

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie

Leiter: Prof. Dr. med. S. Endres

Medizinische Klinik und Poliklinik IV

Klinikum Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

**Genetische Variabilität in Promotoren der RIG-I-like Helikasen:  
Auswirkungen auf den Verlauf einer Hepatitis-C-Virus-Infektion**

Dissertation

Zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

An der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Herman Colmsee

aus Itzehoe

2017

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Simon Rothenfusser

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Josef Eberle  
Prof. Dr. Norbert Grüner

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter: Dr. Andreas Schmidt

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard HICKEL

Tag der mündlichen Prüfung: 06.04.2017

## Inhaltsverzeichnis

---

1. Einleitung.....	1
1.1. Das humane Immunsystem .....	1
1.1.1. Die Unterscheidung von „Selbst “ und „Fremd “ .....	1
1.1.2. Angeborene und adaptive Immunität.....	2
1.1.3. Antigenerkennung der adaptiven Immunität.....	2
1.1.4. Antigenerkennung der angeborenen Immunität .....	3
1.1.5. Rezeptorfamilien der angeborenen Immunität.....	4
1.1.5.1. Die Familie der Toll-like Rezeptoren.....	4
1.1.5.2. Die Familie der RIG-I-like Helikasen (RLH) .....	5
1.1.6. Interferon als Effektormechanismus der angeborenen Immunität .....	7
1.1.6.1. Geschichte des Interferons .....	7
1.1.6.2. Typ I Interferone .....	8
1.1.6.3. Typ II Interferon .....	9
1.1.6.4. Typ III Interferone .....	10
1.2. Hepatitis C Virus Infektion.....	10
1.2.1. Geschichte der Virus-Hepatitis.....	10
1.2.2. Das Hepatitis C Virus .....	12
1.2.3. Genetische Heterogenität.....	13
1.2.4. HCV Genotypen .....	14
1.2.5. Interaktionen mit dem Wirt – Pathogenese der Lebererkrankung .....	15
1.2.5.1. Reaktionen der angeborenen Immunität auf das HCV .....	15
1.2.5.2. Evasionsmechanismen des HCV.....	16
1.3. Genetische Variation und Auswirkungen auf den Verlauf der HCV Infektion.....	17
1.3.1. Arten von Polymorphismen .....	18
1.3.2. Methoden der Assoziationsanalyse.....	19

1.3.2.1. Genomweite Assoziationsstudien .....	19
1.4. Fragestellung .....	20
2. Material und Methoden .....	23
2.1. Geräte, Verbrauchsmittel und Reagenzien .....	23
2.1.1. Geräte .....	23
2.1.2. Reagenziensätze.....	23
2.1.3. Chemikalien.....	23
2.1.4. Materialien für die Zellkultur .....	25
2.1.4.1. Zellkulturmedien, Puffer und Lösungen .....	25
2.1.5. Zellen, Nukleotide und Proteine .....	25
2.1.5.1. Zelllinien.....	25
2.1.5.2. DNA-Primer und –Templates.....	26
2.1.5.3. Plasmide .....	26
2.2. Zellulär-immunologische Methoden .....	27
2.2.1. Allgemeine Kulturbedingungen.....	27
2.2.2. Bestimmung der Zellzahl und Vitalität .....	28
2.2.3. Kultivierung von Zelllinien.....	28
2.2.4. Transiente Transfektion und Stimulation von Zellen.....	28
2.2.5. Transiente Transfektion von 1205Lu-Zellen .....	29
2.2.6. Luciferase-Assay: Allgemeine Funktionsprinzipien .....	29
2.2.6.1. Luciferase-Reporter-Assay: Durchführung.....	30
2.2.7. ELISA Assay .....	30
2.3. Molekularbiologische Methoden .....	31
2.3.1. Polymerase Kettenreaktion: Allgemeines Funktionsprinzip.....	31
2.3.1.1. Kolonien PCR .....	32
2.3.1.2. Zielgerichtete Mutagenese.....	32
2.3.1.3. Bakterienanzucht .....	33
2.3.1.4. Generierung hitzekompetenter Zellen.....	34

2.3.1.5.	Hitzeschock-Transformation .....	34
2.3.1.6.	Isolation von Plasmid-DNA .....	34
2.3.1.7.	Agarose-Gelelektrophorese .....	35
2.3.1.8.	Klonierung der Luciferasekonstrukte .....	35
2.3.2.	Vorbereitung der DNA-Proben für die Sequenzierung .....	36
2.3.3.	Sequenzierung .....	36
2.4.	<i>in silico</i> Analyse von Transkriptionsfaktorbindungsstellen in Promotoren .....	36
2.4.1.	Vorhersage von Transkriptionsfaktorbindungsstellen .....	36
2.5.	Studienpopulation .....	37
2.6.	Analyse der Sequenziererergebnisse .....	38
2.6.1.	Alignment der erhobenen Sequenzen an das entsprechende Referenzgenom 38	
2.6.2.	Filterung und Validierung .....	38
2.6.3.	Statistische Auswertung .....	38
3.	Ergebnisse .....	40
3.1.	Identifikation funktionsfähiger Promotorregionen in <i>RIG-I-like</i> Helikase Genen... 40	
3.2.	Charakterisierung von relevanten TF und ihrer Bindungsstellen für RIG-I..... 43	
3.2.1.	TF-Screen .....	46
3.2.2.	Foxo3a und RIG-I..... 47	
3.2.2.1.	Die durch IRF3 induzierte Aktivität des RIG-I Promotors wird durch den Transkriptionsfaktor Foxo3a inhibiert .....	47
3.2.2.2.	Die Überexpression von Foxo3a inhibiert die basale IP-10-Produktion, hat jedoch keinen wesentlichen Einfluss auf die durch VSV Infektion induzierte Menge an IP-10 49	
3.3.	Ergebnisse der genetischen Assoziationsstudie .....	51
3.3.1.	Demographische Charakteristika der Studienpopulation..... 51	
3.3.2.	Verlauf der Studie..... 52	
3.3.3.	Identifikation von Polymorphismen..... 53	
3.3.4.	Analyse der Genotypverteilungen in den beiden Untersuchungsgruppen..... 56	

3.3.5.	Assoziation der Polymorphismen mit den Untersuchungsgruppen .....	57
3.3.6.	Statistische Analyse der Assoziation von rs56309110 .....	59
3.4.	Auswirkungen von rs56309110 auf die Promotorfunktion.....	60
4.	Diskussion .....	62
4.1.	Zusammenfassung der experimentellen Befunde.....	62
4.2.	Betrachtung der Ergebnisse im Kontext aktueller Literatur.....	63
4.2.1.	Identifikation funktioneller Promotorregionen .....	63
4.2.1.1.	Identifikation beteiligter TF.....	65
4.2.1.2.	Regulation der RIG-I Expression durch Foxo3a .....	68
4.2.2.	Assoziation von genetischen Polymorphismen in RIG-I mit dem Verlauf einer HCV Infektion.....	69
4.2.3.	Die Bedeutung von trait-associated SNPs .....	71
4.2.4.	Einordnung der statistischen Signifikanz und der Effektstärke.....	71
4.2.5.	Funktionelle Auswirkungen von rs56309110 auf die Promotorfunktion .....	72
4.3.	Ausblick und klinische Relevanz der Ergebnisse .....	74
5.	Zusammenfassung.....	76



# 1. Einleitung

## 1.1. Das humane Immunsystem

### 1.1.1. Die Unterscheidung von „Selbst“ und „Fremd“

Die körperliche Unversehrtheit ist für jedes Lebewesen Grundlage des Überlebens auf einer geteilten Erde. Im Gegensatz zu anderen Arten muss der Mensch natürlich keine wirklichen Fressfeinde mehr fürchten, dennoch ist auch seine körperliche Unversehrtheit ein fragiler Zustand, der ständiger Überwachung bedarf. Sie wird durch eine Reihe von Mikroorganismen und Viren gefährdet, denen der Mensch ständig und überall begegnet. Er trägt sie auf der Haut und im Darm, atmet sie ein und gibt sie weiter. Viele davon sind ungefährlich oder apathogen, sie erfüllen sogar wichtige Funktionen für uns. Andere sind nur in bestimmten Situationen gefährlich, das heißt fakultativ pathogen, und wieder andere sind so gefährlich oder pathogen, dass ihre unkontrollierte Vermehrung im Körper für den Menschen tödlich sein kann. Auch körpereigene Zellen können sich verändern, sie können entarten. Die Folge kann ebenso eine unkontrollierte Vermehrung im Körper in Form eines Tumors sein, die auf ähnliche Weise wie ein Virus die Integrität des Organismus gefährdet.

Das Immunsystem soll uns vor genau diesen Gefahren schützen. Es muss in der Lage sein, fremde Zellen und Substanzen zu erkennen und deren Vermehrung zu verhindern. Ebenso muss es körpereigene Zellen erkennen und diejenigen ausschalten, die durch Virusinfektion verändert wurden oder entartet sind. Es muss dafür eine feine Unterscheidung in „Fremd“ und „Selbst“ leisten. In eleganter Weise fasste Charles Janeway diesen Sachverhalt bereits 1992 zusammen, indem er sagte: *„the immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self“* (Janeway, 1992).

### *1.1.2. Angeborene und adaptive Immunität*

Die Unterscheidung in „Fremd“ und „Selbst“ gelingt anhand einer ganzen Reihe von Rezeptoren, die so gestaltet sind, dass sie nur beim Zusammentreffen mit einem fremden Molekül ein Signal auslösen. Beim Zusammentreffen mit einem körpereigenen Molekül wird das Signal nicht ausgelöst.

Diese Rezeptoren müssen demnach auf eine unendliche Vielfalt an körperfremden Substanzen spezifisch reagieren. Dafür sind uns zwei grundlegende Mechanismen bekannt, nach denen das humane Immunsystem modellhaft in das angeborene und adaptive Immunsystem aufgeteilt wird.

### *1.1.3. Antigenerkennung der adaptiven Immunität*

Die Pathogen-Erkennung des adaptiven Immunsystems funktioniert nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip. Für jedes von außen in den Körper eindringende Pathogen (Schlüssel) gibt es im Körper einen Rezeptor (Schloss), der es spezifisch erkennt. Diese Rezeptoren kommen sowohl in löslicher Form vor als auch zellgebunden an den Effektorzellen der adaptiven Immunität, den B- und T- Zellen. Der Kontakt zu einem passenden Antigen führt dazu, dass diese Zellen klonal expandieren. Das heißt, sie vermehren sich stark, wodurch innerhalb weniger Tage eine große Zahl spezifisch gegen ein Antigen gerichteter Zellklone entsteht. Ein kleiner Teil dieser Zellklone persistiert auch nach Abklingen der Immunreaktion als sogenannte Gedächtniszellen. Sie ermöglichen dem Körper bei einem erneuten Kontakt noch schneller gegen das Pathogen aktiv zu werden und vermitteln damit die Langzeitimmunität.

Damit der beschriebene Erkennungsmechanismus funktioniert, bedarf es einer riesigen Anzahl verschiedener Rezeptoren, die die Gesamtzahl unserer Gene bei weitem übersteigt. Daher ist es nicht verwunderlich, dass dieser Erkennungsmechanismus nicht in der Keimbahn weitervererbt wird, sondern in jedem Individuum während der T- und B-Zell Entwicklung von neuem entsteht. Jeder dieser Rezeptoren erhält einen individuellen Bauplan, indem in einem ersten Schritt unterschiedliche Gensegmente verschiedenartig rearrangiert und kombiniert, und in einem weiteren Schritt einzelne Nukleotide dieser Segmente

mutiert oder hinzugefügt werden. Man schätzt, dass jeder Mensch im Laufe seines Lebens durch diesen Mechanismus etwa  $10^{14}$  bis  $10^{18}$  unterschiedliche Rezeptoren generiert, von denen lediglich „nützliche“, also Antigen-erkennende Rezeptoren, persistieren.

#### *1.1.4. Antigenerkennung der angeborenen Immunität*

Das System der angeborenen Immunität ist phylogenetisch deutlich älter. Man vermutet, dass jedes mehrzellige Lebewesen bereits über Komponenten eines keimbahnkodierten Abwehrsystems verfügt. Sogar in Pflanzen wurden Rezeptoren gefunden, die zur Erkennung von Bakterien das gleiche Prinzip wie ihre humanen Analoga verwenden (Ronald & Shirasu, 2012).

Dieses Prinzip muss folgendes Dilemma lösen: Es muss eine spezifische Erkennung einer riesigen Vielzahl unterschiedlicher Pathogene ermöglichen und darf sich dafür lediglich einer äußerst beschränkten Zahl von Genen bedienen. Von den geschätzten 21 000 Genen haben vermutlich nur einige hundert Gene einen direkten Bezug zum Immunsystem.

Diesem Ungleichgewicht begegnet das Immunsystem mit dem Prinzip der Mustererkennung. Es beruht auf einer begrenzten Anzahl von Mustererkennungsrezeptoren (PRR), die einige besondere mikrobielle Strukturen erkennen. Diese Strukturen sind in der Regel Moleküle, die für das Pathogen einen essentiellen Überlebensvorteil darstellen. Sie sind trotz des hohen Selektionsdrucks hochkonserviert und kommen in unterschiedlichen Erregern vor. Darüber hinaus sind es Strukturen, die vom eigenen Organismus nicht kodiert werden. Die Erkennung ist daher pathogen-spezifisch. Dabei sind als weitere Diskriminierungsqualitäten auch der Ort der Präsentation der pathogenen Muster sowie deren Menge von wichtiger Bedeutung.

Im Gegensatz zu den Rezeptoren des adaptiven Immunsystems kommen die PRR nicht nur in T- und B-Zellen vor, sondern auch in Makrophagen, Monozyten, dendritischen Zellen (DC) und vielen anderen Zelltypen. Die Antwort dieser Rezeptoren auf einen Reiz erfolgt unmittelbar und ist nicht von klonaler Expansion abhängig. Dadurch kann das angeborene Immunsystem

bereits in einer früheren Phase der Infektion, direkt nach dem ersten Pathogenkontakt, seine Wirkung entfalten. Es hat daher eine Initiator- und Aktivator-Funktion.

### *1.1.5. Rezeptorfamilien der angeborenen Immunität*

#### *1.1.5.1. Die Familie der Toll-like Rezeptoren*

Das Konzept der PRR wurde bereits 1989 von Charles Janeway postuliert. Es dauerte jedoch bis zum Jahr 1996 bis in *Drosophila* ein Protein „Toll“ beschrieben wurde, das eine entscheidende Rolle in der Immunantwort gegen den Pilz *Aspergillus fumigatus* spielt (Lemaitre, Nicolas, Michaut, Reichhart, & Hoffmann, 1996). Daraufhin wurde auch in Säugern ein Toll-Homolog gefunden, das heute als Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) bezeichnet wird (Medzhitov, Preston-Hurlburt, & Janeway, 1997). Das Protein ist ein zellulärer Rezeptor und erkennt Lipopolysaccharide (LPS) in der Zellwand gram-negativer Bakterien und vermittelt daraufhin eine entzündliche Sofortantwort (Poltorak et al., 1998). In der Folge wurden weitere Mitglieder der Toll-Familie identifiziert: TLR2 und TLR1 wurden als Rezeptoren für Triacyl- und Diacyl-Lipopetide (Bestandteil der Zellwand gram-positiver Erreger) beschrieben, während TLR3, TLR7 und TLR8 die Erkennung viraler RNA vermitteln. TLR5 erkennt bakterielles Flagellin und TLR9 wird durch unmethylierte CpG DNA-Motive stimuliert, die sowohl in Viren als auch in Bakterien vorkommen. Für TLR10 konnte bisher kein Ligand gefunden werden. Die Rolle von TLR11 ist im Menschen unklar, denn sein Gen enthält ein Stopp-Codon und kodiert für ein nicht funktionelles Produkt.

Als Teil der Interleukin1-Rezeptorfamilie (IL-1R) sind Toll-like Rezeptoren Transmembranproteine mit einer *leucin-rich repeatdomain* (LRR), einer einzelnen Transmembrandomäne und einer zytoplasmatischen Signaldomäne. Diese wird Toll/Interleukin1 Rezeptor-Domäne (TIR) genannt und tritt mit intrazellulären Interaktionspartnern in Wechselwirkung. Nach der Assoziation mit Adapterproteinen kommt es zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie

NF- $\kappa$ B, IRF3, IRF7 und AP1, die die Expression antimikrobieller Effektormoleküle induzieren.

#### 1.1.5.2. Die Familie der RIG-I-like Helikasen (RLH)

Die TLR 3, 7 und 8 sind sehr effektiv in der Induktion einer Immunantwort im Rahmen von Virusinfektionen. Da sie jedoch wie alle TLRs als Transmembranproteine Liganden nur extrazellulär sowie im Inneren von Endosomen detektieren können, gibt es eine weitere Gruppe von Rezeptoren. Diese können Viren erkennen, die bereits in das Zytoplasma der Zelle vordringen konnten und sich dort vermehren.

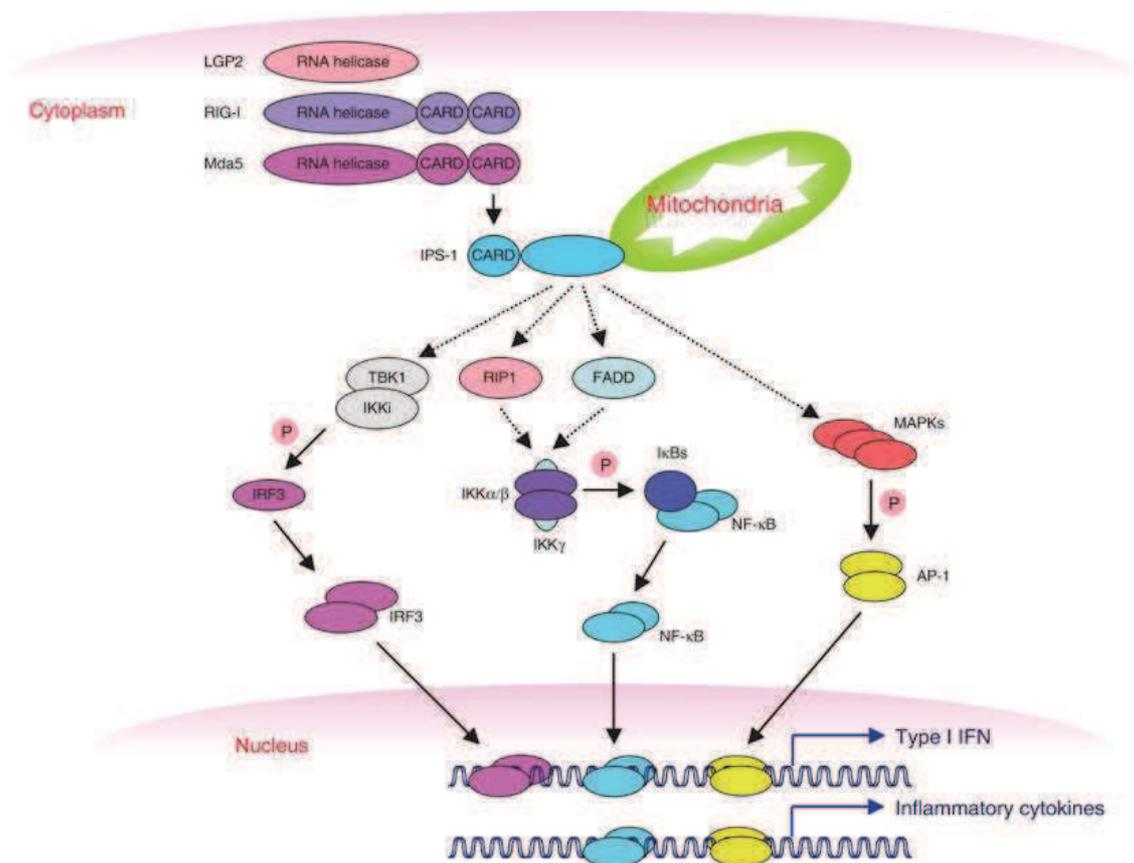
2004 gelang es, den ersten Vertreter dieser Familie von intrazellulären RNA-Rezeptoren zu charakterisieren (Yoneyama et al., 2004). *Retinoic acid inducible gene 1* (RIG-I) wurde als Schlüsselprotein der antiviralen Abwehr erkannt und seine Rolle als positiver Regulator der Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und IRF3 beschrieben. RIG-I enthält eine C-terminale DExD/H Box Helikase Domäne, die mit viraler RNA in Wechselwirkung tritt und zwei N-terminale *caspase activation and recruitment domains* (CARD), die mit Proteinen der Signaltransduktion interagieren. Die molekulare Signatur, anhand derer RIG-I replizierende Viren innerhalb der Zelle erkennt und die Aktivierung des Signalwegs auslöst, ist ein Triphosphat am 5'Ende einer doppelsträngigen RNA (Hornung et al., 2006).

Kurz darauf wurde MDA5 als zweites Mitglied der RLH Familie gefunden (Kang et al., 2002; Kato et al., 2006; Yoneyama et al., 2005). MDA5 verfügt über eine große strukturelle Ähnlichkeit mit RIG-I und interagiert ebenso wie RIG-I über eine CARD-CARD Interaktion mit dem *Mitochondrial antiviral-signaling protein* (MAVS), das im selben Jahr erstmals charakterisiert wurde (Kawai et al., 2005; Meylan et al., 2005; Xu et al., 2005). Es wird angenommen, dass längere doppelsträngige virale RNA von MDA5 erkannt wird. Eine spezifischere molekulare Erkennungsstruktur konnte für MDA5 noch nicht nachgewiesen werden.

MAVS enthält neben der CARD am C-Terminus eine hydrophobe Transmembrandomäne. Diese vermittelt die Lokalisation von MAVS in der äußeren Membran der Mitochondrien, nur dort ist es funktionell. Es interagiert

mit dem *TNF receptor-associated factor 3* (TRAF3) und aktiviert dadurch die TANK-binding kinase 1 (TBK1) und *I $\kappa$ B kinase komplex* (IKKi). Dieser Komplex phosphoryliert die Transkriptionsfaktoren IRF3 und IRF7 und induziert damit eine Typ-I Interferon Antwort (Seth, Sun, Ea, & Chen, 2005). Die weiteren Signalwege unterhalb von MAVS werden in Abb.1 schematisch dargestellt.

Neben RIG-I und MDA5 hat die Familie der RLH mit LGP2 ein drittes Mitglied. LGP2 hat jedoch keine CARD und wurde daher zunächst als Negativ-Regulator von RIG-I beschrieben (Rothenfusser et al., 2005). Später wurde ebenso eine Rolle als Positiv-Regulator von MDA5 und RIG-I postuliert (Sato et al., 2010). Letztlich bleibt die Funktion von LGP2 noch ungeklärt.



**Abb.1 RIG-I und MDA5 vermittelte Signalwege aus(Kawai & Akira, 2006)**

Nach Aktivierung von RIG-I und MDA5 werden über MAVS sowohl IRF3 und IRF7 über TBK1 und IKKe als auch NF- $\kappa$ B über RIP1, FADD und AP-1 über den MAP-Kinase Signalweg aktiviert. Außerdem induziert die MAVS-Aktivierung Apoptose (nicht gezeigt).

## 1.1.6. Interferon als Effektormechanismus der angeborenen Immunität

### 1.1.6.1. Geschichte des Interferons

Die Entdeckung sowie das Verständnis der zellulären Mechanismen und des therapeutischen Nutzens von Interferonen waren eine der bedeutendsten Fortschritte der Biomedizin im Laufe der vergangenen 50 Jahre. Die Familie der Interferone besteht aus wenigen, sezernierten Proteinen, die durch die Aktivierung intrazellulärer und interzellulärer Netzwerke die Resistenz gegenüber Viren fördern, angeborene und adaptive Immunantworten verstärken sowie entscheidenden Einfluss auf das Überleben und Sterben von normalen und tumorös entarteten Zellen haben. Bereits kurz nach der Entdeckung im Jahre 1957 (Isaacs & Lindenmann, 1957; Isaacs, Lindenmann, & Valentine, 1957) wurde ihnen die entscheidende Bedeutung bei der Behinderung der viralen Replikation zugesprochen und dafür der Name Interferon verliehen. Ihr phylogenetischer Ursprung ist alt. Interferone kommen in allen untersuchten Wirbeltieren vor.

Dennoch dauerte es bis in die 80er Jahre bis die wissenschaftlichen Fortschritte klinisch genutzt werden konnten. In dieser Zeit gelang es erstmals cDNA von humanem IFN zu klonieren (Taniguchi, Ohno, Fujii-Kuriyama, & Muramatsu, 1980). Es zeigten sich Erfolge in der Bekämpfung chronischer viraler Infektionen mit Interferon- $\alpha$  sowie in der Therapie der Multiplen Sklerose mit Interferon- $\beta$  (Jacobs, O'Malley, Freeman, & Ekes, 1981; Knobler et al., 1984). Die 90er Jahre waren geprägt von einer Ausbreitung der klinischen Zulassungen und Anwendungen, gepaart mit einem tiefergehenden Verständnis über die molekularen Grundlagen der biologischen Wirksamkeit. Aktuelle Forschungen bekräftigen die Rolle der Interferone als wichtige Basis des angeborenen Immunsystems. Dabei stehen vier Punkte im Vordergrund:

- Die Mechanismen, die die IFN-Produktion induzieren (TLR-, RLH-Signalwege).
- Die Funktion der einzelnen ISGs (*interferon stimulated genes*), die als Effektormechanismen der Interferonwirkung dienen.
- Evasionsmechanismen, die von Viren verwendet werden, um der potenten IFN-Antwort zu entkommen.

- Der Zusammenhang zwischen Mutationen, Suppression von Genen des IFN-Systems und der Entstehung von malignen Zellen bei Krebserkrankungen sowie der Entstehung einer nachhaltigen antiviralen Antwort bei Virusinfektionen.

Auf der Basis ihrer Gensequenz, ihrer chromosomalen Position und ihrer Rezeptorspezifität wurden die Interferone in drei Klassen eingeteilt. Die menschlichen Typ I Interferone wurden zuerst entdeckt und sind eine relativ große Gruppe verwandter Proteine. Sie liegen auf dem kurzen Arm des Chromosoms 9. Von den Typ II Interferonen ist nur ein einziges bekannt. Es ist auf Chromosom 12 kodiert und wurde 1965 erstmals beschrieben (Wheelock & Sibley, 1965). Die „jüngste“ Gruppe sind die Typ III Interferone. Sie besteht aus drei Vertretern, die erst vor zehn Jahren entdeckt wurden und auf Chromosom 19 lokalisiert sind (Sheppard et al., 2003).

#### 1.1.6.2. *Typ I Interferone*

Die Gruppe der Typ I Interferone präsentiert sich heterogen. Sie beinhaltet im Menschen 13 verwandte Formen des IFN- $\alpha$  und jeweils eine Form des IFN- $\beta$ , IFN- $\kappa$ , IFN- $\epsilon$  und IFN- $\omega$ . Für das Immunsystem sind jedoch zum jetzigen Stand lediglich IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$  von besonderer Bedeutung. Sie vermitteln vor allem die antivirale Immunität. Ihre Wirkung wird über einen membranständigen, heterodimeren Rezeptor in die Zelle geleitet, der ubiquitär exprimiert wird und sich aus den Ketten IFN- $\alpha$ R1 und IFN- $\alpha$ R2 zusammensetzt (Darnell, Kerr, & Stark, 1994). Nach der Aktivierung wurde in *microarray*-Experimenten gezeigt, dass es zur Regulation von mehreren hundert Effektorgenen (ISGs) kommt (Der, Zhou, Williams, & Silverman, 1998). Welche dieser Gene nun für Proteine kodieren, die maßgeblich an der Immunantwort beteiligt sind und wie die Mechanismen dahinter sind, konnte bisher nur in Einzelfällen geklärt werden.

