass ein schnell einsetzender Effekt beider Interferone darin besteht, die Freisetzung viraler Partikel aus der Zelle ins Blut zu inhibieren. Übereinstimmend mit dieser Theorie konnten Yan et al. (2015) *in vitro* ebenfalls beobachten, dass IFN- α und IFN- γ zu einer reduzierten Sekretion von Virionen führten, während die intrazelluläre virale Replikation nicht inhibiert wurde. Als verantwortliches Protein für die reduzierte Freisetzung von Virionen fanden die Autoren das ISG Tetherin, welches durch beide Interferone induziert wurde und für eine Bindung der Virionen in den späten Endosomen sorgte (Yan et al. 2015). Da die Induktion von Tetherin in dieser Arbeit nicht untersucht wurde, wären im weiteren Verlauf Analysen auf Genexpressionsebene und Proteinebene mittels qRT-PCR und Fluoreszenzmikroskopie sinnvoll, um zu überprüfen, ob Tetherin auch in diesem Experiment für die Beobachtungen verantwortlich ist. Weiterhin sollten das HBcAg und das virale Protein S mittels Immunfluoreszenz gefärbt werden, um festzustellen, ob die einmalige Behandlung mit IFN- γ und IFN- α zu einer stärkeren Akkumulation der Proteine innerhalb der Zelle führt. Es wäre weiterhin denkbar, dass die Reduktion serologischer viraler Marker damit zusammenhängt, dass virale Partikel schneller im Serum abgebaut werden. Da es in humanisierten uPA/SCID-Mäusen jedoch keine adaptiven Immunzellen gibt, die Virionen im Serum beseitigen könnten, ist dieses Szenario eher unwahrscheinlich.

Eine weitere Erklärung könnte im Studiendesign der Untersuchung begründet sein. Es wurden nur sehr wenige Mäuse für diese ersten Analysen verwendet, wodurch intraindividuelle Schwankungen zwischen den Mäusen innerhalb einer Behandlungsgruppe und zwischen verschiedenen Behandlungsgruppen einen starken Effekt ausgeübt haben könnten. Dies erschwert die Interpretation der Daten und es ist nicht auszuschließen, dass leichte intrahepatische Unterschiede lediglich auf Schwankungen beruhen. Eine Wiederholung der Versuche mit einer größeren Stichprobe wäre daher notwendig, um fundierte Aussagen treffen zu können.

Die Analyse von ISGs in dieser Arbeit zeigte, dass IFN- α die Mehrzahl der untersuchten ISGs deutlich stärker induzieren konnte als IFN- γ , obwohl IFN- γ einige serologische virale

Parameter tendenziell eher reduzieren konnte als IFN- α . Dies könnte bedeuten, dass die untersuchten ISGs eventuell nicht an der Wirkung von IFN- γ beteiligt sind. Eine Analyse von Liu et al. (2012) zeigt, dass es sich bei einigen der untersuchten ISGs um IFN- α -spezifische ISGs handelt, die durch IFN- γ kaum induziert werden. Dies könnte erklären, warum hMx1, hOAS1, und hUSP18 durch IFN- γ in dieser Arbeit kaum oder gar nicht induziert werden konnten. Unklar ist jedoch die geringere Induktion von hISG15 durch IFN- γ , da es sich dabei um ein Gen handelt, welches von beiden Interferonen gleichwertig induziert wird (Liu et al. 2012). Es ist weiterhin verwunderlich, dass die humanen HLA-Gene hHLA-A2 und hHLA-E durch IFN- γ nicht stärker induziert werden konnten, da eine der Hauptfunktionen von IFN- γ darin besteht, die Expression von HLA-Genen zu regulieren (Parvez et al. 2006). Möglicherweise sind die untersuchten ISGs nicht an der Wirkung von IFN- γ beteiligt oder werden erst zu einem späteren Zeitpunkt nach längerer Gabe induziert. Weiterhin wäre denkbar, dass die verabreichte Dosis von IFN- γ nicht ausreichend war, um die ISGs in gleichem Maße zu induzieren, wie durch IFN- α . Möglicherweise ist die Dosis durch die Berechnung in unterschiedlichen Einheiten (IFN- α in IU/g und IFN- γ in ng/g) nicht vollständig vergleichbar. Auch wäre möglich, dass die Hepatozyten eine geringere Rezeptordichte für IFN- γ als für IFN- α aufwiesen, wodurch IFN- γ nur eine schwächere Wirkung entfalten konnte.

In früheren Experimenten wurde festgestellt, dass das HB-Virus den Signalweg von IFN- α behindern und zu einer geringeren Induktion von ISGs führen kann (Lütgehetmann et al. 2011). Dabei stellten die Autoren fest, dass die Menge einiger ISGs in uninfizierten Hepatozyten durch IFN- α signifikant erhöht wurde, während in HBV-infizierten Hepatozyten keine signifikante Erhöhung zu beobachten war (Lütgehetmann et al. 2011). In dieser Arbeit konnte eine Beeinträchtigung der Signalkaskade durch HBV nicht festgestellt werden. Möglicherweise tritt die Beeinflussung durch HBV erst nach längerer Gabe eines Interferons auf.

Insgesamt könnten die Daten auf die Theorie hindeuten, dass bestimmte Interferoneffekte abhängig von der Wirkdauer vorrangig vorherrschen. Damit könnte IFN- α kurzfristig andere Wirkungen auf das HBV hervorrufen als bei einer langfristigen Gabe. Unter Mitbetrachtung der Daten aus dem ersten Teil dieser Arbeit könnte man spekulieren, dass IFN- α in einem frühen Zeitfenster auf die Freisetzung von Virionen wirkt, während es bei längerer Behandlung die virale Transkription inhibiert. Weiterhin deuten die Daten darauf hin, dass IFN- γ kurzfristig ähnliche Effekte wie IFN- α auf das HBV ausüben kann. Da jedoch nicht auszuschließen ist, dass die kurzfristigen intrahepatischen Unterschiede durch Schwankungen zwischen den Versuchstieren beeinflusst sind, wäre es notwendig, die

beobachteten Effekte mit einer größeren Anzahl an Mäusen zu überprüfen. Sollten sich die Beobachtungen dieser Arbeit dabei bestätigen, wären weitere längerfristige Analysen der Wirkung von IFN- γ auf das HBV in Vergleich zu IFN- α interessant.

4.3 Abschließende Schlussfolgerungen

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse dieser Doktorarbeit darauf hin, dass die Induktion von Interferon-stimulierten Genen für eine anhaltende und starke antivirale Wirkung auf das HBV in humanisierten uPA/SCID-Mäusen nicht auszureichen scheint. Obwohl IFN- α und IFN- λ ISGs in humanen Hepatozyten induzieren, kann nur durch IFN- α eine deutliche und langfristige Suppression auf das HBV ausgeübt werden. IFN- α scheint daher neben der Induktion von ISGs einen weiteren Mechanismus zu nutzen. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf die Theorie hin, dass IFN- α , möglicherweise über epigenetische Kontrolle der cccDNA, die virale Transkription inhibiert und somit die gesamte virale RNA und daraus gebildete Proteine reduziert. Daneben sind zusätzliche Effekte wie eine Beeinflussung und Reduktion viraler RNA in einem posttranskriptionellen Schritt denkbar und plausibel. Weiterhin scheinen die Daten darauf hinzuweisen, dass IFN- γ kurzfristig ähnliche Effekte auf das HBV ausüben könnte wie IFN- α . Insgesamt scheint die Reduktion des HBx-Proteins von zentraler Bedeutung für die starke antivirale Wirksamkeit von IFN- α zu sein. Dies könnte in der Folge eine zusätzliche Hemmung der Transkription von HBV durch den SMC5/6-Komplex als zelleigenen Restriktionsfaktor hervorrufen. Weitere Analysen sind jedoch notwendig, um zugrunde liegende Mechanismen der beobachteten Effekte weiter zu untersuchen und Theorien zu bestätigen.

