

**Das Hepatitis C Virus reprogrammiert die
Wirtszellenantwort auf inflammatorische
Mediatoren durch Repression von
endogenen Repressoren der NF- κ B-
Signalübertragung und Hochregulierung
von Komponenten des AP-1 Komplexes**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Tobias Hustedt
aus Achim

Düsseldorf, Januar 2025

Aus der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie
des Universitätsklinikums der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichterstatter:

1. Prof. Dr. Johannes G. Bode
2. Prof. Dr. Dieter Willbold

Tag der mündlichen Prüfung: 13.12.2024

Auszüge aus dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Als Abstracts auf Konferenzen:

Tobias Hustedt, Sabine Stindt, Christian Ehltng, Hans H. Bock, Tom Luedde, Johannes G. Bode. *HCV infection leads to reprogramming of host cell response to IL-1 β by enhancing NF κ B-dependent signaling*. 29th International Symposium on Hepatitis C Virus, Flaviviruses, and Related Viruses, Oktober 2023, Atlanta, Poster Präsentation

Tobias Hustedt, Sabine Stindt, Christian Ehltng, Kerstin Dobner, Hans H. Bock, Tom Luedde, Johannes G. Bode. *HCV rewires NF- κ B target gene expression such as CXCL8 involving suppression of endogenous negative regulators of NF- κ B-signaling*. 40th Annual Conference German Association for the Study of the Liver, Januar 2024, Essen, Poster Präsentation

Tobias Hustedt, Sabine Stindt, Kerstin Dobner, Christian Ehltng, Sanaz Spitzley, Ute Albrecht, Stephanie Wolf, Hans H. Bock, Georg Fluegen, Wolfram Trudo Knoefel, Stephan Ludwig, Ralf Bartenschlager, Mihael Vucur, Tom Luedde, Johannes G. Bode. *Die HCV-Infektion führt zu einer Reprogrammierung der Reaktion der Wirtszelle auf IL-1 β durch Verstärkung der NF κ B-abhängigen Signalübertragung*. Viszeral Medizin, September 2023, Hamburg, Vortrag

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII

1. Einleitung..... 1

1.1 Das Hepatitis C Virus.....	1
1.1.1 Virale Proteine	2
1.1.2 Viraler Zelleintritt und Replikationszyklus.....	3
1.1.3 Therapie der Hepatitis C Infektion	5
1.1.4 Zellkultursysteme zur Erforschung des Hepatitis C Virus.....	7
1.2 Modulation der Wirtszelle durch eine Hepatitis C Infektion	8
1.3 Wachstumsfaktoren	9
1.3.1 Die EGF-Rezeptorfamilie.....	10
1.3.2 Einfluss des Hepatitis C Virus auf den EGFR-Signalweg.....	11
1.4.1 Das Interleukin-1 β	13
1.4.2 IL-1 β während einer Hepatitis C Infektion	15
1.5 Chemokine.....	16
1.5.1 CXC-Liganden	17
1.5.2 Das Chemokin CXCL8.....	18
1.5.3 Regulation der CXCL8 Expression	20
1.5.4 Zusammenhang zwischen CXCR2 Liganden und dem Hepatitis C Virus.....	22
1.6 Die Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- κ B.....	24
1.7 Zielsetzung der Arbeit.....	26

2. Material und Methoden..... 27

2.1 Laborbedarf	27
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien	27
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	29
2.1.3 Geräte.....	30
2.1.4 Datenverarbeitungsprogramme	30
2.1.5 Puffer und Lösungen.....	31
2.1.6 Antikörper	32
2.1.7 Verwendete Primer für die qPCR.....	33
2.1.8 Kit Systeme.....	34
2.2 Zellbiologische Methoden.....	34
2.2.1 Stimulation der Zellen mit IL-1 β und EGF.....	35
2.2.2 Behandlung der Zellen mit siRNA.....	35
2.2.3 Chronisches HCV Zellkultursystem	36

2.3	Molekularbiologische Methoden	36
2.3.1	RNA-Präparation	36
2.3.2	cDNA-Synthese	36
2.3.3	Quantitative PCR	37
2.3.4	Polymerase-Kettenreaktion	Fehler! Textmarke nicht definiert.
2.3.5	Agarose Gelelektrophorese	38
2.3.6	Restriktion und Ligation von DNA-Fragmenten	39
2.3.7	Transformation von kompetenten <i>E. coli</i> -Bakterien	39
2.4	Biochemische Methoden	40
2.4.1	Protein Extraktion	40
2.4.2	Proteinbestimmung	40
2.4.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	41
2.4.4	Protein Transfer und Western Blot	41
2.4.5	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	42
2.4.6	Herstellung des Hepatitis C Virus Infektionssystems	42
2.4.7	Transkriptom-Sequenzierung (RNA-Seq)	44
2.5	Entnahme von Serumproben	44
2.6	Nutzung von bereits publizierten Abbildungen	45
2.7	Statistik	45

3. Ergebnisse..... 46

3.1	Erhöhte Serum Chemokinspiegel bei chronischer HCV-Infektion	46
3.1.1	Verlauf der Leberparameter im untersuchten Kollektiv nach erfolgreicher HCV-Behandlung	49
3.1.2	Korrelationsanalysen zwischen Leberparametern, Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Chemokinen	50
3.1.3	Eine HBV-Infektion führt ebenfalls zu signifikant erhöhten Chemokinen und Wachstumsfaktoren	52
3.2	Das HCV reguliert die basale, IL-1 β - und EGF-induzierte mRNA-Expression von CXCR2-Liganden	54
3.3	Für das CXCL8-Gen konnten 56 potenziellen Transkriptions-faktoren identifiziert werden	56
3.3.2	IL-1 β induziert die transkriptionelle Expression von c-Jun, c-Fos, c-Myb, Fra1, ATF3 und IRF1	61
3.4	Die Verstärkung der basalen sowie der IL-1 β -induzierten Expression von CXCR2-Liganden involviert AP-1 und NF- κ B vermittelte Signale	65
3.4.1	Für die IL-1 β induzierte transkriptionelle Regulation der CXCL8-Expression spielt der AP-1 Komplex eine relevante Rolle	65
3.4.2	Oct1 und NKRF supprimieren die Expression von CXCR2-Liganden	68
3.5	EGF induziert die transkriptionelle Expression von c-Jun, c-Fos, c-Myb, Fra1, ATF3 und IRF1	70
3.6	Die durch HCV verstärkte EGF-induzierte Expression von CXCR2-Liganden involviert die Hochregulation von AP-1 und NF- κ B vermittelten Mechanismen	73
3.6.1	Für die EGF induzierte transkriptionelle Regulation der CXCL8-Expression sowie für den Einfluss von HCV hierauf spielt der AP-1 Komplex eine relevante Rolle	73
3.6.2	Oct1 und NKRF supprimieren die EGF induzierte Expression von CXCL8	74
3.7	Analyse des Einflusses von HCV auf die Genexpression mittels RNA-Seq	76

4. Diskussion.....	80
4.1 HCV induziert die Serumspiegel von Zytokinen und Wachstumsfaktoren	80
4.2 HCV moduliert die Expression der CXCR2 Liganden über NF- κ B und AP-1	83
4.3 RNA Seq Analyse im chronischen HCV-Model.....	90
5. Zusammenfassung.....	93
6. Summary.....	94
7. Literaturverzeichnis	95
8. Anhang.....	118
9. Danksagung.....	144
10. Lebenslauf.....	145
11. Eidesstattliche Erklärung.....	146

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Zusammensetzung des HCV-Genoms.	2
Abbildung 2: Schematisches Modell des HCV-Eintritts.	4
Abbildung 3: Schematische Darstellung der verschiedenen HCV-Zellkultursysteme.....	8
Abbildung 4: Schematische Darstellung der EGFR vermittelten Signaltransduktion.....	11
Abbildung 5: Schematische Darstellung der IL-1 β -induzierten Signaltransduktion.	14
Abbildung 6: Schematische Darstellung der CXCL8-Liganden und deren Funktionen.	18
Abbildung 7: Schematische Darstellung der durch CXCL8 induzierten Signalwege.	20
Abbildung 8: Schematische Darstellung der CXCL8-Produktion nach Stimulation.	22
Abbildung 9: Eine chronische HCV-Infektion erhöht den Serumspiegel von IL-1 β , CXCL8, EGF, TNF- α , VEGF-A, NRG1 und AREG.	48
Abbildung 10: Leberparameter GOT und GPT bleiben trotz erfolgreicher Behandlung gegen das HCV erhöht.....	50
Abbildung 11: Korrelationsanalysen zwischen Leberparametern, Wachstumsfaktoren und Chemokinen bei chronischer HCV-Infektion.	51
Abbildung 12: Korrelationsanalysen zwischen Leberparametern, Wachstumsfaktoren und Chemokinen nach erfolgreicher viralen Eradikation.....	52
Abbildung 13: Eine Hepatitis B Infektion erhöht die Serumspiegel von IL-1 β , CXCL8, TNF- α und EGF.	53
Abbildung 14: Das HCV reguliert die basale, IL-1 β - und EGF-induzierte mRNA-Expression von CXCL8.....	55
Abbildung 15: 56 potenzielle Transkriptionsfaktoren, die an der Expression von CXCL8 beteiligt sein könnten.	57
Abbildung 16: Das HCV verstärkt direkt die Expression der Transkriptionsfaktoren c-Fos, c-Jun, Fra1, IRF1 und ATF3 im Replikon-System, während es die Expression von c-Myb, NKRF und Oct1 signifikant reduziert.	59
Abbildung 17: Das HCV verstärkt direkt die Expression der Transkriptionsfaktoren c-Fos, c-Jun, Fra1, IRF1 und ATF3 im Infektionssystem, während es die Expression von c-Myb, NKRF und Oct1 signifikant reduziert.	60
Abbildung 18: HCV moduliert die Protein Expression von c-Jun, NKRF.	61
Abbildung 19: IL-1 β induziert die transkriptionelle Expression von c-Fos, c-Jun und c-Myb.	63
Abbildung 20: IL-1 β induziert die transkriptionelle Expression von ATF3, IRF1 und Fra1.....	64
Abbildung 21: Der AP-1 Komplex ist an der HCV induzierten CXCL8 Expression beteiligt....	66
Abbildung 22: C-Fos und c-Jun sind essenziell für die Modulation von CXCL8.	67

Abbildung 23: Oct1 und NKRF sind negative Regulatoren für CXCL8.	69
Abbildung 24: EGF induziert die transkriptionelle Expression von c-Fos, c-Jun und c-Myb...71	
Abbildung 25: EGF induziert die transkriptionelle Expression von ATF3, IRF1, und Fra1.....72	
Abbildung 26: C-Fos und c-Jun sind essenzial für die EGF-induzierte Expression von CXCL8.	74
Abbildung 27: Oct1 und NKRF sind negative Regulatoren für die EGF induzierte CXCL8 Expression.	75
Abbildung 28: Transkriptionelle CXCL8 Expression im chronischen System.....76	
Abbildung 29: Schematisch Darstellung des chronischen Infektionsmodell.....77	
Abbildung 30: Auswahl von Genen die im chronischen Infektionssystem durch IL-1 β und/oder HCV induziert werden.....	78
Abbildung 31: Auswertung der RNA-Seq. Daten im chronischen Infektionsmodell.....79	
Abbildung 32: HCV moduliert die Expression von CXCR2 Liganden über NF- κ B und AP-1..90	

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien und Reagenzien.....	27
Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien	29
Tabelle 3: Verwendete Geräte	30
Tabelle 4: Verwendete Programme.....	30
Tabelle 5: Verwendete Puffer und Lösungen	31
Tabelle 6: Verwendete Primärantikörper	32
Tabelle 7: Verwendete Sekundärantikörper	32
Tabelle 8: Verwendete Primer für die qPCR.....	33
Tabelle 9: Verwendete Kit-Systeme	34
Tabelle 10: Verwendete Ziellinien und deren Kulturmedium.....	35
Tabelle 11: Pipettierschema für die cDNA-Synthese (Ansatz pro Reaktion).....	37
Tabelle 12: Zusammensetzung des qPCR Mastermix (Ansatz pro Reaktion)	37
Tabelle 13: Protokoll qPCR Thermocycler.....	38
Tabelle 14: Zusammensetzung des PCR Ansatzes	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Tabelle 15: Verwendete Escherichia coli - Klonierungsstämme.....	40
Tabelle 16: Benötigte Chemikalien für ein Polyacrylamidgel	41
Tabelle 17: Informationen von über die untersuchten Patientengruppen	46

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
A. dest.	destilliertes Wasser
A.-T.	Annealing Temperatur
Abb.	Abbildung
Amp ^R	Ampicillin-resistent
AK	Antikörper
AP	Aktivator-Protein
APS	Ammoniumpersulfat
AREG	Amphiregulin
ATF3	<i>cyclic AMP-dependent transcription factor</i>
bp	Basenpaar/e
BSA	bovine serum albumin
bzw.	beziehungsweise
Ca ²⁺	Kalzium
CBL	E3-Ubiquitin-Ligase Casitas B-Zell-Lymphom
CBP	CREB-binding protein
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CLDN	Claudin
cm	Centimeter
CREB	<i>cAMP response element binding protein</i>
CREBBP	<i>CREB-binding protein</i>
CO ₂	Kohlendioxid
Cp	<i>cycle quantification</i>
CXCL	CXC-Motiv-Chemokin
CXCR	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor
DAAD	<i>direct acting antiviral drugs</i>
DAMP	<i>danger-associated molecular patterns</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
Dr.	Doktor
ds	<i>double strand</i>
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EREG	Epiregulin
ERK	extrazellulär-signalgesteuerten Kinasen
ErbB	avian erythroblastosis oncogene B
et. al.	und andere (lateinisch <i>et alii</i>)
g	Gramm
GPCR	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
G α_{i2}	inhibitorisches G-Protein
G α_s	stimulierendes G-Protein
G α_q	G-Protein α_q Untereinheit
FCS	<i>fetal calf serum</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
HBV	Hepatitis B Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCl	Chlorwasserstoff
HCV	Hepatitis C Virus
HCVcc	<i>cell culture derived</i> HCV
HCVpp	HCV Pseudopartikel
HRP	horseradish peroxidase
HSPG	Heparansulfat-Proteoglykanen
Huh	Humane Hepatomazellen
HVR	hypervariable Region
IKK	<i>inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase</i>
IL	Interleukin
INF	Interferone
IRES	<i>internal ribosome entry site</i>
JAK	Janus kinase
JFH	<i>japanese fulminant hepatitis</i>
JNK	<i>c-JUN N-terminal protein kinase</i>
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
L	Liter
LB	<i>lysogeny broth</i>

LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LVP	Lipo-Viro-Partikel
LDL	<i>low density</i> Lipoprotein
LDLR	<i>low density</i> Lipoprotein-Rezeptor
m	Milli
M	Molar
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MOI	<i>multiplicity of Infection</i>
mRNA	<i>messenger</i> RNA
mTLP	modifizierter Triton-Lyse-Puffer
MW	Molekulargewicht
Na ²⁺	Natrium
NaCl	Natrium Chlorid
NEAA	Nicht-essentielle Aminosäuren
NF-κB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
NRG	Neuregulin
NS	nicht signifikant
OCLN	Occludin
ORF	<i>open reading frame</i>
PAA	Polyacrylamid
PAMP	pathogen-assoziiertes molekulares Muster
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PEG-IFN	PEGyliertes Interferon
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Prof.	Professor
PRR	<i>Pattern Recognition Receptors</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
qPCR	quantitative PCR
RBV	Ribavirin
ref	Relative Zentrifugalbeschleunigung
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur

RT-PCR	<i>realtime</i> PCR
SDHA	Succinat-Dehydrogenase-Komplex, Untereinheit A
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
siRNA	<i>small interfering</i> RNA
SR-BI	<i>scavenger receptor</i> B1
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
SVR	<i>Sustained Virological Response</i>
TBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung
TBST	TBS mit Tween20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TCID ₅₀	<i>tissue culture infection dose</i>
TC-PTP	<i>T-Cell Protein Tyrosine Phosphatase</i>
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TLP	Triton-Lyse-Puffer
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAF	Tumornekrosefaktor-assoziierten Faktors
Tris T	Tris(hydroxy-Aminomethan)
UTR	untranslated region
VLDL	<i>very low density</i> Lipoprotein
VEGF	vascular endothelial growth factor
U	Unit
WB	Western Blot
WHO	<i>World Health Organisation</i>
w/o	<i>without</i>
α	Alpha
β	Beta
μ	Mikro

Fremdsprachige Begriffe sind in Kursivschrift dargestellt.

1. Einleitung

1.1 Das Hepatitis C Virus

Das Hepatitis C Virus (HCV), der Erreger der Hepatitis C, ist ein behülltes RNA-Virus mit positiver Polarität. Es ist das einzige bisher bekannte RNA-Virus, das eine chronische Infektionskrankheit auslösen kann.¹ Entsprechend den Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) sind weltweit etwa 71 Millionen Menschen von einer HCV-Infektion betroffen, wovon etwa 58 Millionen Menschen unter anhaltender Virusreplikation eine chronische Infektion aufweisen. Jährlich infizieren sich weltweit etwa 1,5 Millionen Menschen mit dem HCV und im Jahr 2019 führte eine HCV-Infektion zu 290.000 Todesfällen. Die meisten verstarben aufgrund einer durch HCV induzierten Leberzirrhose und Leberzellkarzinom.² Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist mit 70-80 % der Fälle das häufigste Leberzellkarzinom, wobei die chronische Infektion mit Hepatitis Viren als eine der Hauptursachen für ein HCC gilt.^{3, 4} Derzeit gibt es keinen Impfstoff zur Vorbeugung von HCV-Infektionen.

Die Entdeckung des HCV im Jahr 1989 ermöglichte es der Grundlagenforschung, entscheidende Komponenten des komplexen Lebenszyklus dieses Krankheitserregers zu entschlüsseln.⁵ Das HCV gehört zur Familie Flaviviridae, welche in drei Gattungen aufgeteilt wird: Flavivirus, Pestivirus und Hepacivirus.⁵ Zu den Flaviviren gehören das Gelbfiebertvirus, das Denguefiebervirus, das Virus der Japanischen Enzephalitis und das Virus der durch Zecken übertragenen Enzephalitis.⁶ Zu den Pestiviren gehören das Bovine Virusdiarrhoe-Virus, das Klassische Schweinepestvirus und das Border-Disease-Virus. HCV ist der einzige bekannte Repräsentant der Gattung Hepaciviren.⁷ HCV repräsentiert eine hoch divergente Gruppe von Viren, die in sieben Hauptgenotypen und einer großen Anzahl von Subtypen eingeteilt ist. Weltweit sind die Genotypen eins und drei am häufigsten anzutreffen, wobei etwa 46 % (Genotyp eins) bzw. 30 % (Genotyp drei) aller Hepatitis C Fälle diesen Genotypen zugeordnet sind. In Deutschland ist der Genotyp eins der am weitesten verbreitete Genotyp.⁸ Aufgrund der fehlenden „*proof-reading*“ Funktion der Viruskodierten RNA abhängigen RNA Polymerase NS5B und der hierdurch bedingten hohen Mutagenität zirkuliert HCV in infizierten Personen als sich ständig weiterentwickelnde Quasispezies. Ein Sachverhalt der in wesentlichen Teilen zur viralen Immunevasion des Virus beiträgt.⁶

Das HCV-Genom hat eine Länge von etwa 9600 Nukleotiden. Es setzt sich aus einer 5'-nichtkodierenden Region, einem einzigen offenen Leserahmen (ORF) und einer 3'-nichtkodierenden Region zusammen. Der ORF kann je nach Genotyp zwischen 9030 und 9099 Nukleotiden lang sein und kodiert für einen einzelnen Polyproteinvorläufer mit 3010 bis 3033 Aminosäuren.⁹

1.1.1 Virale Proteine

Das Polyprotein wird durch Proteasen, die spezifisch für den Wirt sind, im Bereich der Strukturproteine sowie durch eine vom Virus kodierte Protease im Bereich der Nicht-Strukturproteine prozessiert. Nach der Prozessierung ergeben sich die Strukturproteine Core, E1, E2 und p7 sowie die Nicht-Strukturproteine NS2, NS3, NS4A, NS4B und NS5B (Abb. 1).

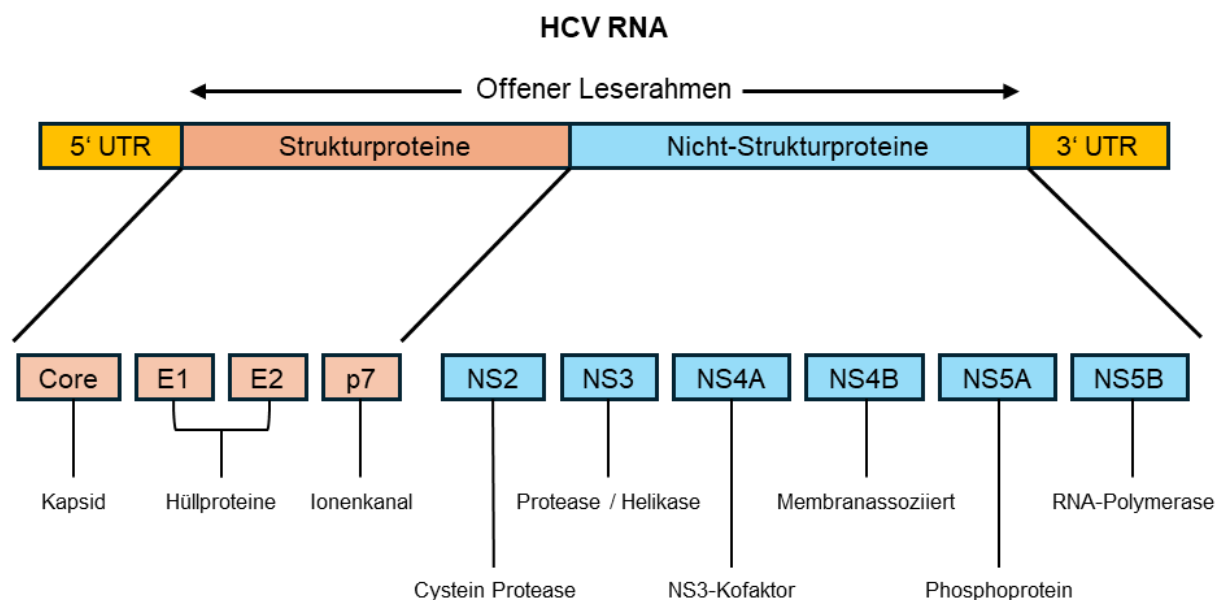


Abbildung 1: Die Zusammensetzung des HCV-Genoms. HCV besteht aus einem umhüllten Partikel, das eine 9,6 kb große Plus-Strang-RNA beinhaltet. Das Genom besteht aus einem langen ORF, der für einen Polyproteinvorläufer von 3010 bis 3033 Aminosäuren kodiert. Die Translation des HCV-ORF wird durch eine 340 Nukleotide lange 5'-nicht-translatierte Region (UTR) reguliert, die als interne Ribosomeneintrittsstelle fungiert und die direkte Bindung von Ribosomen in der Nähe des Startcodons des ORF ermöglicht. Das HCV-Polyprotein wird sowohl ko- als auch posttranslational durch zelluläre und virale Proteasen in zehn verschiedene Produkte gespalten. Dabei befinden sich die Strukturproteine (Core, E1, E2 und p7) im N-terminalen Drittel, während sich die nicht-strukturellen replikativen Proteine (NS2-5) im übrigen Teil befinden.¹⁰ (modifiziert nach Ashfaq *et al.*)¹¹

Das Core-Protein stellt ein hochkonserviertes Basisprotein dar, aus dem sich das virale Nukleokapsid zusammensetzt.¹² Die beiden Hüllproteine E1 und E2 weisen eine starke Glykosylierung auf und übernehmen eine wichtige Funktion beim Eindringen des Virus in den Hepatozyt.¹³ Das p7-Protein fungiert als integrales Membranprotein und bildet einen Ionenkanal.¹⁴ Das NS2-Protein ist essentiell für den Abschluss des viralen Replikationszyklus sowohl *in vitro* als auch *in vivo*.^{15,16} Das NS3-Protein besitzt eine multifunktionale Aktivität. Der N-terminale Bereich von NS3 besitzt Serinprotease-Aktivität, während der C-terminale Bereich NTPase/Helikase-Aktivität aufweist.¹⁷ NS4B nimmt eine bedeutende Rolle bei der Rekrutierung weiterer viraler Proteine ein.¹⁸ NS5A ist ein hydrophiles Phosphoprotein, das eine wesentliche Funktion bei der viralen Replikation, der Modulation von zellulären Signalwegen und der Interferonantwort übernimmt.^{19,20} NS5B fungiert als RNA-abhängige RNA-Polymerase und spielt eine zentrale Rolle bei der Synthese eines neuen RNA-Genoms.²¹

1.1.2 Viraler Zelleintritt und Replikationszyklus

HCV kann nur bei Menschen, Schimpansen und in begrenztem Umfang bei Spitzmäusen zu einer chronischen Infektion führen.^{22,23} Diese Wirtsspezifität könnte auf bestimmte Rezeptoren zurückzuführen sein, die der Virus für den Eintritt in die Zelle und die anschließende Replikation benötigt. Zahlreiche Studien befassen sich mit der Erklärung der Wirtsspezifität von HCV.²⁴⁻²⁶ Der genaue Mechanismus ist jedoch noch nicht vollständig geklärt.

Die Hauptreservoirs des HCV sind Hepatozyten, obwohl auch andere Zelltypen teilweise beschrieben wurden.²⁷ Hepatozyten sind polarisiert, wobei die jeweiligen Membranbereiche durch *Tight Junctions* getrennt sind, die den apikal-kanikulären vom basolateral-sinusoidalen Bereich abgrenzen.²⁸ Bei chronisch infizierten Patienten zirkulieren HCV-Partikel als "Lipo-Viro-Partikel" (LVPs), das heißt Virionen, die mit Lipoprotein-Komponenten niedriger bis sehr niedriger Dichte (LDL und VLDL) assoziiert sind.²⁹ Diese Partikel werden in den Dissé-Raum transportiert, wo das Virus mit den Rezeptoren interagieren kann, die für den Eintritt in Hepatozyten erforderlich sind.^{30,31} Der Dissé-Raum ist ein anatomischer Spaltraum von etwa 10-15 µm Breite zwischen den Hepatozyten und den Endothelzellen der Lebersinusoiden.³² Der Prozess des Viruseintritts kann grob in drei Schritte unterteilt werden: die Anheftung an Hepatozyten, die rezeptorvermittelte Endozytose und die endosomale Fusion.³³ Der HCV-Zelleintritt ist ein komplexer Prozess, an dem Faktoren des Virus und der Wirtszelle beteiligt sind. Dazu gehören unter anderem die viralen Hüllglykoproteine E1 und E2, CD81, der Scavenger-Rezeptor BI (SR-BI), sowie die Tight-Junction-Proteine Claudin-1 (CLDN1) und Occludin (OCLN).³⁴

Sobald HCV-LVPs im Dissé-Raum vorhanden sind, werden sie von Heparansulfat-Proteoglykanen (HSPG) und dem Low-Density-Lipoprotein-Rezeptor (LDLR) auf der Oberfläche der Hepatozyten eingefangen (Abb. 2).^{35,36} Der Viruseintritt erfordert anschließend die Interaktion der HCV-Hüllglykoproteine E1 und E2 mit dem Wirtszellmembranrezeptor SR-BI.³⁷ Nach der Bindung an SR-BI kommt es zur Exposition von Rezeptorbindungsstellen im E2-Glykoprotein, was die Bindung der viralen Partikel an CD81 ermöglicht.³⁸ Die HCV-Bindung an CD81 führt zur Aktivierung des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR) durch Förderung seiner Phosphorylierung. EGFR Liganden verbessern außerdem die Kinetik des HCV-Eintritts, indem sie die Endozytose von EGFR-CD81-Komplexen induzieren.³⁹ Zusätzlich ist der EGFR für die Regulierung der CD81-CLDN1-Assoziation von Bedeutung.⁴⁰ CLDN1 und OCLN verstärken die Bindung zwischen den Viruspartikeln und Rezeptorkomplexen.⁴¹ Die Interaktionen von Viruspartikeln mit Rezeptoren, Korezeptoren und Kofaktoren führen zu molekularen Umstrukturierungen an der Plasmamembran. Diese Umstrukturierungen führen schließlich zur Internalisierung von Viruspartikel-Rezeptorkomplexen durch clathrinabhängige Endozytose. Die Verschmelzung innerhalb des

endosomalen Zellkompartiments zwischen Virus- und Wirtsmembranen, vermittelt durch E1 und E2, ist der letzte Schritt des HCV-Eintritts, wodurch die viralen RNA in das Zytosol der Wirtszelle freigesetzt werden kann (Abb. 2).³⁸

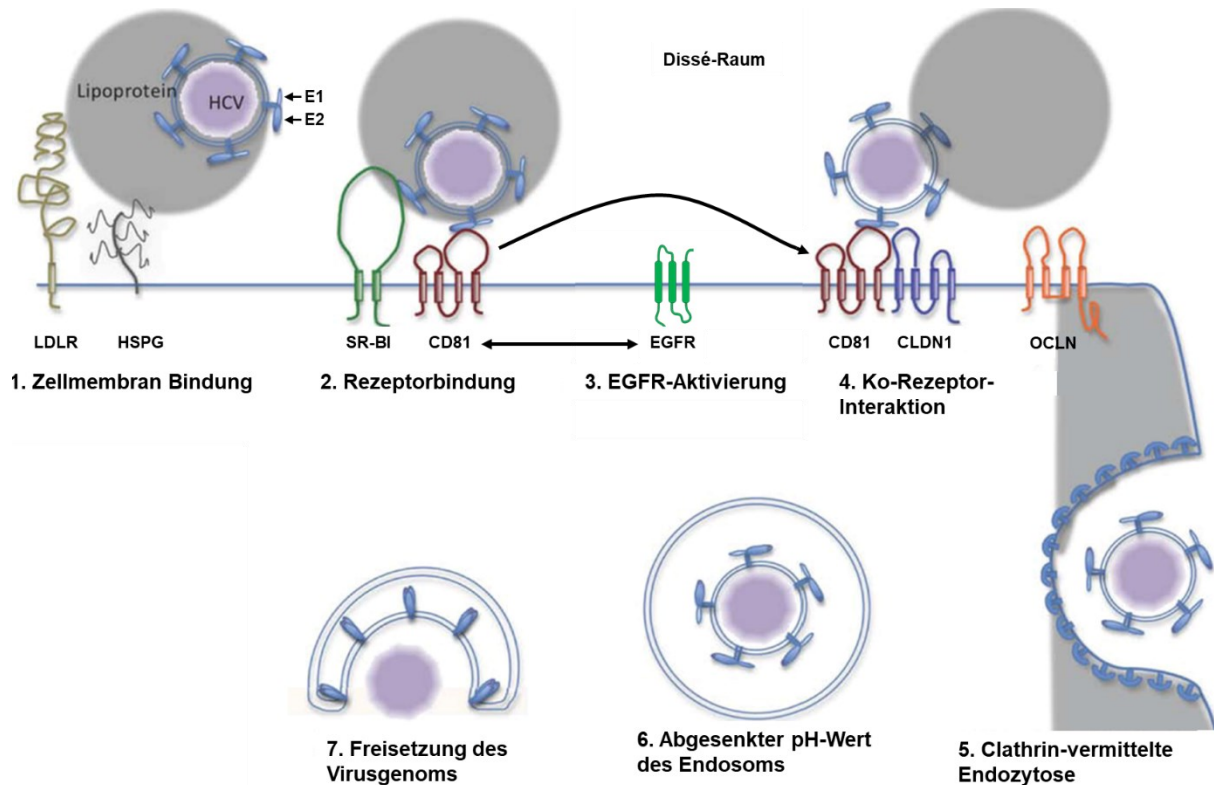


Abbildung 2: Schematisches Modell des HCV-Eintritts. Dargestellt ist ein Hepatozyt, seine Membran und die verschiedenen HCV-Rezeptoren, Kofaktoren und Zellwirtskomponenten, die am HCV-Eintritt beteiligt sind. Die Hauptschritte des HCV-Zelleintrittsprozesses sind fett gedruckt (von 1 bis 7) Lipovirale Partikel heften sich an die Oberfläche von Hepatozyten durch Interaktion mit HSPG-, LDLR oder SR-BI-Oberflächenmolekülen (1). Diese Bindung ermöglicht die Bindung der Viruspartikel an CD81 und die Aktivierung des EGFR-Rezeptorsignals (2). Diese Aktivierung induziert die Assoziation von CD81 mit Claudin-1 (4), die wahrscheinlich durch eine direkte Interaktion zwischen E1E2 und CLDN1 verstärkt wird. Die Komplexbildung der Rezeptoren ermöglicht die Internalisierung der Viruspartikel und die Migration durch Clathrin-vermittelte Endozytose (5). E1-E2-Umlagerungen ermöglichen die Umformung von Heterodimeren und die anschließende Membranverschmelzung (7), wodurch die viralen RNA in das Zytosol der Wirtszelle freigesetzt werden kann. HSPG, Heparansulfat-Proteoglykan; LDLR, Low-Density-Lipoprotein-Rezeptor. (modifiziert nach Staal *et al.*)⁴²

Nach der Freisetzung der viralen RNA in das Zytoplasma wird das RNA-Genom direkt im rauen endoplasmatischen Retikulum (ER) in den zuvor beschriebenen Polyproteinvorläufer übersetzt. Dieser Polyproteinvorläufer wird schließlich von zellulären und viralen Proteasen in die zehn viralen Proteine gespalten (siehe Kapitel 1.1.1).⁴³ Die virale RNA dient zusätzlich als Vorlage für die virale Replikation, bei der positive Genome entstehen, die für die Produktion weiterer Proteine und den Zusammenbau des Virus durch ein Negativ-Sense-Zwischenprodukt verwendet werden.⁴⁴ NS5B, wie zuvor erwähnt, fungiert als virale RNA-abhängige RNA-Polymerase und ist ein entscheidendes Enzym für die RNA-Synthese.²¹ Die meisten viralen Proteine sind für den Replikationsprozess erforderlich, während NS4B und

NS5A Schlüsselfunktionen bei Reorganisationsprozessen in der Wirtszelle übernehmen. Unter anderem sind sie essenziell für die Biogenese und Wartung des 'membranösen Netzes', welches die Replikationsfabriken des Virus enthält.⁴⁵ Neue Virionen werden in einem Kompartiment, das vom ER abgeleitet ist, zusammengebaut und durch Exozytose über einen Golgi-abhängigen Sekretionsweg freigesetzt. Während dieses Prozesses durchläuft das Virus eine Reifung und wird von endogenen Lipoproteinen umhüllt, was es dem ihm ermöglicht neue Zellen zu infizieren.⁴⁶

Das Verständnis der Funktion der viralen Proteine im Kontext des viralen Lebenszyklus war von entscheidender Bedeutung für die Entwicklung von Medikamenten, die direkt mit Virusproteinen wie der RNA-abhängigen Polymerase sowie den viruskodierten Proteasen interagieren und hierüber gezielt die virale Replikation unterdrücken und somit die vollständige Heilung einer HCV-Infektion überhaupt erst ermöglichen.

1.1.3 Therapie der Hepatitis C Infektion

Früher wurde HCV mit pegyliertem Interferon (PEG-IFN) alpha zusammen mit Ribavirin (RBV) über 24 oder 48 Wochen behandelt. RBV unterdrückt dabei vergleichsweise unselektiv die Aktivität von Polymerasen und dadurch die Replikation sowohl von DNA- als auch RNA-Viren.⁴⁷ Diese Kombination führte zu mittelmäßigen Raten des anhaltenden virologischen Ansprechens (SVR) von 40 % bis 50 % und war von einer Reihe von für viele Patienten nicht tolerierbarer unerwünschter Wirkungen wie hämolytischer Anämie, grippeähnlichen Symptomen und psychiatrischen Störungen begleitet.⁴⁸

Ein Durchbruch in der Behandlung gelang 2011 mit der Zulassung von zwei oral verabreichbaren direkt antiviral wirkenden Medikamenten (DAAs), Boceprevir (Victrelis, Merck Sharp & Dohme) und Telaprevir (Incivek, Vertex Pharmaceuticals).⁴⁹ Boceprevir und Telaprevir hemmen gezielt die virale Serinprotease NS3/4A, wodurch die Replikation des HCV unterdrückt wird.⁵⁰ Diese Wirkstoffe führten zu SVR-Raten von bis zu 70 %. Jedoch waren sie mit komplizierten Dosierungsschemata, strikten Diätvorschriften und ungünstigen Nebenwirkungsprofilen verbunden.⁴⁹ Ende 2013 kam es zu einem Paradigmenwechsel, als Simeprevir (Olysio, Janssen) und Sofosbuvir (Sovaldi, Gilead Sciences) innerhalb weniger Wochen zugelassen wurden. Simeprevir inhibiert ebenfalls die Serinprotease NS3/4A, wodurch es zur Unterdrückung der Replikation kommt.⁵¹ Sofosbuvir hingegen zielt gezielt auf die NS5B-Polymerase ab, indem es einen Kettenabbruch induziert und somit ebenfalls die Replikation unterbindet.⁵² Diese Wirkstoffe waren die ersten oralen, einmal täglich einzunehmenden Medikamente, die gut verträglich waren. Sie erreichten bei ausgewählten Genotypen SVR-Raten von über 90 %, entweder als Monotherapie oder in Kombination mit

PEG-Interferon plus RBV. Mit der Zulassung weiterer DAA-Medikamente wurden Therapien ohne IFN für alle HCV-Genotypen verfügbar.

Inzwischen sind mehrere gut verträgliche, rein orale Therapieschemata zur Behandlung von Patienten mit verschiedenen HCV-Genotypen, Lebererkrankungsstadien und Begleiterkrankungen zugelassen.⁵³ Mithilfe von DAAs können heute mehr als 95 % der mit HCV infizierten Patienten geheilt werden.⁵⁴ Angesichts dieser hohen Heilungsrate stellt sich die Frage, ob weitere Forschungen für diese Krankheit überhaupt noch notwendig sind. Obwohl eine Behandlung möglich ist, bestehen weiterhin einige Probleme. Viele Patienten, die chronisch mit dem Virus infiziert sind, bleiben über Jahrzehnte hinweg asymptomatisch und können daher unwissentlich andere Personen infizieren.⁵⁵ Der Virus wird oft erst erkannt, wenn der Patient deutliche Symptome einer Leberschädigung wie eine Zirrhose oder ein hepatozelluläres Karzinom entwickelt. Trotz erfolgreicher Therapie mit DAAs führen bereits vorhandene Leberveränderungen nicht zu einer 'restitutio ad integrum'. Vielmehr resultieren, je nach Stadium der Erkrankung zum Zeitpunkt der Behandlung, variabel ausgeprägte Residualbefunde.⁵⁶ Entsprechend haben mehrere epidemiologische Studien belegen können, dass das Risiko ein HCC zu entwickeln, trotz erfolgreiche Behandlung für eine Reihe von Patienten erhöht bleibt.⁵⁷ Ferner ist HCV weltweit vor allem in Ländern mit begrenzten Ressourcen verbreitet. Da DAAs bislang teuer sind, können sich die meisten Patienten, die sie benötigen, die Behandlung nicht leisten. Darüber hinaus muss hervorgehoben werden, dass die erfolgreiche Eradikation von HCV in keiner Weise zu einer protektiven Immunität führt, weshalb geheilte Patienten weiterhin einem Risiko einer Reinfektion mit HCV ausgesetzt sind. Entsprechend würde die Zielsetzung einer vollständigen Eliminierung des Virus aller Voraussicht nach die Verfügbarkeit einer wirksamen Impfung voraussetzen.

Neuere Studien deuten zusätzlich auf epigenetische "Vernarbung" hin, die auch nach der HCV-Eradikation durch DAAs fortbesteht. Diese anhaltenden Folgeveränderungen einer HCV-Infektion werden, soweit bislang untersucht, durch Veränderungen der Histonmodifikationen verursacht. Diese gehen mit einer Umprogrammierung der Genexpression des Wirts einher und verändern Signalwege, die mit dem HCV-Lebenszyklus und der Entstehung von HCC in Verbindung stehen.⁵⁷ Die Entwicklung von DAAs, mögliche Auswirkungen des Virus auf die Wirtszellen sowie die Forschung an einer potenziellen Impfung wurden erst durch die Etablierung geeigneter HCV-Zellkultursysteme ermöglicht.⁵⁸

1.1.4 Zellkultursysteme zur Erforschung des Hepatitis C Virus

Die frühesten Versuche, Zellkulturmodelle für HCV zu etablieren, konzentrierten sich darauf, verschiedene kultivierte Zellarten, einschließlich primärer menschlicher Hepatozyten, experimentell mit Patientenseren als Quelle für infektiöse Viren zu infizieren. Jedoch erreichten die "Replikationsmengen" in diesen Modellen nie die Eingangsmengen. Die In-vitro-Infektion von Zellen mit Patientenproben stellte daher nie ein robustes Zellkulturmodell für die HCV-Forschung dar. Dies war viele Jahre lang ein bedeutendes Hindernis, das die Grundlagenforschung zum Lebenszyklus von HCV und damit die Entwicklung von Medikamenten stark behinderte.⁵⁹ Um hier die Voraussetzungen für die Forschung zu verbessern wurde an einem Reverse-Genetik-Modell für HCV gearbeitet. Die Etablierung eines Zellkultursystems basierend auf einem geklonten Virusisolat dauerte fast ein Jahrzehnt, bis Lohmann *et al.* im Jahr 1999 das erste robuste Zellkulturmodell für HCV auf der Grundlage eines subgenomischen Replikons etablierten.⁴³ Diese Replikonsysteme können in Huh 7.5-Zellen den intrazellulären Replikationszyklus von HCV simulieren, führen jedoch nicht zur Produktion infektiöser Viruspartikel, da diesem System die Strukturproteine fehlen, welche Voraussetzung für die Produktion infektiöser Partikel sind.

Es dauerte weitere fünf Jahre bis 2005 erstmals vollständig permissive Zellkultursysteme beschrieben wurden, welche in der Lage sind den gesamten viralen Lebenszyklus abzubilden.^{60, 61} Die Charakterisierung des GT2a-Isolat JFH1 ermöglichte es erstmals den vollständigen viralen Lebenszyklus im Zellkulturmodell der Huh 7 Zelllinien zu simulieren ohne dass zellkulturadaptierte Mutationen erforderlich waren.⁶² Das GT2a-Isolat JFH1 stammt von einem japanischen Patienten, der an einer fulminant verlaufenden Hepatitis litt, der sogenannten japanischen fulminanten Hepatitis 1 (JFH1).⁶³ Unter Verwendung dieses Isolats haben drei Gruppen über die Produktion infektiöser HCV-Partikel nach der Transfektion von Huh 7-Zellen (oder bestimmten Klonen davon) mit entweder dem authentischen JFH1-Isolat oder einer intragenotypischen HCV-Chimäre berichtet.^{60, 61, 64} Letztere besteht aus der Core- bis NS2-Region des GT2a J6 HCV-Isolats, die die analoge Region im JFH1-Genom ersetzt.⁶⁰ Pietschmann *et al.* optimierten eine dieser Chimären im Jahr 2006 durch Verwendung der viralen NS2-NS5B-Proteine von JFH1 und die Core-NS2-Proteine des J6-Isolats.¹⁶ Das darauf resultierende und bisher effizienteste Chimär, namens JC1, wird auch in dieser Arbeit als Infektionsmodell verwendet (Abb. 3B).

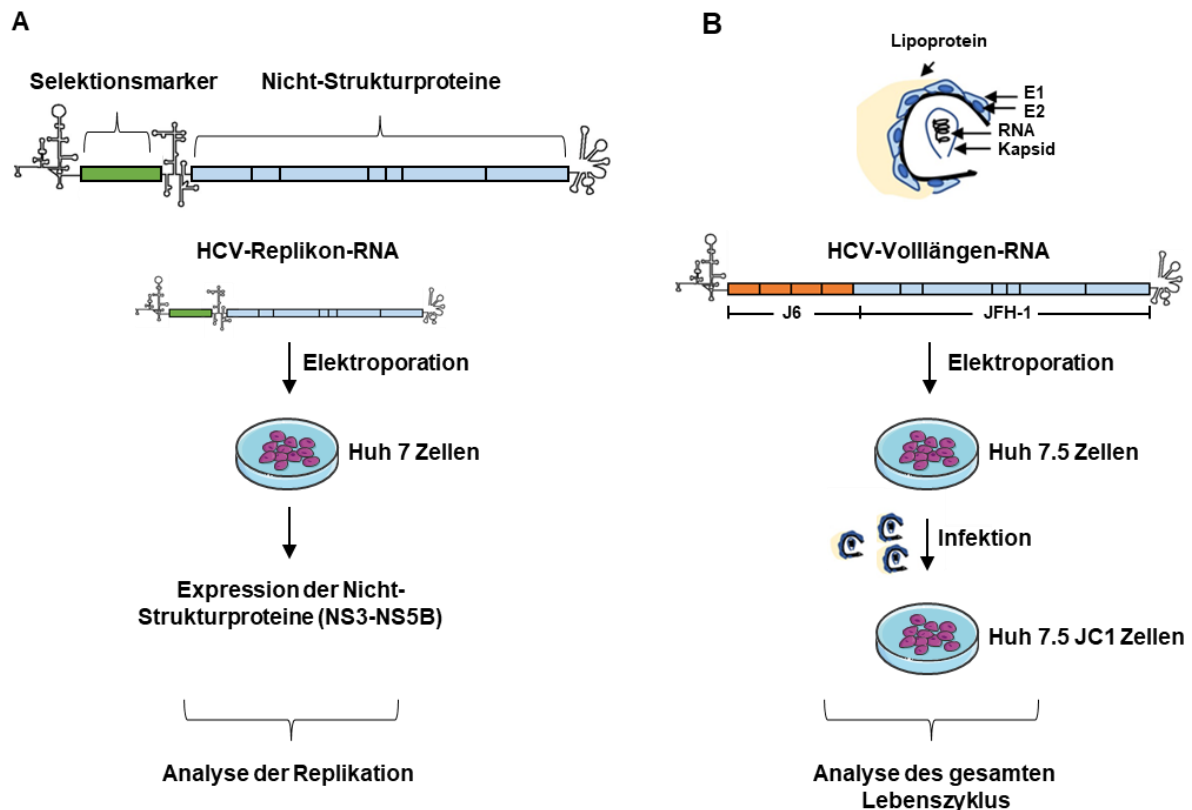


Abbildung 3: Schematische Darstellung der verschiedenen HCV-Zellkultursysteme. Die HCV-RNA enthalten einen Selektionsmarker, der die viralen Proteine von Core bis NS2 ersetzt, und einer zweiten IRES, die die Translation der Nichtstrukturproteine NS3 bis NS5B ermöglicht. Nach der Transfektion wird die virale RNA direkt translatiert. Die HCV-positiven Replikon-Zellen sind als Huh 9.13 gekennzeichnet. B) Die Herstellung von HCV-Partikeln aus Zellkulturen (HCVcc) beruht auf den Genotyp-2a-Isolaten J6 und JFH1. Die vollständigen viralen Genome werden in permissiven humanen Hepatozyten transfiziert, was zu Translation und RNA-Replikation führt und die Produktion viraler Partikel ermöglicht, die neue Zielzellen infizieren können. Auf diese Weise kann der gesamte virale Lebenszyklus von HCV vollständig untersucht werden. Erfolgreich mit HCV infizierte Zellen werden als Huh 7.5 JC1 gekennzeichnet. (modifiziert nach Steinmann *et al.*)⁶⁵

1.2 Modulation der Wirtszelle durch eine Hepatitis C Infektion

Die hohe Neigung zur Persistenz, die niedrige Immunogenität und der schleichende Verlauf einer HCV-Infektion deuten darauf hin, dass leistungsfähige Mechanismen dem HCV ermöglichen, die antivirale Immunität des Wirts zu umgehen, die Entzündungsreaktion zu beeinflussen und die Infrastruktur der Wirtszellen zu nutzen, ohne dabei die Lebensfähigkeit der eigenen Wirtszelle zu beeinträchtigen.⁶⁶ Aufgrund dieser Fähigkeiten kann das Virus über Jahrzehnte, trotz anhaltender Virusreplikation hinweg die Entwicklung einer symptomatischen Krankheit verhindern. Ganz im Vordergrund steht hier die, aufgrund der fehlenden *Proof-reading* Funktion der viralen NS5B Polymerase, hohe Mutationsrate und dem damit einhergehenden beständigen Wandel immunogener Regionen, welche federführend für die Entwicklung einer sogenannten T-Zell *Exhaustion* verantwortlich ist. Darüber hinaus interferiert HCV eng mit den inter- und intra-zellulären Signalwegen des Wirtsorganismus.^{67, 68}

Obwohl die pathogenen Mechanismen noch nicht vollständig geklärt sind, ist gut belegt, dass während sämtlicher Phasen der Virusinfektion und der viralen Replikation eine Wechselwirkung zwischen Wirtszellfaktoren und viralen Komponenten besteht.⁶⁹ Die Modulation der interzellulären Kommunikationswege, die für die Rekrutierung von Immunzellen entscheidend sind, ermöglicht es HCV ferner, die Zusammensetzung der Immunzellpopulationen und damit die Immun- und Entzündungsreaktion des Wirtes nachhaltig zu beeinflussen.⁶⁶ Diese Interaktionen schaffen ein komplexes Gleichgewicht zwischen Wirtszellen und HCV und sind an zahlreichen Mechanismen beteiligt, die die Pathogenese von Hepatitis C kennzeichnen.⁷⁰ Dabei beeinflusst HCV die Funktion der Wirtszelle entscheidend dadurch, dass die intra-zelluläre Signalübertragung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen nachhaltig beeinflusst werden und dadurch auch die Funktion sowie das Kommunikationsverhalten der Wirtszelle moduliert wird. Allerdings ist die exakte Modulation dieser Kommunikationswege durch HCV bisher nicht vollständig bekannt und soll im Rahmen dieser Arbeit weiter untersucht werden.

1.3 Wachstumsfaktoren

Wachstumsfaktoren sind Polypeptide oder Proteine, die von verschiedenen Zelltypen sezerniert werden. Sie spielen eine entscheidende Rolle bei der Regulation vieler zellulärer Prozesse, darunter Proliferation, Differenzierung, Angiogenese, Zellüberleben, Entzündung sowie Gewebereparatur oder Fibrose.⁷¹⁻⁷³ Die Expression von Wachstumsfaktoren wie auch ihre intra-zelluläre Signalübertragung wird durch entsprechende Kontroll- bzw. Rückkopplungs-mechanismen eng kontrolliert. Ein Versagen dieser Mechanismen führt zu einem aberranten Verhalten der betreffenden Zelle und begünstigt damit die maligne Transformation derselben. Entsprechend ist eine übermäßige Aktivität dieser Faktoren oder der durch sie induzierten intra-zellulären Signalübertragung häufig assoziiert mit Krebserkrankungen und eine Blockade derselben, entweder durch Antikörper oder entsprechende Inhibitoren elementarer Bestandteil von Behandlungsstrategien.⁷⁴ Wachstumsfaktoren haben die Fähigkeit, mit spezifischen Rezeptoren auf der Oberfläche von Zellen zu interagieren. Liganden vermittelte Aktivierung dieser Rezeptoren führt zur Aktivierung von intrazellulärer Signalketten, was letztendlich zu einer modifizierten Genexpression und/oder einem veränderten Wachstums- oder Apoptose Verhalten der Zelle führt.⁷⁵ Es existieren mehrere Hauptfamilien von Wachstumsfaktoren, die basierend auf ihrer spezifischen Bindung an Rezeptoren klassifiziert werden. Zu den bekanntesten und am besten untersuchten zählen die Familie der vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren (VEGF-Familie) und die Epidermalen Wachstumsfaktoren (EGF-Familie).⁷⁶ Bei HCV-Patienten sind

VEGF Serumspiegel deutlich erhöht und mögliche Biomarker für eine HCV-bedingte Leberzirrhose und HCC-Diagnose.⁷⁷ Die Serumspiegel von EGF sind bei chronisch HCV infizierten Patienten ebenfalls im Vergleich zu gesunden Kontrollen signifikant erhöht, wobei HCV die EGF-Signalübertragung verändert und dadurch Entzündungsreaktionen sowie die antivirale Immunantwort modulieren könnte.⁶⁶

1.3.1 Die EGF-Rezeptorfamilie

Die EGF-Rezeptorfamilie (EGFR) umfasst vier Mitglieder: EGFR (ErbB1, HER1), ErbB2 (HER2), ErbB3 (HER3) und ErbB4 (HER4). Diese strukturell verwandten Rezeptoren sind einkettige Transmembran-Glykoproteine, die in der Leber stark exprimiert werden und deren Regulation und intrazelluläre Signalübertragung bei einer Reihe von verschiedenen Krebsarten verändert ist.^{78, 79}

Die Bindung von löslichen Liganden an den Rezeptor stimuliert die Bildung von Homo- und Heterodimeren zwischen den vier Mitgliedern dieser Rezeptorfamilie.⁷⁶ Insgesamt binden sieben verschiedene Liganden an den ErbB1 bzw. EGFR, wobei der EGF, Amphiregulin (AREG) und Epregrulin (EREG) am besten erforscht sind.⁸⁰ Die Liganden-induzierte Homodimerisierung des EGF Rezeptors oder dessen Heterodimerisierung mit anderen Familienmitgliedern der ErbB Rezeptorfamilie ist ein entscheidender Schritt zur Aktivierung der intrazellulären Tyrosinkinasedomäne. Die phosphorylierten Tyrosinreste aktivieren anschließend entweder direkt oder über Adaptorproteine nachgeschaltete Komponenten von Signalwegen, zu denen das Aktivator-Protein-1 (AP-1) und der *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF-κB) gehören (Abb. 4).⁸¹⁻⁸³

Bei Aktivierung durch die Bindung eines seiner Liganden induziert der EGFR die Zelldifferenzierung und -proliferation sowie eine gesteigerte Expression proinflammatorischer Zytokine.⁸⁴ Die E3-Ubiquitin-Ligase Casitas B-Zell-Lymphom (CBL) vermittelt die Mono- und Polyubiquitinierung des EGFR, was den Abbau des Rezeptors im Lysosom zur Folge hat.⁸⁵

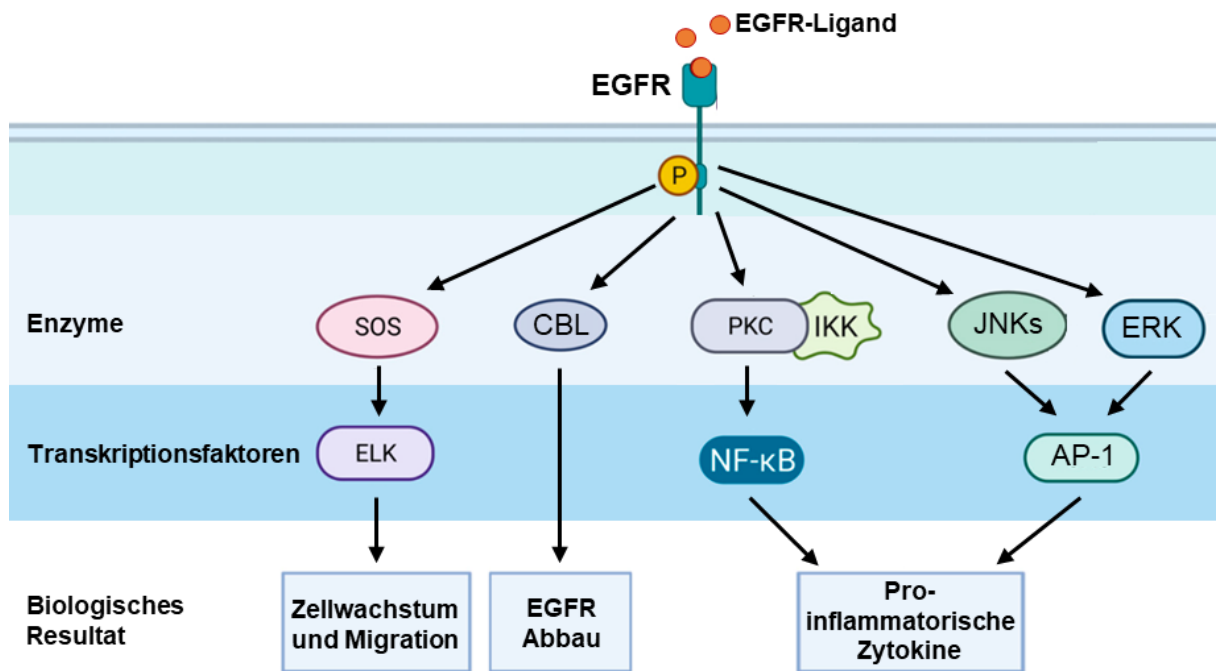


Abbildung 4: Schematische Darstellung der EGFR vermittelten Signaltransduktion. Der EGFR wird durch sieben verschiedene Liganden aktiviert was unter anderem zu Zelldifferenzierung und -proliferation sowie eine gesteigerte Expression proinflammatorischer Zytokine führt. SOS, Sohn von *Sevenless*; PKC, Proteinkinase C; IKK, IκB-Kinase. (modifiziert nach Uribe *et al.* und Fröhlich *et al.*)^{84, 86}

1.3.2 Einfluss des Hepatitis C Virus auf den EGFR-Signalweg

Wie in Kapitel 1.1.2 bereits detaillierter ausgeführt erfolgt während des Eindringens des HCV in die Zelle eine Phosphorylierung des EGFR, die für den Eintritt des Virus in die Wirtszelle wichtig ist.⁸⁷ Der nachfolgende RAF-MEK-ERK-Signalweg wird während der HCV-Infektion aktiviert.^{88, 89} Inhibitoren, die auf diesen Signalweg abzielen, reduzieren den HCV-Eintritt nach der Bindung relevant.^{40, 90} Dies unterstreicht die Relevanz des EGFR und dessen intrazellulärer Signalübertragung für den Eintritt von HCV in die Wirtszelle. Dabei fungiert, wie oben bereits beschrieben, der EGFR als Co-Rezeptor für den viralen Eintritt, wobei seine virusinduzierte Aktivierung sowie die nachfolgende EGFR-Signalgebung für den viralen Eintritt erforderlich sind und auch die Replikation beeinflussen.⁹¹⁻⁹³ Um die Funktionalität dieses Signalwegs zu optimieren, beeinträchtigt HCV die Oberflächenexpression von Mitgliedern der ErbB-Wachstumsfaktor-Rezeptorfamilie und die Proteinlevel eines relevanten endogenen negativen Regulators.^{91, 92} Frühere Arbeiten von Groepper *et al.* legen nahe, dass HCV die Freisetzung von Mitgliedern der Chemokinfamilie, die spezifisch den Chemokinrezeptor CXCR2 erkennen, über einen Mechanismus verstärkt, der eine HCV-vermittelte Hochregulierung der EGF-Expression beinhaltet. Dabei steigert HCV die Expression von CXCR2-Liganden, die wiederum durch EGF weiter hochreguliert werden, während die EGF-vermittelte Induktion der Genexpression in Gegenwart von HCV deutlich verstärkt wird.

Darüber hinaus erhöht HCV die Fähigkeit von EGF und EGFR-vermittelten Signalen, die Expression von CXCR2-Liganden in seiner Wirtszelle zu induzieren, was zur Freisetzung eines Mediatormusters führt, das die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten vermittelt.⁶⁶ Weitere Arbeiten legen zusätzlich nahe, dass neben NS2, NS4A, NS4B/B und NS5A auch die viruskodierte Protease NS3/4A an der HCV-vermittelten Hochregulierung der CXCR2-Ligandenexpression beteiligt ist. NS3/4A vermittelt seine Wirkung auf den EGF-Signalweg, indem es die ubiquitär exprimierte Tyrosinphosphatase TC-PTP spaltet, welche ein endogener negativer Regulator des EGF-Rezeptors ist.^{91, 94} Folglich führt der HCV-vermittelte Abbau der TC-PTP zu einer verstärkten EGF-induzierten Signaltransduktion. Die Herunterregulierung der TC-PTP-Expression imitiert ebenfalls die Wirkung von HCV auf die CXCL8-Expression, was darauf hindeutet, dass die HCV-vermittelte Sensibilisierung der EGF-Signalübertragung und die verstärkte Expression des CXCR2-Liganden miteinander verknüpft sind.⁶⁶ Darüber hinaus kommt es durch die Reduktion der TC-PTP Level über noch unverstandene Mechanismen zu einer verstärkten Aktivierung der Proteinkinase Akt, welche ihrerseits für die Unterstützung der viralen Replikation relevant ist.^{91, 92} Einige Daten legen außerdem nahe, dass HCV nicht nur die EGF-Signalübertragung und die Expression bestimmter Zielgene verstärkt, sondern auch die Expression von EGF selbst hochreguliert, was wiederum die Hochregulierung der Expression des CXCR2-Liganden in der infizierten Wirtszelle vermittelt und auf einen durch EGF vermittelten Rückkopplungsmechanismus hinweist.⁶⁶ Der genaue Mechanismus, der der Verstärkung der CXCR2-Ligandenexpression durch HCV zugrunde liegt, ist jedoch noch nicht vollständig bekannt und soll in dieser Arbeit weiter untersucht werden.

1.4 Zytokine

Zytokine sind eine heterogene Gruppe kleiner Proteine (ca. 5 bis 25 kDa), die eine zentrale Rolle in der zellulären Signalübertragung spielen. Sie sind Teil eines interzellulären Kommunikationssystems, das für die Immunantwort verantwortlich ist. Zu den Zytokinen gehören unter anderem Chemokine, die eine chemotaktische Wirkung besitzen, sowie Interleukine, deren Bezeichnung ursprünglich darauf zurückzuführen ist, dass sie als interzelluläre Kommunikationssignale von Leukozyten identifiziert wurden. Es ist inzwischen jedoch gut untersucht, dass neben verschiedenen Leukozyten Populationen auch eine Vielzahl anderer Zellpopulationen zur Interleukin Produktion fähig ist. Welche Interleukine von welchem Zelltyp produziert werden, hängt dabei sowohl vom auslösenden Stimulus als auch vom untersuchten Zelltyp ab. Zytokine können auf die Zellen wirken, die sie absondern (autokrine Wirkung), auf nahegelegene Zellen (parakrine Wirkung) oder in einigen Fällen auf weit entfernte Zellen (endokrine Wirkung).⁹⁵ Diese Proteine erfüllen ihre Funktion, indem sie

an spezifische Zellrezeptoren binden, die entweder Zytokin regulierte Gene induzieren oder hemmen. Zytokine sind interzelluläre Mediatoren, die sowohl die angeborene als auch die adaptive antivirale Immunantwort sowie die Entzündungsreaktion des Wirtsorganismus kontrollieren. Darüber hinaus spielen sie eine wichtige Rolle bei der Entstehung entzündungs- bzw. immunvermittelter Gewebeschädigungen. Entsprechend spielen eine Reihe von Zytokinen auch in der Kontrolle der antiviralen Wirtsreaktion auf eine HCV-Infektion eine Rolle und/oder sind an der Pathogenese HCV-bedingter Pathologien beteiligt. Über 100 verschiedene Zytokine sind bekannt und werden basierend auf ihrer primären Rolle klassifiziert.