Die Proteinkinase R (PKR) ist zum Beispiel ein IFN-induziertes Effektorprotein, für das eine wichtige Funktion in der viralen Abwehr etabliert werden konnte. Sie phosphoryliert unter anderem den Translationsfaktor EIF2A (Samuel, 1979) und inhibiert dadurch virale mRNA-Translation und Proteinsynthese. Darüberhinaus verstärkt sie das NF- $\kappa$ B Signal durch Phosphorylierung von I $\kappa$ B

(A. Kumar, Haque, Lacoste, Hiscott, & Williams, 1994) und induziert auf unterschiedlichen Wegen Apoptose.

Auch posttranskriptionelle RNA-Modifikationen können einen effektiven Weg darstellen, mit viraler Replikation zu interferieren. Die dsDNA-spezifische Adenosin Desaminase ADAR1 ist ein IFN-induziertes Protein, für das diese Funktion nachgewiesen werden konnte (George & Samuel, 1999).

Darüber hinaus haben IFN- $\alpha/\beta$  wichtige Effekte auf Zellen des adaptiven Immunsystems und schlagen darüber eine Brücke von initialer, direkter, antiviraler Aktivität, zu spezifischer, langsamerer und langanhaltender antiviraler Immunität. So verhindern sie zum Beispiel die Apoptose aktivierter T-Zellen (Marrack, Kappler, & Mitchell, 1999), begünstigen die Antikörperproduktion von Plasmazellen (Le Bon et al., 2001) und fördern die Proliferation von Gedächtnis-T-Zellen (Zhang, Sun, Hwang, Tough, & Sprent, 1998). Unterschiedliche Formen von pegyliertem IFN- $\alpha$  sind als Therapeutikum für sowohl chronische Viruserkrankungen als auch einige maligne Erkrankungen zugelassen. Allerdings ist diese Therapie mit erheblichen Nebenwirkungen behaftet und bringt eine große Belastung für die Patienten mit sich.

#### 1.1.6.3. *Typ II Interferon*

IFN- $\gamma$  ist das einzige Typ II Interferon. Seinem früheren Namen „Immuninterferon“ wird es insofern gerecht, als dass es durch aktivierte T-Zellen und NK-Zellen gebildet wird (Biron, 1997). Es bindet an einen spezifischen Rezeptor, der sich aus den Untereinheiten IFN- $\gamma$ R1 und IFN- $\gamma$ R2 zusammensetzt und in einer Reihe von Zellen des Immunsystems (B-Zellen, Makrophagen, Monozyten), aber auch Epithelzellen und Fibroblasten exprimiert wird (Valente et al., 1992). IFN- $\gamma$  induziert darüber wichtige immunregulatorische Funktionen, von denen die Makrophagen-aktivierenden Eigenschaften, der Einfluss auf die MHC-Gene, die antiproliferativen Eigenschaften und der Einfluss auf die Differenzierung von T-Helferzellen (Th1-Immunantwort) im Vordergrund stehen.

#### 1.1.6.4. *Typ III Interferone*

IFN- $\lambda$ 1 (IL-29), IFN- $\lambda$ 2 (IL-28A), IFN- $\lambda$ 3 (IL-28B) und IFN- $\lambda$ 4 sind die vier bisher beschriebenen Typ III Interferone. Ihr Rezeptor besteht ebenfalls aus zwei Untereinheiten, der IFN- $\lambda$ -spezifischen IFN- $\lambda$ R1-Kette, die selektiv in epithelialen Zellen exprimiert wird und der ubiquitär exprimierten IL-10R $\beta$ -Kette, die gleichzeitig als Rezeptor für IL-10, IL-22 und IL-26 fungiert (Uze & Monneron, 2007). Die Funktion der Typ III Interferone ist noch nicht abschließend geklärt. Bislang wird vermutet, dass sie einen ähnlichen Effekt wie die Typ I Interferone haben und ebenso vorrangig an der antiviralen Immunität beteiligt sind. Durch das selektive Expressionsmuster des Rezeptors ist ihre Wirksamkeit jedoch auf bestimmte epitheliale Zellverbände begrenzt und dadurch spezifischer. Die Vermutung liegt daher nahe, dass die therapeutische Applikation nebenwirkungsärmer sein könnte, als die Therapie mit IFN- $\alpha$  (Donnelly, Dickensheets, & O'Brien, 2011). Es gibt jedoch bisher weder dafür, noch für die generelle Wirksamkeit als Therapeutikum ausreichende Evidenz.

## 1.2. **Hepatitis C Virus Infektion**

### 1.2.1. *Geschichte der Virus-Hepatitis*

Obwohl das Verständnis der viralen Hepatitis erst innerhalb der letzten vier Jahrzehnte wesentlich zugenommen hat, ist die Hepatitis kein neues Problem. Erste Beschreibungen der Gelbsucht tauchen bereits im babylonischen Talmud und in den Schriften des Hippokrates einige Jahrhunderte vor Christus auf. Hinweise auf eine infektiöse Genese der Gelbsucht lassen sich ebenso bereits in vorchristlichen Schriften finden. Diese bezogen sich jedoch auf eine enterale Transmission und sind aus heutiger Sicht wahrscheinlich auf die Hepatitis A bezogen.

Erst als nach der Entwicklung der Pocken-Impfung eine in diesem Zusammenhang epidemische Gelbsucht auftrat, wurde die perkutane Transmission als Übertragungsweg einer viralen Hepatitis entdeckt. Die erste „bahnbrechende“ Veröffentlichung dazu stammt von dem Bremer Arzt Dr.

Lurman in der Berliner klinischen Wochenschrift von 1885. Er hatte bei 191 Mitarbeitern eines Schiffsfriedhofs nach Pockenimpfung eine Gelbsucht beobachtet.

Es brauchte jedoch bis in das Jahr 1958, bis diese klinischen Beobachtungen von Saul Krugmann und Robert Ward in New York experimentell bestätigt werden konnten. Sie trugen die Erkenntnisse über die enteral und die parenteral übertragene endemische Leberentzündung zusammen und definierten eine bis heute gültige Unterscheidung in eine „*serum hepatitis*“ und eine „*enteral hepatitis*“ (Ward, Krugman, Giles, Jacobs, & Bodansky, 1958).

In den darauffolgenden Jahren konnten dann sowohl für die enterale Hepatitis (Feinstone, Kapikian, & Purceli, 1973), wie auch die parenterale Hepatitis (Dane, Cameron, & Briggs, 1970) Erreger gefunden werden. Sie wurden Hepatitis A Virus und Hepatitis B Virus genannt. Leider wurde bereits kurz danach augenscheinlich, dass die Entdeckung dieser beiden Erreger keine abschließende Erklärung für endemische Leberentzündungen lieferte. Denn bereits 1975 stellte man fest, dass sogar die Mehrzahl der Fälle infektiöser Hepatitiden durch keinen der beiden Erreger erklärt werden konnte (Feinstone, Kapikian, Purcell, Alter, & Holland, 1975).

Es musste also eine weitere Virusentität existieren. Sie wurde „nicht-A, nicht-B-Hepatitis“ getauft. Von ihr war anfänglich nicht viel mehr bekannt, als dass auch sie beim Menschen durch Bluttransfusion übertragen werden konnte. Für die schlussendliche Entdeckung des Erregers bedurfte es dann weiterer 15 Jahre und neuerer molekularbiologischer Methoden. Erst 1989 gelang damit die Entdeckung eines Virus, das die Fälle von „nicht-A, nicht-B-Hepatitis“ erklären konnte. Es wurde Hepatitis C genannt (Alter et al., 1989).

Heute gehört das Hepatitis C Virus (HCV) zu den am weitesten verbreiteten Infektionen weltweit. Die Erkrankung betrifft aktuell etwa 200 Millionen Menschen und ist damit etwa fünfmal so häufig wie HIV. Als einer der Hauptrisikofaktoren für chronische Lebererkrankungen, wie Leberzirrhose oder das hepatozelluläre Karzinom, ist es in der westlichen Welt auch die Hauptursache für Lebertransplantationen. Entgegen dem Trend vieler anderer ehemals bedrohlicher Infektionserkrankungen, konnte für HCV auf dem Gebiet

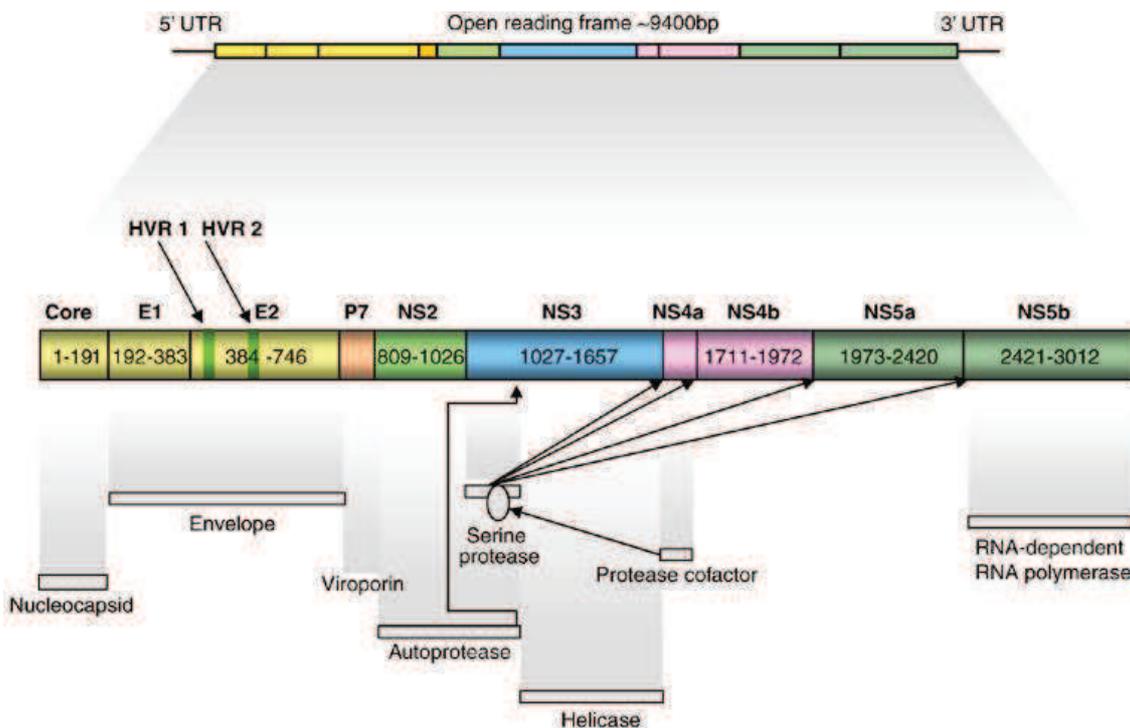
der Prävention noch kein wesentlicher Fortschritt gemacht werden. So gibt es immer noch keine effektive Vakzine und erst seit kurzem spezifische Therapiestrategien. Die bis vor zwei Jahren gültige Therapieempfehlung bestand demnach schon seit 1998 unverändert in der Gabe von pegyliertem IFN- $\alpha$  in Kombination mit Ribavirin.

In den letzten Jahren wurden enorme Anstrengungen unternommen, um die Erforschung der sogenannten „*direct-acting antiviral agents*“ (DAA) voranzutreiben. Dies sind Moleküle, die ganz spezifisch virale Proteinstrukturen angreifen, um so die Virusreplikation nebenwirkungsarm zu inhibieren. Seit 2011 wurden einige dieser Moleküle als Therapeutikum zugelassen. Es handelt sich dabei um NS3/4A-Protease-Inhibitoren (Telaprevir, Boceprevir und Simeprevir) sowie NS5A und B Polymerase Inhibitoren (Sofosbuvir). Die Zulassung galt dabei zunächst für die Kombination mit pegyliertem IFN- $\alpha$  und Ribavirin. Inzwischen werden für die Behandlung der chronischen Hepatitis C-Infektion IFN-freie Therapie-Regimes, bestehend aus einer Kombination mehrerer DAAs, empfohlen. Diese zeigen bei geringem Nebenwirkungsprofil und durchweg oraler Applikation hohe Ansprechraten und erreichen bei der Mehrzahl der Patienten eine dauerhafte Elimination des Virus.

### *1.2.2. Das Hepatitis C Virus*

HCV ist Mitglied der Familie der Flaviviridae. Sein Genom liegt innerhalb eines Nukleokapsids, das von einer Hülle verpackt ist. Die Hülle besteht aus einer Wirtsmembran, in die virale Glykoproteine integriert sind. In der Elektronenmikroskopie erscheinen die Viren als sphärische, 50 nm-große Partikel (Kaito et al., 1994).

Das HCV ist ein einzelsträngiges RNA-Virus mit positiver Polarität (ss(+)-RNA). Sein Genom umfasst 9,6kb mit einer hochkonservierten 5'UTR, einem einzigen langen *open reading frame* (ORF) mit ca. 9kb und einer 3'UTR. Der ORF kodiert ein Vorläuferprotein mit etwa 3000 Aminosäuren, das von sowohl viralen als auch zellulären Proteasen zu zehn verschiedenen Polypeptiden gespalten wird (Grakoui, McCourt, Wychowski, Feinstone, & Rice, 1993; Grakoui, Wychowski, Lin, Feinstone, & Rice, 1993).



**Abb.2 HCV Genom und Proteinom (Lloyd et al., 2007)**

Die Abbildung zeigt das HCV Genom sowie das aus dem ORF abgeschriebene Vorläuferprotein, aus dem die zehn HCV-Proteine entstehen.

Die Peptide lassen sich zwei Gruppen zuordnen, die ebenso Grundlage der Benennung sind. Die strukturellen Proteine der Virushülle heißen E1 und E2 und beinhalten zwei hypervariable Regionen (HVR1 und HVR2). Die nicht-strukturellen Proteine (NS) sind von 2-5 durchnummeriert (Lauer & Walker, 2001). Ihre Funktionen sind nur teilweise aufgeklärt. Sie dienen unter anderem der Interaktion mit dem Wirtsorganismus und beeinflussen dessen Immunsystem. Hierauf wird im Kapitel 1.2.5.2. noch näher eingegangen.

### 1.2.3. Genetische Heterogenität

Die HCV RNA-Polymerase ist sehr fehleranfällig, da sie keine Korrekturlesefunktion besitzt. Die Mutationsrate wird auf etwa  $10^{-2}$  bis  $10^{-3}$  Einzelnukleotid-Substitutionen pro Stelle und Jahr geschätzt (Ogata, Alter, Miller, & Purcell, 1991). Mutationen sind damit etwa 100 000 bis 1 000 000 Mal häufiger als beim Menschen. Daraus entsteht eine sehr heterogene Population von Viren. Viele davon sind nicht reproduktionsfähig und letal, andere wiederum erhöhen die

Anfälligkeit für das Immunsystem des Wirts und werden dadurch aussortiert. Bei einigen kommt es lediglich zu stillen Mutationen. Es gibt jedoch auch solche Mutationen, die einen Vorteil für das Überleben des Virus erzeugen, positiv selektioniert werden und somit neue Populationen begründen.

#### *1.2.4. HCV Genotypen*

Für gewöhnlich unterscheidet man unterschiedliche Isolate eines Virus nach dem Grad ihrer genetischen Verwandtschaft (Genotyp), oder seltener nach ihrer Reaktivität gegenüber bestimmten Antikörpern (Serotyp). Die offensichtlich große genetische Vielfalt der HCV ließ vermuten, dass sich im Laufe der Entwicklung unterschiedliche Genotypen ausgebildet hätten. Diese Theorie konnte bestätigt werden, nachdem etliche Isolate hinsichtlich ihrer genetischen Übereinstimmung analysiert wurden. Man fand eine deutlich diskontinuierliche Verteilung in der genomischen Heterogenität, sodass sich eine Verteilung in Genotypen und Subtypen etablieren ließ (Simmonds, 2001). Isolate innerhalb eines Genotyps haben eine Sequenzhomologie von ca. 80 %, in hochkonservierten Bereichen sogar 90 %. Isolate eines anderen Genotyps haben hingegen Sequenzhomologien von 55 % respektive 70 %. Im Vergleich zu anderen Flaviviridae ist dies ein typischer Wert (Chambers, Hahn, Galler, & Rice, 1990).

Genotyp 1 ist mit 40-80 % der häufigste Genotyp und hat eine weltweite Verbreitung. In Europa ist der Subtyp 1b häufiger als Subtyp 1a. Genotyp 2 ist ebenfalls weltweit verbreitet, verursacht jedoch nur 10-40 % der Infektionen. Die Genotypen 3-6 lassen sich relativ klar örtlich lokalisieren. Ihre phylogenetische Distanz zu den Genotypen 1 und 2 ist weiter und sie zeichnen sich durch eine breitere Divergenz innerhalb des Genotyps aus. Dies lässt die Annahme zu, dass sie sich unabhängig voneinander auf unterschiedlichen Kontinenten vor etwa 500-2000 Jahren entwickelt haben. Indes sind die häufigeren Genotypen voraussichtlich erst vor 50-300 Jahren entstanden und haben sich durch Völkerwanderung weltweit verbreitet (Simmonds & Smith, 1997; Smith et al., 1997).

### 1.2.5. Interaktionen mit dem Wirt – Pathogenese der Lebererkrankung

Der Ausgang der Infektion sowie die klinische Präsentation im akuten und im chronischen Stadium sind extrem variabel. Dies liegt daran, dass die Interaktion zwischen Virus und Wirt auf einem komplexen Zusammenspiel multipler Faktoren beruht. Auf Seiten des Virus stehen die Replikationseffizienz, die Expression viraler Proteine, der Genotyp, die Immunreaktivität der Proteine und nicht zuletzt die direkte Leberzellschädigung. Auf der Wirtsseite spielen sowohl die Komponenten des angeborenen Immunsystems als auch Faktoren der adaptiven Immunität, mit humoraler und zellulärer Abwehr, entscheidende Rollen. Natürlich dürfen auch andere Faktoren, wie zum Beispiel der Alkoholkonsum des Wirts oder eine Immunsuppression nicht außer Acht gelassen werden.

#### 1.2.5.1. Reaktionen der angeborenen Immunität auf das HCV

Nach der Infektion des Wirtsorganismus produziert die virale Replikation ca.  $10^{12}$  Virionen pro Tag. Durch diese hohe Viruslast wird das angeborene Immunsystem bereits in der frühen Infektionsphase aktiviert. Die Infektion von Schimpansen ergab, dass sich bereits bei der ersten Leberbiopsie nach fünf Wochen ein Typ-I IFN-typisches Expressionsprofil zeigte (A. I. Su et al., 2002). Darüberhinaus konnte *in vitro* und *in vivo* eine PRR-abhängige IFN-Antwort nach Stimulation mit HCV RNA beobachtet werden (Saito, Owen, Jiang, Marcotrigiano, & Gale, 2008).

Welche PRR im Einzelnen für die Erkennung von HCV verantwortlich sind, ist nicht vollständig geklärt. Zumindest in Hepatozyten ist eine Abhängigkeit von RIG-I höchstwahrscheinlich, denn in diesen Zellen fehlt die IFN-Antwort nach Ausknocken von RIG-I (Sumpter et al., 2005). Auch in biochemischen Studien wurde die Bindung von nicht-kodierenden Regionen (NCR) der HCV RNA an die Erkennungsdomäne von RIG-I und LGP2, nicht jedoch von MDA5, gezeigt (Saito et al., 2007). Die NCR der HCV RNA verfügen über doppelsträngige Abschnitte sowie ein *Cap*-freies Triphosphat am 5'Ende. Detaillierte Studien der Ligandenbindung konnten diese Strukturen als wichtige Merkmale der HCV Erkennung durch RLH ausmachen (Saito et al., 2008; Uzri & Gehrke, 2009).

Die Produktion von IFN hat autokrine und parakrine Wirkungen und führt zur Stimulation der danach benannten ISG. Deren Effektormechanismen sind vielfältig und nur rudimentär aufgeklärt. Speziell für die Inhibition der HCV Replikation konnte eine Rolle für die PKR und das ISG P56 beschrieben werden, die über die Phosphorylierung von Translationsfaktoren vermittelt wird (Wang et al., 2003). Auch für das IFN-induzierte Effektorprotein ADAR1 ist der Mechanismus bekannt: Es desaminiert HCV Replicon RNA und führt so zu einer Destabilisierung der viralen RNA (Taylor, Puig, Darnell, Mihalik, & Feinstone, 2005).

2011 erschien eine Studie, in der versucht wurde, systematisch diejenigen Gene zu finden, die besonders wichtig für die Hemmung der Virusreplikation sind. Darin wurden 380 ISG überexprimiert und die Veränderung der HCV Replikation gemessen. Es zeigte sich, dass die Überexpression einzelner ISG die Replikation im Mittel um 20 % hemmt. Es gab jedoch fünf Gene, die von der Normalverteilung deutlich abwichen, weil sie die Virusreplikation um 60-80 % hemmten. Dabei handelte es sich um die Gene von RIG-I, MDA5, IRF1, IRF2 und IRF7 (Schoggins et al., 2011).

#### 1.2.5.2. *Evasionsmechanismen des HCV*

HCV entgeht der Elimination, indem es das angeborene Immunsystem an unterschiedlichen Stellen empfindlich stört. Dies erfolgt zum Einen bereits *upstream* der IFN-Produktion, zum Anderen werden auch die Übertragung des IFN-Signals auf Effektorzellen inhibiert sowie die antiviralen Aktivitäten einzelner ISG unterbunden. In Tabelle 1 sind bekannte Mechanismen zusammengefasst, mit denen das HCV Immunmechanismen seines Wirts umgeht.

HCV Komponente	Effekt auf antivirale Antwort des Wirts
E2	Inhibiert die PKR (Taylor, Shi, Romano, Barber, & Lai, 1999)
Core-Protein	Dysreguliert Lymphozyten über SOCS-1 (Yao, Prayther, Trabue, Dong, & Moorman, 2008) Behindert die IRF Aktivierung über DDX3 (Schroder, Baran, & Bowie, 2008)
NS3/4A Protease	Inhibiert IRF3 Aktivierung durch TLR und RLH (Li et al., 2005)
NS5a	Inhibiert die PKR und IRF1 (Gale et al., 1998) Senkt die IFN Sensitivität (Taguchi et al., 2004)
NS2	Inhibiert den IKK $\epsilon$ /TBK1 Kinase Komplex (Kaukinen, Sillanpaa, Nousiainen, Melen, & Julkunen, 2013)
NS4B	Inhibiert STING (Nitta et al., 2013)

### **Tabelle 1 Evasionsmechanismen des HCV**

Die Tabelle zeigt die bisher beschriebenen Funktionen der einzelnen Viruskomponenten auf das Immunsystem des Wirts.

## **1.3. Genetische Variation und Auswirkungen auf den Verlauf der HCV Infektion**

Es wird angenommen, dass etwa drei Prozent der Weltbevölkerung mit HCV infiziert sind. Nach einer Infektion entwickelt sich bei etwa 70 % eine chronische Infektion. 30 % der Infizierten sind jedoch in der Lage, das Virus spontan zu eliminieren.

Neben den bereits erwähnten viralen Faktoren (wie dem jeweiligen Genotyp), die ihrerseits zur Vulnerabilität beitragen, ist inzwischen gut belegt, dass auch die genetische Varianz des Wirts eine wichtige Rolle spielt.

### 1.3.1. Arten von Polymorphismen

Man geht davon aus, dass die Genome von zwei beliebig ausgewählten Individuen zu 99,9 % übereinstimmen. Das heißt wiederum, dass es etwa 0,1 % Variation gibt. Diese Variationen nennt man Polymorphismen. Polymorphismen entstehen auf der Basis von Mutationen. Die einfachste genetische Veränderung ist der Austausch einer einzelnen Base für eine andere Base. Wenn diese Nukleotid-Veränderung in mindestens einem Prozent einer Population auftritt, nennt man sie definitionsgemäß „*single nucleotide polymorphism*“ (SNP). Die SNPs sind die weitaus häufigsten Polymorphismen im menschlichen Genom. Inzwischen wird die Häufigkeit auf über 1/1000 bp geschätzt.

Man teilt SNPs in unterschiedliche Gruppen ein. Zum Beispiel danach, ob sie in kodierenden Bereichen oder nicht-kodierenden Bereichen vorkommen. Dann unterscheidet man innerhalb der SNPs in kodierenden Bereichen die „synonymen“ SNPs von den „nicht-synonymen“ SNPs. Synonym ist ein SNP, wenn es sich um eine stille Mutation handelt, also eine Veränderung, die sich nicht auf die Aminosäuresequenz auswirkt. Nicht-synonyme SNPs verändern die Proteinstruktur und führen damit häufig zu Fehlfunktionen. Sie sind damit stärker natürlicher Selektion unterworfen.

Lange Zeit war man davon ausgegangen, dass die synonymen SNPs keinen Einfluss auf den Phänotyp hätten. Inzwischen weiß man aber, dass dem nicht immer so ist. Die deutlich häufigeren synonymen SNPs und SNPs in nicht-kodierenden Bereichen können in einigen Fällen die Genfunktion beeinflussen, indem sie zum Beispiel die Promotor-Aktivität (LeVan et al., 2001), die mRNA Konformation (Lohrer & Tangen, 2000) oder die Translationseffizienz (Krawczak, Reiss, & Cooper, 1992) verändern. Über diese Mechanismen tragen sie vermutlich wesentlich zur genetischen Evolution bei. Dies gilt nicht nur für Empfänglichkeit und Verlauf von Krankheiten, sondern auch für phänotypische Ausprägungen wie Größe, Haarfarbe und andere variable Merkmale von Individuen.

### 1.3.2. Methoden der Assoziationsanalyse

Den Zusammenhang zwischen Genotyp und Phänotyp aufzuklären, ist schon seit langem ein zentrales Ziel in der medizinischen Forschung. Die Methoden der Assoziationsanalyse, derer man sich bedient um derartige Fragestellungen zu erörtern, haben sich im Laufe der letzten Jahre immer weiter entwickelt. Dabei lassen sich insbesondere folgende zwei Arten von Assoziationsanalysen unterscheiden: die genomweiten und die hypothesengetriebenen Assoziationsstudien.

#### 1.3.2.1. Genomweite Assoziationsstudien

Die Anzahl der bekannten Polymorphismen im menschlichen Genom hat in den letzten Jahren einen rasanten Verlauf genommen. Die öffentliche SNP Datenbank (dbSNP 129) wies 2001 noch 1,4 Millionen Polymorphismen aus (Sachidanandam et al., 2001). Diese Zahl wurde nicht zuletzt durch die Bemühungen des HapMap-Projekts ("A haplotype map of the human genome," 2005), das im Jahr 2007 allein 3,1 Millionen Polymorphismen publizierte (Frazer et al., 2007), auf insgesamt etwa 11 Millionen bekannte SNPs im Jahr 2008 gesteigert. Darüber hinaus veröffentlichte das Projekt ebenso die Kopplungsungleichheiten (LD) benachbarter Polymorphismen. Ein positives Ergebnis in der Analyse der Kopplungsungleichheit bedeutet, dass zum Beispiel zwei benachbarte Polymorphismen auf einem beliebigen Chromosom überproportional häufig zusammen vorkommen.

