

IFN α -Subtyp-spezifische Suszeptibilität von HBV und SARS-CoV-2 im Laufe der Infektion

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.

der Fakultät für Biologie
an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Jonas Schuhenn

aus Hachenburg
März 2022

Die der vorliegenden Arbeit zu Grunde liegenden Experimente wurden am Institut für Virologie (AG Sutter) der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: PD Dr. Kathrin Sutter
2. Gutachter: Prof. Dr. Stefanie Flohé
3. Gutachter: Prof. Dr. Philipp Lang

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: PD Dr. Marc Seifert

Tag der mündlichen Prüfung: 08. November 2022

DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT
DUISBURG
ESSEN

Offen im Denken

ub | universitäts
bibliothek

Diese Dissertation wird via DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

DOI: 10.17185/duepublico/77138

URN: urn:nbn:de:hbz:465-20230403-075618-3

Alle Rechte vorbehalten.

Der folgende wissenschaftliche Artikel wurde im Verlauf dieser Doktorarbeit veröffentlicht. Inhalte dieser Veröffentlichung wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet und mit entsprechenden Verweisen versehen.

Differential interferon- α subtype induced immune signatures are associated with suppression of SARS-CoV-2 infection

Jonas Schuhenn, Toni Luise Meister, Daniel Todt, Thilo Bracht, Karin Schork, Jean-Noel Billaud, Carina Elsner, Natalie Heinen, Zehra Karakoese, Sybille Haid, Sriram Kumar, Linda Brunotte, Martin Eisenacher, Yunyun Di, Jocelyne Lew, Darryl Falzarano, Jieliang Chen, Zhenghong Yuan, Thomas Pietschmann, Bettina Wiegmann, Hendrik Uebner, Christian Taube, Vu Thuy Khanh Le-Trilling, Mirko Trilling, Adalbert Krawczyk, Stephan Ludwig, Barbara Sitek, Eike Steinmann, Ulf Dittmer, Kerry J. Lavender, Kathrin Sutter

PNAS, Feb 2022; 119:e2111600119. doi: 10.1073/pnas.2111600119

PMID: 35131898

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Typ I Interferone	1
1.1.1	Funktion im Kontext des angeborenen Immunsystems	1
1.1.2	Induktion von Typ-I-IFN durch Erkennung pathogener Strukturen	3
1.1.3	Der IFN α -Signalweg und die Induktion von ISGs	8
1.1.4	ISGs und deren Funktionen	10
1.1.5	Therapeutische Verwendung von IFN α	11
1.1.6	Die verschiedenen IFN α -Subtypen und deren Bedeutung.....	12
1.2	Das Hepatitis B Virus	14
1.2.1	Der Replikationszyklus von HBV	14
1.2.2	HBV und IFN α	17
1.3	Das SARS-Coronavirus-2	19
1.3.1	Aufbau und Replikationszyklus von SARS-CoV-2	20
1.3.2	SARS-CoV-2 und IFN α	24
2	Fragestellung und Zielsetzung	26
3	Material	27
3.1	Geräte	27
3.2	Verbrauchsmaterialien	28
3.3	Chemikalien und Reagenzien	29
3.4	Kommerzielle Kits	31
3.5	Puffer und Lösungen	32
3.6	Nährmedien	34
3.7	Antikörper	36
3.8	Zelllinien	36
3.9	Primärzellen	38
3.10	Bakterien	38

3.11	Viren	38
3.12	Plasmide	39
3.13	Oligonukleotide	41
3.14	Software	43
4	Methoden	44
4.1	Zellkultur	44
4.1.1	Kultivierung von Zelllinien	44
4.1.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	44
4.1.3	Bestimmung der Zellzahl	45
4.1.4	Bestimmung der Zellviabilität	45
4.1.5	Differenzierung von HepaRG Zellen	45
4.1.6	Isolation und Kultivierung von primären humanen Hepatozyten	45
4.1.7	Kultivierung von humanen AE Zellen.....	47
4.2	Virusherstellung und Titerbestimmung	48
4.2.1	Herstellung von infektiösen HBV Partikeln	48
4.2.2	Bestimmung des HBV-Titers im Virusstock oder Zellüberständen.....	48
4.2.3	Bestimmung des HBsAg Titers in Zellkulturüberständen.....	49
4.2.4	Herstellung von infektiösen SARS-CoV-2 Partikeln.....	49
4.2.5	Bestimmung des SARS-CoV-2 Titers mittels Endpunkt-Verdünnung	50
4.3	Stimulationen und Infektionsversuche	50
4.3.1	Infektion von dHepaRG Zellen und primären humanen Hepatozyten mit HBV	50
4.3.2	Stimulation von PHHs mit HBV und Poly I:C zur Induktion von IFN	51
4.3.3	Infektion von humanen AE Zellen mit SARS-CoV-2	51
4.3.4	Stimulation von Calu-3 Zellen mit (UV-inaktiviertem) SARS-CoV-2 und Poly I:C zur Induktion von IFN	51
4.3.5	<i>In-cell</i> ELISA (icELISA).....	52

4.3.6	Fluoreszenzmikroskopische Färbung von SARS-CoV-2 infizierten Zellen Vero E6 Zellen	53
4.4	Quantifizierung von DNA und RNA	53
4.4.1	Isolation von RNA aus Zelllysaten	53
4.4.2	Synthese von cDNA aus RNA	53
4.4.3	Relative Quantifizierung von mRNA mittels qPCR.....	54
4.4.4	PCR-Protokolle	54
4.5	Interferone	55
4.5.1	Herstellung von IFN α -Mutanten mittels <i>site-directed mutagenesis</i>	55
4.5.2	Herstellung von rekombinatem IFN	55
4.5.3	Semiquantitative Bestimmung von IFN in Zellkulturüberständen.....	55
4.6	Transkriptom- und Proteomanalysen.....	56
4.6.1	Vorbereitung der Proben zur Proteomanalyse.....	56
4.6.2	Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS- Analyse).....	56
4.6.3	Analyse der Proteomdaten	57
4.6.4	Transkriptom-Quantifizierung.....	57
4.6.5	Analyse der Transkriptomdaten	57
5	Ergebnisse	59
5.1	Induktion von Typ-I-IFN	59
5.1.1	IFN-Induktion durch HBV	59
5.1.2	IFN-Induktion durch SARS-CoV-2	61
5.2	Der antivirale Effekt von IFNα-Subtypen.....	63
5.2.1	Der antivirale Effekt von IFN α -Subtypen auf HBV	63
5.2.2	Die Induktion von ISGs in Leberzellen nach der Stimulation mit IFN α - Subtypen	65
5.2.3	Der Effekt einer HBV-Infektion auf die Genexpression von APOBEC3 ...	69

5.2.4	Der antivirale Effekt von IFN α -Subtypen auf SARS-CoV-2 in Vero E6 Zellen.....	71
5.2.5	Die Genexpression von ISGs nach Stimulation mit IFN α -Subtypen in Vero E6 Zellen	75
5.2.6	Der antivirale Effekt von IFN α -Subtypen auf SARS-CoV-2 in humanen AE Zellen.....	78
5.2.7	Transkriptomanalyse von humanen AE Zellen nach Stimulation mit IFN α -Subtypen	82
5.2.8	Proteomanalyse von humanen AE Zellen nach SARS-CoV-2-Infektion und IFN-Stimulation	85
5.2.9	Der Effekt einer Kombinationstherapie mit IFN α und Remdesivir auf SARS-CoV-2.....	88
5.2.10	Die Modulation des antiviralen Effekts von IFN α -Subtypen durch IL-1 β ..	92
5.3	Der antivirale Effekt von IFNα2-Mutanten auf HBV und SARS-CoV-2	98
5.3.1	Übersicht über die verwendeten IFN α -Mutanten	98
5.3.2	Der antivirale Effekt der der Mutanten auf HBV und SARS-CoV-2.....	101
6	Diskussion	106
6.1	Die Induktion von Typ-I-IFN durch HBV und SARS-CoV-2	106
6.2	Der antivirale Effekt der IFNα-Subtypen	109
6.2.1	Der Effekt der IFN α -Subtypen auf die HBV-Infektion und die Expression von ISGs.....	109
6.2.2	Der Effekt der IFN α -Subtypen auf die SARS-CoV-2-Infektion und die Expression von ISGs	112
6.2.3	Modulation der IFN α 2-Aktivität durch Kostimulation mit IL-1 β	116
6.3	Ein verbesserter antiviraler Effekt durch gezielte Mutation von IFNα2.	118
7	Zusammenfassungen.....	120
7.1	Zusammenfassung	120
7.2	Summary.....	122
8	Literaturverzeichnis	124

9	Anhang	149
9.1	Abkürzungsverzeichnis.....	149
9.2	Abbildungsverzeichnis.....	154
9.3	Tabellenverzeichnis	156
9.4	Danksagung	157
9.5	Lebenslauf	158
9.6	Eidesstattliche Erklärungen.....	160

1 Einleitung

1.1 Typ-I-Interferone

Als Alick Isaacs und Jean Lindenmann 1957 am Influenzavirus forschten, stellten sie fest, dass die Überstände von Zellen, die mit Hitze-inaktiviertem Influenzavirus inkubiert wurden, auf anderen Zellen die Replikation des Influenzavirus stark inhibieren konnten. Sie schlossen daraus, dass die Zellen nach Kontakt mit dem Virus eine Substanz sekretieren, die vor einer Virusinfektion schützt. Aufgrund ihrer Eigenschaft die virale Replikation zu stören (engl. *to interfere*), wurde diese Substanz Interferon (IFN) genannt [96, 231]. Über 60 Jahre später hat die Erforschung der IFN das Wissen über ihre Struktur, Funktion und Wirkungsweise erheblich erweitert. Mittlerweile ist bekannt, dass es nicht nur ein IFN gibt, sondern zahlreiche verschiedene Proteine, die zu dieser Zytokinfamilie des angeborenen Immunsystems gehören. Man unterscheidet u.a. basierend auf der Rezeptorinteraktion, der chromosomalen Lokalisation und der Struktur im Menschen zwischen Typ-I- (α , β , ω , κ , ϵ), Typ-II- (γ) und Typ-III-IFN ($\lambda 1$, $\lambda 2$, $\lambda 3$) [12]. Im Rahmen dieser Arbeit wird der Begriff IFN synonym für die Typ-I-IFN verwendet, sofern nicht anders beschrieben, da sich die Untersuchungen hauptsächlich auf diese Gruppe beschränken.

Insgesamt wurden bisher 17 nicht-allelische, intronfreie Gene für die IFN gefunden, die auf Chromosom 9 lokalisiert sind. Diese kodieren für 12 verschiedene IFN α Proteine und je ein Protein IFN β , IFN ω , IFN κ und IFN ϵ [180]. All diese Proteine stellen einen essentiellen Bestandteil des angeborenen Immunsystems dar und werden hauptsächlich von plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDCs) exprimiert, auch wenn im Grunde fast alle Zellen IFN produzieren können [215]. Neben der angesprochenen antiviralen Eigenschaft, auf die noch in Kapitel 1.1.4 genauer eingegangen wird, sind mittlerweile auch antiproliferative und immunmodulatorische Effekte beschrieben, die in dieser Arbeit aber eine untergeordnete Rolle spielen und nicht weiter diskutiert werden [17, 71].

1.1.1 Funktion im Kontext des angeborenen Immunsystems

Die physische, erste Barriere des Immunsystems stellt die Haut dar, die in ständigem Austausch mit Signalen und Organismen der Umgebung steht und das Eindringen von Pathogenen verhindert [2]. Wenn diese Barriere beispielsweise durch mechanische Reize verletzt wird, ermöglicht dies das Eindringen von Pathogenen wie z.B. Bakterien,

Viren oder Pilzen. In diesem Fall ist es notwendig, dass das angeborene Immunsystem die Pathogene erkennt und bekämpft.

Im Rahmen des angeborenen Immunsystems spielen IFN eine essentielle Rolle als Mediator zwischen verschiedenen Zelltypen und letztlich auch in der Aktivierung der adaptiven Immunantwort. Die Erkennung von Pathogenen durch spezialisierte Rezeptoren führt zur Expression von IFN (siehe auch Kapitel 1.1.2), wobei IFN β von nahezu allen Zelltypen produziert wird, IFN α primär von pDCs. Weiterhin sind auch Makrophagen in der Lage IFN zu produzieren (Abb. 1) [30, 233]. Die Expression von IFN versetzt die infizierte Zelle sowie benachbarte Zellen in einen so genannten antiviralen Zustand (engl. *antiviral state*) [97]. Dieser wird durch die IFN-initiierte Expression von hunderten *interferon-stimulated genes* (ISGs) hervorgerufen, die durch zahlreiche Mechanismen beispielweise zur Inhibition viraler Transkription, Translation und Replikation sowie der Degradation viraler Nukleinsäuren führen können (Abb. 1) [144, 205]. Neben den intrinsischen zellulären Effekten, weisen zahlreiche Studien auch auf Effekte hin, die das adaptive Immunsystem betreffen. Hierzu gehören u.a. eine Erhöhung der Oberflächenexpression von *major histocompatibility complex* (MHC)-Molekülen und kostimulatorischer Moleküle wie *cluster of differentiation* (CD)80 und CD86, die mit einer verbesserten Antigenpräsentation und Stimulation von T-Zellen assoziiert sind [121, 162, 220]. Auch der Einfluss auf B-Zellen durch IFN wurde bereits beschrieben. So begünstigen IFN die Produktion von Antikörpern, deren Klassenwechsel zur Immunglobulin G (IgG)-Klasse und die Etablierung eines langanhaltenden B-Zell-Gedächtnisses [122, 186].

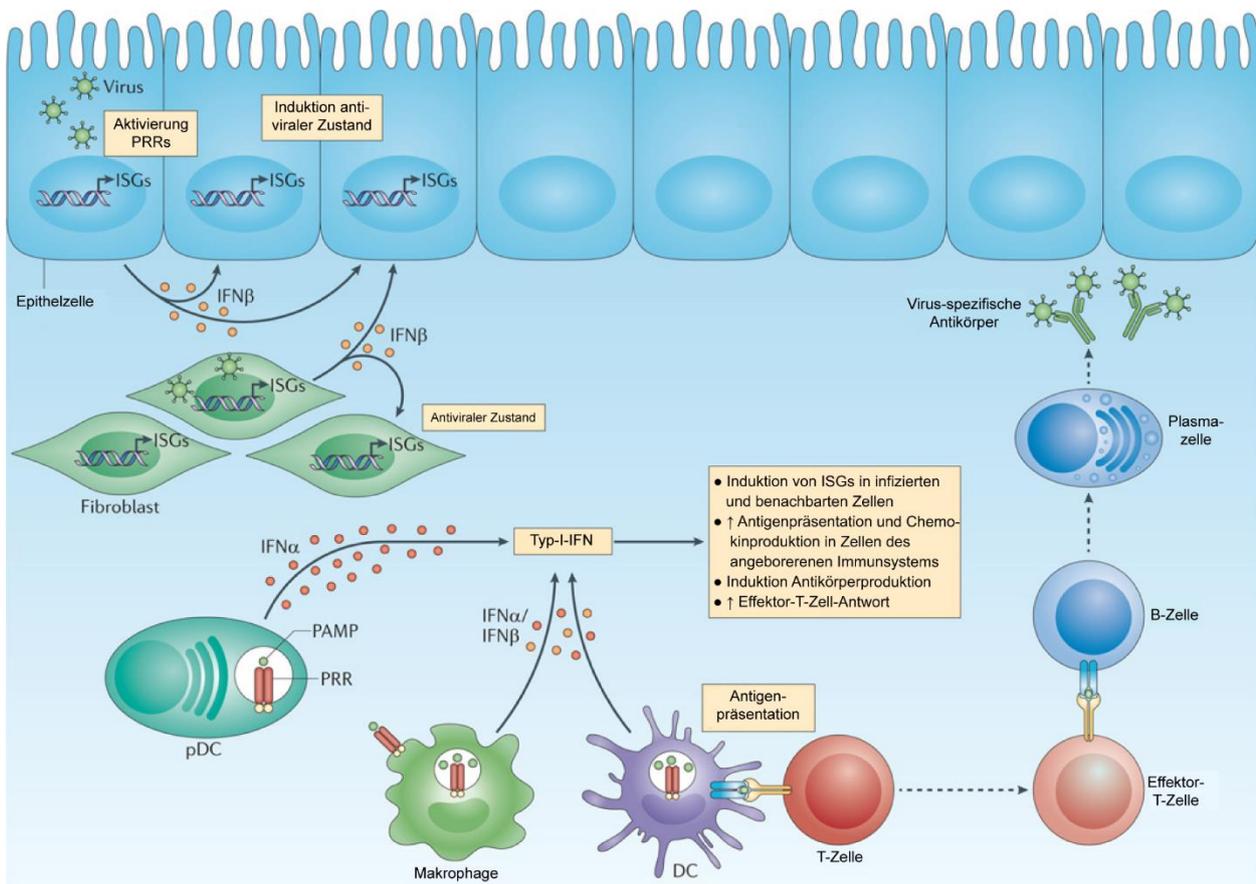


Abbildung 1: Typ-I-IFN kontrolliert angeborene und adaptive Immunität sowie die intrazellulären antimikrobiellen Programme.

Nach Pathogenerkennung produzieren infizierte Zellen IFN. Immunzellen des angeborenen Immunsystems wie Makrophagen oder DCs produzieren IFN nach dem Erkennen von mikrobiellen Strukturen mittels Mustererkennungsrezeptoren, welche sich auf der zellulären und endosomalen Membran sowie im Zytosol finden. Besonders pDCs produzieren große Mengen IFN α . Nicht-Immunzellen wie Fibroblasten oder Epithelzellen exprimieren überwiegend IFN β . In infizierten und benachbarten Zellen führen IFN zur Expression von ISGs, welche das intrazelluläre antimikrobielle Programm initiieren, dass die Vermehrung von Pathogenen inhibiert. Immunzellen des angeborenen Immunsystems reagieren auch auf IFN mit der Verbesserung der Antigenpräsentation und der Produktion von Zytokinen und Chemokinen. Die adaptive Immunantwort wird ebenfalls von IFN beeinflusst. Zum Beispiel verstärken IFN die Antikörperproduktion in B-Zellen und begünstigen die Effektorfunktionen von T-Zellen. Verändert nach [97]

1.1.2 Induktion von Typ-I-IFN durch Erkennung pathogener Strukturen

Die Expression von IFN erfolgt transient und wird durch die Erkennung von Pathogenen durch spezialisierte Rezeptoren induziert. Die Pathogene werden dabei durch Molekülstrukturen identifiziert, die als Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs, engl. *pathogen-associated molecular patterns*) bezeichnet werden. Diese Molekülstrukturen sind in der Regel unverzichtbar für den Lebenszyklus der Pathogene und daher hochkonserviert [5]. Es handelt sich dabei beispielsweise um Lipide, Nucleinsäuren, Proteine oder Zuckerstrukturen. Die Rezeptoren, die auf die Erkennung der PAMPs spezialisiert sind, sind die sogenannten keimbahnkodierten Mustererkennungsrezeptoren (PRRs, engl. *pattern recognition receptors*). Exprimiert

werden die Rezeptoren zwar grundsätzlich auf einem breiten Spektrum an Zellen, am stärksten abundant sind sie jedoch auf Oberflächen-Epithelzellen und Immunzellen wie Makrophagen oder DCs, die in aller Regel zuerst mit den Pathogenen in Kontakt kommen. Dort findet man die PRRs an den zellulären und endosomalen Membranen, im Zytosol oder auch in sekretierter Form im Blut und in der Extrazellulärflüssigkeit [154]. Man unterscheidet im Wesentlichen zwischen vier großen Unterfamilien der PRRs: den Toll-ähnlichen Rezeptoren (TLRs, engl. *toll-like receptors*), den NOD-ähnlichen Rezeptoren (NLRs, engl. *NOD-like receptors*), den RIG-I-ähnlichen Rezeptoren (RLRs, engl. *retinoic acid-inducible gene 1-like receptors*) und den C-Typ-Lektin-Rezeptoren (CLRs, engl. *C-type lectin receptors*) [7]. Im Folgenden sollen die TLRs und die RLRs näher betrachtet werden.

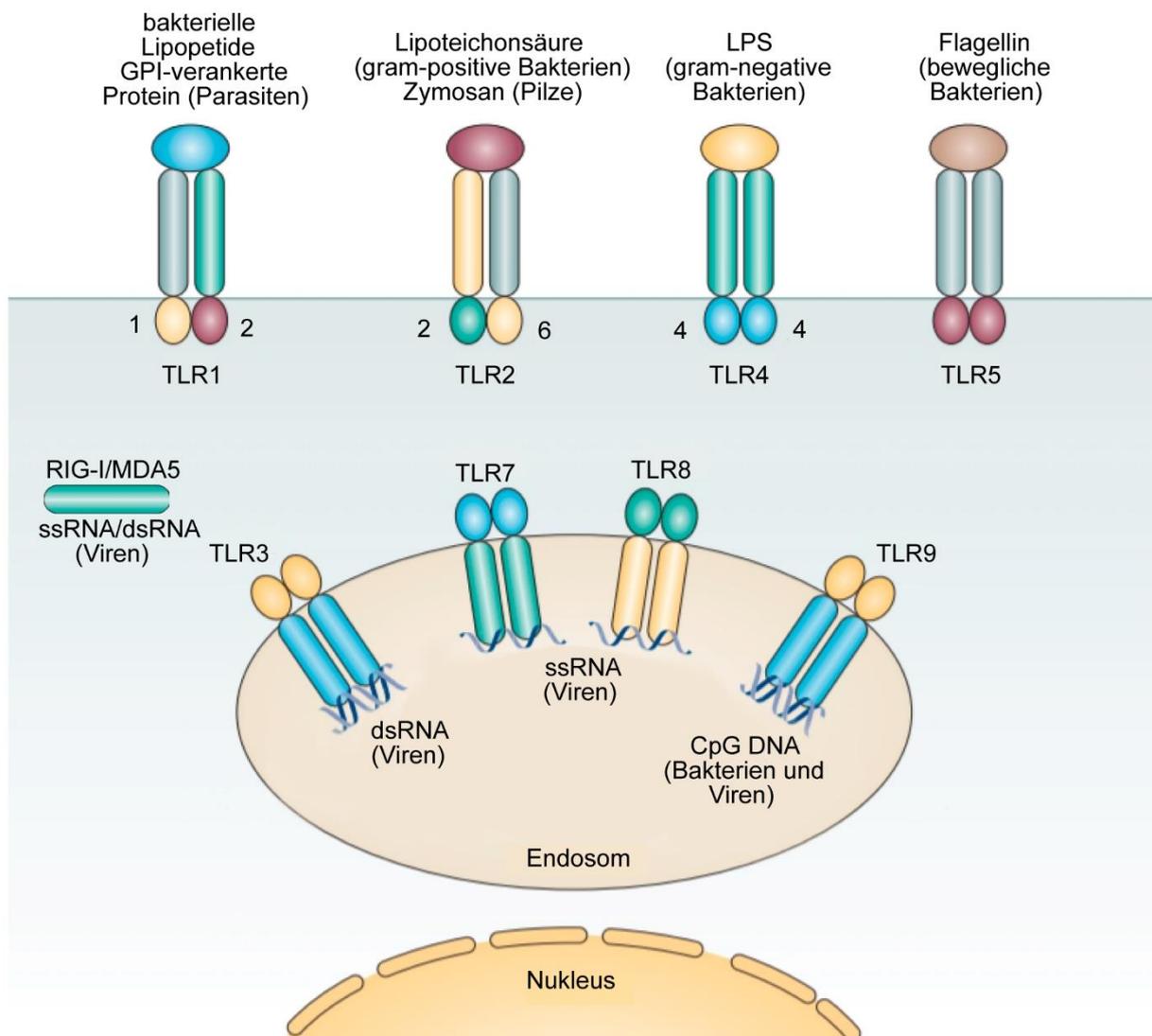


Abbildung 2: TLRs, RLRs und ihre Liganden.

TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 und TLR6 werden auf der Zelloberfläche exprimiert. Ihre extrazellulären Domänen erkennen PAMPs und ihre intrazellulären Domänen, die als Homo- oder Heterodimere fungieren,

leiten Signale über zytoplasmatische Signalproteine weiter. Die spezifischen PAMPs sind oberhalb der Rezeptoren aufgelistet. TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 sind an der endosomalen Membran lokalisiert und erkennen hauptsächlich virale Nukleinsäuren. Die Liganden-bindenden Domänen befinden sich im Lumen, die Signaldomänen im Zytoplasma. RIG-I und MDA5 befinden sich im Zytoplasma und erkennen virale RNA-Strukturen. GPI, Glycosylphosphatidylinositol; LPS, Lipopolysaccharid. Abbildung verändert nach [23].

Die zehn verschiedenen TLRs (TLR1-TLR10) sind auf der zellulären sowie endoplasmatischen Membran verteilt und bestehen aus einer Erkennungsdomäne, die an die PAMPs bindet und aus 20-27 extrazellulären Leucin-reichen Wiederholungen (LRR, engl. *leucin-rich repeats*) besteht, und einer intrazellulären Toll-Interleukin 1 Rezeptor- Domäne (TIR, engl. *toll-interleukin 1 receptor*), die aus Homo- oder Heterodimeren besteht (Abb. 2) [64]. Für die Erkennung viraler Pathogene sind hauptsächlich die endoplasmatischen TLRs verantwortlich, die virale DNA und RNA erkennen können; die Beteiligung von TLR2 und TLR4 wurde aber auch bereits beschrieben [5, 25, 106]. Die Bindung eines Liganden an die TLRs führt zur Signalweiterleitung über rekrutierte Adapterproteine. Dabei wird grundsätzlich zwischen zwei verschiedenen Signalwegen unterschieden, dem *Myeloid differentiation primary response 88* (MyD88)-Signalweg, der von allen TLRs außer TLR3 genutzt wird und zur Produktion inflammatorischer Zytokine führt, und dem *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β* (TRIF)-Signalweg, der vor allem durch TLR3- und TLR4-Ligandenbindung aktiviert wird und zur IFN-Produktion beiträgt [104, 270].

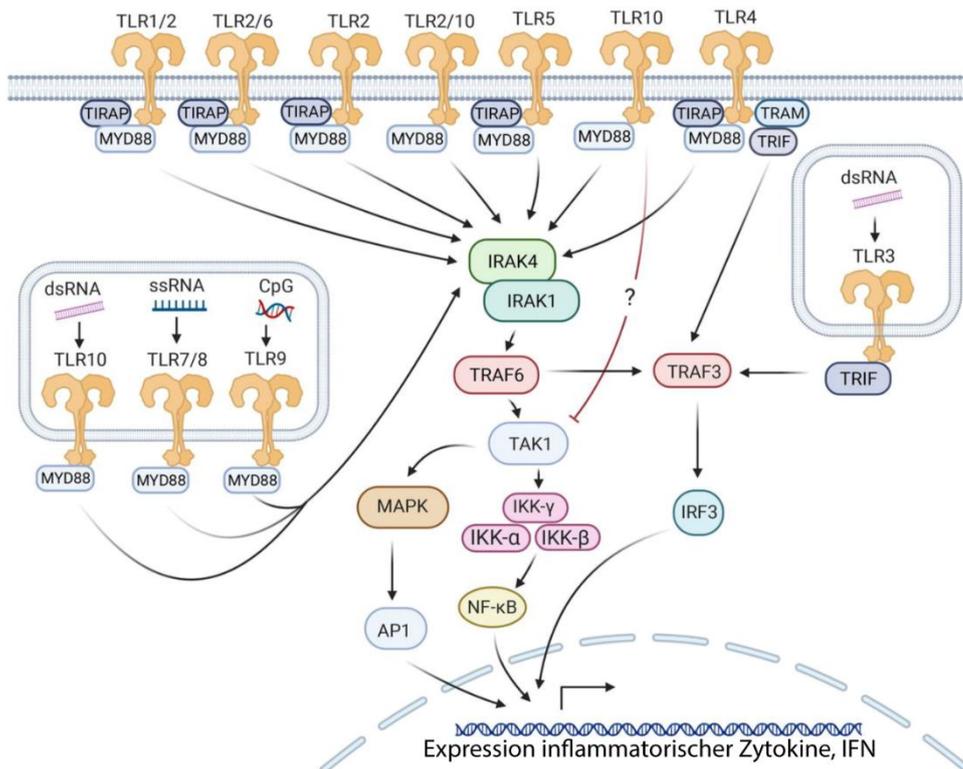


Abbildung 3: Schematische Darstellung der klassischen TLR-Signalwege.

TLRs können Signale MyD88-abhängig oder –unabhängig weiterleiten. Im MyD88-abhängigen Signalweg, wird die Aktivierung der proinflammatorischen Transkriptionsfaktoren AP1 und NF-κB induziert durch IRAK1/4, TRAF6 und TAK1. Im MyD88-unabhängigen Signalweg initiiert das Adaptermolekül TRIF eine Signalweiterleitung über TRAF3 und IRF, was ebenfalls zu einer Induktion der Transkription proinflammatorischer Gene führt. Zusätzlich führt die Aktivierung von IRF3 zu einer Induktion der IFN-Produktion. TAK1, *transforming growth factor-β-activated kinase-1*; TIRAP, *toll-IL-1 receptor domain containing adaptor protein*. Verändert nach [169]

Die Aktivierung von MyD88 durch Bindung eines Liganden an den TLR führt über eine *IL-1R-associated kinase* (IRAK)-vermittelte Phosphorylierungskaskade zur Aktivierung von *TNF receptor associated factor 6* (TRAF6), einer E3 Ubiquitin Ligase. TRAF6 wiederum fördert die eigene Lys-63-verlinkte Polyubiquitinierung und jene von IκB Kinase (IKK)-γ [33]. Infolgedessen kommt es zur Aktivierung von zwei weiteren Kinasen, IKKα und IKKβ, welche inhibitorische *nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor* (IκB) Proteine phosphorylieren. Die IκBs inhibieren normalerweise *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF-κB) im Zytoplasma, werden jedoch durch die Phosphorylierung degradiert und ermöglichen so die Aktivierung und Translokation von NF-κB in den Zellkern. Dies führt zur Expression von inflammatorischen Zytokinen (Abb. 3) [163]. Weiterhin ermöglicht die Polyubiquitinierung von TRAF6 auch eine *mitogen-activated protein kinase* (MAPK)-vermittelte Aktivierung des Transkriptionsfaktors *activator protein 1* (AP1), was ebenfalls zur Transkription proinflammatorischer Zytokine führt. Zusätzlich ist es in pDCs auch möglich, dass die

TLR7- und TLR9-vermittelte Aktivierung von MyD88 zu einer Induktion von IFN führt [163]. *Interferon regulatory factor* (IRF)-7 wird in pDCs konstitutiv exprimiert und bildet mit MyD88 und weiteren Proteinen einen Signalkomplex, in dem IRF-7 phosphoryliert wird, dissoziiert und im Nukleus die IFN Produktion initiiert [84, 105].

Wie bereits erwähnt, spielt vor allem für TLR3, aber auch für TLR4 der TRIF-Signalweg eine wichtige Rolle. Die Bindung eines Liganden an TLR3 führt zur direkten Bindung von TRIF an die TIR-Domäne, aber auch an TRAF6 [172, 199]. Bei TLR4 ist zusätzlich die Beteiligung von *TRIF-related adaptor molecule* (TRAM) nötig (Abb. 2) [171]. TRIF initiiert, vermittelt über TRAF3, die Aktivierung von IRF3, welches in den Nukleus transloziert und die Transkription aller Typ-I-IFN induziert.

Weitere PRRs, die essentiell für die Induktion von IFN sind, sind die bereits erwähnten RLRs, die sich im Zytosol aller Zelltypen finden [202]. Während RIG-I relativ gut erforscht ist und man weiß, dass es Liganden bindet, die eine einzelsträngige (ss, engl. *single-stranded*) RNA oder doppelsträngige (ds, engl. *double-stranded*) RNA mit einem Triphosphat am 5'-Ende aufweisen, sind die Voraussetzungen für eine *melanoma differentiation-associated protein 5* (MDA5)-Aktivierung noch nicht ganz klar [15, 203]. Einige Studien deuten darauf hin, dass MDA5 deutlich längere dsRNA-Fragmente erkennt im Vergleich zu RIG-I, die sogar größer als 7 kb sein können. Weitere Ergebnisse deuten darauf hin, dass RNase L nötig sein könnte, um die dsRNA in eine Struktur zu bringen, die durch MDA5 erkannt wird [143]. Beide RLRs nutzen nach Bindung eines Liganden das Adaptermolekül *mitochondrial antiviral-signaling protein* (MAVS), welches an der Mitochondrienmembran lokalisiert ist [212]. Durch die Ligandenbindung kommt es an der *caspase activation and recruitment domain* (CARD) zu einer Konformationsänderung und einer anschließenden Polyubiquitinierung durch *tripartite motif 25* (TRIM25) [61, 228]. Dadurch interagiert die CARD-Domäne des RLRs mit der CARD-Domäne von MAVS, was dazu führt, das MAVS Prion-ähnliche Aggregate formt [87]. Dadurch aktiviert MAVS zytosolische IKKs, was zu einer Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und IRF3 sowie IRF7 führt. Als Folge translozieren diese in den Nukleus und induzieren die Expression proinflammatorischer Zytokine und IFN [153].

1.1.3 Der IFN α -Signalweg und die Induktion von ISGs

Der Rezeptor für die Bindung von IFN ist der Interferon- α/β -Rezeptor (IFNAR), der sich aus den beiden Untereinheiten IFNAR1 und IFNAR2 zusammensetzt, und von dem nur wenige hundert Kopien pro Zelle exprimiert werden [40]. Sowohl IFNAR1 als auch IFNAR2 gehören zu Klasse II helikalen Zytokin-Rezeptoren und setzen sich aus einer extrazellulären Domäne mit vier (IFNAR1) bzw. zwei (IFNAR2) Fibronectin-Typ-III-Domänen, einer Transmembranhelix und einer zytoplasmatischen Domäne mit 100 (IFNAR1) bzw. 251 (IFNAR2) Aminosäuren zusammen [207, 257]. Von IFNAR2 sind drei verschiedene Isoformen beschrieben: IFNAR2c, welches der soeben beschriebenen Form entspricht, IFNAR2b, welches eine verkürzte intrazelluläre Domäne aufweist, und die lösliche Isoform IFNAR2a. Während für IFNAR2b vermutet wird, dass es als negativer Regulator der IFN-Antwort fungiert, da es selbst keine Signale weiterleiten kann, ist die Funktion von IFNAR2a, welches in zahlreichen Körperflüssigkeiten zu finden ist, nicht geklärt [40, 66, 78].

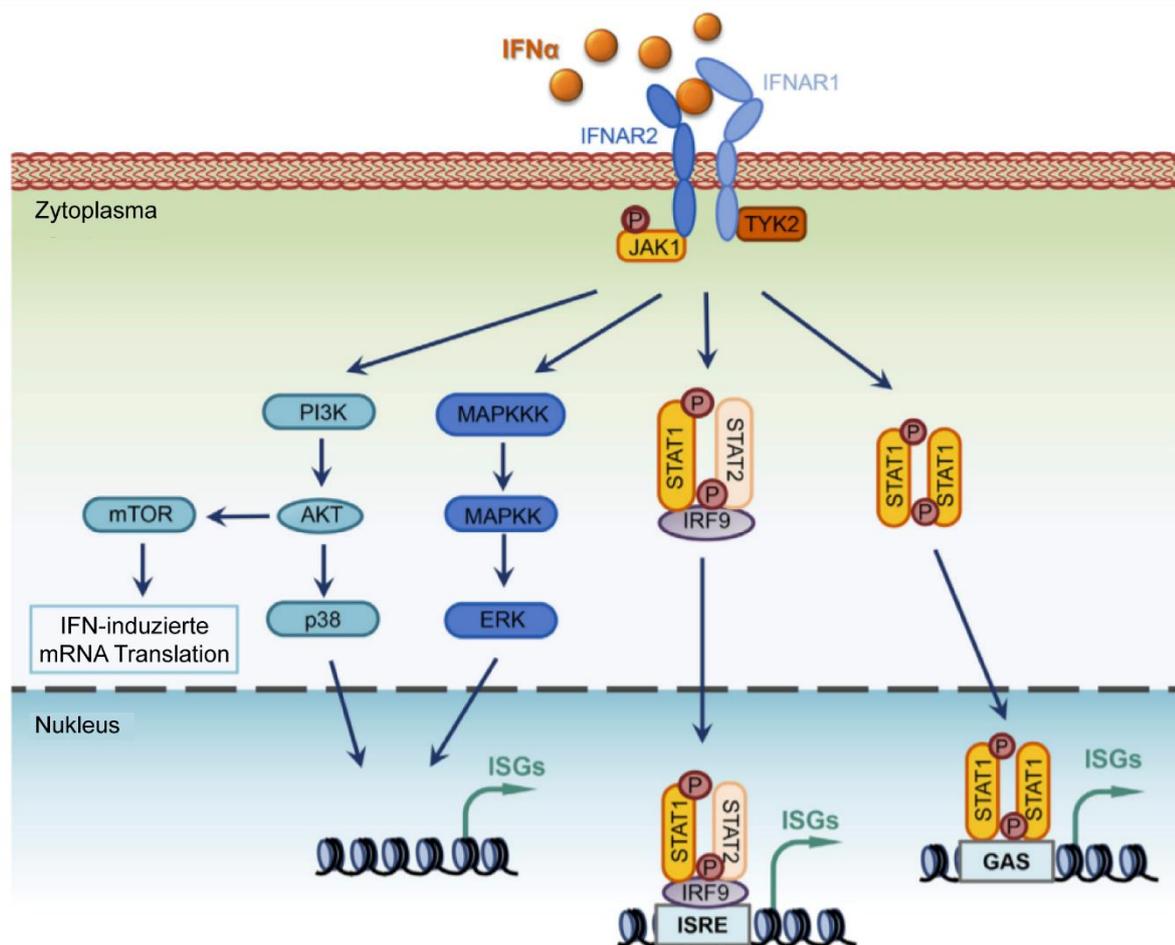


Abbildung 4: Kanonischer und nicht-kanonischer IFN-Signalweg.

Beim kanonischen Signalweg kommt es nach Bindung von IFN an IFNAR zur Phosphorylierung von JAK1 und TYK2. Die phosphorylierten Proteine rekrutieren und aktivieren dann STAT-Proteine, was zu deren Dimerisierung oder Trimerisierung mit IRF9 und Translokation in den Nukleus führt. Diese beiden

verschiedenen Komplexe regulieren die Expression verschiedener ISGs sequenzabhängig. ISGF3, ein Trimerkomplex aus STAT1, STAT2 und IRF9, erkennt das ISRE-Motiv im Promotorbereich vieler ISGs und induziert die Expression antiviraler Gene. Der andere Komplex, ein Homodimer aus STAT1, bindet an das GAS-Motiv und aktiviert hauptsächlich die Expression proinflammatorischer Gene. Beim nicht-kanonischen Signalweg kann IFN die Expression von Genen auch unabhängig von STATs induzieren, bspw. durch den MAPK- oder PI3K-Signalweg. Zusätzlich kann über den mTOR-Signalweg auch die Translation einiger ISGs reguliert werden. Verändert nach [36].

Die Bindung von IFN erfolgt aufgrund der etwa 100-fach höheren Affinität zunächst an IFNAR2. Die folgende Bindung an IFNAR1 und damit die Bildung des ternären Komplexes aus IFN und beiden IFNAR-Untereinheiten ist jedoch essentiell für die Signalweiterleitung. Infolgedessen kommt es zur Aktivierung des klassischen JAK-STAT-Signalwegs. Dieser beginnt mit der Autophosphorylierung und Aktivierung der IFNAR-assozierten Kinasen Januskinase 1 (JAK1) und Tyrosinkinase 2 (TYK2) (Abb. 4) [183, 216]. Diese wiederum regulieren die Phosphorylierung und Aktivierung der so genannten *Signal Transducers and Activators of Transcription* (STAT)-Proteine. STATs, die durch IFN aktiviert werden können, sind STAT1, STAT2, STAT3 und STAT5 [155, 223]. Zwar ist IFN wohl auch in der Lage STAT4 und STAT6 zu aktivieren, diese Aktivierung scheint jedoch auf bestimmte Zelltypen wie z.B. Endothelzellen beschränkt zu sein [58, 238]. Nach der Aktivierung bilden die STATs verschiedene Homo- oder Heterodimere und aktivieren im Nukleus durch Bindung an spezielle Sequenzen die Transkription zahlreicher ISGs, welche unterschiedliche antivirale Effekte aufweisen. Ein besonders wichtiger Transkriptionskomplex, der durch IFN induziert wird, ist dabei *Interferon stimulated gene factor 3* (ISGF3) [223]. ISGF3 setzt sich aus STAT1, STAT2 und IRF9 zusammen. Dieser Komplex ist der einzige, der ein spezifisches Element namens *Interferon-stimulated response element* (ISRE) bindet, welches sich in der Promotorregion diverser ISGs findet, und so deren Transkription aktiviert (Abb. 4) [182]. Andere Komplexe bestehen aus verschiedenen anderen Homo- oder Heterodimeren der STAT-Proteine, die das *IFN- γ -activated site* (GAS)-Element binden, das ebenfalls in den Promotorregionen einiger ISGs zu finden ist [182, 223]. Die Promotorbereiche einiger ISGs enthalten sogar ISRE- und GAS-Motive, weshalb eine Komposition verschiedener STAT-Komplexe für deren Expression entscheidend sein könnte. Inwiefern die unterschiedlichen IFN die Bildung verschiedener Komplexe beeinflussen, ist noch nicht bekannt [183]. Darüber hinaus ist die IFN-Signalweiterleitung auch über nicht-kanonische, STAT-unabhängige Signalwege möglich. Es wurde bspw. gezeigt, dass auch verschiedene MAPK-Signalwege an der IFN-vermittelten Genexpression beteiligt sind [183, 250]. Auch dem *phosphatidylinositol 3-kinase* (PI3K)-Akt-Signalweg wurde

bereits Bedeutung im Zusammenhang mit IFN zugeschrieben. Dieser kann entweder nach IFN-Stimulation der Zelle direkt die Transkription von Genen initiieren oder über *mammalian target of rapamycin* (mTOR) die mRNA Translation hochregulieren [183, 195].

Des Weiteren kann die IFN-Signalweiterleitung durch ein breites Spektrum anderer Signale positiv oder negativ beeinflusst werden. Zur Verstärkung des Signals kann u.a. eine erhöhte Induktion der STAT1- und IRF9-Expression beitragen. Beide Proteine gehören selbst zu den ISGs und lassen sich durch Typ-I-IFN, aber auch z.B. durch IFN γ oder durch das Zytokin IL-6 induzieren [88, 125]. Auch qualitativ wurde bereits eine Modulation beschrieben. So kommt es in CD8-Zellen von Mäusen während der Lymphozytäre-Choriomeningitis-Virus (LCMV)-Infektion vermehrt zu einer Aktivierung von STAT4 statt STAT1, was wie oben beschrieben Einfluss auf die Bindung der Zielsequenz im Nukleus hat [69, 166]. Die Inhibition des IFN-Signals erfolgt bspw. durch Regulation von IFNAR, die Induktion negativer Regulatoren oder die Induktion of MicroRNAs (miRNA) [256]. Die Degradation des IFNAR kann auch als Evasionsmechanismus durch Viren wie bspw. das Influenzavirus induziert werden. Für z.B. HIV konnte dies allerdings auf Zielzellen nicht beobachtet werden [94, 267]. Weitere Mechanismen zur Regulation beinhalten die posttranslationale Modifikation von STATs, die Chromatin-Remodellierung, die Transkriptionselongation oder epigenetische Veränderungen [97].

1.1.4 ISGs und deren Funktionen

Der Begriff ISG fasst unzählige Proteine zusammen, von denen ein Großteil antivirale Effekte aufweist. Viele Wirkmechanismen sind dabei allerdings noch nicht final geklärt. Zudem erfolgt die Expression nicht für alle ISGs zum gleichen Zeitpunkt. So wurde bereits mehrfach gezeigt, dass die Expression einer zeitlichen Hierarchie unterliegt [21, 192]. Im Folgenden werden exemplarisch einige ISGs, die an der antiviralen Antwort beteiligt sind, kurz vorgestellt:

ISG15 ist eines der ISGs, das nach Stimulation mit IFN α quantitativ am stärksten induziert wird [57]. In einem Prozess, der *ISGylation* genannt wird, kann es kovalent an Proteine des Wirts oder des Virus gebunden werden. Dadurch kann es die Funktion und die Stabilität dieser Proteine beeinflussen. Ob dieser Prozess spezifisch oder unspezifisch stattfindet, ist noch nicht geklärt [53, 279]. Die Bedeutung von ISG15 *in vivo* wird ebenfalls noch diskutiert. Während in *ISG15*-defizienten Mäusen in *Vesicular stomatitis virus*

(VSV)- und LCMV-Infektionen kein negativer Effekt beobachtet werden konnte, zeigten die Mäuse für Influenzavirus und Herpes simplex Virus (HSV) eine erhöhte Suszeptibilität [124, 173].

ISG20 gehört zur *death effector domain containing* (DEDD) 3'-5' Exonuklease-Familie und besitzt RNA-, aber offenbar keine DNA-Exonuklease-Aktivität [55]. Daher wurde es mit der Inhibition vieler verschiedener RNA Viren in Verbindung gebracht. Einige Viren wie z.B. das *severe acute respiratory syndrome coronavirus* (SARS-CoV)-1 scheinen jedoch eine Resistenz entwickelt und nicht von dieser Inhibition betroffen zu sein [266, 280].

Myxovirus resistance 1 (Mx1) ist in der Lage die Replikation vieler Viren direkt nach deren Eintritt in die Wirtszelle, noch vor der Genomreplikation, zu inhibieren. Es wird vermutet, dass Mx1 an virale Proteine wie Nukleokapside bindet und verhindert, dass diese ihr Ziel in der Zelle erreichen [204]. Eine zentrale Rolle in der antiviralen Antwort spielt Mx1 bspw. bei Influenzavirus-Infektionen [244].

Die *IFN-inducible transmembrane* (IFITM)-Familie besteht im Menschen aus den vier Mitgliedern IFITM1, IFITM2, IFITM3 und IFITM5 [204]. Die Proteine sind in der Lage ein breites Spektrum an Viren zu inhibieren. Auch wenn wohl alle IFITM-Proteine den Eintritt von Viren in die Zellen inhibieren können, scheint dies nicht der einzige Mechanismus zu sein, besonders vor dem Hintergrund, dass unterschiedliche IFITM-Proteine verschiedene Viren inhibieren können [9, 90, 128, 136]. Welche weiteren Mechanismen im Genaueren zu Grunde liegen, ist nicht vollkommen geklärt.

Die *apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3* (APOBEC3)-Proteinfamilie umfasst insgesamt sieben verschiedenen Proteine (APOBEC3A, APOBEC3B, APOBEC3C, APOBEC3D, APOBEC3F, APOBEC3G und APOBEC3H), die alle mindestens ein hochkonserviertes *zinc-dependent deaminase sequence motif* (ZDD) enthalten. Durch dieses Motiv können die APOBEC3-Proteine ihre Funktion als Cytidin-Desaminasen ausüben, was zu Fehlern und genetischer Instabilität in der DNA bzw. RNA führt. Während grundsätzlich alle APOBEC3-Proteine sowohl an ssDNA als auch an RNA binden können, nutzt nur APOBEC3A RNA als Desaminase-Substrat [196].

1.1.5 Therapeutische Verwendung von IFN α

Der ausgeprägte antivirale Effekt und die hohe Zahl an antiviral wirkenden ISGs, die nach IFN α -Stimulation exprimiert werden, machten IFN α schnell zu einem vielversprechenden Kandidaten für die klinische Anwendung. Der Subtyp, der klinisch zugelassen ist, ist

IFN α 2. Um die pharmakokinetischen Eigenschaften zu verbessern und vor allem die Halbwertszeit zu verlängern, wird Polyethylenglykol (PEG) kovalent an IFN α gebunden [178]. Bereits in den 80ern wurde IFN α für die Behandlung des Hepatitis C Virus (HCV) eingesetzt, Ende der 90er dann in Kombination mit Ribavirin, um die Erfolgsrate signifikant zu steigern [86, 152]. Durch die Entwicklung von neuen sehr wirksamen und gut verträglichen direkt antiviral wirksamen Medikamenten (DAA, engl. *direct acting antivirals*), ist die Therapie mit IFN α in den Hintergrund gerückt [42]. Für eine chronische Infektion mit dem Hepatitis B Virus (HBV) wird nach wie vor IFN α 2 eingesetzt. Es ist die einzige Therapieoption, bei der das Virus völlig entfernt werden kann, jedoch ist die Erfolgsrate der Behandlung mit 20-30 % eher gering [272]. Hierbei scheint aber auch der Genotyp von HBV eine bedeutende Rolle zu spielen [261]. Neben dem Einsatz als antivirale Therapie wird IFN α 2 auch zur onkologischen Behandlung eingesetzt, u.a. bei Haarzelleukämie, Non-Hodgkin-Lymphomen, dem Kaposi-Sarkom oder malignen Melanomen [10]. Das breite Spektrum an Effekten, das die IFN α 2-Therapie ermöglicht, ist zugleich auch der Grund, warum heutzutage oftmals andere Behandlungen vorgezogen werden: viele der Patienten leiden nach Applikation von IFN α 2 an belastenden Nebenwirkungen. Dazu gehören z.B. häufig Müdigkeit (96 %), Fieber (94 %), Anämie (27 %), Muskelschmerzen (21 %), Anorexie (69 %), Durchfall (45 %), Erbrechen (32 %) Kopfschmerzen (62 %), aber auch psychische Nebenwirkungen wie Depression (40 %) oder Schlaflosigkeit (12 %). Seltener Nebenwirkungen können u.a. Sepsis (0,1 %), Splenomegalie (<0,01 %), Beinkrämpfe (0,1 %) oder Leberversagen (<0,01 %) sowie zahllose weitere sein [51].

1.1.6 Die verschiedenen IFN α -Subtypen und deren Bedeutung

Wie bereits beschrieben gibt es im Menschen zwölf verschiedene IFN α -Subtypen (IFN α 1, IFN α 2, IFN α 4, IFN α 5, IFN α 6, IFN α 7, IFN α 8, IFN α 10, IFN α 14, IFN α 16, IFN α 17 und IFN α 21), die eine Sequenzhomologie von bis zu 90 % aufweisen und 161-167 Aminosäuren lang sind [68, 180]. In ihrer Struktur finden sich fünf α -Helices (A-E), die durch eine lange Schleife (AB) und drei kurze Schleifen (BC, CD und DE) verbunden werden [110, 188]. Auch wenn alle Subtypen an den gleichen Rezeptor, den IFNAR, binden, ist klar, dass sie verschiedene Effekte hervorrufen können [68]. Ein Aspekt, der in diesem Zusammenhang relativ gut erforscht ist, allerdings nicht alleine die beobachteten Effekte erklärt, ist die Affinität zu den Rezeptoruntereinheiten IFNAR1 und IFNAR2, die sich teilweise um das 100-fache zwischen den Subtypen unterscheidet

[120]. In murinen Zellen konnte zudem gezeigt werden, dass es nach Stimulation mit verschiedenen IFN α -Subtypen zu Unterschieden in der Phosphorylierung von STAT-Proteinen und Proteinen des MAPK-Signalwegs kommt [44]. Zusätzlich scheint es auch starke Unterschiede zwischen verschiedenen Zelltypen zu geben [120]

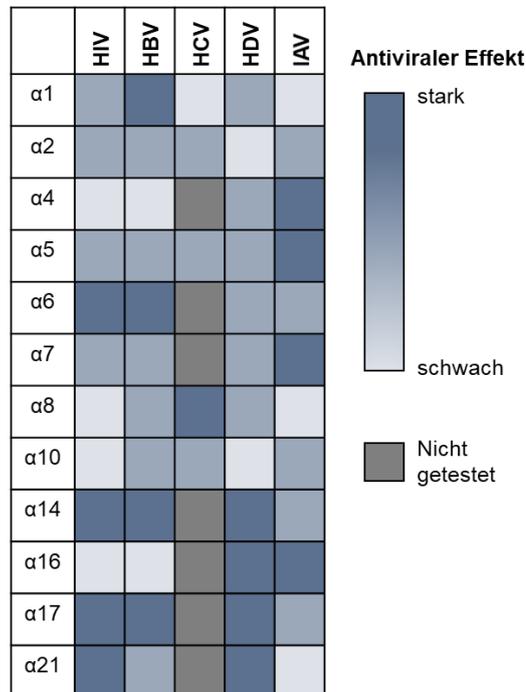


Abbildung 5: Antiviraler Effekt der IFN α -Subtypen gegenüber verschiedenen Viren.

Die Stärke des antiviralen Effekts der verschiedenen IFN α -Subtypen gegenüber verschiedenen Virusinfektionen ist relativ dargestellt. Je dunkler die blaue Schattierung, desto stärker ist der beschriebene Effekt. Für grau schattierte Felder sind keine Daten vorhanden. Darstellung basierend auf Daten aus [37, 115, 119, 209].

Im Zusammenhang mit viralen Infektionen konnte bereits für mehrere Viren gezeigt werden, dass sich die IFN α -Subtypen deutlich in ihrer Effektivität unterscheiden (Abb. 5) [37, 115, 119, 209]. Für HIV und HBV konnte zudem *in vivo* in humanisierten Mäusen ein verbesserter antiviraler Effekt von IFN α 14 gegenüber dem klinisch zugelassenen Subtypen IFN α 2 nachgewiesen werden, der zum Teil durch eine verstärkte ISG-Expression erklärt werden konnte [37, 119]. Neben der Tatsache, dass die virusspezifischen Aktivitäten der IFN α -Subtypen unterschiedlich sind, variieren die Viren selbst darin, welche IFN α -Subtypen sie induzieren [45, 79, 148]. Die komplexen Zusammenhänge zwischen IFN-Induktion, ISG-Induktion und antiviraler Antwort sowie deren Unterschiede zeigen, dass neben IFN α 2 weitere Subtypen durchaus klinisch relevant sein könnten und daher deren Erforschung wichtig für die Therapie von viralen Infektionen sein könnte.

1.2 Das Hepatitis B Virus

HBV ist der Auslöser für die akute und chronische Hepatitis B im Menschen. Während eine Infektion in Gebieten mit einer starken Prävalenz meist schon im jungen Alter erfolgt und mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einer lebenslangen chronischen Infektion führt, kommt es bei einer Infektion im späteren Leben meist zu einer akuten Hepatitis, die von selbst ausheilt. Von einer chronischen Hepatitis B spricht man dann, wenn das Oberflächenprotein *Hepatitis B surface antigen* (HBsAg) bei zwei Messungen mit einem Abstand von mindestens sechs Monaten detektiert werden kann [230, 276]. Jährlich sterben weltweit noch immer über 780.000 Menschen durch HBV und mehr als 250 Millionen Menschen sind aktuell chronisch infiziert [149]. Am stärksten prävalent ist HBV in Ostasien, Subsahara-Afrika und der Pazifikregion mit bis zu 8 % Prävalenz, in Westeuropa liegt die Prävalenz bei unter 1% [56, 174]. Wird die chronische Hepatitis B nicht behandelt, so führt sie in über 40 % der Fälle zu einer Leberzirrhose und es besteht die Chance, dass sich ein hepatozelluläres Karzinom entwickelt [230]. Zur Prophylaxe gibt es ein gut wirksames Vakzin, das rekombinant hergestelltes HBsAg enthält und die Antikörperbildung induziert [46]. Die Therapie einer chronischen Infektion kann mit IFN α 2 erfolgen, was die einzige Möglichkeit ist das Virus vollständig zu entfernen, und/oder mit Nukleos(t)id-Analoga (NA), die lediglich die virale Replikation inhibieren. Aufgrund der deutlich besseren Verträglichkeit werden dennoch häufig die NAs bevorzugt eingesetzt [230].

1.2.1 Der Replikationszyklus von HBV

HBV ist ein behülltes Virus mit partiell doppelsträngiger DNA, das zur Familie der *Hepadnaviridae* gehört und primäre humane Hepatozyten (PHHs) infiziert [211]. Das Virus wird in zehn verschiedene Genotypen und vier Serotypen eingeteilt. Die Genotypen, die in Europa prävalent sind, sind die Genotypen A und D [109]. Das Virion, auch Dane-Partikel genannt, hat einen Durchmesser von etwa 42 nm und besteht aus zwei Teilen: dem Nukleokapsid, welches aus der partiell doppelsträngigen DNA, die an eine Polymerase gebunden ist, und dem *Hepatitis B core* (HBc)-Protein besteht, und aus der Virushülle, die sich aus dem Oberflächenprotein HBsAg zusammensetzt. Das HBsAg unterteilt sich weiterhin in die kurze Form *small* (S)-HBsAg, die mittlere Form *middle* (M)-HBsAg und die lange Form *large* (L)-HBsAg. Das Verhältnis beträgt dabei auf der Virusoberfläche etwa 100:5:1 [118, 160].

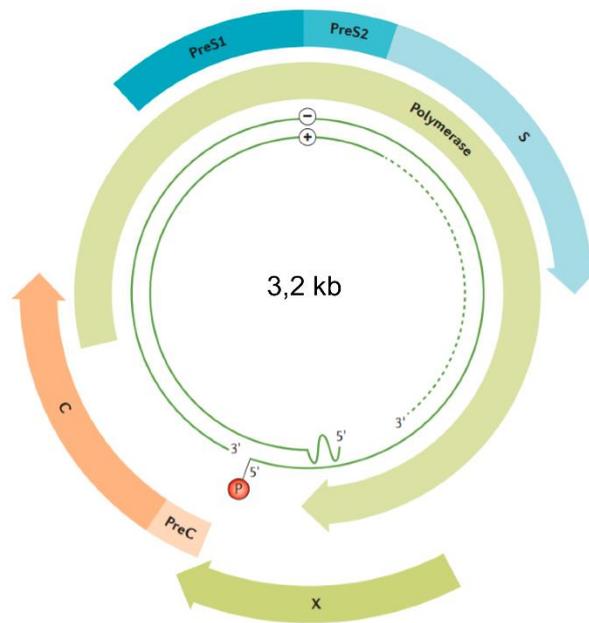


Abbildung 6: Die genomische Struktur von HBV.

Das HBV-Genom ist in zirkulärer Form organisiert mit einem Positivstrang-DNA, die den unvollständigen inneren Ring formt, und einer Negativstrang-DNA, die den vollständigen äußeren Ring formt. Die vier überlappenden Gene sind *P* für die Polymerase, *PreS1/PreS2/S* für HBsAg, *PreC/C* für HBcAg und *X* für das HBx-Protein. Die Polymerase hat eine reverse Transkriptase-Aktivität. Die ORFs von C und S haben am 5'-Ende Erweiterungen, prä-C und prä-S. Die prä-S-Region ist in prä-S1- und prä-S2-Domänen unterteilt, deren Translation zur Produktion der drei HBsAg-Formen führt. Translation des prä-C ORF führt zu Produktion eines sekretorischen Proteins, dem HBeAg, welches ein akzessorisches Protein ist, das für die Etablierung der chronischen Hepatitis relevant ist. Die Translation des C ORF resultiert in der Produktion des HBcAg. HBx ist für die Etablierung der Infektion und dem Erhalt der aktiven Replikation nötig. Verändert nach [276].