Funktionell lassen sich Zytokine in mehrere Hauptgruppen einteilen, wobei einem Teil der Zytokine mehrere Funktionen zugeordnet werden: proinflammatorische Zytokine wie IL-1, IL-6 und TNF- α sowie antiinflammatorische Zytokine wie unter anderen IL-10. Th1-Zytokine, die von Th1-aktivierten Lymphozyten produziert werden, wie Interferon-gamma, IL-12 und IL-18. Th2-Zytokine, die eine Rolle bei der Hemmung von Th1-Zytokinen spielen und die Funktion von Th1-Immunantworten regulieren und Th17-Zytokine, die für die Differenzierung von Th17-Lymphozyten von Bedeutung sind.^{96, 97} Das komplexe Zytokinnetzwerk, das während einer HCV-Infektion aktiviert wird, führt zur Aktivierung sowohl der angeborenen als auch der adaptiven Immunantwort. HCV gelingt es, dieser Immunantwort zu entgehen, indem es in verschiedene Immunmechanismen eingreift, darunter auch die Modulation der Zytokinaktivität.⁹⁷ HCV interveniert auf verschiedenen Ebenen in das Zytokinnetzwerk, indem es unter anderem ein Th2-Zytokinprofil induziert.⁹⁸ Hauptsächlich entzieht sich das HCV der Immunantwort des Wirts jedoch durch eine sogenannte *T-Zell-Exhaustion*, die auf der fehlenden *proof-reading* Aktivität der viralen NS5B-Polymerase zurückzuführen ist. Die Unfähigkeit, die Infektion zu kontrollieren, kann zur Rekrutierung von Entzündungsinfiltraten in das Leberparenchym führen, was eine anhaltende Leberschädigung und letztendlich die Entwicklung von Leberzirrhose oder Leberkrebs zur Folge haben kann.⁹⁷

1.4.1 Das Interleukin-1 β

IL-1 β wird in der Literatur zu den proinflammatorischen Zytokinen gezählt, dass insbesondere im Rahmen der Akutphasereaktion für die Reaktion des Wirts auf Infektionen und Verletzungen von entscheidender Bedeutung ist. Es zählt zu den am besten charakterisierten Mitgliedern der IL-1-Familie und wird von einer Vielzahl von Zelltypen produziert und sezerniert.⁹⁹

ProIL-1 β , die Vorstufe des Interleukin-1 β -Proteins, wird durch das IL1 β -Gen innerhalb eines Genclusters der IL1-Familie auf dem menschlichen Chromosom 2 kodiert. ProIL-1 β wird

primär von aktivierten Makrophagen und Monozyten produziert obwohl auch viele andere Zelltypen in der Lage sind ProIL-1 β zu produzieren.¹⁰⁰⁻¹⁰⁵ Diese Zellen werden durch "pathogen-assoziiertes molekulares Muster" (PAMPs), welche von Mustererkennungsrezeptoren (PRRs) erkannt werden und/oder sekundäre Schadenssignale (DAMPs, danger-associated molecular patterns) aktiviert.^{106, 107} Nach der Aktivierung wird ProIL-1 β als Vorläuferprotein mit sehr geringer biologischer Aktivität synthetisiert. Anschließend wird es entweder intrazellulär durch das Caspase-1-Inflammasom oder extrazellulär durch andere Proteasen zu hochaktivem, reifem IL-1 β verarbeitet.¹⁰⁸⁻¹¹⁰ IL-1 β induziert die mRNA-Expression von Hunderten von Genen in verschiedenen Zelltypen wie Monozyten, Makrophagen, Epithel- und Endothelzellen sowie Chondrozyten und Fibroblasten.¹¹¹⁻¹¹⁶ Parallel dazu induziert IL-1 β auch die Expression seines eigenen Gens, was eine positive Rückkopplungsschleife darstellt, die die IL-1-Reaktion auf autokrine oder parakrine Weise verstärkt.^{99, 117} Die Stimulation der Transkription tritt innerhalb von 30 Minuten nach der Exposition gegenüber IL-1 β auf und kann über viele Stunden aufrechterhalten bleiben.¹¹⁸ IL-1 β bindet an den ubiquitär exprimierten IL-1-Rezeptor I (IL-1R).^{119, 120} Nach der Bindung an IL-1R erfolgt bei der Signaltransduktion von IL-1 β die Rekrutierung und Oligomerisierung des Tumornekrosefaktor-assoziierten Faktors (TRAF) 6 (Abb. 5).^{121, 122} TRAF6 löst daraufhin Signalkaskaden aus, die einerseits zur Aktivierung von MAP-Kinasen (MAPK), extrazellulär-signalgesteuerten Kinasen (ERK) und c-Jun-N-terminale Kinasen (JNK) führen, welche wiederum die Aktivierung des AP-1 Komplexes bewirken.^{123, 124} Darüber hinaus aktiviert TRAF6 zusätzlich über IKK Signalwege den NF- κ B Transkriptionsfaktor.¹²⁵⁻¹²⁹ AP-1 und NF- κ B sind induzierbare TFs die eine Vielzahl von Genen regulieren, die an verschiedenen Prozessen der Immun- und Entzündungsreaktion beteiligt sind.¹³⁰⁻¹³²

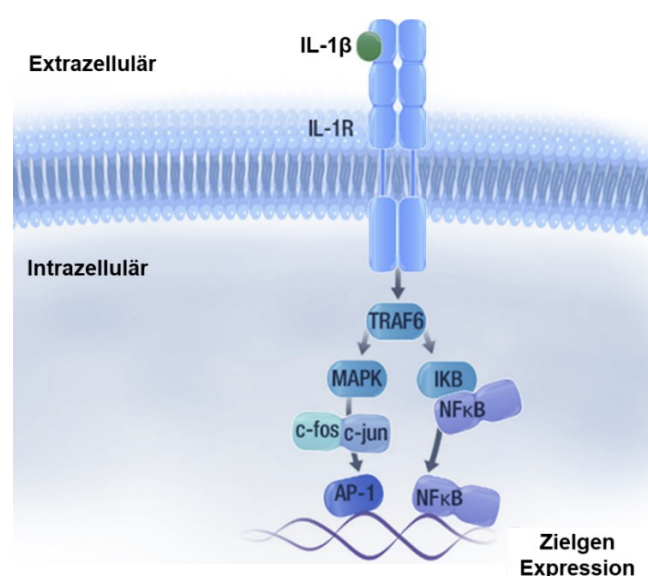


Abbildung 5: Schematische Darstellung der IL-1 β -induzierten Signaltransduktion. Das proinflammatorische Zytokin IL-1 β bindet an IL-1R auf der Oberfläche von Zielzellen, was zur Aktivierung von Signalwegen führt, an denen MAPK und NF- κ B beteiligt sind, und die daraufhin nachgeschaltete Effekte auslösen. (modifiziert nach Garon *et al.*)¹³³

1.4.2 IL-1 β während einer Hepatitis C Infektion

Die oben bereits ausgeführt, wird IL-1 β im Rahmen sowohl akuter als auch chronischer Entzündungsprozesse verstärkt freigesetzt und begleitet Viruserkrankungen.^{100, 134} Virusinfektionen führen zur Induktion der IL-1 β -Produktion durch Inflammasom-Signalwege.¹³⁵ Insbesondere bei Flaviviren, die mit dem HCV verwandt sind, wie dem West-Nil-Virus und dem Japanischen Enzephalitis-Virus, ist beschrieben, dass die über das NLRP3-Inflammasom induzierte Produktion von IL-1 β relevant für die immunologische Kontrolle dieser Virusinfektionen ist. Eine Störung der hierbei involvierten Signalketten führt zu einem aggravierten Verlauf der Virusinfektion und geht mit einer Beeinträchtigung der Viruskontrolle einher.^{136, 137}

Bislang ungeklärt ist, welche Bedeutung den im Vergleich zu einem gesunden Kontrollkollektiv ebenfalls erhöhten IL-1 β -Serumspiegeln, die im Rahmen einer chronischen HCV-Infektion zu beobachten sind, in der Immunkontrolle der Virusinfektion zukommt.^{138, 139} HCV-Produkte induzieren intrazelluläre Signaltransduktionswege und metabolische Veränderungen, welche die Produktion von IL-1 β durch Makrophagen über den NF- κ B-Signalweg stimulieren.¹⁴⁰ In der Leber wird diese Reaktion vermutlich hauptsächlich durch Lebermakrophagen vermittelt, obwohl sie auch in lymphatischem Gewebe und anderen HCV-exponierten Geweben auftreten kann, die Makrophagen oder andere phagozytierende Zellpopulationen beherbergen.¹⁴¹ Obwohl das volle Spektrum der auf IL-1 β in der Leber reagierenden Gene noch nicht vollständig charakterisiert ist, wird angenommen, dass IL-1 β seine entzündlichen Effekte durch die Induktion proinflammatorischer Genexpression vermittelt, Immunzellen zum Infektionsort rekrutiert und infiltrierende zelluläre Immun-Effektoren moduliert.^{142, 143} Darüber hinaus spielt IL-1 β eine zentrale Rolle in der Kontrolle der hepatischen Akutphasereaktion, die unter anderem für die Regulation der angeborenen Immunität von Bedeutung ist.^{144, 145}

IL-1 β wurde als pleiotroper Entzündungsfaktor und mit der Förderung der Gewebepathologie sowie der Induktion der Produktion von profibrogenen Mediatoren in Verbindung gebracht, was seine potenzielle Rolle bei HCV-Erkrankungen betont.¹⁴⁶⁻¹⁴⁸ Die durch die Infektion mit HCV induzierte Produktion von IL-1 β könnte daher einen wesentlichen Mechanismus darstellen über den HCV die Entzündungsreaktion mit unterhält und möglicherweise auch zum Fortschreiten der Lebererkrankung beiträgt.¹⁴¹ Ein entscheidender Faktor sind die durch IL-1 β in verschiedenen Zellpopulationen hervorgerufene Produktion von Chemokinen, die zentrale chemotaktische Signale, unter anderem für Immunzellen darstellen und damit wesentlich die Zusammensetzung eines entzündlichen zellulären Infiltrates bestimmen und hierüber wesentlich den Verlauf sowie die Effizienz eines entzündlichen bzw. immunologischen Prozesses mitbestimmen.¹⁴⁹

1.5 Chemokine

Chemokine werden durch ihre primäre Aminosäuresequenz und die Anordnung spezifischer, strukturell wichtiger Cysteinreste innerhalb des reifen Proteins definiert. Diese bilden Disulfidbindungen, die die Struktur des Chemokinmonomers aufrechterhalten. Das Monomer besteht aus einem zentralen dreisträngigen β -Faltblatt, einer darüber liegenden C-terminalen α -Helix und einem kurzen unstrukturierten N-Terminus, der eine entscheidende Rolle bei der Rezeptoraktivierung spielt.¹⁵⁰

Durch Variationen in der genauen Konfiguration der beiden Cysteine, die dem N-Terminus am nächsten liegen, lassen sich die Chemokine in vier Unterfamilien unterteilen: CC, CXC, CX3C und XC. Bei den CC-Chemokinen liegen diese Cysteine direkt nebeneinander, während bei den CXC-Chemokinen eine einzige variable Aminosäure zwischen ihnen liegt.¹⁵¹ Obwohl Chemokine ursprünglich nach ihren spezifischen Funktionen benannt wurden, wurde im Jahr 2000 eine systematische Nomenklatur eingeführt, die eine Bezeichnung für die Unterfamilie (CC, CXC, CX3C oder XC), gefolgt von dem Buchstaben L (für "Ligand") und einer Nummer enthält, die angibt, wann das Gen erstmals isoliert wurde.^{98, 152} Die Aktivität verschiedener Chemokine wird durch ihre Bindung an den entsprechenden Chemokinrezeptor vermittelt. Die am besten untersuchte Funktion von Chemokinen ist die Induktion von Zellmigration. Dennoch weisen sie eine Vielzahl zusätzlicher Funktionen auf. Beispielsweise vermag die Aktivierung von Chemokinrezeptoren ein breites Spektrum weiterer biologischer Prozesse zu initiieren, darunter Proliferation, Überleben, Differenzierung, Zytokinproduktion, Degranulation und biochemische Oxidation.¹⁵³ Zusätzlich verfügen mehrere Chemokine über eine direkte antimikrobielle Wirkung. Chemokinrezeptoren werden durch verschiedene Zelltypen, einschließlich Leukozyten, Neuronen, Astrozyten, Epithelzellen, mesenchymale Zellen und Endothelzellen exprimiert, so dass Chemokine auf die Funktion und das Verhalten einer Vielzahl von Zellen Einfluss nehmen.¹⁵⁴⁻¹⁵⁹

Wie vorangehend bereits beschrieben stellt die Zellmigration den wichtigsten biologischen Prozess dar, der durch Chemokine und ihre Rezeptoren reguliert wird. Viele verschiedene Arten von Zellbewegungen, die in der Literatur beschrieben wurden, unterliegen der Kontrolle von Chemokinen, darunter Chemotaxis, Haptotaxis, Chemokinese, Haptokinese und transzelluläre Migration. In einigen Kontexten können Chemokine die Migration von Zellgruppen steuern oder die Zelladhäsion stimulieren, was zu einem Stillstand der Zellbewegung führt.¹⁶⁰⁻¹⁶²

Während einer chronischen HCV-Infektion werden Mitglieder der CXC- und CC-Chemokinfamilie in der Leber und im peripheren Blut deutlich hochreguliert.¹⁶³ Groepper *et al.* haben darüber hinaus belegt, dass HCV die CXC-vermittelte interzelluläre Kommunikation von infizierten Zellen modulieren kann.⁶⁶

1.5.1 CXC-Liganden

Gemäß wissenschaftlicher Terminologie werden Mitglieder der CXC-Chemokinfamilie in zwei Subtypen eingeteilt, abhängig davon, ob sie das Glutamin-Leucin-Arginin (ELR)-Motiv aufweisen oder nicht: ELR+ Mitglieder und ELR- Mitglieder.¹⁶⁴ Zu den ELR+ Mitgliedern gehören CXCL1 – CXCL8 und CXCL17, während die ELR- Mitglieder CXCL4, CXCL9, CXCL10 – CXCL14 und CXCL16 umfassen.¹⁶⁵⁻¹⁶⁸ CXC-Chemokinrezeptoren (CXCRs) sind G-Protein-gekoppelte und sieben-transmembrane Rezeptoren für CXC-Chemokine.^{152, 169} Die CXCR-Familie besteht aus sieben Mitgliedern: CXCR1–CXCR7. Die ELR+ CXCLs fungieren als Liganden für CXCR1 und/oder CXCR2, während die ELR- CXCLs hauptsächlich als Liganden für CXCR3, CXCR4, CXCR5, CXCR6 oder CXCR7 dienen.^{165, 169}

Es ist in mehreren Arbeiten dokumentiert, dass es im Rahmen einer HCV-Infektion zu einer Hochregulation der Expression der Chemokine CXCL1 bis CXCL3, CXCL8 bis CXCL11 sowie CXCL13 und CXCL16 kommt.^{66, 170-174} Die CXC-Liganden weisen eine Vielzahl verschiedener Funktionen auf wobei ihre biologische Wirkung über verschiedene Signalwege vermittelt werden (Abb. 6). CXCL1 und CXCL2 rekrutieren Neutrophile über den IL-17/NF- κ B-abhängigen-Signalweg und spielen eine proinflammatorische Rolle.¹⁷⁵ CXCL5 hingegen führt zu einer Rekrutierung von Neutrophilen über die Aktivierung von ERK1/2/JNK- und p38MAPK-Signalwegen, denen insgesamt eine zentrale Rolle in der Kontrolle proinflammatorischer Prozesse zukommt.¹⁴⁹ CXCL6 und die Rezeptoren CXCR1 und CXCR2 rekrutieren Sternzellen und initiieren eine pro-inflammatorische Reaktion.¹⁷⁶ Die Dysregulation von CXCL6 ist eng mit der Aktivierung von Lymphozyten, die in die Leber eindringen, im frühen Stadium der Hepatitis C-induzierten Fibrose verbunden.¹⁷⁷

CXCL8 und seine Rezeptoren CXCR1 und CXCR2 führen über die Aktivierung AKT/mTOR/STAT3-Signalwegs zur Rekrutierung von Neutrophilen und begünstigen hierüber die Unterhaltung einer Entzündungsreaktion und die hierdurch bedingte Gewebeschädigung.^{178, 179} CXCL9 unterbricht die Treg/Th17 über den p-JNK-Signalweg, was ebenfalls als pro-inflammatorisches Signal fungiert.¹⁸⁰ CXCL10 fördert die Makrophagen-Chemotaxis über den MLK3-Mechanismus und löst eine pro-inflammatorische Reaktion aus.¹⁸¹ CXCL12 und sein Rezeptor CXCR4 rekrutieren CD4+ T-Zellen bei Leberverletzungen.¹⁸² Die CXCL16/CXCR6-Achse rekrutiert hauptsächlich Makrophagen und NKT-Zellen und führt zu einer proinflammatorischen Reaktion.¹⁸³

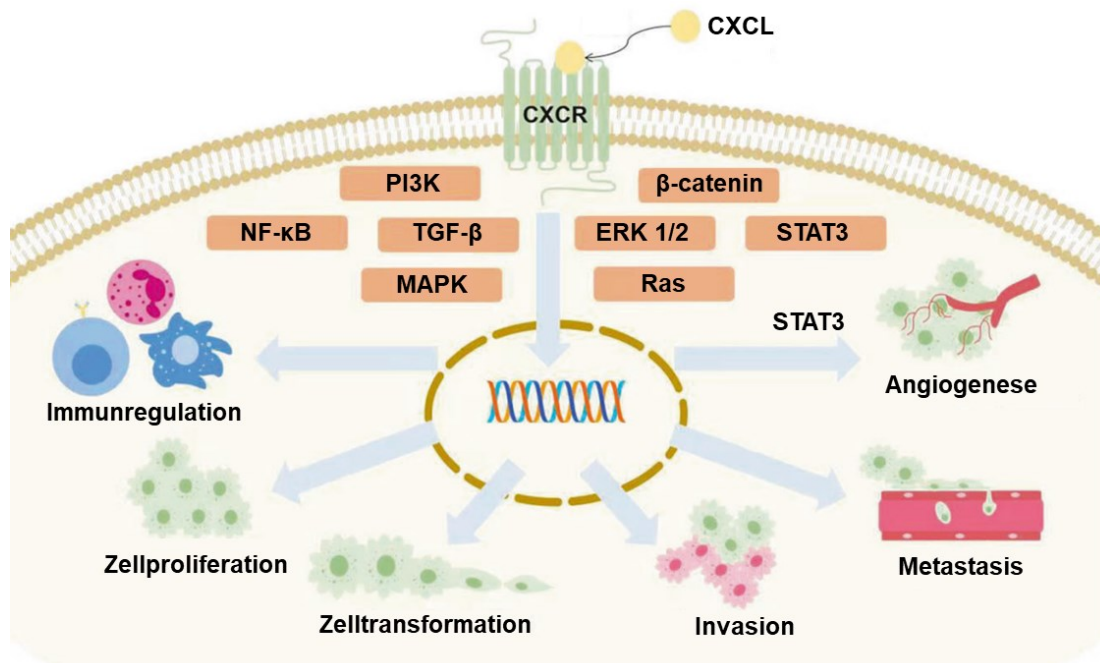


Abbildung 6: Schematische Darstellung der CXC-Liganden und deren Funktionen. Die meisten CXCL-Chemokine binden an ihre entsprechenden Rezeptoren und sind durch die Aktivierung verschiedener Signalwege (STAT3, NF-κB, Ras, MAPK, PI3K, TGF-β, und ERK1/2) am Tumorwachstum beteiligt. Letztendlich beeinflussen sie die Proliferation, Invasion, Migration und Transformation von Krebszellen sowie die Immunkontrolle und die Tumorangiogenese. (modifiziert nach Zhou *et al.*)¹⁶⁸

1.5.2 Das Chemokin CXCL8

CXCL8, auch bekannt als Interleukin-8 (IL-8), wird von Leukozyten sowie fast allen anderen Zelltypen als Antwort auf endogene oder exogene entzündungsfördernde Reize produziert und freigesetzt.¹⁸⁴ Seine Freisetzung trägt zur Rekrutierung von Neutrophilen an Entzündungsstellen, bei Infektionen oder Verletzungen bei.¹⁸⁵ CXCL8 interagiert mit den Chemokinrezeptoren CXCR1 und CXCR2 sowie mit dem atypischen Chemokinrezeptor ACKR1.¹⁸⁶

CXCR1/2 sind zwei G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs), die aus sieben Transmembrandomänen bestehen.¹⁸⁷ Beide Rezeptoren werden hauptsächlich auf Neutrophilen exprimiert, werden aber auch durch einige Interleukin 13 (IL-13) und IL-14 stimulierten Immunzellen sowie durch eine Reihe weiterer Zellen wie Fibroblasten, Astrozyten, Endothelzellen, Epithelzellen, glatten Muskelzellen, Hepatozyten und Melanozyten exprimiert.^{184, 187} CXCR1 und CXCR2 können als Monomere auf Zellmembranen auftreten, aber auch Homo- und Heterodimere miteinander bilden. Zusätzlich kann CXCR2 Heterodimere mit dem sieben-Transmembrandomänen-Rezeptor CCRL2 bilden, der typischerweise während einer Entzündung hochreguliert wird und die CXCR2-vermittelte Neutrophilenrekrutierung durch die Feinabstimmung seiner Expression und Funktion fördern kann.¹⁸⁸ Im Gegensatz dazu fördert ACKR1 die Entzündung durch Bindung, Internalisierung

und Transport von CXCL8 und anderen Chemokinen von der basolateralen zur apikalen Seite der Endothelzellen. Dies erleichtert die Immobilisierung und Präsentation für Leukozyten, was die Extravasation fördert.^{186, 189}

Die Chemokine CXCL1 bis 3 und CXCL5 bis 8 sind sieben Moleküle, die die Chemotaxis in Neutrophilen induzieren und diese aktivieren. Unter diesen ist CXCL8 das am wirksamsten und häufig am meisten produzierte Protein. Darüber hinaus fördert CXCL8, wie alle ELR+ Chemokine, die Bildung neuer Blutgefäße (Angiogenese).¹⁶⁶ Auf diese Weise unterstützt CXCL8 die Gewebereparatur, die Wiederherstellung des Blutflusses nach Organtransplantation und die Heilung von Wunden. Die Produktion von CXCL8 unterstützt zunächst die Rekrutierung und Migration von Neutrophilen in den Wundbereich, um Krankheitserreger zu bekämpfen und Zelltrümmer zu beseitigen. Im Weiteren fördert CXCL8 die Angiogenese, indem es die Wanderung und Vermehrung von CXCR2-exprimierenden neovaskularisierenden Endothelzellen stimuliert, die neue Blutgefäße bilden. Schließlich unterstützt CXCL8 im Bereich der Haut die Wiederherstellung des Epithelgewebes, indem es die Vermehrung von Keratinozyten anregt.^{186, 190}

Die Aktivierung von CXCR1/CXCR2 auf Neutrophilen ist mit G-Protein- und β -Arrestin-vermittelten Signaltransduktionskaskaden verbunden (Abb. 7). Die G-Protein-vermittelte Signalübertragung beginnt mit der Bindung von CXCL8 an den Rezeptor, was eine Konformationsänderung auslöst.¹⁸⁶ Dies führt zum Austausch von Guanosindiphosphat gegen Guanosintriphosphat, was die Dissoziation der $G\beta\gamma$ -Untereinheit von der $G\alpha$ -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins bewirkt. Bei der CXCR1- und CXCR2-vermittelten Signalübertragung handelt es sich in der Regel um $G\alpha$ vom hemmenden G_{i1} -Typ.¹⁹¹ G_{i1} inhibiert die Funktion der Adenylzyklase und senkt die Konzentration von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP). Die $G\beta\gamma$ -Untereinheit aktiviert die Phospholipase $C\beta 2$ ($PLC\beta 2$), welche die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2) zu Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP3) und Diacylglycerin (DAG) initiiert.¹⁹² Dadurch wird Ca^{2+} aus dem endoplasmatischen Retikulum in das Zytosol freigesetzt und Ca^{2+} -empfindliche Proteinkinasen wie die Proteinkinase C (PKC) aktiviert, die für die Auslösung der neutrophilen Chemotaxis entscheidend ist. Darüber hinaus wird die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) γ durch die $G\beta\gamma$ -Untereinheit aktiviert, die wiederum PIP2 in Phosphatidylinositol-(3,4,5)-Trisphosphat (PIP3) umwandelt, was zu einer nachgeschalteten Aktivierung der GTPase Rac, der Phosphokinase B (PKB oder Akt) und der extrazellulär signalregulierten Kinasen (ERK1/2) führt.¹⁸⁶ Diese G-Protein-vermittelten Signalwege induzieren schließlich neutrophile Funktionen wie Aktinpolymerisation (die für die Transmigration von Neutrophilen notwendig ist), Hochregulierung und Aktivierung von Adhäsionsmolekülen, Chemotaxis, Phagozytose, Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), Degranulation und Bildung neutrophiler extrazellulärer Fallen (NETs).^{186, 193-195}

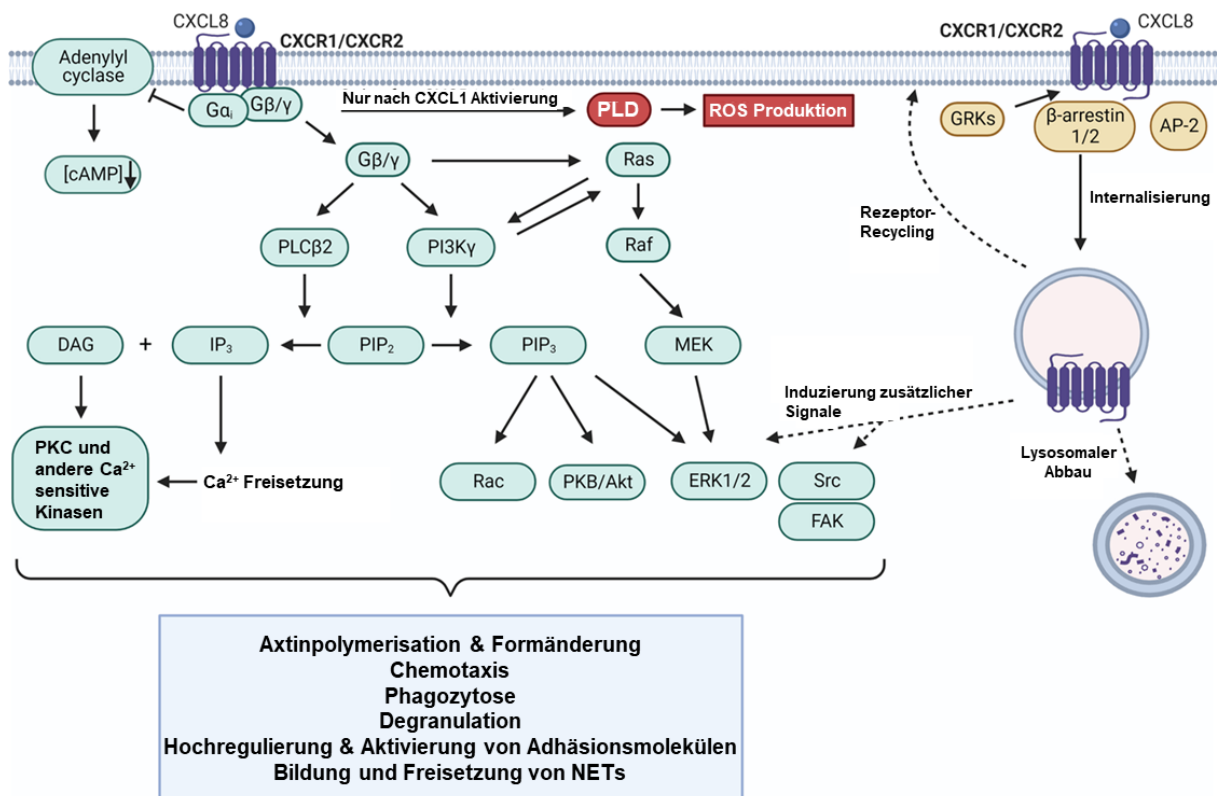


Abbildung 7: Schematische Darstellung der durch CXCL8 induzierten Signalwege. Die Bindung von CXCL8 an CXCR1 und CXCR2 auf Neutrophilen aktiviert G-Protein- und β -Arrestin-vermittelte Signalwege. Die G-Protein-vermittelte Signalübertragung initiiert MAPK-, PLC- und PI3K-Signalpfade, die zu neutrophiler Chemotaxis und Effektorfunktionen führen. Des Weiteren führt die Bindung von CXCL8 an CXCR1/CXCR2 zur Desensibilisierung der G-Protein-vermittelten Signalübertragung durch die Internalisierung der Rezeptoren, hauptsächlich vermittelt durch β -Arrestine. Diese internalisierten Rezeptoren können daraufhin abgebaut, zur Membran zurückgeführt oder von MAPK- oder Tyrosinkinase-Signalen reaktiviert werden. (modifiziert nach Cambier *et al.*)¹⁸⁶

1.5.3 Regulation der CXCL8 Expression

Die Produktion, Freisetzung und Aktivität von CXCL8 und anderen Chemokinen werden auf mehreren Ebenen streng reguliert.¹⁸⁶ Diese Regulation ist notwendig, um eine übermäßige oder unangemessene Anziehung von Leukozyten zu verhindern.¹⁹⁶ Nach Rezeptoraktivierung durch Stimuli wie IL-1, EGF oder Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) wird die Expression des CXCL8-Gens als Antwort auf einen Entzündungsauslöser lokal hochreguliert (Abb. 8A). Die Transkription wird daraufhin durch die koordinierte Interaktion verschiedener Signaltransduktionswege eingeleitet.^{195, 197-200} Zu diesen gehören die Signalwege die zur Aktivierung von NF- κ B führen sowie JNK1-abhängige Signale, welche zur Aktivierung des NF- κ B- und des AP-1 Komplexes führen.²⁰¹

Darüber hinaus können auch die PI3K/Akt- und ERK-Signalwege die Aktivierung von NF- κ B bzw. AP-1 vermitteln (Abb. 8B).²⁰² Die Initiierung des Transkriptionsprozesses des CXCL8-Gens ist kontext- und Zelltyp-abhängig und unter anderem ist eine Aufhebung der Repression des CXCL8-Promotors erforderlich. Zum einen ist die Hemmung der transkriptionellen Aktivierung des CXCL8-Promotors durch die negativen regulatorischen Elemente (NRE) und

deren Assoziation mit NF- κ B sowie dem NF- κ B-repressing factor (NKRF) beschrieben.²⁰³ Andererseits ist beschrieben, dass Octamer1 (Oct1) an der Promotorsequenz von CXCL8 durch den Transkriptionsfaktor CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) ersetzt werden kann. Nach der Bindung von C/EBP an den Promotor kann dieser den Co-Aktivatoren CREB-binding protein (CBP)/p300 rekrutieren, was zu einer Histon-Hyperacetylierung und einer Umstrukturierung des Chromatins führt. Diese Umstrukturierung ermöglichen es den Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- κ B, den Transkriptionsprozess des CXCL8-Gens zu aktivieren.²⁰⁴ Es ist denkbar, dass diese Faktoren und Signalmechanismen auch bei der Aktivierung des CXCL8-Promotors durch IL-1 β oder EGF in Hepatozyten eine Rolle spielen, wobei dieser Aspekt bislang nicht im Detail untersucht wurde.

Ein weiterer Signalweg, der durch proinflammatorische Stimuli aktiviert wird, ist der p38-MAPK-Weg, welcher die MAP-Kinase-aktivierte Proteinkinase 2 (MK2) stimuliert. Dieser Prozess ist entscheidend für die Stabilisierung der instabilen CXCL8-mRNA und trägt zur Hochregulierung der CXCL8-Produktion bei (Abb. 8C).²⁰⁵ Im Gegensatz dazu haben endogene entzündungshemmende Zytokine wie IL-10 und der transformierende Wachstumsfaktor β (TGF- β) die Fähigkeit, die Transkription von proinflammatorischen Chemokin-Genen zu hemmen. IL-10 inhibiert beispielsweise die NF- κ B-Aktivierung in menschlichen Monozyten und unterbindet dadurch die durch LPS stimulierte Produktion von CXCL8.²⁰⁶ Nach dem Kernexport und der ribosomalen Translation der CXCL8-mRNA wird das CXCL8-Protein zunächst intrazellulär im Golgi-Apparat lokalisiert und von dort aus über den konstitutiven Sekretionsweg sezerniert.

Interessanterweise kann CXCL8 nach einer längeren Stimulation (über Stunden) mit proinflammatorischen Mediatoren wie IL-1 β in intrazellulären sekretorischen Speichergranula akkumulieren. Nach einer Phase unterbrochener Stimulation kann eine erneute Stimulierung, beispielsweise durch Histamin, Thrombin oder Fibrin, eine schnelle Freisetzung von CXCL8 bewirken, ohne dass eine de-novo-Proteinsynthese erforderlich ist. Somit kann die Speicherung von CXCL8 als "Gedächtnis" der Endothelzellen für einen vorangegangenen entzündlichen Reiz dienen.^{186, 207, 208}

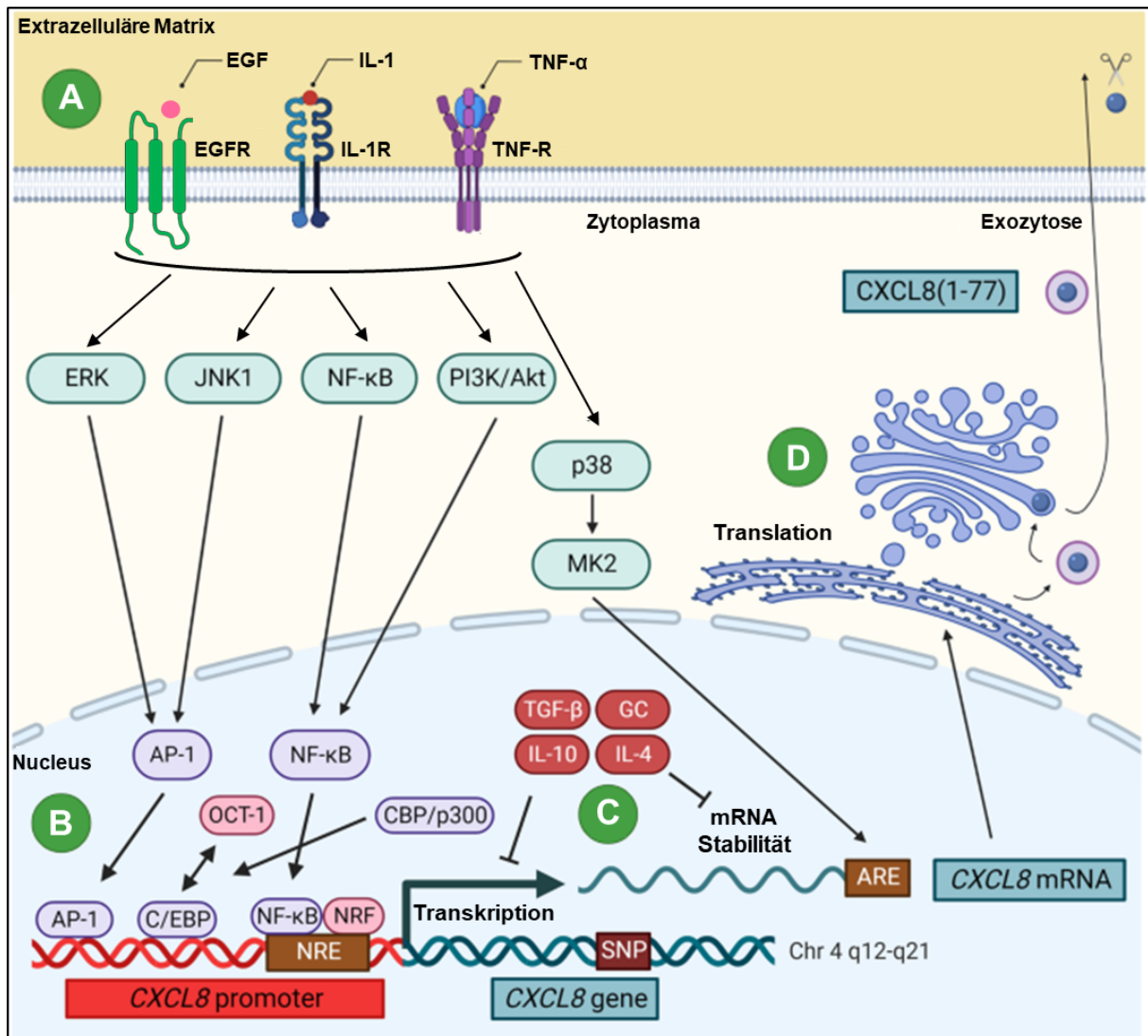


Abbildung 8: Schematische Darstellung der CXCL8-Produktion nach Stimulation. (A) Als Reaktion auf einen Entzündungsauslöser induzieren pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1, EGF oder TNF- α durch Stimulation ihrer Rezeptoren die Produktion von CXCL8. Dies löst nachgeschaltete Signalwege aus, die zur Aktivierung von NF- κ B und des AP-1 Komplexes führen, die sich in den Zellkern verlagern und die Transkription des CXCL8-Gens sowie die Produktion und Freisetzung von CXCL8 einleiten. (B) Die Transkription des CXCL8-Gens findet erst nach der Aufhebung der Repression von Oct1 und NF- κ B am CXCL8-Genpromotor statt. (C) Entzündungshemmende Stimuli wie IL-10 und TGF- β können diesen Transkriptionsprozess blockieren. (D) Nach der mRNA-Translation lokalisiert sich CXCL8 intrazellulär im Golgi-Apparat, von wo aus es sezerniert wird (konstitutiver Sekretionsweg). (modifiziert nach Cambier *et al.*)¹⁸⁶

1.5.4 Zusammenhang zwischen CXCR2 Liganden und dem Hepatitis C Virus

Wie zuvor erläutert, spielen Chemokine eine entscheidende Rolle bei der Chemotaxis von Immunzellen. Die Beeinflussung der Expression von Chemokinen oder den zugehörigen Rezeptoren würde HCV die Möglichkeit eröffnen, die Entzündungs- und Immunantwort des Wirts in einer für die eigene Replikation und damit Persistenz günstigen Weise zu beeinflussen. Darüber hinaus können die Virus bedingten Veränderungen im Entzündungsgeschehen letztlich jedoch auch dazu beitragen eine chronische Entzündungsreaktion und hierdurch bedingte Gewebeschädigung zu unterhalten, was im weiteren Verlauf zu

Komplikationen wie Leberfibrose, Zirrhose und schließlich auch Krebs führen kann.^{209, 210} Erhöhte Spiegel von CXCL1, CXCL2, CXCL3 und CXCL8 wurden bereits bei verschiedenen Tumorarten und Virusinfektionen beobachtet.²¹¹ In den Seren von HCV-infizierten Patienten sind die Protein-Konzentrationen von CXCL8 im Vergleich zu denen von gesunden Kontrollpersonen ebenfalls erhöht, wobei diese Hochregulierung mit dem Schweregrad der Leberentzündung korreliert.²¹⁰ Zusätzlich zu dieser Beobachtung ist jedoch auch beschrieben, dass sowohl die CXCL8-mRNA- als auch die CXCL8-Proteinspiegel in Huh7-Zellen hochreguliert wird, wenn diese mit den NS-Proteinen NS4A, NS4B und NS5A von HCV transfiziert werden.^{212, 213} Dieser Sachverhalt legt nahe, dass der Virus bzw. virale Bestandteile auch in der Wirtszelle selbst die Expression von CXCL8 zu induzieren vermag und dass dies möglicherweise auch zu den erhöhten CXCL8 Konzentrationen im Serum chronisch infizierter Patienten beitragen kann. Darüber hinaus legen Arbeiten aus den späten 1990er Jahren nahe, dass verschiedene HCV-kodierte Proteine mit verschiedenen zellulären Signalwegen interferieren, denen letztlich durch Typ I Interferone induzierte antivirale Effektor Funktionen zukommen und die damit eine Art erste Linie in der antiviralen Wirtsantwort darstellen. So konnte unter anderem belegt werden, dass sowohl das virale Protein NS5A als auch E2 die Proteinkinase R hemmen und hierdurch ein zentrales antivirales Effektormolekül außer Kraft setzen. Ferner legen weitere Arbeiten nahe, dass virale Proteine wie das Core-Protein mit der intrazellulären Signalübertragung von Typ-I-Interferonen interferieren und hierdurch dazu beitragen, dass die Induktion von Interferon-stimulierten Genen (ISGs) unterbunden wird.^{214, 215} Weiterführende Untersuchungen legen ferner nahe, dass NS5A die Expression von CXCL8-mRNA sowie die CXCL8-Proteinspiegel erhöht und dass dies zu einer partiellen Hemmung der durch IFN α -induzierten antiviralen Reaktion in Zellen führt.²¹⁶ Hiermit übereinstimmend korreliert die Serumkonzentration von CXCL8 bei chronisch HCV infizierten Patienten negativ mit dem Ansprechen auf eine IFN-Therapie.²¹⁷ Die Transkription von CXCL8 wird nicht nur als Reaktion auf NS4A, NS4B und NS5A induziert, sondern auch in NS2-transfizierten HepG2-Zellen aktiviert, was wiederum über NF- κ B vermittelt wird. Nachdem die Bindungsstelle des CXCL8-Promotors für NF- κ B durch Mutagenese beseitigt wurde, ist keine erhöhte CXCL8-Transkription mehr in NS2-transfizierten Zellen zu beobachten.²¹⁸ In chronischen HCV-Infektionsmodellen wie dem subgenomischen Replikon-Zellsystem (siehe Kapitel 1.1.4) korreliert die Hochregulierung des CXCL8-Proteins interessanterweise direkt bzw. positiv mit der HCV-Replikation. Die HCV-Replikation wird reduziert, wenn CXCL8 entfernt wird. Im Gegensatz dazu wirkt sich die CXCL8-Produktion in einem akuten Infektionsmodell hemmend auf die HCV-Replikation von Viren mit geringer Replikationskapazität aus. Diese Daten belegen sowohl pro- als auch antivirale Wirkungen von CXCL8, abhängig von verschiedenen Parametern wie der akuten oder chronischen Infektion oder der Replikationsrate des Virus.²¹⁹ Neueste Forschungen deuten darauf hin, dass

HCV-bedingte Veränderungen im Entzündungsmilieu auch nach der Eliminierung des HCV fortbestehen können. Insbesondere bleiben die Serumspiegel von CXCL8 auch nach erfolgreicher Eradikation des Virus im Vergleich zu gesunden Kontrollgruppen weiterhin erhöht.^{220, 221}

1.6 Die Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF-κB

Während einer Hepatitis C Infektion erfolgt die Aktivierung mehrerer Signalwege, welche wie beschrieben unter anderem zu einer Modulation der transkriptionellen Expression verschiedener Chemokine führen. Besonders bedeutsam sind dabei der AP-1 Komplex und NF-κB. AP-1 reguliert eine Vielzahl von zellulären Prozessen, insbesondere Proliferation, Differenzierung und Apoptose.^{130, 131} AP-1 ist ein dimerer Komplex, der aus Mitgliedern der Jun- (c-Jun, JunB und JunD), Fos- (c-Fos, FosB, Fra-1 und Fra-2), ATF- (ATF-2 bis ATF-7, BATF1 bis BATF-3 und JDP2) oder MAF besteht.^{143, 144, 222} Alle aktiven AP-1 Mitglieder weisen ein gemeinsames Merkmal auf: den Besitz von basischen Leucin-Zipper-Domänen (bZIP). Die Leucin-Zipper-Domäne und die benachbarte basische Domäne bilden zusammen eine flexible und einzigartige "scherenförmige" alpha-helicale Struktur.²²³ Die bZIP-Domänen sind für die Dimerisierung und DNA-Bindung unerlässlich, da sie verschiedene Response-Elemente in genomischen Regulationsregionen erkennen.²²² Jun-Proteine können sowohl homo- als auch hetero-dimerisieren, während Fos-Proteine ausschließlich Heterodimere bilden können. Insbesondere bei der Bildung von Jun/Fos-Heterodimeren weisen eine erhöhte Stabilität und eine gesteigerte Transkriptionsaktivität auf.^{224, 225} Im Allgemeinen können die Transkriptionsfaktoren (TF) von AP-1 jedoch in "starke Aktivatoren" der Gentranskription (z. B. c-Fos, c-Jun) und "schwache Transaktivatoren" (z. B. Fra-1, JunD) eingeteilt werden.^{226, 227} Die Mitglieder der AP-1 TF-Familie werden einer präzisen Regulation auf transkriptioneller, translationaler und posttranslationaler Ebene unterzogen, welche zelltyp- und kontextabhängig ist.²²² Eine umfassende Analyse des c-Jun-Promotors auf transkriptioneller Ebene belegte eine hochaffine Bindungsstelle für AP-1. Diese Beobachtung legt eine regulatorische Rückkopplungsschleife nahe, in der AP-1 den c-JUN-Promotor aktiviert, seine Aktivität verlängert und seine Expression verstärkt, was sich auf die gesamte Genexpression auswirkt.²²⁸ Neben den Mechanismen zur Transkriptions- und Translationregulation unterliegen die Transkriptionsfaktoren von AP-1 einer Vielzahl von posttranslationalen Modifikationen, die ihre Aktivität, Stabilität, Lokalisierung und Interaktionseigenschaften beeinflussen.²²² Externe Stimuli wie IL-1β und EGF beeinflussen die Phosphorylierung und die verschiedenen Expressionsmuster von AP-1 Proteinen. Beispielsweise regulieren JNKs die Aktivierung von c-Jun, die durch IL-1β oder EGF induziert

werden.²²⁹⁻²³² Durch die JNK induzierte Aktivierung des AP-1 Komplexes kommt es zu einer gesteigerten Expression von CXCL1, CXCL2, CXCL3 und CXCL8.^{186, 233-235} Eine Infektion mit dem HCV aktiviert den JNK-Signalweg und führt damit zu einer gesteigerten Expression von Komponenten des AP-1 Komplexes.²³⁶ Diese Aktivierung trägt zur Entwicklung von Lebererkrankungen bei, einschließlich Stoffwechselstörungen, Steatose, Leberzirrhose und Leberzellkarzinom.²³⁷ Die Hemmung von c-Jun kann die durch HCV-Core induzierte und geförderte Leber-Onkogenese aufheben.^{62, 238} Des Weiteren induziert HCV die Expression von c-Fos. Die HCV-Replikation ist c-Fos-abhängig und nimmt deutlich zu mit einer gesteigerten Expression von c-Fos.²³⁹ Der AP-1 Komplex, insbesondere c-Jun und c-Fos, spielen somit eine entscheidende Rolle für das HCV und dessen Pathogenese. NF- κ B ist eine Familie von induzierbaren TFs, die eine Vielzahl von Genen regulieren, die an verschiedenen Prozessen der Immun- und Entzündungsreaktion beteiligt sind.¹³² Diese Familie umfasst fünf strukturell verwandte Mitglieder, darunter NF- κ B1 (p50), NF- κ B2 (p52), RelA (p65), RelB und c-Rel. Sie vermitteln die Transkription von Zielgenen durch Bindung an ein spezifisches DNA-Element, den κ B-Enhancer, entweder als verschiedene Hetero- oder Homodimere.²⁴⁰ An der Aktivierung von NF- κ B sind zwei wichtige Signalwege beteiligt: der kanonische und der nicht-kanonische Weg. Trotz ihrer unterschiedlichen Signalmechanismen sind beide Wege für die Regulation von Immun- und Entzündungsreaktionen von Bedeutung.^{241, 242} Der kanonische NF- κ B-Signalweg reagiert auf verschiedene Stimuli, einschließlich Liganden verschiedener Zytokin Rezeptoren, PRRs, Mitglieder der TNF-Rezeptor-Superfamilie sowie T-Zell-Rezeptoren und B-Zell-Rezeptoren.²⁴³ Der primäre Mechanismus für die Aktivierung des kanonischen NF- κ B-Weges ist der induzierte Abbau von I κ B α .^{132, 244} Im Gegensatz zum kanonischen NF- κ B-Signalweg reagiert der nicht-kanonische NF- κ B-Signalweg selektiv auf eine spezifische Gruppe von Stimuli, einschließlich Liganden einer Untergruppe von Mitgliedern der TNFR-Superfamilie.^{245, 246} Des Weiteren ist die Aktivierung des nicht-kanonischen NF- κ B-Weges nicht mit dem Abbau von I κ B α verbunden, sondern beruht auf der Verarbeitung des NF- κ B2-Vorläuferproteins p100.^{241, 245} Darüber hinaus kann die NF- κ B-induzierte Expression spezifischer Zielgene durch NKRF inhibiert werden. NKRF bindet dabei an eine überlappende Sequenz im Promotor, wodurch die Bindung von NF- κ B und die daraus resultierende aktivierende Wirkung abnimmt.²⁴⁷ Funktionell beteiligt sich der kanonische NF- κ B an fast allen Aspekten der Immunreaktion, während sich der nicht-kanonische NF- κ B-Signalweg als ergänzende Signalachse entwickelt hat. Diese arbeitet mit dem kanonischen NF- κ B-Signalweg zusammen, um bestimmte Funktionen des adaptiven Immunsystems zu regulieren.²⁴⁶ Eine gut bekannte Funktion von NF- κ B besteht in der Regulation von Entzündungsreaktionen. Neben der Induktion verschiedener entzündungsfördernder Gene in angeborenen Immunzellen reguliert NF- κ B auch die Aktivierung, Differenzierung und Effektor Funktion entzündlicher T-Zellen.^{248, 249} Wie bereits erwähnt, spielen bei Entzündungsreaktionen Zytokine wie IL-1 β

und Wachstumsfaktoren wie EGF eine entscheidende Rolle. Frühere Studien haben demonstriert, dass IL-1 β die Expression von NF- κ B-Zielgenen durch beschleunigte Degradation von I κ B α und Unterdrückung der Rekonstitution der I κ B α -Proteinspiegel erhöhen kann.¹³⁹ Darüber hinaus induziert EGF den NF- κ B-Signalweg durch Tyrosinphosphorylierung von I κ B α . Die Phosphorylierung von I κ B α ist essenziell für die Regulation der Aktivität von NF- κ B in der Zelle.^{250, 251} Vorarbeiten aus der Arbeitsgruppe konnten belegen, dass die durch HCV vermittelte Hochregulierung der CXCR2-Ligandenexpression und die verstärkte IL-1 β - und EGF-induzierbare Expression das Vorhandensein von NF- κ B p65 erfordert.^{66, 252}

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Das Hepatitis C Virus geht in über 70% der Fälle in eine chronische Infektion über, die trotz anhaltender Virusreplikation zumeist über mehrere Jahrzehnte hinweg oligo-symptomatisch verläuft. Dies legt nahe, dass HCV im Laufe der Koevolution Mechanismen entwickelt hat, die es ihm ermöglichen die antivirale Immunantwort des Wirts effizient zu unterlaufen und auch mit den Mechanismen zu interferieren, über die die Entzündungsreaktion kontrolliert werden. Insbesondere Untersuchungen am Model transgener Tiere legen hierbei nahe, dass HCV hierbei Mechanismen aktiviert, die über eine anhaltende Erhöhung von Mediatoren wie TNF- α letztlich protektive Effekte für den Wirtsorganismus evozieren. Diese Beobachtungen legen nahe, dass HCV das interzelluläre Kommunikationsverhalten der Wirtszelle beeinflusst und hierdurch indirekt die Zusammensetzung wie auch den Aktivierungszustand von Immunzellpopulationen. Im Rahmen dieser Arbeit sollten folgende Aspekte detaillierter untersucht werden:

1. Untersuchung von Veränderungen der Konzentration bestimmter interzellulärer Kommunikationssignale bei chronisch HCV infizierten Patienten sowie gesunden Kontrollprobanden und Patienten mit erfolgreicher Viruseradikation.
2. Beeinflussung der durch inflammatorische Faktoren und Wachstumsfaktoren induzierten Expression von Kommunikationssignalen durch HCV in der Wirtszelle.
3. Untersuchung der molekularen Mechanismen, über die HCV in der Wirtszelle die basale wie auch induzierbare Expression von CXCR2 Liganden beeinflusst mit einem besonderen Fokus auf der Interferenz von HCV mit der durch die Transkriptionskomplexe NF- κ B und AP-1 vermittelten intrazellulären Signalübertragung.

2. Material und Methoden

2.1 Laborbedarf

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller	Katalog Nummer
2-propanol	VWR (Radnor, Pennsylvania, USA)	#20922.320
3-Amino-9-ethylcarbazol	Merck (Darmstadt, Deutschland)	#A5754-10G
5x siRNA Puffer	Dharmacon (Colorado, USA)	#B-002000-UB-100
6-Aminohexansäure	Merck (Darmstadt, Deutschland)	#800145
Acrylamid	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)	#A0951
Adenosintriphosphat (ATP)	Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)	#A1852
Agar	Biozym (Oldendorf, Deutschland)	#840004
Ammonium Persulfat	Serva (Heidelberg, Deutschland)	#13375.05
Ampicillin	Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)	#A1593
AP1-Inhibitors SR 11302	Santa Cruz, Texas, USA	#sc-204295
Bradford Protein Assay	BioRad (Hercules, California, USA)	#5000006
Bromphenolblau Natriumsalz	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)	#A512.1
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck (Darmstadt, Deutschland)	#10043-52-4
DharmaFECT 4	Dharmacon (Colorado, USA)	#T-2004-03
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)	#D2650-5X5ML
DNase	Qiagen (Hilden, Deutschland)	#79254
DTT	Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)	#D0632-1G
Dulbeccos phosphatgepufferte Kochsalzlösung (DPBS)	PAN BIOTECH (Aidenbach, Deutschland)	#P04-36500
EDTA	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)	#KK75.1
Essigsäure	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)	#6755.1
Ethanol	VWR (Radnor, Pennsylvania, USA)	#20821.330
Ethidiumbromid	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)	#7870.1
Fetales Kälberserum (FKS)	Thermo Fisher (Waltham, Massachusetts, USA)	#10270-106
Geneticin (G-418)	Thermo Fisher (Waltham, Massachusetts, USA)	#10131-027
Glucose	Merck (Darmstadt, Deutschland)	#346351
Glutathion	Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)	#Y0000517
Glycerin	Merck (Darmstadt, Deutschland)	#104169
Gotaq qPCR and RT-qPCR	Promega (Madison, Wisconsin, USA)	#A6001
Hefeextrakt	Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)	#Y1625
Interleukin-1 β , human	Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)	#11457756001
Kaliumchlorid (KCL)	Merck (Darmstadt, Deutschland)	#104936
Kaliumdihydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)	#7758-11-4

Bezeichnung	Hersteller	Katalog Nummer
Kaliumhydroxid (KOH)	Merck (Darmstadt, Deutschland)	#1310-58-3
Kaliumphosphat (KH ₂ PO ₄)	Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)	#7778-77-0
L-Glutamine (200mM)	Thermo Fisher (Waltham, Massachusetts, USA)	#25030032
Magnesiumchlorid (Mg ₂ Cl)	Merck (Darmstadt, Deutschland)	#7786-30-3
MEM Nicht-essentielle Aminosäuren Lösung (NEAA)	Thermo Fisher (Waltham, Massachusetts, USA)	#11140-035
Methanol	Merck (Darmstadt, Deutschland)	#106009
MIuI	Thermo Fisher (Waltham, Massachusetts, USA)	#ER0561
Natriumacetat (C ₂ H ₃ NaO ₂)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)	#6773.2
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)	#3957.1
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck (Darmstadt, Deutschland)	#72068
NN-Dimethylformamid (DMF)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)	#6251.1
NotI	Thermo Fisher (Waltham, Massachusetts, USA)	#ER0591
OptiMEM	Thermo Fisher (Waltham, Massachusetts, USA)	#31985070
Penicillin-Streptomycin	Thermo Fisher (Waltham, Massachusetts, USA)	#15140122
PMSF Protease Inhibitor	Thermo Fisher (Waltham, Massachusetts, USA)	#36978
Polyethylenglykol (PEG) 8000	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)	#0263.1
Rekombinantes humanes EGF	Roche (Basel, Switzerland)	#11376454001
Rekombinantes humanes Interleukin-1 β	Roche (Basel, Switzerland)	#11457756001
Rinderserumalbumin (BSA)	Thermo Fisher (Waltham, Massachusetts, USA)	#15561020
RNase-freies Wasser	Dharmacon (Colorado, USA)	#B-003000-WB-100
RNasin® Ribonuclease Inhibitor	Promega (Madison, Wisconsin, USA)	#N2511
siGENOME Non-Targeting-siRNA #1	Dharmacon (Colorado, USA)	#D-001210-01-05
siGENOME Non-Targeting-siRNA #3	Dharmacon (Colorado, USA)	#D-001210-03-05
siGENOME Non-Targeting-siRNA #5	Dharmacon (Colorado, USA)	#D-001210-05-05
siGENOME SMARTpool Human ATF3 siRNA	Dharmacon (Colorado, USA)	#M-008663-01-0005
siGENOME SMARTpool Human c-Fos siRNA	Dharmacon (Colorado, USA)	#M-003265-01-0005
siGENOME SMARTpool Human c-Jun siRNA	Dharmacon (Colorado, USA)	#M-003268-03-0005
siGENOME SMARTpool Human c-Myb siRNA	Dharmacon (Colorado, USA)	#M-003910-00-0005
siGENOME SMARTpool Human Fra1 siRNA	Dharmacon (Colorado, USA)	#M-004341-04-0005
siGENOME SMARTpool Human NKRF siRNA	Dharmacon (Colorado, USA)	#M-031862-01-0005
siGENOME SMARTpool Human POU2F1 siRNA	Dharmacon (Colorado, USA)	#M-019689-00-0005

Bezeichnung	Hersteller	Katalog Nummer
siGENOME SMARTpool Human STAT1 siRNA	Dharmacon (Colorado, USA)	#M-003543-01-0005
siGENOME SMARTpool Human YY1 siRNA	Dharmacon (Colorado, USA)	#M-011796-02-0005
Sodium-Dodecyl-Sulfat (SDS)	Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)	#151-21-3
Spermidine	Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)	#56766
T7 RNA Polymerase	Promega (Madison, Wisconsin, USA)	#P2075
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)	#9281
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	VWR (Radnor, Pennsylvania, USA)	#103156X
Triton X-100	Merck (Darmstadt, Deutschland)	#9036-19-5
Trypanblau -Lösung	Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)	#T8154-20ML
Trypsin/Ethylendiaminessigsäure (EDTA)	Cytogen (Sinn-Fleisbach, Deutschland)	#10-023
Tween 20	Merck (Darmstadt, Deutschland)	#8221840050

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller	Katalog Nummer
0,2 µm Filter	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)	#83.1826.001
0,45 µm Filter	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)	#83.1826
10 cm Zellkulturschalen	Falcon (Heidelberg, Deutschland)	#353003
12-well Zellkulturplatten	Greiner (Solingen, Deutschland)	#657160
15 cm Zellkulturschalen	Falcon (Heidelberg, Deutschland)	#353037
170 cm ² große Zellkulturflaschen	Greiner (Solingen, Deutschland)	#660175
6 cm Zellkulturschalen	Falcon (Heidelberg, Deutschland)	#353004
6-well Zellkulturplatten	Greiner (Solingen, Deutschland)	#665180
75 cm ² große Zellkulturflaschen	Greiner (Solingen, Deutschland)	#658 170
96-well Zellkulturplatten	Greiner (Solingen, Deutschland)	#650101
BD Vacutainer® Röhrchen	BD (Franklin Lakes, USA)	#BD-25324
Eppendorf tubes	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)	#0030120086
Falcon Zentrifugenröhrchen	Falcon (Heidelberg, Deutschland)	#352070
Gene Pulser Cuvette	BioRad (Hercules, California, USA)	#1652081
MicroAMP Optical 96-well Plate	Thermo Fisher (Waltham, Massachusetts, USA)	#N8010560
Pipetten	Greiner (Solingen, Deutschland)	#607107
Zellschaber	Falcon (Heidelberg, Deutschland)	#353086

2.1.3 Geräte

Tabelle 3: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Feinwaage	Sartorius
Geldokumentationssystem GelStick Imager	Intas
Geldokumentationssystem ImageQuant 800	Cytiva
Gene Pulser Xcell ShockPod	BioRad
Heiz-Thermomixer	Eppendorf
Homoginator	Bandelin
Maxwell	Promega
Mikroskop: Vert. A1	Zeiss
NanoPotometer NP80	Implen
pH-Meter: Seven Compact	Mettler Toledo
Power Pac 300	BioRad
Präzisionswaage	Sartorius
Protein Electrophorese System	BioRad
Schüttler	Heidolph
Thermocycler T3000	Biometra
Ultrospec 2100 pro	Amersham Biosciences
ViiA 7 Real-Time PCR System	Applied Biosystems
Wasserbad	Julabo
Zentrifugen	
Eppendorf 5424R	Eppendorf
Rotor: Fixed Angle F45-24-11	Eppendorf
Eppendorf 5810 R	Eppendorf
Rotor: A-4-81	Eppendorf
Beckman Coulter X-15R	Beckmann
Rotor: fixed angle FX6100	Beckmann
Thermo WX100	Thermofisher
Rotor: Surespin 630	Thermofisher

2.1.4 Datenverarbeitungsprogramme

Tabelle 4: Verwendete Programme

Programm	Hersteller
Clone Manager 12	Sci Ed
Endnote 20	Thomson
ImageJ	National Institutes of Health (NIH)
ImageQuant™	Cytiva
Magellan	Tecan
Microsoft Office LTSC Professional Plus 2012	Microsoft
Primer Blast	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primerblast/
Prism 10	GraphPad
Promo	ALLGEN
QuantStudio Software v1.6.1	Thermo Fisher
ZEN	Zeiss

2.1.5 Puffer und Lösungen

Tabelle 5: Verwendete Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
4xLämmli Puffer	Tris/HCL pH 6,8 250 mM Glycerol 40 % Bromphenolblau 5 % β -Mercaptoethanol 8 %
5xRRL Puffer	Hepes (pH 7,5) 400 mM $MgCl_2$ 60 mM Spermidine 10 mM DTT 200 mM
Anodenpuffer I	TRIS 0,3 M Methanol 200 ml ad. 1000 ml Aqua dest.
Anodenpuffer II	TRIS 0,025 M Methanol 200 ml ad. 1000 ml Aqua dest.
Carbazol	3-Amino-9-ethylcarbazol 0,4 g NN-Dimethylformamid 125 ml
Carbazol-Substrat-Lösung	NaOAc 5 ml Carbazol 1,5 ml H_2O_2 20 μ l
Cytomix	KCl 120 mM $CaCl_2$ 0,15 mM KPi* (pH 7,6) 10 mM Hepes (pH 7,6) 25 mM EGTA 2 mM $MgCl_2$ 5 mM ad. 1000 ml Aqua dest.
Elektrophorese Puffer	TRIS 0,025 M Glycin 0,192 M SDS 0,1 %
Kaliumphosphatpuffer (KPi) pH 7,6	K_2HPO_4 1 M KH_2PO_4 1 M ad. 1000 ml Aqua dest., autoklavieren
Kathodenpuffer	6-Aminocaprinsäure 0,04 M Methanol 200 ml ad. 1000 ml Aqua dest.
NaOAc	Natriumacetat 0,5 M Essigsäure 0,5 M ad. 1000 ml Aqua dest.
TAE Puffer	TRIS 242 g EDTA 0,5 M Essigsäure 57,1 ml ad. 1000 ml Aqua dest.
TBS Puffer (pH 7,6)	TRIS 0,01 M NaCl 0,15 M

Bezeichnung	Zusammensetzung	
TBST Puffer (pH 7,6)	TRIS	0,01 M
	NaCl	0,15 M
	Tween 20	0,2 %
Triton Lyse Puffer	Triton X-100	1 %
	Glycerol	10 %
	SDS	0,2 %
	Aprotinin	5 µg/ml
	Leupeptin	5 µg/ml
	NaCl	136 mM
	β-Glycerolphosphat	50 mM
	Natrium-Pyrophosphat	20 mM
	Tris/HCl pH 7,4	20 mM
	Benzamidin	4 mM
	EDTA	2 mM
	Na ₃ VO ₄	0,2 mM

2.1.6 Antikörper

Alle verwendeten Antikörper wurden sofern nicht anders vermerkt für Western Blots verwendet.

Tabelle 6: Verwendete Primärantikörper

Zielprotein	Hersteller	Katalog #	Verdünnung	Wirt
Beta Actin	Abcam (Cambridge, UK)	ab6276	1:1000	Maus
Anti-NS3 (JFH-1) Monoclonal Clone 2E3	BioFront (Florida, USA)	HCV-2E3	1:2000	Maus
C-jun (60A8)	Cell Signaling (Massachusetts, USA)	9166	1:1000	Hase
Fra1 (D80B4)	Cell Signaling (Massachusetts, USA)	5281	1:1000	Hase
NKRF (E9G1T)	Cell Signaling (Massachusetts, USA)	63409	1:1000	Hase

Tabelle 7: Verwendete Sekundärantikörper

Antikörper	Hersteller	Katalog #	Verdünnung	Wirt
Goat-anti Mouse Alexa Flour 488	Abcam (Cambridge, UK)	ab150113	1:20000	Ziege
Goat-anti Rabbit Alexa Flour 647	Abcam (Cambridge, UK)	ab150079	1:20000	Ziege
HRP-coupled goat anti-rabbit	Abcam (Cambridge, UK)	Ab6721	1:20000	Ziege

2.1.7 Verwendete Primer für die qPCR

Tabelle 8: Verwendete Primer für die qPCR

Gen	Codiertes Protein	Sequenz
ATF3	Zyklisches AMP-abhängiger Transkriptionsfaktor ATF-3	F: 5' GAAGGAGAAGACGGAGTGCC 3' R: 5' GCTGCTTCTCGTTCTTGAGC 3'
CXCL1	C-X-C motif chemokine 1	F: 5' CTGGCGGATCCAAGCAAAT 3' R: 5' CATTCCCCTGCCTTCACAAT 3'
CXCL2	C-X-C motif chemokine 2	F: 5' CAAAGTGTGAAGGTGAAGTCC 3' R: 5' GATGCGGGGTTGAGACAAGC 3'
CXCL3	C-X-C motif chemokine 3	F: 5' TGCTTGTAGGGCATAATGCCT 3' R: 5' AGAGAAACGCTGCAGAATGGA 3'
CXCL4	C-X-C motif chemokine 4	F: 5' GTGTGTGAAGACCACCTCCC 3' R: 5' TTCCTTCCATTCTTCAGCGTG 3'
CXCL5	C-X-C motif chemokine 5	F: 5' CCACGCAAGGAGTTCATCCC 3' R: 5' ATTTCTTCCCGTTCTTCAGGG 3'
CXCL6	C-X-C motif chemokine 6	F: 5' GCTGAGAGTAAACCCCAAAACG 3' R: 5' GCTTCCCGTTCTTCAGGGAGG 3'
CXCL7	C-X-C motif chemokine 7	F: 5' AAGTGATCGGGAAAGGAACCC 3' R: 5' ATTCTGGGAGCATCTGGGTC 3'
CXCL8	C-X-C motif chemokine 8	F: 5' AGAAGTTTTTGAAGAGGGCTGAGA 3' R: 5' AGACCCACACAATACATGAAGTG 3'
FOS	Transkriptionsfaktor AP-1 Untereinheit c-Fos	F: 5' TGTGAAGACCATGACAGGAGG 3' R: 5' CCTTCGGATTCTCCTTTTCTCT 3'
Fra1	Fos-verwandtes Antigen 1	F: 5' TAAGGCGCGAGCGGAACA 3' R: 5' CAGCCCAGATTTCTCATCTTCCA 3'
HNF-1A	Hepatozyten-Kernfaktor 1-alpha	F: 5' CTGGTACGTCCGCAAGCAG 3' R: 5' TTGGTAGCTCATCACCTGTGG 3'
HNF-1B	Hepatozyten-Kernfaktor 1-beta	F: 5' TCCCATGAAGACGCAGAAGC 3' R: 5' GCTCTTCAATCAGCCCTCCC 3'
IRF-1	Interferon-Regulationsfaktor 1	F: 5' AAGACCAGAGCAGGAACAAGG 3' R: 5' CTTAGCATCTCGGCTGGACT 3'
JUN	Transkriptionsfaktor AP-1 Untereinheit c-Jun	F: 5' CAGGTGGCACAGCTTAAACA 3' R: 5' AACTGCTGCGTTAGCATGAG 3'
MYB	Transkriptionsfaktor AP-1 Untereinheit c-Myb	F: 5' CCAAGTCTGGAAAGCGTCA 3' R: 5' TCTGTTCCATTCTGTTCCACCA 3'
NKRF	NF-kappa-B-unterdrückender Faktor	F: 5' AGGTCAAAAACGCCACCTCT 3' R: 5' ACAGGCTCAAAACGAGGTCT 3'
NKRF E1 I1	Exon1 Intron1 des NF-kappa-B-unterdrückender Faktors	F: 5' GGTAGGAAGGGAGAGCAGGTA 3' R: 5' TCCTTATGAAGATTGGCTGCTTG 3'
NS3 JC1	NS3-Protease des HCV	F: 5' CTACGGTGTGCGCCAGAG 3' R: 5' CCCAAACGGTACAGGAGAGG 3'
NS5A JC1	NS5a-Protease des HCV	F: 5' GTTGCTGGAGGGCTTCTGAT 3' R: 5' CCGTTGCTGGTTGTGCTCT 3'
NS5A Rep.	NS5a-Protease des Replikonsystems	F: 5' AATTATTCTAGGGCGCTGTGG 3' R: 5' GAGCTGTGACCCAACCAGGT 3'
Oct1	POU domain, class 2, transcription factor 1	F: 5' TGGAGAGTGGAGATGGCAAC 3' R: 5' GGGCTGTTGAGATTGCTCCT 3'
SDHA	Succinat-Dehydrogenase Flavoprotein-Untereinheit	F: 5' AGATGTGGTGTCTCGGTGAT 3' R: 5' CGTGATCTTTCTCAGGGCCA 3'
STAT1-beta	Signaltransducer und Aktivatoren der Transkription 1-beta	F: 5' GGAAAAGCAAGCGTAATCTTCA 3' R: 5' ATCTCTGGGCGTTTTCCAGA 3'
YY1	Zinkfinger-Transkriptionsfaktor YY1	F: 5' ATGATGCTCCAAGAACAATAGC 3' R: 5' TGGGTGTGCAGATGTTTTCTC 3'

2.1.8 Kit Systeme

Tabelle 9: Verwendete Kit-Systeme

Artikel	Hersteller	Katalog Nummer
Human Amphiregulin Quantikine ELISA Kit	R&D Systems (Minneapolis, USA)	#DAR00
Human EGF Quantikine ELISA Kit	R&D Systems (Minneapolis, USA)	#DEG00
Human Epiregulin ELISA Kit	Abcam (Cambridge, UK)	#ab277077
Human IL-8/CXCL8 Quantikine ELISA Kit	R&D Systems (Minneapolis, USA)	#D8000C
Human Lipocalin-2 / NGAL ELISA Kit	Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)	#RAB0332-1KT
Human TNF-alpha Quantikine ELISA Kit	R&D Systems (Minneapolis, USA)	#DTA00D
Human VEGF Quantikine ELISA Kit	R&D Systems (Minneapolis, USA)	#DVE00
IL-1 beta Human ELISA Kit, High Sensitivity	Thermo Fisher (Waltham, Massachusetts, USA)	#MS224HS
Maxwell® RSC simplyRNA Tissue Kit	Promega (Mannheim, Deutschland)	#AS1340
NRG1 beta-1 Human ELISA Kit	Thermo Fisher (Waltham, Massachusetts, USA)	#EHNRG1
PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)	#28104
Plasmid Giga Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)	#12191
QIAshredder Kit	QIAGEN (Hilden, Deutschland)	#79656
QuantiTect Rev. Transcription Kit	QIAGEN (Hilden, Deutschland)	#205311
RNeasy Mini Preparation Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)	#74104
SimpleChIP® Enzymatic Chromatin IP Kit (Magnetic Beads)	Cell Signaling (Cambridge, UK)	#9003
VenorGEM Mycoplasma Detection Kit	Minerva Biolabs (Berlin, Deutschland)	#11-1050

2.2 Zellbiologische Methoden

Die untersuchten Zelllinien (Tabelle 10) wurden unter folgenden Bedingungen kultiviert: 37°C und 5 % CO₂ in einer wassergesättigten Atmosphäre. Das Kulturmedium für die verschiedenen Zellen wurde gemäß den Angaben in Tabelle 11 verwendet. Um das Vorhandensein von Mykoplasmen auszuschließen, wurden regelmäßig PCR-Tests der Zellkulturüberstände durchgeführt. Die Zellen wurden zur Einfrierung bei einer Konfluenz von 50 % in einem Einfriermedium aus DMEM (sowie 10 % DMSO und 20 % FCS) suspendiert und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert. Zur Verwendung wurden die Zellen durch schnelles Erwärmen auf 37°C aufgetaut und in neues Medium überführt. In der Regel erfolgte ein Wechsel des Mediums alle zwei Tage und die Zellen wurden alle drei bis vier Tage passagiert.