Auf dieser Grundlage wurden die ersten genomweiten Assoziationsstudien ins Leben gerufen. Dabei werden einige Hunderttausend bis Millionen bekannter SNPs genotypisiert und im Hinblick auf die Assoziation zu einer bestimmten klinischen Fragestellung ausgewertet. Durch die Verwendung von SNPs mit bekannter Kopplungsungleichheit, gewährleistet dieses Verfahren eine Aussage für die große Mehrheit aller häufigen Varianten. Häufige Varianten nennt man diejenigen Varianten, bei denen die Häufigkeit des seltenen Allels (*minor allele frequency*) größer als fünf Prozent ist. In den letzten Jahren konnten auf diese Art über eintausend genetische Variationen bestimmt werden, die mit einer Erkrankung oder deren Verlauf assoziiert sind (Hindorff et al., 2009).

Trotz dieser Erfolge bedarf es weiterhin großer Bemühungen, um die genetischen Hintergründe komplex vererbter Erkrankungen aufzuklären. Dies liegt vor allem daran, dass die gefundenen Assoziationen häufig funktionell nicht ohne weiteres aufgeklärt werden können und das relative Risiko nur minimal erhöhen (Manolio et al., 2009). Darüber hinaus werden seltene Varianten in GWAS nicht beachtet, obwohl sie in ihrer Gesamtheit deutlich häufiger als häufige Varianten und vermutlich ebenso relevant sind für die genetische Architektur vererbter Erkrankungen (Nejentsev, Walker, Riches, Egholm, & Todd, 2009).

### 1.3.2.2. *Hypothesengetriebene Assoziationsstudien*

Eine weitere Methode bei der Suche nach Genotyp-Phänotyp-Zusammenhängen ist die sogenannte hypothesengetriebene Assoziationsstudie oder „*candidate gene approach*“ (CGA). Diese beschränkt die Suche nach Polymorphismen auf Regionen, für die es Hinweise gibt, dass sie für eine bestimmte Fragestellung eine wichtige Rolle spielen (Zhu & Zhao, 2007). Der Vorteil dieser Methode ist, dass es für die untersuchte Region bereits Informationen gibt, dass diese in die Pathogenese der untersuchten Erkrankung involviert ist. Auch ist es dabei möglich, die seltenen Varianten in die Analyse mit einzuschließen. Die natürliche Limitierung ist hierbei durch die Abhängigkeit von einer genauen und fundierten Kenntnis des molekularbiologischen Hintergrunds der jeweiligen klinischen Fragestellung gegeben.

## 1.4. Fragestellung

Es wird angenommen, dass etwa drei Prozent der Weltbevölkerung mit HCV infiziert sind. Nach einer Infektion entwickelt sich bei etwa 70 % eine chronische Infektion. Eine Infektion hat langfristig schwerwiegende Folgen für die Betroffenen und schränkt die Lebenserwartung deutlich ein. Etwa 30 % der Infizierten sind jedoch in der Lage das Virus spontan zu eliminieren und erwarten daher keine Folgeschäden. Die Gründe für diese interindividuell

unterschiedliche Vulnerabilität sind daher nicht nur von besonderem klinischen, sondern auch von volkswirtschaftlichem Interesse.

Neben den in der Einleitung erwähnten viralen Faktoren, die ihrerseits zur Vulnerabilität beitragen, ist inzwischen gut belegt, dass auch die genetische Varianz des Wirts eine wichtige Rolle spielt. Es wird daher erwartet, dass die interindividuelle Varianz des Krankheitsverlaufs durch Polymorphismen in Genen der Immunabwehr gegen das HCV repräsentiert wird.

Ein entscheidender Signalweg in der Immunantwort nach einer HCV Infektion ist die RLH-abhängige Interferonproduktion. Die RLH RIG-I und MDA5 zeigen nach Überexpression von allen ISG die deutlichste Reduktion der HCV Replikation *in vitro* (Schoggins et al., 2011). In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass eine seltene SNP-Allel-Kombination in MDA5, die für ein Protein mit erhöhter Aktivität nach Ligandenbindung kodiert, mit einer erhöhten Chance des Ausheilens einer HCV Infektion assoziiert ist. Für die Funktion eines Signalwegs kann jedoch nicht nur die Qualität einzelner Proteine, sondern auch die Quantität, also das Expressionsniveau, entscheidend sein.

RLHs sind sowohl initiale Sensoren einer Infektion mit HCV als auch selbst interferon-induzierbare Gene, deren Expression auf Transkriptionsebene in einem positiven *feedback-loop* bei viraler Infektion stark erhöht wird. Sowohl die Menge der initialen Basenexpression vor Infektion, als auch die Stärke der Hochregulation im Falle einer Infektion mit HCV, könnte daher eine Rolle für die Fähigkeit eines Individuums spielen, die Infektion wieder auszuheilen.

In der vorliegenden Arbeit wurden daher regulatorische Bereiche der RIG-I-like Helikasen RIG-I, MDA5 und LGP2 identifiziert und darin nach Polymorphismen gesucht, die mit dem Krankheitsverlauf der HCV Infektion korreliert sein könnten.

Diese Herangehensweise diene der Aufklärung folgender Fragestellungen:

- 1.) Welche Regionen sind an der Regulation der RLH RIG-I, MDA5 und LGP2 beteiligt und lassen sich Transkriptionsfaktoren (TF) ermitteln, die diese Regulation vermitteln?

- 2.) Gibt es eine Assoziation von SNPs im Bereich der Promotoren der RLH mit dem Verlauf einer HCV Infektion?
- 3.) Haben die Polymorphismen in den Promotorregionen eine funktionelle Auswirkung auf die Regulation der nachgeschalteten Gene?

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Geräte, Verbrauchsmittel und Reagenzien

#### 2.1.1. Geräte

<i>Alpha Imager</i> HP	Fa. Alpha Innotech (San Leandro, USA)
Begasungsbrutschrank	Fa. Heraeus (Hanau, D)
Eismaschine	Fa. Ziegra (Isernhagen, D)
Entwickler Curix 60	Fa. AGFA (Köln, D)
FluoroMax-P Fluorimeter	Fa. Horiba Jobin Yvon (Unterhaching, D)
GE Ettan LC System	Fa. GE Healthcare (München, D)
<i>Laminar Air Flow</i> Werkbank(HB 2448)	Fa. Heraeus (Hanau, D)
MidiMACS	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladb., D)
Mikroskop	Fa. Zeiss (Jena, D)
<i>Multiplate Reader Mithras</i> LB 940	Fa. Berthold Technologies (Bad W., D)
NanoPhotometer	Fa. Implen (München, D)
pH-Meter SB70P symphony	Fa. VWR (Darmstadt, D)
Power Pac 200 Spannungsgerät	Fa. Biorad (München, D)
Thermocycler T3	Fa. Biometra (Göttingen, D)
Vortexer	Fa. Janke & Kunkel (Staufen, D)
Waage LP 6209	Fa. Sartorius (Göttingen, D)
Waage SBC 21	Fa. Scaltec Instruments (Heiligenstadt, D)
Zentrifuge 5415 R	Fa. Eppendorf (Hamburg, D)
Zentrifuge Sepatech Omnifuge	Fa. Heraeus (Hanau, D)
96-well Kapillarsequenzierer	Fa. Life technologies (Carlsbad, USA)

#### 2.1.2. Reagenziensätze

<i>JETQUICK Gel Extraction Spin Kit</i>	Fa. Genomed (Löhne, D)
<i>Luciferase-Assay Kit</i>	Fa. BioThema (Handen, S)
<i>GF-1 Nucleic Acid Extraction Kit</i>	Fa. Vivantis (S. Darul Ehsan, Malaysia)
<i>Flexi-Gene DNA Kit</i>	Fa. Quiagen (Hilden, D)
<i>Plasmid MiniPrep Kit</i>	Fa. Fermentas (St. Leon-Roth, D)
<i>MaxiPrep Kit</i>	Fa. Quiagen (Hilden, D)
<i>Dual Promotor TA Cloning Kit</i>	Fa. Invitrogen (Carlsbad, USA)

#### 2.1.3. Chemikalien

##### Luciferase-Assay

Coelenterazine	Fa. Promega (Mannheim, D)
<i>Passive lysis buffer</i>	Fa. Promega (Mannheim, D)
<u>Transfektion</u>	
<i>Genejuice</i>	Fa. Merck Chemicals (Darmstadt, D)
Lipofectamine 2000	Fa. Invitrogen (Carlsbad, USA)
Lipofectamine RNAiMax	Fa. Invitrogen (Carlsbad, USA)
<u>Visualisierung</u>	
Agarose	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Ethidiumbromid	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Formamid	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
<i>GeneRuler DNA Ladder Mix</i>	Fa. Fermentas (St. Leon-Roth, D)
<u>Zellkultur</u>	
Aqua ad injectabilia	Fa. Braun (Melsungen, D)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Fetales Kälberserum	Fa. GibcoBRL (Paisley, GB)
Heparin-Natrium	Fa. Braun (Melsungen, D)
Insulin, Lösung vom Rinderpankreas	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
L-Glutamin	Fa. PAA (Linz, A)
Optimem	Fa. Invitrogen (Carlsbad, USA)
Ortho-mune Lyse-Reagenz	Fa. OrthoClinical Diagnostics (Neckarsgmünd, D)
Penicillin	Fa. PAA (Linz, A)
<i>Phosphate-buffered saline (PBS)</i>	Fa. PAA (Linz, A)
<i>Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI)</i>	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Streptomycin	Fa. PAA (Linz, A)
Trypanblau	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
<u>Bakterienanzucht</u>	
LB-Medium	Fa. Roth (Karlsruhe, D)
LB-Agar	Fa. Roth (Karlsruhe, D)
SOB-Medium	Fa. Roth (Karlsruhe, D)
<u>Zellyse</u>	
Glycerin	Fa. Roth (Karlsruhe, D)
<u>Enzyme und Sonstiges</u>	
Desoxyribonukleotide	Fa. Fermentas (St. Leon-Roth, D)
Pfu-Polymerase	Fa. Fermentas (St. Leon-Roth, D)
RNase-Inhibitor	Fa. Fermentas (St. Leon-Roth, D)
Taq-Polymerase	Fa. Fermentas (St. Leon-Roth, D)
Phusion-Polymerase	Fa. Fermentas (St. Leon-Roth, D)
ExoSAP-IT	Fa. Affymetrix (Santa Clara, USA)

T4 DNA Ligase

Fa. Fermentas (St. Leon-Roth, D)

Restriktionsenzyme

KpnI

Fa. Fermentas (St. Leon-Roth, D)

XhoI

Fa. Fermentas (St. Leon-Roth, D)

EcoRI

Fa. Fermentas (St. Leon-Roth, D)

EcoRV

Fa. Fermentas (St. Leon-Roth, D)

HindIII

Fa. Fermentas (St. Leon-Roth, D)

BamHI

Fa. Fermentas (St. Leon-Roth, D)

SacI

Fa. Fermentas (St. Leon-Roth, D)

*2.1.4. Materialien für die Zellkultur*

Plastikmaterialien für die Zellkultur wurden von den Firmen Greiner (Frickenhäuser, D), Falcon (Heidelberg, D), Becton Dickinson (Le Pont de Claix, F), Bibby Sterilin (Stone, Staffordshire, GB) und Corning (Corning, USA) bezogen.

*2.1.4.1. Zellkulturmedien, Puffer und Lösungen*

<u>DMEM-Vollmedium</u>	<u>1205Lu-Medium</u>	<u>TFBI Puffer</u>	<u>TFBII Puffer</u>
100 IU/ ml Penicillin	80 Vol % MCDB153	20 mM KAc (pH 5,8)	10 mM Mops/NaOH
100 µg/ ml Streptomycin	20 Vol % Leibovitz L-15	50 mM MnCl <sub>2</sub>	75 mM CaCl <sub>2</sub>
1,5 mM L-Glutamin	2 Vol % FCS	100 mM RbCl <sub>2</sub>	10 mM RbCl <sub>2</sub>
10 Vol % FCS in DMEM-Medium	5 µg/ml Insulin 1,68 mM CaCl <sub>2</sub>	10 mM CaCl <sub>2</sub> 15 % Glycerin	15 % Glycerin

*2.1.5. Zellen, Nukleotide und Proteine**2.1.5.1. Zelllinien*

<u>Zelllinie</u>	<u>Zellart</u>	<u>Herkunft</u>
Hek293	Humane embryonale Nierenzelllinie	American Type Culture Collection (ATCC)
1205Lu	Humane Melanomzellen isoliert aus einer Lungenmetastase	M. Herlyn (Wistar Institute, Philadelphia, USA)

### 2.1.5.2. DNA-Primer und –Templates

#### DNA- Primer

<u>Name</u>	<u>Sequenz (5'→3')</u>
huRIG-I Ampl. Primer for.	CCCAAGGCTATCCAATGCCA
huRIG-I Ampl. Primer rev.	GGCTGTGCCTCACTAGCTTT
huMDA5 Ampl. Primer for.	GGGAACTTACAAGCTGGGATCT
huMDA5 Ampl. Primer rev.	GGGACAGGTGAAATGTGCGT
huLGP2 Ampl. Primer for.	GGAGGGAGGCCTCATTGACA
huLGP2 Ampl. Primer rev.	CTGCACCACCACGTAGGC
huRIG-I Sequ. Primer for.	GGCTATCCAATGCCAAAAG
huRIG-I Sequ. Primer rev.	GCCTCACTAGCTTTAAAGCC
huMDA5 Sequ. Primer for.	CTTACAAGCTGGGATCTAGGAA
huMDA5 Sequ. Primer rev	AGGTGAAATGTGCGTGCC
huLGP2 Sequ. Primer for.	GAGGCCTCATTGACAAGTAGG
huLGP2 Sequ. Primer rev.	CACGTAGGCCTGCCCAA
R698 for.	GCAAATGTGCCACCATT
R698 rev.	CTGGAAGGCTTGCAGG
M600 for.	GTTAAGGCAGAACCTGC
M600 rev.	GGGTTCTCCCAAGCAG
L1169 for.	CTGTGCGGAGTACAAC
L1169 rev.	GGAGTAACACAGGCTAC
R156 for.	CTGTGTCTAAACGTTAGCGC
R156 rev.	CGGAGCTGCATAGGAAC
R698 Mutag. Primer for.	CCACAATAATATACCATTTACACAGACCAAGATGGAAG
R698 Mutag. Primer rev.	CTTCCATCTTGGTCTGTGTGAAATGGTATATTATTGTGG

DNA-Primer und -Templates wurden mithilfe der CLC Workbench generiert und von Metabion (Martinsried, D) synthetisiert.

### 2.1.5.3. Plasmide

Alle Plasmide die von anderen Arbeitsgruppen gespendet wurden, wurden zur Identifikation diagnostisch verdaut. Bei positivem Ergebnis wurden sie weiterhin

sequenziert und auf ihre Richtigkeit geprüft. Die Foxo3a-Vektoren stammen von Prof. Mien-Chien Hung vom MD Anderson Cancer Center in Texas. Der NFAT-Vektor sowie die p50- und p65-Untereinheiten wurden aus der Plasmid-Datenbank Addgene bezogen. Die Expressionsplasmide für die IRFs kamen aus dem Bestand von Dr. Atsuko Masumi aus Tokyo. Die Plasmide für Mzf1a und Mzf1b wurden von Prof. Heike Allgayer aus Heidelberg zur Verfügung gestellt und die c-fos und c-jun Plasmide stammen von Dr. Yuri Pekarsky aus Columbus.

### Plasmide

<u>Konstrukt</u>	<u>Vektor</u>	<u>Charakteristika</u>
GFP		Kanamycin-Resistenz
p125-Firefly-Luziferase	pGL3	Ampicillin-Resistenz
pLuc-SV40	pGL3	Ampicillin-Resistenz
pLuc-HRL0	pGL4	Ampicillin-Resistenz
pLuc-TK	pGL4	Ampicillin-Resistenz
GFP-Foxo3a	pEGFP-C2	Kanamycin-Resistenz
GFP-Foxo3a 3A	pEGFP-C2	Kanamycin-Resistenz
IRF1	pcDNA3.1.	Ampicillin-Resistenz
IRF2	pcDNA3.1.	Ampicillin-Resistenz
IRF7 2D	pcDNA3.1.	Ampicillin-Resistenz
IRF3 5D	pcDNA3.1.	Ampicillin-Resistenz
p50	pCMV4	Ampicillin-Resistenz
p65	pCMV4	Ampicillin-Resistenz
HA-c-jun	pCMV4-HA	Ampicillin-Resistenz
C-fos		Zeocin-Resistenz
FLAG-NFATC4	pcDNA3	Ampicillin-Resistenz
Mzf1a	pcDNA3.1.	Ampicillin-Resistenz
Mzf1b	pcDNA3.1.	Ampicillin-Resistenz

## **2.2. Zellulär-immunologische Methoden**

### *2.2.1. Allgemeine Kulturbedingungen*

Für die Kultur der Zellen wurden diese in einem Begasungsbrutschrank bei einer Temperatur von 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und einem fünfprozentigen CO<sub>2</sub>-Luftgemisch in Zellkulturflaschen gelagert. Die Durchführung der

Experimente mit diesen Zellen fand ausschließlich unter sterilen Bedingungen in einem Laminar-Air-Flow statt.

### *2.2.2. Bestimmung der Zellzahl und Vitalität*

Die Lebendzellzahl wurde anhand des Trypanblauausschlusstests ermittelt. Dazu werden Zellen mit einem Farbstoff inkubiert, den nur vitale Zellen ausschließen, während sich tote Zellen anfärben. Die Zählung erfolgte in geeigneter Verdünnung mithilfe einer Neubauer-Zählkammer.

### *2.2.3. Kultivierung von Zelllinien*

HEK-Zellen wurden in 50ml Kulturflaschen in DMEM-Vollmedium, angereichert durch FCS, L-Glutamin sowie Penicillin und Streptomycin, kultiviert. Für die 1205Lu Zellen wurde entsprechend das oben näher bezeichnete Nährmedium verwendet. Das Medium wurde abhängig von der Zelldichte sowie dem Farbindikator des Mediums alle zwei bis drei Tage gewechselt. Dabei wurde altes Medium dekantiert, die Zellen mit PBS gewaschen und neues Medium zugefügt. Täglich wurde eine lichtmikroskopische Inspektion der Zelllinien auf Zelluntergang sowie mikrobielle Verunreinigung durchgeführt. Für die Gewinnung von Zellen für Experimente, wurden diese mit Trypsin vom Zellkulturflaschenboden unter lichtmikroskopischer Kontrolle abgelöst, in Medium aufgenommen und sieben Minuten bei 400 G zentrifugiert. Danach wurde der Überstand über dem Zellpellet dekantiert, die Zellen in PBS gelöst und erneut zentrifugiert.

### *2.2.4. Transiente Transfektion und Stimulation von Zellen*

Um die Luciferasekonstrukte sowie die stimulatorische RNA in die Zellen zu bringen wurden Transfektionsreagentien verwendet. Diese schließen Nukleinsäuren in liposomenartige Vesikel ein. Nach Kontakt mit der Zellmembran fusioniert der Phospholipidmantel eines Liposoms mit dieser und der Inhalt des Vesikels ergießt sich in das Zytoplasma.

### 2.2.5. Transiente Transfektion von 1205Lu-Zellen

Für Luciferase-Assays mit Melanomzellen wurden 1205Lu-Zellen ( $1 \times 10^4$  Zellen in 100  $\mu\text{l/well}$  in 96-*well*-Platten) mit 80 ng Plasmid-DNA (40ng je Reporterkonstrukt) und 0,2  $\mu\text{l}$  *GeneJuice* nach dem Protokoll von Roche transfiziert. Nach 24 h folgte die Immunstimulation. Dabei wurden 100 ng polyI:C und 0,2  $\mu\text{l}$  RNAiMax nach den Herstellerangaben von Novagen transfiziert. Bei den Experimenten, in denen zusätzliche Transkriptionsfaktoren überexprimiert wurden, wurden die DNA Mengen auf 100 ng summiert. Das heißt 30 ng der beiden Reporterprodukte und jeweils 20 ng der zu überexprimierenden TF. Als Kontrollen wurden jeweils die identischen Leervektoren in gleicher Menge transfiziert.

### 2.2.6. Luciferase-Assay: Allgemeine Funktionsprinzipien

Bei den erwähnten Luciferasekonstrukten ist das Gen für die Firefly-Luciferase in einem Plasmid hinter die zu testende regulatorische Region der untersuchten Gene eingebracht. Wenn diese als Promotor funktionieren, dann wird dieser Bereich von Transkriptionsfaktoren gebunden und aktiviert, das Enzym wird exprimiert. Die *Firefly*-Luciferase (*Photinus pyralis*) oxidiert das Substrat Luciferin zu Oxyluciferin. Bei dieser Reaktion wird chemische Energie frei, die in Form eines Elektronen-Übergangs Lichtblitze erzeugt. Die Anzahl an Lichtblitzen korreliert mit der Aktivität des Promotors. Zur Normalisierung der unterschiedlichen Bedingungen, insbesondere hinsichtlich ihrer Transfektionseffizienz, wird in jede Bedingung ein zweites Plasmidkonstrukt mit dem Gen einer anderen Luciferasespezies transfiziert. Diese Renilla-Luciferase (*Renilla reniformis*) befindet sich dabei hinter einem konstitutiv-aktiven CMV-Promotor. Sie setzt nur das Substrat Coelenterazine um. Luciferase-Assays eignen sich für die Untersuchung intrazellulärer Signaltransduktion in Säugetierzellen, da kein endogenes Chemolumineszenz-System existiert und weder *Firefly*- noch Renilla-Luciferase posttranslationale Modifikationen benötigen. Die Ergebnisse werden daher in relativen Luciferase Einheiten (RLU) angegeben, was dem Quotienten beider Luciferasen entspricht.

### 2.2.6.1. *Luciferase-Reporter-Assay: Durchführung*

Nach 24 h Überexpression der Luciferasekonstrukte erfolgte die Stimulation der Zellen mit polyIC. Nach weiteren 16 Stunden Kultivierung wurden die Zellen mit 50 µl *passive lysisbuffer* von Promega versetzt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das entstandene Lysat wurde zu je 20 µl auf zwei weiße, undurchsichtige 96-well-Platten verteilt. Anschließend wurde auf jede Bedingung der einen Platte 20 µl des Substrats für das Enzym Firefly-Luciferase gegeben, auf die andere 20 µl des Substrats für das Enzym Renilla-Luciferase. Der Umsatz des Substrats erfolgte sofort. Die Substrate wurden nach Herstellerangaben benutzt. Die entstehende Chemilumineszenz wurde innerhalb von 15 Minuten in einem *Mithras Multiplate Reader* gemessen.

### 2.2.7. *ELISA Assay*

Um in Zellkulturüberständen die Menge an sezernierten Chemokinen zu bestimmen, wurde der *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) verwendet. Grundlage dieser Methode ist ein Sandwich-Prinzip, bei dem zunächst eine Platte mit Antikörpern, die gegen das gesuchte Antigen gerichtet sind (*Capture antibody*), beschichtet wird. Nach dem Waschen der Platte, wird ein Blockierungspuffer zur Sättigung weiterhin vorhandener freier Bindungsstellen hinzugegeben. Aus Zellkulturexperimenten werden nun zellfreie Überstände abgenommen und diese je nach Bedarf mit Blockierungspuffer verdünnt. Anschließend werden die verdünnten Zellüberstände sowie als Standard dienende, serielle Verdünnungen des gesuchten Proteins aufgetragen. Die Platte wird erneut gewaschen, um so freie Antigene zu beseitigen, während gebundene Antigene verbleiben. Ein zweiter Antikörper, der gegen ein anderes Epitop des Antigens gerichtet ist und mit Biotin markiert ist (*Detection antibody*), wird zugefügt. Erfassbar wird die Konzentration des gesuchten Antigens über Zugabe eines Streptavidin-Peroxidase-Konjugats. Über mehrere Brücken bindet Streptavidin an Biotin und führt so zu einer Signalverstärkung. Die Peroxidase setzt ein zugegebenes Substrat um und erzeugt dadurch eine blaue Farbreaktion. Die Intensität der Farbreaktion ist proportional zur Konzentration des untersuchten Proteins in

den Proben. Durch Zugabe von Schwefelsäure wird weiterer Substratumsatz verhindert und es kommt zu einer gelben Farbreaktion. Quantifiziert werden die Farbintensitäten mit einem ELISA-Auslesegerät, in diesem Fall dem Mithras-Reader, der die Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm erfasst. Anhand einer Standardkurve, die über die bekannte Konzentration der seriellen Verdünnungsreihe des untersuchten Proteins errechnet wird, kann die absolute Konzentration des Proteins in den einzelnen Proben berechnet werden. Zur Bestimmung von IP10 wurde ein kommerziell erhältliches ELISA-Set der Firma BD Biosciences verwendet und der ELISA wurde entsprechend dem angegebenen Protokoll des Herstellers durchgeführt.

## **2.3. Molekularbiologische Methoden**

### *2.3.1. Polymerase Kettenreaktion: Allgemeines Funktionsprinzip*

Mithilfe der PCR (*polymerase chain reaction*) lässt sich ein bestimmtes Stück DNA vervielfältigen. Dazu wird ein DNA Produkt benötigt, das die zu vervielfältigende Sequenz enthält, diese Matrize wird Template genannt. Das Template kann dabei genomische DNA, Plasmid-DNA oder cDNA sein. Die Reaktion verläuft in drei Schritten. 1. Denaturierung: Durch Erhitzen des Reaktionsgemisches wird die DNA denaturiert und die Stränge eines doppelsträngigen Templates werden getrennt. 2. Anlagerung: Im Reaktionsgemisch befinden sich zwei sequenzspezifische Primer, die sich spezifisch an die Enden der zu amplifizierenden Sequenz am Template anlagern. 3. Elongation: Eine ebenfalls im Reaktionsgemisch enthaltene thermostabile DNA-Polymerase synthetisiert von den Primern ausgehend einen komplementären DNA Strang. Diese Schritte werden zyklisch wiederholt, sodass die entstehenden Amplifikationsprodukte im darauffolgenden Zyklus wieder als Template zur Verfügung stehen; es resultiert daraus eine exponentielle Anreicherung genau der Sequenz, die zwischen den beiden Primern liegt.

Komponenten		PCR Protokoll	
50 ng gDNA	X µl	98° C	30 s
dNTP 10 mM	1 µl	98° C	7 s
5xPhusion buffer	10 µl	66° C	20 s
DMSO 6%	3 µl	72° C	35 s
Primer <i>forward</i> 20 µM	1 µl	72° C	7 min
Primer <i>reverse</i> 20 µM	1 µl	4° C	hold
Phusion Polymerase 1u	0,5 µl	Zykluszahl	35
H <sub>2</sub> O	ad 50 µl		

### **Tabelle 2 Komponenten der PCR-Reaktion**

Beispiel einer typischen PCR Reaktion mit genomischer DNA als *template*.

#### *2.3.1.1. Kolonien PCR*

Eine Modifikation der PCR ist die sogenannte Kolonien PCR. Dabei ist das Template Plasmid-DNA. Sie wird nach der Transformation von chemokompetenten Bakterien durchgeführt, um zu überprüfen, ob das gewünschte Plasmid transfiziert wurde. Der Unterschied zur oben erwähnten PCR ist, dass hier anstelle eines DNA Templates, ganze Bakterien der Reaktion zugeführt werden. Dabei werden einzelne Kolonien von einer Agarplatte gepickt und in das Reaktionsgemisch überführt. Diese werden durch die hohen Temperaturen am Anfang der PCR aufgeschlossen und lassen so die darin enthaltenen Plasmide frei. Die plasmidspezifischen Primer können nun binden, die Amplifikation beginnt.