5 Zusammenfassung

Die chronische Infektion mit dem HBV stellt mit weltweit rund 250 Millionen infizierten Menschen ein bedeutendes globales Gesundheitsproblem dar. Während die Prävention mithilfe eines Impfstoffes möglich ist, gibt es aktuell keine therapeutischen Maßnahmen für eine komplette Heilung. Eine mögliche Behandlungsoption bildet die Gabe von IFN- α mit dem Vorteil einer begrenzten Behandlungsdauer und einer anschließenden möglichen Langzeitkontrolle des Virus. Bei IFN- α handelt es sich um ein Zytokin, welches in der Etablierung und Regulation einer Immunantwort eine entscheidende Rolle spielt und eine supprimierende Wirkung auf das HBV ausübt. Der genaue Mechanismus dieser Suppression ist jedoch bislang nicht vollständig verstanden. Neben IFN- α existieren mit IFN- λ und IFN- γ weitere Interferone, die eine ähnliche Signalkaskade aktivieren und einen supprimierenden Effekt auf das HBV ausüben können. Ziel dieser Arbeit war es, mögliche Gemeinsamkeiten und Unterschiede einer direkten antiviralen Wirksamkeit von IFN- λ und IFN- γ auf das HBV im Vergleich zu IFN- α *in vivo* im humanisierten uPA/SCID-Mausmodell zu analysieren um dadurch weitere Einblicke in die Wirkung von IFN- α zu erlangen. Im Vergleich von pegyliertem IFN- α mit pegyliertem IFN- λ konnte gezeigt werden, dass sowohl PEG-IFN- α als auch PEG-IFN- λ ISGs in einem vergleichbaren Maße in humanen Hepatozyten induziert. Eine deutliche und langfristige Suppression von HBV durch Reduktion serologischer und intrahepatischer viraler Parameter konnte jedoch nur durch PEG-IFN- α erreicht werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Induktion von ISGs für eine anhaltende und starke antivirale Wirkung auf das HBV in humanisierten uPA/SCID-Mäusen nicht auszureichen und PEG-IFN- α einen weiteren Mechanismus zu nutzen scheint. Im Gegensatz zur Behandlung mit PEG-IFN- λ konnte durch eine Behandlung mit PEG-IFN- α der wirtseigene Faktor SMC5/6-Komplex in den Hepatozyten wieder detektiert werden. Dieser Komplex scheint als viraler Restriktionsfaktor die Transkription der viralen RNAs von der cccDNA zu inhibieren. Er wird jedoch in der HBV-Infektion durch das HBx-Protein degradiert, sodass er nicht mehr wirken kann. Die Detektion des Komplexes nach Behandlung mit PEG-IFN- α spricht dafür, dass PEG-IFN- α , anders als PEG-IFN- λ , zu einer Reduktion des HBx-Proteins führt, was damit von zentraler Bedeutung für die antivirale Wirksamkeit von PEG-IFN- α zu sein scheint. Für zugrunde liegende Mechanismen dieser Reduktion sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig. In ersten vergleichenden Analysen der kurzfristigen Wirkung von IFN- γ und IFN- α konnte eine ähnliche Wirksamkeit beider Interferone nach einmaliger Gabe beobachtet werden. Für fundierte Aussagen zur antiviralen Wirksamkeit von IFN- γ im Vergleich zu IFN- α , sollten die beobachteten Effekte jedoch mit einer größeren Stichprobe wiederholt werden und eine längerfristige Gabe der Interferone erfolgen.

Abstract

Chronic infection with HBV is a global health problem affecting approximately 250 million people worldwide. While a prophylactic vaccine is available, there are currently no therapeutic options to completely cure the disease. Treatment with IFN- α is one possible treatment strategy and has the advantage to be of finite duration and the potential to induce sustained off-treatment response at least in a minority of chronically infected patients. Besides being one of the main cytokines responsible for the establishment and regulation of immune responses, IFN- α exhibits a suppressing effect on HBV. Knowledge about the exact mechanism of this suppression, however, is still limited. Apart from IFN- α , there are two additional Interferons – namely IFN- λ and IFN- γ – activating a similar intracellular signaling pathway and having a possible suppressing impact on HBV. Aim of this study was to analyze possible similarities and differences in direct antiviral activity of IFN- λ and IFN- γ on HBV in comparison to IFN- α *in vivo* in the humanized uPA/SCID mouse model to also get further insights in the antiviral activity of IFN- α . By comparing pegylated IFN- α with pegylated IFN- λ , both interferons showed a similar strong induction of interferon-stimulated genes (ISGs) in human hepatocytes. However, a remarkable and persisting suppression on HBV with reduction of serological and intrahepatic parameters was only observed for treatment with PEG-IFN- α . These results suggest that the induction of ISGs does not seem to be sufficient to establish a strong and sustained antiviral effect on HBV, thus indicating that PEG-IFN- α uses a mechanism apart from innate signaling to induce HBV suppression. In contrast to PEG-IFN- λ , treatment with PEG-IFN- α promoted re-detection of the host factor SMC5/6 complex in human hepatocytes. SMC5/6 complex is assumed to act as a viral restriction factor repressing cccDNA transcription. However, in the infection process it is degraded by HBx to alleviate the SMC5/6-mediated repression. Detection of the complex suggests a reduction of the HBx protein by PEG-IFN- α , which seems to be of crucial importance for the antiviral activity of PEG-IFN- α as the reduction is not seen with PEG-IFN- λ . Underlying mechanisms for the reduction need to be further investigated. First comparative studies on the short-term impact on IFN- γ und IFN- α showed a similar antiviral activity for both interferons. For profound interpretations, however, observed effects need to be repeated with more mice as well as for a longer treatment period.

6 Abkürzungsverzeichnis

AAV	Adeno-assoziiertes viraler Vektor
Abb.	Abbildung
Actb	β -Actin
APOBEC3	Apolipoprotein B Editing Complex 3
ATP	Adenosintriphosphat
BE	Blutentnahme
BL	Baseline
BSA	bovines Serumalbumin
cccDNA	kovalent geschlossene zirkuläre DNA
CD46	Cluster of Differentiation 46
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
Ck-18	Cytokeratin-18
Ct	Schwellenwertzyklus
Cul4	Cullin4
CXCL10	C-X-C motif chemokine 10
DC	dendritische Zelle
DDB1	DNA-Schaden bindendes Protein 1
DHBV	Enten- Hepatitis-Virus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase I	Desoxyribonuklease I
DR	direkte Wiederholungen
Eef2	eukaryotischer Elongationsfaktor 2
engl.	englisch
ES	embryonale Stammzellen
FAH	Fumarylacetoacetase-Enzym
fw	vorwärts
GAF	Interferon-gamma-Aktivierungsfaktor
GAG	Heparansulfat-Proteoglykane
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GAS	Gamma-aktivierte Sequenz
HBcAg	Hepatitis-B-Core-Antigen
HBeAg	Hepatitis-B-e-Antigen
HBsAg	Hepatitis-B-Oberflächen-Antigen
HBV	Hepatitis-B-Virus
HBx	Hepatitis-B X-Protein
HCC	hepatozelluläres Karzinom