Tabelle 10: Verwendete Ziellinien und deren Kulturmedium

Bezeichnung	Beschreibung	Kulturmedium
Huh 7	Humane Hepatomazelllinie	DMEM/Nutrient Mix F-12 + 10 % FCS
Huh 9.13*	Humane Hepatom-Zelllinie Huh7 mit integriertem subgenomischen Replikon (NS3-NS5B) von HCV (GT1b)	DMEM/Nutrient Mix F-12 + 10 % FCS + 1 mg/ml Geneticin
Huh 7.5**	Humane Hepatomazelllinie, die nach Entfernung des HCV-Replikons durch IFN-Behandlung geheilt wurde.	DMEM (4,5 g / L Glukose) + 10 % FCS + 2 mM Glutamin + 100 U/ml Penicillin + 100 µg/ml + Streptomycin + 1x NEAA

* Bereitgestellt von Ralf Bartenschlager, Heidelberg, Deutschland.

** Von der Firma Apath, New York, USA, zur Verfügung gestellt.

2.2.1 Stimulation der Zellen mit IL-1 β und EGF

Um die Auswirkungen von IL-1 β und EGF auf die in Abschnitt 2.2 aufgeführten Zellen zu untersuchen, wurden diese mit 5 U/ml (0,01ng/ml) IL-1 β oder 40 ng/ml EGF stimuliert. Zu diesem Zweck wurden die Zellen in zweiprozentigen FKS-Komplettmedium für verschiedene Zeitdauern (1, 3, 4, 6, 8, 24 und 48 Stunden) stimuliert.

2.2.2 Behandlung der Zellen mit siRNA

Zur gezielten Deletion von Zielgenen wurden die Zellen mit *small interfering* RNAs (siRNAs) behandelt. Dies sind kleine synthetischen Moleküle, welche durch Transfektion in die Zellen eingebracht werden und die Expression der Zielgene herunter regulieren, indem sie an komplementäre Sequenzen der mRNA binden. Zunächst wurden die Zellen einen Tag vor der Transfektion ausgesät. Anschließend wurden die siRNAs sowie das Transfektionsreagenz Dharmafect 4 gemäß den Vorgaben des Herstellers in einem vorgeschriebenen Verhältnis zu OptiMEM beigefügt und das Gemisch für fünf Minuten bei RT inkubiert. Nach einer zusätzlichen Inkubationszeit von 20 Minuten wurde die Lösung auf die Zellen pipettiert. Nach einer weiteren Inkubationszeit von sechs bis acht Stunden erfolgte der Wechsel des Transfektionsmediums. Abschließend wurden die Zellen für weitere 72 Stunden inkubiert, bevor sie geerntet wurden.

2.2.3 Chronisches HCV-Zellkultursystem

Zur Etablierung persistierender und differenzierter Huh 7.5 Zellen wurde ein Kulturmedium verwendet, das mit 1 % DMSO (Volumen/Volumen) angereichert war. Die Huh 7.5 Zellen wurden in 12-Well-Platten kultiviert, wobei das Medium über einen Zeitraum von zwei Wochen alle 48 Stunden gewechselt wurde. Für die Überprüfung der Differenzierung erfolgte die Fixierung der Zellen in eiskaltem Methanol. Anschließend wurden die Zellen zur Identifikation von Differenzierungsmarkern gefärbt: MRP2 (Verdünnung 1:30) als Marker für die apikale (kanalikuläre) Membran und Na⁺/K⁺ ATPase (Verdünnung 1:100) als Marker für die basolaterale (sinusoidale) Membran. Die Zellkerne wurden mit Hoechst-Farbstoff zur Visualisierung behandelt. Nach erfolgreicher Differenzierung wurden die Zellen mit dem JC1-Virus bei einer Multiplicity of Infection (MOI) von vier infiziert. Eine Woche nach der Infektion wurde die RNA aus den Zellen mittels des RNeasy Mini Kits extrahiert und isoliert. Die isolierte RNA wurde anschließend zur Langzeitlagerung bei -80°C aufbewahrt. Die Infektionsrate wurde durch Immunfärbung des Nicht-Strukturproteins NS3 mittels eines spezifischen Antikörpers und die Detektion mit einem Anti-Mouse-HRP-Zweitantikörper überprüft.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 RNA-Präparation

Zur Isolierung der RNA wurden die Zellen zunächst in 6 cm-Schalen oder 6- bzw. 12-well-Platten kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mittels 350 µl RLT-Puffer und β-Mercaptoethanol (im Verhältnis 1:100) lysiert. Zur Homogenisierung wurde das QIAshredder-Kit verwendet und anschließend die RNA mit dem RNeasy Mini Kits entsprechend den Herstellerangaben isoliert und gereinigt. Die Konzentration und Reinheit der RNA-Proben wurden abschließend mit dem Implen NanoPotometer gemessen, wobei Proben mit einem Verhältnis von 260 / 280 zwischen 1,8 und 2 verwendet wurden. Die RNA wurde bei -80°C gelagert.

2.3.2 cDNA-Synthese

Anschließend an die erfolgreiche RNA-Isolierung wurde die RNA in die komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Für die Reverse Transkriptase-Reaktion wurde das QuantiTect Reverse Transcription Kits von QIAGEN gemäß den Herstellerangaben verwendet (Tabelle 11). Für jeden Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 20 µl wurde jeweils

1 µg RNA verwendet. Zur Überprüfung der cDNA-Synthese wurde ein Kontrollansatz ohne das Enzym parallel durchgeführt. Die erzeugte cDNA wurde daraufhin mit 100 µl RNase freien Wasser verdünnt. Die Lagerung erfolgte abschließend bei -20°C.

Tabelle 11: Pipettierschema für die cDNA-Synthese (Ansatz pro Reaktion)

	Volumen [µl]
RT Puffer	4
RT Primer	1
Reverse Transkriptase	1
Mastermix Pro Probe	6
1 µg RNA in ddH ₂ O	11
Gesamtvolumen	17

2.3.3 Quantitative PCR

Die Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) dient zur Quantifizierung von cDNA, bei der die Fluoreszenz in Echtzeit gemessen wird und proportional zur Menge der amplifizierten PCR-Produkte ist. Zur Detektion wurde der Cyanin-Farbstoff Sybr Green I verwendet. Die hergestellte cDNA diente als Vorlage für die qPCR, wobei der Sybr Green Master Mix von Thermo Fisher für die Durchführung verwendet wurde. In Tabelle 12 ist das verwendete Pipettierschema für die qPCR dargestellt. Die jeweils verwendeten Primer sind in Tabelle 8 aufgeführt. Die Auswahl der Primer wurde mittels einer Schmelzkurven-analyse im Vorhinein untersucht.

Tabelle 12: Zusammensetzung des qPCR Mastermix (Ansatz pro Reaktion)

	V [µl]
Primer forward (10pmol)	1
Primer reverse (10pmol)	1
Sybr Green	12,5
RNase freies Wasser	9,3
cDNA-Einsatz pro Probe	1,2
Gesamtvolumen	25

Für die qPCR wurde das ViiA 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) mit einem festgelegten Protokoll verwendet (Tabelle 13). Die Auswertung der qPCR erfolgte mittels der $\Delta\Delta C_t$ -Methode, wobei der Quantification Cycle (Cq-Wert) dem PCR-Zyklus entspricht, in dem das gemessene Fluoreszenzsignal zum ersten Mal die Hintergrundfluoreszenz übersteigt.²⁵³ Eine relative Quantifizierung des Transkriptes wurde durch den Vergleich mit dem Haushaltsgen SDHA ermöglicht.

Tabelle 13: Protokoll qPCR Thermocycler

Vorgang	Zeit	Temperatur [°C]	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	10 Minuten	95	1
Denaturation	15 Sekunden	95	40
Annealing und Extension	60 Sekunden	60	

2.3.4 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) Reaktionen wurden gemäß der Zusammensetzung in Tabelle 14 durchgeführt. Der PCR-Zyklus umfasste folgende Schritte: Zunächst erfolgte die Denaturierung für fünf Minuten bei 94 °C, gefolgt von Annealing-Zyklen, bei denen die Temperatur je nach verwendeten Primern variierte. Anschließend erfolgte die Extension bei 72°C für 30 Sekunden. Für die Vervielfältigung wurden die Schritte zwischen 20- und 30-mal durchlaufen. Für die Durchführung wurden 0,2 ml Reaktionsgefäße und ein Thermocycler (T3000, Biometra) verwendet.

Tabelle 14: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes

	Konzentration
dNTPs	2,5 mM
Sense Primer	10 pmol
AntiSense Primer	10 pmol
Taq-Polymerase	1 – 2,5 Einheiten
Template	10 – 80 ng
Mg ²⁺ -haltiger Puffer	Auffüllen bis auf 50 µl

2.3.5 Agarose Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der Amplifikation des Produkts während der PCR wurde die Größe des amplifizierten DNA-Fragments mittels Agarosegel-Elektrophorese bestimmt. Hierbei wurden einprozentige (v/w) Agarose-Gele hergestellt, indem Agarose in Puffer 1x TAE mit Ethidiumbromid aufgelöst wurde. Die Proben wurden unter Zugabe von 6x Gel Loading Dye vorbereitet. Als Größenmarker dienten entweder MassRuler oder MassRuler Low Range DNA Ladder von Thermo Fisher Scientific. Die Visualisierung des Gels erfolgte unter Verwendung eines Doc-Print-Gel-Dokumentationssystems von Peqlab.

2.3.6 Restriktion und Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Überprüfung der korrekten Größe von DNA-Fragmenten wurden Restriktionsverdauungen durchgeführt, wobei Restriktionsenzyme der Klasse II eingesetzt wurden. Diese Enzyme erkennen palindromische Sequenzen und spalten sie. Alle verwendeten Restriktionsenzyme wurden von New England Biolabs mit den entsprechenden Reaktionspuffern erworben, um höchste Aktivität und Spezifität sicherzustellen. Für jede Reaktion wurden 50 bis 200 ng DNA mit 10-20 Einheiten Restriktionsenzym gemischt und auf ein Gesamtvolumen von 10 µl mit Wasser aufgefüllt. Danach erfolgte eine Inkubation der Reaktionen für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach einer Hitzeaktivierung von 20 Minuten bei 65 bis 80°C (abhängig vom Enzym) wurden die Proben auf einprozentige Agarosegele aufgetragen und eine Gelelektrophorese bei 120 V durchgeführt.

Die resultierenden Reaktionen wurden auf Agarosegele aufgetragen, und die entsprechenden Banden wurden entweder aus dem Gel ausgeschnitten oder direkt gereinigt. Die DNA wurde aus dem Gelstück oder dem PCR-Produkt mithilfe des NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up Kits gemäß den Anweisungen des Herstellers extrahiert.

Für die Ligation der DNA-Fragmente wurde ein Insert:Vektor-Verhältnis von 2:1 verwendet. Die Ligation erfolgte durch Zugabe von 0,5 µL T4-DNA-Ligase (400.000 U/mL) auf insgesamt 10 µL Reaktionsvolumen und 1x Ligationspuffer (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 10 mM DTT, pH 7,5) mit anschließender Inkubation für zehn Minuten bei Raumtemperatur.

2.3.7 Transformation von kompetenten *E. coli*-Bakterien

Die kompetenten *E. coli*-Stämme JM109 und Top10 (Tabelle 15) wurden für fünf Minuten auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 5 µl der Ligationlösung zu 50 µl kompetenten *E. coli* gegeben und für zehn Minuten auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden dann einem Hitzeschock bei 42°C für 45 Sekunden ausgesetzt, um Poren in der Membran von *E. coli* zu erzeugen und die DNA einzuführen. Die Zellen wurden für weitere 2 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend durch Zugabe von 900 µl LB-Medium (5 g/L Hefeextrakt, 10 g/L Trypton, 5 g/L Natriumchlorid) wiederhergestellt. Diese Mischung wurde in einem Schüttler bei 150-300 U/min für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Zur Selektion der erfolgreich transformierten Zellen wurden 100-200 µl der Lösung auf eine Agarplatte mit den entsprechenden Antibiotika (Ampicillin [50 mg/L] oder Kanamycin [25 mg/L]) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C bebrütet. Für die Kryokonservierung wurde eine Übernachtskultur aus 800 µl LB-Medium und 200 µl Glycerin hergestellt und bei -80°C gelagert.

Tabelle 14: Verwendete *Escherichia coli* - Klonierungsstämme

Bakterienstamm	Genotyp
Top10	F- mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC) 80lacZ M15 lacX74 recA1 ara 139 (ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG
JM109	endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17 (rk-, mk+), relA1, supE44, Δ(lac-proAB), [F' traD36, proAB, lacIqZΔM15].

Die Isolierung der bakteriellen Plasmid-DNA wurde gemäß den Anweisungen des Herstellers mit dem QIAprep Spin Miniprep oder Maxiprep Kit (Qiagen) durchgeführt. Anschließend wurde die DNA-Konzentration bei 260 nm mit dem Spektrophotometer NanoPotometer (Implen) gemessen.

2.4 Biochemische Methoden

2.4.1 Protein Extraktion

Für die Isolation der Proteine wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit Triton-Lyse-Puffer (Tabelle 6) aus den Zellschalen abgelöst. Für die Zell Lyse wurden 120 µl Lyse-Puffer verwendet. Die suspendierten Zellen wurden in ein Gefäß auf Eis überführt und sechsmal im Abstand von jeweils 2 Minuten für 15 Sekunden homogenisiert. Danach wurden die Proben für 10 Minuten bei 10.000 x g und 4°C zentrifugiert, um potenzielle Zelltümmer zu entfernen. Der Überstand wurde entnommen und bei -20°C gelagert.

2.4.2 Proteinbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der Bradford-Test nach Angaben des Herstellers verwendet. Der Bradford-Test dient als photometrisches Verfahren für die Bestimmung der Proteinmenge. Dabei bildet der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant-Blau in saurer Lösung Komplexe mit den kationischen, unpolaren Seitenketten von Proteinen. Dies führt zur Stabilisierung des ursprünglich roten Farbstoffs in seiner blauen, anionischen Sulfonatform und bewirkt eine Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs von 470 nm auf 595 nm. Die Erhöhung der Absorption im Vergleich zum freien Farbreagens kann daher zur Bestimmung der Proteinkonzentration mithilfe des Ultrospec 2100 pro Spektrophotometers gemessen werden.

2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE dient zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen basierend auf ihrer Masse in einem elektrischen Feld. Zur Herstellung des SDS-Gels wurde ein Gelsystem (Biometra) verwendet. Die benötigten Chemikalien zur Herstellung der Polyacrylamidgele sind in Tabelle 16 aufgeführt. Die Protein-Lysate wurden zuvor auf eine Konzentration von 30 µg/ml mit mTLP verdünnt. Anschließend wurden die Proben zusätzlich durch Verdünnung mit 4x Lämmli-Puffer im Verhältnis 3:1 vorbereitet. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben für fünf Minuten bei 95°C denaturiert und anschließend kurz zentrifugiert. Je nach Größe der zu detektierenden Proteine wurden entweder zehn- oder zwölfprozentige Acrylamid verwendet. Nach dem Einspannen der Gele wurde die Elektrophoresekammer mit 1x SDS-Laufpuffer befüllt. Als Referenzstandard für die Größenbestimmung der Proteine wurde der PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher) genutzt. Die SDS-PAGE wurde durchgeführt, indem die Proteine im Sammelgel für 30 Minuten bei 100 V und anschließend im Trenngel für etwa 2 Stunden bei 160 V aufgetrennt wurden.

Tabelle 15: Benötigte Chemikalien für ein Polyacrylamidgel

Chemikalien	Trenngel 10 %	Trenngel 12 %	Sammelgel
Aqua dest.	11,9 ml	9,9 ml	13,6 ml
Acrylamid	10 ml	12 ml	3,4 ml
1,5 M Tris Puffer (pH 8,8)	7,5 ml	7,5 ml	
0,5 M Tris Puffer (pH 6,8)			2,5 ml
SDS (10 %)	300 µl	300 µl	200 µl
APS (10 %)	300 µl	300 µl	200 µl
TEMED	12 µl	12 µl	20 µl

2.4.4 Protein Transfer und Western Blot

Nach erfolgreicher Durchführung der SDS-PAGE (siehe Kapitel 2.3.5) wurden die aufgetrennten Proteine mittels einer Semi-Dry Blotting-Vorrichtung (Biometra) auf Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membranen übertragen. Die Übertragung erfolgte unter Anwendung einer Stromstärke von 1 mA/cm², wobei die Dauer des Vorgangs abhängig von der Proteingröße zwischen 60 und 90 Minuten variierte. Die PVDF-Membran wurde durch Whatman-Papier (Schleicher & Schuell), das mit Anodenpuffer und Kathodenpuffer getränkt war, umschlossen.

Um nicht unspezifischen Proteinbindungen zu vermeiden, wurde die Membran anschließend mit einer Lösung aus fünfprozentiger BSA/TBS-T für eine Stunde bei RT inkubiert. Zur Bindung des Primärantikörpers erfolgte eine weitere Inkubation der Membran bei vier Grad über Nacht auf einem Schüttler. Am darauffolgenden Morgen wurde der primäre Antikörper entfernt, und die Membranen wurden dreimal für jeweils zehn Minuten mit TBST gewaschen, um

unspezifische Bindungen zu entfernen. Anschließend wurde die Membran für eine Stunde mit dem sekundären Antikörper inkubiert, welcher spezifisch für den zuvor verwendeten Primärantikörper war. Nach der Inkubation wurden die Membranen erneut dreimal für jeweils zehn Minuten mit TBST gewaschen. Abschließend wurde Western Lightning Plus auf die Membran gegeben, um die Proteine im Cytiva Image Quant 800 zu detektieren. Die Intensität der Banden wurden anschließend mit ImageJ ausgewertet. Für die relative Quantifizierung diente das Haushaltsgen β -Actin.

2.4.5 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der ELISA ist ein etabliertes bioanalytisches Verfahren, das den quantitativen Nachweis spezifischer Proteine ermöglicht. Das Protokoll beginnt mit der Beschichtung einer Mikrotiterplatte mit einem spezifischen Primärantikörper. Darauf folgend wird das Zielprotein mittels einer Antigen-Antikörper-Interaktion auf der Plattenoberfläche immobilisiert. Zur Quantifizierung des Antigens wird ein enzymmarkierter Sekundärantikörper hinzugefügt, der eine Substratreaktion katalysiert, resultierend in der Generierung eines quantitativ messbaren Farbsignals. Die Intensität des Farbsignals wird photometrisch erfasst und ermöglicht über die Regressionsanalyse eines vom Hersteller bereitgestellten Standards die präzise Bestimmung der Antigenkonzentration. Die Durchführung des Assays erfolgte gemäß den Spezifikationen des Herstellers.

2.4.6 Herstellung des Hepatitis C Virus Infektionssystems

Für die Durchführung der *in vitro* Transkription wurden zehn μg virale DNA mittels Restriktionsverdau unter Verwendung des Enzyms MluI linearisiert. Nachfolgend erfolgte die Reinigung der linearisierten DNA mit dem QIAquick PCR Purification Kit, wobei die Elution in 60 μl Wasser durchgeführt wurde. Zu dem resultierenden Eluat wurden 20 μl eines 5-fach konzentrierten RRL-Puffers, 12,5 μl rNTPs (25 mM), 2,5 μl RNasin (40 U/ μl) sowie 4 μl T7 RNA Polymerase (20 U/ μl) hinzugefügt. Die Inkubation des Reaktionsgemisches erfolgte für drei Stunden bei 37°C. Als nächstes wurden erneut 2 μl T7 RNA Polymerase hinzugefügt, gefolgt von einer verlängerten Inkubation über Nacht bei gleicher Temperatur.

Zur Eliminierung der DNA wurden dem Ansatz 2,5 μl DNase (3 U/ μl) zugesetzt und für 30 Minuten inkubiert. Die gereinigte RNA wurde mittels des RNeasy Mini Kits aufbereitet. Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte durch spektralphotometrische Messung der Extinktion bei 260 nm mittels eines NanoDropTM-Gerätes. Für die Elektroporation wurden Huh 7.5 Zellen, mit einer Konfluenz von 80 bis 90 % genutzt. Anschließend erfolgte ein Waschriff

mit PBS und die Zellen wurden durch Trypsin abgelöst und diese in acht ml DMEM pro 75 cm² Zellkulturflasche resuspendiert. Danach erfolgte die Resuspension in 1 ml Cytomix. Im Rahmen der Elektroporation benötigte man 400 µl der vorbereiteten Suspension, welche mit zehn µg gereinigter RNA angereichert und anschließend in eine Elektroporationskammer transferiert wurden. Diese Zellsuspension wurde erneut mit zehn µg der aufgereinigten RNA vermischt und in eine Pulschammer überführt. Die Elektroporation wurde bei 975 µF und 270 V durchgeführt. Die Zeitkonstante der Elektroporation betrug 20 ms. Nach der Elektroporation wurden eineinhalb Elektroporationsansätze in 18 ml frisches Huh 7.5 Medium überführt und in einer Kulturschale inkubiert.

Die Virusernte und die anschließende PEG-Fällung wurden zu definierten Zeitpunkten nach der Elektroporation durchgeführt: 48, 72 und 96 Stunden post-Transfektion. Zu diesen Zeitpunkten wurde das Medium, welches das HCV enthalten hat, abgenommen und neues Huh 7.5 Medium hinzugefügt. Unmittelbar nach der Entnahme des Mediums erfolgte eine Zentrifugation für fünf Minuten bei 1.000 Umdrehungen pro Minute (rpm) und RT. Die Lagerung des Überstandes erfolgte bei 4 °C. Für die PEG-Fällung wurden 4,8 ml einer 40 %igen PEG-8000/PBS-Lösung zu 20 ml des geernteten, virushaltigen Mediums hinzugefügt. Zur Optimierung der Virus Aufreinigung wurden die zuvor gelagerten Überstände für weitere drei Tage mit dem Fällungsreagenz inkubiert. Als Nächstes erfolgte eine Zentrifugation für 90 Min. bei 8.000 x g und einer Temperatur von 4°C. Abschließend wurde das resultierende Pellet in DMEM gelöst, in Aliquots aufgeteilt und bei -80°C gelagert.

Die *Tissue Culture Infection Dose 50* (TCID₅₀) ist ein Maß für die infektiöse Viruskonzentration und wird als die Verdünnung eines Viruspräparats definiert, um 50 % der kultivierten Zellen in einer Kulturschale zu infizieren. Zur Bestimmung der TCID₅₀ wurden Zellen in 96 Well Platten ausgesät und anschließend mit schrittweise von 1:10 bis 1:50 verdünnten Viruskonzentrationen behandelt. In jedem Verdünnungsschritt erhielten 6 benachbarte Wells konsistent denselben Verdünnungsfaktor. Aus jeder dieser Primärverdünnungen wurden zusätzlich sieben sekundäre Verdünnungen im Verhältnis 1:6 erstellt, dafür wurden 40 µl in das darunterliegende Well transferiert. Die Infektionsrate wurde durch Immunfärbung des Nicht-Strukturproteins NS3 mittels eines spezifischen Antikörpers und die Detektion mit einem Anti-Mouse-HRP-Zweitantikörper in Verbindung mit einer Carbazol-Substratlösung ermittelt. Die Quantifizierung der TCID₅₀ erfolgte nach der Methode von Spearman & Kärber.

2.4.7 Transkriptom-Sequenzierung (RNA-Seq)

RNA-Seq ist eine Technologie, welche die Hochdurchsatz-Sequenzierung nutzt um sowohl die Präsenz als auch die Quantität von RNA-Molekülen in einer biologischen Probe zu erfassen. Diese Technik bietet eine detaillierte Momentaufnahme der Genexpression. RNA-Seq Analysen ermöglichen insbesondere die Untersuchung verschiedener Aspekte der Genregulation. Darüber hinaus kann mittels RNA-Seq die Dynamik der Genexpression über die Zeit hinweg oder zwischen verschiedenen Gruppen und Behandlungsbedingungen analysiert werden. Die RNA-Seq-Analysen wurden in Kooperation mit dem Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum unter Verwendung des NextSeq 2000 Sequenziergeräts durchgeführt. Der experimentelle Ansatz wurde für jede Bedingung mit sechs Replikaten durchgeführt. Zur Analyse der Daten wurden Filterbedingungen verwendet die im Wesentlichen den in der Literatur im Rahmen vergleichbarer Analysen eingesetzten Methoden entsprechen. Für die Auswertungen wurden nur Gene mit einem FC-Schwellenwert ($FC \geq 1,5$ oder $\leq -1,5$) und einem Standardfilter für RNA-Seq-Analysen ($P \text{ adj. Wert} \leq 0,05$) berücksichtigt.

2.5 Entnahme von Serumproben

Die Serumproben wurden von Patienten mit chronischer Hepatitis C Infektion sowie von Patienten nach erfolgreicher Heilung der HCV-Infektion entnommen.

Vor der Entnahme der Serumproben wurde eine informierte Zustimmung der Probanden eingeholt, und die Entnahme wurde von der Ethikkommission der Universität Düsseldorf, Deutschland, genehmigt. (Studiennummer 2022-1848: „Virus-induzierte Veränderungen in der zellulären Signaltübertragung im Hepatozyten führen zu einer Reprogrammierung der Zellantwort auf Wachstumsfaktoren - Analyse der molekularen Mechanismen und funktioneller Konsequenzen“).

Die Probanden, die in Zusammenarbeit mit Dr. Jordan Feld von der Universität von Toronto in Kanada untersucht wurden, erhielten vorab ebenfalls eine umfassende Aufklärung, nachdem das Forschungsethikkomitee der Universität von Toronto, Kanada, seine Zustimmung erteilt hatte (Forschungsethikausschuss ID: CAPCR-ID: 23-5372.0.1: „*Investigation of various chemokines and growth factors in different stages of hepatitis C infection*“). Angaben zu Alter, Geschlecht, Viruslast und HBV-Infektion der Patienten finden sich in Tabelle 17.

2.6 Nutzung von bereits publizierten Abbildungen

Alle verwendeten Abbildungen aus bereits publizierten Arbeiten stehen unter einer Open-Access-Lizenz zur freien Nutzung zur Verfügung. Diese Abbildungen wurden in Übereinstimmung mit den entsprechenden Lizenzbestimmungen korrekt zitiert. Insbesondere stehen einige der genutzten Publikationen unter der Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0). Diese Lizenz erlaubt die Nutzung, Weitergabe, Anpassung, Verbreitung und Vervielfältigung in jedem Format oder Medium, sofern die ursprünglichen Autoren und die Quelle angemessen genannt werden. Zudem muss ein Link zur Lizenz angegeben werden, und es muss kenntlich gemacht werden, ob Änderungen an den Materialien vorgenommen wurden. Weitere Informationen finden sich unter <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>.

2.7 Statistik

Die statistischen Auswertungen sowie die Erstellung der Diagramme wurden mithilfe des Programms Prism 10 von GraphPad durchgeführt. Die Daten wurden entweder als Mittelwert $\pm$ SEM oder als Median mit Interquartilsabstand dargestellt. Die Normalverteilung der Daten wurde mittels des D'Agostino & Pearson-Normalitätstests überprüft. Für den Vergleich zwischen der Kontrollgruppe und der behandelten Gruppe bei normalverteilten Daten wurde der parametrische, ungepaarte, zweiseitige t-Test verwendet. Bei nicht normalverteilten Daten wurde die nichtparametrische Mann-Whitney-U-Statistik angewendet. Der Pearson-Korrelationskoeffizient wurde zur Bestimmung der Korrelationen zwischen den verschiedenen Parametern verwendet. Vor der Analyse wurden potenzielle Ausreißer, die den Korrelationskoeffizienten beeinflussen könnten, mittels Prism 10 identifiziert und ausgeschlossen. Werte mit $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet. Die Daten wurden mit * für $p \leq 0,05$, ** für $p \leq 0,01$, *** für $p \leq 0,001$ oder **** für $p \leq 0,0001$ gekennzeichnet.

3. Ergebnisse

3.1 Erhöhte Serum Chemokinspiegel bei chronischer HCV-Infektion

Wie einleitend ausgeführt, spielen Chemokine im Zuge von Entzündungsreaktionen als Faktoren, die unter anderem die Chemotaxis von Immunzellen beeinflussen, eine relevante Rolle und beeinflussen entsprechend am Ort des Entzündungsgeschehens die Zusammensetzung eines Immuninfiltrates. Für Patienten mit chronischer HCV-Infektion ist beschrieben, dass abgesehen von Zytokinen wie IL-1 β und TNF- α auch die Serumkonzentrationen von Chemokinen wie CXCL8 erhöht sind. Darüber hinaus legen Ergebnisse aus in vitro Studien nahe, dass HCV die Signalübertragung von Wachstumsfaktoren derart beeinflusst, dass Faktoren wie insbesondere EGF unter dem Einfluss von HCV zu relevanten Induktoren der Synthese von CXCR2-Liganden wie CXCL8 konvertieren.⁶⁶

Es sollte daher zunächst an den der Arbeitsgruppe zugänglichen Patientenkollektiven (siehe Kapitel 2.5: Entnahme von Serumproben) geprüft werden, ob die berichteten Veränderungen der Serumkonzentrationen von Faktoren wie IL-1 β , TNF- α und CXCL8 auch bei unseren chronisch HCV-infizierten Patienten nachvollzogen werden können und inwieweit eine erfolgreiche Eradikation die Serumlevel beeinflusst. Die Zusammensetzung der der Arbeitsgruppe zugänglichen Kohorten im Hinblick auf Alter, Geschlecht und Viruslast der Patienten ist in Tabelle 17 zusammengefasst.

Tabelle 16: Informationen von über die untersuchten Patientengruppen

	Kontrolle	HCV-positiv	HCV-geheilt
Anzahl	45	136	129
Alter (MW $\pm$ SEM)	43 $\pm$ 13	52 $\pm$ 16	59 $\pm$ 15
Geschlecht (%)			
Männer	18 (40 %)	83 (61 %)	60 (55 %)
Frauen	27 60 %)	53 (39 %)	49 (45 %)
Viruslast (HCV)	-	26 $\pm$ 13,5 x 10 ⁵ U / ml	-
HBV-Koinfektion (n)	0	8 (5 %)	5 (4 %)

In Übereinstimmung mit der Literatur ergab die Analyse von Seren, dass bei Patienten mit einer chronischen HCV-Infektion die Serumkonzentrationen von IL-1 β , CXCL8, EGF, TNF- α und VEGF-A im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen signifikant erhöht sind (Abb. 9A – 9E).^{66, 77, 141, 254} Darüber hinaus legen die in Abbildung 9F und 9G zusammengefassten Ergebnisse nahe, dass auch die Serumkonzentrationen von NRG1 und AREG bei Patienten mit einer chronischen HCV-Infektion im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen signifikant erhöht sind (Abb. 9F und 9G). Interessant ist, dass für die Serumkonzentrationen von Epiregulin (EREG), anders als für die anderen untersuchten Liganden der

ErbB-Rezeptorfamilie, sich keine Unterschiede zwischen den untersuchten Patientengruppen ergaben (Abb. 9H). Dies legt nahe, dass eine gewisse Selektivität hinsichtlich der durch HCV beeinflussten Wachstumsfaktoren besteht.

Bemerkenswert ist, dass nach erfolgreicher Therapie im Vergleich zu chronisch infizierten HCV-Patienten zwar zu einer signifikanten Abnahme der Serumspiegel von IL-1 β und TNF- α kam (Abb. 9A und 9D), jedoch im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe zu keiner vollständigen Normalisierung derselben. Im Gegensatz hierzu war für die Serumkonzentrationen von EGF, Neuregulin 1 (NRG1) und VEGF-A eine signifikante Reduktion erst nach mehr als einem Jahr nach erfolgreicher Eradikation des Virus zu beobachten (Abb. 9C und 9E), während die Serumkonzentrationen von CXCL8 und AREG (Abb. 9B und 9F) auch mehrere Jahre nach erfolgreicher Eradikation noch erhöht waren und sich nicht wesentlich von denen chronisch HCV-infizierter Patienten unterschieden. Anzumerken ist, dass es mit Ausnahme von Nrg1 (Abb. 9G) auch bei den Faktoren, die im zeitlichen Verlauf nach erfolgreicher Eradikation signifikant in ihren Serumkonzentrationen abfielen, zu keiner vollständigen 'restitutio ad integrum' kam, sodass diese im Vergleich zu gesunden Kontrollen immer noch erhöht waren.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass HCV die Erhöhung der hier untersuchten Faktoren über verschiedene Mechanismen hervorruft und dass nur ein Teil derselben reversibel ist.

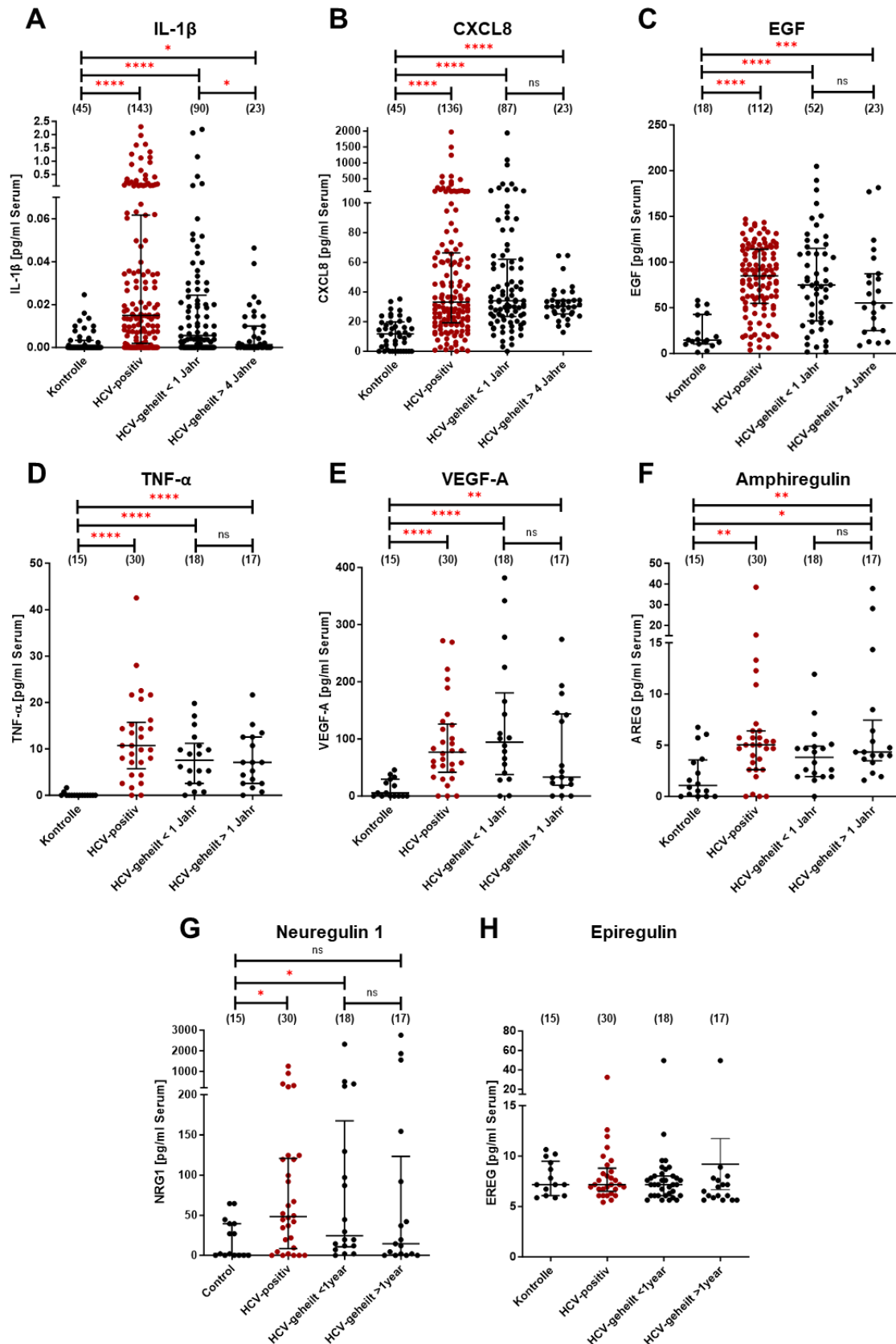


Abbildung 9: Eine chronische HCV-Infektion erhöht den Serumspiegel von IL-1 β , CXCL8, EGF, TNF- α , VEGF-A, NRG1 und AREG. Seren von HCV-negativen Spendern (Kontrolle), Patienten mit chronischer HCV-Infektion (HCV-positiv) und geheilten Patienten nach erfolgreicher viraler Eradikation (HCV-geheilt) wurden mittels ELISA untersucht. Die Punkte repräsentieren die Werte einzelner Personen. Signifikanzniveaus wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet. Fehlerbalken wurden basierend auf dem Median mit Interquartilsbereich dargestellt. Die Daten wurden mit * für $p \leq 0,05$, ** für $p \leq 0,01$, *** für $p \leq 0,001$ bzw. **** für $p \leq 0,0001$ markiert. Ns bedeutet nicht signifikant.

3.1.1 Verlauf der Leberparameter im untersuchten Kollektiv nach erfolgreicher HCV-Behandlung

Da ein Teil der vorangehend untersuchten Zytokine auch im Kontext der Leberschädigung eine Rolle spielen bzw. Ausdruck derselben sein können, wurden mit der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) und der Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) Parameter analysiert, deren Konzentrationsanstieg im Serum Hinweis auf eine Leberschädigung ist.²⁵⁵⁻²⁵⁸ Dem Stand der Literatur entsprechend waren die Serumkonzentrationen von GOT und GPT auch in dem hier untersuchten Kollektiv bei Patienten mit chronischer HCV-Infektion im Vergleich zu entsprechenden Kontrollen signifikant erhöht.²⁵⁹ Nach erfolgreicher Eradikation nehmen diese signifikant ab, bleiben jedoch im Vergleich zu gesunden Kontrollen weiterhin erhöht. Erst im mehrjährigen Verlauf kommt es zumindest im Hinblick auf die GPT zu einer annähernd vollständigen Normalisierung (Abb. 10).⁵⁷ Um einen Korrelationswert zum Grad der Fibrose zu erhalten, wurde ergänzend der Fibrose-4 Index (FIB-4 Score) für chronisch HCV-infizierte und erfolgreich geheilte Patienten berechnet und verglichen. Dieser Wert korreliert mit dem Grad der Fibrose und kann daher als nicht-invasiver Parameter herangezogen werden, um den Schweregrad einer Leberfibrose und deren Übergang in eine Zirrhose abzuschätzen. So besteht bei einem Wert unter 1,45 ein niedriges Risiko für eine fortgeschrittene Leberfibrose, während ein Wert von 3,25 auf ein erhöhtes Risiko für eine fortgeschrittene Leberfibrose hinweist. Werte im Zwischenbereich erfordern genauere Untersuchungen für präzisere Aussagen.²⁶⁰ Bei einigen der behandelten Patienten wurde ein FIB-4 Score über 3,25 festgestellt, was auf fortgeschrittenere Leberschäden hindeuten könnte (Abb. 10C). Es wurde jedoch kein signifikanter Unterschied im FIB-4 Score zwischen HCV-infizierten und erfolgreich geheilten Patienten beobachtet.

Diese Befunde lassen annehmen, dass es erst im mehrjährigen Verlauf nach erfolgreicher Eradikation zu einer annähernd vollständigen Rückbildung der durch die Infektion mit dem Hepatitis C Virus hervorgerufenen Hepatitis kommt. Ferner belegen die Befunde, dass in den hier untersuchten Kollektiven hinsichtlich einer fortgeschrittenen Fibrose keine signifikanten Unterschiede zwischen Gesunden, Patienten mit aktiver HCV-Infektion und solchen besteht bei denen HCV erfolgreich eradiziert wurde.

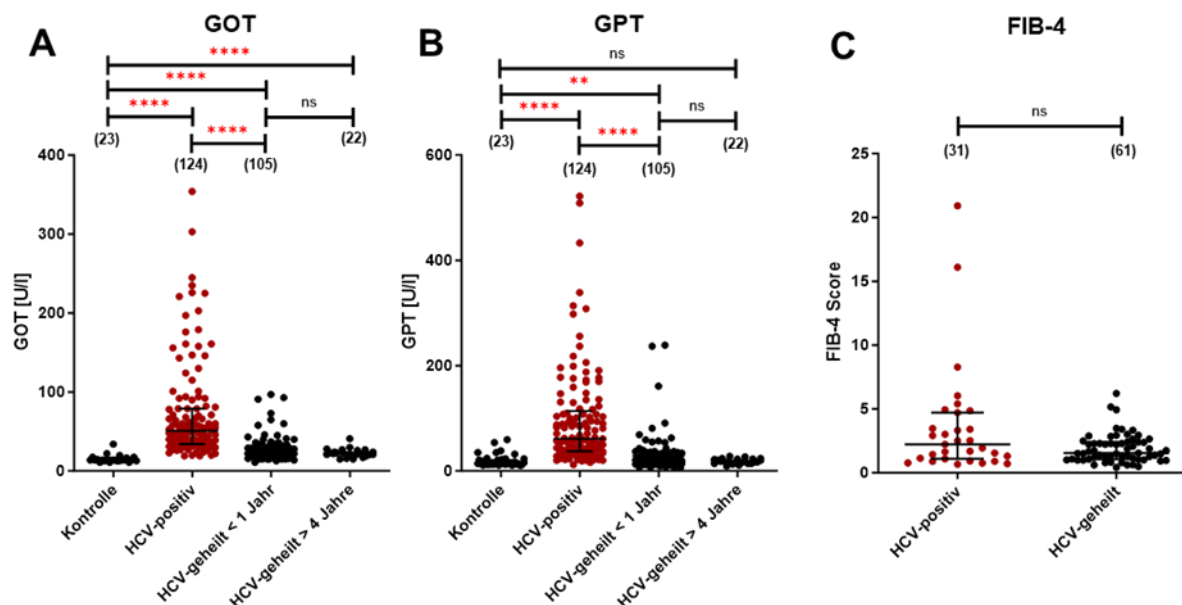


Abbildung 10: Leberparameter GOT und GPT bleiben trotz erfolgreicher Behandlung gegen das HCV erhöht. A und B) Blutproben von HCV-negativen Spendern (Kontrolle), Patienten mit chronischer HCV-Infektion (HCV-positiv) und geheilten Patienten nach erfolgreicher viraler Eradikation (HCV-geheilt) wurden auf GOT (A) und GPT (B) untersucht. C) Der FIB-4 Score wurde für Patienten mit chronischer HCV-Infektion (HCV-positiv) und geheilten Patienten nach erfolgreicher viraler Eradikation (HCV-geheilt) errechnet. Die Punkte repräsentieren die Werte einzelner Personen. Signifikanzniveaus wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet. Fehlerbalken wurden basierend auf dem Median mit Interquartilsbereich dargestellt. Die Daten wurden mit ** für $p \leq 0,01$ und **** für $p \leq 0,0001$ markiert. Ns bedeutet nicht signifikant.

3.1.2 Korrelationsanalysen zwischen Leberparametern, Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Chemokinen

Zur Untersuchung einer möglichen Korrelation zwischen den untersuchten Zytokinen, Chemokinen, Wachstumsfaktoren und Leberschädigungsparametern als Hinweis auf einen eventuellen Zusammenhang wurden ergänzende Korrelationsanalysen durchgeführt. In diesen ergaben sich für Patienten mit chronischer HCV-Infektion insgesamt 17 signifikante Korrelationen (Abb. 11). So bestand erwartungsgemäß eine signifikante Korrelation zwischen GOT bzw. GPT und dem FIB-4-Score. Darüber hinaus ergab sich eine positive Korrelation der Serumkonzentration von IL-1 β und GOT. Für alle anderen Faktoren, deren Serumkonzentrationen hier bestimmt wurden, ließen sich keine Korrelationen mit der Höhe der Leberwerte bzw. dem FIB-4-Score nachweisen. Es wurden jedoch mehrere Korrelationen untereinander identifiziert. Besonders bemerkenswert war die deutliche Korrelation zwischen IL-1 β und CXCL8, wobei beide auch signifikante Korrelationen mit den Wachstumsfaktoren EGF, AREG und VEGF-A aufwiesen. Hervorzuheben ist, dass ausschließlich die Serumspiegel von IL-1 β positiv mit der Viruslast der Patienten korrelierten. Entsprechend kam es hier auch zu einer signifikanten Abnahme der Serumkonzentrationen von IL-1 β nach erfolgreicher viraler Eradikation, wobei diese wie oben schon ausgeführt, zwar signifikant

abnehmen, jedoch im Vergleich zu gesunden Kontrollen weiterhin signifikant erhöht waren. Dabei weist die Tatsache, dass auch bei Patienten, die erfolgreich von einer HCV-Infektion geheilt wurden, noch Korrelationen zwischen den Serumkonzentrationen von insgesamt neun der untersuchten Parameter bestanden (Abb. 12), darauf hin, dass es nach Ausheilung der Infektion allenfalls erst deutlich verzögert zu einer 'restitutio ad integrum' und damit zu einer vollständigen Normalisierung des Risikoprofils kommt. So bestanden auch nach erfolgreicher Viruseradikation positive Korrelationen zwischen den Konzentrationen von CXCL8 im Serum von Patienten mit ausgeheilter HCV-Infektion und denjenigen von IL-1 β , AREG, VEGF-A und TNF- α . Die grafischen Darstellungen aller Analysen sind im Kapitel 8, Anhang, Abbildungen 1.1 bis 1.22, zu finden.

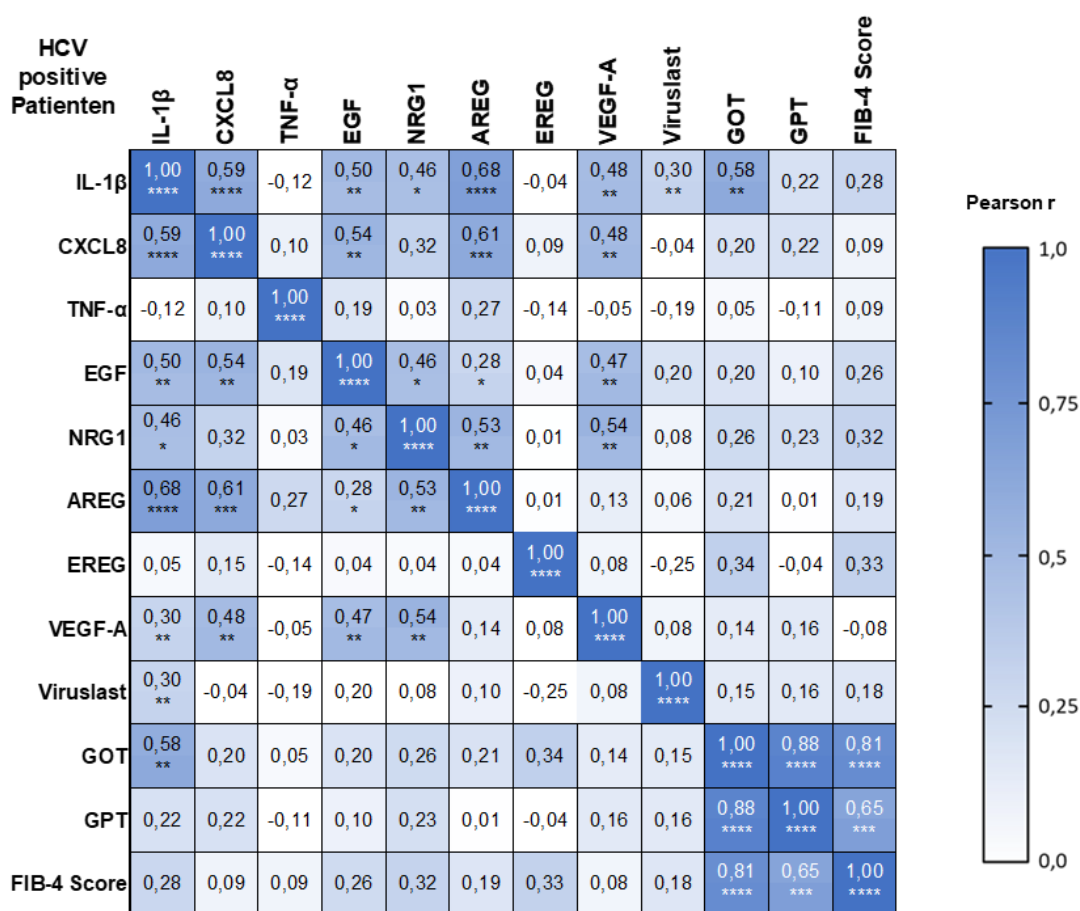


Abbildung 11: Korrelationsanalysen zwischen Leberparametern, Wachstumsfaktoren und Chemokinen bei chronischer HCV-Infektion. Zusammenfassung der Pearson-Korrelationskoeffizienten der jeweiligen Korrelationen aller Serumspiegel der Chemokin und Wachstumsfaktoren sowie der gemessenen Leber Parameter. Um eine präzisere Beurteilung vorzunehmen, wurden zuvor mittels der PRISM 10-Software Ausreißer identifiziert und ausgeschlossen, da der Pearson-Korrelationskoeffizient sehr empfindlich gegenüber Ausreißern ist. Die Punkte repräsentieren die Werte einzelner Personen. Die Daten wurden mit * für $p \leq 0,05$, ** für $p \leq 0,01$, *** für $p \leq 0,001$ bzw. **** für $p \leq 0,0001$ markiert.

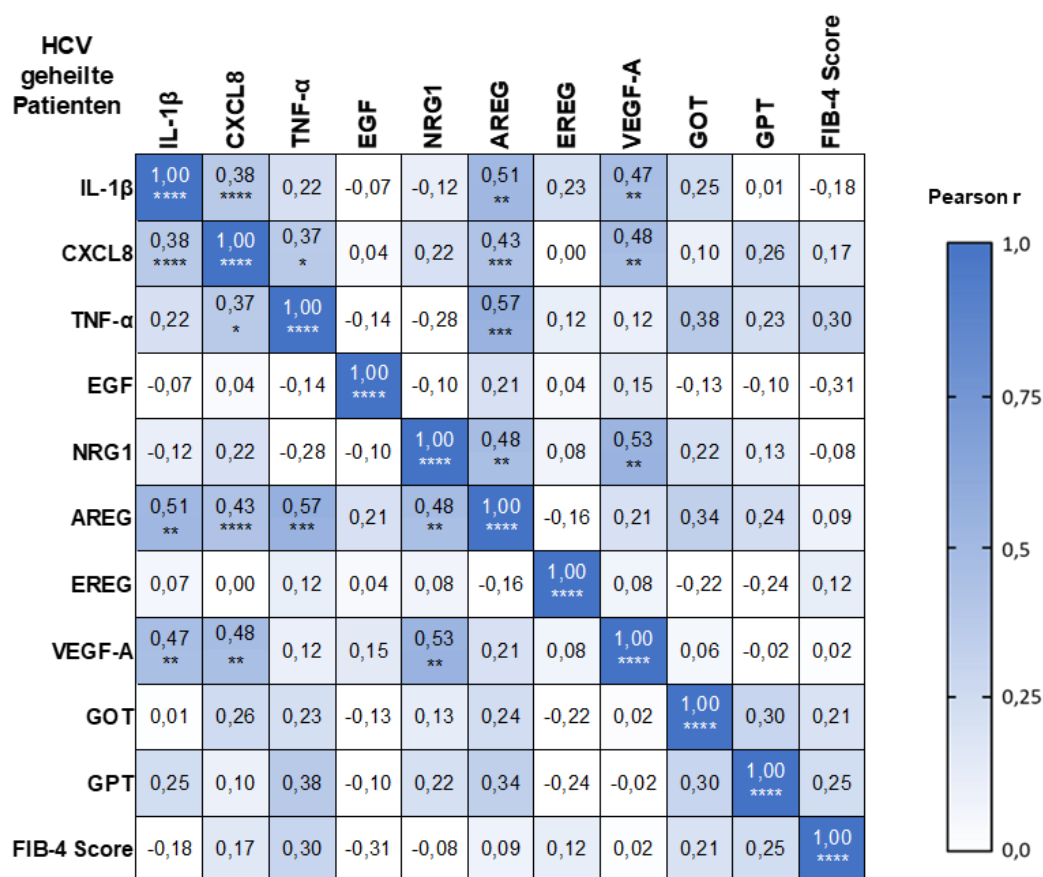


Abbildung 12: Korrelationsanalysen zwischen Leberparametern, Wachstumsfaktoren und Chemokinen nach erfolgreicher viralen Eradikation. Zusammenfassung der Pearson-Korrelationskoeffizienten der jeweiligen Korrelationen aller Serumspiegel der Chemokin und Wachstumsfaktoren sowie der gemessenen Leber Parameter. Um eine präzisere Beurteilung vorzunehmen, wurden zuvor mittels der PRISM 10-Software Ausreißer identifiziert und ausgeschlossen, da der Pearson-Korrelationskoeffizient sehr empfindlich gegenüber Ausreißern ist. Die Punkte repräsentieren die Werte einzelner Personen. Die Daten wurden mit * für $p \leq 0,05$, ** für $p \leq 0,01$, *** für $p \leq 0,001$ bzw. **** für $p \leq 0,0001$ markiert.

3.1.3 Eine HBV-Infektion führt ebenfalls zu signifikant erhöhten Chemokinen und Wachstumsfaktoren

Ergänzend zur Bestimmung der Serumkonzentrationen bei Patienten mit persistierender HCV-Infektion wurden die Konzentrationen ausgewählter Zytokine auch bei Patienten analysiert, bei denen eine chronische Hepatitis B Virus (HBV)-Infektion bestand. Ein bemerkenswertes Ergebnis dieser Untersuchungen war, dass die Serumspiegel von IL-1 β , CXCL8 und EGF bei Patienten mit einer HBV-Infektion nicht nur gegenüber gesunden Kontrollen, sondern auch im Vergleich zu denjenigen von Patienten mit einer chronischen Hepatitis C Infektion signifikant erhöht waren (Abb. 13A – 13C). Hingegen waren die Serumspiegel von TNF- α zwar, wie auch bei Patienten mit chronischer Hepatitis C, im Vergleich zu gesunden Kontrollen erhöht, unterschieden sich jedoch nicht signifikant von denjenigen mit einer HCV-Infektion (Abb. 13). Interessant ist in diesem Kontext auch, dass auch bei Patienten mit einer HBV-Infektion eine

positive Korrelation zwischen den Serumkonzentrationen von IL-1 β und denjenigen von CXCL8 bestand (Kapitel 8. Anhang Abb. 2).

Diese Befunde legen nahe, dass es sich bei den beobachteten Veränderungen der Serumkonzentrationen bestimmter Zytokine und Wachstumsfaktoren nicht um für eine HCV-Infektion spezifische Veränderungen handelt, sondern dass diese sich auch im Kontext einer chronischen HBV-Infektion nachweisen lassen. Ferner legt die positive Korrelation der Serumkonzentrationen von IL-1 β und CXCL8 die Vermutung nahe, dass die chronische Hepatitis B Infektion Veränderungen in der Entzündungsreaktion des Wirtsorganismus auslöst, die mit denjenigen vergleichbar sind, die im Kontext der HCV-Infektion beobachtbar sind.

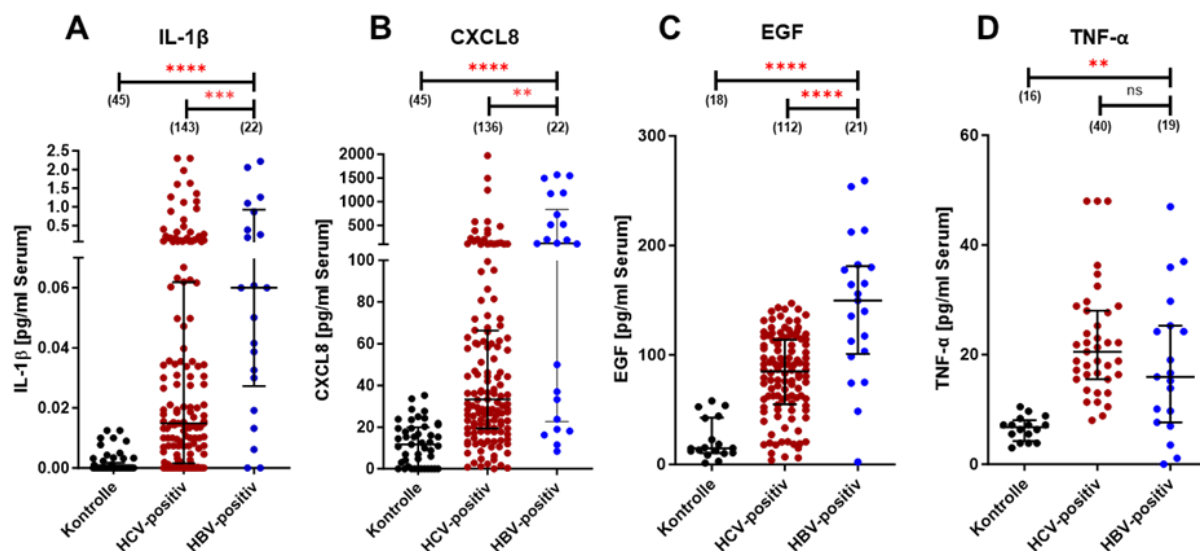


Abbildung 13: Eine Hepatitis B Infektion erhöht die Serumspiegel von IL-1 β , CXCL8, TNF- α und EGF. Seren von HCV-negativen Spendern (Kontrolle), Patienten mit chronischer HCV-Infektion (HCV-positiv), sowie Patienten mit einer HBV-Infektion (HBV positiv) wurden mittels ELISA untersucht. Signifikanzniveaus wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet. Fehlerbalken wurden basierend auf dem Median mit Interquartilsbereich dargestellt. Die Punkte repräsentieren die Werte einzelner Personen. Die Daten wurden mit ** für $p \leq 0,01$, *** für $p \leq 0,001$ bzw. **** für $p \leq 0,0001$ markiert. Ns bedeutet nicht signifikant.

3.2 Das HCV reguliert die basale, IL-1 β - und EGF-induzierte mRNA-Expression von CXCR2-Liganden

Wie vorangehend bereits ausgeführt, sind die Serumspiegel von CXCL8, IL-1 β und EGF bei Patienten mit einer chronischen HCV-Infektion im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden signifikant erhöht (Abb. 9). Des Weiteren bestand eine positive Korrelation zwischen den Serumspiegeln von CXCL8 und IL-1 β sowie EGF (Abb. 11 und 12). Wie bereits einleitend erläutert, legt die aktuelle Literatur nahe, dass CXCR2-Liganden, insbesondere CXCL8, im Rahmen der HCV-Infektion eine entscheidende Rolle zukommt. Insbesondere lassen Untersuchungen an Zellen, die mit einzelnen HCV-Proteinen transfiziert wurden, vermuten, dass das NS5A-Protein des Hepatitis C Virus die mRNA- und Proteinexpression von CXCL8 induziert und hierüber die antivirale Wirkung von Interferon (IFN) hemmt.²⁶¹ Dass HCV eine verstärkte Expression und Produktion von CXCL8 in der Wirtszelle hervorruft, belegen dabei auch Untersuchungen der Arbeitsgruppe, die dies sowohl für das subgenomische HCV-Replikon als auch für eine Infektion mit dem HCV Virusstamm JC1 nachweisen konnten.⁶⁶ Dass CXCL8 möglicherweise tatsächlich eine interferon-antagonistische Wirkung hat, legen die Ergebnisse von Untersuchungen nahe, in denen belegt werden konnte, dass erhöhte Serumkonzentrationen von CXCL8 mit einem Nichtansprechen auf eine Interferontherapie korrelieren.²⁶² Vor dem Hintergrund der beobachteten Korrelationen und der Tatsache, dass in Untersuchungen anderer sowie der Arbeitsgruppe bereits belegt werden konnte, dass HCV die Expression und Produktion von CXCL8 in der Wirtszelle hervorruft, lag es nahe zu prüfen, ob HCV die durch andere Stimuli induzierte Expression und Produktion von CXCL8 beeinflusst. Hierzu wurden Huh 9.13 Zellen, die ein vom Genotyp 1 abgeleitetes subgenomisches HCV-Replikon beherbergen, sowie Huh 7.5-Zellen, die mit dem vom Genotyp 2 abgeleiteten JC1-Stamm infiziert wurden, mit IL-1 β oder EGF stimuliert und die Chemokin-Expression auf Transkriptionsebene analysiert. In Übereinstimmung mit Vorbefunden der Arbeitsgruppe führte sowohl die Präsenz des subgenomischen HCV-Replikons als auch die Infektion mit HCV im Vergleich zu entsprechenden Kontrollzellen zu einer signifikanten Heraufregulation der basalen transkriptionellen Expression von CXCL8 (Abb. 14A und 14C) sowie der basalen Expression anderer CXCR2-Liganden wie CXCL1, CXCL2 und CXCL3 (Kapitel 8, Anhang Abb. 3.1 und 3.2). Zusätzlich konnte eine signifikant verstärkte Induktion der Expression von CXCL8 durch IL-1 β und EGF sowohl in der Replikon-Zelllinie Huh 9.13 als auch in der Infektionszelllinie Huh 7.5 JC1 beobachtet werden (Abb. 14B und 14D). Auch die durch IL-1 β - und EGF-induzierte Expression von CXCL1, CXCL2 und CXCL3 war im Vergleich zur basalen Expression in Gegenwart des HCV-Replikons sowie nach Infektion mit dem HCV-Stamm JC1 signifikant erhöht (Kapitel 8, Anhang Abb. 3.1 und 3.2). Dabei sind die Effekte von HCV auf die Chemokinexpression im Replikonsystem, welches

eher einer chronischen Infektion entspricht, prominenter als im Falle der akuten HCV-Infektion. Für die Chemokine CXCL4, CXCL5, CXCL6 und CXCL7 konnten hingegen keine vergleichbaren Veränderungen durch eine HCV-Infektion hervorgerufen werden.

Diese Ergebnisse belegen, dass sowohl IL-1 β als auch EGF die transkriptionelle Expression von CXCR2-Liganden in hepatozytären Zellen induzieren können und dass sowohl die basale als auch die induzierbare Expression von CXCR2-Liganden in Gegenwart von HCV signifikant verstärkt wird. Es ist daher gut vorstellbar, dass die bei chronisch HCV-infizierten Patienten beobachteten erhöhten Serumkonzentrationen von CXCL8 durch den Einfluss von HCV auf die basale sowie induzierbare Expression derselben in der Wirtszelle mitbedingt sind. Die molekularen Mechanismen, über die HCV die basale bzw. induzierte Expression von CXCR2-Liganden beeinflusst, sind unklar. Zum Teil noch unveröffentlichte Befunde der Arbeitsgruppe lassen annehmen, dass der Aktivierung von NF- κ B sowie der Dysregulation endogener Inhibitoren der EGFR-vermittelten Signalübertragung in diesem Kontext eine Bedeutung zukommt.

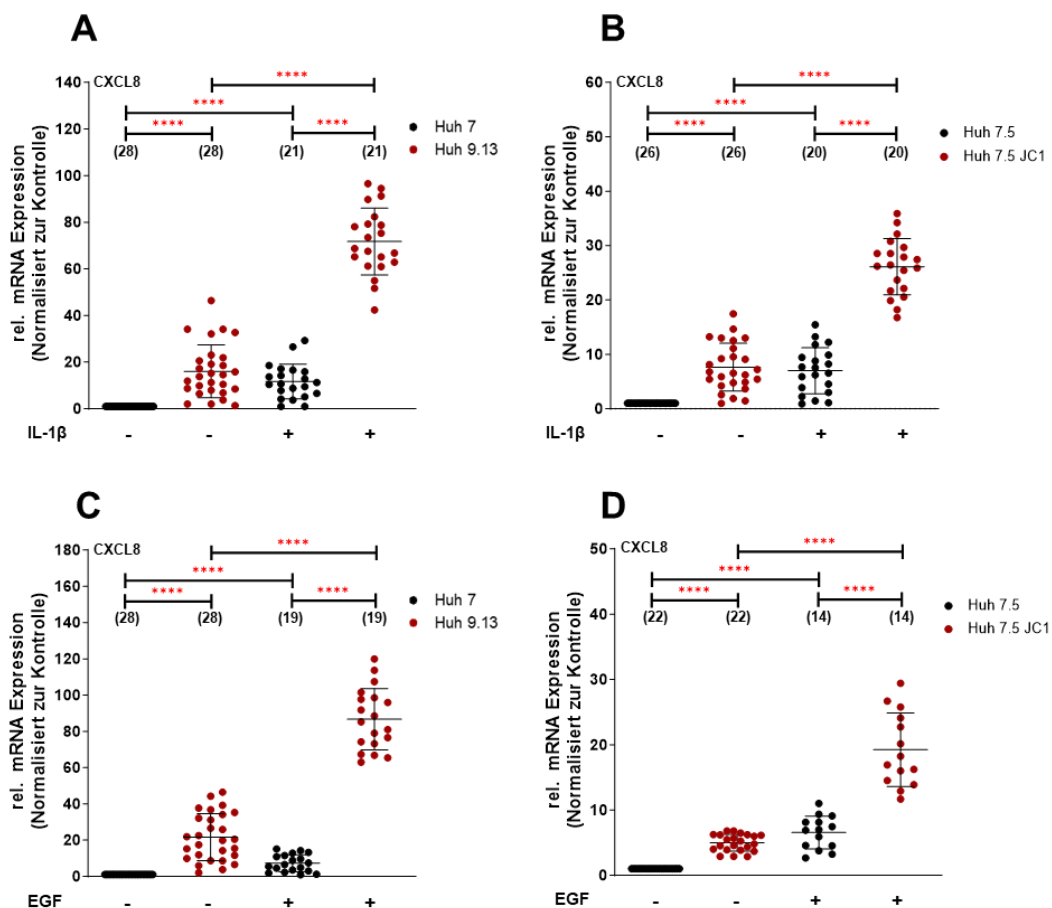


Abbildung 14: Das HCV reguliert die basale, IL-1 β - und EGF-induzierte mRNA-Expression von CXCL8. Huh 9.13 Replikon- (A und C) oder infizierte Huh 7.5-JC1-Zellen (B und D), im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen, wurden für acht Stunden mit 5 U/ml IL-1 β (A und B) oder 40 ng/ml EGF (C und D) stimuliert. Die quantitativen PCR-Ergebnisse wurden unter Anwendung der $\Delta\Delta$ CT-Methode ermittelt und auf SDHA normalisiert. Die Ergebnisse werden als Bruchteile des normalisierten Wertes der Kontrolle ausgedrückt, die auf 1 gesetzt wurde, und die Daten werden als Mittelwert $\pm$ SD dargestellt. Die Signifikanz wurde mittels des Mann-Whitney-U-Tests berechnet. Die Daten wurden mit **** für $p \leq 0,0001$ markiert, sofern eine Signifikanz vorliegt.