Das partiell doppelsträngige *relaxed circular (rc)* DNA-Genom von HBV ist etwa 3,2 kb groß und am 5'-Ende des Minusstrangs kovalent an die virale Polymerase gebunden (Abb. 6) [67]. Im Genom finden sich vier überlappende offene Leserahmen (ORF, engl. *open reading frames*): S, C, P und X [83]. Der größte ORF kodiert für die Polymerase, die auch eine reverse Transkriptase (RT)-Aktivität besitzt. Der ORF für das HBsAg besitzt am 5'-Ende zwei Erweiterungen, prä-S1 und prä-S2. Durch die Nutzung verschiedener Startcodons entstehen so die drei verschiedenen Formen des HBsAg. Ähnlich verhält es sich mit dem ORF für HBcAg, der ebenfalls am 5'-Ende eine prä-C-Erweiterung besitzt. Je nachdem, wo die Translation initiiert wird, entstehen so das HBcAg oder das *Hepatitis B e antigen* (HBeAg), welches von den Wirtszellen sezerniert wird. Der kleinste ORF kodiert für das *Hepatitis B x* (HBx)-Protein, dem eine bedeutende Rolle als Virulenzfaktor zugesprochen wird [107, 118, 240, 284]. Die Transkription wird durch spezifische Promotorsequenzen im viralen Genom reguliert. Viele der Bindestellen für Transkriptionsfaktoren werden dabei durch Proteine von HBV selbst aktiviert, oftmals durch das HBx. Dessen Expression wiederum wird durch Transkriptionsfaktoren

begünstigt, die teilweise nur in Leberzellen zu finden sind, was möglicherweise die Wahl der Wirtszelle erklären könnte [49].

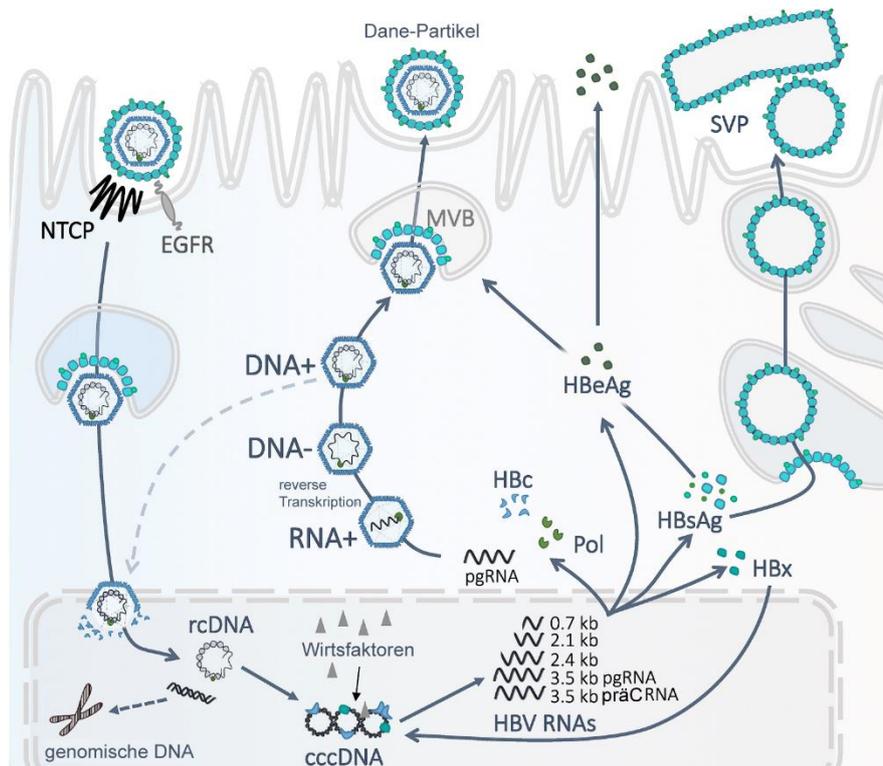


Abbildung 7: Schematischer Ablauf des HBV-Replikationszyklus.

HBV bindet mit hoher Spezifität an den Eintrittsrezeptor NTCP. Endozytose-vermittelt kommt es zur Aufnahme des Virions und zum Transport des Kapsids zum Nukleus. Aus der rcDNA entsteht im Nukleus cccDNA, die episomal verbleibt und als Transkriptionsmatrize dient. Aus der cccDNA entstehen verschiedene RNAs, die zur Translation der viralen Proteine Pol, HBeAg, HBsAg und HBx dienen. Die HBeAg-Proteine formieren sich zu Kapsiden und die virale pgRNA wird in diese verpackt. In den Kapsiden kommt es zur reversen Transkription der RNA zu rcDNA. Die Kapside setzen sich mit reifen Oberflächenproteinen, HBsAg, zu infektiösen Virionen zusammen und verlassen die Zelle mittels Exozytose. Zusätzlich können auch SVPs, die keine Kapside oder DNA enthalten, die Zelle verlassen. MVB, *multivesicular bodies*. Verändert nach [241].

Der Eintritt in die PHHs erfolgt zunächst über eine lockere Bindung des HBsAg an Heparansulfat-Proteoglykane mit niedriger Affinität [210]. Anschließend erfolgt eine sehr spezifische Bindung mit hoher Affinität an den Eintrittsrezeptor *sodium taurocholate cotransporting peptide* (NTCP), der erst relativ spät entdeckt wurde und spezifisch in Zellen der Leber exprimiert wird [168, 271]. Das Virus wird dann vermutlich über Endozytose in die Zelle aufgenommen, auch wenn die genauen Mechanismen noch nicht vollständig geklärt sind [91, 241, 269]. Auch dem *epidermal growth factor receptor* (EGFR) wird mittlerweile eine wichtige Rolle als Ko-Rezeptor zugeschrieben [98]. Anschließend wird das Nukleokapsid in den Nukleus transportiert. Im Nukleus wird die genomische HBV-DNA durch zelluläre Faktoren modifiziert. Zunächst werden jeweils am 5'-Ende beider Stränge Stücke entfernt und im Anschluss werden die Lücken gefüllt und

ligiert, sodass sich die so genannte *covalently closed circular DNA* (cccDNA) formiert [75, 167]. Die cccDNA stellt in der Behandlung der HBV-Infektion eine große Herausforderung dar, da sie episomal im Nukleus verbleibt und als Matrize für die Transkription dient. Es finden sich im Durchschnitt etwa 10 Kopien cccDNA pro Zelle [187, 242]. Zwar sind die Mechanismen, die die cccDNA Stabilität regulieren, nicht ganz klar, jedoch haben neuere Studien immer wieder die Bedeutung der ISG-Proteinfamilie APOBEC3 bei der Destabilisierung der cccDNA hervorgehoben [141, 268]. Mit der cccDNA als Matrize werden fünf verschiedene RNAs transkribiert (Abb. 7). Die Regulation der Transkription findet dabei auf unterschiedlichen Ebenen statt. Zum einen ist die cccDNA mit zahlreichen Histonen verbunden, deren post-translationale Modifikationen die transkriptionale Aktivität der cccDNA stark beeinflussen [85, 184]. Zum anderen spielen Transkriptionsfaktoren eine wichtige Rolle, von denen mittlerweile viele identifiziert werden konnten. Einige sind zum Teil exklusiv in der Leber vertreten [85]. Zudem ist die Transkription auch vom HBx-Protein abhängig. Dieses kann mit der cccDNA assoziieren und die Rekrutierung von Chromatin-modifizierenden Enzymen modulieren und somit den epigenetischen Zustand der Histone beeinflussen [18, 140]. Vor relativ kurzer Zeit fand man zudem heraus, dass HBx über eine hochkonservierte Domäne der Suppression der HBV-DNA durch den *structural maintenance of chromosomes* (Smc)-Proteinkomplex Smc5/6 entgegenwirken kann [164, 191]. Nachdem aus der RNA die viralen Proteine translatiert wurden, bilden 90 – 120 HBcAg-Dimere ein ikosaedrisches Kapsid und die prägenomische RNA (pgRNA) wird darin eingebaut [26, 241]. Danach erfolgt die reverse Transkription des Genoms durch die Polymerase zu DNA, bei der gleichzeitig durch eine RNase H-Domäne der Polymerase die pgRNA weitestgehend abgebaut wird [241]. Die Kapside mit der rcDNA können entweder erneut in den Nukleus transportiert werden, um den Erhalt der cccDNA sicherzustellen, oder sich mit viralem HBsAg zusammensetzen und durch Exozytose aus der Zelle austreten [111, 225]. Neben infektiösen Virionen besteht auch die Möglichkeit, dass sich so genannte *subviral particles* (SVP), die kein Kapsid oder keine DNA enthalten, zusammensetzen und die Zelle verlassen (Abb. 7) [100, 241].

1.2.2 HBV und IFN α

Die Beziehung zwischen HBV und IFN α wird schon lange untersucht, besonders da IFN α 2 klinische Anwendung bei der Behandlung einer chronischen Hepatitis B findet und weil dies die einzige Therapie ist, bei der es zur völligen Eradikation der cccDNA kommen

kann. Aufgrund der geringen Erfolgsrate von 20 - 30 % und den belastenden Nebenwirkungen werden heutzutage häufig NAs vorgezogen [51, 272]. Man geht mittlerweile stark davon aus, dass einen wichtigen Aspekt bei der Degradation von cccDNA die ISGs der APOBEC3-Familie darstellen [141, 268]. Für die Mitglieder der APOBEC3-Familie konnte gezeigt werden, dass *APOBEC3B/3C/3F/3G* nach Stimulation mit IFN α in PHHs und Leberzelllinien verstärkt exprimiert werden. Von diesen drei waren APOBEC3B, APOBEC3F und APOBEC3G in der Lage verschiedene Zwischenprodukte der HBV-Replikation durch Desaminierung zu inhibieren, vermutlich auch cccDNA [22, 227]. Für APOBEC3G wurde zudem beschrieben, dass es auch das Einfügen der pgRNA in die Kapside negativ beeinflussen kann [243]. Im Speziellen konnte für cccDNA in neueren Studien gezeigt werden, dass APOBEC3A und APOBEC3B die cccDNA effizient desaminieren und dadurch zu deren Degradation führen. Die Expression von *APOBEC3A*, *APOBEC3F* und *APOBEC3G* wird in HBV-infizierten PHHs und dHepaRG-Zellen nach IFN α -Stimulation zudem erhöht [141, 222]. Die Bedeutung, die den APOBEC3-Proteinen wird auch dadurch deutlich, dass das HBx-Protein gezielt zu deren Degradation führen kann [34, 63]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass in Patienten, die auf die IFN-Therapie angesprochen haben, eine signifikant erhöhte Expression von *APOBEC3A* und *APOBEC3B* nachzuweisen war im Vergleich zu denjenigen, bei denen die Therapie keinen Erfolg zeigte [129].

Darüber hinaus können viele weitere ISGs die Replikation von HBV inhibieren: ISG20 inhibiert die Replikation durch Bindung an die pgRNA, Mx1 interagiert mit HBc und könnte dadurch das Zusammensetzen des Kapsids behindern, *2'-5'-oligoadenylate synthetase 2* (OAS2) ist in der Lage HBV RNA RNase L-vermittelt zu inhibieren und *indoleamine 2,3-dioxygenase 1* (IDO1) reduziert die Menge an intrazellulärer HBV-DNA durch Degradation von Tryptophan [127, 133, 146, 176]. Auch Publikationen über Proteine aus der TRIM-Familie, die u.a. auch an der Signalweiterleitung nach Erkennung von Pathogenen beteiligt sind (siehe Kapitel 1.1.3), haben gezeigt, dass sie z.B. die Promotoraktivität reduzieren oder allgemein in einer Art positiven Rückkopplung die IFN-Antwort in der HBV-Infektion verstärken können [62, 229, 277]. Weitere Studien deuten zudem auf einen bedeutsamen Einfluss von IFN α -induzierten Genen auf die epigenetische Regulation der cccDNA hin [275].

Im Laufe der Evolution hat HBV zahlreiche Mechanismen entwickelt, um der IFN-vermittelten Antwort zu entgehen. Zum einen wurde lange vermutet, dass HBV ein so

genanntes *stealth virus* ist, da es durch PRRs scheinbar nicht wirklich erkannt wird und es zu keiner IFN-Induktion kommt [262]. Eine Erklärung der geringen IFN-Antwort könnte in der verminderten Abundanz des Adapterproteins *stimulator of IFN genes* (STING) in Hepatozyten liegen, das an der Erkennung viraler DNA beteiligt ist [236]. Neuere Studien zeigen jedoch, dass zumindest TLR2 und RIG-I durch HBV-Partikel bzw. HBV-Transkripte aktiviert wird [200, 278]. Zum anderen weiß man aber mittlerweile, dass HBV gezielt bei der Induktion von IFN intervenieren kann. Die viralen Proteine HBsAg und HBeAg können beide die Bindung von MyD88 an Interaktionspartner inhibieren und so negativ Einfluss auf die IFN-Produktion nehmen [132]. Zusätzlich kann das virusinduzierte Protein Rubicon an IKK- γ binden und so die IFN-Induktion inhibieren [39]. Daneben kann HBV auch den IFN-Signalweg beeinflussen, indem es die Expression von IFNAR runterreguliert oder sogar zur Degradation des Rezeptors führt [11, 35].

Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass es in der *enhancer 1/X gene* Promotorregion des HBV Genoms eine ISRE-Sequenz gibt [19, 189]. Studien zeigten, dass an die ISRE-Sequenz (phosphoryliertes) STAT1 und STAT2 rekrutiert werden, welche zur Transkription und Replikation beitragen. Deutlich wurde dies auch in Versuchen mit inaktivierenden Mutationen des ISRE, die zu einer verminderten Transkription der pgRNA führten [19, 275]. Ob Mutationen der ISRE-Sequenz möglicherweise Grund für die niedrigen Erfolgsraten der IFN-Therapie sind, wird ebenfalls diskutiert [137].

Aus Zellkulturexperimenten weiß man zudem, dass IFN α 2 effektiv gegen alle Genotypen ist, es jedoch Unterschiede zwischen Zelllinien bzw. Primärzellen gibt [214]. Darüber hinaus wurde in einer Studie der Effekt der verschiedenen IFN α -Subtypen auf unterschiedliche HBV-Marker untersucht und man fand heraus, dass es starke Unterschiede in der Effektivität gegen HBV gibt und IFN α 6 und IFN α 14 bspw. deutlich stärker antiviral wirken als der klinisch zugelassene Subtyp IFN α 2 [37]. Aufgrund der Tatsache, dass bisher nur IFN zu einer vollständigen Eradikation der cccDNA führen kann, unterstreicht dies die Wichtigkeit der Untersuchung aller IFN α -Subtypen.

1.3 Das SARS-Coronavirus-2

Als im Dezember 2019 mehrere Fälle von Pneumonie mit ungeklärter Ursache in Wuhan, China auftraten, war nicht zu erahnen, dass der Auslöser ein Virus ist, das sich zu einer globalen Pandemie entwickeln sollte. Bereits am 9. Januar 2020 wurde ein neuartiges Coronavirus als Auslöser identifiziert. Einen Monat später wurde das Virus vom

Internationalen Komitee für die Taxonomie von Viren (ICTV) aufgrund der genetischen Ähnlichkeit zu SARS-CoV aus dem Jahr 2003 SARS-CoV-2 genannt. Die Krankheit, die ausgelöst wird, heißt *coronavirus disease 2019* (COVID-19) [89, 95]. Das Virus wird hauptsächlich über Tröpfchen übertragen und trotz der Zulassung mehrerer wirksamer Impfstoffe ist die Pandemie u.a. aufgrund auftretender Virusvarianten auch heute (Stand Februar 2022) noch nicht überstanden und es gab mittlerweile mehr als 400 Mio. gemeldete Infektionen und fast 6 Mio. Tote weltweit [159, 265, 282]. Gerade aber in Gebieten mit begrenztem Zugang zum Gesundheitssystem wie in weiten Teilen Afrikas ist von einer hohen Dunkelziffer auszugehen [260]. Bei einer Infektion besteht die Gefahr, dass das Virus die unteren Atemwege infiltriert und dort erheblichen Schaden an der Lunge anrichtet, was zu einer tödlichen Pneumonie führen kann [283]. Gefährlich kann das Virus besonders für ältere Menschen ab 60 Jahren werden, die häufig an anderen altersbedingten Erkrankungen leiden [245]. Männer haben zudem im Allgemeinen ein höheres Risiko für einen schweren Krankheitsverlauf [197]. Neben den erwähnten Impfstoffen zur Prophylaxe gibt es derzeit kaum Möglichkeiten die Krankheit effektiv zu behandeln.

1.3.1 Aufbau und Replikationszyklus von SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 gehört zur Gattung der Betacoronaviren in der Familie der Coronaviren. Es weist eine Genomidentität von 79% zu SARS-CoV-1 auf [139]. Das Virus ist behüllt und besitzt eine positiv-gerichtete ssRNA als Genom.

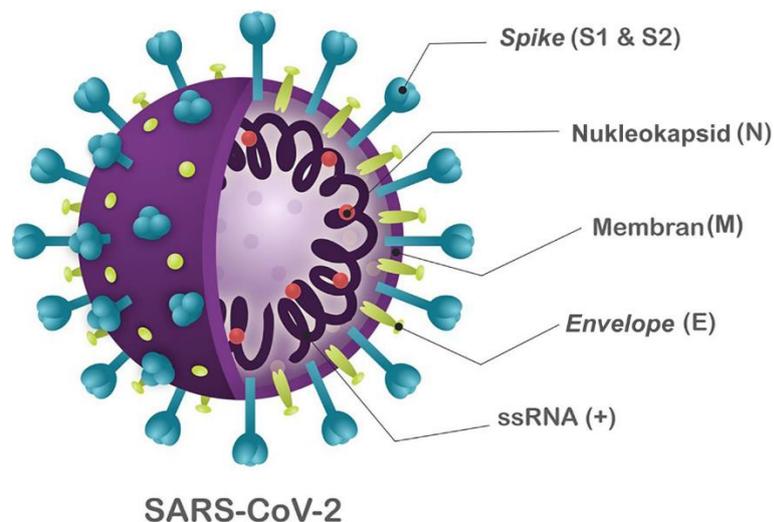


Abbildung 8: Schematische Struktur von SARS-CoV-2.

Die virale Struktur wird primär durch die Strukturproteine *Spike* (S), *Membran* (M), *Envelope* (E) und *Nukleokapsid* (N) geformt. Die S-, M- und E-Proteine sind alle in die virale Hülle verankert, eine Lipiddoppelschicht, die von der Wirtszelle abgeleitet ist. Das N-Protein interagiert mit der viralen RNA im Inneren des Virus. Verändert nach [198].

Das Kapsid um das Genom herum wird vom Nukleokapsid-Protein (N) geformt. Um das Kapsid herum befindet sich die Hülle, die sich von der Lipiddoppelschicht des Wirts ableitet und mit drei weiteren Strukturproteinen, dem *Spike*- (S), dem Membran- (M) und dem *Envelope*-Protein (E) assoziiert ist (Abb. 8) [27]. Neben diesen vier Strukturproteinen besitzt SARS-CoV-2 zudem 16 Nichtstrukturproteine (NSP1-16), die verschiedene Aufgaben im viralen Replikationszyklus übernehmen, und elf akzessorische Proteine, deren Aufgaben noch nicht vollständig geklärt sind [190, 251].

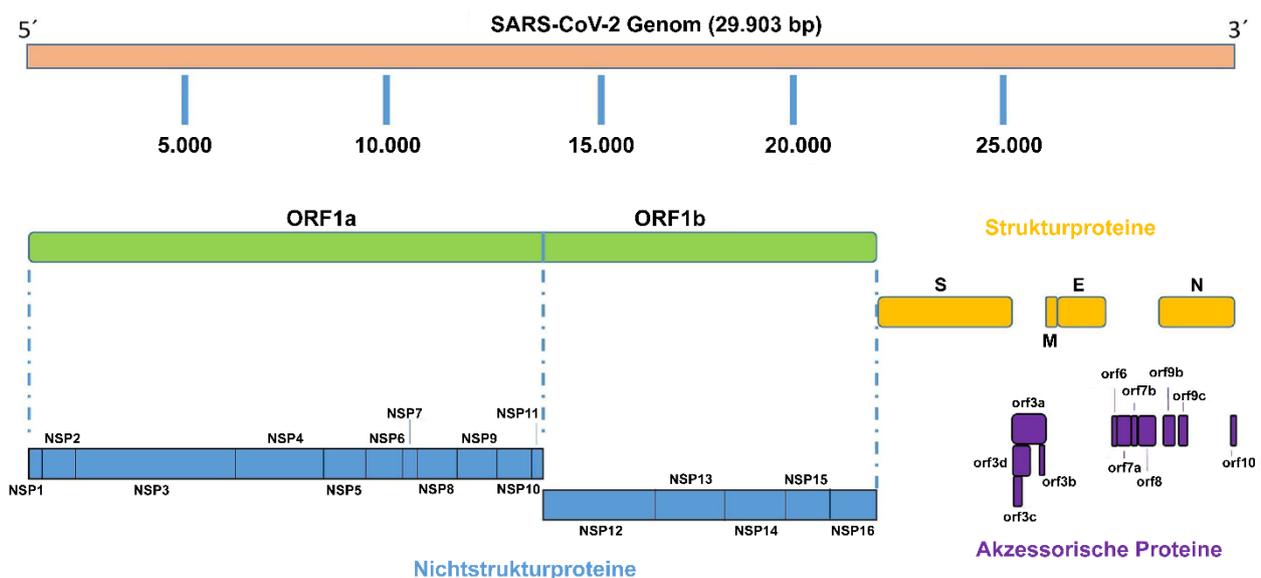


Abbildung 9: Genomorganisation von SARS-CoV-2.

Das Genom von SARS-CoV-2 ist etwa 30.000 bp lang und unterteilt sich in 14 sich überlappende ORFs. Die ORFs 1a und 1b machen fast zwei Drittel des Genoms aus und kodieren Polypeptide, die in die verschiedenen Nichtstrukturproteine aufgespalten werden können. Das letzte Drittel enthält die ORFs für die vier Strukturproteine S, M, E und N und die teilweise ineinander liegenden ORFs für die elf akzessorischen Proteine. Verändert nach [190].

Das Genom von SARS-CoV-2 ist etwa 30.000 bp lang und gehört damit zu den größten Genomen von RNA-Viren überhaupt [251]. Am 5'-Ende findet sich eine Cap-Struktur, am 3'-Ende ein Poly-A-Schwanz variabler Länge. Der kodierende Teil wird an beiden Enden von etwa 300 bp langen untranslatierten Regionen (UTRs) flankiert [145]. Das Genom unterteilt sich in 14 verschiedene ORFs, wobei ORF1a und ORF1b für zwei große Polypeptide kodieren, die durch virale Proteasen in die unterschiedlichen Nichtstrukturproteine aufgetrennt werden, die in die Genomreplikation und die frühe transkriptionelle Regulation involviert sind [274]. Im hinteren Drittel des Genoms finden sich die ORFs für die Strukturproteine S, M, E und N sowie die ORFs für die akzessorischen Proteine (ORF3a, ORF3b, ORF3c, ORF3d, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8, ORF9b, ORF9c und ORF10) (Abb. 9). Diese Proteine sind nicht essentiell für den

Replikationszyklus des Virus, doch weiß man, dass einige eine wichtige Rolle in der Interaktion zwischen Wirt und Virus spielen. Auch in einigen der Virusvarianten finden sich Mutationen in akzessorischen Proteinen [43, 190, 193]. Akzessorische Proteine, die Einfluss auf die IFN-Antwort nehmen, werden in Kapitel 1.3.2 näher vorgestellt.

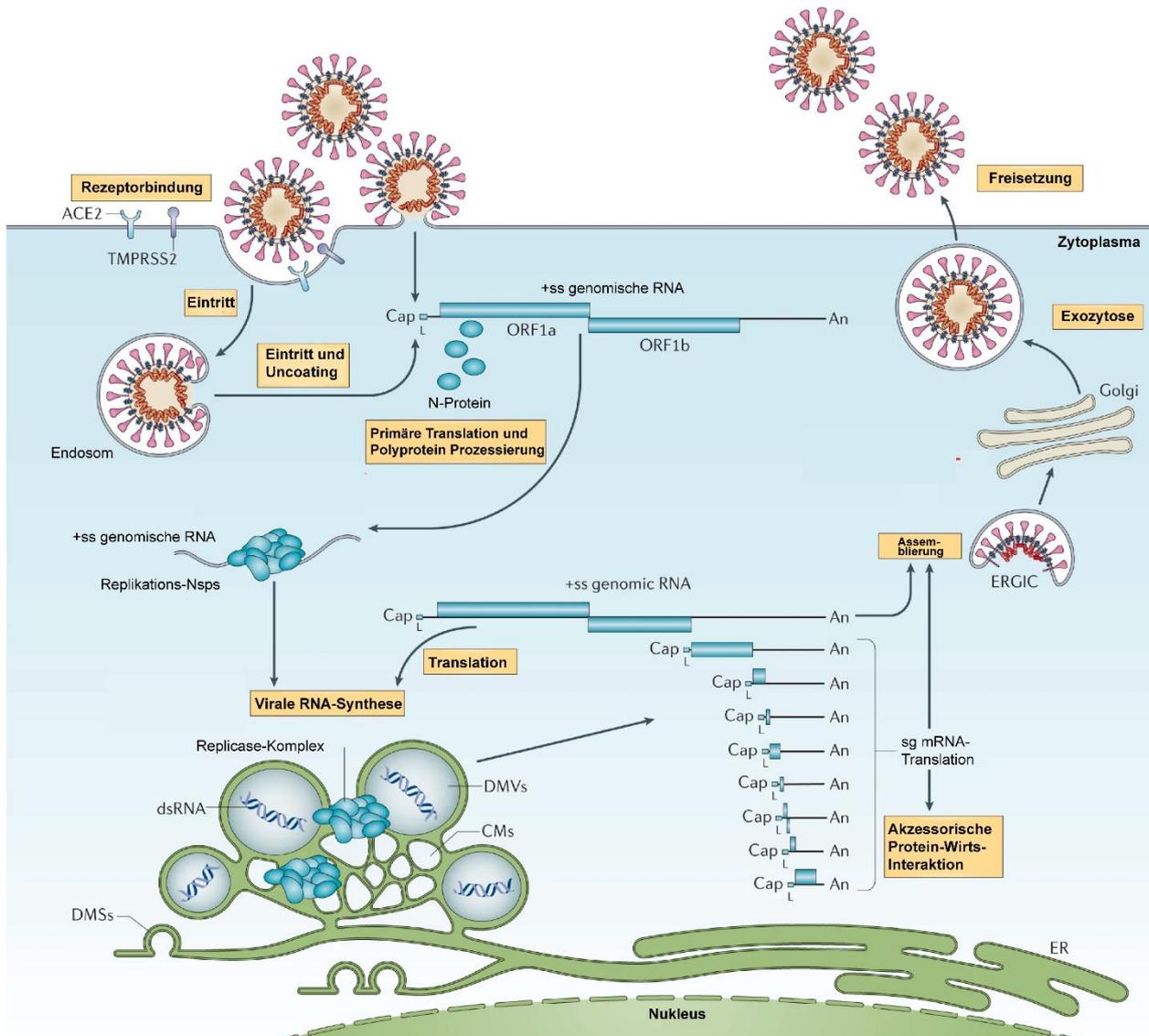


Abbildung 10: Schematischer Replikationszyklus von SARS-CoV-2.

Die Viruspartikel binden über ihr S-Protein an den Rezeptor ACE2 auf der Zelloberfläche und treten vermittelt durch Wirtspoteasen wie TMPRSS2, die das S-Protein spalten und so dessen Membran-Fusions-Kapazität aktivieren, in die Zelle ein. Danach wird die virale RNA freigesetzt und es kommt zur Translation der beiden großen ORFs 1a und 1b. Die dabei entstehenden Polyproteine werden während und nach der Translation in die unterschiedlichen Nichtstrukturproteine prozessiert, welche die Komplexe für Replikation und Translation bilden. Mit der Expression von Nichtstrukturproteinen werden auch virale Replikationsorganellen aus perinukleären *double-membrane vesicles* (DMVs), *convoluted membranes* (CMs) und *double-membrane spherules* (DMSs) geformt, die eine schützende Umgebung für die virale genomische RNA und die Transkription von sg mRNAs schaffen. Translatierte Strukturproteine translozieren in die Endoplasmatisches Retikulum (ER)-Membranen und durchqueren das ERGIC, wo die Interaktion mit genomischer RNA, die durch das N-Protein eingekapselt ist, zur Knospung in das Lumen sekretorischer Vesikel führt. Schließlich werden die Virionen durch Exozytose aus der Zelle sekretiert. Subgenomische mRNA-Translation führt zur Entstehung der akzessorischen Proteine, die mit der

Wirtszelle interagieren können. An, 3' polyA-Sequenz; cap, 5' cap-Struktur; L, leader-Sequenz. Verändert nach [249].

Das S-Protein setzt sich aus den beiden funktionellen Einheiten S1, das die Rezeptorbindedomäne (RBD) enthält, und der S2-Einheit, die ein Fusionspeptid enthält und letztlich für den Zelleintritt erforderlich ist, zusammen [239]. Die Bindung der S1-Einheit erfolgt an den Rezeptor *angiotensin-converting enzyme 2* (ACE2). Danach schneidet die zelluläre Protease *transmembrane protease serine subtype 2* (TMPRSS2), die hauptsächlich in der Lunge exprimiert wird, das S-Protein, um so die Fusionsaktivität zu aktivieren [213]. Nach der Membranfusion wird die genomische RNA ins Zytosol freigesetzt. Die genomische RNA rekrutiert dann Wirts-Ribosomen und dient als Matrize für die Translation der beiden großen ORFs 1a und 1b. Aus den entstehenden Polyproteinen pp1a und pp1ab werden durch proteolytische Spaltung durch virale Proteasen die 16 Nichtstrukturproteine freigesetzt [249]. Die Entstehung von pp1ab ist dabei abhängig von einer -1 ribosomalen Leserasterverschiebung genau vor dem Endcodon von ORF1, wodurch pp1a um das ORF1b-kodierte Polyprotein verlängert wird [60]. NSP1, welches sehr schnell freigesetzt wird, vermittelt eine Verminderung der Translation der Wirts-mRNA [20, 208]. Die anderen Nichtstrukturproteine formen Proteinkomplexe, die an der viralen RNA-Synthese beteiligt sind und als *replication-transcription complexes* (RTCs) bezeichnet werden [218]. Die Nichtstrukturproteine 12-16 beinhalten die enzymatischen Kernfunktionen für die RNA-Synthese und –Modifikation [218]. Die RNA-Synthese erfolgt durch die NSP12 RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRP) mit den beiden Kofaktoren NSP7 und NSP8 [65]. Die anderen Nichtstrukturproteine modulieren die Immunantwort des Wirts oder sind an der Bildung spezieller Replikationsorganellen beteiligt, wo die RNA-Synthese stattfindet (Abb. 10) [41, 219]. Mit der genomischen RNA als Matrize werden durch die RNA-Synthese sowohl ein komplettes komplementäres Genom zur Synthese neuer genomischer RNA als auch subgenomische (sg) Minusstrang-RNAs synthetisiert. Diese sg RNA wird wiederum zur Synthese von positivsträngiger mRNA verwendet [246, 249]. Die sg mRNA wird zur Translation der Strukturproteine sowie der akzessorischen Proteine genutzt [252]. Die Assemblierung der Strukturproteine findet am *ER-to-Golgi intermediate compartment* (ERGIC) statt, wo die Interaktion mit RNA, die durch das N-Protein eingekapselt ist, zur Knospung in das Lumen sekretorischer Vesikel führt. Die Virionen verlassen schließlich über Exozytose die Zelle [249].

Als Therapieansatz wurde immer wieder die Inhibition der RdRP in Betracht gezogen. So wurde der direkt-antiviral wirksame Arzneistoff Remdesivir in Studien mit einer verkürzten Infektionsdauer hospitalisierter Patienten in Verbindung gebracht und als Notfallmedikament zugelassen [16, 73]. Remdesivir wird durch die RdRP bevorzugt anstelle von Adenosin in die RNA eingebaut und führt dadurch zu einem verspäteten Kettenabbruch und einer so genannten „Template-abhängigen Inhibition“, bei der Remdesivir im Matrizenstrang während der nächsten Replikationsrunde den Einbau des komplementären Nukleotids verhindert [72, 232].

1.3.2 SARS-CoV-2 und IFN α

Die Wechselwirkung von IFN α und den Coronaviren im Allgemeinen ist relativ gut erforscht. Jedoch gibt es zum Teil gravierende Unterschiede zwischen SARS-CoV-1 und SARS-CoV-2 bezüglich der Wirksamkeit von IFN α . Während grundsätzlich alle Coronaviren aufgrund ihrer Replikationszwischenprodukte durch TLR3, TLR7, TLR8 sowie RIG-I und MDA5 erkannt werden können, zeigen SARS-CoV-1 und SARS-CoV-2 im Vergleich zu den gewöhnlichen saisonalen Coronaviren, die hohe IFN-Level induzieren, nur eine stark abgeschwächte Expression von IFN. Die ist vermutlich auf diverse Evasionsmechanismen zurückzuführen [108, 177, 194]. Ein Mechanismus zur Evasion stellt die RNA-Synthese an den Replikationsorganellen dar, die die Replikationszwischenprodukte vor Erkennung durch RIG-I und MDA5 schützen [224]. Außerdem kann das Virus die 5'-Enden seiner mRNA durch NSP10/NSP16 Heterodimere methylieren und so die Struktur der Wirts-mRNA nachahmen [248]. Auch das Anbringen einer Cap-Struktur an das 3'-Ende durch weitere Nichtstrukturproteine schützt vor der Erkennung durch verschiedene PRRs [158, 248]. Zudem wird die PRR-Signalweiterleitung durch SARS-CoV-2 inhibiert, u.a.: Bindung des N-Proteins an RIG-I, um dessen Bindung an PAMPs zu inhibieren; ORF6 blockiert die nukleäre Translokation von IRF3; ORF9b führt zur Degradation von MAVS; NSP3 inhibiert die IRF3-Phosphorylierung [108, 158, 170]. Neben der IFN-Induktion wirkt SARS-CoV-2 aber auch dem IFN-Signalweg und der ISG-Expression entgegen. Neben der Degradation von IFNAR1 wurde gezeigt, dass NSP1, ORF3b und ORF6 die Phosphorylierung von STAT1 sowie dessen Translokation in den Nukleus negativ beeinflussen können [114, 254]. NSP1, NSP7, NSP9 und NSP16 beeinflussen zusätzlich die gesamte Proteinsynthese und den Proteintransport des Wirts und supprimieren so die ISG-Expression [13, 235].

Trotz dieser zahlreichen Evasionsstrategien konnte *in vitro* gezeigt werden, dass die Stimulation mit rekombinantem IFN zu einer starken Inhibition der Replikation von SARS-CoV-2 führt – im Gegensatz zu SARS-CoV-1, wo kein signifikanter Effekt beschrieben ist [134]. Warum der Effekt von IFN so unterschiedlich ist, stellt eine Fragestellung von großem Interesse dar. Ein Sequenzalignment von viralen Proteinen zeigte, dass die größten Unterschiede zwischen SARS-CoV-1 und SARS-CoV-2 in ORF6 liegen, das nur zu 69 % konserviert ist, und ORF3b ist in SARS-CoV-2 deutlich verkürzt, weshalb diese beiden Proteine als Grund für die beobachteten Unterschiede diskutiert werden [134]. Ergebnisse einer anderen Studie deuten jedoch darauf hin, dass die verkürzte Form von ORF3b sogar ein effizienterer IFN-Antagonist ist als das SARS-CoV-1 Ortholog [112]. Ein weiterer IFN-Antagonist ist ORF7a, welches ubiquitiniert werden kann und wahrscheinlich STAT2 inhibiert [29, 190]. ORF8 inhibiert die Aktivität des ISRE-Promotors und somit ebenfalls den IFN-Signalweg [123, 264]. Schließlich ist ORF9b in der Lage inhibierend auf MAVS zu wirken und damit ebenfalls die IFN-Antwort zu supprimieren [190].

Welche wichtige Rolle IFN während einer SARS-CoV-2-Infektion spielen zeigt auch eine Studie, bei der Patienten mit asymptomatischem oder mildem Verlauf mit Patienten mit lebensbedrohlichen Symptomen in Bezug auf Autoantikörper gegen Typ-I-IFN verglichen wurden. Während keiner der Patienten mit mildem Verlauf Autoantikörper aufwies, waren dies in der anderen Gruppe mit schwerem Verlauf 10 %, davon ein Großteil gegen IFN α -Subtypen [14].

Darüber hinaus wurde der therapeutische Einsatz von IFN gegen SARS-CoV-2 auch in diversen klinischen Studien untersucht [92, 161, 281]. In China wurde IFN α 2 zudem erfolgreich in Form von Nasentropfen als Prophylaxe für Mitarbeiter im Gesundheitswesen eingesetzt [157].

2 Fragestellung und Zielsetzung

Die Expression von IFN α -Subtypen im Rahmen der angeborenen Immunantwort stellt einen essentiellen und effektiven Bestandteil der antiviralen Abwehr dar. Von den zwölf humanen IFN α -Subtypen ist bislang nur IFN α 2 klinisch zugelassen. Allerdings konnte gezeigt werden, dass verschiedene Subtypen abhängig von der Virusinfektion teils deutlich stärkere antivirale Effekte aufweisen. Die molekularen Mechanismen, die diese unterschiedlichen antiviralen Aktivitäten charakterisieren, konnten bisher nicht vollständig identifiziert werden. Sowohl die zelltyp- und virusspezifische Induktion von IFN α -Subtypen als auch die Expression von ISGs stellen mögliche Ursachen dar. Ebenso könnten strukturelle Unterschiede auf Aminosäureebene zwischen den Subtypen eine wichtige Rolle spielen. In dieser Arbeit werden daher anhand von HBV, für dessen Behandlung IFN α 2 eingesetzt wird, und SARS-CoV-2, das ein Virus von großem aktuellem Interesse darstellt, die Induktion, der antivirale Effekt und die Modulation des antiviralen Effekts von IFN α -Subtypen untersucht.

Zur Untersuchung der Induktion werden virusspezifische Zielzellen mit HBV oder SARS-CoV-2 infiziert, um die PRR-vermittelte Induktion von IFN auf mRNA- und Protein-Ebene zu untersuchen. Anschließend werden die antiviralen Effekte der IFN α -Subtypen in Zelllinien und Primärzellen mit spezifischen Methoden charakterisiert und die Expression von Schlüssel-ISGs mittels qPCR analysiert. Für HBV soll im Speziellen die Expression von *APOBEC3*-Genen, die mit der Eradikation von cccDNA in Verbindung gebracht werden, in differenzierten HepaRG Zellen untersucht und zusätzlich mit der Expression in HBV-infizierten Zellen verglichen werden. Für SARS-CoV-2 werden die Subtypspezifischen Expressionsmuster durch Transkriptom- und Proteomanalyse untersucht, um mögliche Schlüssel-Effekte in der antiviralen Antwort zu identifizieren. Der mögliche Nutzen einer Kombinationstherapie wird für SARS-CoV-2 durch Kombination von IFN α -Subtypen und dem antiviral wirksamen Medikament Remdesivir bestimmt. Weiterhin wird die Modulation des antiviralen Effekts für beide Viren durch Kombination mit dem proinflammatorischen Zytokin IL-1 β untersucht.

Darüber hinaus wurden auf Basis von IFN α 2 gezielt IFN α 2/ α 6- bzw. IFN α 2/IFN α 14-Mutanten erzeugt. Der antivirale Effekt dieser Mutanten wird untersucht, um mögliche wichtige strukturelle Regionen für die unterschiedlichen Effekte der IFN α -Subtypen zu identifizieren. Mögliche effiziente Mutanten könnten schneller Anwendung in der Klinik finden als die Zulassung eines komplett neuen IFN α -Subtyps.

3 Material

3.1 Geräte

Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
5200 Fragment Analyzer System	Agilent Technologies
-80 °C Gefrierschrank MDF-U73V	Sanyo
Airclean600 PCR Workstation	StarLab
Auflichtmikroskop CK2	Hund
Auflichtmikroskop LabA1 AX10	Zeiss
Branson Sonifer 250	Branson
Brutschrank alaxy 48R	Eppendorf
CO ₂ Inkubator MCO-170AICUVD-PE	PHCbi
CO ₂ Inkubator MCO-20AIC	Sanyo
Elektrophoresesystem	Biorad
EPS 301 Power Supply	Cytiva
Graham-Kondensator	Thermo Fisher Scientific
Heizmischer Thermomixer Comfort	Eppendorf
Illumina NovaSeq 6000	Illumina
Inverses Mikroskop Wilovert S	Hund
Kühl-Gefrierkombination CN 47 13-20	Liebherr
Lichtmikroskop Axio LA.1	Zeiss
Manuelle Pipetten (2,10,20,200,1000µl)	StarLab, Eppendorf
Masterflex™ L/S™ Easy-Load™ II	Masterflex
MaxQ™ 4000 Tischorbitalschüttler	Thermo Fisher Scientific
Multifuge 3SR+	Heraeus
Neubauer-Zählkammer	Hecht-Assistent
Pipettierhilfe Ergo One Fast	StarLab
Q Exactive HF Orbitrap	Thermo Fisher Scientific
qTower2.0	Analytik-Jena
Sicherheitswerkbank HeraSafe™	Thermo Fisher Scientific
Sorvall® RC 6 Plus	Thermo Fisher Scientific
Tecan Spark	Tecan
Ultimate 3000 RSLCnano HPLC	Dionex

UV-6 S/M	Herolab
UV-Transilluminator	Intas Science Imaging
VIAFLOW elektronische Pipette	Integra
Vortexmischer Genius 3	IKA Labortechnik
Waage Scout Pro	Ohaus
Wasserheizbad GFL	Oehmen
Zentrifuge 5415R	Eppendorf
Zentrifuge Heraeus Multifuge 3SR+	Thermo Fisher Scientific

3.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
96-Well-PCR-Platte, Semi-Skirted, weiß	StarLab
Acclaim™ PepMap™ 100 C18-LC-Säulen	Thermo Fisher Scientific
Amicon Zentrifugationsfilter	Merck
Bechergläser	Schott
Cryo-Tubes, 2ml	Greiner Bio One
Einmalspritzen, steril, 2 ml	Braun
Erlenmeyerkolben	Schott
Handschuhe Vasco Nitril	Braun
HighTrap QXL 5 ml	GE Healthcare
Histoacryl-Gewebekleber, blau	Braun
LumiNunc, 96well, weiß, FP, unsteril	Thermo Fisher Scientific
Mr. Frosty™ Gefrierbehälter	Thermo Fisher Scientific
Pieptenspitzen, steril 300 µl	Integra Bioscience
Pinzetten	Braun
Pipettenspitzen, steril & unsteril	StarLab
PP-Röhrchen mit Schraubverschluss, 15ml & 50 ml	Greiber Bio One
Reagenzien-Reservoir, steril	Integra Bioscience
Reaktionsgefäße, steil, 0,5 – 2 ml	Eppendorf
Schraubverschlussröhrchen, steril, 1,5 ml	Eppendorf
Spritzenfilter 45 µm	Roth
Stabpipette, steril, 5 ml, 10ml, 25ml	Greiner Bio One

VASOFIX Braunüle 20 G 33 mm rosa	Braun
Xtra-Clear Advanced Polyolefin StarSeal (qPCR)	StarLab
Zellkulturflasche, steril (T25, T75, T175)	Greiner Bio One
Zellkulturplatte, steril, (12, 24, 48 Well)	Greiner Bio One
Zellkulturplatte, steril, 96 Well	Sarstedt
Zellkulturplatten mit Kollagenbeschichtung	Corning
Zentrifugenflasche, Nalgene, 500 ml	Thermo Fisher Scientific
Zentrifugenröhrchen, Oak Ridge, Nalgene, 50 ml	Thermo Fisher Scientific

3.3 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie oder Reagenz	Hersteller
4',6-Diamidino-2-phenyl-indol –dihydrochlorid (DAPI)	Sigma-Aldrich
Acetonitril (ACN)	Roth
Acrylamid	Applichem
Ameisensäure	Roth
Ammoniumhydrogencarbonat	Roth
Arginin	Applichem
Beetle-Juice Luciferase assay Firefly	PJK Biotech
b-Mercaptoethanol	Applichem
Bronchial Epithelial Cell Medium-basal (BEpiCM-b)	ScienCell
Bronchial Epithelial SingleQuots™ Kit	Lonza
Buffer RLT	Qiagen
Carbenicillin Dinatriumsalz	Roth
Carbenicillin-Dinatriumsalz	Roth
Coomassie Brilliant Blue	BioRad
Cytiva Sera-Mag Carboxyl-Magnet-Beads	GE Healthcare
Diethiothreitol (DTT)	Thermo Fisher Scientific
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Applichem
Dimethylsulfoxid Hybri-Max™ (DMSO)	Sigma-Aldrich
DMEM	Thermo Fisher Scientific
DMEM/F12 (1:1)	PAN Biotech
DNA/RNA Shield	Zymo Research

EC-23	Tocris
EDTA - Lösung pH 8,0 (0,5 M)	Appllichem
Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), human	PeptoTech
Fast-Media® Amp Agar	InvivoGen
Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich
Formaldehyd-Lösung 30 %, methanolarm	Roth
G418 (Geneticin)	InvivoGen
GelRed	Biotium
Guanidinium-Hydrochlorid	Roth
<i>Hanks' Balanced Salt Solution</i> (HBSS)	PanBiotech
HEPES	Thermo Fisher Scientific
Hydrocortison	Sigma-Aldrich
Hygromycin B Gold	InvivoGen
Insulin-Lösung, human	PAN Biotech
Iodacetamid (IAA)	Sigma-Aldrich
Kollagenase Typ IV	Sigma-Aldrich
Kristallviolett	Roth
LB-Medium (Luria/Miller)	Appllichem
Illumina Free Adapter Blocking Reagent	Illumina
Lysis Juice	PJK Biotech
Lysozym (Huhn)	Sigma-Aldrich
MEM	Thermo Fisher Scientific
Natriumchlorid (NaCl)	Appllichem
Natrium-Deoxycholate Detergenz (NaDOC)	Thermo Fisher Scientific
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Appllichem
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth
Natrium-Pyruvat (100 mM)	Thermo Fisher Scientific
Nicht-essenzielle Aminosäuren 100x (NEAA)	Thermo Fisher Scientific
Penicillin-Streptomycin 10.000 U/ml (P/S)	Thermo Fisher Scientific
Phalloidin, CF®594	BioTrend
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Thermo Fisher Scientific
Poly I:C, hohes Molekulargewicht	InvivoGen
Polyethylenglykol 8000 (PEG 8000)	Roth
Roti Histofix 10 %	Roth

RPMI 1640	Thermo Fisher Scientific
Schwefelsäure, 2N	Roth
SOC-Medium	NEB
Tetramethylethylenediamin (TEMED)	Thermo Fisher Scientific
Thio-Urea	Thermo Fisher Scientific
TMB Substrat	BioLegend
Trifluoressigsäure	Roth
Tris-Acetat	Roth
Tris-HCl	Applichem
Triton X-100	Roth
Triton X-114	Roth
Trypanblau-Lösung (0,4 %)	Thermo Fisher Scientific
Trypsin, MS geprüft	SERVA
Trypsin-EDTA (0,05 %)	Thermo Fisher Scientific
Tween 20	Applichem
Urea	SERVA
William's Medium E mit stabilem Glutamin	PAN Biotech

3.4 Kommerzielle Kits

Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete kommerzielle Kits

Bezeichnung	Hersteller
Hepatitis B surface antigen ELISA Kit	Abnova
HiScript II Q RT SuperMix for qPCR	Vazyme
Human IFN Alpha Sampler Set	PBL Assay Science
Luna Universal qPCR MasterMix	NEB
Monarch Plasmid Miniprep Kit	NEB
NEBNext Single Cell/Low Input RNA Library	NEB
NovaSeq 6000 S1 Reagent Kit	Illumina
NucleoSpin Tissue	Macherey-Nagel
Orangu Cell Counting Solution	Cell guidance systems
Quick-RNA Miniprep Kit	Zymo Research
QuikChange II Kit	Agilent
ToxinSensor™ Gel Clot Endotoxin Assay Kit	GenScript

3.5 Puffer und Lösungen

Tabelle 5: In dieser Arbeit verwendete Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Antikörper-Lösung	PBS 1 % FCS Antikörper nach Protokoll
Blockierungs-Puffer	PBS 3 % FCS
Calcium-Lösung	Leber-Spüllösung 5mM CaCl ₂
Collagenase-Lösung	Calcium-Lösung 1 mg/ml Collagenase IV
EGTA-Lösung	Leber-Spüllösung 500 µM EGTA
GEFI-Puffer	H ₂ O 20 mM Tris-HCl 500 mM NaCl pH 7,5
IFN-Dialyse-Puffer	H ₂ O 25 mM Tris-HCl pH 7,45
IFN-Wasch-Puffer 1	H ₂ O 50 mM Tris-HCl 100 mM NaCl 0,5% Triton X-100 pH 8

IFN-Wasch-Puffer 2	H ₂ O 50 mM Tris-HCl 100 mM NaCl pH 8
IONEX-Puffer A	H ₂ O 25 mM Tris-HCl pH 8
IONEX-Puffer B	H ₂ O 25 mM Tris-HCl 1 M NaCl pH 8
Kristallviolett-Lösung	PBS 10 % Ethanol 0,1 % Kristallviolett 0,37 % Formaldehyd
Leber-Spüllösung	HBSS 2 % HEPES 20 µg/ml Gentamicin
Permeabilisierungs-Puffer	PBS 1 % Triton X-100
Solvent A	H ₂ O 0,1 % Ameisensäure
Solvent B	H ₂ O 0,1 % Ameisensäure 84 % Acetonitril
Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE)	H ₂ O

	0,4 M Tris-Acetat
	0,01 M EDTA
Urea-Puffer	H ₂ O
	30 mM Tris-HCl
	7 M Urea
	2 M Thiourea
	0,1 % NaDOC
	pH 8,5
Wasch-Puffer	PBS
	0,05 % Tween 20

3.6 Nährmedien

Tabelle 6: In dieser Arbeit verwendete Nährmedien

Bezeichnung	Zusammensetzung
Einfriermedium Zelllinien	90 % FCS 10 % DMSO
Kulturmedium Vero E6 Zellen	DMEM 10 % FCS 1 % P/S 1 % NEAA
Kulturmedium HepaRG Zellen	William's Medium E (mit stabilem Glutamin) 10 % FCS 1 % P/S 1 % NEAA 50 µM Hydrocortison 5 µg/ml humanes Insulin
Differenzierungsmedium HepaRG Zellen	Kulturmedium HepaRG Zellen 1,7 % DMSO (Hybri-Max™)
Infektionsmedium HepaRG Zellen	Kulturmedium HepaRG Zellen

	4 % PEG 8000 1,7 % DMSO (Hybri-Max™)
Kulturmedium 1 HepG2.117	RPMI 1640 10 % FCS 1 % P/S 1 % NEAA 1 % HEPES 100 µg/ml Hygromycin B 500 µg/ml G418 (frisch zugeben)
Kulturmedium 2 HepG2.117	RPMI 1640 2 % FCS 1 % P/S 1 % NEAA 1 % HEPES 1 % DMSO 500 µg/ml G418 (frisch dazugeben)
Kulturmedium PHHs	William's Medium E mit stabilem Glutamin 10 % FCS 1 % P/S 1 % NEAA 50 µM Hydrocortison 5 µg/ml humanes Insulin 2 % DMSO (Hybri-Max™) 25 ng/ml EGF (frisch dazugeben)
Leber-Basismedium	DMEM/F12 (1:1) 1 % P/S
Infektionsmedium PHH	Kulturmedium PHHs ohne DMSO 4 % PEG 8000 2 % DMSO (Hybri-Max™)

Kulturmedium Calu-3	MEM 10 % FCS 1 % P/S 1 % Natrium-Pyruvat
Kulturmedium ISRE-luc	DMEM 10 % FCS 1 % P/S 500 µg/ml G418 (frisch zugeben)
Kulturmedium hAE Zellen	DMEM/BEpiCM-b (1:1) 1 % P/S 1,25 % HEPES Bronchial Epithelial SingleQuots Kit 5mM EC-23

3.7 Antikörper

Tabelle 7: In dieser Arbeit verwendete Antikörper

Bezeichnung (Klon)	Wirt	Arbeitskonzentration	Bezugsquelle
SARS-CoV-2 Nukleocapsid Antikörper (1C7)	Maus	0,2 µg/µl	Antikoerper-online.de
Ziege IgG anti-Maus IgG (H+L)-Alexa Fluor 488, MinX keine (Polyklonal)	Ziege	0,5 µg/µl	Dianova
Ziege IgG anti-Maus IgG (H+L)-HRPO, MinX keine (Polyklonal)	Ziege	0,5 µg/µl	Dianova

3.8 Zelllinien

Calu-3:

Calu-3 Zellen sind adhärente Epithelzellen aus dem Lungen-Adenokarzinom eines 25 Jahre alten Mannes [1]. Die Zellen werden oft als Modell für Epithelzellen der humanen

Atemwege genutzt, um mögliche Wirkstoffe gegen Krebs zu untersuchen [116]. Die Zellen sind auch suszeptibel für eine Infektion mit SARS-CoV-2 [185].

HepaRG:

Die adhärente, humane Leberzelllinie HepaRG stammt aus einem gut differenzierten Lebertumor einer Patientin, die mit dem Hepatitis C Virus infiziert war und unter einer Leberzirrhose litt. Unter dem Einfluss von Corticosteroiden und DMSO differenzieren HepaRG Zellen zu zwei Zellpopulationen aus und ähneln in ihrer Morphologie und ihren Eigenschaften zum einen primären humanen Hepatozyten (PHH) und zum anderen Cholangiozyten. Gut differenzierte HepaRG Zellen unterstützen den kompletten Replikationszyklus des Hepatitis B Virus und eignen sich daher sehr gut für die Untersuchung der HBV Infektion [74, 147].

HepG2.117:

HepG2.117 Zellen sind ein Derivat der adhärenenten, humanen Leberzelllinie HepG2. HepG2 Zellen wurden 1975 aus der Biopsie eines Lebertumors eines 15 Jahre alten Jungen aus Argentinien isoliert, der zunächst als hepatozelluläres Karzinom klassifiziert wurde [3]. Später wurde jedoch gezeigt, dass es sich wahrscheinlich um ein Hepatoblastom handelte [135]. Das Derivat HepG2.117 entstand durch die stabile Transfektion von HepG2 Zellen mit einem HBV-Expressionsvektor, bei dem die Transkription von pgRNA durch ein Tet-off System kontrolliert wird [226]. Die Zellen eignen sich zur Herstellung von infektiösen HBV Partikeln des Genotyps D (Serotyp ayw).

ISRE-luc:

Die ISRE-luc Reporterzelllinie besteht aus Retina-Epithelzellen, die aus den Augen eines 19-jährigen Mannes isoliert wurden und adhärent wachsen [52]. Die Zelllinie wurde stabil mit einem Plasmid transfiziert, welches Firefly-Luciferase unter der Kontrolle des ISRE kodiert.

Vero E6:

Vero E6 Zellen sind ein Klon der Vero-Zelllinie. Vero Zellen wachsen adhärent und wurden ursprünglich in der 1960er Jahren aus der Niere einer adulten Grünmeerkatze der Art *Cercopithecus aethiops* isoliert. Die Zellen werden aufgrund ihrer Suszeptibilität gegenüber zahlreicher Viren hauptsächlich in der virologischen Forschung verwendet.

[8]. Vero Zellen haben einen Defekt in der Produktion von Typ-I-Interferonen, jedoch eine funktionale Typ-I-Interferon Signalkaskade [48].

3.9 Primärzellen

Humane *airway epithelial* Zellen:

Humane *airway epithelial* Zellen (hAE Zellen) stellen natürliche Zielzellen für die SARS-CoV-2-Infektion dar und spiegeln die natürlichen physiologischen Gegebenheiten im respiratorischen Trakt wider, einschließlich Zilienschlag und Mukusproduktion. Die Zellen werden als *air liquid interface* (ALI) kultiviert, d.h. die Zellen werden adhärent in einem Transwell kultiviert. Basal befindet sich das Medium inklusive aller Stimulantien, apikal sind die Zellen der Luft ausgesetzt und sondern Mukus ab. Die Waschungen zur Bestimmung der viralen Titer werden ebenfalls apikal durchgeführt.

Primäre humane Hepatozyten:

Primäre humane Hepatozyten sind adhärente Zellen und stellen den größten Teil an Zellen in der Leber dar. Die Zellen können aus Leberresektaten isoliert werden und ermöglichen die Untersuchung einer HBV-Infektion. Sie exprimieren zudem zahlreiche funktionsfähige TLRs [28].