HHBV	Fischreier- Hepatitis-Virus
HLA	humane Leukozytenantigene
HLA-A2	humanes Leukozytenantigen A2
HLA-E	humanes Leukozytenantigen E
IFI35	Interferon-induziertes Protein 35
IFI44	Interferon-induziertes Protein 44
IFN- α	Interferon alpha
IFN- γ	Interferon gamma
IFN- λ	Interferon lambda
IL-2RG	Interleukin-2-Rezeptoruntereinheit Gamma
IL32	Interleukin 32
IRF9	Interferon-regulatorischer Faktor 9
ISG15	Interferon-stimuliertes Gen 15
ISGF3	IFN-stimulierter Genfaktor 3
ISGs	Interferon-stimulierten Gene
ISRE	Interferon-stimuliertes Response Element
JAK	Januskinase
KG	Körpergewicht
LHB	Großes Hepatitis-B-Oberflächenprotein
LLoD	lower limit of detection, untere Messgrenze
MAP	mitogen-activated protein
MHB	Mittleres Hepatitis-B-Oberflächenprotein
MHC-Komplex	Haupthistokompatibilitätskomplex
MOI	multiplicity of infection, Multiplizität der Infektion
mRNA	messenger RNA
MX1	Dynamamin-ähnliche GTPase 1
NF- κ B	Kernfaktor Kappa B
NFQ	nicht-fluoreszierender Quencher
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
NTBC	2-(2-Nitro-4-trifluormethyl-benzoyl)-1,3-cyclohexandion
NTCP	Natrium-Taurochlorat- Co-transportierendes Polypeptid
NUC	Nukleosid- beziehungsweise Nukleotidanalogen
OAS1	2'-5'-Oligoadenylatsynthetase 1
ORF	offener Leserahmen
p-ds-DNA-Genom	partiell doppelsträngigen DNA Genom
PEG	pegyliert
pgRNA	prägenomische RNA

PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PRR	Mustererkennungsrezeptor
qRT-PCR	quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion
Rag2	Rekombination-aktivierendes-Gen
rcDNA	entspannte zirkuläre DNA
RNA	Ribonukleinsäure
RNase H	Ribonuklease H
RPL30	ribosomales Protein L30
RTr	reverse Transkriptase
rv	rückwärts
S/CO	Signal zu Cutoff
SCID	schwerer kombinierter Immundefekt
SGHBV	Schneegans- Hepatitis-Virus
SHB	Kleines Hepatitis-B-Oberflächenprotein
SMC	structural maintenance of chromosomes
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TAP1	Antigenpeptid-Transporter 1
TYK2	Tyrosinkinase 2
uPA	Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator
USP18	Ubiquitin-spezifische Peptidase 18
vgl.	vergleiche
vs.	versus
WHV	Waldmurmeltier- Hepatitis-Virus
WMHBV	Wollaffen- Hepatitis-Virus

7 Literaturverzeichnis

- Akira, S., et al. (2006) Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell*, 124, 783-801.
- Allweiss, L. & Dandri, M. (2016) Experimental in vitro and in vivo models for the study of human hepatitis B virus infection. *J Hepatol*, 64, S17-s31.
- Allweiss, L. & Dandri, M. (2017) The Role of cccDNA in HBV Maintenance. *Viruses*, 9.
- Allweiss, L., et al. (2017) Immunofluorescent Staining for the Detection of the Hepatitis B Core Antigen in Frozen Liver Sections of Human Liver Chimeric Mice. *Methods Mol Biol*, 1540, 135-142.
- Allweiss, L., et al. (2014) Immune cell responses are not required to induce substantial hepatitis B virus antigen decline during pegylated interferon-alpha administration. *J Hepatol*, 60, 500-7.
- Ashley, C. L., et al. (2019) Interferon-Independent Upregulation of Interferon-Stimulated Genes during Human Cytomegalovirus Infection is Dependent on IRF3 Expression. *Viruses*, 11.
- Barker, L. F., et al. (1973) Transmission of type B viral hepatitis to chimpanzees. *J Infect Dis*, 127, 648-62.
- Bartenschlager, R. & Schaller, H. (1992) Hepadnaviral assembly is initiated by polymerase binding to the encapsidation signal in the viral RNA genome. *Embo j*, 11, 3413-20.
- Beck, J. & Nassal, M. (2007) Hepatitis B virus replication. *World journal of gastroenterology*, 13, 48-64.
- Bellezza, C. A., et al. (2015). The Laboratory Woodchuck (*Marmota monax*). In: Fox, J. G., Anderson, L. C., Otto, G. M., et al. (eds.) *Laboratory Animal Medicine (Third Edition)*. Boston: Academic Press, 351-386.
- Belloni, L., et al. (2012) 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*, 122, 529-37.
- Bock, C. T., et al. (1994) Hepatitis B virus genome is organized into nucleosomes in the nucleus of the infected cell. *Virus Genes*, 8, 215-29.
- Bock, C. T., et al. (2001) Structural organization of the hepatitis B virus minichromosome. *J Mol Biol*, 307, 183-96.
- Bockmann, J. H., et al. (2019) Comparative analysis of the antiviral effects mediated by type I and III interferons in hepatitis B virus infected hepatocytes. *J Infect Dis*.
- Bogler, Y., et al. (2018). Epidemiology and Natural History of Chronic Hepatitis B Virus Infection. In: Kao, J.-H. & Chen, D.-S. (eds.) *Hepatitis B Virus and Liver Disease*. Springer Nature Singapore, 63-90.
- Bonjardim, C. A., et al. (2009) Interferons: Signaling, antiviral and viral evasion. *Immunology Letters*, 122, 1-11.
- Bustin, S. A. (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*, 25, 169-93.
- Chan, H. L. Y., et al. (2016) Peginterferon lambda for the treatment of HBeAg-positive chronic hepatitis B: A randomized phase 2b study (LIRA-B). *J Hepatol*, 64, 1011-1019.
- Chang, S.-F., et al. (1999) A New Avian Hepadnavirus Infecting Snow Geese (*Anser caerulescens*) Produces a Significant Fraction of Virions Containing Single-Stranded DNA. *Virology*, 262, 39-54.
- Chaplin, D. D. (2010) Overview of the immune response. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 125, S3-S23.
- Chen, J., et al. (2020) Functional Comparison of IFN- α Subtypes Reveals Potent HBV Suppression by a Concerted Action of IFN- α and - γ Signaling. *Hepatology*, n/a.
- Chisari, F. V. & Ferrari, C. (1995) Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annu Rev Immunol*, 13, 29-60.
- Chisari, F. V., et al. (1985) A transgenic mouse model of the chronic hepatitis B surface antigen carrier state. *Science*, 230, 1157-60.