3.3 Für das CXCL8-Gen konnten 56 potenziellen Transkriptionsfaktoren identifiziert werden

Ziel der weiterführenden Untersuchungen war es die molekularen Mechanismen über die HCV die transkriptionelle Expression von CXCR2 Liganden und hierbei insbesondere von CXCL8 verstärkt. Hierzu erfolgte eine in siliko Analyse potenzieller Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen in der 5' regulatorischen Region des CXCL8 Gens.

Zur Identifizierung potenzieller Transkriptionsfaktoren für die CXCL8-Expression wurde die Software Promo verwendet. Promo ist ein virtuelles Labor zur Identifizierung vermuteter Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen (TFBS) in DNA-Sequenzen. Die in der TRANSFAC-Datenbank festgelegten Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen (TFBS) werden genutzt, um spezifische Gewichtungsmatrizen für die Prognose von TFBS zu erstellen.^{263, 264} Mit Hilfe der Software konnten 56 Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, die möglicherweise eine Bindungsstelle in der Promotorregion von CXCL8 aufweisen (Abb. 7). Nach eingehender Literaturrecherche wurden zwölf Transkriptionsfaktoren ausgewählt, die in weitergehenden Untersuchungen analysiert werden sollten. Die folgenden Kapitel widmen sich den Ergebnissen einer detaillierteren Untersuchung der Transkriptionsfaktoren NKRF, Oct1, c-Fos, c-Jun, Fos-verwandtes Antigen 1 (Fra1), c-Myb, Interferon-Regulationsfaktor 1 (IRF1), aktivierender Transkriptionsfaktor 3 (ATF3), Signalüberträger und Aktivator der Transkription 1 (STAT1 β), Ying Yang 1 (YY1) sowie Hepatozyten-Nuklearfaktor 1A und 1B (HNF-1A und HNF-1B).

Wie einleitend bereits erörtert, können NKRF und Oct1 an der Unterdrückung spezifischer NF- κ B-Zielgene beteiligt sein, darunter auch CXCL8.²⁶⁵ Dabei sind sowohl für Oct1 als auch für NKRF in der Promotorregion von CXCL8 potenzielle Bindungsstellen beschrieben.^{266, 267} Der Zusammenhang im Kontext der Signalübertragung von IL-1 β sowie der Einfluss von HCV darauf wurde bislang jedoch nicht untersucht. Zusätzlich zur Repression von NF- κ B kann Oct1 auch die Transkriptionsaktivität des AP-1 Komplexes regulieren. Es ist denkbar, dass diese Faktoren bzw. Signalmechanismen auch im Kontext der Aktivierung des CXCL8-Promoters durch IL-1 β und EGF in Hepatozyten eine Rolle spielen, wobei dieser Aspekt bislang nicht im Detail untersucht wurde. Der AP-1 Komplex, welcher neben NF- κ B ebenfalls als relevant für die Regulation der CXCL8-Expression beschrieben wurde, setzt sich unter anderem aus c-Fos, c-Jun und Fra1 zusammen.²⁶⁸ C-Myb ist ein sequenzspezifisches DNA-bindendes Protein, das die Expression von Genen reguliert, die an der Zellproliferation und Differenzierung beteiligt sind.²⁶⁹ Bei Patienten mit chronischer HCV-Infektion wurde bereits eine verminderte Expression von c-Myb beschrieben.²⁷⁰ IRF1 spielt eine entscheidende Rolle bei der Vermittlung der Immunantwort während einer Infektion und steht in enger Verbindung mit NF- κ B.^{271, 272}

ATF3 gehört zur Familie der aktivierenden Transkriptionsfaktoren/CREB-Proteine (cAMP-reaktive Element-bindende Proteine) bei Säugetieren. Mehrere Studien haben bereits belegt, dass CREB für die Regulation der CXCL8-Expression eine wichtige Rolle spielen kann.²⁰⁴ STAT1 β , ein Mitglied der STAT-Familie, fungiert im IFN-Signalweg und spielt eine zentrale Rolle bei vielen IFN-abhängigen biologischen Reaktionen. IFN können die Expression von CXCL8 induzieren.²⁷³ YY1 ist ein multifunktionales Protein, das je nach zellulärem Kontext die Genexpression aktivieren oder unterdrücken kann. Es wird mit Lebererkrankungen in Verbindung gebracht, die auch Folgen einer HCV-Infektion sein können.²⁷⁴ HNF-1A und HNF-1B spielen eine wesentliche Rolle bei der Regulation von Lebergenen sowie bei der HCV-Genexpression und Subgenom-Replikation.²⁷⁵ Bezüglich der Expression von CXCL8 ist ihre Rolle derzeit unbekannt.

Zusammenfassend wurden zwölf Transkriptionsfaktoren identifiziert, die möglicherweise in die Verstärkung der basalen wie auch induzierbaren Expression des CXCL8 Gens durch HCV von Bedeutung sein könnten.

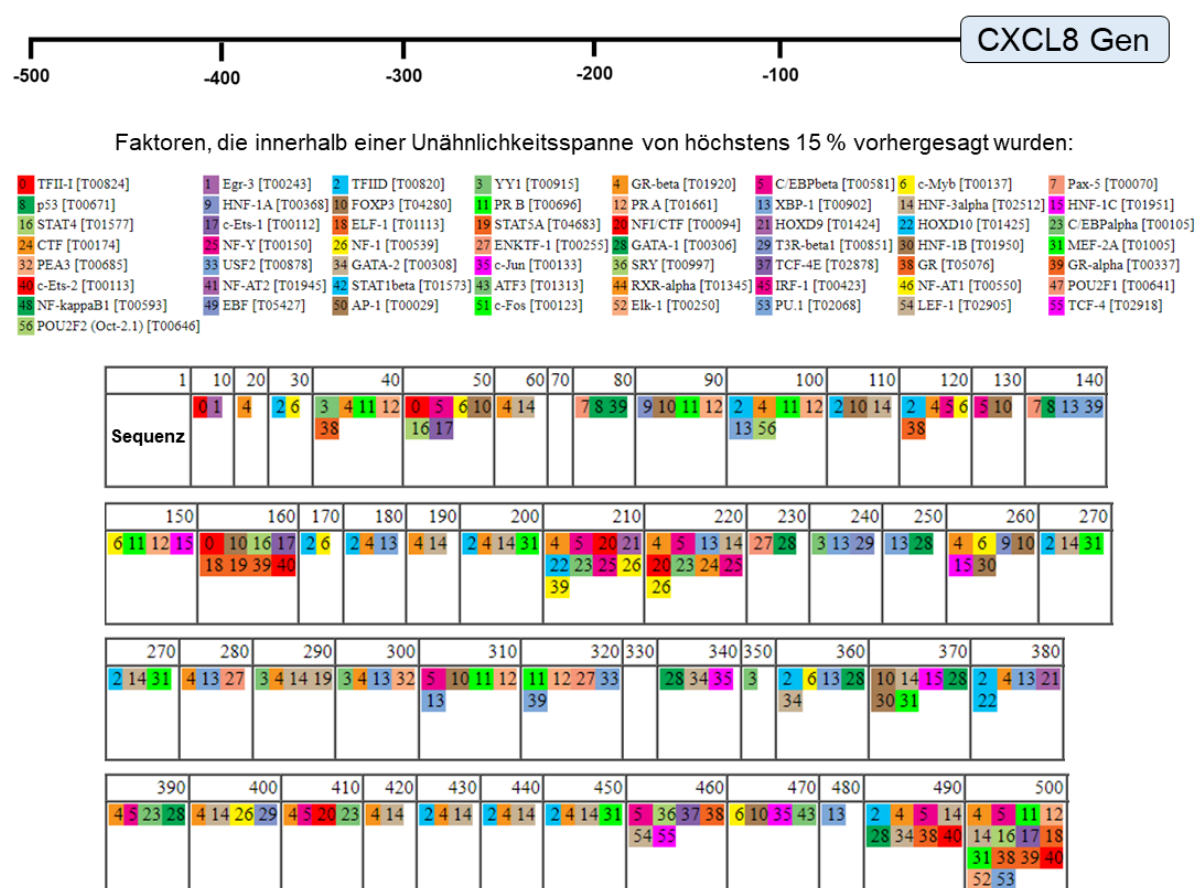


Abbildung 15: 56 potenzielle Transkriptionsfaktoren, die an der Expression von CXCL8 beteiligt sein könnten. Für die Bestimmung potenzieller Transkriptionsfaktoren für die Expression von CXCL8, wurde die Promotorsequenz von CXCL8 in die Software Promo eingegeben.^{263, 264} Daraufhin prognostizierte die Software 56 Faktoren, die möglicherweise eine Bindung an den Promotor aufweisen könnten. Die Sequenz gibt an, wo jeder Transkriptionsfaktor eine potenzielle Bindungsstelle in der Promotorsequenz haben könnte. (Darstellung modifiziert von Farre *et al.* und Messeguer *et al.*)

3.3.1 HCV beeinflusst die Expression von Transkriptionsfaktoren auf transkriptioneller Ebene

Um zu untersuchen, ob das HCV einen direkten Einfluss auf einen der zuvor bestimmten Transkriptionsfaktoren ausübt, wurden HCV-Replikon-Zellen (Huh 9.13) sowie Zellen, die mit dem JC1-Virus infiziert wurden (Huh 7.5 JC1), sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene analysiert und mit entsprechenden Kontrollen verglichen. In sowohl dem Replikon-System als auch dem Infektionssystem konnte eine signifikante Steigerung der transkriptionellen mRNA-Expression von c-Fos, c-Jun, Fra1, IRF1 und ATF3 detektiert werden (Abb. 16A – 16E und 17A – 17B). Im Gegensatz dazu führte die Präsenz bzw. Infektion mit HCV zu einer reduzierten Expression der Transkripte von c-Myb, NKRF und Oct1 (Abb. 16F – 16H und 17F – 17H), während der Expression der Transkriptionsfaktoren YY1, STAT1 β , HNF-1A und HNF-1B auf Transkriptebene unbeeinflusst blieb (Abb. 16I – 16L und 17I – 17L).

Interessant ist, dass die Induktion der Expression von c-Fos, c-Jun und ATF3 insbesondere durch eine akute Infektion mit HCV heraufreguliert wird (Abb. 16A, 16B, 16D und Abb. 17A, 17B und 17D) und weniger ausgeprägt durch das Replikonsystem. Hingegen war die reduzierte Expression von NKRF, Oct1 und c-Myb zwar in beiden experimentellen Settings signifikant reduziert, jedoch vorrangig im Replikonsystem zu beobachten. Auf Proteinebene konnte auch nach Evaluation mehrerer Antikörper kein geeigneter Antikörper für die Untersuchung von Oct1 im Immunblot identifiziert werden. Hingegen konnte die Herabregulation von NKRF sowie die Heraufregulation von c-Jun auch auf Proteinebene nachgewiesen werden (Abb. 18A und 18B). Die HCV-bedingte Heraufregulation von Fra1 auf Transkriptebene konnte auf Proteinebene nicht nachvollzogen werden (Abb. 18C).

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse darauf hin, dass HCV die Expression von Transkriptionsfaktoren signifikant beeinflusst. Dabei spielen insbesondere c-Jun, c-Fos, NKRF und Oct1 eine relevante Rolle für NF- κ B- und AP-1-abhängige Signalübertragungsprozesse.^{265,268}

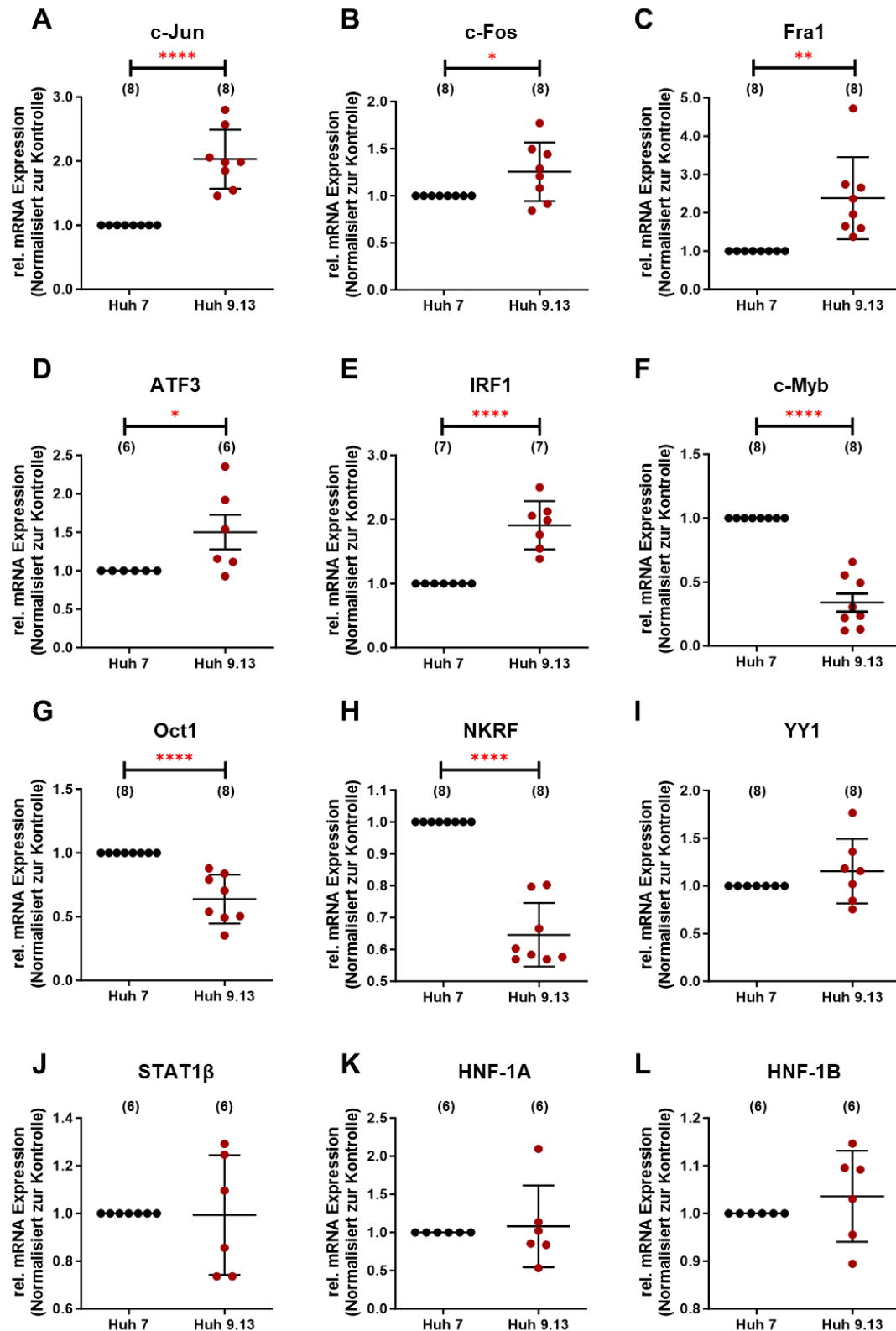


Abbildung 16: Das HCV verstärkt direkt die Expression der Transkriptionsfaktoren c-Fos, c-Jun, Fra1, IRF1 und ATF3 im Replikon-System, während es die Expression von c-Myb, NKRF und Oct1 signifikant reduziert. Die Faktoren wurden in Huh-Zellen, mit dem HCV-Replikon (Huh 9.13) oder in Huh7-Zellen als Kontrolle analysiert. Die quantitativen PCR-Ergebnisse wurden unter Anwendung der $\Delta\Delta CT$ -Methode ermittelt und auf SDHA normalisiert. Die Ergebnisse werden als Bruchteile des normalisierten Wertes der Kontrolle ausgedrückt, die auf 1 gesetzt wurde, und die Daten werden als Mittelwert $\pm$ SD dargestellt. Die Signifikanz wurde mittels des Mann-Whitney-U-Tests berechnet. Die Daten wurden mit * für $p \leq 0,05$, ** für $p \leq 0,01$, *** für $p \leq 0,001$ und **** für $p \leq 0,0001$ markiert, sofern eine Signifikanz vorliegt.

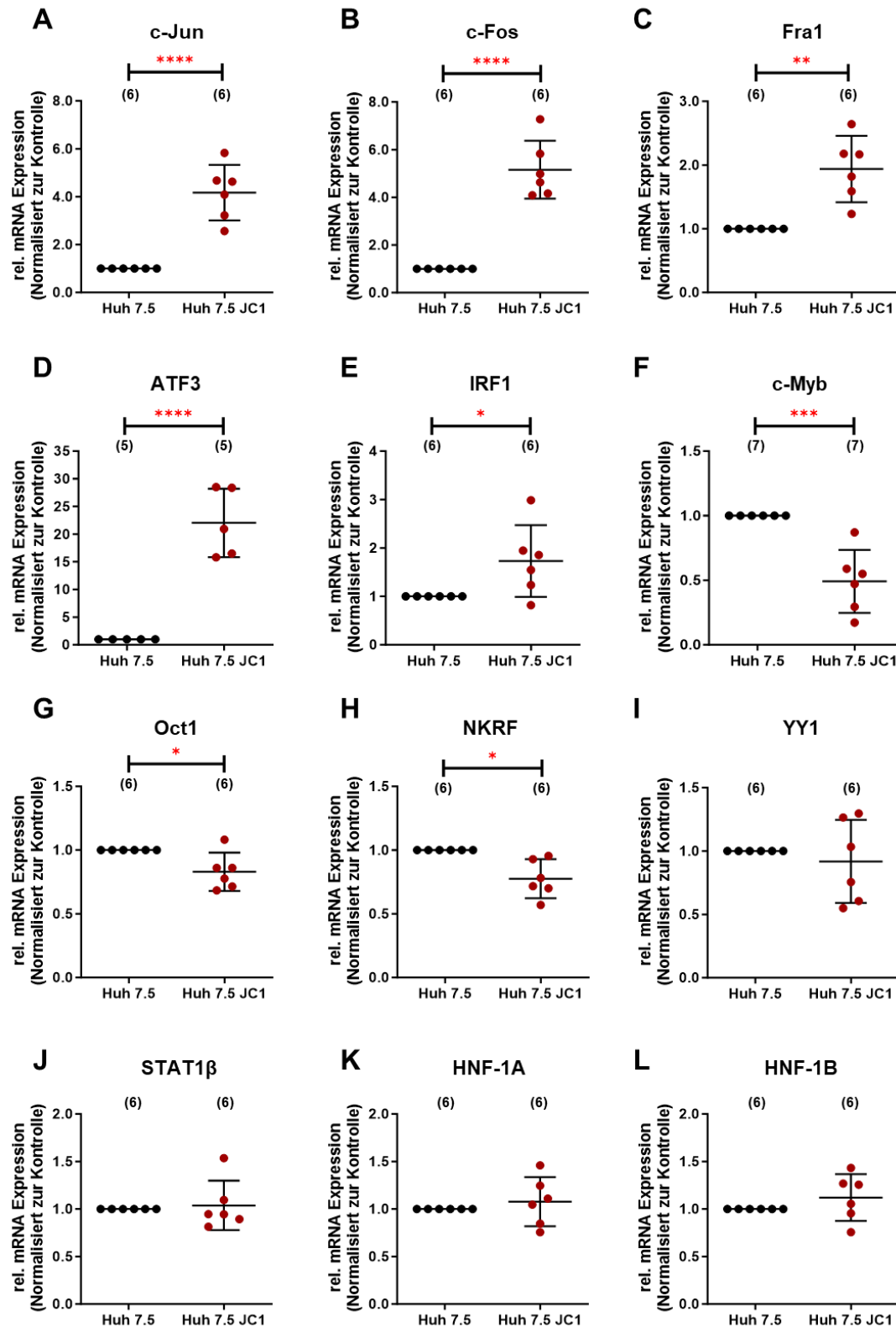


Abbildung 17: Das HCV verstärkt direkt die Expression der Transkriptionsfaktoren c-Fos, c-Jun, Fra1, IRF1 und ATF3 im Infektionssystem, während es die Expression von c-Myb, NKRF und Oct1 signifikant reduziert. Im Rahmen der Untersuchung wurden die Faktoren in Huh 7.5-Zellen, die entweder mit dem JC1-Virus (MOI = 1) infiziert wurden (Huh 7.5 JC1), oder als Kontrolle in Huh 7.5-Zellen analysiert. Die quantitativen PCR-Ergebnisse wurden unter Anwendung der $\Delta\Delta CT$ -Methode ermittelt und auf SDHA normalisiert. Die Ergebnisse werden als Bruchteile des normalisierten Wertes der Kontrolle ausgedrückt, die auf 1 gesetzt wurde, und die Daten werden als Mittelwert $\pm$ SD dargestellt. Die Signifikanz wurde mittels des Mann-Whitney-U-Tests berechnet. Die Daten wurden mit * für $p \leq 0,05$, ** für $p \leq 0,01$, *** für $p \leq 0,001$ und **** für $p \leq 0,0001$ markiert, sofern eine Signifikanz vorliegt.

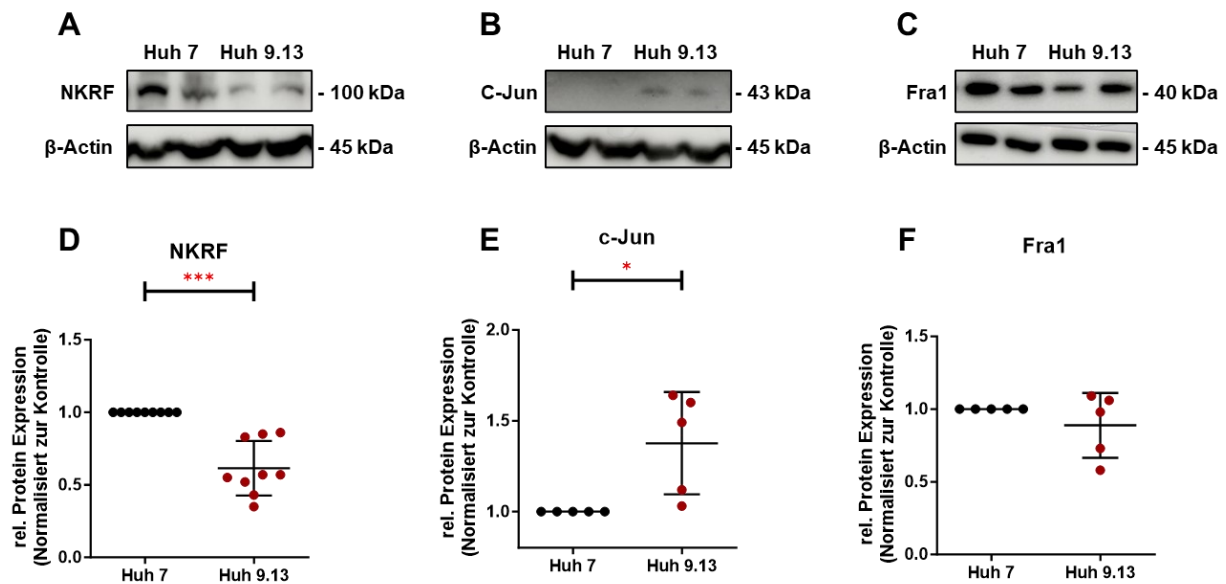


Abbildung 18: HCV moduliert die Protein Expression von c-Jun, NKRF. Western Blots wurden bei Zellen mit dem das subgenomische HCV-Replikon (Huh 9.13) und Kontrollzellen (Huh 7) durchgeführt. A bis C zeigen repräsentative Immunoblots aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. D bis E zeigen densitometrische Berechnungen der entsprechenden Immunoblots. Die Gesamtproteinexpression wurde relativ zur Expression des Referenz-β-Actins berechnet. Die Ergebnisse werden als Bruchteile des normalisierten Wertes der Kontrolle ausgedrückt, die auf 1 gesetzt wurde, und die Daten werden als Mittelwerte $\pm$ SD dargestellt. Die Signifikanz wurde mittels des Mann-Whitney-U-Tests berechnet. Die Daten wurden mit * für $p \leq 0,05$, ** für $p \leq 0,01$, *** für $p \leq 0,001$ und **** für $p \leq 0,0001$ markiert, sofern eine Signifikanz vorliegt.

3.3.2 IL-1 β induziert die transkriptionelle Expression von c-Jun, c-Fos, c-Myb, Fra1, ATF3 und IRF1

Wie oben bereits demonstriert, sind die IL-1 β -Serumspiegel bei Patienten mit chronischer HCV-Infektion erhöht (vgl. Kapitel 3.1). Zusätzlich ist bekannt, dass IL-1 β neben CXCL8 eine Vielzahl anderer Faktoren induziert.^{276, 277} Um die potenzielle Auswirkung von IL-1 β auf die zuvor analysierten Transkriptionsfaktoren zu bestimmen, wurden sowohl HCV-Replikon Zellen (Huh 9.13), als auch Kontrollen (Huh 7) mit IL-1 β stimuliert und mittels qPCR analysiert. Um eine präzisere Aussage über die IL-1 β -abhängige Induktion zu treffen, wurden die Zellen über einen Zeitraum von einer bis 48 Stunden mit 5 U/ml IL-1 β stimuliert.

Bereits eine Stunde nach der Stimulation mit IL-1 β ließ sich ein signifikanter Anstieg von c-Jun und c-Fos nachweisen. Beide erreichten ihre höchste Expression nach acht Stunden und nahmen kontinuierlich ab, bis sie nach 24 Stunden wieder auf das Expressionsniveau ohne Stimulation zurückgingen (Abb. 19A und 19B). Im Gegensatz dazu wies c-Myb erst nach acht Stunden einen deutlichen Anstieg auf und blieb selbst nach 48 Stunden im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle deutlich erhöht (Abb. 19C). Dagegen wurde die transkriptionelle Expression von Fra1, ATF3 und IRF1 im Beobachtungszeitraum nur transient induziert und erreichte ein Maximum vier bis sechs Stunden nach der Stimulation. Nach acht Stunden war

eine kontinuierliche Abnahme der durch IL-1 β induzierten Expression zu beobachten (Abb. 20A bis 20C). Nach 48 Stunden wiesen Fra1, ATF3 und IRF1 ein Niveau auf, das dem der nicht stimulierten Kontrollzellen entsprach (Abb. 20). Interessant ist, dass die Stimulation mit IL-1 β den Einfluss des subgenomischen HCV-Replikons auf die Expression der untersuchten Transkripte nicht veränderte. IL-1 β hatte keinen Einfluss auf die Expression von NKRF, Oct1 und YY1 (Daten nicht dargestellt).

STAT1 β , HNF-1A und HNF-1B wurden nicht weiter untersucht, da sich bei ihnen, im Gegensatz zu den anderen Faktoren, kein Hinweis auf eine Beeinflussung durch HCV auf Transkriptebene ergab (vgl. Kapitel 3.3.1). Angesichts dessen, dass die meisten Faktoren ihre maximale Expression nach ungefähr acht Stunden erreichten, wurde für sämtliche nachfolgenden Experimente eine Stimulationsdauer von acht Stunden festgelegt.

Die Ergebnisse legen nahe, dass IL-1 β die Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren induzieren kann und dass sowohl die basale als auch die induzierbare Expression derselben durch HCV beeinflusst wird.

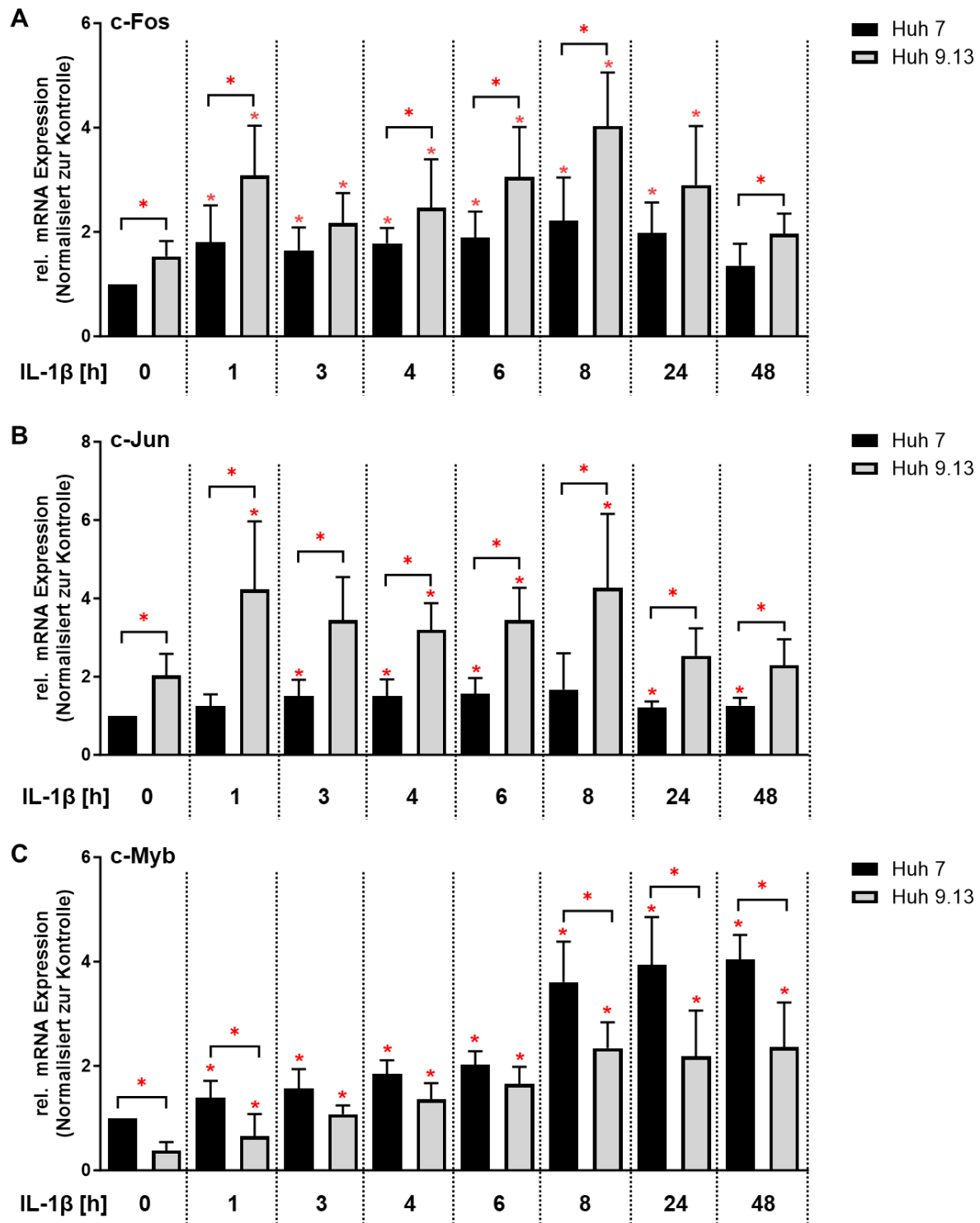


Abbildung 19: IL-1β induziert die transkriptionelle Expression von c-Fos, c-Jun und c-Myb. Die mRNA-Expression von c-Fos, c-Jun und c-Myb wurde mittels qRT-PCR in Zellen mit dem subgenomischen HCV-Replikon (Huh 9.13) analysiert und mit entsprechenden Kontrollzellen verglichen. Die quantitativen PCR-Ergebnisse wurden unter Verwendung der $\Delta\Delta CT$ -Methode ermittelt und auf SDHA normalisiert. Die Ergebnisse werden als Bruchteile des normalisierten Wertes der Kontrolle ausgedrückt, die auf 1 gesetzt wurde. Die Daten werden als Mittelwerte $\pm$ SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test ermittelt. Sterne (*) ohne Linien markieren Unterschiede zwischen den stimulierten Zellen im Vergleich zu den entsprechenden nicht stimulierten Kontrollzellen. Signifikante Unterschiede zwischen dem Replikon-System und den Kontrollzelllinien sind durch Sterne (*) mit Linien markiert.

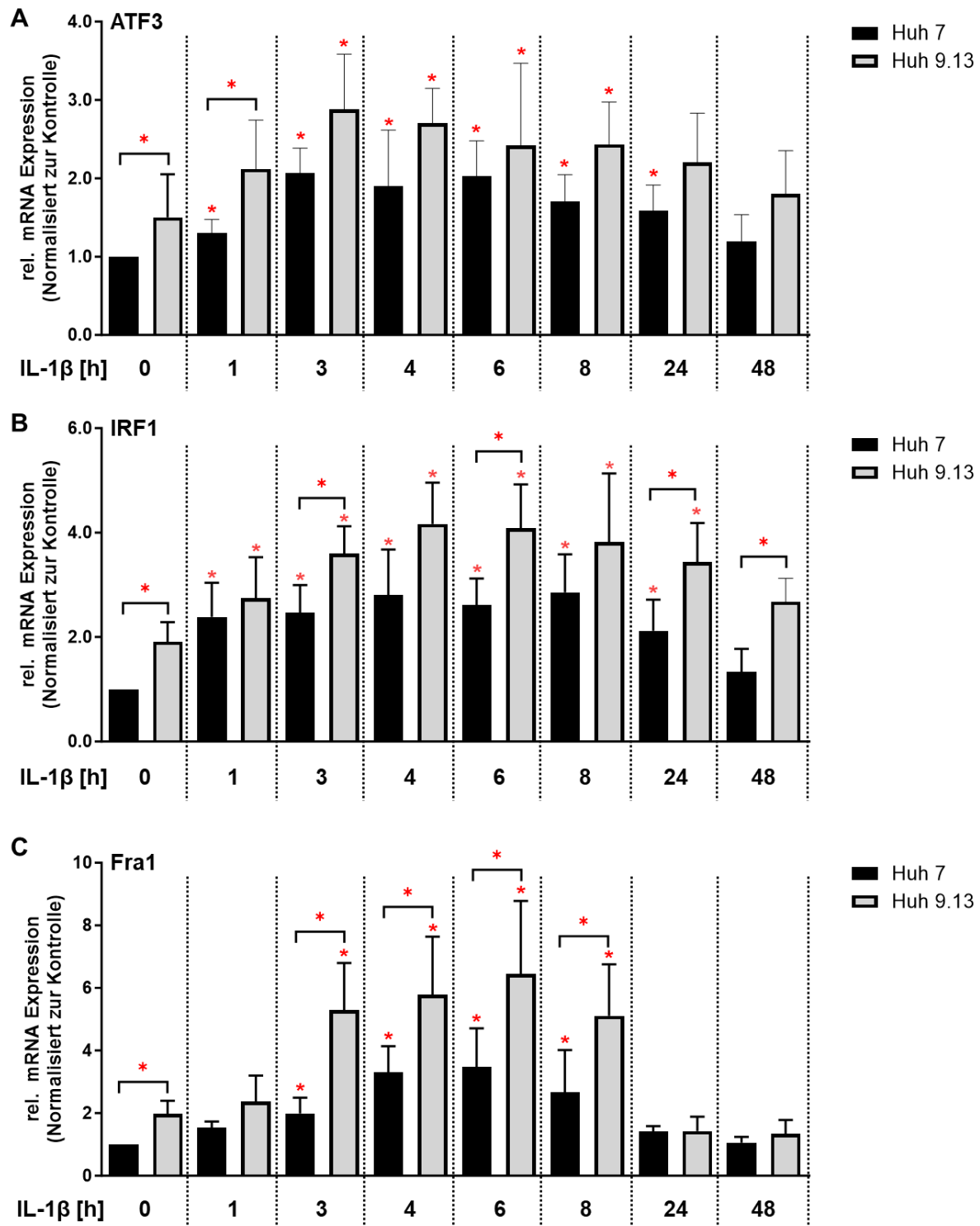


Abbildung 20: IL-1 β induziert die transkriptionelle Expression von ATF3, IRF1 und Fra1. Die mRNA-Expression von ATF3, IRF1 und Fra1 wurde mittels qRT-PCR in Zellen mit dem subgenomischen HCV-Replikon (Huh 9.13) analysiert und mit entsprechenden Kontrollzellen verglichen. Die quantitativen PCR-Ergebnisse wurden unter Verwendung der $\Delta\Delta CT$ -Methode ermittelt und auf SDHA normalisiert. Die Ergebnisse werden als Bruchteile des normalisierten Wertes der Kontrolle ausgedrückt, die auf 1 gesetzt wurde. Die Daten werden als Mittelwerte $\pm$ SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Die Signifikanz wurde mittels des Mann-Whitney-U-Tests berechnet. Sterne (*) ohne Linien markieren Unterschiede zwischen den stimulierten Zellen im Vergleich zu den entsprechenden nichtstimulierten Kontrollzellen. Signifikante Unterschiede zwischen dem Replikon-System und den Kontrollzelllinien sind durch Sterne (*) mit Linien markiert.

3.4 Die Verstärkung der basalen wie auch der IL-1 β -induzierten Expression von CXCR2-Liganden involviert sowohl AP-1 als auch NF- κ B vermittelte Signale

Die Relevanz der identifizierten Faktoren, deren Expression durch HCV sowie teilweise auch durch IL-1 β moduliert wird, für den Einfluss von HCV auf die basale und induzierbare Expression von CXCL8 wurde weitergehend mit Hilfe von Inhibitoren bzw. Gen-Knockdown mittels spezifischer siRNA untersucht. Vorbefunde der Arbeitsgruppe legen nahe, dass die basale und induzierbare Expression der CXCL8-mRNA durch einen Gen-Knockdown der NF- κ B-Untereinheit p65 mittels spezifischer siRNA deutlich reduziert wird. Allerdings ließen sich hierdurch die verstärkenden Effekte von HCV nur partiell aufheben.²⁵²

3.4.1 Für die IL-1 β induzierte transkriptionelle Regulation der CXCL8-Expression sowie für den Einfluss von HCV hierauf spielt der AP-1 Komplex eine relevante Rolle

Neben NF- κ B ist auch der AP-1 Komplex in die transkriptionelle Regulation von CXCL8 involviert.²⁶⁸ Zu den zentralen Komponenten, aus denen sich der AP-1 Komplex zusammensetzt, gehören unter anderem c-Jun und c-Fos. Deren Expression kann sowohl durch HCV als auch durch IL-1 β heraufreguliert werden (Abb. 19).²⁷⁸

Um zu untersuchen, ob AP-1 ebenfalls eine wichtige Rolle für den Einfluss von HCV auf die basale wie auch die IL-1 β -induzierbare Expression von CXCL8 spielt, wurden zunächst Inhibitor Versuche durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden Zellen mit dem subgenomischen HCV-Replikon sowie entsprechende Kontrollzellen mit einem AP-1 Inhibitor und IL-1 β behandelt. Die Behandlung mit dem AP-1 Inhibitor führte zu einer signifikanten Reduktion der basalen und der IL-1 β -induzierbaren Expression von CXCL8 sowohl in den Huh 9.13-Zellen als auch in den Huh 7-Kontrollzellen (Abb. 21). Allerdings ließ sich der verstärkende Einfluss von HCV, insbesondere auf die IL-1 β -induzierte Expression von CXCL8, durch Hemmung von AP-1 nur teilweise beeinflussen.

Die Ergebnisse legen nahe, dass der AP-1 Komplex eine Rolle bei der transkriptionellen Regulation der CXCL8-Expression sowohl durch IL-1 β als auch durch HCV spielen könnte.

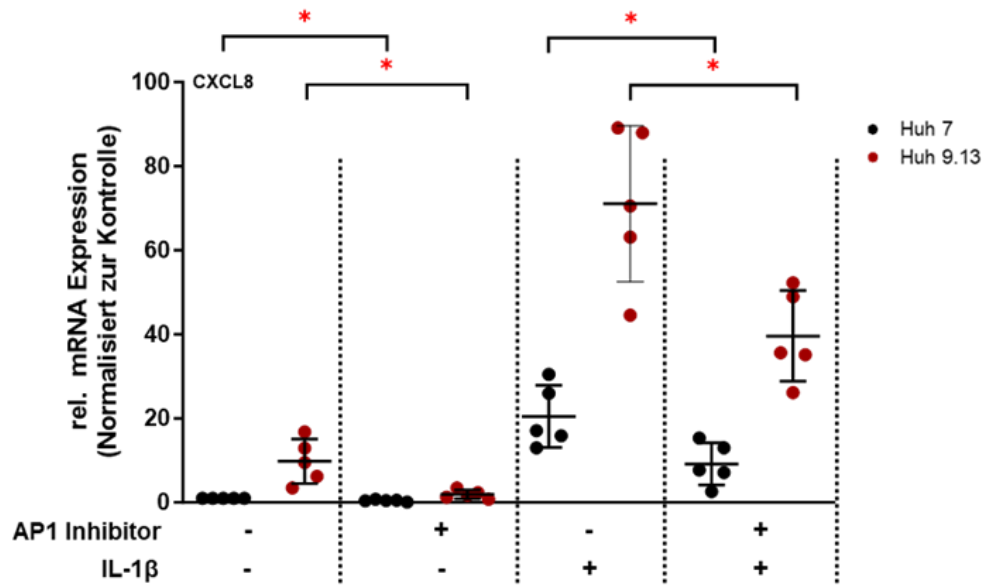


Abbildung 21: Der AP-1 Komplex ist an der HCV induzierten CXCL8 Expression beteiligt. Zellen, die das subgenomische HCV-Replikon (Huh 9.13) tragen, sowie entsprechende Kontrollzellen (Huh 7) wurden neun Stunden lang mit 100 nm des AP-1 Inhibitors SR 11302 und acht Stunden lang mit fünf U/ml IL-1 β behandelt. Die mRNA-Expression von CXCL8 wurde mittels qRT-PCR analysiert und verglichen. Die quantitativen PCR-Ergebnisse wurden unter Verwendung der $\Delta\Delta CT$ -Methode ermittelt und auf SDHA normalisiert. Die Ergebnisse wurden als Bruchteile des normalisierten Wertes der Kontrolle ausgedrückt, die auf 1 gesetzt wurde, und die Daten wurden als Mittelwert $\pm$ SD dargestellt. Die Signifikanz wurde mittels des Mann-Whitney-U-Tests berechnet. Daten mit einem Stern (*) wurden markiert, um eine Signifikanz bei $p \leq 0,05$ zu kennzeichnen.

Um zu bestimmen, welche Komponenten des AP-1 Komplexes für die Regulation der CXCL8-Expression durch IL-1 β und deren Modulation durch HCV verantwortlich sind, wurden Versuche mit selektivem Knockdown von c-Fos oder c-Jun mittels spezifischer siRNA durchgeführt. Wie in Abbildung 22 dargestellt, führt der Gen-Knockdown von c-Fos und c-Jun annähernd zu einer vollständigen Aufhebung des verstärkenden Effekts von HCV auf die basale Transkript Expression von CXCL8 und zu einer signifikanten Reduktion der IL-1 β -induzierten CXCL8-Expression. Hierbei war jeweils die Herabregulation der Expression von c-Fos oder c-Jun ausreichend, während eine kombinierte Herabregulation beider Faktoren keinen additiven Effekt hatte (Abb. 22E).

Nach der Herunterregulation von c-Fos und c-Jun in Replikonzellen wurde zusätzlich eine Verringerung der Expression von CXCL1 und CXCL2 festgestellt (Kapitel 8, Anhang Abb. 4). Auf die Expression von CXCL3 konnte kein signifikanter Effekt durch die Herunterregulation der Komponenten von AP-1 detektiert werden.

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse darauf hin, dass der AP-1 Komplex vor allem für die Heraufregulation der basalen Expression von CXCL8 durch HCV eine wichtige Rolle spielt und auch an der IL-1 β -induzierten Heraufregulation der CXCL8-Expression beteiligt ist.

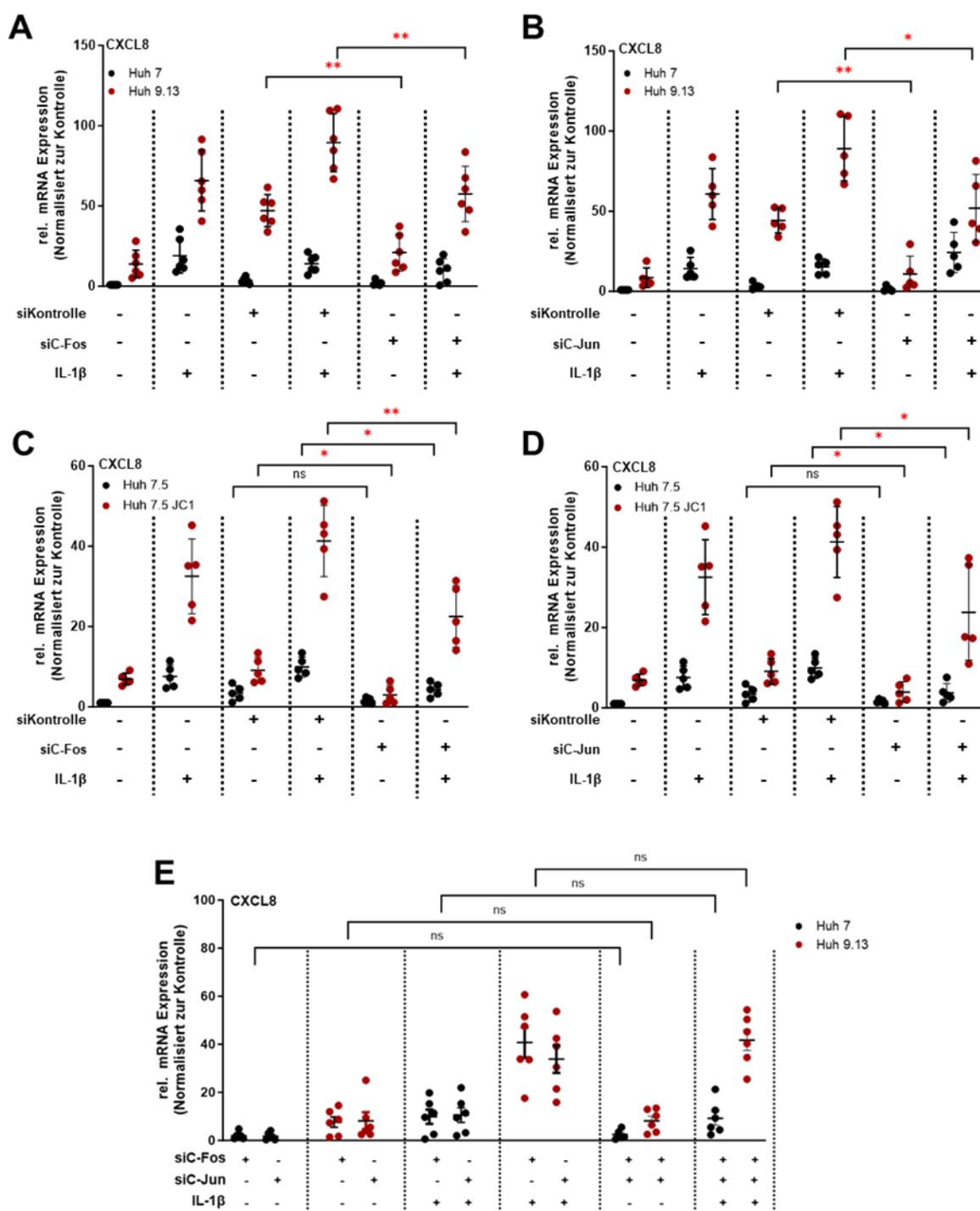


Abbildung 22: C-Fos und c-Jun sind essenziell für die Modulation von CXCL8. Die Expression von CXCL8 mRNA wurde mittels qRT-PCR in Huh9.13- oder Huh7.5-Zellen, die mit dem HCV JC1-Stamm (MOI = 1) infiziert waren, analysiert und mit entsprechenden Kontrollzellen verglichen. Die Zellen wurden 48 Stunden mit spezifischer SiRNA gegen c-Fos oder c-Jun behandelt und anschließend für acht Stunden mit fünf U/ml IL-1 β behandelt. Die quantitativen PCR-Ergebnisse wurden unter Verwendung der $\Delta\Delta$ CT-Methode ermittelt und auf SDHA normalisiert. Die Ergebnisse wurden als Bruchteile des normalisierten Wertes der Kontrolle ausgedrückt, die auf 1 gesetzt wurde, und die Daten wurden als Mittelwert $\pm$ SD dargestellt. Die Signifikanz wurde mittels des Mann-Whitney-U-Tests berechnet. Die Daten wurden mit * für $p \leq 0,05$, ** für $p \leq 0,1$, *** für $p \leq 0,001$ und **** für $p \leq 0,0001$ markiert, sofern eine Signifikanz vorliegt.

3.4.2 Oct1 und NKRF supprimieren die Expression von CXCR2-Liganden

Zusätzlich zu NF- κ B und dem AP-1 Komplex sind noch weitere Faktoren bekannt die für die Regulation der CXCL8 eine Rolle spielen. Ein entscheidender Faktor, der sowohl NF- κ B als auch den AP-1 Komplex beeinflussen kann, ist Oct1.^{279,280} Für Oct1 ist beschrieben, dass es an eine Promotorsequenz der 5'-regulatorischen Region des CXCL8 Gens bindet und hierdurch die Bindung des Transkriptionsfaktors C/EBP an diese Region verhindert. Im Falle einer Aktivierung wird Oct1 über noch unklare Mechanismen durch C/EBP ersetzt und ermöglicht so die Rekrutierung des Co-Aktivators CBP/p300, was zu einer Histon-Hyperacetylierung und einer Umgestaltung des Chromatins führt. Dies ist Voraussetzung für die Bindung des transkriptionellen Aktivator-Komplexes, der AP-1 und NF- κ B beinhaltet und die Aktivierung der Transkription des CXCL8-Gens.¹⁸⁶ Zusätzlich kann NKRF mit negativ regulatorischen Elementen interagieren und hierüber die NF- κ B-vermittelte transkriptionelle Aktivierung des CXCL8-Gens hemmen.²⁸¹ Das bedeutet, dass sowohl Oct1 als auch NKRF als negative regulatorische Faktoren der CXCL8-Genexpression wirken können, indem sie die Funktion von NF- κ B bzw. des AP-1 Komplexes inhibieren. Um die Bedeutung von Oct1 und NKRF für die HCV- und IL-1 β -induzierte CXCL8-Expression zu untersuchen, wurden siRNA-Versuche mit beiden Faktoren durchgeführt und geprüft, ob sie die Wirkung von HCV simulieren können bzw. die transkriptionelle Aktivierung des CXCL8-Gens durch HCV und/oder IL-1 β verstärken. Interessanterweise führt sowohl der Gen-Knockdown der Genexpression von Oct1 als auch von NKRF zu einer signifikanten Steigerung der basalen Transkription des CXCL8-Gens (Abb. 23). Dieser Effekt lässt sich durch den kombinierten Gen-Knockdown beider Faktoren noch verstärken. Dabei ist bereits der Gen-Knockdown von NKRF bzw. Oct1 allein in der Lage, den Einfluss von HCV auf die basale Genexpression von CXCL8 zu simulieren, wobei der Einfluss des HCV-Replikons auf die Genexpression nur unwesentlich durch den zusätzlichen Gen-Knockdown eines der beiden Faktoren steigerbar ist. Dies verhält sich im Falle der akuten Infektion mit dem JC1-Virus anders, da hier der Gen-Knockdown eines der beiden Faktoren und die zusätzliche Infektion der Zelle mit dem JC1-Virusstamm zu einer synergistischen Verstärkung der transkriptionellen Expression des CXCL8-Gens führt. Diese Differenz lässt sich am ehesten durch die Tatsache erklären, dass die Herabregulation der Genexpression von NKRF und Oct1 im Replikon-System, und damit in einem Setting, welches vorwiegend durch die chronische Expression von HCV-Proteinen in der Wirtszelle gekennzeichnet ist, deutlich stärker ausfällt als im akuten Infektionssystem. Vergleichbare Einflüsse des Gen-Knockdowns von Oct1 oder NKRF lassen sich für die Aktivierung der CXCL8-Genexpression durch IL-1 β in Gegenwart oder Abwesenheit des HCV-Replikons bzw. des HCV-Virus beobachten, wobei hier sowohl der Gen-Knockdown von Oct1 als auch der von NKRF oder der kombinierte Gen-Knockdown die transkriptionelle Aktivierung

des CXCL8-Gens durch IL-1 β synergistisch beeinflussen (Abb. 23E). Die Suppression der Genexpression der Faktoren c-Myb, YY1, ATF3, IRF1 und Fra1 mittels siRNA hatte keinen nachweisbaren Einfluss auf die Expression von CXCL8 (Daten nicht dargestellt).

Diese Ergebnisse legen nahe, dass HCV durch die Modulation negativer Regulatoren zu einer veränderten Aktivierung von NF- κ B und AP-1 führt und über die konsekutiv veränderte Genexpression die intrazelluläre Kommunikation modifiziert.

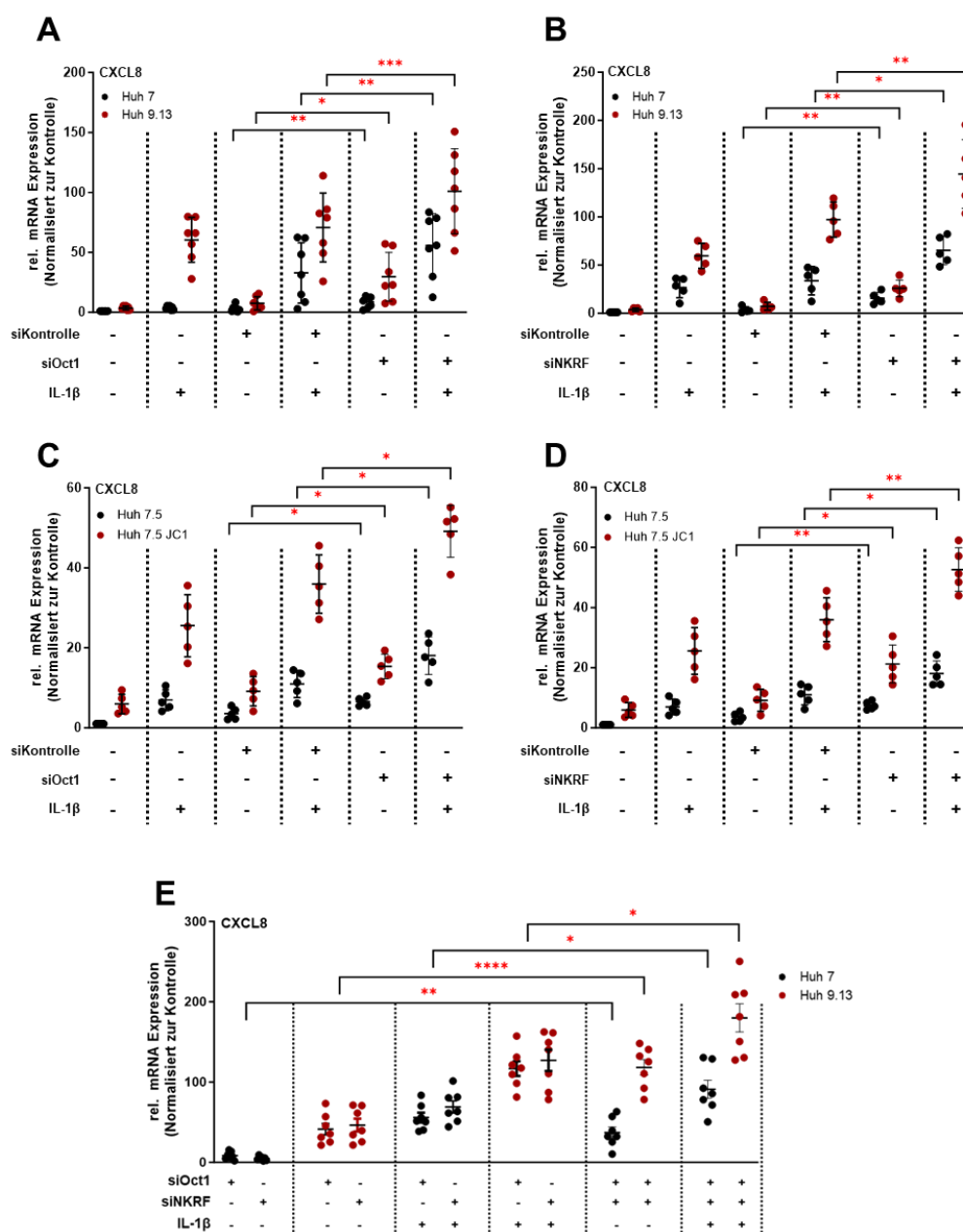


Abbildung 23: Oct1 und NKRf sind negative Regulatoren für CXCL8. Die Expression von CXCL8 mRNA wurde mittels qRT-PCR in Huh9.13- oder Huh7.5-Zellen, die mit dem HCV JC1-Stamm (MOI = 1) infiziert waren, analysiert und mit entsprechenden Kontrollzellen verglichen. Die Zellen wurden 48 Stunden mit spezifischer SiRNA gegen Oct1 oder NKRf behandelt und anschließend für acht Stunden mit fünf U/ml IL-1 β behandelt. Die quantitativen PCR-Ergebnisse wurden unter Verwendung der $\Delta\Delta$ CT-Methode ermittelt und auf SDHA normalisiert. Die Ergebnisse wurden als Bruchteile des normalisierten Wertes der Kontrolle ausgedrückt, die auf 1 gesetzt wurde, und die Daten wurden als Mittelwert $\pm$ SD dargestellt. Die Signifikanz wurde mittels des Mann-Whitney-U-Tests berechnet. Die Daten wurden mit * für $p \leq 0,05$, ** für $p \leq 0,01$, *** für $p \leq 0,001$ und **** für $p \leq 0,0001$ markiert, sofern eine Signifikanz vorliegt.

3.5 EGF induziert die transkriptionelle Expression von c-Jun, c-Fos, c-Myb, Fra1, ATF3 und IRF1

Wie oben bereits demonstriert und in vorangehenden Arbeiten der Arbeitsgruppe belegt, sind die Serumspiegel von EGF bei Patienten mit chronischer HCV-Infektion ebenfalls erhöht (vgl. Kapitel 3.1). Ferner legen Befunde der Arbeitsgruppe nahe, dass EGF, insbesondere im Kontext der HCV-Infektion, die Expression von CXCL8 in der Wirtszelle heraufreguliert.⁶⁶ Darüber hinaus werden durch EGF kontext- und zelltypabhängig eine Reihe anderer Faktoren induziert.^{282, 283}

Um die potenzielle Auswirkung von EGF auf die in Kapitel 3.3 analysierten Transkriptionsfaktoren zu bestimmen, wurden sowohl Huh 9.13- als auch Huh 7-Zellen mit 40 ng/ml EGF über einen Zeitraum von einer bis 48 Stunden stimuliert und mittels qPCR analysiert. Bereits eine Stunde nach der Stimulation mit EGF ließ sich ein signifikanter Anstieg der Transkripte von c-Jun und c-Fos nachweisen. Erst nach 24 Stunden ging die Expression beider Faktoren wieder zurück, sodass sie nach 48 Stunden fast auf dem Niveau ohne Stimulation waren (Abb. 24A und 24B). Im Gegensatz zu IL-1 β konnte keine Induktion der c-Myb-Expression durch EGF beobachtet werden (Daten nicht dargestellt). Die Heraufregulation der transkriptionellen Expression von Fra1, ATF3 und IRF1 in Reaktion auf die Stimulation mit EGF erreichte ein Maximum nach acht Stunden Stimulationsdauer. Nach 24 bis 48 Stunden ging die Expression ebenfalls auf das Niveau ohne Stimulation zurück (Abb. 25A – 25C). Interessant ist, dass die Stimulation mit EGF den Einfluss des subgenomischen HCV-Replikons auf die Expression untersuchter Transkripte nicht verändert.

EGF hatte keinen Einfluss auf die Expression von NKRF, Oct1 und YY1 (Daten nicht dargestellt). STAT1 β , HNF-1A und HNF-1B wurden nicht weiter untersucht, da sich für diese, im Gegensatz zu den anderen Faktoren, kein Hinweis auf eine Beeinflussung der Transkript Expression durch HCV ergeben hatte (vgl. Kapitel 3.3.1). Da die meisten der untersuchten Transkriptionsfaktoren unter Stimulation mit EGF das Maximum der Expression nach ungefähr acht Stunden erreicht hatten, wurde für die nachfolgenden Experimente eine Stimulationsdauer von acht Stunden festgelegt.

Die Ergebnisse legen nahe, dass neben IL-1 β (vgl. Kapitel 3.3.2) auch EGF die Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren induzieren kann und dass sowohl die basale als auch die induzierbare Expression derselben durch HCV beeinflusst wird.

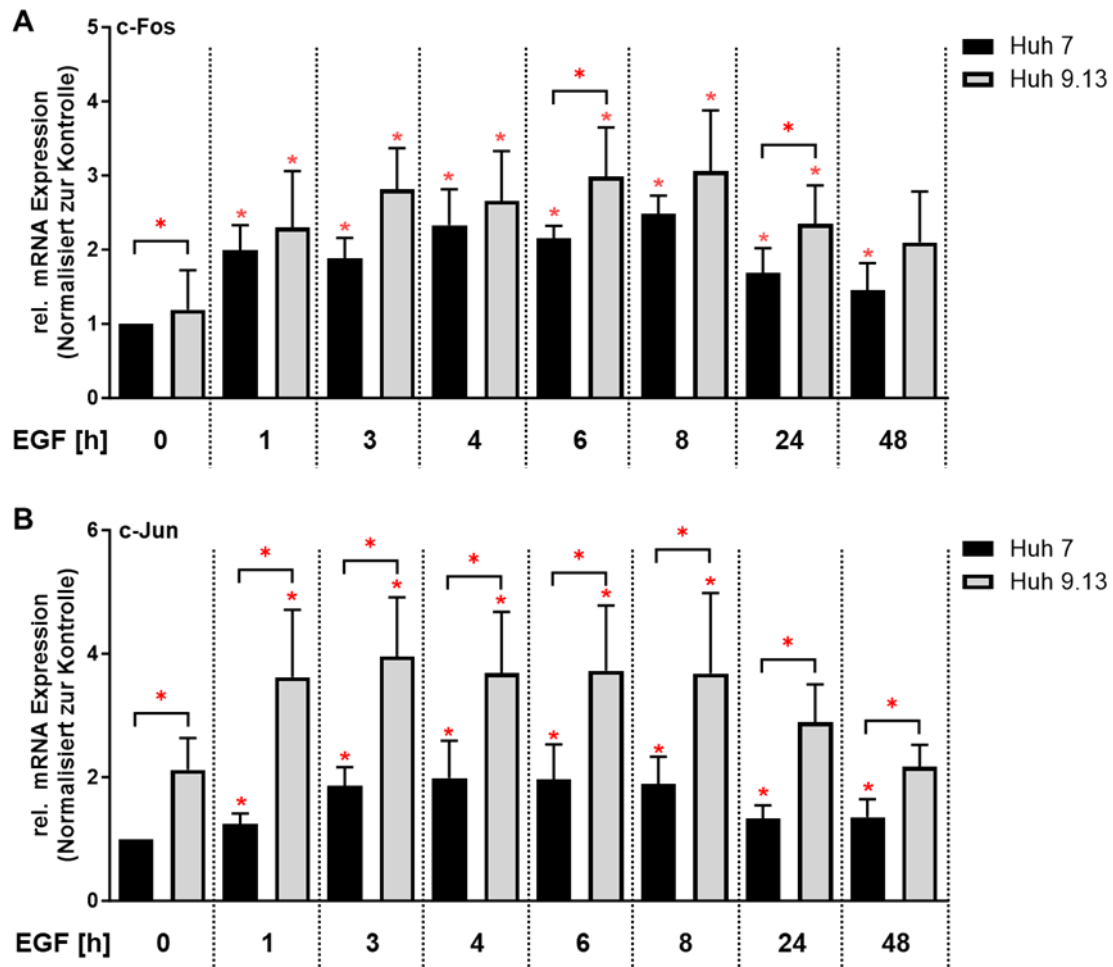


Abbildung 24: EGF induziert die transkriptionelle Expression von c-Fos, c-Jun und c-Myb. Die mRNA-Expression von c-Fos, c-Jun und c-Myb wurde mittels qRT-PCR in Zellen mit dem subgenomischen HCV-Replikon (Huh 9.13) analysiert und mit entsprechenden Kontrollzellen verglichen. Die quantitativen PCR-Ergebnisse wurden unter Verwendung der $\Delta\Delta CT$ -Methode ermittelt und auf SDHA normalisiert. Die Ergebnisse werden als Bruchteile des normalisierten Wertes der Kontrolle ausgedrückt, die auf 1 gesetzt wurde. Die Daten werden als Mittelwerte $\pm$ SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test ermittelt. Sterne (*) ohne Linien markieren Unterschiede zwischen den stimulierten Zellen im Vergleich zu den entsprechenden nicht stimulierten Kontrollzellen. Signifikante Unterschiede zwischen dem Replikon-System und den Kontrollzelllinien sind durch Sterne (*) mit Linien markiert.