#### *2.3.1.2. Zielgerichtete Mutagenese*

Um die genetischen Polymorphismen im Luciferase Assay funktionell testen zu können, wurden die Luciferase Plasmide mutagenisiert. Das heißt, an den entsprechenden Stellen wurden in der Promotorsequenz einzelne Basen mutiert. Das Verfahren ähnelt dem der PCR. Der Austausch der Base wird dadurch erreicht, dass die gewählten PCR Primer so gestaltet sind, dass die auszutauschende Base in der Mitte der Primer-Sequenz liegt (35-40 nt). Damit

ist gewährleistet, dass die Primer ihre Bindungsstelle erkennen und sowohl vor als auch hinter der mutagenisierten Region den Matrizenstrang sicher binden.

Komponenten	Polymerase Protokoll		
30 ng template	X µl	95° C	60 s
dNTP 10mM	1 µl	95° C	30 s
10x <i>Pfu buffer</i> + MgCl <sub>2</sub>	5 µl	55° C	60 s
Primer <i>forward</i> 125 ng	X µl	72° C	2 min/kb
Primer <i>reverse</i> 125 ng	X µl	72° C	5 min
ddH <sub>2</sub> O	ad 50 µl	4° C	hold
Pfu Polymerase	1 µl	Zykluszahl (2-4)	13

### **Tabelle 3 Komponenten und Ablauf der Mutagenese PCR**

Die Tabelle zeigt das Protokoll der Mutagenese-Reaktion, bei der eine einzelne Base in einem Plasmid-*template* von 4,8 kb ausgetauscht wurde.

Nach der Polymerisierung wurde das Produkt mit Dpn I verdaut. Dazu wurde dem Reaktionsgemisch direkt 1 µl hinzugegeben und 75 min bei 37° C inkubiert. Dpn I hat die Eigenschaft nur methylierte DNA zu schneiden. Da die frisch in vitro polymerisierte DNA im Gegensatz zu dem in den Bakterien gezüchteten *template* nicht methyliert ist, wird diese durch das spezifisch methylierte DNA verdauende Enzym Dpn I nicht geschnitten.

Nach dem Verdau wurden 10 µl der verdauten DNA in hitzekompetente Bakterien transformiert. Antibiotikum-resistente Kolonien wurden gezüchtet und die DNA mithilfe des *Genejet Plasmid Miniprep Kit* isoliert. Die erfolgreiche Mutagenese der isolierten Plasmide wurde durch eine Sequenzierung verifiziert.

#### **2.3.1.3. Bakterienanzucht**

Bei den hier verwendeten Bakterien handelt es sich um den vielfach verwendeten *E. coli* Stamm DH5α. Diese wurden entweder im LB-Flüssigmedium oder auf Agarplatten kultiviert. Zur Selektion plasmidhaltiger Kolonien wurden die Medien mit Antibiotika in der Konzentration 100 µg/ml versetzt. Dazu wurden Ampicillin, Kanamycin und Neomycin verwendet.

#### 2.3.1.4. *Generierung hitzekompetenter Zellen*

Kompetente Bakterien haben den Vorteil, dass ihre Zellwand unter bestimmten Bedingungen durchlässig für ringförmige DNA wird. In diesem Fall wurden die Bakterien hitzekompetent gemacht, das heißt, durch das kurze Aufheizen der Bakteriensuspension auf 42° C wird die Membran für Plasmide permeabel, sodass die Transformation der Bakterien erfolgt. Um die DH5 $\alpha$ -Bakterien derart kompetent zu machen, wurden sie zunächst in einem LB-Medium mit 2 ml einer Kaliumchloridlösung der Stoffmengenkonzentration 1 mol/l und 2 ml einer Magnesiumsulfatlösung in derselben Konzentration kultiviert. In der exponentiellen Wachstumsphase wurde die Bakteriensuspension dann auf 4° C abgekühlt und bei 4000 rpm abzentrifugiert. Anschließend wurden die Sedimente für fünf Minuten in eisgekühlter TFBII-Lösung inkubiert und danach erneut abzentrifugiert. Zum Schluss wurden die Pellets in TFBII-Lösung resuspendiert und zu 50  $\mu$ l auf Eppendorf-Reaktionsgefäße aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die auf diese Weise kompetent gemachten Zellen wurden bei -80° C gelagert und für die jeweiligen Klonierungen bedarfsgerecht aufgetaut.

#### 2.3.1.5. *Hitzeschock-Transformation*

Für die Hitzeschock-Transformation wurden die kompetenten Bakterien langsam auf Eis aufgetaut und dann mit 1-2  $\mu$ l der jeweiligen Plasmide versetzt. Anschließend wurden sie für 45 sec in einem Heizblock bei 42° C inkubiert und dann in 200  $\mu$ l SOC-Medium aufgenommen und für weitere 60 min bei 37° C inkubiert. Abschließend wurde die Suspension auf Antibiotikum-haltige Agarplatten ausgestrichen und so die erfolgreich transformierten Bakterien selektioniert.

#### 2.3.1.6. *Isolation von Plasmid-DNA*

Die Isolation der in den Bakterien produzierten Plasmid-DNA erfolgte mit den an den jeweiligen Bedarf angepassten Mini- und Maxi-Prep Kits. Dabei wird die DNA über DNA-bindende Säulen aufgereinigt. Dies geschah nach dem Protokoll des Herstellers Fermentas.

### 2.3.1.7. Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA Fragmenten erfolgte per Gelelektrophorese. Dabei läuft die DNA aufgrund ihrer Ladung in einem elektrischen Feld durch ein polymerisiertes Agarosegel. Dazu wurden 2-4 g Agarose in 200 ml TBE-Puffer in der Mikrowelle aufgeköcht und mit einem Kamm in eine Gelkammer gefüllt. Zusätzlich wurden 10 µl Ethidiumbromidin die Kammer gegeben und gleichmäßig im flüssigen Gel verteilt. Nach 60 min wurde das abgekühlte, feste Gel in die Laufkammer gestellt und mit TBE-Puffer überschichtet. Dann wurden die DNA Proben und ein farbiger Ladepuffer in die Taschen gefüllt und eine Spannung von etwa 100 V angelegt. Nach ca. 45 min wurde die Spannung wieder abgestellt und das Gel auf einem UV-Tisch fotografiert.

Für die Klonierung wurden die entsprechenden Banden mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die darin enthaltene DNA wurde dann mit dem *JETQUICK Gel-extraction Kit* der Fa. Genomed nach Herstellerprotokoll aufgereinigt.

### 2.3.1.8. Klonierung der Luciferasekonstrukte

Für die Herstellung der Luciferasekonstrukte wurden die *Upstream*-Bereiche der RLH Gene durch PCR aus genomischer DNA amplifiziert und mittels Dual Promotor *TA-Cloning* in den pCRII Vektor ligiert. Dazu werden die PCR Produkte nach der Polymerisierung mit Taq-Polymerase für 10 min bei 72° C inkubiert. Dabei wird an den Enden der jeweiligen Produkte ein *A-tail* hinzugefügt. Mithilfe dieser Überhänge werden die Produkte in den TA-Vektor ligiert, der seinerseits über einen *T-tail* verfügt. So wird gewährleistet, dass beliebige PCR-Produkte in einfacher und eleganter Weise in eine *cloning site* integriert werden. Bei korrekter Orientierung der Inserts wurden diese mit KpnI und XhoI geschnitten und in den pGL4.10 Luciferase Vektor kloniert. Bei inkorrekt orientierten Inserts wurden EcoRV und HindIII verwendet. Dadurch ließ sich die Orientierung umkehren. Alle Konstrukte wurden sequenziert, um die richtige Sequenz und Orientierung zu verifizieren.

### 2.3.2. Vorbereitung der DNA-Proben für die Sequenzierung

Zu Beginn wurden die zu untersuchenden Regionen per PCR amplifiziert. Als *template* dienten dabei die DNA-Proben der Studienpopulation. Von den 50  $\mu$ l der PCR-Reaktion wurden 20  $\mu$ l auf ein Gel aufgetragen, um den Erfolg der Amplifikation in der Elektrophorese zu kontrollieren. Im erfolgreichen Fall wurden dann jeweils weitere 5  $\mu$ l des Gemisches auf zwei *well* einer 96-*well*-Platte verteilt. Dann wurden jeweils 2  $\mu$ l „Exo-SAP-IT“ der Fa. Affymetrix hinzugefügt. Dabei handelt es sich um ein Enzymgemisch, mit dem sich in einem einzigen Schritt der PCR-Ansatz aufreinigen lässt. Insbesondere werden die Primer enzymatisch gespalten. Dazu wird die Platte für 15 Minuten bei 37° C inkubiert. Anschließend werden die Enzyme weitere 15 Minuten lang bei 80° C inaktiviert.

Danach wurden in die beiden *wells* jeweils der vorwärts und der rückwärts gerichtete Sequenzierprimer in der Konzentration 0,5 mM hinzugefügt.

### 2.3.3. Sequenzierung

Die Sequenzierung der Patientenproben wurde durch das „*Biocenter*“ der LMU München in einem herkömmlichen 96-*well* Kapillarsequenziergerät durchgeführt.

## 2.4. *in silico* Analyse von Transkriptionsfaktorbindungsstellen in Promotoren

### 2.4.1. Vorhersage von Transkriptionsfaktorbindungsstellen

Die Vorhersage wurde mithilfe des „*MatInspectors*“ von Genomatix Version 2.6 durchgeführt. Die verwendete Bibliothek war die *Matrix Family Library* Version 8.4 (Juni 2011). Für alle Anwendungen wurden folgende Filtermodalitäten eingestellt: Die *core similarity* betrug 0,75 und als *matrix similarity* wurden die für die jeweiligen Matrizes optimierten Schwellenwerte ausgewählt. Die Verwendung von gewichteten Matrizes im Vergleich zu Konsensussequenzen

bietet den Vorteil, dass dabei berücksichtigt wird, dass einige Positionen innerhalb der Sequenzen besser konserviert sind als andere und damit vermutlich wichtiger sind für die Funktion der Bindungsstelle. Je mehr Informationen zu einzelnen Bindungsstellen verfügbar sind und je länger die Sequenz ist, desto genauer kann die Matrix gewichtet werden. Desto genauer ist also der Wert, der jeder möglichen Base für eine bestimmte Position innerhalb der Bindungssequenz zugewiesen wird. Aus diesem Grund ist es sinnvoll, die Schwellenwerte immer an die Potenz der jeweiligen Matrix anzupassen.

## **2.5. Studienpopulation**

Die Ausgangspopulation der Studie (n=859) setzt sich aus zwei Gruppen zusammen. Eine Gruppe (n=535) besteht aus chronischen HCV Patienten, die andere (n=324) aus Patienten, bei denen die HCV Infektion spontan ausgeheilt ist. Alle in die Studie eingeschlossenen Patienten sind kaukasischen Ursprungs. Die Proben wurden von unterschiedlichen Quellen zur Verfügung gestellt. Ein Teil sind Hämophilie Patienten der Universitätsklinik Bonn, ein Teil stammt aus dem Kompetenznetz Hepatitis, ein weiterer sind irische Patienten, die durch anti-D Immunglobulin infiziert wurden. Die Patientenproben wurden mit Genehmigung der zuständigen Ethikkommissionen der besteuernden Institutionen erhoben und protokollgemäß analysiert.

Eine chronische Infektion erfüllt die Kriterien: 1. Persistierende anti-HCV Antikörper und 2. detektierbare HCV RNA im Serum für sechs Monate nach Infektion. Spontan ausgeheilte Patienten haben HCV Antikörper und für mindestens 100 Tage keine nachweisbare HCV RNA im Serum.

## 2.6. Analyse der Sequenzierergebnisse

### 2.6.1. Alignment der erhobenen Sequenzen an das entsprechende Referenzgenom

Die Sequenzierergebnisse wurden mit der *CLC Main Workbench* analysiert. Als Referenzsequenzen wurden die entsprechenden Regionen aus der Genbank des NCBI kopiert. Ebenso wurden alle beschriebenen Polymorphismen für das jeweilige Gen aus der SNP Datenbank des NCBI in die Referenzsequenz annotiert.

Zur Analyse der Polymorphismen wurden die Sequenzierergebnisse der Patientenproben mit der jeweiligen Referenzsequenz aus dem NCBI36 Referenzgenom abgeglichen.

### 2.6.2. Filterung und Validierung

Zu Beginn wurden alle Sequenzen nach den gleichen Kriterien gefiltert. Dafür wurde der Qualitätswert 0,08 gewählt. Außerdem wurde die „*maximum number of ambiguous nucleotides*“ auf 3 beschränkt. Damit ist gewährleistet, dass nur qualitativ hochwertige „*reads*“ für die Auswertung berücksichtigt werden. Dies betrifft vor allem die Anfänge und Enden der Sequenzierstrecken, in denen die Qualität der Kurven naturgemäß eingeschränkt ist.

In einem letzten Schritt wurden nach der Filterung persistierende Konflikte validiert. Dazu wurden alle Konflikte einzeln begutachtet und die Kurvenverläufe auf Plausibilität geprüft.

### 2.6.3. Statistische Auswertung

Um eine Aussage über die genetische Assoziation zwischen den Polymorphismen und den untersuchten Studiengruppen zu treffen wurden die Ergebnisse der Analyse mithilfe des Programms GraphPad Prism statistisch ausgewertet. Es wurde für jeden gefundenen SNP die statistische Korrelation

zum klinischen Verlauf geprüft. Dabei gelten die jeweilige Allelkombination (z.B. AA, AT oder TT) sowie der klinische Verlauf (also „spontan ausgeheilt“ oder „chronisch infiziert“) als kategorische Variablen. Die Prüfung der stochastischen Unabhängigkeit dieser Variablen erfolgte dann mit dem zweiseitigen Fisher-Exakt-Test, wobei p-Werte von  $< 0,05$  als signifikant bezeichnet wurden. Für die Auswertung der Genotypfrequenzanalyse wurde der Chi-Quadrat-Test verwendet.

Die Beurteilung der statistischen Signifikanz der Unterschiede der funktionellen Analysen erfolgte ebenfalls mithilfe der Software GraphPad Prism. Hierbei wurden der unverbundene T-Test bei Vergleich der Mittelwerte eines Experiments und der verbundene T-Test bei Vergleich von Mittelwerten aus mehreren Experimenten verwendet. Statistische Signifikanz wurde bei p-Werten von  $*p < 0.05$ ;  $**p < 0.01$ ;  $***p \leq 0.001$  angenommen und entsprechend gekennzeichnet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Identifikation funktionsfähiger Promotorregionen in *RIG-I-like* Helikase Genen

Ein Promotor ist laut der Definition im “*Dorland’s Illustrated Medical Dictionary*” „*a segment of DNA usually occurring upstream from a gene coding region and acting as a controlling element in the expression of that gene; it serves as a recognition signal for an RNA polymerase and marks the site of initiation of transcription*”. Was diese Definition nicht leistet, ist eine Voraussage zu treffen, welche Anzahl von Basenpaaren *upstream* der *transcription start site* (TSS) funktionell in die regulatorische Einheit einbezogen sind. Der Grund dafür ist, dass bereits für viele Gene nachgewiesen werden konnte, dass selbst in entfernten Regionen (>10 kb) Elemente gefunden wurden, die bei der Regulation der Gene eine große Rolle spielen können. Ebenso wurden regulatorische Funktionen auch für Elemente *downstream* der TSS beschrieben. Dies ist insofern nachvollziehbar, als dass diese distalen Promotorelemente durch die jeweilige dreidimensionale Chromosomen-Architektur und bestimmte *Loop*-Formationen in die räumliche Nähe der TSS gelangen und daran bindende TF ihre Wirkung auf den Initiationskomplex entfalten können.

Für die experimentelle Suche nach Promotorregionen bedeutet dies, dass es momentan unmöglich ist, mit Hilfe eines Reporterkonstrukts den einen Promotor eines Gens zu identifizieren.

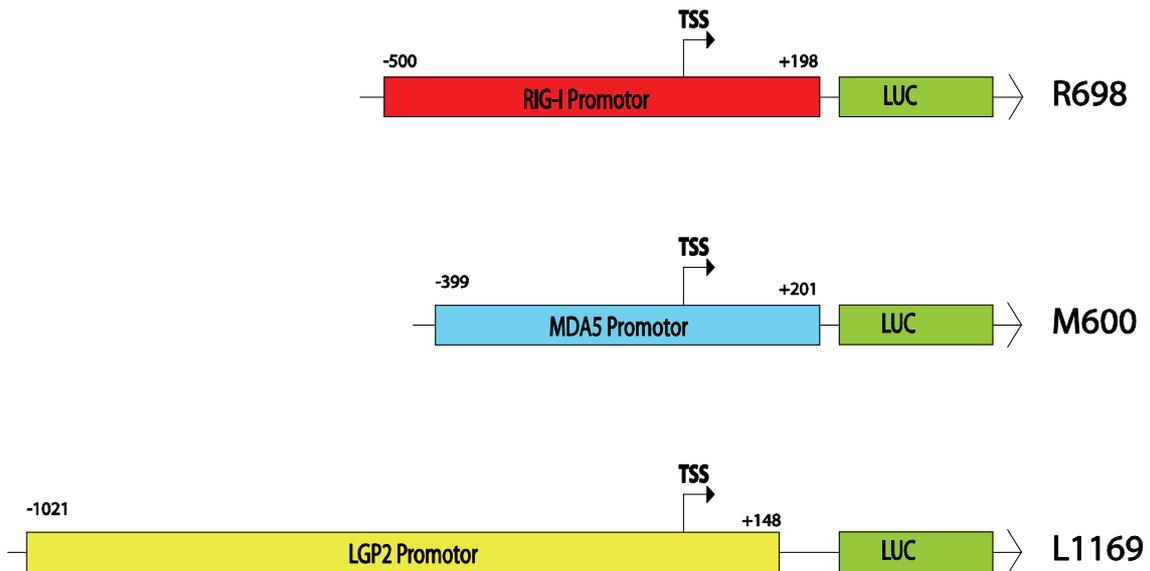
Der gängige Weg bei der Suche nach Promotoren sieht daher einen Kompromiss vor, der in den Grenzen der molekularbiologischen Durchführbarkeit die Regionen einschließt, die neben dem *core promoter* die vermeintlich wichtigsten regulatorischen Elemente enthält. In der Regel sind diese Bereiche zwischen 100 und 2000 bp groß. In diesem Bereich ist zudem ein optimales Verhältnis aus Signal- und Störfaktoren gegeben.

Um die wichtigsten regulatorischen Elemente zu identifizieren wurde zunächst eine Analyse der die TSS umgebenden 1000 bp mit dem „*MatInspector*“ von Genomatix durchgeführt, um potentielle TF-Bindungsstellen zu identifizieren. Dieser berechnet anhand von gewichteten Konsensussequenzen Bindungswahrscheinlichkeiten einer Vielzahl von Transkriptionsfaktoren für die zu analysierenden Sequenzabschnitte. Anhand dieser Daten wurde für jede der drei *RIG-I-like* Helikasen RIG-I, MDA5 und Lgp2 ein Promotorbereich für die weitere experimentelle Analyse ausgewählt.

Für RIG-I wurde der Bereich zwischen -500 und +198 als Promotor festgelegt (siehe Abb.1). Er enthält neben den bereits in der Literatur beschriebenen wichtigen IRF-Bindungsstellen zwischen -17 und -4 und den TATA-Boxen bei -162 und -144 (Z. Z. Su, Sarkar, Emdad, Barral, & Fisher, 2007) zwei weitere potentielle IRF-Bindungsstellen sowie eine NF- $\kappa$ B-Bindungsstelle.

Für MDA5 und LGP2 gab es noch keine in der Literatur beschriebenen Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen. Anhand der Vorhersagen des Genomatix-Programms wurde für MDA5 der Bereich -399 bis +201 und für LGP2 der Bereich -1021 und +148 festgelegt. Auch dort wurde darauf geachtet, dass voraussichtlich wichtige Bindungsstellen für IRF und NF- $\kappa$ B enthalten sind und dass diese Bereiche am jeweiligen Ende Sequenzen enthalten, die eine Bindung von Amplifikationsprimern ermöglichen.

Im Folgenden wurden diese Bereiche dann per PCR amplifiziert. Als *template* diente genomische DNA, die aus einer Eigenblutspende gewonnen wurde. Die Amplifikate wurden zunächst mit *TA-cloning* in einen Zwischenvektor kloniert. Dadurch wurden an den jeweiligen Enden Schnittstellen für Restriktionsenzyme hinzugefügt, sodass in einem letzten Schritt die Promotorkonstrukte mittels Restriktionsenzymen geschnitten und in den pGL4.10 Luciferase-Zielvektor ligiert werden konnten. Die Benennung der Konstrukte erfolgte anhand der jeweiligen Anzahl der im Promotor enthaltenen Basenpaare und dem Anfangsbuchstaben des Proteins, welches das entsprechende Gen kodiert.

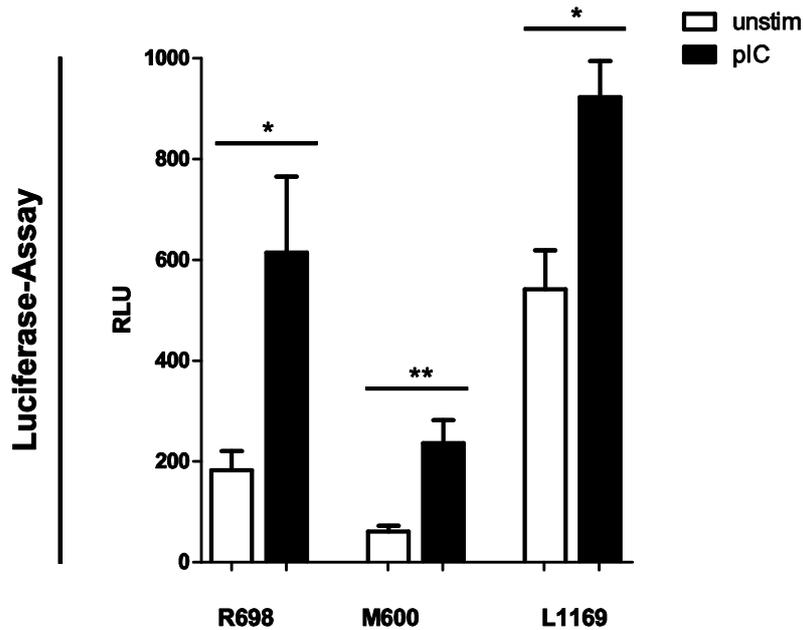


### Abb.3 Schematische Darstellung der Promotorkonstrukte im pGL4.10 Luciferase-Vektor

Die Luciferase-Reporterkonstrukte enthalten jeweils unterschiedlich lange Upstream-Regionen sowie Teile der 5'UTR der angezeigten Gene vor dem Firefly-Luciferase Gen. R698=RIG-I Promotor; M600=MDA5 Promotor; L1169=LGP2 Promotor.

Um eine erste Aussage über die Funktionalität dieser Promotorkonstrukte treffen zu können, wurde zunächst untersucht, ob bekannte und wichtige regulatorische Eigenschaften der Promotoren in den gewählten Bereichen erhalten geblieben sind und experimentell getestet werden können.

Dieses Experiment wurde in 1205Lu-Zellen durchgeführt. Dabei handelt es sich um humane Melanomzellen, die nach Stimulation mit einem synthetischen Analogon von Doppelstrang-RNA Interferon produzieren. Bei dem Analogon handelte es sich in diesem Fall um polyIC (pIC). Dies ist aufgrund seiner Struktur ein Ligand für MDA5, RIG-I und TLR3 und induziert eine Signalkaskade, die über Interferon zu einer Induktion der ISGs führt. Dies bedeutet, dass die Promotorregionen nach Stimulation mit pIC TF binden, die die Transkription der jeweiligen Gene aktivieren. Im Falle der Reporterkonstrukte ist das zu untersuchende Gen durch das Luciferase-Gen ersetzt, dessen Aktivität im Luciferase-Assay leicht experimentell und quantitativ erfasst werden kann. Wie in Abb. 2. dargestellt, führt die Stimulation der Zellen mit pIC zu einer verstärkten Transkription des nachgeschalteten Kontrollgens in den ausgewählten Reporterplasmiden.



**Abb.4 Die Promotoren der RLH werden durch pIC-Stimulation aktiviert und induzieren die Transkription des nachgeschalteten Kontrollgens**

1205Lu-Zellen wurden mit den jeweiligen Promotorkonstrukten transfiziert und nach 24 h mit pIC stimuliert. Nach weiteren 24 h zeigen alle drei Versuchsbedingungen eine deutliche Steigerung der Luciferase-Aktivität nach pIC-Stimulation im Vergleich zur Kontroll-Stimulation. Es wurden jeweils Triplikate untersucht. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Grundgesamtheit aus drei unabhängigen Experimenten an. RLU = Relative Luciferase Einheiten; MW  $\pm$  SEM; \* $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.005$ .

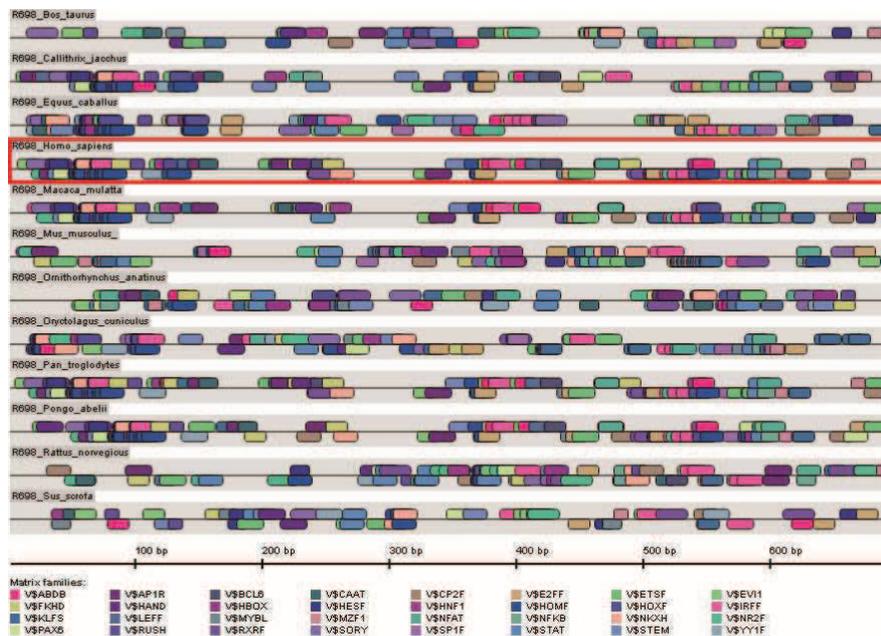
Das bedeutet, dass die gewählten Genabschnitte in der Tat Eigenschaften funktioneller Promotoren aufweisen und damit Bereiche enthalten, die für die Regulation der RLH eine wichtige Rolle spielen.

### 3.2. Charakterisierung von relevanten TF und ihrer Bindungsstellen für RIG-I

Nachdem funktionell bestätigt werden konnte, dass die gewählten Promotorabschnitte regulatorisch aktiv sind, wurden diese Bereiche nun näher untersucht. Dazu wurde wieder das Vorhersage-Werkzeug „*MatInspector*“ verwendet. Um dessen Aussagekraft zu erhöhen, wurden in diesem Fall die 550 Basenpaare *upstream* der TSS von RIG-I von elf verschiedenen Säugetierarten analysiert und mit der Vorhersage der entsprechenden humanen DNA-Region verglichen.

Für die Analyse möglicher TF wurde als Bedingung festgelegt, dass relevante TF-Bindestellen laut Vorhersage in der humanen sowie mindestens zehn von zwölf weiteren Spezies vorkommen müssen. Durch diese Filterung wurde die Zahl der vorhergesagten TF auf etwa 10 % der ursprünglichen Bindungsvorhersage reduziert.

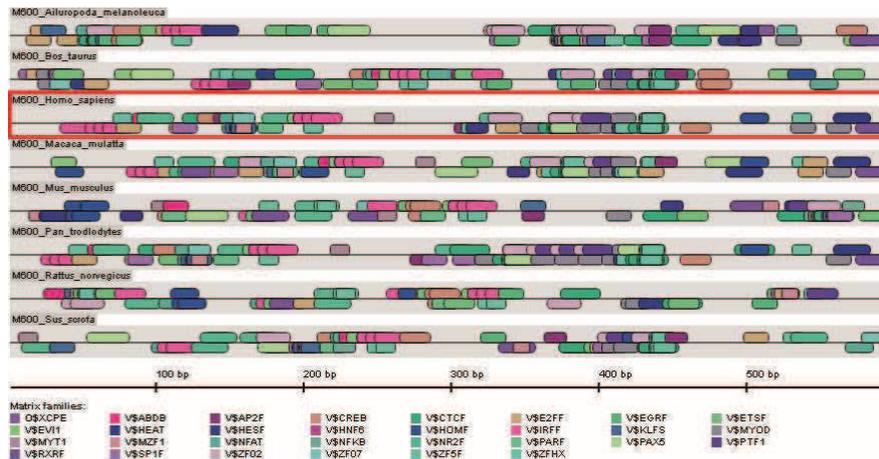
Dabei zeigt sich, dass die Muster der jeweiligen TF-Bindestellen bei artverwandten Spezies sehr ähnlich sind, während man zu phylogenetisch weiter entfernten Spezies einen deutlichen Unterschied erkennt.



**Abb.5 Vorhersage der TF-Bindestellen am RIG-I Promotor bei zwölf Säugetieren mit Hilfe des Computerprogramms „MatInspector“**

Dargestellt ist hier die Vorhersage der TF-Bindestellen für zwölf Säugetiere nach Anwendung des Filters. Die Legende zeigt die jeweiligen TF-Familien mit ihrer farblichen Kodierung.

Eine ähnliche Vorhersage wurde auch für MDA5 durchgeführt. Die Vergleichbarkeit ist allerdings eingeschränkt, da die Sequenzdaten nicht für alle Spezies der vorhergehenden Analyse verfügbar waren. Hier erfolgte die Analyse in acht Säugetierspezies, die nur zum Teil denen der vorhergehenden Analyse entsprechen. Die Filterkriterien wurden bei dieser Analyse angepasst. Herausgefiltert wurden alle TF-Bindestellen, die nicht in mindestens sechs von acht Spezies und im Menschen vorkommen.



**Abb.6 Vorhersage der TF-Bindestellen am MDA5 Promotor bei acht Säugetieren**

Dargestellt ist hier die Vorhersage der TF-Bindestellen für acht Säugetiere nach Anwendung des Filters. Die Legende zeigt die jeweiligen TF-Familien mit ihrer farblichen Kodierung.

Ausgehend von der Analyse wurde eine Liste von TF erstellt, die voraussichtlich an der Regulation von RIG-I und MDA5 beteiligt sind. Aus diesen TF wurden nach Literaturrecherche wiederum diejenigen für eine weitere experimentelle Testung ausgewählt, für die ein Expressionsplasmid in der Literatur war und von den jeweiligen Wissenschaftlern zur Verfügung gestellt wurde. Einige dieser Transkriptionsfaktoren sind bereits in der Literatur im Zusammenhang mit ISGs beschrieben, andere wiederum werden bisher nicht im Zusammenhang mit angeborener Immunität beschrieben.

Transkriptionsfaktor	Familie
IRF1, IRF2, IRF3, IRF7	<i>Interferon regulatory factors</i>
c-Jun, c-fos	<i>Activator protein 1 family</i>
MZF1	<i>Krüppel C2H2-type zinc-finger protein family</i>
NF-κB	NF-κB
NFATc4	<i>NFAT family</i>
Foxo3a	<i>Fork Head Domain family of TF (FKHD)</i>

**Tabelle 4 TF-Kandidaten für die Regulation von RIG-I und MDA5**

In der Tabelle sind diejenigen TF aufgeführt, die nach der Vorhersage an der Regulation von RIG-I und MDA5 beteiligt sind und für die ein Expressionsplasmid zur funktionellen Testung vorliegt.

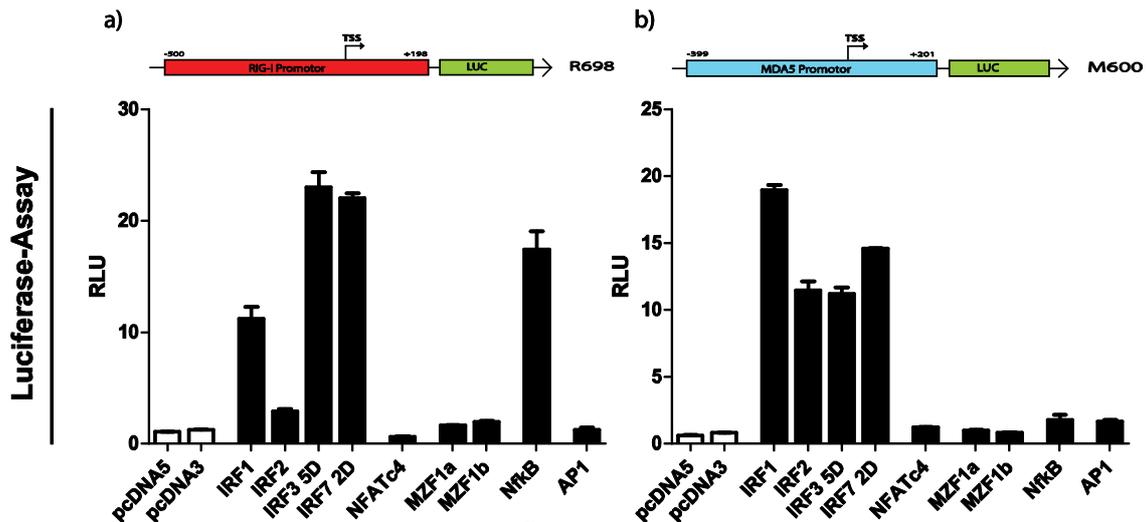
### 3.2.1. TF-Screen

Weiterhin wurde nun der Effekt der Überexpression einzelner TF mittels Expressionsplasmiden auf die Promotoraktivität des RIG-I Promotors R698 sowie des MDA5 Promotors M600 funktionell getestet. Bei den Expressionsplasmiden handelt es sich um Konstrukte, bei denen die cDNA der TF in Vektoren kloniert wurde, die über einen konstitutiv aktiven Promotor verfügen. Zudem wurde bei einigen Konstrukten (IRF3 und IRF7) mutagenisierte cDNA verwendet, die Proteine ergeben, die intrazellulär nicht deaktiviert werden können. Die Bindung dieser Konstrukte an die vorhergesagten TF-Bindestellen sollte daher zur Aktivierung des Promotors führen. Es wurden HEK-Zellen mit dem Luciferasekonstrukt sowie dem jeweiligen Expressionsplasmid co-transfiziert und die Promotoraktivität im Luciferase-Assay quantitativ bestimmt.

Wie in Abbildung 7a gezeigt, führt die Expression von IRF1, IRF3, IRF7 und NF- $\kappa$ B zu einer deutlichen Aktivitätssteigerung des R698-Reporterplasmids von RIG-I. Für die Überexpression von IRF2 zeigt sich lediglich eine minimale Steigerung. Die Überexpression der übrigen getesteten Faktoren, also MZF1a, MZF1b, NFATc4 und AP1, haben keinen signifikanten Unterschied ergeben.

Bei der Koexpression der Expressionsvektoren der gleichen TF mit dem Reporterkonstrukt M600 war eine deutliche Steigerung der Promotoraktivität für die Transkriptionsfaktoren IRF 1, 2, 3 und 7 zu verzeichnen (Abb. 7b). Für die anderen Faktoren ergab sich auch hier kein Unterschied.

Beim Vergleich der beiden Promotoren von RIG-I und MDA5 fällt daher auf, dass sie beide gemeinsam durch die Faktoren IRF1, IRF3 und IRF7 stimuliert werden. IRF2 erhöht die Aktivität bei Koexpression mit dem M600-Vektor deutlich stärker als mit dem R698-Vektor. Dagegen verhält es sich bei NF- $\kappa$ B genau umgekehrt. NF- $\kappa$ B hat eine deutlich stimulierende Wirkung auf den RIG-I Promotor, während keine Wirkung auf den hier getesteten MDA5 Promotor nachzuweisen war. Die TF MZF1, NFATc4 und AP1 haben in der Koexpression mit keinem der Reporterkonstrukte eine Änderung der Luciferase-Aktivität ergeben.



**Abb.7 Auswirkungen der Überexpression einzelner TF auf die Expression von RIG-I und MDA5**

HEK-Zellen wurden mit den jeweiligen Promotorkonstrukten transfiziert und nach 24 h zusätzlich mit Expressionsvektoren der angegebenen TF bzw. den Leervektoren als Negativkontrolle transfiziert. Nach weiteren 24 h wurde die Promotoraktivität über Messung der Luciferase-Aktivität bestimmt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte mit dem Standardfehler der Grundgesamtheit von Triplikaten angegeben. RLU = Relative Luciferase Einheiten.

### 3.2.2. Foxo3a und RIG-I

#### 3.2.2.1. Die durch IRF3 induzierte Aktivität des RIG-I Promotors wird durch den Transkriptionsfaktor Foxo3a inhibiert

Foxo3a wurde in der Analyse mit „MatInspector“ als einer der möglichen Kandidaten bestimmt, die auf Grund von vorausgesagten Bindestellen an der Regulation von RIG-I beteiligt sind. Foxo3a ist ein Vertreter aus der Familie der *forkhead-box* Transkriptionsfaktoren. Er spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation des Zellzyklus zum Beispiel durch die Induktion von Apoptose in einer Reihe von Tumoren (Myatt & Lam, 2007). Untersuchungen an Foxo3a<sup>-/-</sup>-Mäusen konnten jedoch auch Effekte auf die Homöostase von lymphatischen Zellen belegen. Die Mäuse zeigten einen initial gesunden Phänotyp, entwickelten jedoch nach acht Monaten lymphoproliferative Erkrankungen und eine systemische Entzündungsreaktion. Als Ursache wurde eine Inaktivierung von NF-κB durch Induktion des I-κB (*Inhibitor of kappa-B*) in T-Zellen beobachtet (Lin, Hron, & Peng, 2004).

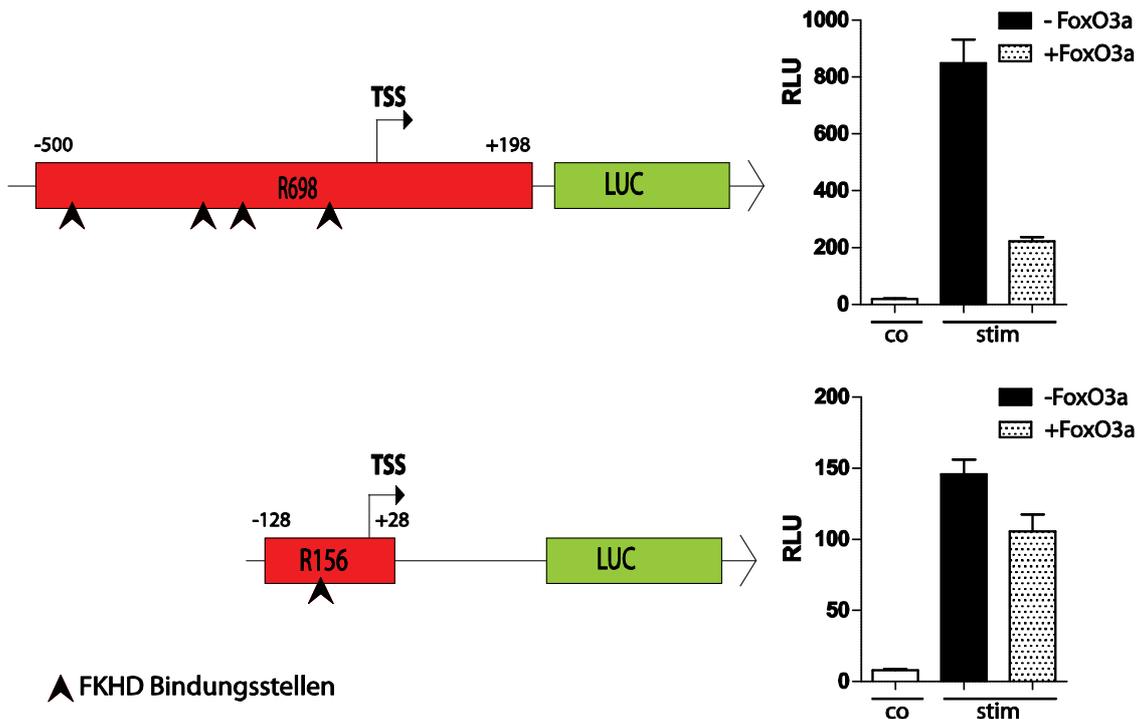
Inzwischen wurde auch eine Rolle als Negativ-Regulator in der antiviralen Immunantwort postuliert. In Genexpressions-Analysen von Makrophagen aus Foxo3a<sup>-/-</sup>-Mäusen konnte eine signifikante Minderexpression wichtiger Interferon-abhängiger Gene nach Stimulation gezeigt werden, darunter unter anderem IL6, IRF 7 und RIG-I (Litvak et al., 2012).

Es wurde daher angenommen, dass die vorhergesagte Bindung von Foxo3a an den RIG-I Promotor einen negativ-regulatorischen Effekt hat.

Nachdem die Überexpression eines konstitutiv aktiven Foxo3a allein keinen Effekt auf die Promotoraktivität des Reporterplasmids R698 hat (Daten nicht gezeigt), wurde nun die kombinierte Überexpression mit einem bereits als aktivierend bekannten Transkriptionsfaktor untersucht. Es wurde dazu je ein Plasmid für die konstitutiv aktive Variante von Foxo3a gemeinsam mit der ebenfalls konstitutiv aktiven Form des aktivierenden TF IRF3 in HEK-Zellen transfiziert. Dabei zeigte sich ein deutlicher repressorischer Effekt von Foxo3a auf die IRF-3-induzierte Promotoraktivität des R698 Reporterplasmids.

Da dieses mehrere potentielle Foxo3a-Bindestellen enthält, wurde, um festzustellen welche der vorausgesagten Bindungsstellen relevant für den Effekt ist, ein weiteres, trunkiertes Promotorkonstrukt getestet, das nur eine potentielle Foxo3a-Bindestelle enthält. Es ist zu erwähnen, dass das kürzere R156 Konstrukt die von Su et al. publizierte IRF-Bindestelle an Position -17 bis -4 enthält und wie im Experiment gezeigt ebenfalls durch das konstitutiv aktive IRF3 aktiviert wird.

In dem kürzeren Konstrukt R156 ist der Effekt des Foxo3a weiterhin erhalten, allerdings schwächer ausgeprägt als in R698. Dies spricht dafür, dass mehrere Bindungsstellen relevant für die Repression des Gens sind und es sich um einen additiven Effekt handelt.



### Abb.8 Foxo3a inhibiert den RIG-I Promotor

HEK-Zellen wurden mit den jeweiligen Promotorkonstrukten transfiziert und nach 24 h mit den TF-Plasmiden transfiziert. Nach weiteren 24 h wurden die Luciferase-Assays durchgeführt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte mit dem Standardfehler von Triplikaten angegeben. RLU = Relative Luciferase Einheiten; stim: Stimulation mit dem konstitutiv aktiven IRF3 Konstrukt; co: Transfektion mit Leervektor.

#### 3.2.2.2. Die Überexpression von Foxo3a inhibiert die basale IP-10-Produktion, hat jedoch keinen wesentlichen Einfluss auf die durch VSV Infektion induzierte Menge an IP-10

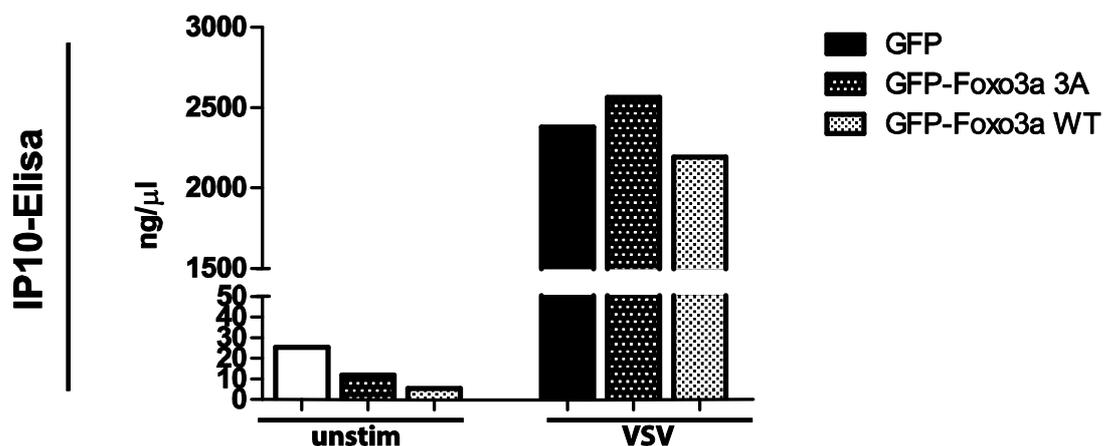
Nachdem gezeigt werden konnte, dass der TF Foxo3a ein potenter Inhibitor der IRF-3-induzierten Expression von RIG-I ist, wurde im Anschluss experimentell getestet, ob diese Inhibition sich auch auf die Zytokinproduktion von virusinfizierten 1205Lu-Zellen auswirkt. Aus Vorexperimenten war bekannt, dass die Infektion mit dem RIG-I-abhängig erkannten Vesicular Stomatitis Virus (VSV) zu einer deutlichen Hochregulation der Transkriptionsrate von RIG-I sowohl auf mRNA als auch auf Protein-Ebene führt. Dieser Mechanismus trägt entscheidend dazu bei, dass die replizierten Viren im Verlauf der Infektion besser erkannt werden können und eine effektivere Zytokinantwort etabliert wird (Poeck et al., 2010). Durch die Überexpression des Repressors Foxo3a sollte dieser Mechanismus gebremst werden und es zu einer Verminderung der Zytokinproduktion kommen.

Im Versuch zeigte sich jedoch, dass dies in den Virus-stimulierten Bedingungen nicht der Fall ist. Dabei wurden zwei unterschiedliche Foxo3a-Plasmide verwendet. Eine 3A Variante, die konstitutiv aktiv ist und die Wildtyp-Variante, die in phosphorylierter Form aus dem Zellkern ausgeschlossen wird und somit transkriptionell inaktiv ist. Nach der Inkubation mit den Viren wurden nach 18 h im zellfreien Überstand die IP10-Spiegel mittels ELISA bestimmt.

Im Experiment wurde VSV M51R verwendet. Dabei handelt es sich um eine VSV Mutante, bei der an Position 51 die Aminosäure Methionin durch Arginin ersetzt wird. Das mutierte M-Protein hat dadurch eine verminderte Fähigkeit antivirale Wirtsmechanismen zu unterdrücken, wodurch wiederum die Pathogenität eingeschränkt wird (Ahmed et al., 2003).

Dabei zeigte sich ein deutlicher Effekt der Stimulation in allen Virus-infizierten Bedingungen. Die Überexpression von Foxo3a senkte jedoch in diesem experimentellen Setting weder als Wildtyp-, noch als konstitutiv aktive 3A-Variante die IP10-Menge signifikant.

Interessanterweise ließ sich allerdings in den unstimulierten Bedingungen ein Unterschied im basalen Expressionsniveaus von IP-10 feststellen. Dieses war nach Foxo3a Expression deutlich niedriger als in der Kontrollbedingung.



**Abb.9 Foxo3a Überexpression hat in Virus-infizierten 1205Lu-Zellen keinen Einfluss auf die IP10-Produktion**

1205Lu-Zellen wurden mit einem Wildtyp Foxo3a und einem konstitutiv aktiven Foxo3a transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen für 1 h mit Virus infiziert. Nach weiteren 18 h wurden die Zellen lysiert und die IP10 Menge im Lysat bestimmt. VSV: Stimulation mit VSV M51R-GFP in der Konzentration 5 MOI. GFP-Foxo3a 3A ist eine konstitutiv aktive Variante, bei der die Phosphorylierungs-Stellen mutiert sind. Bei GFP-Foxo3a WT

handelt es sich um die Wildtyp-Variante jeweils mit einem GFP-Tag. Als Kontrolle wurde ein Plasmid mit GFP-Tag ohne Foxo3a transfiziert.

### **3.3. Ergebnisse der genetischen Assoziationsstudie**

Es wurde weiterhin untersucht, ob sich in den beschriebenen Promotorregionen Polymorphismen finden lassen und ob diese mit der Ausheilung einer HCV Infektion assoziiert sind. Dazu wurden jeweils etwa 1000 Basenpaare *upstream* der TSS der drei RLH RIG-I, MDA5 und LGP2 sequenziert. Als *template* wurde die DNA von Patienten aus zwei unterschiedlichen Kollektiven verwendet, einem mit chronischer HCV Infektion sowie einem mit spontan ausgeheilter HCV Infektion.

#### *3.3.1. Demographische Charakteristika der Studienpopulation*

Die Untersuchung von Polymorphismen in Genen oder regulatorischen Bereichen von Genen des Immunsystems bedarf besonderer Vorsicht bei der Auswahl der Studienpopulation. Aufgrund des Vorkommens unterschiedlicher Pathogene in unterschiedlichen Regionen der Erde geht man davon aus, dass sich das Immunsystem im Laufe der Zeit an das jeweilige Expositionsprofil angepasst hat (Lazarus et al., 2002). Diese Anpassung beruht allem Anschein nach vor allem auf der Konservierung bestimmter SNPs, die sich für bestimmte Ethnien als vorteilhaft darstellen.

Daher ist bei Assoziationsstudien dieser Art die Homogenität der Studienpopulation hinsichtlich der ethnischen Zugehörigkeit von besonderer Bedeutung. Diesem Umstand wurde in dieser Studie Rechnung getragen. Beide Populationen sind rein kaukasischer Herkunft. Zum Vergleich der ermittelten Allelfrequenzen wurden diese den Daten aus der CEU-Population des HapMap Projekts gegenübergestellt. Diese setzt sich ebenfalls aus Individuen mit west- und nordeuropäischem Hintergrund zusammen.

	<b>Patienten mit spontan ausgeheilter Hepatitis</b>	<b>Patienten mit chronischer Hepatitis</b>
Anzahl	324	535
Geschlecht	m: 129	m: 271
	w: 195	w: 264
	m/w: 40%/60%	m/w: 51%/49%
Herkunft	Deutschland: 292 (90%)	Deutschland: 459 (86%)
	Irland: 28 (9%)	Irland: 48 (9%)
	Südeuropa: 2 (1%)	Osteuropa: 16 (3%)
	Osteuropa: 2 (1%)	Russland: 10 (2%)
		Südeuropa: 2 (0,4%)

**Tabelle 5 Demographische Eigenschaften der Studienpopulation**

Die Tabelle zeigt Einzelheiten über das Geschlecht und die Herkunft der in der Studie eingeschlossenen Individuen

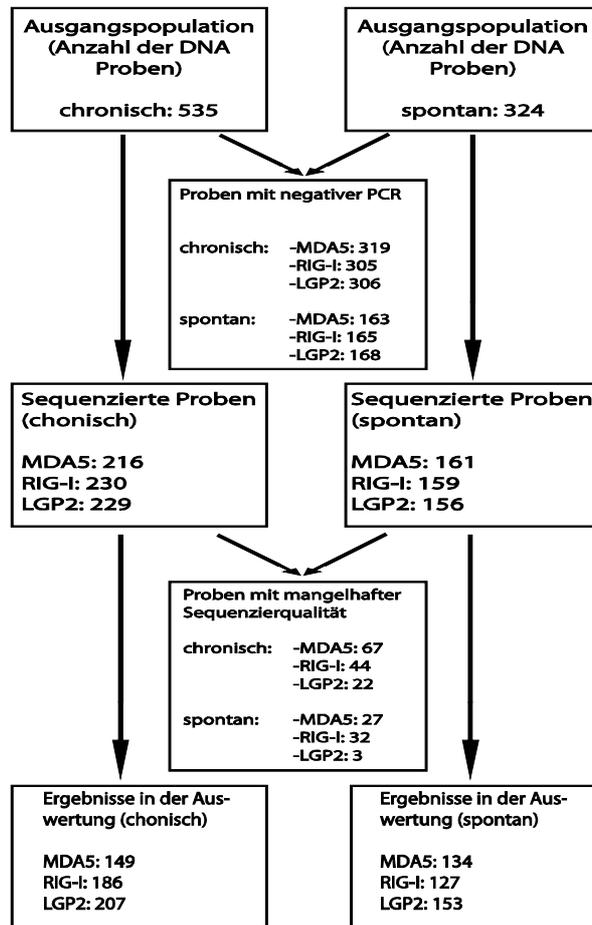
### 3.3.2. Verlauf der Studie

Von den ursprünglichen DNA-Proben sind nicht alle in die Auswertung eingegangen. Im folgenden dynamischen Ablaufschema sind die Anzahl der Proben bei den jeweiligen Analyseschritten sowie die Gründe für ein zwischenzeitliches Ausscheiden angegeben.

Die meisten Ausfälle waren beim ersten Schritt zu verzeichnen. Darin wurden die jeweiligen DNA-Abschnitte in den Proben mittels PCR amplifiziert. Die hohe Ausfallquote bei diesem Schritt ist auf eine mangelhafte Qualität der DNA-Proben zurückzuführen. Ein negatives PCR-Ergebnis bedeutet, dass die Probe nach der Amplifikation in der Gelelektrophorese keine eindeutige Bande ergeben hat.

Auch von den sequenzierten Proben konnten nicht alle in die Auswertung mit eingeschlossen werden. Das lag vor allem daran, dass die Qualität der einzelnen *reads* nicht in allen Bereichen gleich gut war. Um eine eindeutige Aussage über die jeweilige Base sowie eine Zuordnung in heterozygot und

homozygot treffen zu können, wurden Filterkriterien für die Qualität der *reads* angewandt. Dadurch konnten jedoch einige Proben nicht berücksichtigt werden.



**Abb. 10** *Flow-chart* der Studienpopulation

Dargestellt sind die Größe der Studienpopulation bei den jeweiligen Analyseschritten sowie die Gründe für das Ausscheiden von Proben.

Insgesamt wurden 1.796.428 DNA Basenpaare sequenziert. Alle Sequenzen wurden nach dem gleichen Auswertungsschema analysiert.

Alle Sequenz-*reads* wurden mit den jeweiligen Regionen aus dem NCBI 36 Referenzgenom abgeglichen. Die bekannten SNPs wurden ebenso aus der NCBI Datenbank (Stand Nov. 2011) übernommen und in die Referenzsequenz annotiert.

### 3.3.3. Identifikation von Polymorphismen

Es konnten acht Polymorphismen identifiziert werden. Davon waren drei bisher nicht in der Datenbank aufgeführt. Für RIG-I umfasste der untersuchte Bereich

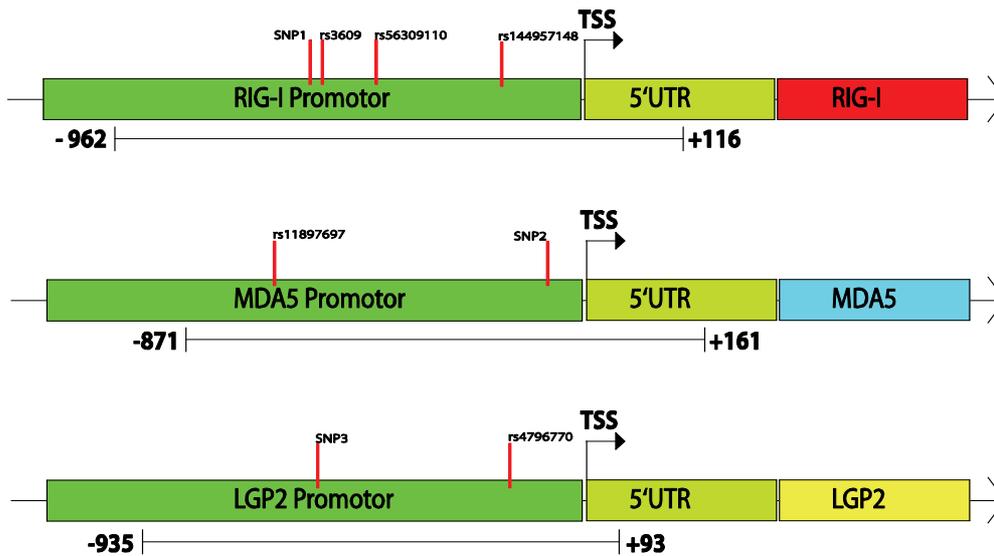
genau 962 bp vor und 116 bp nach der TSS. Bei MDA5 waren es 871 bp und 161 bp, bei LGP2 935 bp und 93 bp. Die Addition der sequenzierten Promotorbereiche ergibt einen Wert von 3138 bp. Wenn man von diesem Wert die Enden der jeweiligen Sequenz-*reads* abzieht, an denen die Primer binden und die Sequenzierqualität ungenügend ist, bleiben etwa 3000 bp. Das bedeutet, dass im Durchschnitt ein Polymorphismus pro 400 bp gefunden werden konnte.

	<b>RIG-I</b>	<b>MDA5</b>	<b>LGP2</b>
Proben	313	283	360
Basen insgesamt	653 kb	545 kb	599 kb
Anzahl der Polymorphismen	4	2	2
(davon neu)	(1)	(1)	(1)

**Tabelle 6 Anzahl der SNPs in den untersuchten Regionen**

Dargestellt sind die Anzahl der sequenzierten Basen für jede Region sowie die darin gefundenen SNPs.

Die Verteilung von SNPs in Promotorbereichen ist nicht willkürlich. Untersuchungen dazu zeigten, dass die Häufigkeit der SNPs in Richtung der TSS zunimmt und danach rapide abfällt (Guo & Jamison, 2005). Um einen derartigen Effekt zu sehen, ist die Stichprobe in der Vorliegenden Untersuchung zu klein. Wie in der Abbildung dargestellt, lässt sich ein Trend in diese Richtung erahnen, dieser ist jedoch nicht statistisch signifikant.



**Abb. 11 Darstellung aller SNPs innerhalb der untersuchten Promotorabschnitte**

Dargestellt sind die Positionen der bei der Analyse der Sequenzierdaten identifizierten SNPs auf den drei untersuchten Genen RIG-I, MDA5, LGP2. Die Ziffern unter den Sequenzbereichen markieren Anfang und Ende der jeweils sequenzierten Region.

Der Vorteil der Sequenziermethode ist, dass nicht nur vorbeschriebene Polymorphismen untersucht werden, wie es zum Beispiel bei Genotypisierungen im Rahmen von GWAS der Fall ist. Dadurch wird ermöglicht, dass auch bisher unbekannte Polymorphismen, beziehungsweise solche mit einer geringen Allelfrequenz aufgedeckt werden. Dies war hier der Fall. Die folgende Tabelle zeigt die SNPs, die bisher nicht in der Datenbank aufgeführt sind. Es sind allesamt seltene SNPs mit MAF von 0,2 bis 0,3 %.

	<b>Allele</b>	<b>Promotor</b>	<b>Lokus</b>	<b>MAF (%)</b>
SNP 1	T/C	RIG-I	NC_000009.11 32526845	0,2
SNP 2	G/A	MDA5	NC_000002.11 163175121	0,3
SNP 3	A/G	LGP2	NC_000017.10 40265267	0,3

**Tabelle 7 MAF und Lokus der bisher unbekanntenen Polymorphismen**

Dargestellt sind die Loci der bisher unbekanntenen SNPs auf den jeweiligen Chromosomen sowie die Häufigkeit als MAF (= *Minor Allele Frequency*).

### *3.3.4. Analyse der Genotypverteilungen in den beiden Untersuchungsgruppen*

Aus den gewonnenen Sequenzierdaten wurden die Genotypverteilungen zwischen Patienten mit chronischer Hepatitis und Patienten, die das HCV spontan eliminieren konnten für alle gefundenen Polymorphismen ermittelt. Neben den in dieser Studie identifizierten SNPs gibt es in der NCBI Datenbank weitere Einträge von Polymorphismen, die innerhalb des sequenzierten Bereiches liegen. Dass diese Polymorphismen in dieser Population nicht vorkommen, kann mehrere Gründe haben. Zum einen kann es daran liegen, dass die hinterlegten SNP so selten sind, dass sie in der hier getesteten Stichprobe nicht vorkamen. Zum anderen muss man bedenken, dass die Verbreitung der SNPs, wie bereits erwähnt, sehr stark vom ethnischen Hintergrund abhängt. Da in der vorliegenden Studie lediglich Proben von Menschen kaukasischen Hintergrunds verwendet wurden, lassen sich selbstverständlich nur die SNPs identifizieren, die auch innerhalb der kaukasischen Bevölkerung vorkommen.

Gen	SNP	Genotyp	CH		SAH	
			n	(%)	n	(%)
RIG-I	SNP1	TT	203	100	118	99
		TC	0	0	1	1
		CC	0	0	0	0
	rs3609	AA	156	81	95	81
		AG	33	17	20	17
		GG	3	2	3	3
	rs56309110	CC	114	61	86	77
		CA	57	31	21	19
		AA	15	8	5	5
	rs144957148	AA	194	99	113	100
		AG	1	1	0	0
		GG	0	0	0	0
MDA5	rs11897697	TT	142	99	130	98
		TG	2	1	1	1
		GG	0	0	1	1
	SNP2	GG	159	99	143	100
		GA	0	0	0	0
		AA	1	1	0	0
LGP2	SNP3	GG	142	99	150	100
		GA	2	1	0	0
		AA	0	0	0	0
	rs4796770	GG	146	100	153	99
		TG	0	0	0	0
		TT	0	0	1	1

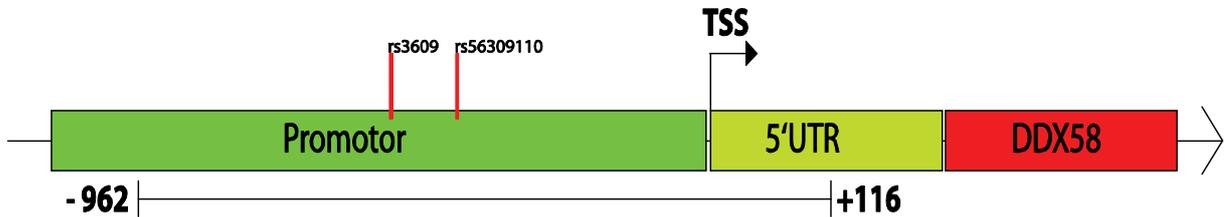
**Tabelle 8 Genotypverteilungen in der Gruppe der chronischen Patienten (CH) und spontan ausgeheilten Patienten (SAH)**

Dargestellt ist die Anzahl der einzelnen Genotypen mit den jeweiligen Frequenzen für alle gefundenen SNPs.

### 3.3.5. Assoziation der Polymorphismen mit den Untersuchungsgruppen

Um herauszufinden, ob einzelne Polymorphismen eine Assoziation zu den beiden phänotypischen Ausprägungsformen „chronisch krank“ und „spontan ausgeheilt“ haben, wurden nun die Häufigkeiten einzelner Polymorphismen zwischen den Untersuchungsgruppen verglichen. Da die neu identifizierten SNPs allesamt MAF von unter 1 % haben, sind diese nicht in die Untersuchung eingegangen.

Von den bereits bekannten SNPs hatten zwei MAF von über zehn Prozent. Sowohl rs3609 als auch rs56309110 liegen im Promotor von RIG-I. Mit 498 bp für rs3609 und 432 bp liegen beide SNPs relativ weit vor der TSS.



**Abb.12 Position der SNPs innerhalb der Promotoren**

Dargestellt ist unter den Schemazeichnungen ein Bereich, der die sequenzierte Region repräsentiert sowie die Position der beiden SNPs in rot darüber.

SNP ID und Allele		Allel Verteilung (%)			p-Wert	OR (95 % KI)	
		CO	CH	SAH			
RIG-I	rs3609 A/G	A	85,0	89,8	90,1	1	0,9689
		G	15,0	10,2	9,9		(0,563 – 1,668)
	rs56309110 C/A	C	83,3	76,6	86,2	<b>0,0056</b>	1,901
		A	16,7	24,4	13,8		(1,213 – 2,977)

**Tabelle 9 Allelfrequenzanalyse**

Allelfrequenzen der SNPs in Individuen mit chronischer Hepatitis (CH), spontan ausgeheilter Hepatitis (SAH) und einer Kontrollpopulation (CO). Als Kontrolle wurden die Daten aus der HapMap-CEU Population verwendet. Die Ermittlung der statistischen Signifikanz erfolgte mittels exaktem Test nach Fisher. OR = Odds ratio, KI = Konfidenzintervall.

Um mögliche Risiko-Allele zu identifizieren wurden aus den bekannten Genotypfrequenzen die Allelfrequenzen berechnet. Diese Allelfrequenzen wurden zwischen den beiden Versuchsgruppen „chronisch“ und „spontan ausgeheilt“ verglichen. Vergleichend sind die Allelfrequenzen der HapMap-CEU-Population dargestellt. Unterschiede in den Versuchsgruppen wurden

mithilfe des exakten Tests nach Fisher auf ihre Signifikanz überprüft. Dargestellt sind der p-Wert und die jeweiligen OR mit den 95 %-Konfidenzintervallen.

Für rs3609 ergibt sich kein Unterschied der Allelfrequenzen in den beiden Vergleichsgruppen. Es fällt jedoch auf, dass in beiden Gruppen die Frequenz des selteneren Allels geringer als in der Kontrollgruppe ist.

Für rs56309110 ergibt sich eine MAF von 24,4 % in der chronischen Untersuchungsgruppe und 13,8 % in der spontanen Untersuchungsgruppe. Dieser Unterschied ist statistisch signifikant bei einer OR von 1,901 (95 % KI: 1.213 - 2.977). Dies bedeutet, dass es sich bei dem selteneren Allel A um ein Risiko-assoziiertes Allel handelt, das mit dem chronischen Verlauf der HCV Infektion korreliert.

### *3.3.6. Statistische Analyse der Assoziation von rs56309110*

Weiterhin wurde für rs56309110 analysiert inwiefern es sich bei der Assoziation um einen dominanten Effekt handelt. Dazu wurden in der Tabelle noch einmal die Allelfrequenzen dargestellt, die einen deutlich signifikanten Unterschied zeigen. Dieser Unterschied zeigt sich auch bei der Verteilung der Genotypen.

Um nun herauszufinden, ob der Effekt dominant ist, wurde der Genotyp CC mit dem heterozygoten Genotyp CA verglichen. Dabei zeigt sich, dass der Unterschied auch zwischen den CC Homozygoten und den CA Heterozygoten statistisch signifikant ist. Die Wahrscheinlichkeit ist demnach für CC Homozygote etwa doppelt so groß die Infektion spontan auszuheilen (bei einem p-Wert von  $1,4 \times 10^{-2}$ ). Dieses Ergebnis bestätigt sich auch, wenn man die CC Homozygoten mit allen Trägern eines A Allels vergleicht (bei einem p-Wert von  $7,3 \times 10^{-3}$ ). Der Unterschied ist dabei nur minimal größer. Das bedeutet, dass die Wahrscheinlichkeit der Ausheilung eines CC Homozygoten auch im Vergleich zu allen Trägern eines A Allels etwa doppelt so groß ist.

Daraus lässt sich schlussfolgern, dass es sich bei dem selteneren Allel A um ein dominantes Risikoallel handelt, während der protektive Effekt des C-Allels rezessiv ist. Es reicht also bereits ein einzelnes A Allel aus, um das Risiko einer chronischen Infektion deutlich zu erhöhen. Dagegen ergibt sich beim Vergleich

der Genotypen CA und AA kein Unterschied (OR = 0,91, p-Wert = 1,0). Das wiederum bedeutet in analoger Weise, dass durch die Akquise eines weiteren A Allels das Risiko nicht signifikant weiter steigt.

<b>Analysierte Merkmale</b>	<b>CH</b>	<b>SAH</b>	<b>p-Wert</b>	<b>OR (95% KI)</b>
C	285 (76,6 %)	193 (86,2 %)	0,0056	1,901
A	87 (24,4 %)	31 (13,8 %)		(1,213 – 2,977)
CC	114 (61,3 %)	86 (76,8 %)	0,022	
CA	57 (30,6 %)	21 (18,8 %)		
AA	15 (8,1 %)	5 (4,5 %)		
CC	114 (66,7 %)	86 (80,4 %)	0,0139	0,4884
CA	57 (33,3 %)	21 (19,6 %)		0,2752-0,8666
CC	114 (61,3 %)	186 (87,7 %)	0,0073	0,4787
CA oder AA	72 (38,7 %)	26 (12,3 %)		0,2821-0,8123

**Tabelle 10 Analyse der Allelfrequenzen, Genotypfrequenzen und der kombinierten Genotypfrequenzen**

Die Tabelle zeigt die berechneten Frequenzen der Allele, Genotypen, der für CC Homozygoten im Vergleich zu den CT Heterozygoten und der CC Homozygoten im Vergleich mit allen Trägern eines A-Allels für rs56309110. Sowohl die Allelfrequenzanalyse als auch die Analyse der CC-Genotypverteilung erfolgte mit dem exakten Test nach Fisher. Für die Auswertung der Genotypfrequenzanalyse wurde der Chi-Quadrat-Test verwendet.

### **3.4. Auswirkungen von rs56309110 auf die Promotorfunktion**

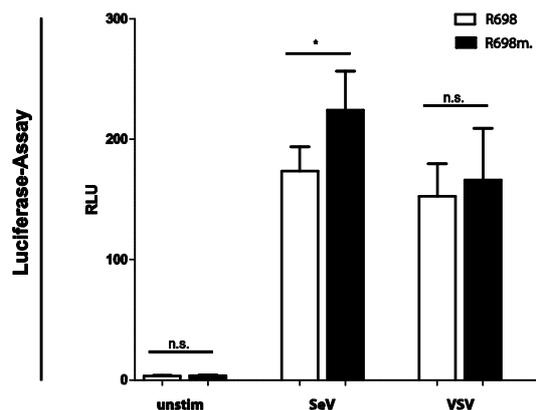
Im Anschluss an die Analyse der Sequenzierdaten wurde getestet, ob der Polymorphismus, der in der statistischen Analyse einen signifikanten

Unterschied ergab, auch Konsequenzen auf die Promotorfunktion hat. Dazu wurde die Region des SNP mithilfe des „MatInspectors“ auf potentielle TFBS untersucht.

Dabei zeigte sich, dass rs56309110 in einer Region liegt, die laut Vorhersage nicht direkt Teil einer TFBS ist. Dennoch wurde das bereits beschriebene Konstrukt R698 an der entsprechenden Stelle mutiert und beide Konstrukte in dem etablierten Luciferase-System getestet. Aufgrund der experimentellen Machbarkeit wurden in diesem System anstelle von HCV das Sendai Virus sowie das Vesicular Stomatitis Virus gewählt. Von beiden ist bekannt, dass sie RIG-I-abhängig erkannt werden und eine effektive antivirale Antwort induzieren.

Das mutierte Promotorkonstrukt „R698m.“ trägt im Bereich des entsprechenden Polymorphismus homozygot das seltenere Allel A, das in der chronischen Gruppe häufiger vorkommt und damit einen Risikofaktor für die Chronifizierung der HCV Infektion darstellt. R698 beinhaltet das häufigere Allel C homozygot.

Experimentell zeigte sich, dass die Luciferase Aktivität beider Konstrukte nach der Stimulation sowohl mit SeV als auch mit VSV deutlich ansteigt. Beim Vergleich des Wildtyp-Konstrukts mit dem mutierten Promotorkonstrukt ergibt sich nach der Stimulation mit SeV eine etwas erhöhte Promotoraktivität für das mutierte Konstrukt. Bei VSV zeigt sich kein signifikanter Unterschied.



### Abb.13 Vergleich der Promotoraktivität nach Mutagenese

1205Lu-Zellen wurden mit den jeweiligen Promotorkonstrukten transfiziert und nach 24 h für 1 h mit den SeV und VSV inkubiert. Es wurden jeweils Triplikate untersucht. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Grundgesamtheit aus drei unabhängigen Experimenten an. RLU = Relative Luciferase Einheiten; MW  $\pm$  SEM; n.s. =  $p > 0,05$ , \* =  $p < 0,05$ .

## 4. Diskussion

### 4.1. Zusammenfassung der experimentellen Befunde

In der vorliegenden Arbeit wurden funktionelle Promotorregionen der RLHs RIG-I, MDA5 und LGP2 identifiziert. Weiterhin wurden diese Regionen für RIG-I und MDA5 *in silico* auf das Vorhandensein von Transkriptionsfaktorbindungsstellen analysiert und ihr Ansprechen auf eine Reihe von Transkriptionsfaktoren experimentell ermittelt. Zudem wurde durch Sequenzieren einer größeren Kohorte von Hepatitis C Patienten das Vorkommen von Gen-Polymorphismen in diesen Promotorregionen überprüft. Die führende Fragestellung bei dieser Untersuchung war, ob es Polymorphismen gibt, die mit dem Ausgang einer HCV Infektion assoziiert sind.

Die identifizierten Promotorregionen lagen für RIG-I (-500 bis +198), MDA5 (-399 bis +201) und LGP2 (-1021 bis +148) im Bereich des Transkriptionsstarts. Es gelang nach Klonierung und Transfer in Luciferasereporterkonstrukte für diese Promotoren eine vermehrte Expression nach Stimulation mit pIC nachzuweisen.

Ein Screening mit potentiell relevanten Transkriptionsfaktoren ergab für den RIG-I Promotor funktionelle Bindungsstellen für IRF1, 2, 3, 7, NF- $\kappa$ B und Foxo3a. Der MDA5 Promotor hat funktionelle Bindungsstellen für IRF1, 2, 3, 7 und NF- $\kappa$ B. Dabei reagierte RIG-I stark auf NF- $\kappa$ B und nur schwach auf IRF2, während dies bei MDA5 umgekehrt ist.

Durch die weiteren vorhergesagten Transkriptionsfaktoren NFATc4, MZF1 oder AP1 ließen sich die getesteten Reporterkonstrukte durch alleinige Überexpression nicht anschalten.

Die Überexpression eines konstitutiv aktiven Foxo3a kann die IRF-3 vermittelte Hochregulation des RIG-I Reporterkonstrukts inhibieren. Foxo3a ist damit ein Suppressor der RIG-I Expression. Es gibt vier potentielle Foxo3a

Bindungsstellen innerhalb der ersten 500 Basen des RIG-I Promotors, von denen die erste und mindestens eine weitere funktionell aktiv zu sein scheinen. Foxo3a inhibiert ebenso die basale IP-10 Produktion in 1205Lu-Zellen, kann aber die VSV-induzierte IP-10 Produktion nicht wesentlich reduzieren.

In den Promotorregionen von RIG-I, MDA5 und LGP2 konnten insgesamt acht Polymorphismen gefunden werden, von denen fünf bereits vorbeschrieben waren und drei bisher nicht vorbeschrieben sind. Von diesen haben alle bis auf rs56309110 und rs3609 in RIG-I MAF von weniger als 1 %.

Die Häufigkeit des selteneren Allels A von rs56309110 in RIG-I war dabei signifikant häufiger in der Gruppe von Patienten mit chronischer Hepatitis C zu finden, als in der Gruppe der Patienten mit spontan ausgeheilter Hepatitis C (24,4 % versus 13,8 %,  $p < 0,0056$ , OR 1,9). Damit konsistent zeigte sich auch ein statistisch signifikanter Unterschied in der Genotypverteilung für rs56309110 zwischen Patienten mit chronischer Hepatitis C und Patienten mit spontan ausgeheilter Hepatitis C (siehe Tabelle 10). Damit ist das A Allel an rs56309110 im Falle einer Infektion mit HCV mit einem erhöhten Risiko für eine chronische Hepatitis assoziiert. Der direkte experimentelle Vergleich der beiden Allele von rs56309110 in die Basen -500 bis +198 des RIG-I Promotors umfassenden Luciferasereporterkonstrukten zeigte einen Trend zu erhöhter Expression von RIG-I nach Infektion mit Sendai Virus und VSV in Anwesenheit des A Allels. Ob es sich bei diesem SNP nur um einen Assoziationsmarker oder um eine ursächliche Variation handelt, ist daher nicht zu entscheiden.

## **4.2. Betrachtung der Ergebnisse im Kontext aktueller Literatur**

### *4.2.1. Identifikation funktioneller Promotorregionen*

Die Initiierung der Transkription ist ausschlaggebend dafür, ob ein Gen exprimiert wird und wie viel mRNA gebildet wird. Der Promotor ist die Sequenz, die diesen Prozess steuert und damit am Anfang eines transkriptionell regulierten Zellstoffwechsels steht.

Wie entscheidend das Expressionsniveau für die Funktion der RLH ist, wird zum einen dadurch deutlich, dass die RLH zu den am stärksten Interferon-abhängig regulierten Proteinen überhaupt gehören (Samarajiwa, Forster, Auchetl, & Hertzog, 2009). Das Expressionsniveau der RLH wiederum ist ein direkter Indikator für den Erfolg der Immunabwehr gegen Viren, wie etwa das HCV (Dill et al., 2011). Zum anderen bestätigt dies auch die Tatsache, dass Viren die bereits in der Einleitung erwähnten Evasions-Mechanismen konservieren, um das Expressionsniveau der RLH zu reduzieren und so der effektiven Immunabwehr zu entkommen.

Dafür, dass die Promotoren der RLH für eine effektive antivirale Immunantwort so entscheidend sind, gibt es bisher nur sehr wenige Erkenntnisse über ihre Charakteristika. Das in dieser Hinsicht noch am besten untersuchte Gen ist RIG-I. In einer Veröffentlichung von 2007 wurde ein Vektor von 1902 *upstream*-Basen Länge kloniert, der die Eigenschaften eines funktionellen Promotors aufweist (Z. Z. Su et al., 2007). In einer weiteren Veröffentlichung wurde dies für einen etwas kürzeren Vektor von 1,3 kb bestätigt (Kimura et al., 2012). Darin erfolgte in humanen Keratinozyten nach der Stimulation mit pIC eine Steigerung der Promotoraktivität auf das 4-5-fache. Auch die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse stützen diese Beobachtung. Hier konnten in der humanen Melanomzelllinie 1205Lu in unterschiedlichen Promotorkonstrukten von 140-700 bp Länge, Steigerungen um das 2-4-fache nach Stimulation mit pIC registriert werden.

Für MDA5 gibt es bisher keine Veröffentlichungen, die sich explizit auf dessen transkriptionelle Regulation beziehen. Der in dieser Arbeit beschriebene Vektor ist demnach der erste, für den sich Eigenschaften eines funktionellen Promotors nachweisen lassen. In 1205Lu-Zellen war die basale Expression des Reportergens geringer als bei RIG-I. Die Steigerung der Aktivität nach Stimulation mit pIC war jedoch genau wie bei RIG-I in dem Bereich des 3-4-fachen des Basalwerts.

Auch für das humane LGP2 gibt es noch keine Daten zu einem möglichen Promotor. In einer Arbeit wurde jedoch der LGP2 Promotor einer

Großzahnflunder kloniert, der funktionell dem in dieser Arbeit dargestellten Konstrukt ähnelt (Hikima et al., 2012).

Insgesamt lässt sich feststellen, dass sowohl die Zusammenschau der bisherigen Literatur als auch die Interpretation der eigenen Ergebnisse den Schluss zulässt, dass die Bereiche direkt *upstream* der TSS der RLH wesentlich an der Regulation beteiligt sind. Demnach erscheint ein Bereich von 1 kb sinnvoll und ausreichend, um wichtige Mechanismen der Regulation zu entschlüsseln. Aufgründessen wurde dieser Bereich im zweiten Teil der Arbeit auch für die Sequenzierung und die Suche nach Polymorphismen verwendet.

#### 4.2.1.1. Identifikation beteiligter TF

Zu den an der transkriptionellen Regulation von RLH beteiligten Transkriptionsfaktoren und insbesondere deren Bindungsstellen innerhalb der Promotoren gibt es nur wenige Daten. Die für den RIG-I Promotor durchgeführte *in silico* Vorhersage von Bindungsstellen liefert also erste wertvolle Informationen zur Aufdeckung der Faktoren. Auch wenn sich durch die Anordnung und Zusammenlagerung der Bindemotive keine eindeutige Evidenz für einen in seiner Anordnung konservierten Promotor ergab, fanden sich dennoch kanonische Bindemotive, die in allen überprüften Spezies konserviert waren. Darunter zum Beispiel Bindemotive für die IRFs, STAT1/2, NF- $\kappa$ B und AP1. Dies lässt vermuten, dass diese Transkriptionsfaktoren an der Regulation von RIG-I beteiligt sind. Durch die Koexpression der Transkriptionsfaktoren mit den jeweiligen Reporterplasmiden konnte diese Vermutung für die IRFs und NF- $\kappa$ B bestätigt werden.

Bisher erschienene Daten zur transkriptionellen Regulation der RLH beschränken sich im Wesentlichen auf wenige Veröffentlichungen zum RIG-I Promotor (Kimura et al., 2012; Z. Z. Su et al., 2007). Die bereits erwähnte Publikation von Hikima et al. beschreibt zwar eine regulatorische Rolle von IRF3 bei der Transkription von LGP2. Allerdings wurden die Luciferase-Versuche zu diesen Daten allesamt in Zelllinien der Großzahnflunder durchgeführt. Für die Regulation des humanen LGP2 sowie MDA5 sind also bislang keine Transkriptionsfaktoren experimentell untersucht.

Zur Regulation von RIG-I ist erstmals 2007 die bereits erwähnte Veröffentlichung von Su et al. erschienen. Darin wird IRF1 eine zentrale Rolle für die Regulation von RIG-I zugeschrieben. Der Bereich von -166 bis -87 wurde als derjenige beschrieben, der sowohl für die basale Expression als auch die IFN-abhängige Stimulation verantwortlich ist. Zudem konnte ein potentes *interferon-sensitive response element* an der Position -17 bis -4 identifiziert werden. Diese Beobachtung wurde durch weitere Veröffentlichungen in etwas kürzeren Vektoren bestätigt (Soye, Trottier, Richardson, Ward, & Miller, 2011).

Inzwischen wurde auch für IRF2 in B-Zellen eine positiv-regulatorische Rolle auf RIG-I postuliert (Masumi et al., 2010). Dies würde gegen die bisherige Annahme sprechen, nach der IRF2 bei der Regulation von IFN-abhängigen Genen antagonistisch zu IRF1 wirkt (Harada et al., 1993). IRF2 bindet nach dem bisherigen Kenntnisstand die gleiche TFBS, verfügt jedoch nicht über die gleiche aktivierende Domäne wie IRF1. Insofern muss man davon ausgehen, dass es die Funktion eines kompetitiven Inhibitors hat. Es wird ebenso IFN-abhängig, jedoch später als IRF1 exprimiert und hat zudem eine längere Halbwertszeit. Dies könnte darauf hinweisen, dass über diesen Mechanismus die Immunantwort gedrosselt werden kann.

Es gibt jedoch auch Studien, die in der zentralen Region von IRF2 eine latent aktivierende Domäne beschreiben (Yamamoto, Lamphier, Fujita, Taniguchi, & Harada, 1994). Dies könnte sowohl die von Masumi et al. beschriebene, als auch die in dieser Arbeit dargestellte Beobachtung erklären, nach der IRF2 ebenfalls eine die Expression stimulierende Wirkung auf RIG-I hat. Diese ist zwar im Vergleich mit der Wirkung von IRF1 geringer, jedoch nicht antagonistisch.

Zusätzlich konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass auch NF- $\kappa$ B einen positiven Einfluss auf die Expression von RIG-I hat. Diese Erkenntnis entspricht insofern der Erwartung, als dass die Aktivierung von NF- $\kappa$ B im Zuge der antiviralen Antwort auch zu einer vermehrten Expression anderer proinflammatorischer Proteine, wie zum Beispiel des Zytokins IL6, führt.

Zur transkriptionellen Regulation von MDA5 gibt es bisher noch keine Veröffentlichungen. Bekannt ist jedoch, dass die Expression von MDA5 genau

wie die von RIG-I Interferon-abhängig und nach Virus-Infektion hochreguliert wird. Dementsprechend liegt eine Beteiligung zumindest teilweise übereinstimmender TF nahe. In dieser Arbeit wurde daher auch der Effekt, der mittels der Vorhersage für RIG-I ermittelten TF, auf den MDA5 Promotor untersucht. Dies geschah mit Hilfe eines Koexpressionversuchs mit dem Reporterkonstrukt des Promotors. Es konnte gezeigt werden, dass die TF IRF1, IRF2, IRF3 und IRF7 auch auf den MDA5 Promotor eine stimulatorische Wirkung haben. Interessanterweise war die Wirkung von IRF2 sogar deutlich stärker als bei RIG-I. Dies spricht zusätzlich dafür, dass IRF2 entgegen der bisherigen Annahme durchaus auch als transkriptioneller Stimulator eine Rolle spielt. Außerdem fiel auf, dass sich bei der Koexpression des Promotors mit NF- $\kappa$ B nur eine geringe Veränderung der Luciferase-Aktivität ergab. Dies ist ein interessanter Hinweis auf eine differentielle Regulierung der beiden funktionell ähnlichen Helikasen.

Grundsätzlich müssen einige Einschränkungen zur Interpretation der experimentellen Ergebnisse angeführt werden. Wie bereits erwähnt, ist die transkriptionelle Regulation ein komplexer Prozess. Der Promotor beschränkt sich ausdrücklich nicht auf den Bereich kurz vor der TSS eines Gens. Die hier erhobenen Befunde beziehen sich also lediglich auf mögliche Bindemotive innerhalb des etwas arbiträr gewählten Sequenzabschnitts der Promotorkonstrukte. Außerdem kann eine direkte Bindung des TF an das Bindemotiv mittels dieser Methode nicht nachgewiesen werden. Dies ist insbesondere relevant bei den TF IRF3 und IRF7, da diese bekanntermaßen wichtige transkriptionelle Stimulatoren des Interferon-Gens sind. Über die autokrine Wirkung des Interferons wäre demnach ein nicht zu vernachlässigender indirekter Effekt über den IFN-Rezeptor, den JAK/STAT Signalweg und den ISGF3 Transkriptionsfaktorenkomplex denkbar.

Bezüglich der Bindungsvorhersage muss weiterhin eingeschränkt werden, dass das Programm „*MatInspector*“ nicht in der Lage ist, Aussagen über die Art der Regulation zu treffen. Insbesondere ist daher nicht bekannt, ob ein TF einen die Transkription stimulierenden, oder einen die Transkription hemmenden Effekt hat. Dies ist insofern relevant, als in der hier präsentierten Vorhersage auch wenig vorbeschriebene TF vorkamen, von denen unklar ist, in welche Richtung

sie ein Gen regulieren würden. Daher müssen diese Faktoren weiterhin in einer stimulierten Bedingung getestet werden, ähnlich wie dieses für den TF Foxo3a durchgeführt wurde.

#### 4.2.1.2. Regulation der RIG-I Expression durch Foxo3a

Neben den IRF und STATs, deren Beitrag zur Regulation inflammatorischer Proteine bereits bekannt ist, sind in der computergestützten Vorhersage der TFBS auch einige Bindemotive für TF aufgetaucht, die bislang deutlich weniger Beachtung in diesem Gebiet fanden. Ein Beispiel dafür ist Foxo3a, aus der Familie der *forkhead box proteins*.

Foxo3a ist ein TF, dessen Rolle in der Regulation nicht-immunologischer, zellulärer Funktionsketten bereits untersucht wurde. Zuerst und am sorgfältigsten untersucht ist seine Rolle als Zellzyklus-Regulator. Dabei wird Foxo3a vor allem im PI3-Kinase-Akt-IKK Signalweg durch Akt, aber auch durch andere Kinasen phosphoryliert und daraufhin aus dem Zellkern ausgeschleust und somit unwirksam gemacht. Diese Signalwege werden insbesondere durch Wachstumsfaktoren wie EGFR, *insuline-like growth factor*, Insulin, aber auch oxidativen Stress aktiviert (Hedrick, 2009). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von Foxo3a während der Tumorgenese, die maligne Transformation, die Tumorprogression sowie die Angiogenese fördert (Greer & Brunet, 2005). Daher ist Foxo3a ein interessantes Ziel für die gezielte Tumorthherapie (Yang & Hung, 2009).

In den letzten zwei Jahren wurde auch eine Rolle von Foxo3a bei der Regulation immunologischer Signalwege beschrieben. In ersten Studien wurde dabei vor allem die Bedeutung für die Regulation von Überleben und Apoptose von B-Zellen (Yusuf, Zhu, Kharas, Chen, & Fruman, 2004) sowie von CD4+ Gedächtnis-T-Zellen (Riou et al., 2007) beschrieben. Inzwischen konnten auch in Zellen des angeborenen Immunsystems wichtige Funktionen von Foxo3a nachgewiesen werden. Zum Beispiel wurde gezeigt, dass Foxo3a in dendritischen Zellen durch CTLA-4-Stimulation in den Zellkern lokalisiert und dort die Produktion von IL-6 und TNF $\alpha$  inhibiert und somit die Immunreaktion bremst (Dejean et al., 2009).

Kürzlich wurde ein Foxo3-IRF7 einbeziehender regulatorischer Kreislauf beschrieben, in dem Foxo3a durch die transkriptionelle Repression von antiviralen Effektorproteinen die Entzündungsreaktion limitiert und damit Folgeschäden verhindert (Litvak et al., 2012). Die Daten beruhen auf der Auswertung eines globalen Gen-Expressions-Profiles. Dabei wurden die mRNA Mengen von Wildtyp Makrophagen mit denen von Makrophagen aus Foxo3<sup>-/-</sup> Mäusen verglichen. Dies erfolgte sowohl in einer unstimulierten Bedingung als auch nach Stimulation mit pIC. Bezeichnenderweise fand sich auch DDX58, das RIG-I kodierende Gen, unter den signifikant veränderten Genen.

Dies ist besonders interessant, da in der vorliegenden Arbeit über einen anderen Ansatz ein ähnliches Ergebnis gefunden werden konnte. So konnte gezeigt werden, dass die Koexpression eines konstitutiv aktiven Foxo3a-Vektors, die Aktivität des RIG-I Promotors deutlich hemmt. Dies zeigt sich durch eine Reduktion der Luciferase-Aktivität nach Expression des proinflammatorischen TF IRF3.

In dieser Arbeit konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Überexpression von Foxo3a auch funktionelle Auswirkungen auf die Produktion des Chemokin IP10 in *Iu* Zellen hat. Dies konnte entgegen der Erwartung allerdings nur in den nicht mit Virus stimulierten Bedingungen beobachtet werden. In Virus-infizierten Zellen stieg die IP10 Produktion unabhängig von der Überexpression von Foxo3a auf ähnliche Werte an. Diese Beobachtung wird in der Veröffentlichung von Litvak et al. bestätigt. Auch dort ist in der unstimulierten Bedingung das Verhältnis von mRNA in den Wildtyp und den Foxo3-null Zellen deutlich größer, als in der stimulierten Bedingung. Daraus lässt sich insgesamt ableiten, dass Foxo3 auch zur Kontrolle der RIG-I Expression in ruhenden Zellen einen Beitrag leistet.

#### *4.2.2. Assoziation von genetischen Polymorphismen in RIG-I mit dem Verlauf einer HCV Infektion*

Die großen Unterschiede beim Verlauf der HCV Infektion sowie die Häufigkeit und Relevanz der Erkrankung machen es zu einem erstrebenswerten Ziel, die zugrundeliegenden Mechanismen aufzudecken. Tatsächlich wurde in den

letzten Jahren eine ganze Reihe von Erkenntnissen gewonnen, die die wichtige Rolle von SNPs für den Verlauf der HCV Infektion unterstreichen und in diese Richtung führen. So konnten bereits mehrere SNPs gefunden werden, die mit der spontanen Ausheilung der Infektion assoziiert sind:

1. rs12979860 → 3 kb *upstream* des IL28b Gens (Thomas et al., 2009)
2. rs2069707 → 764 bp *upstream* des IFN- $\gamma$  Gens (Huang et al., 2007)
3. rs3212227 → 3'UTR des IL-12b Gens (Houldsworth et al., 2005)

Darüber hinaus konnten in der Region des IL28b Gens weitere SNPs gefunden werden, die mit dem Ansprechen auf die Interferon plus Ribavirin Therapie korreliert sind (Suppiah et al., 2009). Auch für das Fortschreiten einer chronischen Hepatitis C zu einem Hepatozellulären Karzinom ließ sich bereits eine genetische Korrelation feststellen. Sie liegt in der Region des MICA-Gens auf Chromosom 6 (V. Kumar et al., 2011).

Die genannten Veröffentlichungen zeigen deutlich, dass SNPs wichtige Faktoren für den Ausgang einer HCV Infektion sind. Interessanterweise lässt sich dabei beobachten, dass die Polymorphismen keine nicht-synonymen SNPs sind, sondern in den angrenzenden Bereichen wichtiger Gene liegen. Dies ist insofern nicht verwunderlich, als dass eine Analyse aller bislang veröffentlichten *trait-associated-SNPs* (TAS) eine Konzentration dieser in regulatorischen DNA Abschnitten ergab (Maurano et al., 2012). Vor diesem Hintergrund ist es plausibel, dass bei der hier durchgeführten Untersuchung ein Polymorphismus gefunden werden konnte, der vor der TSS von RIG-I liegt und mit der Chronifizierung der HCV Infektion assoziiert ist. Die Position der SNPs in Bezug zur TSS ist dabei variabel. In den erwähnten Veröffentlichungen konnten relevante Polymorphismen bis zu 3 kb bis 159 bp vor der TSS gefunden werden. Der in dieser Arbeit gefundene SNP liegt 432 bp vor der TSS.

Die Tatsache, dass der Polymorphismus im RIG-I Promotor liegt, ist bemerkenswert. Denn obgleich alle der untersuchten Gene potentiell relevant für die HCV Infektion sind, ist der Einfluss von RIG-I beim Verlauf der Infektion vermeintlich führend (Foy et al., 2005).

#### 4.2.3. Die Bedeutung von trait-associated SNPs

Seit der Publikation der ersten GWAS im März 2005 ist die Zahl derartiger Publikationen bis zum Ende des Jahres 2012 in ausnahmslos jedem darauffolgenden Quartal eines Jahres gestiegen. Allein im zweiten Quartal 2012 waren es laut der Erhebung des *National Human Genome Research Institute* bereits 1350 Veröffentlichungen. In diesen Veröffentlichungen konnten insgesamt etwa 1300 Loci und etwa 200 assoziierte Erkrankungen gefunden werden. Trotz dieser Flut an genetischen Daten, gelang es nur bei einer Handvoll dieser Loci, die kausalen Varianten zu identifizieren (Cooper & Shendure, 2011), geschweige denn eine klinische Konsequenz daraus abzuleiten. Das liegt vor allem daran, dass nur in seltenen Fällen der Veröffentlichung eines TAS ein detailliertes *fine mapping* folgt. Dementsprechend werden die kausalen Varianten innerhalb eines assoziierten Haplotyp Blocks meist nicht identifiziert (Edwards, Beesley, French, & Dunning, 2013).

#### 4.2.4. Einordnung der statistischen Signifikanz und der Effektstärke

Bei Assoziationsstudien in Kandidatengenen ist eine einheitlich ethnische Herkunft der Studienpopulationen vorteilhaft. Das liegt daran, dass die Verteilung von Polymorphismen erheblich von der geografischen Herkunft der Versuchspersonen abhängt (Genomes Project et al., 2012). Diesem Umstand wurde in dieser Studie Rechnung getragen, indem die Teilnehmer in der behandelten Studienpopulation allesamt kaukasischen Ursprungs sind. Allerdings muss eingeräumt werden, dass auch innerhalb dieser Population unbekannte Stratifizierungen möglich sind, die das Ergebnis der Studie über *Confounding* Effekte verzerren können. Aus diesem Grund wird für die Signifikanz von Assoziationsstudien gefordert, dass sie in einer unabhängigen Stichprobe wiederholt werden müssen. Dies steht für die hier präsentierte Assoziation noch aus.

Werden bei Assoziationsstudien eine Vielzahl von Loci in einer Studienpopulation getestet, nimmt unweigerlich die Häufigkeit von Fehlern 1.

Art zu (Peters, Rodin, de Boer, & Maitland-van der Zee, 2010). Diesem „*multiple testing problem*“ kann man zum Beispiel mit einer Bonferroni-Korrektur begegnen. Nach der Bonferroni-Korrektur wird der p-Wert der statistischen Signifikanz durch die Anzahl der getesteten Variablen geteilt. Dadurch sinkt der  $\alpha$ -Fehler, allerdings steigt gleichermaßen die Rate an falsch-negativen Ergebnissen.

Da sich in dieser Arbeit die auswertbaren SNPs mit MAF über 2 % ausschließlich auf RIG-I konzentrierten, wurden nur zwei Loki getestet. Dadurch ergibt sich auch nach der Bonferroni-Korrektur eine statistisch signifikante Assoziation für den Polymorphismus rs56309110.

Die durchschnittliche Effektstärke aller bisher publizierten *trait-associated* SNPs (TAS) liegt bei einer *odds-ratio* von 1,33 (Hindorff et al., 2009). Damit ist der Effekt, der in dieser Arbeit beschriebenen Assoziation mit der *odds-ratio* 1,9 als stark einzuschätzen. Vergleicht man die Effektstärken der genetischen Assoziationen jedoch mit anderen Umweltfaktoren, wie zum Beispiel dem Zusammenhang zwischen Alkoholkonsum und dem Fortschritt der Leberzirrhose (OR 15,0 (Corrao & Arico, 1998)), so muss man insgesamt konstatieren, dass es sich dabei um deutlich geringere Effekte handelt. Dies ist auch ein Grund dafür, warum sich das Wissen um genetische Assoziationen bisher nur selten gewinnbringend in den klinischen Ablauf implementieren lässt.

#### *4.2.5. Funktionelle Auswirkungen von rs56309110 auf die Promotorfunktion*

Die Regulation der Expression einzelner Gene ist auch ein halbes Jahrhundert nach Entdeckung der DNA noch ein Prozess, bei dem viele Fragen offen sind. Es gibt inzwischen gut etablierte Konzepte, die verdeutlichen, dass erst wenn mehrere an die DNA gebundene TF einen Komplex bilden, die Transkription begonnen wird. Welche TF an welche Sequenzen binden und inwiefern einzelne Basen diese Bindungen verändern, ist jedoch im Detail oft nicht bekannt.

Neben der Komplexität ist auch die Schwierigkeit bei der molekularbiologischen Untersuchung von Mechanismen der transkriptionellen Genregulation ein Grund für die Probleme bei deren Aufklärung. Denn im Gegensatz zu Genen, kann man bei Promotoren nicht sagen, wo sie anfangen und aufhören. Daher ist es unmöglich sie vollständig zu klonieren. Luciferasereporterkonstrukte bieten ein etabliertes Modell, um sich diesem Sachverhalt anzunähern. Die Schwächen liegen dabei nicht nur in der erwähnten Unvollständigkeit, sondern auch darin, dass die an der DNA *in vivo* vorkommenden Modifikationen in diesem Modell unbeachtet bleiben. Dies betrifft auch das Fehlen von Histonen und damit einer definierten Chromatinstruktur. Auch was die DNA-Konformation anbelangt, verhalten sich die kurzen Promotorsequenzen naturgemäß anders, als die Originalsequenzen. Alle diese Faktoren beschränken eine funktionelle Analyse von Promotoren *in vitro* und machen die Interpretation von Versuchsergebnissen schwierig.

Vor diesem Hintergrund erscheint es wenig verwunderlich, dass die Assoziationsstudien, bei denen SNPs in Promotorbereichen gefunden wurden, nur in einzelnen Fällen eine funktionelle Erklärung liefern können. Huang et al. gelang es für den von ihnen mit der spontanen HCV Remission assoziierten SNP rs2069707 eine funktionelle Erklärung zu finden. Der SNP liegt 764 bp vor der TSS des IFN- $\gamma$  Gens und innerhalb einer Bindesequenz für den TF HSF1. Dieser TF ist bekannt als Transkriptionsaktivator für Chaperone, die unter anderem auch bei einer Virusinfektion hochreguliert werden. Da der Promotor nach dem Einfügen der Punktmutation seine Aktivität 2-3-fach senkte, ist davon auszugehen, dass HSF1 durchaus auch als Transkriptionsaktivator für IFN- $\gamma$  infrage kommt.

Auch in der vorliegenden Arbeit wurde auf analoge Weise ein punktmutiertes Promotor-Plasmid hergestellt und im Luciferase-Assay getestet. Dabei ließ sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den jeweiligen Konstrukten ausmachen. Dafür kann es mehrere Gründe geben: Zum einen ist es möglich, dass die Änderung der Base *in vivo* einen Einfluss auf die DNA Konformation in diesem Bereich hat, die wiederum die Genexpression verändert. Dieser Einfluss wurde in dieser Arbeit nicht getestet. Zudem muss eingeräumt werden, dass bei den Experimenten zur Stimulation keine HCV verwendet wurden, sondern Viren

mit ähnlichen Eigenschaften, die als Modell für RNA-Viren etabliert sind. Nichtsdestotrotz ist es denkbar, dass durch die HCV Infektion ein leicht divergentes Profil von TF aktiviert wird, deren Effekt in dem gezeigten Experiment nicht abgebildet wird.

Weiterhin ist es ebenso denkbar, dass die hier beschriebene Assoziation sich zwar in einem gekoppelten Haplotyp-Block befindet, jedoch nicht selbst funktionell relevant ist. In dem Fall wäre der hier beschriebene Polymorphismus an einen weiteren funktionell relevanten Polymorphismus gekoppelt, der sich außerhalb des in dieser Arbeit untersuchten Bereiches befindet.

### **4.3. Ausblick und klinische Relevanz der Ergebnisse**

Wie bereits erwähnt, lässt sich das Wissen um genetische Assoziationen bestimmter Erkrankungen nur sehr selten gewinnbringend in deren klinische Behandlung umsetzen. Dies gilt nach wie vor auch für die chronische Hepatitis C. Nach der Entdeckung des IL28b – Locus (Thomas et al., 2009) war die Hoffnung groß, dass das auch als IFN- $\lambda$  bezeichnete IL28 aufgrund der höheren Selektivität auch therapeutisch einen Vorteil bringen könnte. Dafür gibt es bereits positive Hinweise. In der Studie von Muir et al. zeigte sich sowohl für mit IFN- $\alpha$  vorbehandelte Patienten als auch für Therapie-naive Patienten nach IFN- $\lambda$  Therapie eine deutliche Reduktion der HCV RNA bei insgesamt akzeptablem Nebenwirkungs-Profil (Muir et al., 2010). Die Bestimmung des IL-28 Genotyps wurde 2011 als prädiktiver Marker in die leitliniengerechte Diagnostik aufgenommen (European Association for the Study of the Liver 2011). Inzwischen ist durch den Vormarsch der DAAs die Therapie mit IFN (sei es IFN- $\alpha$  oder IFN- $\lambda$ ) in den neuen Leitlinien auf wenige Indikationen beschränkt und damit auch die Bedeutung des IL28 Locus in den Hintergrund gerückt.

Wenn sich die in dieser Arbeit gefundene Assoziation bestätigen lässt, könnte sie in ähnlicher Weise als prädiktiver Marker für eine spontane Ausheilung beziehungsweise eine Chronifizierung der Erkrankung verwendet werden. Dies wäre im Hinblick auf die Entscheidung für oder gegen eine Therapie nach einer Exposition mit dem Virus hilfreich. Allerdings muss eingeschränkt werden, dass

auch die Assoziation des rs56309110 Polymorphismus keine ausreichende Stärke besitzt, um allein Grundlage für eine Therapieentscheidung zu sein.

Auch wäre es interessant, die Assoziation in Patientenkollektiven mit positivem und fehlendem Ansprechen auf die Therapie zu überprüfen. Dies könnte dazu beitragen, dass rs56309110 gemeinsam mit den Polymorphismen am IL28b Locus eine noch bessere Vorhersage des Therapieerfolgs ermöglicht.

In den funktionellen Experimenten konnten Hinweise zur transkriptionellen Regulation der RLH gewonnen werden. Dies ist ebenso von klinischem Interesse. Inzwischen gibt es eine Reihe von Arbeiten, in denen gezeigt werden konnte, dass die Expressionslevel der RLH pathophysiologisch an einer Reihe von entzündlichen Erkrankungen, wie MS, Typ I Diabetes und SLE beteiligt sind (Downes et al., 2010; S. Tanaka, Aida, Nishida, & Kobayashi, 2013). In Zukunft wäre es daher denkbar, auch therapeutisch über die Regulation der RLH Expression ein gestörtes Gleichgewicht zwischen überschießender Entzündung und effektiver antiviraler Abwehr wiederherzustellen.

## 5. Zusammenfassung

Etwa 3 % der Weltbevölkerung sind mit dem Hepatitis C Virus infiziert. Bei den meisten Betroffenen führt eine Infektion zu einer chronischen Lebererkrankung mit deutlicher Einschränkung der Lebenserwartung. Einige Betroffene sind jedoch in der Lage das Virus spontan zu eliminieren. Die interindividuelle Varianz des Krankheitsverlaufs wird durch Polymorphismen in Genen der Immunabwehr gegen das HCV entscheidend beeinflusst.

In den letzten Jahren mehren sich die Hinweise, dass die RIG-I-*like*-Helikasen (RLH) als Mustererkennungsrezeptoren entscheidend an der Entwicklung einer antiviralen Immunantwort nach HCV Infektion beteiligt sind. Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe identifizierten eine SNP-Allel-Kombination, die für eine RLH (MDA5) mit gesteigerter Aktivität nach Ligandenbindung kodiert und mit einer erhöhten Chance des Ausheilens nach HCV Infektion assoziiert ist. Neben Polymorphismen mit direktem Einfluss auf die Proteinfunktion, könnten jedoch auch Polymorphismen, die das Expressionsniveau einer RLH verändern, die interindividuellen Unterschiede beim Verlauf der Infektion beeinflussen.

In der vorliegenden Arbeit wurden daher zunächst regulatorische Bereiche in den Promotorregionen der RLH RIG-I, MDA5 und LGP2 identifiziert und funktionell charakterisiert sowie im Rahmen einer Kohortenstudie darin nach Polymorphismen gesucht, die mit dem Krankheitsverlauf einer HCV Infektion assoziiert sind.

Die untersuchten Promotorregionen lagen für RIG-I (-500 bis +198), MDA5 (-399 bis +201) und LGP2 (-1021 bis +148) im Bereich des Transkriptionsstarts. Nach Klonierung und Transfer in Luciferasereporterkonstrukte zeigten sich diese Promotoren induzierbar durch Stimulation mit poly IC, einem Trigger des Interferonsignalwegs und Liganden für RIG-I und MDA5.

Nach Analyse der Promotorregionen auf Transkriptionsfaktorbindungsstellen mit Hilfe des Computerprogramms „*MatInspector*“ wurden potentiell relevante Transkriptionsfaktoren ausgewählt und experimentell getestet. Im RIG-I

Promotor fanden sich dabei Bindungsstellen für IRF1, 2, 3, 7, NF- $\kappa$ B und Foxo3a. Der MDA5 Promotor zeigte funktionelle Bindungsstellen für IRF1, 2, 3, 7 und NF- $\kappa$ B. Dabei reagierte RIG-I stark auf NF- $\kappa$ B und schwach auf IRF2, während sich bei MDA5 eine inverse Abhängigkeit zeigte.

Foxo3a inhibierte die IRF3-vermittelte Hochregulation des RIG-I Reporterkonstrukts und agiert damit als Suppressor der RIG-I Expression. Experimente mit trunkierten RIG-I Promotorkonstrukten zeigten dabei, dass von vier *in silico* vorhergesagten Foxo3a Bindungsstellen innerhalb der ersten 500 Basen des RIG-I Promotors, die erste und mindestens eine weitere funktionell aktiv sind.

Die Sequenzierung der identifizierten Promotorabschnitte von RIG-I, MDA5 und LGP2 in einer Kohorte von Patienten mit spontan ausgeheilter Hepatitis C Virus Infektion (n=127) und Patienten mit chronischer HCV Infektion (n=186) ergab einen statistisch signifikant assoziierten SNP (rs56309110) in der Promotorregion von RIG-I. Das an dieser Stelle seltenere Allel A war dabei signifikant häufiger in der Gruppe der chronisch erkrankten Patienten (24,4 % versus 13,8 %,  $p < 0,0056$ , OR 1,9). Die Auswertung der Genotypverteilung für rs56309110 ergab einen weiterhin statistisch signifikanten Unterschied bei heterozygoten Trägern des Allels A. Damit ist von einem dominanten Effekt des A Allels auszugehen.

Der direkte experimentelle Vergleich der beiden Allele von rs56309110 in Luciferasepromotorkonstrukten von RIG-I ergab nach Stimulation mit den Modellviren Sendai-Virus und *Vesicular Stomatitis Virus* einen leichten Trend zu gesteigerter Aktivität, jedoch keinen signifikanten Unterschied. Ob es sich bei diesem SNP nur um einen Assoziationsmarker, oder um eine ursächliche Variation handelt, ist daher noch nicht abschließend geklärt.

## Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

AP1	<i>Activator protein 1</i>
CARD	<i>Caspase activation and recruitment domain</i>
CMV	Zytomegalie-Virus
DC	Dendritische Zelle
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FADD	<i>Fas-Associated protein with Death Domain</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
<i>FKHD family</i>	<i>Forkhead domain family of TF</i>
Foxo3	<i>Forkhead box O3</i>
GWAS	<i>Genome-wide association study</i>
HCV	Hepatitis C Virus
HEK	<i>Human embryonic kidney cells</i>
HSF1	<i>Heat shock factor 1</i>
IFN	Interferon
IFNAR	Interferon- $\alpha/\beta$ Rezeptor
IKK	<i>I<math>\kappa</math>B kinase komplex</i>
IL	Interleukin
IP10	Interferon-gamma induziertes Protein 10
IRF	Interferon regulatorischer Faktor
ISG	Interferon-stimulierte Gene
LGP2	<i>Laboratory of genetics and physiology 2</i>
MAF	<i>Minor Allele Frequency</i>
MAVS	<i>Mitochondrial antiviral-signaling protein</i>
MDA5	<i>Melanoma Differentiation-Associated protein 5</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>

MS	Multiple Sklerose
MZF1	<i>Myeloid zinc finger protein 1</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NCR	<i>Non-coding region</i>
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T-cells</i>
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear factor kappa B</i>
ORF	<i>Open reading frame</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PRR	<i>Pattern-recognition Rezeptor</i>
RIG-I	<i>Retinoic acid-inducible gene 1 protein</i>
RIP1	<i>Receptor interacting protein 1</i>
RLH	RIG-I-like Helikasen
SeV	Sendai Virus
SLE	Systemischer Lupus Erythematodes
SOC	<i>Super Optimal Broth (+Glukose)</i>
SOCS-1	<i>Silencer of Cytokine Signaling 1</i>
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
STAT	<i>Signal transducers and activators of transcription</i>
TAS	<i>Trait-associated SNPs</i>
TBE-Puffer	Tris, Borsäure, EDTA
TBK1	<i>TANK-binding kinase 1</i>
TF	Transkriptionsfaktor
TFBS	Transkriptionsfaktorbindungsstelle
TRAF3	<i>TNF receptor-associated factor 3</i>
UTR	Untranslatierte Region
VSV	<i>Vesicular Stomatitis Virus</i>

## Quellenverzeichnis

- Ahmed, M., McKenzie, M. O., Puckett, S., Hojnacki, M., Poliquin, L., & Lyles, D. S. (2003). Ability of the matrix protein of vesicular stomatitis virus to suppress beta interferon gene expression is genetically correlated with the inhibition of host RNA and protein synthesis. *J Virol*, *77*(8), 4646-4657
- Alter, H. J., Purcell, R. H., Shih, J. W., Melpolder, J. C., Houghton, M., Choo, Q. L., & Kuo, G. (1989). 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*, *321*(22), 1494-1500
- Biron, C. A. (1997). Activation and function of natural killer cell responses during viral infections. *Curr Opin Immunol*, *9*(1), 24-34
- Chambers, T. J., Hahn, C. S., Galler, R., & Rice, C. M. (1990). Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu Rev Microbiol*, *44*, 649-688
- Cooper, G. M., & Shendure, J. (2011). Needles in stacks of needles: finding disease-causal variants in a wealth of genomic data. *Nat Rev Genet*, *12*(9), 628-640
- Corrao, G., & Arico, S. (1998). Independent and combined action of hepatitis C virus infection and alcohol consumption on the risk of symptomatic liver cirrhosis. *Hepatology*, *27*(4), 914-919
- Dane, D. S., Cameron, C. H., & Briggs, M. (1970). Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet*, *1*(7649), 695-698
- Darnell, J. E., Jr., Kerr, I. M., & Stark, G. R. (1994). Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science*, *264*(5164), 1415-1421
- Dejean, A. S., Beisner, D. R., Chen, I. L., Kerdiles, Y. M., Babour, A., Arden, K. C., . . . Hedrick, S. M. (2009). Transcription factor Foxo3 controls the magnitude of T cell immune responses by modulating the function of dendritic cells. *Nat Immunol*, *10*(5), 504-513
- Der, S. D., Zhou, A., Williams, B. R., & Silverman, R. H. (1998). Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *95*(26), 15623-15628
- Dill, M. T., Duong, F. H., Vogt, J. E., Bibert, S., Bochud, P. Y., Terracciano, L., . . . Heim, M. H. (2011). Interferon-induced gene expression is a stronger predictor of treatment response than IL28B genotype in patients with hepatitis C. *Gastroenterology*, *140*(3), 1021-1031
- Donnelly, R. P., Dickensheets, H., & O'Brien, T. R. (2011). Interferon-lambda and therapy for chronic hepatitis C virus infection. *Trends Immunol*, *32*(9), 443-450
- Downes, K., Pekalski, M., Angus, K. L., Hardy, M., Nutland, S., Smyth, D. J., . . . Todd, J. A. (2010). Reduced expression of IFIH1 is protective for type 1 diabetes. *PLoS One*, *5*(9)
- Edwards, S. L., Beesley, J., French, J. D., & Dunning, A. M. (2013). Beyond GWASs: illuminating the dark road from association to function. *Am J Hum Genet*, *93*(5), 779-797

- European Association for the Study of the Liver. (2011). EASL Clinical Practice Guidelines: management of hepatitis C virus infection. *J Hepatol*, *55*(2), 245-264
- Feinstone, S. M., Kapikian, A. Z., & Purceli, R. H. (1973). Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a viruslike antigen associated with acute illness. *Science*, *182*(4116), 1026-1028
- Feinstone, S. M., Kapikian, A. Z., Purcell, R. H., Alter, H. J., & Holland, P. V. (1975). Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med*, *292*(15), 767-770
- Foy, E., Li, K., Sumpter, R., Jr., Loo, Y. M., Johnson, C. L., Wang, C., . . . Gale, M., Jr. (2005). Control of antiviral defenses through hepatitis C virus disruption of retinoic acid-inducible gene-I signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*(8), 2986-2991
- Frazer, K. A., Ballinger, D. G., Cox, D. R., Hinds, D. A., Stuve, L. L., Gibbs, R. A., . . . Stewart, J. (2007). A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature*, *449*(7164), 851-861
- Gale, M., Jr., Blakely, C. M., Kwieciszewski, B., Tan, S. L., Dossett, M., Tang, N. M., . . . Katze, M. G. (1998). Control of PKR protein kinase by hepatitis C virus nonstructural 5A protein: molecular mechanisms of kinase regulation. *Mol Cell Biol*, *18*(9), 5208-5218
- Ge, D., Fellay, J., Thompson, A. J., Simon, J. S., Shianna, K. V., Urban, T. J., . . . Goldstein, D. B. (2009). Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature*, *461*(7262), 399-401
- Genomes Project, Consortium, Abecasis, G. R., Auton, A., Brooks, L. D., DePristo, M. A., Durbin, R. M., . . . McVean, G. A. (2012). An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature*, *491*(7422), 56-65
- George, C. X., & Samuel, C. E. (1999). Human RNA-specific adenosine deaminase ADAR1 transcripts possess alternative exon 1 structures that initiate from different promoters, one constitutively active and the other interferon inducible. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *96*(8), 4621-4626
- Grakoui, A., McCourt, D. W., Wychowski, C., Feinstone, S. M., & Rice, C. M. (1993). A second hepatitis C virus-encoded proteinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *90*(22), 10583-10587
- Grakoui, A., Wychowski, C., Lin, C., Feinstone, S. M., & Rice, C. M. (1993). Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. *J Virol*, *67*(3), 1385-1395
- Greer, E. L., & Brunet, A. (2005). FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene*, *24*(50), 7410-7425
- Guo, Y., & Jamison, D. C. (2005). The distribution of SNPs in human gene regulatory regions. *BMC Genomics*, *6*, 140
- A haplotype map of the human genome. (2005). *Nature*, *437*(7063), 1299-1320
- Harada, H., Kitagawa, M., Tanaka, N., Yamamoto, H., Harada, K., Ishihara, M., & Taniguchi, T. (1993). Anti-oncogenic and oncogenic potentials of interferon regulatory factors-1 and -2. *Science*, *259*(5097), 971-974
- Hedrick, S. M. (2009). The cunning little vixen: Foxo and the cycle of life and death. *Nat Immunol*, *10*(10), 1057-1063
- Hikima, J., Yi, M. K., Ohtani, M., Jung, C. Y., Kim, Y. K., Mun, J. Y., . . . Jung, T. S. (2012). LGP2 expression is enhanced by interferon regulatory factor 3 in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *PLoS One*, *7*(12), e51522

- Hindorff, L. A., Sethupathy, P., Junkins, H. A., Ramos, E. M., Mehta, J. P., Collins, F. S., & Manolio, T. A. (2009). Potential etiologic and functional implications of genome-wide association loci for human diseases and traits. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *106*(23), 9362-9367
- Hornung, V., Ellegast, J., Kim, S., Brzozka, K., Jung, A., Kato, H., . . . Hartmann, G. (2006). 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science*, *314*(5801), 994-997
- Houldsworth, A., Metzner, M., Rossol, S., Shaw, S., Kaminski, E., Demaine, A. G., & Cramp, M. E. (2005). Polymorphisms in the IL-12B gene and outcome of HCV infection. *J Interferon Cytokine Res*, *25*(5), 271-276
- Huang, Y., Yang, H., Borg, B. B., Su, X., Rhodes, S. L., Yang, K., . . . Liang, T. J. (2007). A functional SNP of interferon-gamma gene is important for interferon-alpha-induced and spontaneous recovery from hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *104*(3), 985-990
- Isaacs, A., & Lindenmann, J. (1957). Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, *147*(927), 258-267
- Isaacs, A., Lindenmann, J., & Valentine, R. C. (1957). Virus interference. II. Some properties of interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, *147*(927), 268-273
- Jacobs, L., O'Malley, J., Freeman, A., & Ekes, R. (1981). Intrathecal interferon reduces exacerbations of multiple sclerosis. *Science*, *214*(4524), 1026-1028
- Janeway, C. A., Jr. (1992). The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol Today*, *13*(1), 11-16
- Kaito, M., Watanabe, S., Tsukiyama-Kohara, K., Yamaguchi, K., Kobayashi, Y., Konishi, M., . . . Kohara, M. (1994). Hepatitis C virus particle detected by immunoelectron microscopic study. *J Gen Virol*, *75* ( Pt 7), 1755-1760
- Kang, D. C., Gopalkrishnan, R. V., Wu, Q., Jankowsky, E., Pyle, A. M., & Fisher, P. B. (2002). mda-5: An interferon-inducible putative RNA helicase with double-stranded RNA-dependent ATPase activity and melanoma growth-suppressive properties. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *99*(2), 637-642
- Kato, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Matsui, K., . . . Akira, S. (2006). Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature*, *441*(7089), 101-105
- Kaukinen, P., Sillanpaa, M., Nousiainen, L., Melen, K., & Julkunen, I. (2013). Hepatitis C virus NS2 protease inhibits host cell antiviral response by inhibiting IKKepsilon and TBK1 functions. *J Med Virol*, *85*(1), 71-82
- Kawai, T., & Akira, S. (2006). TLR signaling. *Cell Death Differ*, *13*(5), 816-825
- Kawai, T., Takahashi, K., Sato, S., Coban, C., Kumar, H., Kato, H., . . . Akira, S. (2005). IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat Immunol*, *6*(10), 981-988
- Kimura, K., Matsuzaki, Y., Nishikawa, Y., Kitamura, H., Akasaka, E., Rokunohe, D., . . . Sawamura, D. (2012). Characterization of retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I) expression corresponding to viral infection and UVB in human keratinocytes. *J Dermatol Sci*, *66*(1), 64-70
- Knobler, R. L., Panitch, H. S., Braheny, S. L., Sipe, J. C., Rice, G. P., Huddlestone, J. R., . . . et al. (1984). Systemic alpha-interferon therapy of multiple sclerosis. *Neurology*, *34*(10), 1273-1279

- Krawczak, M., Reiss, J., & Cooper, D. N. (1992). The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. *Hum Genet*, *90*(1-2), 41-54
- Kumar, A., Haque, J., Lacoste, J., Hiscott, J., & Williams, B. R. (1994). Double-stranded RNA-dependent protein kinase activates transcription factor NF-kappa B by phosphorylating I kappa B. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *91*(14), 6288-6292
- Kumar, V., Kato, N., Urabe, Y., Takahashi, A., Muroyama, R., Hosono, N., . . . Matsuda, K. (2011). Genome-wide association study identifies a susceptibility locus for HCV-induced hepatocellular carcinoma. *Nat Genet*, *43*(5), 455-458
- Lauer, G. M., & Walker, B. D. (2001). Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*, *345*(1), 41-52
- Lazarus, R., Vercelli, D., Palmer, L. J., Klimecki, W. J., Silverman, E. K., Richter, B., . . . Kwiatkowski, D. J. (2002). Single nucleotide polymorphisms in innate immunity genes: abundant variation and potential role in complex human disease. *Immunol Rev*, *190*, 9-25
- Le Bon, A., Schiavoni, G., D'Agostino, G., Gresser, I., Belardelli, F., & Tough, D. F. (2001). Type I interferons potently enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells in vivo. *Immunity*, *14*(4), 461-470
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M., & Hoffmann, J. A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, *86*(6), 973-983
- LeVan, T. D., Bloom, J. W., Bailey, T. J., Karp, C. L., Halonen, M., Martinez, F. D., & Vercelli, D. (2001). A common single nucleotide polymorphism in the CD14 promoter decreases the affinity of Sp protein binding and enhances transcriptional activity. *J Immunol*, *167*(10), 5838-5844
- Li, K., Foy, E., Ferreon, J. C., Nakamura, M., Ferreon, A. C., Ikeda, M., . . . Lemon, S. M. (2005). Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*(8), 2992-2997
- Lin, L., Hron, J. D., & Peng, S. L. (2004). Regulation of NF-kappaB, Th activation, and autoinflammation by the forkhead transcription factor Foxo3a. *Immunity*, *21*(2), 203-213
- Litvak, V., Ratushny, A. V., Lampano, A. E., Schmitz, F., Huang, A. C., Raman, A., . . . Aderem, A. (2012). A FOXO3-IRF7 gene regulatory circuit limits inflammatory sequelae of antiviral responses. *Nature*, *490*(7420), 421-425
- Lloyd, A. R., Jagger, E., Post, J. J., Crooks, L. A., Rawlinson, W. D., Hahn, Y. S., & French, R. A. (2007). Host and viral factors in the immunopathogenesis of primary hepatitis C virus infection. *Immunol Cell Biol*, *85*(1), 24-32
- Lohrer, H. D., & Tangen, U. (2000). Investigations into the molecular effects of single nucleotide polymorphism. *Pathobiology*, *68*(6), 283-290
- Manolio, T. A., Collins, F. S., Cox, N. J., Goldstein, D. B., Hindorf, L. A., Hunter, D. J., . . . Visscher, P. M. (2009). Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature*, *461*(7265), 747-753

- Marrack, P., Kappler, J., & Mitchell, T. (1999). Type I interferons keep activated T cells alive. *J Exp Med*, *189*(3), 521-530
- Masumi, A., Ito, M., Mochida, K., Hamaguchi, I., Mizukami, T., Momose, H., . . . Yamaguchi, K. (2010). Enhanced RIG-I expression is mediated by interferon regulatory factor-2 in peripheral blood B cells from hepatitis C virus-infected patients. *Biochem Biophys Res Commun*, *391*(4), 1623-1628
- Maurano, M. T., Humbert, R., Rynes, E., Thurman, R. E., Haugen, E., Wang, H., . . . Stamatoyannopoulos, J. A. (2012). Systematic localization of common disease-associated variation in regulatory DNA. *Science*, *337*(6099), 1190-1195
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., & Janeway, C. A., Jr. (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, *388*(6640), 394-397
- Meylan, E., Curran, J., Hofmann, K., Moradpour, D., Binder, M., Bartenschlager, R., & Tschopp, J. (2005). Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature*, *437*(7062), 1167-1172
- Muir, A. J., Shiffman, M. L., Zaman, A., Yoffe, B., de la Torre, A., Flamm, S., . . . Lawitz, E. (2010). Phase 1b study of pegylated interferon lambda 1 with or without ribavirin in patients with chronic genotype 1 hepatitis C virus infection. *Hepatology*, *52*(3), 822-832
- Myatt, S. S., & Lam, E. W. (2007). The emerging roles of forkhead box (Fox) proteins in cancer. *Nat Rev Cancer*, *7*(11), 847-859
- Nejentsev, S., Walker, N., Riches, D., Egholm, M., & Todd, J. A. (2009). Rare variants of IFIH1, a gene implicated in antiviral responses, protect against type 1 diabetes. *Science*, *324*(5925), 387-389
- Nitta, S., Sakamoto, N., Nakagawa, M., Kakinuma, S., Mishima, K., Kusano-Kitazume, A., . . . Watanabe, M. (2013). Hepatitis C virus NS4B protein targets STING and abrogates RIG-I-mediated type I interferon-dependent innate immunity. *Hepatology*, *57*(1), 46-58
- Ogata, N., Alter, H. J., Miller, R. H., & Purcell, R. H. (1991). Nucleotide sequence and mutation rate of the H strain of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *88*(8), 3392-3396
- Oshiumi, H., Ikeda, M., Matsumoto, M., Watanabe, A., Takeuchi, O., Akira, S., . . . Seya, T. (2010). Hepatitis C virus core protein abrogates the DDX3 function that enhances IPS-1-mediated IFN-beta induction. *PLoS One*, *5*(12), e14258
- Peters, B. J., Rodin, A. S., de Boer, A., & Maitland-van der Zee, A. H. (2010). Methodological and statistical issues in pharmacogenomics. *J Pharm Pharmacol*, *62*(2), 161-166
- Poeck, H., Bscheider, M., Gross, O., Finger, K., Roth, S., Rebsamen, M., . . . Ruland, J. (2010). Recognition of RNA virus by RIG-I results in activation of CARD9 and inflammasome signaling for interleukin 1 beta production. *Nat Immunol*, *11*(1), 63-69
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M. Y., Van Huffel, C., Du, X., . . . Beutler, B. (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*, *282*(5396), 2085-2088
- Riou, C., Yassine-Diab, B., Van grevenynghe, J., Somogyi, R., Greller, L. D., Gagnon, D., . . . Haddad, E. K. (2007). Convergence of TCR and

- cytokine signaling leads to FOXO3a phosphorylation and drives the survival of CD4<sup>+</sup> central memory T cells. *J Exp Med*, 204(1), 79-91
- Ronald, P. C., & Shirasu, K. (2012). Front-runners in plant-microbe interactions. *Curr Opin Plant Biol*, 15(4), 345-348
- Rothenfusser, S., Goutagny, N., DiPerna, G., Gong, M., Monks, B. G., Schoenemeyer, A., . . . Fitzgerald, K. A. (2005). The RNA helicase Lgp2 inhibits TLR-independent sensing of viral replication by retinoic acid-inducible gene-I. *J Immunol*, 175(8), 5260-5268
- Sachidanandam, R., Weissman, D., Schmidt, S. C., Kakol, J. M., Stein, L. D., Marth, G., . . . Altshuler, D. (2001). A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*, 409(6822), 928-933
- Saito, T., Hirai, R., Loo, Y. M., Owen, D., Johnson, C. L., Sinha, S. C., . . . Gale, M., Jr. (2007). Regulation of innate antiviral defenses through a shared repressor domain in RIG-I and LGP2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(2), 582-587
- Saito, T., Owen, D. M., Jiang, F., Marcotrigiano, J., & Gale, M., Jr. (2008). Innate immunity induced by composition-dependent RIG-I recognition of hepatitis C virus RNA. *Nature*, 454(7203), 523-527
- Samarajiwa, S. A., Forster, S., Auchettl, K., & Hertzog, P. J. (2009). INTERFEROME: the database of interferon regulated genes. *Nucleic Acids Res*, 37(Database issue), D852-857
- Samuel, C. E. (1979). Mechanism of interferon action: phosphorylation of protein synthesis initiation factor eIF-2 in interferon-treated human cells by a ribosome-associated kinase processing site specificity similar to hemin-regulated rabbit reticulocyte kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(2), 600-604
- Satoh, T., Kato, H., Kumagai, Y., Yoneyama, M., Sato, S., Matsushita, K., . . . Takeuchi, O. (2010). LGP2 is a positive regulator of RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(4), 1512-1517
- Schoggins, J. W., Wilson, S. J., Panis, M., Murphy, M. Y., Jones, C. T., Bieniasz, P., & Rice, C. M. (2011). A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. *Nature*, 472(7344), 481-485
- Schroder, M., Baran, M., & Bowie, A. G. (2008). Viral targeting of DEAD box protein 3 reveals its role in TBK1/IKKepsilon-mediated IRF activation. *EMBO J*, 27(15), 2147-2157
- Seth, R. B., Sun, L., Ea, C. K., & Chen, Z. J. (2005). Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell*, 122(5), 669-682
- Sheppard, P., Kindsvogel, W., Xu, W., Henderson, K., Schlutsmeyer, S., Whitmore, T. E., . . . Klucher, K. M. (2003). IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat Immunol*, 4(1), 63-68
- Simmonds, P. (2001). The origin and evolution of hepatitis viruses in humans. *J Gen Virol*, 82(Pt 4), 693-712
- Simmonds, P., & Smith, D. B. (1997). Investigation of the pattern of diversity of hepatitis C virus in relation to times of transmission. *J Viral Hepat*, 4 Suppl 1, 69-74

- Smith, D. B., Pathirana, S., Davidson, F., Lawlor, E., Power, J., Yap, P. L., & Simmonds, P. (1997). The origin of hepatitis C virus genotypes. *J Gen Virol*, *78* ( Pt 2), 321-328
- Soye, K. J., Trottier, C., Richardson, C. D., Ward, B. J., & Miller, W. H., Jr. (2011). RIG-I is required for the inhibition of measles virus by retinoids. *PLoS One*, *6*(7), e22323
- Su, A. I., Pezacki, J. P., Wodicka, L., Brideau, A. D., Supekova, L., Thimme, R., . . . Chisari, F. V. (2002). Genomic analysis of the host response to hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *99*(24), 15669-15674
- Su, Z. Z., Sarkar, D., Emdad, L., Barral, P. M., & Fisher, P. B. (2007). Central role of interferon regulatory factor-1 (IRF-1) in controlling retinoic acid inducible gene-I (RIG-I) expression. *J Cell Physiol*, *213*(2), 502-510
- Sumpter, R., Jr., Loo, Y. M., Foy, E., Li, K., Yoneyama, M., Fujita, T., . . . Gale, M., Jr. (2005). Regulating intracellular antiviral defense and permissiveness to hepatitis C virus RNA replication through a cellular RNA helicase, RIG-I. *J Virol*, *79*(5), 2689-2699
- Suppiah, V., Moldovan, M., Ahlenstiel, G., Berg, T., Weltman, M., Abate, M. L., . . . George, J. (2009). IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. *Nat Genet*, *41*(10), 1100-1104
- Taguchi, T., Nagano-Fujii, M., Akutsu, M., Kadoya, H., Ohgimoto, S., Ishido, S., & Hotta, H. (2004). Hepatitis C virus NS5A protein interacts with 2',5'-oligoadenylate synthetase and inhibits antiviral activity of IFN in an IFN sensitivity-determining region-independent manner. *J Gen Virol*, *85*(Pt 4), 959-969
- Tanaka, S., Aida, K., Nishida, Y., & Kobayashi, T. (2013). Pathophysiological mechanisms involving aggressive islet cell destruction in fulminant type 1 diabetes. *Endocr J*, *60*(7), 837-845
- Tanaka, Y., Nishida, N., Sugiyama, M., Kurosaki, M., Matsuura, K., Sakamoto, N., . . . Mizokami, M. (2009). Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet*, *41*(10), 1105-1109
- Taniguchi, T., Ohno, S., Fujii-Kuriyama, Y., & Muramatsu, M. (1980). The nucleotide sequence of human fibroblast interferon cDNA. *Gene*, *10*(1), 11-15
- Taylor, D. R., Puig, M., Darnell, M. E., Mihalik, K., & Feinstone, S. M. (2005). New antiviral pathway that mediates hepatitis C virus replicon interferon sensitivity through ADAR1. *J Virol*, *79*(10), 6291-6298
- Taylor, D. R., Shi, S. T., Romano, P. R., Barber, G. N., & Lai, M. M. (1999). Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science*, *285*(5424), 107-110
- Thomas, D. L., Thio, C. L., Martin, M. P., Qi, Y., Ge, D., O'Huigin, C., . . . Carrington, M. (2009). Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature*, *461*(7265), 798-801
- Uze, G., & Monneron, D. (2007). IL-28 and IL-29: newcomers to the interferon family. *Biochimie*, *89*(6-7), 729-734
- Uzri, D., & Gehrke, L. (2009). Nucleotide sequences and modifications that determine RIG-I/RNA binding and signaling activities. *J Virol*, *83*(9), 4174-4184

- Valente, G., Ozmen, L., Novelli, F., Geuna, M., Palestro, G., Forni, G., & Garotta, G. (1992). Distribution of interferon-gamma receptor in human tissues. *Eur J Immunol*, *22*(9), 2403-2412
- Wang, C., Pflugheber, J., Sumpter, R., Jr., Sodora, D. L., Hui, D., Sen, G. C., & Gale, M., Jr. (2003). Alpha interferon induces distinct translational control programs to suppress hepatitis C virus RNA replication. *J Virol*, *77*(7), 3898-3912
- Ward, R., Krugman, S., Giles, J. P., Jacobs, A. M., & Bodansky, O. (1958). Infectious hepatitis; studies of its natural history and prevention. *N Engl J Med*, *258*(9), 407-416
- Wheelock, E. F., & Sibley, W. A. (1965). Circulating Virus, Interferon and Antibody after Vaccination with the 17-D Strain of Yellow-Fever Virus. *N Engl J Med*, *273*, 194-198
- Xu, L. G., Wang, Y. Y., Han, K. J., Li, L. Y., Zhai, Z., & Shu, H. B. (2005). VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling. *Mol Cell*, *19*(6), 727-740
- Yamamoto, H., Lamphier, M. S., Fujita, T., Taniguchi, T., & Harada, H. (1994). The oncogenic transcription factor IRF-2 possesses a transcriptional repression and a latent activation domain. *Oncogene*, *9*(5), 1423-1428
- Yang, J. Y., & Hung, M. C. (2009). A new fork for clinical application: targeting forkhead transcription factors in cancer. *Clin Cancer Res*, *15*(3), 752-757
- Yao, Z. Q., Prayther, D., Trabue, C., Dong, Z. P., & Moorman, J. (2008). Differential regulation of SOCS-1 signalling in B and T lymphocytes by hepatitis C virus core protein. *Immunology*, *125*(2), 197-207
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Matsumoto, K., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., . . . Fujita, T. (2005). Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J Immunol*, *175*(5), 2851-2858
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., . . . Fujita, T. (2004). The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol*, *5*(7), 730-737
- Yusuf, I., Zhu, X., Kharas, M. G., Chen, J., & Fruman, D. A. (2004). Optimal B-cell proliferation requires phosphoinositide 3-kinase-dependent inactivation of FOXO transcription factors. *Blood*, *104*(3), 784-787
- Zhang, X., Sun, S., Hwang, I., Tough, D. F., & Sprent, J. (1998). Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8+ T cells in vivo by IL-15. *Immunity*, *8*(5), 591-599
- Zhu, M., & Zhao, S. (2007). Candidate gene identification approach: progress and challenges. *Int J Biol Sci*, *3*(7), 420-427

## Eidesstattliche Versicherung

**Colmsee, Herman**

---

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Genetische Variabilität in Promotoren der RIG-I-like Helikasen:  
Auswirkungen auf den Verlauf einer Hepatitis-C-Virus-Infektion**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

**München, 16.04.2017**

---

Ort, Datum

---

Unterschrift Doktorandin/Doktorand