- Crowe, J. E. (2017). 122 - Host Defense Mechanisms Against Viruses. In: Polin, R. A., Abman, S. H., Rowitch, D. H., et al. (eds.) *Fetal and Neonatal Physiology (Fifth Edition)*. Elsevier, 1175-1197.e7.
- Dandri, M., et al. (2001) Repopulation of mouse liver with human hepatocytes and in vivo infection with hepatitis B virus. *Hepatology*, 33, 981-8.
- Dandri, M. & Petersen, J. (2012) Chimeric mouse model of hepatitis B virus infection. *J Hepatol*, 56, 493-5.
- Dandri, M. & Petersen, J. (2017) Animal models of HBV infection. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 31, 273-279.
- Dandri, M. & Petersen, J. (2018). HBV virology. In: Mauss, S., Berg, T., Rockstroh, J. R., et al. (eds.) *Hepatology – A clinical textbook*. 9th Edition. web-based, 87-104.
- Dane, D. S., et al. (1970) VIRUS-LIKE PARTICLES IN SERUM OF PATIENTS WITH AUSTRALIA-ANTIGEN-ASSOCIATED HEPATITIS. *The Lancet*, 295, 695-698.
- Datta, S. (2008) An overview of molecular epidemiology of hepatitis B virus (HBV) in India. *Virology journal*, 5, 156-156.
- Datta, S., et al. (2012) Molecular biology of the hepatitis B virus for clinicians. *Journal of clinical and experimental hepatology*, 2, 353-365.
- Davis, M. G. & Jansen, R. W. (1994) Inhibition of hepatitis B virus in tissue culture by alpha interferon. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 38, 2921-2924.
- Decorsiere, A., et al. (2016) Hepatitis B virus X protein identifies the Smc5/6 complex as a host restriction factor. *Nature*, 531, 386-9.
- Demma, S. & Dusheiko, G. (2015) The current treatment situation and definitions of a cure for chronic HBV infection. *Future Virology*, 11, 79-92.
- Di Bisceglie, A. M., et al. (2015) Recent US Food and Drug Administration warnings on hepatitis B reactivation with immune-suppressing and anticancer drugs: just the tip of the iceberg? *Hepatology*, 61, 703-11.
- Diaz, M. & Pecinka, A. (2018) Scaffolding for Repair: Understanding Molecular Functions of the SMC5/6 Complex. *Genes (Basel)*, 9.
- Donnelly, R. P. & Kotenko, S. V. (2010) Interferon-lambda: a new addition to an old family. *J Interferon Cytokine Res*, 30, 555-64.
- Durantel, D. & Zoulim, F. (2016) New antiviral targets for innovative treatment concepts for hepatitis B virus and hepatitis delta virus. *J Hepatol*, 64, S117-s131.
- EASL (2017) EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. *J Hepatol*, 67, 370-398.
- Eberharter, A. & Becker, P. B. (2002) Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. Second in review series on chromatin dynamics. *EMBO reports*, 3, 224-229.
- Fattovich, G., et al. (2008) Natural history of chronic hepatitis B: special emphasis on disease progression and prognostic factors. *J Hepatol*, 48, 335-52.
- Gerlich, W. H. (2013) Medical virology of hepatitis B: how it began and where we are now. *Virology journal*, 10, 239-239.
- Giersch, K., et al. (2017a) Serum HBV pgRNA as a clinical marker for cccDNA activity. *J Hepatol*, 66, 460-462.
- Giersch, K., et al. (2017b) Both interferon alpha and lambda can reduce all intrahepatic HDV infection markers in HBV/HDV infected humanized mice. *Sci Rep*, 7, 3757.
- Glebe, D. & Bremer, C. M. (2013) The molecular virology of hepatitis B virus. *Semin Liver Dis*, 33, 103-12.
- González-Jara, P., et al. (2009) The Multiplicity of Infection of a Plant Virus Varies during Colonization of Its Eukaryotic Host. *Journal of Virology*, 83, 7487.
- Goodbourn, S., et al. (2000) Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures. *Journal of General Virology*, 81, 2341-2364.
- Guidotti, L. G., et al. (1996a) Viral cross talk: intracellular inactivation of the hepatitis B virus during an unrelated viral infection of the liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 4589-94.
- Guidotti, L. G. & Chisari, F. V. (2001) Noncytolytic Control of Viral Infections by the Innate and Adaptive Immune Response. *Annual Review of Immunology*, 19, 65-91.

- Guidotti, L. G., et al. (1994) Interleukin-2 and alpha/beta interferon down-regulate hepatitis B virus gene expression in vivo by tumor necrosis factor-dependent and -independent pathways. *J Virol*, 68, 1265-70.
- Guidotti, L. G., et al. (1996b) Intracellular inactivation of the hepatitis B virus by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity*, 4, 25-36.
- Guidotti, L. G., et al. (1995) High-level hepatitis B virus replication in transgenic mice. *J Virol*, 69, 6158-69.
- Guo, P. (2013) Suppression of interferon-mediated antiviral immunity by hepatitis B virus: an overview of research progress. *Scand J Immunol*, 78, 230-7.
- Guo, W.-N., et al. (2018) Animal models for the study of hepatitis B virus infection. *Zoological research*, 39, 25-31.
- Gust, I. D., et al. (1986) Taxonomic Classification of Human Hepatitis B Virus. *Intervirology*, 25, 14-29.
- Hadziyannis, E. & Laras, A. (2018) Viral Biomarkers in Chronic HBeAg Negative HBV Infection. *Genes*, 9, 469.
- Hantz, O., et al. (2009) Persistence of the hepatitis B virus covalently closed circular DNA in HepaRG human hepatocyte-like cells. *J Gen Virol*, 90, 127-35.
- Hayashi, Y. & Koike, K. (1989) Interferon inhibits hepatitis B virus replication in a stable expression system of transfected viral DNA. *Journal of virology*, 63, 2936-2940.
- Holland, P. M., et al. (1991) Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88, 7276-7280.
- Hong, S.-H., et al. (2007) Effect of interferon-lambda on replication of hepatitis B virus in human hepatoma cells. *Virus Research*, 126, 245-249.
- Hong, X., et al. (2017) Epigenetic regulation of hepatitis B virus covalently closed circular DNA: Implications for epigenetic therapy against chronic hepatitis B. *Hepatology*, 66, 2066-2077.
- Huang, L. R., et al. (2012) Transfer of HBV genomes using low doses of adenovirus vectors leads to persistent infection in immune competent mice. *Gastroenterology*, 142, 1447-50.e3.
- Hwang, J.-R. & Park, S.-G. (2018) Mouse models for hepatitis B virus research. *Laboratory animal research*, 34, 85-91.
- Hyams, K. C. (1995) Risks of chronicity following acute hepatitis B virus infection: a review. *Clin Infect Dis*, 20, 992-1000.
- Kang, S., et al. (2018) Direct Antiviral Mechanisms of Interferon-Gamma. *Immune network*, 18, e33-e33.
- Kann, M., et al. (1999) Phosphorylation-dependent binding of hepatitis B virus core particles to the nuclear pore complex. *The Journal of cell biology*, 145, 45-55.
- Kassenärztliche Bundesvereinigung (2011) Wirkstoff aktuell - pegylierte Interferone: PegIntron® und Pegasys®. *Wirkstoff aktuell*, 05/2011.
- Kim, C. M., et al. (1991) HBx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice. *Nature*, 351, 317-20.
- Klumpp, K., et al. (2018) Efficacy of NVR 3-778, Alone and In Combination With Pegylated Interferon, vs Entecavir In uPA/SCID Mice With Humanized Livers and HBV Infection. *Gastroenterology*, 154, 652-662.e8.
- Kock, J., et al. (2001) Efficient infection of primary tupaia hepatocytes with purified human and woolly monkey hepatitis B virus. *J Virol*, 75, 5084-9.
- Kohli, A., et al. (2012) Distinct and overlapping genomic profiles and antiviral effects of Interferon- λ and - α on HCV-infected and noninfected hepatoma cells. *Journal of Viral Hepatitis*, 19, 843-853.
- Konerman, M. A. & Lok, A. S. (2016) Interferon Treatment for Hepatitis B. *Clinics in Liver Disease*, 20, 645-665.
- König, A. (2014). *Zoonotisches Potenzial neu entdeckter Orthohepadnaviren aus Fledermäusen und die Charakterisierung der Virus-Rezeptor Interaktionen des*