3.10 Bakterien

Tabelle 8: In dieser Arbeit verwendete Bakterien

Bezeichnung	Bezugsquelle
Kompetente <i>E.coli</i> (TG1)	Zymo Research

3.11 Viren

Tabelle 9: In dieser Arbeit verwendete Viren

Bezeichnung	Bezugsquelle
HBV, Genotyp D	Mengji Lu (UK Essen), [130]
SARS-CoV-2	Adalbert Krawczyk (UK Essen), Patientenisolat [81]

3.12 Plasmide

Tabelle 10: In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Bezeichnung	Charakteristika	Bezugsquelle
pSM2/HBV; HBV-Standard	basiert auf dem Vektor pSM2 und enthält das HBV-Genom	Mengji Lu (UK Essen)
pT7T3 <i>IFNA1</i>	Expressionsvektor pT7T3 mit kodierender Sequenz für IFN α 1	Jacob Piehler (Uni Osnabrück)
pT7T3 <i>IFNA10</i>	Expressionsvektor pT7T3 mit kodierender Sequenz für IFN α 10; <i>E. coli</i> Kodon-optimiert	GeneArt/Thermo Scientific
pT7T3 <i>IFNA14</i>	Expressionsvektor pT7T3 mit kodierender Sequenz für IFN α 14; <i>E. coli</i> Kodon-optimiert	GeneArt/Thermo Scientific
pT7T3 <i>IFNA16</i>	Expressionsvektor pT7T3 mit kodierender Sequenz für IFN α 16	Jacob Piehler (Uni Osnabrück)
pT7T3 <i>IFNA17</i>	Expressionsvektor pT7T3 mit kodierender Sequenz für IFN α 17; <i>E. coli</i> Kodon-optimiert	GeneArt/Thermo Scientific
pT7T3 <i>IFNA2</i>	Expressionsvektor pT7T3 mit kodierender Sequenz für IFN α 2	Jacob Piehler (Uni Osnabrück)
pT7T3 <i>IFNA21</i>	Expressionsvektor pT7T3 mit kodierender Sequenz für IFN α 21	Jacob Piehler (Uni Osnabrück)

pT7T3 IFNA2-ASVT	Expressionsvektor pT7T3 mit kodierender Sequenz für IFN α 2-ASVT; <i>E. coli</i> Kodon-optimiert	Vu Thuy Khanh Le-Trilling (UK Essen)
pT7T3 IFNA2-EIFK	Expressionsvektor pT7T3 mit kodierender Sequenz für IFN α 2-EIFK; <i>E. coli</i> Kodon-optimiert	Vu Thuy Khanh Le-Trilling (UK Essen)
pT7T3 IFNA2-MS	Expressionsvektor pT7T3 mit kodierender Sequenz für IFN α 2-MS; <i>E. coli</i> Kodon-optimiert	Vu Thuy Khanh Le-Trilling (UK Essen)
pT7T3 IFNA2-NNEMM	Expressionsvektor pT7T3 mit kodierender Sequenz für IFN α 2-NNEMM; <i>E. coli</i> Kodon-optimiert	Vu Thuy Khanh Le-Trilling (UK Essen)
pT7T3 IFNA2-NNEMMM	Expressionsvektor pT7T3 mit kodierender Sequenz für IFN α 2-NNEMMM; <i>E. coli</i> Kodon-optimiert	Vu Thuy Khanh Le-Trilling (UK Essen)
pT7T3 IFNA2-PEIFKF	Expressionsvektor pT7T3 mit kodierender Sequenz für IFN α 2-PEIFKF; <i>E. coli</i> Kodon-optimiert	Vu Thuy Khanh Le-Trilling (UK Essen)
pT7T3 IFNA2-PF	Expressionsvektor pT7T3 mit kodierender Sequenz für IFN α 2-PF; <i>E. coli</i> Kodon-optimiert	Vu Thuy Khanh Le-Trilling (UK Essen)

pT7T3 IFNA2-QASMT	Expressionsvektor pT7T3 mit kodierender Sequenz für IFN α 2-QASMT; <i>E. coli</i> Kodon-optimiert	Vu Thuy Khanh Le-Trilling (UK Essen)
pT7T3 IFNA4	Expressionsvektor pT7T3 mit kodierender Sequenz für IFN α 4; <i>E. coli</i> Kodon-optimiert	GeneArt/Thermo Scientific
pT7T3 IFNA5	Expressionsvektor pT7T3 mit kodierender Sequenz für IFN α 5; <i>E. coli</i> Kodon-optimiert	GeneArt/Thermo Scientific
pT7T3 IFNA6	Expressionsvektor pT7T3 mit kodierender Sequenz für IFN α 6; <i>E. coli</i> Kodon-optimiert	GeneArt/Thermo Scientific
pT7T3 IFNA7	Expressionsvektor pT7T3 mit kodierender Sequenz für IFN α 7; <i>E. coli</i> Kodon-optimiert	GeneArt/Thermo Scientific
pT7T3 IFNA8	Expressionsvektor pT7T3 mit kodierender Sequenz für IFN α 8	Jacob Piehler (Uni Osnabrück)

3.13 Oligonukleotide

Tabelle 11: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide. fw = forward, rv = reverse

Bezeichnung	Sequenz	Konzentration	Volumen PCR
<i>APOBEC3B</i> fw	gaccctttggtccttcgac	10 μ M	0,5 μ l
<i>APOBEC3B</i> rv	gcacagcccaggagaag	10 μ M	0,5 μ l
<i>APOBEC3C</i> fw	agcgcttcagaaaagagtgg	10 μ M	0,5 μ l
<i>APOBEC3C</i> rv	aagtttcgttccgatcgttg	10 μ M	0,5 μ l
<i>APOBEC3D</i> fw	accCAAacgtcagtcgaatc	10 μ M	0,5 μ l

<i>APOBEC3D</i> rv	cacatttctgctggttctc	10 µM	0,5 µl
<i>APOBEC3F</i> fw	ccgtttggacgcaaagat	10 µM	0,5 µl
<i>APOBEC3F</i> rv	ccaggtgatctggaacactt	10 µM	0,5 µl
<i>APOBEC3G</i> fw	ggttacctgcttcacctct	10 µM	0,5 µl
<i>APOBEC3G</i> rv	atcatagatgcgggcagtga	10 µM	0,5 µl
<i>APOBEC3H</i> fw	cggaatgtttcggctgtt	10 µM	0,5 µl
<i>APOBEC3H</i> rv	agctgtggccagaagcac	10 µM	0,5 µl
<i>GAPDH</i> fw	caaggtcatccatgacaacttg	10 µM	0,5 µl
<i>GAPDH</i> rv	gtccaccaccctgttgctgtag	10 µM	0,5 µl
HBV fw	cccgtttgtcctctaattcc	10 µM	1 µl
HBV rv	gtccgtaggtttgtacagc	10 µM	1 µl
<i>IDO1</i> fw	caaaggtcatggagatgtcc	10 µM	0,5 µl
<i>IDO1</i> rv	ccaccaatagagagaccagg	10 µM	0,5 µl
<i>IFI35</i> fw	aacaaaaggagcacacgatca	10 µM	0,5 µl
<i>IFI35</i> rv	ctccgttcttagtcttgccaa	10 µM	0,5 µl
<i>IFITM3</i> fw	ggtcttcgctggacacccat	10 µM	0,5 µl
<i>IFITM3</i> rv	tgtccctagacttcacggagta	10 µM	0,5 µl
<i>IFNA</i> fw*	tccatgagvtgatbcagcaga	1,67 µM	3 µl
<i>IFNA</i> rv	atttctgctctgacaacctccc	1,67 µM	3 µl
<i>IFNB</i> fw	agctgaagcagttccagaag	1 µM	1,5 µl
<i>IFNB</i> rv	agtctcattccagccagtgc	1 µM	1,5 µl
<i>ISG15</i> fw	gcgaactcatcttgccagt	10 µM	0,5 µl
<i>ISG15</i> rv	cttcagctctgacaccgaca	10 µM	0,5 µl
<i>ISG20</i> fw	tagccgctcatgtcctcttt	10 µM	0,5 µl
<i>ISG20</i> rv	tgagggagagatcaccgatt	10 µM	0,5 µl
<i>MX1</i> fw	tggcataaccagagtggtctg	10 µM	0,5 µl
<i>MX1</i> rv	caccaccaggctgattgtct	10 µM	0,5 µl
<i>OAS2</i> fw	acccgaacagttccccctggt	10 µM	0,5 µl
<i>OAS2</i> rv	acaagggtaccatcggagttgcc	10 µM	0,5 µl
<i>Tetherin</i> fw	aagggtttcaggatgtgga	10 µM	0,5 µl
<i>Tetherin</i> rv	ttgtccttgggccttctct	10 µM	0,5 µl

* b = c, g oder t; v = a, c oder g

3.14 Software

Tabelle 12: In dieser Arbeit verwendete Software

Bezeichnung	Urheber
Array Studio software v10.2.5.9	QIAGEN
Cytoscape (v.3.8.2)	Cytoscape Consortium
<i>Four Parameter Logistic (4PL) Curve Calculator</i>	AAT Bioquest
Ingenuity Pathway Analysis (IPA)	QIAGEN
MaxQuant (v.1.6.17)	Max Planck Institut für Biochemie
Prism 8	GraphPad
R (v.3.6.2)	The R foundation
STRING (v.11)	STRING Consortium
SynergyFinder Webapplikation 2.0	SynergyFinder
Tecan Spark Software 3.1	Tecan

4 Methoden

4.1 Zellkultur

4.1.1 Kultivierung von Zelllinien

Alle Zelllinien wurden in einem CO₂-Begasungsbrutschrank bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit in Zellkulturflaschen kultiviert. Die Zellen wurden in der Regel zweimal die Woche passagiert, lediglich die HepaRG Zellen wurden nur einmal wöchentlich subkultiviert.

Zum Passagieren wurde zunächst das Medium von den Zellen abgenommen. Anschließend wurden die Zellen einmal mit einer gleichen Menge PBS gewaschen, kurz mit Trypsin-EDTA bedeckt und solange bei 37°C inkubiert bis die Zellen sich ablösten. Danach wurden die gesamten Zellen in Kulturmedium aufgenommen und ein Teil in eine neue Zellkulturflasche mit frischem Medium zur weiteren Kultivierung gegeben.

Bei den HepaRG Zellen wurde nach dem Ablösen zunächst die Zellzahl bestimmt und im Anschluss $2,6 \times 10^4$ Zellen/cm² in eine neue Flasche ausgesät.

4.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zur Langzeitlagerung von Zellen wurden diese in Einfriermedium, bestehend aus 90 % FCS und 10 % DMSO, eingefroren. Dafür wurden die Zellen wie beschrieben abgelöst und gezählt. Im Anschluss wurden die Zellen bei 300 x g für 5 min zentrifugiert und in Einfriermedium mit einer Zelldichte von 2×10^6 Zellen/ml aufgenommen. Die Zellsuspension wurde zügig zu je 1 ml auf Kryoröhrchen aufgeteilt und in einem mit Isopropanol gefüllten Mr. Frosty™ Gefrierbehälter bei -80°C über Nacht eingefroren. Die Benutzung des Gefrierbehälters ermöglicht ein kontrolliertes Abkühlen der Zellen mit einer Geschwindigkeit von 1°C/min. Das DMSO verhindert zudem die Bildung von Eiskristallen, die die Zellen zerstören würden. Am nächsten Tag wurden die Zellen zur dauerhaften Lagerung in einem Stickstofftank eingelagert.

Zum Auftauen wurden die Zellen im Wasserbad bei 37°C erwärmt und, nachdem sich die Zellsuspension vollständig verflüssigt hat, zu 9 ml vorgewärmten Kulturmedium gegeben. Dann wurden die Zellen bei 300 x g für 5 min zentrifugiert, das Medium dekantiert und die Zellen in 10 ml PBS gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren wurden die Zellen in entsprechendem Kulturmedium aufgenommen und in einer Zellkulturflasche kultiviert.

4.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl einer Zellsuspension wurde mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dazu wurden 50 µl der Zellsuspension mit 50 µl Trypanblau vermischt und auf die Zählkammer pipettiert. Nun wurden in vier Großquadraten alle Zellen gezählt, die keine Blaufärbung aufwiesen und der Mittelwert pro Großquadrat berechnet. Durch Multiplikation des Mittelwerts mit dem Kammerfaktor 1×10^4 , der spezifisch für die Neubauer-Zählkammer ist, ergibt sich die Zellzahl/ml.

4.1.4 Bestimmung der Zellviabilität

Zur Bestimmung der Zellviabilität wurden die Zellen zunächst entsprechend dem Protokoll behandelt, für das die Zellviabilität überprüft werden sollte. Im Anschluss wurde *Orangu Cell Counting Solution* entsprechend des Herstellerprotokolls zu den Zellen gegeben und die Zellen für 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Absorption bei 450 nm gemessen und die Zellviabilität relativ zu einer unbehandelten Kontrolle ermittelt.

4.1.5 Differenzierung von HepaRG Zellen

Die HepaRG Zellen wurden auf Basis des veröffentlichten Protokolls von Yi Ni und Stephan Urban differenziert [167].

Zur Differenzierung wurden 6×10^4 Zellen in 300 µl Kulturmedium in den inneren 24 Wells einer 48-Well-Platte ausgesät. Die äußeren Wells wurden mit der gleichen Menge PBS aufgefüllt, um die Verdunstung zu minimieren. Für andere Platten wurden Zellzahl und Medium entsprechend angepasst. Nach einer Woche wurde das Kulturmedium gewechselt. Nach einer weiteren Woche Inkubation wurden das Kulturmedium abgenommen und durch Differenzierungsmedium ausgetauscht, welches dreimal wöchentlich gewechselt wurde. Das im Differenzierungsmedium enthaltene DMSO führt in Kombination mit der hohen Konfluenz durch die lange Kultivierung in der 48-Well-Platten zur Ausdifferenzierung der HepaRG Zellen zu einem Hepatozyten-ähnlichen Phenotyp [74]. Nach mindestens zweiwöchiger Kultivierung mit Differenzierungsmedium wurden die Zellen für Versuche genutzt.

4.1.6 Isolation und Kultivierung von primären humanen Hepatozyten

Primäre humane Hepatozyten wurden aus Leberresektaten von Patienten des Universitätsklinikums Essen isoliert basierend auf einem veröffentlichten Protokoll von Melanie Werner und Ruth Bröring [258]. Nachdem ein Pathologe das Resektat für die

Forschung freigegeben hat, wurde es durch die Westdeutsche Biobank Essen an uns übergeben (Projekt 18-WBE-048). Alle Patienten haben ihr schriftliches Einverständnis gegeben. Die Studie ist konform mit den ethischen Richtlinien der Deklaration von Helsinki aus 1975. Ein entsprechender Ethikantrag wurde vom Ethikkomitee der medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen bewilligt (Ethikantrag 12-5232-BO).

Zunächst wurde ein Graham-Kondensator mit einem Stativ fixiert und mit einem Schlauch an ein Wasserbad angeschlossen, das auf 39°C erhitzt wurde, um so die Lösungen, die später durch die innere Spule des Graham-Kondensators gepumpt wurden, zu erwärmen. Die innere Spule des Graham-Kondensators wurde mittels eines Schlauches mit einer Peristaltikpumpe verbunden. An die Austrittsöffnung des Graham-Kondensators wurde ebenfalls ein Schlauch für den Efflux der Flüssigkeit angeschlossen. Anschließend wurde die Apparatur für wenige Minuten mit 70 % Ethanol (vergällt) zur Reinigung durchgespült. Danach wurde 5-10 min mit PBS gespült, um das Ethanol vollständig aus der Glasspule zu entfernen. Im Anschluss wurde kurz mit Leber-Spüllösung gespült, um das PBS zu verdrängen, und eine VASOFIX Braunüle 20 G 33 mm rosa wurde an das Ende, an dem die Flüssigkeit austrat, angeschlossen.

Das Leberresektat wurde in eine Petrischale gelegt und von außen mit Leber-Spüllösung gereinigt, um Blutreste zu entfernen. Dann wurde die Braunüle in die verschiedenen Gefäße der Leber eingeführt und diese bei einer Einstellung von ca. 35 Umdrehungen pro Minute (rpm, engl. *revolutions per minute*) der Peristaltikpumpe durchgespült, um das Blut aus dem Gewebe zu entfernen. Es wurde so lange gespült bis die Leber möglichst blutleer ist, was an einer gräulichen Verfärbung des Gewebes zu erkennen war. Danach wurde das Gefäß ausfindig gemacht, welches den größten Teil des Resektats durchzog und dabei möglichst ausreichend Abstand zur Leberkapsel aufwies um eine Perfusion beim späteren Verdau zu vermeiden. Die Braunüle wurde im ausgewählten Gefäß fixiert und die Schnittfläche mit Histoacryl-Gewebekleber verklebt, sodass keine größeren Mengen Leber-Spüllösung mehr austraten. Das Leberstück sollte sich beim Spülen ruhig aufbäumen, da dies auf einen erhöhten Innendruck hindeutete, der für die folgenden Schritte erwünscht war. Anschließend wurden zunächst ca. 40 ml EGTA-Lösung durch die Leber gepumpt, dann wurden weitere ca. 60 ml für 15-20 min durch das Gewebe gepumpt, indem ein Kreislauf durch Platzieren von Eintritts- und Austrittsschlauch in der Petrischale gebildet wurde. Durch die Spülung mit EGTA wurden Proteasen unspezifisch inhibiert und Salze durch die Eigenschaft von EGTA als Chelatbildner aus dem Gewebe

entfernt. Im Anschluss wurden 40 ml Calcium-Lösung durch das Gewebe gespült und mit 60 ml der Collagenase-Lösung je nach Lebergröße für 10-20 min ein Kreislauf gebildet. Ein erfolgreicher Verdau des Gewebes war an einer weichen, glibberigen Konsistenz zu erkennen. Die Leber wurde dann über einem Becherglas in ein Metallsieb (60 µm) gelegt, mit einer Schere zunächst Reste des Gewebeklebers entfernt und die Leber dann aufgeschnitten, sodass die Zellsuspension austrat. Durch leichtes Drücken mit einem Stößel und Zugabe von Leber-Basismedium wurden die Zellen im Becherglas in maximal 200 bis 300 ml gesammelt. Die Zellsuspension wurde auf 50 ml Röhrchen aufgeteilt und bei 50 x g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, die Zellen je Röhrchen in 25 ml Leber-Spüllösung resuspendiert und je zwei Röhrchen vereinigt. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt, sodass nur noch 1 oder 2 Röhrchen übrig und die Leber-Spüllösung nach dem Zentrifugieren möglichst klar war. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen in Leber-Basismedium aufgenommen und gezählt. Die Zellen wurden in Zellkulturplatten, die mit Collagen beschichtet waren, ausgesät. Für eine 24-Well-Platte wurden 5×10^5 Zellen/Well in 500 µl und für eine 12-Well-Platte 1×10^6 Zellen/Well in 1 ml pro Well ausgesät. Die Zellen wurden bei 37°C inkubiert und dabei alle 15 min beherzt geschwenkt. Nach 60 min wurde das Medium vorsichtig zu Kulturmedium gewechselt. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit PBS gewaschen und danach in Kulturmedium, das dreimal wöchentlich gewechselt wurde, weiterkultiviert.

4.1.7 Kultivierung von humanen AE Zellen

Die hAE Zellen wurden entweder von Spendern einer Lungentransplantation *post mortem* (Ethikzustimmung der Universität Duisburg-Essen 18-8024-BO and 19-8717-BO) oder aus explantierten Lungen (Ethikzustimmung der Medizinischen Hochschule Hannover 3346/2016) erhalten und für diese Arbeit isoliert und zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung und Differenzierung aus explantierten Lungen erfolgte wie von Hulda Jonsdottir und Ronald Dijkman beschrieben [101]. Die hAE Zellen von Lungenspendern wurden wie in der im Rahmen dieser Arbeit entstandenen Veröffentlichung isoliert und kultiviert [209]. Das Medium auf der basolateralen Seite wurde dreimal wöchentlich gewechselt.

4.2 Virusherstellung und Titerbestimmung

4.2.1 Herstellung von infektiösen HBV Partikeln

Zur Herstellung von infektiösen HBV Partikeln wurde die Zelllinie HepG2.117 verwendet, die stabil mit einem replikationskompetenten HBV Genom des Genotyps D (Serotyp ayw) transfiziert wurde [226]. Die Zellen wurden bis zur Konfluenz in Kulturmedium 1 kultiviert, passagiert und zu gleichen Teilen auf 3 neue Zellkulturflaschen aufgeteilt. Nach zwei Tagen, bzw. sobald die Zellen ca. 70-80 % konfluent waren, wurde das Medium durch Kulturmedium 2 ersetzt. Das DMSO im Medium führte hierbei zu einem Arrest in der G1-Phase bei konstanter Virionenproduktion. Nach 5-6 Tagen wurde das Medium gesammelt und bei -80°C eingefroren. Die Zellen wurden verworfen.

Sobald insgesamt mindestens ein Liter Zellkulturüberstand gesammelt wurde, wurde dieser bei 150 g für 10 min zentrifugiert und in ein sauberes Becherglas dekantiert. Mithilfe eines 45 µm Spritzenfilters wurde der Überstand sterilfiltriert. Anschließend wurden 6 % PEG 8000 zugegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Überstand bei 16.000 x g für 60 min bei 4°C zentrifugiert und mindestens 100-fach konzentriert in PBS mit 10 % FCS aufgenommen, aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

4.2.2 Bestimmung des HBV-Titers im Virusstock oder Zellüberständen

Die Bestimmung des viralen Titers erfolgte mittels PCR. Zu diesem Zweck wurden 100 µl des Virusstock oder von Zellkulturüberständen zur Isolation von DNA mit dem *NucleoSpin Tissue Mini Kit* nach dem Herstellerprotokoll für die Isolation viraler DNA aus Blutproben verwendet. Dafür wurden die 100 µl Virus mit einem gleichen Teil PBS vermischt. Es wurden 25 µl Proteinase K und 200 µl Buffer B3 zugegeben und die Probe gevortext. Anschließend erfolgte eine Inkubation für zunächst 5 min bei RT, dann für 26 min bei 70°C. Danach wurden 210 µl Ethanol (100 %) zugegeben und gemischt. Die Probe wurde auf eine *NucleoSpin Tissue* Säule pipettiert und bei 11.000 x g für 1 min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule erst mit 500 µl Buffer BW, dann mit 600 µl Buffer B5 gewaschen. Die Probe wurden dann erneut bei 11.000 x g für 1 min zentrifugiert um alle Pufferreste zu entfernen. Zum Eluieren wurden 50 µl Buffer BE, der zuvor auf 70°C vorgewärmt wurde, auf die Membran der Säule gegeben, für 1 min bei RT inkubiert und anschließend bei 11.000 x g für 1 min gefugt.

Im Anschluss wurden eine 1:10 und eine 1:50 Verdünnung des Eluats hergestellt. Mit 1 µl jeder Verdünnung als Template wurde in Triplikaten eine HBV-PCR durchgeführt und die Kopienanzahl/µl mithilfe des pSM2-Standardplasmids berechnet.

4.2.3 Bestimmung des HBsAg Titers in Zellkulturüberständen

Zur Messung von HBsAg in Zellkulturüberständen wurden die Zellen für 8 Tage infiziert, um einen ausreichenden Titer zur Quantifizierung sicherzustellen. Um sicherzustellen, dass im Laufe dieser Arbeit alle Proben gleich behandelt wurden, wurden alle Überstände einmal bei -80°C eingefroren. Nach dem Auftauen und Erwärmen der Proben auf Raumtemperatur, wurde das HBs-Antigen mittels *Hepatitis B surface antigen ELISA Kit* nach Herstellerprotokoll quantifiziert. Zur späteren Erstellung einer Standardkurve wurden durch 1:2 Verdünnung der beigefügten Positivkontrolle (8 ng/ml) mit PBS insgesamt 9 Verdünnungen hergestellt. Proben von PHH wurden ebenfalls 1:2 mit PBS verdünnt. Danach wurden 50 µl aller Proben sowie der Standardreihe und einer Negativkontrolle auf die ELISA-Platte pipettiert. Es wurden 50 µl Anti-HBs Peroxidase Solution zu jedem Well außer 2 Wells, die als Leerwert genutzt wurden, gegeben und für 80 min bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde die Platte 6x mit der beiliegenden Waschlösung gewaschen, trocken geklopft und 100 µl TMB Substrat (*TMB Substrate Solution A* und *TMB Substrate Solution B* zu gleichen Teilen gemischt) zugegeben. Es folgte eine Inkubation für 20-30 min im Dunkeln. Als die Negativkontrollen anfangen sich leicht bläulich zu färben, wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µl *Stop solution* (2 N H₂SO₄) gestoppt und die Absorption bei 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm mit dem Spark® 10M gemessen.

Die Auswertung erfolgte durch Berechnung einer Standardkurve und Kurvengleichung durch logistische Regression mit 4 Parametern (4PL) mit der Web-Anwendung „*Four Parameter Logistic (4PL) Curve Calculator*“ (AAT Bioquest). Die Absorptionswerte der Messproben abzüglich Leerwert wurden dort eingegeben, um mit der erzeugten Gleichung die HBs-Antigen-Konzentration zu berechnen.

4.2.4 Herstellung von infektiösen SARS-CoV-2 Partikeln

Das SARS-CoV-2 Virus, das in dieser Arbeit verwendet wurde, wurde wie von Christiane Silke Heilingloh und Adalbert Krawczyk beschrieben aus Patientenmaterial isoliert und zur Verfügung gestellt [81]. Zur Vermehrung wurden 2 x 10⁶ Vero E6 Zellen in einer T75 Zellkulturflasche ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit isoliertem Virus

infiziert und für 3 Tage bei 37°C inkubiert. Danach wurde der Zellüberstand gesammelt und Zellreste durch Zentrifugation bei 320 g für 15 min entfernt. Der Überstand wurde dann aliquotiert und bei -80°C gelagert.

4.2.5 Bestimmung des SARS-CoV-2 Titers mittels Endpunkt-Verdünnung

Vero E6 Zellen wurden mit einer Zellzahl von 1×10^4 Zellen/Well in 200 µl in einer 96-Well-Platte ausgesät und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde das Virus durch Zugabe von je 22 µl des Überstands zur ersten Reihe der Platte mit 6 Replikaten 1:10 verdünnt. Durch Mischen und wiederholtes Verdünnen wurden insgesamt 8 Verdünnungen angefertigt und die Zellen für 3 Tage bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde der Überstand abgesaugt und 100 µl Kristallviolett-Lösung zugegeben und für 5 min bei RT inkubiert. Die Kristallviolett-Lösung wurde abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und die Zahl der Wells mit intaktem oder beschädigtem Zellrasen bestimmt. Der TCID₅₀/ml (*engl. Tissue culture infectious dose 50*), also die Menge an Virus, bei der 50 % der Wells infiziert sind, wurde mit dem Spearman & Kärber Algorithmus berechnet [103, 221]. Die Anzahl an PFU/ml (*engl. Plaque forming units*), also die Anzahl an Viruspartikeln pro Volumenmenge, die in der Lage sind Plaques zu bilden, ergibt sich aus der Umrechnung $\text{PFU/ml} = 0,7 \times \text{TCID}_{50}/\text{ml}$.

4.3 Stimulationen und Infektionsversuche

4.3.1 Infektion von dHepaRG Zellen und primären humanen Hepatozyten mit HBV

Die Infektion wurde auf Basis des veröffentlichten Protokolls von Yi Ni und Stephan Urban durchgeführt [167].

Für die Infektion wurde zunächst ausreichend Infektionsmedium durch Zugabe von 40 % PEG 8000 Stocklösung und DMSO zum Kulturmedium angesetzt. Danach wurde ein Teil des Infektionsmediums für die nicht zu infizierenden Wells beiseitegestellt und zum restlichen Teil Virus in angegebener Menge zugegeben. Für dHepaRG Zellen wurden üblicherweise 500, für PHHs 250 geq/Zelle (*engl. Genome equivalents*), basierend auf der ursprünglich ausgesäten bzw. einer geschätzten Zellzahl für PHHs, zugegeben. Das Medium wurde von den Zellen abgenommen und anschließend Infektionsmedium mit oder ohne Virus zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden anschließend 20 – 24 h inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Inokulum abgenommen und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurde zur weiteren Kultivierung Differenzierungsmedium

für dHepaRG Zellen bzw. Kulturmedium für PHHs verwendet, welches dreimal wöchentlich gewechselt wurde.

Die Stimulation mit IFN erfolgte bei Infektionsversuchen stets wie in den Abbildungsbeschriftungen angegeben durch Zugabe von IFN nach der Zugabe von frischem Medium.

4.3.2 Stimulation von PHHs mit HBV und Poly I:C zur Induktion von IFN

Zur Stimulation von PHHs mit HBV in 12-Well-Platten wurde wie für die Infektion (siehe Kapitel 3.3.1) beschrieben Infektionsmedium zu den Zellen gegeben. Für die Stimulation mit HBV wurde Virus mit einer Menge von 250 geq/well zu den Zellen gegeben. Als Kontrolle für die IFN-Induktion wurde der TLR3-Ligand Poly I:C (HMW) in einer Konzentration von 10 µg/ml hinzu pipettiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde der Überstand der Zellen gesammelt und bei -80°C eingefroren. Danach wurden 250 µl DNA/RNA Shield zugegeben und für 2-3 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Lysate gesammelt und ebenfalls bei -80°C gelagert.

4.3.3 Infektion von humanen hAE Zellen mit SARS-CoV-2

Vollständig differenzierte hAE Zellen wurden vor der Infektion für 10 min mit HBSS apikal gewaschen. Dann wurden die Zellen apikal mit 30.000 PFU verdünnt in HBSS infiziert. Die Zellen wurden mit dem Inokulum bei 33°C für 1 h inkubiert. Anschließend wurde das Inokulum abgenommen und die Zellen dreimal apikal mit 150 µl HBSS für 10 min gewaschen. Die letzte Waschung wurde gesammelt und bei -80°C als Zeitpunkt t = 0 gelagert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen apikal für 10 min mit HBSS gewaschen, die Waschungen gesammelt und mittels Endpunkt-Verdünnung die Virustiter bestimmt.

Die Behandlung mit IFN α und Remdesivir erfolgte durch Zugabe direkt ins Zellkulturmedium auf der basolateralen Seite der Zellen.

4.3.4 Stimulation von Calu-3 Zellen mit (UV-inaktiviertem) SARS-CoV-2 und Poly I:C zur Induktion von IFN

Zur Stimulation von Calu-3 Zellen mit SARS-CoV-2 wurden 45cm² konfluente Zellen in eine 24-Well-Platte mit 1 ml Medium/Well ausgesät und für 2 Tage bei 37°C inkubiert. Dann wurden zunächst zwei Aliquots SARS-CoV-2 aufgetaut und ein Aliquot für etwa 10 min unter die Herolab UV-6 S/M bei einer kombinierten Wellenlänge von 254 und 312 nm

gelegt, um das Virus zu inaktivieren. Anschließend wurde das Medium von den Zellen genommen und 500 µl Medium mit 350 PFU/ml SARS-CoV-2 oder UV-inaktiviertem SARS-CoV-2 zugegeben. Als Kontrolle für die IFN-Induktion wurde der TLR3-Ligand Poly I:C (HMW) in einer Konzentration von 10 µg/ml hinzu pipettiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde der Überstand der Zellen gesammelt und bei -80°C eingefroren. Danach wurden 200 µl Buffer RLT mit 0,1 % β-Mercaptoethanol zugegeben und für 2-3 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Lysate gesammelt und ebenfalls bei -80°C gelagert.

4.3.5 *In-cell* ELISA (icELISA)

Der *in-cell* (ic) ELISA wurde auf Grundlage des von Lara Schoeler, Vu Thuy Khanh Le-Trilling und Mirko Trilling veröffentlichten Protokolls durchgeführt [206].

2 x 10⁴ Vero E6 Zellen/Well in 100 µl wurden in einer 96-Well-Platte ausgesät. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde das Medium abgenommen und (seriell verdünnte) IFNα Subtypen oder Remdesivir und Virus mit einer Endkonzentration von 350 PFU/ml in 100 µl Gesamtvolumen zugegeben. Die Zellen wurden nach der Infektion für 24 h inkubiert. Danach wurden 100 µl 8 % ROTI®Histofix zugegeben und für mindestens 2 h bei RT inkubiert, um die Zellen zu fixieren und das Virus zu inaktivieren, damit weitere Arbeiten außerhalb des S3**-Labors durchgeführt werden konnten. Im Anschluss wurde die Platte dreimal mit PBS gewaschen und 200 µl Permeabilisierung-Puffer für 30 min bei RT zu jedem Well gegeben. Danach wurde der Puffer abgenommen und 200 µl Blockierung-Puffer für 1 h zugegeben. Nach dem Abnehmen des Puffers wurden 50 µl Antikörper-Lösung mit anti-SARS-CoV-2-NP (0,2 µg/µl) Primärantikörper zugegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Platte dreimal mit Wasch-Puffer gewaschen und 50 µl Antikörper-Lösung mit Peroxidase-AffiniPure Goat 648 Anti-Mouse IgG (H+L) (0,5 µg/µl) für 2 h bei RT zugegeben. Die Platte wurde erneut 4x mit Wasch-Puffer gewaschen und trocken geklopft. Es wurden 100 µl TMB Substrat zugegeben und für ca. 20 min im Dunkeln bei RT inkubiert bis die Negativkontrollen anfangen sich leicht bläulich zu färben. Die Reaktion wurde dann durch Zugabe von 100 µl 2N H₂SO₄ abgestoppt und die Absorption bei 450 nm mit einer Referenzwellenlänge von 620 nm mit dem Tecan Spark® gemessen.

4.3.6 Fluoreszenzmikroskopische Färbung von SARS-CoV-2 infizierten Zellen Vero E6 Zellen

Zunächst wurden für die Fluoreszenzmikroskopie alle Schritte entsprechend des Protokolls für den icELISA bis zur Inkubation mit dem Primärantikörper durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit Wasch-Puffer gewaschen und 50 µl Antikörper-Lösung mit Ziege IgG anti-Maus IgG (H+L)-Alexa Fluor 488 (0,5 µg/µl) und Phalloidin CF647 (2 U/ml) für 2 h bei RT zugegeben. Danach wurden die Zellen dreimal mit Wasch-Puffer gewaschen und 50 µl DAPI (0,5 µg/ml) in PBS zugegeben und für 20 min bei RT inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und bedeckt. Die Mikroskopie fand am Leica *THUNDER Imager 3D Cell Culture* statt.

4.4 Quantifizierung von DNA und RNA

4.4.1 Isolation von RNA aus Zelllysaten

Zur Isolation von RNA aus Zelllysaten wurde das *Quick-RNA Miniprep Kit* nach Herstellerprotokoll verwendet. Für Proben, die mit Buffer RLT lysiert wurden, wurden die Lysate vor der Isolation nochmals 1:1 mit dem RNA Lysis Buffer aus dem Kit gemischt. Die Lysate wurden zunächst auf einen *Spin-Away* Filter gegeben und für 30 s bei 16.000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde mit einem gleichen Teil Ethanol (100 %) gut gemischt, auf eine *Zymo-Spin III CG Column* gegeben und es wurde erneut zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Probe mit 400 µl *RNA Wash Buffer* gewaschen. Anschließend wurden 75 µl *DNA Digestion Buffer* mit 5 µl DNase I (1 U/µl) gemischt und direkt auf die Säule gegeben. Die Probe wurde so für 30 min bei RT inkubiert, um genomische DNA in der Probe weitestgehend zu verdauen. Danach wurden 400 µl *RNA Prep Buffer* zugegeben, zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Dann wurde mit 700 µl *RNA Wash Buffer* gewaschen und darauffolgend mit 400 µl *RNA Wash Buffer*. Es wurde für 1 min zentrifugiert, um den Waschpuffer komplett aus der Säule zu entfernen. Zuletzt wurden 50 µl DNase/RNase-freies Wasser auf die Säule gegeben, für eine Minute inkubiert und dann zentrifugiert, um die Probe zu eluieren. Die RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

4.4.2 Synthese von cDNA aus RNA

Die Synthese von cDNA erfolgte mit dem *HiScript II Q RT SuperMix for qPCR* nach Herstellerprotokoll. Pro Probe wurden 4 µl 5 x *HiScript II qRT SuperMix* und 16 µl RNA

zusammengemischt. Anschließend wurden die Proben zunächst bei 25°C für 10 min, dann bei 50°C für 30 min und zuletzt bei 85°C für 5 min inkubiert.

4.4.3 Relative Quantifizierung von mRNA mittels qPCR

Zur relativen Quantifizierung von mRNA wurden Luna® Universal qPCR Master Mix und der qTower2.0 verwendet. Die PCR wurde entsprechend des jeweiligen Protokolls mit spezifischen Primern durchgeführt (siehe Kapitel 3.4.4). Die Messung erfolgte in Duplikaten. Anschließend erfolgte die Auswertung mit der Software qPCRsoft 4.1. Die Schmelzkurven wurden auf Spezifität überprüft. Die relative Quantifizierung erfolgte mit der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode mit Normalisierung auf das Haushaltsgen *GAPDH*. Alle Proben und Kontrollen, die verglichen wurden, liefen jeweils auf der gleichen Platte, um Variation in der Effizienz auszuschließen.

4.4.4 PCR-Protokolle

Die PCRs wurden jeweils in einem Volumen von 20 μl angesetzt. Folgender Mix wurde als Grundlage verwendet:

2 x Luna® Universal qPCR Master Mix	10 μl
Primer vorwärts	siehe Primerliste
Primer rückwärts	siehe Primerliste
Template	1 μl
RNase/DNase-freies Wasser	auf 20 μl auffüllen

IFNA-PCR/IFNB-PCR:

95°C 2 min
 95°C 15 s
 58°C 1 min
 94°C 15 s
 Schmelzkurve 65°C – 94°C

HBV-PCR:

95°C 2 min
 95°C 15 s
 60°C 30 s
 72°C 10 s
 Schmelzkurve 65°C – 94°C

ISG-PCR:

95°C 2 min
 95°C 15 s
 60°C 1 min
 Schmelzkurve 65°C – 94°C

GAPDH-PCR:

95°C 2 min
 95°C 15 s
 60°C 1 min
 Schmelzkurve 65°C – 94°C

4.5 Interferone

4.5.1 Herstellung von IFN α -Mutanten mittels *site-directed mutagenesis*

Alle Plasmide zur Herstellung von IFN α -Mutanten wurden durch Vu Thuy Khanh Le-Trilling (UK Essen) hergestellt und zur Verfügung gestellt. Die *site-directed mutagenesis* wurde mit dem *QuikChange II Kit* nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Alle Plasmide wurden durch Sequenzierung der kodierenden Sequenz validiert.

4.5.2 Herstellung von rekombinatem IFN

Die rekombinanten IFN wurden nach dem Protokoll von Jacob Piehler und Gideon Schreiber hergestellt [181]. Kurz, die rekombinanten IFN wurden in *Escherichia coli* nach M13-Phagen-Transduktion exprimiert. Zur Ernte der Proteine wurden die Bakterien pelletiert und die Inklusionskörper, die die Proteine enthalten, wurden durch Ultraschall denaturiert, in 6 M Guanidinhydrochlorid gelöst und in Arginin gefaltet. Die rekombinanten Proteine wurden durch Ionenaustauscher-Chromatographie und Größenausschluss-Chromatographie aufgereinigt. Spezifität und Reinheit wurden jeweils durch ein Natriumdodecylsulfat (SDS)-Gel validiert. Durch Phasentrennung der Produkte mit Triton X-114 wurde verbleibendes Endotoxin entfernt. Die Endotoxinlevel wurden mit dem ToxinSensor semiquantitativ bestimmt und liegen unter 0,25 EU/ml. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte mit seriellen Verdünnungsreihen wie im folgenden Abschnitt beschrieben. Dazu wurden die Konzentrationen der rekombinanten IFN basierend auf den kommerziell erhältlichen IFN von PBL bestimmt.

4.5.3 Semiquantitative Bestimmung von IFN in Zellkulturüberständen

Die semiquantitative Konzentrationsbestimmung in Zellkulturüberständen erfolgte mithilfe der ISRE-luc Reporterzelllinie. Dazu wurden 2×10^5 Zellen/Well in 500 μ l in den 24 inneren Wells einer 48-Well-Platte ausgesät. Die äußeren Wells wurden mit der gleichen Menge PBS aufgefüllt und die Zellen über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellüberstände auf RT erwärmt und je 50 μ l pro Probe in ein Well ISRE-luc Zellen pipettiert. Anschließend wurden die Zellen geschwenkt und für 4,5 h inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Medium abgenommen und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Dann wurden 100 μ l Lysis-Juice zu jedem Well gegeben und für 15 min unter konstantem Schütteln inkubiert. Danach wurden die Lysate bei -20°C eingefroren.

Zur Messung wurden die Lysate aufgetaut, auf RT erwärmt und je 20 μ l in eine weiße 96-Well-LumiNunc-Platte pipettiert. Die Platte wurde in den Tecan Spark® eingelegt und

mittels Injektor 100 μ l *Beetle Juice* für Firefly Luciferase zugefügt und die Chemilumineszenz im Wellenlängenbereich 565 nm bis 650 nm gemessen.

4.6 Transkriptom- und Proteomanalysen

4.6.1 Vorbereitung der Proben zur Proteomanalyse

Die Zellen wurden zunächst mit eiskaltem PBS gewaschen und in Urea-Puffer aufgenommen. Dann wurden die Zellen für 15 min bei 16.100 x g bei 4 °C zentrifugiert und die Überstände wie beschrieben zur Bestimmung der Viruslast weiterverwendet. Der Trypsinverdau wurde mit 20 μ l Zelllysate durchgeführt. Durch die Zugabe von 5 mM DTT für 15 min bei 50°C wurden die Disulfidbrücken reduziert und durch Zugabe von 15 mM IAA für 15 min im Dunkeln wurden Thiole alkalisiert. Hydrophile und hydrophobe *Cytiva Sera-Mag Carboxyl-Magnet-Beads* wurden 1:1 gemischt und 2 μ l der *Beads* (25 μ g/ μ l) wurden zu der Probe gegeben. Die Proben wurden auf 70 % ACN aufgefüllt und für 15 min inkubiert, um sicherzustellen, dass die Proteine an die *Beads* binden. Anschließend wurden die *Beads* erst zweimal mit Ethanol (70 %) gewaschen und danach einmal mit ACN (100 %). Die *Beads* wurden in 100 mM Ammoniumhydrogencarbonat mit 0,2 μ g Trypsin resuspendiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Peptide wurden in ein neues Gefäß überführt, vakuumgetrocknet und in Trifluoressigsäure (0,1 %) aufgenommen.

4.6.2 Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS-Analyse)

400 ng der tryptischen Peptide pro Probe wurden mit dem Ultimate 3000 RSLCnano HPLC verbunden mit einem Q Exactive HF Orbitrap analysiert. Die Proben wurden auf einer C18 *trap* Säule in 7 min mit einer Flussrate von 30 μ l/min mit Trifluoressigsäure (0,1 %) aufkonzentriert und anschließend auf eine Nano Viper C18 Analysensäule übertragen. Die Peptidtrennung erfolgte über einen Gradienten von 5 % bis 30 % des Solvent B über 120 min mit 400 nl/min. Die Massenspektren wurden im Profilmodus bei einer Auflösung von 70.000 bei 400 m/z in einem Massebereich von 350 m/z bis 1.400 m/z . Die zehn am stärksten abundanten Peptid-Ionen wurden durch kollisionsinduzierte Dissoziation (normalisierte Kollisionsenergie = 27) fragmentiert und MS/MS-Spektren wurden bei einer Auflösung von 35.000 aufgenommen.

4.6.3 Analyse der Proteomdaten

Die Peptid-Identifikation und –Quantifikation wurde mit MaxQuant und *UniProtKB/SwissProt (2020_05, 563,552 entries)* für *Homo sapiens* oder *Homo sapiens* und SARS-CoV-2 durchgeführt. Es wurden die Standardsuchparameter verwendet, *label*-freie Quantifizierung wurde für die Spitzen-Quantifizierung verwendet und Normalisierung wurde erlaubt. Peptide wurden unabhängig von Modifikationen für die Quantifizierung berücksichtigt. Treffer zwischen Läufen wurden nur für humane Proteine berücksichtigt. Die statistische Auswertung wurde mit der R-Software durchgeführt. Unterschiede zwischen den experimentellen Gruppen wurden mit t-Tests (gepaart, zweiseitig) ermittelt und Proteine, die in mindestens drei von vier Donoren pro Gruppe mit mindestens zwei einzigartigen Peptiden und eine P-Wert von mindestens 0,05 sowie einem Verhältnis der Abundanz im Mittel von mindestens 1,5 oder höchstens 0,67 wurden als statistisch signifikant angesehen. Proteine, die nur ein einer Gruppe, aber nicht in den anderen Gruppen detektiert wurden, wurden als *on-off*-reguliert definiert. GO-Annotationen und Anreicherungs-Analysen wurden mit STRING durchgeführt. Die Daten wurden mit R und Cytoscape visualisiert.

4.6.4 Transkriptom-Quantifizierung

Qualität und Integrität der RNA wurde auf dem 5200 Fragment Analyzer System kontrolliert. Die *RNA Sequenzierungs-Library* wurde aus 50 ng Gesamt-RNA mit *NEBNext Single Cell/Low Input RNA Library* nach Herstellerprotokoll generiert. Die *Libraries* wurden mit dem *Illumina Free Adapter Blocking* behandelt und auf dem Illumina NovaSeq 6000 mit dem NovaSeq 6000 S1 Reagent Kit (100 Zyklen, *paired end run 2 x 50 bp*) mit durchschnittlich 3×10^7 *reads* pro RNA-Probe.

4.6.5 Analyse der Transkriptomdaten

Die FASTQ-Dateien der RNA-Sequenzierung wurde in die Array Studio Softwarepaket v10.2.5.9 von QIAGEN zur weiteren Analyse geladen. Alle FASTQ-Dateien wurden an das Genmodell Ensembl v96 und die Referenzdatenbank Human B38 mit OmicSoft Aligner OSA aligniert. Differentielle Genexpression jeder Kondition wurde mit DESeq2 ermittelt. DEGs wurden mittels QIAGEN Ingenuity Pathway Analysis (IPA) analysiert mit Grenzwerten des P-Werts von $< 0,05$, Vervielfachung $> |1,5|$, und mindestens 5 Treffern. Die Statistik der IPA beruht auf zwei Faktoren. Ein P-Wert, der von einem rechtsseitigen exakten Test nach Fisher abgeleitet ist, bestimmt die Wahrscheinlichkeit, dass die

Assoziation zwischen einer Funktion oder Signalweg und einem Satz an Molekülen zufällig sein könnte, aber berücksichtigt keine Richtungswechsel (hoch- oder runterreguliert). Dieser wird jedoch für eine Krankheit oder eine Funktion, einen kanonischen Signalweg oder einen übergeordneten Regulator durch den *activation z-score algorithm* vorhergesagt. Der *z-score* beschreibt eine Methode zur Normalisierung der Expression der Transkripte, bei der die mittlere Expression durch die Standardabweichung nach oben und unten geteilt wird. Ein *z-score* > 2 wurde als signifikant erhöht, ein *z-score* < -2 als signifikant erniedrigt angesehen. Es wurde eine Expressionsanalyse durchgeführt, um Veränderungen im Transkriptom für kanonische Signalwege für jedes IFN gegenüber der unstimulierten Kontrolle zu ermitteln.

5 Ergebnisse

5.1 Induktion von Typ-I-IFN

Für eine effektive Immunabwehr gegen Pathogene durch das angeborene Immunsystem, ist es unerlässlich, dass die Pathogene effizient erkannt und in der Folge Typ-I-IFN induziert werden. Zentrale Komponenten dieses Erkennungsmechanismus sind die PRRs, zu denen die TLRs sowie RIG-I und MDA5 gehören. Diese Rezeptoren sind in der Lage, hochkonservierte Moleküle der Pathogene zu erkennen und die IFN-Expression zu induzieren (siehe Kapitel 1.1.2). Da zahlreiche Viren, einschließlich HBV und SARS-CoV-2, Strategien zur Evasion dieser Erkennungsmechanismen entwickelt haben, soll in diesem Kapitel untersucht werden, inwieweit Typ-I-IFN durch diese beiden Viren induziert werden. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Zelllinien und Primärzellen mit Virus oder dem TLR3-Liganden Poly I:C als Positivkontrolle stimuliert. Die Überstände der Zellen wurden mittels einer ISRE-luc-Reporterzelllinie auf Typ-I-IFN-Produktion untersucht, die Zellen selbst wurden lysiert und die *IFNA*- und *IFNB*-Genexpression mittels qPCR analysiert.

5.1.1 IFN-Induktion durch HBV

Für lange Zeit wurde HBV als so genanntes *stealth virus* bezeichnet, da man davon ausging, dass das Virus in der Lage ist, unerkannt vom Immunsystem eine Infektion zu etablieren [262]. Neuere Studien zeigen jedoch, dass HBV in der frühen Infektionsphase durch TLR2 erkannt werden kann und es zu einer IFN-unabhängigen Inhibition der viralen Replikation kommt [278]. Um diesen kontrovers diskutierten Aspekt zu untersuchen, wurden differenzierte HepaRG Zellen und PHHs für 4 h – 48 h mit HBV infiziert. Anschließend wurden die Überstände mittels Reporterzelllinie auf IFN bzw. die Zelllysate mittels qPCR auf IFN-mRNA untersucht.

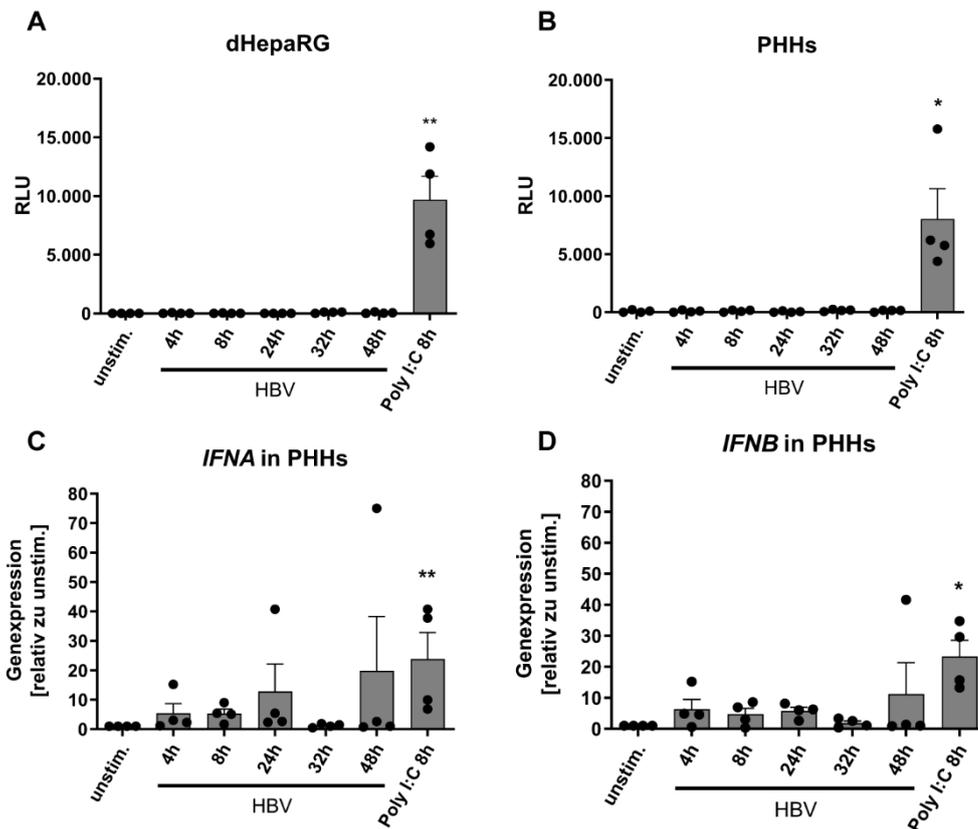


Abbildung 11: Induktion von Typ-I-IFN durch Stimulation mit HBV.

Differenzierte HepaRG Zellen und PHHs wurden mit 500 geq/Zelle bzw. 250 geq/Zelle HBV oder 10 ng/ml Poly I:C stimuliert. Die Zellüberstände wurden zu den angegebenen Zeitpunkten gesammelt und auf ISRE-luc-Reporterzellen gegeben, um die Menge an Typ-I-IFN zu bestimmen (A und B). Die zelluläre RNA wurde aus PHHs isoliert und die Genexpression von *IFNA* (alle Subtypen) und *IFNB* mittels qPCR bestimmt. Die Expression wurde auf das Haushaltsgen *GAPDH* normalisiert und die relative Expression gegenüber einer unstimulierten Kontrolle mit der $\Delta\Delta CT$ -Methode errechnet (C und D). $n = 4$. Gezeigt wird der Mittelwert mit Standardfehler. Statistik: HBV- bzw. Poly I:C-stimulierte Proben getestet gegen unstimulierte Kontrolle mittels Kruskal-Wallis- (A) bzw. Friedman-Test (B – D) mit *Dunn's Multiple Comparison*. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Für die Stimulation mit HBV konnte weder in differenzierten HepaRG Zellen, noch in PHHs sekretierte Typ-I-IFN in den Zellüberständen mittels ISRE-luc-Reporterzelllinie nachgewiesen werden (Abb. 11A und 11B). Die Proben, die mit Poly I:C stimuliert wurden, zeigten allerdings in beiden Zelltypen eine signifikante Induktion von Typ-I-IFN und belegen damit die Funktionalität des Versuchsaufbaus. Auf mRNA-Level in PHHs konnte ebenfalls eine signifikante Induktion der Genexpression sowohl für *IFNA* als auch für *IFNB* nur für die Poly I:C-stimulierten Proben nachgewiesen werden (Abb. 11C und 11D). Für *IFNA* wies ein Donor bei 4 h, 24 h und 48 h zwar eine erhöhte Genexpression auf, diese ist aufgrund der geringen Genexpression der anderen drei Donoren allerdings nicht statistisch relevant (Abb. 11C). Gleiches gilt für die Expression von *IFNB*, wo lediglich ein Donor für 4 h und 48 h eine erhöhte Genexpression zeigte (Abb. 11D).

Insgesamt konnte durch HBV-Stimulation weder auf Proteinlevel, noch auf mRNA-Level eine signifikante Induktion von Typ-I-IFN nachgewiesen werden.

5.1.2 IFN-Induktion durch SARS-CoV-2

Während die saisonalen Coronaviren zur Induktion relativ hoher Mengen IFN führen, weiß man, dass SARS-CoV-1 und SARS-CoV-2 durch zahlreiche Evasionsmechanismen dieser Induktion entgegenwirken und kaum Typ-I-IFN-Induktion nach der Infektion zu messen ist. Allerdings ist auch beschrieben, dass grundsätzlich TLR3, TLR7, TLR8 und RIG-I sowie MDA5 in der Lage sind SARS-CoV-2 zu erkennen [108, 177, 194]. Wie wichtig jedoch die Induktion und Funktion von IFN ist, zeigt die hohe Suszeptibilität von SARS-CoV-2 gegenüber einer Stimulation mit Typ-I-IFN und Studien, bei denen eine signifikant erhöhte Anzahl schwer erkrankter Patienten Autoantikörper gegen Typ-I-IFN aufwies [14, 134]. Aus diesem Grund wurden Calu-3 Zellen, die ein gutes Modell für Lungenzellen darstellen und Typ-I-IFN produzieren können, für einen Zeitraum von 4 h – 48 h mit SARS-CoV-2 stimuliert. Die Überstände wurden mit einer Reporterzelllinie auf Typ-I-IFN untersucht. Um zu untersuchen, inwieweit sich die Evasionsmechanismen auf die Typ-I-IFN-Induktion auswirken, wurde der Versuch ebenfalls mit UV-inaktiviertem Virus durchgeführt. Die Inaktivierung des Virus wurde mit einer Endpunkt-Verdünnung auf Vero E6 Zellen validiert.

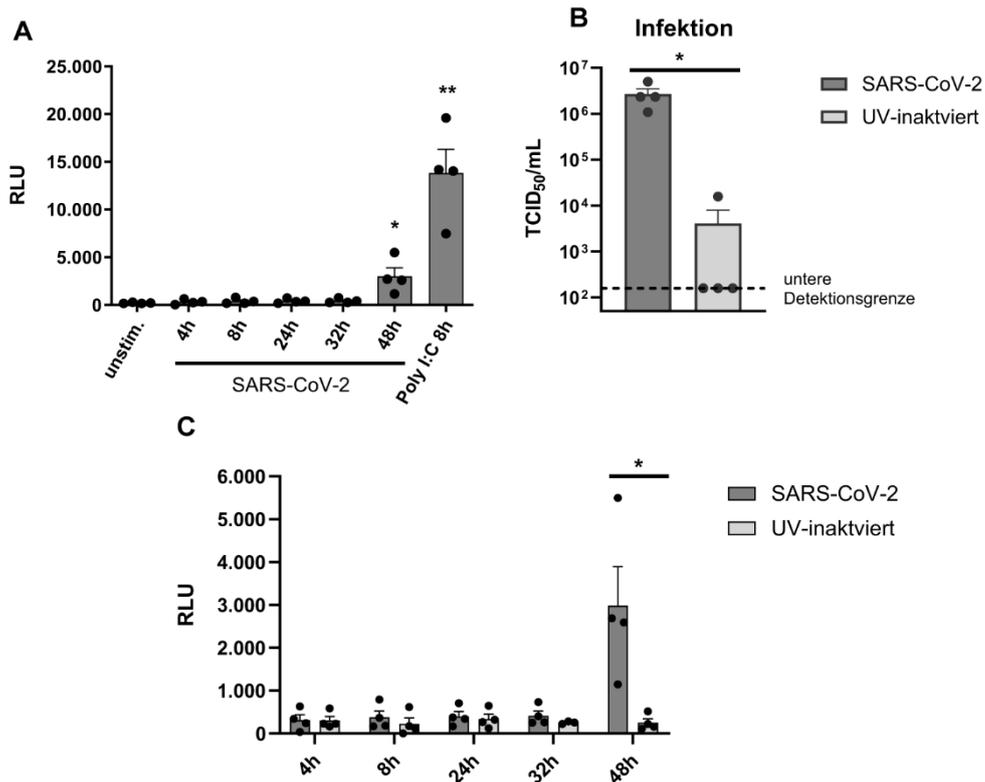


Abbildung 12: Induktion von Typ-I-IFN durch Stimulation mit SARS-CoV-2.

Calu-3 Zellen wurden mit 350 PFU/ml SARS-CoV-2, UV-inaktiviertem SARS-CoV-2 oder 10 ng/ml Poly I:C stimuliert. Die Zellüberstände wurden zu den angegebenen Zeitpunkten gesammelt und auf ISRE-luc-Reporterzellen gegeben, um die Menge an Typ-I-IFN zu bestimmen. Die mit SARS-CoV-2- bzw. Poly I:C-stimulierten Proben sind im Vergleich dargestellt (A). Die Infektiosität von SARS-CoV-2 und UV-inaktiviertem Virus wurde mittels Endpunkt-Verdünnung in Vero E6 Zellen bestimmt (B). Die Induktion von Typ-I-IFN durch SARS-CoV-2 und durch UV-inaktiviertes Virus im Vergleich (C). $n = 4$. Gezeigt wird der Mittelwert mit Standardfehler. Statistik: A: SARS-CoV-2- bzw. Poly I:C-stimulierte Proben getestet gegen unstimulierte Kontrolle mittels Kruskal-Wallis-Test mit *Dunn's Multiple Comparison*; B und C: UV-inaktivierte Probe getestet gegen entsprechende SARS-CoV-2 Probe mittels Mann-Whitney-Test. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Die Stimulation von Calu-3 Zellen mit SARS-CoV-2 führte für die Zeitpunkte von 4 h – 32 h zu keiner messbaren Induktion von Typ-I-IFN in den Zellüberständen mittels ISRE-luc-Reporterzelllinie. Jedoch konnte 48 h nach der Stimulation eine signifikant erhöhte Menge Typ-I-IFN in den Überständen gemessen werden und auch die Poly I:C-stimulierte Kontrollprobe führte zu einer signifikanten Sekretion von IFN in den Überstand (Abb. 12A). Um den möglichen Effekt von Evasionsmechanismen auf die IFN-Induktion zu untersuchen, wurde SARS-CoV-2 UV-inaktiviert. Ein Vergleich von SARS-CoV-2 und UV-inaktiviertem SARS-CoV-2 auf Vero E6 Zellen zeigte, dass die Infektiosität durch die UV-Inaktivierung signifikant reduziert wurde, bei drei von vier Proben bis unter die Detektionsgrenze (Abb. 12B). In Bezug auf die Typ-I-IFN-Induktion zeigte sich, dass auch die Stimulation mit UV-inaktiviertem Virus für die Zeitpunkte 4 h – 32 h zu keiner messbaren Induktion führte. Entgegen der Erwartung konnte für den Zeitpunkt 48 h sogar

eine signifikante Reduktion der Typ-I-IFN-Induktion im Vergleich zu replikationsfähigem SARS-CoV-2 beobachtet werden (Abb. 12C).

5.2 Der antivirale Effekt von IFN α -Subtypen

Der antivirale Effekt von IFN α im Allgemeinen ist bekannt und auch relativ gut erforscht. Während IFN α für eine chronische HBV-Infektion sogar in der Klinik Anwendung findet, wurde auch für SARS-CoV-2 gezeigt, dass IFN α in der Lage ist, die Replikation des Virus stark zu inhibieren [134, 272]. Allerdings findet bei Untersuchungen und Experimenten oft nur IFN α 2 Beachtung, da dies der einzige Subtyp ist, der klinisch zugelassen ist. Jedoch konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass andere IFN α -Subtypen in diversen Virusinfektionen bessere antivirale Aktivitäten besitzen [37, 115, 119]. Daher soll in diesem Kapitel der Effekt aller zwölf humanen IFN α -Subtypen auf HBV und SARS-CoV-2 untersucht werden. Zudem soll die ISG-Expression nach Stimulation mit verschiedenen IFN α -Subtypen virusspezifisch analysiert werden. Auch die Verbesserung des antiviralen Effekts durch Kombination mit anderen Wirkstoffen bzw. Zytokinen soll näher untersucht werden.