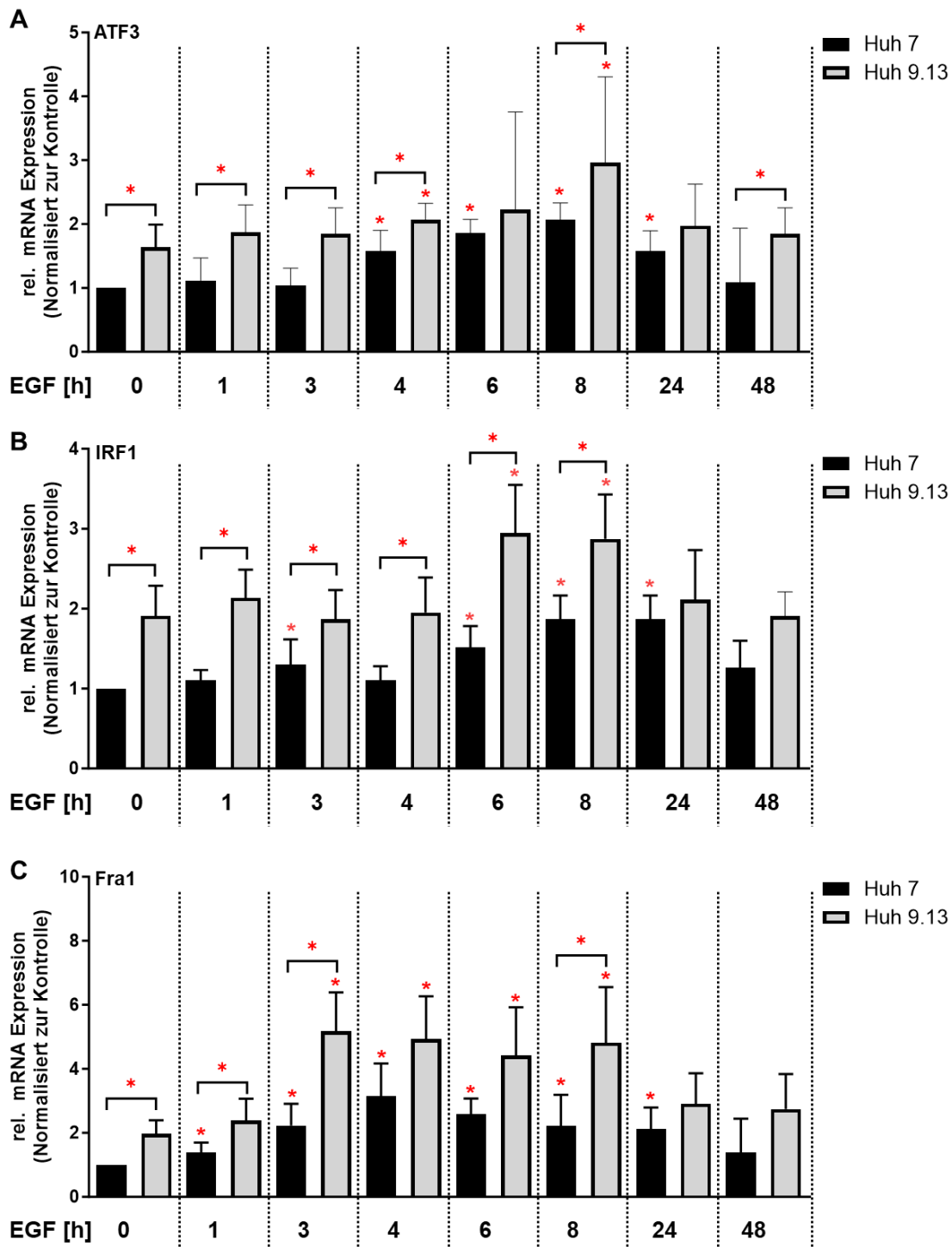


Abbildung 25: EGF induziert die transkriptionelle Expression von ATF3, IRF1, und Fra1. Die mRNA-Expression von c-Fos, c-Jun und c-Myb wurde mittels qRT-PCR in Zellen mit dem subgenomischen HCV-Replikon (Huh 9.13) analysiert und mit entsprechenden Kontrollzellen verglichen. Die quantitativen PCR-Ergebnisse wurden unter Verwendung der $\Delta\Delta CT$ -Methode ermittelt und auf SDHA normalisiert. Die Ergebnisse werden als Bruchteile des normalisierten Wertes der Kontrolle ausgedrückt, die auf 1 gesetzt wurde. Die Daten werden als Mittelwerte $\pm$ SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test ermittelt. Sterne (*) ohne Linien markieren Unterschiede zwischen den stimulierten Zellen im Vergleich zu den entsprechenden nicht stimulierten Kontrollzellen. Signifikante Unterschiede zwischen dem Replikon-System und den Kontrollzelllinien sind durch Sterne (*) mit Linien markiert.

3.6 Die durch HCV verstärkte EGF-induzierte Expression von CXCR2-Liganden involviert die Hochregulation von AP-1 sowie von NF- κ B vermittelten Mechanismen

Es wurde bereits oben demonstriert, dass IL-1 β eine Rolle bei der HCV-induzierten Expression von CXCR2-Liganden spielt und diese über mehrere Faktoren modulieren kann. Die Relevanz identifizierter Transkriptionsfaktoren, deren Expression durch HCV sowie zum Teil auch durch EGF moduliert wird, für den Einfluss von HCV auf die basale wie auch induzierbare Expression von CXCL8 wurde weitergehend mit Hilfe von Gen-Knockdown mittels spezifischer siRNA untersucht. Vorbefunde der Arbeitsgruppe legen dabei nahe, dass HCV die Expression von CXCR2-Liganden in seiner Wirtszelle über die Induktion der Produktion von EGF induziert und dass die Ausschaltung von EGF oder der p65-Untereinheit des NF- κ B-Komplexes zu einer erheblichen Herabregulierung der HCV-induzierten CXCR2-Ligandenexpression führt.⁶⁶ Allerdings ließen sich hierdurch die verstärkenden Effekte von HCV nur partiell aufheben.

3.6.1 Für die EGF induzierte transkriptionelle Regulation der CXCL8-Expression sowie für den Einfluss von HCV hierauf spielt der AP-1 Komplex eine relevante Rolle

Wie oben beschrieben, ist neben NF- κ B auch der AP-1 Komplex kontextabhängig in die transkriptionelle Regulation der Genexpression von CXCL8 involviert.²⁶⁸ Die vorangehend ausgeführten Daten belegen, dass die AP-1 Komponenten c-Fos und c-Jun in die transkriptionelle Regulation von CXCR2-Liganden durch HCV und/oder IL-1 β involviert sind. Um zu untersuchen, ob AP-1 auch für den Einfluss von HCV auf die EGF-induzierbare Expression von CXCL8 relevant ist, wurde die Genexpression von c-Fos und/oder c-Jun mittels spezifischer siRNA supprimiert und anschließend mit 40 ng/ml EGF in An- oder Abwesenheit des HCV-Replikons für acht Stunden stimuliert. Der Gen-Knockdown sowohl von c-Fos als auch von c-Jun führte zu einer signifikanten Reduktion der HCV- und EGF-induzierten CXCL8-mRNA-Expression in Huh 9.13- und Huh 7-Zellen (Abb. 26A und 26B). Dies bestätigt, dass c-Fos und c-Jun für die Induktion der CXCL8-Expression durch HCV von Bedeutung sind. Es belegt jedoch auch, dass AP-1 nicht nur für die IL-1 β -vermittelte Expression von CXCL8 eine wichtige Rolle spielt, sondern auch für die Regulation der transkriptionellen Expression von CXCL8 durch EGF.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass der AP-1 Komplex eine Rolle bei der transkriptionellen Regulation der CXCL8-Expression sowohl durch IL-1 β und HCV als auch durch EGF spielt. Dabei kann sowohl die Expression von c-Fos als auch

von c-Jun auf transkriptioneller Ebene durch HCV, IL-1 β und EGF induziert werden. Darüber hinaus lassen diese Daten zusammenfassend annehmen, dass HCV über die verstärkte Heraufregulation der Komponenten des AP-1 Komplexes die transkriptionelle Expression von CXCL8 direkt beeinflusst.

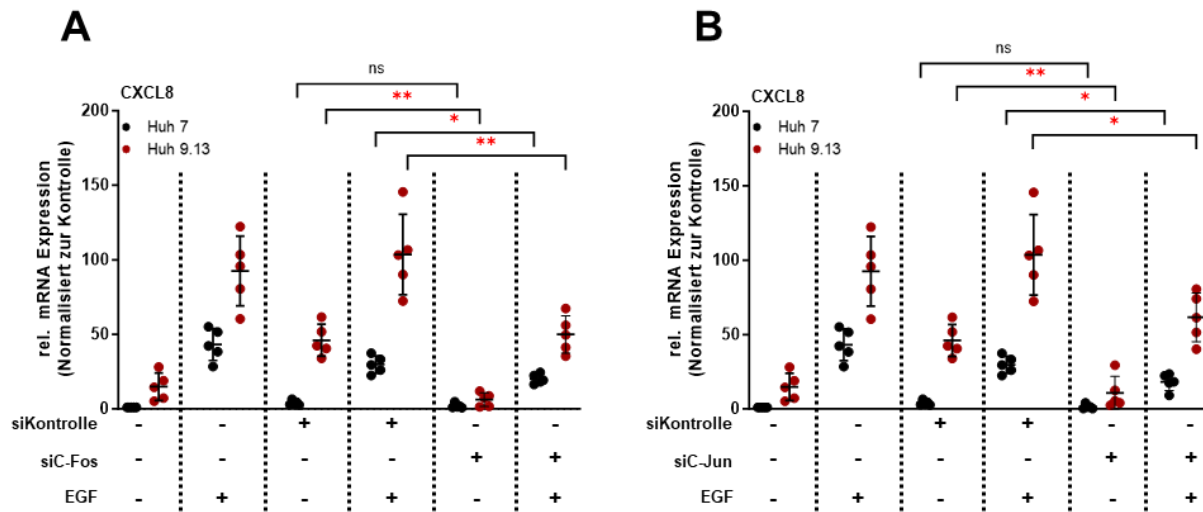


Abbildung 26: C-Fos und c-Jun sind essenziell für die EGF-induzierte Expression von CXCL8. Die Expression von CXCL8 mRNA wurde mittels qRT-PCR in Huh 9.13 Zellen analysiert und mit entsprechenden Kontrollzellen verglichen. Die Zellen wurden 48 Stunden mit spezifischer SiRNA gegen c-Fos oder c-Jun behandelt und anschließend für acht Stunden 40 ng/ml EGF behandelt. Die quantitativen PCR-Ergebnisse wurden unter Verwendung der $\Delta\Delta CT$ -Methode ermittelt und auf SDHA normalisiert. Die Ergebnisse wurden als Bruchteile des normalisierten Wertes der Kontrolle ausgedrückt, die auf 1 gesetzt wurde, und die Daten wurden als Mittelwert $\pm$ SD dargestellt. Die Signifikanz wurde mittels des Mann-Whitney-U-Tests berechnet. Die Daten wurden mit * für $p \leq 0,05$, ** für $p \leq 0,01$, *** für $p \leq 0,001$ und **** für $p \leq 0,0001$ markiert, sofern eine Signifikanz vorliegt.

3.6.2 Oct1 und NKRF supprimieren die EGF induzierte Expression von CXCL8

Wie bereits beschrieben, kommt Oct1 und NKRF eine relevante Rolle als endogene Suppressoren der NF- κ B- und AP-1 vermittelten transkriptionellen Regulation der CXCL8-Expression zu.²⁷⁹⁻²⁸¹ Mittels Oct1- und NKRF-spezifischer siRNA wurde im Folgenden die Bedeutung dieser Faktoren für die EGF-induzierte CXCL8-Expression und den Einfluss von HCV hierauf untersucht. Der Gen-Knockdown von Oct1 wie auch von NKRF führte zu einer signifikanten Zunahme der EGF-induzierten CXCL8-mRNA-Expression in An- oder Abwesenheit des HCV-Replikons (Abb. 27A – 28B). In Übereinstimmung mit vorangehend ausgeführten Experimenten ließ sich dieser Effekt durch einen kombinierten Gen-Knockdown synergistisch verstärken. Dabei ist anzumerken, dass dies der Situation entspricht, die insbesondere durch eine persistierende Präsenz von HCV-Proteinen hervorgerufen wird, wie es in den Replikonzellen der Fall ist, und weniger ausgeprägt auch durch eine akute Infektion (vgl. Kapitel 3.3.1). Diese Ergebnisse legen nahe, dass vor allem die kombinierte Herabregulation der Expression von Oct1 und NKRF in der Lage ist, den Einfluss des HCV-

Replikons auf die basale sowie die durch IL-1 β - bzw. EGF-induzierbare Expression von CXCL8 zu simulieren.

Entsprechend ist zusammenfassend anzunehmen, dass die HCV-vermittelte Herabregulation der Expression von Oct1 und NKRF auf Transkriptebene für den Einfluss von HCV auf die basale sowie die induzierbare Heraufregulation der CXCL8-Expression in der Wirtszelle von Bedeutung ist.

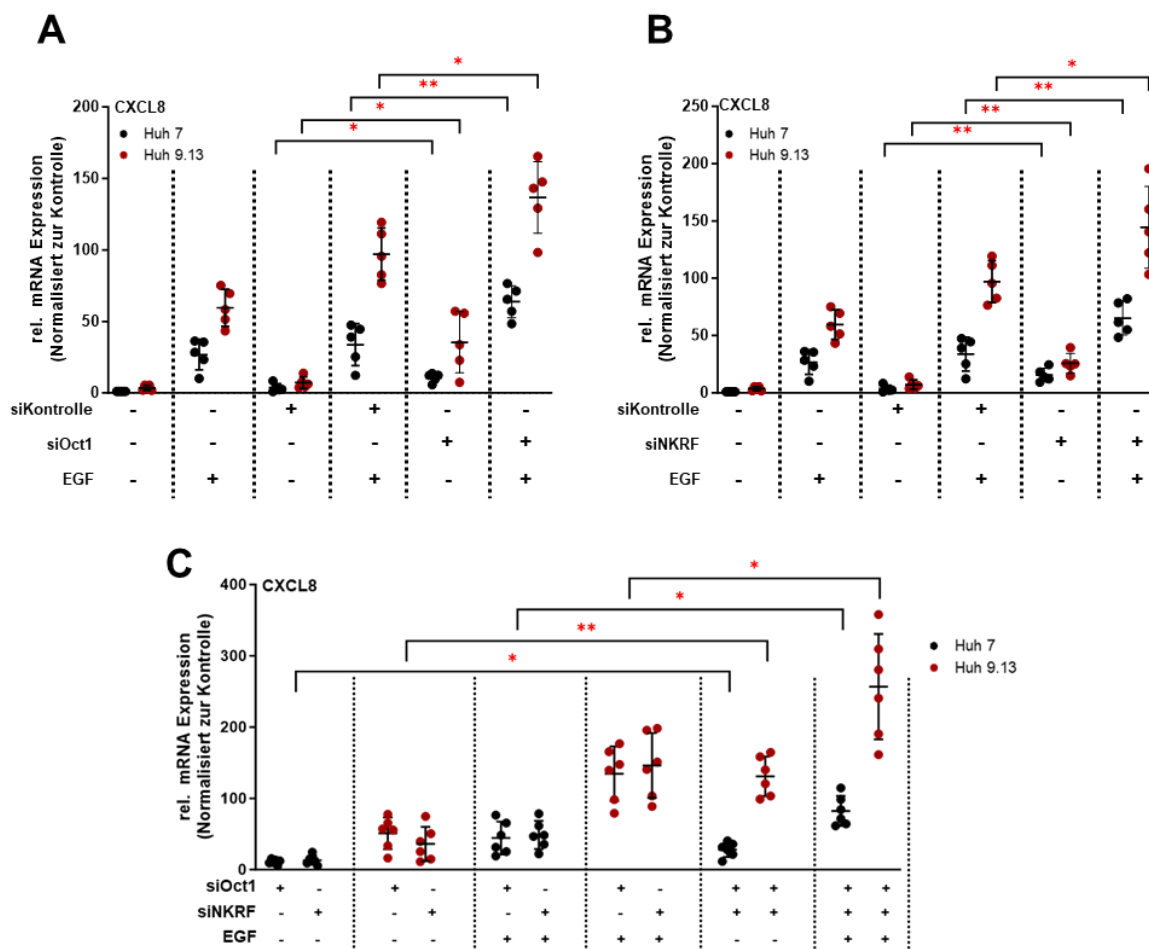


Abbildung 27: Oct1 und NKRF sind negative Regulatoren für die EGF induzierte CXCL8 Expression. Die Expression von CXCL8 mRNA wurde mittels qRT-PCR in Huh9.13 Zellen analysiert und mit entsprechenden Kontrollzellen verglichen. Die Zellen wurden 48 Stunden mit spezifischer SiRNA gegen Oct1 oder NKRF behandelt und anschließend für acht Stunden mit 40 ng/ml EGF behandelt. Die quantitativen PCR-Ergebnisse wurden unter Verwendung der $\Delta\Delta CT$ -Methode ermittelt und auf SDHA normalisiert. Die Ergebnisse wurden als Bruchteile des normalisierten Wertes der Kontrolle ausgedrückt, die auf 1 gesetzt wurde, und die Daten wurden als Mittelwert $\pm$ SD dargestellt. Die Signifikanz wurde mittels des Mann-Whitney-U-Tests berechnet. Die Daten wurden mit * für $p \leq 0,05$ oder ** für $p \leq 0,01$ markiert, sofern eine Signifikanz vorliegt.

3.7 Analyse des Einflusses von HCV auf die Genexpression mittels RNA-Seq

In einem weiteren Ansatz sollte der Einfluss von HCV auf die basale sowie die durch IL-1 β induzierbare Genexpression über einen umfassenderen Ansatz analysiert werden. Dabei legen die hier ausgeführten Untersuchungen sowie die Beobachtungen der Arbeitsgruppe nahe, dass insbesondere die suppressiven Effekte von HCV auf die Genexpression und die Proteinlevel deutlicher unter experimentellen Bedingungen zu beobachten sind, die eine persistierende Infektion simulieren, als im akuten Infektionssystem. Entsprechend wurde für diese Experimente ein Ansatz gewählt, der eine persistierende Infektion erlaubt. Hierzu wurden Huh 7.5-Zellen zunächst für zwei Wochen mit 1 % DMSO behandelt, um eine Differenzierung zu induzieren und entsprechend ihre Teilungsaktivität zu reduzieren. Anschließend wurden diese Zellen mit dem HCV JC1-Stamm für eine Woche infiziert. Nach einer Infektionsdauer von einer Woche wurden die HCV-infizierten Zellen sowie die Huh 7.5-Kontrollzellen mit 0,5 U/ml IL-1 β stimuliert.

Zur Erfolgskontrolle wurde zunächst der Einfluss der persistierenden HCV-Infektion auf die basale sowie die induzierbare CXCL8-Expression mittels qPCR analysiert (Abb. 28) und im Weiteren die isolierte RNA mittels RNA-Seq untersucht (Abb. 29).

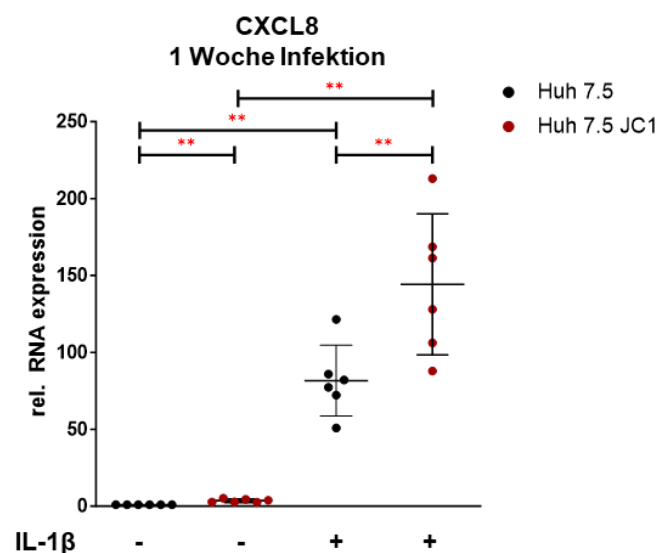


Abbildung 28: Transkriptionelle CXCL8 Expression im chronischen System. Huh 7.5-Zellen wurden für zwei Wochen mit 1 % DMSO behandelt. Anschließend wurden diese Zellen mit dem HCV JC1-Stamm für eine Woche infiziert. Nach einer Infektionsdauer von einer Woche wurden die HCV-infizierten Zellen sowie die Huh 7.5-Kontrollzellen mit 0,5 U/ml IL-1 β stimuliert. Die quantitativen PCR-Ergebnisse wurden unter Verwendung der $\Delta\Delta CT$ -Methode ermittelt und auf SDHA normalisiert. Die Ergebnisse wurden als Bruchteile des normalisierten Wertes der Kontrolle ausgedrückt, die auf 1 gesetzt wurde, und die Daten wurden als Mittelwert $\pm$ SD dargestellt. Die Signifikanz wurde mittels des Mann-Whitney-U-Tests berechnet. Die Daten wurden mit * für $p \leq 0,05$ oder ** für $p \leq 0,01$ markiert, sofern eine Signifikanz vorliegt.

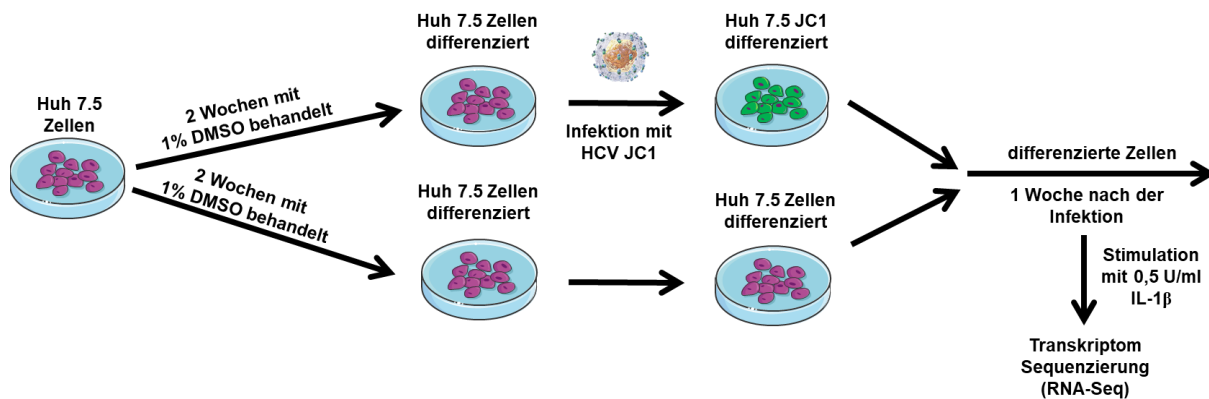


Abbildung 29: Schematisch Darstellung des chronischen Infektionsmodell. Huh 7.5-Zellen wurden für zwei Wochen mit 1 % DMSO behandelt. Anschließend wurden diese Zellen mit dem HCV JC1-Stamm für eine Woche infiziert. Nach einer Infektionsdauer von einer Woche wurden die HCV-infizierten Zellen sowie die Huh 7.5-Kontrollzellen mit 0,5 U/ml IL-1 β stimuliert. Abschließend wurde die isolierte RNA mittels RNA-Seq analysiert

Dieser experimentelle Ansatz wurde für jede Bedingung mit sechs Replikaten durchgeführt. Es wurden mehrere Auswahlkriterien getestet, um die Liste der analysierten Gene auf diejenigen zu beschränken, deren Expression durch eine HCV-Infektion und/oder Stimulation mit hoher Wahrscheinlichkeit beeinflusst wird. Entsprechend wurden in den Auswertungen nur Gene mit einem FC-Schwellenwert ($FC \geq 1,5$ oder $\leq -1,5$) und einem Standardfilter für RNA-Seq-Analysen (P adj. Wert $\leq 0,05$) berücksichtigt.

Unter diesen Kriterien ließen sich nach einer Woche HCV-Infektion 78 differentiell exprimierte Gene (DEGs) identifizieren, deren Expression durch HCV beeinflusst wird (Abb. 31A JC1 vs. Mock). Unter diesen waren mehrere Gene, wie beispielsweise CXCR2-Liganden, die bereits in qRT-PCR-Untersuchungen als HCV-regulierte Faktoren identifiziert worden waren (Abb. 31 JC1 vs. Mock). Im Gegensatz hierzu wurden unter Stimulation mit IL-1 β über 3000 DEGs identifiziert, deren Expression durch IL-1 β differentiell beeinflusst wird (Abb. 31A IL-1 β vs. Mock). Soweit sich dies aus den vorliegenden Daten schließen lässt, hat HCV nur auf eine vergleichbar kleine Gruppe der durch IL-1 β induzierten Gene einen Einfluss (Abb. 31A JC1_IL-1 β vs. Mock_IL-1 β). Der Vergleich der verschiedenen Bedingungen weist darauf hin, dass nur 6 % der durch IL-1 β induzierten Gene durch eine Infektion mit HCV zusätzlich verändert werden, während über 90 % der Gene ausschließlich durch IL-1 β induziert oder supprimiert werden (Abb. 31B). Dabei ist zu berücksichtigen, dass viele der durch HCV induzierten Gene auch durch IL-1 β induziert werden und dass der Einfluss von HCV auf die IL-1 β -induzierbare Genexpression durch die hier durchgeführten Untersuchungen nicht vollständig erfasst wird. Interessanterweise wurde für Faktoren wie insbesondere IRF9 eine deutliche Steigerung der Expression in HCV-infizierten Zellen, jedoch nicht in Zellen, die nur mit IL-1 β stimuliert wurden, beobachtet (Abb. 30). Letzteres legt nahe, dass die HCV-Infektion erfolgreich zu einer Aktivierung der Interferon-Antwort geführt hat.

Insgesamt wurden 133 Gene identifiziert, die durch IL-1 β als NF- κ B-abhängige Zielgene moduliert wurden. Zusätzlich wurden zehn NF- κ B-abhängige Zielgene identifiziert, die durch eine HCV-Infektion hochreguliert werden. Bei der Untersuchung von Zielgenen des AP-1 Komplexes wurden über 300 Gene identifiziert, die IL-1 β -abhängig moduliert wurden. HCV-infizierte Zellen wiesen dagegen 14 Zielgene des AP-1 Komplexes auf, die hochreguliert waren (Abb. 29C). Auch bei den NF- κ B- und AP-1 Zielgenen war der Einfluss von IL-1 β -stimulierten HCV-infizierten Zellen im Vergleich zu den stimulierten Kontrollzellen nur geringfügig höher (Daten nicht dargestellt).

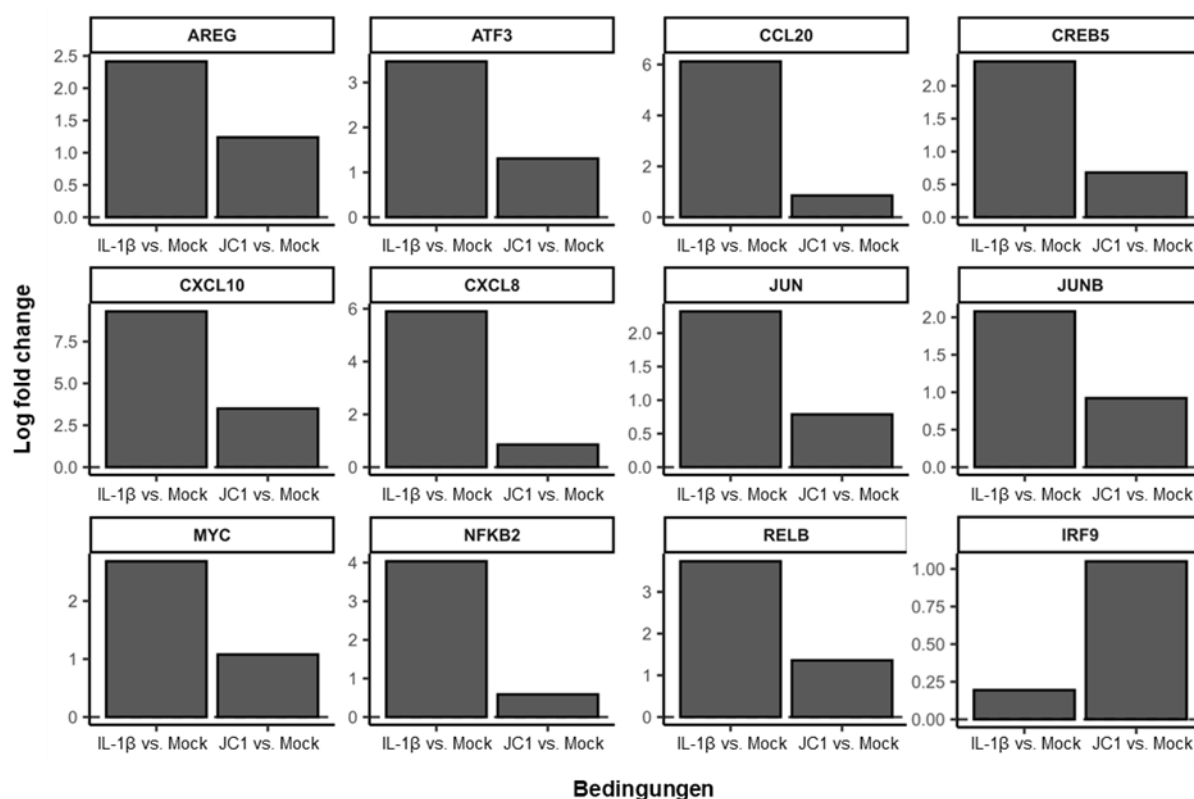


Abbildung 30: Auswahl von Genen die im chronischen Infektionssystem durch IL-1 β und/oder HCV induziert werden. Barplot Darstellung von Genen die durch IL-1 β und/oder HCV induziert werden. Die Signifikante Veränderung wurde als log. Veränderung dargestellt. Die Analyse wurde für jede Bedingung mit sechs Replikaten durchgeführt. Ein Gen wurde als signifikant verändert betrachtet, wenn die Expression um den Faktor 1,5 zu - oder abnahm und der p-Wert unter 0,05 lag.

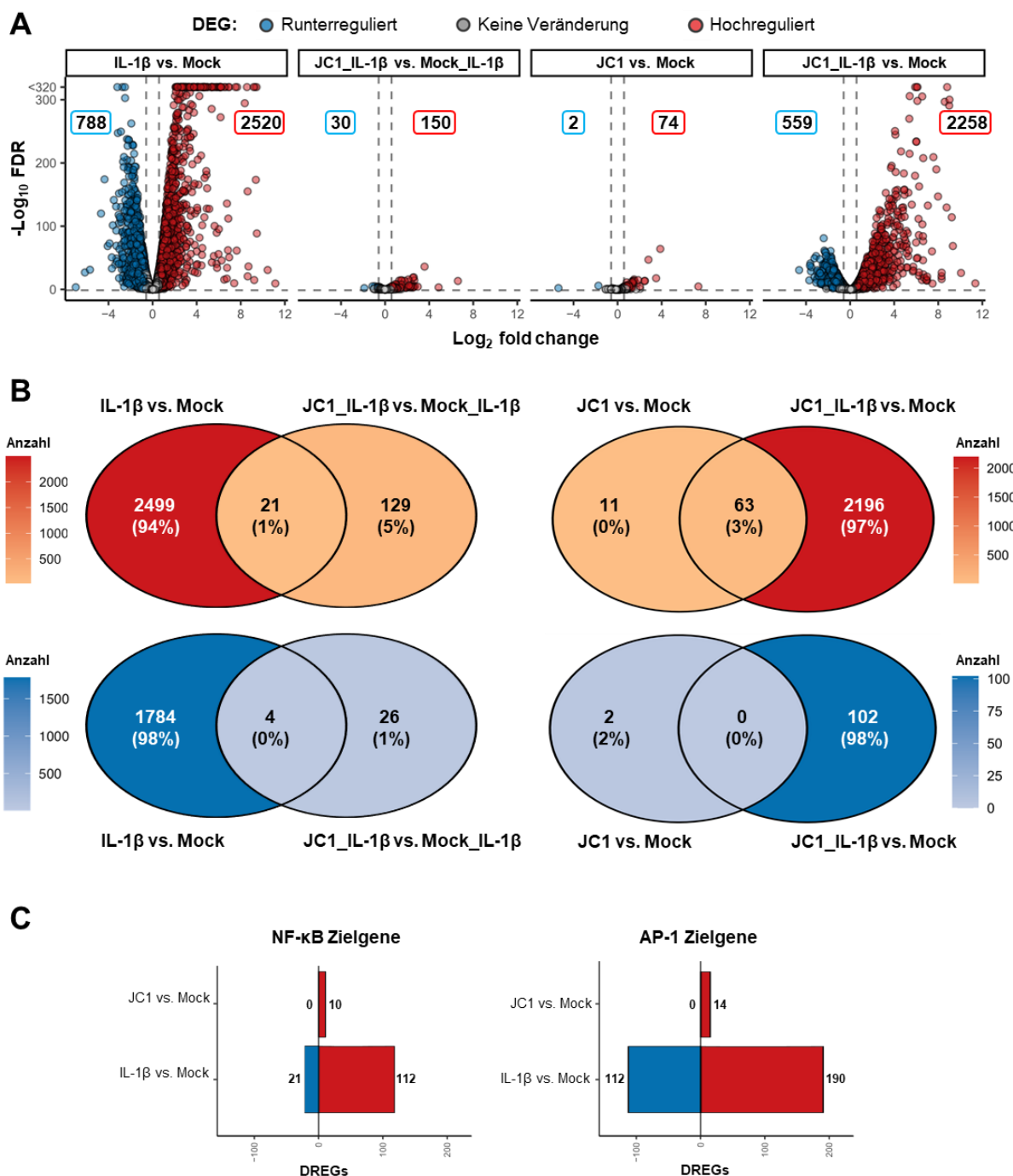


Abbildung 31: Auswertung der RNA-Seq. Daten im chronischen Infektionsmodell. A) Bei der Analyse der Daten für RNA-basiertes Genexpressionsprofil (GEP) veranschaulicht das Vulkandiagramm den $\log_{10}$ -transformierten bereinigten p-Wert gegen die $\log_2$ -fache Änderung für jede Sonde im Assay. B) Venn Diagramme: Zur Verdeutlichung der Beziehungen zwischen zwei verschiedenen Bedingungen bzw. Datensätzen. Zur Unterscheidung des Einflusses von IL-1 β allein und in Kombination einer HCV-Infektion. C) Bar Plots: Zeigt den Einfluss der einzelnen Konditionen auf die Zielgene von NF- κ B und AP-1. Die RNA-Analyse wurde für jede Bedingung mit sechs Replikaten durchgeführt. Ein Gen wurde als signifikant verändert betrachtet, wenn die Expression um den Faktor 1,5 zu- oder abnahm und der p-Wert unter 0,05 lag. Rote Darstellung: Induktion von Genen; Blaue Darstellung: Runterregulation von Genen.

4. Diskussion

4.1 HCV induziert die Serumspiegel von Zytokinen und Wachstumsfaktoren

Mehrere Studien haben belegt, dass Patienten mit chronischer Hepatitis C Infektion erhöhte Serumspiegel verschiedener Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren aufweisen. Beispielsweise sind die Serumspiegel von IL-1 β , TNF- α , CXCL8, EGF und VEGF-A im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen deutlich erhöht, was auf eine subklinische Entzündungsreaktion bei diesen Patienten hinweisen könnte.^{66, 141, 284-286}

Die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Serumanalysen bestätigen diese Befunde und legen darüber hinaus nahe, dass AREG und NRG1 ebenfalls bei Patienten mit chronischer Hepatitis C im Vergleich zu gesunden Kontrollen erhöht sind. Die Induktion der Expression dieser Wachstumsfaktoren durch HCV wurde bisher ausschließlich in Zellkulturmodellen nachgewiesen und wird durch die hier ausgeführten Untersuchungen nun auch in vivo bestätigt (Abb. 9).^{92, 287} Der Anstieg der Serumkonzentrationen von IL-1 β , TNF- α , CXCL8 und EGF ist jedoch nicht ausschließlich in Verbindung mit einer HCV-Infektion zu beobachten, sondern auch bei Patienten nachweisbar, die an einer chronischen HBV-Infektion erkrankt sind (Abb. 13).²⁸⁸⁻²⁹⁰ Zumindest im Kontext von CXCL8 deuten diese Befunde darauf hin, dass die Induktion der CXCL8-Expression eine übergeordnete Reaktion des Wirts auf eine Virusinfektion ist und nicht spezifisch für eine HCV-Infektion, sondern auch im Rahmen anderer Virusinfektionen wie dem Hepatitis B Virus zu beobachten ist. Hiermit übereinstimmend legen die Ergebnisse von in vitro Untersuchungen nahe, dass die Infektion einer monozytären Zelllinie mit dem humanen Cytomegalievirus oder von alveolaren Epithelzellen mit dem respiratorischen Synzytialvirus ähnliche Reaktionen hervorruft.^{291, 292} Hinsichtlich der Serumspiegel von TNF- α nehmen, dem gegenwärtigen Stand der Literatur zufolge, die Serumkonzentrationen nach erfolgreicher Therapie wieder ab.²⁹³ Einschränkend ist hier anzumerken, dass in der hierzu existierenden Studie kein Vergleich mit gesunden Kontrollen erfolgte. Entsprechend besteht hier keine ausreichende Grundlage, um zu überprüfen, ob die Serumspiegel nach erfolgreicher Therapie wieder auf das Niveau eines gesunden Kontrollkollektivs abfallen oder ob sie zwar reduziert sind, jedoch im Vergleich zu gesunden Kontrollen weiterhin erhöht sind.

Die Ergebnisse der hier durchgeführten Untersuchungen bestätigen, dass TNF- α nach erfolgreicher Eradikation einer HCV-Infektion abnimmt. Dennoch wurde zusätzlich beobachtet, dass die Serumspiegel trotz dieses Rückgangs im Vergleich zu gesunden Kontrollen weiterhin erhöht bleiben (Abb. 9D). In den hier ausgeführten Untersuchungen legen lediglich die Ergebnisse für die Serumkonzentrationen von IL-1 β und NRG1 nahe, dass es nach

erfolgreicher HCV-Eradikation im zeitlichen Verlauf zu einem Abfall der Serumkonzentrationen auf diejenigen eines gesunden Kontrollkollektivs kommt (Abb. 9A und 9G). Im Gegensatz hierzu führte, ähnlich wie bei TNF- α , die erfolgreiche Eradikation zwar zu einem Abfall der Serumkonzentrationen für EGF und VEGF-A, jedoch blieben diese im Vergleich zu gesunden Kontrollen auch im zeitlichen Verlauf weiterhin signifikant erhöht (Abb. 9C und 9E). Interessant ist, dass die Serumkonzentrationen von CXCL8 und AREG auch nach erfolgreicher Eradikation der HCV-Infektion langfristig erhöht blieben und im Vergleich zu Patienten mit chronischer HCV-Infektion nur unwesentlich abfielen (Abb. 9B und 9F). Diese Befunde legen nahe, dass die HCV-Infektion zu Veränderungen führt, die auch nach erfolgreicher Eradikation des Virus eine anhaltend verstärkte Expression bzw. Produktion von CXCL8 und AREG bedingen, sodass die Serumkonzentrationen bei diesen Patienten auch im längerfristigen Verlauf nach erfolgreicher Viruselimination signifikant erhöht bleiben und nicht einmal tendenziell bzw. partiell abfallen.

Die pathophysiologische Bedeutung dieser Ergebnisse, insbesondere ihre potenzielle Rolle bei der Förderung eines virusfreundlichen Milieus, bleibt unklar. Ebenso ist ungewiss, ob sie eine Folge oder eine Ursache der bei einer beträchtlichen Anzahl chronisch mit HCV infizierter Patienten zu beobachtenden, persistierenden und oft über Dekaden asymptomatisch verlaufenden Hepatitis sind.

In diesem Kontext ist auch interessant, dass in den hier untersuchten Patientenkollektiven die erfolgreiche Eradikation von HCV zwar zu einem Abfall der Transaminasen GOT und GPT führte, jedoch ebenfalls nicht zu einer vollständigen Normalisierung. Entsprechend könnte die trotz erfolgreicher Viruseradikation persistierende Erhöhung der Leberenzyme sowie die zum Teil anhaltend erhöhten FIB-4-Werte auf eine Persistenz der Hepatitis auf niedrigerem Niveau hinweisen (Abb. 10). Wie vorangehend bereits ausgeführt, kommt es bei einer Reihe chronisch HCV-infizierter Patienten zu einer persistierenden subklinischen Hepatitis, die über Dekaden ohne klinisch fassbare Symptomatik verläuft und erst nach fortgeschrittener Leberschädigung mit Übergang in eine Fibrose bzw. Zirrhose sowie den hieraus resultierenden Komplikationen in einer offenen klinischen Symptomatik resultiert.²⁹⁴ Für die hier untersuchten Faktoren IL-1 β , TNF- α , CXCL8, VEGF-A und die Aktivierung des EGFR ist eine Korrelation mit einer Leberschädigung beschrieben,^{255,256,295-298} jedoch ist ihre pathogenetische Bedeutung unklar. Insbesondere ist unklar, ob sie für die Aufrechterhaltung der chronisch persistierenden Hepatitis und ihre Progression zu Fibrose und Zirrhose von Relevanz sind, lediglich Begleitphänomen derselben oder ob sie im Kontext der Virusinfektion, beispielsweise als provirale Faktoren, von Bedeutung sind. Dies wird auch in der Tatsache deutlich, dass die hier durchgeführten Untersuchungen nahelegen, dass lediglich IL-1 β mit der Virusreplikation selbst zu korrelieren scheint, während bei allen anderen der hier untersuchten Faktoren weder eine

Korrelation zwischen Virusreplikation und Serumkonzentration noch zwischen Transaminasen und Serumkonzentration der untersuchten Faktoren beobachtet werden konnte.

Neueste Studien legen außerdem nahe, dass eine HCV-Infektion epigenetische Veränderungen hervorruft. Diese durch HCV induzierten epigenetischen Veränderungen können, soweit bisher untersucht, zu einer Neuprogrammierung der Genexpression des Wirts bzw. der Wirtszelle führen und könnten als "epigenetische Signatur" auch nach der Viruseradikation bestehen bleiben.^{299, 57} Entsprechend könnte die hier beobachtete, trotz erfolgreicher Viruseradikation persistierende Erhöhung der Serumkonzentration von Faktoren wie CXCL8, TNF- α , VEGF-A, EGF und NRG1 auch durch epigenetische Veränderungen mitbedingt sein bzw. durch eine Kombination aus direkten Viruseffekten und indirekten Ursachen wie einer, auch nach erfolgreicher Eradikation, anhaltenden Hepatitis.³⁰⁰

In diesem Zusammenhang ist auch interessant, dass für IL-1 β , TNF- α sowie für die EGFR- und VEGF-Signalwege eine pathogenetische Rolle bei der Entstehung und Progression eines HCCs diskutiert wird und dass CXCL8 im Zellkulturmodell pro-virale Effekte hat.³⁰¹⁻³⁰⁵ Für Letzteres wird, wie auch im Kontext der HBV-Infektion, als zugrundeliegender Mechanismus eine interferonantagonistische Wirkung von CXCL8 diskutiert.^{216, 219, 301, 302} Hiermit übereinstimmend legen Korrelationsanalysen nahe, dass erhöhte Serumkonzentrationen von CXCL8 bei chronisch HCV-Infizierten invers mit dem Therapieansprechen auf eine Interferontherapie korrelieren.²¹⁷

Im Hinblick auf die erhöhten Serumkonzentrationen von CXCL8 ist ferner interessant, dass es sowohl bei Patienten mit chronischen Virusinfektionen als auch bei nicht infizierten Personen mit Leberzirrhose als Biomarker für ein HCC diskutiert wird. Diese Befunde legen nahe, dass CXCL8 zumindest Ausdruck eines immunologischen Milieus ist, welches die Entstehung und Progression eines HCCs begünstigt, wobei auch hier mögliche kausale Verknüpfungen bislang ungeklärt sind.³⁰³⁻³⁰⁵

Die Beobachtung der hier zusammengefassten Untersuchungen demonstriert, dass die Serumkonzentrationen von IL-1 β positiv mit der HCV-Viruslast und ebenso mit der Serumkonzentration von CXCL8 korrelieren. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die HCV-Viruslast, die Serumkonzentration von IL-1 β und die von CXCL8 funktionell wechselseitig miteinander verbunden sind. Gleiches gilt für die positive Korrelation von CXCL8 mit der Serumkonzentration von EGF, sodass auch hier eine funktionelle Verbindung denkbar ist (Abb. 11). Diese Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen anderer Studien überein, die ebenfalls nahelegen, dass CXCR2-Liganden wie CXCL8, aber auch Zytokine und Wachstumsfaktoren wie IL-1 β und EGF im Rahmen einer HCV-Infektion heraufreguliert werden können.^{66, 141} Darüber hinaus können IL-1 β wie auch EGF die Produktion von CXCL8 ihrerseits weiter heraufregulieren.^{66, 210, 252} Unter Berücksichtigung der aktuellen Literatur legt Letzteres nahe, dass hier eine wechselseitige Amplifikation im Sinne von

Rückkopplungsschleifen erfolgt, da HCV in vitro zumindest die Expression von EGF heraufreguliert und die basale sowie die EGF- bzw. IL-1 β -induzierbare Expression von CXCL8 verstärkt.^{66, 252} CXCL8 wiederum führt als Chemokin besonders zur Rekrutierung und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und damit zu einer vermehrten Produktion inflammatorischer Zytokine wie unter anderem IL-1 β .^{186, 306} Letzteres nimmt nun seinerseits Einfluss auf die induzierbare und durch HCV verstärkte Expression von CXCL8. Die molekularen Mechanismen, durch die HCV die basale bzw. induzierbare transkriptionelle Expression von CXCL8 in der Wirtszelle verstärkt, sind nur unvollständig verstanden.

Für verschiedene HCV-kodierte Proteine wie NS2, NS4A, NS4B und NS5A, ist beschrieben, dass ihre isolierte Expression in Zellen die Heraufregulation der CXCL8-Expression hervorrufen kann.^{213, 216, 307} Diese Arbeiten legen nahe, dass die Wirkung dieser verschiedenen viralen Proteine auf die CXCL8-Expression unter anderem über die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und/oder AP-1 vermittelt wird.^{213, 216, 307} Ferner legen die Ergebnisse weiterer Untersuchungen nahe, dass HCV die Transkript Stabilität von CXCL8 beeinflussen kann.²¹²

4.2 HCV moduliert die Expression der CXCR2 Liganden über NF- κ B und AP-1

Mehrere veröffentlichte Promotoranalysen des CXCL8-Gens belegen, dass mindestens fünf verschiedene Transkriptionsfaktoren an die Promotorregion des CXCL8-Gens aktiv binden und die Expression von CXCL8 modulieren können. Dazu gehören NF- κ B, NKRF, C/EBP, Oct1 sowie die Komponenten des AP-1 Komplexes, c-Fos und c-Jun.^{186, 204, 308}

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zusätzlich zu den vorangehend genannten Faktoren mit ATF3, IRF1, c-Myb, Fra1, YY1, STAT1b sowie HNF1A und B sechs weitere Faktoren untersucht, für die in der 5'-regulatorischen Region des CXCL8-Gens potenzielle Bindungsstellen mittels der Software Promo identifiziert werden konnten. Dabei konnten die hier ausgeführten Untersuchungen übereinstimmend mit früheren Untersuchungen für IRF1 und ATF3 belegen, dass sowohl die Expression von IRF1 als auch von Fra1 und ATF3 in von Hepatozyten abgeleiteten Zelllinien durch IL-1 β wie auch durch EGF induziert werden kann (Abb. 20 und 25).³⁰⁹⁻³¹³ In Übereinstimmung mit früheren Studien wurde nachgewiesen, dass sowohl IRF1 als auch ATF3 sowohl von IL-1 β als auch von EGF induziert werden kann.³⁰⁹⁻³¹² In der Literatur ist beschrieben, dass c-Myb in mehreren Zelllinien durch IL-1 β induziert werden kann.³¹⁴⁻³¹⁶ Hingegen wird c-Myb in hepatozytären Zelllinien durch IL-1 β , aber nicht durch EGF induziert. Zumindest für IL-1 β wurde bereits für andere Zelllinien beschrieben, dass es die Expression von c-Myb zu induzieren vermag, während der Einfluss von EGF auf die

Expression von c-Myb bisher nicht untersucht wurde. Interessant ist hier, dass c-Myb, wie auch IRF-1, ATF3 und Fra1, durch HCV zumindest auf Transkript-Ebene beeinflusst werden.³¹⁴⁻³¹⁶ Wobei HCV die Expression von IRF1, ATF3 und Fra1 jeweils heraufreguliert, während die Expression von c-Myb eher supprimiert wird. Dabei ist zumindest für IRF1, Fra1 und ATF3 bereits beschrieben, dass HCV einen Einfluss auf die Expression dieser Faktoren hat.^{271, 317, 318} Da die basale sowie die durch IL-1 β induzierbare Expression von CXCL8 durch den Genknockdown dieser Faktoren jeweils nicht beeinflusst wurde, wurde die Relevanz dieser Transkriptionsfaktoren für die Beeinflussung der Wirtszelle durch HCV im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Es ist allerdings gut denkbar, dass HCV durch die Beeinflussung der Expression dieser Faktoren die transkriptionelle Regulation von Genen, deren Expression durch diese kontrolliert werden, beeinflusst. Diese Überlegung wird durch die Beobachtung gestützt, dass Gen Cluster, deren Expression durch ATF3 kontrolliert wird, in ihrer Expression durch HCV moduliert werden.³¹⁹ Abgesehen davon bestehen bislang allerdings keine weiteren Untersuchungen zur Bedeutung des Einflusses von HCV auf die Expression von c-Myb, Fra1, ATF3 und IRF1 für die Regulation der basalen sowie induzierbaren Genexpression in der Wirtszelle, sodass die Ergebnisse der hier ausgeführten Untersuchungen mehrere Anknüpfungspunkte für weiterführende Arbeiten bieten.

In Arbeiten anderer wurde bereits belegt, dass HCV oder isolierte virale Proteine wie das Core-Protein, NS2 oder NS5A eine Aktivierung von über NF- κ B- und/oder AP-1 vermittelte Signalwege hervorrufen können.^{63, 307, 320-322} Hiermit übereinstimmend belegen die hier ausgeführten Untersuchungen, dass es in HCV-Replikon Zellen, sowie in mit dem HCV-Stamm JC1 infizierten Zellen zu einer Heraufregulation der Expression von c-Fos und c-Jun und damit von zwei zentralen Komponenten des AP-1 Komplexes kommt. Darüber hinaus führt die Präsenz von HCV zu einer Herabregulation von Oct1 und NKRF, zweier Faktoren, die NF- κ B-vermittelte Signalprozesse inhibitorisch beeinflussen. Entsprechend legen diese Befunde nahe, dass HCV die Signalübertragung der Wirtszelle dergestalt beeinflusst, dass AP-1- sowie NF- κ B-vermittelte Signalprozesse und die hiervon abhängige Genexpression und Zellfunktionen verstärkt werden.

Wie vorangehend bereits dargelegt, belegen die Ergebnisse der hier ausgeführten Untersuchungen in Übereinstimmung mit der Literatur, dass die Serumkonzentrationen von TNF- α , IL-1 β und EGF bei Patienten mit chronischer HCV-Infektion erhöht sind.^{66, 141, 284, 285} Von diesen Zytokinen ist zumindest für TNF- α und IL-1 β gut dokumentiert, dass sowohl NF- κ B als auch der AP-1 Komplex für die Signalübertragung dieser Zytokine eine kritische Rolle spielen. So werden nach Stimulation mit TNF- α beide Transkriptionsfaktoren über TRAF2 aktiviert und auch IL-1 β führt zur Aktivierung und Phosphorylierung der Untereinheiten p65 und p105 von NF- κ B wie auch zur Heraufregulation der Expression von c-Jun und c-Fos, zweier zentraler Komponenten des AP-1 Komplexes.³²³⁻³²⁷ Durch NF- κ B und AP-1 wird dabei

unter anderem auch die Transkription von pro-IL-1 β gefördert, sodass hierüber potenziell auch ein sich selbst verstärkender Rückkopplungsmechanismus aktiviert werden kann.^{328, 329} Entsprechend ist anzunehmen, dass NF- κ B- und AP-1-vermittelte Signalprozesse nicht nur durch HCV auf Ebene der Wirtszelle verstärkt werden, sondern auch auf Ebene des Wirtsorganismus. Hierbei wird die Konzentration von Faktoren, die ihre Aktivierung in der Zelle hervorrufen, heraufreguliert.

Ein Zielgen, dessen Expression unter anderem NF- κ B-abhängig kontrolliert wird, ist der CXCR2-Ligand CXCL8.^{128, 210, 330} Übereinstimmend hiermit belegen Vorbefunde der Arbeitsgruppe sowie die hier ausgeführten Befunde, dass sowohl der Knockdown der NF- κ B-Untereinheit p65 durch spezifische siRNA als auch die Hemmung der NF- κ B-Aktivierung zu einer signifikanten Reduktion sowohl der basalen als auch der induzierbaren Expression von CXCR2-Liganden in Zellen führt, die ein subgenomisches HCV-Replikon aufweisen.^{66, 252} Diese Beobachtung unterstreicht die zentrale Rolle dieses Transkriptionsfaktors für die Regulation der Expression von Chemokinen wie den Liganden der CXCR2-Familie. Weiterführende Untersuchungen der Arbeitsgruppe sowie die hier vorgelegten Untersuchungen belegen, dass auch HCV über die Beeinflussung der Aktivierung von NF- κ B die basale sowie die durch EGF bzw. IL-1 β induzierbare Expression von CXCL8 erheblich modifiziert.^{4, 33} Diese Befunde werden auch durch die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen gestützt, die nahelegen, dass HCV oder isolierte virale Proteine wie NS2, NS4A oder NS4B über die Aktivierung von NF- κ B die Expression von CXCL8 heraufregulieren.^{66, 252, 331, 332}

Es wurde in verschiedenen Zelllinien nachgewiesen, dass die Initiierung des Transkriptionsprozesses des CXCL8 Gens eine Aufhebung der Repression des CXCL8 Promotors erfordert. NKRF ist ein Transkriptionsfaktor, der mit spezifischen negativen regulatorischen Elementen (NREs) interagieren kann und hierüber die transkriptionelle Aktivierung von bestimmten NF- κ B-Zielgenen wie CXCL8 unterdrückt.²⁸¹ So kann NKRF die Bindung der NF- κ B Untereinheit p65 an die entsprechende Promotorsequenz im CXCL8 Gen stören und hierüber die transkriptionelle Expression des CXCL8 Gens verhindern.³³³

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen, dass die Expression von NKRF sowohl in Zellen, die das subgenomische Replikon des Genotyps 1 von HCV beherbergen, als auch in Zellen, die mit dem chimären HCV Virusstamm JC1 infiziert wurden, auf Transkriptebe-
supprimiert wird. Hiermit übereinstimmend sind auch die NKRF-Proteinlevel in HCV-Replikon Zellen, signifikant reduziert (Abb. 16, 17 und 18). Die Tatsache, dass der Knockdown von NKRF mittels spezifischer siRNA in einer Heraufregulation der Transkriptexpression von CXCL8 resultiert, legt nahe, dass die Supprimierung der Expression von NKRF durch HCV und die HCV vermittelte Steigerung der CXCL8 Expression funktionell miteinander zusammenhängen (Abb. 23 und 27). Es ist daher anzunehmen, dass die Supprimierung der Expression von NKRF durch HCV ein Teil des molekularen Mechanismus darstellt über den

HCV, wie in dieser Arbeit belegt, die basale sowie die durch IL-1 β - bzw. EGF-induzierbare Expression von CXCL8 verstärkt. Der genaue Mechanismus, durch den HCV über die Supprimierung der Expression von NKRF die basale sowie die IL-1 β - oder EGF-induzierte transkriptionelle Aktivierung der Expression des CXCL8 Gens verstärkt, ist ungeklärt und erfordert weiterführende Untersuchungen.

Ergänzend ist anzumerken, dass Ergebnisse von in HeLa-Zellen durchgeführten Reporteranalysen zur transkriptionellen Regulation der IL-1 α -induzierten CXCL8 Expression nahelegen, dass NKRF möglicherweise auch als transkriptioneller Aktivator fungiert. Dies könnte bedeuten, dass der Einfluss von NKRF auf die Genexpression eventuell stimulus und kontextabhängig ist. Da die Aussagen zur Rolle von NKRF für die durch IL-1 α -induzierte CXCL8-Expression jedoch lediglich auf der Auswirkung von Punktmutationen auf die Aktivierung von Reporter-Konstrukten der 5'-regulatorischen Region des CXCL8-Gens beruhen, bleibt offen, inwieweit diese Experimente tatsächlich die Funktion von NKRF widerspiegeln. Da die Aussagen zur Rolle von NKRF für die durch IL-1 α induzierte CXCL8 Expression jedoch lediglich auf der Auswirkung von Punktmutationen auf die Aktivierung von Reporter-Konstrukten der 5'-regulatorischen Region des CXCL8 Gens beruhen, bleibt offen, inwieweit diese Experimente tatsächlich die Funktion von NKRF widerspiegeln. Dies zumal in diesen Untersuchungen der Einfluss eines knock-downs von NKRF nicht miteinbezogen wurde.²⁸¹

Die Ergebnisse aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppe legen nahe, dass NF- κ B (p65) zwar ein wichtiger Faktor in der transkriptionellen Aktivierung der Genexpression von CXCL8 durch HCV ist, jedoch für sich genommen nicht ausreichend ist, um die verstärkende Wirkung von HCV auf die basale sowie die durch EGF- bzw. IL-1 β -induzierte Expression von CXCL8 hinlänglich zu erklären. Dies insbesondere, da der Knockdown der p65-Einheit zwar zu einer signifikanten Reduktion der basalen sowie durch EGF- bzw. IL-1 β -induzierbaren CXCL8-Expression führt, jedoch nicht in der Lage ist, den verstärkenden Einfluss von HCV auf die basale bzw. induzierte Genexpression von CXCL8 aufzuheben.^{66, 252} Entsprechend müssen weitere Faktoren involviert sein, über die die verstärkenden Effekte von HCV auf die Regulation der Expression von CXCR2 Liganden vermittelt werden.^{66, 252} Wie vorangehend bereits ausgeführt, spielt abgesehen von NF- κ B in der transkriptionellen Regulation der Genexpression von CXCL8 unter anderem noch der AP-1 Komplex eine wichtige Rolle. Dies ist durch eine Vielzahl an Untersuchungen in verschiedenen Zelltypen belegt.^{186, 301, 308, 334, 335} Dabei stellen die beiden Faktoren c-Jun und c-Fos, die auch zur Gruppe der *immediate early* Genes gehören, wichtige Untereinheiten des AP-1 Komplexes dar. Ein weiterer Ko-Faktor ist neben c-Jun und c-Fos auch ATF. Dieser Komplex ist in die Regulation einer Vielzahl von Genen involviert und spielt eine zentrale Rolle bei der Regulation zahlreicher biologischer Prozesse, darunter Proliferation, Differenzierung und Zelltod.²²²

Die hier zusammengefassten Untersuchungen belegen, dass HCV die basale sowie die induzierbare Expression von c-Fos und c-Jun signifikant verstärkt. Darüber hinaus belegen sowohl die Resultate der Inhibitorstudien unter Verwendung des AP-1 Inhibitors SR 11302 als auch die Knockdown-Experimente mittels c-Fos- bzw. c-Jun-spezifischer siRNA, dass AP-1 sowohl für die verstärkende Wirkung von HCV auf die basale und durch IL-1 β induzierte Expression von CXCL8 relevant ist als auch für die transkriptionelle Aktivierung der Genexpression durch Stimulation mit IL-1 β allein (Abb. 21 und 22).

Dabei legen die Ergebnisse der Knockdown Experimente mittels spezifischer siRNA insbesondere nahe, dass c-Fos und c-Jun jeweils für sich genommen für die verstärkenden Effekte von HCV auf die basale Expression von CXCL8 von besonderer Relevanz zu sein scheinen. Folgerichtig reicht der Knockdown eines der beiden Faktoren aus, um den verstärkenden Effekt von HCV auf die basale Expression des CXCL8-Gens annähernd vollständig aufzuheben (Abb. 22). Hiermit übereinstimmend führt auch die Hemmung der Aktivierung von AP-1 mit dem AP-1 Inhibitor SR 11302 zu einer annähernd vollständigen Aufhebung des verstärkenden Effektes des subgenomischen HCV-Replikons auf die basale CXCL8-Expression (Abb. 21). Diese Beobachtungen sind in Übereinstimmung mit der Literatur in welcher ebenfalls die Bedeutung von c-Jun und c-Fos bzw. des AP-1 Komplexes für die Regulation der Expression von CXCL8 durch HCV bzw. viruskodierte Proteine beschrieben ist.^{238, 239, 336-338} Dabei kann die Aktivierung von c-Jun und c-Fos durch HCV über die Aktivierung von JNK und ERK1/2 erfolgen, welche jedoch auch durch andere Stimuli wie IL-1 β und EGF aktiviert werden können.^{336, 337 231, 339, 340} Die kontext- und stimulusabhängige Rolle von AP-1 für die Regulation der CXCL8 Expression ist jedoch nur unvollständig verstanden. Interessant ist in diesem Kontext ferner, dass c-Fos einen direkten Einfluss auf die HCV-Replikation zu haben scheint. So legen Untersuchungen nahe, dass die Reduktion der c-Fos Expression zu einer reduzierten Replikation von HCV führt, während die Überexpression diese signifikant zu verstärken scheint.²³⁹ Denkbar wäre hier, dass dieser Effekt von c-Fos auf die HCV Replikation zumindest partiell auch über die Induktion der Expression von CXCL8 und die interferon-antagonistischen Effekte von letzterem vermittelt wird.²¹⁷ Weitere Arbeiten legen eine mögliche Rolle von c-Jun in der Entwicklung eines HCCs auf dem Boden einer chronischen HCV-Infektion nahe.²³⁸ In diesem Kontext könnte auch die Bedeutung von c-Jun für die Regulation der Expression von CXCL8 eine Rolle spielen, welches, wie oben ausgeführt, in der Literatur auch als für die HCC Entstehung relevanter Ko-Faktor diskutiert wird.³⁰⁵

Ein weiterer Faktor, über den die Aktivität und die Bindung von NF- κ B sowie von AP-1 am CXCL8 Promotor beeinträchtigt werden können ist Oct1, ebenfalls bekannt als POU2F1. Soweit aus Untersuchungen an nicht-hepatozytären Zellpopulationen hervorgeht, reprimiert Oct1 die transkriptionelle Expression des CXCL8-Gens.^{186, 280, 308} Dabei bindet es

entgegengesetzt zur C/EBP-Bindungsstelle an den komplementären Strang des CXCL8-Genpromotors und blockiert hierdurch die Transkription.³⁰⁸ Im Zuge der Aktivierung der transkriptionellen Expression des CXCL8 Gens wird Oct1 durch C/EBP ersetzt, welches seinerseits den Co-Aktivator CBP/p300 rekrutiert und hierüber die Hyperacetylierung von Histonen und die Umgestaltung des Chromatins verursacht. Letzteres ist Voraussetzung für die Bindung von AP-1 und NF- κ B an den Promoter und damit für eine optimale Aktivierung des CXCL8 Gens.¹⁸⁶ Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass für das HCV-Core Protein beschrieben ist, dass es mit p300/CBP interagieren kann und hierüber sowohl dessen Acetyltransferase- als auch Transkriptionsaktivitäten verstärkt.³⁴¹

Vor dem Hintergrund der Bedeutung von c-Fos und c-Jun für die Regulation des CXCL8 Promotors sowie für die Signalübertragung von IL-1 β und EGF in Hepatozyten lag es auf der Hand, sich die Bedeutung von Oct1 für die basale sowie die durch IL-1 β - bzw. EGF-induzierbare Expression der CXCL8-Genexpression und den Einfluss von HCV hierauf näher anzuschauen. Wie im Ergebnisteil ausgeführt, konnte in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen beobachtet werden, dass sowohl das subgenomische Replikon von HCV als auch die Infektion der Wirtszelle mit dem JFH1 Stamm des Hepatitis C Virus zu einer Herabregulation der Transkriptexpression von Oct1 führt (Abb. 16 und 17).

Der Knockdown der Oct1 Genexpression hat die Verstärkung der basalen Expression des CXCL8 Gens zur Folge sowie eine substantielle Verstärkung der durch IL-1 β und EGF induzierbaren transkriptionellen Aktivierung des CXCL8-Gens. Damit simuliert der Knockdown von Oct1 alle Effekte von HCV, sodass es wahrscheinlich ist, dass die Suppression der Oct1 Expression durch HCV und die Verstärkung der basalen sowie der induzierbaren Genexpression von CXCL8 durch HCV funktionell miteinander in Verbindung stehen. HCV würde somit durch Suppression von Oct1 die Bindung von CBP/p300 an den CXCL8 Promotor begünstigen und eine Hyperacetylierung der Histone mit konsekutiver Umgestaltung des Chromatins hervorrufen, welche, wie oben ausgeführt, wiederum Voraussetzung für die Bindung von NF- κ B und AP-1 an den CXCL8-Promotor wäre. Dies sind Aspekte, die im Verlauf weiterführender Arbeiten geklärt werden müssten. HCV supprimiert also sowohl die Expression von Oct1 als auch von NKRF und damit von zwei endogenen Repressoren der CXCL8-Genexpression und erzielt damit, soweit dies aus den Ergebnissen von Gen Knockdown Experimenten mit spezifischen siRNAs geschlossen werden kann, synergistische Effekte. So führt der kombinierte Knockdown von Oct1 und NKRF im Vergleich zum Knockdown der einzelnen Faktoren zu einer signifikanten Verstärkung sowohl der basalen als auch der induzierbaren Expression des CXCL8 Gens. Darüber hinaus wird der Einfluss des subgenomischen HCV-Replikons hierauf durch weitere Suppression der Expression von NKRF und Oct1 mittels Gen-Knock-down substantiell verstärkt (Abb. 23).

Zusammenfassend legen die Ergebnisse der hier ausgeführten Untersuchungen nahe, dass HCV über eine Interferenz mit der Aktivierung von NF- κ B und AP-1 die Expression von CXCR2-Liganden in der Wirtszelle verstärkt. Hierbei erfolgt die Interferenz einerseits direkt durch eine Heraufregulation der Expression von c-Fos und c-Jun, zwei zentralen Komponenten des AP-1 Komplexes, und damit über eine vermehrte Verfügbarkeit desselben. Andererseits supprimiert HCV die Expression von Oct1 und NKRF und damit von zwei endogenen Negativregulatoren der NF- κ B- und AP-1-vermittelten Genexpression, die zueinander synergistisch die Expression entsprechender Zielgene unterdrücken. Entsprechend führt die Suppression beider Faktoren durch HCV zu einer weiteren Verstärkung der basalen sowie der durch IL-1 β induzierbaren Genexpression von CXCL8 (Abb. 23). Entsprechend ist gut vorstellbar, dass die durch HCV reprogrammierte Wirtszelle auf die Stimulation mit IL-1 β , dessen Serumkonzentration direkt mit der HCV Viruslast korreliert, mit einer substantiellen Produktion von CXCL8 reagiert und folglich eine zusätzliche Erklärung für die erhöhten CXCL8 Serumspiegel bei chronisch infizierten Patienten darstellt. Ferner würde HCV, vor dem Hintergrund, dass CXCR2-Liganden wie CXCL8 zentrale Rekrutierungssignale für neutrophile Granulozyten darstellen, die interzelluläre Kommunikation zwischen Wirtszelle und neutrophilen Granulozyten relevant verändern.