- Hepatitis B Virus*. Naturwissenschaftliche Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Königer, C., et al. (2014) Involvement of the host DNA-repair enzyme TDP2 in formation of the covalently closed circular DNA persistence reservoir of hepatitis B viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111, E4244-E4253.
- Korba, B. E., et al. (1989) Natural history of woodchuck hepatitis virus infections during the course of experimental viral infection: molecular virologic features of the liver and lymphoid tissues. *Journal of virology*, 63, 1360-1370.
- Kotenko, S. V., et al. (2003) IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat Immunol*, 4, 69-77.
- Koumbi, L. (2015) Current and future antiviral drug therapies of hepatitis B chronic infection. *World J Hepatol*, 7, 1030-40.
- Koumbi, L. & Karayiannis, P. (2015) The Epigenetic Control of Hepatitis B Virus Modulates the Outcome of Infection. *Front Microbiol*, 6, 1491.
- Koyama, S., et al. (2008) Innate immune response to viral infection. *Cytokine*, 43, 336-341.
- Kraß, P. (2006). *Bindung und Synthese von Hepatitis B-Virus surface Antigen durch primäre Tupaiahepatozyten*. Medizinische Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Lamontagne, R. J., et al. (2016) Hepatitis B virus molecular biology and pathogenesis. *Hepatoma research*, 2, 163-186.
- Lanford, R. E., et al. (1998) Isolation of a hepadnavirus from the woolly monkey, a New World primate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 5757-5761.
- Lazear, H., et al. (2019) Shared and Distinct Functions of Type I and Type III Interferons. *Immunity*, 50, 907-923.
- Lee, H. M. & Banini, B. A. (2019) Updates on Chronic HBV: Current Challenges and Future Goals. *Current Treatment Options in Gastroenterology*, 17, 271-291.
- Levero, M., et al. (2009) Control of cccDNA function in hepatitis B virus infection. *J Hepatol*, 51, 581-92.
- Li, J., et al. (2010) Inhibition of Hepatitis B Virus Replication by MyD88 Involves Accelerated Degradation of Pregenomic RNA and Nuclear Retention of Pre-S/S RNAs. *Journal of Virology*, 84, 6387.
- Li, N., et al. (2012) MxA inhibits hepatitis B virus replication by interaction with hepatitis B core antigen. *Hepatology*, 56, 803-11.
- Li, Y., et al. (2017) IFN-alpha-mediated Base Excision Repair Pathway Correlates with Antiviral Response Against Hepatitis B Virus Infection. *Sci Rep*, 7, 12715.
- Liang, T. J. (2009) Hepatitis B: The virus and disease. *Hepatology*, 49, S13-S21.
- Lin, C.-L. & Kao, J.-H. (2011) The clinical implications of hepatitis B virus genotype: Recent advances. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 26, 123-130.
- Lin, F. C. & Young, H. A. (2014) Interferons: Success in anti-viral immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev*, 25, 369-76.
- Liu, F., et al. (2013) Alpha-interferon suppresses hepadnavirus transcription by altering epigenetic modification of cccDNA minichromosomes. *PLoS pathogens*, 9, e1003613-e1003613.
- Liu, S.-Y., et al. (2012) Systematic identification of type I and type II interferon-induced antiviral factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109, 4239-4244.
- Liu, Y., et al. (2017) Interferon-inducible ribonuclease ISG20 inhibits hepatitis B virus replication through directly binding to the epsilon stem-loop structure of viral RNA. *PLoS Pathog*, 13, e1006296.
- Livingston, C. M., et al. (2017) Identifying and Characterizing Interplay between Hepatitis B Virus X Protein and Smc5/6. *Viruses*, 9.
- Loeb, D. D., et al. (1991) Sequence-independent RNA cleavages generate the primers for plus strand DNA synthesis in hepatitis B viruses: implications for other reverse transcribing elements. *Embo j*, 10, 3533-40.

- Lok, A. S. (2018). *Standard and pegylated interferon for chronic hepatitis B virus infection* [Online]. Verfügbar unter: <https://www.uptodate.com/contents/standard-and-pegylated-interferon-for-chronic-hepatitis-b-virus-infection> [Zuletzt abgerufen am 15.11.2020].
- Lucifora, J., et al. (2011) Hepatitis B virus X protein is essential to initiate and maintain virus replication after infection. *Journal of Hepatology*, 55, 996-1003.
- Lucifora, J., et al. (2014) Specific and nonhepatotoxic degradation of nuclear hepatitis B virus cccDNA. *Science*, 343, 1221-8.
- Lütgehetmann, M., et al. (2011) Hepatitis B virus limits response of human hepatocytes to interferon-alpha in chimeric mice. *Gastroenterology*, 140, 2074-83, 2083.e1-2.
- Malmstrom, S., et al. (2012) Hepatitis B viral DNA decline at loss of HBeAg is mainly explained by reduced cccDNA load--down-regulated transcription of PgRNA has limited impact. *PLoS One*, 7, e36349.
- Mao, R., et al. (2011) Indoleamine 2,3-dioxygenase mediates the antiviral effect of gamma interferon against hepatitis B virus in human hepatocyte-derived cells. *Journal of virology*, 85, 1048-1057.
- Mason, W. S., et al. (1980) Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. *Journal of virology*, 36, 829-836.
- Maynard, J. E., et al. (1972) Experimental infection of chimpanzees with the virus of hepatitis B. *Nature*, 237, 514-5.
- Mercer, D. F., et al. (2001) Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nature Medicine*, 7, 927-933.
- Meuleman, P., et al. (2005) Morphological and biochemical characterization of a human liver in a uPA-SCID mouse chimera. *Hepatology*, 41, 847-856.
- Micco, L., et al. (2013) Differential boosting of innate and adaptive antiviral responses during pegylated-interferon-alpha therapy of chronic hepatitis B. *J Hepatol*, 58, 225-33.
- Milich, D. R., et al. (1990) Is a function of the secreted hepatitis B e antigen to induce immunologic tolerance in utero? *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 6599-603.
- Mitra, B. & Guo, H. (2016) Hepatitis B virus X protein crosses out Smc5/6 complex to maintain covalently closed circular DNA transcription. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 64, 2246-2249.
- Mohr, R., et al. (2018). Hepatitis B. In: Mauss, S., Berg, T., Rockstroh, J. R., et al. (eds.) *Hepatology – A clinical textbook*. web-based, 39-53.
- Muir, A. J., et al. (2014) A randomized phase 2b study of peginterferon lambda-1a for the treatment of chronic HCV infection. *Journal of Hepatology*, 61, 1238-1246.
- Murphy, C. M., et al. (2016) Hepatitis B Virus X Protein Promotes Degradation of SMC5/6 to Enhance HBV Replication. *Cell Rep*, 16, 2846-2854.
- Nassal, M. (2015) HBV cccDNA: viral persistence reservoir and key obstacle for a cure of chronic hepatitis B. *Gut*, 64, 1972-84.
- National Library of Medicine at the National Institutes of Health (NIH) (2020). *ClinicalTrials.gov* [Online]. Verfügbar unter: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=pegylated+interferon+gamma&cnt ry=&state=&city=&dist=> [Zuletzt abgerufen am 17.05.2020].
- Newbold, J. E., et al. (1995) The covalently closed duplex form of the hepadnavirus genome exists in situ as a heterogeneous population of viral minichromosomes. *Journal of virology*, 69, 3350-3357.
- Nguyen, D. H., et al. (2007) Deamination-Independent Inhibition of Hepatitis B Virus Reverse Transcription by APOBEC3G. *Journal of Virology*, 81, 4465.
- Ni, Y., et al. (2014) Hepatitis B and D viruses exploit sodium taurocholate co-transporting polypeptide for species-specific entry into hepatocytes. *Gastroenterology*, 146, 1070-83.
- Niu, C., et al. (2017) The Smc5/6 Complex Restricts HBV when Localized to ND10 without Inducing an Innate Immune Response and Is Counteracted by the HBV X Protein Shortly after Infection. *PLOS ONE*, 12, e0169648.