5.2.1 Der antivirale Effekt von IFN α -Subtypen auf HBV

Im Zusammenhang mit HBV kommt IFN α eine besondere Bedeutung zu, denn bis heute gibt es keine andere Therapie, bei der das virale Reservoir in der Wirtszelle, die cccDNA vollständig entfernt werden kann [272]. Aufgrund der erheblichen Nebenwirkungen und des geringen Behandlungserfolgs von nur 20-30 %, werden häufig NAs als Therapie vorgezogen [51]. Da die NAs allerdings zu keiner vollständigen Heilung von HBV führen können, ist IFN α immer noch von großem Interesse für die Forschung. Eine neuere Studie hat dabei den Effekt aller humanen IFN α -Subtypen untersucht und gezeigt, dass andere Subtypen wie IFN α 6 und IFN α 14 die Replikation des Virus effizienter inhibieren können als IFN α 2 [37]. Aufgrund des Umstandes, dass allerdings ansonsten kaum Daten über andere IFN α -Subtypen in humanen Zellen in Bezug auf HBV publiziert sind, soll in diesem Abschnitt zunächst der antivirale Effekt aller Subtypen gegen HBV untersucht werden. Dazu wurden PHHs aus Leberresektaten von Patienten isoliert und mit 250 geq/Zelle HBV infiziert. Die Zellen wurden mit einer seriellen Verdünnungsreihe der verschiedenen IFN α -Subtypen wiederholt stimuliert. Acht Tage nach der Infektion wurden die Zellüberstände gesammelt und die Menge an HBsAg mit einem ELISA bestimmt.

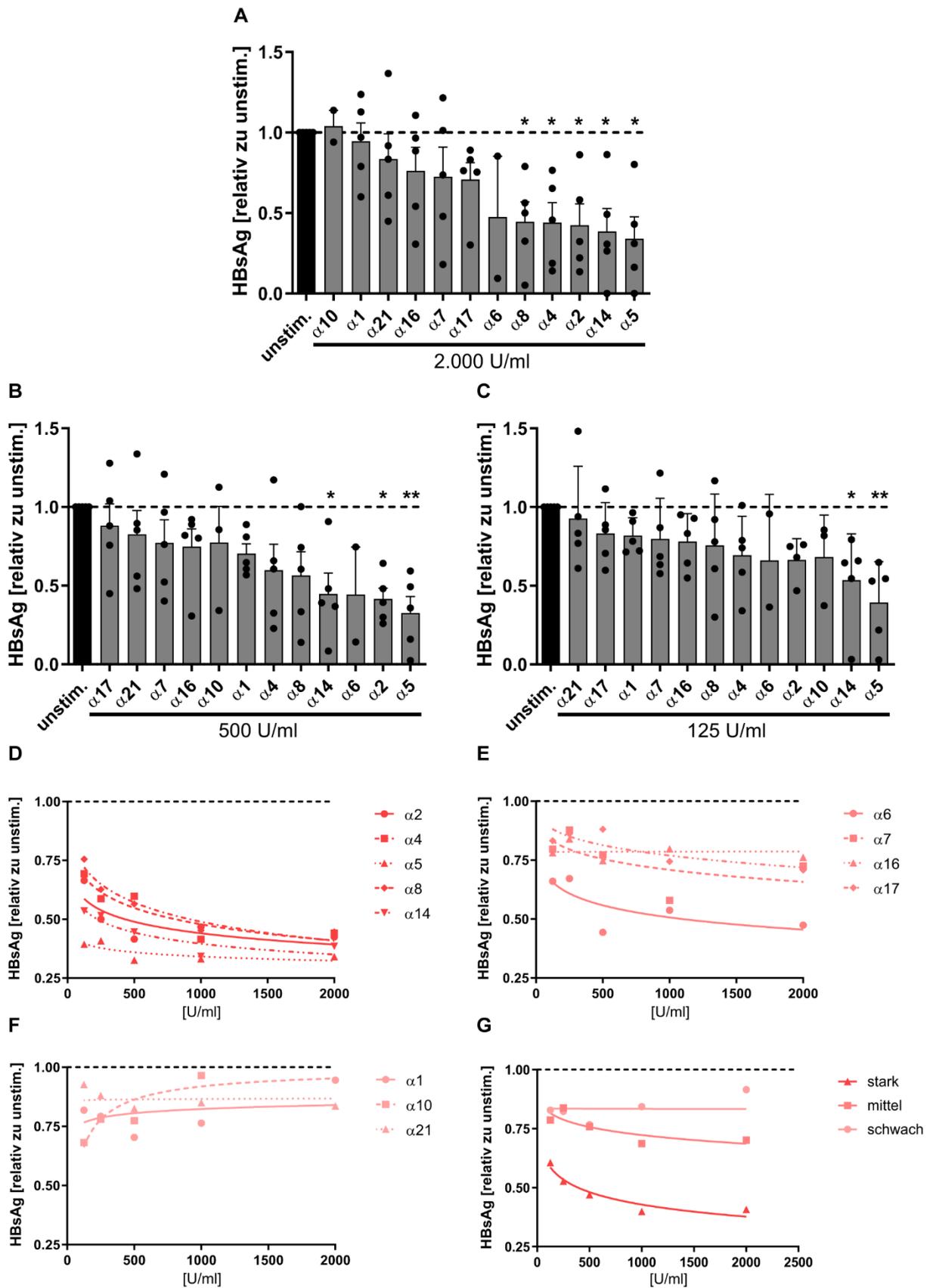


Abbildung 13: Der Effekt von IFN α -Subtypen auf die Replikation von HBV in PHHs.

PHHs wurden isoliert und mit ca. 250 geq/Zelle infiziert. Parallel zur Infektion sowie an den Tagen 1, 4 und 6 nach Infektion wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen der IFN α -Subtypen stimuliert. An Tag 8 wurden die Überstände zur Bestimmung der HBsAg-Titer gesammelt. Der antivirale Effekt der hohen

(2.000 U/ml), mittleren (500 U/ml) und niedrigen (125 U/ml) IFN-Konzentrationen sind im direkten Vergleich dargestellt (**A – C**). Die IFN α Subtypen wurden anhand ihres Effekts bei der höchsten Konzentration aufgeteilt und die einzelnen Subtypen (**D**: stark antivirale Subtypen; **E**: mittel antivirale Subtypen; **F**: schwach antivirale Subtypen) im Verlauf dargestellt. Der Verlauf der verschiedenen Gruppen wird im Mittel abgebildet (**G**). Die Kurven zeigen eine nichtlineare Regression der tatsächlichen Werte, die abgebildeten Punkte zeigen die Mittelwerte. n = 5; IFN α 2 (125 U/ml) n = 4; IFN α 6 n = 2; IFN α 10 n = 3, IFN α 10 (2.000 U/ml) n = 2. A – C: Mittelwert mit Standardfehler. Statistik: IFN α -Subtypen getestet gegen unstimulierte Kontrolle mittels *Ordinary one-way ANOVA* mit Dunnett's Test. *p < 0,05; **p < 0,01.

Die relativen HBsAg-Titer im Vergleich zur unstimulierten Kontrollprobe zeigten deutliche Unterschiede zwischen den IFN α -Subtypen. Für die hohe, mittlere und niedrige IFN-Konzentration in der seriellen Verdünnungsreihe konnte jeweils eine signifikante Reduktion der HBsAg-Titer für IFN α 5 und IFN α 14 gemessen werden, wobei IFN α 5 für alle drei Konzentrationen die stärkste Reduktion mit über 50 % aufwies (Abb. **13A – C**). Für die hohe IFN-Konzentration von 2.000 U/ml konnten auch die Subtypen IFN α 2, IFN α 4 und IFN α 8 zu einer signifikanten Reduktion an HBsAg führen. Bei der mittleren Konzentration, 500 U/ml, ergab sich von diesen Subtypen nur noch für IFN α 2 ein statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrollprobe (Abb. **13A** und **13B**). Die anderen Subtypen zeigten teilweise die Tendenz einer Reduktion, dies war aber nicht statistisch signifikant, was auch auf die Varianz zwischen den verschiedenen Donoren zurückzuführen ist. Entsprechend ihres antiviralen Effekts bei der höchsten IFN-Konzentration wurden die Subtypen in drei Gruppen unterteilt, um deren Verlauf für alle Konzentrationen der Verdünnungsreihe darzustellen (Abb. **13D – F**; stark antiviral: IFN α 2, IFN α 4, IFN α 5, IFN α 8, IFN α 14; mittel antiviral: IFN α 6, IFN α 7, IFN α 16, IFN α 17; schwach antiviral: IFN α 1, IFN α 10, IFN α 21). Zusätzlich sind die Mittelwerte der Gruppen im Verlauf dargestellt, um die Unterschiede deutlich zu machen (Abb. **13G**). Für die Gruppen der stark antiviralen und mittel antiviralen Subtypen konnte ein dosisabhängiger Effekt beobachtet werden. Lediglich IFN α 5 reduzierte den HBsAg-Titer auch bei nur 125 U/ml noch auf unter 40 %, ähnlich wie bei der höchsten IFN-Konzentration und auch bei IFN α 16 war kein deutlicher Dosiseffekt zu erkennen. Aufgrund der Streuung und der generell niedrigen Reduktion war für die schwach antiviralen Subtypen ebenfalls kein dosisabhängiger Effekt zu erkennen. Deutlich wurde dies auch in den Mittelwerten der Gruppen, die das gleiche Bild abzeichneten.

5.2.2 Die Induktion von ISGs in Leberzellen nach der Stimulation mit IFN α -Subtypen

Der antivirale Effekt von IFN α wird hauptsächlich über die Induktion zahlloser ISGs vermittelt, die auf ganz unterschiedliche Weise den Replikationszyklus von Viren

inhibieren können (siehe Kapitel 1.1.4). Da die IFN α -Subtypen unterschiedliche antivirale Effekte in Bezug auf HBV zeigten, sollen im Folgenden mögliche Unterschiede bezüglich der ISG-Expression untersucht werden. Dazu wurden differenzierte HepaRG Zellen, die PHHs ähnlich sind und ebenfalls mit HBV infiziert werden können, für 18 h mit 1.000 U/ml sechs exemplarisch ausgewählter IFN α -Subtypen stimuliert. IFN α 2, IFN α 5 und IFN α 14 wiesen alle einen starken Effekt gegen HBV auf, während IFN α 6, IFN α 7 und IFN α 16 alle einen deutlich schwächeren antiviralen Effekt zeigten. Im Anschluss wurden die Zellen lysiert und die Genexpression von vier Schlüssel-ISGs mittels qPCR untersucht. Weil die Expression von ISGs einer zeitlichen Hierarchie unterliegt, wurde der Zeitpunkt 18 h gewählt, um den Expressionszeitpunkt möglichst vieler ISGs abzudecken [21, 192].

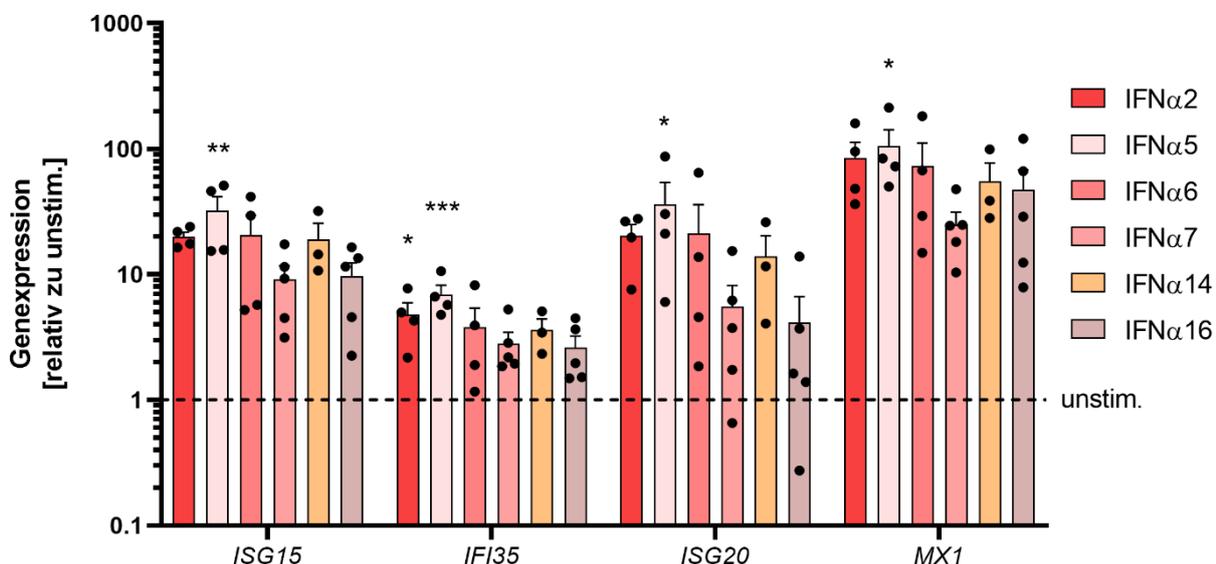


Abbildung 14: Relative Genexpression von Schlüssel-ISGs nach Stimulation mit IFN α -Subtypen in HepaRG Zellen.

Differenzierte HepaRG Zellen wurden für 18 h mit 1.000 U/ml der verschiedenen IFN α Subtypen stimuliert. Im Anschluss wurde zelluläre RNA isoliert und die Genexpression von *ISG15*, *IFI35*, *ISG20*, und *MX1* mittels qPCR bestimmt. Die Expression wurde auf das Haushaltsgen *GAPDH* normalisiert und die relative Expression gegenüber einer unstimulierten Kontrolle mit der $\Delta\Delta$ CT-Methode errechnet. n = 4; IFN α 7 und IFN α 16 n = 5. Gezeigt wird der Mittelwert mit Standardfehler. Statistik: IFN α Subtypen getestet gegen unstimulierte Kontrolle mittels *Ordinary one-way ANOVA* mit Dunnett's Test. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001.

Alle der verwendeten IFN α -Subtypen zeigten nach Stimulation in differenzierten HepaRG Zellen die Tendenz einer Induktion aller Schlüssel-ISGs (Abb. 14). Die höchste ISG-Induktion konnte für *MX1* erreicht werden, das nach IFN-Stimulation um bis zu 100-fach verstärkt exprimiert wurde. Dagegen wurde die schwächste Induktion für *IFI35* erzielt, dessen Expression maximal um den Faktor 10 erhöht wurde. Die Expression aller getesteten ISGs war nach Stimulation mit IFN α 5 sogar signifikant erhöht, ansonsten war

dies nur für die *IFI35*-Expression nach IFN α 2-Stimulation der Fall. Interessanterweise zeigte sich bei allen vier ISGs eine ähnliche Relation bezüglich der verschiedenen IFN α -Subtypen. Stets führte IFN α 5 zur stärksten Induktion, gefolgt von IFN α 2 und IFN α 6, die zu einer ähnlich starken ISG-Expression führten. IFN α 14 induzierte stets die vierstärkste Induktion und IFN α 7 sowie IFN α 16 führten zur schwächsten ISG-Expression (Abb. 14). Der Vergleich mit dem antiviralen Effekt der IFN α -Subtypen wies grundsätzlich die gleichen Tendenzen wie die ISG-Induktion auf, lediglich IFN α 14 zeigte dort zumeist einen stärkeren Effekt als IFN α 6 (Abb. 13 und 14).

Besonders in Hinblick auf die Eradikation von cccDNA durch IFN α wurde in den letzten Jahren immer wieder die zentrale Rolle der ISG-Proteinfamilie APOBEC3 diskutiert. Es handelt sich um Cytidin-Desaminasen, die zur Desaminierung und anschließenden Degradation der cccDNA führen können [141, 222]. Um zu untersuchen, ob verschiedene IFN α -Subtypen zu Unterschieden in der Genexpression verschiedener APOBEC3-Gene führen können, wurden differenzierte HepaRG Zellen mit 1.000 U/ml der exemplarisch ausgewählten Subtypen IFN α 2, IFN α 6 oder IFN α 7 stimuliert. IFN α 2 ist als klinisch verwendeter Subtyp von hohem Interesse, während IFN α 6 und IFN α 7 beide mittlere antivirale Effekte gegen HBV zeigten. Interessanterweise wies IFN α 6 aber eine höhere Induktion von Schlüssel-ISGs auf als IFN α 7. Zusätzlich wurden für die APOBEC3-Gene verschiedene Zeitpunkte in Betracht gezogen, um mögliche Unterschiede in der Kinetik zwischen den IFN α -Subtypen und den APOBEC3-Genen erfassen zu können. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde RNA aus den Zellen lysiert und die mRNA-Level mittels qPCR bestimmt.

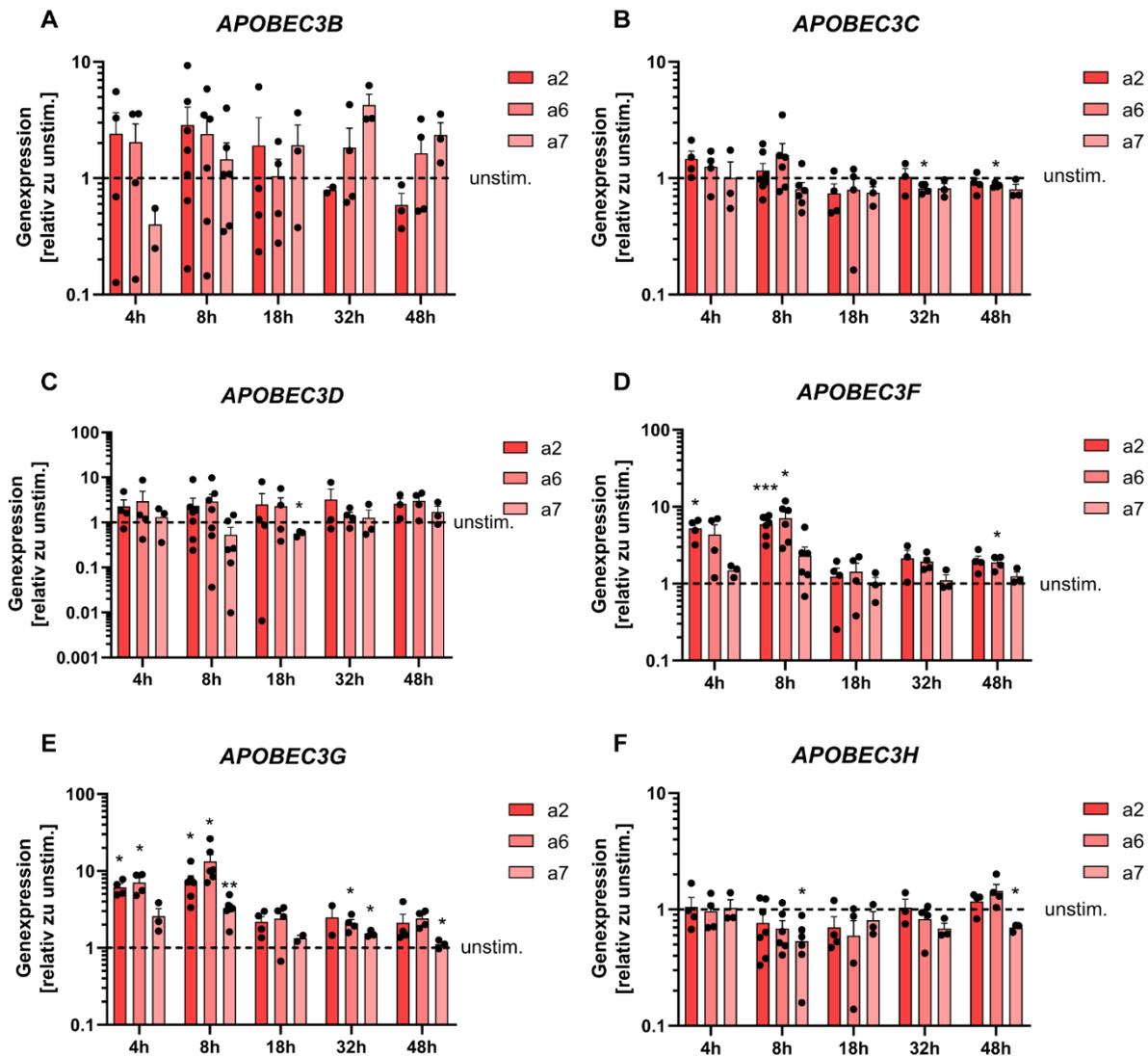


Abbildung 15: Relative Genexpression von *APOBEC3*-Genen nach Stimulation mit $\text{IFN}\alpha$ -Subtypen in HepaRG Zellen.

Differenzierte HepaRG Zellen wurden für die angegebenen Zeiten mit 1.000 U/ml der verschiedenen $\text{IFN}\alpha$ Subtypen stimuliert. Im Anschluss wurde zelluläre RNA isoliert und die Genexpression von *APOBEC3B* (A), *APOBEC3C* (B), *APOBEC3D* (C), *APOBEC3F* (D), *APOBEC3G* (E) und *APOBEC3H* (F) mittels qPCR bestimmt. Die Expression wurde auf das Haushaltsgen *GAPDH* normalisiert und die relative Expression gegenüber einer unstimulierten Kontrolle mit der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode errechnet. $\text{IFN}\alpha 2$ und $\text{IFN}\alpha 6$ $n = 4$, $n = 7$ für 8 h, $n = 3$ für $\text{IFN}\alpha 2$ 32 h; $\text{IFN}\alpha 7$ $n = 3$, $n = 6$ für 8 h; abweichend davon: A: $\text{IFN}\alpha 2$ $n = 2$ für 32 h, $n = 3$ für 48h; $\text{IFN}\alpha 6$ $n = 6$ für 8 h; $\text{IFN}\alpha 7$ $n = 2$ für 4 h; B: $\text{IFN}\alpha 6$ $n = 6$ für 8 h; C: $\text{IFN}\alpha 2$ $n = 3$ für 48 h; D: $\text{IFN}\alpha 6$ $n = 6$ für 8 h; E: $\text{IFN}\alpha 2$ $n = 6$ für 8 h; $\text{IFN}\alpha 7$ $n = 2$ für 18 h; F: $\text{IFN}\alpha 6$ $n = 6$ für 8 h. Gezeigt ist der Mittelwert mit Standardfehler. Statistik: $\text{IFN}\alpha$ Subtypen für jeden Zeitpunkt getestet gegen unstimulierte Kontrolle mittels *Mixed-effects model* mit Dunnett's Test. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Die Analyse der Genexpression ergab für *APOBEC3B* keine signifikante Erhöhung nach Stimulation mit den $\text{IFN}\alpha$ -Subtypen. Jedoch zeichnete sich die Tendenz ab, dass eine Stimulation mit $\text{IFN}\alpha 2$ zu einer Erhöhung der Genexpression zu den frühen Zeitpunkten 4 h und 8 h führte, während es diese Tendenz nach $\text{IFN}\alpha 7$ -Stimulation zu den späten Zeitpunkten 32 h und 48 h gab (Abb. 15A). Für die Expression von *APOBEC3C*,

APOBEC3D und *APOBEC3H* konnte keinerlei Erhöhung durch die Stimulation mit IFN α festgestellt werden. Bei einzelnen Zeitpunkten zeigte sich sogar eine statistisch signifikante Reduktion der Genexpression für *APOBEC3C* und *APOBEC3D* durch IFN α 6 (Abb. **15B** und **C**). Für IFN α 7 war dies bei *APOBEC3H* der Fall (Abb. **15F**). Die Expression von *APOBEC3F* war nach 4 h und 8 h Stimulation durch IFN α 2 signifikant erhöht. Nach 8 h führte auch IFN α 6-Stimulation zu einer signifikanten Erhöhung, ebenso wie nach 48 h. (Abb. **15D**). Für *APOBEC3G* führten IFN α 2 und IFN α 6 nach 4 h und 32 h zu einer signifikanten Erhöhung der mRNA-Level, nach 8 h sogar alle drei IFN-Subtypen. Nach 48 h zeigte sich zumindest durch IFN α 7-Stimulation noch eine signifikant erhöhte Genexpression (Abb. **15E**). Generell fiel auf, dass die Induktion der *APOBEC3*-Gene nach IFN α -Stimulation relativ gering war. Lediglich *APOBEC3F* und *APOBEC3G* wurden zu den frühen Zeitpunkten 4 h und 8 h etwas stärker induziert.

5.2.3 Der Effekt einer HBV-Infektion auf die Genexpression von APOBEC3

Die viel diskutierte Bedeutung von APOBEC3-Proteinen in der Eradikation von cccDNA wurde bereits mehrfach angesprochen. Weil allerdings der Erfolg einer möglichen Therapie nicht alleine von der Induktion von *APOBEC3*-Genen durch IFN α bestimmt wird, sondern auch das Virus Mechanismen entwickelt hat, um dem IFN-Signalweg und APOBEC3 entgegenzuwirken, wurde nachfolgend untersucht, ob eine etablierte HBV-Infektion zu einer Veränderung in der Genexpression von Mitgliedern der APOBEC3-Familie führen kann. Besonders interessant ist dies, da ein Zusammenhang zwischen Behandlungserfolg mit IFN α und APOBEC3-Leveln in Patienten nachgewiesen werden konnte [129]. Zu diesem Zweck wurden differenzierte HepaRG Zellen mit HBV infiziert und für acht Tage kultiviert, damit diese eine stabile Infektion etablieren. Danach wurden exemplarisch Überstände von infizierten und nicht infizierten Zellen gesammelt, um die Infektion mittels qPCR nachzuweisen. Dann wurde je ein infiziertes und ein nicht-infiziertes Well mit 1.000 U/ml der Subtypen IFN α 2, IFN α 6 oder IFN α 7 für 8 h stimuliert. Die Genexpression der *APOBEC3*-Gene wurde durch qPCR bestimmt.

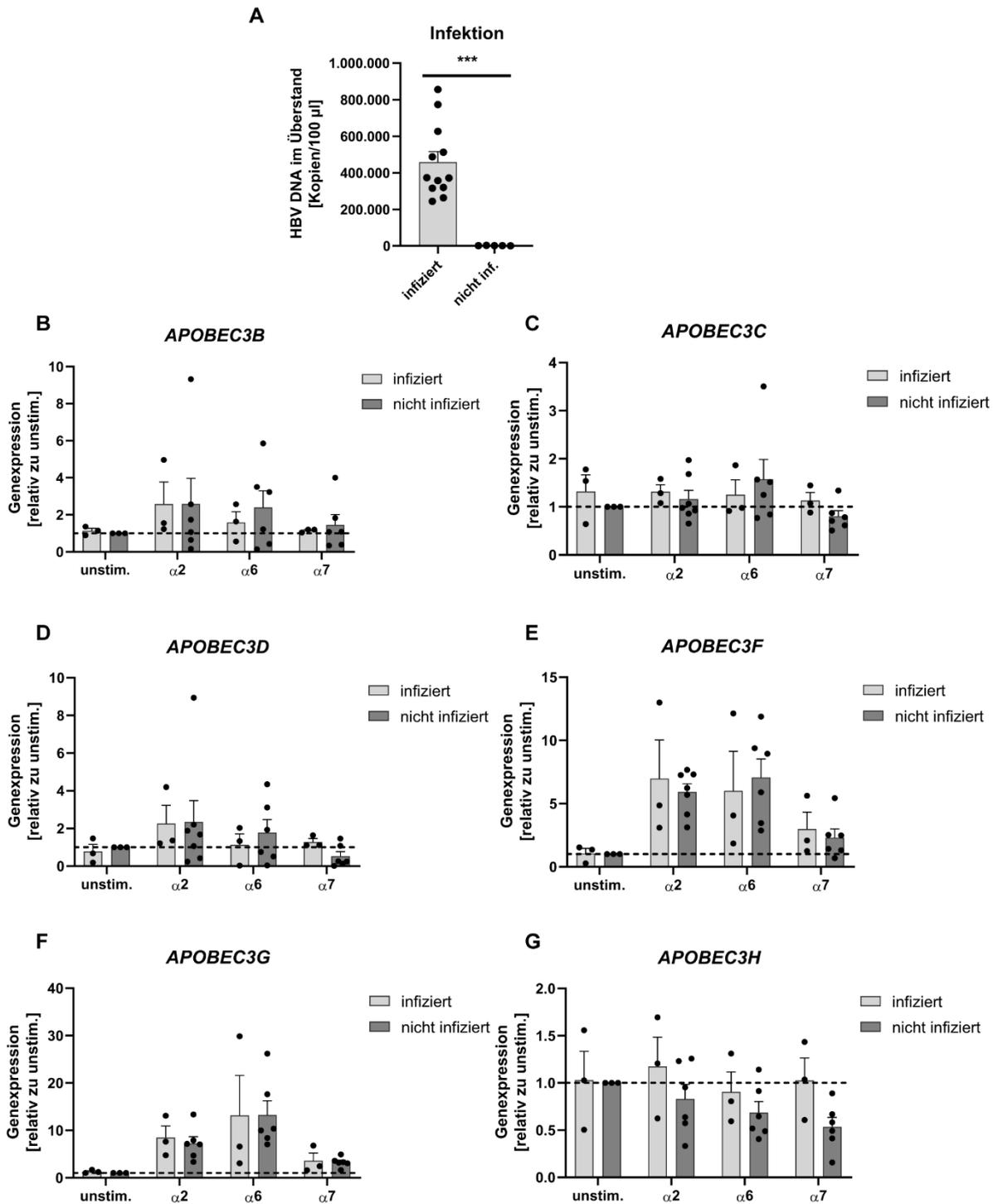


Abbildung 16: Relative Genexpression von *APOBEC3*-Genen nach Stimulation mit $\text{IFN}\alpha$ -Subtypen in infizierten und nicht infizierten HepaRG Zellen.

Differenzierte HepaRG Zellen wurden mit HBV mit 500 geq/Zelle infiziert und für 8 Tage inkubiert. Im Anschluss wurde exemplarisch DNA aus den Zellüberständen infizierter und nicht infizierter Zellen isoliert, um den Virustiter mittels qPCR zu quantifizieren (A). Dann wurden die Zellen für 8 h mit 1.000 U/ml der verschiedenen $\text{IFN}\alpha$ -Subtypen stimuliert. Die zelluläre RNA wurde isoliert und die Genexpression von *APOBEC3B* (B), *APOBEC3C* (C), *APOBEC3D* (D), *APOBEC3F* (E), *APOBEC3G* (F) und *APOBEC3H* (G) mittels qPCR bestimmt. Die Expression wurde auf das Haushaltsgen *GAPDH* normalisiert und die relative Expression gegenüber einer unstimulierten Kontrolle mit der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode errechnet. Infizierte Proben $n = 3$; nicht infizierte Proben $n = 6$, unstimulierte Probe $n = 3$. Gezeigt ist der Mittelwert mit Standardfehler. Statistik: A: Infizierte Proben getestet gegen nicht infizierte Proben mittels ungepaartem t-Test. *** $p < 0,001$.

Die Bestimmung der viralen Titer zeigte, dass in allen der exemplarisch getesteten Proben, die infiziert sein sollten, hohe Mengen an HBV-DNA nachgewiesen werden konnte und sich im Mittel wie zu erwarten ein signifikanter Unterschied im Vergleich zu den nicht infizierten Proben ergab (Abb. **16A**). Für die Expression der verschiedenen *APOBEC3*-Gene zeigte sich im Vergleich von infizierten zu nicht infizierten Proben kein Unterschied, unabhängig von der IFN α -Subtyp-Stimulation (Abb. **16B – F**). Lediglich für *APOBEC3H* scheint es durch die IFN α -Stimulation in nicht infizierten Zellen zu einer Reduktion der mRNA-Level zu kommen, was in den infizierten Proben nicht beobachtet werden konnte (Abb. **16G**). Statistisch signifikant ist diese Beobachtung aber nicht. Zusammenfassend machte es den Eindruck, als hätte die Infektion im durchgeführten Versuch keinen Einfluss auf die *APOBEC3*-Genexpression.

5.2.4 Der antivirale Effekt von IFN α -Subtypen auf SARS-CoV-2 in Vero E6 Zellen

Aufgrund seiner guten antiviralen Wirkung wurde IFN α auch im Rahmen der andauernden SARS-CoV-2-Pandemie als mögliche Therapieoption in Betracht gezogen. Zahlreiche Studien wurden durchgeführt und in China wurde IFN α 2 sogar prophylaktisch in Form von Nasentropfen von Mitarbeitern im Gesundheitswesen eingesetzt [157, 161, 281]. Zudem konnte auch *in vitro* bereits gezeigt werden, dass SARS-CoV-2 - im Gegensatz zum genetisch nah verwandten SARS-CoV-1 - durch IFN α inhibiert werden kann [134]. Da SARS-CoV-2 allerdings ein sehr neues Virus ist, gibt es bisher nur Daten zu IFN α 2. Wie bereits beschrieben zeigen teilweise jedoch andere IFN α -Subtypen je nach Virusinfektion stärkere antivirale Aktivitäten (siehe Kapitel 1.1.6). Aus diesem Grund sollen im folgenden Abschnitt die antiviralen Effekte aller IFN α -Subtypen auf SARS-CoV-2 untersucht werden. Dazu wurden Vero E6 Zellen, die ein gut etabliertes Zellkulturmodell für Coronavirus-Infektionen darstellen, selbst jedoch kein Typ-I-IFN produzieren können, für 16 h mit 1.000 U/ml oder 100 U/ml der verschiedenen IFN α -Subtypen stimuliert und dann für 24 h mit SARS-CoV-2 infiziert [48]. Im Anschluss wurde der virale Titer durch Endpunkt-Verdünnung bestimmt. Der Versuch wurde in Zusammenarbeit mit Toni Luise Meister (Ruhr-Universität Bochum) durchgeführt. Zusätzlich wurde die Infektion auch für einige Subtypen fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen. Zur Analyse des Dosiseffekts wurden Vero E6 Zellen zudem für 1 h mit seriell verdünnten IFN α -Subtypen stimuliert und dann für 24 h infiziert. Die Menge an intrazellulärem SARS-Nukleoprotein wurde mit einem icELISA gemessen.

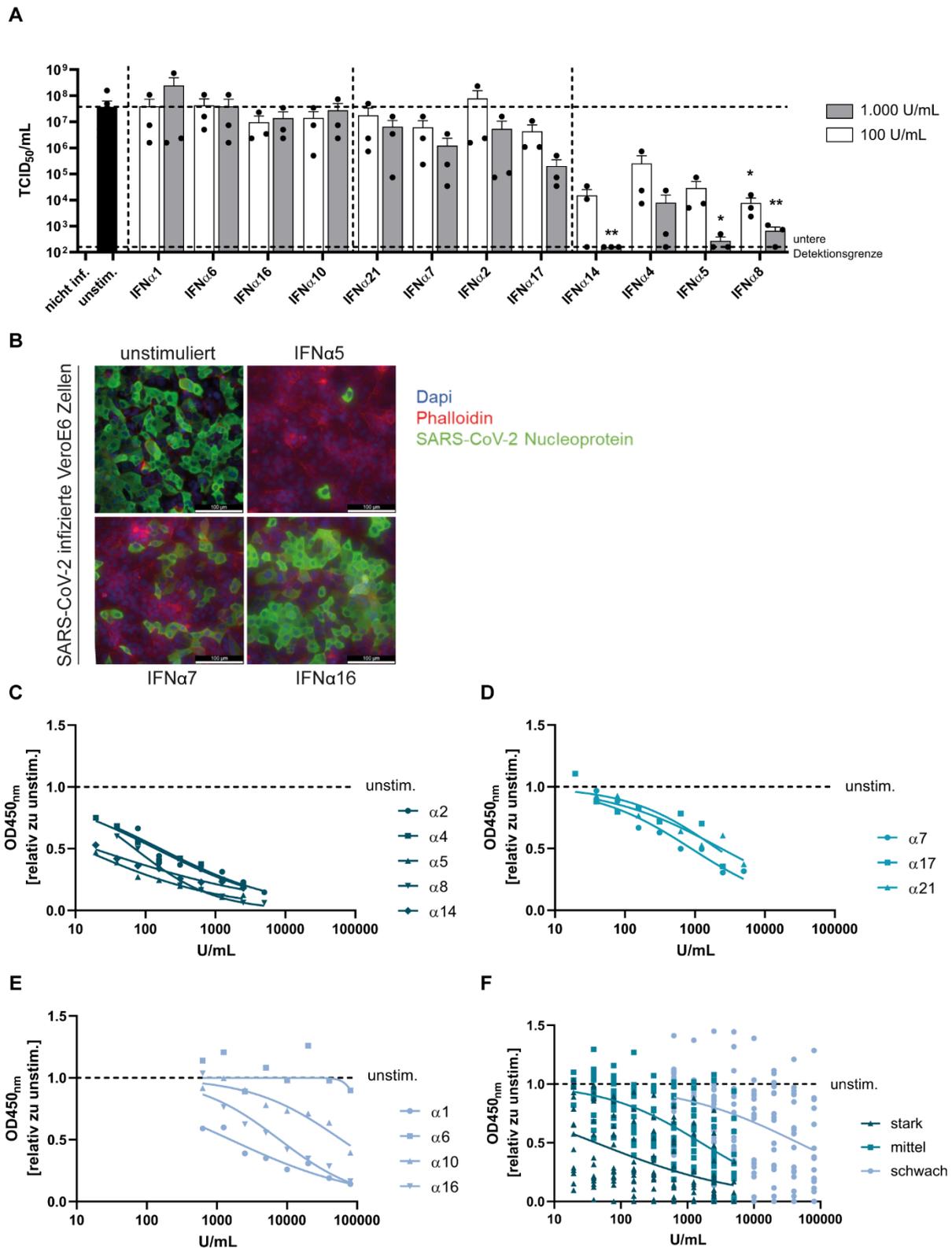


Abbildung 17: Der Effekt von IFNα auf die Replikation von SARS-CoV-2 in Vero E6 Zellen.

Vero E6 Zellen wurden für 16 h mit den verschiedenen IFNα Subtypen stimuliert und dann mit SARS-CoV-2 infiziert. Nach 24 Stunden wurde der Virustiter im Überstand mittels Endpunkt-Verdünnung bestimmt (A). Vero E6 Zellen wurden mit repräsentativen IFNα-Subtypen stimuliert und mit SARS-CoV-2 infiziert. Die Infektion wurde fluoreszenzmikroskopisch visualisiert (Skala: 100 μm) (B). Mithilfe eines icELISAs wurden Dosis-Effekt-Kurven erzeugt und die IFNα-Subtypen wurden anhand ihres antiviralen Effekts in drei Gruppen aufgeteilt (C: stark antivirale Subtypen; D: mittel antivirale Subtypen; E: schwach antivirale Subtypen). Der Verlauf der verschiedenen Gruppen im Mittel wird abgebildet (F). Die Kurven zeigen eine

nichtlineare Regression der tatsächlichen Werte, die abgebildeten Punkte zeigen die Mittelwerte (C - E) bzw. die einzelnen Replikate (F). A: n = 3, n = 6 für unstim.; Gezeigt wird der Mittelwert mit Standardfehler. Die Daten wurden gemeinsam mit Toni Luise Meister (Ruhr-Universität Bochum) generiert. C – E: n = 5, n = 4 für IFN α 1, IFN α 2, IFN α 4, n = 3 für IFN α 8. Statistik: A: IFN α Subtypen getestet gegen unstimulierte Kontrolle mittels Kruskal-Wallis-Test mit *Dunn's Multiple Comparison*. *p < 0,05; **p < 0,01. Verändert nach [209].

Die Bestimmung der viralen Titer durch Endpunkt-Verdünnung zeigte, dass es deutliche Unterschiede zwischen den Effekten der IFN α -Subtypen gegen SARS-CoV-2 gab (Abb. **17A**). Die Stimulation mit den Subtypen IFN α 5, IFN α 8 und IFN α 14 zeigte bei 1.000 U/ml eine signifikante Reduktion der viralen Titer, teils bis unter die Detektionsgrenze. Bei IFN α 8 war der Effekt sogar noch bei 100 U/ml signifikant. Auch IFN α 4 führte zu einer Reduktion von mehr als Faktor 1.000, auch wenn dieser Effekt aufgrund der Abweichung der Ergebnisse nicht signifikant war. Die Subtypen IFN α 2, IFN α 7, IFN α 17 und IFN α 21 zeigten einen deutlich schwächeren Effekt als die vorher genannten Subtypen, führten tendenziell dennoch zu einer Reduktion des Virus um den Faktor 10 bis 100. Die verbleibenden Subtypen, IFN α 1, IFN α 6, IFN α 10 und IFN α 16 führten zu keinem nennenswerten Effekt. Um die beobachteten Effekte zu visualisieren, wurde der Versuch mit je einem Vertreter der soeben beschriebenen unterschiedlich antiviralen Gruppen (IFN α 5, IFN α 7 und IFN α 16) wiederholt, die Zellen diesmal jedoch fluoreszenzmikroskopisch durch Visualisierung des SARS-CoV-2-Nukleoproteins untersucht. Ähnlich wie bei der Endpunkt-Verdünnung konnte eine steigende Reduktion an AlexaFluor 488 (grün)-gefärbten, infizierten Zellen von IFN α 16- zu IFN α 7- zu IFN α 5-stimulierten Zellen nachgewiesen werden (Abb. **17B**). Die Ergebnisse des icELISAs zeigten, dass sich die IFN α -Subtypen aufgrund ihres antiviralen Effekts in drei Gruppen einteilen lassen (Abb. **17C – E**). Die IFN α -Subtypen innerhalb der Gruppen ähneln sich von ihren Effekten und für alle drei Gruppen war gut ein dosisabhängiger Effekt zu erkennen. Der Unterschied zwischen den Gruppen wurde durch die Mittelwerte der einzelnen Gruppen im direkten Vergleich gut sichtbar (Abb. **17F**). Während die Gruppe der stark antiviralen IFN α -Subtypen im Mittel bereits bei etwa 20 U/ml zu einer relativen Inhibition von 50 % in der Absorption führte, benötigte die Gruppe der schwach antiviralen IFN α -Subtypen dazu im Mittel fast eine Konzentration von 80.000 U/ml.

In den Versuchen zur Untersuchung des antiviralen Effekts der IFN α -Subtypen auf SARS-CoV-2 wurde das IFN jeweils vor der Infektion zu den Zellen gegeben. Um den Einfluss des Stimulationszeitpunkts auf die Inhibition des Virus zu beleuchten, wurde mit

IFN α 5, das einen besonders starken antiviralen Effekt zeigte, sowohl eine Endpunkt-Verdünnung als auch ein icELISA in Vero E6 Zellen durchgeführt. Das IFN wurde dabei zu verschiedenen Zeitpunkten bezogen auf die Infektion zu den Zellen gegeben. Der Versuch wurde in Zusammenarbeit mit Toni Luise Meister (Ruhr-Universität Bochum) durchgeführt.

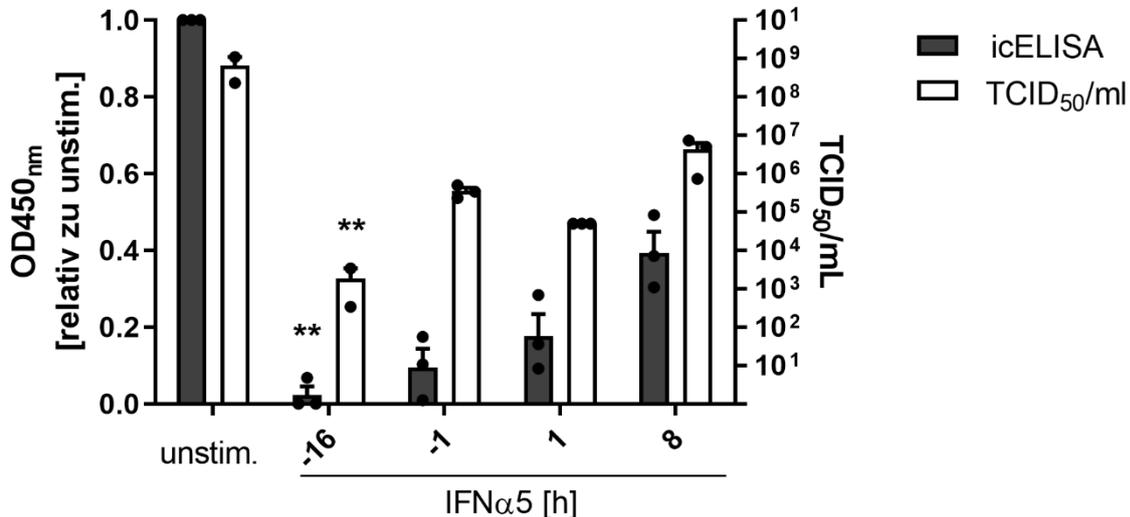


Abbildung 18: Der Einfluss des Stimulationszeitpunkts auf den antiviralen Effekt von IFN α 5.

Vero E6 Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten mit 1.000 U/ml IFN α 5 stimuliert und zum Zeitpunkt $t = 0$ h mit 350 PFU/ml (icELISA) oder 30.000 PFU/well (Endpunkt-Verdünnung) SARS-CoV-2 infiziert. Nach 24 h wurden die Virustiter mit einem icELISA (linke y-Achse) und einer Endpunkt-Verdünnung (rechte y-Achse) bestimmt. $n = 3$, $n = 2$ für TCID₅₀ unstim. und -16 h. Gezeigt wird der Mittelwert mit Standardfehler. Durchgeführt in Zusammenarbeit mit Toni Luise Meister (Ruhr-Universität Bochum). Statistik: Stimulationszeitpunkte getestet gegen entsprechende unstimulierte Kontrolle mittels Kruskal-Wallis-Test mit *Dunn's Multiple Comparison*. ** $p < 0,01$. Verändert nach [209].

Sowohl die Auswertung mittels Endpunkt-Verdünnung als auch mittels icELISA zeigten einen zeitabhängigen Effekt der IFN α 5-Stimulation (Abb. 18). Für die Stimulation 16 h vor der Infektion konnte für beide Methoden eine signifikante Reduktion der Virusmenge nachgewiesen werden, bei der das Virus um den Faktor 10⁶ bei der Endpunkt-Verdünnung inhibiert werden konnte. Für die anderen Zeitpunkte konnte wegen der geringen Größe der Stichprobe keine Signifikanz mehr erreicht werden, es zeigte sich aber dennoch für alle Zeitpunkte die Tendenz einer Reduktion der Virusmenge. Gleichzeitig wurde auch ein zeitabhängiger Effekt deutlich: je früher die Stimulation mit IFN α 5 erfolgte, desto stärker war der antivirale Effekt. Dies war beim icELISA nochmal deutlicher zu erkennen als bei der Endpunkt-Verdünnung. Trotzdem konnte bspw. für den icELISA mit einer Stimulation 8 h nach der Infektion noch eine Reduktion um 60 % erreicht werden. Auch bei der Endpunkt-Verdünnung betrug der Faktor für die Reduktion

der viralen Titer noch immer 100 – 1.000. Zusammenfassend zeigte sich aber, dass eine möglichst frühe Stimulation mit IFN α zu einem verbesserten antiviralen Effekt führt, da die Zellen sich dann bei der Infektion im besten Falle schon in einem antiviralen Zustand befinden.

5.2.5 Die Genexpression von ISGs nach Stimulation mit IFN α -Subtypen in Vero E6 Zellen

Die Infektionsversuche mit den verschiedenen IFN α -Subtypen haben ergeben, dass die einzelnen Subtypen sich in ihrer antiviralen Aktivität gegenüber SARS-CoV-2 teilweise stark unterscheiden. Um Unterschiede in der ISG-Expression als möglichen Grund näher zu betrachten, wurde die ISG Expression nach Stimulation mit 1.000 U/ml exemplarischer IFN α -Subtypen für 18 h in Vero E6 Zellen untersucht. IFN α 4 und IFN α 5 wurden als Vertreter der stark antiviralen Gruppe, IFN α 2 als klinisch relevanter Subtyp, IFN α 7 als Vertreter der mittel antiviralen Gruppe und IFN α 1 sowie IFN α 16 als Vertreter der schwach antiviralen Gruppe ausgewählt. Die Zellen wurden lysiert und die relative Genexpression von Schlüssel-ISGs, die alle auch gegen RNA-Viren wirken, mittels qPCR quantifiziert.

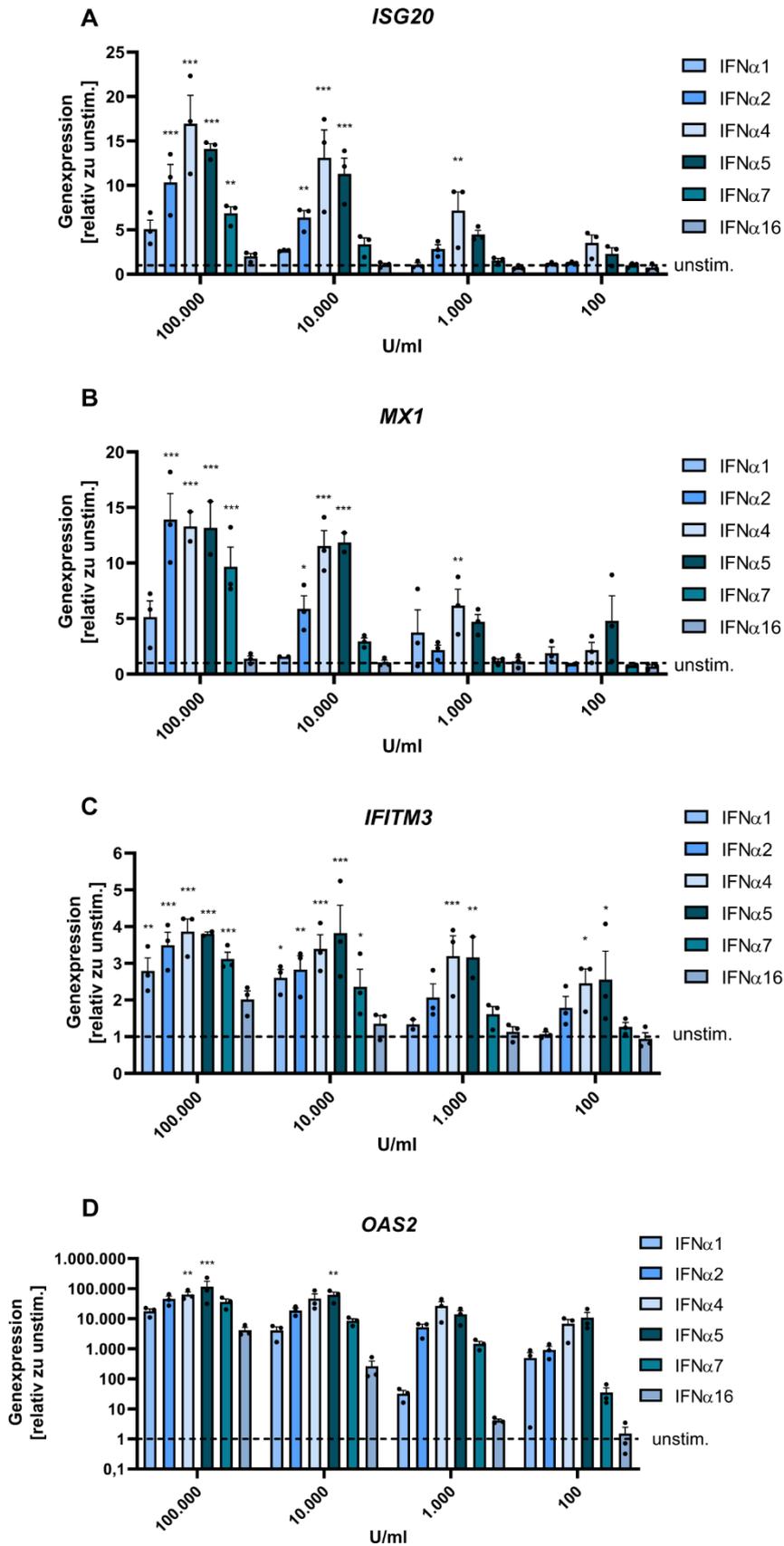


Abbildung 19: Relative Genexpression von Schlüssel-ISGs nach Stimulation mit IFN α -Subtypen in Vero E6 Zellen.

Vero E6 Zellen wurden für 16 h mit den angegebenen Konzentrationen der verschiedenen IFN α -Subtypen stimuliert. Im Anschluss wurde zelluläre RNA isoliert und die Genexpression von *ISG20* (A), *MX1* (B),

IFITM3 (C), und *OAS2* (D) mittels qPCR bestimmt. Die Expression wurde auf das Haushaltsgen *GAPDH* normalisiert und die relative Expression gegenüber einer unstimulierten Kontrolle mit der $\Delta\Delta CT$ -Methode errechnet. $n = 3$; abweichend davon $n = 2$ für IFN α 1 (*MX1* 10.000 U/ml, *IFITM3* 1.000 U/ml), IFN α 2 (*Mx1* 100 U/ml), IFN α 4 (*MX1* 100.000 U/ml), IFN α 5 (*MX1* 100.000 U/ml und 10.000 U/ml, *IFITM3* 100.000 U/ml und 1.000 U/ml) und IFN α 7 (*MX1* 100 U/ml). Gezeigt ist der Mittelwert mit Standardfehler. Statistik: IFN α Subtypen getestet gegen unstimulierte Kontrolle mittels *Two-way ANOVA* mit Dunnett's Test. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Die Auswertung der Genexpression von *ISG20* zeigte, dass es nach Stimulation mit IFN α 2, IFN α 4, IFN α 5 und IFN α 7 mit 100.000 U/ml zu einer signifikanten Erhöhung der mRNA-Level um bis zu das 15-fache im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle kam. Bei 10.000 U/ml war die Genexpression durch IFN α 2, IFN α 4 und IFN α 5-Stimulation erhöht, bei 1.000 U/ml nur noch durch IFN α 4 um etwa das 8-fache (Abb. **19A**). Bei der niedrigsten Konzentration 100 U/ml konnte keine signifikante Erhöhung gemessen werden. Generell konnte die Stimulation mit den Subtypen IFN α 1 und IFN α 16 zu keiner signifikanten Expression von *ISG20* führen. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch für die Expression von *MX1* (Abb. **19B**). Auch der Faktor der der Induktion war mit knapp 15 fast so hoch wie bei *ISG20*. Die Induktion der Expression von *IFITM3* war im Allgemeinen deutlich niedriger als die der beiden anderen ISGs. Stimulation mit IFN α 4 und IFN α 5 führte wiederum zur stärksten Induktion, die diesmal sogar auch für die niedrigste Konzentration von 100 U/ml noch signifikant war (Abb. **19C**). Für die beiden hohen Konzentrationen zeigten auch die IFN α 2- und IFN α 7-stimulierten Proben eine signifikante Induktion. Anders als bei den anderen drei ISGs konnte auch IFN α 1 für die beiden hohen Konzentrationen zu einer signifikant erhöhten Induktion führen, während dies für IFN α 16 nicht der Fall war. Die Induktion der Expression von *OAS2* war im Gesamten deutlich höher als die der anderen ISGs und erreichte sogar den Faktor 100.000 für IFN α 5 (Abb. **19D**). Signifikant war diese Induktion jedoch nur für IFN α 5 für die beiden höchsten Konzentrationen sowie für IFN α 4 für 100.000 U/ml. Für die anderen Subtypen handelt es sich nur um starke Tendenzen. Auffällig war dabei jedoch, dass die tendenzielle Induktion durch IFN α 16 für *OAS2* deutlich geringer war als die durch alle anderen Subtypen. Zusammenfassend kann in Bezug auf alle vier getesteten ISGs gesagt werden, dass die Induktionsmuster relativ ähnlich sind: Stimulation mit IFN α 4 und IFN α 5 wies die stärkste Induktion auf, gefolgt von IFN α 2 sowie IFN α 7 und bei IFN α 1- und IFN α 16-Stimulation war so gut wie keine signifikante Induktion der Genexpression zu messen. Dies entspricht den Ergebnissen, die für die antiviralen Effekte beobachtet werden konnten.

5.2.6 Der antivirale Effekt von IFN α -Subtypen auf SARS-CoV-2 in humanen AE Zellen

In Versuchen mit Vero E6 Zellen konnte gezeigt werden, dass die verschiedenen humanen IFN α -Subtypen unterschiedliche virale Effekte in Bezug auf SARS-CoV-2 aufweisen. Allerdings stammen Vero E6 Zellen aus der Niere einer adulten Grünmeerkatze der Art *Cercopithecus aethiops* und besitzen somit nicht den humanen IFNAR [8]. Weiterhin verfügen sie zwar über eine funktionierende Typ-I-IFN-Signalweiterleitung, haben allerdings einen Defekt in der Produktion von Typ-I-IFN [48]. Aus diesem Grund wurde nachfolgend der antivirale Effekt der IFN α -Subtypen auf natürliche Zielzellen von SARS-CoV-2 untersucht. Zu diesem Zweck wurden gut differenzierte humane *airway epithelial* (hAE) Zellen sieben verschiedener Spender genutzt, die gut die *in vivo* Physiologie des respiratorischen Trakts widerspiegeln, sich in verschiedene Zelltypen ausdifferenzieren und Zilienschlag sowie Mukusproduktion aufweisen [82, 102]. Die Zellen wurden für 16 h mit den IFN α -Subtypen stimuliert, dann für 2 h mit SARS-CoV-2 infiziert. Die Zugabe von IFN α erfolgte dabei direkt ins Medium auf der basolateralen Seite der Zellen, die in einem Transwell-System kultiviert wurden. Das Virus wurde apikal in HBSS verdünnt auf die Zellen gegeben. Alle 24 h wurden die Zellen apikal gewaschen und der Virustiter in den Waschungen mittels Endpunkt-Verdünnung bestimmt. Der Versuch wurde in Zusammenarbeit mit Toni Luise Meister (Ruhr-Universität Bochum) durchgeführt.

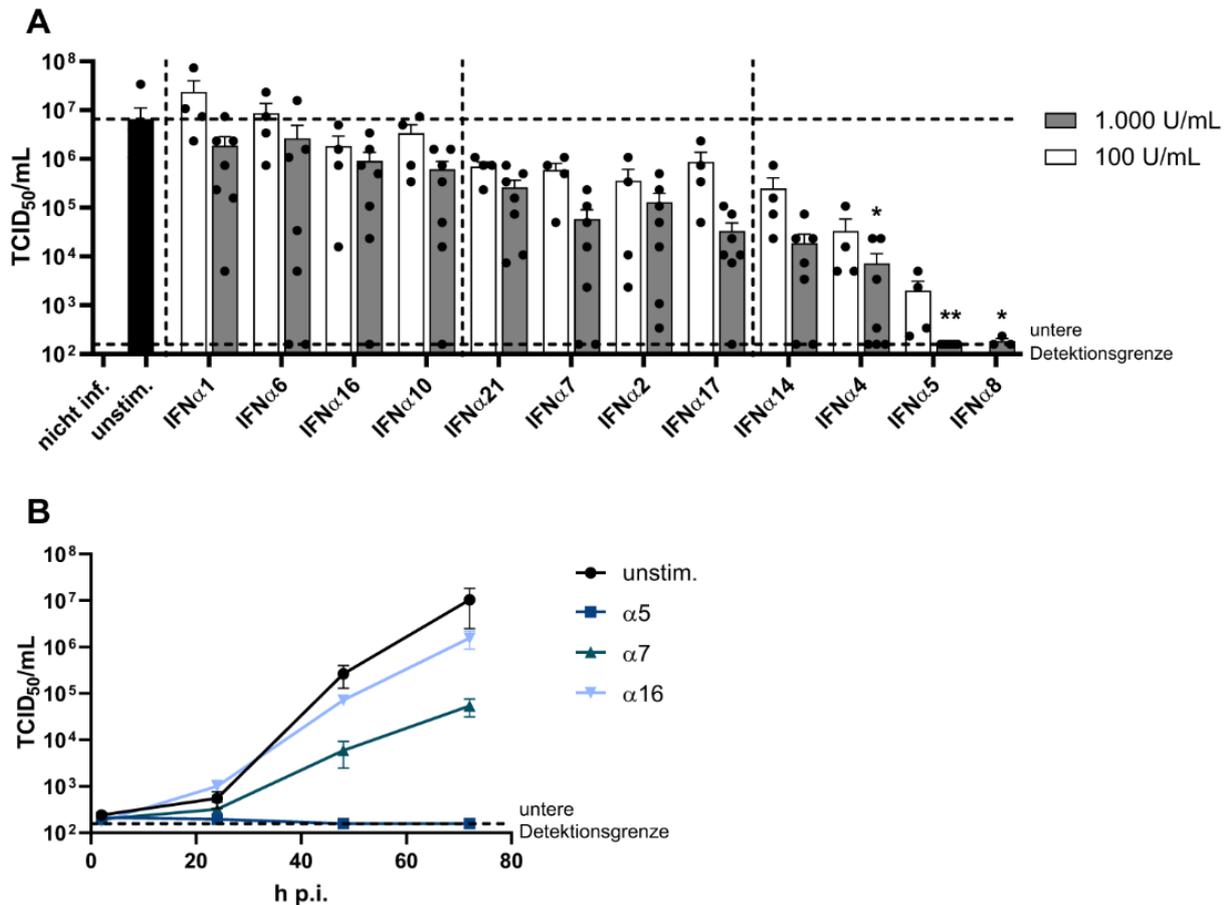


Abbildung 20: Der Effekt von IFN α auf die Replikation von SARS-CoV-2 in hAE Zellen.