Dies würde im Verlauf zu einer veränderten Rekrutierung dieser Zellpopulation in die Leber führen und wäre somit unter anderem auch ursächlich für die erhöhten Serumkonzentrationen von TNF- α und IL-1 β , für die neutrophile Granulozyten als relevante Quelle fungieren könnten, während Hepatozyten (vor allem im Hinblick auf TNF- α) nur in sehr begrenztem Umfang als Quelle in Frage kommen. Unklar bleibt, warum es abgesehen von IL-1 β , nach Ausheilen der HCV-Infektion zu keinem vollständigen Abfall der Serumkonzentrationen der anderen untersuchten Mediatoren auf die bei gesunden Kontrollen zu beobachtenden Level kommt. Dies gilt insbesondere auch für CXCL8, dessen Serumkonzentrationen, anders als auf der Basis des hier entwickelten regulatorischen Modells zu erwarten gewesen wäre, auch nach erfolgreicher Eradikation und damit Normalisierung der Serumkonzentrationen von IL-1 β und zumindest signifikantem Abfall der Konzentrationen von TNF- α , auch im mehrjährigen Verlauf nicht signifikant abfallen. Eine mögliche Erklärung wäre hier, dass HCV die intra- und interzelluläre Kommunikation beispielsweise über epigenetische Veränderungen anhaltend modifiziert, sodass sich diese, selbst nachdem das Virus eliminiert wurde, nicht vollständig normalisieren. Diese Überlegung ist jedoch bislang nicht detailliert untersucht worden und erfordert entsprechend weiterführende Untersuchungen.

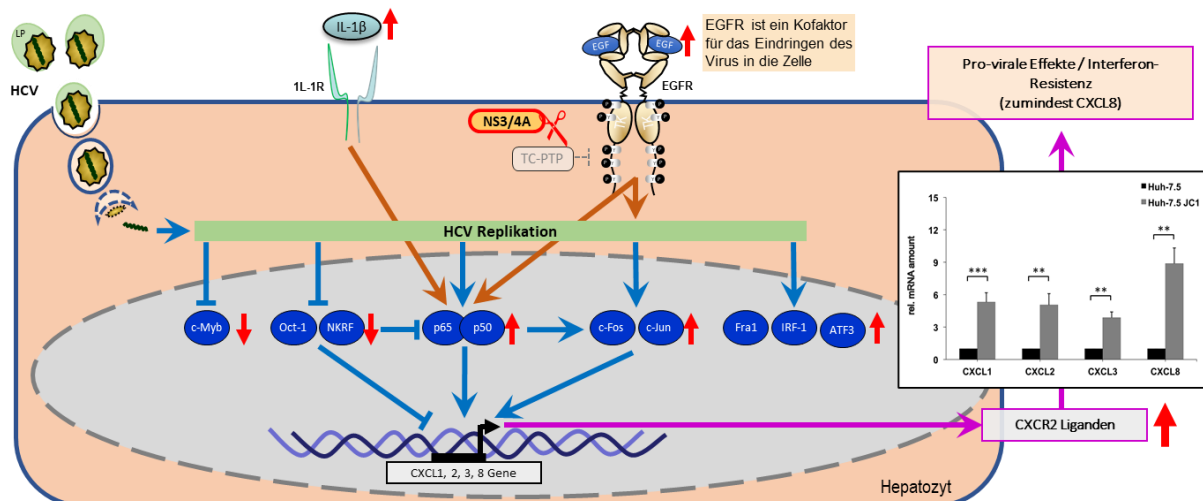


Abbildung 32: HCV moduliert die Expression von CXCR2 Liganden über NF-κB und AP-1. Bei Patienten mit chronischer HCV-Infektion sind die Serumspiegel von IL-1β und EGF signifikant erhöht. Zusätzlich spaltet die virale Protease NS3/4A die TC-PTP, was zu einer gesteigerten Expression von EGFR führt. HCV, IL-1β und EGF weisen eine positive Wirkung auf die Aktivität von NF-κB sowie von c-Fos/c-Jun auf. Des Weiteren unterdrückt HCV die Expression der negativen Regulatoren Oct1 und NKRF. Die Unterdrückung führt zu einer gesteigerten Aktivität von NF-κB sowie von c-Fos/c-Jun. Alles zusammen führt zu einer gesteigerten Expression von CXCR2-Liganden infolge einer HCV-Infektion.²⁵²

4.3 RNA Seq Analyse im chronischen HCV-Model

Die vorangehenden Analysen legen nahe, dass HCV signifikant mit der intrazellulären Signalübertragung und der hierdurch kontrollierten Genexpression interferiert. Daher wurde in einem zweiten umfassenderen Ansatz mittels RNA-Seq Analysen untersucht, inwieweit HCV die basale sowie die durch IL-1β induzierbare Genexpression beeinflusst. Hierfür wurde ein experimenteller Ansatz gewählt, bei dem Huh 7.5 Zellen nach Induktion einer Differenzierung mittels DMSO und damit auch eines Proliferationsarrests für die Dauer von einer Woche (168 Stunden) infiziert wurden. Anders als die zumeist eingesetzten Infektionsexperimente, die eher die akute Infektion nachstellen, kommt dieser Ansatz, ähnlich wie die auf dem stabil exprimierten subgenomischen Replikon basierenden experimentellen Ansätze, einer persistierenden Infektion am nächsten. Vergleichbare Arbeiten in der Literatur basieren hingegen auf dem "akuten" Infektionsmodell ohne vorangehende Induktion einer Zelldifferenzierung, wobei Infektionsdauern von 24 bis maximal 120 Stunden nach der Infektion untersucht wurden.

Zur Analyse der Daten wurden die im Material & Methoden Teil ausgeführten Filterbedingungen eingesetzt, die im Wesentlichen den in der Literatur im Rahmen vergleichbarer Analysen eingesetzten Methoden entsprechen (siehe Kapitel 2.4.7). Um die statistische Aussagekraft zu erhöhen, gingen in die Analysen pro Kondition sechs voneinander unabhängige Ansätze ein. Basierend auf den gesetzten Kriterien konnten im chronischen

Modell 76 Gene identifiziert werden, die in Reaktion auf die Infektion mit HCV unterschiedlich exprimiert wurden (Abb. 31). Es ist erwähnenswert, dass die überwiegende Mehrheit der untersuchten Veränderungen eine Hochregulierung der Genexpression umfasste, was mit den Berichten in der Literatur übereinstimmt.^{342, 343}

In der Literatur wird beschrieben, dass nach 72 Stunden Infektion etwas über 700 *differentially expressed genes* (DEGs) mittels RNA-Seq identifiziert werden können. Allerdings nimmt die Anzahl der DEGs nach 96 Stunden Infektion bereits auf etwa 300 Gene ab.⁸⁷ Somit reduziert sich die Anzahl der DEGs um mehr als die Hälfte im Vergleich zwischen 72 und 96 Stunden nach der Infektion. Es ist daher gut möglich, dass nach 168 Stunden (einer Woche) Infektion durch HCV im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle nur noch vergleichbar wenige Gene differentiell exprimiert werden. Einschränkend muss hier gesagt werden, dass dies auch Folge einer Reduktion infizierter Zellen in der gesamten Zellkultur sein kann. Dies zumal in diesem Ansatz die Infektionskontrolle mittels RT-PCR erfolgte und nicht durch immunhistochemische Färbungen, die eine genauere Quantifizierung der Zahl infizierter Zellen ermöglicht hätte. Es ist allerdings sehr wahrscheinlich, dass die Gene, die selbst nach einer Woche Infektion noch durch die Wirtszellen differentiell exprimiert werden (wie unter anderem CXCL8, Jun, NFKB2), von zentraler Bedeutung für die Aufrechterhaltung des viralen Lebenszyklus sowie die Interferenz mit antiviralen Effektormechanismen sind (Abb. 30).

Zusätzlich konnten mit den Filterbedingungen über 3000 Gene identifiziert werden, die bereits bei Stimulation mit einer geringen Konzentration von 0,5 U/ml (0,01 ng/ml) IL-1 β eine signifikante Veränderung der Genexpression in Hepatozyten bewirkt haben. In der Literatur finden sich in anderen Zelllinien etwa 788 bis 1.747 DEGs nach Stimulation mit IL-1 β .³⁴⁴ Bisher gab es keine vergleichbaren RNA-Seq Analysen in Hepatozyten nach Stimulation mit IL-1 β . Diese Ergebnisse legen nahe, dass insbesondere in Hepatozyten bereits durch eine geringe Konzentration von IL-1 β (0,01 ng/ml) eine Vielzahl von Genen sowohl induziert als auch supprimiert wird. In Übereinstimmung mit der Literatur legen die Ergebnisse von Signalweg Analysen nahe, dass eine relevante Zahl an Genen, die durch IL-1 β aktiviert werden, einer transkriptionellen Kontrolle durch NF- κ B und/oder AP-1 unterliegt.³⁴⁵⁻³⁴⁷

HCV-infizierte Zellen, die mit IL-1 β stimuliert wurden, wiesen im Vergleich zu den stimulierten Kontrollzellen keine Zunahme an DEGs insgesamt auf. Der Effekt von HCV hat, soweit sich aus diesen Daten schlussfolgern lässt, somit einen überschaubaren Einfluss auf die Gesamtheit der durch IL-1 β induzierten Gene. Dies ist vor dem Hintergrund der bereits bekannten Mechanismen aus dem Replikon- oder Infektionssystem, bei denen in der Literatur belegt ist, dass HCV den durch IL-1 β induzierten Effekt bestimmter Zielgene (unter anderem CXCL1, CXCL3 und CXCL8) zusätzlich steigert, etwas überraschend.²⁵²

Vor dem Hintergrund des deutlichen Effekts der Stimulation mit IL-1 β muss jedoch allen voran auch hier diskutiert werden, ob die Zahl noch infizierter Zellen zu niedrig ist, um den Einfluss

von HCV auf den Effekt von IL-1 β noch adäquat abzubilden. Hier sollten für Folgeexperimente Methoden evaluiert werden, bei denen sichergestellt ist, dass nach einer Woche Infektionsdauer noch ein relevanter Anteil an Zellen HCV-infiziert ist. Neben diesem sowie den vorangehend bereits ausgeführten limitierenden Punkten bleibt jedoch offen, ob die hier gewählten Analyseansätze, deren relative Quantifizierung überwiegend auf der Ermittlung des x-fachen der korrespondierenden Kontrolle beruht, zu kurz greifen, sodass möglicherweise Effekte nicht berücksichtigt werden, bei denen sowohl die Kontrolle als auch die induzierte Situation verstärkt wird. Eine weitere Erklärung könnte sein, dass in den länger kultivierten Zellen bereits bei einer Konzentration von 0,01 ng/ml IL-1 β eine Genexpression erfolgt, die durch HCV in ihrer Amplitude nur noch vergleichsweise geringfügig beeinflusst wird. Hier werden in Folgeprojekten weiterführende experimentelle Ansätze erforderlich sein, die die vorangehend diskutierten Punkte adressieren.

5. Zusammenfassung

Bis zu 70 % der mit dem Hepatitis-C-Virus (HCV) infizierten Personen entwickeln eine persistierende Infektion, die in den meisten Fällen jahrzehntelang asymptomatisch verläuft, bis die Krankheit symptomatisch wird. Dies deutet darauf hin, dass sich Mechanismen entwickelt haben, die dem Virus eine geringe Immunogenität verleihen und es ihm ermöglichen, in der Wirtszelle zu replizieren, ohne deren Lebensfähigkeit zu stark zu beeinträchtigen. Dies wird zum Teil durch eine weitreichende Interferenz von HCV mit der intra- und interzellulären Signaltransduktion der Wirtszelle erreicht. Vorarbeiten der Arbeitsgruppe haben belegt, dass HCV in diesem Zusammenhang auch die basale sowie die durch Zytokine und Wachstumsfaktoren induzierbare Expression von Liganden des CXCR2-Rezeptors wie CXCL8 signifikant verändert. Darauf aufbauend war es Ziel der Arbeit, insbesondere am Beispiel des CXCL8 Gens die Mechanismen weiter zu untersuchen, über die HCV die basale sowie die induzierbare Expression desselben beeinflusst. Darüber hinaus sollten die Veränderungen der Serumkonzentrationen ausgewählter Zytokine und Wachstumsfaktoren im Verlauf einer chronischen HCV-Infektion weiter analysiert werden. Die Ergebnisse der in dieser Arbeit zusammengefassten Untersuchungen legen nahe, dass Patienten mit einer chronischen HCV-Infektion im Vergleich zu gesunden Kontrollen signifikant erhöhte Serumspiegel von IL-1 β , CXCL8, EGF, TNF- α , VEGF-A, NRG1 und AREG aufweisen. Interessanterweise sanken nach erfolgreicher Behandlung nur die Serumspiegel von IL-1 β , EGF, TNF- α und NRG1, während die Konzentrationen von CXCL8, VEGF-A und AREG trotz erfolgreicher Viruselimination auch im Langzeitverlauf erhöht blieben. Basierend auf einer *in silico*-Analyse der 5' regulatorischen Region des CXCL8-Promotors konnten neben NF- κ B acht weitere Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, deren Expression durch HCV moduliert wird, wobei die Expression der Transkriptionsfaktoren c-Fos, c-Jun, Fra1, IRF1 und ATF3 in Gegenwart von HCV signifikant zunahm, während die Expression von c-Myb, NKRF und Oct1 signifikant abnahm. Weitere Analysen unter Verwendung von Inhibitoren und selektivem Knockdown der Genexpression durch spezifische siRNA belegen, dass HCV sowohl die basale als auch die IL-1 β - und EGF-induzierbare Expression von CXCL8 über die Herabregulation der Transkriptionsfaktoren NKRF und Oct1, die verstärkte Expression der beiden Komponenten des AP-1 Komplexes, c-Fos und c-Jun, und die verstärkte Aktivierung von NF- κ B beeinflusst. Die Ergebnisse von RNA-Seq-Analysen legen ferner nahe, dass HCV neben CXCR2 Liganden in der Wirtszelle die Expression einer Reihe weiterer Zielgene beeinflusst, die durch die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 reguliert werden. Zusammenfassend deuten diese Daten darauf hin, dass HCV die CXCL8-vermittelte interzelluläre Kommunikation reprogrammiert und dass in diesem Zusammenhang die Beeinflussung der NF- κ B- und AP-1-vermittelten intrazellulären Signaltransduktion sowie endogene Regulatoren wie Oct1 und NKRF von Bedeutung sind.

6. Summary

Up to 70 % of people infected with the hepatitis C virus (HCV) develop persistent infection, in most cases remaining asymptomatic for decades until the development of overt disease. This suggests that mechanisms have evolved that confer low immunogenicity on the virus and allow it to replicate in the host cell without compromising its viability. This is achieved in part by extensive interference of HCV with intra- and intercellular signaling in the host cell. Preliminary work by the research group has shown that HCV also significantly alters the basal expression of CXCR2 receptor ligands such as CXCL8, as well as the expression of these ligands induced by cytokines and growth factors. The aim of this study was to further investigate the mechanisms by which HCV affects the basal and inducible expression of CXCL8. In addition, the changes in serum concentrations of selected cytokines and growth factors during chronic HCV infection were further analyzed. The results of the studies summarized in this paper suggest that patients with chronic HCV infection have significantly higher serum levels of IL-1 β , CXCL8, EGF, TNF- α , VEGF-A, NRG1, and AREG than healthy controls. Interestingly, only the serum levels of IL-1 β , EGF, TNF- α , and NRG1 decreased after successful treatment, whereas the levels of CXCL8, VEGF-A, and AREG remained elevated in the long term despite successful virus elimination. Based on an *in silico* analysis of the 5' regulatory region of the CXCL8 promoter, eight transcription factors were identified in addition to NF- κ B whose expression is modulated by HCV. c-Fos, c-Jun, Fra1, IRF1, and ATF3 were significantly upregulated in the presence of HCV, whereas c-Myb, NKRF, and Oct1 were significantly downregulated. Further analyses using inhibitors and selective knockdown of gene expression by specific siRNA indicate that HCV affects both basal and IL-1 β - and EGF-inducible expression of CXCL8 by downregulating the transcription factors NKRF and Oct1, increasing the expression of the two components of the AP-1 complex, c-Fos and c-Jun, and increasing the activation of NF- κ B. The results of RNA-seq analyses also suggest that, in addition to CXCR2 ligands in the host cell, HCV affects the expression of several other target genes regulated by the transcription factors NF- κ B and AP-1.

In conclusion, these data suggest that HCV reprograms CXCL8-mediated intercellular communication and that the influence of NF- κ B- and AP-1 mediated intracellular signaling, as well as endogenous regulators such as Oct1 and NKRF, are important in this context

7. Literaturverzeichnis

1. Klepper A, Eng FJ, Doyle EH, et al. Hepatitis C virus double-stranded RNA is the predominant form in human liver and in interferon-treated cells. *Hepatology* 2017;66:357-370.
2. Weltgesundheitsorganisation. Hepatitis C. Volume 2023, 2023.
3. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018;68:394-424.
4. Axley P, Ahmed Z, Ravi S, Singal AK. Hepatitis C Virus and Hepatocellular Carcinoma: A Narrative Review. *J Clin Transl Hepatol* 2018;6:79-84.
5. Chevaliez S, Pawlotsky JM. HCV Genome and Life Cycle. In: Tan SL, ed. *Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology*. Norfolk (UK): Horizon Bioscience Copyright © 2006, Horizon Bioscience., 2006.
6. Moradpour D, Penin F, Rice CM. Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol* 2007;5:453-63.
7. Alter HJ, Purcell RH, Shih JW, et al. Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med* 1989;321:1494-500.
8. Global prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus infection in 2015: a modelling study. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2017;2:161-176.
9. Morozov VA, Lagaye S. Hepatitis C virus: Morphogenesis, infection and therapy. *World J Hepatol* 2018;10:186-212.
10. Beaulieu PL, Tsantrizos YS. Inhibitors of the HCV NS5B polymerase: new hope for the treatment of hepatitis C infections. *Curr Opin Investig Drugs* 2004;5:838-50.
11. Ashfaq UA, Javed T, Rehman S, et al. An overview of HCV molecular biology, replication and immune responses. *Virology Journal* 2011;8:161.
12. Bukh J. The history of hepatitis C virus (HCV): Basic research reveals unique features in phylogeny, evolution and the viral life cycle with new perspectives for epidemic control. *Journal of Hepatology* 2016;65:S2-S21.
13. Drummer HE, Maerz A, Pountourios P. Cell surface expression of functional hepatitis C virus E1 and E2 glycoproteins. *FEBS Lett* 2003;546:385-90.
14. Atoom AM, Taylor NG, Russell RS. The elusive function of the hepatitis C virus p7 protein. *Virology* 2014;462-463:377-87.
15. Khromykh AA, Westaway EG. Subgenomic replicons of the flavivirus Kunjin: construction and applications. *J Virol* 1997;71:1497-505.

16. Pietschmann T, Kaul A, Koutsoudakis G, et al. Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:7408-13.
17. Gallinari P, Brennan D, Nardi C, et al. Multiple enzymatic activities associated with recombinant NS3 protein of hepatitis C virus. *J Virol* 1998;72:6758-69.
18. Lundin M, Lindström H, Grönwall C, Persson MAA. Dual topology of the processed hepatitis C virus protein NS4B is influenced by the NS5A protein. *J Gen Virol* 2006;87:3263-3272.
19. Macdonald A, Crowder K, Street A, et al. The hepatitis C virus NS5A protein binds to members of the Src family of tyrosine kinases and regulates kinase activity. *J Gen Virol* 2004;85:721-729.
20. Reed KE, Xu J, Rice CM. Phosphorylation of the hepatitis C virus NS5A protein in vitro and in vivo: properties of the NS5A-associated kinase. *J Virol* 1997;71:7187-97.
21. Behrens SE, Tomei L, De Francesco R. Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *Embo j* 1996;15:12-22.
22. Sandmann L, Ploss A. Barriers of hepatitis C virus interspecies transmission. *Virology* 2013;435:70-80.
23. Ding Q, von Schaewen M, Ploss A. The impact of hepatitis C virus entry on viral tropism. *Cell Host Microbe* 2014;16:562-8.
24. Flint M, von Hahn T, Zhang J, et al. Diverse CD81 proteins support hepatitis C virus infection. *J Virol* 2006;80:11331-42.
25. Ploss A, Evans MJ, Gaysinskaya VA, et al. Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature* 2009;457:882-6.
26. Masciopinto F, Freer G, Burgio VL, et al. Expression of human CD81 in transgenic mice does not confer susceptibility to hepatitis C virus infection. *Virology* 2002;304:187-96.
27. Forton DM. Hepatitis C - the brain strain. *Liver Int* 2016;36:1415-7.
28. Meredith LW, Wilson GK, Fletcher NF, McKeating JA. Hepatitis C virus entry: beyond receptors. *Rev Med Virol* 2012;22:182-93.
29. Thomssen R, Bonk S, Propfe C, et al. Association of hepatitis C virus in human sera with beta-lipoprotein. *Med Microbiol Immunol* 1992;181:293-300.
30. Ploss A, Evans MJ. Hepatitis C virus host cell entry. *Curr Opin Virol* 2012;2:14-9.
31. Miao Z, Xie Z, Miao J, et al. Regulated Entry of Hepatitis C Virus into Hepatocytes. *Viruses* 2017;9.
32. Häussinger D, Kordes C. Space of Disse: a stem cell niche in the liver. *Biol Chem* 2019;401:81-95.

33. Zhu YZ, Qian XJ, Zhao P, Qi ZT. How hepatitis C virus invades hepatocytes: the mystery of viral entry. *World J Gastroenterol* 2014;20:3457-67.
34. Zeisel MB, Fofana I, Fafi-Kremer S, Baumert TF. Hepatitis C virus entry into hepatocytes: Molecular mechanisms and targets for antiviral therapies. *Journal of Hepatology* 2011;54:566-576.
35. Lefèvre M, Felmlee DJ, Parnot M, et al. Syndecan 4 is involved in mediating HCV entry through interaction with lipoviral particle-associated apolipoprotein E. *PLoS One* 2014;9:e95550.
36. Shi Q, Jiang J, Luo G. Syndecan-1 serves as the major receptor for attachment of hepatitis C virus to the surfaces of hepatocytes. *J Virol* 2013;87:6866-75.
37. Bankwitz D, Steinmann E, Bitzegeio J, et al. Hepatitis C virus hypervariable region 1 modulates receptor interactions, conceals the CD81 binding site, and protects conserved neutralizing epitopes. *J Virol* 2010;84:5751-63.
38. Douam F, Lavillette D, Cosset F-L. Chapter Three - The Mechanism of HCV Entry into Host Cells. In: Klasse PJ, ed. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Volume 129: Academic Press, 2015:63-107.
39. Diao J, Pantua H, Ngu H, et al. Hepatitis C virus induces epidermal growth factor receptor activation via CD81 binding for viral internalization and entry. *J Virol* 2012;86:10935-49.
40. Zona L, Lupberger J, Sidahmed-Adrar N, et al. HRas signal transduction promotes hepatitis C virus cell entry by triggering assembly of the host tetraspanin receptor complex. *Cell Host Microbe* 2013;13:302-13.
41. Farquhar MJ, Hu K, Harris HJ, et al. Hepatitis C virus induces CD81 and claudin-1 endocytosis. *J Virol* 2012;86:4305-16.
42. Wong-Staal F, Syder AJ, McKelvy JF. Targeting HCV entry for development of therapeutics. *Viruses* 2010;2:1718-1733.
43. Lohmann V, Körner F, Koch J, et al. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 1999;285:110-3.
44. Alazard-Dany N, Denolly S, Boson B, Cosset FL. Overview of HCV Life Cycle with a Special Focus on Current and Possible Future Antiviral Targets. *Viruses* 2019;11.
45. Calattini S, Fusil F, Mancip J, et al. Functional and Biochemical Characterization of Hepatitis C Virus (HCV) Particles Produced in a Humanized Liver Mouse Model. *J Biol Chem* 2015;290:23173-87.
46. Maggi F, Focosi D, Pistello M. How Current Direct-Acting Antiviral and Novel Cell Culture Systems for HCV are Shaping Therapy and Molecular Diagnosis of Chronic HCV Infection? *Curr Drug Targets* 2017;18:811-825.
47. Loustaud-Ratti V, Debette-Gratien M, Jacques J, et al. Ribavirin: Past, present and future. *World J Hepatol* 2016;8:123-30.

48. Sulkowski MS, Cooper C, Hunyady B, et al. Management of adverse effects of Peg-IFN and ribavirin therapy for hepatitis C. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2011;8:212-23.
49. Zumla A. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases: *Lancet Infect Dis*. 2010 May;10(5):303-4. doi: 10.1016/S1473-3099(10)70089-X. Epub 2010 Apr 21.
50. Wilby KJ, Partovi N, Ford JA, et al. Review of boceprevir and telaprevir for the treatment of chronic hepatitis C. *Can J Gastroenterol* 2012;26:205-10.
51. Sulkowski MS, Vargas HE, Di Bisceglie AM, et al. Effectiveness of Simeprevir Plus Sofosbuvir, With or Without Ribavirin, in Real-World Patients With HCV Genotype 1 Infection. *Gastroenterology* 2016;150:419-29.
52. Cada DJ, Cong J, Baker DE. Sofosbuvir. *Hosp Pharm* 2014;49:466-78.
53. Kish T, Aziz A, Sorio M. Hepatitis C in a New Era: A Review of Current Therapies. *P t* 2017;42:316-329.
54. Fierer DS, Wyles DL. Re-treatment of Hepatitis C Infection After Multiple Failures of Direct-Acting Antiviral Therapy. *Open Forum Infect Dis* 2020;7:ofaa095.
55. Hajarizadeh B, Grebely J, Dore GJ. Epidemiology and natural history of HCV infection. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013;10:553-62.
56. Khatun M, Ray RB. Mechanisms Underlying Hepatitis C Virus-Associated Hepatic Fibrosis. *Cells* 2019;8.
57. Brochado-Kith Ó, Martínez I, Berenguer J, et al. HCV Cure With Direct-Acting Antivirals Improves Liver and Immunological Markers in HIV/HCV-Coinfected Patients. *Front Immunol* 2021;12:723196.
58. Kwong AD, Kauffman RS, Hurter P, Mueller P. Discovery and development of telaprevir: an NS3-4A protease inhibitor for treating genotype 1 chronic hepatitis C virus. *Nat Biotechnol* 2011;29:993-1003.
59. Bartenschlager R, Lohmann V. Replication of hepatitis C virus. *J Gen Virol* 2000;81:1631-48.
60. Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, et al. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 2005;309:623-6.
61. Wakita T, Pietschmann T, Kato T, et al. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 2005;11:791-6.
62. Kato T, Date T, Miyamoto M, et al. Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. *Gastroenterology* 2003;125:1808-17.
63. Kato T, Furusaka A, Miyamoto M, et al. Sequence analysis of hepatitis C virus isolated from a fulminant hepatitis patient. *J Med Virol* 2001;64:334-9.

64. Zhong J, Gastaminza P, Cheng G, et al. Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:9294-9.
65. Steinmann E, Pietschmann T. Cell culture systems for hepatitis C virus. *Curr Top Microbiol Immunol* 2013;369:17-48.
66. Groepper C, Ruffinatscha K, Schröder N, et al. HCV modifies EGF signalling and upregulates production of CXCR2 ligands: Role in inflammation and antiviral immune response. *Journal of Hepatology* 2018;69:594-602.
67. Bode JG, Brenndörfer ED, Karthe J, Häussinger D. Interplay between host cell and hepatitis C virus in regulating viral replication. *Biol Chem* 2009;390:1013-32.
68. Heim MH, Thimme R. Innate and adaptive immune responses in HCV infections. *J Hepatol* 2014;61:S14-25.
69. Randall G, Panis M, Cooper JD, et al. Cellular cofactors affecting hepatitis C virus infection and replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:12884-9.
70. Pascut D, Hoang M, Nguyen NNQ, et al. HCV Proteins Modulate the Host Cell miRNA Expression Contributing to Hepatitis C Pathogenesis and Hepatocellular Carcinoma Development. *Cancers (Basel)* 2021;13.
71. Naderali E, Khaki AA, Rad JS, et al. Regulation and modulation of PTEN activity. *Mol Biol Rep* 2018;45:2869-2881.
72. Eddy AC, Bidwell GL, 3rd, George EM. Pro-angiogenic therapeutics for preeclampsia. *Biol Sex Differ* 2018;9:36.
73. Sharma D, Jaggi AS, Bali A. Clinical evidence and mechanisms of growth factors in idiopathic and diabetes-induced carpal tunnel syndrome. *Eur J Pharmacol* 2018;837:156-163.
74. Witsch E, Sela M, Yarden Y. Roles for Growth Factors in Cancer Progression. *Physiology* 2010;25:85-101.
75. Stone WL, Leavitt L, Varacallo M. Physiology, Growth Factor. StatPearls. Treasure Island (FL) ineligible companies. Disclosure: Logan Leavitt declares no relevant financial relationships with ineligible companies. Disclosure: Matthew Varacallo declares no relevant financial relationships with ineligible companies.: StatPearls Publishing Copyright © 2024, StatPearls Publishing LLC., 2024.
76. Wieduwilt MJ, Moasser MM. The epidermal growth factor receptor family: biology driving targeted therapeutics. *Cell Mol Life Sci* 2008;65:1566-84.
77. Alzamzamy A, Elsayed H, Abd Elraouf M, et al. Serum vascular endothelial growth factor as a tumor marker for hepatocellular carcinoma in hepatitis C virus-related cirrhotic patients. *World J Gastrointest Oncol* 2021;13:600-611.
78. Linggi B, Carpenter G. ErbB receptors: new insights on mechanisms and biology. *Trends Cell Biol* 2006;16:649-56.

79. Lockhart AC, Berlin JD. The epidermal growth factor receptor as a target for colorectal cancer therapy. *Semin Oncol* 2005;32:52-60.
80. Singh B, Carpenter G, Coffey RJ. EGF receptor ligands: recent advances. *F1000Res* 2016;5.
81. Scaltriti M, Baselga J. The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy. *Clin Cancer Res* 2006;12:5268-72.
82. Eitsuka T, Tatewaki N, Nishida H, et al. Synergistic Anticancer Effect of Tocotrienol Combined with Chemotherapeutic Agents or Dietary Components: A Review. *International Journal of Molecular Sciences* 2016;17:1605.
83. Wee P, Wang Z. Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways. *Cancers* 2017;9:52.
84. Uribe ML, Marrocco I, Yarden Y. EGFR in Cancer: Signaling Mechanisms, Drugs, and Acquired Resistance. *Cancers (Basel)* 2021;13.
85. Visser Smit GD, Place TL, Cole SL, et al. Cbl controls EGFR fate by regulating early endosome fusion. *Sci Signal* 2009;2:ra86.
86. Fröhlich H, Bahamondez G, Götschel F, Korf U. Dynamic Bayesian Network Modeling of the Interplay between EGFR and Hedgehog Signaling. *PLoS One* 2015;10:e0142646.
87. Baktash Y, Madhav A, Collier KE, Randall G. Single Particle Imaging of Polarized Hepatoma Organoids upon Hepatitis C Virus Infection Reveals an Ordered and Sequential Entry Process. *Cell Host Microbe* 2018;23:382-394.e5.
88. Meyer K, Kwon YC, Liu S, et al. Interferon- α inducible protein 6 impairs EGFR activation by CD81 and inhibits hepatitis C virus infection. *Sci Rep* 2015;5:9012.
89. Mailly L, Xiao F, Lupberger J, et al. Clearance of persistent hepatitis C virus infection in humanized mice using a claudin-1-targeting monoclonal antibody. *Nat Biotechnol* 2015;33:549-554.
90. Brazzoli M, Bianchi A, Filippini S, et al. CD81 is a central regulator of cellular events required for hepatitis C virus infection of human hepatocytes. *J Virol* 2008;82:8316-29.
91. Brenndörfer ED, Karthe J, Frelin L, et al. Nonstructural 3/4A protease of hepatitis C virus activates epithelial growth factor-induced signal transduction by cleavage of the T-cell protein tyrosine phosphatase. *Hepatology* 2009;49:1810-20.
92. Stindt S, Cebula P, Albrecht U, et al. Hepatitis C Virus Activates a Neuregulin-Driven Circuit to Modify Surface Expression of Growth Factor Receptors of the ErbB Family. *PLoS One* 2016;11:e0148711.
93. Lupberger J, Zeisel MB, Xiao F, et al. EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy. *Nat Med* 2011;17:589-95.

94. Tiganis T, Bennett AM, Ravichandran KS, Tonks NK. Epidermal growth factor receptor and the adaptor protein p52Shc are specific substrates of T-cell protein tyrosine phosphatase. *Mol Cell Biol* 1998;18:1622-34.
95. Zhang JM, An J. Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin* 2007;45:27-37.
96. Steinke JW, Borish L. 3. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:S441-5.
97. Fallahi P, Ferri C, Ferrari SM, et al. Cytokines and HCV-related disorders. *Clin Dev Immunol* 2012;2012:468107.
98. Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, et al. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev* 2000;52:145-76.
99. Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 1996;87:2095-147.
100. Dinarello CA, Ikejima T, Warner SJ, et al. Interleukin 1 induces interleukin 1. I. Induction of circulating interleukin 1 in rabbits in vivo and in human mononuclear cells in vitro. *J Immunol* 1987;139:1902-10.
101. Granowitz EV, Clark BD, Vannier E, et al. Effect of interleukin-1 (IL-1) blockade on cytokine synthesis: I. IL-1 receptor antagonist inhibits IL-1-induced cytokine synthesis and blocks the binding of IL-1 to its type II receptor on human monocytes. *Blood* 1992;79:2356-63.
102. Netea MG, Nold-Petry CA, Nold MF, et al. Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1 β in monocytes and macrophages. *Blood* 2009;113:2324-35.
103. Hoffmann E, Thiefes A, Buhrow D, et al. MEK1-dependent delayed expression of Fos-related antigen-1 counteracts c-Fos and p65 NF-kappaB-mediated interleukin-8 transcription in response to cytokines or growth factors. *J Biol Chem* 2005;280:9706-18.
104. Bandman O, Coleman RT, Loring JF, et al. Complexity of inflammatory responses in endothelial cells and vascular smooth muscle cells determined by microarray analysis. *Ann N Y Acad Sci* 2002;975:77-90.
105. Holzberg D, Knight CG, Dittrich-Breiholz O, et al. Disruption of the c-JUN-JNK complex by a cell-permeable peptide containing the c-JUN delta domain induces apoptosis and affects a distinct set of interleukin-1-induced inflammatory genes. *J Biol Chem* 2003;278:40213-23.
106. Eder C. Mechanisms of interleukin-1 β release. *Immunobiology* 2009;214:543-53.
107. Pétrilli V, Dostert C, Muruve DA, Tschopp J. The inflammasome: a danger sensing complex triggering innate immunity. *Curr Opin Immunol* 2007;19:615-22.
108. Dubyak GR. P2X7 receptor regulation of non-classical secretion from immune effector cells. *Cell Microbiol* 2012;14:1697-706.

109. Dinarello CA. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood* 2011;117:3720-32.
110. Pulugulla SH, Packard TA, Galloway NLK, et al. Distinct mechanisms regulate IL1B gene transcription in lymphoid CD4 T cells and monocytes. *Cytokine* 2018;111:373-381.
111. Jura J, Wegrzyn P, Korostyński M, et al. Identification of interleukin-1 and interleukin-6-responsive genes in human monocyte-derived macrophages using microarrays. *Biochim Biophys Acta* 2008;1779:383-9.
112. Allantaz F, Chaussabel D, Stichweh D, et al. Blood leukocyte microarrays to diagnose systemic onset juvenile idiopathic arthritis and follow the response to IL-1 blockade. *J Exp Med* 2007;204:2131-44.
113. Vincenti MP, Brinckerhoff CE. Early response genes induced in chondrocytes stimulated with the inflammatory cytokine interleukin-1beta. *Arthritis Res* 2001;3:381-8.
114. Joos H, Albrecht W, Laufer S, Brenner RE. Influence of p38MAPK inhibition on IL-1beta-stimulated human chondrocytes: a microarray approach. *Int J Mol Med* 2009;23:685-93.
115. Wolter S, Doerrie A, Weber A, et al. c-Jun controls histone modifications, NF-kappaB recruitment, and RNA polymerase II function to activate the ccl2 gene. *Mol Cell Biol* 2008;28:4407-23.
116. Jeong JG, Kim JM, Cho H, et al. Effects of IL-1beta on gene expression in human rheumatoid synovial fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;324:3-7.
117. Gaestel M, Kotlyarov A, Kracht M. Targeting innate immunity protein kinase signalling in inflammation. *Nat Rev Drug Discov* 2009;8:480-99.
118. Krause A, Holtmann H, Eickemeier S, et al. Stress-activated protein kinase/Jun N-terminal kinase is required for interleukin (IL)-1-induced IL-6 and IL-8 gene expression in the human epidermal carcinoma cell line KB. *J Biol Chem* 1998;273:23681-9.
119. Dunn E, Sims JE, Nicklin MJ, O'Neill LA. Annotating genes with potential roles in the immune system: six new members of the IL-1 family. *Trends Immunol* 2001;22:533-6.
120. Schreuder H, Tardif C, Trump-Kallmeyer S, et al. A new cytokine-receptor binding mode revealed by the crystal structure of the IL-1 receptor with an antagonist. *Nature* 1997;386:194-200.
121. Kawagoe T, Sato S, Matsushita K, et al. Sequential control of Toll-like receptor-dependent responses by IRAK1 and IRAK2. *Nat Immunol* 2008;9:684-91.
122. Cao Z, Xiong J, Takeuchi M, et al. TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature* 1996;383:443-6.
123. Huang Q, Yang J, Lin Y, et al. Differential regulation of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor signaling by MEKK3. *Nat Immunol* 2004;5:98-103.

124. Shim JH, Xiao C, Paschal AE, et al. TAK1, but not TAB1 or TAB2, plays an essential role in multiple signaling pathways in vivo. *Genes Dev* 2005;19:2668-81.
125. Walsh MC, Kim GK, Maurizio PL, et al. TRAF6 autoubiquitination-independent activation of the NFkappaB and MAPK pathways in response to IL-1 and RANKL. *PLoS One* 2008;3:e4064.
126. Lomaga MA, Yeh WC, Sarosi I, et al. TRAF6 deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD40, and LPS signaling. *Genes Dev* 1999;13:1015-24.
127. Takaesu G, Kishida S, Hiyama A, et al. TAB2, a novel adaptor protein, mediates activation of TAK1 MAPKKK by linking TAK1 to TRAF6 in the IL-1 signal transduction pathway. *Mol Cell* 2000;5:649-58.
128. Takaesu G, Ninomiya-Tsuji J, Kishida S, et al. Interleukin-1 (IL-1) receptor-associated kinase leads to activation of TAK1 by inducing TAB2 translocation in the IL-1 signaling pathway. *Mol Cell Biol* 2001;21:2475-84.
129. Weber A, Wasiliew P, Kracht M. Interleukin-1 (IL-1) Pathway. *Science Signaling* 2010;3:cm1-cm1.
130. Shaulian E, Karin M. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol* 2002;4:E131-6.
131. Eferl R, Wagner EF. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 2003;3:859-68.
132. Oeckinghaus A, Ghosh S. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009;1:a000034.
133. Garon EB, Chih-Hsin Yang J, Dubinett SM. The Role of Interleukin 1 β in the Pathogenesis of Lung Cancer. *JTO Clin Res Rep* 2020;1:100001.
134. Allen IC, Scull MA, Moore CB, et al. The NLRP3 inflammasome mediates in vivo innate immunity to influenza A virus through recognition of viral RNA. *Immunity* 2009;30:556-65.
135. Kanneganti TD. Central roles of NLRs and inflammasomes in viral infection. *Nat Rev Immunol* 2010;10:688-98.
136. Aarreberg LD, Wilkins C, Ramos HJ, et al. Interleukin-1 β Signaling in Dendritic Cells Induces Antiviral Interferon Responses. *mBio* 2018;9.
137. Kaushik DK, Gupta M, Kumawat KL, Basu A. NLRP3 inflammasome: key mediator of neuroinflammation in murine Japanese encephalitis. *PLoS One* 2012;7:e32270.
138. Lupfer C, Malik A, Kanneganti TD. Inflammasome control of viral infection. *Curr Opin Virol* 2015;12:38-46.
139. Hustedt T, Stindt S, Dobner K, et al. Die HCV Infektion führt zu einer Reprogrammierung der Reaktion der Wirtszelle auf IL-1 β durch Verstärkung der NFkB-abhängigen Signalübertragung. *Z Gastroenterol* 2023;61:KV131.

140. Shrivastava S, Mukherjee A, Ray R, Ray RB. Hepatitis C virus induces interleukin-1 β (IL-1 β)/IL-18 in circulatory and resident liver macrophages. *J Virol* 2013;87:12284-90.
141. Negash AA, Ramos HJ, Crochet N, et al. IL-1 β production through the NLRP3 inflammasome by hepatic macrophages links hepatitis C virus infection with liver inflammation and disease. *PLoS Pathog* 2013;9:e1003330.
142. Ichinohe T, Lee HK, Ogura Y, et al. Inflammasome recognition of influenza virus is essential for adaptive immune responses. *J Exp Med* 2009;206:79-87.
143. Dinarello CA. Interleukin-1 and the pathogenesis of the acute-phase response. *N Engl J Med* 1984;311:1413-8.
144. Bode JG, Ehrling C, Häussinger D. The macrophage response towards LPS and its control through the p38(MAPK)-STAT3 axis. *Cell Signal* 2012;24:1185-94.
145. Ehrling C, Wolf SD, Bode JG. Acute-phase protein synthesis: a key feature of innate immune functions of the liver. *Biological Chemistry* 2021;402:1129-1145.
146. Chakraborty S, Kaushik DK, Gupta M, Basu A. Inflammasome signaling at the heart of central nervous system pathology. *J Neurosci Res* 2010;88:1615-31.
147. Artlett CM, Sassi-Gaha S, Rieger JL, et al. The inflammasome activating caspase 1 mediates fibrosis and myofibroblast differentiation in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2011;63:3563-74.
148. Daheshia M, Yao JQ. The interleukin 1beta pathway in the pathogenesis of osteoarthritis. *J Rheumatol* 2008;35:2306-12.
149. Bisset LR, Schmid-Grendelmeier P. Chemokines and their receptors in the pathogenesis of allergic asthma: progress and perspective. *Curr Opin Pulm Med* 2005;11:35-42.
150. Miller MC, Mayo KH. Chemokines from a Structural Perspective. *Int J Mol Sci* 2017;18.
151. Hughes CE, Nibbs RJB. A guide to chemokines and their receptors. *Febs j* 2018;285:2944-2971.
152. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 2000;12:121-7.
153. Wolf M, Moser B. Antimicrobial activities of chemokines: not just a side-effect? *Front Immunol* 2012;3:213.
154. Kulkarni N, Pathak M, Lal G. Role of chemokine receptors and intestinal epithelial cells in the mucosal inflammation and tolerance. *J Leukoc Biol* 2017;101:377-394.
155. Beck LA, Tancowny B, Brummet ME, et al. Functional analysis of the chemokine receptor CCR3 on airway epithelial cells. *J Immunol* 2006;177:3344-54.
156. Ghosh MC, Makena PS, Gorantla V, et al. CXCR4 regulates migration of lung alveolar epithelial cells through activation of Rac1 and matrix metalloproteinase-2. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2012;302:L846-56.

157. Cartier L, Hartley O, Dubois-Dauphin M, Krause KH. Chemokine receptors in the central nervous system: role in brain inflammation and neurodegenerative diseases. *Brain Res Brain Res Rev* 2005;48:16-42.
158. Dimberg A. Chemokines in angiogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 2010;341:59-80.
159. Mehrad B, Keane MP, Strieter RM. Chemokines as mediators of angiogenesis. *Thromb Haemost* 2007;97:755-62.
160. Bussmann J, Raz E. Chemokine-guided cell migration and motility in zebrafish development. *Embo j* 2015;34:1309-18.
161. Donà E, Barry JD, Valentin G, et al. Directional tissue migration through a self-generated chemokine gradient. *Nature* 2013;503:285-9.
162. Malet-Engra G, Yu W, Oldani A, et al. Collective cell motility promotes chemotactic prowess and resistance to chemorepulsion. *Curr Biol* 2015;25:242-250.
163. Wald O, Weiss ID, Galun E, Peled A. Chemokines in hepatitis C virus infection: pathogenesis, prognosis and therapeutics. *Cytokine* 2007;39:50-62.
164. Taub DD, Oppenheim JJ. Chemokines, inflammation and the immune system. *Ther Immunol* 1994;1:229-46.
165. Lee NH, Nikfarjam M, He H. Functions of the CXC ligand family in the pancreatic tumor microenvironment. *Pancreatology* 2018;18:705-716.
166. Strieter RM, Polverini PJ, Kunkel SL, et al. The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J Biol Chem* 1995;270:27348-57.
167. Li Y, Liang M, Lin Y, et al. Transcriptional Expressions of CXCL9/10/12/13 as Prognosis Factors in Breast Cancer. *J Oncol* 2020;2020:4270957.
168. Zhou C, Gao Y, Ding P, et al. The role of CXCL family members in different diseases. *Cell Death Discovery* 2023;9:212.
169. Huynh C, Dingemanse J, Meyer Zu Schwabedissen HE, Sidharta PN. Relevance of the CXCR4/CXCR7-CXCL12 axis and its effect in pathophysiological conditions. *Pharmacol Res* 2020;161:105092.
170. Nischalke HD, Berger C, Luda C, et al. The CXCL1 rs4074 A allele is associated with enhanced CXCL1 responses to TLR2 ligands and predisposes to cirrhosis in HCV genotype 1-infected Caucasian patients. *J Hepatol* 2012;56:758-64.
171. Brownell J, Wagoner J, Lovelace ES, et al. Independent, parallel pathways to CXCL10 induction in HCV-infected hepatocytes. *Journal of Hepatology* 2013;59:701-708.
172. Butera D, Marukian S, Iwamaye AE, et al. Plasma chemokine levels correlate with the outcome of antiviral therapy in patients with hepatitis C. *Blood* 2005;106:1175-82.

173. El-attar EA, younes TB, Abdo SA, Riad GS. A study of serum levels of B cell-attracting chemokine-13 (CXCL 13) and rheumatologic manifestations of chronic hepatitis C virus infection in a cohort of Egyptian patients. *Alexandria Journal of Medicine* 2013;49:355-362.
174. Korbecki J, Bajdak-Rusinek K, Kupnicka P, et al. The Role of CXCL16 in the Pathogenesis of Cancer and Other Diseases. *Int J Mol Sci* 2021;22.
175. Chang B, Xu MJ, Zhou Z, et al. Short- or long-term high-fat diet feeding plus acute ethanol binge synergistically induce acute liver injury in mice: an important role for CXCL1. *Hepatology* 2015;62:1070-85.
176. Cai X, Li Z, Zhang Q, et al. CXCL6-EGFR-induced Kupffer cells secrete TGF- β 1 promoting hepatic stellate cell activation via the SMAD2/BRD4/C-MYC/EZH2 pathway in liver fibrosis. *J Cell Mol Med* 2018;22:5050-5061.
177. Bièche I, Asselah T, Laurendeau I, et al. Molecular profiling of early stage liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Virology* 2005;332:130-44.
178. Soker M, Colpan L, Ece A, et al. Serum levels of IL-1 beta, sIL-2R, IL-6, IL-8, and TNF-alpha in febrile children with cancer and neutropenia. *Med Oncol* 2001;18:51-7.
179. Casilli F, Bianchini A, Gloaguen I, et al. Inhibition of interleukin-8 (CXCL8/IL-8) responses by repertaxin, a new inhibitor of the chemokine receptors CXCR1 and CXCR2. *Biochem Pharmacol* 2005;69:385-94.
180. Li L, Xia Y, Ji X, et al. MIG/CXCL9 exacerbates the progression of metabolic-associated fatty liver disease by disrupting Treg/Th17 balance. *Exp Cell Res* 2021;407:112801.
181. Ibrahim SH, Hirsova P, Tomita K, et al. Mixed lineage kinase 3 mediates release of C-X-C motif ligand 10-bearing chemotactic extracellular vesicles from lipotoxic hepatocytes. *Hepatology* 2016;63:731-44.
182. Wang S, Gao S, Li Y, et al. Emerging Importance of Chemokine Receptor CXCR4 and Its Ligand in Liver Disease. *Front Cell Dev Biol* 2021;9:716842.
183. Ullah A, Ud Din A, Ding W, et al. A narrative review: CXC chemokines influence immune surveillance in obesity and obesity-related diseases: Type 2 diabetes and nonalcoholic fatty liver disease. *Rev Endocr Metab Disord* 2023;24:611-631.
184. Russo RC, Garcia CC, Teixeira MM, Amaral FA. The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases. *Expert Rev Clin Immunol* 2014;10:593-619.
185. Horn LA, Fousek K, Palena C. Tumor Plasticity and Resistance to Immunotherapy. *Trends Cancer* 2020;6:432-441.
186. Cambier S, Gouwy M, Proost P. The chemokines CXCL8 and CXCL12: molecular and functional properties, role in disease and efforts towards pharmacological intervention. *Cellular & Molecular Immunology* 2023;20:217-251.
187. Bachelier F, Ben-Baruch A, Burkhardt AM, et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. [corrected]. LXXXIX. Update on the extended family of chemokine receptors and introducing a new nomenclature for atypical chemokine receptors. *Pharmacol Rev* 2014;66:1-79.

188. D'Agostino G, García-Cuesta EM, Gomariz RP, et al. The multilayered complexity of the chemokine receptor system. *Biochem Biophys Res Commun* 2020;528:347-358.
189. Pruenster M, Mudde L, Bombosi P, et al. The Duffy antigen receptor for chemokines transports chemokines and supports their promigratory activity. *Nat Immunol* 2009;10:101-8.
190. Romagnani P, Lasagni L, Annunziato F, et al. CXC chemokines: the regulatory link between inflammation and angiogenesis. *Trends Immunol* 2004;25:201-9.
191. Waugh DJ, Wilson C. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14:6735-41.
192. Narzi D, van Keulen SC, Röthlisberger U. Gai1 inhibition mechanism of ATP-bound adenylyl cyclase type 5. *PLoS One* 2021;16:e0245197.
193. Metzemaekers M, Gouwy M, Proost P. Neutrophil chemoattractant receptors in health and disease: double-edged swords. *Cell Mol Immunol* 2020;17:433-450.
194. Metzemaekers M, Van Damme J, Mortier A, Proost P. Regulation of Chemokine Activity - A Focus on the Role of Dipeptidyl Peptidase IV/CD26. *Front Immunol* 2016;7:483.
195. Ha H, Debnath B, Neamati N. Role of the CXCL8-CXCR1/2 Axis in Cancer and Inflammatory Diseases. *Theranostics* 2017;7:1543-1588.
196. Mortier A, Van Damme J, Proost P. Overview of the mechanisms regulating chemokine activity and availability. *Immunol Lett* 2012;145:2-9.
197. Son D-S, Kabir SM, Dong Y, et al. Characteristics of chemokine signatures elicited by EGF and TNF in ovarian cancer cells. *Journal of Inflammation* 2013;10:25.
198. Matsushima K, Yang D, Oppenheim JJ. Interleukin-8: An evolving chemokine. *Cytokine* 2022;153:155828.
199. Holtmann H, Winzen R, Holland P, et al. Induction of interleukin-8 synthesis integrates effects on transcription and mRNA degradation from at least three different cytokine- or stress-activated signal transduction pathways. *Mol Cell Biol* 1999;19:6742-53.
200. Hoffmann E, Dittrich-Breiholz O, Holtmann H, Kracht M. Multiple control of interleukin-8 gene expression. *J Leukoc Biol* 2002;72:847-55.
201. Richmond A. Nf-kappa B, chemokine gene transcription and tumour growth. *Nat Rev Immunol* 2002;2:664-74.
202. Granado-Serrano AB, Martín MA, Haegeman G, et al. Epicatechin induces NF-kappaB, activator protein-1 (AP-1) and nuclear transcription factor erythroid 2p45-related factor-2 (Nrf2) via phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B (PI3K/AKT) and extracellular regulated kinase (ERK) signalling in HepG2 cells. *Br J Nutr* 2010;103:168-79.
203. Ho SC, Wu SM, Feng PH, et al. Noncanonical NF-κB mediates the Suppressive Effect of Neutrophil Elastase on IL-8/CXCL8 by Inducing NKRF in Human Airway Smooth Muscle. *Sci Rep* 2017;7:44930.

204. Jundi K, Greene CM. Transcription of Interleukin-8: How Altered Regulation Can Affect Cystic Fibrosis Lung Disease. *Biomolecules* 2015;5:1386-98.
205. Moretto N, Bertolini S, Iadicicco C, et al. Cigarette smoke and its component acrolein augment IL-8/CXCL8 mRNA stability via p38 MAPK/MK2 signaling in human pulmonary cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2012;303:L929-38.
206. Wang P, Wu P, Siegel MI, et al. Interleukin (IL)-10 inhibits nuclear factor kappa B (NF kappa B) activation in human monocytes. IL-10 and IL-4 suppress cytokine synthesis by different mechanisms. *J Biol Chem* 1995;270:9558-63.
207. Utgaard JO, Jahnsen FL, Bakka A, et al. Rapid secretion of prestored interleukin 8 from Weibel-Palade bodies of microvascular endothelial cells. *J Exp Med* 1998;188:1751-6.
208. Wolff B, Burns AR, Middleton J, Rot A. Endothelial cell "memory" of inflammatory stimulation: human venular endothelial cells store interleukin 8 in Weibel-Palade bodies. *J Exp Med* 1998;188:1757-62.
209. Marra F, Tacke F. Roles for chemokines in liver disease. *Gastroenterology* 2014;147:577-594.e1.
210. Brass A, Brenndörfer ED. The role of chemokines in hepatitis C virus-mediated liver disease. *Int J Mol Sci* 2014;15:4747-79.
211. Cheng Y, Ma XL, Wei YQ, Wei XW. Potential roles and targeted therapy of the CXCLs/CXCR2 axis in cancer and inflammatory diseases. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 2019;1871:289-312.
212. Green J, Khabar KS, Koo BC, et al. Stability of CXCL-8 and related AU-rich mRNAs in the context of hepatitis C virus replication in vitro. *J Infect Dis* 2006;193:802-11.
213. Kadoya H, Nagano-Fujii M, Deng L, et al. Nonstructural proteins 4A and 4B of hepatitis C virus transactivate the interleukin 8 promoter. *Microbiol Immunol* 2005;49:265-73.
214. Gale MJ, Jr., Korth MJ, Tang NM, et al. Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein. *Virology* 1997;230:217-27.
215. Taylor DR, Shi ST, Romano PR, et al. Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science* 1999;285:107-10.
216. Polyak SJ, Khabar KS, Paschal DM, et al. Hepatitis C virus nonstructural 5A protein induces interleukin-8, leading to partial inhibition of the interferon-induced antiviral response. *J Virol* 2001;75:6095-106.
217. Polyak SJ, Khabar KS, Rezeiq M, Gretch DR. Elevated levels of interleukin-8 in serum are associated with hepatitis C virus infection and resistance to interferon therapy. *J Virol* 2001;75:6209-11.
218. Oem JK, Jackel-Cram C, Li YP, et al. Hepatitis C virus non-structural protein-2 activates CXCL-8 transcription through NF-kappaB. *Arch Virol* 2008;153:293-301.

- 219. Koo BC, McPoland P, Wagoner JP, et al. Relationships between hepatitis C virus replication and CXCL-8 production in vitro. *J Virol* 2006;80:7885-93.
- 220. Witte M, Oltmanns C, Tauwaldt J, et al. Inflammatory milieu alterations associated with carcinogenesis persist in cirrhotic patients despite HCV cure. *Z Gastroenterol* 2024;62:P5.16.
- 221. Hustedt T, Stindt S, Ehlting C, et al. HCV rewires NF- κ B target gene expression such as CXCL8 involving suppression of endogenous negative regulators of NF- κ B-signaling. *Z Gastroenterol* 2024;62:P5.09.
- 222. Garces de Los Fayos Alonso I, Liang HC, Turner SD, et al. The Role of Activator Protein-1 (AP-1) Family Members in CD30-Positive Lymphomas. *Cancers (Basel)* 2018;10.
- 223. Glover JN, Harrison SC. Crystal structure of the heterodimeric bZIP transcription factor c-Fos-c-Jun bound to DNA. *Nature* 1995;373:257-61.
- 224. Halazonetis TD, Georgopoulos K, Greenberg ME, Leder P. c-Jun dimerizes with itself and with c-Fos, forming complexes of different DNA binding affinities. *Cell* 1988;55:917-24.
- 225. O'Shea EK, Rutkowski R, Kim PS. Mechanism of specificity in the Fos-Jun oncoprotein heterodimer. *Cell* 1992;68:699-708.
- 226. Hess J, Angel P, Schorpp-Kistner M. AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J Cell Sci* 2004;117:5965-73.
- 227. Bakiri L, Matsuo K, Wisniewska M, et al. Promoter specificity and biological activity of tethered AP-1 dimers. *Mol Cell Biol* 2002;22:4952-64.
- 228. Angel P, Hattori K, Smeal T, Karin M. The jun proto-oncogene is positively autoregulated by its product, Jun/AP-1. *Cell* 1988;55:875-85.
- 229. Xia Y, Yang W, Bu W, et al. Differential regulation of c-Jun protein plays an instrumental role in chemoresistance of cancer cells. *J Biol Chem* 2013;288:19321-9.
- 230. Karin M. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 1995;270:16483-6.
- 231. Zhang Y, Li F, Liu S, et al. MEKK1-MKK4-JNK-AP1 pathway negatively regulates Rgs4 expression in colonic smooth muscle cells. *PLoS One* 2012;7:e35646.
- 232. Kimura H, Okubo N, Chosa N, et al. EGF positively regulates the proliferation and migration, and negatively regulates the myofibroblast differentiation of periodontal ligament-derived endothelial progenitor cells through MEK/ERK- and JNK-dependent signals. *Cell Physiol Biochem* 2013;32:899-914.
- 233. Lo H-m, Lai T-h, Li C-h, Wu W-b. TNF- α induces CXCL1 chemokine expression and release in human vascular endothelial cells in vitro via two distinct signaling pathways. *Acta Pharmacologica Sinica* 2014;35:339-350.

234. Singha B, Gatla HR, Vancurova I. Transcriptional regulation of chemokine expression in ovarian cancer. *Biomolecules* 2015;5:223-43.
235. Kusuyama J, Komorizono A, Bandow K, et al. CXCL3 positively regulates adipogenic differentiation. *Journal of Lipid Research* 2016;57:1806-1820.
236. Qadri I, Iwahashi M, Capasso JM, et al. Induced oxidative stress and activated expression of manganese superoxide dismutase during hepatitis C virus replication: role of JNK, p38 MAPK and AP-1. *Biochem J* 2004;378:919-28.
237. Ariffianto A, Deng L, Harada S, et al. Transcription Factor JunB Suppresses Hepatitis C Virus Replication. *Kobe J Med Sci* 2023;69:E86-e95.
238. Machida K, Tsukamoto H, Liu JC, et al. c-Jun mediates hepatitis C virus hepatocarcinogenesis through signal transducer and activator of transcription 3 and nitric oxide-dependent impairment of oxidative DNA repair. *Hepatology* 2010;52:480-92.
239. Kang SM, Lim S, Won SJ, et al. c-Fos regulates hepatitis C virus propagation. *FEBS Lett* 2011;585:3236-44.
240. Sun SC, Chang JH, Jin J. Regulation of nuclear factor- κ B in autoimmunity. *Trends Immunol* 2013;34:282-9.
241. Sun SC. Non-canonical NF- κ B signaling pathway. *Cell Res* 2011;21:71-85.
242. Vallabhapurapu S, Karin M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol* 2009;27:693-733.
243. Zhang H, Sun SC. NF- κ B in inflammation and renal diseases. *Cell Biosci* 2015;5:63.
244. Karin M, Delhase M. The I kappa B kinase (IKK) and NF-kappa B: key elements of proinflammatory signalling. *Semin Immunol* 2000;12:85-98.
245. Sun SC. The noncanonical NF- κ B pathway. *Immunol Rev* 2012;246:125-40.
246. Sun SC, Liu ZG. A special issue on NF- κ B signaling and function. *Cell Res* 2011;21:1-2.
247. Rother S, Bartels M, Schweda AT, et al. NF- κ B-repressing factor phosphorylation regulates transcription elongation via its interactions with 5'→3' exoribonuclease 2 and negative elongation factor. *Faseb j* 2016;30:174-85.
248. Lawrence T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009;1:a001651.
249. Tak PP, Firestein GS. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest* 2001;107:7-11.
250. Sethi G, Ahn KS, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Epidermal growth factor (EGF) activates nuclear factor- κ B through I κ B α kinase-independent but EGF receptor-kinase dependent tyrosine 42 phosphorylation of I κ B α . *Oncogene* 2007;26:7324-7332.

251. Choi SH, Yoon H-S, Yoo S-A, et al. Co-relation with novel phosphorylation sites of I κ B α and necroptosis in breast cancer cells. *BMC Cancer* 2021;21:596.
252. Rufinatscha K, Stindt S, Luedde T, Bode JG. IL-1 β and TNF α enhance the CXC chemokine expression of Hepatitis C Virus infected cells. *Z Gastroenterol* 2021;59:5.10.
253. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25:402-8.
254. Zylberberg H, Rimaniol A-C, Pol S, et al. Soluble tumor necrosis factor receptors in chronic hepatitis C: a correlation with histological fibrosis and activity. *Journal of Hepatology* 1999;30:185-191.
255. Barbier L, Ferhat M, Salamé E, et al. Interleukin-1 Family Cytokines: Keystones in Liver Inflammatory Diseases. *Front Immunol* 2019;10:2014.
256. Zimmermann HW, Seidler S, Gassler N, et al. Interleukin-8 is activated in patients with chronic liver diseases and associated with hepatic macrophage accumulation in human liver fibrosis. *PLoS One* 2011;6:e21381.
257. Bhushan B, Michalopoulos GK. Role of epidermal growth factor receptor in liver injury and lipid metabolism: Emerging new roles for an old receptor. *Chem Biol Interact* 2020;324:109090.
258. Hall P, Cash J. What is the real function of the liver 'function' tests? *Ulster Med J* 2012;81:30-6.
259. Sheth SG, Flamm SL, Gordon FD, Chopra S. AST/ALT ratio predicts cirrhosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Am J Gastroenterol* 1998;93:44-8.
260. Sterling RK, Lissen E, Clumeck N, et al. Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection. *Hepatology* 2006;43:1317-25.
261. Wagoner J, Austin M, Green J, et al. Regulation of CXCL-8 (interleukin-8) induction by double-stranded RNA signaling pathways during hepatitis C virus infection. *J Virol* 2007;81:309-18.
262. Akbar H, Idrees M, Butt S, et al. High baseline interleukine-8 level is an Independent risk factor for the achievement of sustained virological response in chronic HCV patients. *Infection, Genetics and Evolution* 2011;11:1301-1305.
263. Messeguer X, Escudero R, Farré D, et al. PROMO: detection of known transcription regulatory elements using species-tailored searches. *Bioinformatics* 2002;18:333-4.
264. Farré D, Roset R, Huerta M, et al. Identification of patterns in biological sequences at the ALGGEN server: PROMO and MALGEN. *Nucleic Acids Res* 2003;31:3651-3.
265. Ho SC, Lee KY, Chan YF, et al. Neutrophil elastase represses IL-8/CXCL8 synthesis in human airway smooth muscle cells through induction of NF-kappa B repressing factor. *J Immunol* 2009;183:411-20.

266. Umasuthan N, Bathige S, Thulasitha WS, et al. Comparative Characterization of Two cxcl8 Homologs in *Oplegnathus fasciatus*: Genomic, Transcriptional and Functional Analyses. *Biomolecules* 2020;10.
267. Drożdżik M, Lapczuk-Romanska J, Wenzel C, et al. Protein Abundance of Drug Transporters in Human Hepatitis C Livers. *Int J Mol Sci* 2022;23.
268. Rial NS, Lazennec G, Prasad AR, et al. Regulation of deoxycholate induction of CXCL8 by the adenomatous polyposis coli gene in colorectal cancer. *Int J Cancer* 2009;124:2270-80.
269. Lyon J, Robinson C, Watson R. The role of Myb proteins in normal and neoplastic cell proliferation. *Crit Rev Oncog* 1994;5:373-88.
270. Mourad L, El-Ahwany E, Zoheiry M, et al. Expression analysis of liver-specific circulating microRNAs in HCV-induced hepatocellular Carcinoma in Egyptian patients. *Cancer Biol Ther* 2018;19:400-406.
271. Feng H, Zhang YB, Gui JF, et al. Interferon regulatory factor 1 (IRF1) and anti-pathogen innate immune responses. *PLoS Pathog* 2021;17:e1009220.
272. Kanda T, Yokosuka O, Nagao K, Saisho H. State of hepatitis C viral replication enhances activation of NF- κ B- and AP-1-signaling induced by hepatitis B virus X. *Cancer Letters* 2006;234:143-148.
273. Ma Y-T, Zheng L, Zhao C-W, et al. Interferon- α induces differentiation of cancer stem cells and immunosuppression in hepatocellular carcinoma by upregulating CXCL8 secretion. *Cytokine* 2024;177:156555.
274. Zhang M, Zhang Y, Yang S, et al. Multifunctional YY1 in Liver Diseases. *Semin Liver Dis* 2017;37:363-376.
275. Qadri I, Iwahashi M, Kullak-Ublick GA, Simon FR. Hepatocyte nuclear factor (HNF) 1 and HNF4 mediate hepatic multidrug resistance protein 2 up-regulation during hepatitis C virus gene expression. *Mol Pharmacol* 2006;70:627-36.
276. Marriott HM, Gascoyne KA, Gowda R, et al. Interleukin-1 β regulates CXCL8 release and influences disease outcome in response to *Streptococcus pneumoniae*, defining intercellular cooperation between pulmonary epithelial cells and macrophages. *Infect Immun* 2012;80:1140-9.
277. Lopez-Castejon G, Brough D. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. *Cytokine Growth Factor Rev* 2011;22:189-95.
278. Kim J, Woolridge S, Biffi R, et al. Members of the AP-1 family, c-Jun and c-Fos, functionally interact with JC virus early regulatory protein large T antigen. *J Virol* 2003;77:5241-52.
279. Wu GD, Lai EJ, Huang N, Wen X. Oct-1 and CCAAT/Enhancer-binding Protein (C/EBP) Bind to Overlapping Elements within the Interleukin-8 Promoter: THE ROLE OF Oct-1 AS A TRANSCRIPTIONAL REPRESSOR*. *Journal of Biological Chemistry* 1997;272:2396-2403.