- O'shea, J. J., et al. (2019). 9 - Cytokines and Cytokine Receptors. In: Rich, R. R., Fleisher, T. A., Shearer, W. T., et al. (eds.) *Clinical Immunology (Fifth Edition)*. London: Content Repository Only!, 127-155.e1.
- Pagliaccetti, N. E., et al. (2010) Lambda and alpha interferons inhibit hepatitis B virus replication through a common molecular mechanism but with different in vivo activities. *Virology*, 401, 197-206.
- Parvez, M. K., et al. (2006) Inhibition of hepatitis B virus DNA replicative intermediate forms by recombinant interferon-gamma. *World J Gastroenterol*, 12, 3006-14.
- Pasquetto, V., et al. (2002) Cytokine-sensitive replication of hepatitis B virus in immortalized mouse hepatocyte cultures. *Journal of virology*, 76, 5646-5653.
- Patient, R., et al. (2009) Morphogenesis of hepatitis B virus and its subviral envelope particles. *Cell Microbiol*, 11, 1561-70.
- Perng, Y.-C. & Lenschow, D. J. (2018) ISG15 in antiviral immunity and beyond. *Nature reviews. Microbiology*, 16, 423-439.
- Perou, C. M., et al. (1996) Identification of the murine beige gene by YAC complementation and positional cloning. *Nat Genet*, 13, 303-8.
- Petersen, J. (2018). Hepatitis B: diagnostic tests. In: Mauss, Stefan Et Al. (ed.) *Hepatology – A clinical textbook*. 9th. web-based.
- Petersen, J., et al. (1998) Liver repopulation with xenogenic hepatocytes in B and T cell-deficient mice leads to chronic hepadnavirus infection and clonal growth of hepatocellular carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 310-315.
- Pfaffl, M. W. (2004) Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum*, 1/04, 92-95.
- Phillips, S., et al. (2017) Peg-Interferon Lambda Treatment Induces Robust Innate and Adaptive Immunity in Chronic Hepatitis B Patients. *Frontiers in Immunology*, 8.
- Prange, R. (2012) Host factors involved in hepatitis B virus maturation, assembly, and egress. *Medical Microbiology and Immunology*, 201, 449-461.
- Pujol, F. H., et al. (2009) Worldwide genetic diversity of HBV genotypes and risk of hepatocellular carcinoma. *Cancer Letters*, 286, 80-88.
- Rabe, B., et al. (2006) Lipid-mediated introduction of hepatitis B virus capsids into nonsusceptible cells allows highly efficient replication and facilitates the study of early infection events. *J Virol*, 80, 5465-73.
- Rabe, B., et al. (2003) Nuclear import of hepatitis B virus capsids and release of the viral genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 9849-9854.
- Radziwill, G., et al. (1990) Mutational analysis of the hepatitis B virus P gene product: domain structure and RNase H activity. *J Virol*, 64, 613-20.
- Rathi, A. V., et al. (2010) Induction of interferon-stimulated genes by Simian virus 40 T antigens. *Virology*, 406, 202-211.
- Rhim, J. A., et al. (1995) Complete reconstitution of mouse liver with xenogeneic hepatocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 4942-4946.
- Robek, M. D., et al. (2005) Lambda Interferon Inhibits Hepatitis B and C Virus Replication. *Journal of Virology*, 79, 3851.
- Robert-Koch-Institut (2016). *RKI-Ratgeber - Hepatitis B und D* [Online]. Robert Koch-Institut. Verfügbar unter: https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_HepatitisB.html;jsessionid=73C3A79A967431A5587FB809D894BB03.2_cid381#doc2390050b_odyText1 [Zuletzt abgerufen am 15.11.2020].
- Robinson, W. S., et al. (1974) DNA of a human hepatitis B virus candidate. *Journal of virology*, 14, 384-391.
- Sadler, A. J. & Williams, B. R. G. (2008) Interferon-inducible antiviral effectors. *Nature Reviews Immunology*, 8, 559-568.
- Samuel, C. E. (2001) Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev*, 14, 778-809, table of contents.

- Schaefer, S., et al. (2010). Hepatitis-B-Virus (Hepadnaviridae). In: Doerr, H. W. & Gerlich, W. H. (eds.) *Medizinische Virologie*. 2., komplett überarbeitete und erweiterte Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 345-372.
- Schoggins, J. W. & Rice, C. M. (2011) Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions. *Curr Opin Virol*, 1, 519-25.
- Schultz, U. & Chisari, F. V. (1999) Recombinant duck interferon gamma inhibits duck hepatitis B virus replication in primary hepatocytes. *Journal of virology*, 73, 3162-3168.
- Schultz, U., et al. (1999) Elimination of duck hepatitis B virus RNA-containing capsids in duck interferon-alpha-treated hepatocytes. *Journal of virology*, 73, 5459-5465.
- Schulze, A., et al. (2007) Hepatitis B virus infection initiates with a large surface protein-dependent binding to heparan sulfate proteoglycans. *Hepatology*, 46, 1759-68.
- Seeger, C., et al. (1986) Biochemical and genetic evidence for the hepatitis B virus replication strategy. *Science*, 232, 477-84.
- Sheppard, P., et al. (2003) IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat Immunol*, 4, 63-8.
- Sirma, H. S., et al. (2006). Molekulare Virologie von Hepatitis-B- und -D-Viren. In: Heintges, T. & Häussinger, D. (eds.) *Hepatitis B: Infektion – Therapie – Prophylaxe*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, 1-22.
- Song, J., et al. (2017) Different antiviral effects of IFNalpha subtypes in a mouse model of HBV infection. *Sci Rep*, 7, 334.
- Sprengel, R., et al. (1988) Isolation and characterization of a hepatitis B virus endemic in herons. *Journal of virology*, 62, 3832-3839.
- Sprinzl, M. F., et al. (2001) Transfer of hepatitis B virus genome by adenovirus vectors into cultured cells and mice: crossing the species barrier. *J Virol*, 75, 5108-18.
- Stanifer, M. L., et al. (2019) Differential Regulation of Type I and Type III Interferon Signaling. *International journal of molecular sciences*, 20, 1445.
- Stavrou, S. & Ross, S. R. (2015) APOBEC3 Proteins in Viral Immunity. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 195, 4565-4570.
- Strom, S. C., et al. (2010) Chimeric mice with humanized liver: tools for the study of drug metabolism, excretion, and toxicity. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 640, 491-509.
- Summers, J. (1988) The replication cycle of hepatitis B viruses. *Cancer*, 61, 1957-1962.
- Summers, J., et al. (1975) Genome of hepatitis B virus: restriction enzyme cleavage and structure of DNA extracted from Dane particles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72, 4597-601.
- Summers, J., et al. (1978) A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75, 4533-4537.
- Tatematsu, K., et al. (2009) A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype J. *J Virol*, 83, 10538-47.
- Tateno, C., et al. (2004) Near completely humanized liver in mice shows human-type metabolic responses to drugs. *The American journal of pathology*, 165, 901-912.
- Thermo Fisher Scientific (2019). *So funktionieren TaqMan Assays* [Online]. ThermoFisher Scientific. Verfügbar unter: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/how-taqman-assays-work.html> [Zuletzt abgerufen am 13.12.2020].
- Thimme, R., et al. (2014) Hepatitis B und C: von der molekularen Virologie zu neuen Perspektiven in der Therapie. *Dtsch med Wochenschr*, 139, 655-659.
- Tropberger, P., et al. (2015) Mapping of histone modifications in episomal HBV cccDNA uncovers an unusual chromatin organization amenable to epigenetic manipulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112, E5715-24.
- Tsuge, M., et al. (2010) HBx protein is indispensable for development of viraemia in human hepatocyte chimeric mice. *J Gen Virol*, 91, 1854-64.