Humane AE Zellen wurden für 16 h mit den verschiedenen IFN α -Subtypen stimuliert und dann mit 30.000 PFU/Well SARS-CoV-2 infiziert. Die Zellen wurden alle 24 h apikal gewaschen und die Waschungen auf virale Replikation untersucht. Der TCID₅₀/ml wurde 72 h nach der Infektion bestimmt und die IFN α -Subtypen aufgrund ihres antiviralen Effekts in drei Gruppen eingeteilt (vertikale Linien) (A). Die Virustiter von Zellen, die mit 1.000 U/ml dreier repräsentativer IFN α -Subtypen stimuliert wurden, wurde im zeitlichen Verlauf dargestellt (B). A: n = 7 für 1.000 U/ml, n = 4 für 100 U/ml, n = 3 für IFN α 8 1.000 U/ml. B: n = 4. Gezeigt wird der Mittelwert mit Standardfehler. Der Versuch wurde zusammen mit Toni Luise Meister (Ruhr-Universität Bochum) durchgeführt. Statistik: A: IFN α Subtypen getestet gegen unstimulierte Kontrolle mittels Kruskal-Wallis-Test mit *Dunn's Multiple Comparison*. *p < 0,05; **p < 0,01. Verändert nach [209].

Bei der Auswertung der Endpunkt-Verdünnung zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den IFN α -Subtypen bezüglich ihres antiviralen Effekts (Abb. 20A). Die unstimulierten Proben zeigten im Durchschnitt Virustiter von etwa 10⁷ TCID₅₀/ml. Durch Stimulation mit 1.000 U/ml IFN α 5 und IFN α 8 war es möglich die Virusmenge bis unter die Detektionsgrenze zu verringern. Auch Stimulation mit 1.000 U/ml IFN α 4 führte zu einer signifikanten Reduktion um den Faktor 1.000. Stimulation mit IFN α 14 reduzierte den Virustiter ebenfalls stark, dies war jedoch aufgrund der Donorvarianz nicht statistisch signifikant. Die Subtypen IFN α 2, IFN α 7, IFN α 17 und IFN α 21 zeigten alle einen ähnlich starken antiviralen Effekt und konnten mit 1.000 U/ml den Virustiter auf etwa 5x10⁴ bis 5x10⁵ reduzieren. Die verbleibenden Subtypen, IFN α 1, IFN α 6, IFN α 10 und IFN α 16

zeigten maximal die Tendenz eines geringen antiviralen Effekts. Für alle Subtypen konnte zudem ein dosisabhängiger Effekt beobachtet werden. Der Vergleich mit den Ergebnissen aus den Versuchen mit Vero E6 Zellen zeigte eine übereinstimmende Tendenz, was die antiviralen Effekte der Subtypen betrifft und validiert somit die Ergebnisse aus der Zelllinie (Abb. **17A** und **20A**). Die exemplarische Analyse von je einem IFN α -Subtyp pro unterschiedlich antiviraler Gruppe über den gesamten Versuchszeitraum machte deutlich, dass IFN α 5 die viralen Titer über den kompletten Zeitraum nahe an der unteren Detektionsgrenze halten konnte (Abb. **20B**). Zum Zeitpunkt 48 h war bereits der Unterschied zwischen den antiviralen Effekten der Subtypen deutlich sichtbar, nach 72 h verstärkte sich diese Tendenz noch.

Um die möglichen Ursachen für die unterschiedlichen antiviralen Effekte weiter zu analysieren, wurde aus den Zellen von vier Spendern des Versuchs zum Zeitpunkt 72 h RNA isoliert und die relative Genexpression von fünf Schlüssel-ISGs mittels qPCR bestimmt.

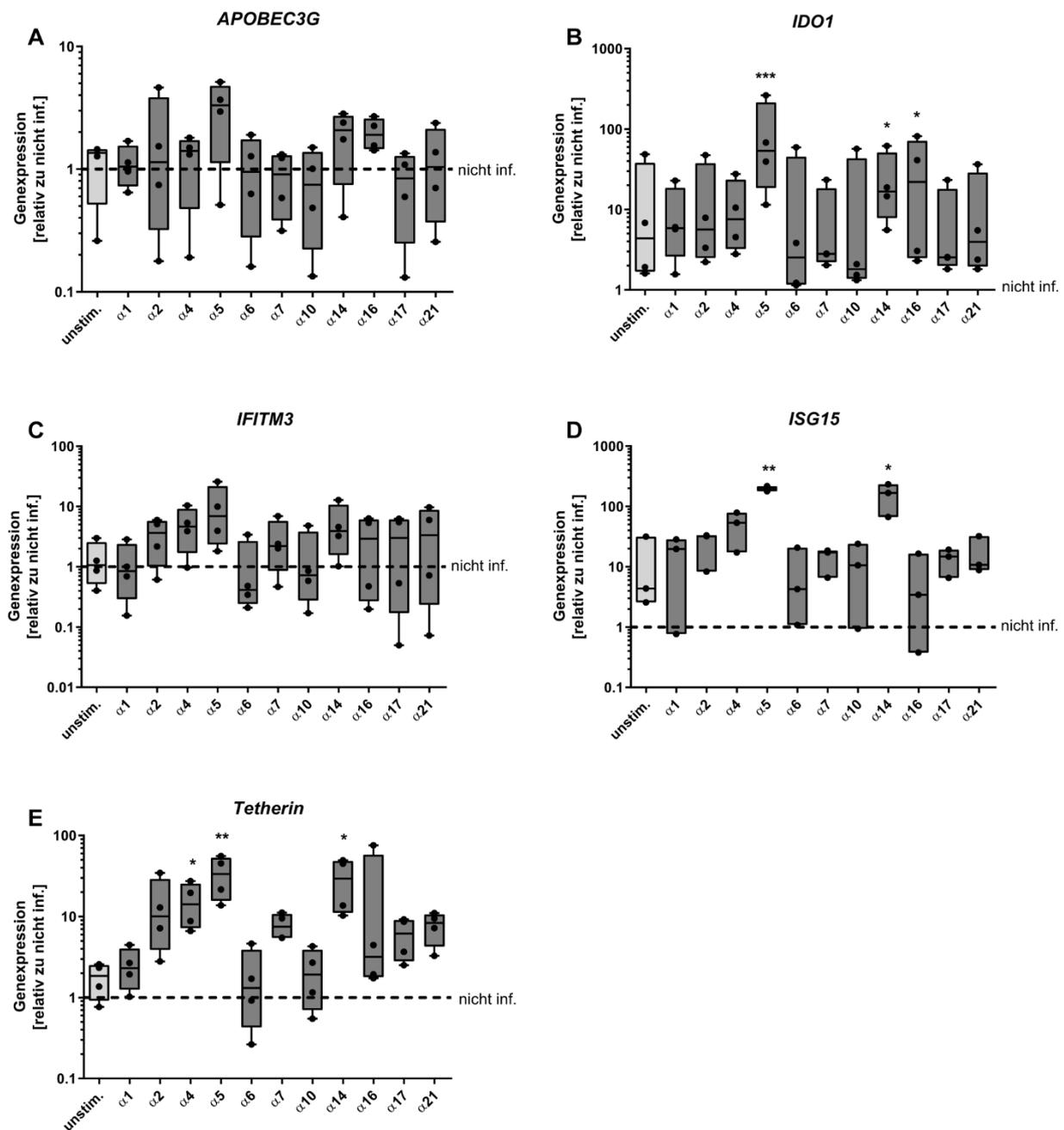


Abbildung 21: Relative Genexpression von Schlüssel-ISGs nach Stimulation mit IFN α -Subtypen in hAE Zellen.

Humane AE Zellen wurden für 16 h mit 1.000 U/ml der verschiedenen IFN α -Subtypen stimuliert und im Anschluss für 72 h mit SARS-CoV-2 infiziert. Danach wurde zelluläre RNA isoliert und die Genexpression von *APOBEC3G* (A), *IDO1* (B), *IFITM3* (C), *ISG15* (D) und *Tetherin* (E) mittels qPCR bestimmt. Die Expression wurde auf das Haushaltsgen *GAPDH* normalisiert und die relative Expression gegenüber einer nicht infizierten (nicht inf.) Kontrolle mit der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode errechnet. $n = 4$, $n = 3$ für *ISG15*. Gezeigt wird der Median. Statistik: IFN α Subtypen und unstim. Probe getestet gegen nicht inf. Kontrolle mittels Kruskal-Wallis-Test mit *Dunn's Multiple Comparison*. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Verändert nach [209].

Nach Stimulation mit den IFN α -Subtypen konnte sowohl für *APOBEC3G* als auch für *IFITM3* keine signifikante Induktion beobachtet werden (Abb. 21A und C). Dennoch zeigte sich bei *APOBEC3G* für IFN α 5, IFN α 14 und IFN α 16 die Tendenz eines mRNA-

Anstiegs. Bei *IFITM3* war dies für IFN α 4, IFN α 5 und IFN α 14 der Fall. Eine Signifikanz konnte für die IFN α 5- und IFN α 14-stimulierten Proben für *IDO1*, *ISG15* und *Tetherin* nachgewiesen werden (Abb. **21B**, **D** und **E**). Zudem führte auch die IFN α 16-Stimulation zu einer signifikant erhöhten *IDO1*-Expression und für *Tetherin* war dies nach IFN α 4-Stimulation der Fall. Die Infektion mit SARS-CoV-2 führte für keines der untersuchten ISGs zu einer erhöhten Expression. Auch in humanen AE Zellen schien für die getesteten ISGs die Induktion nach IFN α -Stimulation grundsätzlich mit dem antiviralen Effekt zu korrelieren, allerdings zeigt bspw. die signifikante Induktion von *IDO1* nach IFN α 16-Stimulation, dass grundsätzlich auch die gegen SARS-CoV-2 schwach antiviralen Subtypen ISGs induzieren. Der Zusammenhang zwischen antiviralem Effekt und Expression von ISGs machte daher eine detailliertere Untersuchung der ISG-Profile notwendig.

5.2.7 Transkriptomanalyse von humanen AE Zellen nach Stimulation mit IFN α -Subtypen

Das Netzwerk aus ISGs, deren Expression nach Stimulation mit IFN α induziert wird, beinhaltet hunderte und tausende beteiligter Proteine, die am antiviralen Effekt sowie der Regulation des IFN-Signalwegs beteiligt sind. In vorhergehenden Versuchen wurde versucht die relative Expression von Schlüssel-ISGs mit dem antiviralen Effekt der IFN α -Subtypen zu korrelieren. Aufgrund der Komplexität der ISGs ist es jedoch nicht möglich auf diese Weise ein vollständiges Bild über Prozesse, die durch die IFN α -Stimulation beeinflusst werden, zu erhalten. Aus diesem Grund wurde in Zusammenarbeit mit Toni Luise Meister (Ruhr-Universität Bochum) eine Analyse des Transkriptoms von hAE Zellen von vier Spendern durchgeführt. Dazu wurden die Zellen für 16 h mit 1.000 U/ml der IFN α -Subtypen stimuliert, anschließend lysiert und die isolierte RNA für die Transkriptomanalyse verwendet. Für diesen Versuch wurde zusätzlich auch mit IFN λ 3 stimuliert, da für dieses IFN ein starker antiviraler Effekt gegen SARS-CoV-2 beschrieben war [59, 99]. Die Ergebnisse für IFN λ 3 werden im Folgenden jedoch nicht im Detail wiedergegeben. Ebenfalls wurden SARS-CoV-2-infizierte Zellen mit in die Analyse eingeschlossen, um zelluläre Veränderungen durch die Infektion zu untersuchen. Analysiert wurden die Daten durch Daniel Todt (Ruhr-Universität Bochum) sowie Jean-Noel Billaud (Qiagen).

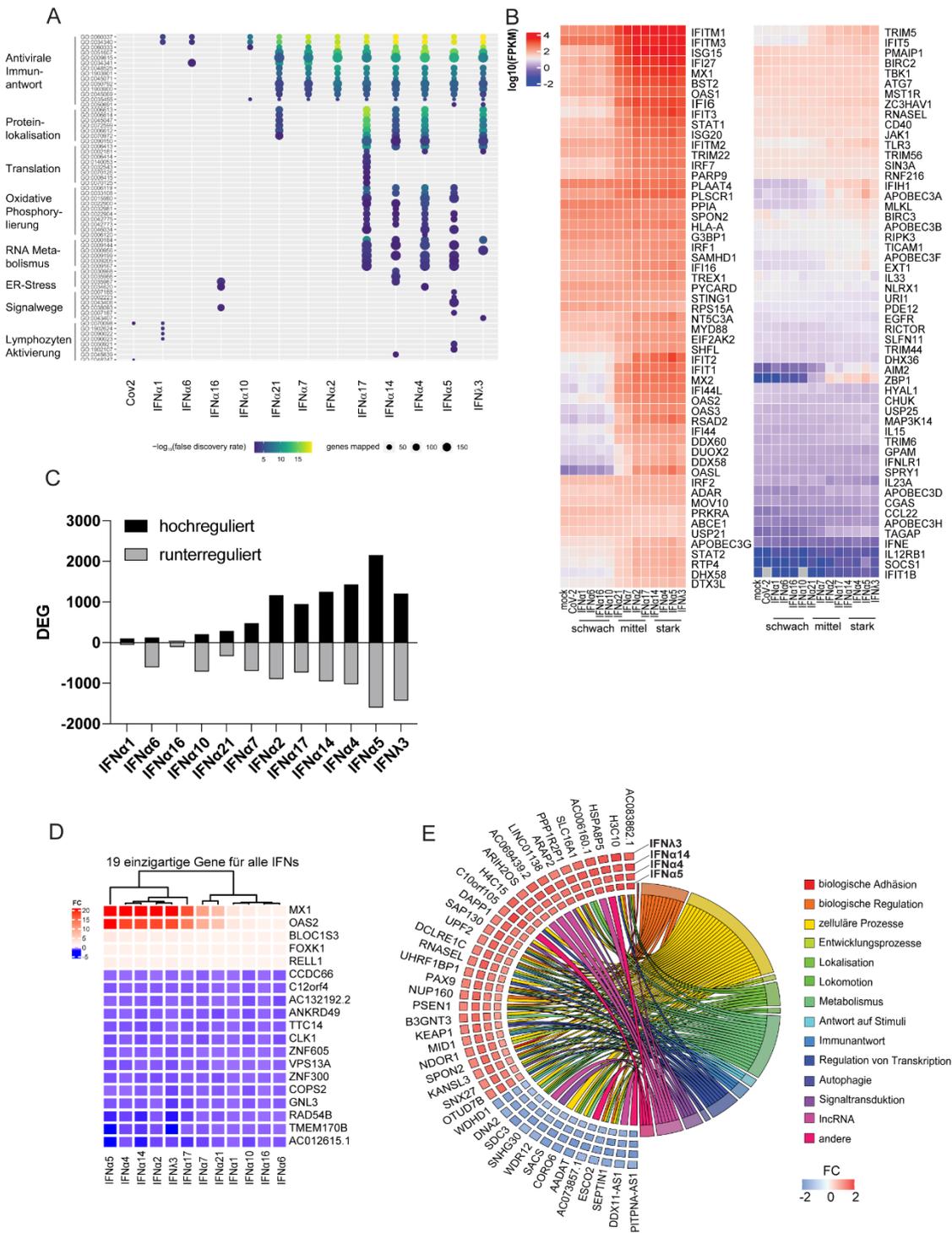


Abbildung 22: Transkriptomanalyse von hAE Zellen nach IFNα-Stimulation bzw. SARS-CoV-2-Infektion.

Humane AE Zellen wurden für 16 h mit 1.000 U/ml der verschiedenen IFNα-Subtypen stimuliert bzw. für 18 h mit 30.000 PFU/Well SARS-CoV-2 infiziert. Im Anschluss wurde zelluläre RNA isoliert und das Transkriptom der Zellen analysiert. Dargestellt sind: verschiedene biologische Prozesse (GO Prozesse), die durch IFNα-Subtypen oder SARS-CoV-2 induziert wurden (**A**); eine Heatmap der Gene, die der antiviralen Immunantwort zugeordnet sind (**B**); die Anzahl hoch- und runterregulierter Gene in IFNα-stimulierten Proben gegenüber den unstimulierten Proben (**C**); Heatmap der 19 einzigartigen Gene, die durch alle IFNα-Subtypen reguliert werden (**D**); ein Graph, der die relative Genexpression der 42 Gene zeigt, die einzigartig für die Gruppe der stark antiviralen IFN sind, und die Gene biologischen Prozessen

zuordnet (E). n = 4. Durchführung in Zusammenarbeit mit Toni Luise Meister (Ruhr-Universität Bochum). Analyse durch Daniel Todt (Ruhr-Universität Bochum) und Jean-Noel Billaud (Qiagen) Verändert nach [209].

Eine *gene ontology* (GO) Signalweg-Analyse zeigte interessanterweise, dass die IFN α -Subtypen, die einen mittleren oder starken antiviralen Effekt gegen SARS-CoV-2 aufwiesen, zu einer höheren Expression von Genen führten, die an der antiviralen Immunantwort beteiligt sind, aber auch zu Expression von Genen im Zusammenhang mit Proteinlokalisierung, oxidativer Phosphorylierung, RNA-Stoffwechsel, ER-Stress, Signalwegen oder der Lymphozyten-Aktivierung (Abb. **22A**). Besonders IFN α 4, IFN α 5 und IFN α 14, welche die stärksten antiviralen Effekte zeigten, führten zur stärksten Regulation dieser Gene. Interessanterweise wies auch IFN α 17 ein einzigartiges Muster auf, da es als einziger Subtyp Gene regulierte, die an der Translation beteiligt sind. Ein näherer Blick auf Gene, die der antiviralen Immunantwort zugeordnet sind, zeigte, dass die Gruppe an IFN α -Subtypen, die schwach antiviral wirkten (IFN α 1, IFN α 6, IFN α 10 und IFN α 16), eine vergleichsweise deutlich niedrigere Expression bestimmter ISGs aufwiesen im Vergleich zu den mittel und stark antiviralen IFN α -Subtypen (Abb. **22B**). Zwei Gruppen von ISGs dabei einen besonders großen Unterschied: die erste Gruppe beinhaltete u.a. *ISG15* und *MX1*, die zweite, bei der der Unterschied noch ausgeprägter war, beinhaltete neben anderen bspw. *OAS2*. Ein Blick auf die Gesamtzahl an differentiell regulierten Genen (DEG) nach IFN α -Stimulation im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle zeigt, dass die Subtypen, die besonders stark antiviral wirkten (IFN α 4, IFN α 5, IFN α 14), die größte Zahl an Genen sowohl hoch-, als auch runterregulierten (Abb. **22C**). Insgesamt fanden sich im Transkriptom 19 gemeinsame Gene, die durch alle IFN α -Subtypen differentiell reguliert werden, darunter auch *MX1* und *OAS2* (Abb. **22D**). Für diese beiden Gene war auch am deutlichsten ein Unterschied zwischen den IFN α -Subtypen zu erkennen, der die Subtypen klar entsprechend des antiviralen Effekts aufteilte. Für die IFN, die den stärksten antiviralen Effekt zeigten (IFN α 4, IFN α 5 und IFN α 14; IFN λ 3 ist aus technischen Gründen ebenfalls in der Analyse enthalten), konnten 42 DEG analysiert werden, die spezifisch für diese sind. Darunter befanden sich Gene, die mit der Regulation von Transkription, der Signaltransduktion und dem Metabolismus assoziiert sind (Abb. **22E**). Auch *RNaseL* konnte identifiziert werden, welche Bestandteil der antiviralen Maschinerie von *OAS2* ist. Zusammenfassend konnte die Transkriptomanalyse Subtyp-spezifische Regulationssignaturen deutlich machen, die

möglicherweise an den beobachteten Unterschieden der antiviralen Aktivität beteiligt sind.

5.2.8 Proteomanalyse von humanen AE Zellen nach SARS-CoV-2-Infektion und IFN-Stimulation

Da die Analyse des Transkriptoms unterschiedliche, Subtyp-spezifische Muster nach Stimulation mit IFN α aufzeigte und mögliche Unterschiede als Grund für die verschiedenen antiviralen Effekte zu Vorschein brachte, wurde zusätzlich auch eine Proteomanalyse vorgenommen. Dafür wurden exemplarisch IFN α 5, IFN α 7 und IFN α 16 als Vertreter der stark, mittel und schwach antiviral wirkenden Subtypen verwendet, um mögliche Schlüssel-Moleküle während der SARS-CoV-2-Infektion auffindig zu machen. IFN λ 3 wurde ebenfalls verwendet und ist aus technischen Gründen in der Abbildung enthalten. Auf die Ergebnisse für IFN λ 3 soll nachfolgend aber nicht im Detail eingegangen werden. Die hAE Zellen von 4 Spendern wurden für 16 h mit 1.000 U/ml der Subtypen stimuliert und Proben für die Proteomanalyse gesammelt. Dieser frühe Zeitpunkt ($t = 0$) spiegelt die Situation wider, die zur Zeit der Infektion in den Experimenten zur Bestimmung der antiviralen Effekte in den Zellen vorherrschte (siehe Kap. 4.2.6). Zusätzlich wurde auch ein später Zeitpunkt ($t = 72$ h) für die Analysen berücksichtigt, für den es sowohl Proben gibt, die lediglich mit IFN stimuliert wurden, und Proben, die dazu auch mit SARS-CoV-2 infiziert wurden, um mögliche Einflüsse von viralen Proteinen zu berücksichtigen. Der gesamte Versuchsablauf ist in Abb. **23A** dargestellt. Die Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Toni Luise Meister (Ruhr-Universität Bochum) durchgeführt. Die Analyse der Daten erfolgte durch das Medizinische Proteom-Center (Bochum).

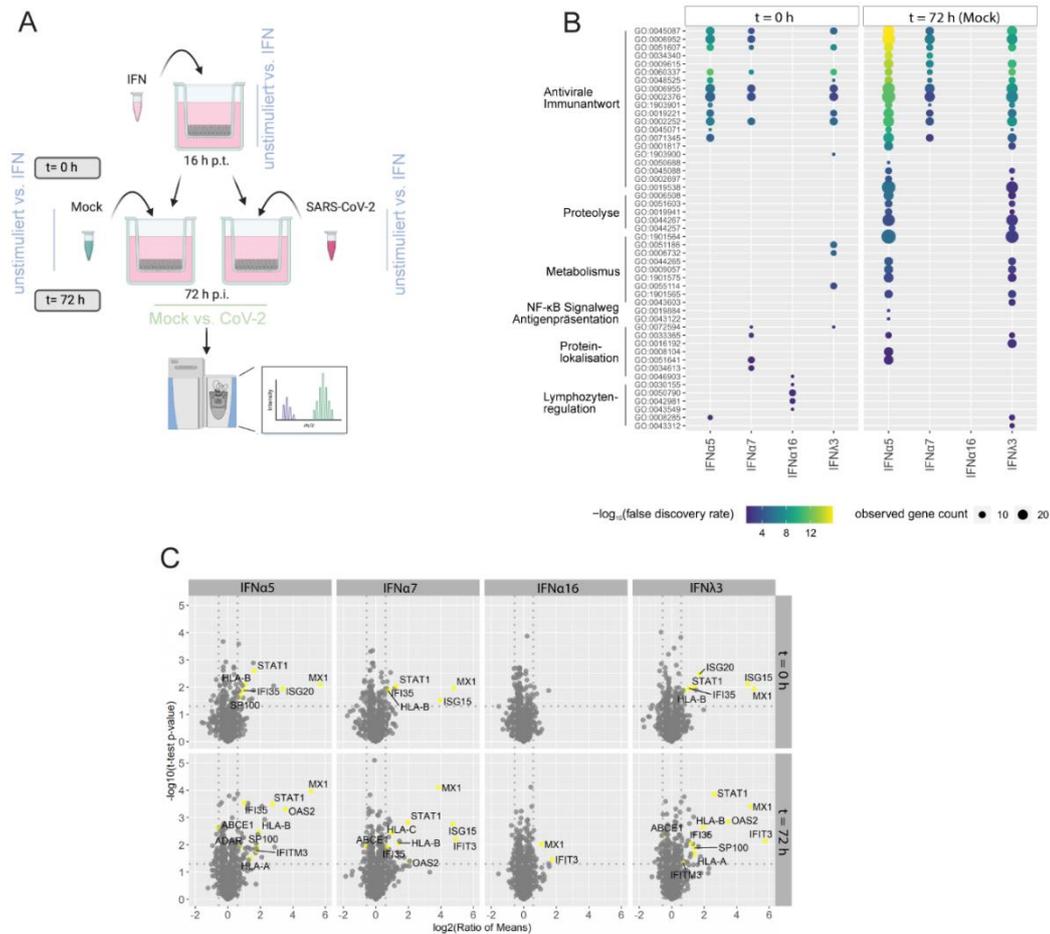


Abbildung 23: Proteomanalyse von hAE Zellen nach IFN α -Stimulation.

Humane AE Zellen wurden für 16 h ($t = 0$ h) oder insgesamt 88 h ($t = 72$ h) mit 1.000 U/ml der angegebenen IFN stimuliert. Zum Zeitpunkt $t = 0$ h wurde je ein Well pro IFN mit 30.000 PFU/Well SARS-CoV-2 infiziert und ein zweites Well mit einer Mock-Kontrolle stimuliert. Dargestellt sind: der schematische Versuchsaufbau (**A**); die Induktion biologischer Prozesse 16 h ($t = 0$ h) bzw. 88 h ($t = 72$ h) nach IFN-Stimulation (**B**); *Volcano Plots* der hAE Zellen zu beiden Zeitpunkten, ISGs sind gelb markiert (**C**). $n = 4$. Der Versuch wurde in Zusammenarbeit mit Toni Luise Meister (Ruhr-Universität Bochum) durchgeführt. Die Analyse erfolgte durch das Medizinische Proteom-Center (Bochum). Verändert nach [209].

Die GO-Analyse von Proteinen, die unterschiedlich stark abundant sind mit und ohne Stimulation von IFN α -Subtypen, zeigte zu beiden Zeitpunkten, dass es zu einer starken Anreicherung an Proteinen der antiviralen Immunantwort durch IFN α 5 und IFN α 7, jedoch nicht durch IFN α 16 kam (Abb. **23B**). Für IFN α 16 konnte lediglich zum frühen Zeitpunkt eine Anreicherung von Proteinen der Lymphozyten-Regulation beobachtet werden, die aber *in vitro* vermutlich keinen Einfluss auf die SARS-CoV-2-Replikation hat. Anders sieht es womöglich *in vivo* aus. Zum Zeitpunkt 72 h konnte zudem für IFN α 5-stimulierte Proben eine Anreicherung von Proteinen assoziiert mit Proteolyse, Metabolismus, NF- κ B-Signalweg, Antigenpräsentation und Proteinlokalisierung festgestellt werden. In Bezug auf den IFN-Signalweg zeigte sich, dass prominente Vertreter wie u.a. STAT1, Mx1, ISG15, ISG20 und IFI35 nur nach Stimulation mit IFN α 5 und IFN α 7 stark abundant waren,

während sie in IFN α 16-stimulierten sowie unstimulierten Proben nicht nachgewiesen werden konnten (Abb. 23C).

Da diese Ergebnisse bereits einen interessanten Einblick in die möglichen Schlüssel-Moleküle für den antiviralen Effekt der IFN α -Subtypen liefern konnten, wurden nachfolgend auch die infizierten Proben näher analysiert. Dafür wurden zusätzlich alle 24 h nach der Infektion die Zellen apikal gewaschen und die Waschungen zur Virustiter-Bestimmung mittels Endpunkt-Verdünnung genutzt, um sicherzustellen, dass sowohl Infektion als auch IFN-Stimulation wie gewünscht funktioniert haben.

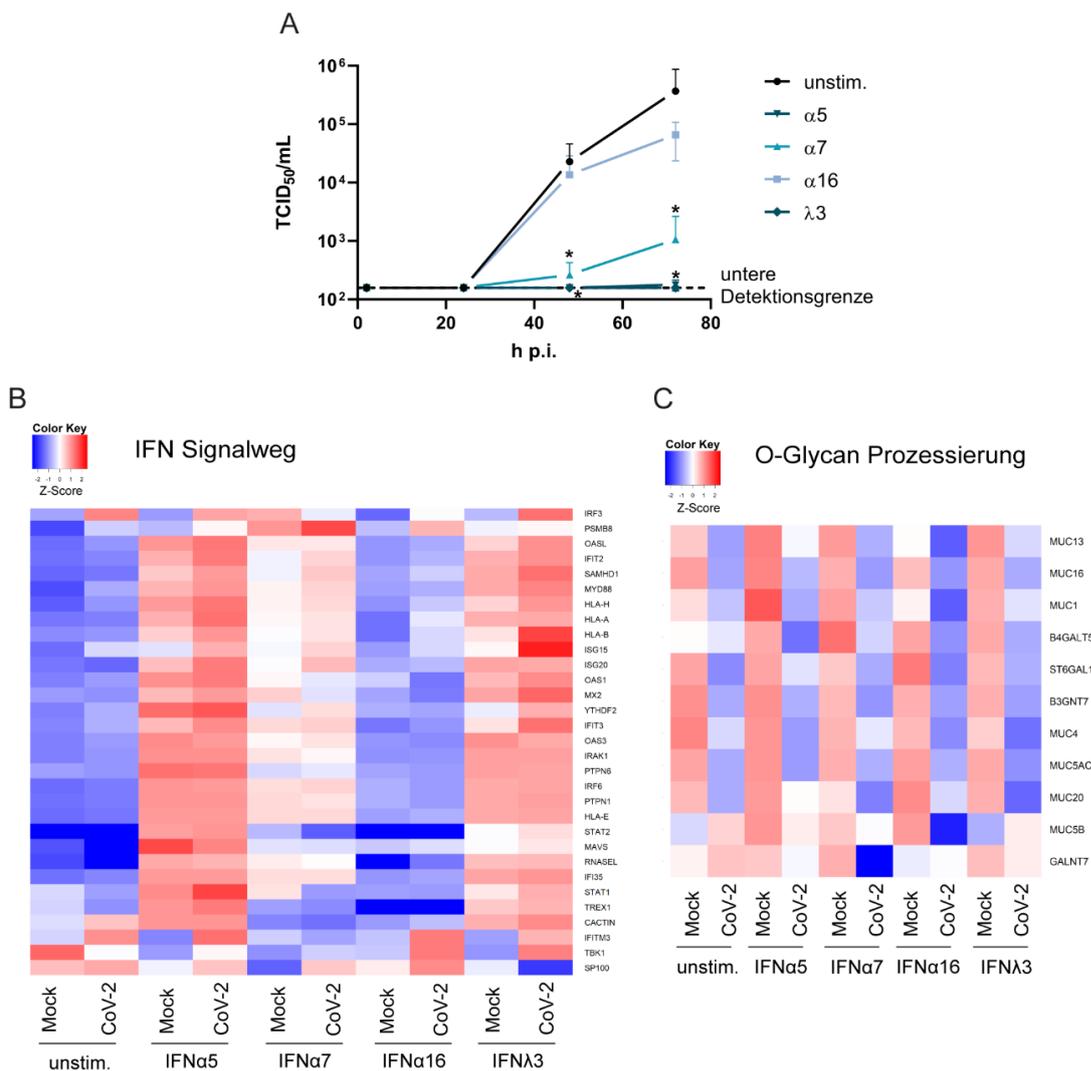


Abbildung 24: Proteomanalyse von hAE Zellen nach IFN-Stimulation in SARS-CoV-2 infizierten Zellen.

Humane AE Zellen wurden für 16 h mit 1.000 U/ml der angegebenen IFN stimuliert. Zum Zeitpunkt $t = 0$ h wurde je ein Well pro IFN mit 30.000 PFU/Well SARS-CoV-2 infiziert und ein zweites Well mit einer Mock-Kontrolle stimuliert. 72 h nach der Infektion wurden die Proteome analysiert (siehe auch Abb. 23A für den Versuchsaufbau). Dargestellt sind: die Kinetik der antiviralen Aktivität der IFN zur Validierung der Infektion, bestimmt durch Titration mit Endpunkt-Verdünnung (**A**); Heatmaps von differentiell exprimierten Proteinen, die mit dem IFN-Signalweg (**B**) oder der O-Glycan-Prozessierung (**C**) assoziiert werden. $n = 4$. A: Gezeigt wird der Mittelwert mit Standardabweichung. Der Versuch wurde in Zusammenarbeit mit Toni Luise Meister (Ruhr-Universität Bochum) durchgeführt. Die Analyse erfolgte durch das Medizinische Proteom-Center

(Bochum). Statistik: IFN-stimulierte Proben getestet gegen unstim. Kontrolle mittels Kruskal-Wallis-Test mit *Dunn's Multiple Comparison*. *p < 0,05. Verändert nach [209].

Die Bestimmung der viralen Titer über die Zeit zeigte, dass die Infektion funktioniert hat und die Titer über die Dauer des Versuchs zunahm (Abb. **24A**). Auch die IFN-Stimulation führte wie bereits zuvor in Abb. 20 gezeigt zu einer Reduktion der viralen Replikation, die sowohl für IFN α 5 als auch IFN α 7 nach 48 h und 72 h signifikant war. Interessanterweise machte ein Vergleich der infizierten und nicht-infizierten Proben deutlich, dass die Infektion scheinbar kaum Einfluss auf die Abundanz von Proteinen des IFN-Signalwegs hat (Abb. **24B**). Auf der anderen Seite wiederum zeigte eine Analyse von Proteinen der O-Glycan-Prozessierung, dass es durch die Infektion mit SARS-CoV-2 unabhängig von der IFN-Stimulation zu einer Verringerung zahlreicher Mucine (MUC1, MUC4, MUC5AC, MUC13, MUC16, MUC20, MUC58) kam (Abb. **24C**). Mucine sind Proteine, die den Mukus zusammensetzen und so bspw. den respiratorischen Trakt vor Pathogenen schützen [131]. Das Herunterregulieren dieser Proteine könnte ein wichtiger Mechanismus in der Pathogenese von SARS-CoV-2 sein. Im Gesamten konnten durch die Proteomanalyse mögliche Schlüssel-Moleküle und biologische Prozesse für die antiviralen Effekte der IFN α -Subtypen als auch Mechanismen in der Pathogenese des Virus identifiziert werden.

5.2.9 Der Effekt einer Kombinationstherapie mit IFN α und Remdesivir auf SARS-CoV-2

Derzeit stehen neben einer Impfung als Prophylaxe kaum Medikamente für die Behandlung einer COVID-19-Infektion zur Verfügung. Remdesivir, ein direkt-antiviral wirksamer Arzneistoff, der die RdRP inhibiert, wurde in einigen Studien mit einer verkürzten Hospitalisierung von schwer erkrankten Patienten in Verbindung gebracht und daher auch als Notfallmedikament zugelassen [16, 73]. Neuere Studien jedoch konnten keinen positiven Effekt auf den Zustand schwer erkrankter Patienten durch Remdesivir alleine belegen [175]. Da IFN α 5 in den durchgeführten Versuchen stets einen starken antiviralen Effekt zeigte, sollte auch die antivirale Kapazität einer Kombinationstherapie von IFN α 5 und Remdesivir untersucht werden. Dazu wurden Vero E6 Zellen entweder 16 h mit IFN α 5 oder 1 h mit Remdesivir oder beidem in Kombination in serieller Verdünnung vorstimuliert (Prä-Stimulation), infiziert und nach 24 h wurde mittels icELISA die intrazelluläre Menge an SARS-Nukleoprotein bestimmt. Da im Kontext von Patienten

eine prophylaktische Therapie mit diesen beiden Stoffen nicht möglich ist, wurde der Versuch auch mit einer Stimulation 8 h nach der Infektion durchgeführt (Post-Stimulation). Zusätzlich wurde die Kombinationstherapie auch mit Remdesivir und IFN α 2 durchgeführt, da dies der klinisch zugelassene Subtyp ist. Der schematische Versuchsablauf ist in Abb. 25A dargestellt. Der Versuch wurde in Zusammenarbeit mit Toni Luise Meister (Ruhr-Universität Bochum) durchgeführt.

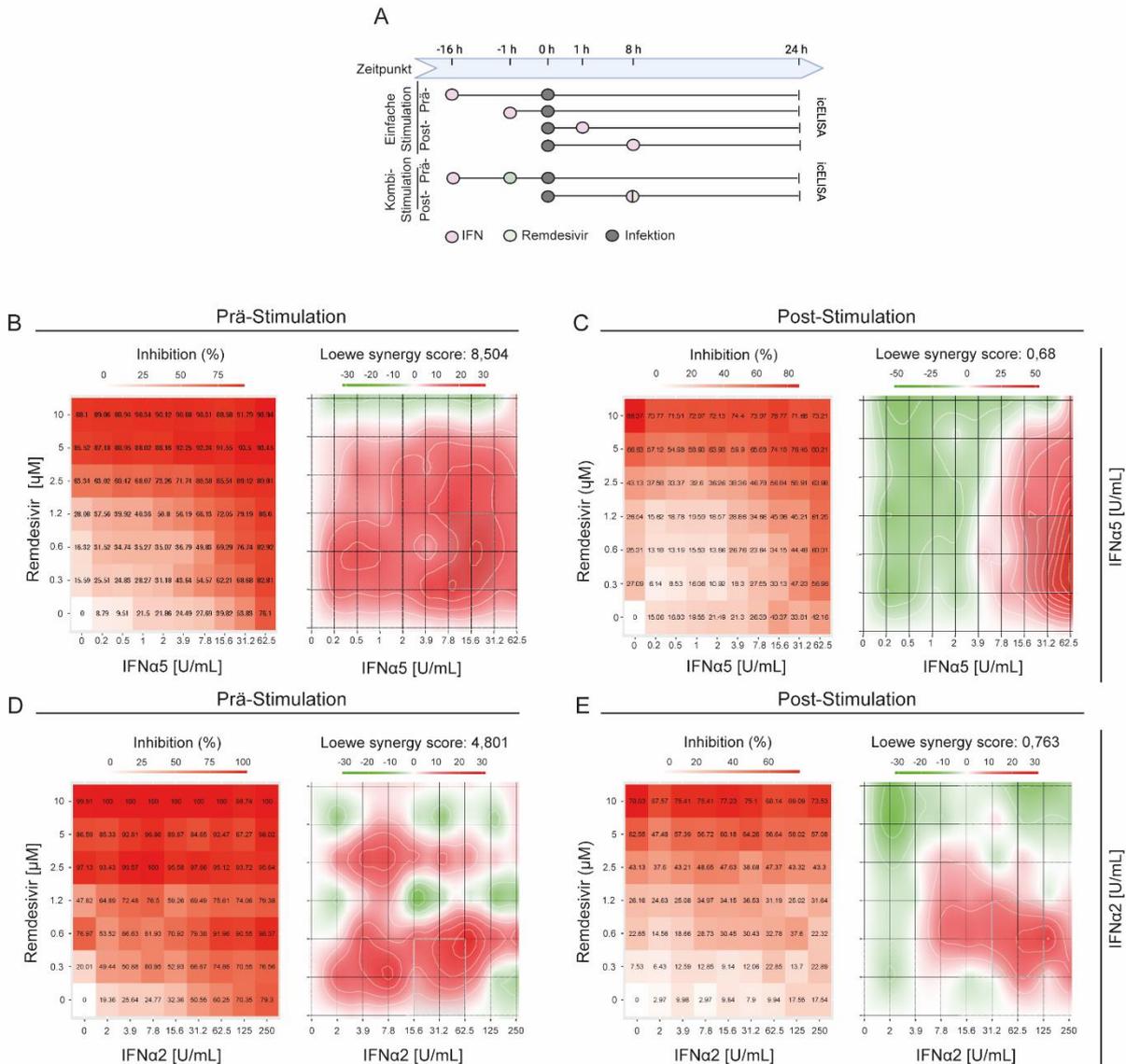


Abbildung 25: Kombinationsbehandlung von SARS-CoV-2 infizierten Vero E6 Zellen mit IFN α und Remdesivir.

Vero E6 Zellen wurden mit 2.000 PFU SARS-CoV-2 infiziert und das intrazelluläre virale Nukleoprotein mittels icELISA gemessen. Die Zellen wurden entweder vor oder nach der Infektion mit IFN α 2, IFN α 5 oder Remdesivir behandelt. Dargestellt sind: der schematische Versuchsaufbau mit den Stimulationszeiten (**A**); Inhibition der viralen Replikation durch IFN α 5 und Remdesivir durch Stimulation vor (Prä-Stimulation, **B**) und nach (Post-Stimulation, **C**) der Infektion. Der Kombinationseffekt wurde durch Analyse mit der Webapplikation Synergy Finder ausgerechnet; Inhibition der viralen Replikation durch IFN α 2 und Remdesivir durch Stimulation vor (**D**) und nach (**E**) der Infektion. n = 3. Der Versuch wurde in Zusammenarbeit mit Toni Luise Meister (Ruhr-Universität Bochum) durchgeführt. Verändert nach [209]

Um den antiviralen Effekt der Kombinationstherapie zu quantifizieren, wurde der beobachtete Effekt mit dem erwarteten Effekt auf Grundlage der Ergebnisse aus den Einzelstimulationen mithilfe des *Loewe additivity models* verglichen. In diesem Model deutet ein δ -score (*Loewe synergy score*) von über 10 auf einen synergistischen Effekt der beiden Stimulantien hin. Für die Prä-Stimulation konnte ein starker Kombinationseffekt mit mehr als 90 % viraler Inhibition für die hohen Konzentrationen sowohl für IFN α 5 als auch IFN α 2 beobachtet werden (Abb. **25B** und **D**). Die δ -scores deuteten mit 8,504 und 4,801 auf einen keinen synergistischen, sondern einen additiven Effekt von IFN α und Remdesivir hin. Entsprechend der Erwartungen aufgrund der Kinetikversuche mit IFN α 5 (siehe Kapitel 4.2.4) lag die antivirale Inhibition bei der Post-Stimulation dosisabhängig mit maximal etwas über 70 % ein wenig niedriger als die Prä-Stimulation (Abb. **25C** und **E**). Auch die δ -scores lagen für beide Kombinationen unter 1 und damit deutlich niedriger als bei der Prä-Stimulation.

Um einen möglichen zytotoxischen Effekt der Kombinationstherapie als Ursache für die starke antivirale Inhibition auszuschließen, wurden die Versuche ohne Infektion wiederholt und die Zellviabilität bestimmt.

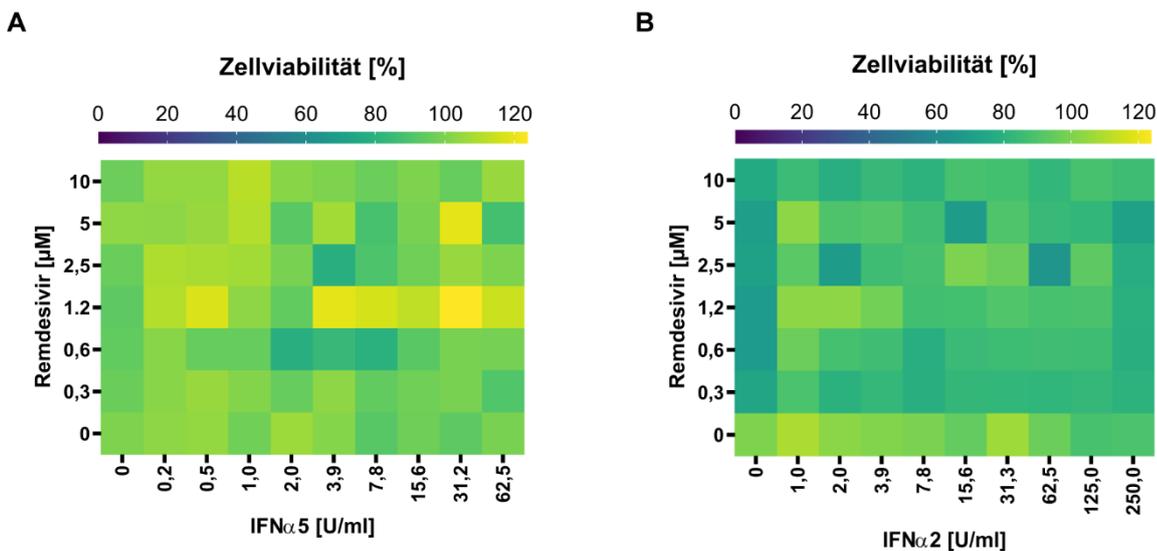


Abbildung 26: Zellviabilität von Vero E6 Zellen nach Stimulation mit IFN α 2 oder IFN α 5 in Kombination mit Remdesivir.

Vero E6 Zellen wurden für insgesamt 40 h mit den angegebenen Konzentrationen IFN α 2 oder IFN α 5 und für 25 h mit den angegebenen Konzentrationen Remdesivir stimuliert. Danach wurde die Zellviabilität gemessen. n = 1, Messung in Triplikaten. Gezeigt wird der Mittelwert. Verändert nach [209].

Sowohl für die Kombination von IFN α 5 als auch von IFN α 2 mit Remdesivir konnte keine Zytotoxizität gemessen werden (Abb. **26A** und **B**). Für alle Konzentrationen von IFN α 5 und Remdesivir lag die Zellviabilität bei nahezu 100 %. Die Werte für die Kombination

von IFN α 2 und Remdesivir liegen im Allgemeinen etwas niedriger, deuteten aber mit etwa 80 % auch nicht auf einen starken zytotoxischen Effekt hin.

Um diese Ergebnisse auch in natürlichen Zielzellen von SARS-CoV-2 zu bestätigen, wurden ausgewählte Konzentrationen von IFN α 5 und Remdesivir für die Stimulation infizierter hAE Zellen als Post-Stimulation ausgewählt. Ein ebenso großes Spektrum an Konzentrationen wie bei den vorherigen Versuchen konnte aufgrund der limitierten Verfügbarkeit an Primärzellen nicht analysiert werden. Die verwendeten Konzentrationen wurden aufgrund der Vorergebnisse in Vero E6 Zellen ausgewählt. Die hAE Zellen von drei Spendern wurden mit SARS-CoV-2 infiziert und nach 8 h mit drei verschiedenen Kombinationen aus IFN α 5 und Remdesivir stimuliert. Die Zellen wurden alle 24 h nach der Infektion apikal gewaschen und der virale Titer mittels Endpunkt-Verdünnung bestimmt. Der Versuch wurde in Zusammenarbeit mit Toni Luise Meister (Ruhr-Universität Bochum) durchgeführt.

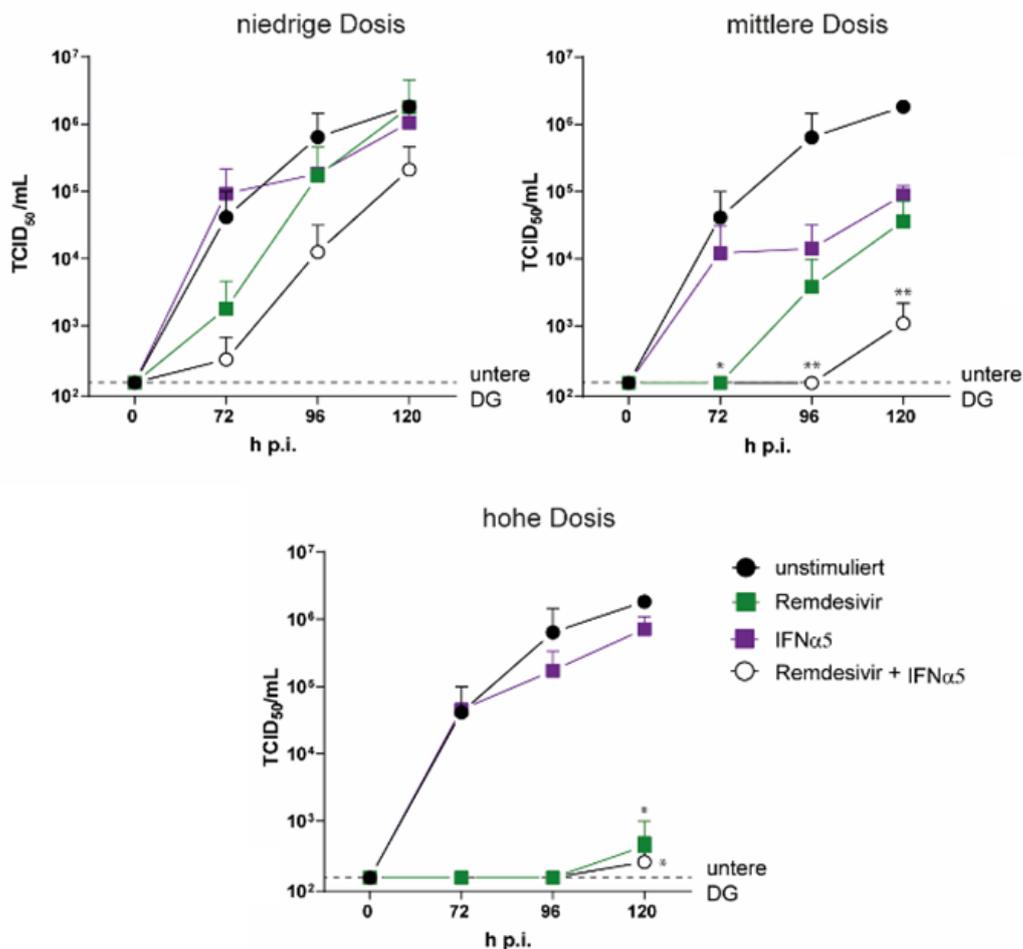


Abbildung 27: Kombinationsbehandlung von SARS-CoV-2 infizierten hAE Zellen mit IFN α 5 und Remdesivir.

Humane AE Zellen wurden mit 30.000 PFU/Well SARS-CoV-2 infiziert und nach 8 h mit drei verschiedenen Dosen IFN α 5 und Remdesivir alleine oder in Kombination behandelt. Die virale Replikation wurde zu den angegebenen Zeitpunkten durch Titration der apikalen Waschungen mit Endpunkt-Verdünnung bestimmt.

Niedrige Dosis: 0,313 μM Remdesivir, 0,2444 U/ml IFN α 5; mittlere Dosis: 0,63 μM Remdesivir, 15,625 U/ml IFN α 5; hohe Dosis: 2,5 μM Remdesivir, 1,953 U/ml IFN α 5. n = 3. Gezeigt wird der Mittelwert mit Standardfehler. Statistik: Die Behandlung wurde jeweils getestet gegen die unstimulierte Kontrolle mittels Kruskal-Wallis Test mit *Dunn's Multiple Comparison*. *p < 0,05; **p < 0,01.

Für alle drei kombinierten Konzentrationen konnte ein additiver Effekt für die Stimulation 8 h nach der Infektion beobachtet werden (Abb. 27). Für die niedrige Dosis (0,313 μM Remdesivir und 0,2444 U/ml IFN α 5) konnte sowohl für die Einzelstimulationen als auch für die Kombination nur ein geringer Effekt beobachtet werden, der nicht statistisch signifikant war. Bei der mittleren Dosis (0,63 μM Remdesivir und 15,625 U/ml IFN α 5) konnten beide Einzelbehandlungen für eine nicht signifikante Reduktion um den Faktor 100 gegenüber der unstimulierten Probe sorgen. Die kombinierte Stimulation konnte in diesem Fall einen deutlich besseren, signifikanten Effekt erzielen. Bei der hohen Dosis (2,5 μM Remdesivir und 1,953 U/ml IFN α 5) führte die Stimulation mit IFN α 5 alleine zu keiner nennenswerten Reduktion der viralen Titer. Da jedoch Remdesivir alleine und entsprechend auch die Kombination zu einer starken, signifikanten Reduktion der Virusmenge führte, wurde der positive Effekt der Kombination in diesem Fall nicht so deutlich wie für die mittlere Kombination.

Zusammengenommen konnte gezeigt werden, dass die kombinierte Gabe von IFN α 5 mit einem direkt-antiviral wirksamen Wirkstoff die virale Replikation auf additive Weise inhibieren konnte und somit einen möglichen alternativen Ansatz für die Therapie von COVID-19 darstellt.

5.2.10 Die Modulation des antiviralen Effekts von IFN α -Subtypen durch IL-1 β

Die Induktion von ISGs durch Stimulation mit IFN α stellt einen essentiellen Bestandteil der antiviralen Immunantwort dar. Die Inhibition der Typ-I-IFN-Antwort bzw. der ISG-Induktion ist ein weit verbreiteter Mechanismus von Viren und stellt die Wichtigkeit von ISGs heraus. Aus diesem Grund ist die Verstärkung der Typ-I-IFN-Antwort bzw. der ISG-Induktion ein möglicher Ansatz, um die antiviralen Effekte der IFN α -Subtypen zu verbessern. In einigen Studien wurde das proinflammatorische Zytokin IL-1 β als möglicher Modulator der IFN α -Antwort diskutiert. Während IL-1 β durch Bindung an seinen Rezeptor hauptsächlich den NF- κ B-Signalweg aktiviert, gibt es auch Belege, dass dadurch STAT3 aktiviert werden kann [6, 255]. Außerdem wurde beobachtet, dass eine Kostimulation von IFN α und IL-1 β in einer Leberzelllinie zu einer stärkeren und langlebigeren STAT1-Phosphorylierung führte [93]. Eine neuere Studie konnte belegen,

dass die kombinierte Stimulation von IFN α mit IL-1 β zu einer erhöhten ISG-Expression, verbesserten STAT3-Aktivierung und stärkeren Inhibition von HCV in einer Huh7-Reporterzelllinie, bei der die HCV-Replikation mit der Expression von Luciferase korreliert, im Vergleich zu IFN α alleine geführt hat [192]. Aus diesem Grund wurde im folgenden Abschnitt die Modulation des antiviralen Effekts von IFN α -Subtypen durch IL-1 β in Bezug auf die Inhibition der viralen Replikation und der ISG-Expression für HBV und SARS-CoV-2 untersucht.

Für die Untersuchung des Effekts auf HBV wurden differenzierte HepaRG Zellen mit HBV infiziert und regelmäßig mit IL-1 β alleine oder in Kombination mit einem der angegebenen Subtypen von IFN α stimuliert. Acht Tage nach der Infektion wurde die Menge an HBsAg in den Überständen bestimmt und die IL-1 β Proben mit den entsprechenden Proben ohne IL-1 β verglichen. Für die Experimente zur ISG-Expression wurden differenzierte HepaRG-Zellen für 18 h mit IL-1 β alleine oder in Kombination mit einem der angegebenen IFN α -Subtypen stimuliert. Danach wurde die RNA isoliert und die relative Genexpression von *ISG15*, *ISG20* und *MX1* mittels qPCR bestimmt.

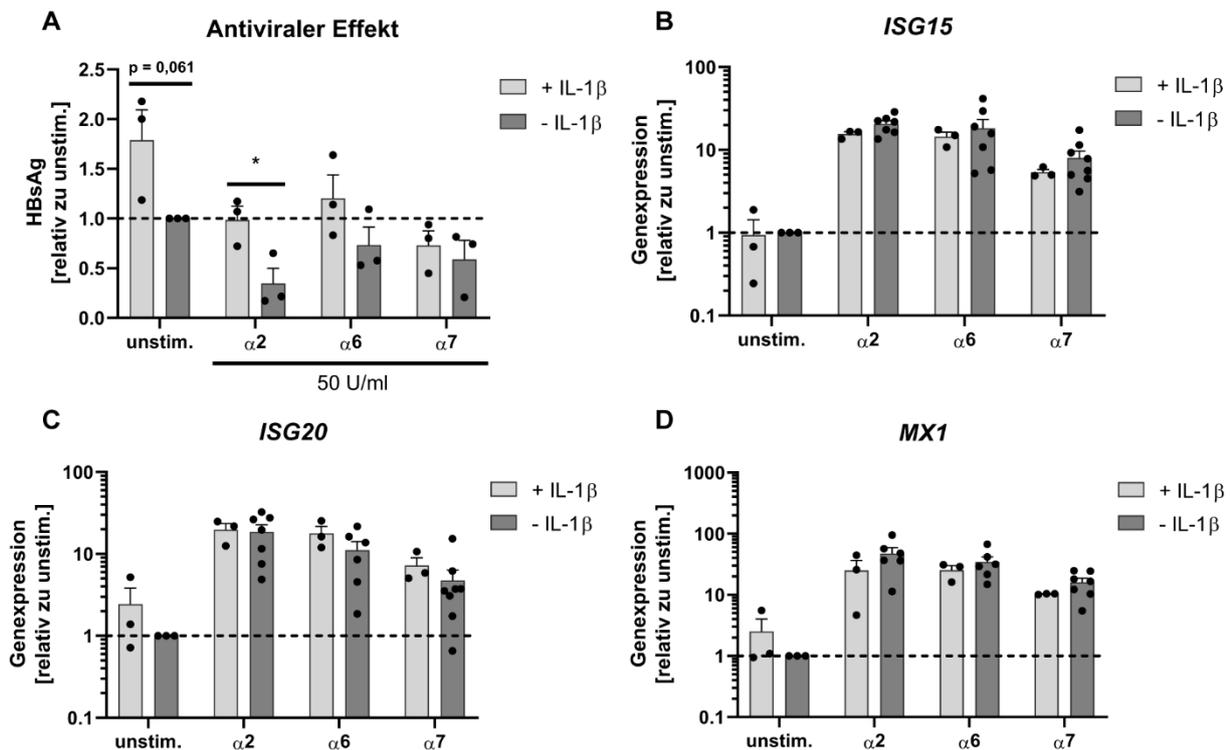


Abbildung 28: Der Effekt von IL-1 β auf den antiviralen Effekt von IFN α -Subtypen und die ISG-Expression nach Stimulation mit IFN α -Subtypen in HepaRG Zellen.

Differenzierte HepaRG Zellen wurden mit HBV mit 500 geq/Zelle infiziert und parallel zur Infektion sowie an Tag 1, 4 und 6 nach Infektion mit 5 ng/ml IL-1 β , 1.000 U/ml der IFN α Subtypen oder beidem in Kombination behandelt. An Tag 8 wurden die HBsAg-Titer im Überstand mittels ELISA bestimmt (A). Zur Untersuchung der ISG-Expression wurden dHepaRG Zellen für 18 h mit 5 ng/ml IL-1 β , 1.000 U/ml der IFN α Subtypen oder beidem in Kombination stimuliert. Im Anschluss wurde zelluläre RNA isoliert und die Genexpression von *ISG15*, *ISG20* und *MX1* mittels qPCR bestimmt. Die Expression wurde auf das

Haushaltsgen *GAPDH* normalisiert und die relative Expression gegenüber einer unstimulierten Kontrolle mit der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode errechnet (**B-D**). A: n = 3; B-D: + IL-1 β n = 3; - IL-1 β unstim. n = 3, IFN α 2 n = 7, n = 6 für *MX1*, IFN α 6 n = 6, n = 7 für *ISG15*, IFN α 7 n = 8, n = 7 für *MX1*. Gezeigt wird der Mittelwert mit Standardfehler. Statistik: Für jeden IFN α Subtyp bzw. unstim. wurde jeweils + IL-1 β gegen - IL-1 β getestet mittels ungepaartem t-Test. *p < 0,05.

Durch eine kombinierte Stimulation von IFN α -Subtypen und IL-1 β konnte für HBV-infizierte Zellen kein verbesserter antiviraler Effekt beobachtet werden (Abb. **28A**). Für die Stimulation mit IFN α 2, die alleine die HBsAg-Menge auf etwa 40 % verringern konnte, ergab sich sogar ein signifikant schlechterer Effekt bei gleichzeitiger Zugabe von IL-1 β . Auch für die IFN α 6- und IFN α 7-stimulierten Proben zeigte sich, dass IL-1 β den antiviralen Effekt tendenziell verringerte. Interessant war auch, dass die Stimulation mit IL-1 β alleine gegenüber der unstimulierten Kontrolle zu einer etwa 1,8-fach so hohen Menge an HBsAg führte. Dieser Unterschied war zudem fast signifikant. Für die Induktion der ISG-Expression konnte festgestellt werden, dass alle IFN α -Subtypen zu einer starken Induktion der drei ISGs führten (Abb. **28B – D**). Die Induktion wurde jedoch durch Zugabe von IL-1 β nicht erhöht und auch IL-1 β alleine induzierte keine ISG-Expression. Insgesamt konnte für dHepaRG Zellen keine verbesserte ISG-Induktion durch IL-1 β beobachtet werden und bezogen auf die Infektion mit HBV schien diese durch IL-1 β -Zugabe sogar begünstigt gewesen zu sein.

Da die Effekte der IFN α -Subtypen sich zwischen verschiedenen Zelltypen und Virusinfektionen unterscheiden, wurde der Effekt von IL-1 β auch für Vero E6 Zellen bzw. die SARS-CoV-2-Infektion untersucht. Dazu wurden Vero E6 Zellen zunächst mit seriell verdünnten IFN α -Subtypen alleine oder in Kombination mit IL-1 β für 1 h stimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit SARS-CoV-2 infiziert und nach 24 h die Menge an intrazellulärem Nukleoprotein mittels icELISA gemessen. Für diesen Versuch wurden exemplarisch IFN α 5, IFN α 7 und IFN α 16 ausgewählt, da sie entsprechend einen starken, mittleren und schwachen antiviralen Effekt zeigten (Abb. **17** und **20**).

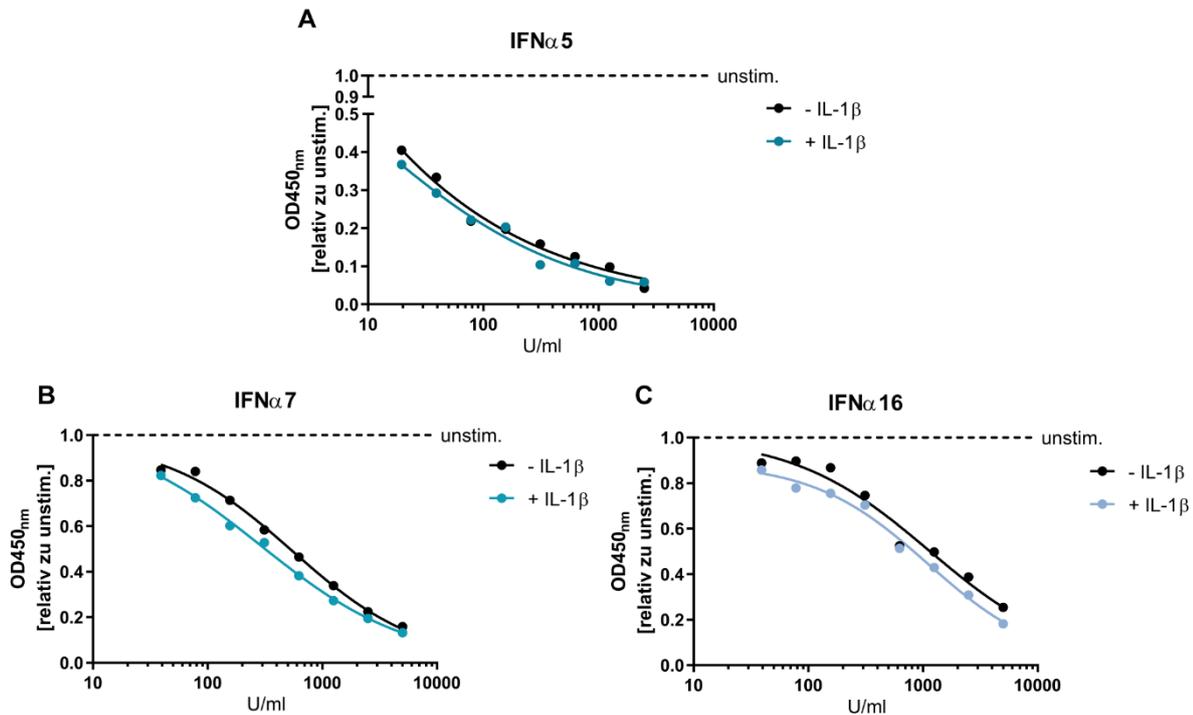


Abbildung 29: Der Effekt von IL-1 β auf den antiviralen Effekt von IFN α -Subtypen in Vero E6 Zellen. Vero E6 Zellen wurden für 1 h mit 10 ng/ml IL-1 β und den angegebenen Konzentrationen IFN α 5 (A), IFN α 7 (B) oder IFN α 16 (C) stimuliert und anschließend mit 350 PFU/ml SARS-CoV-2 infiziert. Nach 24 h wurde die virale Replikation mittels icELISA gemessen. Die Kurven zeigen eine nichtlineare Regression der tatsächlichen Werte, die abgebildeten Punkte zeigen die Mittelwerte. n = 3.

Für die Stimulation mit IFN α 5 zeigte sich ein dosisabhängiger Effekt der Inhibition der viralen Replikation im icELISA, die auch bei der niedrigsten Konzentration nur bei etwa 40 % lag. Die zusätzliche Zugabe von IL-1 β zeigte allerdings keine Verbesserung des antiviralen Effekts (Abb. 29A). Der Effekt durch IFN α 7 war entsprechend der Vorergebnisse deutlich geringer mit nur etwa 20 % Inhibition bei der niedrigsten Konzentration von 39 U/ml. Jedoch war erkennbar, dass die zusätzliche Stimulation mit IL-1 β besonders bei den niedrigeren Konzentrationen wie 78 U/ml oder 156 U/ml zu einer tendenziellen Verbesserung des antiviralen Effekts um etwa 10 % führte, auch wenn diese nicht signifikant war (Abb. 29B). Eine ähnliche Tendenz konnte bei IFN α 16 beobachtet werden, bei dem auch bei den niedrigeren Konzentrationen, bei denen der Effekt des IFN α -Subtyps alleine eher gering war, die Zugabe von IL-1 β den Effekt verstärkte.

Da die Ergebnisse des Versuchs darauf hindeuteten, dass IL-1 β bei einem bereits starken Effekt von IFN α alleine zu keiner Verbesserung mehr führt, diese jedoch bei den niedrigeren Konzentrationen von IFN α 7 und IFN α 16 tendenziell zu erkennen war, wurde der Versuch mit den Subtypen IFN α 7 und IFN α 16 wiederholt. Diesmal wurde jedoch

konstant mit 78 U/ml IFN α stimuliert und IL-1 β seriell verdünnt, um mögliche konzentrationsabhängige Effekte von IL-1 β zu untersuchen.

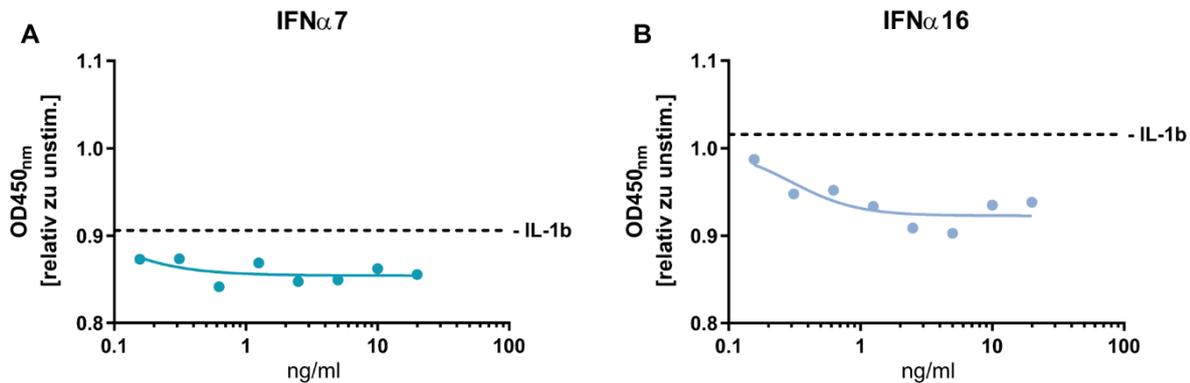


Abbildung 30: Der konzentrationsabhängige Effekt von IL-1 β auf den antiviralen Effekt von IFN α -Subtypen in Vero E6 Zellen.

Vero E6 Zellen wurden für 1 h mit den angegebenen Konzentrationen IL-1 β und 78 U/ml IFN α 7 (A) oder IFN α 16 (B) stimuliert und anschließend mit 350 PFU/ml SARS-CoV-2 infiziert. Nach 24 h wurde die virale Replikation mittels icELISA gemessen. Die Kurven zeigen eine nichtlineare Regression der tatsächlichen Werte, die abgebildeten Punkte zeigen die Mittelwerte. Die gestrichelten Linien stellen den Effekt von 78 U/ml IFN ohne IL-1 β dar. n = 3.

In Bezug auf IFN α 7 konnte für alle Konzentrationen von IL-1 β die Tendenz eines leicht verbesserten antiviralen Effekts gegenüber der Stimulation ohne IL-1 β beobachtet werden (Abb. 30A). Dieser Effekt war mit etwa 5 % allerdings sehr gering und es konnte keine klare Konzentrationsabhängigkeit gezeigt werden. Für IFN α 16 hingegen war mit steigender Zunahme an IL-1 β eine leichte Verbesserung des antiviralen Effekts zu sehen (Abb. 30B). Während die niedrigste Konzentration von etwa 0,16 ng/ml so gut wie keinen Unterschied zur Stimulation mit IFN α 16 allein zeigte, konnte bei Konzentrationen ab ca. 2,5 ng/ml eine Verringerung der relativen viralen Replikation um 10 % erreicht werden, auch wenn diese nicht signifikant war.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass IL-1 β tendenziell in der Lage ist den antiviralen Effekt von IFN α -Subtypen zu verstärken. Es konnte allerdings nur bedingt ein konzentrationsabhängiger Effekt beobachtet werden.

Da für SARS-CoV-2 in Vero E6 Zellen die Tendenz eines positiven Effekts von IL-1 β auf den antiviralen Effekt von IFN α beobachtet werden konnte, wurde auch die Expression von ISGs untersucht. Dazu wurden Vero E6 Zellen für 18 h mit IL-1 β alleine oder in Kombination mit 1.000 U/ml eines der angegebenen IFN α -Subtypen stimuliert. Danach wurde die RNA isoliert und die relative Genexpression von *ISG15*, *ISG20* und *MX1* mittels qPCR bestimmt.

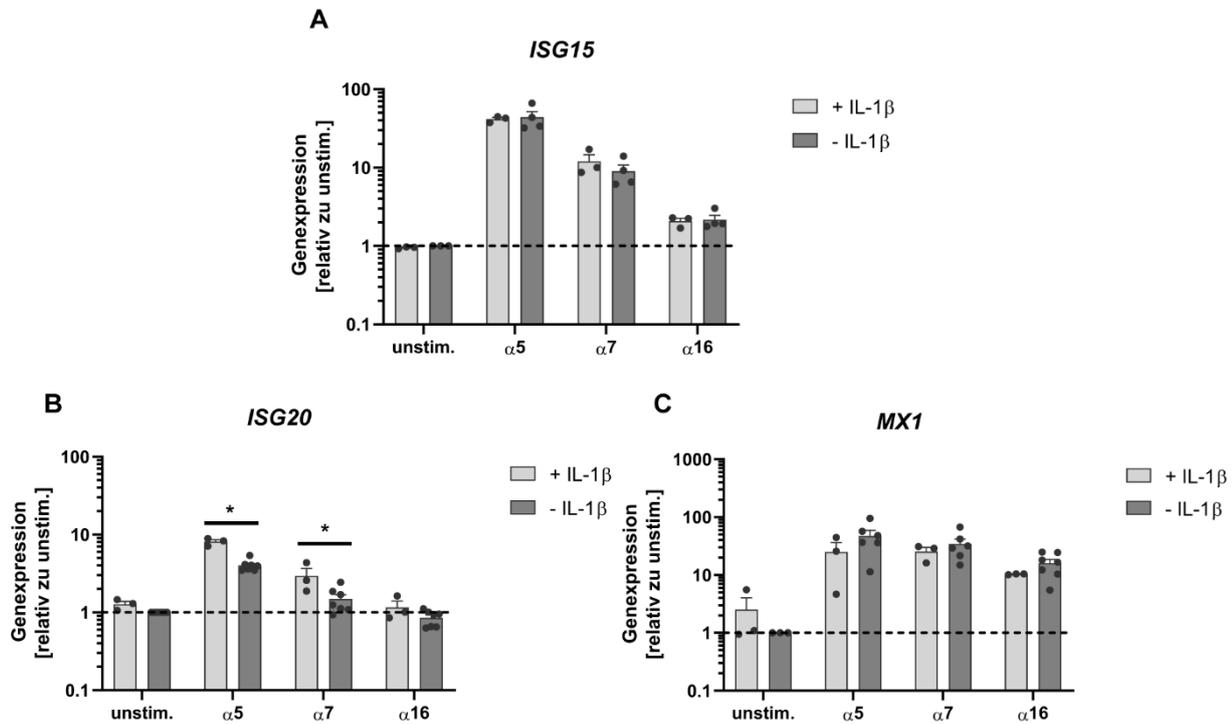


Abbildung 31: Der Effekt von IL-1 β auf die ISG-Expression nach Stimulation mit IFN α -Subtypen in Vero E6 Zellen.

Zur Untersuchung der ISG-Expression wurden Vero E6 Zellen für 18 h mit 5 ng/ml IL-1 β , 1.000 U/ml der IFN α -Subtypen oder beidem in Kombination stimuliert. Im Anschluss wurde zelluläre RNA isoliert und die Genexpression von *ISG15* (A), *ISG20* (B) und *MX1* (C) mittels qPCR bestimmt. Die Expression wurde auf das Haushaltsgen *GAPDH* normalisiert und die relative Expression gegenüber einer unstimulierten Kontrolle mit der $\Delta\Delta CT$ -Methode errechnet. n = 3 für + IL-1 β ; für - IL-1 β : n = 4 für *ISG15*, n = 7 für *ISG20*, n = 6 für IFN α 5 und IFN α 7 *MX1*, n = 7 für IFN α 16 *MX1*. Gezeigt wird der Mittelwert mit Standardfehler. Statistik: Für jeden IFN α Subtyp bzw. unstim. wurde jeweils + IL-1 β gegen - IL-1 β getestet mittels Mann-Whitney-Test. *p < 0,05.

Für die Stimulation mit allen drei IFN α -Subtypen konnte eine Induktion von *ISG15* beobachtet werden, die in Korrelation mit den antiviralen Effekten bei IFN α 5 am stärksten und bei IFN α 16 am schwächsten war (Abb. 31A). Für keinen der IFN α -Subtypen konnte jedoch eine Erhöhung durch zusätzliche Stimulation mit IL-1 β gemessen werden und auch IL-1 β allein führte zu keiner Induktion von *ISG15*. Die relative Induktion von *ISG20* war nach IFN α -Stimulation insgesamt etwas geringer als für *ISG15* und für IFN α 16 konnte generell, genau wie für IL-1 β allein, keine Induktion gemessen werden (Abb. 31B). Interessanterweise konnte eine kombinierte Stimulation von IFN α 5 bzw. IFN α 7 mit IL-1 β zu einer signifikant höheren Induktion von *ISG20* führen als die IFN α -Subtypen alleine. Für *MX1* zeigte sich ein ähnliches Bild wie für *ISG15*. Zwar war hier der Unterschied zwischen den Subtypen nicht so stark und alle führten jeweils zu einer mindestens 10-fach erhöhten relativen Genexpression, doch es konnte auch hier kein positiver Effekt von IL-1 β auf die ISG-Induktion durch IFN α gemessen werden.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass IL-1 β die Induktion von ISGs durch IFN α verstärken kann, dies jedoch Zelltyp- und ISG-spezifisch zu sein scheint.

5.3 Der antivirale Effekt von IFN α 2-Mutanten auf HBV und SARS-CoV-2

Die klinische Verwendung von IFN α ist bisher auf den Subtyp IFN α 2 beschränkt. Allerdings wird heutzutage oftmals die Behandlung mit anderen Therapieoptionen vorgezogen, da die Applikation von IFN α 2 zu gravierenden Nebenwirkungen führen kann [51]. In vergangenen Publikationen konnte im Zusammenhang mit mehreren viralen Infektionen jedoch gezeigt werden, dass andere IFN α -Subtypen als IFN α 2 je nach Virus stärkere antivirale Effekte aufweisen [37, 115, 119, 209]. Andere Subtypen könnten daher ebenfalls eine therapeutische Option darstellen. Da der Weg zur klinischen Zulassung anderer Subtypen jedoch aufwendig wäre, besteht eine andere Option darin, den bereits zugelassenen Subtyp IFN α 2 zu modifizieren und dessen antivirale Aktivitäten zu verbessern. Im folgenden Kapitel wurden daher mögliche vielversprechende Mutationen aufgezeigt und der Effekt von IFN α -Mutanten auf HBV und SARS-CoV-2 im Zellkulturmodell untersucht.

5.3.1 Übersicht über die verwendeten IFN α -Mutanten

Für die Signalweiterleitung durch IFN α ist die Bildung des ternären Komplexes bestehend aus IFNAR1, IFNAR2 und dem IFN α -Subtyp unerlässlich. Daher stellen die Aminosäuren, die an der Bindung von IFN α an die beiden Rezeptoruntereinheiten beteiligt sind, mögliche wichtige Modulatoren der Signalweiterleitung und antiviralen Aktivität dar. Eine weitere Region von Interesse stellt ein Bereich namens *Tunable anchor* zwischen den Aminosäuren 53-67 dar, der nach außen gerichtet eine stark konservierte Bindestelle für IFNAR1 aufweist, nach innen gerichtet jedoch variabel zwischen den einzelnen Subtypen ist (nicht publizierte Daten). Da sowohl IFN α 6 als auch IFN α 14 gegen HIV und HBV in veröffentlichten Studien stärkere Effekte zeigten als IFN α 2, wurde zunächst ein Sequenzalignment auf Aminosäureebene durchgeführt, um Unterschiede innerhalb und außerhalb der eben genannten Bereiche zu visualisieren. Da alle verwendeten IFN α -Subtypen rekombinant in Bakterien hergestellt wurden, wurden für das Alignment nur die Aminosäuren hinter dem Signalpeptid berücksichtigt. Dieses Signalpeptid entscheidet über den Bestimmungsort und den Transportweg des Proteins innerhalb einer Zelle. Da Bakterienzellen nicht kompartimentiert sind, muss dieses bei

der rekombinanten Herstellung von eukaryotischen Proteinen in Bakterien vorher in der DNA-Sequenz entfernt werden.

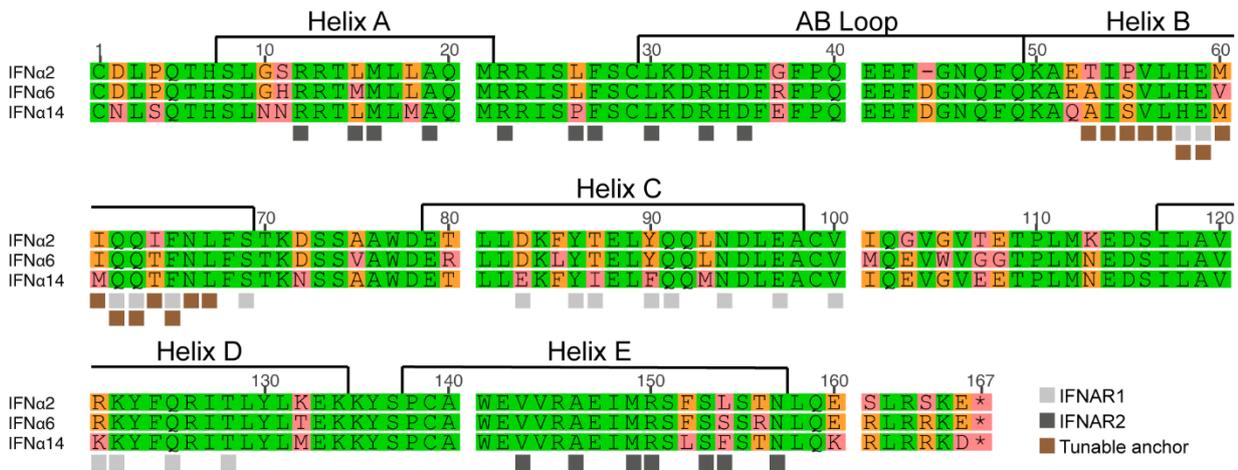


Abbildung 32: Alignment der Proteinsequenzen von IFN α 2, IFN α 6 und IFN α 14.

Die Proteinsequenzen von IFN α 2, IFN α 6 und IFN α 14 wurden nach Entfernen der Sequenz des Signalpeptids mit der BLOSUM62-Matrix in Geneious 5 gegeneinander ausgerichtet. Die Sekundärstrukturen (Helices, AB Loop) wurden annotiert. Grün unterlegte Aminosäuren sind in allen drei, orange unterlegte Aminosäuren in zwei Sequenzen identisch. Rot markierte Aminosäuren sind nur in einer Sequenz zu finden. Die grauen Quadrate kennzeichnen Aminosäuren, die an der Bindung zu den Rezeptoruntereinheiten IFNAR1 oder IFNAR2 beteiligt sind [234, 263]. Braune Quadrate kennzeichnen die Aminosäuren der *Tunable anchor*-Region.

Das Alignment der Aminosäuresequenzen der drei IFN α -Subtypen zeigt, dass die Sequenzen in großen Teilen identisch sind. Innerhalb der Region, die an der Bindung zu IFNAR2 beteiligt ist, gibt es jeweils nur zwei Aminosäuren, die sich zwischen IFN α 2 und IFN α 6 (Positionen 15 und 154) bzw. IFN α 2 und IFN α 14 (Positionen 26 und 154) unterscheiden (Abb. 32). Die für die Bindung an IFNAR1 assoziierte Aminosäuren sind zwischen IFN α 2 und IFN α 6 identisch, zwischen IFN α 2 und IFN α 14 gibt es vier Unterschiede (Positionen 83, 87, 90 und 121). In der *Tunable anchor*-Region unterscheiden sich IFN α 2 und IFN α 6 in vier Aminosäuren (Positionen 53, 55, 60 und 64) und IFN α 2 und IFN α 14 ebenfalls in vier Aminosäuren (Positionen 53, 55, 61 und 64). Weitere Unterschiede gibt es zudem außerhalb dieser Regionen, die jedoch hier nicht alle benannt werden sollen (Abb. 32).

Auf Grundlage dieser Unterschiede wurden mittels *site-directed mutagenesis* durch Vu Thuy Khanh Le-Trilling (UK Essen) IFN α 2/ α 6- bzw. IFN α 2/ α 14-Mutanten erzeugt, die auf Basis von IFN α 2 Mutationen in den IFNAR-Bindestellen, dem *Tunable anchor* oder anderen Regionen enthalten. Eine Übersicht über die hier verwendeten Mutanten zeigt Tabelle 13.

Tabelle 13: Übersicht über die verwendeten IFN α 2-Mutanten.

Die Tabelle zeigt die verwendeten IFN α 2/ α 6- sowie IFN α 2/ α 14-Mutanten, die darin enthaltenen Mutationen sowie die betroffenen Regionen. Hellgrau: Aminosäuren der IFNAR1-Bindestelle; Dunkelgrau: Aminosäuren der IFNAR2-Bindestelle; Braun: Aminosäuren der Tunable anchor-Region; Schwarz: Aminosäuren anderer Regionen.

Mutante	IFN α -Subtypen	Mutationen	Betroffene Regionen
IFNα2-MS	IFN α 2/ α 6	L15M, L154S	IFNAR2
IFNα2-ASVT	IFN α 2/ α 6	T53A, P55S, M60V, I64T	<i>Tunable anchor</i>
IFNα2-PF	IFN α 2/ α 14	L26P, L154F	IFNAR2
IFNα2-EIFK	IFN α 2/ α 14	D83E, T87I, Y90F, R121K	IFNAR1
IFNα2-PEIFKF	IFN α 2/ α 14	L26P, D83E, T87I, Y90F, R121K, L154F	IFNAR1, IFNAR2
IFNα2-NNEMM	IFN α 2/ α 14	D2N, G10N, G37E, L93M, K131M	andere
IFNα2-NNEMMM	IFN α 2/ α 14	D2N, G10N, G37E, I61M, L93M, K131M	<i>Tunable anchor</i> , andere
IFNα2-QASMT	IFN α 2/ α 14	E52Q, T53A, P55S, I61M, I64T	<i>Tunable anchor</i>

Um auszuschließen, dass die IFN α 2-Mutanten einen zytotoxischen Effekt auf die Zellen, mit denen später der antivirale Effekt untersucht werden sollte, haben, wurde die Zellviabilität gemessen. Dazu wurden zum einen differenzierte HepaRG Zellen innerhalb von 8 Tagen vier Mal (an den Tagen 1, 2, 5 und 7) mit 5.000 U/ml der IFN α -Subtypen bzw. deren Mutanten stimuliert. Zum anderen wurden Vero E6 Zellen für 24 h mit 2.500 U/ml der IFN α -Subtypen oder der Mutanten stimuliert. Im Anschluss wurde jeweils die Zellviabilität mittels *Orangu Cell Counting Solution* gemessen. Die ausgewählten Zeitpunkte und Konzentrationen entsprechen denen, die später zur Untersuchung der antiviralen Effekte verwendet werden sollten.

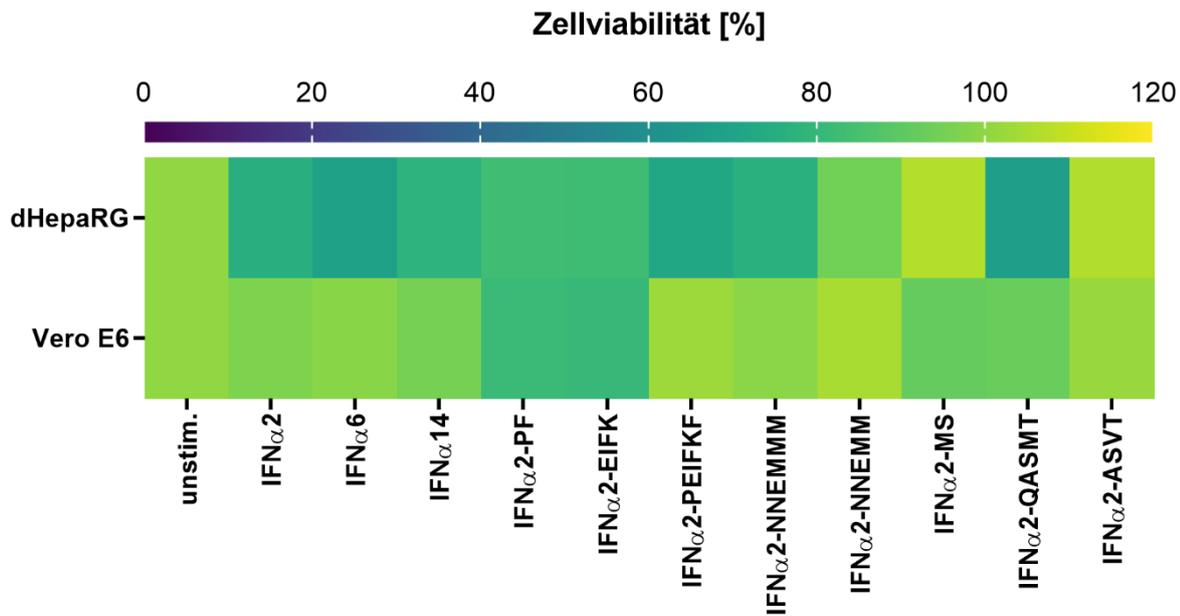


Abbildung 33: Zellviabilität von HepaRG und Vero E6 Zellen nach Stimulation mit IFN α 2-Mutanten. Differenzierte HepaRG Zellen wurden an Tag 1, 2, 5 und 7 mit je 5.000 U/ml der verschiedenen IFN α -Subtypen bzw. IFN α 2-Mutanten stimuliert. An Tag 9 wurde die Zellviabilität gemessen. Vero E6 Zellen wurden für 24 h mit 2.500 U/ml stimuliert, bevor die Zellviabilität bestimmt wurde. n = 1; n = 2 für dHepaRG IFN α 6, IFN α 2-PEIFKF, IFN α 2-NNEMM und IFN α 2-MS. Gemessen jeweils in Triplikaten. Gezeigt wird der Mittelwert.

Für alle getesteten Mutanten und IFN α -Subtypen konnte keine hohe Zytotoxizität beobachtet werden (Abb. 33). Die Zellviabilität der dHepaRG Zellen lag im Gesamten zwar unter der der Vero E6 Zellen, allerdings wurden die dHepaRG Zellen auch häufiger und mit höheren Konzentrationen an IFN α stimuliert. Dennoch liegt die Zellviabilität für alle Proben bei über 65 %. Bei den Vero E6 Zellen lag die Zellviabilität für alle Proben bei über 90 %, lediglich die Werte für IFN α 2-PF und IFN α 2-EIFK lagen mit 80 % etwas darunter. Insgesamt konnte aber keine bedenkliche Zytotoxizität der Mutanten im Vergleich mit den IFN α -Subtypen festgestellt werden.

5.3.2 Der antivirale Effekt der der Mutanten auf HBV und SARS-CoV-2

Um den antiviralen Effekt der IFN α 2-Mutanten auf HBV zu untersuchen, wurden differenzierte HepaRG Zellen für acht Tage mit HBV infiziert. Dabei wurden sie regelmäßig mit seriellen Verdünnungen von IFN α 2, IFN α 6, IFN α 14 oder IFN α 2-Mutanten stimuliert. Nach acht Tagen wurden die HBsAg Titer im Überstand mittels ELISA bestimmt.

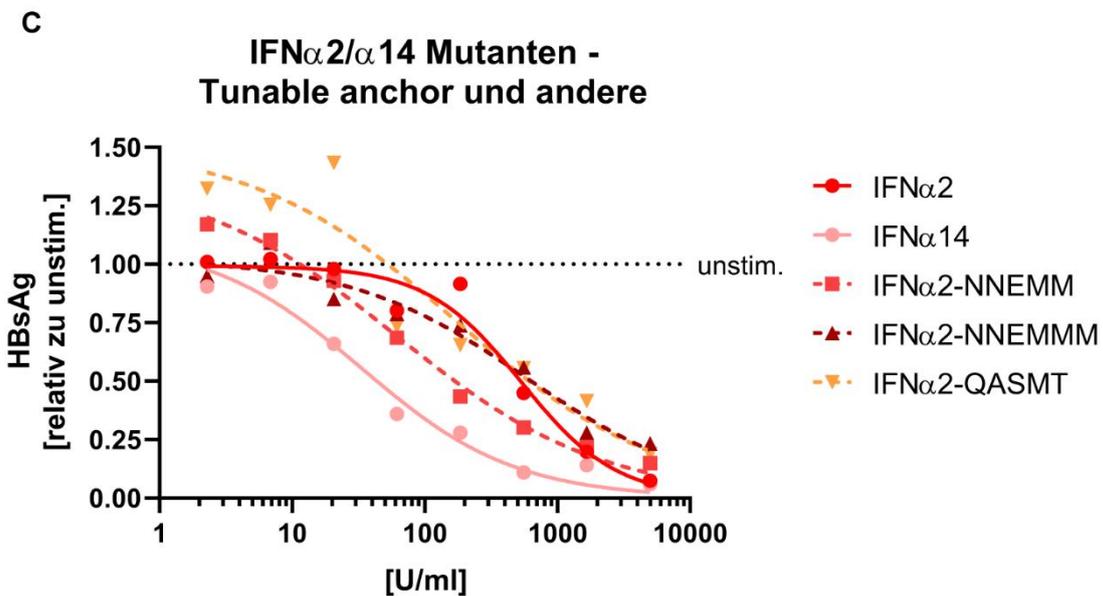
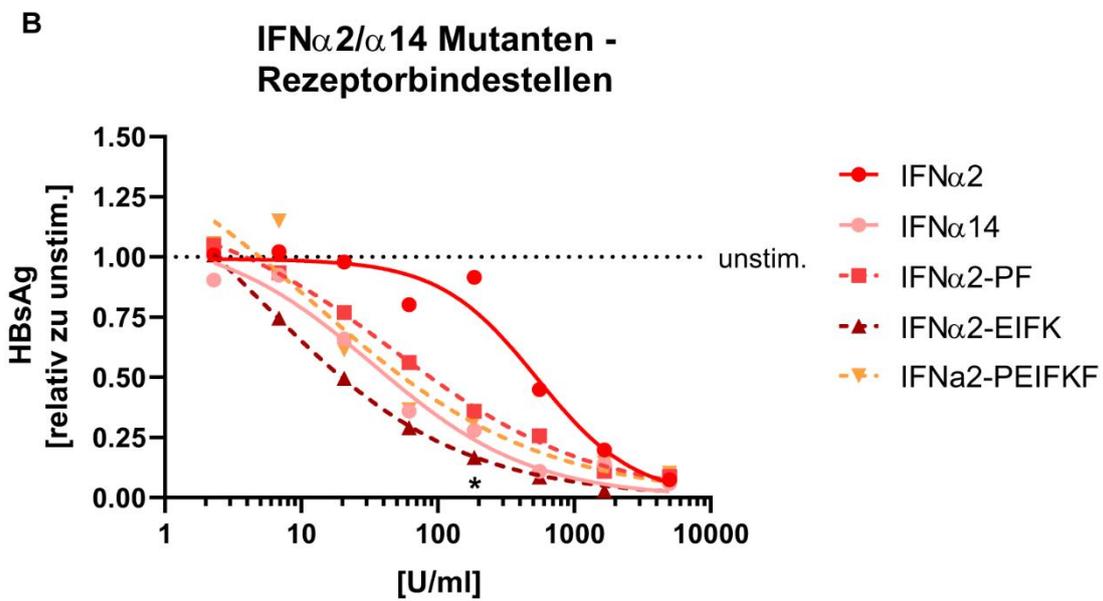
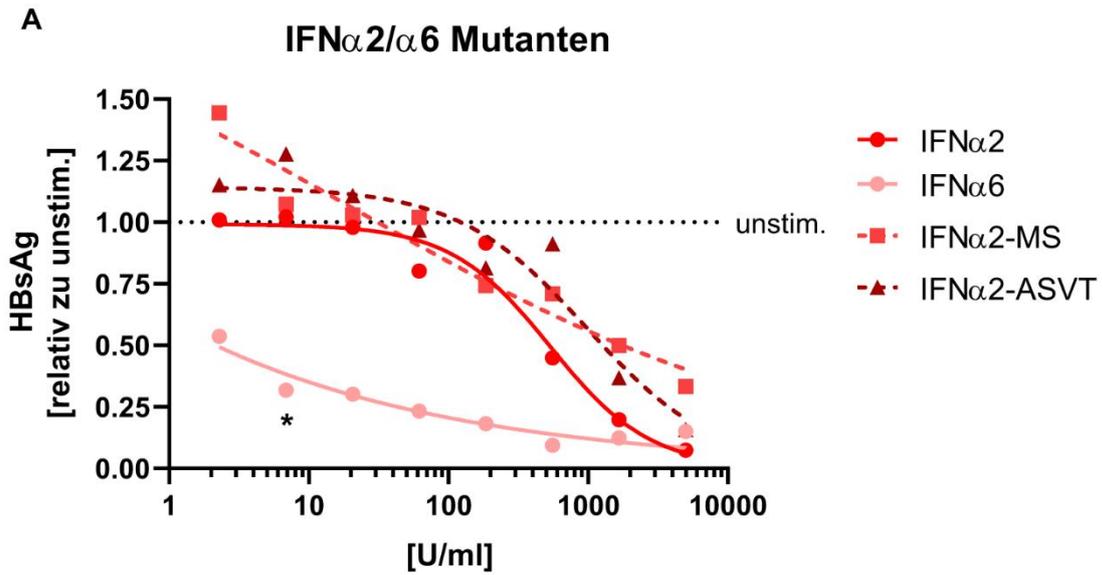


Abbildung 34: Der Effekt von IFN α 2-Mutanten auf die Replikation von HBV.

Differenzierte HepaRG Zellen wurden mit HBV mit 500 geq/Zelle infiziert und parallel zur Infektion und an den Tagen 1, 4 und 6 nach Infektion mit den angegebenen Konzentrationen von IFN α 2, IFN α 6 und IFN α 14 sowie Mutanten von diesen behandelt. An Tag 8 wurden die HBsAg-Titer im Überstand mittels ELISA bestimmt (**A - C**). $n = 3$, davon abweichend $n = 2$ für IFN α 2 185 U/ml, IFN α 6 $n = 2$ für 185 U/ml und 21 U/ml, IFN α 14 $n = 2$ für 185 U/ml und 2 U/ml, IFN α 2-PEIFKF $n = 2$ für 185 U/ml, IFN α 2-NNEMM $n = 2$ für 5.000 U/ml, IFN α 2-MS $n = 2$ für 62 U/ml, IFN α 2-QASMT $n = 2$ für 556 U/ml, 62 U/ml und 7 U/ml, IFN α 2-ASVT $n = 2$ für 21 U/ml und 7 U/ml. Die Kurven zeigen eine nichtlineare Regression der tatsächlichen Werte, die abgebildeten Punkte zeigen die Mittelwerte. Statistik: IFN α 6, IFN α 14 sowie die IFN α 2-Mutanten wurden gegen IFN α 2 getestet mittels *Two-way ANOVA* mit Dunnett's Test. * $p < 0,05$.

Nach Stimulation mit IFN α 6 konnte für die HBsAg-Level eine deutliche, konzentrationsabhängige Verringerung im Vergleich zu den IFN α 2-stimulierten Zellen für alle Konzentrationen beobachtet werden. Für etwa 7 U/ml war dieser Unterschied sogar signifikant (Abb. **34A**). Für die Mutanten IFN α 2-MS und IFN α 2-ASVT konnte hingegen keine Verbesserung gegenüber IFN α 2 beobachtet werden, die Mutanten zeigten tendenziell eher schwächere Effekte. Im Falle von IFN α 14 konnte ebenfalls die Tendenz eines deutlich besseren Effekts im Vergleich zu IFN α 2 beobachtet werden (Abb. **34B** und **C**). Für die Mutationen der Rezeptorbindestellen wurde festgestellt, dass die Mutanten IFN α 2-PF und IFN α 2-PEIFKF, welche die Bindestellen für IFNAR2 bzw. IFNAR1 und IFNAR2 mutiert haben, einen tendenziell besseren antiviralen Effekt aufwiesen als IFN α 2, dieser war jedoch nicht signifikant. Interessanterweise führten alleinige Mutationen von IFNAR1-Bindestellen in der Mutante IFN α 2-EIFK zu einem Effekt, der sogar leicht besser zu sein schien als der von IFN α 14 (Abb. **34B**). In Bezug auf IFN α 2 konnte für die Konzentration 185 U/ml sogar ein signifikanter Effekt gezeigt werden, bei dem die relative HBsAg-Menge nach IFN α 2-Stimulation noch bei etwa 85 % lag, während sie durch IFN α 2-EIFK auf etwa 20 % verringert werden konnte. Für die Mutationen des *Tunable anchor* bzw. sonstiger Regionen konnte keine Verbesserung des antiviralen Effekts gegenüber IFN α 2 festgestellt werden (Abb. **34C**).

Zur Untersuchung des antiviralen Effekts der IFN α -Mutanten gegen SARS-CoV-2 wurden Vero E6 Zellen für 1 h mit den IFN α -Subtypen bzw. den IFN α 2-Mutanten in serieller Verdünnung stimuliert und anschließend mit SARS-CoV-2 infiziert. Nach 24 h wurde die relative Menge an intrazellulärem Nukleoprotein mittels icELISA bestimmt.

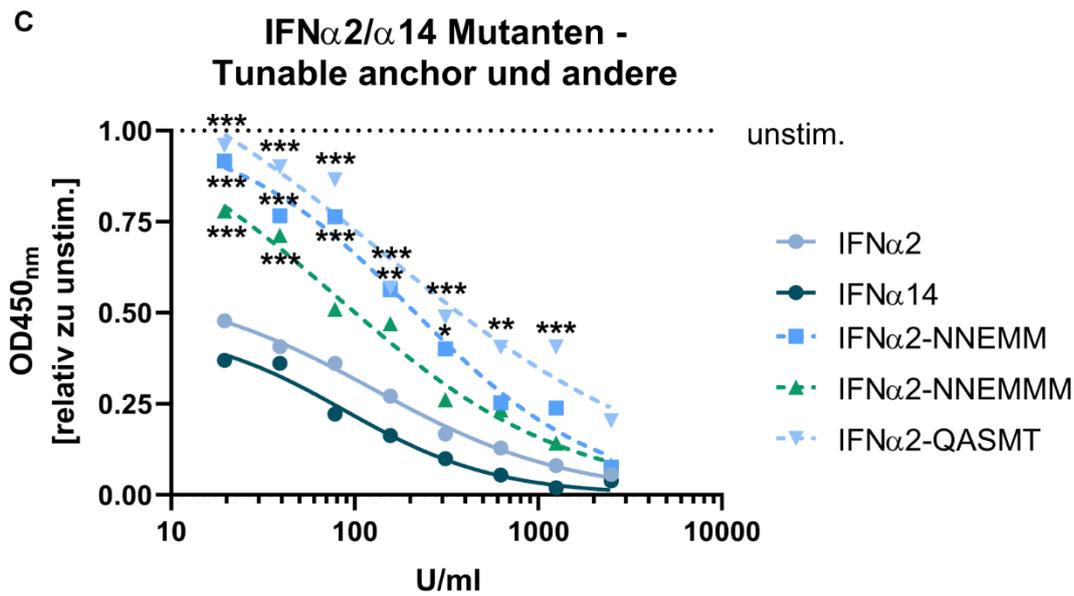
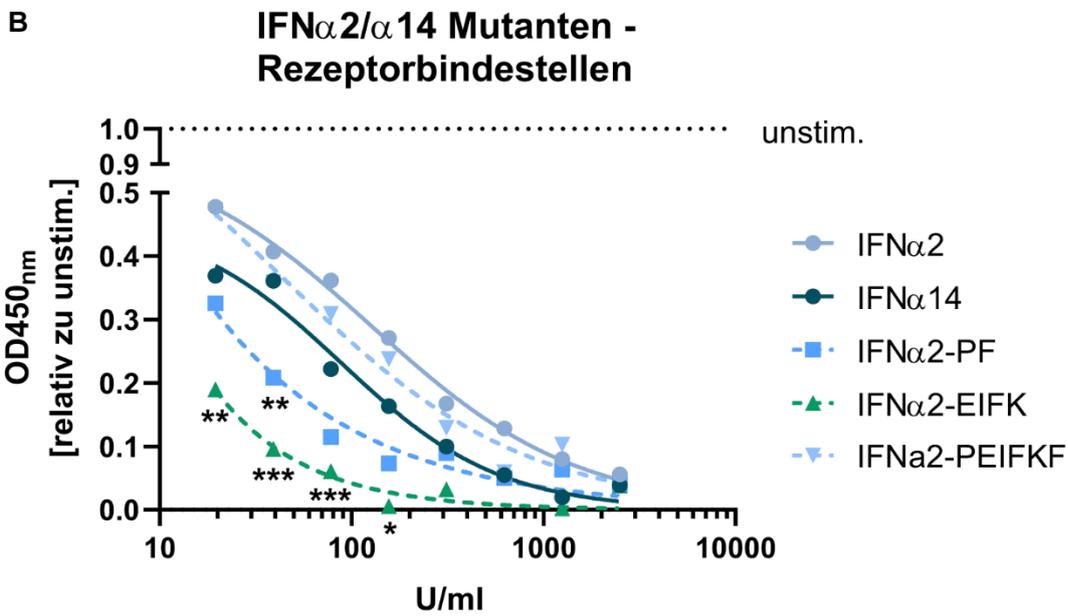
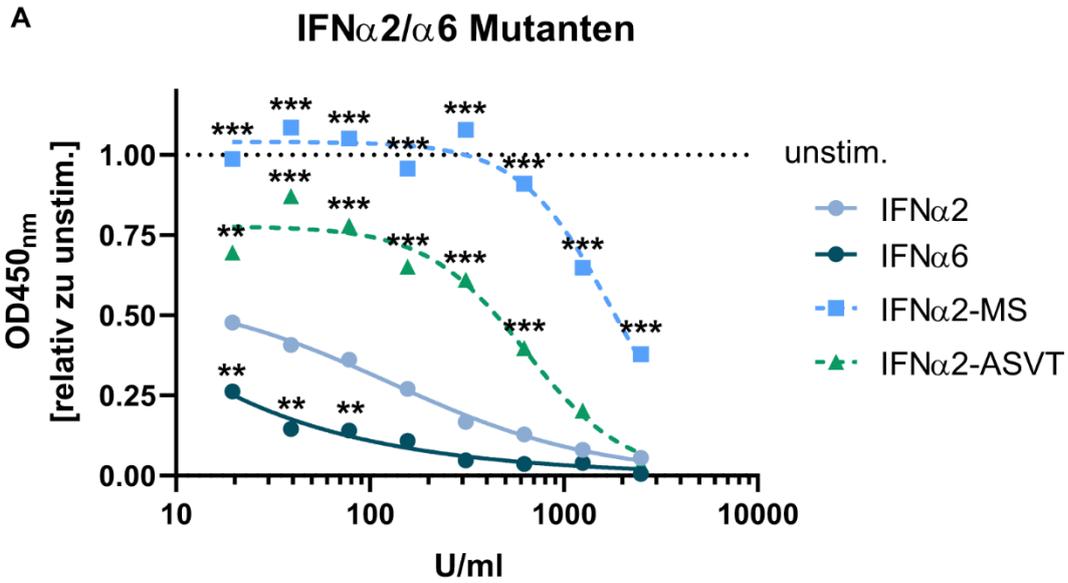


Abbildung 35: Der Effekt von IFN α 2 Mutanten auf die Replikation von SARS-CoV-2.

Vero E6 Zellen wurden mit SARS-CoV-2 mit 350 PFU/ml infiziert und parallel zur Infektion mit den angegebenen Konzentrationen von IFN α 2, IFN α 6 und IFN α 14 sowie Mutanten von diesen behandelt. Nach 24 h wurden das virale Nukleoprotein mittels icELISA gemessen (**A - C**). $n = 3$, $n = 6$ für IFN α 2 und IFN α 14; davon abweichend IFN α 2 und IFN α 14 $n = 5$ für 2.500 U/ml, IFN α 2-PF, IFN α 2-EIFK und IFN α 2-NNEMMM $n = 2$ für 2.500 U/ml und 156 U/ml. Die Kurven zeigen eine nichtlineare Regression der tatsächlichen Werte, die abgebildeten Punkte zeigen die Mittelwerte. Statistik: IFN α 6, IFN α 14 sowie die IFN α 2-Mutanten wurden gegen IFN α 2 getestet mittels *Two-way ANOVA* mit Dunnett's Test. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Die Auswertung des icELISA zeigte, dass die Stimulation mit IFN α 6 zu einem signifikant (für die Konzentrationen 20 U/ml, 39 U/ml und 78 U/ml) verbesserten antiviralen Effekt im Vergleich zu IFN α 2 führte (Abb. **35A**). Die Stimulation mit den IFN α 2/ α 6-Mutanten hingegen hatte für fast alle Konzentrationen einen signifikant schlechteren Effekt gegen SARS-CoV-2 zur Folge. Für IFN α 14 konnte zwar die Tendenz eines leicht stärkeren Effekts beobachtet werden, die war jedoch nicht signifikant, da beide IFN α -Subtypen recht nah beieinanderliegen. Der Effekt der Mutanten IFN α 2-PEIFKF, die beide IFNAR-Bindestellen mutiert hat, war fast identisch mit dem von IFN α 2 (Abb. **35B**). Interessanterweise zeigten sowohl IFN α 2-PF, bei der die IFNAR2-Bindestelle mutiert ist, und IFN α 2-EIFK, bei der die IFNAR1-Bindestelle mutiert ist, sogar einen tendenziell verbesserten Effekt gegenüber IFN α 14. In Bezug auf IFN α 2 war dieser Effekt für IFN α 2-PF für 39 U/ml signifikant. Für IFN α 2-EIFK konnte im gesamten Bereich zwischen 20 U/ml und 156 U/ml eine Signifikanz erreicht werden und die Menge an Nukleoprotein wurde sogar fast bis unter die Detektionsgrenze reduziert (Abb. **35B**). Ähnlich wie bei HBV zeigten auch für SARS-CoV-2 Mutationen des *Tunable anchors* bzw. anderer Regionen eine signifikante Verschlechterung des antiviralen Effekts über fast den ganzen Bereich an getesteten Konzentrationen (Abb. **35C**)

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass durch die Mutation bestimmter Aminosäuren der antivirale Effekt von IFN α 2 verbessert werden konnte. Dabei scheinen besonders die Bindestellen für die Rezeptoruntereinheiten IFNAR1 und IFNAR2 eine wichtige Rolle zu spielen.

6 Diskussion

Die Erkennung von Pathogenen und die daraus resultierende Induktion von Typ-I-IFN stellt einen essentiellen Bestandteil in der Immunabwehr des angeborenen Immunsystems dar. Die PRRs sind in der Lage, ein breites Spektrum an PAMPs von Pathogenen zu erkennen und infolgedessen die Expression von Typ-I-IFN zu induzieren [5]. Die Bindung der Typ-I-IFN an den ubiquitär exprimierten Rezeptor IFNAR hat zur Konsequenz, dass die Zellen in einen antiviralen Zustand versetzt werden und zahlreiche ISGs zur Regulation zellulärer Mechanismen und Inhibition der viralen Replikation exprimieren [97]. Obwohl alle zwölf humanen IFN α -Subtypen an den gleichen Rezeptor binden und letztlich die Expression von ISGs induzieren, unterscheiden sich die Subtypen in ihrer biologischen Aktivität bezogen auf Inhibition der viralen Replikation und ISG-Induktion virus- und zellspezifisch. Dabei wurde mehrfach bereits gezeigt, dass der klinisch zugelassene Subtyp IFN α 2 gegen viele Viren geringer antiviral wirkt als andere Subtypen [37, 119, 209]. Bisher weiß man nur, dass Unterschiede in der Affinität der einzelnen Subtypen zu IFNAR eine Rolle spielen, was jedoch alleine nicht alle beobachteten Unterschiede erklärt [120, 181]. Welche weiteren Mechanismen noch eine Rolle spielen, ist bislang nicht geklärt. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit die verschiedenen IFN α -Subtypen anhand von HBV, für dessen Behandlung IFN α verwendet wird, und SARS-CoV-2, das ein Virus von aktuell großem Interesse darstellt, untersucht. Dazu wurde erstens die Induktion von Typ-I-IFN, zweitens die antivirale Aktivität und ISG-Induktion durch IFN α -Subtypen sowie drittens ein möglicher verbesserter Effekt durch gezielte Mutation von IFN α 2 in viruspezifischen Modellsystemen untersucht.

6.1 Die Induktion von Typ-I-IFN durch HBV und SARS-CoV-2

Die PRR-vermittelte Induktion von Typ-I-IFN ist ein wichtiger Aspekt in der antiviralen Antwort. Da Typ-I-IFN stark antiviral wirkt, haben viele Viren Mechanismen entwickelt, um die Typ-I-IFN-Induktion zu supprimieren.

Im Falle von HBV wurde lange vermutet, dass es der Erkennung durch das Immunsystem entgehen und unentdeckt eine Infektion etablieren kann, obwohl eine Erkennung durch TLR3, RIG-I und MDA5 grundsätzlich möglich sein sollte [117, 138, 200]. Daher wurde und wird es regelmäßig als *stealth virus* betitelt. Neuere Studien konnten jedoch zeigen, dass zumindest TLR2 und RIG-I durch HBV aktiviert werden und so zur Induktion von Typ-III-IFN und inflammatorischer Zytokine führen [200, 278]. In dieser Arbeit wurden

differenzierte HepaRG Zellen, die ein etabliertes Modellsystem für HBV darstellen, und PHHs mit HBV infiziert und im Anschluss auf Protein- und mRNA-Ebene die Induktion von Typ-I-IFN untersucht.

Sowohl im Überstand der Zellen als auch auf mRNA-Ebene konnte keine Induktion von Typ-I-IFN nachgewiesen werden. Lediglich ein Donor (PHHs) wies zu einzelnen Zeitpunkte eine tendenziell erhöhte Menge an Typ-I-IFN im Überstand und *IFNA*-mRNA auf. Daher war keine weitere Untersuchung bezogen auf die Induktion der einzelnen IFN α -Subtypen möglich. Diese Ergebnisse stimmen mit einer Studie überein, in der ebenfalls nach HBV-Stimulation von dHepaRG Zellen kein IFN β als Vertreter der Typ-I-Interferone gemessen werden konnte [165]. Zudem sind zahlreiche Mechanismen beschrieben, wie HBV die IFN-Induktion inhibieren kann, wie z.B. die Inhibition von MyD88 oder IKK γ [39, 132]. Dem entgegen stehen jedoch Studien, in denen Typ-III-IFN und proinflammatorische Zytokine als Antwort auf die HBV-Stimulation gemessen werden konnten, denen eine PRR-Aktivierung zugrunde liegt [200, 278]. Da auch die Funktionalität der TLRs1-9 in PHHs in einer Studie charakterisiert und bestätigt wurde, lässt dies die Vermutung zu, dass die Inhibition der IFN-Induktion gezielt gegen Typ-I-IFN gerichtet sein könnte [28]. Da allerdings Typ-III-IFN ebenfalls durch den TLR-Signalweg induziert wird, sollte auch kein Typ-III-IFN messbar sein. Daher könnte ein wichtiger Aspekt womöglich in der geringen Abundanz des DNA-Sensors STING in Leberzellen liegen [236]. Zytoplasmatische DNA aktiviert die *cyclic GMP-AMP synthase* (cGAS) des Wirts, welche zyklische Dinukleotide generiert. Diese Moleküle binden an STING und führen zur Aktivierung des STING-Signalwegs. Interessanterweise induziert der STING-Signalweg nur Typ-I-IFN, jedoch keine Typ-III-IFN-Antwort [4]. Welche Mechanismen letztlich an der ausbleibenden Typ-I-IFN-Induktion beteiligt sind, erfordert weitere Untersuchung. Möglicherweise könnte bspw. eine Überexpression von STING dessen Bedeutung weiter deutlich machen.

Für SARS-CoV-2 wurde bereits beschrieben, dass die Level an Typ-I-IFN durch zahllose Evasionsmechanismen deutlich niedriger sind als die von saisonalen Coronaviren, obwohl grundsätzlich eine Erkennung durch TLR3, TLR7, TLR8 sowie RIG-I und MDA5 möglich ist [108, 177, 194]. Bekannt ist, dass das N-Protein RIG-I inhibiert, ORF9b MAVS inhibiert und NSP3 sowie ORF6 inhibieren IRF3. Dadurch wird die Signalweiterleitung und Induktion von Typ-I-IFN bereits frühzeitig supprimiert und eine antivirale Antwort verhindert. Um zu untersuchen, ob dennoch messbare Mengen an Typ-I-IFN in den

Überständen nachzuweisen sind, wurden Calu-3 Zellen mit SARS-CoV-2 stimuliert. Zusätzlich wurde auch mit UV-inaktiviertem SARS-CoV-2 stimuliert, um mögliche Evasionsmechanismen zu unterdrücken.

Die Stimulation mit SARS-CoV-2 führte überraschenderweise zu einer signifikanten, aber späten Typ-I-IFN-Induktion auf Proteinebene nach 48 h (siehe Abb. 12). Dies stimmt mit Ergebnissen aus Studien überein, in denen in nasalen ALI Zellen und AE Zellen, abgeleitet aus pluripotenten Stammzellen, eine späte Induktion von Typ-I-IFN auf mRNA-Ebene zu messen war, unabhängig vom Virustiter [80, 273]. Allerdings konnten beide Gruppen nur eine Induktion von *IFNB* messen, haben dabei jedoch auch nur *IFNA1* als Vertreter der *IFNA*-Gene einbezogen. Mit der Reporterzelllinie, die in dieser Arbeit verwendet wurde, lässt sich nicht zwischen IFN α und IFN β unterscheiden. Daher ist es durchaus möglich, dass es sich bei der beobachteten Induktion nur um die Induktion von IFN β handelt. Vorläufige Ergebnisse einer weiteren Gruppe hingegen konnten in pDCs, die mit SARS-CoV-2 stimuliert wurden, sowohl nach 48 h als auch bereits nach 24 h eine Induktion von IFN α messen (IFN β wurde nicht getestet) [31]. Möglicherweise sind dies aber auch zelltypspezifische Unterschiede, da pDCs die Hauptproduzenten von IFN α sind und TLR7 in diesen Zellen besonders stark abundant ist [163]. Da die nasalen ALIs und AE Zellen im Gegensatz zu systemisch zirkulierenden pDCs die Zielzellen von SARS-CoV-2 sind, könnte die verspätete IFN-Antwort in diesen Zellen womöglich einen Kernaspekt in der erfolgreichen Etablierung der Infektion darstellen.

Entgegen der Erwartung konnte das UV-inaktivierte Virus zu keiner Induktion von Typ-I-IFN in den Calu-3 Zellen führen. Dadurch, dass das Virus nicht mehr in der Lage war zu replizieren, wurde die späte Typ-I-IFN-Induktion gegenüber dem replikationskompetenten Virus sogar signifikant reduziert. Dies ist konträr zu den Ergebnissen der bereits erwähnten Studien in pDCs, in denen auch UV-inaktiviertes Virus zu einer signifikanten IFN α -Induktion führen konnte [31]. Dies könnte aber wiederum auf die Unterschiede zwischen den verwendeten Calu-3 Zellen, die sich von Lungenzellen ableiten und lediglich die TLRs1-6 exprimieren, und den pDCs, die zusätzlich u.a. auch TLR7 und TLR9 exprimieren, zurückzuführen sein [156, 163]. Die Tatsache jedoch, dass replikationskompetentes Virus für die Induktion von Typ-I-IFN notwendig ist, lässt darauf schließen, dass die Typ-I-IFN-Induktion hauptsächlich auf der Erkennung von Replikationszwischenprodukten beruht. Eine Untersuchung von 16 Sensoren viraler RNA zeigte, dass besonders MDA5, welches lange dsRNA-Fragmente erkennt, durch Zwischenprodukte der SARS-CoV-2-Replikation aktiviert wird und unterstützt damit die

vorhergehende Annahme [15, 143, 273]. Zudem beobachtete man in der gleichen Studie in Calu-3 *MDA5 knock-out* Zellen eine erhöhte Viruslast im Vergleich zu Wildtyp-Zellen. Zusammengefasst konnten in dieser Arbeit bezüglich der Typ-I-IFN-Induktion die bisher veröffentlichten Studien weitestgehend bestätigt werden. Zusätzlich konnte für SARS-CoV-2 anhand der generierten Daten im Einklang mit bisherigen Erkenntnissen Hypothesen in Bezug auf die Erkennung von Replikationszwischenprodukten und der möglichen Bedeutung der verspäteten Typ-I-IFN-Antwort aufgestellt werden.

6.2 Der antivirale Effekt der IFN α -Subtypen

6.2.1 Der Effekt der IFN α -Subtypen auf die HBV-Infektion und die Expression von ISGs

HBV stellt trotz einer verfügbaren Impfung noch immer ein globales gesundheitliches Problem dar. Die Entwicklung einer chronischen Infektion in Folge der Ansteckung birgt unbehandelt das Risiko einer Leberzirrhose oder eines hepatozellulären Karzinoms. Zwar kann die Therapie mit NAs zu einer effizienten Inhibierung der viralen Replikation führen, doch die cccDNA, die episomal im Zellkern des Wirts residiert, dient als Matrize für die Transkription und ermöglicht jederzeit die Produktion neuer Virionen. IFN α ist bisher die einzige Behandlungsmöglichkeit, bei der auch die cccDNA eliminiert werden kann. Aufgrund einer geringen Erfolgsrate und gravierender Nebenwirkungen, werden oftmals NAs bevorzugt. Allerdings ist nur IFN α 2 klinisch zugelassen und der Einfluss der anderen Subtypen auf HBV ist wenig untersucht. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit der Einfluss aller IFN α -Subtypen auf die HBV Replikation und die ISG-Induktion in PHHs oder dHepaRG Zellen untersucht.

In den hier durchgeführten Versuchen konnten in infizierten PHHs die Subtypen IFN α 5, IFN α 14 und IFN α 2 zu den stärksten, teils signifikanten Reduktionen von HBsAg als Marker für die virale Replikation führen. Dies stimmt insofern mit den Ergebnissen einer anderen Arbeitsgruppe überein, dass diese in PHHs ebenfalls beobachten konnte, dass IFN α 14 zur stärksten Reduktion führen konnte [37]. Für alle getesteten Marker (pgRNA, HBV-DNA, HBeAg und HBsAg) zeigte IFN α 5 dort erstaunlicherweise nur mittelmäßige Effekte. Konträr sind die Daten bspw. für IFN α 1, das in besagter Studie zu den stärksten Subtypen gehört, während es in dieser Arbeit kaum einen antiviralen Effekt gegen HBV zeigte. Möglicherweise können diese Unterschiede dadurch erklärt werden, dass Infektion und Behandlung in der Studie der anderen Gruppe (12 Tage, 3 Stimulationen) länger andauerten als in dieser Arbeit (8 Tage, 4 Stimulationen). Es wurde der gleiche

Genotyp für die Infektion verwendet. Weitere Studien, die den Effekt aller IFN α -Subtypen untersuchen, stehen leider nicht zur Verfügung. Grundsätzlich zeigt sich aber, dass sich die IFN α -Subtypen in ihrer antiviralen Antwort gegen HBV unterscheiden. Mögliche Unterschiede auf Ebene der ISG-Induktion wurden daher ebenfalls für vier Schlüssel-ISGs untersucht. Dabei führte in dHepaRG Zellen IFN α 5 zur stärksten Induktion von *ISG15*, *IFI35*, *ISG20* und *MX1*. Dass IFN α 5 auch in PHHs den stärksten antiviralen Effekt gegen HBV zeigt, ist möglicherweise dadurch bedingt, dass bspw. ISG20 die Replikation durch Bindung an die pgRNA inhibiert; Mx1 interagiert mit HBc und könnte dadurch das Zusammensetzen des Kapsids behindern [127, 133]. Ob die ISG-Induktion in PHHs allerdings genauso aussieht wie in dHepaRG Zellen, wurde nicht untersucht. Diese Vermutung kann aufgrund der Vielzahl an induzierten ISGs jedoch auch nur eine erste Beobachtung darstellen.

Die Proteine der APOBEC3-Familie sind Cytidin-Desaminasen, für die wiederholt beschrieben wurde, dass sie zur Desaminierung und Degradation von cccDNA führen können. Es ist bekannt, dass in PHHs nach IFN α -Stimulation APOBEC3B/3C/3F/3G verstärkt exprimiert werden [22]. In neueren Studien konnte gezeigt werden, dass im Speziellen APOBEC3A und APOBEC3B die cccDNA effizient desaminieren und dadurch zu deren Degradation führen [141]. Um spezifisch den möglichen Einfluss der IFN α -Subtypen auf die cccDNA näher zu betrachten, wurde die Expression von APOBEC3-Genen nach Stimulation mit den IFN α -Subtypen IFN α 2, IFN α 6 und IFN α 7 in dHepaRG untersucht. APOBEC3A konnte aus technischen Gründen leider nicht berücksichtigt werden. Es zeigte sich, dass APOBEC3C, APOBEC3D und APOBEC3H durch IFN α nicht induziert, sondern tendenziell eher runterreguliert wurden. APOBEC3B zeigte die Tendenz einer frühen Induktion für IFN α 2 und IFN α 6 und einer späten Induktion für IFN α 7, während APOBEC3F und APOBEC3G bis 8 h von allen Subtypen induziert wurden. Damit entsprechen die gemessenen Expressionsmuster denen, die bereits für dHepaRG Zellen beobachtet wurden [222]. Für APOBEC3F und APOBEC3G, welches am besten untersucht ist, entspricht dies auch in etwa den Daten, die für PHHs publiziert sind [22, 179]. Für diese beiden APOBEC3-Proteine konnte auch belegt werden, dass sie verschiedene Zwischenprodukte der Replikation inhibieren, es wird vermutet auch cccDNA [227]. Zusätzlich kann APOBEC3G die Assemblierung der Virionen negativ beeinflussen [243]. Für die anderen APOBEC3-Gene gibt es leider kaum Expressionsdaten. APOBEC3B und APOBEC3C konnten in einer Studie nach IFN α -Stimulation zwar in PHHs induziert werden, jedoch nicht in Huh-7 und HepG2 Zellen,

zwei Leberkarzinomzelllinien [22]. Entsprechend könnten die Unterschiede zu den hier erhobenen Daten auf der verwendeten Zelllinie basieren und eine weitere Untersuchung in PHHs ist empfehlenswert. Inwieweit die Beobachtungen bezüglich der Induktion der *APOBEC3*-Gene Rückschlüsse auf den antiviralen Effekt zulässt, ist fraglich. Interessant ist jedoch möglicherweise, dass in humanisierten Mäusen, die mit IFN α 2 oder IFN α 14 stimuliert wurden, keine signifikante Induktion von *APOBEC3G* beobachtet werden konnte. Allerdings führte die Stimulation mit IFN α 14 im Gegensatz zu IFN α 2 in HIV-infizierten, humanisierten Mäusen zu einem höheren Anteil an Mutationen im HIV-Genom [119]. Dies könnte darauf hindeuten, dass posttranskriptionale Effekte durch IFN α -Subtypen einen wichtigen Einfluss auf die *APOBEC3*-Aktivität haben könnten, auch wenn quantitativ keine Unterschiede festzustellen sind. Generell ist die Erradikation der cccDNA ein Feld, das noch weiterer Untersuchung bedarf. Ggf. könnten die Überexpression einzelner *APOBEC3*-Gene in HBV-infizierten Leberzellen weitere Einblicke geben.

Teilweise konnte zudem auch *in vitro* in PHHs keine Reduktion der cccDNA sowohl nach Stimulation mit IFN α 2 als auch IFN α 14 gemessen werden [37]. Da die cccDNA-Level in der angegebenen Untersuchung allerdings nach 12 Tagen gemessen wurde, stellt sich die Frage, ob HBV möglicherweise in diesem Zeitraum der *APOBEC3*-Expression entgegenwirkt und die cccDNA-Level durch Reinfektion erneuert werden. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass Patienten, die erfolgreich mit IFN α gegen eine chronische HBV-Infektion behandelt wurden, signifikant erhöhte mRNA-Mengen an *APOBEC3A* und *APOBEC3B* aufwiesen [129]. Aus diesem Grund wurden dHepaRG Zellen stabil mit HBV infiziert und nach acht Tagen die Expression von *APOBEC3*-Genen nach IFN α -Subtyp-Stimulation mittels qPCR gemessen. Hierbei konnte allerdings kein Unterschied in der *APOBEC3*-Expression zwischen infizierten und nicht infizierten Zellen gemessen werden. Dies stimmt mit publizierten Daten überein, die zeigen, dass in infizierten dHepaRG-Zellen *APOBEC3A*, *APOBEC3F* und *APOBEC3G* nach Stimulation mit IFN α 2 erhöht exprimiert werden [222]. Da jedoch wie oben beschrieben auch Unterschiede zwischen Primärzellen und Zelllinien möglich sind, empfiehlt sich eine erneute Untersuchung in PHHs unter Berücksichtigung weiterer IFN α -Subtypen.

Insgesamt konnte in Bezug auf den antiviralen Effekt der IFN α -Subtypen festgestellt werden, dass sie unterschiedliche Aktivitäten gegen HBV besitzen, die jedoch nur teilweise mit den bisher veröffentlichten Daten übereinstimmen. Exemplarisch ausgewählte Subtypen zeigten zudem eine Korrelation der antiviralen Effekte mit der

Induktion von Schlüssel-ISGs, die einen gegen HBV beschriebenen Effekt besitzen. Die Expression der *APOBEC3*-Gene nach IFN α -Stimulation weist unabhängig von der HBV-Infektion deutliche Unterschiede zwischen den Mitgliedern der Genfamilie auf und die bisherigen Erkenntnisse wurden um weitere IFN α -Subtypen erweitert.

6.2.2 Der Effekt der IFN α -Subtypen auf die SARS-CoV-2-Infektion und die Expression von ISGs

Aufgrund der andauernden COVID-19 Pandemie stellt SARS-CoV-2 ein Virus von hohem Interesse dar. Besonders der Mangel an wirksamen Therapien bleibt weiterhin ein großes Problem. Man konnte bereits beobachten, dass SARS-CoV-2 im Gegensatz zu SARS-CoV-1 durch IFN α inhibiert werden kann und auch diverse klinische Studien wurden mit IFN α 2 durchgeführt [92, 134, 161, 281]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Applikation von pegyliertem IFN α 2 in Patienten mit angeborenem Typ-I-Interferon-Defekt eine COVID-19-Erkrankung verhindern konnte [126]. Und auch die Beobachtung, dass Patienten mit starken COVID-19-Symptomen signifikant häufiger Autoantikörper gegen Typ-I-Interferone aufweisen, deutet auf die Bedeutung von IFN α hin [14]. Da für diese Studien allerdings nur IFN α 2 oder universelles IFN α , welches ein artifizielles IFN α aus den Subtypen α 1 und α 2a darstellt, verwendet wurden, ist die Untersuchung aller IFN α -Subtypen in Bezug auf SARS-CoV-2 ein vielversprechender Ansatzpunkt für neue Therapieoptionen. Für andere Virusinfektionen zeigte sich bereits, dass andere Subtypen teilweise deutlich stärker antiviral wirkten als IFN α 2 [37, 119, 209]. Für SARS-CoV-2 wurden dazu noch keine Daten erhoben. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit in Vero E6 Zellen sowie in humanen AE Zellen, die natürliche Zielzellen von SARS-CoV-2 widerspiegeln, der antivirale Effekt aller zwölf humanen IFN α -Subtypen untersucht. Zusätzlich wurde versucht die zugrundeliegende Regulation von Genen und Proteinen durch die IFN α -Subtypen und das Virus zu analysieren, um mögliche Schlüssel-moleküle in der Immunantwort gegen SARS-CoV-2 zu identifizieren.

Sowohl in Vero E6 Zellen als auch in hAE Zellen konnten IFN α 4, IFN α 5, IFN α 8 und IFN α 14 als die Subtypen identifiziert werden, welche die Replikation des Virus am stärksten inhibieren konnten. Dies unterscheidet sich von den Ergebnissen, die hier für HBV erzielt werden konnten, wo IFN α 4 und IFN α 8 nur einen mittleren Effekt zeigten, und auch bspw. von den für HIV publizierten Daten, bei denen neben IFN α 14 auch IFN α 6 und IFN α 17 einen starken Effekt zeigten [119]. Diese Unterschiede deuten auf ein virusspezifisches Muster der antiviralen Aktivität für SARS-CoV-2 hin und zeigen

Subtypen mit höherem Therapiepotential als IFN α 2 auf. Zudem ist der virusspezifische Unterschied in den antiviralen Kapazitäten weiterhin ein Beleg dafür, dass allein die Differenzen in der Affinität zum Rezeptor IFNAR, die sich teilweise um bis zu das 100-fache unterscheiden, nicht die unterschiedlichen biologischen Aktivitäten erklären können [120].

Die Kinetikversuche mit IFN α 5 machten zudem deutlich, dass eine möglichst frühe Stimulation mit IFN α die Replikation von SARS-CoV-2 stärker inhibiert als eine Stimulation nach der Infektion. Dennoch konnte auch acht Stunden nach der Infektion mit zwei Methoden noch die Tendenz einer starken Inhibition der viralen Replikation nachgewiesen werden. Die frühe Stimulation mit IFN α versetzt die Zellen frühzeitig in einen antiviralen Zustand, in dem zahlreiche ISGs exprimiert werden, die das Virus dann bereits nach oder während dem Eintritt in die Zelle inhibieren können. Im Falle von Patienten ist es zwar nicht möglich IFN α aufgrund der Nebenwirkungen prophylaktisch zu verabreichen, dennoch können die Ergebnisse gewissermaßen auf die *in vivo* Situation übertragen werden, da es in jeder Infektion Zellen gibt, die zuerst infiziert werden und durch die Sekretion von IFN α andere Zellen parakrin in einen antiviralen Zustand versetzen, bevor das Virus auch diese infiziert. Die Ergebnisse geben zudem einen Hinweis darauf, warum es für das Virus wichtig sein könnte, die frühe Typ-I-IFN-Induktion, wie in dieser und anderen Arbeiten beobachtet, zu unterdrücken, da sonst das Etablieren einer stabilen Infektion stark erschwert wird. In den Versuchen mit hAE Zellen wurde beobachtet, dass es 24 h – 48 h dauert bis stark erhöhte virale Titer zu messen sind. Dies stimmt in etwa mit der Verzögerung der Typ-I-IFN-Antwort nach Infektion überein, die zumindest in Zelllinien beobachtet werden konnte.

Die Kombination von IFN α 2 und IFN α 5 mit Remdesivir bestätigte ebenfalls den positiven Effekt einer frühen Behandlung. Zwar konnte kein synergistischer Effekt für eine Prä- oder Post-Stimulation nachgewiesen werden, doch die Versuche mit IFN α 5 und Remdesivir in hAE Zellen belegen ebenfalls den positiven Effekt einer Kombinationstherapie auf additive Weise ohne jegliche Zytotoxizität. Sowohl IFN α als auch Remdesivir wurden in klinischen Studien getestet und zur Behandlung oder prophylaktisch eingesetzt [16, 73, 161]. Obwohl beide Substanzen ein gutes antivirales Potential zeigten, konnte kein bedeutend besserer Ausgang des Krankheitsverlaufs durch Einzeltherapie belegt werden [175]. Besonders vor dem Hintergrund starker Nebenwirkungen sind diese beiden Therapien damit aus dem Vordergrund gerückt. Durch den hier gezeigten positiven Effekt einer kombinierten Anwendung offenbart sich

aber eine neue Therapieoption, da ein additiver Effekt eine starke Virusinhibition bei niedrigerer Konzentration der Einzeltherapeutika ermöglichen könnte. Damit könnten möglicherweise trotz bedeutsamer Restriktion des Virus eine Verringerung der Nebenwirkungen erreicht werden. Des Weiteren zeigte sich in Vero E6 Zellen wiederum, dass IFN α 5 in Kombination mit Remdesivir einen besseren Effekt zeigte als der klinisch zugelassene Subtyp IFN α 2.

Die Untersuchung der ISG-Expression in Vero E6 Zellen und hAE Zellen zeigte größtenteils eine Übereinstimmung in der Induktion von Schlüssel-ISGs und der antiviralen Effekte, wobei IFN α 5 fast immer zur stärksten ISG-Induktion führte, während bspw. IFN α 16 nur geringe Tendenzen einer Induktion zeigte. Da für einige der untersuchten ISGs bereits eine Inhibition der SARS-CoV-2-Replikation beschrieben wurde, könnte dieser Auszug aus der großen Anzahl an unterschiedlichen ISGs eine erste Erklärung für die verschiedenen antiviralen Effekte liefern. Für Mx1 wurde zum Beispiel mehrfach gezeigt, dass es gegen RNA-Viren wirksam ist und auch OAS2 kann zur Degradation viraler RNA führen [77]. Die Analyse der Transkriptomdaten zeigte, dass sich auch auf Transkriptebene die IFN α -Subtypen entsprechend ihrer antiviralen Aktivität aufgliedern. Während fast alle Subtypen eine Induktion antiviraler Immunabwehr aufwiesen, war diese bei den stark antiviralen Subtypen deutlich ausgeprägter und die Induktion erstreckte sich auf weitere Prozesse einschließlich bspw. Translation, Metabolismus oder oxidative Phosphorylierung. Die Aufschlüsselung in einzelne Prozesse macht aber wiederum deutlich, dass die Subtypen abseits der antiviralen Aktivität einzigartige Expressionsmuster aufweisen. Zudem gab es deutliche Unterschiede in der Anzahl differentiell regulierter Gene, von denen durch IFN α 5 fast 4.000 Stück reguliert wurden. Eine Gruppe berichtete im Zusammenhang mit HIV, dass die Stimulation mit sättigenden Mengen (1.000 pg/ml) der IFN α -Subtypen zu einer ähnlichen Induktion von lediglich 25 ISGs führte, und sich die Subtypen nur in der Quantität der ISG-Expression unterscheiden [201]. Die Daten dieser Arbeit widersprechen deutlich den Ergebnissen der gerade genannten Gruppe und zeigen, dass das Interferon ein Netzwerk aus tausenden von Genen umfasst, die auch qualitativ durch die verschiedenen Subtypen unterschiedlich reguliert werden. Allein die Analyse der Gene, die der antiviralen Immunantwort zugeordnet wurden, zeigte, dass es zur quantitativ und qualitativ unterschiedlichen Regulation etlicher Gene kommt. Zudem wies eine weitere Studie im Zusammenhang mit HIV, bei der CD4 Zellen des Darms mit unterschiedlichen IFN α -Subtypen stimuliert wurden, auf die Induktion von einzigartigen

Subtyp-spezifischen ISGs hin, besonders nach Stimulation mit IFN α 5 [76]. Die drastischen Unterschiede bei zwei Gruppen von ISGs zwischen den stark und mittel antiviralen und den schwach antiviralen Subtypen gibt zudem Hinweise auf mögliche wichtige ISGs zur Inhibition der SARS-CoV-2-Replikation. Übereinstimmend mit den ISG-Daten, die mittels qPCR erhoben wurden, fanden sich darunter auch *MX1* und *OAS2*. Diese beiden ISGs gehören auch zu den 19 DEGs, die von allen IFN α -Subtypen exprimiert wurden und einen deutlichen Verlauf von starker Induktion bei den stark antiviralen Subtypen zu keiner Induktion bei den schwach antiviralen Subtypen aufwiesen. Lediglich bezüglich der SARS-CoV-2-infizierten Zellen sind die hier generierten Daten gegensätzlich zu einer früheren Publikation. Während hier durch das Virus alleine nur eine schwache bis keine Induktion von ISGs der antiviralen Immunantwort detektiert werden konnte, zeigt eine andere Studie in humanen Epithelzellen der Bronchien (BE Zellen) eine signifikante Induktion mehrerer ISGs, darunter *MX1* und *OAS2* [142]. Allerdings wurden in der genannten Studie nur Zellen aus einem Donor untersucht, während in dieser Arbeit die gepoolten Daten von vier Donoren als Grundlage dienten. Gestützt werden die Erkenntnisse der Transkriptomanalyse zudem von den Proteomdaten, die mit IFN α 5, IFN α 7 und IFN α 16 als Vertreter der drei unterschiedlich antiviralen Gruppen, durchgeführt wurden. Auch dort konnte eine erhöhte Abundanz von Proteinen der antiviralen Immunantwort beobachtet werden, die mit der antiviralen Aktivität korrelierte und zum späteren Zeitpunkt verstärkt war. Ebenso fanden sich im Einklang mit den Transkriptomdaten *Mx1* und *OAS2* in Abhängigkeit von der viralen Aktivität unter den Proteinen, die nur nach IFN α -Stimulation stark angereichert waren (*on/off*-reguliert). Einzigartige Muster der Proteinanreicherung konnten auch unabhängig von der antiviralen Aktivität für andere GO-Signalwege (z.B. Proteinlokalisierung oder Lymphozytenregulation) beobachtet werden und bestätigen Subtyp-spezifische Effekte.

Eine interessante Entdeckung, die über die Effekte der IFN α -Subtypen hinaus beobachtet werden konnte, war, dass die Infektion mit SARS-CoV-2 zur verminderten Abundanz von Mucinen führte. Mucine sind Proteine, die den Mukus zusammensetzen und so bspw. den respiratorischen Trakt vor Pathogenen schützen [131]. Studien in Patienten zeigten, dass die mRNA-Signatur von Mucinen im Blut signifikante Unterschiede zwischen schwerer Symptomatik, leichter Symptomatik und Patienten ohne COVID-19 aufweist und sich somit möglicherweise als Biomarker eignen könnte [24, 217]. Mechanistisch wird vermutet, dass die Glykosylierungsmuster der Mucine die Bindung von SARS-CoV-2 an

den Rezeptor sterisch behindern oder die Expression von Ko-Rezeptoren regulieren [24]. Für IAV, ein anderes respiratorisches Virus, konnte ebenfalls ein inhibitorischer Effekt von Mucin1 auf die Virusreplikation berichtet werden [151]. Bezogen auf die Infektion ist die Verringerung der Mucine und der Mukusschicht damit ein wichtiger Aspekt, um nicht-infizierte Zellen suszeptibler für die Infektion zu machen.

Zusammenfassend konnte für den antiviralen Effekt in Bezug auf SARS-CoV-2 gezeigt werden, dass die Subtypen spezifische antivirale Aktivitäten zeigen, wie es bereits für andere Viren beobachtet wurde, wobei IFN α 5 bessere Effekte zeigte als der klinisch zugelassene Subtyp IFN α 2. Darüber hinaus konnte dieser Effekt mit der Expression von Schlüssel-ISGs korreliert werden und die Untersuchung zugrundeliegender ISG-Regulation der antiviralen Immunantwort und anderer biologischer Prozesse durch Transkriptom- und Proteomanalysen deutete auf mögliche neue Schlüsselmoleküle für die Restriktion von SARS-CoV-2 hin. Die dabei ergründeten Regulationsmuster weisen abseits der antiviralen Aktivität zudem auf eine Subtyp-spezifische Regulation weiterer biologischer Prozesse hin. Die durchgeführten Versuche zur Kombinationstherapie von IFN α mit Remdesivir eröffnen zusätzlich Einblicke in eine mögliche alternative Therapie der Infektion. Neben IFN-spezifischen Erkenntnissen konnten auch auf Proteinebene Mechanismen des Virus gezeigt werden, welche die Infektion begünstigen könnten.

6.2.3 Modulation der IFN α 2-Aktivität durch Kostimulation mit IL-1 β

Neben der bereits diskutierten Möglichkeit einer Kombinationstherapie, um die antiviralen Effekte von IFN α additiv durch eine weitere antivirale Substanz zu verstärken, besteht auch die Möglichkeit, die biologischen Effekte von IFN α durch Zugabe einer Substanz zu verstärken, die den IFN-Signalweg und die ISG-Expression positiv beeinflusst. Für das proinflammatorische Zytokin IL-1 β konnte ein solcher Effekt in PHHs berichtet werden [192]. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit untersucht, ob eine Kostimulation mit IFN α -Subtypen und IL-1 β zu einer verbesserten antiviralen Aktivität und ISG-Expression führt.

Überraschenderweise zeigten die Versuche in dieser Arbeit, dass die Kostimulation von IFN α mit IL-1 β einen negativen Einfluss auf die Inhibition der viralen Replikation von HBV durch IFN α hatte. Eine alleinige Stimulation mit IL-1 β erhöhte die viralen Titer ebenfalls fast signifikant. Dem gegenüber stehen zwei Studien, die von einer Inhibition von HBV-RNA,-DNA und HBsAg durch IL-1 β mittels Aktivierung von Cytidin-Desaminasen berichten [47, 253]. Allerdings unterscheiden sich der Versuchsaufbau zwischen diesen

Studien und dieser Arbeit deutlich, sodass weitere Versuche zur Untersuchung nötig wären. Übereinstimmend mit der bisherigen Literatur ist jedoch der verminderte Effekt von IFN α durch IL-1 β auf PHHs, da bereits zuvor von einem attenuierten IFN α -Effekt durch Inhibition von STAT1-Bindung und –Phosphorylierung berichtet wurde [237]. Auch wurde beobachtet, dass IL-1 β die IFN α -Expression begrenzen kann, um exzessive IFN-Antworten zu regulieren [150]. Möglicherweise wird daher im vorliegenden Versuchsaufbau eine mögliche autokrine IFN-Stimulation unterdrückt. Im Gegensatz dazu konnte für SARS-CoV-2 in Vero E6 Zellen in dieser Arbeit ein tendenziell verbesserter antiviraler Effekt durch IL-1 β nachgewiesen werden, der allerdings auf die schwach antiviralen IFN α -Subtypen beschränkt war. Die Transkriptom- und Proteomanalysen zeigten, dass die IFN α -Subtypen sich teilweise auch qualitativ in ihren Antworten unterscheiden. Sofern IL-1 β nur zu einer quantitativen Erhöhung der ISG-Induktion führt, könnte dies vermutlich nicht ausreichend sein, um zu signifikant verbesserten antiviralen Effekten zu führen. Offen bleibt des Weiteren die Frage, ob ein solcher Effekt auch in natürlichen Zielzellen von SARS-CoV-2 oder *in vivo* erzielt werden könnte, da Berichten zufolge IL-1 β die Expression der zellulären Protease TMPRSS2 verstärkt und somit eventuell den Eintritt des Virus in die Zelle begünstigen könnte [38]. Bezüglich der ISG-Expression konnte in dHepaRG Zellen unabhängig vom IFN α -Subtyp kein Effekt beobachtet werden. Zwar wurde eine erhöhte ISG-Expression nach Kostimulation mit IFN α und IL-1 β in Leberzellen publiziert, doch dafür wurden Huh7.5 Zellen, eine Karzinomzelllinie, verwendet, die sich möglicherweise in ihren Eigenschaften von dHepaRG Zellen unterscheiden [192]. Interessanterweise konnte für *ISG20* für IFN α 5 und IFN α 7 in Vero E6 Zellen eine signifikant erhöhte Expression nach Kostimulation gemessen werden, für die anderen beiden getesteten ISGs jedoch nicht. Dies legt den möglichen Schluss nahe, dass der verstärkende Effekt von IL-1 β möglicherweise auf bestimmte Zellen und bestimmte ISGs beschränkt ist. IL-1 β wird mit der Aktivierung von STAT3 in Verbindung gebracht und daher wäre es denkbar, dass vor allen Dingen ISGs mit einer GAS-Sequenz in ihrer Promotorregion durch die IL-1 β -Stimulation beeinflusst werden [6, 192]. Eine solche GAS-Sequenz in der Promotorregion ist bspw. für *ISG20* beschrieben, jedoch nicht für *ISG15* oder *MX1* [70]. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass IL-1 β potentiell den antiviralen Effekt und die ISG-Expression durch IFN α verstärken kann, dies jedoch scheinbar stark zelltyp- und ISG-abhängig ist. Damit liefert diese Arbeit besonders in Hinblick auf SARS-CoV-2 neue Erkenntnisse, die in Primärzellen bestätigt werden müssen.

6.3 Ein verbesserter antiviraler Effekt durch gezielte Mutation von IFN α 2

Bisher ist für die klinische Anwendung nur der Subtyp IFN α 2 zugelassen. Allerdings konnte im Zusammenhang mit zahlreichen Viren mittlerweile gezeigt werden, dass andere IFN α -Subtypen bessere antivirale Effekte aufweisen [37, 119, 209]. IFN α 6 und IFN α 14 haben sich als besonders potente Subtypen gegen unterschiedliche Viren erwiesen. In dieser Arbeit sollte daher anhand eines Vergleichs der Aminosäuresequenzen mögliche Mutationen zur Verbesserung des antiviralen Effekts auf Grundlage der Sequenzunterschiede zwischen IFN α 2 und IFN α 6 oder IFN α 14 ermittelt werden. Im Anschluss wurden IFN α 2-Mutanten rekombinant hergestellt und der antivirale Effekt auf HBV und SARS-CoV-2 im Vergleich zu den parentalen IFN α -Subtypen getestet.

Der Vergleich der Proteinsequenzen zeigte Unterschiede zwischen IFN α 2 und IFN α 6 bzw. IFN α 14 sowohl an den Bindestellen an die Rezeptoruntereinheiten IFNAR1 und IFNAR2 als auch in der *Tunable anchor*-Region, die in einer vorhergehenden Untersuchung als Region identifiziert wurde, die nach außen gerichtet hochkonserviert, nach innen gerichtet jedoch variabel und möglicherweise modulierbar ist (nicht publizierte Daten). Interessanterweise zeigten die IFN α 2/ α 6-Mutanten, die auf diese Weise hergestellt wurden, sowohl für HBV als auch SARS-CoV-2 deutliche Verschlechterungen des antiviralen Effekts nach Mutationen an der IFNAR2-Bindestelle bzw. dem *Tunable anchor*. Dies könnte ein Beleg dafür sein, dass die Bindestellen an IFNAR2 für IFN α 6 als Gesamtes bereits evolutionär optimiert sind. Schließlich gibt es auch außerhalb der IFNAR-Bindestellen Sequenzunterschiede, die die chemischen Wechselwirkungen von IFN α 6 insgesamt beeinflussen können. Unterschiede bezüglich IFNAR1 gibt es zwischen IFN α 2 und IFN α 6 nicht. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen zeigten auch für IFN α 2/IFN α 14-Mutanten Veränderungen am *Tunable anchor* oder anderen Nicht-Rezeptorbindestellen keine Verbesserung des antiviralen Effekts. Im Gegensatz zu IFN α 2/IFN α 6-Mutanten wiesen Veränderungen in der IFNAR2-Bindestelle keine Verschlechterung auf, sondern eine tendenzielle Verbesserung des antiviralen Effekts gegenüber IFN α 2. Für SARS-CoV-2 waren diese Ergebnisse teilweise sogar signifikant. IFNAR2 ist die Rezeptoruntereinheit, an die IFN α aufgrund der etwa 100-fach höheren Affinität zuerst bindet, bevor nachfolgend die Bindung an IFNAR1 und damit die Bildung des ternären Komplexes stattfindet [183, 216]. Die Mutationen in dieser Region könnten daher eventuell die initiale Bindung oder deren Stabilität begünstigen. Für die Mutation

von L26 wurde zudem bereits eine mögliche Modulation des antiviralen Effekts beschrieben und für L154 gibt es ebenfalls einen Bericht über die Bedeutung für die Rezeptorbindung [113, 247, 259]. Dies könnten Belege für die vorliegenden Beobachtungen sein. Eine Mutation von L15 hingegen, die in der IFN α 2/IFN α 6-Mutante enthalten ist, wurde mit einer bis zu 100-fach schlechteren antiviralen Wirkung in Verbindung gebracht [54, 247].

Darüber hinaus konnten Mutationen in der IFNAR1-Bindestelle zu einer signifikant verbesserten antiviralen Aktivität führen. Womöglich führen Veränderungen in IFNAR1-Bindestellen zu einer verbesserten IFNAR1-Bindung und verstärkten Phosphorylierungskaskaden. Für die einzelnen Aminosäuren der IFNAR1-Mutante IFN α 2-EIFK ist wenig Genaues bekannt. Es wurde jedoch berichtet, dass Y90 die Geschwindigkeit der Bindungsdynamik zu IFNAR1 beeinflusst [50]. Eine Veränderung von R121 zeigte in Abhängigkeit von anderen Aminosäuren ambivalente Ergebnisse. Eine Kombination mit einem Cystein an Position 86 führte zu einer Verbesserung der antiviralen Aktivität um das Vielfache in humanen, murinen und bovinen Zellen [32, 247]. Ein Beleg für diese Bivalenz ist ebenfalls, dass die Mutante IFN α 2-PEIFKF, die alle IFNAR1- und IFNAR2-Mutationen enthält, für SARS-CoV-2 eine deutlich schlechtere antivirale Aktivität zeigte als die Mutationen an der Bindestelle nur einer Rezeptoruntereinheit. Die Zusammensetzung der Mutationen bzw. Aminosäuren im Gesamten scheint hier also bedeutend zu sein. Leider sind die vorhergehenden Studien zur funktionalen Analyse der einzelnen Aminosäuren bereits sehr alt und methodisch sowie inhaltlich nicht mehr aktuell. Daher sind neue Studien dazu dringend notwendig. Auch weitere IFN α -Subtypen könnten mit in die Studie aufgenommen werden, da im Rahmen dieser Arbeit besonders IFN α 5 durch starke antivirale Effekte hervorgetreten ist. Neben den antiviralen Effekten wurden ebenfalls die zytotoxischen Eigenschaften der Mutanten untersucht und es konnte keine erhöhte Zytotoxizität im Vergleich zu den natürlich vorkommenden IFN α -Subtypen festgestellt werden.

Zusammengefasst konnte diese Arbeit zeigen, dass eine Verbesserung des antiviralen Effekts von IFN α 2 durch gezielte Mutation auf Basis der Sequenzunterschiede zwischen IFN α -Subtypen möglich ist. Dies könnte dazu beitragen, durch Mutation verändertes IFN α 2 vergleichsweise schnell in die klinische Anwendung zu bringen und stellt eine völlig neue Herangehensweise dar. Allerdings sind weitere Untersuchungen nötig, um eine Optimierung der Mutationskomposition durchzuführen.

7 Zusammenfassungen

7.1 Zusammenfassung

IFN α -Subtypen stellen eine wichtige Komponente des angeborenen Immunsystems in der Abwehr gegen Pathogene wie Bakterien, Pilzen und Viren dar. Die Induktion von IFN α findet nach Erkennung von hochkonservierten Strukturen der Pathogene durch bestimmte Sensoren statt und versetzt Zellen in einen antiviralen Zustand. Dabei führt die Bindung von IFN α an dessen Rezeptor zur Expression hunderter ISGs, die über zahlreiche Mechanismen direkt antiviral wirken. Bekannt ist jedoch, dass die zwölf humanen IFN α -Subtypen abhängig von verschiedenen Virusinfektion unterschiedliche antivirale Effekte aufweisen. Der Grund für diese Unterschiede konnte noch nicht vollständig geklärt werden. In dieser Arbeit wurden Typ-I-IFN-Induktion, der antivirale Effekt der IFN α -Subtypen sowie die Modulation des antiviralen Effekts durch andere Zytokine oder Mutation von IFN α 2 für HBV und SARS-CoV-2 untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass die Infektion mit HBV sowohl in einer Zelllinie als auch in Primärzellen zu keiner Induktion von Typ-I-IFN geführt hat. Für SARS-CoV-2 hingegen konnte in Calu-3 Zellen eine späte Typ-I-IFN-Produktion gemessen werden, die abhängig von der Replikationskompetenz des Virus ist.

Für die antiviralen Effekte der IFN α -Subtypen konnten für beide Viren signifikante Unterschiede festgestellt werden und die IFN α -Subtypen ließen sich jeweils in stark, mittel und schwach antivirale Subtypen eingruppiert. In beiden Infektionen zeigte IFN α 5 den stärksten antiviralen Effekt, was sich von bereits publizierten Ergebnissen für andere Virusinfektionen wie HIV oder Influenza unterscheidet. Dies macht deutlich, dass die Effekte der IFN α -Subtypen virusspezifisch sind. Die antiviralen Effekte korrelierten zudem weitestgehend mit der Expression von bestimmten Schlüssel-ISGs.

Im Falle von HBV konnte gezeigt werden, dass die *APOBEC3*-Gene nach IFN α -Stimulation in HepaRG Zellen relativ schwach induziert wurden, wobei signifikante Induktionen nur für *APOBEC3F* und *APOBEC3G* erzielt werden konnten. Auch hier wurden Subtyp-spezifische Unterschiede beobachtet. Eine Veränderung der Expression durch eine HBV-Infektion konnte nicht beobachtet werden.

Mögliche Schlüssel-Moleküle für den antiviralen Effekt gegen SARS-CoV-2 wurden in Primärzellen mittels Transkriptom- und Proteomanalyse analysiert. Es konnten wiederum deutliche Unterschiede zwischen den Subtypen beobachtet werden, die ein Beleg für die spezifischen Aktivitäten sind. Die Expressionsdaten der ISGs spiegelten im Transkriptom

die antiviralen Aktivitäten der Subtypen wider und es fanden sich 19 Gene, die durch alle Subtypen differentiell reguliert wurden. Innerhalb dieser 19 Gene zeigte die Expression von *MX1* und *OAS2* eine deutliche Korrelation mit den antiviralen Effekten. Ebendiese beiden Gene konnten auch im Proteom als stark *on-off*-reguliert identifiziert werden, wiederum in Korrelation mit den antiviralen Effekten. Zusätzlich zeigten die Proteomdaten, dass die Infektion mit SARS-CoV-2 zu einer verringerten Abundanz von Mucinen führt, die wichtig für den Schutz des respiratorischen Trakts sind.

Die Kombinationstherapie von IFN α 2 und IFN α 5 mit Remdesivir gegen SARS-CoV-2 führte in Vero E6 Zellen zu einem verbesserten antiviralen Effekt auf additive Weise. Für ausgewählte Konzentrationen konnte dies auch in humanen Lungenprimärzellen beobachtet werden. Dies gibt Einblicke in die Möglichkeit einer neuen alternativen Therapie.

Eine kombinierte Stimulation mit dem proinflammatorischen Zytokin IL-1 β , dass die Aktivierung von STATs begünstigen soll, führte im Falle der HBV-Infektion zu einem verminderten antiviralen Effekt. Für SARS-CoV-2 konnte die leichte Tendenz eines verbesserten antiviralen Effekts beobachtet werden, der sich jedoch nur auf die Stimulation von schwach antiviralen Subtypen in niedrigen Konzentrationen beschränkte. Eine Untersuchung der ISG-Induktion zeigte von drei untersuchten ISGs lediglich eine signifikante Erhöhung von *ISG20* nach der Kostimulation mit IFN α 5 oder IFN α 7 und IL-1 β in Vero E6 Zellen, was auf eine gewisse Zelltyp- und ISG-Spezifität des kombinatorischen Effekts von IL-1 β hindeutet.

Die Generation und Verwendung von IFN α 2-Mutanten basierend auf den Sequenzunterschieden zu IFN α 6 und IFN α 14 zeigte für beide Virusinfektionen eine Verbesserung des Effekts gegenüber IFN α 2 durch IFN α 2/IFN α 14-Mutanten, die Mutationen für die Bindungsstellen an die IFNAR-Untereinheiten enthielten. Besonders die Mutation der IFNAR1-Bindestellen führte zu einem signifikant verbesserten Effekt.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass sich die Induktion von Typ-I-IFN zwischen verschiedenen Virusinfektionen unterscheidet. Gleiches gilt auch für die antiviralen Effekte, die Subtyp-spezifische Aktivitäten erkennen lassen. Diese Hypothese konnte auch auf mRNA- und Protein-Ebene durch die Analyse von Transkriptom- und Proteomdaten bestätigt werden. Außerdem liefert die Arbeit neue Ansatzpunkte für die Verbesserung des antiviralen Effekts, sei es durch Kombination mit DAAs, anderen Zytokinen oder durch die Generation neuer IFN α 2-Mutanten.

7.2 Summary

IFN α subtypes represent an important effector cytokine of the innate immune system in defending pathogens like bacteria, fungi or viruses. IFN α is induced upon recognition of highly conserved structures of the pathogens by specific sensors and it triggers an antiviral state within cells. Autocrine and paracrine binding of IFN α to its receptors results in the expression of hundreds of ISGs, which act directly antiviral through various mechanisms. It is known that the twelve human IFN α subtypes exhibit unique antiviral effects during different viral infections. The exact molecular mechanisms for these differences have not yet been elucidated so far. In this thesis, type I IFN induction, the antiviral effect of the IFN α subtypes and the modulation of this antiviral effect by other cytokines or mutations of IFN α 2 was investigated for HBV and SARS-CoV-2.

The experiments showed that the infection with HBV led to no type I IFN induction, neither in a cell line nor in primary cells. However, for SARS-CoV-2 a late type I IFN response could be measured in Calu-3 cells which was dependent on viral replication.

For the antiviral effects of the IFN α subtypes, significant differences could be observed for both infections. The different IFN α subtypes could be divided into three groups based on their high, medium or low antiviral effect. In both infections, IFN α 5 showed the strongest antiviral effects, which differed from the results published for other viruses like HIV or IAV. This emphasizes that the effect of the IFN α subtypes is virus-specific. For most parts, the antiviral effects correlated with the expression of some key ISGs.

In the case of HBV, *APOBEC3* gene levels were relatively low after IFN α stimulation of differentiated HepaRG cells. Significant induction could only be observed for *APOBEC3F* and *APOBEC3G*. Again, subtype-specific differences were observed. Changes in the expression could not be measured during an established HBV infection.

Possible key molecules for the antiviral effect against SARS-CoV-2 were examined in primary cells by transcriptomics and proteomics analysis. Once more, clear differences among the subtypes could be observed, which might explain their specific antiviral activities. The ISG expression data reflected the antiviral activities of the subtypes in the transcriptome. There were 19 genes, which were differentially regulated by all subtypes. Within this set of genes, the expression of *MX1* and *OAS2* showed an obvious correlation with their antiviral effects. Both genes could also be identified as strongly on-off regulated proteins in the proteomic analysis, once again in correlation with their antiviral effects. Further, the protein data revealed that the infection with SARS-CoV-2 led to a reduced abundance of mucins, which are important for the protection of the respiratory tract.

Combination therapy of IFN α 2 or IFN α 5 with remdesivir against SARS-CoV-2 in Vero E6 cells led to an increased antiviral effect in an additive manner. For selected concentrations, this could also be validated in human primary lung cells. This might contribute to new insight for alternative therapies.

A combined stimulation with the pro-inflammatory cytokine IL-1 β , which was reported to increase STAT activation, led to the reduction of the antiviral effect of IFN α subtypes in the case of HBV. For SARS-CoV-2, there was a slight tendency that IL-1 β might increase the antiviral effect. However, this was limited to the low antiviral subtypes in low concentrations. An analysis of the ISG induction revealed that out of three examined ISGs, there was only a significantly increased induction observed for *ISG20* after co-stimulation of IFN α 5 or IFN α 7 with IL-1 β in Vero E6 cells. This might point at a certain cell- and/or ISG-specificity of the combinatory effect of IL-1 β .

The generation and stimulation with IFN α 2 mutants based on the amino acid differences with IFN α 6 and IFN α 14 showed an increased antiviral activity compared to IFN α 2 by IFN α 2/IFN α 14 mutants, which contained mutations for the IFNAR binding sites. Especially, mutations of the IFNAR1 binding site led to significantly increased effects.

In summary, it was shown in this thesis that the induction of type I IFNs differs between different virus infections. Same applies to the antiviral effects, which elucidate subtype-specific activities and a clear separation of IFN α subtypes in groups with high, medium and low antiviral activity. This hypothesis could also be confirmed on mRNA and protein levels by transcriptomics and proteomics. Further, this thesis points at new central aspects for the enhancement of the antiviral effects, which might be combination with DAAs, combination with other cytokines or by generation of new IFN α 2 mutants.

8 Literaturverzeichnis

1. (2021) Calu-3 | ATCC. <https://www.atcc.org/products/htb-55>. Accessed 21 Dec 2021
2. Abdallah F, Mijouin L, Pichon C (2017) Skin Immune Landscape: Inside and Outside the Organism. *Mediators Inflamm* 2017:5095293. doi: 10.1155/2017/5095293
3. Aden DP, Fogel A, Plotkin S et al. (1979) Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* 282:615–616. doi: 10.1038/282615a0
4. Ahn J, Barber GN (2019) STING signaling and host defense against microbial infection. *Exp Mol Med* 51:1–10. doi: 10.1038/s12276-019-0333-0
5. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124:783–801. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.015
6. Albrecht U, Yang X, Asselta R et al. (2007) Activation of NF-kappaB by IL-1beta blocks IL-6-induced sustained STAT3 activation and STAT3-dependent gene expression of the human gamma-fibrinogen gene. *Cell Signal* 19:1866–1878. doi: 10.1016/j.cellsig.2007.04.007
7. Amarante-Mendes GP, Adjemian S, Branco LM et al. (2018) Pattern Recognition Receptors and the Host Cell Death Molecular Machinery. *Front Immunol* 9:2379. doi: 10.3389/fimmu.2018.02379
8. Ammerman NC, Beier-Sexton M, Azad AF (2008) Growth and maintenance of Vero cell lines. *Curr Protoc Microbiol* Appendix 4:Appendix 4E. doi: 10.1002/9780471729259.mca04es11
9. Anafu AA, Bowen CH, Chin CR et al. (2013) Interferon-inducible Transmembrane Protein 3 (IFITM3) Restricts Reovirus Cell Entry*. *J Biol Chem* 288:17261–17271. doi: 10.1074/jbc.M112.438515
10. Antonelli G, Scagnolari C, Moschella F et al. (2014) Twenty-five years of type I interferon-based treatment: A critical analysis of its therapeutic use. *Cytokine Growth Factor Rev* 26:121–131. doi: 10.1016/j.cytogfr.2014.12.006
11. Bai L, Zhang W, Tan L et al. (2015) Hepatitis B virus hijacks CTHRC1 to evade host immunity and maintain replication. *J Mol Cell Biol* 7:543–556. doi: 10.1093/jmcb/mjv048
12. Bandurska K, Król I, Myga-Nowak M (2014) Interferons: between structure and function (Interferons: between structure and function). *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 68:428–440. doi: 10.5604/17322693.1101229

13. Banerjee AK, Blanco MR, Bruce EA et al. (2020) SARS-CoV-2 Disrupts Splicing, Translation, and Protein Trafficking to Suppress Host Defenses. *Cell* 183:1325-1339.e21. doi: 10.1016/j.cell.2020.10.004
14. Bastard P, Rosen LB, Zhang Q et al. (2020) Autoantibodies against type I IFNs in patients with life-threatening COVID-19. *Science* 370. doi: 10.1126/science.abd4585
15. Baum A, García-Sastre A (2010) Induction of type I interferon by RNA viruses: cellular receptors and their substrates. *Amino Acids* 38:1283–1299. doi: 10.1007/s00726-009-0374-0
16. Beigel JH, Tomashek KM, Dodd LE et al. (2020) Remdesivir for the Treatment of Covid-19 — Final Report. *N Engl J Med*. doi: 10.1056/NEJMoa2007764
17. Bekisz J, Baron S, Balinsky C et al. (2010) Antiproliferative Properties of Type I and Type II Interferon. *Pharmaceuticals (Basel)* 3:994–1015. doi: 10.3390/ph3040994
18. Belloni L, Pollicino T, Nicola F de et al. (2009) Nuclear HBx binds the HBV minichromosome and modifies the epigenetic regulation of cccDNA function. *PNAS* 106:19975–19979. doi: 10.1073/pnas.0908365106
19. Belloni L, Allweiss L, Guerrieri F 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. *The Journal of clinical investigation* 122:529–537. doi: 10.1172/JCI58847
20. Berezhnoĭ AP, Pavlova GA, Samoĭlova LI et al. (1980) Siringomieliticheskie osteoartropatii u deteĭ (Syringomyelitic osteoarthropathies in children). *Ortop Travmatol Protez*:6–10
21. Bolen CR, Ding S, Robek MD et al. (2014) Dynamic expression profiling of type I and type III interferon-stimulated hepatocytes reveals a stable hierarchy of gene expression. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 59:1262–1272. doi: 10.1002/hep.26657
22. Bonvin M, Achermann F, Greeve I et al. (2006) Interferon-inducible expression of APOBEC3 editing enzymes in human hepatocytes and inhibition of hepatitis B virus replication. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 43:1364–1374. doi: 10.1002/hep.21187
23. Borden EC, Sen GC, Uze G et al. (2007) Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. *Nat Rev Drug Discov* 6:975–990. doi: 10.1038/nrd2422
24. Bose M, Mitra B, Mukherjee P (2021) Mucin signature as a potential tool to predict susceptibility to COVID-19. *Physiol Rep* 9:e14701. doi: 10.14814/phy2.14701
25. Botos I, Segal DM, Davies DR (2011) The structural biology of Toll-like receptors, vol 19

26. Böttcher B, Wynne SA, Crowther RA (1997) Determination of the fold of the core protein of hepatitis B virus by electron cryomicroscopy. *Nature* 386:88–91. doi: 10.1038/386088a0
27. Brian DA, Baric RS (2005) Coronavirus genome structure and replication. *Curr Top Microbiol Immunol* 287:1–30. doi: 10.1007/3-540-26765-4_1
28. Broering R, Lutterbeck M, Trippler M et al. (2014) Long-term stimulation of Toll-like receptor 3 in primary human hepatocytes leads to sensitization for antiviral responses induced by poly I:C treatment. *J Viral Hepat* 21:480–490. doi: 10.1111/jvh.12174
29. Cao Z, Xia H, Rajsbaum R et al. (2021) Ubiquitination of SARS-CoV-2 ORF7a promotes antagonism of interferon response. *Cell Mol Immunol* 18:746–748. doi: 10.1038/s41423-020-00603-6
30. Cella M, Jarrossay D, Facchetti F et al. (1999) Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med* 5:919–923. doi: 10.1038/11360
31. Cervantes-Barragan L, Vanderheiden A, Royer CJ et al. (2021) Plasmacytoid dendritic cells produce type I interferon and reduce viral replication in airway epithelial cells after SARS-CoV-2 infection. *bioRxiv*. doi: 10.1101/2021.05.12.443948
32. Cheetham BF, McInnes B, Mantamadiotis T et al. (1991) Structure-function studies of human interferons-alpha: enhanced activity on human and murine cells. *Antiviral Research* 15:27–39. doi: 10.1016/0166-3542(91)90038-s
33. Chen F, Bhatia D, Chang Q et al. (2006) Finding NEMO by K63-linked polyubiquitin chain. *Cell Death Differ* 13:1835–1838. doi: 10.1038/sj.cdd.4402014
34. Chen R, Zhao X, Wang Y et al. (2017) Hepatitis B virus X protein is capable of down-regulating protein level of host antiviral protein APOBEC3G. *Sci Rep* 7:40783. doi: 10.1038/srep40783
35. Chen J, Xu W, Chen Y et al. (2017) Matrix Metalloproteinase 9 Facilitates Hepatitis B Virus Replication through Binding with Type I Interferon (IFN) Receptor 1 To Repress IFN/JAK/STAT Signaling. *J Virol* 91. doi: 10.1128/JVI.01824-16
36. Chen K, Liu J, Cao X (2017) Regulation of type I interferon signaling in immunity and inflammation: A comprehensive review. *J Autoimmun* 83:1–11. doi: 10.1016/j.jaut.2017.03.008
37. Chen J, Li Y, Lai F et al. (2021) Functional Comparison of Interferon- α Subtypes Reveals Potent Hepatitis B Virus Suppression by a Concerted Action of Interferon- α

- and Interferon- γ Signaling. *Hepatology* (Baltimore, Md.) 73:486–502. doi: 10.1002/hep.31282
38. Cioccarelli C, Sánchez-Rodríguez R, Angioni R et al. (2021) IL1 β Promotes TMPRSS2 Expression and SARS-CoV-2 Cell Entry Through the p38 MAPK-GATA2 Axis. *Front Immunol* 12:781352. doi: 10.3389/fimmu.2021.781352
39. Clark K, Nanda S, Cohen P (2013) Molecular control of the NEMO family of ubiquitin-binding proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14:673–685. doi: 10.1038/nrm3644
40. Cohen B, Novick D, Barak S et al. (1995) Ligand-induced association of the type I interferon receptor components. *Mol Cell Biol* 15:4208–4214. doi: 10.1128/MCB.15.8.4208
41. Cortese M, Lee J-Y, Cerikan B et al. (2020) Integrative Imaging Reveals SARS-CoV-2-Induced Reshaping of Subcellular Morphologies. *Cell Host Microbe* 28:853-866.e5. doi: 10.1016/j.chom.2020.11.003
42. Cortez KJ, Kottlilil S (2015) Beyond interferon: rationale and prospects for newer treatment paradigms for chronic hepatitis C. *Ther Adv Chronic Dis* 6:4–14. doi: 10.1177/2040622314551934
43. CoVariants (2022) CoVariants. <https://covariants.org/variants>. Accessed 13 Feb 2022
44. Cull VS, Tilbrook PA, Bartlett EJ et al. (2003) Type I interferon differential therapy for erythroleukemia: specificity of STAT activation. *Blood* 101:2727–2735. doi: 10.1182/blood-2002-05-1521
45. Da Matos AR, Wunderlich K, Schloer S et al. (2019) Antiviral potential of human IFN- α subtypes against influenza A H3N2 infection in human lung explants reveals subtype-specific activities. *Emerg Microbes Infect* 8:1763–1776. doi: 10.1080/22221751.2019.1698271
46. Das S, Ramakrishnan K, Behera SK et al. (2019) Hepatitis B Vaccine and Immunoglobulin: Key Concepts. *J Clin Transl Hepatol* 7:165–171. doi: 10.14218/JCTH.2018.00037
47. Delphin M, Faure-Dupuy S, Isorce N et al. (2021) Inhibitory Effect of IL-1 β on HBV and HDV Replication and HBs Antigen-Dependent Modulation of Its Secretion by Macrophages. *Viruses* 14. doi: 10.3390/v14010065
48. Desmyter J, Melnick JL, Rawls WE (1968) Defectiveness of interferon production and of rubella virus interference in a line of African green monkey kidney cells (Vero). *J Virol* 2:955–961. doi: 10.1128/JVI.2.10.955-961.1968

49. Doitsh G, Shaul Y (2004) Enhancer I predominance in hepatitis B virus gene expression. *Mol Cell Biol* 24:1799–1808. doi: 10.1128/MCB.24.4.1799-1808.2004
50. Dron M, Tovey MG, Uzé G (1986) Isolation of Daudi cells with reduced sensitivity to interferon. IV. Characterization of clones with altered binding of human interferon alpha subspecies. *J Gen Virol* 67 (Pt 4):663–669. doi: 10.1099/0022-1317-67-4-663
51. Drugs.com (2022) Interferon alfa-2b Side Effects: Common, Severe, Long Term - Drugs.com. <https://www.drugs.com/sfx/interferon-alfa-2b-side-effects.html>. Accessed 08 Feb 2022
52. Dunn KC, Aotaki-Keen AE, Putkey FR et al. (1996) ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties. *Exp Eye Res* 62:155–169. doi: 10.1006/exer.1996.0020
53. Durfee LA, Lyon N, Seo K et al. (2010) The ISG15 conjugation system broadly targets newly synthesized proteins: implications for the antiviral function of ISG15. *Mol Cell* 38:722–732. doi: 10.1016/j.molcel.2010.05.002
54. Edge MD, Camble R, Moore VE et al. (1986) Interferon analogues from synthetic genes: an approach to protein structure-activity studies. *Interferon* 7:1–46
55. Espert L, Degols G, Gongora C et al. (2003) ISG20, a new interferon-induced RNase specific for single-stranded RNA, defines an alternative antiviral pathway against RNA genomic viruses. *J Biol Chem* 278:16151–16158. doi: 10.1074/jbc.M209628200
56. European Centre for Disease Prevention and Control (2016) Systematic review on hepatitis B and C prevalence in the EU/EEA. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/systematic-review-hepatitis-b-and-c-prevalence-eueea>. Accessed 08 Feb 2022
57. Farrell PJ, Broeze RJ, Lengyel P (1979) Accumulation of an mRNA and protein in interferon-treated Ehrlich ascites tumour cells. *Nature* 279:523–525. doi: 10.1038/279523a0
58. Fasler-Kan E, Pansky A, Wiederkehr M et al. (1998) Interferon-alpha activates signal transducers and activators of transcription 5 and 6 in Daudi cells. *Eur J Biochem* 254:514–519. doi: 10.1046/j.1432-1327.1998.2540514.x
59. Felgenhauer U, Schoen A, Gad HH et al. (2020) Inhibition of SARS-CoV-2 by type I and type III interferons. *J Biol Chem* 295:13958–13964. doi: 10.1074/jbc.AC120.013788
60. Finkel Y, Mizrahi O, Nachshon A et al. (2021) The coding capacity of SARS-CoV-2. *Nature* 589:125–130. doi: 10.1038/s41586-020-2739-1

61. Gack MU, Shin YC, Joo C-H et al. (2007) TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. *Nature* 446:916–920. doi: 10.1038/nature05732
62. Gao B, Duan Z, Xu W et al. (2009) Tripartite motif-containing 22 inhibits the activity of hepatitis B virus core promoter, which is dependent on nuclear-located RING domain. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 50:424–433. doi: 10.1002/hep.23011
63. Gao Y, Feng J, Yang G et al. (2017) Hepatitis B virus X protein-elevated MSL2 modulates hepatitis B virus covalently closed circular DNA by inducing degradation of APOBEC3B to enhance hepatocarcinogenesis. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 66:1413–1429. doi: 10.1002/hep.29316
64. Gao W, Xiong Y, Li Q et al. (2017) Inhibition of Toll-Like Receptor Signaling as a Promising Therapy for Inflammatory Diseases: A Journey from Molecular to Nano Therapeutics. *Front Physiol* 8:508. doi: 10.3389/fphys.2017.00508
65. Gao Y, Yan L, Huang Y et al. (2020) Structure of the RNA-dependent RNA polymerase from COVID-19 virus. *Science* 368:779–782. doi: 10.1126/science.abb7498
66. Gazzola C, Cordani N, Carta S et al. (2005) The relative endogenous expression levels of the IFNAR2 isoforms influence the cytostatic and pro-apoptotic effect of IFNalpha on pleomorphic sarcoma cells. *Int J Oncol* 26:129–140
67. Gerlich W (1980) Hepatitis B virus contains protein attached to the 5' terminus of its complete DNA strand. *Cell* 21:801–809. doi: 10.1016/0092-8674(80)90443-2
68. Gibbert K, Schlaak JF, Yang D et al. (2013) IFN- α subtypes: distinct biological activities in anti-viral therapy. *British journal of pharmacology* 168:1048–1058. doi: 10.1111/bph.12010
69. Gil MP, Ploquin MJY, Watford WT et al. (2012) Regulating type 1 IFN effects in CD8 T cells during viral infections: changing STAT4 and STAT1 expression for function. *Blood* 120:3718–3728. doi: 10.1182/blood-2012-05-428672
70. Gongora C, Degols G, Espert L et al. (2000) A unique ISRE, in the TATA-less human Isg20 promoter, confers IRF-1-mediated responsiveness to both interferon type I and type II. *Nucleic Acids Res* 28:2333–2341
71. González-Navajas JM, Lee J, David M et al. (2012) Immunomodulatory functions of type I interferons. *Nat Rev Immunol* 12:125–135. doi: 10.1038/nri3133
72. Gordon CJ, Tchesnokov EP, Woolner E et al. (2020) Remdesivir is a direct-acting antiviral that inhibits RNA-dependent RNA polymerase from severe acute respiratory

- syndrome coronavirus 2 with high potency. *J Biol Chem* 295:6785–6797. doi: 10.1074/jbc.RA120.013679
73. Grein J, Ohmagari N, Shin D et al. (2020) Compassionate Use of Remdesivir for Patients with Severe Covid-19. *N Engl J Med* 382:2327–2336. doi: 10.1056/NEJMoa2007016
74. Gripon P, Rumin S, Urban S et al. (2002) Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:15655–15660. doi: 10.1073/pnas.232137699
75. Guo H, Jiang D, Zhou T et al. (2007) Characterization of the intracellular deproteinized relaxed circular DNA of hepatitis B virus: an intermediate of covalently closed circular DNA formation. *J Virol* 81:12472–12484
76. Guo K, Shen G, Kibbie J et al. (2020) Qualitative Differences Between the IFN α subtypes and IFN β Influence Chronic Mucosal HIV-1 Pathogenesis. *PLoS Pathog* 16. doi: 10.1371/journal.ppat.1008986
77. Haller O, Staeheli P, Schwemmler M et al. (2015) Mx GTPases: dynamin-like antiviral machines of innate immunity. *Trends Microbiol* 23:154–163. doi: 10.1016/j.tim.2014.12.003
78. Hardy MP, Owczarek CM, Trajanovska S et al. (2001) The soluble murine type I interferon receptor Ifnar-2 is present in serum, is independently regulated, and has both agonistic and antagonistic properties. *Blood* 97:473–482. doi: 10.1182/blood.V97.2.473
79. Harper MS, Guo K, Gibbert K et al. (2015) Interferon- α Subtypes in an Ex Vivo Model of Acute HIV-1 Infection: Expression, Potency and Effector Mechanisms. *PLOS Pathogens* 11:e1005254. doi: 10.1371/journal.ppat.1005254
80. Hatton CF, Botting RA, Dueñas ME et al. (2021) Delayed induction of type I and III interferons mediates nasal epithelial cell permissiveness to SARS-CoV-2. *Nat Commun* 12:7092. doi: 10.1038/s41467-021-27318-0
81. Heilingloh CS, Aufderhorst UW, Schipper L et al. (2020) Susceptibility of SARS-CoV-2 to UV irradiation. *Am J Infect Control* 48:1273–1275. doi: 10.1016/j.ajic.2020.07.031
82. Heinen N, Klöhn M, Steinmann E et al. (2021) In Vitro Lung Models and Their Application to Study SARS-CoV-2 Pathogenesis and Disease. *Viruses* 13. doi: 10.3390/v13050792
83. Hollinger FB, Liang TJ (2001) Fields virology. *Hepatitis B virus*:2971–3036

84. Honda K, Yanai H, Mizutani T et al. (2004) Role of a transductional-transcriptional processor complex involving MyD88 and IRF-7 in Toll-like receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:15416–15421. doi: 10.1073/pnas.0406933101
85. Hong X, Kim ES, Guo H (2017) Epigenetic regulation of hepatitis B virus covalently closed circular DNA: Implications for epigenetic therapy against chronic hepatitis B. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 66:2066–2077. doi: 10.1002/hep.29479
86. Hoofnagle JH, Mullen KD, Jones DB et al. (1986) Treatment of chronic non-A,non-B hepatitis with recombinant human alpha interferon. A preliminary report. *N Engl J Med* 315:1575–1578. doi: 10.1056/NEJM198612183152503
87. Hou F, Sun L, Zheng H et al. (2011) MAVS forms functional prion-like aggregates to activate and propagate antiviral innate immune response. *Cell* 146:448–461. doi: 10.1016/j.cell.2011.06.041
88. Hu X, Herrero C, Li W-P et al. (2002) Sensitization of IFN-gamma Jak-STAT signaling during macrophage activation. *Nat Immunol* 3:859–866. doi: 10.1038/ni828
89. Hu B, Guo H, Zhou P et al. (2021) Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol* 19:141–154. doi: 10.1038/s41579-020-00459-7
90. Huang I-C, Bailey CC, Weyer JL et al. (2011) Distinct patterns of IFITM-mediated restriction of filoviruses, SARS coronavirus, and influenza A virus. *PLOS Pathogens* 7:e1001258. doi: 10.1371/journal.ppat.1001258
91. Huang H-C, Chen C-C, Chang W-C et al. (2012) Entry of hepatitis B virus into immortalized human primary hepatocytes by clathrin-dependent endocytosis. *J Virol* 86:9443–9453
92. Hung IF-N, Lung K-C, Tso EY-K et al. (2020) Triple combination of interferon beta-1b, lopinavir–ritonavir, and ribavirin in the treatment of patients admitted to hospital with COVID-19: an open-label, randomised, phase 2 trial. *Lancet* 395:1695–1704. doi: 10.1016/S0140-6736(20)31042-4
93. Ichikawa T, Nakao K, Nakata K et al. (2002) Involvement of IL-1beta and IL-10 in IFN-alpha-mediated antiviral gene induction in human hepatoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 294:414–422. doi: 10.1016/S0006-291X(02)00502-8
94. Ickler J, Francois S, Widera M et al. (2020) HIV infection does not alter interferon α/β receptor 2 expression on mucosal immune cells. *PLoS One* 15:e0218905. doi: 10.1371/journal.pone.0218905

-
95. International Committee on Taxonomy of Viruses (2020) The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol* 5:536–544. doi: 10.1038/s41564-020-0695-z
 96. ISAACS A, LINDENMANN J (1957) Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 147:258–267. doi: 10.1098/rspb.1957.0048
 97. Ivashkiv LB, Donlin LT (2014) Regulation of type I interferon responses. *Nat Rev Immunol* 14:36–49. doi: 10.1038/nri3581
 98. Iwamoto M, Saso W, Sugiyama R et al. (2019) Epidermal growth factor receptor is a host-entry cofactor triggering hepatitis B virus internalization. *PNAS* 116:8487–8492. doi: 10.1073/pnas.1811064116
 99. Jafarzadeh A, Nemati M, Saha B et al. (2021) Protective Potentials of Type III Interferons in COVID-19 Patients: Lessons from Differential Properties of Type I- and III Interferons. *Viral Immunol* 34:307–320. doi: 10.1089/vim.2020.0076
 100. Jiang B, Himmelsbach K, Ren H et al. (2015) Subviral Hepatitis B Virus Filaments, like Infectious Viral Particles, Are Released via Multivesicular Bodies. *J Virol* 90:3330–3341. doi: 10.1128/JVI.03109-15
 101. Jonsdottir HR, Dijkman R (2015) Characterization of human coronaviruses on well-differentiated human airway epithelial cell cultures. *Methods Mol Biol* 1282:73–87. doi: 10.1007/978-1-4939-2438-7_8
 102. Jonsdottir HR, Dijkman R (2016) Coronaviruses and the human airway: a universal system for virus-host interaction studies. *Virol J* 13:24. doi: 10.1186/s12985-016-0479-5
 103. Kärber G (1931) Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Archiv f experiment Pathol u Pharmakol* 162:480–483. doi: 10.1007/bf01863914
 104. Kawai T, Akira S (2010) The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11:373–384. doi: 10.1038/ni.1863
 105. Kawai T, Sato S, Ishii KJ et al. (2004) Interferon-alpha induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6. *Nat Immunol* 5:1061–1068. doi: 10.1038/ni1118
 106. Kawasaki T, Kawai T (2014) Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol* 5:461. doi: 10.3389/fimmu.2014.00461

107. Keasler VV, Hodgson AJ, Madden CR et al. (2007) Enhancement of hepatitis B virus replication by the regulatory X protein in vitro and in vivo. *J Virol* 81:2656–2662. doi: 10.1128/JVI.02020-06
108. Kim Y-M, Shin E-C (2021) Type I and III interferon responses in SARS-CoV-2 infection. *Exp Mol Med* 53:750–760. doi: 10.1038/s12276-021-00592-0
109. Kim BK, Revill PA, Ahn SH (2011) HBV genotypes: relevance to natural history, pathogenesis and treatment of chronic hepatitis B. *Antivir Ther* 16:1169–1186. doi: 10.3851/IMP1982
110. Klaus W, Gsell B, Labhardt AM et al. (1997) The three-dimensional high resolution structure of human interferon alpha-2a determined by heteronuclear NMR spectroscopy in solution. *J Mol Biol* 274:661–675. doi: 10.1006/jmbi.1997.1396
111. Ko C, Chakraborty A, Chou W-M et al. (2018) Hepatitis B virus genome recycling and de novo secondary infection events maintain stable cccDNA levels. *Journal of hepatology* 69:1231–1241. doi: 10.1016/j.jhep.2018.08.012
112. Konno Y, Kimura I, Uriu K et al. (2020) SARS-CoV-2 ORF3b Is a Potent Interferon Antagonist Whose Activity Is Increased by a Naturally Occurring Elongation Variant. *Cell Rep* 32:108185. doi: 10.1016/j.celrep.2020.108185
113. Kontsek P (1994) Human type I interferons: structure and function. *Acta Virol* 38:345–360
114. Kopecky-Bromberg SA, Martínez-Sobrido L, Frieman M et al. (2007) Severe acute respiratory syndrome coronavirus open reading frame (ORF) 3b, ORF 6, and nucleocapsid proteins function as interferon antagonists. *J Virol* 81:548–557. doi: 10.1128/JVI.01782-06
115. Koyama T, Sakamoto N, Tanabe Y et al. (2006) Divergent activities of interferon-alpha subtypes against intracellular hepatitis C virus replication. *Hepatol Res* 34:41–49. doi: 10.1016/j.hepres.2005.10.005
116. Kreft ME, Jerman UD, Lasič E et al. (2015) The characterization of the human cell line Calu-3 under different culture conditions and its use as an optimized in vitro model to investigate bronchial epithelial function. *Eur J Pharm Sci* 69:1–9. doi: 10.1016/j.ejps.2014.12.017
117. Lai Y, Yi G, Chen A et al. (2011) Viral Double-Strand RNA-Binding Proteins Can Enhance Innate Immune Signaling by Toll-Like Receptor 3. *PLoS One* 6. doi: 10.1371/journal.pone.0025837

118. Lamontagne RJ, Bagga S, Bouchard MJ (2016) Hepatitis B virus molecular biology and pathogenesis. *Hepatoma Res* 2:163–186. doi: 10.20517/2394-5079.2016.05
119. Lavender KJ, Gibbert K, Peterson KE et al. (2016) Interferon Alpha Subtype-Specific Suppression of HIV-1 Infection In Vivo. *J Virol* 90:6001–6013. doi: 10.1128/JVI.00451-16
120. Lavoie TB, Kalie E, Crisafulli-Cabatu S et al. (2011) Binding and activity of all human alpha interferon subtypes. *Cytokine* 56:282–289. doi: 10.1016/j.cyto.2011.07.019
121. Le Bon A, Etchart N, Rossmann C et al. (2003) Cross-priming of CD8+ T cells stimulated by virus-induced type I interferon. *Nat Immunol* 4:1009–1015. doi: 10.1038/ni978
122. Le Bon A, Thompson C, Kamphuis E et al. (2006) Cutting edge: enhancement of antibody responses through direct stimulation of B and T cells by type I IFN. *J Immunol* 176:2074–2078. doi: 10.4049/jimmunol.176.4.2074
123. Lei X, Dong X, Ma R et al. (2020) Activation and evasion of type I interferon responses by SARS-CoV-2. *Nat Commun* 11:3810. doi: 10.1038/s41467-020-17665-9
124. Lenschow DJ, Lai C, Frias-Staheli N et al. (2007) IFN-stimulated gene 15 functions as a critical antiviral molecule against influenza, herpes, and Sindbis viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:1371–1376. doi: 10.1073/pnas.0607038104
125. Levy DE, Lew DJ, Decker T et al. (1990) Synergistic interaction between interferon-alpha and interferon-gamma through induced synthesis of one subunit of the transcription factor ISGF3. *EMBO J* 9:1105–1111
126. Lévy R, Bastard P, Lanternier F et al. (2021) IFN- α 2a Therapy in Two Patients with Inborn Errors of TLR3 and IRF3 Infected with SARS-CoV-2. *J Clin Immunol* 41:26–27. doi: 10.1007/s10875-020-00933-0
127. Li N, Zhang L, Chen L et al. (2012) MxA inhibits hepatitis B virus replication by interaction with hepatitis B core antigen. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 56:803–811. doi: 10.1002/hep.25608
128. Li K, Markosyan RM, Zheng Y-M et al. (2013) IFITM proteins restrict viral membrane hemifusion. *PLOS Pathogens* 9:e1003124. doi: 10.1371/journal.ppat.1003124

129. Li Y, Xia Y, Han M et al. (2017) IFN- α -mediated Base Excision Repair Pathway Correlates with Antiviral Response Against Hepatitis B Virus Infection. *Sci Rep* 7:12715. doi: 10.1038/s41598-017-13082-z
130. Li F, Wang Z, Hu F et al. (2020) Cell Culture Models and Animal Models for HBV Study. *Advances in experimental medicine and biology* 1179:109–135. doi: 10.1007/978-981-13-9151-4_5
131. Linden SK, Sutton P, Karlsson NG et al. (2008) Mucins in the mucosal barrier to infection. *Mucosal Immunol* 1:183–197. doi: 10.1038/mi.2008.5
132. Liu S, Peng N, Xie J et al. (2015) Human hepatitis B virus surface and e antigens inhibit major vault protein signaling in interferon induction pathways. *Journal of hepatology* 62:1015–1023. doi: 10.1016/j.jhep.2014.11.035
133. Liu Y, Nie H, Mao R 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 Pathogens* 13:e1006296. doi: 10.1371/journal.ppat.1006296
134. Lokugamage KG, Hage A, Vries M de et al. (2020) Type I Interferon Susceptibility Distinguishes SARS-CoV-2 from SARS-CoV. *J Virol* 94. doi: 10.1128/JVI.01410-20
135. López-Terrada D, Cheung SW, Finegold MJ et al. (2009) Hep G2 is a hepatoblastoma-derived cell line. *Hum Pathol* 40:1512–1515. doi: 10.1016/j.humpath.2009.07.003
136. Lu J, Pan Q, Rong L et al. (2011) The IFITM proteins inhibit HIV-1 infection. *J Virol* 85:2126–2137. doi: 10.1128/JVI.01531-10
137. Lu J-J, Chen E-Q, Yang J-H et al. (2012) A mutation in the interferon regulatory element of HBV may influence the response of interferon treatment in chronic hepatitis B patients. *Virol J* 9:10. doi: 10.1186/1743-422X-9-10
138. Lu H-L, Liao F (2013) Melanoma differentiation-associated gene 5 senses hepatitis B virus and activates innate immune signaling to suppress virus replication. *J Immunol* 191:3264–3276. doi: 10.4049/jimmunol.1300512
139. Lu R, Zhao X, Li J et al. (2020) Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet* 395:565–574. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30251-8
140. Lucifora J, Arzberger S, Durantel D et al. (2011) Hepatitis B virus X protein is essential to initiate and maintain virus replication after infection. *Journal of hepatology* 55:996–1003. doi: 10.1016/j.jhep.2011.02.015

141. Lucifora J, Xia Y, Reisinger F et al. (2014) Specific and nonhepatotoxic degradation of nuclear hepatitis B virus cccDNA. *Science* 343:1221–1228. doi: 10.1126/science.1243462
142. Luo W, Huang L, Wang X et al. (2021) SARS-CoV-2 infection activates a subset of intrinsic pathways to inhibit type I interferons in vitro and in vivo. *Int J Med Sci* 18:2561–2569. doi: 10.7150/ijms.56630
143. Luthra P, Sun D, Silverman RH et al. (2011) Activation of IFN- γ expression by a viral mRNA through RNase L and MDA5. *PNAS* 108:2118–2123. doi: 10.1073/pnas.1012409108
144. MacMicking JD (2012) Interferon-inducible effector mechanisms in cell-autonomous immunity. *Nat Rev Immunol* 12:367–382. doi: 10.1038/nri3210
145. Malone B, Urakova N, Snijder EJ et al. (2022) Structures and functions of coronavirus replication-transcription complexes and their relevance for SARS-CoV-2 drug design. *Nat Rev Mol Cell Biol* 23:21–39. doi: 10.1038/s41580-021-00432-z
146. Mao R, Zhang J, Jiang D et al. (2011) Indoleamine 2,3-dioxygenase mediates the antiviral effect of gamma interferon against hepatitis B virus in human hepatocyte-derived cells. *J Virol* 85:1048–1057. doi: 10.1128/JVI.01998-10
147. Marion M-J, Hantz O, Durantel D (2010) The HepaRG cell line: biological properties and relevance as a tool for cell biology, drug metabolism, and virology studies. *Methods Mol Biol* 640:261–272. doi: 10.1007/978-1-60761-688-7_13
148. Markušić M, Šantak M, Košutić-Gulija T et al. (2014) Induction of IFN- α subtypes and their antiviral activity in mumps virus infection. *Viral Immunol* 27:497–505. doi: 10.1089/vim.2014.0028
149. Martinez MG, Boyd A, Combe E et al. (2021) Covalently closed circular DNA: The ultimate therapeutic target for curing HBV infections. *Journal of hepatology* 75:706–717. doi: 10.1016/j.jhep.2021.05.013
150. Mayer-Barber KD, Andrade BB, Oland SD et al. (2014) Host-directed therapy of tuberculosis based on interleukin-1 and type I interferon crosstalk. *Nature* 511:99–103. doi: 10.1038/nature13489
151. McAuley JL, Corcilius L, Tan H-X et al. (2017) The cell surface mucin MUC1 limits the severity of influenza A virus infection. *Mucosal Immunol* 10:1581–1593. doi: 10.1038/mi.2017.16
152. McHutchison JG, Gordon SC, Schiff ER et al. (1998) Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. *Hepatitis*

-
- Interventional Therapy Group. *N Engl J Med* 339:1485–1492. doi: 10.1056/NEJM199811193392101
153. McWhirter SM, Tenover BR, Maniatis T (2005) Connecting mitochondria and innate immunity. *Cell* 122:645–647. doi: 10.1016/j.cell.2005.08.026
154. Medzhitov R, Janeway CA (1997) Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Current Opinion in Immunology* 9:4–9. doi: 10.1016/S0952-7915(97)80152-5
155. Meinke A, Barahmand-Pour F, Wöhrl S et al. (1996) Activation of different Stat5 isoforms contributes to cell-type-restricted signaling in response to interferons. *Mol Cell Biol* 16:6937–6944. doi: 10.1128/MCB.16.12.6937
156. Melkamu T (2010) Toll-like receptor interactions and their contribution to airway inflammation
157. Meng Z, Wang T, Chen L et al. (2021) The Effect of Recombinant Human Interferon Alpha Nasal Drops to Prevent COVID-19 Pneumonia for Medical Staff in an Epidemic Area. *Curr Top Med Chem* 21:920–927. doi: 10.2174/1568026621666210429083050
158. Min Y-Q, Huang M, Sun X et al. (2021) Immune evasion of SARS-CoV-2 from interferon antiviral system. *Comput Struct Biotechnol J* 19:4217–4225. doi: 10.1016/j.csbj.2021.07.023
159. Mistry P, Barmania F, Mellet J et al. (2022) SARS-CoV-2 Variants, Vaccines, and Host Immunity. *Front Immunol* 12. doi: 10.3389/fimmu.2021.809244
160. Modrow S, Truyen U, Schätzl H (2021) *Molekulare Virologie*, 4. Aufl. 2021. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg
161. Monk PD, Marsden RJ, Tear VJ et al. (2021) Safety and efficacy of inhaled nebulised interferon beta-1a (SNG001) for treatment of SARS-CoV-2 infection: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *The Lancet Respiratory Medicine* 9:196–206. doi: 10.1016/S2213-2600(20)30511-7
162. Montoya M, Schiavoni G, Mattei F et al. (2002) Type I interferons produced by dendritic cells promote their phenotypic and functional activation. *Blood* 99:3263–3271. doi: 10.1182/blood.v99.9.3263
163. Moynagh PN (2005) TLR signalling and activation of IRFs: revisiting old friends from the NF-kappaB pathway. *Trends Immunol* 26:469–476. doi: 10.1016/j.it.2005.06.009

-
164. Murphy CM, Xu Y, Li F et al. (2016) Hepatitis B Virus X Protein Promotes Degradation of SMC5/6 to Enhance HBV Replication. *Cell Rep* 16:2846–2854. doi: 10.1016/j.celrep.2016.08.026
 165. Mutz P, Metz P, Lempp FA et al. (2018) HBV Bypasses the Innate Immune Response and Does Not Protect HCV From Antiviral Activity of Interferon. *Gastroenterology* 154:1791-1804.e22. doi: 10.1053/j.gastro.2018.01.044
 166. Nguyen KB, Watford WT, Salomon R et al. (2002) Critical role for STAT4 activation by type 1 interferons in the interferon-gamma response to viral infection. *Science* 297:2063–2066. doi: 10.1126/science.1074900
 167. Ni Y, Urban S (2017) Hepatitis B Virus Infection of HepaRG Cells, HepaRG-hNTCP Cells, and Primary Human Hepatocytes. *Methods Mol Biol* 1540:15–25. doi: 10.1007/978-1-4939-6700-1_2
 168. Ni Y, Lempp FA, Mehrle S et al. (2014) Hepatitis B and D viruses exploit sodium taurocholate co-transporting polypeptide for species-specific entry into hepatocytes. *Gastroenterology* 146:1070–1083. doi: 10.1053/j.gastro.2013.12.024
 169. Nouri Y, Weinkove R, Perret R (2021) T-cell intrinsic Toll-like receptor signaling: implications for cancer immunotherapy and CAR T-cells. *J Immunother Cancer* 9:e003065. doi: 10.1136/jitc-2021-003065
 170. Oh SJ, Shin OS (2021) SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein Targets RIG-I-Like Receptor Pathways to Inhibit the Induction of Interferon Response. *Cells* 10. doi: 10.3390/cells10030530
 171. O'Neill LAJ, Bowie AG (2007) The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 7:353–364. doi: 10.1038/nri2079
 172. Oshiumi H, Matsumoto M, Funami K et al. (2003) TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nat Immunol* 4:161–167. doi: 10.1038/ni886
 173. Osiak A, Utermöhlen O, Niendorf S et al. (2005) ISG15, an interferon-stimulated ubiquitin-like protein, is not essential for STAT1 signaling and responses against vesicular stomatitis and lymphocytic choriomeningitis virus. *Mol Cell Biol* 25:6338–6345. doi: 10.1128/MCB.25.15.6338-6345.2005
 174. Ott JJ, Stevens GA, Groeger J et al. (2012) Global epidemiology of hepatitis B virus infection: new estimates of age-specific HBsAg seroprevalence and endemicity. *Vaccine* 30:2212–2219. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.12.116

175. Pan H, Peto R, Henao-Restrepo A-M et al. (2021) Repurposed Antiviral Drugs for Covid-19 - Interim WHO Solidarity Trial Results. *N Engl J Med* 384:497–511. doi: 10.1056/NEJMoa2023184
176. Park I-H, Kwon Y-C, Ryu W-S et al. (2014) Inhibition of hepatitis B virus replication by ligand-mediated activation of RNase L. *Antiviral Research* 104:118–127. doi: 10.1016/j.antiviral.2014.01.021
177. Park A, Iwasaki A (2020) Type I and Type III Interferons - Induction, Signaling, Evasion, and Application to Combat COVID-19. *Cell Host Microbe* 27:870–878. doi: 10.1016/j.chom.2020.05.008
178. Paul F, Pellegrini S, Uzé G (2015) IFNA2: The prototypic human alpha interferon. *Gene* 567:132–137. doi: 10.1016/j.gene.2015.04.087
179. Peng G, Lei KJ, Jin W et al. (2006) Induction of APOBEC3 family proteins, a defensive maneuver underlying interferon-induced anti-HIV-1 activity. *J Exp Med* 203:41–46. doi: 10.1084/jem.20051512
180. Pestka S, Krause CD, Walter MR (2004) Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev* 202:8–32. doi: 10.1111/j.0105-2896.2004.00204.x
181. Piehler J, Schreiber G (1999) Biophysical analysis of the interaction of human ifnar2 expressed in *E. coli* with IFNalpha2. *J Mol Biol* 289:57–67. doi: 10.1006/jmbi.1999.2726
182. Plataniias L (1999) Signaling pathways activated by interferons. *Exp Hematol* 27:1583–1592. doi: 10.1016/s0301-472x(99)00109-5
183. Plataniias LC (2005) Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol* 5:375–386. doi: 10.1038/nri1604
184. Pollicino T, Belloni L, Raffa G et al. (2006) Hepatitis B virus replication is regulated by the acetylation status of hepatitis B virus cccDNA-bound H3 and H4 histones. *Gastroenterology* 130:823–837. doi: 10.1053/j.gastro.2006.01.001
185. Pommerenke C, Rand U, Uphoff CC et al. (2021) Identification of cell lines CL-14, CL-40 and CAL-51 as suitable models for SARS-CoV-2 infection studies. *PLoS One* 16:e0255622. doi: 10.1371/journal.pone.0255622
186. Prchal M, Pilz A, Simma O et al. (2009) Type I interferons as mediators of immune adjuvants for T- and B cell-dependent acquired immunity. *Vaccine* 27 Suppl 6:G17-20. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.10.016
187. Qu B, Ni Y, Lempp FA et al. (2018) T5 Exonuclease Hydrolysis of Hepatitis B Virus Replicative Intermediates Allows Reliable Quantification and Fast Drug Efficacy

- Testing of Covalently Closed Circular DNA by PCR. *J Virol* 92. doi: 10.1128/JVI.01117-18
188. Radhakrishnan R, Walter LJ, Hruza A et al. (1996) Zinc mediated dimer of human interferon- α 2b revealed by X-ray crystallography. *Structure* 4:1453–1463. doi: 10.1016/S0969-2126(96)00152-9
189. Rang A, Günther S, Will H (1999) Effect of interferon alpha on hepatitis B virus replication and gene expression in transiently transfected human hepatoma cells. *Journal of hepatology* 31:791–799. doi: 10.1016/S0168-8278(99)80279-7
190. Redondo N, Zaldívar-López S, Garrido JJ et al. (2021) SARS-CoV-2 Accessory Proteins in Viral Pathogenesis: Knowns and Unknowns. *Front Immunol* 12:708264. doi: 10.3389/fimmu.2021.708264
191. Rivière L, Quioc-Salomon B, Fallot G et al. (2019) Hepatitis B virus replicating in hepatocellular carcinoma encodes HBx variants with preserved ability to antagonize restriction by Smc5/6. *Antiviral Research* 172:104618. doi: 10.1016/j.antiviral.2019.104618
192. Robichon K, Maiwald T, Schilling M et al. (2020) Identification of Interleukin1 β as an Amplifier of Interferon alpha-induced Antiviral Responses. *PLOS Pathogens* 16:e1008461. doi: 10.1371/journal.ppat.1008461
193. Rohaim MA, El Naggar RF, Clayton E et al. (2021) Structural and functional insights into non-structural proteins of coronaviruses. *Microb Pathog* 150:104641. doi: 10.1016/j.micpath.2020.104641
194. Sa Ribero M, Jouvenet N, Dreux M et al. (2020) Interplay between SARS-CoV-2 and the type I interferon response. *PLoS Pathog* 16. doi: 10.1371/journal.ppat.1008737
195. Saleiro D, Plataniias LC (2015) Intersection of mTOR and STAT signaling in immunity. *Trends Immunol* 36:21–29. doi: 10.1016/j.it.2014.10.006
196. Salter JD, Bennett RP, Smith HC (2016) The APOBEC Protein Family: United by Structure, Divergent in Function. *Trends Biochem Sci* 41:578–594. doi: 10.1016/j.tibs.2016.05.001
197. Santesmasses D, Castro JP, Zenin AA et al. (2020) COVID-19 is an emergent disease of aging. *Aging Cell* 19:e13230. doi: 10.1111/accel.13230
198. Santos IdA, Grosche VR, Bergamini FRG et al. (2020) Antivirals Against Coronaviruses: Candidate Drugs for SARS-CoV-2 Treatment? *Front Microbiol* 11:1818. doi: 10.3389/fmicb.2020.01818

199. Sato S, Sugiyama M, Yamamoto M et al. (2003) Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-kappa B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol* 171:4304–4310. doi: 10.4049/jimmunol.171.8.4304
200. Sato S, Li K, Kameyama T et al. (2015) The RNA sensor RIG-I dually functions as an innate sensor and direct antiviral factor for hepatitis B virus. *Immunity* 42:123–132. doi: 10.1016/j.immuni.2014.12.016
201. Schlaepfer E, Fahrny A, Gruenbach M et al. (2019) Dose-Dependent Differences in HIV Inhibition by Different Interferon Alpha Subtypes While Having Overall Similar Biologic Effects. *mSphere* 4. doi: 10.1128/mSphere.00637-18
202. Schlee M (2013) Master sensors of pathogenic RNA - RIG-I like receptors. *Immunobiology* 218:1322–1335. doi: 10.1016/j.imbio.2013.06.007
203. Schlee M, Roth A, Hornung V et al. (2009) Recognition of 5' triphosphate by RIG-I helicase requires short blunt double-stranded RNA as contained in panhandle of negative-strand virus. *Immunity* 31:25–34. doi: 10.1016/j.immuni.2009.05.008
204. Schneider WM, Chevillotte MD, Rice CM (2014) Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annu Rev Immunol* 32:513–545. doi: 10.1146/annurev-immunol-032713-120231
205. Schoggins JW, Wilson SJ, Panis M et al. (2011) A diverse array of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. *Nature* 472:481–485. doi: 10.1038/nature09907
206. Schöler L, Le-Trilling VTK, Eilbrecht M et al. (2020) A Novel In-Cell ELISA Assay Allows Rapid and Automated Quantification of SARS-CoV-2 to Analyze Neutralizing Antibodies and Antiviral Compounds. *Front Immunol* 11:573526. doi: 10.3389/fimmu.2020.573526
207. Schreiber G, Piehler J (2015) The molecular basis for functional plasticity in type I interferon signaling. *Trends Immunol* 36:139–149. doi: 10.1016/j.it.2015.01.002
208. Schubert K, Karousis ED, Jomaa A et al. (2020) SARS-CoV-2 Nsp1 binds the ribosomal mRNA channel to inhibit translation. *Nat Struct Mol Biol* 27:959–966. doi: 10.1038/s41594-020-0511-8
209. Schuhenn J, Meister TL, Todt D et al. (2022) Differential interferon- α subtype induced immune signatures are associated with suppression of SARS-CoV-2 infection. *PNAS* 119:e2111600119. doi: 10.1073/pnas.2111600119

210. Schulze A, Gripon P, Urban S (2007) Hepatitis B virus infection initiates with a large surface protein-dependent binding to heparan sulfate proteoglycans. *Hepatology* (Baltimore, Md.) 46:1759–1768. doi: 10.1002/hep.21896
211. Seitz S, Urban S, Antoni C et al. (2007) Cryo-electron microscopy of hepatitis B virions reveals variability in envelope capsid interactions. *EMBO J* 26:4160–4167. doi: 10.1038/sj.emboj.7601841
212. Seth RB, Sun L, Ea C-K et al. (2005) Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell* 122:669–682. doi: 10.1016/j.cell.2005.08.012
213. Shang J, Wan Y, Luo C et al. (2020) Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *PNAS* 117:11727–11734. doi: 10.1073/pnas.2003138117
214. Shen F, Li Y, Wang Y et al. (2018) Hepatitis B virus sensitivity to interferon- α in hepatocytes is more associated with cellular interferon response than with viral genotype. *Hepatology* (Baltimore, Md.) 67:1237–1252. doi: 10.1002/hep.29609
215. Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M et al. (1999) The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 284:1835–1837. doi: 10.1126/science.284.5421.1835
216. Silvennoinen O, Ihle JN, Schlessinger J et al. (1993) Interferon-induced nuclear signalling by Jak protein tyrosine kinases. *Nature* 366:583–585. doi: 10.1038/366583a0
217. Smet A, Breugelmans T, Michiels J et al. A dynamic mucin mRNA signature associates with COVID-19 disease presentation and severity. *JCI Insight* 6. doi: 10.1172/jci.insight.151777
218. Snijder EJ, Decroly E, Ziebuhr J (2016) The Nonstructural Proteins Directing Coronavirus RNA Synthesis and Processing. *Adv Virus Res* 96:59–126. doi: 10.1016/bs.aivir.2016.08.008
219. Snijder EJ, Limpens RWAL, Wilde AH de et al. (2020) A unifying structural and functional model of the coronavirus replication organelle: Tracking down RNA synthesis. *PLoS Biol* 18:e3000715. doi: 10.1371/journal.pbio.3000715
220. Spadaro F, Lapenta C, Donati S et al. (2012) IFN- α enhances cross-presentation in human dendritic cells by modulating antigen survival, endocytic routing, and processing. *Blood* 119:1407–1417. doi: 10.1182/blood-2011-06-363564

221. SPEARMAN C (1908) THE METHOD OF 'RIGHT AND WRONG CASES' ('CONSTANT STIMULI') WITHOUT GAUSS'S FORMULAE. *British Journal of Psychology*, 1904-1920 2:227–242. doi: 10.1111/j.2044-8295.1908.tb00176.x
222. Stadler D, Kächele M, Jones AN et al. (2021) Interferon-induced degradation of the persistent hepatitis B virus cccDNA form depends on ISG20. *EMBO Rep* 22:e49568. doi: 10.15252/embr.201949568
223. Stark GR, Kerr IM, Williams BR et al. (1998) How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* 67:227–264. doi: 10.1146/annurev.biochem.67.1.227
224. Stertz S, Reichelt M, Spiegel M et al. (2007) The intracellular sites of early replication and budding of SARS-coronavirus. *Virology* 361:304–315. doi: 10.1016/j.virol.2006.11.027
225. Stieler JT, Prange R (2014) Involvement of ESCRT-II in hepatitis B virus morphogenesis. *PLoS One* 9:e91279. doi: 10.1371/journal.pone.0091279
226. Sun D, Nassal M (2006) Stable HepG2- and Huh7-based human hepatoma cell lines for efficient regulated expression of infectious hepatitis B virus. *Journal of hepatology* 45:636–645. doi: 10.1016/j.jhep.2006.05.019
227. Suspène R, Guétard D, Henry M et al. (2005) Extensive editing of both hepatitis B virus DNA strands by APOBEC3 cytidine deaminases in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:8321–8326. doi: 10.1073/pnas.0408223102
228. Takahasi K, Yoneyama M, Nishihori T et al. (2008) Nonself RNA-sensing mechanism of RIG-I helicase and activation of antiviral immune responses. *Mol Cell* 29:428–440. doi: 10.1016/j.molcel.2007.11.028
229. Tan G, Song H, Xu F et al. (2018) When Hepatitis B Virus Meets Interferons. *Front Microbiol* 9. doi: 10.3389/fmicb.2018.01611
230. Tang LSY, Covert E, Wilson E et al. (2018) Chronic Hepatitis B Infection: A Review. *JAMA* 319:1802–1813. doi: 10.1001/jama.2018.3795
231. Taylor MW Interferons. *Viruses and Man: A History of Interactions*:101–119. doi: 10.1007/978-3-319-07758-1_7
232. Tchesnokov EP, Gordon CJ, Woolner E et al. (2020) Template-dependent inhibition of coronavirus RNA-dependent RNA polymerase by remdesivir reveals a second mechanism of action. *J Biol Chem* 295:16156–16165. doi: 10.1074/jbc.AC120.015720

-
233. Theofilopoulos AN, Baccala R, Beutler B et al. (2005) Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 23:307–336. doi: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115843
234. Thomas C, Moraga I, Levin D et al. (2011) Structural linkage between ligand discrimination and receptor activation by type I interferons. *Cell* 146:621–632. doi: 10.1016/j.cell.2011.06.048
235. Thoms M, Buschauer R, Ameismeier M et al. (2020) Structural basis for translational shutdown and immune evasion by the Nsp1 protein of SARS-CoV-2. *Science* 369:1249–1255. doi: 10.1126/science.abc8665
236. Thomsen MK, Nandakumar R, Stadler D et al. (2016) Lack of immunological DNA sensing in hepatocytes facilitates hepatitis B virus infection. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 64:746–759. doi: 10.1002/hep.28685
237. Tian Z, Shen X, Feng H et al. (2000) IL-1 beta attenuates IFN-alpha beta-induced antiviral activity and STAT1 activation in the liver: involvement of proteasome-dependent pathway. *J Immunol* 165:3959–3965. doi: 10.4049/jimmunol.165.7.3959
238. Torpey N, Maher SE, Bothwell ALM et al. (2004) Interferon alpha but not interleukin 12 activates STAT4 signaling in human vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 279:26789–26796. doi: 10.1074/jbc.M401517200
239. Tortorici MA, Velesler D (2019) Structural insights into coronavirus entry. *Adv Virus Res* 105:93–116. doi: 10.1016/bs.aivir.2019.08.002
240. Tsuge M, Hiraga N, Akiyama R et al. (2010) HBx protein is indispensable for development of viraemia in human hepatocyte chimeric mice. *J Gen Virol* 91:1854–1864. doi: 10.1099/vir.0.019224-0
241. Tsukuda S, Watashi K (2020) Hepatitis B virus biology and life cycle. *Antiviral Research* 182:104925. doi: 10.1016/j.antiviral.2020.104925
242. Tu T, Zehnder B, Qu B et al. (2020) A novel method to precisely quantify hepatitis B virus covalently closed circular (ccc)DNA formation and maintenance. *Antiviral Research* 181:104865. doi: 10.1016/j.antiviral.2020.104865
243. Turelli P, Mangeat B, Jost S et al. (2004) Inhibition of hepatitis B virus replication by APOBEC3G. *Science* 303:1829. doi: 10.1126/science.1092066
244. Verhelst J, Parthoens E, Schepens B et al. (2012) Interferon-inducible protein Mx1 inhibits influenza virus by interfering with functional viral ribonucleoprotein complex assembly. *J Virol* 86:13445–13455. doi: 10.1128/JVI.01682-12

-
245. Verity R, Okell LC, Dorigatti I et al. (2020) Estimates of the severity of coronavirus disease 2019: a model-based analysis. *The Lancet Infectious Diseases* 20:669–677. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30243-7
246. Viehweger A, Krautwurst S, Lamkiewicz K et al. (2019) Direct RNA nanopore sequencing of full-length coronavirus genomes provides novel insights into structural variants and enables modification analysis. *Genome Res* 29:1545–1554. doi: 10.1101/gr.247064.118
247. Viscomi GC (1997) Structure-activity of type I interferons. *Biotherapy* 10:59–86. doi: 10.1007/BF02678218
248. Viswanathan T, Arya S, Chan S-H et al. (2020) Structural basis of RNA cap modification by SARS-CoV-2. *Nat Commun* 11:3718. doi: 10.1038/s41467-020-17496-8
249. V'kovski P, Kratzel A, Steiner S et al. (2021) Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol* 19:155–170. doi: 10.1038/s41579-020-00468-6
250. Wang F, Ma Y, Barrett JW et al. (2004) Disruption of Erk-dependent type I interferon induction breaks the myxoma virus species barrier. *Nat Immunol* 5:1266–1274. doi: 10.1038/ni1132
251. Wang M-Y, Zhao R, Gao L-J et al. (2020) SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. *Front Cell Infect Microbiol* 10:587269. doi: 10.3389/fcimb.2020.587269
252. Wang D, Jiang A, Feng J et al. (2021) The SARS-CoV-2 subgenome landscape and its novel regulatory features. *Mol Cell* 81:2135-2147.e5. doi: 10.1016/j.molcel.2021.02.036
253. Watashi K, Liang G, Iwamoto M et al. (2013) Interleukin-1 and tumor necrosis factor- α trigger restriction of hepatitis B virus infection via a cytidine deaminase activation-induced cytidine deaminase (AID). *J Biol Chem* 288:31715–31727. doi: 10.1074/jbc.M113.501122
254. Wathelet MG, Orr M, Frieman MB et al. (2007) Severe acute respiratory syndrome coronavirus evades antiviral signaling: role of nsp1 and rational design of an attenuated strain. *J Virol* 81:11620–11633. doi: 10.1128/JVI.00702-07
255. Weber A, Wasiliew P, Kracht M (2010) Interleukin-1 (IL-1) pathway. *Sci Signal* 3:cm1. doi: 10.1126/scisignal.3105cm1

-
256. Weerd NA de, Nguyen T (2012) The interferons and their receptors--distribution and regulation. *Immunol Cell Biol* 90:483–491. doi: 10.1038/icb.2012.9
257. Weerd NA de, Samarajiwa SA, Hertzog PJ (2007) Type I interferon receptors: biochemistry and biological functions. *J Biol Chem* 282:20053–20057. doi: 10.1074/jbc.R700006200
258. Werner M, Driftmann S, Kleinehr K et al. (2015) All-In-One: Advanced preparation of Human Parenchymal and Non-Parenchymal Liver Cells. *PLoS One* 10:e0138655. doi: 10.1371/journal.pone.0138655
259. Wetzel R (ed) (1982) STRUCTURE-FUNCTION STUDIES ON HUMAN ALPHA INTERFERON
260. WHO | Regional Office for Africa (2022) Six in seven COVID-19 infections go undetected in Africa. <https://www.afro.who.int/news/six-seven-covid-19-infections-go-undetected-africa>. Accessed 12 Feb 2022
261. Wiegand J, Hasenclever D, Tillmann HL (2008) Should treatment of hepatitis B depend on hepatitis B virus genotypes? A hypothesis generated from an explorative analysis of published evidence. *Antivir Ther* 13:211–220
262. Wieland SF, Chisari FV (2005) Stealth and cunning: hepatitis B and hepatitis C viruses. *J Virol* 79:9369–9380. doi: 10.1128/JVI.79.15.9369-9380.2005
263. Wittling MC, Cahalan SR, Levenson EA et al. (2020) Shared and Unique Features of Human Interferon-Beta and Interferon-Alpha Subtypes. *Front Immunol* 11:605673. doi: 10.3389/fimmu.2020.605673
264. Wong HH, Fung TS, Fang S et al. (2018) Accessory proteins 8b and 8ab of severe acute respiratory syndrome coronavirus suppress the interferon signaling pathway by mediating ubiquitin-dependent rapid degradation of interferon regulatory factor 3. *Virology* 515:165–175. doi: 10.1016/j.virol.2017.12.028
265. World Health Organization (2022) WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard | WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard With Vaccination Data. <https://covid19.who.int/>. Accessed 12 Feb 2022
266. Wu N, Nguyen X-N, Wang L et al. (2019) The interferon stimulated gene 20 protein (ISG20) is an innate defense antiviral factor that discriminates self versus non-self translation. *PLOS Pathogens* 15:e1008093. doi: 10.1371/journal.ppat.1008093
267. Xia C, Vijayan M, Pritzl CJ et al. (2015) Hemagglutinin of Influenza A Virus Antagonizes Type I Interferon (IFN) Responses by Inducing Degradation of Type I IFN Receptor 1. *J Virol* 90:2403–2417. doi: 10.1128/JVI.02749-15

-
268. Xia Y, Stadler D, Lucifora J et al. (2016) Interferon- γ and Tumor Necrosis Factor- α Produced by T Cells Reduce the HBV Persistence Form, cccDNA, Without Cytolysis. *Gastroenterology* 150:194–205. doi: 10.1053/j.gastro.2015.09.026
269. Yamada M, Oeda A, Jung J et al. (2012) Hepatitis B virus envelope L protein-derived bio-nanocapsules: mechanisms of cellular attachment and entry into human hepatic cells. *Journal of controlled release* 160:322–329
270. Yamamoto M, Sato S, Mori K et al. (2002) Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol* 169:6668–6672. doi: 10.4049/jimmunol.169.12.6668
271. Yan H, Zhong G, Xu G et al. (2012) Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *elife* 1:e00049
272. Ye J, Chen J (2021) Interferon and Hepatitis B: Current and Future Perspectives. *Front Immunol* 12:733364. doi: 10.3389/fimmu.2021.733364
273. Yin X, Riva L, Pu Y et al. (2021) MDA5 Governs the Innate Immune Response to SARS-CoV-2 in Lung Epithelial Cells. *Cell Rep* 34:108628. doi: 10.1016/j.celrep.2020.108628
274. Yoshimoto FK (2020) The Proteins of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS CoV-2 or n-COV19), the Cause of COVID-19. *Protein J* 39:198–216. doi: 10.1007/s10930-020-09901-4
275. Yuan Y, Yuan H, Yang G et al. (2020) IFN- α confers epigenetic regulation of HBV cccDNA minichromosome by modulating GCN5-mediated succinylation of histone H3K79 to clear HBV cccDNA. *Clin Epigenetics* 12:135. doi: 10.1186/s13148-020-00928-z
276. Yuen M-F, Chen D-S, Dusheiko GM et al. (2018) Hepatitis B virus infection. *Nat Rev Dis Primers* 4:18035. doi: 10.1038/nrdp.2018.35
277. Zhang S, Guo J-T, Wu JZ et al. (2013) Identification and characterization of multiple TRIM proteins that inhibit hepatitis B virus transcription. *PLoS One* 8:e70001. doi: 10.1371/journal.pone.0070001
278. Zhang Z, Trippler M, Real CI et al. (2020) Hepatitis B Virus Particles Activate Toll-Like Receptor 2 Signaling Initially Upon Infection of Primary Human Hepatocytes. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 72:829–844. doi: 10.1002/hep.31112

-
279. Zhao C, Collins MN, Hsiang T-Y et al. (2013) Interferon-induced ISG15 pathway: an ongoing virus-host battle. *Trends Microbiol* 21:181–186. doi: 10.1016/j.tim.2013.01.005
280. Zhou Z, Wang N, Woodson SE et al. (2011) Antiviral activities of ISG20 in positive-strand RNA virus infections. *Virology* 409:175–188. doi: 10.1016/j.virol.2010.10.008
281. Zhou Q, MacArthur MR, He X et al. (2020) Interferon- α 2b Treatment for COVID-19 Is Associated with Improvements in Lung Abnormalities. *Viruses* 13. doi: 10.3390/v13010044
282. Zhou L, Ayeh SK, Chidambaram V et al. (2021) Modes of transmission of SARS-CoV-2 and evidence for preventive behavioral interventions. *BMC Infect Dis* 21:496. doi: 10.1186/s12879-021-06222-4
283. Zhu N, Zhang D, Wang W et al. (2020) A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med* 382:727–733. doi: 10.1056/NEJMoa2001017
284. Zoulim F, Saputelli J, Seeger C (1994) Woodchuck hepatitis virus X protein is required for viral infection in vivo. *J Virol* 68:2026–2030. doi: 10.1128/JVI.68.3.2026-2030.1994

9 Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
x g	Gravitation, Erdbeschleunigung
A	
ACE2	<i>angiotensin-converting enzyme 2</i>
ALI	<i>air-liquid Interface</i>
AP1	Aktivatorprotein 1
APOBEC3	<i>apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide 3</i>
B	
BE	Bronchien-Epithelzelle
bp	Basenpaar
C	
CARD	<i>caspase recruitment domain</i>
cccDNA	<i>covalently closed circular DNA</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cGAS	<i>Cyclic GMP-AMP synthase</i>
CLR	C-Typ-Lektin-Rezeptor
CM	<i>convoluted membrane</i>
COVID-19	<i>coronavirus disease 2019</i>
D	
DAA	<i>direct-acting antivirals</i>
DEDD	<i>death Effector Domain Containing</i>
DEG	Differentiell exprimierte Gene
DG	Detektionsgrenze
DMS	<i>double-membrane spherules</i>
DMV	<i>double-Membrane Vesicle</i>
E	
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>

ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERGIC	endoplasmic-reticulum–Golgi intermediate compartment
F	
fw	<i>forward</i>
G	
GAS	<i>gamma activated sequence</i>
geq	<i>genome equivalents</i>
GO	<i>gene ontology</i>
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
H	
h	Stunde
hAE	<i>human airway epithelial</i>
HBcAg	<i>hepatitis B core antigen</i>
HBeAg	<i>hepatitis B e antigen</i>
HBsAg	<i>hepatitis B surface antigen</i>
HBV	Hepatitis B Virus
HBx	Hepatitis B X Protein
HCV	Hepatitis C Virus
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HSV	Herpes-simplex-Virus
I	
IAV	Influenza-A-Virus
icELISA	<i>in-cell ELISA</i>
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses ICTV</i>
IDO1	Indoleamin 2,3-Dioxygenase 1
IFN	Interferon
IFNAR	Interferon-alpha/beta-Rezeptor
IgG	Immunglobulin G
inf.	infiziert
Interferon-induced transmembrane proteins	<i>interferon-induced transmembrane proteins</i>
IRAK	<i>Interleukin-1 receptor associated kinase</i>
IRF	<i>interferon regulatory factor</i>

ISG	<i>interferon-stimulated gene</i>
ISGF3	interferon-stimulierter Genfaktor 3
ISRE	<i>interferon-stimulated response element</i>
I κ B	<i>IkappaB kinase</i>
J	
JAK1	Janus Kinase 1
K	
kb	Kilobase
L	
LCMV	Lymphozytäres Choriomeningitis-Virus
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	<i>leucin-rich repeats</i>
M	
M	Molar
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MAVS	<i>mitochondrial antiviral-signaling protein</i>
MDA5	Melanom-Differenzierungsantigen 5
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minute
miRNA	mikroRNA
ml	Milliliter
mRNA	<i>messenger RNA</i>
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
MyD88	<i>myeloid Differentiation Primary Response Gene 88</i>
N	
NA	Nukleos(t)idanaloga
NF- κ B	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
ng	Nanogramm
NLR	<i>NOD-like receptor</i>
nm	nanometer
NSP	Nichtstrukturprotein
NTCP	<i>Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide</i>
O	
OAS2	<i>2'-5'-oligoadenylate synthetase 2</i>

ORF	offener Leserahmen
P	
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster
pDC	plasmazytoide dendritische Zelle
PEG	Polyethylenglykol
pgRNA	prägenomische RNA
PHH	Primäre humane Hepatozyten
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
R	
RBD	Rezeptorbindende Domäne
rc	<i>relaxed circular</i>
RdRP	<i>RNA-dependent RNA polymerase</i>
RIG-I	<i>retinoic acid inducible gene 1</i>
RLR	<i>RIG-I-like receptor</i>
RT	Reverse Transkription
RTC	<i>replication/transcription complex</i>
rv	<i>reverse</i>
S	
SARS-CoV	<i>severe acute respiratory syndrome coronavirus</i>
sg	subgenomisch
Smc	<i>structural maintenance of chromosomes</i>
ss	<i>single-stranded</i>
STAT	<i>signal Transducers and Activators of Transcription</i>
STING	<i>stimulator of interferon genes</i>
SVP	subvirale Partikel
T	
TAK1	<i>transforming growth factor beta-activated kinase 1</i>
TCID ₅₀	tissue-culture infectious dose 50
TIR	<i>toll/interleukin-1 receptor</i>
TIRAP	<i>TIR Domain Containing Adaptor Protein</i>
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TMPRSS2	<i>transmembrane protease serine subtype 2</i>
TRAF	<i>TNF receptor associated factor</i>

TRAM	<i>translocating chain-associated membrane protein</i>
TRIF	<i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β</i>
TRIM	<i>tripartite motif</i>
TYK2	Tyrosinkinase 2
U	
U	Units
UTR	Untranslatierte Region
V	
VSV	Vesikuläres Stomatitis-Virus

9.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Typ-I-IFN kontrolliert angeborene und adaptive Immunität sowie die intrazellulären antimikrobiellen Programme.	3
Abbildung 2: TLRs, RLRs und ihre Liganden.	4
Abbildung 3: Schematische Darstellung der klassischen TLR-Signalwege.	6
Abbildung 4: Kanonischer und nicht-kanonischer IFN-Signalweg.	8
Abbildung 5: Antiviraler Effekt der IFN α -Subtypen gegenüber verschiedenen Viren	13
Abbildung 6: Die genomische Struktur von HBV.	15
Abbildung 7: Schematischer Ablauf des HBV-Replikationszyklus.	16
Abbildung 8: Schematische Struktur von SARS-CoV-2	20
Abbildung 9: Genomorganisation von SARS-CoV-2.	21
Abbildung 10: Schematischer Replikationszyklus von SARS-CoV-2.	22
Abbildung 11: Induktion von Typ-I-IFN durch Stimulation mit HBV.	60
Abbildung 12: Induktion von Typ-I-IFN durch Stimulation mit SARS-CoV-2.	62
Abbildung 13: Der Effekt von IFN α -Subtypen auf die Replikation von HBV in PHHs.	64
Abbildung 14: Relative Genexpression von Schlüssel-ISGs nach Stimulation mit IFN α -Subtypen in HepaRG Zellen.	66
Abbildung 15: Relative Genexpression von <i>APOBEC3</i> -Genen nach Stimulation mit IFN α -Subtypen in HepaRG Zellen.	68
Abbildung 16: Relative Genexpression von <i>APOBEC3</i> -Genen nach Stimulation mit IFN α -Subtypen in infizierten und nicht infizierten HepaRG Zellen.	70
Abbildung 17: Der Effekt von IFN α auf die Replikation von SARS-CoV-2 in Vero E6 Zellen.	72
Abbildung 18: Der Einfluss des Stimulationszeitpunkts auf den antiviralen Effekt von IFN α 5.	74
Abbildung 19: Relative Genexpression von Schlüssel-ISGs nach Stimulation mit IFN α -Subtypen in Vero E6 Zellen.	76
Abbildung 20: Der Effekt von IFN α auf die Replikation von SARS-CoV-2 in hAE Zellen.	79
Abbildung 21: Relative Genexpression von Schlüssel-ISGs nach Stimulation mit IFN α -Subtypen in hAE Zellen.	81
Abbildung 22: Transkriptomanalyse von hAE Zellen nach IFN α -Stimulation bzw. SARS-CoV-2-Infektion.	83
Abbildung 23: Proteomanalyse von hAE Zellen nach IFN α -Stimulation.	86
Abbildung 24: Proteomanalyse von hAE Zellen nach IFN-Stimulation in SARS-CoV-2 infizierten Zellen.	87
Abbildung 25: Kombinationsbehandlung von SARS-CoV-2 infizierten Vero E6 Zellen mit IFN α und Remdesivir.	89
Abbildung 26: Zellviabilität von Vero E6 Zellen nach Stimulation mit IFN α 2 oder IFN α 5 in Kombination mit Remdesivir	90
Abbildung 27: Kombinationsbehandlung von SARS-CoV-2 infizierten hAE Zellen mit IFN α 5 und Remdesivir.	91
Abbildung 28: Der Effekt von IL-1 β auf den antiviralen Effekt von IFN α -Subtypen und die ISG-Expression nach Stimulation mit IFN α -Subtypen in HepaRG Zellen.	93
Abbildung 29: Der Effekt von IL-1 β auf den antiviralen Effekt von IFN α -Subtypen in Vero E6 Zellen.	95
Abbildung 30: Der konzentrationsabhängige Effekt von IL-1 β auf den antiviralen Effekt von IFN α -Subtypen in Vero E6 Zellen.	96

Abbildung 31: Der Effekt von IL-1 β auf die ISG-Expression nach Stimulation mit IFN α -Subtypen in Vero E6 Zellen.	97
Abbildung 32: Alignment der Proteinsequenzen von IFN α 2, IFN α 6 und IFN α 14.....	99
Abbildung 33: Zellviabilität von HepaRG und Vero E6 Zellen nach Stimulation mit IFN α 2-Mutanten.	101
Abbildung 34: Der Effekt von IFN α 2-Mutanten auf die Replikation von HBV.	103
Abbildung 35: Der Effekt von IFN α 2 Mutanten auf die Replikation von SARS-CoV-2.....	105

9.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete Geräte.....	27
Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete Verbrauchsmaterialien	28
Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete Chemikalien und Reagenzien	29
Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete kommerzielle Kits	31
Tabelle 5: In dieser Arbeit verwendete Puffer und Lösungen	32
Tabelle 6: In dieser Arbeit verwendete Nährmedien.....	34
Tabelle 7: In dieser Arbeit verwendete Antikörper	36
Tabelle 8: In dieser Arbeit verwendete Bakterien	38
Tabelle 9: In dieser Arbeit verwendete Viren	38
Tabelle 10: In dieser Arbeit verwendete Plasmide	39
Tabelle 11: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide. fw = forward, rv = reverse	41
Tabelle 12: In dieser Arbeit verwendete Software	43
Tabelle 13: Übersicht über die verwendeten IFN α 2-Mutanten.....	100

9.4 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei PD Dr. Kathrin Sutter für die Bereitstellung des Forschungsthemas und die Möglichkeit das Projekt in ihrer Arbeitsgruppe durchzuführen bedanken. Mein Dank gilt auch Prof. Dr. Ulf Dittmer, der mich in sein Institut aufgenommen hat. Zudem möchte ich mich bei meiner Arbeitskollegin Zehra Karaköse bedanken, die mich stets wissenschaftlich und persönlich unterstützt hat. Auch meinen ehemaligen Arbeitskollegen Dr. Julia Ickler und Dr. Rouven Kaiserling bin ich dankbar, dass sie mich gut in die Arbeitsgruppe aufgenommen haben.

Weiterhin danke ich auch PD Dr. Ruth Broering, die mich bei der Isolation von Primärzellen unterstützt und mir die die Methode beigebracht hat.

Darüber hinaus möchte ich mich auch bei Toni Luise Meister und Prof. Dr. Stephanie Pfänder für die gute Zusammenarbeit und die daraus resultierende Publikation bedanken. Mein Dank geht auch an alle weiteren Personen, die an dem Projekt der Publikation mitgewirkt haben.

9.5 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

9.6 Eidesstattliche Erklärungen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) d) + f) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient, bei der Abfassung der Dissertation nur die angegebenen Hilfsmittel benutzt und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Düsseldorf, 21.03.2022

Jonas Schuhenn

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) e) + g) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät/Fachbereich abgelehnt worden ist.

Düsseldorf, 21.03.2022

Jonas Schuhenn

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. (2) g) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „IFN α -Subtyp-spezifische Suszeptibilität von HBV und SARS-CoV-2 im Laufe der Infektion“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Jonas Schuhenn befürworte und die Betreuung auch im Falle eines Weggangs, wenn nicht wichtige Gründe dem entgegenstehen, weiterführen werde.

Essen, 21.03.2022

PD Dr. Kathrin Sutter