280. dela Paz NG, Simeonidis S, Leo C, et al. Regulation of NF-kappaB-dependent gene expression by the POU domain transcription factor Oct-1. *J Biol Chem* 2007;282:8424-34.
281. Nourbakhsh M, Kalble S, Dorrie A, et al. The NF-kappa b repressing factor is involved in basal repression and interleukin (IL)-1-induced activation of IL-8 transcription by binding to a conserved NF-kappa b-flanking sequence element. *J Biol Chem* 2001;276:4501-8.
282. Xie H, Pallero MA, Gupta K, et al. EGF receptor regulation of cell motility: EGF induces disassembly of focal adhesions independently of the motility-associated PLCgamma signaling pathway. *J Cell Sci* 1998;111 (Pt 5):615-24.
283. Haim K, Weitzenfeld P, Meshel T, Ben-Baruch A. Epidermal Growth Factor and Estrogen Act by Independent Pathways to Additively Promote the Release of the Angiogenic Chemokine CXCL8 by Breast Tumor Cells. *Neoplasia* 2011;13:230-243.
284. Lapiński TW. The levels of IL-1beta, IL-4 and IL-6 in the serum and the liver tissue of chronic HCV-infected patients. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2001;49:311-6.
285. Mourtzikou A, Alepaki M, Stamouli M, et al. Evaluation of serum levels of IL-6, TNF- α , IL-10, IL-2 and IL-4 in patients with chronic hepatitis. *Immunologia* 2014;33:41-50.
286. Nasimuzzaman M, Waris G, Mikolon D, et al. Hepatitis C Virus Stabilizes Hypoxia-Inducible Factor 1 α and Stimulates the Synthesis of Vascular Endothelial Growth Factor. *Journal of Virology* 2007;81:10249-10257.
287. Pei R, Chen H, Lu L, et al. Hepatitis C virus infection induces the expression of amphiregulin, a factor related to the activation of cellular survival pathways and required for efficient viral assembly. *Journal of General Virology* 2011;92:2237-2248.
288. Bekçibaşı M, Deveci Ö, Oğuz A, et al. Serum TNF- α , IL-1 β , and IL-6 levels in chronic HBV-infected patients. *Int J Clin Pract* 2021;75:e14292.
289. Yu X, Chen Y, Cui L, et al. CXCL8, CXCL9, CXCL10, and CXCL11 as biomarkers of liver injury caused by chronic hepatitis B. *Front Microbiol* 2022;13:1052917.
290. Barreiros AP, Sprinzl M, Rosset S, et al. EGF and HGF levels are increased during active HBV infection and enhance survival signaling through extracellular matrix interactions in primary human hepatocytes. *Int J Cancer* 2009;124:120-9.
291. Murayama T, Ohara Y, Obuchi M, et al. Human cytomegalovirus induces interleukin-8 production by a human monocytic cell line, THP-1, through acting concurrently on AP-1- and NF-kappaB-binding sites of the interleukin-8 gene. *J Virol* 1997;71:5692-5.
292. Garofalo R, Sabry M, Jamaluddin M, et al. Transcriptional activation of the interleukin-8 gene by respiratory syncytial virus infection in alveolar epithelial cells: nuclear translocation of the RelA transcription factor as a mechanism producing airway mucosal inflammation. *J Virol* 1996;70:8773-81.
293. Wang C-C, Tseng K-C, Tzeng IS, Kao J-H. The impact of cytokine change after hepatitis C virus clearance by direct antiviral agents on the risk of hepatocellular carcinoma. *Journal of the Formosan Medical Association* 2021;120:965-973.

294. Mengshol JA, Golden-Mason L, Rosen HR. Mechanisms of Disease: HCV-induced liver injury. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2007;4:622-34.
295. Yang YM, Seki E. TNF α in liver fibrosis. *Curr Pathobiol Rep* 2015;3:253-261.
296. Komposch K, Sibilia M. EGFR Signaling in Liver Diseases. *Int J Mol Sci* 2015;17.
297. Mariotti V, Fiorotto R, Cadamuro M, et al. New insights on the role of vascular endothelial growth factor in biliary pathophysiology. *JHEP Rep* 2021;3:100251.
298. Santamaría E, Rodríguez-Ortigosa CM, Uriarte I, et al. The Epidermal Growth Factor Receptor Ligand Amphiregulin Protects From Cholestatic Liver Injury and Regulates Bile Acids Synthesis. *Hepatology* 2019;69:1632-1647.
299. Perez S, Kaspi A, Domovitz T, et al. Hepatitis C virus leaves an epigenetic signature post cure of infection by direct-acting antivirals. *PLoS Genet* 2019;15:e1008181.
300. Goto K, Roca Suarez AA, Wrensch F, et al. Hepatitis C Virus and Hepatocellular Carcinoma: When the Host Loses Its Grip. *International Journal of Molecular Sciences* 2020;21:3057.
301. Pollicino T, Bellinghieri L, Restuccia A, et al. Hepatitis B virus (HBV) induces the expression of interleukin-8 that in turn reduces HBV sensitivity to interferon-alpha. *Virology* 2013;444:317-328.
302. Yang K, Guan SH, Zhang H, et al. Enhanced levels of interleukin-8 are associated with hepatitis B virus infection and resistance to interferon-alpha therapy. *Int J Mol Sci* 2014;15:21286-98.
303. Duan S, Gao J, Lou W, et al. Prognostic signature for hepatocellular carcinoma based on 4 pyroptosis-related genes. *BMC Med Genomics* 2022;15:166.
304. Shabangu CS, Siphepho PY, Li CY, et al. The Persistence of Hepatitis C Virus Infection in Hepatocytes Promotes Hepatocellular Carcinoma Progression by Pro-Inflammatory Interleukin-8 Expression. *Biomedicines* 2021;9.
305. Zhu J, Zhou Y, Wang L, et al. CXCL5/CXCL8 is a promising potential prognostic and tumor microenvironment-related cluster in hepatocellular carcinoma. *J Gastrointest Oncol* 2020;11:1364-1380.
306. Karmakar M, Sun Y, Hise AG, et al. Cutting edge: IL-1 β processing during *Pseudomonas aeruginosa* infection is mediated by neutrophil serine proteases and is independent of NLRP4 and caspase-1. *J Immunol* 2012;189:4231-5.
307. Oem J-K, Jackel-Cram C, Li Y-P, et al. Hepatitis C virus non-structural protein-2 activates CXCL-8 transcription through NF- κ B. *Archives of virology* 2008;153:293-301.
308. Xiong X, Liao X, Qiu S, et al. CXCL8 in Tumor Biology and Its Implications for Clinical Translation. *Front Mol Biosci* 2022;9:723846.
309. Harikumar KB, Yester JW, Surace MJ, et al. K63-linked polyubiquitination of transcription factor IRF1 is essential for IL-1-induced production of chemokines CXCL10 and CCL5. *Nature Immunology* 2014;15:231-238.

310. Andersen P, Pedersen MW, Woetmann A, et al. EGFR induces expression of IRF-1 via STAT1 and STAT3 activation leading to growth arrest of human cancer cells. *Int J Cancer* 2008;122:342-9.
311. Perrone M, Chiodoni C, Lecchi M, et al. ATF3 Reprograms the Bone Marrow Niche in Response to Early Breast Cancer Transformation. *Cancer Res* 2023;83:117-129.
312. Nilsson M, Ford J, Bohm S, Toftgård R. Characterization of a nuclear factor that binds juxtaposed with ATF3/Jun on a composite response element specifically mediating induced transcription in response to an epidermal growth factor/Ras/Raf signaling pathway. *Cell Growth Differ* 1997;8:913-20.
313. Tang X, McMullen TPW, Brindley DN. Increasing the low lipid phosphate phosphatase 1 activity in breast cancer cells decreases transcription by AP-1 and expressions of matrix metalloproteinases and cyclin D1/D3. *Theranostics* 2019;9:6129-6142.
314. Li Y, Jin K, van Pelt GW, et al. c-Myb Enhances Breast Cancer Invasion and Metastasis through the Wnt/ β -Catenin/Axin2 Pathway. *Cancer Research* 2016;76:3364-3375.
315. Muñoz E, Zubiaga A, Huang C, Huber BT. Interleukin-1 induces protein tyrosine phosphorylation in T cells. *Eur J Immunol* 1992;22:1391-6.
316. Dúcka M, Kučeríková M, Trčka F, et al. c-Myb interferes with inflammatory IL1 α -NF- κ B pathway in breast cancer cells. *Neoplasia* 2021;23:326-336.
317. Chusri P, Kumthip K, Hong J, et al. HCV induces transforming growth factor β 1 through activation of endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response. *Scientific Reports* 2016;6:22487.
318. Kireva T, Erhardt A, Tiegs G, et al. Transcription factor Fra-1 induces cholangitis and liver fibrosis. *Hepatology* 2011;53:1259-69.
319. Liu J, Wang B, Wang W, et al. Computational networks of activating transcription factor 3 gene in Huh7 cell lines and hepatitis C virus-infected Huh7 cell lines. *Mol Med Rep* 2015;12:1239-46.
320. Tsutsumi T, Suzuki T, Moriya K, et al. Alteration of intrahepatic cytokine expression and AP-1 activation in transgenic mice expressing hepatitis C virus core protein. *Virology* 2002;304:415-24.
321. You LR, Chen CM, Lee YH. Hepatitis C virus core protein enhances NF-kappaB signal pathway triggering by lymphotoxin-beta receptor ligand and tumor necrosis factor alpha. *J Virol* 1999;73:1672-81.
322. Gong G, Waris G, Tanveer R, Siddiqui A. Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF-kappa B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:9599-604.
323. Natoli G, Costanzo A, Ianni A, et al. Activation of SAPK/JNK by TNF receptor 1 through a noncytotoxic TRAF2- dependent pathway. *Science* 1997;275:200-203.
324. Vermeulen L, De Wilde G, Notebaert S, et al. Regulation of the transcriptional activity of the nuclear factor-kappaB p65 subunit. *Biochem Pharmacol* 2002;64:963-70.

325. Viatour P, Merville MP, Bours V, Chariot A. Phosphorylation of NF-kappaB and IkappaB proteins: implications in cancer and inflammation. *Trends Biochem Sci* 2005;30:43-52.
326. Perkins ND. Post-translational modifications regulating the activity and function of the nuclear factor kappa B pathway. *Oncogene* 2006;25:6717-30.
327. Tseng HC, Lee IT, Lin CC, et al. IL-1 β promotes corneal epithelial cell migration by increasing MMP-9 expression through NF- κ B- and AP-1-dependent pathways. *PLoS One* 2013;8:e57955.
328. Wan P, Zhang S, Ruan Z, et al. AP-1 signaling pathway promotes pro-IL-1 β transcription to facilitate NLRP3 inflammasome activation upon influenza A virus infection. *Virulence* 2022;13:502-513.
329. Cogswell JP, Godlevski MM, Wisely GB, et al. NF-kappa B regulates IL-1 beta transcription through a consensus NF-kappa B binding site and a nonconsensus CRE-like site. *J Immunol* 1994;153:712-23.
330. Kang HB, Kim YE, Kwon HJ, et al. Enhancement of NF-kappaB expression and activity upon differentiation of human embryonic stem cell line SNUhES3. *Stem Cells Dev* 2007;16:615-23.
331. Wang PX, Zhang XJ, Luo P, et al. Hepatocyte TRAF3 promotes liver steatosis and systemic insulin resistance through targeting TAK1-dependent signalling. *Nat Commun* 2016;7:10592.
332. Zhou Z, Xu MJ, Gao B. Hepatocytes: a key cell type for innate immunity. *Cell Mol Immunol* 2016;13:301-15.
333. Huang K-H, Wang C-H, Lee K-Y, et al. NF- κ B Repressing Factor Inhibits Chemokine Synthesis by Peripheral Blood Mononuclear Cells and Alveolar Macrophages in Active Pulmonary Tuberculosis. *PLOS ONE* 2013;8:e77789.
334. Gales D, Clark C, Manne U, Samuel T. The Chemokine CXCL8 in Carcinogenesis and Drug Response. *ISRN Oncol* 2013;2013:859154.
335. Lin CH, Wang YH, Chen YW, et al. Transcriptional and posttranscriptional regulation of CXCL8/IL-8 gene expression induced by connective tissue growth factor. *Immunol Res* 2016;64:369-84.
336. Deng L, Liang Y, Ariffianto A, et al. Hepatitis C Virus-Induced ROS/JNK Signaling Pathway Activates the E3 Ubiquitin Ligase Itch to Promote the Release of HCV Particles via Polyubiquitylation of VPS4A. *J Virol* 2022;96:e0181121.
337. Hassan M, Ghozlan H, Abdel-Kader O. Activation of c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) signaling pathway is essential for the stimulation of hepatitis C virus (HCV) non-structural protein 3 (NS3)-mediated cell growth. *Virology* 2005;333:324-336.
338. Watanabe T, Hiasa Y, Tokumoto Y, et al. Protein kinase R modulates c-Fos and c-Jun signaling to promote proliferation of hepatocellular carcinoma with hepatitis C virus infection. *PLoS One* 2013;8:e67750.

- 339. Hashimoto A, Kurosaki M, Gotoh N, et al. Shc Regulates Epidermal Growth Factor-induced Activation of the JNK Signaling Pathway*. *Journal of Biological Chemistry* 1999;274:20139-20143.
- 340. Zhang W, Liu HT. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Research* 2002;12:9-18.
- 341. Gómez-Gonzalo M, Benedicto I, Carretero M, et al. Hepatitis C virus core protein regulates p300/CBP co-activation function. Possible role in the regulation of NF-AT1 transcriptional activity. *Virology* 2004;328:120-130.
- 342. Hojka-Osinska A, Budzko L, Zmienko A, et al. RNA-Seq-based analysis of differential gene expression associated with hepatitis C virus infection in a cell culture. *Acta Biochim Pol* 2016;63:789-798.
- 343. Walters KA, Syder AJ, Lederer SL, et al. Genomic analysis reveals a potential role for cell cycle perturbation in HCV-mediated apoptosis of cultured hepatocytes. *PLoS Pathog* 2009;5:e1000269.
- 344. Swindell WR, Beamer MA, Sarkar MK, et al. RNA-Seq Analysis of IL-1B and IL-36 Responses in Epidermal Keratinocytes Identifies a Shared MyD88-Dependent Gene Signature. *Front Immunol* 2018;9:80.
- 345. Guo Q, Jin Y, Chen X, et al. NF-κB in biology and targeted therapy: new insights and translational implications. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2024;9:53.
- 346. Scholz CC, Cavadas MA, Tambuwala MM, et al. Regulation of IL-1β-induced NF-κB by hydroxylases links key hypoxic and inflammatory signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:18490-5.
- 347. Liu F-L, Chen C-H, Chu S-J, et al. Interleukin (IL)-23 p19 expression induced by IL-1β in human fibroblast-like synoviocytes with rheumatoid arthritis via active nuclear factor-κB and AP-1 dependent pathway. *Rheumatology* 2007;46:1266-1273.

8. Anhang

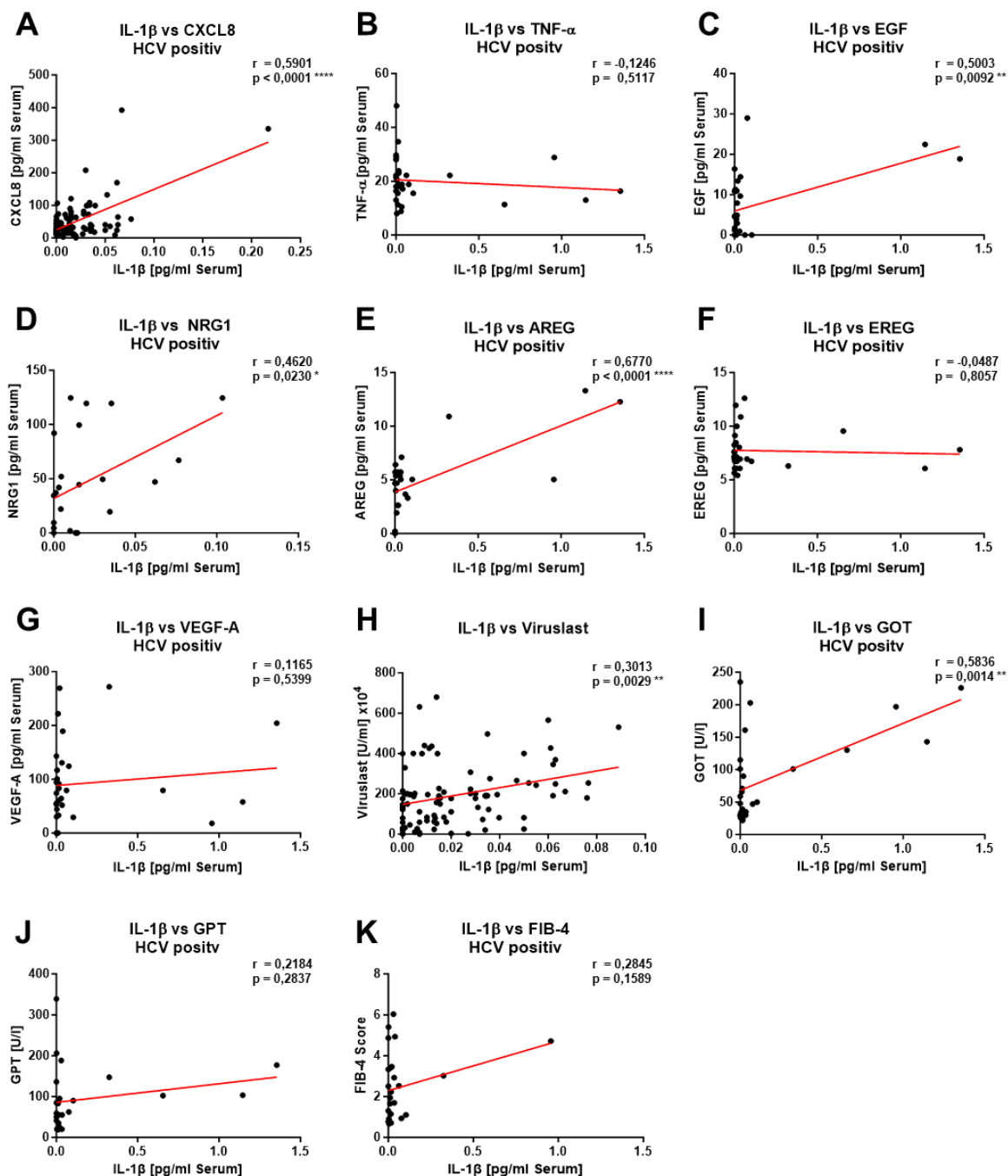


Abbildung A1.1 Korrelationsanalysen zwischen IL-1β und allen gemessenen Faktoren bei Patienten mit einer chronischen HCV-Infektion. Zur Ermittlung der Korrelationen zwischen den einzelnen Faktoren wurde die Pearson-Korrelation verwendet. Der r-Wert wird im Bereich von -1 bis 1 dargestellt. Um eine präzisere Beurteilung vorzunehmen, wurden zuvor mittels der PRISM 10-Software, Ausreißer identifiziert und ausgeschlossen, da der Pearson-Korrelationskoeffizient sehr empfindlich gegenüber Ausreißern ist. Die Punkte repräsentieren die Werte einzelner Personen. Die Daten wurden mit * für $p \leq 0,05$, ** für $p \leq 0,01$, *** für $p \leq 0,001$ bzw. **** für $p \leq 0,0001$ markiert.

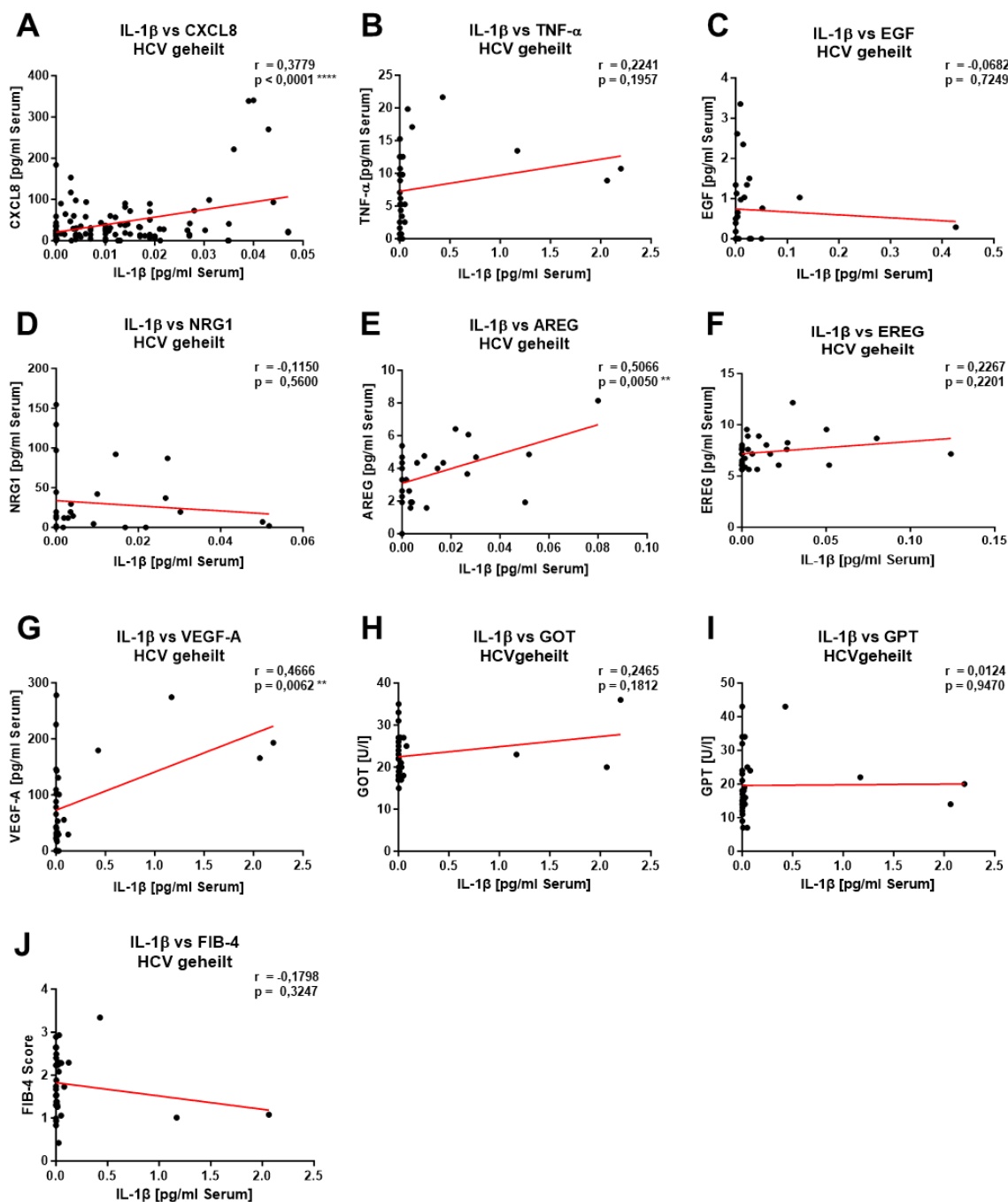


Abbildung A1.2 Korrelationsanalysen zwischen IL-1 β und allen gemessenen Faktoren bei geheilten HCV-Patienten. Zur Ermittlung der Korrelationen zwischen den einzelnen Faktoren wurde die Pearson-Korrelation verwendet. Der r-Wert wird im Bereich von -1 bis 1 dargestellt. Um eine präzisere Beurteilung vorzunehmen, wurden zuvor mittels der PRISM 10-Software, Ausreißer identifiziert und ausgeschlossen, da der Pearson-Korrelationskoeffizient sehr empfindlich gegenüber Ausreißern ist. Die Punkte repräsentieren die Werte einzelner Personen. Die Daten wurden mit * für $p \leq 0,05$, ** für $p \leq 0,01$, *** für $p \leq 0,001$ bzw. **** für $p \leq 0,0001$ markiert.

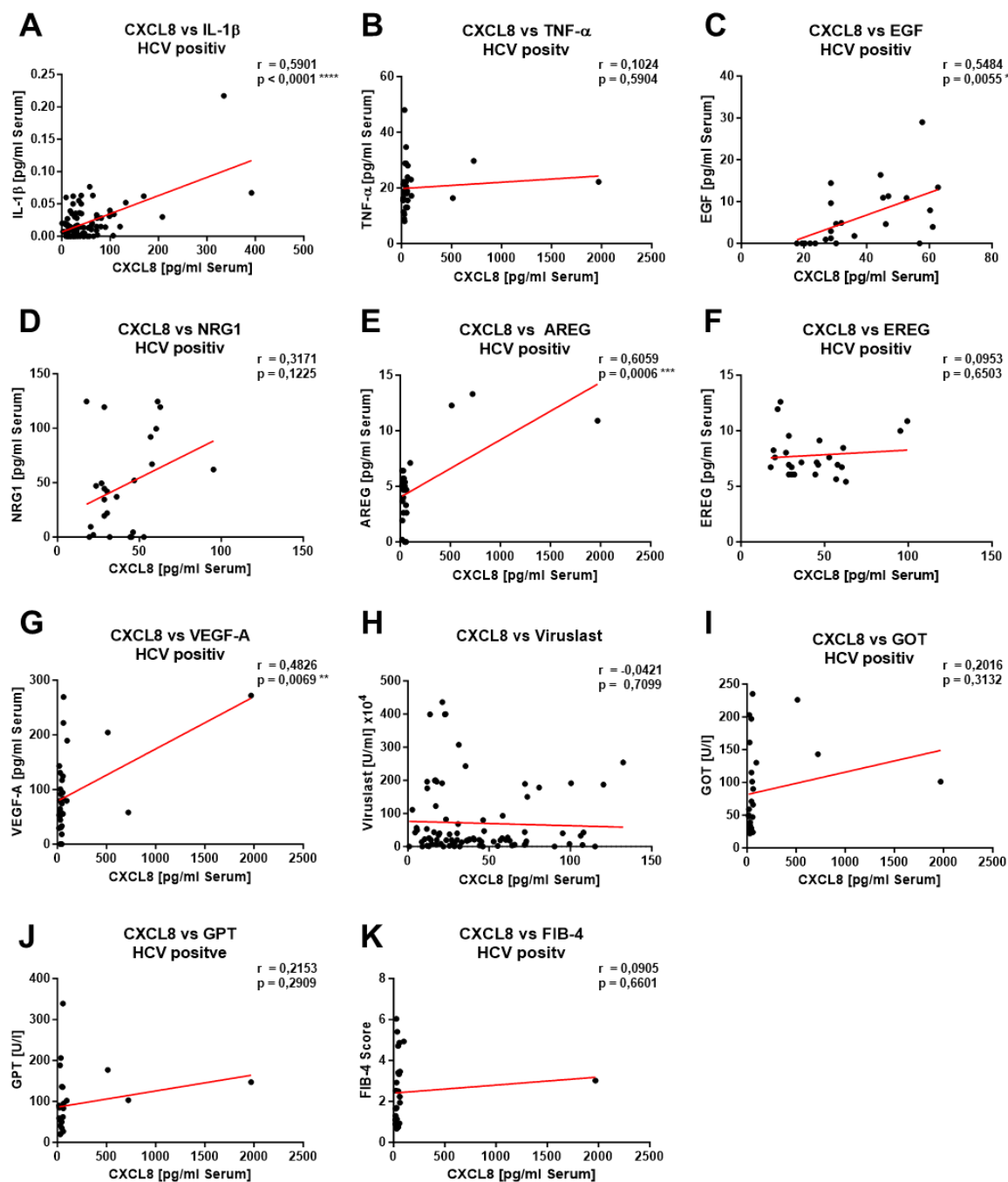


Abbildung A1.3 Korrelationsanalysen zwischen CXCL8 und allen gemessenen Faktoren bei Patienten mit einer chronischen HCV-Infektion. Zur Ermittlung der Korrelationen zwischen den einzelnen Faktoren wurde die Pearson-Korrelation verwendet. Der r-Wert wird im Bereich von -1 bis 1 dargestellt. Um eine präzisere Beurteilung vorzunehmen, wurden zuvor mittels der PRISM 10-Software, Ausreißer identifiziert und ausgeschlossen, da der Pearson-Korrelationskoeffizient sehr empfindlich gegenüber Ausreißern ist. Die Punkte repräsentieren die Werte einzelner Personen. Die Daten wurden mit * für $p \leq 0,05$, ** für $p \leq 0,01$, *** für $p \leq 0,001$ bzw. **** für $p \leq 0,0001$ markiert.

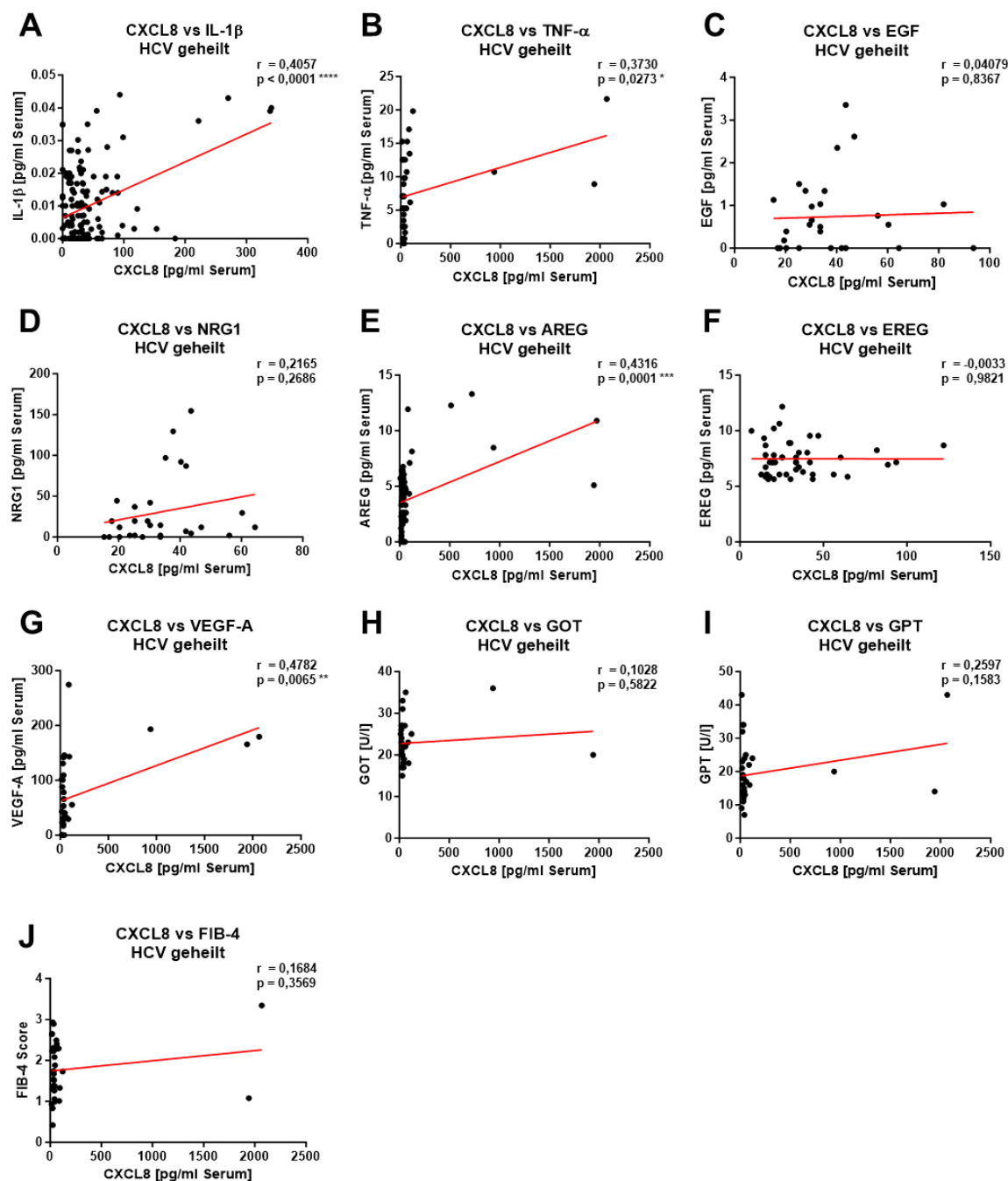


Abbildung A1.4 Korrelationsanalysen zwischen CXCL8 und allen gemessenen Faktoren bei geheilten HCV-Patienten. Zur Ermittlung der Korrelationen zwischen den einzelnen Faktoren wurde die Pearson-Korrelation verwendet. Der r -Wert wird im Bereich von -1 bis 1 dargestellt. Um eine präzisere Beurteilung vorzunehmen, wurden zuvor mittels der PRISM 10-Software, Ausreißer identifiziert und ausgeschlossen, da der Pearson-Korrelationskoeffizient sehr empfindlich gegenüber Ausreißern ist. Die Punkte repräsentieren die Werte einzelner Personen. Die Daten wurden mit * für $p \leq 0,05$, ** für $p \leq 0,01$, *** für $p \leq 0,001$ bzw. **** für $p \leq 0,0001$ markiert.

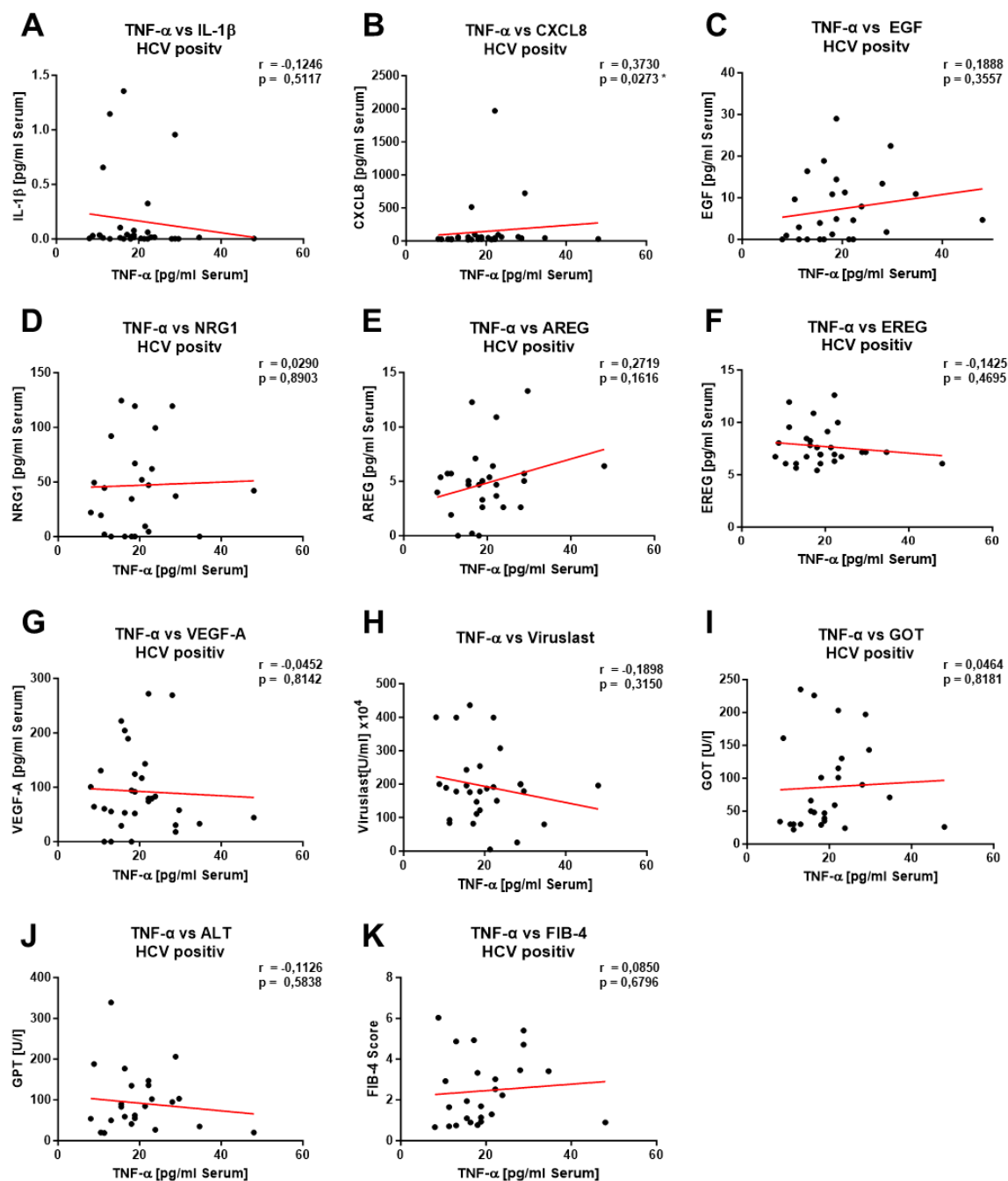


Abbildung A1.5 Korrelationsanalysen zwischen TNF-α und allen gemessenen Faktoren bei Patienten mit einer chronischen HCV-Infektion. Zur Ermittlung der Korrelationen zwischen den einzelnen Faktoren wurde die Pearson-Korrelation verwendet. Der r-Wert wird im Bereich von -1 bis 1 dargestellt. Um eine präzisere Beurteilung vorzunehmen, wurden zuvor mittels der PRISM 10-Software, Ausreißer identifiziert und ausgeschlossen, da der Pearson-Korrelationskoeffizient sehr empfindlich gegenüber Ausreißern ist. Die Punkte repräsentieren die Werte einzelner Personen. Die Daten wurden mit * für $p \leq 0,05$, ** für $p \leq 0,01$, *** für $p \leq 0,001$ bzw. **** für $p \leq 0,0001$ markiert.

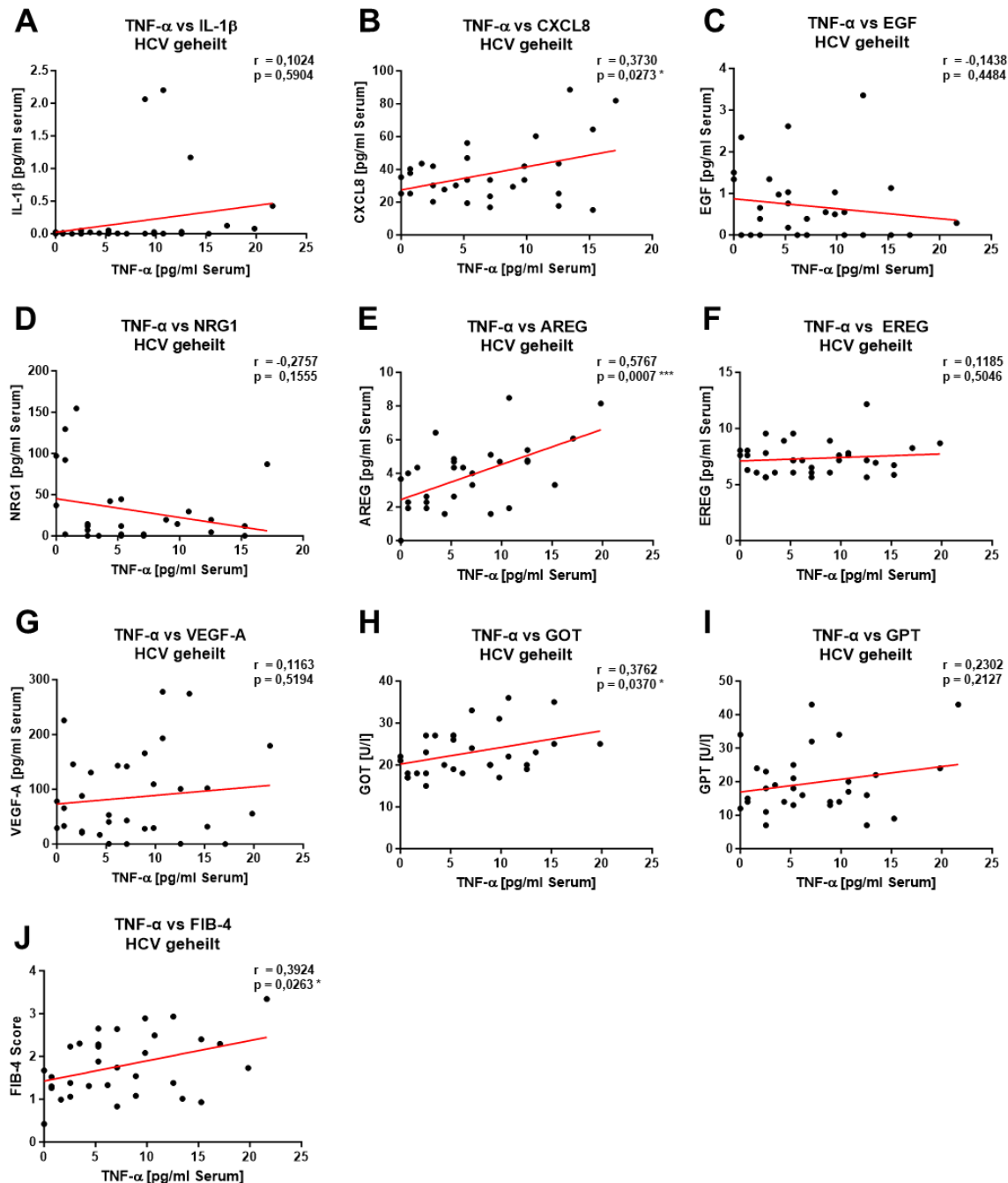


Abbildung A1.6 Korrelationsanalysen zwischen TNF-α und allen gemessenen Faktoren bei geheilten HCV-Patienten. Zur Ermittlung der Korrelationen zwischen den einzelnen Faktoren wurde die Pearson-Korrelation verwendet. Der r-Wert wird im Bereich von -1 bis 1 dargestellt. Um eine präzisere Beurteilung vorzunehmen, wurden zuvor mittels der PRISM 10-Software, Ausreißer identifiziert und ausgeschlossen, da der Pearson-Korrelationskoeffizient sehr empfindlich gegenüber Ausreißern ist. Die Punkte repräsentieren die Werte einzelner Personen. Die Daten wurden mit * für $p \leq 0,05$, ** für $p \leq 0,01$, *** für $p \leq 0,001$ bzw. **** für $p \leq 0,0001$ markiert.

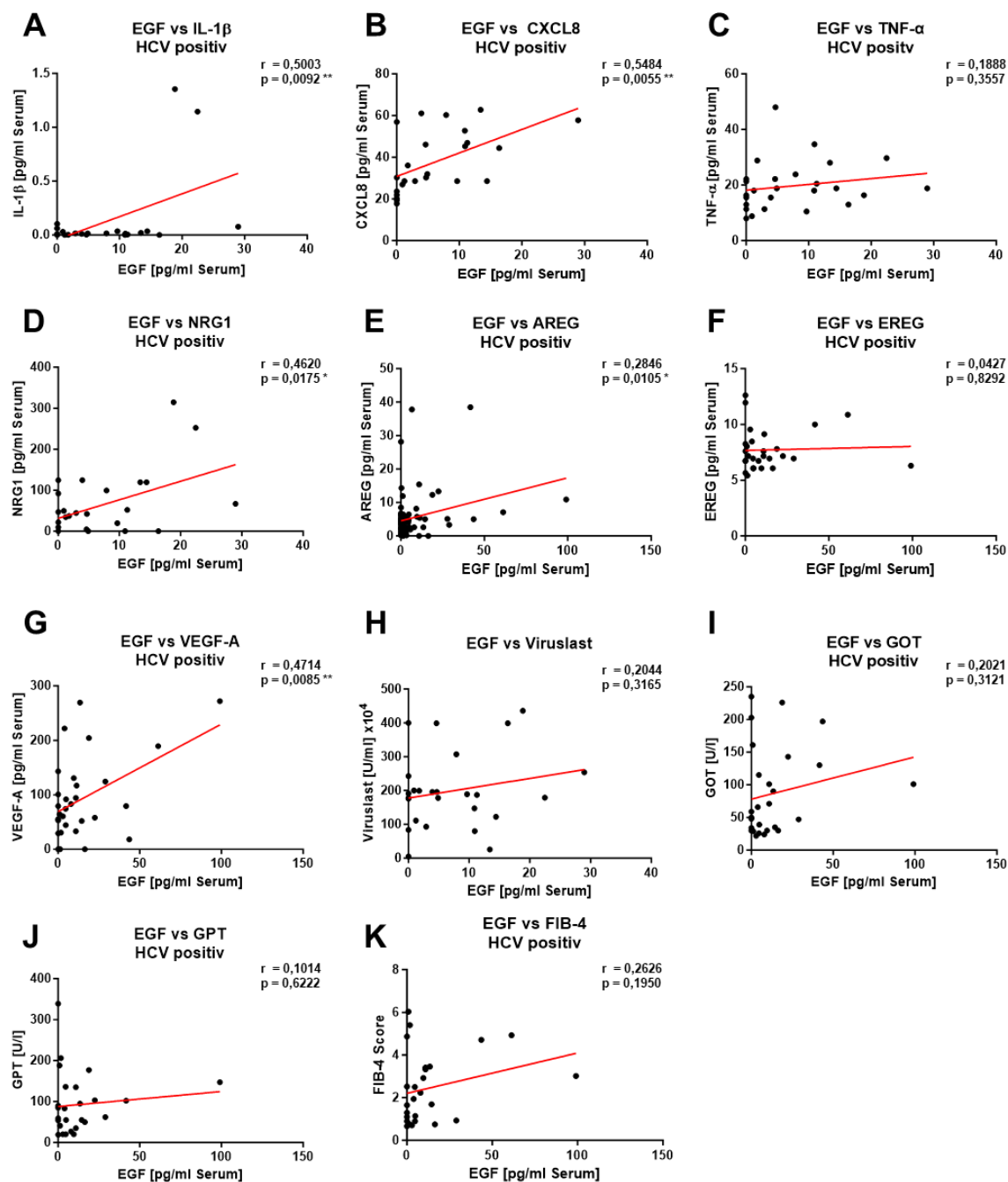


Abbildung A1.7 Korrelationsanalysen zwischen EGF und allen gemessenen Faktoren bei Patienten mit einer chronischen HCV-Infektion. Zur Ermittlung der Korrelationen zwischen den einzelnen Faktoren wurde die Pearson-Korrelation verwendet. Der r-Wert wird im Bereich von -1 bis 1 dargestellt. Um eine präzisere Beurteilung vorzunehmen, wurden zuvor mittels der PRISM 10-Software, Ausreißer identifiziert und ausgeschlossen, da der Pearson-Korrelationskoeffizient sehr empfindlich gegenüber Ausreißern ist. Die Punkte repräsentieren die Werte einzelner Personen. Die Daten wurden mit * für $p \leq 0,05$, ** für $p \leq 0,01$, *** für $p \leq 0,001$ bzw. **** für $p \leq 0,0001$ markiert.

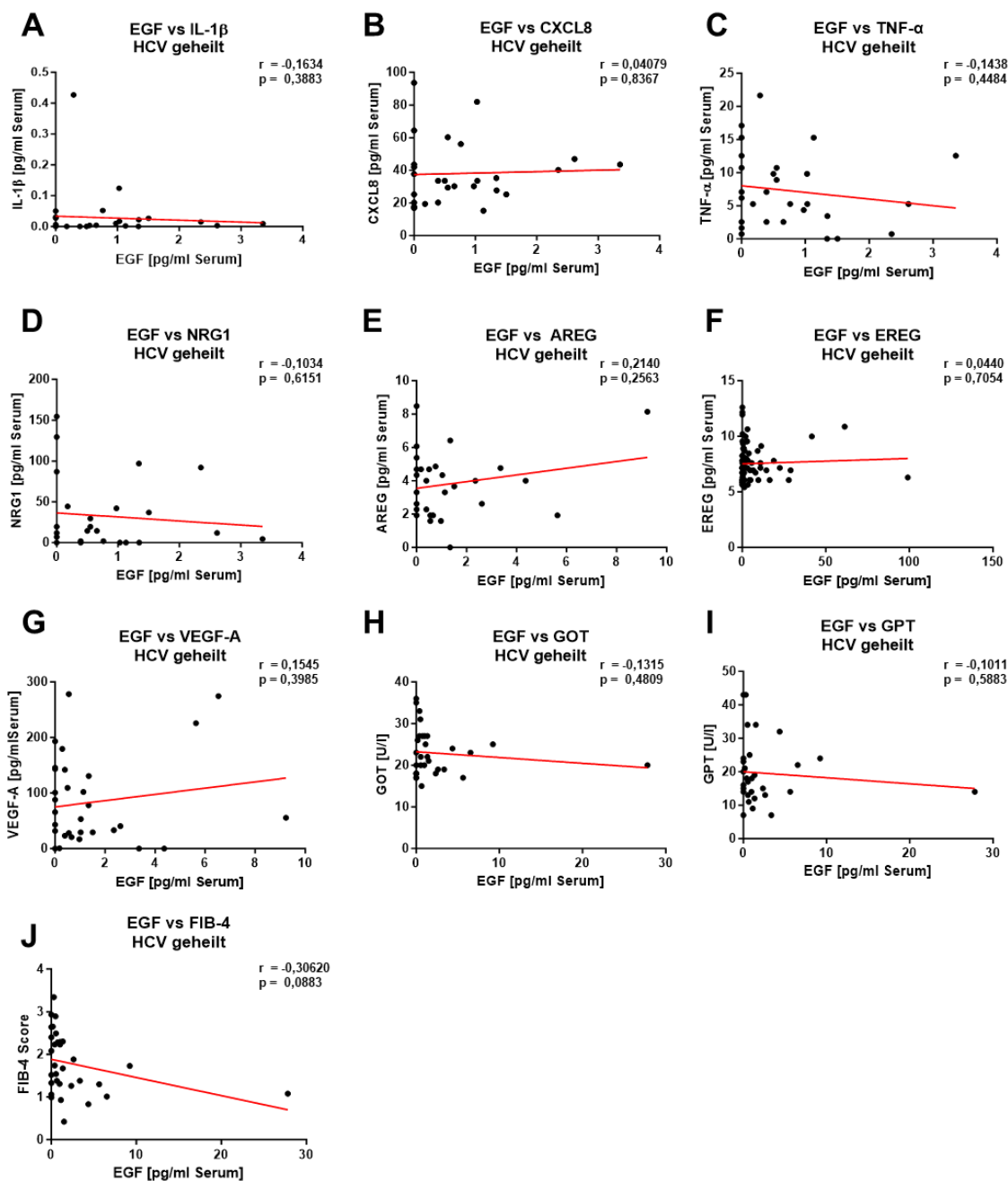


Abbildung A1.8 Korrelationsanalysen zwischen EGF und allen gemessenen Faktoren bei geheilten HCV-Patienten. Zur Ermittlung der Korrelationen zwischen den einzelnen Faktoren wurde die Pearson-Korrelation verwendet. Der r-Wert wird im Bereich von -1 bis 1 dargestellt. Um eine präzisere Beurteilung vorzunehmen, wurden zuvor mittels der PRISM 10-Software, Ausreißer identifiziert und ausgeschlossen, da der Pearson-Korrelationskoeffizient sehr empfindlich gegenüber Ausreißern ist. Die Punkte repräsentieren die Werte einzelner Personen. Die Daten wurden mit * für $p \leq 0,05$, ** für $p \leq 0,01$, *** für $p \leq 0,001$ bzw. **** für $p \leq 0,0001$ markiert.

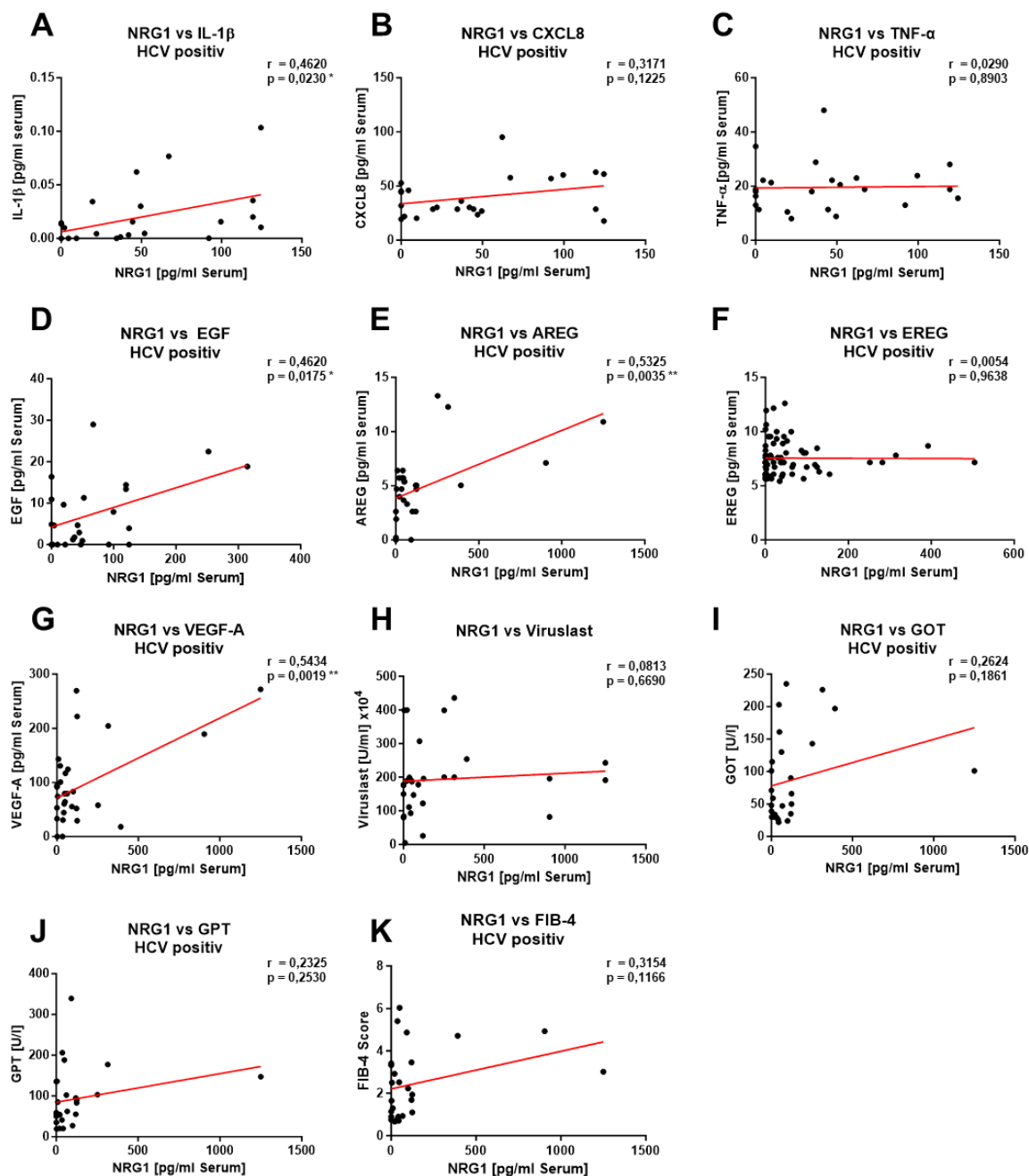


Abbildung A1.9 Korrelationsanalysen zwischen NRG1 und allen gemessenen Faktoren bei Patienten mit einer chronischen HCV-Infektion. Zur Ermittlung der Korrelationen zwischen den einzelnen Faktoren wurde die Pearson-Korrelation verwendet. Der r -Wert wird im Bereich von -1 bis 1 dargestellt. Um eine präzisere Beurteilung vorzunehmen, wurden zuvor mittels der PRISM 10-Software, Ausreißer identifiziert und ausgeschlossen, da der Pearson-Korrelationskoeffizient sehr empfindlich gegenüber Ausreißern ist. Die Punkte repräsentieren die Werte einzelner Personen. Die Daten wurden mit * für $p \leq 0,05$, ** für $p \leq 0,01$, *** für $p \leq 0,001$ bzw. **** für $p \leq 0,0001$ markiert.

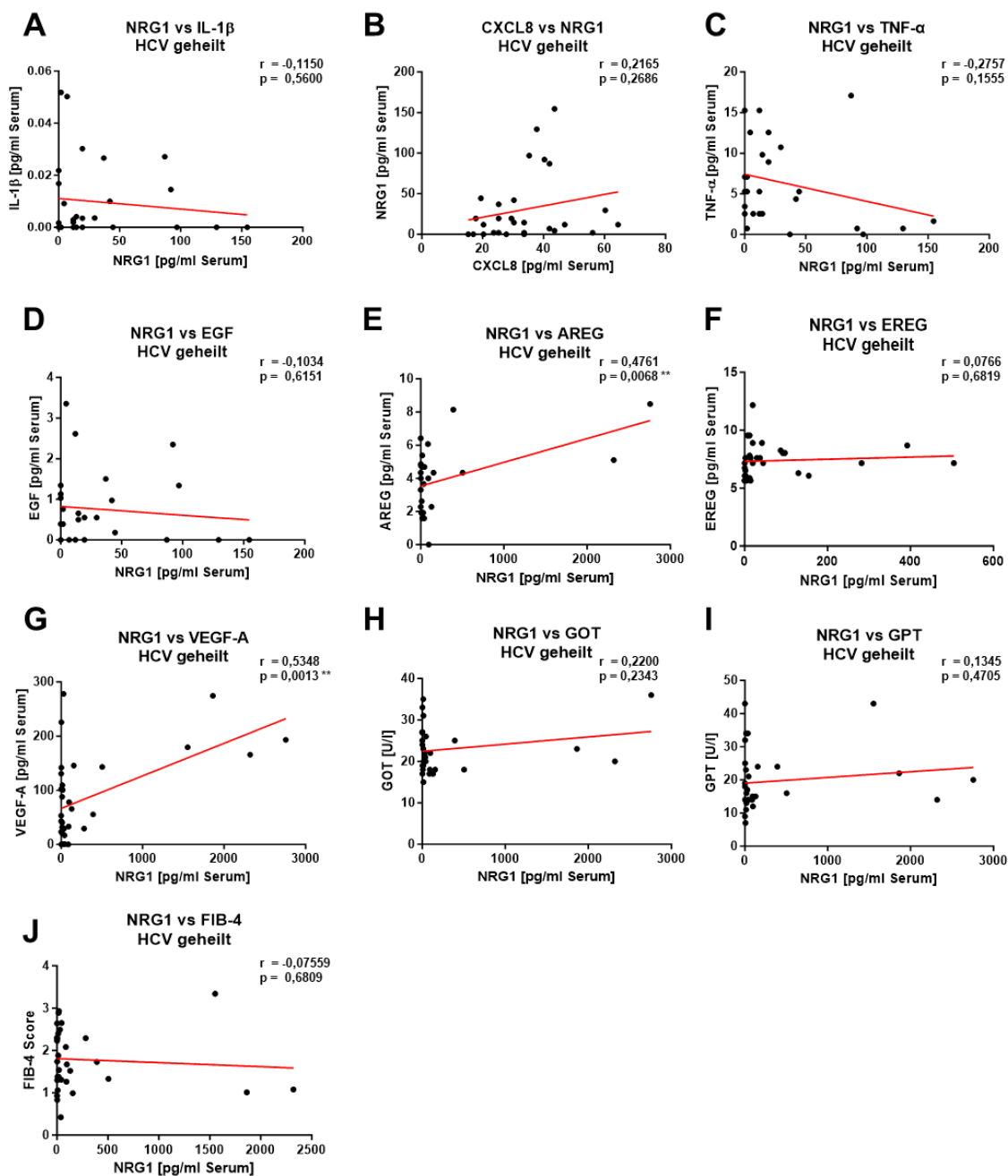


Abbildung A1.10 Korrelationsanalysen zwischen NRG1 und allen gemessenen Faktoren bei geheilten HCV-Patienten. Zur Ermittlung der Korrelationen zwischen den einzelnen Faktoren wurde die Pearson-Korrelation verwendet. Der r-Wert wird im Bereich von -1 bis 1 dargestellt. Um eine präzisere Beurteilung vorzunehmen, wurden zuvor mittels der PRISM 10-Software, Ausreißer identifiziert und ausgeschlossen, da der Pearson-Korrelationskoeffizient sehr empfindlich gegenüber Ausreißern ist. Die Punkte repräsentieren die Werte einzelner Personen. Die Daten wurden mit * für $p \leq 0,05$, ** für $p \leq 0,01$, *** für $p \leq 0,001$ bzw. **** für $p \leq 0,0001$ markiert.

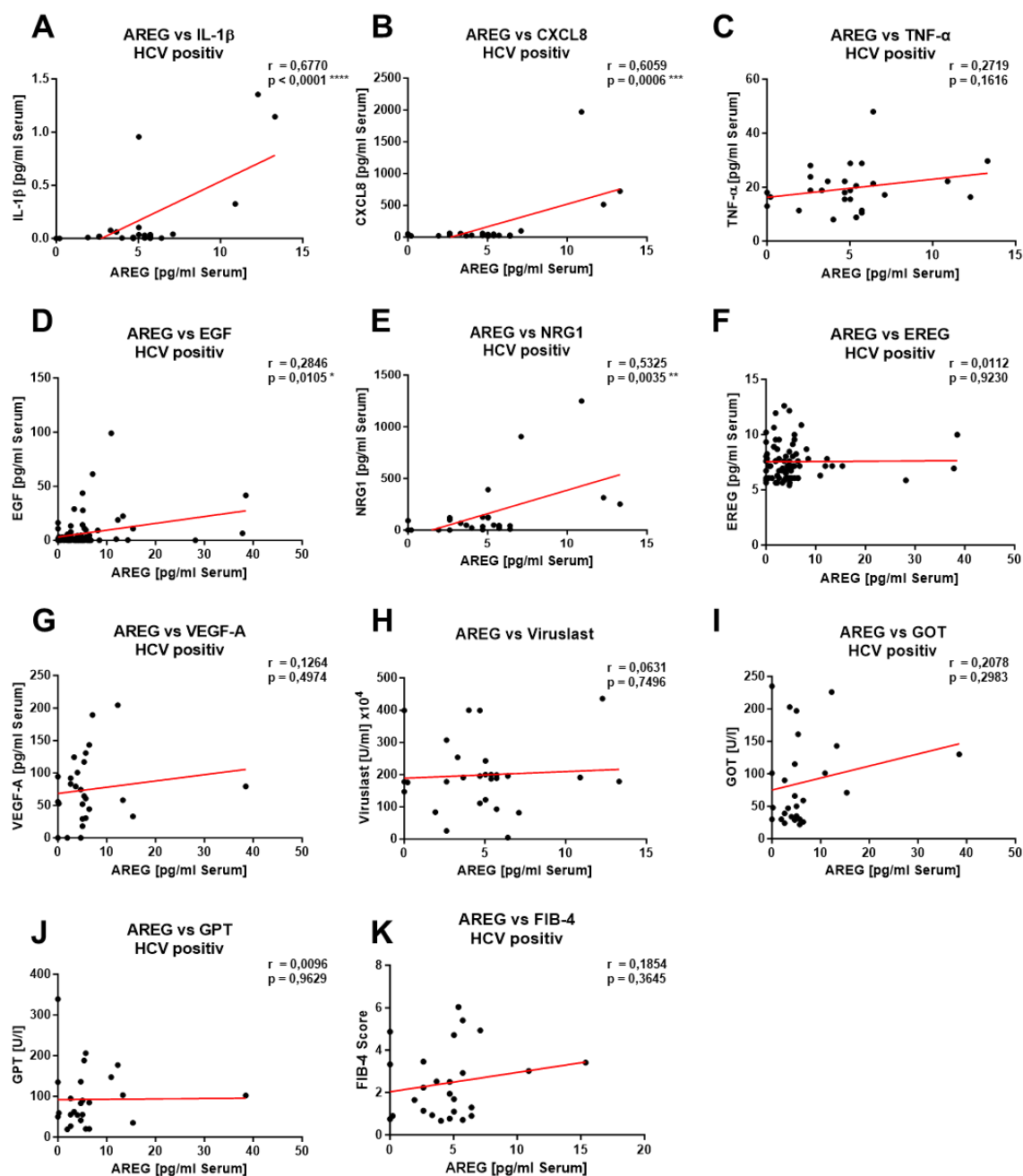


Abbildung A1.11 Korrelationsanalysen zwischen AREG und allen gemessenen Faktoren bei Patienten mit einer chronischen HCV-Infektion. Zur Ermittlung der Korrelationen zwischen den einzelnen Faktoren wurde die Pearson-Korrelation verwendet. Der r-Wert wird im Bereich von -1 bis 1 dargestellt. Um eine präzisere Beurteilung vorzunehmen, wurden zuvor mittels der PRISM 10-Software, Ausreißer identifiziert und ausgeschlossen, da der Pearson-Korrelationskoeffizient sehr empfindlich gegenüber Ausreißern ist. Die Punkte repräsentieren die Werte einzelner Personen. Die Daten wurden mit * für $p \leq 0,05$, ** für $p \leq 0,01$, *** für $p \leq 0,001$ bzw. **** für $p \leq 0,0001$ markiert.

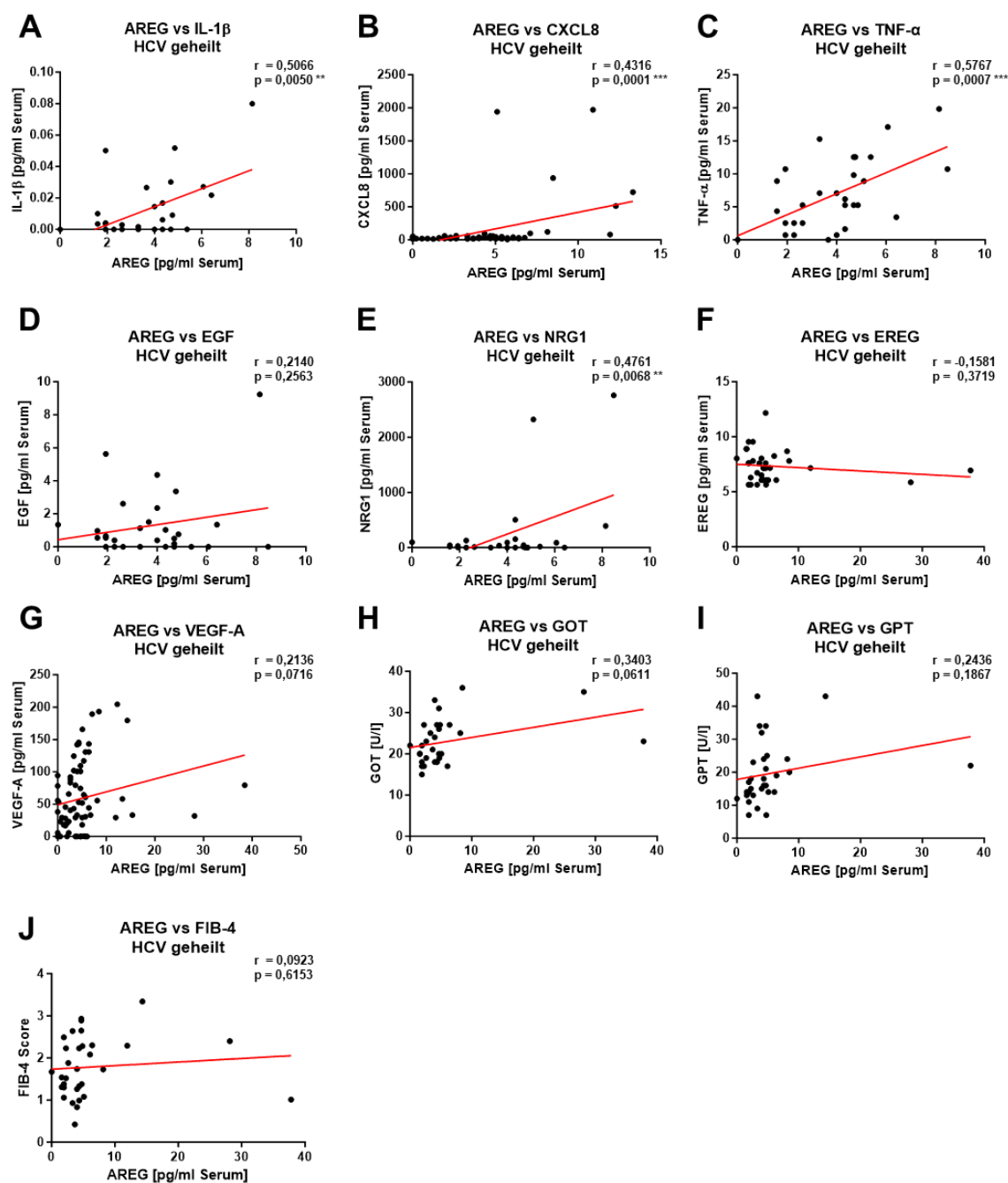


Abbildung A1.12 Korrelationsanalysen zwischen AREG und allen gemessenen Faktoren bei geheilten HCV-Patienten. Zur Ermittlung der Korrelationen zwischen den einzelnen Faktoren wurde die Pearson-Korrelation verwendet. Der r-Wert wird im Bereich von -1 bis 1 dargestellt. Um eine präzisere Beurteilung vorzunehmen, wurden zuvor mittels der PRISM 10-Software, Ausreißer identifiziert und ausgeschlossen, da der Pearson-Korrelationskoeffizient sehr empfindlich gegenüber Ausreißern ist. Die Punkte repräsentieren die Werte einzelner Personen. Die Daten wurden mit * für $p \leq 0,05$, ** für $p \leq 0,01$, *** für $p \leq 0,001$ bzw. **** für $p \leq 0,0001$ markiert.

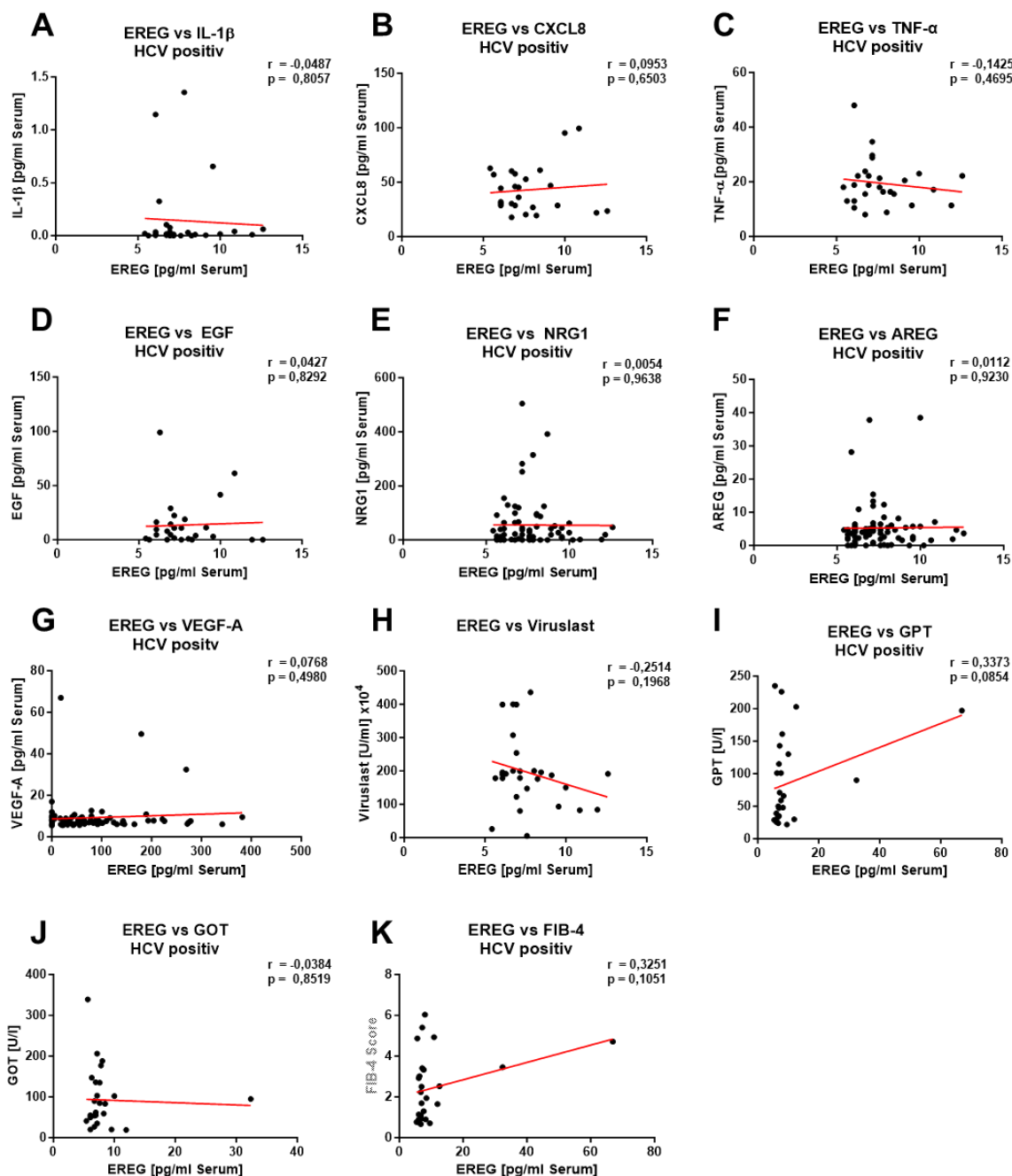


Abbildung A1.13 Korrelationsanalysen zwischen EREG und allen gemessenen Faktoren bei Patienten mit einer chronischen HCV-Infektion. Zur Ermittlung der Korrelationen zwischen den einzelnen Faktoren wurde die Pearson-Korrelation verwendet. Der r-Wert wird im Bereich von -1 bis 1 dargestellt. Um eine präzisere Beurteilung vorzunehmen, wurden zuvor mittels der PRISM 10-Software, Ausreißer identifiziert und ausgeschlossen, da der Pearson-Korrelationskoeffizient sehr empfindlich gegenüber Ausreißern ist. Die Punkte repräsentieren die Werte einzelner Personen. Die Daten wurden mit * für $p \leq 0,05$, ** für $p \leq 0,01$, *** für $p \leq 0,001$ bzw. **** für $p \leq 0,0001$ markiert.

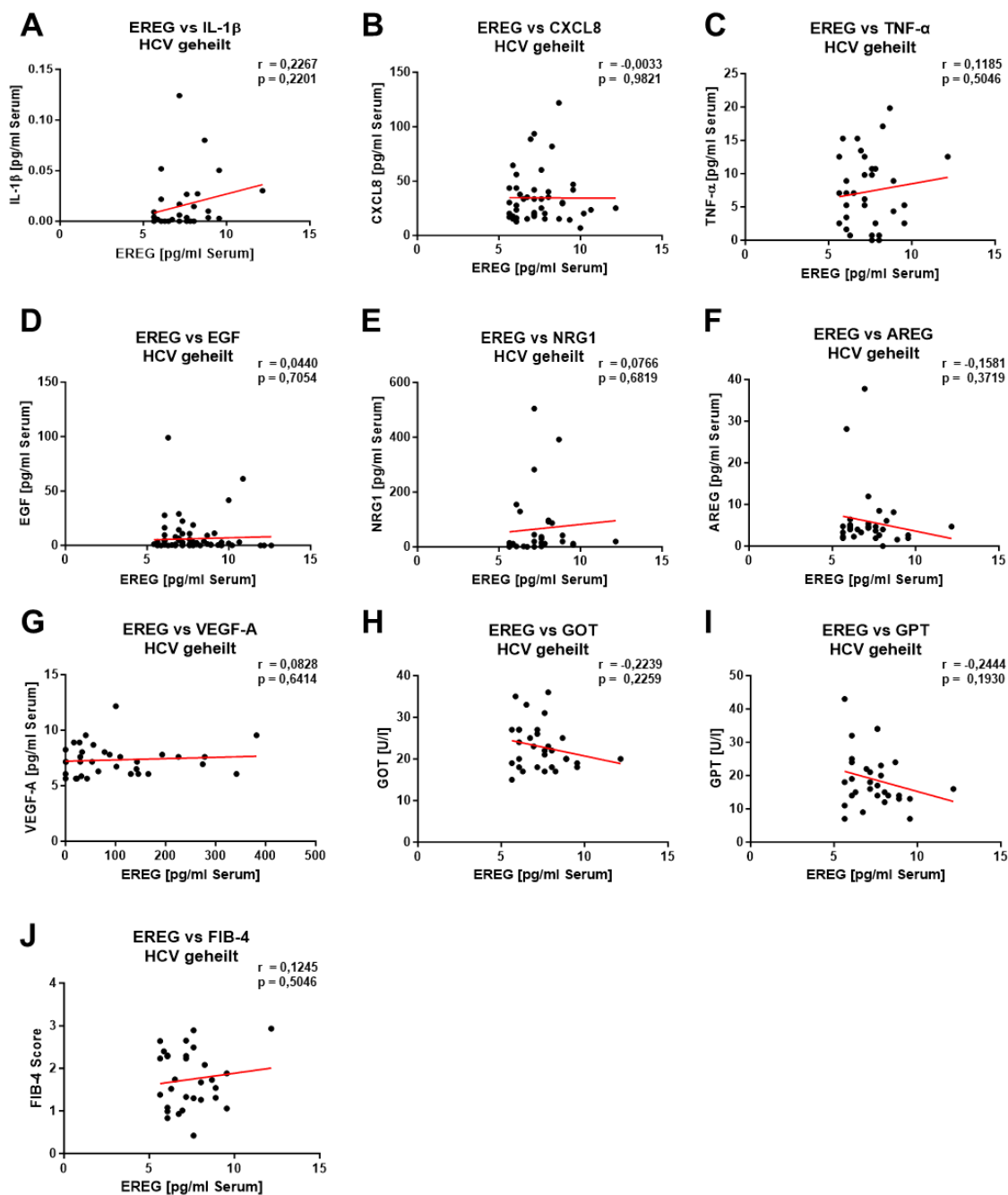


Abbildung A1.14 Korrelationsanalysen zwischen AREG und allen gemessenen Faktoren bei geheilten HCV-Patienten. Zur Ermittlung der Korrelationen zwischen den einzelnen Faktoren wurde die Pearson-Korrelation verwendet. Der r -Wert wird im Bereich von -1 bis 1 dargestellt. Um eine präzisere Beurteilung vorzunehmen, wurden zuvor mittels der PRISM 10-Software, Ausreißer identifiziert und ausgeschlossen, da der Pearson-Korrelationskoeffizient sehr empfindlich gegenüber Ausreißern ist. Die Punkte repräsentieren die Werte einzelner Personen. Die Daten wurden mit * für $p \leq 0,05$, ** für $p \leq 0,01$, *** für $p \leq 0,001$ bzw. **** für $p \leq 0,0001$ markiert.

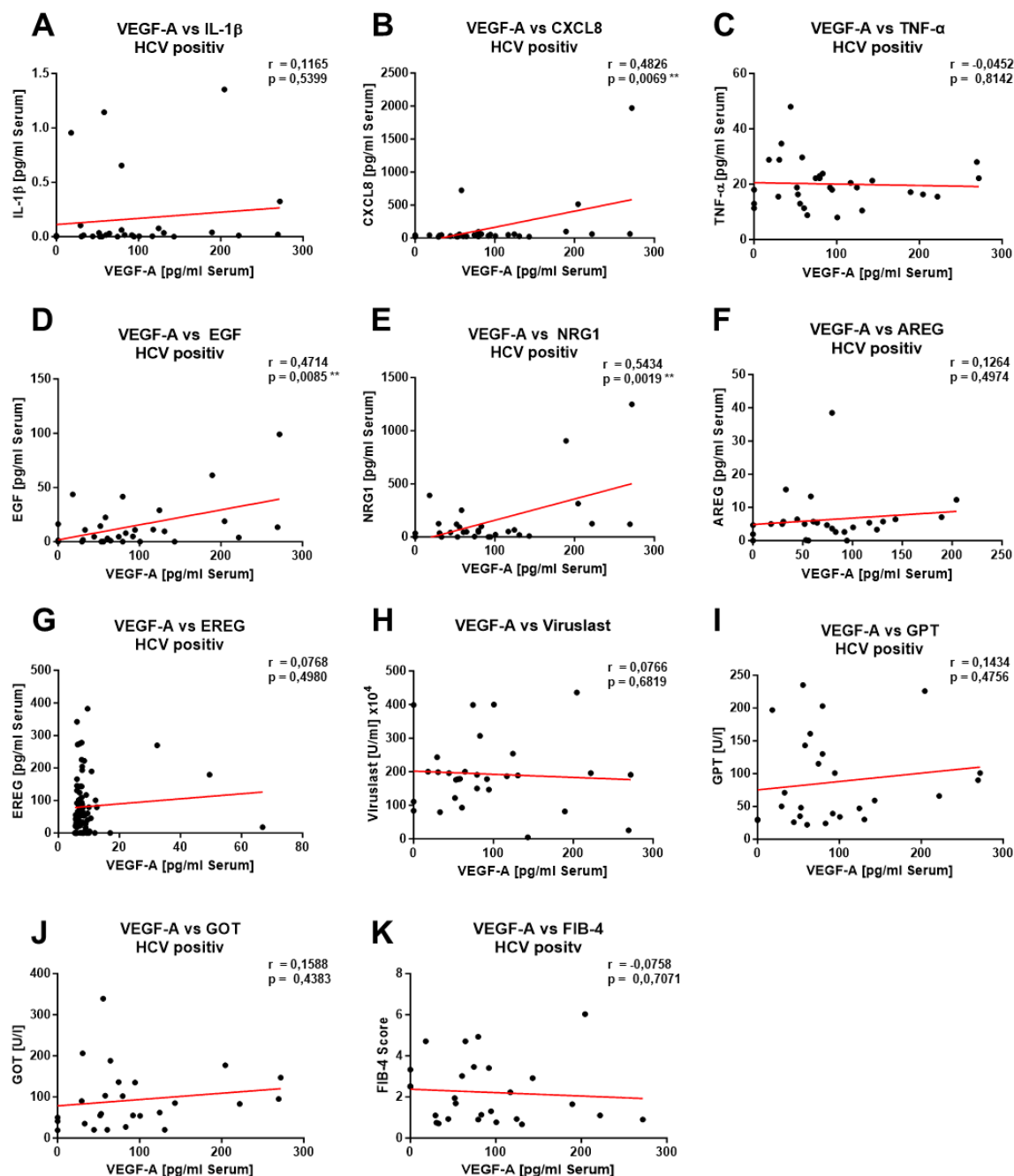


Abbildung A1.15 Korrelationsanalysen zwischen VEGF-A und allen gemessenen Faktoren bei Patienten mit einer chronischen HCV-Infektion. Zur Ermittlung der Korrelationen zwischen den einzelnen Faktoren wurde die Pearson-Korrelation verwendet. Der r-Wert wird im Bereich von -1 bis 1 dargestellt. Um eine präzisere Beurteilung vorzunehmen, wurden zuvor mittels der PRISM 10-Software, Ausreißer identifiziert und ausgeschlossen, da der Pearson-Korrelationskoeffizient sehr empfindlich gegenüber Ausreißern ist. Die Punkte repräsentieren die Werte einzelner Personen. Die Daten wurden mit * für $p \leq 0,05$, ** für $p \leq 0,01$, *** für $p \leq 0,001$ bzw. **** für $p \leq 0,0001$ markiert.

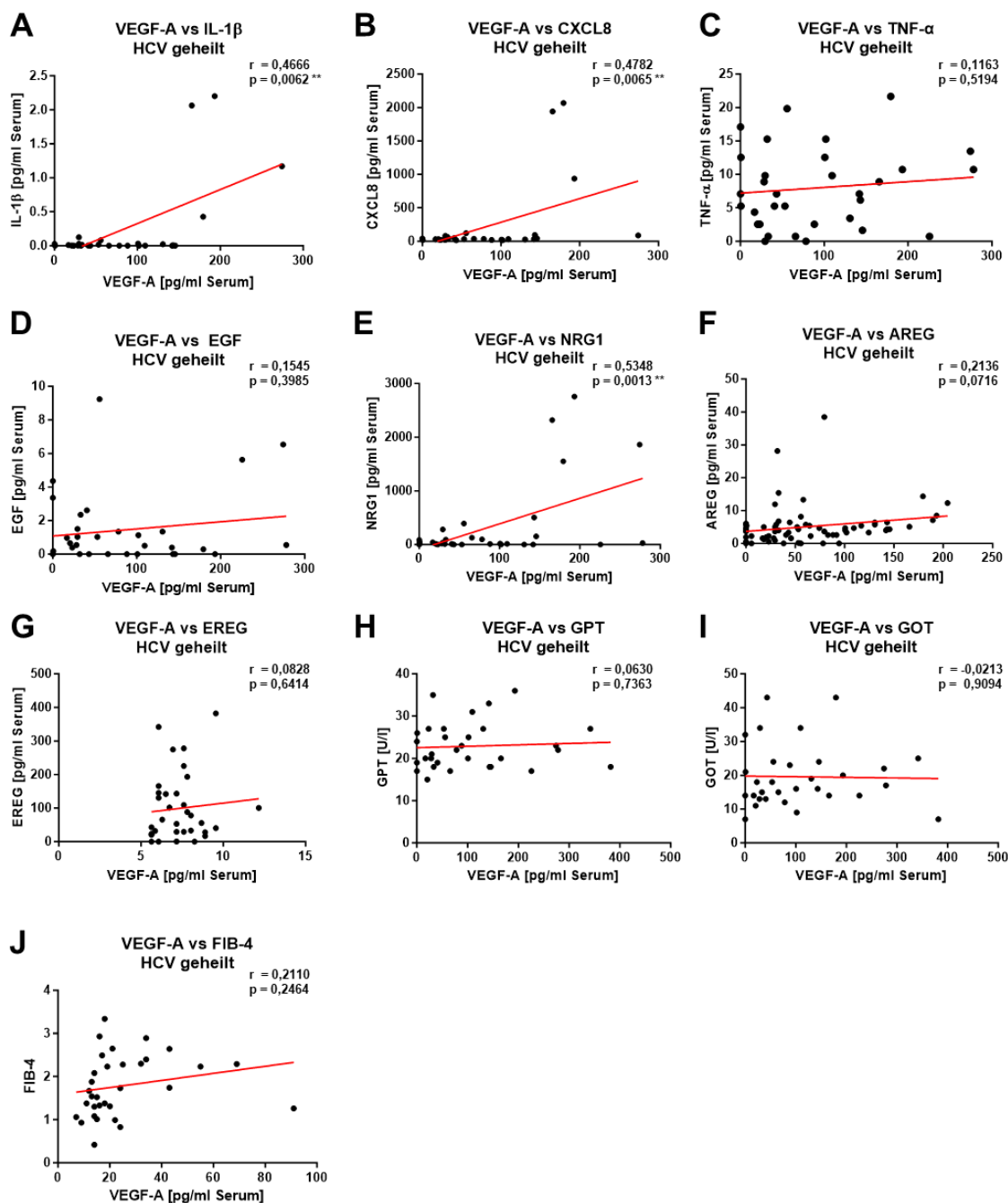


Abbildung A1.16 Korrelationsanalysen zwischen VEGF-A und allen gemessenen Faktoren bei geheilten HCV-Patienten. Zur Ermittlung der Korrelationen zwischen den einzelnen Faktoren wurde die Pearson-Korrelation verwendet. Der r-Wert wird im Bereich von -1 bis 1 dargestellt. Um eine präzisere Beurteilung vorzunehmen, wurden zuvor mittels der PRISM 10-Software, Ausreißer identifiziert und ausgeschlossen, da der Pearson-Korrelationskoeffizient sehr empfindlich gegenüber Ausreißern ist. Die Punkte repräsentieren die Werte einzelner Personen. Die Daten wurden mit * für $p \leq 0,05$, ** für $p \leq 0,01$, *** für $p \leq 0,001$ bzw. **** für $p \leq 0,0001$ markiert.

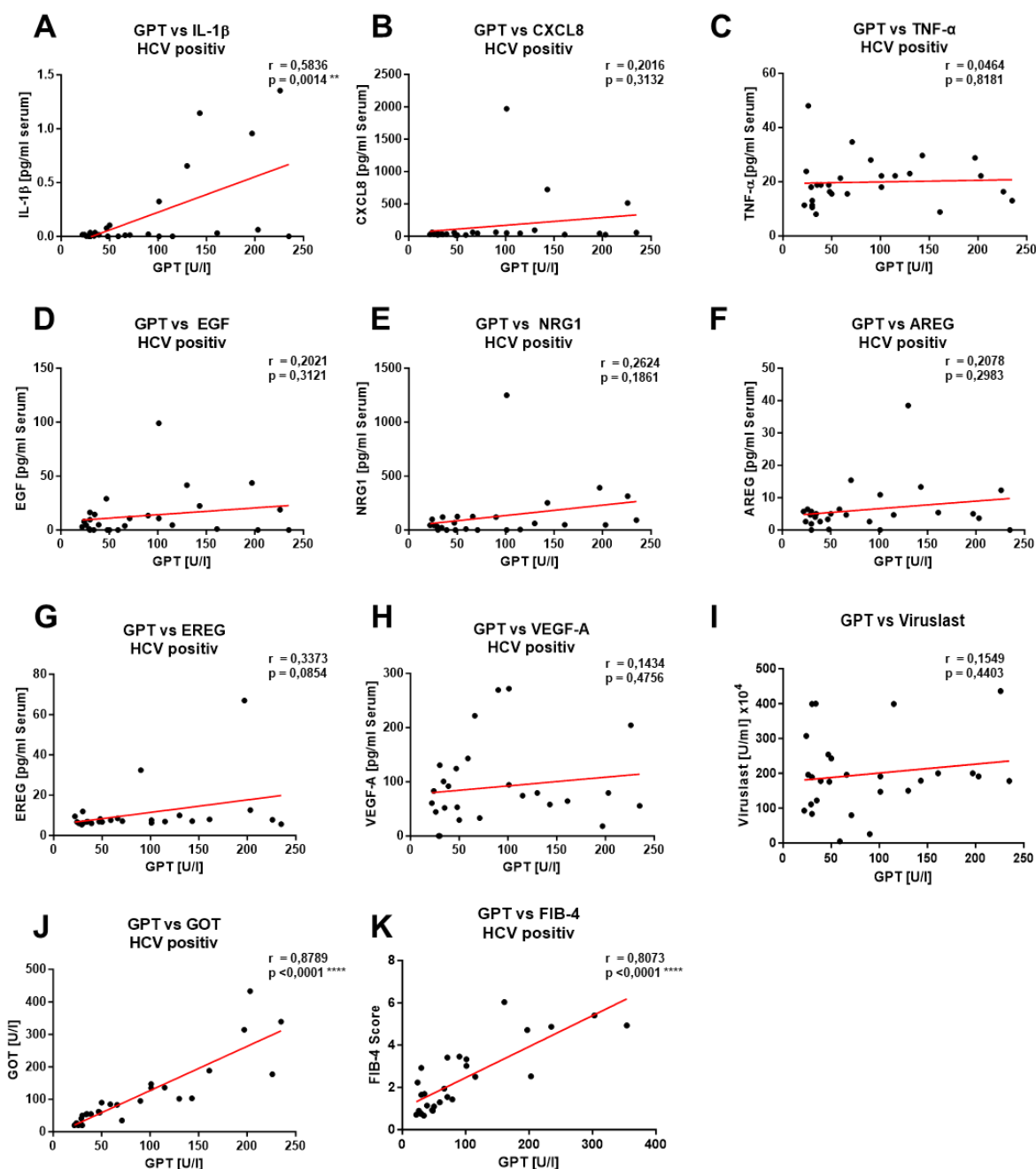


Abbildung A1.17 Korrelationsanalysen zwischen GPT und allen gemessenen Faktoren bei Patienten mit einer chronischen HCV-Infektion. Zur Ermittlung der Korrelationen zwischen den einzelnen Faktoren wurde die Pearson-Korrelation verwendet. Der r -Wert wird im Bereich von -1 bis 1 dargestellt. Um eine präzisere Beurteilung vorzunehmen, wurden zuvor mittels der PRISM 10-Software, Ausreißer identifiziert und ausgeschlossen, da der Pearson-Korrelationskoeffizient sehr empfindlich gegenüber Ausreißern ist. Die Punkte repräsentieren die Werte einzelner Personen. Die Daten wurden mit * für $p \leq 0,05$, ** für $p \leq 0,01$, *** für $p \leq 0,001$ bzw. **** für $p \leq 0,0001$ markiert.

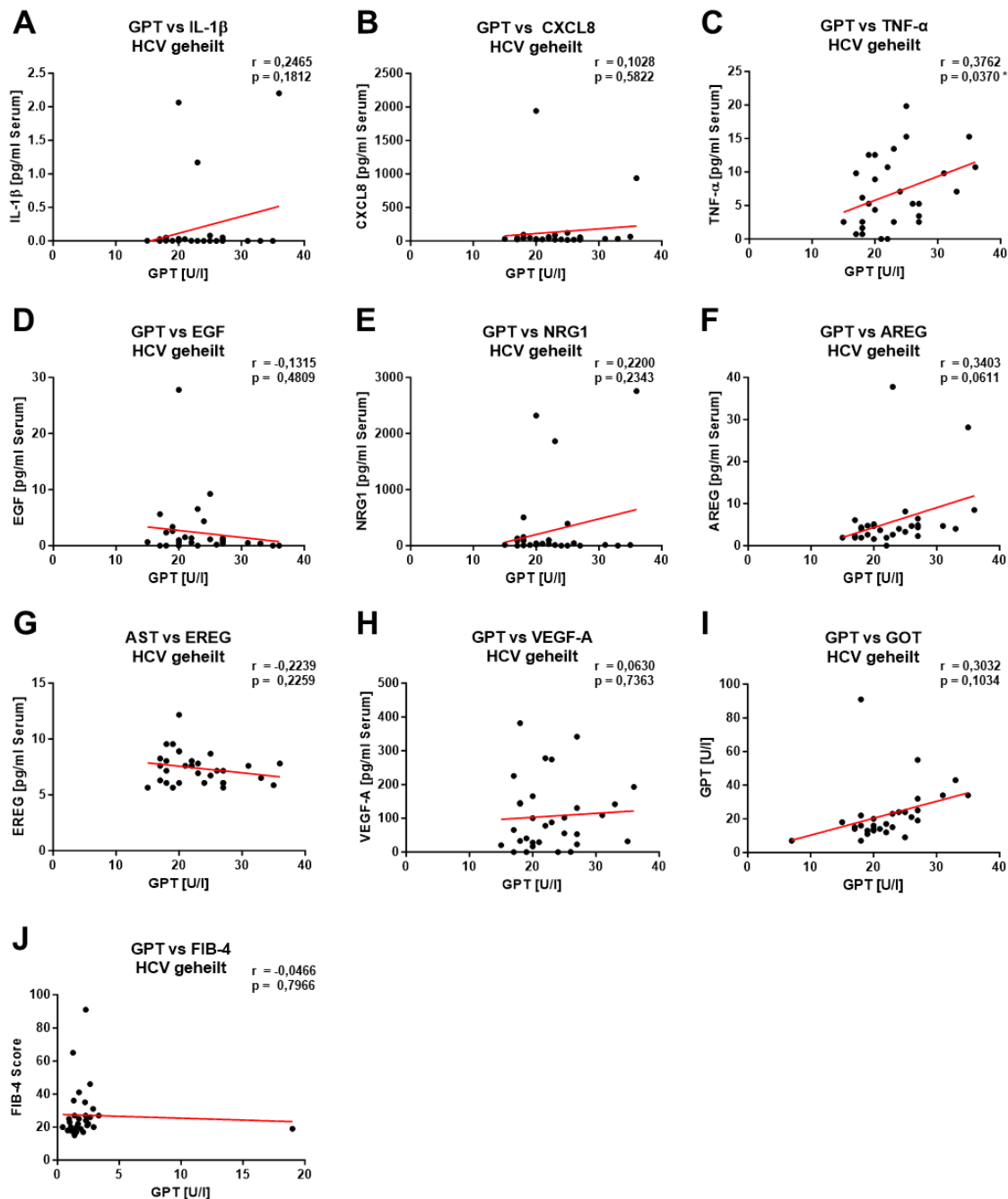


Abbildung A1.18 Korrelationsanalysen zwischen GPT und allen gemessenen Faktoren bei geheilten HCV-Patienten. Zur Ermittlung der Korrelationen zwischen den einzelnen Faktoren wurde die Pearson-Korrelation verwendet. Der r-Wert wird im Bereich von -1 bis 1 dargestellt. Um eine präzisere Beurteilung vorzunehmen, wurden zuvor mittels der PRISM 10-Software, Ausreißer identifiziert und ausgeschlossen, da der Pearson-Korrelationskoeffizient sehr empfindlich gegenüber Ausreißern ist. Die Punkte repräsentieren die Werte einzelner Personen. Die Daten wurden mit * für $p \leq 0,05$, ** für $p \leq 0,01$, *** für $p \leq 0,001$ bzw. **** für $p \leq 0,0001$ markiert.

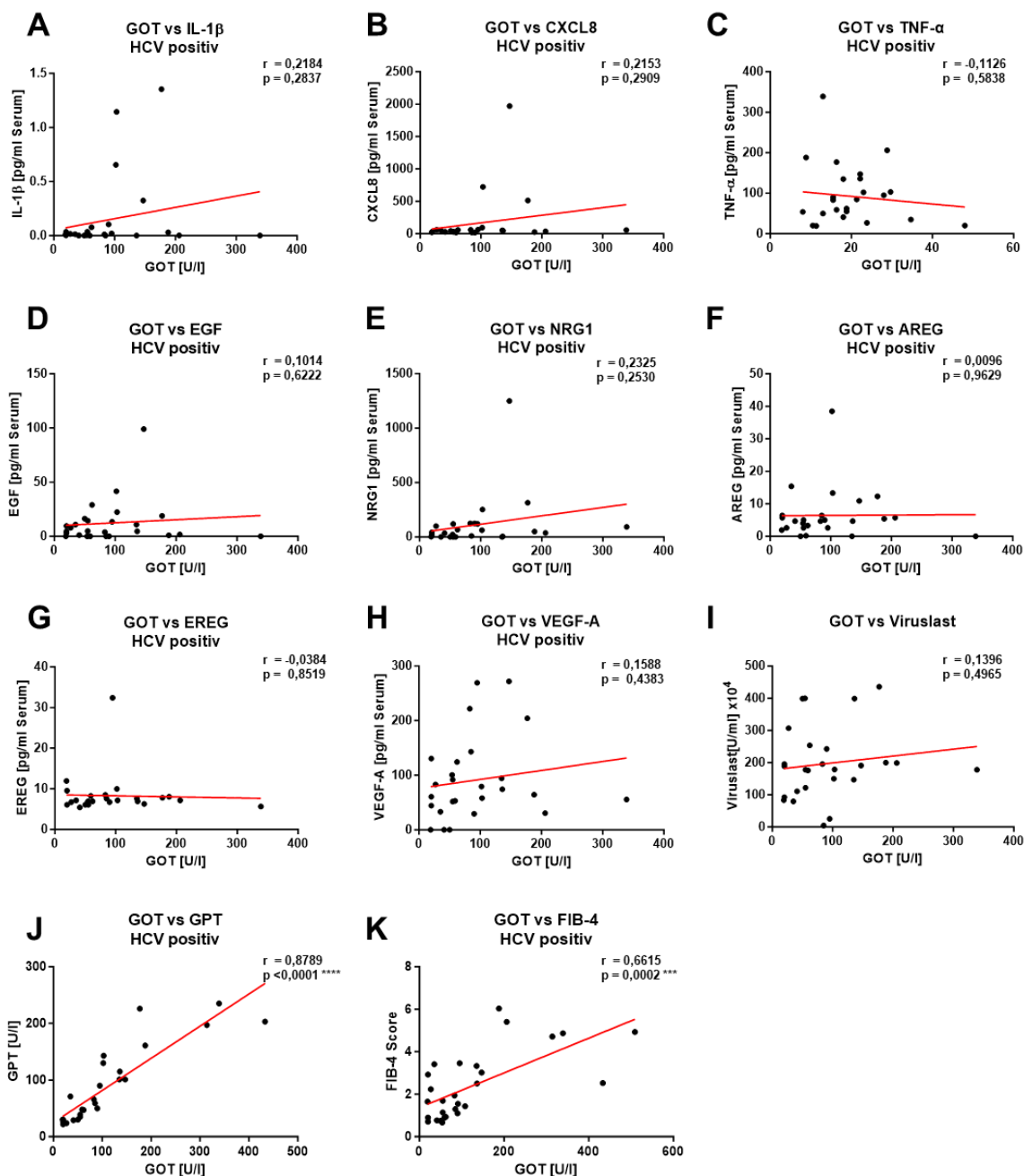


Abbildung A1.19 Korrelationsanalysen zwischen GOT und allen gemessenen Faktoren bei Patienten mit einer chronischen HCV-Infektion. Zur Ermittlung der Korrelationen zwischen den einzelnen Faktoren wurde die Pearson-Korrelation verwendet. Der r-Wert wird im Bereich von -1 bis 1 dargestellt. Um eine präzisere Beurteilung vorzunehmen, wurden zuvor mittels der PRISM 10-Software, Ausreißer identifiziert und ausgeschlossen, da der Pearson-Korrelationskoeffizient sehr empfindlich gegenüber Ausreißern ist. Die Punkte repräsentieren die Werte einzelner Personen. Die Daten wurden mit * für $p \leq 0,05$, ** für $p \leq 0,01$, *** für $p \leq 0,001$ bzw. **** für $p \leq 0,0001$ markiert.

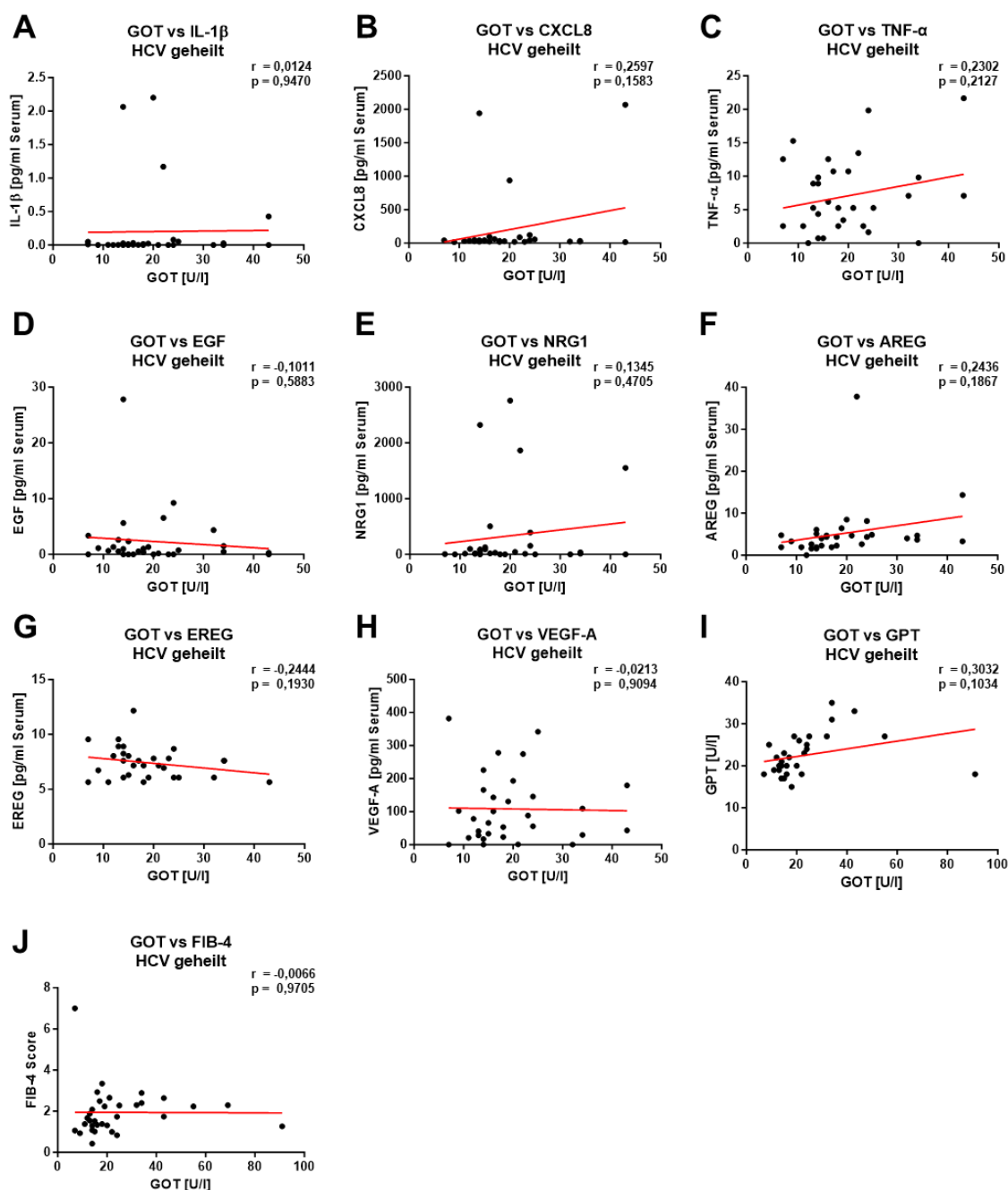


Abbildung A1.20 Korrelationsanalysen zwischen GOT und allen gemessenen Faktoren bei geheilten HCV-Patienten. Zur Ermittlung der Korrelationen zwischen den einzelnen Faktoren wurde die Pearson-Korrelation verwendet. Der r-Wert wird im Bereich von -1 bis 1 dargestellt. Um eine präzisere Beurteilung vorzunehmen, wurden zuvor mittels der PRISM 10-Software, Ausreißer identifiziert und ausgeschlossen, da der Pearson-Korrelationskoeffizient sehr empfindlich gegenüber Ausreißern ist. Die Punkte repräsentieren die Werte einzelner Personen. Die Daten wurden mit * für $p \leq 0,05$, ** für $p \leq 0,01$, *** für $p \leq 0,001$ bzw. **** für $p \leq 0,0001$ markiert.

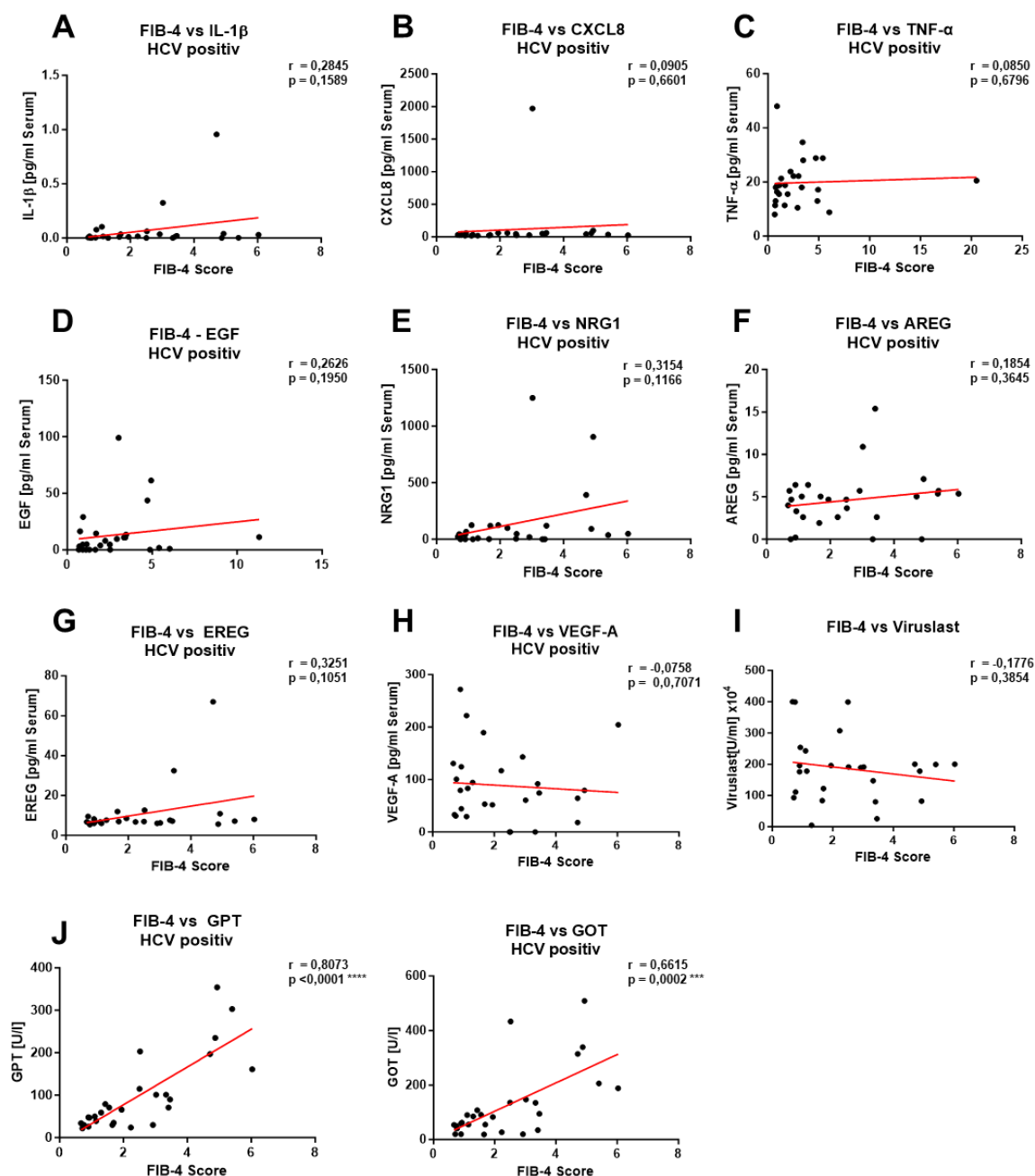


Abbildung A1.21 Korrelationsanalysen zwischen FIB-4 und allen gemessenen Faktoren bei Patienten mit einer chronischen HCV-Infektion. Zur Ermittlung der Korrelationen zwischen den einzelnen Faktoren wurde die Pearson-Korrelation verwendet. Der r-Wert wird im Bereich von -1 bis 1 dargestellt. Um eine präzisere Beurteilung vorzunehmen, wurden zuvor mittels der PRISM 10-Software, Ausreißer identifiziert und ausgeschlossen, da der Pearson-Korrelationskoeffizient sehr empfindlich gegenüber Ausreißern ist. Die Punkte repräsentieren die Werte einzelner Personen. Die Daten wurden mit * für $p \leq 0,05$, ** für $p \leq 0,01$, *** für $p \leq 0,001$ bzw. **** für $p \leq 0,0001$ markiert.

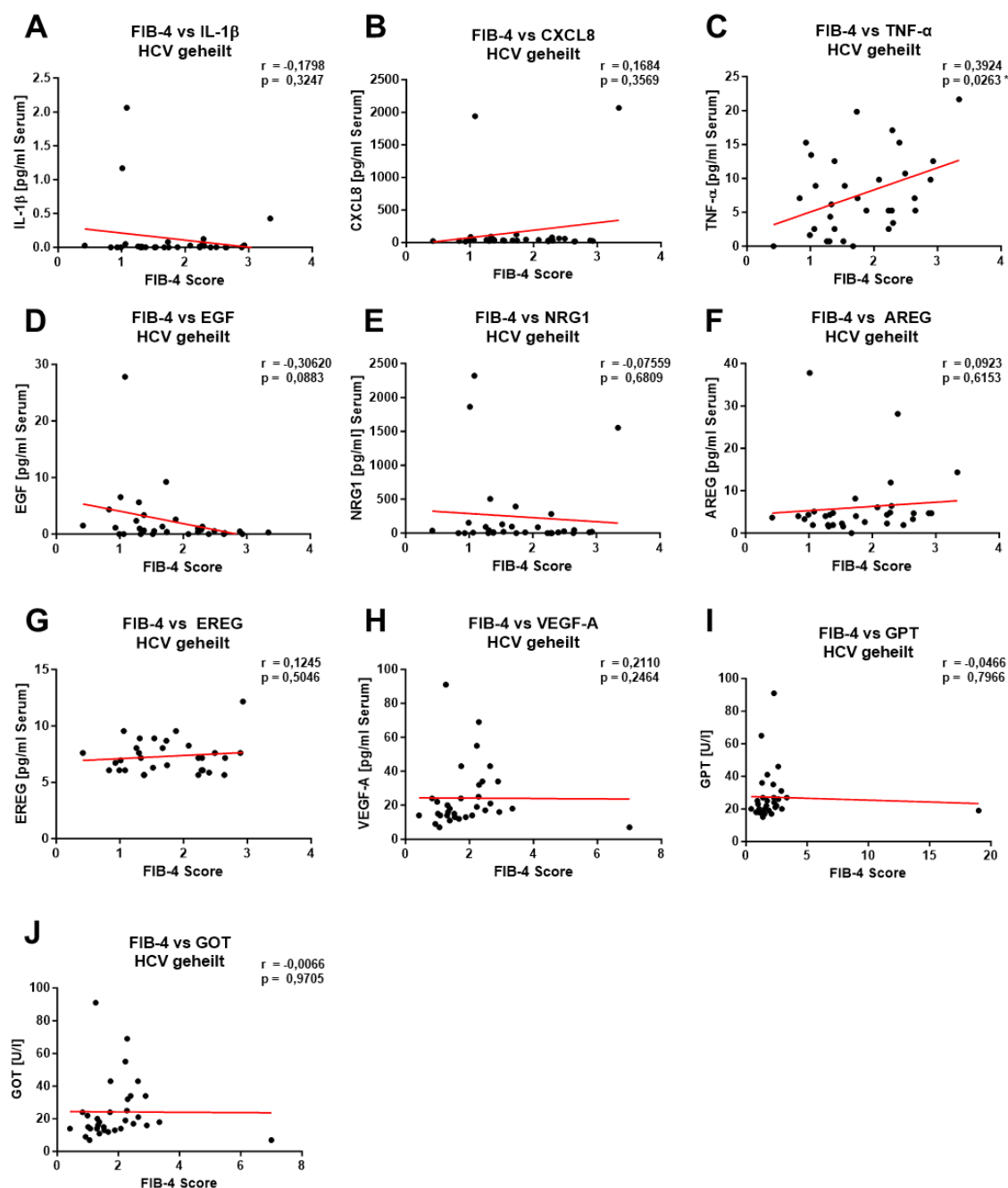


Abbildung A1.22 Korrelationsanalysen zwischen FIB-4 und allen gemessenen Faktoren bei geheilten HCV-Patienten. Zur Ermittlung der Korrelationen zwischen den einzelnen Faktoren wurde die Pearson-Korrelation verwendet. Der r -Wert wird im Bereich von -1 bis 1 dargestellt. Um eine präzisere Beurteilung vorzunehmen, wurden zuvor mittels der PRISM 10-Software, Ausreißer identifiziert und ausgeschlossen, da der Pearson-Korrelationskoeffizient sehr empfindlich gegenüber Ausreißern ist. Die Punkte repräsentieren die Werte einzelner Personen. Die Daten wurden mit * für $p \leq 0,05$, ** für $p \leq 0,01$, *** für $p \leq 0,001$ bzw. **** für $p \leq 0,0001$ markiert.

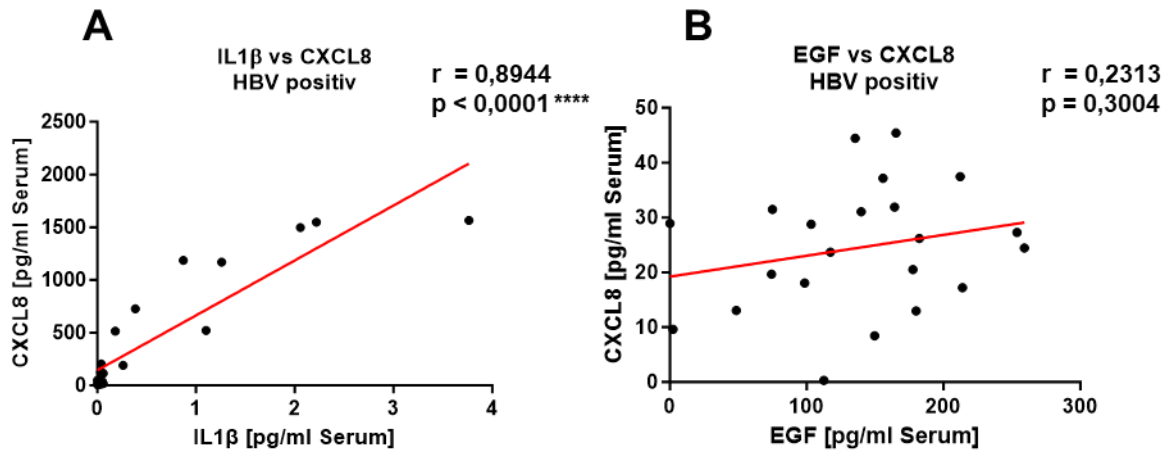


Abbildung A2 Korrelationsanalysen zwischen IL-1 β , EGF und CXCL8 bei Patienten mit einer HBV-Infektion. Zur Ermittlung der Korrelationen zwischen den einzelnen Faktoren wurde die Pearson-Korrelation verwendet. Der r-Wert wird im Bereich von -1 bis 1 dargestellt. Um eine präzisere Beurteilung vorzunehmen, wurden zuvor mittels der PRISM 10-Software, Ausreißer identifiziert und ausgeschlossen, da der Pearson-Korrelationskoeffizient sehr empfindlich gegenüber Ausreißern ist. Die Punkte repräsentieren die Werte einzelner Personen. Die Daten wurden mit * für $p \leq 0,05$, ** für $p \leq 0,01$, *** für $p \leq 0,001$ bzw. **** für $p \leq 0,0001$ markiert.

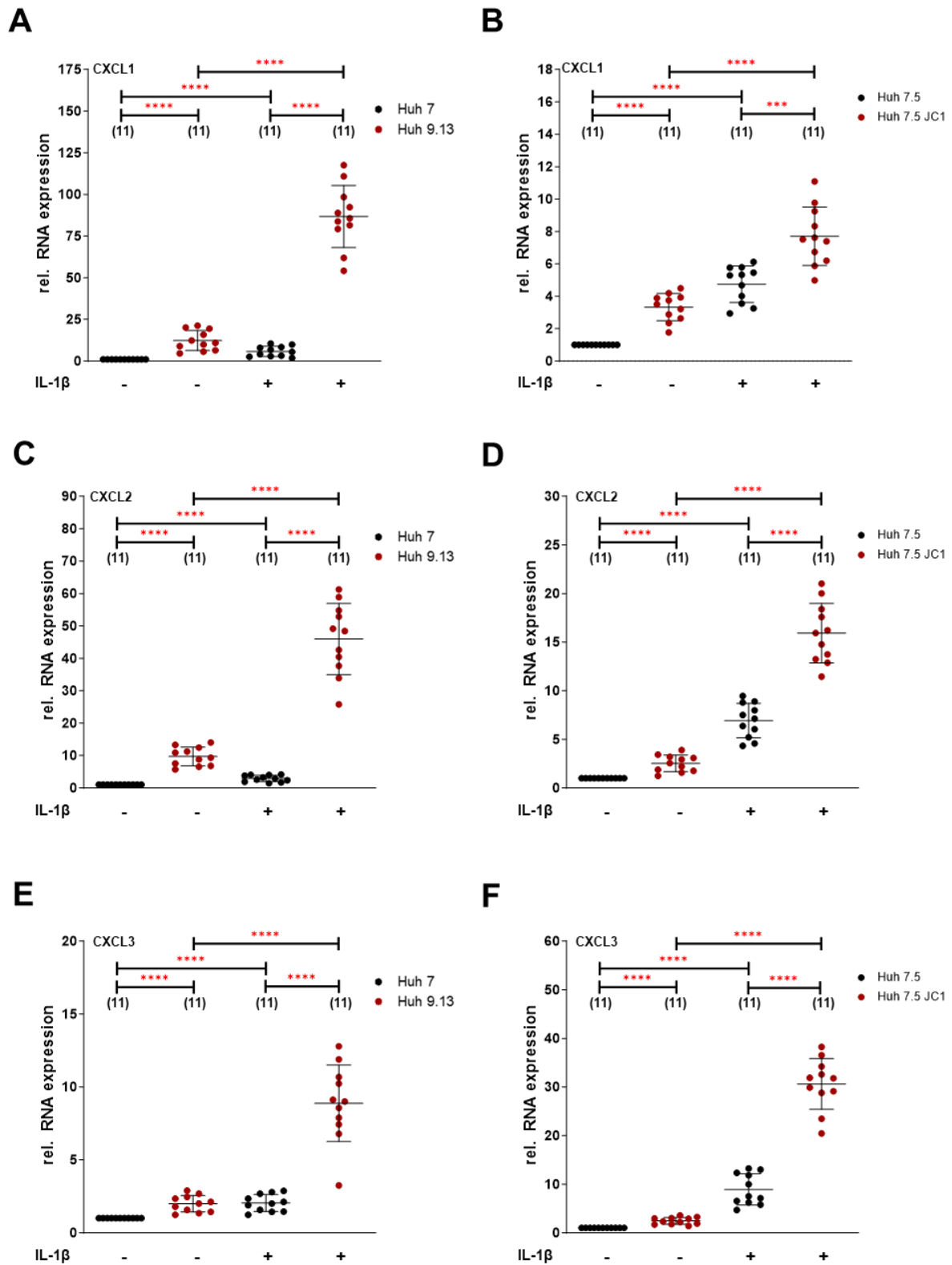


Abbildung A3.1: Das HCV reguliert die basale und IL-1 β -induzierte mRNA-Expression von CXCL1 – CXCL3. Huh 9.13 Replikon- (A, C und E) oder infizierte Huh 7.5-JC1-Zellen (B, D und F), im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen, wurden für acht Stunden mit 5 U/ml IL-1 β stimuliert. Die quantitativen PCR-Ergebnisse wurden unter Anwendung der $\Delta\Delta$ CT-Methode ermittelt und auf SDHA normalisiert. Die Ergebnisse werden als Bruchteile des normalisierten Wertes der Kontrolle ausgedrückt, die auf 1 gesetzt wurde, und die Daten werden als Mittelwert $\pm$ SD dargestellt. Die Signifikanz wurde mittels des Mann-Whitney-U-Tests berechnet. Die Daten wurden mit **** für

p ≤ 0,0001 markiert, sofern eine Signifikanz vorliegt.

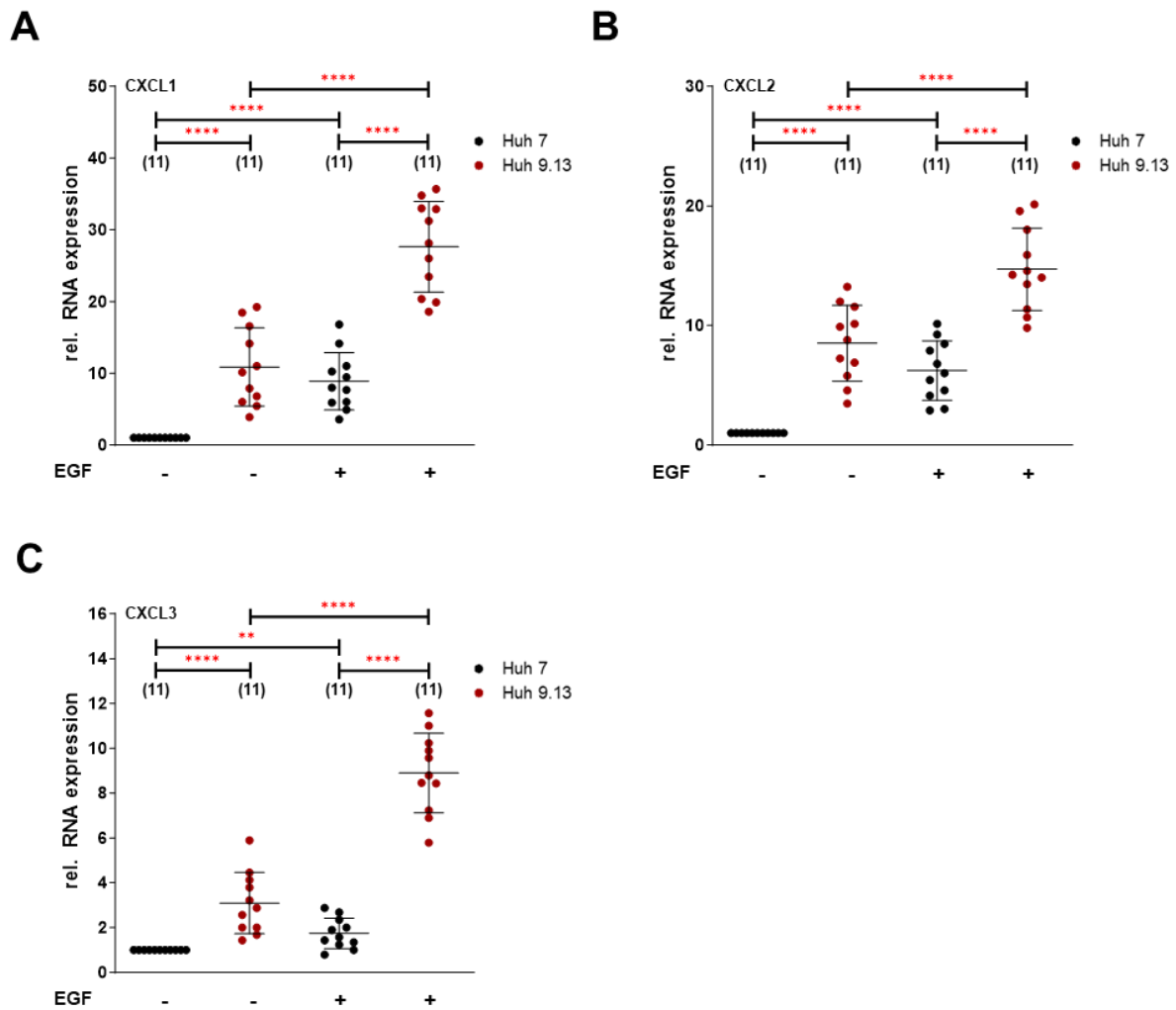


Abbildung A3.2: Das HCV reguliert die basale und EGF-induzierte mRNA-Expression von CXCL1 – CXCL3. Huh 9.13 Replikon-Zellen im Vergleich zu Huh 7 Kontroll-Zellen, wurden für acht Stunden mit 40 ng/ml EGF stimuliert. Die quantitativen PCR-Ergebnisse wurden unter Anwendung der $\Delta\Delta CT$ -Methode ermittelt und auf SDHA normalisiert. Die Ergebnisse werden als Bruchteile des normalisierten Wertes der Kontrolle ausgedrückt, die auf 1 gesetzt wurde, und die Daten werden als Mittelwert $\pm$ SD dargestellt. Die Signifikanz wurde mittels des Mann-Whitney-U-Tests berechnet. Die Daten wurden mit **** für $p \leq 0,0001$ markiert, sofern eine Signifikanz vorliegt.

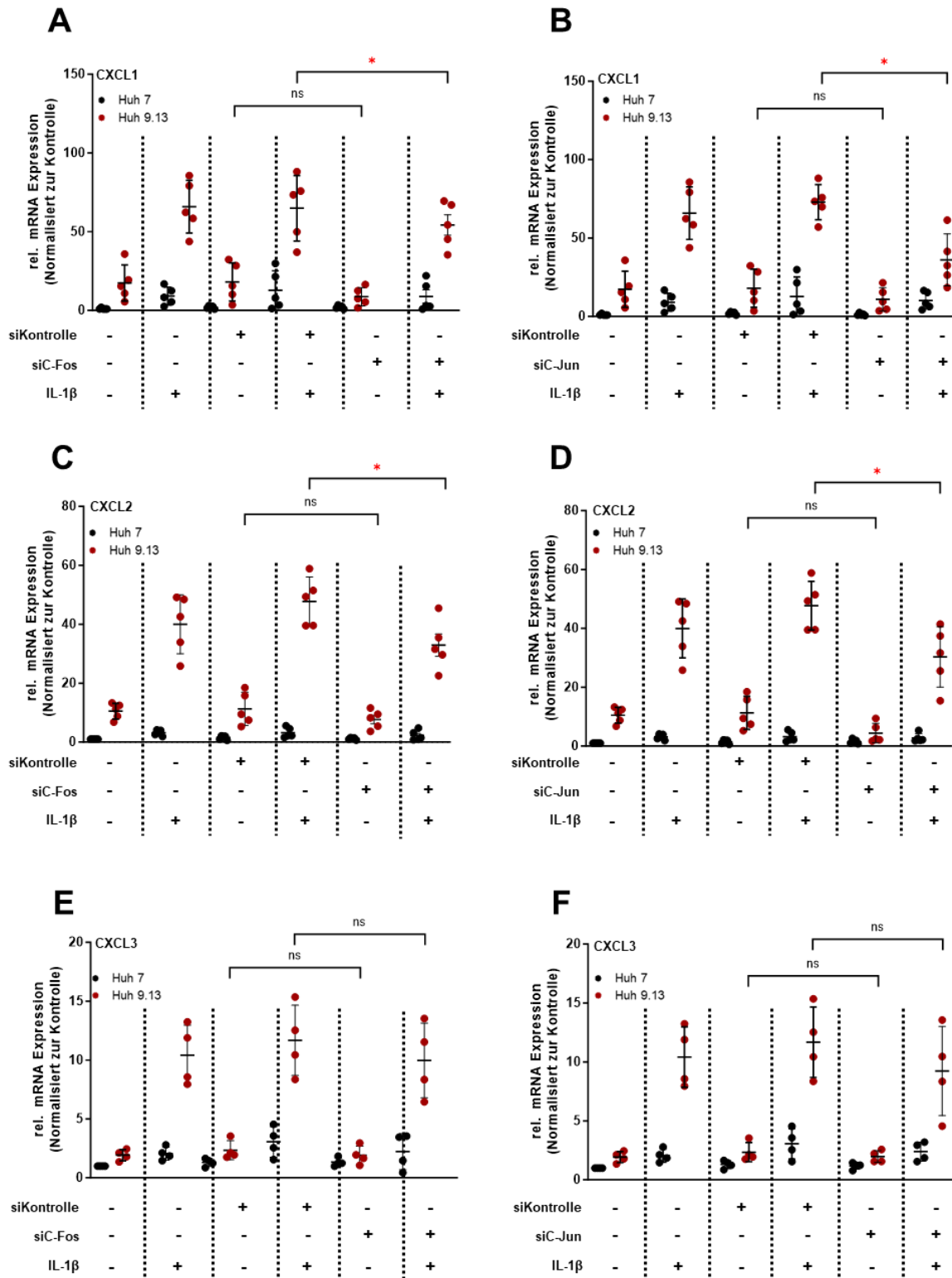


Abbildung A4: C-Fos und c-Jun sind wichtig für die Modulation von CXCL1 und CXCL2. Die Expression von CXCL8 mRNA wurde mittels qRT-PCR in Huh9.13- oder Huh7.5-Zellen, die mit dem HCV JC1-Stamm (MOI = 1) infiziert waren, analysiert und mit entsprechenden Kontrollzellen verglichen. Die Zellen wurden 48 Stunden mit spezifischer SiRNA gegen c-Fos oder c-Jun behandelt und anschließend für acht Stunden mit 5 U/ml IL-1β behandelt. Die quantitativen PCR-Ergebnisse wurden unter Verwendung der $\Delta\Delta C_T$ -Methode ermittelt und auf SDHA normalisiert. Die Ergebnisse wurden als Bruchteile des normalisierten Wertes der Kontrolle ausgedrückt, die auf 1 gesetzt wurde, und die Daten wurden als Mittelwert $\pm$ SD dargestellt. Die Signifikanz wurde mittels des Mann-Whitney-U-Tests berechnet. Die Daten wurden mit * für $p \leq 0,05$, ** für $p \leq 0,1$, *** für $p \leq 0,001$ und **** für $p \leq 0,0001$ markiert, sofern eine Signifikanz vorliegt.

9. Danksagung

Ich möchte meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Johannes G. Bode, meinen besonderen Dank aussprechen. Er hat mir die Möglichkeit gegeben, diese Arbeit in einem spannenden Forschungsfeld anzufertigen. Besonders schätze ich seine umfassende Unterstützung, die anregenden abendlichen Diskussionen und die kontinuierlich wertvollen Anregungen.

Ein außerordentlicher Dank gebührt auch Herrn Professor Dr. Dieter Willbold, der meine Promotion als Zweitbetreuer und Gutachter in der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät begleitete.

Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. Dieter Häussinger und Herrn Prof. Dr. Tom Lüdde herzlich für die Möglichkeit, die experimentellen Arbeiten in ihrer Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie durchführen zu können.

Ein besonderer Dank gebührt Frau Dr. Sabine Stindt und Herrn Dr. Christian Ehling für ihre direkte Betreuung im Labor, ihre methodische Expertise und Einweisung sowie ihre stets offenen Ohren für jegliche Fragen.

Ich möchte auch allen Mitarbeitern der Experimentellen Hepatologie danken, insbesondere Frau Dr. Stefanie Wolf und Frau Marijana Suzanji, die mir stets weitergeholfen haben.

Herrn Dr. Jordan Feld von der Universität von Toronto danke ich herzlich dafür, dass er mir meinen Forschungsaufenthalt im Ausland ermöglicht hat. Dank seiner herausragenden Betreuung und finanziellen Unterstützung konnte ich meine Untersuchungen an humanen Serumproben deutlich vertiefen. Ebenfalls gebührt Herrn Dr. Atif Zahoor Dank für die herzliche Aufnahme und Betreuung im Labor in Toronto. Die wertvolle Erfahrung und die Zeit, die ich in Toronto verbringen durfte, schätze ich besonders.

Herzlichen Dank auch an Herrn Prof. Dr. Dr. Bertram Bengsch und Herrn Prof. Dr. Robert Thimme vom Universitätsklinikum Freiburg für die Bereitstellung von Serumproben geheimer HCV-Patienten.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. André Gömer und Herrn Dr. Richard Brown für ihre Auswertung meiner Gesamt-Transkriptom-Shotgun-Sequenzierung, die meine Promotionsergebnisse maßgeblich bereichert hat.

Abschließend möchte ich der Manchot Graduiertenschule (Molecules of Infection IV - MOI IV) für ihre finanzielle Unterstützung danken, ohne die meine Promotion nicht möglich gewesen wäre. Besonders bedanke ich mich für die Teilnahme an interessanten Veranstaltungen und den bereichernden Austausch mit anderen Stipendiaten sowie die Möglichkeit, im Ausland zu forschen und an internationalen Kongressen teilzunehmen. Diese Erfahrungen haben mich persönlich enorm bereichert.

10. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Tobias Hustedt
Geboren:	17.07.1992 in Achim
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Schulbildung

1998 – 2002	Grundschule Arbergen
2002 – 2009	Wilhelm-Olbers-Oberschule
2009 – 2013	Oberschule Kurt-Schumacher-Allee

Studium

2013 – 2017	Studium der Biologie an der Gottfried Wilhelm-Leibniz-Universität Hannover (Bachelor of Science) Bachelorarbeit zum Thema „Charakterisierung von Oberflächenantigenen bei <i>Mycoplasma mycoides</i> “
2017 – 2019	Studium der Medizinischen Biologie an der Universität Duisburg-Essen (Master of Science) Masterarbeit zum Thema „NDPK-vermittelte Regulierung von G-Protein-gekoppelten Signalwegen in HL1-Zellen.“

Promotion

2020 – 2024	Promotion zum Thema „Das Hepatitis C Virus reprogrammiert die Wirtszellenantwort auf inflammatorische Mediatoren durch Repression von endogenen Repressoren der NF- κ B-Signalübertragung und Hochregulierung von Komponenten des AP-1 Komplexes“ an der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf
-------------	--

11. Eidesstattliche Erklärung

Ich, Herr Tobias Hustedt versichere an Eides Statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Düsseldorf, den 16. Januar 2025

Tobias Hustedt