- Tu, T., et al. (2017) HBV DNA Integration: Molecular Mechanisms and Clinical Implications. *Viruses*, 9, 75.
- Tur-Kaspa, R., et al. (1990) Alpha interferon suppresses hepatitis B virus enhancer activity and reduces viral gene transcription. *Journal of virology*, 64, 1821-1824.
- U. S. Food and Drug Administration (FDA) (2020). *FDA-Approved Drugs* [Online]. Verfügbar unter: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=BasicSearch.process> [Zuletzt abgerufen am 21.05.2020].
- Uprichard, S. L., et al. (2003) Transcriptional and posttranscriptional control of hepatitis B virus gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 1310-1315.
- Van Bömmel, F., et al. (2018). Treatment of hepatitis B infections. In: Mauss, S., Berg, T., Rockstroh, J. R., et al. (eds.) *Hepatology – A clinical textbook*. web-based, 163-211.
- Vigano, M., et al. (2018) Treatment of hepatitis B: Is there still a role for interferon? *Liver Int*, 38 Suppl 1, 79-83.
- Wacker, M. J. & Godard, M. P. (2005) Analysis of one-step and two-step real-time RT-PCR using SuperScript III. *Journal of biomolecular techniques : JBT*, 16, 266-271.
- Waller, D. G. & Sampson, A. P. (2018). Liver disease. In: Waller, D. G. & Sampson, A. P. (eds.) *Medical Pharmacology and Therapeutics (Fifth Edition)*. Elsevier, 425-432.
- Walter, E., et al. (1996) Hepatitis B virus infection of tupaia hepatocytes in vitro and in vivo. *Hepatology*, 24, 1-5.
- Wang, J., et al. (2016) Serum hepatitis B virus RNA is encapsidated pregenome RNA that may be associated with persistence of viral infection and rebound. *J Hepatol*, 65, 700-710.
- Wang, J., et al. (2017) Relationship between serum HBV-RNA levels and intrahepatic viral as well as histologic activity markers in entecavir-treated patients. *J Hepatol*.
- Wang, L., et al. (2000) High-dose and long-term therapy with interferon-alfa inhibits tumor growth and recurrence in nude mice bearing human hepatocellular carcinoma xenografts with high metastatic potential. *Hepatology*, 32, 43-8.
- Wang, Q., et al. (2012) Experimental chronic hepatitis B infection of neonatal tree shrews (*Tupaia belangeri chinensis*): a model to study molecular causes for susceptibility and disease progression to chronic hepatitis in humans. *Virology*, 9, 170.
- Ward, J. W. & Damme, P. V. (2018). Hepatitis B Vaccines. In: Kao, J.-H. & Chen, D.-S. (eds.) *Hepatitis B Virus and Liver Disease*. Springer Nature Singapore, 91-118.
- Warren, C. J., et al. (2017) Roles of APOBEC3A and APOBEC3B in Human Papillomavirus Infection and Disease Progression. *Viruses*, 9, 233.
- Watanabe, T., et al. (2007) Involvement of host cellular multivesicular body functions in hepatitis B virus budding. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 10205-10.
- WHO (2017). *Global Hepatitis Report 2017* [Online]. Verfügbar unter: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/255016> [Zuletzt abgerufen am 17.10.2020].
- WHO (2019). *Hepatitis B - Key facts* [Online]. Verfügbar unter: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b> [Zuletzt abgerufen am 15.11.2019].
- Wieland, S. F. (2015) The chimpanzee model for hepatitis B virus infection. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 5.
- Wieland, S. F., et al. (2005) Interferon prevents formation of replication-competent hepatitis B virus RNA-containing nucleocapsids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 9913-7.
- Wieland, S. F., et al. (2000) Intrahepatic induction of alpha/beta interferon eliminates viral RNA-containing capsids in hepatitis B virus transgenic mice. *J Virol*, 74, 4165-73.
- Will, H., et al. (1987) Replication strategy of human hepatitis B virus. *J Virol*, 61, 904-11.
- Winer, B. Y., et al. (2016) In vivo models of hepatitis B and C virus infection. *FEBS letters*, 590, 1987-1999.
- Wong, D. J. & Locarnini, S. A. (2018). Molecular Virology and Life Cycle. In: Kao, J.-H. & Chen, D.-S. (eds.) *Hepatitis B Virus and Liver Disease*. Springer Nature Singapore, 1-24.
- Woo, A. S. J., et al. (2017) Alpha-interferon treatment in hepatitis B. *Annals of translational medicine*, 5, 159-159.

- Wu, Y. J., et al. (2011) Long-term antifibrotic action of interferon-gamma treatment in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 10, 151-7.
- Xia, Y., et al. (2017) Secreted Interferon-Inducible Factors Restrict Hepatitis B and C Virus Entry In Vitro. *Journal of immunology research*, 2017, 4828936-4828936.
- Xia, Y., et al. (2016) Interferon-gamma and Tumor Necrosis Factor-alpha Produced by T Cells Reduce the HBV Persistence Form, cccDNA, Without Cytolysis. *Gastroenterology*, 150, 194-205.
- Xu, C., et al. (2010) Interferons accelerate decay of replication-competent nucleocapsids of hepatitis B virus. *J Virol*, 84, 9332-40.
- Yan, H., et al. (2012) Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *eLife*, 1, e00049.
- Yan, R., et al. (2015) The Interferon-Inducible Protein Tetherin Inhibits Hepatitis B Virus Virion Secretion. *J Virol*, 89, 9200-12.
- Yang, C., et al. (2015) Chronic hepatitis B virus infection and occurrence of hepatocellular carcinoma in tree shrews (*Tupaia belangeri chinensis*). *Virol J*, 12, 26.
- Yang, D., et al. (2014) A mouse model for HBV immunotolerance and immunotherapy. *Cell Mol Immunol*, 11, 71-8.
- Yang, H.-C. & Kao, J.-H. (2014) Persistence of hepatitis B virus covalently closed circular DNA in hepatocytes: molecular mechanisms and clinical significance. *Emerging Microbes & Infections*, 3, 1-7.
- Yang, P. L., et al. (2002) Hydrodynamic injection of viral DNA: a mouse model of acute hepatitis B virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 13825-13830.
- Yang, Q., et al. (2017) Interferon-alpha inhibits cell migration and invasion and induces the expression of antiviral proteins in Huh-7 cells transfected with hepatitis B virus X gene-expressing lentivirus. *Exp Ther Med*, 14, 5924-5930.
- Yu, H., et al. (2010) Molecular and Phylogenetic Analyses Suggest an Additional Hepatitis B Virus Genotype "I". *PLOS ONE*, 5, e9297.
- Zhao, Y., et al. (2019) Biological Characteristics of Severe Combined Immunodeficient Mice Produced by CRISPR/Cas9-Mediated Rag2 and IL2rg Mutation. *Frontiers in genetics*, 10, 401-401.

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Globale Verteilung der HBV-Genotypen.....	2
Abbildung 1.2: Morphologie von infektiösen und subviralen Partikeln des Hepatitis-B-Virus.	3
Abbildung 1.3: Die Oberflächenproteine des Hepatitis-B-Virus.	4
Abbildung 1.4: Genomstruktur des Hepatitis-B-Virus.	5
Abbildung 1.5: Interaktion von HBx mit dem SMC5/6-Komplex.....	8
Abbildung 1.6: Schematische Darstellung der viralen RNA-Transkripte und daraus gebildeter Proteine.....	9
Abbildung 1.7: Replikationszyklus des Hepatitis-B-Virus.....	10
Abbildung 1.8: Schematische Darstellung von HBV-Mausmodellen.....	17
Abbildung 1.9: Generierung des HBV-infizierten humanisierten uPA/SCID-Mausmodells und Anwendungsmöglichkeiten.	20
Abbildung 1.10: Signalweg der Interferone.	24
Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der experimentellen Gruppen für die Behandlung mit PEG-Interferon- α und PEG-Interferon- λ	34
Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der experimentellen Gruppen für die Behandlung mit Interferon- α und Interferon- γ	35
Abbildung 2.3: Ablauf eines TaqMan Genexpressionsassays.....	37
Abbildung 3.1: HBV-Virämie.	46
Abbildung 3.2: HBsAg im Serum.....	47
Abbildung 3.3: HBeAg im Serum.	48
Abbildung 3.4: Prägenomische RNA im Serum.....	49
Abbildung 3.5: Intrahepatische HBV-RNA.....	51
Abbildung 3.6: Intrahepatische HBV-DNA und cccDNA.	52
Abbildung 3.7: Immunfluoreszenz-Färbung von HBcAg.....	54
Abbildung 3.8: Induktion klassischer humaner ISGs.	57
Abbildung 3.9: Induktion weiterer humaner ISGs.	58
Abbildung 3.10: Immunfluoreszenz-Färbung von humanem ISG15.	59
Abbildung 3.11: Immunfluoreszenz-Färbung von humanem MX1.	60
Abbildung 3.12: Induktion muriner ISGs.....	61
Abbildung 3.13: Induktion von humanem STAT1.	62
Abbildung 3.14: Immunfluoreszenz-Färbung von humanem STAT1.	63
Abbildung 3.15: Expressionsanalyse der humanen APOBEC3-Gene.	65
Abbildung 3.16: Induktion von humaner SMC6-mRNA.....	67
Abbildung 3.17: Immunfluoreszenz-Färbung von humanem SMC6.....	68
Abbildung 3.18: HBV-Virämie.	70
Abbildung 3.19: Prägenomische RNA im Serum.....	70
Abbildung 3.20: HBsAg im Serum.....	71
Abbildung 3.21: HBeAg im Serum.	71
Abbildung 3.22: Intrahepatische HBV-DNA und RNA.	72
Abbildung 3.23: Induktion humaner ISGs 1.....	74
Abbildung 3.24: Induktion humaner ISGs 2.....	75
Abbildung 4.1: Mögliches Modell zur antiviralen Wirkung von IFN- α	82

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Laborequipment.	28
Tabelle 2.2: Verbrauchsmaterialien.....	28
Tabelle 2.3: Chemikalien und Reagenzien.....	29
Tabelle 2.4: Puffer und Lösungen.	29
Tabelle 2.5: Kits.....	30
Tabelle 2.6: Enzyme.	30
Tabelle 2.7: Primärantikörper.....	30
Tabelle 2.8: Sekundärantikörper.....	31
Tabelle 2.9: Spezifische Primer und Sonden.	31
Tabelle 2.10: TaqMan Genexpressionsassays.	32
Tabelle 2.11: Pipettierschema der quantitativen PCR für die Messung von HBV-DNA im Serum.....	37
Tabelle 2.12: PCR-Zyklen der quantitativen Real-Time (qRT) PCR für die Messung von HBV-DNA.	38
Tabelle 2.13: Pipettierschema der quantitativen PCR für die Messung von pgRNA in Serum.	39
Tabelle 2.14: Pipettierschema für den Verdau mit Plasmid-Safe™ ATP-Dependent DNase.	40
Tabelle 2.15: Pipettierschema der quantitativen Real-Time PCR für die Messung von intrahepatischer HBV-DNA, cDNA und β -Globin.....	41
Tabelle 2.16: PCR-Zyklen der quantitativen Real-Time PCR für die Messung von cccDNA.	41
Tabelle 2.17: Pipettierschema der quantitativen Real-Time PCR für die Messung von cccDNA.	41
Tabelle 2.18: Pipettierschema der quantitativen Real Time PCR für die Messung von intrahepatischer HBV-RNA und GAPDH.....	42
Tabelle 2.19: Pipettierschema der quantitativen Real Time PCR für die Messung von intrahepatischer pgRNA.....	43
Tabelle 3.1: Expressionsänderung der ISGs durch Behandlung mit PEG-IFN- α oder PEG-IFN- λ	55
Tabelle 3.2: Expressionsänderung der ISGs durch Behandlung mit IFN- α oder IFN- γ	73

10 Danksagung

Mein größter Dank gilt Prof. Dr. Maura Dandri, die mir trotz meines begrenzten Zeitrahmens die großartige Gelegenheit gab, Teil ihrer Arbeitsgruppe zu werden und dieses Promotionsthema überließ. Ich danke ihr für die hervorragende Betreuung, die zahlreichen bereichernden Gespräche und Anregungen und die einzigartige Möglichkeit, die Ergebnisse auf einem Kongress vorstellen zu dürfen. Ganz besonders möchte ich Prof. Dr. Maura Dandri für die stetige, immer herzliche Hilfsbereitschaft danken, die sie mir jederzeit entgegenbrachte.

Der gesamten Arbeitsgruppe Dr. Marc Lütgehetmann, Dr. Katja Giersch, Dr. Janine Kah, Dr. Jan-Hendrik Bockmann, Andrea Piroso, Claudia Dettmer und Corinna Eggers danke ich für die offene und warmherzige Aufnahme, die Betreuung der Mäuse, die unentwegte Unterstützung und die wunderbare Zeit sowohl innerhalb als auch außerhalb des Labors, an die ich mich immer gern zurückerinnern werde. Insbesondere möchte ich Dr. Lena Allweiss danken für ihre konstruktive Hilfe und ihre Ideen und das selbstverständliche Beantworten aller Fragen. Auch gilt mein besonderer Dank Dr. Tassilo Volz, der mich jederzeit mit einem offenen Ohr, seiner praktischen Erfahrung und seiner unermüdlichen gutmütigen Bereitschaft zur Hilfe in jeglichen Fragen und Anliegen unterstützte.

Außerdem möchte ich mich bei meiner Familie und meinem Freund dafür bedanken, dass sie mir unentwegt Rückhalt entgegenbrachten und mich stets in all meinen Entscheidungen bestärkten.

11 Lebenslauf

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

12 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: