Hepatitis-B-Virus-Oberflächenproteine beschleunigen die Zunahme cholestatischer Lebererkrankungen und Tumorprogression im Abcb4-knockout Mausmodell

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von Glimm, Hannah, geb. Reinhard

aus Gießen

Gießen 2018

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II,
Innere Medizin - Schwerpunkt Gastroenterologie,
unter Leitung von Prof. Dr. Werner Seeger,
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

1. Gutachter: Prof. Dr. Elke Roeb

2. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Neuhaus

Tag der Disputation: 17.04.2019

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1
2. Zielsetzung der Arbeit 2
3. Literaturübersicht 3
3.1 Die Leber 3
3.1.1 Anatomie und Physiologie 3
3.2 Akute und chronische Lebererkrankungen 5
3.2.1 Leberfibrose-/ zirrhose 6
3.3 Extrazelluläre Matrix 8
3.4. Biliäre Erkrankungen 9
3.4.1 Cholestase 9
3.4.1.1 Ätiologie und Pathogenese der Cholestase 9
3.4.1.2. Klinik der Cholestase 10
3.4.2 Cholangitis 11
3.4.2.1 Epidemiologie, Ätiologie und Pathogenese der PSC und SSC 11
3.4.2.2 Klinik der PSC und SSC 12
3.5 Zusammensetzung der Galle 12
3.6 Rolle des MDR3 Transporters bei Lebererkrankungen des Menschen 13
3.7 Hepatitis-B-Virus 15
3.7.1 Partikel und Genomaufbau 15
3.7.2 Replikationszyklus 18
3.7.3 Epidemiologie 19
3.7.4 Ätiologie und Pathogenese 19
3.7.5 Klinik und Diagnostik 20
3.8 HBV und Cholangitis als gemischte Pathologie beim Menschen 21
3.9 HCC Tumorgenese 22
3.9.1 Epidemiologie, Ätiologie und Pathogenese des HCC 22
3.9.2 Klinik und Diagnostik des HCC 25
3.9.3 Therapie des HCC 26
3.10 Unfolded Protein Response 28
3.11 *Second Hit* Theorie 30
3.12 Tiermodelle 30
3.12.1 Abcb4$^{-/-}$ Mausmodell 30
3.12.2 Balb/c-HBV-tg Mausmodell 31
3.12.3 Balb/c-HBV-tg/Abcb4$^{-/-}$ Mausmodell 32
4. Material und Methoden 32
4.1 Versuchstiere 32
4.2 Probengewinnung und Lagerung 34
4.3 Molekularbiologische Methoden 34

4.3.1 Genotypisierung 34
4.3.2 RNA Isolierung 35
4.3.3 Synthese komplementärer DNA (cDNA) 37
4.3.4 Real time quantitativ-Detection-PCR (qPCR) 38
4.4 Histologische Färbungen 41
4.4.1 H&E- Färbung 42
4.4.2 Sirius-Red-Färbung 43
4.5 Immunhistochemische Färbung 43
4.5.1. Immunhistochemische Analyse an Paraffinschnitten 43
4.6 Serumparameter 47
4.6.1 Serumtransaminasen AST und ALT 47
4.6.2. Alkalische Phosphatase (ALP) 48
4.6.3 Cholesterin 48
4.6.4 Triglyceride 48
4.7 Western Blot 49
4.7.1 Lysat Herstellung 49
4.7.2 Proteinauftrennung durch SDS-Page 50
4.7.3 Proteintransfer auf Nitrozellulosemembran 52
4.7.4 Immunhistochemischer Proteinnachweis 53
4.8 Hydroxyprolinbestimmung 54
4.8.1 Probenvorbereitung 55
4.8.2 Herstellung des Hydroxyprolin-Standards 55
4.9 Analyse der Gallensäuren 57
4.10 Statistische Auswertung 57
5. Ergebnisse 59
5.1 Hepatische Schädigung 59
5.1.1 Verstärkte Parenchymschädigung im Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Modell 59
5.1.2 Gesteigerte periportale Entzündungsreaktion im Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Modell 60
5.1.3 Gesteigerte Kollagenexpression im Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Modell 63
5.1.4 Verstärkte HSC Aktivierung und duktale Reaktion im Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Modell 67
5.2 Metabolismus 68
5.2.1 Anstieg der Gesamtkonzentrationen der Serum-Gallensäuren im Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Modell 68
5.2.2 Abnahme der relativen Menge der protektiven Gallensäure TUDCA im Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Modell 70
5.2.3 Absolute Serumkonzentrationen der 8 häufigsten Gallensäuren im Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Modell 71
5.2.4 Korrelation der Serumgallensäurekonzentration mit der ALT als Marker der Hepatopathie 71
5.3 HbsAg Expression 74

5.3.1 Reduzierte HBsAg Expression im Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Modell 74
5.4 ER Stress 77
5.4.1 ER-Stress im Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Modell 77
5.5 Karzinogenese 78
5.5.1 Verstärkte Karzinogenese im Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Modell 78
5.5.2 Verstärkte Aktivierung Karzinogenese-assoziierter Signaltrans-duktionswege im Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Modell 80
5.5.3 Immunhistochemische Charakteristika der Tumore in Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Tieren 81
6. Diskussion 83
6.1 Charakterisierung der hepatischen Schädigung 83
6.2 Verringerte HBsAg Akkumulation im Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Modell 85
6.3 Die Second/ Multiple Hit Theorie 86
6.4 Schädigende Wirkung der Gallensäuren 87
6.5 Fehlender Einfluss des HBsAg Expressionsverlust auf ER- Stress und UPR 88
6.6 Einfluss der HBsAg Expression auf die Karzinogenese im Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Modell 90
6.7 Schema zur Übersicht der Schädigung 91
6.8 Limitationen der Studie 92
7. Zusammenfassung und Ausblick 92
8. Summary 93
9. Abkürzungsverzeichnis 96
10. Abbildungsverzeichnis 101
11. Tabellenverzeichnis 102
12. Literaturverzeichnis 102
13. Publikationsverzeichnis 116
14. Ehrenwörtliche Erklärung 117

1. Einleitung

Hepatitis B (HBV) ist eine akut oder chronisch verlaufende Viruserkrankung. Bei ca. 240 Millionen chronisch Infizierten stellt sie ein globales Problem dar (Glebe und Bremer 2013; WHO 2015). Weltweit ist HBV eine der häufigsten Ursachen für ein Hepatozelluläres Karzinom (HCC) (Onkologie Leitlinienprogramm 2013). Das HCC stellt die fünfthäufigste Krebsart des Menschen und die dritthäufigste krebsbedingte Todesursache mit steigender Tendenz in den Industrienationen dar (EASL 2015).

In Vorarbeiten zur aktuellen Studie wurden transgene Mäuse für das große HBV-Hüllprotein auf den Fibrose-suszeptiblen Stamm BALB/c zurück gekreuzt und charakterisiert. Die Abcb4$^{-/-}$ Maus wurde als Model für Cholangitis und biliäre Fibrose etabliert, da ihre Pathohistologie, die durch eine progressiv fortschreitende Leberfibrose gekennzeichnet ist, der menschlichen primären und sekundären sklerosierenden Cholangitis ähnelt (Fickert et al. 2004; Popov et al. 2005; Roderfeld et al. 2010b). Sowohl Cholangitis als auch der direkte pathogene Effekt des HBV-Oberflächenproteins können Leberschäden, Fibrogenese und onkogene Effekte induzieren (Chisari et al. 1989; Chisari et al. 1986; Chisari et al. 1987; Roderfeld et al. 2010b; Churin et al. 2014; Zhou et al. 2014b; Trierweiler et al. 2016). Eine Reihe transgener Tiermodelle hat bisher dazu beigetragen, die Rolle der einzelnen Komponenten bei der viralen Pathogenese von HBV besser zu verstehen. Aufgrund des stark begrenzten Wirtstropismus von HBV hatten bis dahin nur Schimpansen als immunkompetentes Tiermodell für *in vivo* Studien verwendet werden können (Lavanchy 2012; Winer et al. 2016).

Mittlerweile existieren jedoch diverse Mausmodelle zur HBV Forschung (Li et al. 2011; Winer et al. 2016; Dandri et al. 2005; Yan et al. 2012). Zu den aktuelleren Modellen gehören z.B. das *Natrium-Taurocholat Cotransporting Polypeptide* (NT-CT) transgene Mausmodell, durch das es Yan et al. 2012 gelang, den zellulären Interaktionspartner von HBV, den HBV Rezeptor, zu identifizieren (Yan et al. 2012), sowie das humanisierte Mausleber Modell mit HBV (uPA-SCID). Die Verwendung von humanen Leber-chimären Mausmodellen hat dazu beigetragen, den Lebenszyklus des HBV besser zu verstehen und einen detaillierteren Einblick in die virale Pathogenese und das menschliche Immunsystem zu erhalten.

Interessanterweise zeigen transgene Mäuse, die HBV-Oberflächenproteine exprimieren, ein vergleichbares histopathologisches Muster mit Inflammation, regenerativer Hyperplasie, transkriptionaler Deregulierung, Aneuploidie, bis hin zu Neoplasien und dem HCC (Meuleman et al. 2006; Churin et al. 2014).

Die in dieser Arbeit verwendete HBV-transgene Maus-Linie ist seit vielen Jahren bekannt (Chisari et al. 1985) und in Bezug auf zahlreiche Faktoren untersucht worden (Li et al. 2011; Churin et al. 2014; Glebe und Bremer 2013). Die Hepatozyten überexprimieren das *large Hepatitis B surface antigen* (LHB) und verursachen u.a. eine zunehmende Akkumulation der Virusproteine. In der Folge kommt es durch Induktion von Endoplasmatischem Retikulum (ER)- Stress zu progredienter hepatischer Schädigung, die einer chronischen Hepatitis mit HCC-Entstehung ähnelt (Chisari et al. 1985; Chisari et al. 1987; Li et al. 2011).
Bis heute ist jedoch kein Mausmodell mit der gemischten Pathologie von HBV/LHB und Cholangitis beschrieben. Mit der vorliegenden Studie wurde ein neues Maus-Modell für die Simulation einer viralen und cholangitischen Schädigung der Leber etabliert und charakterisiert.

2. Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Studie war es, ein *Second Hit* Modell zu entwickeln, welches das Zusammenspiel von HBV und Cholestase, vor allem in Bezug auf die gegenseitige Beeinflussung der beiden Noxen ermöglicht.
Die Hypothese der vorliegenden Studie war, dass die hepatische Expression von HBsAg/LHB bei Mäusen, denen das *Phospholipidflippase-Multidrug-Resistenz-Protein 2* (MDR2) fehlt, ein geeignetes Modell darstellt, um die simultane Schädigung durch die direkten zytopathischen Effekte von HBsAg und Cholestase zu analysieren.

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit war die Frage:

- Erhöht der *second Hit* Fibrogenese, Inflammation, Metabolismus und Tumorgenese im Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Modell?

Hepatische Funktionen und Schädigungen, sowie das Ausmaß der Leberfibrose, wurden mittels des Nachweises der Aktivität der Serumtransaminasen, der Bestimmung des Gesamtgehaltes an hepatischem Hydroxyprolin sowie verschiedener konjugierter und unkonjugierter Gallensäuren untersucht. Zentrale Methoden dieser Arbeit waren zudem immunhistochemische Färbungen. Sie umfassten sowohl histologische Analysen mittels Hämatoxylin-Eosin (H&E)-Färbung, fibrosespezifische Färbung mittels Sirius-Red sowie den Nachweis HBsAg-positiver Hepatozyten und tumorspezifischer Färbungen wie z.B. Ki67. Ergänzend führten wir Western Blots zum Proteinnachweis für ER- Stress- und Karzinogenese-assoziierte Signalwege durch.

3. Literaturübersicht

3.1 Die Leber

3.1.1 Anatomie und Physiologie

Die Leber liegt als größtes Stoffwechselorgan des Menschen intraperitoneal und wiegt beim gesunden Erwachsenen ca. 1,5kg. Sie besitzt eine glatte Oberfläche und ist von bräunlicher Farbe. Die Blutversorgung erfolgt über die durch die Leberpforte (Porta hepatis) verlaufende Arteria (A.) hepatica propria (sauerstoffreiches Blut) sowie über das nährstoffreiche Blut aus den unpaaren Bauchorganen durch den Zusammenfluss von Vena (V.) mesenterica superior und V. lienalis der V. portae. Angelehnt an den Verlauf der Pfortader wird die Leber in neun Segmente aufgeteilt (I- IX). Der venöse Abfluss erfolgt über die Zentralvenen in die Venae hepaticae und schließlich in die V. cava inferior. Die intrahepatischen Äste von Pfortader, Leberarterien und Gallengängen laufen bis in die kleinsten Verzweigungen parallel.
Die Aufgaben der Leber umfassen die Synthese wichtiger Proteine wie z.B. Gerinnungsfaktoren oder Albumin. Außerdem ist die Leber für die Verwertung und Speicherung von Nahrungsbestandteilen, wie lipidlösliche Vitamine, Glykogen und die Produktion von Gallensäuren (exokrine Funktion) verantwortlich. Auch die Entgiftung bzw. Transformation in eine ausscheidbare Form, sowohl von körpereigenen Stoffen (Steroidhormone und Gallenfarbstoffe) als auch von körperfremden Stoffen (Medikamenten oder Alkohol) findet hier statt (Kuntz und Kuntz 2008; Juza und Pauli 2014).
Die *Lobuli* (Leberläppchen) stellen die kleinsten funktionellen Einheiten der Leber dar. Die *Lobuli* bestehen aus Hepatozyten, Teilen des Gallengangssytems sowie Bindegewebe und Gefäßen. Im Zentrum jedes Leberläppchens findet sich die Zentralvene und am Rand des Polygons, dort wo mehrere Leberläppchen zusammentreffen, findet sich das so genannte Periportalfeld. Dieses besteht wiederum aus Bindegewebe, einer A. und V. interlobularis, dem interlobulären Gallengang sowie einem Lymphgefäß. Diese Strukturen werden gemeinsam als Glisson’sche Trias bezeichnet (Lüllmann-Rauch 2006).

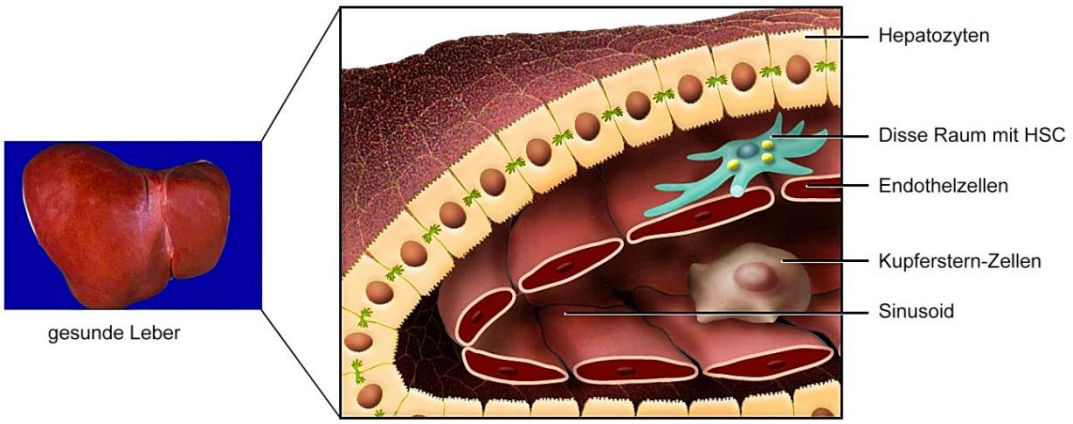

Abbildung 1. Mikroarchitektur der gesunden Leber (modifiziert nach Bataller und Brenner 2005)

Legende siehe Text.

Neben den Parenchymzellen (Hepatozyten) sind auch nicht-parenchymatösen Zellen wie Endothelzellen, Kupffer-Zellen, hepatische Sternzellen (engl. *Hepatic stellate cell*, HSC) und Pit-Zellen (große granuläre Lymphozyten) Bestandteile des Lebergewebes (Bataller und Brenner 2005; Lüllmann-Rauch 2006; Welsch et al. 2014).

Zwischen den radiär zur Zentralvene verlaufenden Lebersinusoiden bilden Reihen von Hepatozyten Leberbalken mit Galle- und Blutpol (vgl. Abb. 1). Die Sinusiode sind mit Mischblut gefüllt und ihre Wand besteht aus gefensterten Endothelzellen sowie Kupffer-Zellen (Welsch et al. 2014). Zwischen diesen und dem Gallepol liegt der Disse Raum in dem der Stoffaustausch zwischen Blut und Zellen stattfindet. In ihm befinden sich die *Hepatic stellate cells* (HSC). Das intrahepatische Gallengangsystem beginnt mit den Canaliculi biliferi. Diese Canaliculi besitzen keine eigene Wandung, sondern sind durch die Plasmamembranen der Heptozyten begrenzt. Die Gallenflüssigkeit wird von Hepatozyten und Cholangiozyten gebildet und fließt vom Zentrum des Leberläppchens in Richtung portale Zone, wo sie in den Hering-Kanal, ein kurzes Schaltstück, gelangt. Erst dort, in der Peripherie des Leberläppchens, kleiden Cholangiozyten die Wand der Gallengänge aus.

Der Gallenfluss ist dem Blutfluss entgegengesetzt. Somit wird auch die Sauerstoffversorgung von der Peripherie des *Lobuli* zum Zentrum schlechter. In der Zone 1 finden energieverbrauchende Prozesse, wie z.B. Glucogenese, statt. In der sauerstoffärmeren Zone 3 läuft hingegen die anaerobe Glykolyse ab (Lüllmann-Rauch 2006).

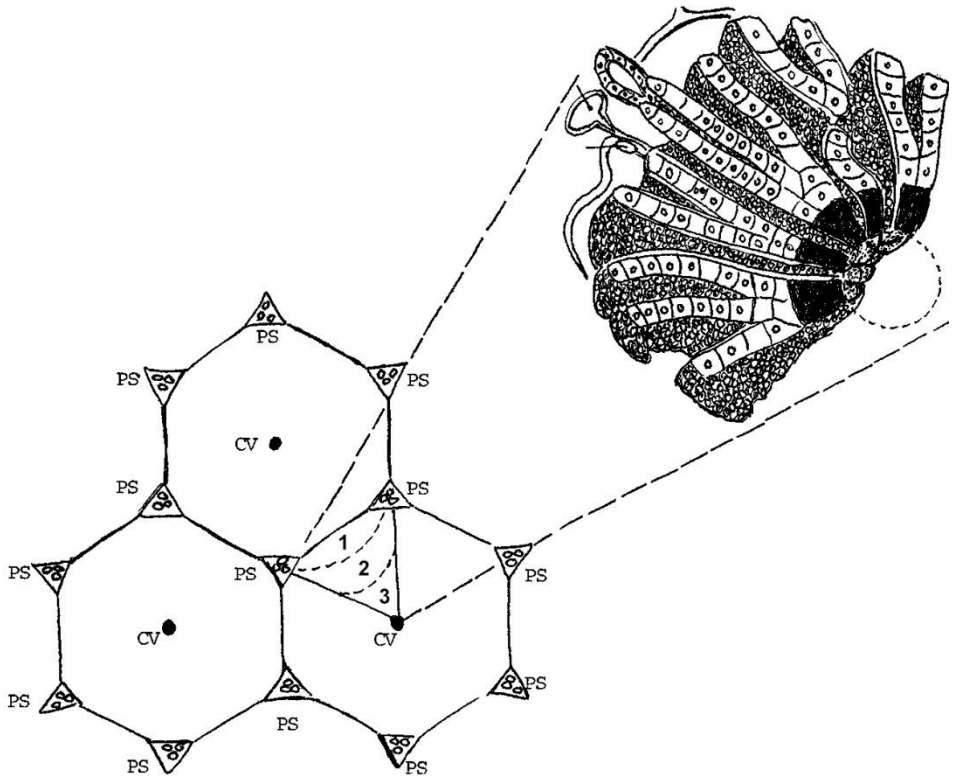

Abbildung 2. Gliederung der Leber in verschiedene Baueinheiten (modifiziert nach Tzanakakis et al. 2000)

A) In der Mitte der Zentralvenenläppchen liegt die Zentralvene (CV). An den Kanten, dort wo sich mehrere Läppchen treffen, liegen die periportalen Felder (PS) mit Arterie, Vene und Gallengang. Ein Leberazinus bildet sich zwischen zwei portalen Feldern und einer Zentralvene. Zone 1 liegt periportal und enthält sauerstoffreiches Blut, Zone 3 liegt perivenös und enthält sauerstoffarmes Blut, Zone 2 liegt dazwischen. B) Anatomie eines Periportalfelds. Dieser Bereich enthält die sog. Glisson-Trias, welche aus Arteria und Vena interlobularis sowie einem interlobulären Gallengang besteht. Zusätzlich findet sich hier noch ein Lymphgefäß. A.- und V. interlobularis bilden ein mit Mischblut gefülltes Sinusoid das zur Zentralvene verläuft.

3.2 Akute und chronische Lebererkrankungen

Lebererkrankungen können in akute und chronische Formen unterteilen werden.
Ursachen chronischer oder akuter Lebererkrankungen können Virushepatitiden (A, B, C, D, E und G), Autoimmunhepatitiden, Stoffwechselerkrankungen und toxische Substanzen sein.
Die Hämochromatose, die Primär Biliäre Cholangitis (Schramm und Strassburg 2017) und der alpha1- Antitrypsinmangel treten hingegen nur als chronische Formen auf. Die jedoch häufigste chronische Lebererkrankung in der westlichen Welt ist die Nicht-

alkoholische Steatohepatitis (NASH), die oft in Kombination mit einer Stoffwechselerkrankung wie Diabetes Mellitus Typ 2 und dem metabolischen Syndrom auftritt (Oseini und Sanyal 2017).
Die Endstrecke vieler Lebererkrankungen und irreversibler Umbauprozesse stellt die Entstehung einer Leberfibrose bzw. –zirrhose dar (Elpek 2014).

3.2.1 Leberfibrose-/ zirrhose

Leberfibrose-/ zirrhose werden durch ein komplexes Netzwerk Zytokin-vermittelter Signalwege, die die Aktivierung Hepatischer Sternzellen (HSC) und der Fibrogenese regulieren, gesteuert (Zhou et al. 2014b). Es kommt zur Zerstörung der normalen Leberarchitektur und dem Auftreten von entzündlichen Reaktionen im Leberparenchym. Die Leberfibrose gilt als der erste Schritt in der Progression zur Zirrhose und schließlich zur Entwicklung des Hepatozellulären Karzinoms (HCC) (Atta 2015). Erkrankungen wie z.B. die Nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH) können auch ohne Fibrose- oder Zirrhose zum HCC führen (Okazaki et al. 2014).
Wenn die schädigende Noxe erfolgreich entfernt werden kann, ist dieser Prozess zu Beginn noch reversibel. Bei anhaltender Schädigung kann sich die Regenerationsfähigkeit der Leber allerdings erschöpfen (Xu et al. 2012).
Lange Zeit nahm man die Leberzirrhose als das nicht-reversible Endstadium einer hepatischen Fibrose wahr (Bataller und Brenner 2005). Aufgrund neuer Behandlungsmöglichkeiten chronischer Lebererkrankungen hat sich das Konzept der Zirrhose von einem statisch-irreversiblen zu einem dynamisch-reversiblen entwickelt (Sohrabpour et al. 2012). Gerade im Zusammenhang von HBV und Leberfibrose-/ zirrhose zeigen klinische Studien mit antiviraler Therapie und histologischem Follow-up, dass eine Fibrose regredieren kann und sogar eine Zirrhose nach langwieriger HBV-DNA-Suppression rückläufig sein kann (Bedossa 2015). Eine antivirale Behandlung stellt daher im Moment die wirksamste antifibrotische Therapie dar (Bedossa 2015), da der HBV-DNA Gehalt mit dem Ausmaß des Leberzellschadens korreliert (Calvaruso und Craxi 2014). Eine Verbesserung der inflammatorischen Reaktion kann auch das Stadium der Fibrose verringern, sowie die Dekompensation und im Verlauf die HCC Entstehung verhindern, was die Prognose von Patienten mit HBV-Zirrhose signifikant verändert (Calvaruso und Craxi 2014). Um eine Verbesserung der Fibrose-/ zirrhose von HBV Patienten zu erreichen, sollte deshalb frühestmöglich mit einer oralen antiviralen Therapie begonnen werden (Lampertico et al. 2011).

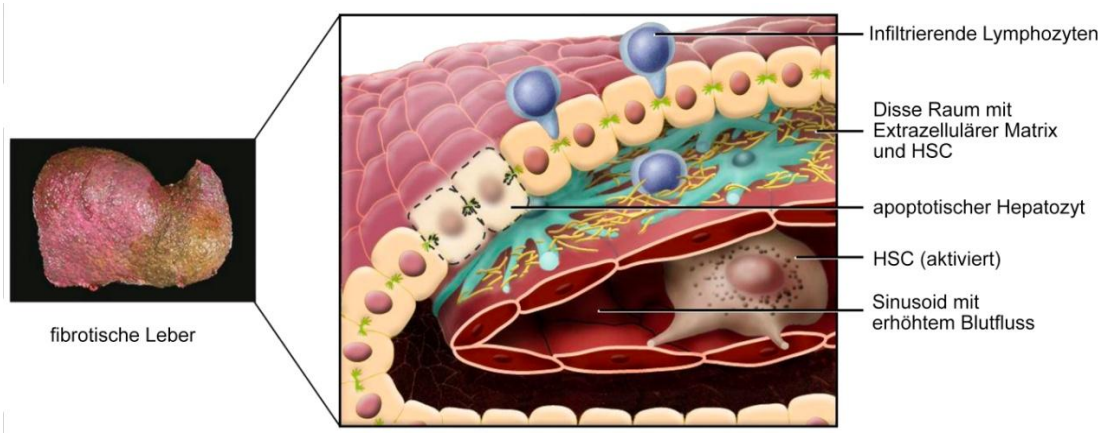

Abbildung 3. Mikroarchitektur der fibrotischen Leber (modifiziert nach Bataller und Brenner 2005).

Makroskopisch zeigt die fortgeschritten fibrotische Leber eine knotige, unregelmäßige Oberfläche. Die chronische Leberschädigung führt zur Infiltration mit Lymphozyten, der Apoptose von Hepatozyten und der Aktivierung von Kupffer-Zellen. Hepatische Sternzellen (HSC) führen zu Proliferation und Zunahme der Extrazellulärmatrix (ECM) im Disse Raum und erhöhtem Blutfluss in den Sinusoiden. Dadurch kommt es zu portaler Hypertension.

In den letzten Jahrzehnten sind die Nicht-alkoholischen Fettlebererkrankungen (NAFLD) zu einer führenden Ursache chronischer Lebererkrankungen in der westlichen Welt mit einer Prävalenz von ca. 30% in der allgemeinen Bevölkerung, geworden (Zhou et al. 2014b).

In Deutschland entsteht die Leberzirrhose, als Endpunkt aller chronischen Lebererkrankungen, nach der NAFLD größtenteils auf dem Boden übermäßigen Alkoholkonsums (Pausch und Rösch 2009). Jedes Jahr versterben allein in Deutschland ca. 15.000 Menschen an einer Lebererkrankung (Statistisches Bundesamt 2015a), das entspricht einer Sterberate von 19/100.000 Einwohner. Nach Angaben des Gesundheitsberichtes für Deutschland wird die Zahl der Erwachsenen mit alkoholbedingter Leberkrankheit auf 2 bis 3 Mio. Menschen geschätzt, davon versterben etwa 8.000 an einer alkoholischen Leberkrankheit (Statistisches Bundesamt 2015b). In Europa sterben jährlich ca. 170.000 Menschen an den Folgen einer Leberzirrhose (Blachier et al. 2013).

Die Leberfibrose besitzt somit als Vorläufer der Zirrhose und damit dem Endstadium aller chronischen Lebererkrankungen, unabhängig von ihrer Ätiologie, erhebliche klinische und gesundheitsökonomische Relevanz.

3.3 Extrazelluläre Matrix

Die Extrazelluläre Matrix (ECM) bildet den Hauptbestandteil des extrazellulären Raumes. Dieser bildet zusammen mit organspezifischen Zellen das menschliche Gewebe (Rodriguez et al. 2010). Weiterhin bildet die ECM ein kompliziertes Netzwerk, das ein Gerüst für Zellen sowie strukturelle Unterstützung, Zug-, Druckfestigkeit und Elastizität in allen Geweben und Organen bereitstellt (Arriazu et al. 2014). Die ECM nimmt großen Einfluss auf die Modulation der umgebenden Organe und deren Homöostase. Sie übernimmt regulative Aufgaben bei der Embryogenese, der Zellproliferation, -migration und -differenzierung, bei der fibrogenen Aktivierung und Deaktivierung und innerhalb des Immunsystems (Schuppan et al. 2001).

Die ECM zeigt eine typische Zusammensetzung die jedoch nicht statisch, sondern vielmehr dem Einfluss verschiedener Umbauprozesse durch Enzyme unterworfen ist. Funktionell wird die ECM in die Gruppe der Proteoglykane und die Gruppe der Faserproteine eingeteilt. Quantitativ machen Kollagene den Hauptbestandteil der ECM aus (Arriazu et al. 2014).

In einer gesunden Leber besteht ein Gleichgewicht von Ab- und Umbau der ECM-Komponenten. Verantwortlich dafür ist u.a. eine Gruppe von Enzymen, die Matrix-Metalloproteasen (MMP) und deren spezifische Inhibitoren, die *tissue inhibitors of metalloproteinases* (TIMP) (Roderfeld et al. 2007; Duarte et al. 2015; Hemmann et al. 2007).

MMPs gehören zur Familie zinkabhängiger Endopeptidasen, die eine zentrale Funktion im physiologischen und pathologischen Gewebeumbau einnehmen (Roderfeld et al. 2007). Zur Gruppe der humanen MMPs zählen heute mindestens 24 zinkabhängige Endopeptidasen, die aufgrund ihrer Substratspezifität in verschiedene Gruppen eingeteilt werden:

Kollagenasen, Gelatinasen, Membranständige MMPs, Stromelysine, Matrilysine und nicht klassifizierte MMPs (Nagase et al. 2006; Hemmann et al. 2007).

Zahlreiche Forschungen haben gezeigt, dass MMPs an diversen biologischen Prozessen beteiligt sind. Sie sind essentiell für den Umbau von ECM bei der Embryogenese, der Wundheilung, dem Tumorwachstum sowie der Fibrogenese (Rodriguez et al. 2010).

MMPs katalysieren die hydrolytische Spaltung von Peptidbindungen in Proteinen und können so mittels des Abbaus z.B. von Kollagen Typ I antifibrotisch wirken (Rodriguez et al. 2010).

MMPs werden wiederum von spezifischen TIMPs gehemmt, die eine wichtige Rolle beim Auf- und Abbau der ECM spielen (Hemmann et al. 2007). Sie sind Schlüsselregulatoren der Metalloproteinasen und als Gegenspieler der MMPs zu verstehen (Brew und Nagase 2010). Bisher sind 4 verschiedene TIMPs bekannt (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4) (Hemmann et al. 2007).

Bei andauernder Schädigung und Parenchymverletzung vermitteln profibrinogene Zytokine, wie platelet-derived growth factor (PDGF), transformierender Wachstumsfaktor (TGF) -β, Tumor-Nekrose- Faktor (TNF) -α und Interleukin (IL) -1 die Aktivierung der HSC und deren Transdifferenzierung zu einem Myofibroblasten-ähnlichen Zelltyp (MF), der Extrazelluläre Matrix produziert (Xu et al. 2012; Yin et al. 2013).

Die HSC-Aktivierung ist ein entscheidendes Ereignis im Initiierungsprozess und der Progression der Leberfibrose. Aktivierte HSC weisen kontraktile Aktivität sowie eine spindelzellförmige Morphologie auf, zudem können sie die mesenchymalen zellulären Marker *alpha smooth muscle Actin* (αSMA) und Desmin exprimieren (Xu et al. 2012). *Glial fibrillary acidic protein* (GFAP), das als Marker für nicht-aktivierte HSC gilt, wird hingegen vermindert gebildet (Xu et al. 2012). Mit der Produktion von Extrazellulärmatrix wie z.B. dem Fibrillen-bildenden Kollagen Typ I tragen sie maßgeblich zur hepatischen Fibrogenese bei (Bataller und Brenner 2005; Zhou et al. 2014b). Neben der Produktion von fibrillären Kollagenen tragen auch proinflammatorische Zytokine, wie IL-6 und IL-8 sowie TIMPs zur Fibrogenese bei (Bataller und Brenner 2005). Die beiden Intermediärfilamente GFAP und Desmin sind in der Leber spezifisch für HSC und können daher zur Identifizierung dieser Zellpopulation dienen. Sie kennzeichen die Transdifferenzierung von HSC in myofibroblastenähnliche Zellen, tragen aber nicht direkt zur Fibrogenese bei (Kordes et al. 2014).

3.4. Biliäre Erkrankungen

3.4.1 Cholestase

3.4.1.1 Ätiologie und Pathogenese der Cholestase

Beeinträchtigungen des Gallenabflusses führen zu einem Syndrom, welches als Cholestase, „Gallestauung“, bezeichnet wird (Zollner und Trauner 2008). Die Ursachen sind sehr variabel und können entweder das Ergebnis der gestörten Sekretion der Galle oder aber obstruktiver Prozesse des Gallengang-Systems sein (intra-/

extrahepatische Cholestase). Auf Ebene der Hepatozyten (intrahepatisch) werden funktionale Defekte von einem breiten Spektrum an genetischen Transporterdefekten verursacht, zum Beispiel der progressiven familiären intrahepatischen Cholestase (PFIC 1,2,3) (Hirschfield et al. 2010; Zollner und Trauner 2008; Srivastava 2014). Neben Patienten mit klassischer PFIC, entwickeln Patienten mit Abcb4 Mutationen (veränderter MDR3 Funktion) ein breites Spektrum an cholestatischen Erkrankungen (Hirschfield et al. 2010; Degiorgio et al. 2016). Dazu gehören u.a. die idiopathische Gallenzirrhose des Erwachsenen, die transiente neonatale Cholestase, die intrahepatische Schwangerschaftscholestase, die Arzneimittel-induzierte Cholestase und die sklerosierende Cholangitis (Hirschfield et al. 2010). Aber auch Hepatitis, Leberzirrhose, bakterielle Infektionen und diverse Pharmaka können eine intrahepatische Cholestase auslösen (Pausch und Rösch 2009).
Im Gegensatz dazu gehören die Gallenabflussstörungen z.B. durch Gallensteine, Papillenstenose oder Tumoren zu den Auslösern einer extrahepatischen Cholestase (Hirschfield et al. 2010; Trauner et al. 2008).

3.4.1.2. Klinik der Cholestase

Die Abgrenzung von extra- und intrahepatischer Cholestase erfolgt am besten durch die Sonographie. Die klinische Unterscheidung ist schwierig, da Patienten mit Cholestase ein sehr heterogenes Erscheinungsbild liefern können. Mit der Sonographie gelingt es in bis zu 95% der Fälle Dilatationen von extra- und/ oder intrahepatischen Gallengängen festzustellen (Balfe et al. 2000) und diese anhand der Höhe des Aufstaus zu differenzieren (Busse et al. 1993).
Führende klinische Symptome sind: Ikterus, Pruritus, dunkel verfärbter Urin und acholische Stühle. Im Verlauf stellen diese Symptome Komplikationen einer portalen Hypertension dar (Paumgartner 2006; Sokol et al. 2006). Laborchemisch zeigt sich die Cholestase typischerweise durch den Anstieg Cholestase-empfindlicher Enzyme wie der Alkalischen Phosphatase (AP) und der Gamma-Glutamyl-Transferase (γGT). Zusätzlich kommt es zu einem Anstieg des direkten oder indirekten Bilirubins und der Serum-Gallensäuren (Pausch und Rösch 2009).

3.4.2 Cholangitis

3.4.2.1 Epidemiologie, Ätiologie und Pathogenese der PSC und SSC

Die Primär Sklerosierende Cholangitis (PSC) gehört zu den chronisch verlaufenden cholestatischen Lebererkrankungen unklarer Ätiologie (Pollheimer et al. 2011). Charakterisiert ist sie in erster Linie durch eine fibrosierende Entzündung der intra- und/ oder extrahepatischen Gallengänge. Hinzu kommt eine lymphozytäre Entzündung des portalen Traktes (Chapman und Cullen 2008; Hirschfield et al. 2010; Lazaridis 2008; Zollner und Trauner 2008; Pausch und Rösch 2009). Die Folge sind Cholestase und biliäre Zirrhose (LaRusso et al. 2006; Hirschfield et al. 2010).

Histologisch zeigt sich eine konzentrische, periduktale Fibrose (zwiebelschalenartig), welche in der Regel zur Stenose der kleineren Gallengänge führt. Die Erkrankung tritt mit einer Inzidenz von 1- 5/ 100.000 Einwohner pro Jahr vorwiegend zwischen dem 30. und 50. Lebensjahr auf. Jedoch können Kinder und Erwachsene jeden Alters auch betroffen sein. Männer erkranken dreimal häufiger als Frauen (Pausch und Rösch 2009; LaRusso et al. 2006). Bei 80% der Patienten ist die PSC mit einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung assoziiert- vorwiegend mit der Colitis ulcerosa, umgekehrt haben jedoch nur 5% der Colitis Patienten eine PSC (Chapman und Cullen 2008; Lindor et al. 2015).

Der Erkrankungsverlauf ist variabel. Im Durchschnitt liegen vom Zeitpunkt der Diagnose bis zu Lebertransplantation oder Tod 12 bis 15 Jahre. In dieser Zeit entwickeln etwa 10-15% der Patienten mit PSC als schwerste Komplikation ein Cholangiokarzinom (Chapman und Cullen 2008; Pausch und Rösch 2009; LaRusso et al. 2006; Schramm und Strassburg 2017).

Die Sekundär Sklerosierende Cholangitis (SSC) ist eine seltene Erkrankung und gehört wie die PSC zu den chronisch cholestatischen Lebererkrankungen (Ruemmele et al. 2009). Das histologische Erscheinungsbild ähnelt dem der PSC mit progressiver hepatischer Fibrose, Gallengangsstrikturen und Dilatationen (LaRusso et al. 2006).

Auslöser einer SSC können sowohl toxische Einflüsse, chronische Obstruktion, infektiöse Ursachen oder Erkrankungen aus dem immunologischen Formenkreis sein, als auch ischämische Ursachen nach Lebertransplantation (Ruemmele et al. 2009).

Die Klinik ähnelt der der PSC, wie in Abschnitt 3.4.2.2 näher beschrieben.

3.4.2.2 Klinik der PSC und SSC

Die klinischen Symptome der primär-/ sekundär sklerosierenden Cholangitis sind sehr unspezifisch. Häufig zeigen sich Müdigkeit, Juckreiz und Ikterus. Aber auch Symptome wie Oberbauchschmerzen durch eine fortschreitende Hepatomegalie, Gewichtsabnahme und Fieber können mit der PSC/ SSC einhergehen (LaRusso et al. 2006). Ca. 20% der Patienten sind beschwerdefrei und fallen nur durch pathologische Laborparameter auf (Boonstra et al. 2012).
Laborchemisch zeigen sich erhöhte Cholestaseparameter (AP und γGT). Zusätzlich können anti-neutrophile cytoplasmatische Antikörper (pANCA), sowie das humane Leukozyten Antigen B8 und DR3 (HLA) nachweisbar sein (Aron und Bowlus 2009).
Diagnostisch ist die endoskopisch retrograde Cholangiopankreatikographie (ERCP) die Methode der Wahl (Pausch und Rösch 2009).
In der ERCP zeigen sich multifokale Strikturen und Irregularitäten der intrahepatischen und/ oder extrahepatischen Gallengänge. Zwischen Strikturen und Stenosen bestehen normalkalibrige Segmente, wodurch das typische „perlschnurartige“ Bild entsteht. Der große Vorteil der ERCP ist die Möglichkeit von Interventionen, wie zum Beispiel einer Ballondilatation stenotisch veränderter Gallengänge (Pausch und Rösch 2009).

3.5 Zusammensetzung der Galle

Die Galle wird in der Leber zu 80% von den Hepatozyten und zu 20% von den Cholangiozyten gebildet (Lüllmann-Rauch 2006; Welsch et al. 2014). Sie ist eine pigmentreiche, isotone Flüssigkeit mit einer Elektrolytzusammensetzung, die der des Blutplasmas ähnelt. Galle besteht zu 82% aus Wasser, Gallensäuren bilden mit 67% den Hauptanteil der in ihr gelösten Substanzen. Weitere wichtige Bestandteile sind Phospholipide, Cholesterin, Proteine und Bilirubin. Das Bilirubin wird mit Glukuronsäure gekoppelt und als konjugiertes Bilirubin sezerniert. Es verleiht der Galle ihre braungelbe Farbe. Täglich werden 600-700 ml Galle produziert (Arastéh und Baenkler 2009).
Man unterscheidet primäre, sekundäre und tertiäre Gallensäuren. Zu den primären Gallensäuren gehören die Cholsäure (CA) und die Chenodeoxycholsäure (CDCA). Diese werden in der Leber aus Cholesterin synthetisiert und anschließend mit Glycin (GCA, GCDCA) oder Taurin (TCA, TCDCA) konjugiert und in die Galle ausgeschieden. Durch die Konjugation werden die primären Gallensäuren, die bei normalem pH- Wert in Wasser nur wenig löslich sind, sehr gut wasserlöslich, da sie anschließend als

Anionen vorliegen. Mit entsprechenden Kationen bilden sie Gallensalze. In der „normalen“ Galle beträgt der Quotient aus Glycin- und Taurinkonjugaten etwa 3:1 (Hofmann 1984; Arastéh und Baenkler 2009). Ein Teil der Gallensäuren wird im distalen Ileum bakteriell dehydroxyliert und so in die sekundären Gallensäuren Deoxycholsäure (DCA) und Lithocholsäure (LCA) umgewandelt und im Kolon resorbiert, Lithocholsäure in deutlich geringerem Ausmaß als Deoxycholsäure (Arastéh und Baenkler 2009). Tertiäre Gallensäuren sind Umwandlungsprodukte der sekundären Gallensäuren, die entweder im Darm oder nach deren Resorption in der Leber entstehen. Durch reduzierende Enzyme werden Ursodeoxycholsäure (UDCA) (hauptsächlich im Darm) und Sulfolithocholsäure (SLCA) (hauptsächlich in der Leber) gebildet (Hofmann 1984).

Gallensäuren bilden, oberhalb einer kritischen Konzentration in Wasser gelöst, molekulare Aggregate die als Mizellen bezeichnet werden. Diese bestehen aus Cholesterin, Phospholipiden, Lezithin und Gallensäuren. Somit ist die biliäre Exkretion des Cholesterins möglich. Außerdem sind Gallensäuren über einen mizellären Transportmechanismus für die normale intestinale Resorption der Nahrungsfette, in erster Linie Cholesterin und fettlösliche Vitamine, verantwortlich (Hofmann 1984).

3.6 Rolle des MDR3 Transporters bei Lebererkrankungen des Menschen

Multidrug resistance P-Glykoprotein 3 (MDR3) ist ein Transmembranprotein, das an der apikalen Seite der Hepatozytenmembran sitzt und zur Gruppe der *ATP-binding Cassette Transporter* (ABC) gehört (Linton 2015). Mit seiner Flippase Aktivität bringt es Phosphatidylcholin von der inneren auf die äußere Seite der kanalikulären Hepatozytenmembran (Smith et al. 2000; Wendum et al. 2012).

Knockout-Mäuse für das Maus Äquivalent des menschlichen MDR3 Transporters, mdr2 oder nach der neueren Nomenklatur Abcb4, entwickeln Gallengangs-Läsionen, die denen der Primär Sklerosierenden Cholangitis sehr ähnlich sind. Sie ähneln sich besonders im klinischen Erscheinungsbild der duktalen Fibrose und der möglichen Entwicklung eines Hepatozellulären Karzinoms ((Wendum et al. 2012).

Doch obwohl die Abcb4$^{-/-}$ Maus viele pathologische Veränderungen der PSC zeigt, konnten beim Menschen bis heute keine Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen PSC und MDR3 Defizienz festgestellt werden (Wendum et al. 2012). Mutationen dieser Flippase führen jedoch zu anderen Lebererkrankungen, wie z.B. der progressiven familiären intrahepatischen Cholestase Typ 3 (PFIC 3). PFIC 3 ist eine progressiv

verlaufende Erkrankung, deren cholestatisches Erscheinungsbild häufig bereits in der Kindheit auftritt. Duch den Defekt des *MDR3* Gens kommt es zu einem Mangel an Phosphatidylcholin in der Galle mit der Folge einer unvollständigen Mizellenbildung. Es entsteht so eine Schädigung des Gallengangepithels durch hydrophobe Gallensäuren (Jacquemin 1999).
Bestimmte Mutationen im MDR3 Gen führen zum Low Phospholipid Associated Cholelithiasis (LPAC)- Syndrom. Die Erkrankung tritt familiär gehäuft auf und geht mit einer intrahepatischen Schwangerschaftscholestase (ICP) oder einer Hormon-induzierten Cholestase einher. Die Patienten fallen durch einen Erkrankungsbeginn im jungen Erwachsenenalter (<40 LJ.), wiederauftretende Symptome nach Cholezystektomie, intrahepatische echoreiche Herde, *Sludge* oder Mikrolithiasis entlang der Gallenwege auf (Rosmorduc und Poupon 2007).

Darüber hinaus scheinen MDR3 Mutationen eine prädisponierende Rolle z.B. bei der ICP oder der toxisch/ medikamentös induzierten Cholestase zu spielen. Die ICP ist durch das Auftreten von Cholestase im dritten Trimester der Schwangerschaft bei Frauen mit einer ansonsten unauffälligen Schwangerschaftsanamnese jedoch hohem Östrogenspiegel gekennzeichnet (Bissell et al. 2001; Trauner et al. 2007; Ziol et al. 2008)
Die medikamentös induzierte Cholestase kann z.B. durch Medikamente wie Cyclosporin, Steroide, Paracetamol, Erythromycin und viele andere ausgelöst werden (Tscheke 2001; Katarey und Verma 2016). Die meisten Medikamente die eine Cholestase verursachen sind Substrate für verschiedene Transporter an der kanalikulären Hepatozytenmembran und Mitglieder der ATP- *binding Cassette* Superfamilie (Lang et al. 2007; Yang et al. 2013). Die Cholestase tritt meist dosisunabhängig (Paracetamol ausgenommen) auf und entsteht innerhalb von 4 Wochen nach Behandlungsbeginn.
Die Cholestase kann entweder akut selbstlimitierend, oder als chronische Erkrankung persistierend auftreten und zu Gallengangsschädigungen und Zirrhose führen (Bhamidimarri und Schiff 2013).

3.7 Hepatitis-B-Virus

3.7.1 Partikel und Genomaufbau

Das Hepatitis-B-Virus (HBV) ist ein membranumhülltes DNA-Virus und gehört zur Familie der Hepadnaviridae (Pausch und Rösch 2009; Glebe und Bremer 2013). Es kann beim Menschen akute und chronische Leberentzündungen verursachen (Ocama et al. 2005; Modrow et al. 2010; Glebe und Bremer 2013). Aus der Gruppe der Hepatitis Viren ist es das einzige DNA Virus, alle anderen Hepatitis Viren sind RNA Viren (Baumert et al. 2007). HBV und seine Verwandten haben ein enges Wirtsspektrum und eine hohe Leberaffinität (Glebe und Bremer 2013). Nach seinem Entdecker David S. Dane wird das HBV auch als Dane-Partikel bezeichnet (Modrow et al. 2010; Dane et al. 1970).

Die infektiösen Viruspartikel haben einen Durchmesser von 42nm und eine sphärische Gestalt. Das Virus besteht aus einer Hülle und einem Nukleokapsid. Die Virushülle bildet sich aus dem Hepatitis-B-Oberflächen (*Surface*)- Proteinen (HBsAg) und einer zellulären Lipidmembran. Vom HBsAg existieren drei unterschiedliche Formen, das L(arge)-, M(iddle)- und S(mall)- Hepatitis B *surface* (SHB) Protein (Baumert et al. 2007; Ocama et al. 2005).

Die einzelnen Formen unterscheiden sich bezüglich ihrer aminoterminalen Enden durch zusätzliche Domänen. SHBs besteht nur aus der S-Domäne, MHBs besitzt zusätzlich die PräS2-Domäne und LHB die PräS1- und die PräS2-Domäne.

Im Inneren des Virus befindet sich das ikosaedrische Capsid (*Core*), welches die DNA und die DNA Polymerase enthält (Pausch und Rösch 2009; Baumert et al. 2007). Es besteht aus dem Hepatitis-B-Core-Protein (HBcAg) (You et al. 2014).

Neben Virionen sezernieren infizierte Hepatozyten auch HBV-Oberflächenproteine als sphärische oder filamentöse Partikel, die jedoch keine virale DNA enthalten und nicht infektiös sind (Glebe und Bremer 2013). Die subviralen Partikel sind stark immunogen und dienen vermutlich als „Antikörperfänger“ zum Schutze des Virus (Prange 2012).

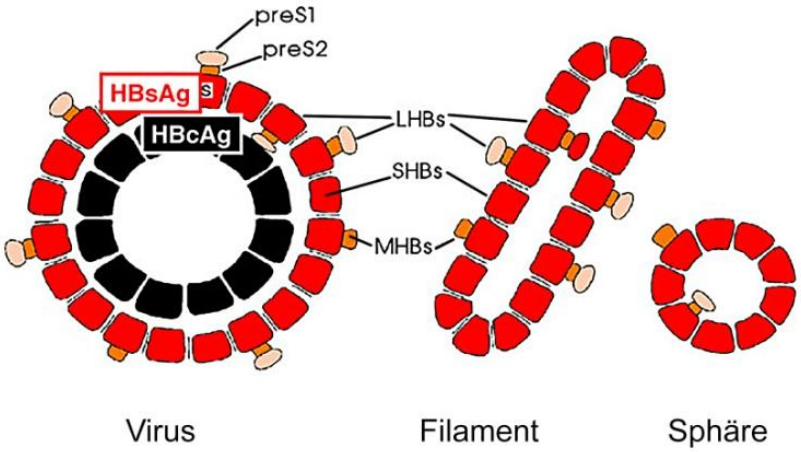

Abbildung 4. Modell des Hepatitis-B-Virus und der filamentösen und sphärischen HBsAg-Partikel (modifiziert nach Gerlich 2013)

Das Virus (links) enthält ein teilweise doppelsträngiges DNA-Genom. Der Kern ist von drei viralen Oberflächenproteinen umhüllt- dem *large* (LHBs), dem *middle* (MHBs) und dem *small* (SHBs) Proteinen. Die carboxyterminale S-Domäne (hier rot dargestellt) ist in allen Oberflächenproteinen repräsentiert, preS1 (rosa) nur in LHBs, preS2 (orange) in MHBs und LHBs vorhanden. Die Oberflächenproteine sind in eine im ER gebildete Lipidmembran eingebettet und mit Cholesterin angereichert. Die nicht-infektiösen, subviralen Partikel (Filamente und Sphären) enthalten kein Nukleokapsid und unterscheiden sich durch ihren Gehalt an LHBs.

Das Genom der infektiösen Partikel besteht je nach Subtyp aus einer ca. 3100- 3300 Basenpaare langen DNA, die nur teilweise doppelsträngig ist (Ganem und Prince 2004; Ocama et al. 2005; Glebe und Bremer 2013). Das Genom befindet sich im Inneren des Nukleokapsids. Dort befinden sich auch, über ein terminales Protein kovalent an den negativen DNA-Strang befestigt, die viralen Polymerasen. Es existieren ein kurzer Plusstrang (ohne virale Genprodukte) und ein langer Minusstrang. Der Minusstrang wird im Replikationsverlauf transkribiert und enthält insgesamt vier offene Leserahmen (*open reading frames*, ORF), die sich teilweise überlappen und in verschiedenen Leserastern abgelesen werden (Glebe und Bremer 2013; You et al. 2014).
Von diesen kodiert jeweils einer für die verschiedenen Formen des HBsAg (*small, middle und large*), für die Capsidproteine (HBcAg, das auch in sezernierter Form als exkretorisches HBeAg vorliegt), für die DNA-Polymerase (P Protein) sowie für das X-Protein (HBx) (Ocama et al. 2005; Modrow et al. 2010; Glebe und Bremer 2013).

Die Rolle von HBx für die Virusreplikation und die virusassoziierte Pathogenese ist noch nicht abschliessend geklärt und wird kontrovers diskutiert (Kew 2011; Glebe und Bremer 2013). Das X-Protein liegt als Homodimer vor und wird in der Literatur häufig mit der HBV-assoziierten Karzinogenese des HCC und regulatorischen Aufgaben bei der Replikation in Verbindung gebracht (Baumert et al. 2007; Kew 2011; Glebe und Bremer 2013). Das HBx-Protein bindet nicht selbst an die DNA, sondern wirkt durch Wechselwirkungen mit zellulären und viralen Transaktivatoren (*Promotor* und *Enhancer*) (Kew 2011). Es besitzt sowohl pro-apoptotische, als auch anti-apoptotische Eigenschaften, deren Widersprüchlichkeit noch zu erforschen ist. Besonders wichtig unter den anti-apoptotischen Eigenschaften ist, auch im Hinblick auf die Karzinogenese, die Hemmung von p53 (Kew 2011).

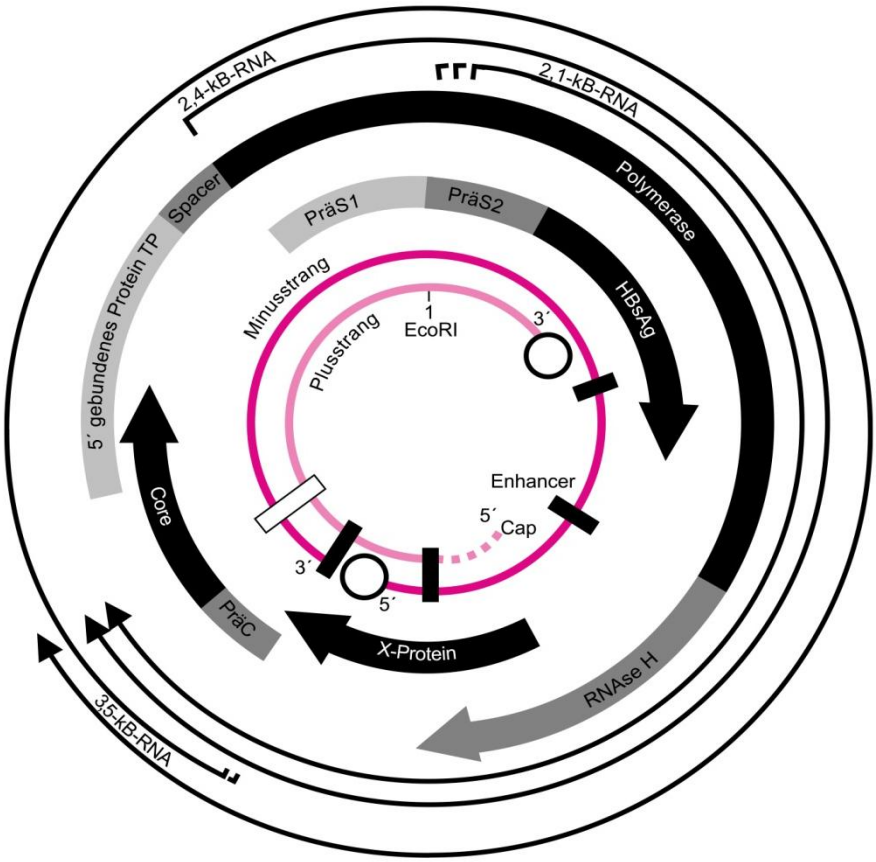

Abbildung 5. Genomorganisation des HB-Virus (Subtyp awy) (modifiziert nach Modrow et al. 2010)

Das Genom liegt in den infektiösen Viruspartikeln als partiell doppelsträngige DNA (rosa) vor. Die sich überlappenden Pfeile stehen für die *open reading frames.* Diese HBs-Proteine werden in 100-1000fachem Überschuss synthetisiert.

3.7.2 Replikationszyklus

Die Replikation von HBV erfolgt ausschließlich in den Hepatozyten des Wirts (Modrow et al. 2010). Der Replikationszyklus gliedert sich in zwei Teile:
Der erste Teil umfasst Adsorption und Eintritt des Virus in die Zelle, den zytosolischen Transport des viralen Capsids zu den Kernporen, gefolgt von der Bildung von *covalently closed circular DNA* (cccDNA) innerhalb des infizierten Hepatozyten.
Der zweite Teil beinhaltet Transkription und Translation von virusspezifischen Genen, die Einkapselung der prägenomischen Ribonukleinsäure (RNA), die reverse Transkription und die Knospenbildung und Sekretion von Virionen und subviralen Partikeln (Modrow et al. 2010; Glebe und Bremer 2013).
Die HBV-Adsorption und der Eintritt in die Zelle beginnen mit einer niederspezifischen Bindung an Heparansulfat-Proteoglycane (HSPG), gefolgt von der Bindung an hochspezifische Rezeptoren (HNCP). 2012 gelang es Yan et al. den zellulären Interaktionspartner von HBV, den HBV-Rezeptor *Natrium-Taurocholat Cotransporting Polypeptide* (NTCP) zu identifizieren (Yan et al. 2012). NTCP ist der wichtigste Transporter konjugierter Gallensäuren und kommt hauptsächlich in der Leber vor (Stieger 2011). In der Studie von Yan et al. konnte zudem gezeigt werden, dass HBV mittels des PräS1-Teils des LHB hochspezifisch mit NTCP in Kontakt tritt. Ein experimentelles *silencing* des NTCP-Rezeptors hemmt die HBV-Infektion in primären humanen Hepatozyten jedoch nicht vollständig, was darauf hindeutet, dass es noch andere zelluläre Faktoren gibt, die am viralen Eintritt beteiligt sind (Yan et al. 2012).
Der weiterführende Mechanismus des viralen *Uncoatings,* sowie des intrazellulären Transports des Nukleokapsids zum Zellkern ist noch nicht völlig verstanden (Glebe und Bremer 2013).
Von zentraler Bedeutung für die Virusreplikation ist die RNA- und DNA- abhängige DNA Polymerase, die Reverse-Transkriptase-Aktivität besitzt. Sie synthetisiert ein kurzes Stück genomischer DNA und hybridisiert sie dann mit dem RNA-Transkript. Dieses fungiert anschliessend als Primer zur Synthese des gesamten genomischen DNA-Stranges (Weber et al. 1994; Modrow et al. 2010). Der komplementäre DNA-Strang wird mit Hilfe der RNase-H-Aktivität der Polymerase synthetisiert.
Nach dem Ausschleusen aus dem Kern beginnt die Translation der messenger RNA (mRNA). Die Oberflächenproteine LHB, MHB und SHB werden an der Membran des endoplasmatischen Retikulums translatiert. Auch HBe entsteht auf diesem Wege im ER und wird dann über den Golgi Apparat in Form von Vesikeln in den Blutkreislauf sezerniert. HBc sowie die virale Polymerase werden an freien Ribosomen im Zytoplasma translatiert. In dem neugebildeten Nukleokapsid synthetisiert die virale

Reverse-Transkriptase den negativen DNA-Strang, der als Vorlage für den Plusstrang dient. Aufgrund der komplementären Sequenzen an den Enden der Stränge kann sich das Genom anschliessend in seine zirkuläre Form umwandeln (Modrow et al. 2010). Im ER werden die Nukleokapside von einer Lipiddoppelmembran des Wirts eingehüllt und gelangen dann auf sekretorischem Wege durch den Golgi-Apparat in den Blutkreislauf (Glebe und Bremer 2013).

3.7.3 Epidemiologie

Hepatitis B ist eine global auftretende, akut und chronisch verlaufende Viruserkrankung. Nach Schätzungen der WHO waren 2015 weltweit 2 Milliarden Menschen erkrankt oder hatten eine Infektion durchgemacht. Ca. 240 Millionen Menschen waren chronisch infiziert. Damit zählt Hepatits B zu den weltweit häufigsten Infektionskrankheiten (Perz et al. 2006). HBV stellt zudem global die häufigste Ursache für eine Leberfibrose-/ zirrhose und das hepatozelluläre Karzinom (HCC) dar (WHO 2015). Zu den Hochendemiegebieten für HBV gehören Sub-Sahara-Afrika und Ostasien mit einer Prävalenz von 5-10% chronisch infizierter Erwachsenener. Eine hohe Prävalenz chronischer Infektionen ist auch im Amazonas-Gebiet und in den südlichen Teilen von Ost- und Zentraleuropa zu finden. Im Mittleren Osten und auf dem Indischen Subkontinent sind ca. 2-5% der Allgemeinbevölkerung betroffen. Demgegenüber sind weniger als 1% in Westeuropa und Nord-Amerika chronisch infiziert (WHO 2015; RKI 2016). Obwohl es seit Anfang der 1980er Jahre einen Hepatitis-B-Impfstoff mit hoher Wirksamkeit und guter Verträglichkeit gibt, sind nach wie vor hohe Zahlen an Neu-Infizierten zu verzeichnen (Glebe und Bremer 2013; RKI 2016). Jedes Jahr sterben weltweit ca. 650.000 Menschen an den Folgen einer HBV-Infektion (WHO 2015).

3.7.4 Ätiologie und Pathogenese

Das Hepatitis-B-Virus wird parenteral, sexuell oder perinatal übertragen. Dabei ist der Mensch das einzige Reservoir für die Erreger, wobei eine experimentelle Übertragung auf den Schimpansen möglich ist (Barker et al. 1975).
Hochrisikogruppen stellen i.v. Drogenabhängige, Homosexuelle, promiskuitiv lebende Heterosexuelle, Dialysepatienten und medizinisches Personal dar (Shi und Shi 2009).
Die Infektion des Neugeborenen durch eine HBsAg positive Mutter kann postpartal, aber vor allem perinatal erfolgen und führt in 90% zu einer chronischen Verlaufsform (Ocama et al. 2005; Pausch und Rösch 2009; Shi und Shi 2009).

Die Inkubationszeit der akuten Hepatitis B liegt zwischen 2-6 Monaten und verläuft in bis zu 65% asymptomatisch. Die Dauer ist vor allem von der Erregerdosis, dem Infektionsweg und dem Immunstatus der Betroffenen abhängig (Gerlich et al. 2012; RKI 2016). Die symptomatische Form geht mit Ikterus, Hepatomegalie, Oberbauchschmerzen, Übelkeit, Erbrechen und Transaminasenanstieg einher. Die Erkrankungsdauer beträgt in der Regel 2-3 Wochen und heilt bei immunkompetenten Erwachsenen in über 90% der Fälle spontan aus (RKI 2016). Die meisten chronischen Infektionen treten perinatal, von infizierten Müttern auf das Kind oder von Mensch zu Mensch während des ersten Lebensjahres auf (Seeger und Mason 2015). Bei einer Infektion unter der Geburt verläuft die Infektion in ca. 90% chronisch. Auch Kleinkinder bis zum Alter von 3 Jahren und immunkompromittierte Personen entwickeln in 30-90% eine chronische HBV-Infektion (RKI 2016).

Die chronische HBV-Infektion zeigt ein breites Spektrum an Veränderungen. Die Bandbreite reicht von minimalen histopathologischen Veränderungen bis hin zur Ausprägung einer Leberfibrose-/ zirrhose.

Mit der Dauer der chronischen Infektion und der Ausbildung einer Leberzirrhose steigt das Risiko ein hepatozelluläres Karzinom zu entwickeln um das 100fache (Kremsdorf et al. 2006; Seeger und Mason 2015; RKI 2016).

3.7.5 Klinik und Diagnostik

Mittels serologischer Marker sind Aussagen darüber, ob es sich um eine frische oder eine länger bestehende Infektion handelt (Abb. 6) und über die Infektiosität, möglich.

In der Frühphase der HBV-Infektion ist HBV-DNA als erste positiver Infektionsmarker nachweisbar. Der quantitative Nachweis von HBV-DNA beschreibt die Viruslast und ist somit ein Parameter, der Rückschlüsse auf die Infektiosität zulässt. HBV-DNA wird bei fast allen Patienten mit akuter und chronischer Infektion gefunden (RKI 2016). Das HBsAg ist zwei bis zehn Wochen nach Infektion nachweisbar (Liang 2009; Gerlich et al. 2012). Sehr früh sind auch Anti-HBc-IgM und HBeAg nachweisbar. Beide zusammen zeigen das Vorliegen einer akuten Infektion an.

Die Ausheilung der HBV-Infektion ist zu Beginn durch den Verlust von HBV-DNA gekennzeichnet. Es kommt zu einer Serokonversion von Anti-HBc-IgM zu Anti-HBc-IgG, anschließend von HBeAg zu Anti-HBe-IgG und schließlich von HBsAg zu Anti-HBs-IgG. IgG-Antikörper gegen HBcAg bleiben lebenslang nachweisbar.

Bei einer Persistenz von HBsAg im Blut der Patienten über 6 Monate spricht man von einer chronischen Hepatitis B Infektion. Im Falle dieser Verlaufsform kann das HBeAg

persistieren (Immuntoleranz-Phase) oder wird nach der Serokonversion (HBeAg zu Anti-HBe-IgG) negativ (Niedrig-replikative-Phase) (Liang 2009; Modrow et al. 2010).
Nach abgelaufener Primärinfektion kommt es zu einem Anstieg der Serumtransaminasen, speziell der Alaninaminotransferasen (ALT). Freigesetzt wird die ALT durch die zytotoxische Leberentzündung und die einsetzende adaptive Immunantwort von apoptotischen Hepatozyten. Sie dient in der klinischen Diagnostik zur Einschätzung der Leberschädigung (Liang 2009).
Zur besseren Einschätzung von Schweregrad und eventueller Komplikationen einer HBV-Infektion ist es jedoch notwendig, zusätzliche Diagnostik wie die Abdomen-Sonografie, die Ösophagogastroduodenoskopie oder die Leberhistologie etc. einzusetzen (Pausch und Rösch 2009).

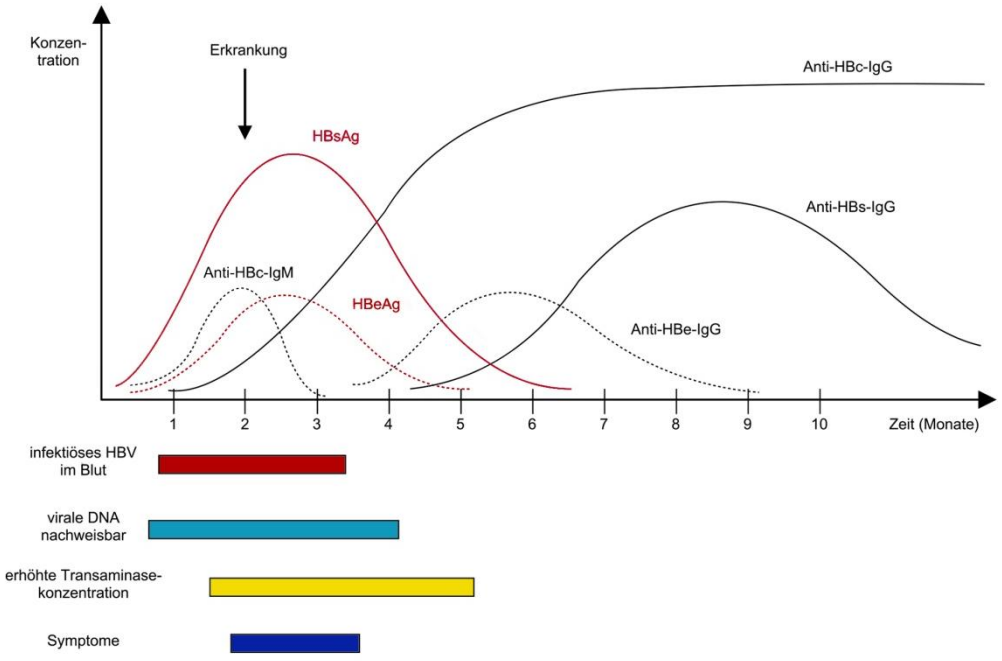

Abbildung 6. Serologische Parameter einer akuten Hepatitis-B-Virusinfektion und deren Ausheilung (modifiziert nach Modrow et al. 2010)

Legende siehe Text.

3.8 HBV und Cholangitis als gemischte Pathologie beim Menschen

Bei der Entwicklung chronischer Lebererkrankungen spielen häufig mehrere Faktoren eine Rolle, was derzeit intensiv für die nicht-alkoholische Fettleber (NAFLD),

besonders aber für die nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH), die progressive Form einer Leberverfettung, untersucht wird (Tsukamoto et al. 2009; Buzzetti et al. 2016).

In zwei Studien aus Japan konnte gezeigt werden, dass eine HBV-Infektion bereits bei Neugeborenen zu biliärer Atresie führen kann (Tanaka et al. 1993; Yaghobi et al. 2011). Yaghobi et al. konnten außerdem zeigen, dass 10% der Biopsien von HBV-Patienten eine Cholangitis bzw. eine Gallengangsschädigung aufwiesen (Burgart 1998; Gupta und Chakravarti 2008; Yaghobi et al. 2011).

In einer griechischen Studie konnte gezeigt werden, dass Patienten mit autoimmunen Lebererkrankungen wie der AIH, PBC und PSC ein signifikant erhöhtes Risiko einer okkulten HBV-Infektion haben (mit Nachweis von HBV-DNA, bei Fehlen von HBsAg) (Georgiadou et al. 2009).

Eine chinesiche Studie zeigte jedoch, dass eine HBV-Infektion, insbesondere in Endemiegebieten, eine wichtige Rolle in der Entstehung eines intrahepatischen Cholangiokarzinoms (ICC) spielt. HBV-assoziierte ICC zeigen viele Ähnlichkeiten mit dem HBV-assoziierten HCC. Interessanterweise zeigen Patienten mit einem ICC und HBV-Infektion sogar eine bessere Prognose als solche ohne begleitenden HBV-Infektion (Zhou et al. 2014a).

Derzeit ist unklar, ob eine begleitende Cholangitis den pathologischen Verlauf einer chronischen HBV-Infektion beeinflusst und ob dadurch die Entstehung eines HCC gefördert wird.

3.9 HCC Tumorgenese

3.9.1 Epidemiologie, Ätiologie und Pathogenese des HCC

Das Hepatozelluläre Karzinom ist ein multizentrisch wachsender, epithelialer Tumor. Er stellt die fünfthäufigste Krebsart des Menschen und die dritthäufigste krebsbedingte Todesursache mit steigender Tendenz in den Industrienationen dar (EASL 2015). 85%-90% aller primären Lebertumoren sind HCC. Weltweit ist die Infektion mit HBV die häufigste Ursache für ein HCC. Eine chronische Hepatitis C Infektion ist vor allem in Südeuropa und Nordamerika die häufigste Urache für eine chronische Entzündung der Leber und in der Folge für das HCC (Waller et al. 2015; Balogh et al. 2016). Die häufigsten Risikofaktoren in Deutschland sind Alkoholkonsum und eine chronische HCV-Infektion (Onkologie Leitlinienprogramm 2013). Das Metabolische Syndrom mit Diabetes mellitus, Dyslipoproteinämie, Adipositas und arterieller Hypertonie hat außerdem in den letzten Jahren zu einem deutlichen Inzidenzanstieg geführt.

Zunehmend an Bedeutung gewonnen hat auch die nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH) (Onkologie Leitlinienprogramm 2013; Waller et al. 2015). Aktuelle Daten aus den USA zeigen, dass Stoffwechselstörungen, wie die nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD) und das metabolische Syndrom, numerisch deutlich mehr zur HCC Entstehung beitragen als jeder andere Risikofaktor. Durch die hohe Prävalenz von NAFLD sowie die seit wenigen Jahren mögliche HCV Heilung (mittels direkt antiviralen Substanzen) sinkt die HCV Infektion als HCC-Auslöser in ihrer prozentualen Bedeutsamkeit (Balogh et al. 2016; Heimbach et al. 2017).
Patienten mit Leberzirrhose haben ein deutlich erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines HCC (Waller et al. 2015). Im Gegensatz zu chronischer Hepatitis C kann die chronische Hepatitis B auch im nicht-zirrhotischen Stadium ein HCC entwickeln (Waller et al. 2015; Balogh et al. 2016).
Dieser Sachverhalt ist auch die große Herausforderung beim NASH-induziertem HCC. Ca. die Hälfte der HCC tritt bei nicht-zirrhotischen Patienten auf (Kolly und Dufour 2016). Die Inzidenz der HCC Entstehung auf Grundlage einer NASH wird auf jährlich 2,6% geschätzt (Noureddin und Rinella 2015).
Genetisch bedingte metabolische Erkankungen, die eine Assoziation mit dem HCC aufweisen umfassen die Hämochromatose, den Morbus Wilson, den alpha1-Antitrypsin-Mangel, die Tyrosinämie, Glykogen-Speicherkrankheiten und die Porphyria cutanea tarda (Balogh et al. 2016). Männer erkranken 4-mal häufiger als Frauen (Balogh et al. 2016).

Die Karzinogenese ist ein Prozess zu dem genetische und epigenetische Faktoren beitragen. Tumorinitiatoren führen zu genetischen Veränderungen wie der Proto-Onkogen-Aktivierung und/ oder dem Verlust von Tumorsuppressorgenen (He et al. 2010). Auch die „Tumor-Umgebung“ ist für die Progression und das Verhalten von wesentlicher Bedeutung. Chronische Entzündungen und eine Vielzahl von Wirtskomponenten erzeugen eine für das Tumorwachstum günstige Umgebung (Patel et al. 2016).
In den letzten Jahren wurden viele verschiedene Signalwege und Schlüsselgene, die für die Tumorprogression verantwortlich sind, identifiziert:
Verschiedene Wachstumsfaktoren der Angiogenese, wie der *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) und der *Epidermal Groth Faktor* (EGF) werden bei Patienten mit HCC überexprimiert (EASL 2011). Von Bedeutung sind der Ras (*Rat Sarcoma*) MAPK (*mitogen-activated protein Kinase*)-Signalweg, der in der Hälfte der frühen und fast allen fortgeschrittenen HCC aktiviert ist. Der PI3K (phosphatidylinositol-3-kinase)/AKT/mTOR(*mammalian target of rapamycin*)-Signalweg, der die

Zellproliferation, den Zellzyklus und die Apoptose kontrolliert, ausserdem der Insulin-like growth Factor (IGFR)-Signalweg und der Wnt/β-Catenin-Signalweg.
All diese Signalwege werden als Eckpfeiler der Tumorentstehung betrachtet, wobei deren Gewichtung im einzelnen noch nicht bekannt ist (EASL 2011; Patel et al. 2016).

Schlüsselregulatoren der Karzinogenese und Hepatozytenproliferation bei HBV-Patienten sind u.a. der Transkriptionsfaktor c-JUN, die Januskinase JNK und der *signal transducer and activator of transcription* (STAT-3). Ihre Aktivierung ist essentiell für Proliferation, Zell-Transformation und somit für die HCC Entstehung (Eferl et al. 2003; He und Karin 2011). Die Bedeutung der o.g. Faktoren ist sowohl in chemisch induzierten Lebertumoren bei Mäusen, als auch im HCC beim Menschen nachgewiesen (Eferl et al. 2003; He et al. 2010; Trierweiler et al. 2016).
In einer aktuellen Studie von Trierweiler et al. konnte die wichtige Funktion von c-JUN während der HBV-assoziierten Karzinogenese spezifiziert werden. Es konnte gezeigt werden, dass c-Jun durch inflammatorische Reize verstärkt exprimiert wird und dadurch sowohl die Hepatozytenproliferation als auch die Dysplasie-Entstehung fördert (Trierweiler et al. 2016). Auch der Tumorsuppressor p53 wird durch den Transkriptionsfaktor c-Jun negativ reguliert, was wiederum zur Inhibition von apoptotischen Prozessen führt (Eferl et al. 2003).
Einige andere Studien legen einen Zusammenhang zwischen erhöhtem ER-Stress und Hepatokarzinogenese nahe (Shuda et al. 2003; Arai et al. 2006). So wurde in HCC eine konsekutive Überexpression von GRP-78 gefunden (Arai et al. 2006).
Die oben beschriebenen Alterationen lassen sich jedoch nur in einem Teil der Patienten nachweisen, so dass bisher kein überzeugendes Modell für die molekularen Grundlagen der Entstehung des HCC entwickelt werden konnte und dies weiterhin Gegenstand der Forschung ist (EASL 2011).
Das gleichzeitige Auftreten mehrerer Noxen fördert vermutlich die Entstehung eines HCC. Dies wird in der aktuellen Litertatur vor allem bei den NASH assoziierten Lebererkrankungen häufig diskutiert (Takaki et al. 2013; Buzzetti et al. 2016; Caligiuri et al. 2016). Das in dieser Arbeit vorliegende Modell ermöglicht in diesem Zusammenhang zum ersten Mal die Untersuchung der HBV- und Cholestase assoziierten hepatischen Karzinogenese.

3.9.2 Klinik und Diagnostik des HCC

Die Diagnosestellung des Hepatozellulären Karzinoms (HCC) ist oft schwierig, da die funktionalen Reserven der Leber groß sind. Die Prognose hängt in erster Linie vom Tumorstadium bei Diagnosestellung ab. Patienten mit HCC zeigen häufig keine spezifischen Frühsymptome. Unspezifische Symptome wie B-Symptomatik (Fieber, Nachtschweiß, Gewichtsverlust) treten häufig, jedoch eher spät auf, und so werden HCC meist erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert (Pausch und Rösch 2009). Für die Diagnostik eines HCC sind verschiedene bildgebende Verfahren (Sonographie, MRT, CT, Angiographie) ebenso wie Serummarker, z.B. Alpha Fetoprotein (AFP) (Reichl und Mikulits 2016) wichtig.

Die therapeutischen Optionen beschränken sich häufig auf palliative Behandlungen (Reichl und Mikulits 2016). In dieser Hinsicht ist die transabdominale Sonographie derzeit das am häufigsten verwendete Werkzeug für die HCC-Detektion und Überwachung, vor allem aufgrund ihrer Wirtschaftlichkeit und der hohen Akzeptanz von Patienten. Sensitivität und Spezifität der Sonographie sind jedoch in hohem Maße von der Erfahrung des Bedieners sowie der Verfassung des Patienten abhängig (Reichl und Mikulits 2016). Nachteile zeigen sich auch bei der Diagnose im Frühstadium des HCC, da dort die Abgrenzung eines HCC gegen eine chronische Leberzirrhose häufig schwierig ist (Reichl und Mikulits 2016).

Die *European Association for the Study of the Liver* (EASL) orientiert sich als Zeitintervall zwischen den Untersuchungen an einer Metaanalyse, die 19 Studien (Singal et al. 2009) beinhaltet und zeigte, dass die Sensitivität jener Studien, welche das Verfahren alle 6 Monate und nicht im ganzjährigen Abstand durchgeführt hatten, signifikant höher war (EASL 2011).

Ergibt die Sonographie Hinweise für eine Raumforderung sollte zur Diagnostik eines HCC nach einem Algorithmus der EASL wie folgt vorgegangen werden: Handelt es sich um Knoten <1cm Durchmesser sollte dieser in Abständen von 4 Monaten mittels Sonographie kontrolliert werden. Zeigen sich dabei Wachstum oder Veränderungen ihres Erscheinungsbildes sollten invasive Maßnahmen ergriffen werden: Bei Knoten zwischen 1 und 2cm Durchmesser sollte eine Mehrphasen-Computertomographie oder eine Perfusions-Magnetresonanztomographie angefertigt werden. Im Bestätigungsfalle kann die Diagnose eines HCC gestellt werden. Bei unklarem Befund sollte eine Biopsie erfolgen. Zeigt sich diese unauffällig empfehlen sich 4-monatige Kontrolluntersuchungen. Bei Raumforderungen von >2cm Durchmesser sollte ein analoges Vorgehen erfolgen, jedoch kann die Verdachtsdiagnose eines HCC bereits aufgrund der Bildgebung gestellt werden (EASL 2011).

3.9.3 Therapie des HCC

Zur Therpie des HCC gibt es verschiedene Evidenz-basierte Verfahren, die sich am Barcelona-Clinic-Liver-Cancer (BCLC)-Staging-System orientieren (Llovet et al. 1999). Dieses gibt Auskunft über die anzustrebende Therapie in Abhängigkeit von Tumorstadium, Leberfunktion und Allgemeinzustand (vgl. Abb. 7). Nach den aktuellen Leitlinien der *European Association for the Study of the Liver* (EASL) und der *American Association for the Study of Liver Disease* (AASLD) sind kurative Therapien nur auf frühe Tumorstadien beschränkt. Für Patienten im BCLC-Stadium 0 und A stehen als kurative Therapieoptionen die Resektion, die Lebertransplantation und die lokal ablativen Verfahren wie Radiofrequenzablation oder Alkoholinstillation zur Verfügung, während für Patienten im Stadium B die transarterielle Chemoembolisation und im Stadium C die systemische Behandlung mittels Sorafenib empfohlen werden. Für Patienten im Stadium D bleibt auch heute noch lediglich die supportive Behandlung (EASL 2011; EASL 2015).

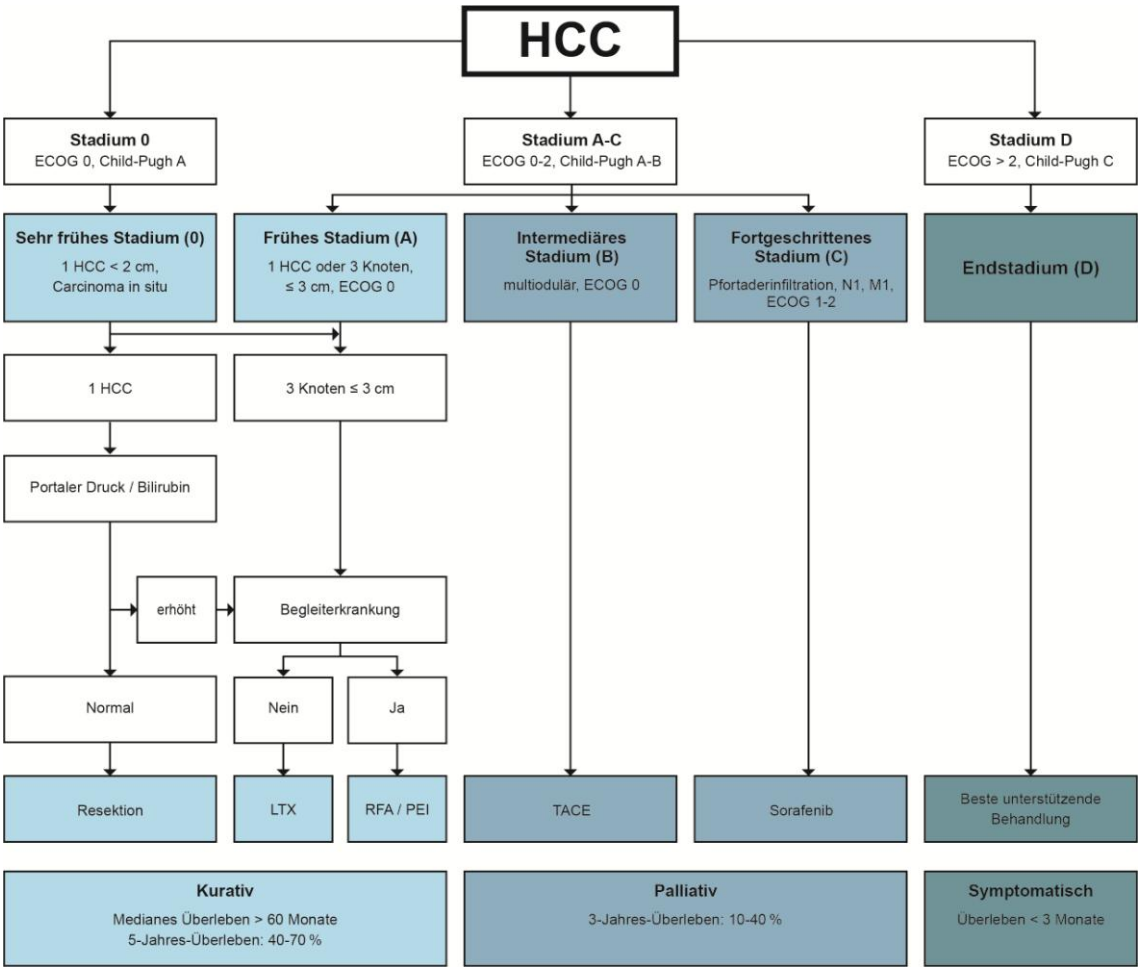

Abbildung 7. Stadieneinteilung des Hepatozellulären Karzinoms nach den BCLC Kriterien (modifiziert nach EASL 2015)

Child: A-C (Einteilung der Leberzirrhose nach Schweregrad), N1: Lymphknotenstatus positiv, M1: Metastasen vorhanden, CIS: Carcinoma in situ, RFA: Radio Frequenz Ablation, PEI: Perkutane Ethanol-Injektion, TACE: Transarterielle Chemoembolisation.

Die chirurgische Entfernung des Tumors im Sinne einer Leberteilresektion oder einer Lebertransplantation sind die einzigen Möglichkeiten einen Patienten potenziell zu heilen (Reichl und Mikulits 2016). Obwohl die Lebertransplantation die wirksamste Behandlung bei Patienten in frühem Stadium des HCC darstellt, sind weniger als 30% der Patienten für eine Transplantation geeignet.

Zur Abschätzung der Erfolgsaussichten der Lebertransplantation werden die Milan Kriterien herangezogen. Diese beinhalten die Knotengröße (prognostisch günstig ist ein Durchmesser von <5cm bei einem solitären Knoten und <3cm bei bis zu 3 Knötchen ohne makroskopische vaskuläre Invasion) und Begleiterkrankungen (EASL 2011; Raza und Sood 2014; EASL 2015). Patienten, die innerhalb der Milan-Kriterien

transplantiert werden, zeigen ein Langzeit-Überleben von 75% nach vier Jahren (Raza und Sood 2014).

Die anatomische Resektion eines unifokalen HCC stellt das Verfahren der Wahl bei Patienten ohne Zirrhose und guter Leberfunktion dar (Raza und Sood 2014; Balogh et al. 2016). Bei Patienten mit Leberzirrhose muss eine sorgfältige Vorauswahl getroffen werden, um zu vermeiden, dass es bei ungeeigneten Patienten aufgrund der insuffizienten verbleibenden Restleber zu einem lebensbedrohlichen Leberversagen kommt (Weinmann und Wörns 2009; Raza und Sood 2014).

Eine Lebertransplantation kommt für die Patienten in Frage, bei denen keine Resektion durchgeführt werden kann und die Milan-Kriterien erfüllt werden (s.o.). Aufgrund eines Mangels an Spenderorganen kann die Wartezeit bis zur Transplantation oft einige Monate betragen. Zur Überbrückung können eine Leber-Lebendspende oder neoadjuvante lokoregionäre Verfahren zum Einsatz kommen (Raza und Sood 2014; Waller et al. 2015). Zu diesen zählen die Perkutane Ethanol-Injektion (PEI), die Radiofrequenzablation (RFTA), sowie die Transarterielle Chemoembolisation (TACE), die aufgrund ihrer geringen Invasivität am häufigsten angewandt wird (Waller et al. 2015). Die lokalablativen Verfahren werden jedoch auch bei Patienten durchgeführt, die für eine primär chirurgische Versorgung ungeeignet sind und bei denen man sich durch die Therapie ein *Downstaging* erhofft (Balogh et al. 2016). Der PEI und der RFTA sollte bei Patienten im Stadium BCLC 0 und A der Vorzug gewährt werden, wohingegen die TACE bei Patienten im Stadium BCLC B eingesetzt werden sollte (vgl. Abb. 7).

Die systemische Chemotherapie kann mit Sorafenib, einem Tyrosin-Kinase-Inhibitor, durchgeführt werden, der über eine Hemmung des VEGF-Signalweges die Tumorangiogenese hemmt (Balogh et al. 2016). Diese Methode ist den Patienten im Stadium BCLC C mit guter Leberfunktion (siehe Abb. 7) oder den Betroffenen, die unter lokalablativer Therapie einen Progress zeigen, vorbehalten (EASL 2011; Waller et al. 2015).

3.10 Unfolded Protein Response

In eukaryotischen Zellen falten sich die meisten Proteine im Lumen des ER. Die Proteine treten als entfaltete Polypeptidketten in das ER ein und werden dort gefaltet. Dies unterliegt einem dynamischen Prozess, der durch verschiedene Signaltransduktionswege kontrolliert wird (Ron und Walter 2007). ER-Stress, der durch Hypoxie, Hypoglykämien, oxidativen Stress und virale Infektionen hervorgerufen

werden kann (Kim et al. 2008) führt zur Akkumulation un- bzw. fehlgefalteter Proteine im ER und stört dadurch physiologische Funktionen. Das endoplasmatische Retikulum reagiert auf die Akkumulation dieser falsch gefalteten Proteine mit der Aktivierung intrazellulärer Signaltransduktionswege, die die *Unfolded Protein Response* (UPR) auslösen (Ron und Walter 2007; Kim et al. 2008). Ziel der UPR ist die Wiederherstellung der normalen ER-Funktionen und der Homöostase zwischen fehlgefalteten Proteinen und Chaperonen.

Die Signalkaskade beginnt mit der Abkapselung des *glucose-regulated-protein-78kDa* (GRP-78) von der ER Membran (Malhi und Kaufman 2011). GRP-78 ist eines der am häufigsten vorkommenden und am besten charakterisierten calciumabhängigen Chaperone im ER, welches mit hydrophoben Domänen vieler Proteine interagiert (Gething und Sambrook 1992; Tabas und Ron 2011).

Die Aktivierung der UPR kann durch drei verschiedene Klassen von ER-Membran-*Transducern* vermittelt werden: *Inositol requiring-enzyme* (IRE1), *protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase* (PERK) und *activating transkription factor-6* (ATF-6) (Tabas und Ron 2011). Allgemein kann ER-Stress zur Ablösung von GRP-78 von diesen drei integralen Membranproteinen führen, wodurch der Faltungsstatus im Lumen des ER erfasst und diese Information über die ER-Membran nach außen zum Zytosol hin übertragen wird (Ron und Walter 2007). PERK ist ein Typ I-Transmembranprotein, welches in der ER-Membran lokalisiert ist (Bertolotti et al. 2000). Es ist luminal an GRP-78 gebunden, wodurch die Latenz dieses ER-Stress Sensors aufrecht erhalten wird. Löst sich die Bindung zwischen GRP-78 und PERK, wird PERK durch Phosphorylierung aktiviert. Aktiviertes PERK phosphoryliert anschließend den eukaryotischen Initiationsfaktor 2 alpha (eIF2α), was zu einem mRNA-Translationsstopp führt. Die dadurch reduzierte Menge an neu synthetisierten Proteinen verhindert, dass weitere ungefaltete Proteine in das ER geschleust werden. Gleichzeitig wird selektiv die Übersetzung von mehreren mRNAs erhöht, einschließlich des Transkriptionsfaktors ATF4 und nachgeschaltet von C/ EBP *homologous protein* (CHOP), auch bekannt als *DNA damage- inducible Gen* (GADD) 153. CHOP kann proapoptotische Wege vermitteln, die durch ER-Stress getriggert werden (Ron und Walter 2007).

Bisher wurde gezeigt, dass eine erhöhte CHOP Expression das Resultat von prolongiertem ER-Stress darstellt und Apoptose bewirkt. Gleichzeitig schützt eine CHOP Deletion vor Apoptose (Oyadomari und Mori 2004).

3.11 *Second Hit* Theorie

Die „*Second Hit* Theorie“ wurde erstmals 1998 von Day et al. propagiert und besagt, dass bestimmte Patienten, bei denen es zu einer Kombination von genetischen- und Umweltfaktoren kommt, für nicht-alkoholische Lebererkrankungen (NASH) prädisponiert sind (Day und James 1998).

Beim NASH Modell umfasst der „*first hit*“ eine Kombination aus weitgehend unbekannten genetischen und aus erworbenen Faktoren, die in der Folge zu einer peripheren Insulinresistenz führen. Diese führt dann wiederum zu einer Akkumulation von Triglyceriden in den Hepatozyten und damit zur Steatose.

Der „*first hit*“ erhöht die Anfälligkeit der Leber gegenüber weiteren schädigenden Faktoren („*second hit*“) (Day 2002; Takaki et al. 2013).

Der „*second hit*“ umfasst Mechanismen, die zur Entstehung von Entzündung und Fibrose führen. Dafür werden unterschiedliche Faktoren wie oxidativer Stress, mitochondriale Veränderungen und hormonelle Störungen verantwortlich gemacht (Basaranoglu et al. 2013; Day und James 1998).

Das in dieser Arbeit etablierte „*Second Hit*“ Modell aus biliärer und viraler Schädigung simuliert die häufige multifaktorielle Leberschädigung von Patienten (viral und medikamentös-toxisch). Außerdem zeigt es, wie die Koinzidenz zweier Ereignisse (HBV-Infektion und Cholangitis) den Erkrankungsverlauf in Bezug auf Metabolismus, Fibrogenese, Inflammation und Tumorgenese beeinflusst.

3.12 Tiermodelle

3.12.1 Abcb4$^{-/-}$ Mausmodell

Das Abcb4 knockout Mausmodell stellt ein gut repoduzierbares und mittlerweile sehr gut charakterisiertes Modell für Cholangiopathien dar (Fickert et al. 2004; Popov et al. 2005; Trauner et al. 2007; Baghdasaryan et al. 2008; Trauner et al. 2010; Ikenaga et al. 2015).

In diesem Mausmodell kommt es zu einem gezielten *knockout* des Abcb4 (*MDR2*) Gens, welches für die kanalikuläre Phospholipid Flippase kodiert. Das P-Glykoprotein Abcb4, ein Mitglied der Adenosin Triphosphat *binding cassette* (ABC) Transporter, ist für den Transport von Phospholipiden über die kanalikulären Membran verantwortlich (Fickert et al. 2004).

Unter physiologischen Bedingungen werden die biliären Phospholipide über die kanalikuläre Phospholipid Flippase MDR2 in die Galle transportiert und bilden dort Mizellen mit Gallensäuren. Die Aufgabe dieser Mizellen ist es, die Cholangiozyten vor der schädigenden Wirkung freier Gallensäuren zu schützen. Durch den Ausfall der Phospholipid-Flippase kommt es in den Abcb4$^{-/-}$ Mäusen zu einer durch Gallensäuren induzierten Schädigung (Fickert et al. 2004; Katzenellenbogen et al. 2007).
Die Tiere zeigen makroskopische (fokale Obliteration der Gallengänge) und mikroskopische (konzentrische periduktaler Fibrose/ zwiebelschalenartige Fibrose). Merkmale, die mit denen der primär und sekundär sklerosierenden Cholangitis beim Menschen vergleichbar sind (Fickert et al. 2004; Popov et al. 2005; Roderfeld et al. 2010b).
Mutationen im menschlichen *Abcb4* Gen (*MDR3*) sind mit einer Reihe chronischer Lebererkrankungen assoziiert, z.B. der Leberzirrhose, der Cholelithiasis, der intrahepatischen Schwangerschaftscholestase und der progressiv intrahepatischen Cholestase (PFIC) vom Typ 3 (Wasmuth et al. 2007).
Daher hat das vorliegende Mausmodell einen engen Bezug zur Pathologie verschiedener cholestatischer Erkrankungen beim Menschen.

3.12.2 Balb/c-HBV-tg Mausmodell

1985 wurde erstmals ein Mausmodell entwickelten, bei dem transgene Mäuse für das große HBV- Hüllenprotein gezüchtet wurden (Chisari et al. 1985).
Durch Microinjektion sub-genomischer HBV-DNA Fragmente aus den Plasmiden pMT-PSX und PALB-PSX wurden transgene Mäuse erzeugt. Diese sub-genomischen Fragmente codieren für die *open reading frame* (ORF) für das virale *surface* Protein und das HBx Protein (Chisari et al. 1985).
Die Tiere bilden nicht-sekretierbares, subvirales HBsAg, welches sich im Endoplasmatischen Retikulum (ER) ansammelt und schließlich zur Apoptose der Hepatozyten führt. Durch die Akkumulation des HBsAg im ER vergrößern sich die Hepatozyten und erscheinen in der H&E Färbung eosinophil, wodurch die charakteristischen „*ground glass*“ Hepatozyten entstehen (Chisari et al. 1987).
Mit fortschreitender Einlagerung von HBsAg kommt es zu Koagulationsnekrosen der Uhrglas-Hepatozyten, deren Schweregrad von der Konzentration des intrazellulären HBsAg abhängig ist. Die progrediente chronische Leberschädigung geht mit Inflammation und regenerativer Hyperplasie einher. Auf dem Boden dieser chronischen

Leberschädigung entstehen bei den Tieren im Verlauf hepatozelluläre Adenome und Karzinome (Chisari et al. 1985; Chisari et al. 1986; Chisari et al. 1987).
Die Alb1-HBV transgene Maus zeigt die hepatische Expression und Speicherung des *large* HBV *surface* Proteins, was interessanterweise zu einer Hepatitis führt, die ähnliche Symptome wie eine viralen HBV-Infektion zeigt (Chisari et al. 1985).
Das transgene Maus Modell für HBV ist ein gut etabliertes Modell für die Forschung an Lebererkrankungen die mit dem HB-Virus assoziiert sind. Sie sind weitgehend tolerant gegenüber transgenen Proteinen (Wirth et al. 1995) und stellen somit ein hervorragendes Modell für die Untersuchung direkter zytotoxischer Effekte von HBsAg und Proteinspeichererkrankungen dar (Reifenberg et al. 2006; Churin et al. 2014; Churin et al. 2015).

3.12.3 Balb/c-HBV-tg/Abcb4$^{-/-}$ Mausmodell

Für die Etablierung des HBV/ Cholangitis Mausmodells wurden Chimären aus dem HBV-Maus Modell (3.12.1) und dem Cholangitis Maus Modell (3.12.2) gezüchtet. Dies ist in Kapitel 4.1 ausführlich beschrieben.

4. Material und Methoden

4.1 Versuchstiere

Die Tierversuche wurden durch das Regierungspräsidium Giessen unter dem Aktenzeichen A36/2011 genehmigt.
Alle Tiere wurden unter spezifischen pathogen- freien (SPF)- Bedingungen im Zentralen Tierstall der Justus-Liebig-Universität, Frankfurter Str. 125, in 35392 Gießen gehalten.
Die Studie wurde außerdem unter strikter Übereinstimmung mit den Empfehlungen des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt.

Die unten aufgeführte Tabelle zeigt die in den Experimenten untersuchten Mauslinien.

Mauslinie:	Bedeutung:
C57BL/6J-Tg(Alb1HBV)44Bri/J	Ursprüngliche transgene HBV-Mauslinie auf C57BL/6J Basis (Chisari et al. 1985).
BALB/c-Tg(Alb1HBV)	Transgene HBV-Mauslinie auf BALB/c Basis. Bezeichnung: HBV-tg
BALB/c-Lm	Transgene Mauslinie auf BALB/c Basis. Kontrollgruppe (= Wild Typ). Bezeichnung: WT
CJ.129P2-Abcb4^{tm1Bor}/J	Abcb4- knockout Mauslinie, Cholangitis Maus Modell Bezeichnung: Abcb4$^{-/-}$
C.Cg-Tg(Alb1HBV)44Bri-Abcb4tm1Bor	Stellt das second Hit Modell dar Bezeichnung: Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg

Tabelle 1. Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Mauslinien

Die transgenen HBV-Maus Linien C57BL/6J-Tg(Alb1HBV)44Bri/J wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Kurt Reifenberg, Leiter der Zentralen Versuchstiereinrichtung (ZVTE) der Universität Mainz zur Verfügung gestellt.

BALBc/HBV-LHB-transgene Mäuse des Ursprungsstammes wurden in der AG Roeb über 10 Generationen von C57BL/6J -Tg(Alb1HBV-LHBs)44Bri/J auf den Fibrose-suszeptiblen Stamm BALB/cJ (Shi et al. 1997) zurück gekreuzt. Dabei entstand die HBV-transgene Mauslinie BALB/c-Tg(Alb1HBV).

Da die BALB/c-Tg(Alb1HBV)-Mäuse nicht infektiös sind, wurden sie unter S1-Bedingungen (Gentechnisch veränderte Organismen (GVO) Risikogruppe 1) gehalten.

Für die Etablierung des HBV/Cholangitis Mausmodells wurden schließlich Chimären aus dem HBV-Maus Modell und einem Cholangitis Mausmodell gezüchtet:

BALB/c-Tg(Alb1HBV)- Mäuse wurden dafür mit dem *Abcb4*-knockout Mäusen (CJ.129P2-Abcb4^{tm1Bor}/J) gekreuzt.

Die transgenen und Abcb4 heterozygoten Nachkommen wurden ein weiteres Mal untereinander verpaart, bis HBV heterozygot- transgene und Abcb4- homozygote knockout Mäuse vorlagen.

4.2 Probengewinnung und Lagerung

Es wurden sowohl männliche als auch weibliche Tiere gleicher Anzahl für die Versuche verwendet. Diese wurden im Alter von 7-8, 12-16 und 52 Wochen durch CO_2-Inhalation getötet.
Die Leber der jeweiligen Tiere wurde durch Laparotomie exenteriert und anschließend venöses Blut aus der Vena cava entnommen. Sowohl Leber- als auch Serumproben wurden in Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt.

4.3 Molekularbiologische Methoden

4.3.1 Genotypisierung

Um die Mäuse in die Kontroll- oder Versuchsgruppe einzuordnen wurde die DNA der Mäuse auf das Vorhandensein des jeweiligen Transgens untersucht. Zur Genotypisierung der Mäuse wurden Ohrlochbiopsien eingesetzt, die bei der Markierung gewonnen wurden und daraus anschließend DNA isoliert. Diese wurde mit Transgen-spezifischen Primern in der q-PCR untersucht.

Für die Aufreinigung der DNA aus den Ohrlochbiopsien der Mäuse wurde das DNeasy Blood & Tissue Kit [1] verwendet.
Den Ohrlochbiopsien wurde jeweils 180 µl ATL Puffer [2] und 20 µl Proteinase K [3] zugesetzt. Durch Vortexen [4] wurde alles gut gemischt und dann für 24 Stunden bei 56° im Thermomixer [5] inkubiert.
Nach Ablauf der Zeit wurden 200 µl AL Puffer (Qiagen) hinzugegeben, um die eigentliche Lyse zu beginnen, zusätzlich noch 200 µl EtOH (96-100%) [6] und gründlich gemischt. Das Gemisch wurde zusammen mit dem Präzipitat auf das DNeasy Mini Spin Column [7] pipettiert und danach eine Minute bei 8000 x g zentrifugiert [8]. Das Collection tube (Qiagen) wurde entleert und mit den Waschschritten durch Zusatz von 500 µl AW1 Puffer [9] begonnen. Daran schloss sich erneut eine einminütige Zentrifugation bei 8000 x g an. Das Überstand wurde verworfen und 500 µl AW2 Puffer [10] auf das DNeasy Spin Column pipettiert und wiederum eine Minute bei 8000 x g zentrifugiert. Die Collection Tubs wurden entleert und verworfen und die Säule auf 1,5 µl Eppendorf Tubes gesetzt und 40 µl Aqua dest. eluiert.

Daran schloss sich eine weitere einminütige Zentrifugation bei 8000 x g mit anschließender Lagerung bei -20°C an.

Geräte/ Materialien:
[1] DNeasy Blood & Tissue Kit, Fa. Qiagen, # 69506
[2] ATL Puffer, Fa. Qiagen
[3] Proteinase K, Fa. Qiagen
[4] Vortex Mixer 7-2020, Fa. neoLab
[5] Thermomixer 5436, Fa. Eppendorf
[6] EtOH 96-100%, Apotheke der Justus-Liebig-Universität Giessen
[7] DNeasy Mini Spin Column, Fa. Qiagen
[8] Zentrifuge Mikro 200R von Fa. Hettich
[9] AW1 Puffer, Fa. Qiagen
[10] AW2 Puffer, Fa. Qiagen
Pipettenspitzen, Fa. Sarstedt
Reaktionsgefäße Safe Seal, Fa. Sarstedt

4.3.2 RNA Isolierung

Für die Durchführung einer PCR-Analyse ist es notwendig zunächst die RNA aus Zellen oder Geweben, in unserem Fall von Mauslebern, zu isolieren. Hierfür wurde das RNAeasy Mini Kit von Qiagen [1] mit eigens dafür vorgesehenem Pipettensatz verwendet.
Mit dieser Methode ist es möglich bis zu 100 g der RNA, die aus jeweils mehr als 200 Basen besteht, an die Rneasy-Membran [2] zu binden und zu isolieren. Auf diese Weise kommt es zu einer Anreicherung von *messenger* RNA (mRNA). Andere RNA-Moleküle, wie transport RNA und ribosomale RNA, die weniger Nukleotide besitzen werden nicht gebunden.
Die bei –80°C gelagerten Proben der Mäuselebern wurden in 350 µl einer Pufferlösung [3] gegeben und danach in einem 1,5 ml Eppendorf Tube mechanisch homogenisiert [4]. Die Pufferlösung inaktiviert die in dem Lebergewebe enthaltenen RNasen. Das so entstandene Lysat wurde dann für drei Minuten bei 14.000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abpipettiert und in ein neues Eppendorf-Tube überführt. Das Lysat wurde mit 350 µl 70% Ethanol [5] versetzt, wobei vorhandene Nukleinsäuren ausgefällt werden. Anschließend wurde die entstandene Lösung auf die RNeasy Spin Column [6] eines 2 ml Eppendorf-Tube gegeben und bei

14.000 x g für 15 Sekunden zentrifugiert. Die in der Probe enthaltende RNA war nun an die Membran der Spin Column (Qiagen) gebunden.
Der Durchfluss wurde verworfen und 700 µl RW1 Puffer [7] auf die RNeasy Spin Column pipettiert und wiederum 15 Sekunden bei 14.000 x g zentrifugiert. Auch dieses Zentrifugat wurde verworfen, 500 µl RPE Buffer [8] auf dieselbe Spin Column pipettiert und danach erneut 15 Sekunden bei 14.000 x g zentrifugiert. Zum zweiten Mal wurden nun 500 µl RPE Puffer auf die Spin Column pipettiert. Anschließend wurde die Probe für zwei Minuten bei 14.000 x g zentrifugiert. Nach Abgießen des Durchflusses folgte die Trockenzentrifugation für eine Minute.
Die trockenzentrifugierte Spin Column wurde dann auf eine neues 1,5 ml Eppendorf-Tube gesetzt und zur Eluierung der RNA wurden 30- 40 µl RNase-freies Wasser (Qiagen) auf die Säule gegeben. Danach folgte eine letzte Zentrifugation für eine Minute bei 14.000 x g. Die auf diese Weise gewonnene RNA wurde unverzüglich auf Eis gelegt und bei -80 ºC eingefroren.

Die Konzentrationsbestimmung der Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des NANO-Drop Spectrophotometers [9] bei 260 nm Wellenlänge gemessen. Dafür wurde jeweils 1 µl der RNA- Probe aufgetragen.
Das Verhältnis der Absorption bei 260 nm Wellenlänge und 280 nm Wellenlänge wurde zur Prüfung der Proteinreinheit herangezogen (A260/ A280) (Gallagher und Desjardins 2006). Danach wurden die RNA-Proben entweder bei -80°C gelagert oder direkt weiterverarbeitet.

Die Konzentration der Gesamt-RNA errechnete sich wie folgt:

$$C_{RNA} = (A_{260} - A_{LW}) * 40 * V$$

C_{RNA} = RNA Konzentration in µg/ ml
A_{260} = Absorption der Probe bei 260 nm
A_{LW} = Absorption des Leerwertes (260 nm)
40 = Multiplikationsfaktor
V = Verdünnungsfaktor

Geräte/ Materialien:
[1] RNeasy Mini Kit, Fa. Qiagen, # 74106
[2] RNeasy-Membran, Fa. Qiagen
[3] RTL Buffer (Fa. Qiagen) und Mercaptoethanol (Carl Roth GmbH) im Verhältnis 1:10

[4] Homogenizer Ultra Turrax T8, Ika Werke
[5] Ethanol, Apotheke der Justus-Liebig-Universität Giessen
[6] RNeasy Spin Column, Fa. Qiagen
[7] RW1 Buffer, Fa. Qiagen
[8] RPE Buffer, Fa. Qiagen
[9] Nano Drop ND 1000 Spectrophotometer, Fa. Thermo Scientific
Pipettenspitzen, Fa. Sarstedt
Reaktionsgefäße Safe Seal, Fa. Sarstedt
RNase-freie Pipettenspitzen mit Filter, Fa. Greiner, Bio-One

4.3.3 Synthese komplementärer DNA (cDNA)

Die mRNA, die aus der zuvor beschriebenen RNA Isolierung stammt, wird bei der cDNA Synthese in komplementäre DNA umgeschrieben. Die cDNA ist also eine komplementäre DNA und entspricht als Kopie der mRNA der DNA, die die gesuchte mRNA kodiert. Diese cDNAs erhalten, wie auch Gene, die wesentlichen Informationen zur Bildung von Proteinen, besitzen aber im Gegensatz zu ihnen keine Introns.
Der RNA wurde Reverse Transkiptase zugesetzt, welche die einzelsträngige RNA in doppelsträngige DNA umschreibt. Die RNA-Menge jeder Probe wurde mithilfe der Werte aus der Konzentrationsbestimmung der Gesamt-RNA auf 1 µg umgerechnet und in einem Gesamt-Volumen von 15 µl RNase freiem- Wasser (Bio Rad Lab.) gelöst.
Mit Hilfe des iScript cDNA Synthesis Kit [1] wurde die Synthese von cDNA anschließend durchgeführt. Folgenden Reagenzien wurden nach Herstellerangaben (Bio Rad Laboratories) dazu verwendet:

5x iScript Reaction Mix	4 µl
iScript Reverse Transkriptase	1 µl
Nuclease-free water	x µl
RNA template (1 µg total RNA)	x µl
Gesamtvolumen	20 µl

Mit 1 µg der zuvor isolierten mRNA und 5x iScript Reaction mix [3] iScript Reverse Transcriptase [4] sowie RNase-freiem Wasser (Bio Rad Lab.) wurde ein Gesamtansatz von 20 µl hergestellt.
Dieser wurde danach in folgendem Programm im Thermocycler [2] inkubiert:
5 Minuten bei 25 ºC,

30 Minuten bei 45 °C,
5 Minuten bei 85 °C
Die verschiedenen Temperaturabfolgen ermöglichten die folgenden Reaktionen:
Bei 25°C findet die Hybridisierung des Primers an die RNA Matrize statt, in der 45°C Phase wird die optimale Temperatur für die reverse Transkriptase erreicht, sodass die cDNA Synthese erfolgen kann. 5 minütiges Erhitzen auf 85°C sorgte schließlich für die Denaturierung der reversen Transkriptase.

Geräte/ Materialien:
[1] iScript cDNA Synthesis Kit, BIO- Rad Laboratories, USA
[2] Thermocycler T3, Fa. Biometra, #3100-810-10
[3] iScript Reaction mix, Fa. BIO- Rad Laboratories, USA
[4] iScript Reverse Transcriptase, Fa. BIO- Rad Laboratories, USA
Pipettenspitzen, Fa. Sarstedt
Reaktionsgefäße Safe Seal, Fa. Sarstedt
RNase-freie Pipettenspitzen mit Filter, Fa. Greiner, Bio-One

4.3.4 Real time quantitativ-Detection-PCR (qPCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der Vervielfältigung und Analyse spezifischer DNA-Abschnitte (Fakruddin et al. 2013). Mit dieser Technik kann man die Genexpression selbst kleinster Genmengen auf RNA Ebene exakt bestimmen. Die Zugabe des Enzyms DNA-Polymerase ermöglicht die Amplifizierung, da die DNA-Polymerase spezifisch an einen DNA-Einzelstrang bindet. Mit Hilfe von *Primern* synthetisiert sie dann einen komplementären Strang. In vielen aufeinanderfolgenden Zyklen werden die Doppelstränge durch Erhitzen wieder getrennt und neue Komplementärstränge an diese synthetisiert. Das ist möglich, da die verwendeten Polymerasen thermostabil sind. Die verwendeten Primer, sowie deren Annealingtemperaturen sind in Tabelle 2 aufgeführt.
Die Quantifizierung der doppelsträngigen DNA wurde durch unspezifische Einlagerung des Fluoreszensfarbstoffes *SYBR Green* [1] verfolgt. Dieser Farbstoff sendet immer am Ende der 72°C-Phase ein Fluoreszenzsignal, welches bei der Wellenlänge 521 nm gemessen wird. Die Intensität der Fluoreszenz ist proportional zur gebildeten Menge an doppelsträngiger DNA. In jedem Zyklus verdoppelt sich die Anzahl der in den *Templates* enthaltenen DNA-Kopien und es erfolgt bis zur Sättigungsgrenze ein exponentieller Anstieg. Dies zeigt sich in einem sigmoidalen Kurvenverlauf.

Für die PCR wurden jeweils 0,5 µl der cDNA-Proben mit 12 µl Mastermix versetzt.

Der Mix für die Qiagen Primer bestand aus folgenden Komponenten:

	Volumen µl (für eine Probe)
Primer (Qiagen)	1,25
SYBR GREEN/Rox	6,3
dd H_2O	4,45

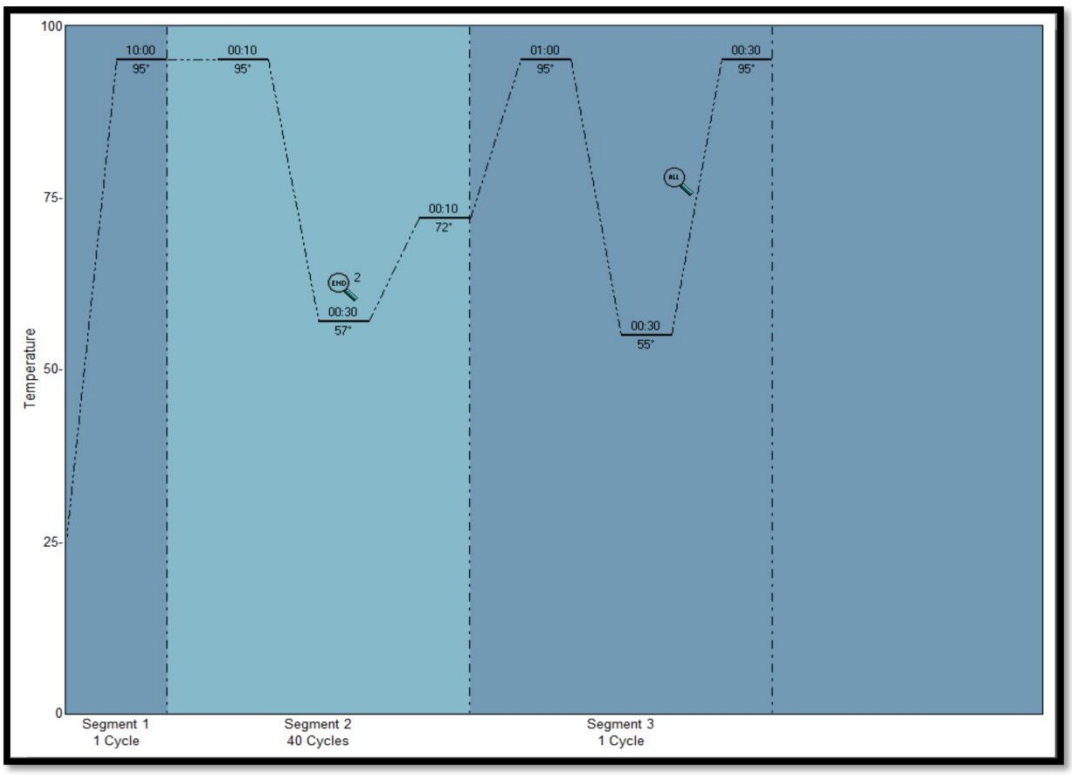

Abbildung 8. Temperaturprofil der PCR (Bild: Screenshot der Software MXpro [3]).

Die PCR wurde nach folgendem Programm durchgeführt: 1. Denaturierung bei ca. 95 °C, 10 min; 2. Denaturierung bei ca. 95 °C, 30 sec. zur Auftrennung des Doppelstrangs; 3. Primer-Hybridisierung bei spezifischer Annealing-Temperatur (30 sec. bei z.B. 57°C); 4. Polymerisation bei 72 °C, 30 min (Elongation durch Polymerase)

Am Ende der gesamten PCR-Analyse wird eine Dissoziationskurve aller Fluoreszenzsignale erstellt. Dadurch kann überprüft werden, ob andere nicht erwünschte Nebenprodukte das Endergebnis verfälschen, da diese Nebenprodukte andere Schmelzpunkte als die zu untersuchende DNA haben. Diese zeigen sich als zusätzliche Peaks in der Dissoziationskurve. Den Punkt mit der höchsten Steigung in

der Amplifikationskurve bezeichnet man als *Treshold*-Wert (CT Wert). Er bezeichnet den Zyklus, bei dem sich das Fluoreszenzsignal am deutlichsten von der Hintergrundfluoreszenz unterscheidet. Der *Treshold* ist umso größer, je kleiner die anfangs vorhandene cDNA-Menge ist.

Um kleine Pipettierfehler auszugleichen wurden bei alle Analysen Doppelbestimmungen durchgeführt und anschließend der Mittelwert der Ergebnisse berechnet. Zusätzlich wurden in jeder Analyse Negativkontrollen ohne cDNA mitgeführt um auch etwaige Verunreinigungen des Reaktionsansatzes feststellen zu können.

Für jeden Versuch wurde die Expression eines Referenzgens bestimmt. In diesem Fall war es das Housekeeping-Gen 18sRNA, das sich durch laborinterne Vorversuche als sehr valide gezeigt hatte. Bei der Auswertung wurde es dann als Vergleichsprobe genutzt, da es eine konstante Expression aufweist und unabhängig vom physiologischen Status des Gewebes ist. Aus der Differenz der *Treshold*-Werte zwischen dem zu messenden Gen und dem *Housekeeping*-Gens ergab sich eine Quantifizierung der Genexpression. Die Auswertung der quantitative PCR wurde mit Hilfe des Multiplex Quantitative PCR-Systems MX 3000P von Stratagene [2] durchgeführt. Unter Verwendung des Programms MXpro [3] wurden die Ct-Werte ermittelt und die Amplifikationskurven bewertet.

Die relative mRNA-Konzentration wurde mittels der ΔΔCt-Methode berechnet (Livak und Schmittgen 2001):

$$\Delta\Delta Ct = Ct_{Cyp18} - Ct_{Zielgen}$$

Die Temperaturprofile der PCR und die genutzten Primer sind in Tabelle 2 dargestellt:

Primer	Katalognummer	Annealingtemperatur
18 s RNA	Qiagen Cat. QT01036875	57°C
Coll 1	Qiagen Cat. QT00162204	57°C
TGF β	Qiagen Cat. QT00145250	57°C
GFAP	Qiagen Cat. QT00101143	57°C
TIMP 1	Qiagen Cat. QT00996282	57°C
TIMP 2	Qiagen Cat. QT00138558	57°C
TNF α	Qiagen Cat. QT00104006	57°C
IL1 β	Qiagen Cat. QT01048355	57°C
IL 12	Qiagen Cat. QT00153643	57°C

MMP 2	Qiagen Cat. QT00116116	57°C
MMP 7	Qiagen Cat. QT00110012	57°C
MMP 9	Qiagen Cat. QT00108815	57°C
MMP 13	Qiagen Cat. QT00111104	57°C
F4/80	Qiagen Cat. QT00099617	57°C
CD45	Qiagen Cat. QT00139405	57°C
CD4	Qiagen Cat. QT00096166	57°C
IFN γ	Qiagen Cat. QT01038821	57°C
CHOP	Qiagen Cat. QT01749748	57°C
JUN	Qiagen Cat. QT00296541	57°C

Tabelle 2. In der q-PCR verwendete Primer sowie deren Annealingtemperatur.

Geräte/ Materialien:

[1] Platinum SYBR Green qPCR Super Mix, #11733-038, Fa. Invitrogen, Carlsbad, USA

[2] Multiplex quantitative PCR- System MX 3000P, # 401 401, Fa. Stratagene

[3] MXpro, Fa. Corbett Research, Australien

Primer, siehe Tabelle, Fa. Qiagen

PCR Strips, #3418, Thermo Scientific

Pipettenspitzen, Fa. Sarstedt

Reaktionsgefäße Safe Seal, Fa. Sarstedt

RNase-freie Pipettenspitzen mit Filter, Fa. Greiner, Bio-One

4.4 Histologische Färbungen

Teile der zu untersuchenden Lebern wurden in Paraformaldehyd (1% PFA) gelagert und nach einer Nacht in Phosphatgepufferter- Salzlösung (PBS) gewaschen. Im Anschluss wurden sie in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und in Paraffin eingebettet.

Aus den in Paraffin eingebetteten Organen wurden am Mikrotom [1] 3 µm dicke Schnitte hergestellt und diese dann der Hämatoxylin-Eosin-Färbung und der Sirius-Red-Färbung unterzogen.

4.4.1 H&E- Färbung

Bei der H&E- Färbung (Hämatoxylin- Eosin- Färbung) handelt es sich um eine Kern-Plasma Färbung zur Untersuchung von histologischen Schnitten (Avwioro 2011).
Die basophilen Strukturen, z.B. Kerne färben sich blauschwarz/ violett, azidophile Strukturen wie z.B. Zytoplasma zeigen sich rot/ orange (Schmitz et al. 2010).
Die HE-Färbung dient vor allem als Übersichtsfärbung und nutzt dafür die Farbstoffe Hämatoxylin und Eosin. Die Farbstoffe werden nacheinander gefärbt, dies geschieht nach dem Prinzip der elektrostatischen Absorption und Durchtränkung.
Mit Hämatoxylin wird progressiv gefärbt, bei Erreichen des gewünschten Färbegrades wird deshalb die Färbung beendet. Da Hämatoxylin bei niedrigem pH-Wert positiv geladen ist, färbt es negativ geladene Strukturen blau.
Mit Eosin wird eher regressiv gefärbt, es wird erst überfärbt und dann mit Wasser gespült, bis der gewünschte Färbegrad erreicht ist.
Da Eosin negativ geladen ist, bindet es an positiv geladene Strukturen des Gewebes, z.B. Eiweiße des Zytoplasmas.

Das H&E- Färbeprotokoll ist nachfolgend dargestellt:
Die Objektträger werden entparaffiniert und im Brutschrank [2] 40 min. bei 60°C inkubiert und anschließend mit einer absteigenden Alkoholreihe (99,6 %, 99,6 %, 96 %, 70 % jeweils 5 min.) rehydriert. Die Proben werden für 5 min. unter fließendem Leitungswasser gespült und danach mit Hämalaun nach Mayer [3] für 4 min. gefärbt. Nach der Färbung werden sie unter fließendem Leitungswasser für 5 min. gespült. Nach anschließender Gegenfärbung mit Eosin Y Lösung [4] für 15 sec. findet ein erneut Spülschritt unter fließendem Leitungswasser statt. Danach werden die Objektträger in einer aufsteigenden Alkoholreihe (2 min. 99 % Ethanol, 2x 5 min. Isopropanol [5], 3x 5 min. Xylol [6]) erneut dehydriert. Nach dem Eindecken mit Pertex [7] und Deckplättchen werden die Objektträger getrocknet und untersucht.

Geräte/ Materialien:
[1] Microtom RM 2165, Fa. Leica
[2] Wärmeschrank Heraeus, Thermo Scientific
[3] Hämalaun Sauer nach Mayer, #T865.2, Fa. Carl Roth
[4] 0,5 % Eosin Y Lösung nach Mayer, Fa. Thermo Scientific
[5] Isopropanol, Sigma Aldrich
[6] Xylol, VWR International GmbH
[7] Pertex Eindeckmedium, Fa. Medite

99,6 % Ethanol, Apotheke der Justus-Liebig-Universität
96 % Ethanol, Apotheke der Justus-Liebig-Universität
70 % Ethanol, Apotheke der Justus-Liebig-Universität
Deckgläschen, Fa. R. Langenbrick
Objektträger Super Frost Ultraplus, Fa. R. Langenbrinck
37 % Paraformaldehyd Lösung, #1.03999.1000, Fa. Merck

4.4.2 Sirius-Red-Färbung

Bei der Sirius-Red-Färbung stellen sich Kollagenfasern rot dar, während Muskelfasern und Zytoplasma eher gelb erscheinen. Unter polarisiertem Licht ist das Verfahren eine sehr sensitive Methode zum Kollagennachweis. Kollagen Typ I färbt sich gelb-orange, Kollagen Typ III hingegen grün-weißlich (Junqueira et al. 1979).

Das Sirius-Red-Färbeprotokoll ist nachfolgend dargestellt:
Die Proben werden im Brutschrank bei 37 °C erwärmt, entparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert (siehe 4.4.1). Danach werden die Präparate kurz gespült und für 60 min. mit Sirius-Red-Lösung [1] bedeckt sowie 2x 5 min. mit einer 0,01N Salzsäurelösung [2] behandelt. Abschließend erfolgte die Dehydrierung mit einer aufsteigenden Alkoholreihe sowie das Eindecken mit Pertex (siehe 4.4.1)

Verwendete Lösungen:

Sirius Red 0,1 %:	0,1g Sirius Red [1] in 100 ml Pikrinsäure [2]
0,01N HCl:	1ml 1N HCl [3] in 99 ml Aqua dest.

Geräte/ Materialien:
[1] Sirius Red, #09400, Fa. Polysience
[2] HCl, #1000631000, Fa. Merck

4.5 Immunhistochemische Färbung

4.5.1. Immunhistochemische Analyse an Paraffinschnitten

Nach der Leberentnahme und der Organlagerung in 1% Paraformaldehyd (PFA)/ PBS über Nacht wurden die Präparate in PBS gewaschen und anschließend entwässert.

Danach folgte das Einbetten in Paraffin. Die Paraffinblöcke wurden anschließend mit Hilfe des Mikrotoms [1] in 5 µm dicke Scheiben geschnitten. Die Schnitte wurden in ein Wasserbad [2] von 40°C überführt, nach kurzer Zeit mit Hilfe eines Objektträgers [3] aufgenommen und über Nacht auf einer Heizplatte [4] bei 40°C getrocknet. Anschließend erfolgte das Färben der Schnitte.

Übersicht über die verwendeten Antikörper Tabelle 3:

Antikörper	Verd.	Hersteller	Katalognr.
LHB (mouse)/ MA 18/7	1:500	Heermann et al. (Heermann et al. 1984)	
Glutamin- Synth.	1:500	GeneTex	GTX109121
Typ IV Kollagen	1:100	Progen	10760
Ki 67 (rabbit)	1:50	Thermo Scientific	RM-9106-SO
Desmin (mouse)	1:50	Santa Cruz	Sc-23879
GFAP (rabbit)	1:50	Dako	Z0334
SOX-9 (rabbit)	1:200	Santa Cruz	Sc-20095

Tabelle 3. In der Immunhistochemie verwendete sekundäre Antiköper

Übersicht über die verwendeten Kits:

Kit	Hersteller	Katalognr.
ImmPRESS Reagent Anti-Goat IgG Peroxidase	Vector Lab	MP-7405
ImmPRESS Reagent Anti-Rabbit IgG Peroxidase	Vector Lab	MP-7401
ImmPRESS Reagent Anti-Mouse IgG Peroxidase	Vector Lab	MP-7402
Vector Vip	Vector Lab	SK-4600
M.O.M. Kit	Vector Lab	PK-2200

Tabelle 4. Übersicht über die verwendeten Kits

Der Ablauf ist nachfolgend dargestellt:

Für die Färbung von Leberschnitten wurden diese zunächst bei 60°C für 50 min. im Wärmeschrank deparaffiniert. Anschließend folgte eine absteigende Alkoholreihe zur Rehydrierung der Schnitte:

Xylol	3x, 10 min., 10 min., 5 min
99,6 % Ethanol	2x 5 min
96 % Ethanol	5 min
70 % Ethanol	5 min

Danach wurden die Schnitte 5 min. in Aqua dest. und 2x 5 min. in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Objektträger in eine Plastikküvette mit Citratpuffer überführt und 10 min. bei 600 Watt in der Mikrowelle [5] gekocht. Die Schnitte wurden in der Küvette auf Raumtemperatur (RT) abgekühlt und erst dann gewaschen (5 min. Leitungswasser, 2x 5 min. PBS). Durch die Hitzebehandlung mit Citratpuffer erfolgt eine Demaskierung der Proteine, das heißt, dass Epitope freigelegt werden, die durch die Formalinfixierung verändert wurden.

Danach erfolgte das Blocken für 10 min. mit einem 1:10 verdünnten H_2O_2-Methanol-Gemisch [6]. Nach der Inkubationszeit wurden die Objektträger wieder 5 min. in Leitungswasser und 2x 5 min. PBS gewaschen. Nach den Waschgängen folgte das Blockieren der Schnitte mit 2,5% normal *horse* Serum [7] für 20 min. in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur. Das Blockieren diente der Vermeidung bzw. Verringerung von zu starken Hintergründen durch Absättigung unspezifischer Bindungsstellen. Anschließend wurden die Objektträger dekantiert und die Schnitte kurz mit PBS gewaschen, bevor sie mit dem primären Antikörper (1 h, RT bzw. über Nacht bei 4°C) inkubiert wurden.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Objektträger wieder 3x 5 min. mit PBS gewaschen und danach der Sekundärantikörper (30 min., feuchte Kammer, Raumtemperatur (RT)) aufgetragen.

Nach Ablauf der Zeit wurden die Objektträger dekantiert, gewaschen und vorsichtig abgetupf. Nun folgte die Inkubation in Peroxidase Lösung Vector VIP (5- 30 min. bei RT).

Alle zwei Minuten erfolgten Kontrollen der Färbung unter dem Mikroskop bis eine optimale Färbung erreicht werden konnte. Danach erfolgt eine Reinigung für 5 min. unter fliessendem Leitungswasser und Gegenfärbung mit Hämalaun.

Anschließend erfolgte eine aufsteigende Alkoholreihe zur Dehydrierung der Schnitte:

Ethanol 99,6 % für 2 min.

2x Isopropanol für jeweils 5 min.

3x Xylol je 5 min.

Zum Schluss wurden die Schnitte mit dem Eindeckmedium Pertex eingedeckt und bei RT aufbewahrt.

Verwendete Lösungen:

PBS (10x): 80 g NaCl, 2g KCl, 11,5g Na_2HPO_4 x 2 Wasser und 2,45 g KH_2HPO_4 wurden in 950ml Aqua dest. gelöst und dann das Gesamtvolumen auf 1000 ml mit Aqua dest. aufgefüllt.

PBS (1x): 100 ml PBS (10x) wurden in 900 ml Aqua dest. gelöst. Danach wurde der pH der Lösung mit HCl auf 7,4 eingestellt.

Citratpuffer Ansatz:

Stammlösung A:	0,1M Zitronensäure ($C_6H_8O_7$) [8]	21,01 g
	dH_2O	ad 1000 ml
	pH 2,1	
Stammlösung B:	0,1M Trinatriumcitrat-Dihydrat ($C_6H_9Na_3O_9$)	29,41 g
	dH_2O	ad 1000 ml
	pH 8,4	
Gebrauchslösung:	Puffer A	9 ml
	Puffer B	41 ml
	dH_2O	ad 500 ml
	pH 6,0	

Geräte/ Materialien:

[1] Microtom RM 2165, Fa. Leitz

[2] Wasserbad H1210, Fa. Leitz

[3] Objektträger Super Frost Ultraplus, Fa. R. Langenbrinck

[4] Heizplatte H 1220, Fa. Leitz

[5] Mikrowelle, Fa. Alaska

[6] H_2O_2-Methanol-Gemisch, #1.07210.1000, Fa. Merck

[7] 2,5% normal horse Serum, #S-2012, Fa. Vector Lab

[8] Zitronensäure ($C_6H_8O_7$), #1002440500, Fa. Merck

Trockenschrank T12, Fa. Heraeus

Einbett- Maschine EG1140H, Fa. Leitz

Wasserbad H1210, Fa. Leitz

Pipettenspitzen, Fa. Sarstedt
Reaktionsgefäße Safe Seal, Fa. Sarstedt
Pertex Eindeckmedium, Fa. Medite
NaCl, #31434, Fa. Sigma Aldrich
KCl, #6781.3, Fa. Carl Roth
Na_2HPO_4, #3904.2, Fa. Carl Roth
KH_2HPO_4, #P030.1, Fa. Carl Roth
HCl, #84422-12, Fa. Sigam Aldrich
Trinatriumcitrat-Dihydrat, #1.06448.1000, Fa. Merck

4.6 Serumparameter

Die Parameter der klinischen Chemie wurden am Reflotron Plus, der Roche Diagnostics GmbH, Mannheim erhoben. Es wurden die Aminotransferasen Aspartat-Aminotransferase (AST, früher GPT) und Alanin-Aminotransferase (ALT, früher GOT), die Alkalische Phosphatase (AP), Cholesterin und Triglyceride (TG) gemessen.
Der Strichprobenumfang betrug dabei pro Gruppe mindestens 8-10 Tiere. Zur Sicherung der Genauigkeit wurden für jede Maus Doppelmessungen durchgeführt und anschließend der Mittelwert errechnet.

4.6.1 Serumtransaminasen AST und ALT

Die Aspartat-Aminotransferase (AST) und die Alanin-Aminotransferase (ALT) gehören zur Gruppe der Transaminasen. Diese katalysieren die Umwandlung von Aminosäuren zu α–Ketosäuren und umgekehrt.
AST ist im Gewebe weit verbreitet und kommt vor allem im Myokard vor, jedoch auch in Gehirn, Leber, Skelettmuskel und Niere.
Erhöhte Werte können in Bezug auf die Leber vor allem Hepatopathien anzeigen.
Zur Bestimmung wurde der Reflotron Teststreifen AST [1] verwendet, auf dem die aufgetragene Serumprobe Richtung Reaktionszone fließt. Nach Ablauf der chemischen Reaktion entsteht Wasserstoffperoxid welches mit einem Indikator reagiert und einen blauen Farbumschlag zur Folge hat. Dieser Farbumschlag kann dann vom Gerät durch eine kinetische Messung bei 37°C beurteilt werden. Das Ergebnis wird in U/l angezeigt.
ALT ist das leberspezifischere Enzym dieser Gruppe, weshalb auch die höchste Konzentration der Alanin-Aminotransferase in der Leber auftritt. Geringe Aktivitäten zeigen jedoch auch Niere, Herz, Skelettmuskel, Pankreas und Lunge.

Serumerhöhungen der ALT sind daher sehr spezifisch für Leberparenchymschäden.
Die Serumprobe wurde auf den Reflotron Teststreifen ALT [2] nach dem gleichen Prinzip aufgetragen wie oben bereits beschrieben.

4.6.2. Alkalische Phosphatase (ALP)

Die Alkalische Phosphatase ist ein Enzym das Phosphorsäureester hydrolysiert und an einer Reihe von Reaktionen beteiligt ist. Enzymaktivitäten findet man u.a. in Leber, Knochen, Darm und Plazenta. Häufige Ursachen einer Erhöhung sind jedoch meist Leber- und Gallenwegserkrankungen. Deshalb wird die ALP häufig zusammen mit GOT und GPT bestimmt.
Die Probe wurde auf den Reflotron Teststreifen ALP [3] aufgetragen und in der Reaktionszone hydrolysiert. Das dabei gebildete farbige Hydrolyseprodukt ist dann direkt proportional zur ALP Konzentration.

4.6.3 Cholesterin

Cholesterin gehört zur Gruppe der Steroide und wird in vielen Geweben produziert, hauptsächlich jedoch in Leber und Darm. Der größere Teil des Cholesterins entsteht durch Neusynthese und nur der kleinere Teil wird mit der Nahrung aufgenommen.
Auch bei diesem Test floss die auf den Reflotron Teststreifen Colesterol [4] aufgetragene Serumprobe ähnlich wie bei der ALT Bestimmung in die Reaktionszone. Bei den im Folgenden ablaufenden Reaktionen entstand ebenfalls Wasserstoffperoxid, welches wie vorbeschrieben mit einem Indikator reagierte und einen blauen Farbstoff erzeugte.

4.6.4 Triglyceride

Triglyceride, auch Glycerol-Triester genannt sind Ester des dreiwertigen Alkohols Glycerin mit 3 langkettigen Fettsäuren.
Ein Teil wird in der Leber synthetisiert und der andere Teil mit der Nahrung aufgenommen. Die Triglycerid-Bestimmung dient vor allem der Früherkennung von Arteriosklerose und Hyperlipidämie.
Die Triglycerid-Bestimmung erfolgte mithilfe des Reflotron Teststreifens Triglyceride [5] nach ähnlichem Messprinzip wie bei der Cholesterin-Bestimmung. Die Probe floss auf dem Teststreifen in die Reaktionszone, wo die vorhandenen Triglyceride durch

verschiedene enzymatische Schritte unter der Bildung von H_2O_2 gespalten wurden. Dieses reagierte nun mit einem Indikator, was einen blauen Farbumschlag zur Folge hatte.
Bei 37°C wurde dann der gebildete Farbstoff gemessen und die Triglycerid-Konzentration in md/dl vom Gerät errechnet.

Geräte/ Materialien:
Reflotron Plus Analyzer, Fa. Roche Diagnostics GmbH
Reflotron Teststreifen (Check), Fa. Roche Diagnostics GmbH, Ref.: 21148607
Reflotron Pipette 32µl, Fa. Roche Diagnostics GmbH

[1] Reflotron GOT (AST), Roche Diagnostics GmbH, Ref.: 10745120
[2] Reflotron GPT (ALT), Roche Diagnostics GmbH, Ref.: 10745138
[3] Reflotron ALP, Roche Diagnostics GmbH, Ref.: 11622773
[4] Reflotron Cholesterol, Roche Diagnostics GmbH, Ref.: 10745065
[5] Reflotron Triglyceride, Roche Diagnostics GmbH, Ref.: 10745049

4.7 Western Blot

Der *Western Blot* ist eine Methode zur Quantifizierung und Visualisierung von Proteinen. Dabei werden Proteine auf eine Trägermembran übertragen und anschließend mit Antigen-Antikörper Reaktionen sichtbar gemacht (Burnette 1981).
Man verwendet die Gelelektrophorese um die Proteine zu trennen und dadurch zu differenzieren. Sie trennen sich aufgrund ihrer elektrophoretischen Eigenschaften wie Länge, elektrische Ladung, Molekulargewicht, Proteinfaltung, posttranslationale Modifikation und anderer Faktoren. Danach werden die Proteine durch Elektroblotting auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und durch Antikörper sichtbar gemacht.

4.7.1 Lysat Herstellung

Zur Herstellung der Leber Lysate werden ca. 10 mg Leberpulver eingewogen und mit 400 µl 1:4 verdünntem Lämmli Puffer versetzt.
Die Proben werden kurz gevortext und danach 10 min. bei 99°C im Thermomixer gekocht. Anschließend 10 min. bei 80.000 x g zentrifugiert und der Überstand in frische Eppendorf Tube überführt. Gelagert werden die Lysate bei -20°C oder aber direkt weiterverarbeitet.

Verwendete Lösungen:

Lämmli Puffer:	TRIS/ HCl, pH 6,8 [1]	250 mmol
	SDS [2]	8 % (m/v)
	Glycerin [3]	40 % (m/v)
	Bromphenolblau [4]	0,4 % (m/v)
	Mercaptoethanol [5]	20 % (m/v)
	APS [6]	20%
	dH_2O	ad 5 ml

Geräte/ Materialien:

[1] TRIS/ HCl, Fa. Roth

[2] Sodiumdodecylsulfate (SDS), Fa. Roth

[3] Glycerin, Fa. Merck

[4] Bromphenolblau, Fa. Roth

[5] Mercaptoethanol, Fa. Roth

[6] Ammoniumperoxidsulfat (APS), Fa. Roth

4.7.2 Proteinauftrennung durch SDS-Page

Die Proteinseparation erfolgte durch die SDS- Gelelektrophorese nach Laemmli (Laemmli et al. 1970). Die Lösung für das Trenngel wurde frisch angesetzt und bis ca. 2 cm unterhalb des Glasplattenoberrandes gegossen. Um einen geraden Abschluss zu erhalten wurde das Gel mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Isopropanol abgeschüttet und das ebenso frisch angesetzte Sammelgel auf das Trenngel gegossen und ein Kamm eingebracht, welcher die Taschen für die Proben ausspart. Nach Polymerisation des gesamten Gels wurden in die Taschen jeweils 10 µg des Leber-Lysates aufgetragen. Pro Gel erfolgte die Auftragung des Größenmarkers Page Ruler [1] zur Bestimmung des Molekulargewichtes.

Die Elektrophoresekammer [2] wurde mit 1x Page aufgefüllt und die Gele wurden befestigt. In der Elektrophoresekammer floss ein Strom mit der Spannung von 130 Volt. Diese Spannung wurde angelegt bis die Lauffront das Ende des Gels erreicht hatte.

Die für die SDS-Page Elektrophorese verwendeten Puffer sind nachfolgend aufgelistet.

Verwendete Lösungen:

1x SDS Page Running Puffer:	Tris/ HCl, pH 8,3	0,25 mol/l
	Glycin	1,92 mol/l
	SDS	20 % (v/v)
	dH_2O	ad 1000 ml
TBS-T:	Tris/ HCl, pH 7,5	20 mmol/l
	NaCl	137 mmol/l
	Tween 20	0,1 % (v/v)
15% SDS – Trenngel:	Gel 30	10 ml
	Trenngel Puffer	5 ml
	dH_2O	20 ml
	APS	200 µl
	TEMED	20 µl
Trenngel Puffer:	Tris/ HCl, pH 8,8	2 mol/l
	SDS	20 % (v/v)
	dH_2O	ad 500 ml
Sammelgel:	Gel 30	0,66 ml
	Sammelgel Puffer	1,66 ml
	dH_2O	4,26 ml
	APS	80 µl
	TEMED	8 µl
Sammelgel Puffer:	Tris/ HCl, pH 6,8	0,5 mol/l
	SDS	20 % (v/v)
	dH_2O	ad 500 ml

Geräte/ Materialien:

[1] Page Ruler Plus, #26619, Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific

[2] WesternBlot- Kammer Fastblot B44, Fa. Biometra

Tetramethylethylendiamin (TEMED), Fa. Serva

Ammoniumperoxidsulfat (APS), Fa. Roth

Glycin, Fa. Merck

SDS, Fa. Roth

Rotipherese Gel 30, Fa. Roth

4.7.3 Proteintransfer auf Nitrozellulosemembran

Bei dem nun folgenden, eigentlichen Western Blot, werden die durch Gelelektrophorese getrennten Proteine vom Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran überführt. Für den Semidry Blot wird die PDVF Membran [1] vorbereiten, indem sie kurz mit 100% Ethanol aktiviert, mit H_2O abgespült und anschließend dem Anodenpuffer II zugeführt wird.
Benötigt wurden insgesamt 5 Filterpapiere, wobei zwei in Anodenpuffer I eingeweicht wurden, eins in Anodenpuffer II und 3 in den Kathodenpuffer. Anschließend wurde der Blot luftblasenfrei zusammengesetzt, wobei die Nitrozellulose zur Anode und das Gel zur Kathode gerichtet waren. Der Transfer fand bei einer Stromstärke von 70 mA/ cm_2 für die Dauer von 1 h statt.
Die für den Western-Blot verwendeten Puffer sind nachfolgend aufgelistet

Verwendete Lösungen:

Anodenpuffer I:	Tris	0,3 mmol/l
	Methanol	20 % (v/v)
	dH_2O	ad 1000 ml
Anodenpuffer II:	Tris	0,025 mmol/l
	Methanol	20 % (v/v)
	dH_2O	ad 1000 ml
Kathoden Puffer:	ε-Aminocapronsäure	0,04 mol/l
	SDS	0,01 % (v/v)
	Methanol	20 % (v/v)
	dH_2O	ad 1000 ml

Geräte/ Materialien:
[1] Polyvinylidene Fluoride Transfer Membran (PVDF), Fa. PALL Life Sciences, USA
[2] Filterpapier, VWR International GmbH
ε-Aminocapronsäure, Serva Electrophoresis GmbH
TRIS, Fa. Merck

4.7.4 Immunhistochemischer Proteinnachweis

Die PVDF-Membran mit den Proteinbanden wurde eine Stunde in 10% TBS-T-Puffer geblockt. Nach drei Waschschritten von jeweils 3x 15 Minuten erfolgte die einstündige Inkubation mit dem ersten Antikörper. Alle Erstantikörper wurden nach den Herstellerempfehlungen für die Proteindetektion verdünnt. Die eingesetzten Konzentrationen sind in nachfolgender Tabelle aufgelistet:

Übersicht über alle verwendeten Antikörper in Tabelle 5:

Antikörper	Verd.	Hersteller	Katalognummer
GADD 153 (rabbit)	1:400	Santa Cruz	F168
p-eIF2α (rabbit)	1:1000	Cell Signaling	119A11
eIF2α (rabbit)	1:1000	Cell Signaling	L57A5
BIP/ GRP78 (rabbit)	1:1000	Cell Signaling	3177s
c- Jun (rabbit)	1:1000	Cell Signaling	60A8
p-c-Jun (rabbit)	1:1000	Cell Signaling	D47G9
p-PERK (rabbit)	1:1000	Cell Signaling	3179
PERK (rabbit)	1:400	Santa Cruz	H-300
p-JNK	1:1000	Cell Signaling	81E11
STAT 3	1:1000	Cell Signaling	79D7
p-STAT 3	1:1000	Cell Signaling	D3A7
HBs AG (rabbit)	1:1000	Fitzgerald	20-HR20
LHB	1:5000	(Heermann et al. 1984)	
β Aktin (rabbit)	1:1000	Cell Signaling	13E5

Tabelle 5. Im Western Blot verwendete Antikörper und deren Verdünnung

Nach drei weiteren Waschschritten von jeweils 15 Minuten in 10% in TBS-T-Puffer erfolgte die einstündige Inkubation mit dem 1:3000 verdünnten Sekundärantikörper. Nach weiteren Waschschritten (3x15 Minuten TBS-T) wurde die Membran für eine Minute im ECL Detection Reagent inkubiert. Hier kam es zur Anregung der Horseradish-Peroxidase (HRP) durch in der Detektionslösung enthaltenes Starterreagenz. Diese Anregung führte durch Umsetzung von H_2O_2 zur Oxidation von Luminol [1]. Das bei dieser Oxidation emittierte Licht belichtete einen Röntgenfilm und ermöglichte so die Detektion des spezifischen Proteins. Die Exposition der Membran erfolgte auf Röntgenfilmen [2]. Für alle verwendeten Primärantikörper erfolgte die Membranexposition für 2 und 30 Minuten auf dem Röntgenfilm.

Verwendete Lösungen:

ECL Detection Reagent

Solution 1:	dH_2O	9 ml
	Tris/ HCl, pH 8,5	1 ml
	Luminol 250 µM	100 µl
	Coumaric acid 90 µM	45 µl
Solution 2:	dH_2O	9 ml
	Tris/ HCl, pH 8,5	1 ml
	H_2O_2	6 µl

Geräte/ Materialien:

[1] Luminol, Fa. Sigma Aldrich

[2] Röntgenfilm CL-XPosure, Fa. Thermo Scientific

Western Blot Entwicklungs Gerät Agfa Curix 60, Fa. AGFA

p- Coumaric acid, Fa. Sigma Aldrich

Röntgenkasette, Fa. Roth

4.8 Hydroxyprolinbestimmung

Hydroxyprolin (HYP) ist eine zyklische Aminosäure und ein wichtiger Baustein von Kollagen. Durch Säurehydrolyse ist es möglich den Hydroxyprolingehalt der Leberproben quantitativ zu bestimmen und daraus den Gesamtkollagengehalt zu errechnen. Das ursprüngliche Verfahren nach Woessner (Woessner 1961) wurde, um auch Proben mit niedrigem HYP- Gehlat zu erfassen, nach Stegemann und Stalder (Stegemann und Stalder 1967) modifiziert.

Ein erhöhter Hydroxyprolin Gehalt in Gewebeproben ist ein Indikator für erhöhte Kollagenablagerung.

4.8.1 Probenvorbereitung

50 mg pulversiertes Lebergewebe wird in Gläsröhrchen [1] eingewogen und bis zur Weiterverarbeitung auf Trockeneis gelagert. Anschließend wird 1 ml 6N HCl hinzugeben, homogenisieren [2] und die Probe 16 Stunden bei 110° C im Brutschrank inkubiert. Der Inhalt wird danach mit einer steriler Nadel [3], Filter [4] und Spritze [5] aufgenommen und in 1,5 ml Eppendorf Tubes überführt. Es folgt eine Zentrifugation für 5 min. bei 14.000 x g und aus dem Überstand werden dann 2x 15 µl (Doppelwerte) in 1,5 ml Eppendorf Tubes überführt. Zu jeder Probe werden 15 µl Methanol gegeben und die Eppendorf Tubes wieder kurz zentrifugiert. Im Wärmeblock [6] werden die Proben 30 min. bei ca. 40° C erwärmt und gleichzeitig mit Stickstoff eingeengt. Das entstandene Pelett anschließend bei -20° C eingefroren oder direkt weiterverarbeitet.

Geräte/ Materialien:
[1] Glasröhrchen, Schott Duran
[2] Ultra Turrax T18 Homogenizer, Fa. IKA- Works, USA
[3] sterile Nadel, B. Braun
[4] Filter Millex HP, Merck Millipore, Cat. No.: SLHP033RS
[5] Spritze, 1 ml, B. Braun
[6] Thermomixer Comfort, Fa. Eppendorf

Verwendete Lösungen:
6N HCl, Fa. Merck
Methanol, Apotheke der Justus-Liebig-Universität Giessen

4.8.2 Herstellung des Hydroxyprolin-Standards

Standard (50 µl Endvolumen):

5. 640 ng/ 50 µl (12,8 µg/ ml)= 87,2 µl 50 % Isopropanol + 12,8 µl 100 µg/ ml HP
4. 320 ng/ 50 µl (6,4 µg/ ml) 1:2
3. 160 ng/ 50 µl (3,2 µg/ ml) 1:2
2. 80 ng/ 50 µl (1,6 µg/ ml) 1:2
1. 40 ng/ 50 µl (0,8 µg/ ml) 1:2
0. Leerwert= 50 µl 50 % Isopropanol

Das Pelett wird in 50 µl 50 % Isopropanol gelöst und anschließend kurz gevortext. In die 50 µl Probe/ Standard werden 100 µl 0,6 % Chloramin T hinzugegeben. Es folgt

sofortiges vortexen und eine Inkubation bei RT für 10min. Nach Hinzugabe von 100 µl frisch hergestelltem Ehrlichs Reagenz erfolgt erneutes vortexen und Inkubation für 45 min. bei 50° C.
Die Messung der Proben findet bei 570 nm im Elisa Reader statt. Es folgt die Berechnung der Konzentration anhand der mitgeführten Standards in µg/ g Leber gegen eine Leerprobe. Jede Probe wird zweimal gemessen und zur Auswertung der Mittelwerte der Adsorption berechnet.

Die Berechnung des HYP Gehaltes erfolgt mit folgender Formel:

$$\mathbf{A / K \times F = C_{Hyp}}$$

C_{Hyp} = µg Hyp/ g Leber
A = Adsorption der jeweiligen Probe
K = Regressionskoeffizient der Standardkurve
F = Verdünnungsfaktor (hier 1,33)

Geräte/ Materialien:
Elisa Gerät Fusion, Packard
HCl, #84422-12, Fa. Sigma Aldrich
Homogenizer Ultra Turrax T8, Ika Werke
Trockenschrank T12, Fa. Heraeus
Zentrifuge Mikro 200R, Fa. Hettich
Minisart SRP 4, #17820, Fa. Sartorius
Ethanol, Apotheke der Justus-Liebig-Universität Gießen
Isopropanol, Apotheke der Justus-Liebig-Universität Gießen
L-4-Hydroxyprolin, # H5,440-9, Fa. Sigma Aldrich
Vortex Mixer 7-2020, Fa. neoLab
Microplate ELISA-Reader Fusion, Fa. HP
NaOH, #1.06498.1000, Fa. Merck
Zitronensäure-Monohydrat, # 1002440500, Fa. Merck
Natriumacetat-Trihydrat, # 1062655000, Fa. Merck
Chloramin T-Trihydrat, #1.024260250, Fa. Merck
Ehrlich Reagenz, #803057, Fa. Merck
Perchlorsäure, #30775, Fa. Sigma Aldrich
Pipettenspitzen, Fa. Sarstedt
Reaktionsgefäße Safe Seal, Fa. Sarstedt

Verwendete Lösungen:

Hydroxyprolin Stock Lsg. (HP):	1mg/ ml Hydroxyprolin- Lsg., 100 mg in 100 ml 50% Isopropanol, bei -20° C aufbewahren	
100 µg/ ml Working Lsg.:	1mg/ ml HP in 50 % Isopropanol (1:10)	
Ehrlich Reagenz Lsg.:	Ehrlich`s Reagenz	3 g
	Isopropanol	26 ml
	50 % Perchlorsäure	8 ml
0,6% Chloramin T- Lsg.:	Chloamin T	300 mg
	Puffer B	50 ml
Puffer A:	NaOH	3,4 g
	Citronensäure monohydrat (=162mM)	3,4 g
	Natriumacetat trihydrat (=881mM)	12 g
	dH_2O	ad 100 ml
Puffer B:	Isopropanol	60 ml
	dH_2O	33 ml
	Puffer A	39 ml

4.9 Analyse der Gallensäuren

Die Gallensäure-Konzentrationen im Serum wurden durch unseren Kooperationspartner Herrn Dr. rer. nat. Diran Herebian aus der Abteilung für Allgemeine Pädiatrie, Neonatologie und Kinderkardiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf mittels UHPLC-MS/MS bestimmt (Sawitza et al. 2015).

4.10 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit dem Programm SPSS Version 20.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) durchgeführt, die graphische Darstellung mit Hilfe des Computerprogrammes Microsoft Excel (Version 2007) und GraphPad Prism5

(GraphPas Software Inc.). Die Auswertung der Daten erfolgte nach Bödeker (Bödeker und Frenz 2001).

Die Stichprobenanzahl in den einzelnen Messungen sowie in den histologischen Analysen betrug n = 5-15.

Die Signifikanzen zwischen den einzelnen Gruppen wurden mittels Mann-Whitney-U-Test berechnet. Dieser Test war hierzu am besten geeignet, da nur kleine Stichproben vorlagen und die Werte in den Subgruppen nicht sicher normalverteilt waren.

Desweiteren wurde der Spearman Rank Test für die Korrelation zwischen der ALT und der Gallensäure Konzentration der jeweiligen Gruppen verwendet.

Die erhöhte Tumor Inzidenz wurde mit dem Chi^2 Test gemessen.

Box und Whisker Plots wurden verwendet, um zentrale Tendenzen, Streuung und Spannweite der Verteilung zu erkennen. Die Box umfasst die mittleren 50% der Verteilung und reicht vom oberen bis zum unteren Quartil, die der 75. und 25. Perzentile entsprechen.

P-Werte:

Die Ergebnisse der Tests wurden in P-Werte umgerechnet. Dies ist das maximale Niveau, zu dem der Test die Nullhypothese noch widerlegen kann. Für die Signifikanzgrenze wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ($p<0,05$) gewählt. Die signifikanten Unterschiede wurden in den Diagrammen mit Sternchen [*] gekennzeichnet. Als hochsignifikant gelten Unterschiede, bei dem der P-Wert kleiner als das Signifikanzniveau $\alpha=0.01$ ist. Solche Unterschiede wurden in den Diagrammen mit zwei Sternchen [**] gekennzeichnet.

5. Ergebnisse

5.1 Hepatische Schädigung

5.1.1 Verstärkte Parenchymschädigung im Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Modell

Um einen allgemeinen Leberschaden zu quantifizieren wurde die Aktivität der Alanin-Aminotransferase (ALT) im Serum der Tiere gemessen.

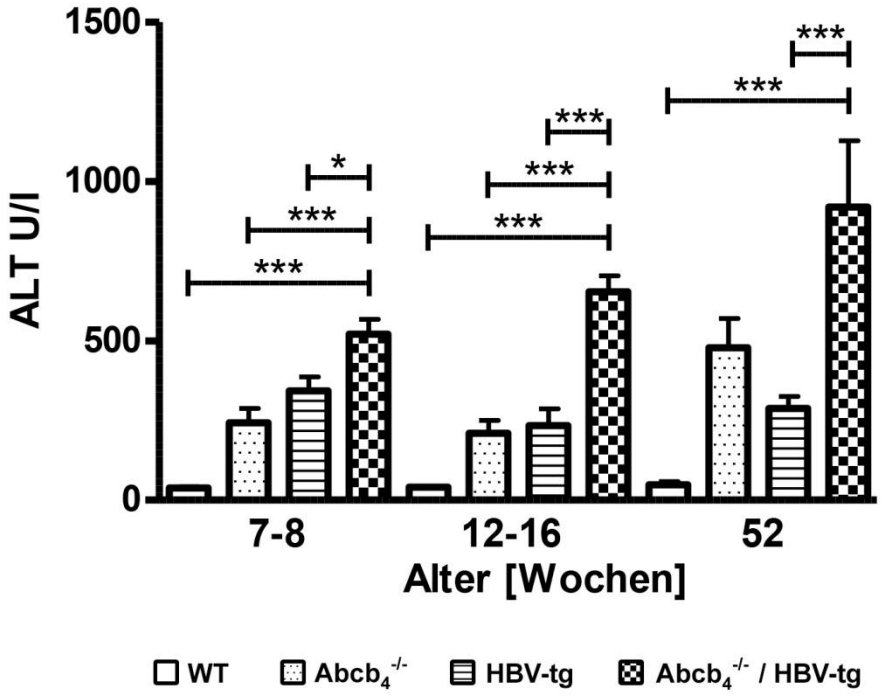

Abbildung 9. Darstellung der hepatischen Schädigung anhand der Serum ALT-Konzentrationen.

Eine HBsAg Expression erhöht die Serum-ALT Konzentration im Abcb4$^{-/-}$ Modell. Die Abbildung zeigt den Vergleich der Mittelwerte der Serum ALT Konzentrationen. Stichprobenumfang: n=10 (5 männliche und 5 weibliche Tiere)

Bei Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Tieren (karierte Säule) zeigten sich 2-3fach erhöhte ALT-Konzentrationen verglichen mit Abcb4$^{-/-}$ Tieren (gepunktete Säule) in allen Altersgruppen. Speziell bei 12-16 und 52 Wochen alten Tieren der Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Gruppe zeigte sich ein nahezu additiver Effekt der ALT Konzentrationen von Abcb4$^{-/-}$ und HBV-tg Mäusen. Diese Tiere entwickelten einen deutlichen Leberzellschaden und es fand sich eine verstärkte Parenchymschädigung (vgl. Abb. 10). Die gemittelten ALT

Konzentrationen stiegen von 521U/l bei den 7-8 Wochen alten Tieren auf 920U/l bei den 52 Wochen alten Tieren in der Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Gruppe.

Die mit den erhöhten Serum ALT Konzentrationen einhergehenden histologischen Veränderungen der Leber wurden mittels H&E-Färbungen untersucht.

5.1.2 Gesteigerte periportale Entzündungsreaktion im Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Modell

Die H&E- Färbung ist eine der wichtigsten und in der Pathologie am häufigsten verwendete Färbemethode zur Unterscheidung verschiedener Gewebestrukturen und dient vor allem als Übersichtsfärbung (Avwioro 2011). Basophile Strukturen, z.B. Kerne färben sich blauschwarz-violett, azidophile Strukturen wie z.B. Zytoplasma rot-orange (vgl. Kapitel 4.4.1).

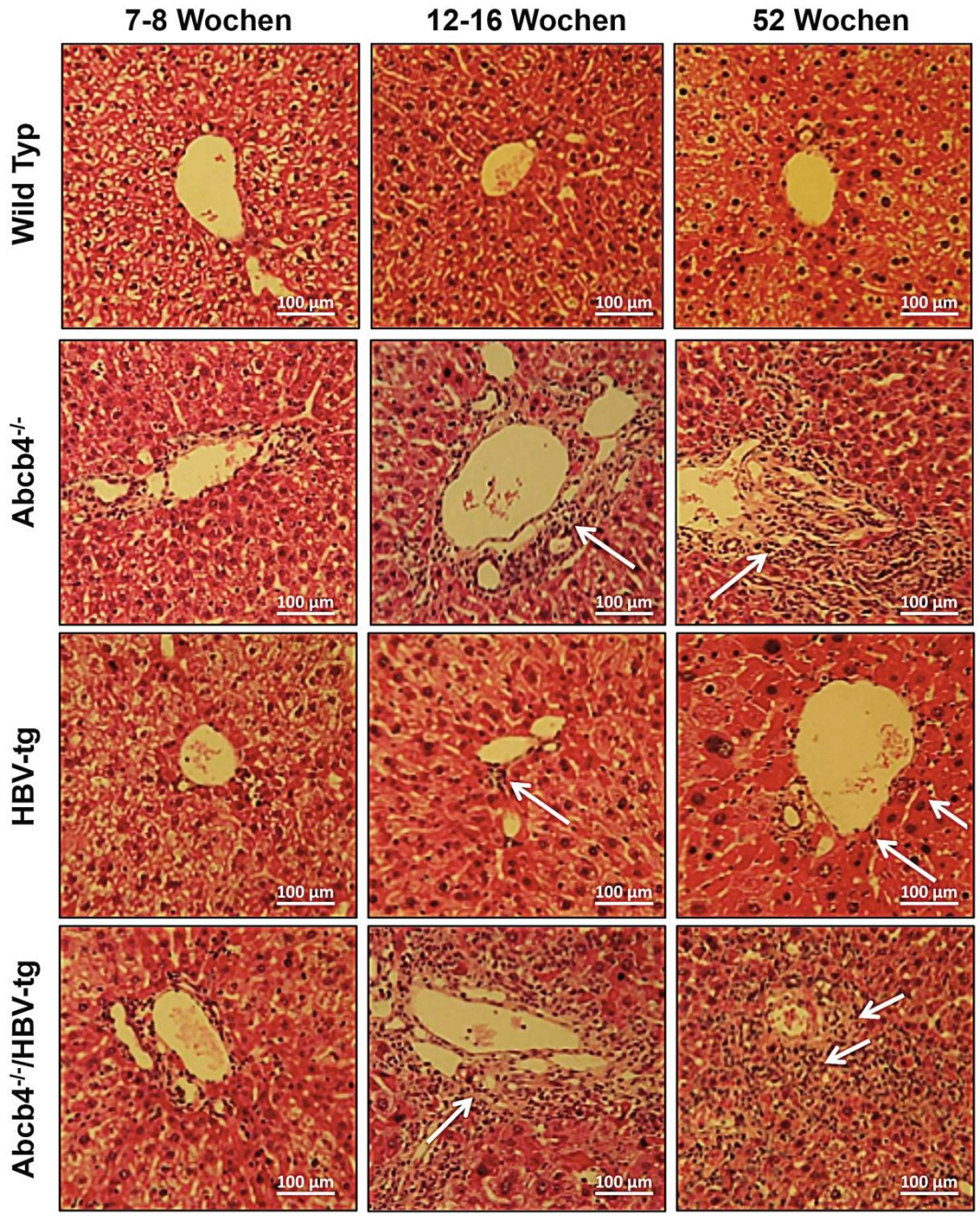

Abbildung 10. Gesteigerte portale Inflammation in Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Tieren.

H&E Färbung von Lebergewebe, Maßeinheit: 100 µm, Vergrößerung: 200 x Verstärkte periportale Entzündungsreaktion (Leukozyteninfiltration siehe Pfeil) im Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Modell vor allem bei den 52 Wochen alten Tieren.

Wildtiere (oberste Zeile) zeigten in allen Altersgruppen eine unauffällige Gewebestruktur und normale Zellgrößen. Sowohl in den Abcb4$^{-/-}$ Tieren (2. Zeile von oben), als auch in den HBV-tg Tieren (3. Zeile von oben), fiel eine vermehrte Leukozyteninfiltration (Pfeil) sowie eine hepatozelluläre Parenchymschädigung auf. Die

Gallengangsproliferation in den Abcb4$^{-/-}$ Tieren wurde durch die HBsAg Expression in Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Tieren vermutlich noch verstärkt (unterste Zeile, Bild rechts, Pfeil).
Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Tiere zeigten mit zunehmendem Alter, verglichen mit den Kontrollen (WT, Abcb4$^{-/-}$ und HBV-tg), eine verstärkte Infiltration von Immunzellen um die Portalfelder. Speziell bei 52 Wochen alten Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Tieren zeigte sich eine Zerstörung der Leberarchitektur und eine ausgeprägte kompensatorische mesenchymale Proliferation.

Um den Fibrosierungsgrad zu bestimmen und eine Aussage über die Verteilung des Kollagens innerhalb der Leber machen zu können, wurden Leberschnitte mit Sirius-Red gefärbt. Somit ließ sich der Kollagengehalt histologisch nachweisen und beurteilen (vgl. Kapitel 4.4.2).

5.1.3 Gesteigerte Kollagenexpression im Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Modell

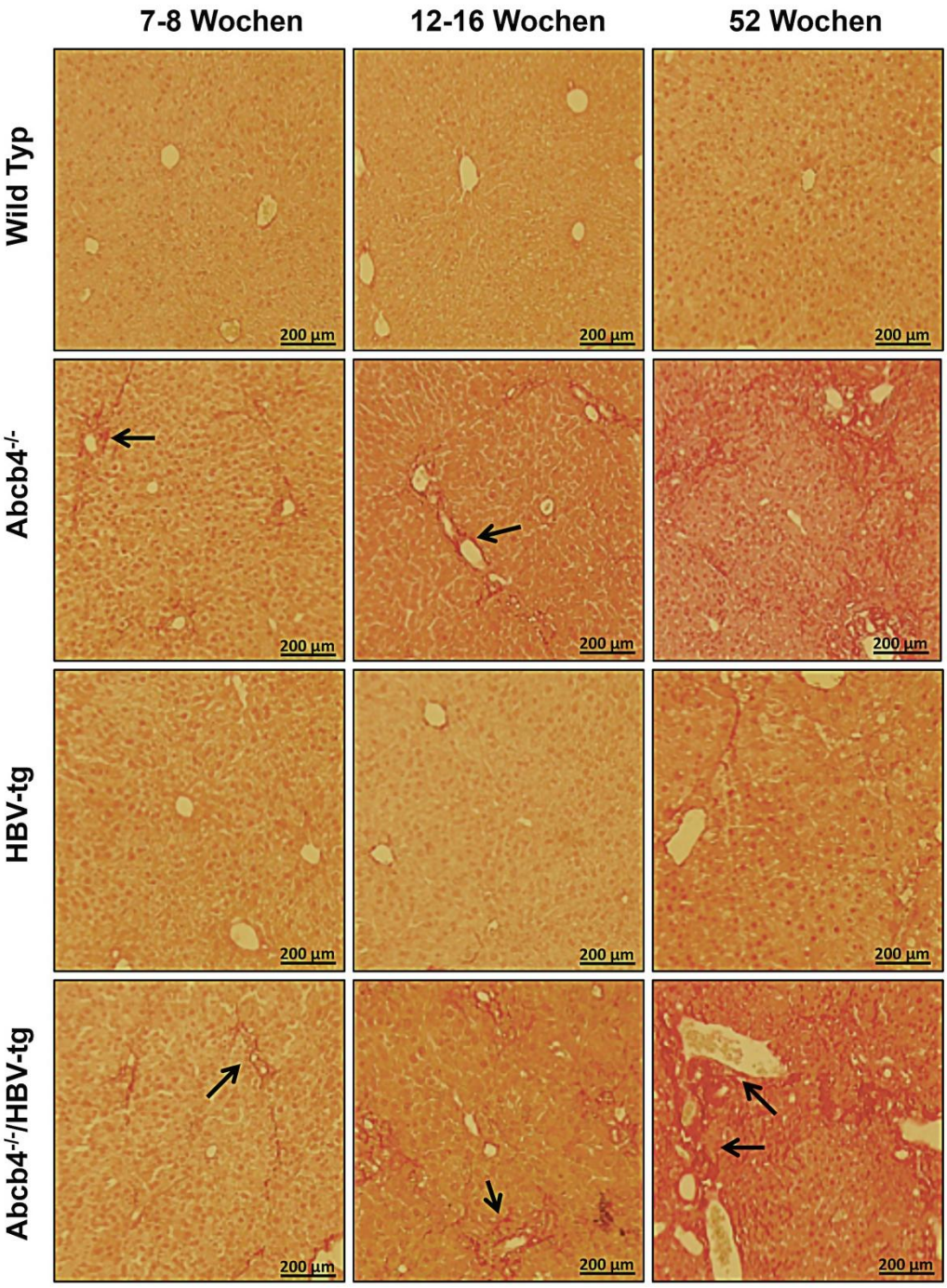

Abbildung 11. Verstärkte Fibrose im Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Modell.

Sirius-Red-Färbung von Lebergewebe, Maßeinheit: 200 µm, Vergrößerung: 100 x
Die Färbung demonstrierte eine verstärkte Kollagenexpression im Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Modell.

Die Sirius-Red gefärbten Schnitte demonstrierten den unterschiedlichen Kollagengehalt und damit den unterschiedlichen Fibrosierungsgrad in den vier experimentellen Gruppen. Ablagerungen fibrillärer Kollagene wurden hauptsächlich im Periportalbereich der jeweiligen Tiere beobachtet (Pfeile).
Die typische zwiebelschalenartige, periduktale Fibrose entwickelte sich schon in jungen Abcb4$^{-/-}$ (zweite Zeile von oben, erstes Bild von links, Pfeil) und Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg (unterste Zeile, erstes Bild von links, Pfeil) Mäusen.
Im Vergleich zu Abcb4$^{-/-}$ Mäusen und HBV-tg Mäusen zeigten Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Tiere eine stärkere Fibrosierung vor allem im Alter von 52 Wochen (unterste Zeile, drittes Bild von links, Pfeil). Die Zunahme periportaler und septaler Kollagenexpression (Pfeil) in Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Tieren machte den progressiven Verlauf deutlich und ließ eine verstärkte Kollagenansammlung bei HBsAg Expression vermuten.

Die Sirius-Red gefärbten Schnitte wurden anschliessend unter polarisiertem Licht fotografiert und mittels ImageJ quantifiziert.

Bei der Quantifizierung Sirius-Red positiver Areale ergab sich ein signifikant erhöhter Fibrosierungsgrad in Abcb4$^{-/-}$, HBV-tg und Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Tieren aller Altersgruppen. Speziell im Alter von 12-16 Wochen zeigten die Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Tiere eine verstärkte Fibrosebildung verglichen mit den Kontrollen (WT, Abcb4$^{-/-}$, HBV-tg). Im Alter von 52 Wochen zeigte sich dieser Effekt noch deutlicher (siehe Abb. 12).

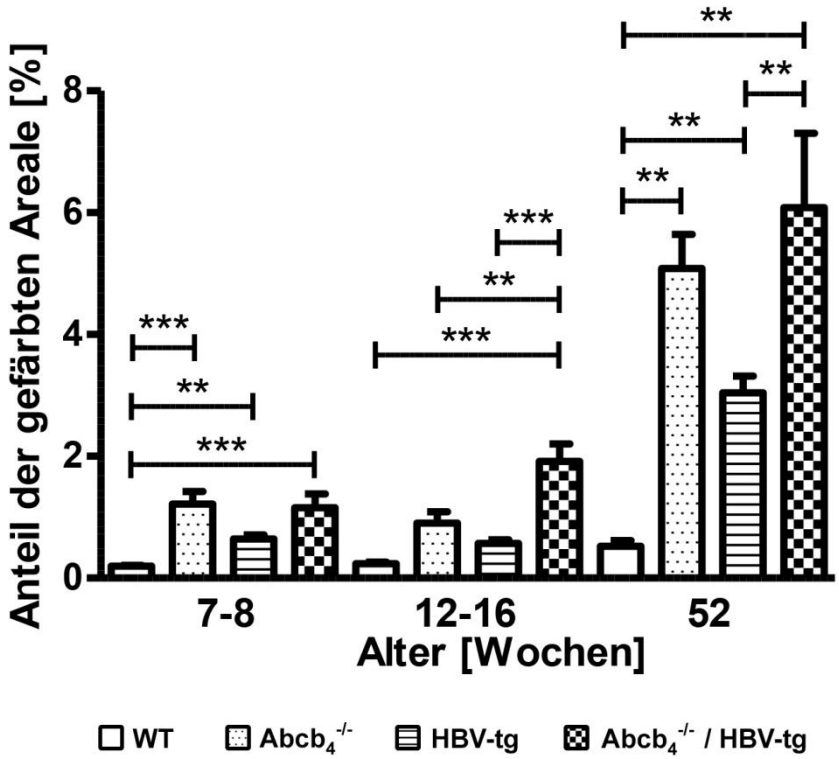

Abbildung 12. Quantifizierung Sirius-Red positiver Areale.

Verstärkte Kollagenexpression in allen Gruppen (Abcb4$^{-/-}$, HBV-tg, Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg) verglichen mit dem WT. Stichprobenumfang: n=5 (3 männliche, 2 weibliche Tiere). Bei jeder der untersuchten Mäuse wurden 3 Bilder aus verschiedenen Leberschnitten mit Hilfe der Computer Anlayse ImageJ ausgewertet.

Ergänzend zur Sirius-Red-Färbung wurde zur Bestimmung des Ausmaßes der Fibrose die biochemische Quantifizierung von Hydroxyprolin im Lebergewebe der Mäuse durchgeführt. Die in dieser Methode nachgewiesene Aminosäure Hydroxyprolin kommt fast ausschließlich in fibrillärem Kollagen vor (vgl. Kapitel 4.8).

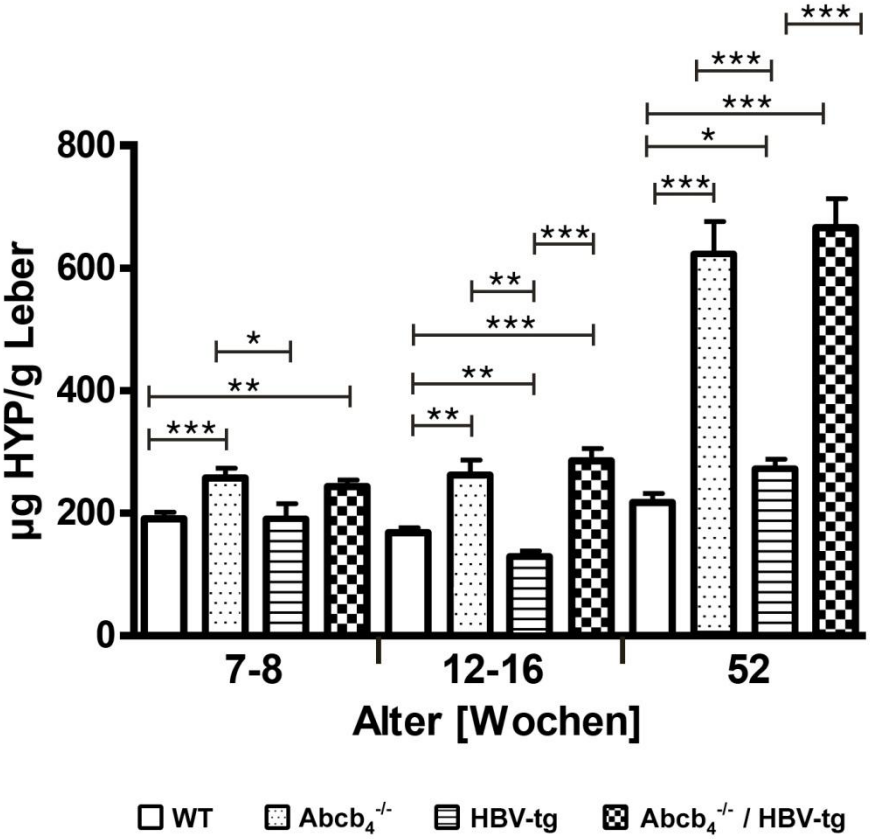

Abbildung 13. Signifikant erhöhter hepatischer Hydroxyprolin-Gehalt in Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Tieren verglichen mit dem WT.

Die Grafik zeigt eine altersabhängige Zunahme des Hydroxyprolingehaltes. Die Abbildung zeigt den Vergleich der Mittelwerte. Stichprobenumfang: n = 10 (5 weibliche und 5 männliche Tiere).

Im Alter von 7-8 und 12-16 Wochen fanden sich signifikante Unterschiede im Hydroxyprolin-Gehalt der WT-Tiere verglichen mit den Kontrollgruppen (Abcb4$^{-/-}$, HBV-tg, Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg). Abcb4$^{-/-}$ Tiere zeigten weder im Alter von 7-8 Wochen, noch im Alter von 12-16 Wochen signifikante Unterschiede im Hydroxyprolin-Gehalt gegenüber den Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Tieren. Interessanterweise war der Kollagen-Gehalt von HBV-tg Tieren signifikant gegenüber dem der Abcb4$^{-/-}$ Tiere vermindert. Vergleicht man Abcb4$^{-/-}$ Tiere (gepunktete Säule) mit HBV-tg Tieren (gestreifte Säule) und Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Tieren (karierte Säule), so zeigten sich zwar vor allem im Alter von 52 Wochen signifikante Unterschiede im Hydroxyprolin-Gehalt zwischen den einzelnen Gruppen und dem WT, der in der Sirius Red Färbung deutlich erkennbare Unterschied in Kollagen-Gehalt spiegelte sich jedoch nicht wider.

Zwar nahm der Gesamtgehalt an hepatischem Hydroxyprolin altersbedingt zu (ausgenommen WT), jedoch konnte in keiner der Altersgruppen eine Signifikanz im

Anstieg des Kollagengehaltes zwischen Abcb4$^{-/-}$ Tieren (gepunktete Säule) und Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Tieren (karierte Säule) beobachtet werden.

5.1.4 Verstärkte HSC Aktivierung und duktale Reaktion im Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Modell

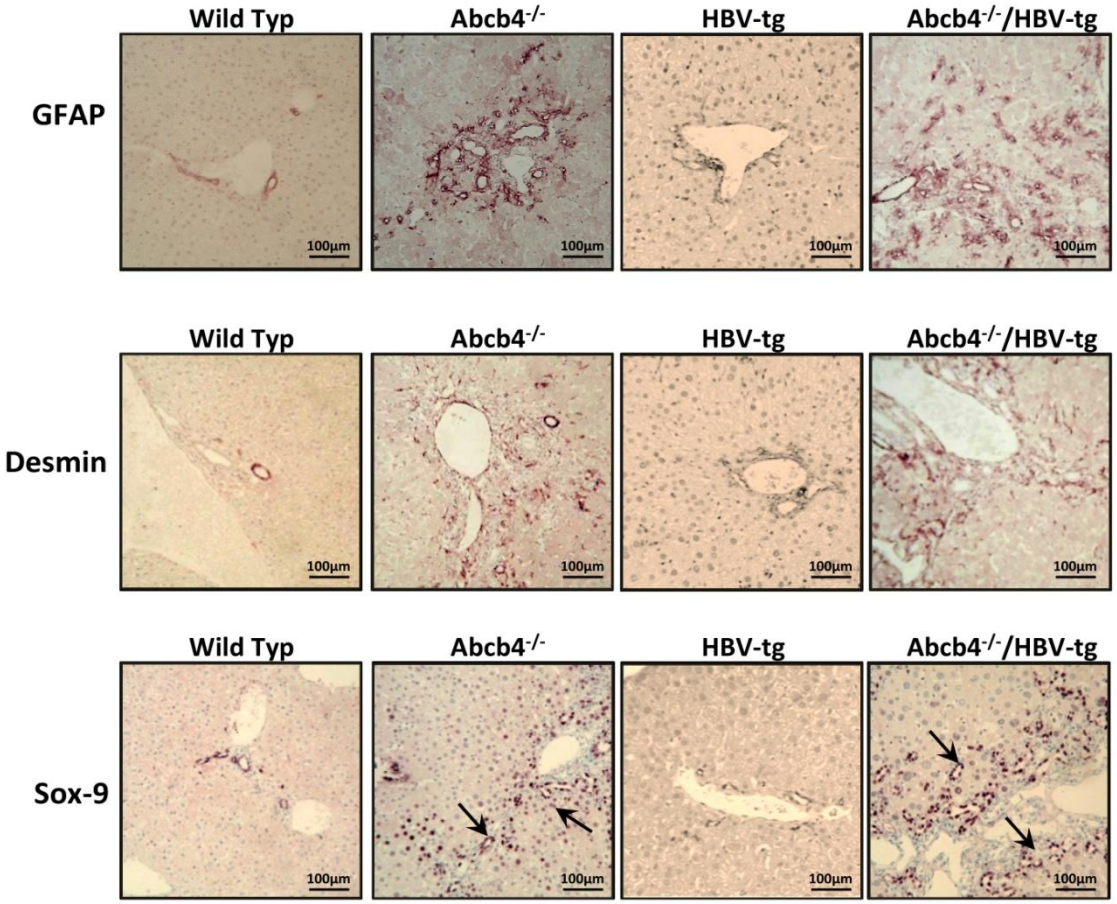

Abbildung 14. HSC Aktivierung und periduktale Reaktion in 12-16 Wochen alten WT, Abcb4$^{-/-}$, HBV-tg und Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Tieren.

Immunhistochemische Färbungen von Lebergewebe, Maßeinheit: 100 µm, Vergrößerung: 100x. Immunhistochemische Färbung für GFAP, einen Marker für ruhende HSC, Desmin, einen Marker für aktivierte HSC und den Transkriptionsfaktor SOX-9 bei 12-16 Wochen alten Tieren aller Gruppen. Die Pfeile markieren die duktale Reaktion, die besonders in Abcb4$^{-/-}$ und Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Tieren deutlich wurde. Stichprobenumfang: n=10 (5 männliche und 5 weibliche Tiere)

GFAP positive Zellen fanden sich vermehrt in Abcb4$^{-/-}$ Tieren (1. Zeile von oben, zweites Bild von links) verglichen mit HBV-tg Tieren (1. Zeile von oben, drittes Bild von links). Am prominentesten erschien die Färbung von GFAP positiven Zellen jedoch bei

Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Tieren und dort hauptsächlich periportal (1. Zeile von oben, viertes Bild von links).
In allen Gruppen (WT, Abcb4$^{-/-}$, HBV-tg, Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg) sind Desmin- positive Zellen angefärbt (mittlere Zeile). Desmin positive Areale färbten sich, konkordant zu GFAP, deutlicher in Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Tieren verglichen mit Abcb4$^{-/-}$und HBV-tg Tieren. Bei Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Tieren fanden sich Desmin gefärbte Zellen vor allem periportal, sie zogen jedoch auch von der portalen Zone ausgehend ins Parenchym.

SOX-9 positiv gefärbte Hepatozyten-Zellkerne zeigten die Beteiligung chronisch geschädigter Hepatozyten innerhalb duktaler Reaktionen (Yin 2017). Mit dieser Färbung konnte die duktale Reaktion in Abcb4$^{-/-}$ und Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Tieren (unterste Zeile, zweites und viertes Bild von links, Markierung der SOX-9 positiven Zellkerne mit Pfeilen) demonstriert werden.

5.2 Metabolismus

Cholestatische Lebererkrankungen sind unter Anderem durch die Akkumulation von Gallensäuren charakterisiert die sowohl Hepatozyten als auch Cholangiozyten schädigen.
Aus diesem Grund wurden in unserem Modell die Gallensäurekonzentrationen der konjugierten, schädigenden Gallensäuren und der protektiven Gallensäure Tauroursodeoxycholsäure (TUDCA) bestimmt. Unkonjugierte Gallensäuren und Glycin-konjugierte Gallensäuren stellten weniger als 5% des Anteils der Gallensäuren dar und wurden deshalb von den weiteren Analysen ausgeschlossen.
Um die Gesamtzunahme der Gallensäurekonzentration zu analysieren, wurden die Serumkonzentrationen der 11 Taurin-konjugierten Gallensäuren addiert.

5.2.1 Anstieg der Gesamtkonzentrationen der Serum-Gallensäuren im Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Modell

Um einen Gesamtüberblick über den Anstieg der Gallensäuren zu erhalten wurden die Serumkonzentrationen der 11 folgenden Taurin-konjugierten Gallensäuren in allen vier Gruppen (WT, Abcb4$^{-/-}$, HBV-tg, Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg) im Alter von 7-8, 12-16 und 52 Wochen analysiert: Taurohyodeoxycholsäure (THDC), Taurocholsäure (TCA), Taurohyocholsäuren (THCA), Taurochenodeoxycholsäure (TCDCA), Taurodeoxycholsäure (TDCA), Taurolithocholsäure (TLCA), Tauroursodeoxycholsäure

(TUDCA), Tauromuricholsäure (T-α-MCA, T-β-MCA, T-ω-MCA), Taurohyodeoxycholsäure (THDCA).

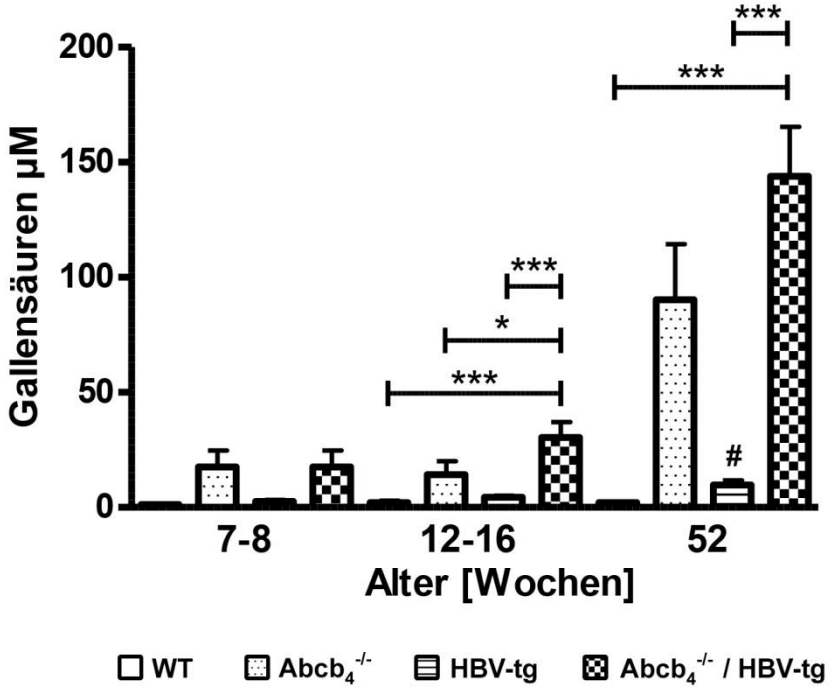

Abbildung 15. Erhöhte Gesamtkonzentration der Taurin-konjugierten Gallensäuren im Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Modell.

Signifikanter Anstieg der Gallensäure-Konzentration in Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Tieren im Vergleich mit den Kontrollgruppen. Die Gallensäuren wurden am Tag der Tötung durch UHPLC-MS/MS gemessen. Stichprobenumfang: n=10 (5 männliche und 5 weibliche Tiere)

Abcb4$^{-/-}$ Tiere wiesen in allen Altersgruppen erhöhte Gallensäurekonzentrationen im Vergleich mit WT Tieren auf. Eine zusätzliche Steigerung der Serum-Gallensäure-Konzentrationen wurde in den Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Tieren gefunden. Besonders deutlich wurde dies im Alter von 12-16 Wochen und 52 Wochen. Dort fanden sich signifikante Anstiege der Gallensäure-Konzentrationen im Vergleich von Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Tieren mit WT und HBV-tg Tieren.

Interessanterweise waren auch bei den HBV-tg Tieren im Alter von 52 Wochen die Gallensäure Konzentrationen im Vergleich mit den WT Tieren erhöht (#p= 0,001). Im Alter von 7-8 und 12-16 Wochen war dieser Unterschied noch nicht zu verifzieren.

5.2.2 Abnahme der relativen Menge der protektiven Gallensäure TUDCA im Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Modell

Tauroursodeoxycholsäure schützt Hepatozyten vor Gallensäure-induzierter Apoptose, indem sie „*Survival Pathways*“ aktiviert (Schoemaker et al. 2004). Die folgende Abbildung zeigt die Konzentrationen der protektiven Gallensäure TUDCA in den vorliegenden Modellen.

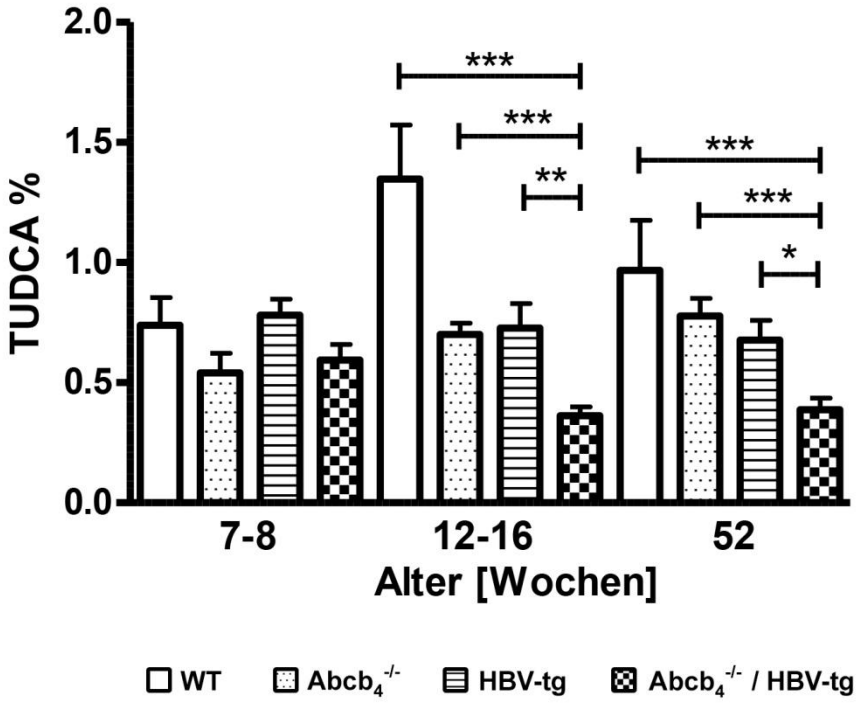

Abbildung 16. Abnahme der relativen Konzentrationen der protektiven Gallensäure TUDCA im Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Modell.

Signifikant reduzierte TUDCA vor allem im Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Modell. Die Gallensäuren wurden am Tag der Tötung durch UHPLC-MS/MS gemessen. Stichprobenumfang: n=10 (5 männliche und 5 weibliche Tiere)

Die relativen Konzentrationen der TUDCA waren in den 12-16 Wochen alten Abcb4$^{-/-}$, HBV-tg und vor allem in den Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Tieren gegenüber den WT-Tieren signifikant reduziert. Mit zunehmendem Alter der Tiere zeigte sich eine deutlichere Abnahme der TUDCA Konzentration.

5.2.3 Absolute Serumkonzentrationen der 8 häufigsten Gallensäuren im Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Modell

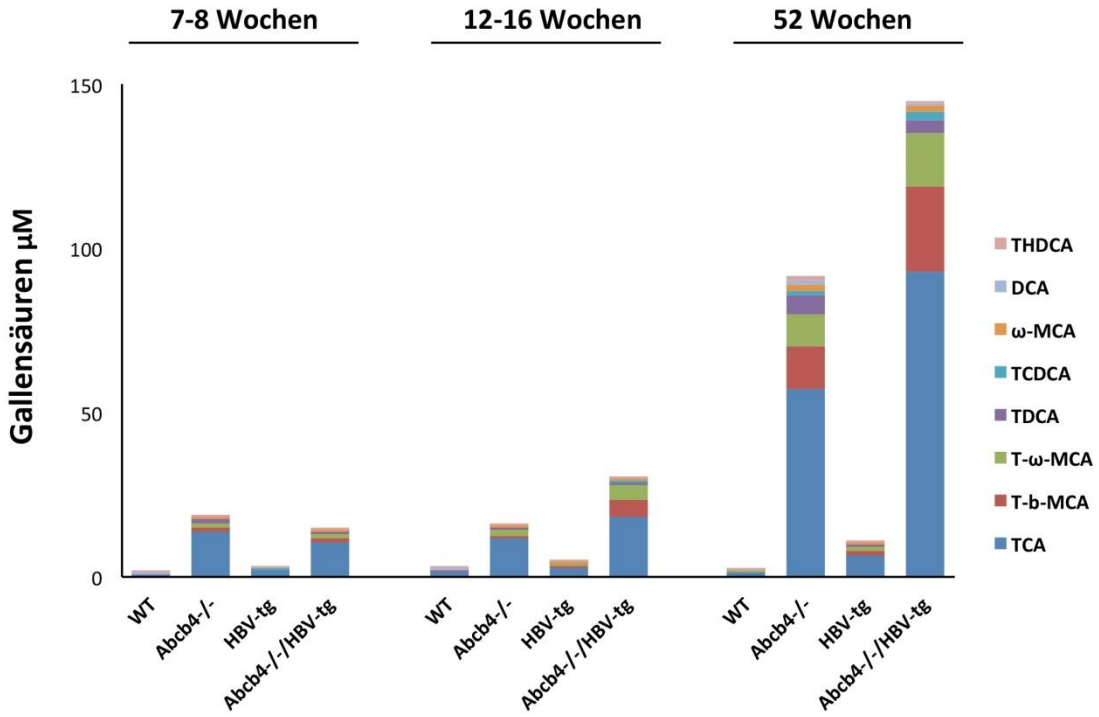

Abbildung 17. Absolute Serumkonzentrationen der 8 häufigsten Gallensäuren.

Die Abbildung zeigt in allen Mausgruppen, mit Ausnahme des WT, einen Anstieg der Mittelwerte der absoluten Gallensäurekonzentrationen im Serum. Stichprobenumfang: n=10 (5 männliche und 5 weibliche Tiere)

Abcb4$^{-/-}$ und Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Tiere zeigen mit zunehmendem Alter deutlich ansteigende absolute Gallensäurekonzentrationen im Serum (Vgl. Abb. 17). Die TCA Konzentration, gefolgt von T-β-MCA und T-ω-MCA, stellt in allen Gruppen die Hauptkomponente der Gallensäuren dar.

5.2.4 Korrelation der Serumgallensäurekonzentration mit der ALT als Marker der Hepatopathie

Die Korrelationsanalyse des Serumparameters ALT mit der Gesamtkonzentration der Taurin-konjugierten Gallensäuren im Serum demonstrierte den signifikanten Zusammenhang zwischen Leberschädigung und Gallensäurekonzentrationen.

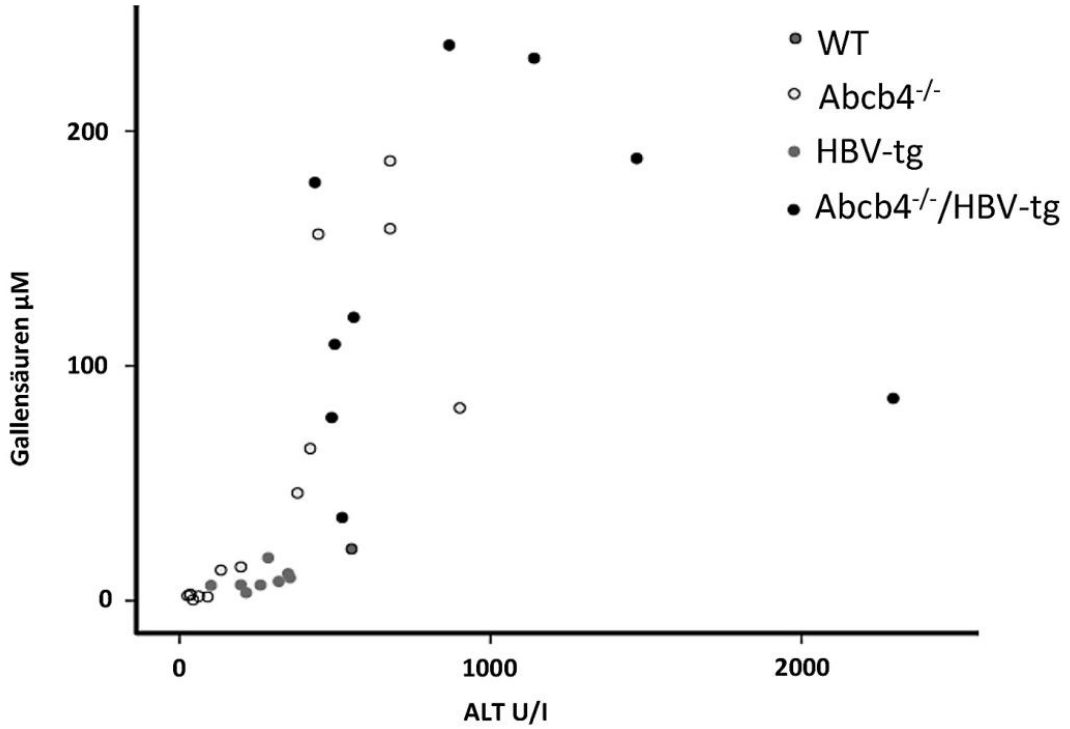

Abbildung 18. Korrelation der Serum-ALT mit der Gesamtkonzentration der Serum-Gallensäuren.

Die Serumkonzentration der Gallensäuren korrelierte mit der der ALT. Untersucht wurden 52 Wochen alte Tiere. Es zeigte sich ein positiver linearer Zusammenhang zwischen der steigenden ALT- und der Gallensäurekonzentration. Stichprobenumfang: n= 8 (4 männliche und 4 weibliche Tiere), Korrelationskoeffizient $\rho = 0{,}90$; $p<0{,}001$

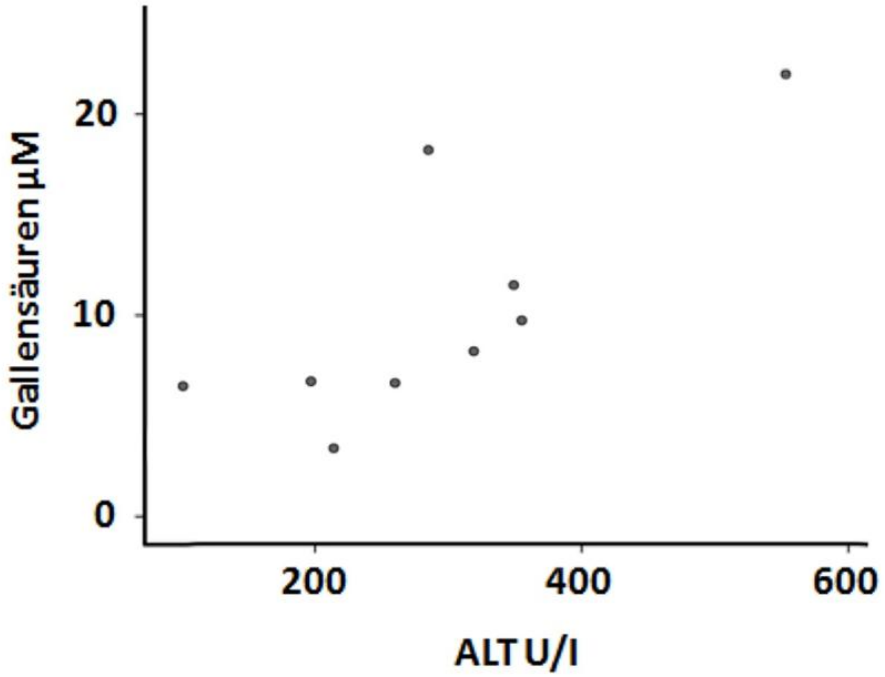

Abbildung 19. Korrelation der Serum-ALT mit der Gesamtkonzentration der Serum-Gallensäuren in HBV-tg Tieren.

Es zeigte sich ein positiver linearer Zusammenhang zwischen der ALT- und der Gallensäurekonzentration in den HBV-tg Tieren im Alter von 52 Wochen. Stichprobenumfang: n= 9 (4 männliche und 5 weibliche Tiere), Korrelationskoeffizient ρ = 0,80; p=0,01. Die Ordinatenskalierung weicht von Abbildung 18 ab.

5.3 HbsAg Expression

Um den Einfluss des Abcb4-Knockouts auf die HBsAg Expression zu analysieren, wurde HBsAg in Western Blot Analysen und immunhistochemischen Färbungen untersucht.

5.3.1 Reduzierte HBsAg Expression im Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Modell

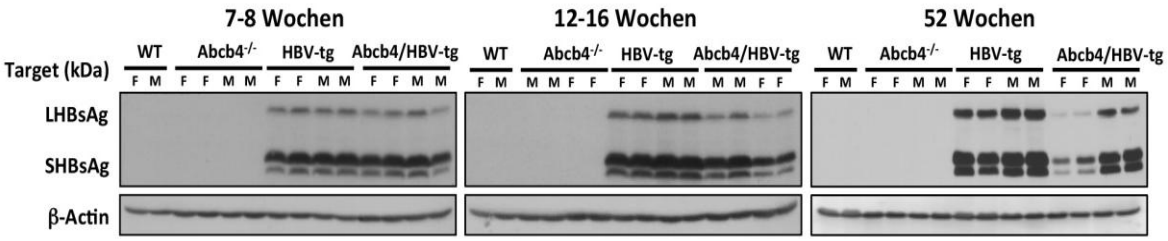

Abbildung 20. Western-Blot-Analyse der HBsAg-Expression.

Western Blot Analyse der Protein Lysate von Lebergewebe aller Maus- und Altersgruppen. Die Abbildung zeigt eine mit zunehmendem Alter reduzierte Expression von HBsAg in Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Tieren. Dargestellt sind Banden von 14 repräsentativen Versuchstieren je Gruppe (7 männliche und 7 weibliche). Als Ladekontrolle diente ß-Actin.

In den Western Blot Analysen zeigte sich eine LHB und SHB Expression sowohl in HBV-tg als auch in Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Tieren. In WT oder Abcb4$^{-/-}$ Tieren, die als Negativkontrollen dienten, war weder eine LHB noch eine SHB Expression sichtbar. Im Vergleich mit HBV-tg Tieren war in Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Tieren die HBsAg-Expression sowohl in 12-16, als auch in 52 Wochen alten Tieren vermindert. Interessanterweise zeigten sich geschlechtsspezifische Unterschiede im Sinne einer verstärkten HBsAg-Akkumulation in männlichen verglichen mit weiblichen Tieren (vgl. Abb. 21 und 22). Dieser Unterschied wurde mit zunehmendem Alter deutlicher.

Die immunhistochemische Färbung zeigte eine HBsAg-Akkumulation in Hepatozyten der HBV-tg- und in deutlich geringerem Ausmaß der Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Tiere. Diese war mit zunehmendem Alter rückläufig, und zwar bei den Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Tieren ausgeprägter als bei den HBV-tg Tieren. Männliche Tiere zeigten eine vermehrte HBsAg-Expression im Vergleich mit den weiblichen. Die WT- und Abcb4$^{-/-}$-Tiere, exprimierten kein HBsAg.

Die Befunde der WB Analysen und der immunhistochemischen Färbung sind somit kongruent.

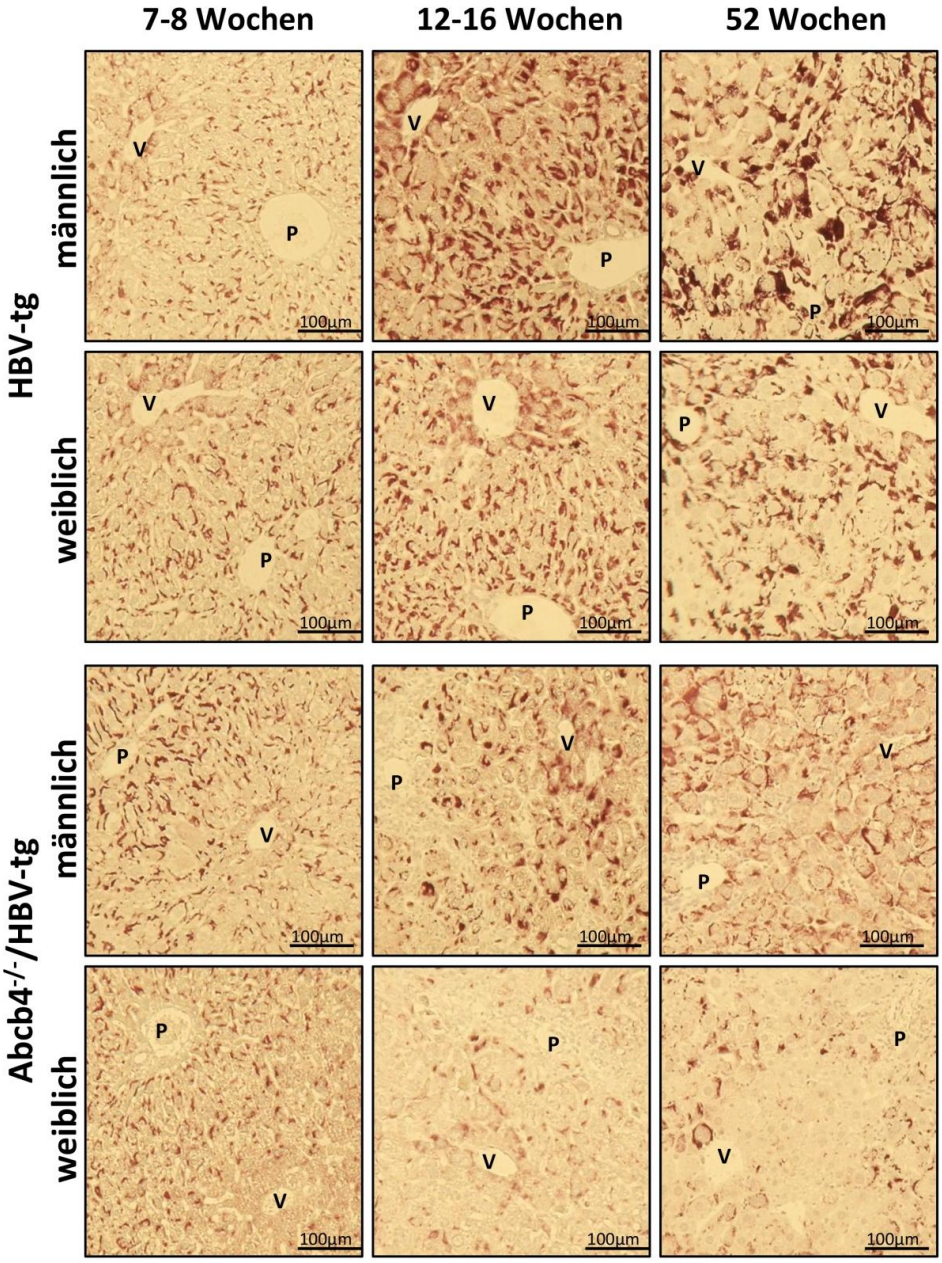

Abbildung 21. Vergleich der HBsAg Expression in HBV-tg und Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Tieren.

Immunhistochemische Färbung für HBsAg. Maßeinheit: 100 µm, Vergrößerung: 100 x Es zeigt sich eine reduzierte HBsAg Expression vor allem in 52 Wochen alten, weiblichen Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Tieren. V= Zentralvene, P= Portalfeld. Die Abbildung zeigt repräsentative mikroskopische Aufnahmen.

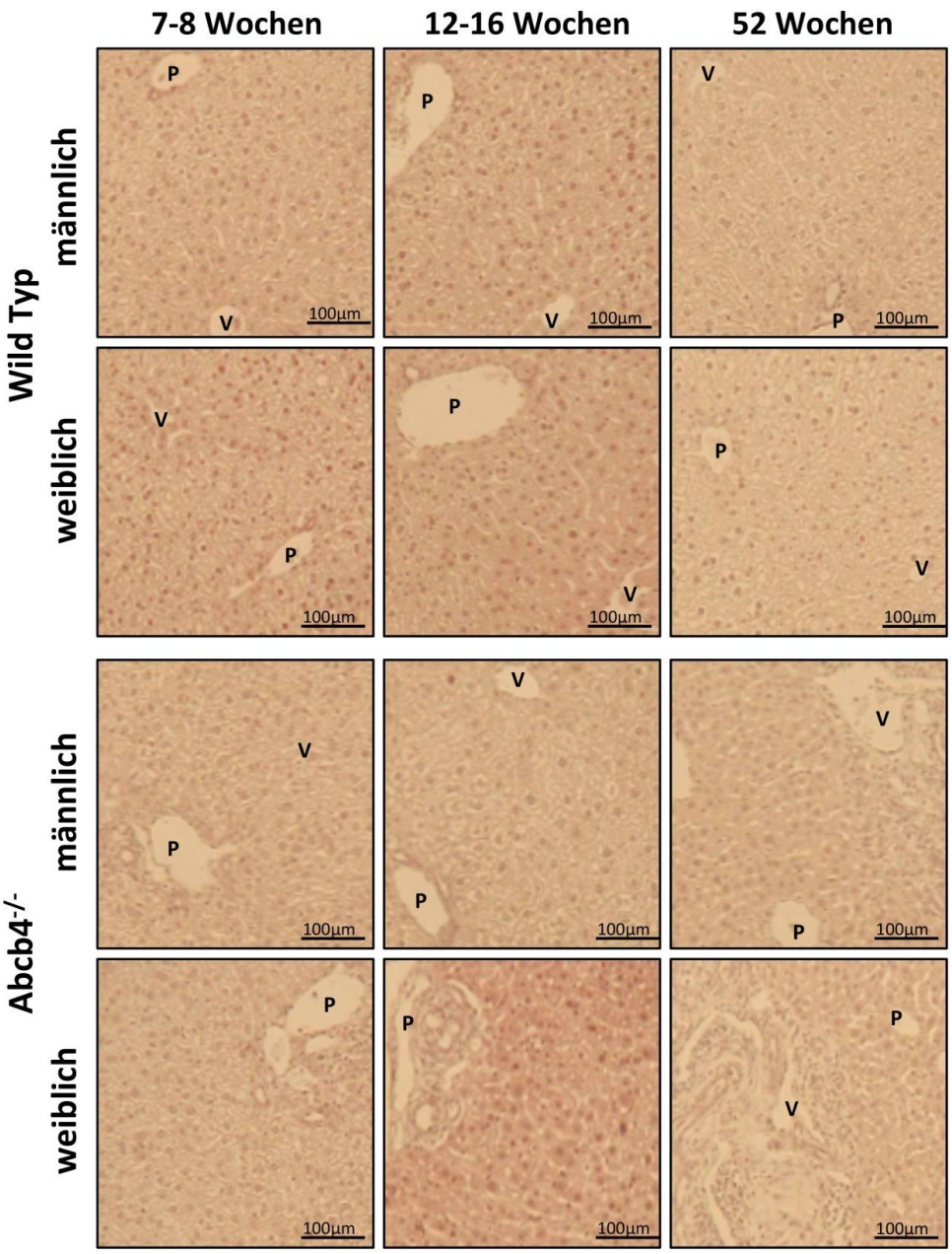

Abbildung 22. HBsAg Färbung in WT und Abcb4$^{-/-}$Tieren.

Immunhistochemische Färbung für die HBsAg. Maßeinheit: 100 µm, Vergrößerung: 100 x. Fehlende HBsAg Färbung in den Kontrollgruppen. V= Zentralvene, P= Portalfeld. Die Abbildung zeigt repräsentative mikroskopische Aufnahmen.

5.4 ER Stress

Verschiedene zelluläre Stressituationen, wie die Akkumulation ungefalteter Proteine im ER können ER-Stress erzeugen. Um die normale Funktion des ER wiederherzustellen kann die Zelle mehrere Signalkaskaden aktivieren die protektive Zellfunktionen wie die *Unfolded Protein Response* auslösen können (vgl. Kapitel 3.10).

5.4.1 ER-Stress im Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Modell

Um die Effekte von Cholestase auf HBsAg assoziierten ER-Stress zu untersuchen, wurden mittels Western Blot Analysen der Proteinlysate von Lebergewebe die ER Stress Marker GRP78, PERK, eIF2α und CHOP untersucht.

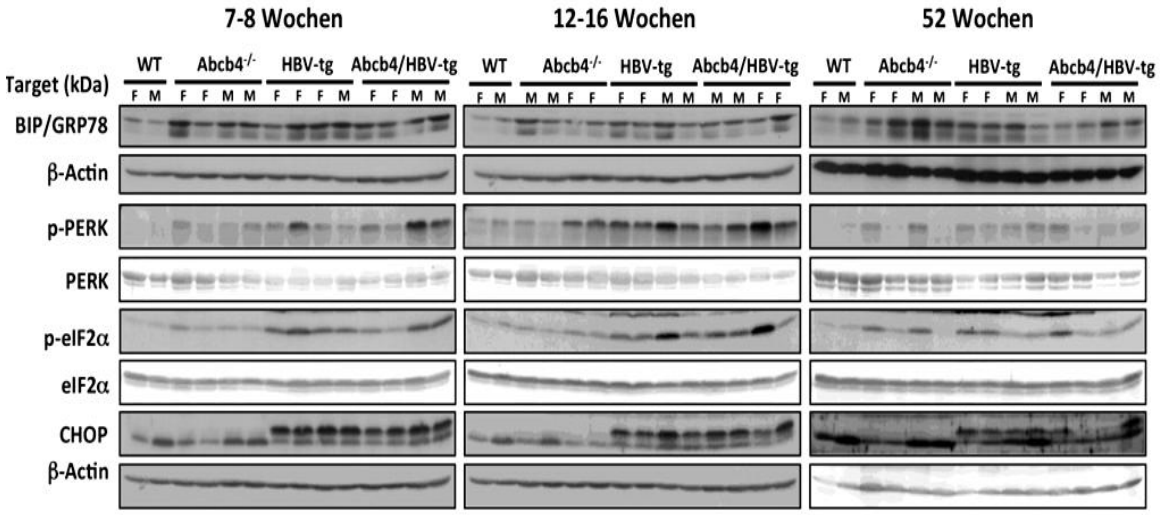

Abbildung 23. Western-Blot-Analyse der ER-Stress Marker.

Western-Blot-Analyse der Protein Lysate von Lebergewebe aller Maus- und Altersgruppen. Die Abbildung zeigt die Expression von ER-Stress-Markern in Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Tieren. Dargestellt sind Banden von 14 repräsentativen Versuchstieren je Gruppe (7 männliche und 7 weibliche). Als Ladekontrolle diente ß-Actin.

GRP-78, PERK und eIF2α zeigten, wie auch die phosphorylierten Formen p-eIF2α und p-PERK, keine Unterschiede ihrer Regulation im Vergleich zwischen HBV-tg und Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Tieren. Auch hinsichtlich der durch ER-Stress induzierten Expression von CHOP zeigte sich kein Unterschied zwischen den o.g. Gruppen.

Hervorzuheben ist, dass auch in Abcb4$^{-/-}$ Mäusen GPR78, PERK und eIF2α aktiviert waren. Dieser Effekt zeigte sich am deutlichsten in 52 Wochen alten Tieren.
Die CHOP Aktivierung fehlte in Abcb4$^{-/-}$ Tieren völlig, wohingegen sie sich in HBV-tg Tieren deutlich zeigte.

5.5 Karzinogenese

Hepatozelluläre Karzinome entstehen beim Menschen hauptsächlich auf dem Boden einer Leberzirrhose. Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Tiere zeigen hingegen eine Tumorentwicklung ohne vorangehende Zirrhose. Um Signalwege des Tumorwachstums zu charakterisieren wurden in Western Blot Analysen der Proteinlysate von Lebergewebe Karzinogenese-assoziierte Signaltransduktionswege untersucht. Ausserdem konnten in immunhistochemischen Färbungen einige histologische Eigenschaften von HCC herausgearbeitet werden.

5.5.1 Verstärkte Karzinogenese im Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Modell

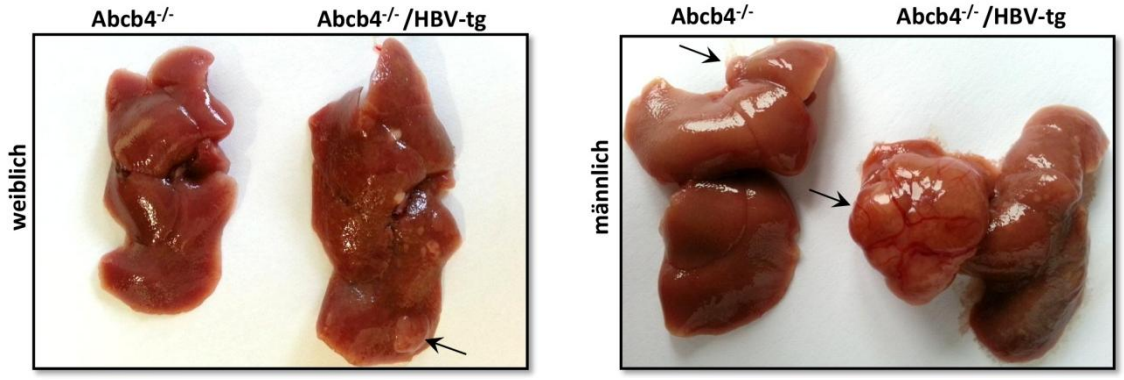

Abbildung 24. Tumorgenese in Abcb4$^{-/-}$ und Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Tieren.

Tumore sind in den Lebern 52 Wochen alter Tiere makroskopisch deutlich zu erkennen. Weibliche Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Tiere (Abb. links) zeigen wenig vaskularisierte Tumoren von <5mm Durchmesser (Pfeil), während männliche Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Tiere (Abb. rechts) gut vaskularisierte Tumoren von >5mm Durchmesser (Pfeil) zeigen. Stichprobenumfang n=9 (5 weibliche und 4 männliche Tiere).

Tumore wurden bei acht von insgesamt neun Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Tieren im Alter von 52 Wochen beobachtet. Der Durchmesser betrug im Durchschnitt 8,3 ± 4,5 mm. Die

Tumorzunahme ging bei den Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Tieren mit verstärkter Angiogenese einher (vgl. Abb. 24).

In der Abcb4$^{-/-}$ Gruppe entwickelte nur eine weibliche Maus von insgesamt neun Mäusen (4 männliche und 5 weibliche) einen Tumor. Dieser hatte einen Durchmesser von 2 mm. Das Tumorwachstum in der Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Gruppe zeigte sich, verglichen mit der Abcb4$^{-/-}$ Gruppe, signifikant erhöht (x^2= 10,9; p= 0,001) (vgl. Abb. 25). Interessanterweise zeigte die Tumorentstehung in HBV-tg Tieren auch ein geschlechtsspezifisches Muster. Im Alter von 52 Wochen hatten 58 % der männlichen Tiere Tumoren entwickelt, wohingegen keines der weiblichen Tiere eine Tumorentwicklung zeigte. Jüngere HBV-tg Tiere und WT Tiere zeigten ebenso keine Tumorentwicklung.

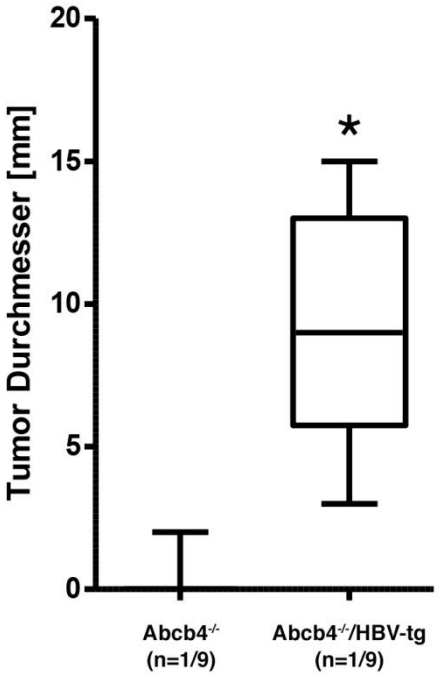

Abbildung 25. Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Tiere entwickeln größere Tumore als Abcb4$^{-/-}$-Tiere.

Die Tumordurchmesser sind als Box und Whisker Plot dargestellt. Der untere und obere Rand der Box repräsentiert jeweils die 75. und 25. Perzentile. Die Linie in der Box repräsentiert den Mittelwert. Fehlerbalken spiegeln Minimum und Maximum wider. Die erhöhte Inzidenz wurde im Chi^2 Test berechnet, p<0,0001. Stichprobenumfang n=9 (4 männliche und 5 weibliche Tiere), ausschließlich 52 Wochen alte Tiere.

5.5.2 Verstärkte Aktivierung Karzinogenese-assoziierter Signaltransduktionswege im Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Modell

Um die Wege der Tumorentstehung zu charakterisieren wurden in Proteinlysaten von Lebergewebe Western-Blot-Analysen für das hepatische Tumorwachstum essentieller nukleärer Faktoren und Protoonkogene durchgeführt: P-c-Jun, c-JUN, p-JNK sowie p-STAT-3 und STAT-3.

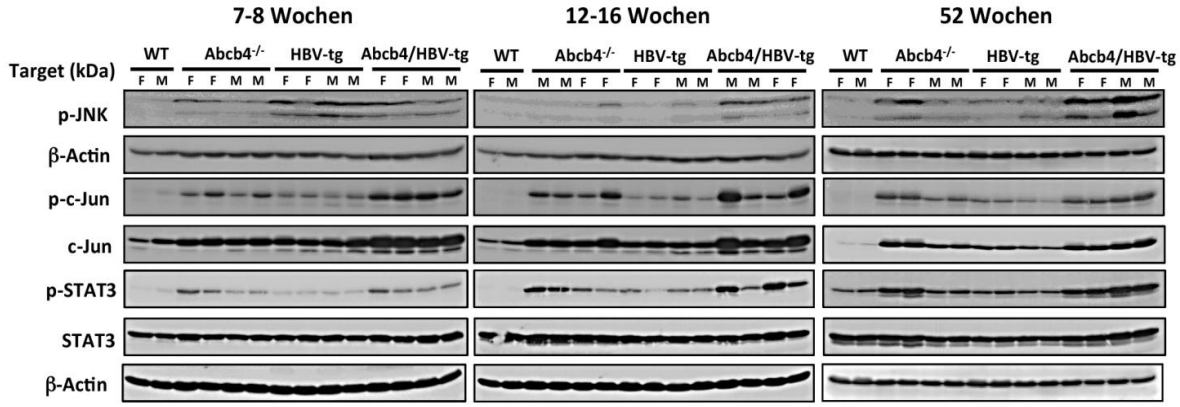

Abbildung 26. Western-Blot-Analyse von Karzinogenese-assoziierten Signaltransduktionswegen.

Western-Blot-Analysen der Protein Lysate von Lebergewebe aller Gruppen und Altersklassen. Die Expression von phosphoryliertem JNK, phosphoryliertem c-Jun, c-Jun, phosphoryliertem STAT3 und STAT3 zeigten eine deutlich erhöhte Induktion Karzinogenese-assoziierter Signalwege. Die Abbildung zeigt Banden von 14 repräsentativen Versuchstieren je Gruppe (7 männliche und 7 weibliche). Als Ladekontrolle diente ß-Actin.

Die aktivierte Januskinase p-JNK phosphoryliert c-Jun zu seiner aktivierten Form p-c-Jun. Die JNK Aktivierung wird besonders deutlich in 52 Wochen alten Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Tieren. Die Western-Blot-Analysen demonstrieren auch, dass sowohl die c-Jun Expression als auch die Phosphorylierung von c-Jun sowohl in Abcb4$^{-/-}$ als auch in HBV-tg Tieren erhöht ist. Bei Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Tieren lässt sich dieser Effekt bereits im Alter von 7-8 Wochen erkennen und steigt mit zunehmendem Alter der Tiere deutlich an. STAT3 wurde in allen Gruppen in vergleichbarem Maße exprimiert, jedoch in Abcb4$^{-/-}$ Tieren stärker phosphoryliert als in den WT und HBV-tg Tieren. HBV-tg Tiere zeigen eine schwache, altersabhängige Zunahme der Aktivierung von STAT3. In Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Tieren wurde STAT3 deutlich stärker aktiviert als in den Abcb4$^{-/-}$ und

HBV-tg Tieren. Die Phosphorylierung von STAT3 korrelierte mit dem Alter und war in den 52 Wochen alten Tieren besonders deutlich ausgeprägt.

5.5.3 Immunhistochemische Charakteristika der Tumore in Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Tieren

Die immunhistochemischen Färbungen in Abb. 27 zeigen einige charakteristische Eigenschaften des Hepatozellulären Karzinoms in den Tumoren der Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Mäuse: Abb. 27 A zeigt eine klare Abgrenzung von Leber und Tumorgewebe, Abb. 27 B das Fehlen von fibrillärem Kollagen im Tumorgewebe, Abb. 27 C die erhöhte Zellproliferation im Tumorgewebe, Abb. 27 D den Mangel an Typ IV Kollagen im Tumorgewebe, Abb. 27 E eine diffuse, nicht zonierte Expression von Glutamin Synthetase im Tumorgewebe und Abb. 27 F den Verlust der Expression des HBsAg im Tumorgewebe.

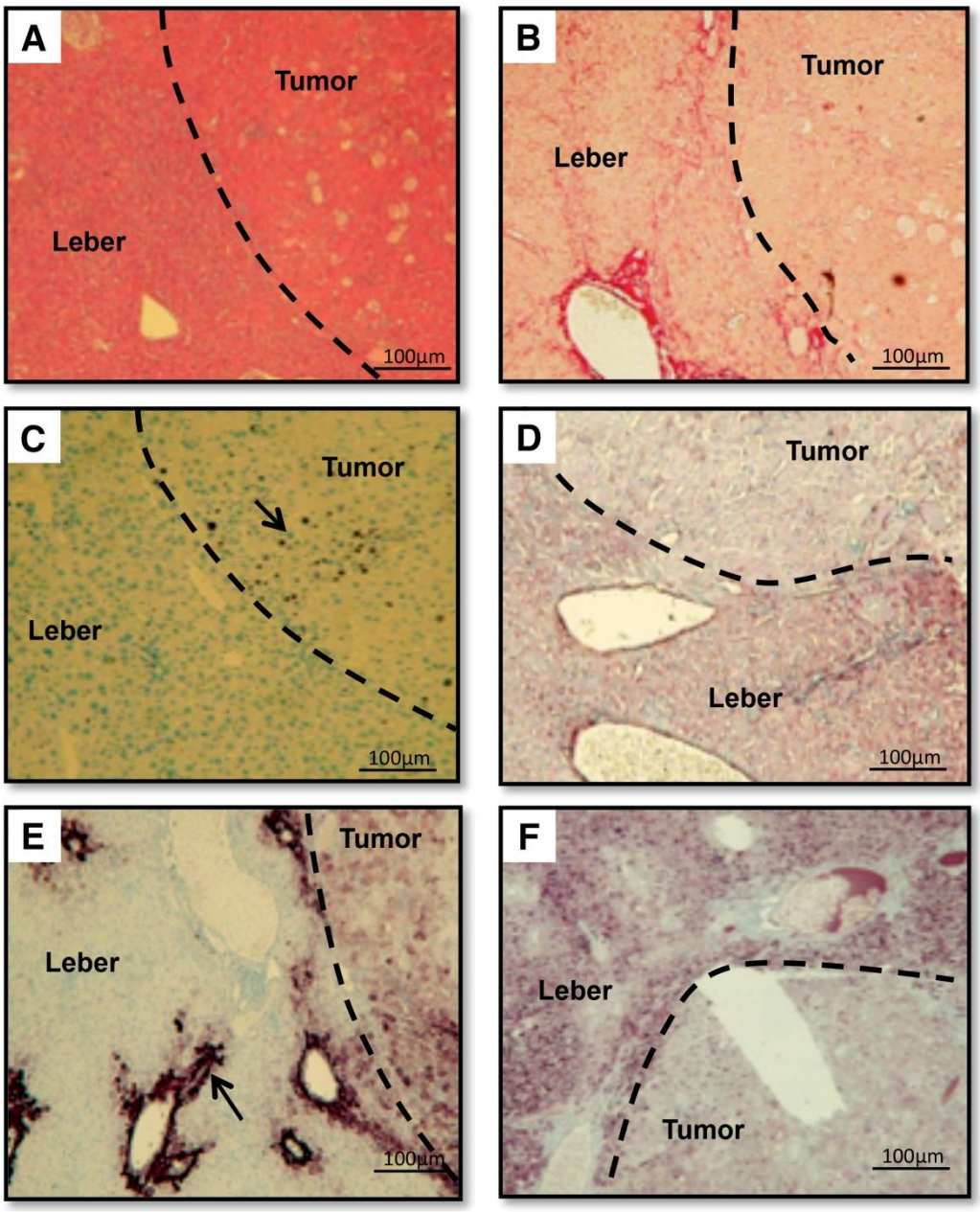

Abbildung 27. Nachweis histologischer Charakteristika von HCC in 52 Wochen alten Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Tieren.

Immunhistochemische Färbungen von Lebergewebe, Maßeinheit: 100 µM, Vergrößerung: 100 x Die gestrichelten Linien trennen Lebergewebe von Tumorgewebe. A) zeigt eine H&E Färbung mit klarer Grenze zwischen Lebergewebe und Tumorgewebe. B) In der Sirius-Red-Färbung zeigt sich das Tumorstroma nahezu kollagenfrei. C) Ki67 zeigt Proliferation im Tumorstroma (dunkel gefärbte Zellkerne, markiert durch Pfeil). D) Färbung für Typ IV Kollagen zeigt den Verlust der normalen Leberarchitektur im Tumorgewebe. E) Immunfärbung für die Glutamin Synthetase zeigt diffuses Auftreten im Tumorgewebe und eine Zonierung um die Zentralvenen im gesunden Lebergewebe. F) Immunfärbung für HBsAg zeigt den HBsAg Verlust im Tumorgewebe.

6. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde das Zusammenspiel von Cholestase und HBV hinsichtlich der hepatischen Fibrogenese und Karzinogenese in den gut charakterisierten Modellen der Abcb4$^{-/-}$ und der HBV-tg Maus sowie dem aus den beiden Modellen neu kombinierten Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Modell untersucht. Es wurde somit erstmals ein murines *Multiple Hit* Modell für Cholestase und HBV-induzierten Leberschaden beschrieben.

Zentrale Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind:

1. Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Mäuse wiesen gegenüber den Ursprungsmodellen eine Zunahme der hepatozellulären Schädigung auf. Cholestase, Fibrogenese und Karzinogenese waren verstärkt.
2. Im Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Modell zeigte sich eine verringerte HBsAg Akkumulation.
3. Die Erhöhung der Gesamtkonzentration der Serumgallensäuren und die relative Abnahme der protektiven Gallensäure TUDCA führten im Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Modell zu einer vermehrten Parenchymschädigung.
4. Eine reduzierte HBsAg Expression hatte keinen Einfluss auf ER-Stress und UPR im Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Modell.
5. Die prä-kanzerogene Pathogenese und die Aktivierung HCC-assoziierter Signalwege zeigten sich im Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Modell kumulativ verstärkt. In der Folge potenzierten sich Anzahl und Größe der Lebertumoren.

6.1 Charakterisierung der hepatischen Schädigung

Das gleichzeitige Auftreten einer HBV-Infektion sowohl mit einer Primär Biliären Cholangitis als auch mit einer biliären Atresie wurde in der Literatur beschrieben (Yaghobi et al. 2011; Rigopoulou et al. 2013; Adachi et al. 2014). Es wurde gezeigt, dass eine HBV-Infektion bei Neugeborenen zu einer biliären Atresie führen kann (Tanaka et al. 1993; Yaghobi et al. 2011). Bekannt ist außerdem, dass HBV-Infektionen eine Cholangitis induzieren können (Burgart 1998; Gupta und Chakravarti 2008).
Leberschädigungen bei Patienten mit chronischer Hepatitis-B-Virus-Infektion wurden lange Zeit hauptsächlich der durch infizierte Hepatozyten hervorgerufenen T-Zell-

Antwort zugeschrieben (Chisari et al. 2010; Schuch et al. 2014). Immunsupprimierte Patienten mit chronischer HBV-Infektion sind jedoch besonders anfällig für die Entwicklung einer Fibrosierenden cholestatischen Hepatitis (FCH) (Pol 2013). Das HBV-transgene Mausmodell eignet sich hervorragend für die Untersuchung direkter zytotoxischer Effekte von HBsAg bei gleichzeitiger Abwesenheit der adaptiven Immunantwort (Meuleman et al. 2006; Pol 2013; Shouval und Shibolet 2013). So zeigten Patienten mit einer HBV-Infektion unter einer immunsuppresiven Behandlung eine Verschlechterung bis hin zur Entwicklung einer FCH (Churin et al. 2015).

Bei humanisierten HBV-infizierten uPA-SCID-chimären Mäusen zeigte die Mehrheit der menschlichen Hepatozyten eine intensive Färbung für virale Proteine und einen erheblichen hepatozellulären Schaden bis hin zur Apoptose (Meuleman et al. 2006). Interessanterweise zeigten auch die in der vorliegenden Studie verwendeten HBV-transgenen Mäuse, die nur die HBV Oberflächenproteine exprimierten, ein ähnliches histopathologisches Muster (Uhrglas-Hepatozyten) sowie ebenfalls eine progrediente Leberschädigung (Chisari et al. 1986; Churin et al. 2014; Meuleman et al. 2006), regenerative Hyperplasien sowie Adenome und HCC (Chisari et al. 1987; Chisari et al. 1989).

Die Mechanismen der HBs-Pathogenität sind bis heute nur unvollständig verstanden (Churin et al. 2014). Bekannt ist, dass die verstärkte Synthese von LHB zur Anhäufung ungewöhnlich langer, nicht sekretierbarer, filamentöser HBsAg-Partikel im glatten ER der HBV-transgenen Mäuse führt (Chisari 1989). Die hohen Konzentrationen von LHB, die im ER akkumuliert werden, erschweren wiederum eine regelrechte Bildung von HBV-Partikeln und reduzieren damit deren Sekretion. In der Folge nehmen die HBs akkumulierenden Hepatozyten eine hypertrophe Form an und bilden die für eine HBV-Infektion typischen Uhrglas-Charakteristika aus. Inflammation, regenerative Hyperplasie, Deregulierung der Transkription, Aneuploidien bis hin zu Neoplasien und zum HCC können die Folge sein (Meuleman et al. 2006; Chisari et al. 1986; Chisari et al. 1989; Churin et al. 2014). Mit zunehmender HBsAg Synthese nimmt der hepatozelluläre Schaden zu (Chisari et al. 1987; Churin et al. 2014). Die portalen Zonen und die Gallengänge bleiben dabei jedoch weitgehend unbeschädigt. In der vorliegenden Studie ist der hepatozelluläre Schaden mit einem signifikanten Anstieg der Serum ALT Konzentration (vgl. Abb. 9), Einzelzellnekrosen, fokalen Nekrose sowie mit Inflammation und Fibrose assoziiert.

Die Quantifizierung der Fibrose mittels Sirius-Red-Färbung und Hydroxyprolin Assay zeigte in unserer Studie nicht immer kongruente Ergebnisse. Während in der Sirius-Red-Färbung eine deutliche Fibrose sichtbar war (vgl. Abb. 11), wurde in einem zusätzlich durchgeführten Hydroxyprolin-Assay (vgl. Abb. 13) kein signifikanter

Unterschied im Gesamtkollagengehalt der Lebern zwischen Abcb4$^{-/-}$ und Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Tieren festgestellt. Die Diskrepanz zwischen dem Ergebnis dieser Messungen lässt sich am ehesten mit methodischen Mängeln des Hydroxyprolin-Assays erklären. In Frage kommen eine mangelhafte Vergleichbarkeit von in unterschiedlichen Läufen gewonnen Ergebnissen oder aber auch eine unterschiedliche regionale Verteilung des Kollagens.

6.2 Verringerte HBsAg Akkumulation im Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Modell

Wenn auch im HBV-tg Modell Charakteristika einer Cholestase nicht beschrieben sind, kann die intrazelluläre HBsAg Akkumulation zur Zunahme der Cholestase beitragen. In der immunhistochemischen Färbung (vgl. Abb. 21) wird deutlich, dass eine HBsAg Akkumulation in allen Hepatozyten der HBV-tg Tiere und der Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Tiere zu beobachten ist. Der Anteil der HBsAg positiven Zellen zeigt sich jedoch - besonders mit zunehmendem Alter und in weiblichen Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Tieren - reduziert.
Eine altersabhängige Abnahme von HBsAg in HBV-tg Mäusen vom Balb/c Typ ist in der Literatur bereits beschrieben (Graumann et al. 2015). Unsere Arbeitsgruppe hat gezeigt, dass der Expressionsverlust auf transkriptioneller Ebene stattfindet und durch Methylierungen im Genom der Tiere reguliert wird. Das Ausmaß der HBsAg-Expression korrelierte negativ mit der Anzahl der Methylierungen. Dieses Epigenetische Phänomen stellt vermutlich einen Schutzmechanismus dar, der Hepatozyten vor einer zu starken Akkumulation von HBV-Oberflächenproteinen bewahrt. In der vorliegenden Studie wurden Tiere ausgeschlossen, bei denen wir in den untersuchten Leberproben keine HBsAg Expression hatten finden können. Es muss vermutet werden, dass dieser Befund auf DNA Methylierungen zurückzuführen war.
CD8^{+}-zytotoxische T-Lymphozyten können HBV replikative Zwischenstufen aus den Hepatozyten beseitigen, indem sie inflammatorische Zytokine wie TNFα und INFγ sezernieren, sodass die Virusausbreitung auf nicht-infizierte Zellen gestoppt wird (Chisari et al. 2010). Die ausgeschütteten Zytokine lösen eine breit gefächerte Kaskade aus, die den Entzündungsprozess verstärkt und eine nicht-zytopathische antivirale Aktivität gegen HBV aufweist (Chisari et al. 2010). Auch dieser Prozess führt zu einer Abnahme von HBsAg.
In einem HBsAg Mausmodell ist die Hypersensitivität transgener Mäuse nach Concanavalin A oder Tetrachlormethan Trigger beschrieben. Eine nicht-hepatotoxische niedrige Dosis dieser Substanzen führte bei WT Mäusen nicht zu einer hepatischen

Schädigung, wohingegen HBV-tg Tiere mit hepatischer Schädigung und Anhäufung von NK-Zellen reagierten. Die NK Aktivierung führte zur Ausschüttung inflammatorischer Zytokine wie INFγ und IL4, was in der Folge die HBsAg Reduktion verursachte (Chen et al. 2007). Darüber hinaus zeigen eigene unveröffentlichte Befunde, dass die mittels qt-PCR gemessenen inflammatorischen Zytokine altersabhängig (Daten nur von 8 und 16 Wochen alten Tieren vorliegend) ansteigen.
Im vorliegenden Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Modell stellen HBV-Infektion und Cholangitis eine doppelte Noxe dar. Diese sind vermutlich ursächlich für die histologisch und immunhistochemisch beobachtete starke inflammatorische Infiltration und den Befund der altersabhängigen HBsAg Abnahme.

6.3 Die Second/ Multiple Hit Theorie

1998 wurde erstmals die *Two-Hit-Theorie* im Rahmen der NASH propagiert. Sie besagt, dass die Steatosis als „*first hit*“, die Anfälligkeit der Leber gegenüber weiteren schädigenden Faktoren („*second hit*“) erhöht (Day 2002; Day und James 1998). Der „*second hit*“ umfasst Mechanismen, die zur Entstehung von Inflammation und Fibrose führen. Der NASH wird dabei eine Schlüsselrolle zwischen metabolischem Syndrom und hepatozellulärer Schädigung bis hin zur Hepatokarzinogenese zugeschrieben. Mittlerweile sind die Mechanismen der NASH sehr gut beschrieben (Roeb et al. 2015; EASL 2015; Friedman et al. 2018).
Die *Two-Hit-Hypothese* ist bereits überholt, da sie die verschiedenen molekularen und metabolischen Veränderungen kaum zu erklären vermag, die in *Non-alcoholic Fatty Liver Diseases* (NAFLD)/ NASH stattfinden. Eine Multiple Hit Hypothese versucht mit Berücksichtigung mehrerer Faktoren der komplizierteren Pathogenese gerecht zu werden (Buzzetti et al. 2016).
In der vorliegenden Studie könnte die HBsAg induzierte Speicherkrankheit neben der Cholestase als weiterer Schädigungsmechanismus angesehen werden. Dieser führt dazu, dass zahlenmäßig mehr und größere Tumore in der geschädigten Leber entstehen. Unsere Hypothese wird dadurch gestärkt, dass das Risiko von Patienten ein HCC zu entwickeln, bei hohen HBsAg-Konzentrationen größer als bei niedrigen ist (Tseng et al. 2013; Kawanaka et al. 2014).

Im Maus Modell der Kombination einer Gallengangsligatur mit einer Alpha-1-Antitrypsin Mutation (PiZZ), die zu einer ER-Speicherkrankheit führt, wurde ebenfalls eine additiv gesteigerte Pathologie beobachtet (Mencin et al. 2007). Die Autoren schlussfolgern,

dass Patienten mit einer Alpha-1-Antitrypsin Mutation anfälliger für die Entwicklung schwerer Lebererkrankungen sind, wenn gleichzeitig ein cholestatischer Lebererschaden vorliegt.
Unsere Daten bestätigen diese Hypothese: ER-Speicherkrankheit und Cholestase beinflussen sich wechselseitig. Sie aggravieren die chronische Lebererkrankung und erhöhen das Risiko der Entwicklung eines HCC.

6.4 Schädigende Wirkung der Gallensäuren

Die zellulären und molekularen Mechanismen der Hepatozytenschädigung, die durch Retention hydrophober Gallensäuren bei cholestatischen Erkrankungen verursacht werden, sind gut charakterisiert (Attili et al. 1986, 1986, 1986; Perez und Briz 2009).
Hydrophobe Gallensäuren können sowohl zu oxidativem Stress (Serviddio et al. 2004) als auch zu Apoptose und Nekrose von Hepatozyten führen und stellen somit einen signifikanten Schädigungsmechanismus dar (Yerushalmi et al. 2001; Faubion et al. 1999). In der Literatur werden verschiedene Mechanismen diskutiert, um die Gallensäuren-induzierte Apoptose zu erklären. Die direkte Aktivierung der Todesrezeptoren Fas und TRAIL-R2 induziert oxidativen Stress, der in der Folge zu mitochondrialer Dysfunktion und ER-Stress führt (Perez und Briz 2009; Adachi et al. 2014). Gallensäuren können darüber hinaus als krebsfördernde Promotoren wirken (Perez und Briz 2009, 2009).
Einige Gallensäuren können neben den toxischen aber auch protektive Wirkungen entfalten. Tauroursodeoxycholsäure (TUDCA) gehört zu den protektiven Gallensäuren, die Hepatozyten vor Gallensäure-induzierter Apoptose schützt, indem sie protektive Signalwege aktiviert (Schoemaker et al. 2004). Unser Modell zeigt (vgl. Abb. 16) die altersabhängige Abnahme der relativen Konzentration der protektiven Gallensäure TUDCA. Die Schädigung ist vermutlich sowohl auf die reduzierten Konzentrationen an TUDCA, als auch auf die erhöhten Konzentrationen toxischer Gallensäuren zurückzuführen. Die Zunahme der Gallensäure-Konzentration ist das Ergebnis eines kumulativen Effektes der erhöhten Gallensäure-Konzentration des Abcb4$^{-/-}$ und des HBV-tg Modells und in deren Folge eines durch ER-Stress veränderten Metabolismus (Flowers et al. 2008)
Neben TUDCA wird in der Literatur auch Tauro-β-muricholsäure (T-β-MCA) und Tauro-α- muricholsäure (T-α-MCA) eine protektive Eigenschaft zugeschrieben. Sie können auf Grund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zur TUDCA einen Leberzellschaden verhindern (Kitani et al. 1994). Tauro-β-Muricholsäure ist eine sehr hydrophile

Gallensäure und beschränkt die Gallensäure-induzierte hepatozelluläre Apoptose durch die Erhaltung des mitochondrialen Membranpotentials (Denk et al. 2012). β-MCA ist bei Nagern physiologischer Weise in der Leber vorhanden, was deren höhere Widerstandsfähigkeit gegenüber Gallensäure induzierter Apoptose erklären könnte. In der menschlichen Leber ist hingegen kein β-MCA vorhanden. (Wang und Tazuma 2002; Montet et al. 1987).

In unseren Messungen zeigten die absoluten Konzentrationen der T-β-MCA und T-ω-MCA eine altersabhängige Zunahme, die für die T-α-MCA nicht nachweisbar war. Diese Befunde könnten den Abfall der relativen TUDCA Konzentration kompensieren.

Interessanterweise korreliert die Konzentration der Serum Gallensäuren im vorliegenden Modell mit der der Serum ALT. Bekannt ist, dass Serum Gallensäure Konzentrationen von >10µM zu einer hepatozellulären Schädigung führen und mit einer erhöhten Serum ALT Konzentration einher gehen (Song et al. 2011). Es besteht ein annähernd linearer Zusammenhang zwischen der Serum ALT Konzentration und der der Serum Gallensäuren. Diese Korrelation gilt sowohl für die Gesamtkohorte als auch für die Gruppe der HBV-tg Tiere (vgl. Abb. 18 und 19).

Diese Beobachtungen legen nahe, dass der additive Effekt der Serum Gallensäuren zumindest mit verantwortlich für die Kumulation der beiden Schäden (HBV und Cholangitis) im vorliegenden Modell ist. Mit diesem Befund wurde zum ersten Mal gezeigt, dass die hepatozelluläre Akkumulation des HBs- Transgens eine biliäre Schädigung des Leberparenchyms induziert.

6.5 Fehlender Einfluss des HBsAg Expressionsverlust auf ER-Stress und UPR

Um den Einfluss der Cholestase auf den HBsAg induzierten ER-Stress zu untersuchen, wurden die ER-Stress Marker PERK, GRP78 und eIF2α (UPR Kaskade) sowie CHOP mittels Western Blot in ihrer Abhängigkeit von der HBsAg Konzentration analysiert. Beschrieben ist, dass die Menge des hepatozellulär akkumulierten HBsAg mit dem Ausmaß der ER-Stress Aktivierung und der assoziierten Leberschädigung korreliert (Churin et al. 2014). Eine weitere Studie zeigte, dass die GRP78 Aktivierung sowohl in einer humanen Hepatomzelllinie erhöht war, die HBs-Proteine überproduzierte (Xu et al. 1997) als auch in der Leber von transgenen Mäusen, die eine Deletionsmutante des großen HBs Hüllenprotein (LHB) exprimierten (Wang et al. 2005).

In der vorliegenden Studie zeigten die Phosphorylierungen von PERK und eIF2α, die ER-Stress induzierte GRP78 sowie die CHOP Expression keine signifikanten Unterschiede zwischen HBV-tg und Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Tieren. In Abcb4$^{-/-}$ Mäusen waren PERK, GRP78 und eIF2α aktiviert. Dieser Effekt zeigte sich vor allem in 52 Wochen alten Tieren deutlich. Das spricht dafür, dass ER-Stress und UPR bereits im Abcb4$^{-/-}$ Mausmodell allein eine wichtige Rolle spielen, auch wenn CHOP und ER-Stress bedingte Apoptose nicht induziert waren (vgl. Abb. 23).

Dem CHOP Anstieg wird im HBV-tg Mausmodell eine wichtige Rolle als proapoptotischer Effektor zugeschrieben (Churin et al. 2014). Die Produktion von HBV-Oberflächenproteinen stimuliert die Expression von CHOP in Hepatozyten. Der durch die CHOP Expression induzierte Leberschaden korreliert mit den Serum ALT Konzentrationen im HBV-tg Modell (Churin et al. 2014).

Ein erheblicher Teil der Hepatozyten, die HBsAg exprimieren, akkumulieren auch CHOP im Zellkern, während in HBsAg freien Gebieten ein Fehlen von CHOP beobachtet werden kann (Graumann et al. 2015). Die HBsAg Expression geht somit zu einer hohen Wahrscheinlichkeit mit einer CHOP Expression einher und ist deshalb im Abcb4$^{-/-}$ Mausmodell nicht vorhanden. Der Verlust der HBsAg-Expression hat demzufolge eine schützende Wirkung auf die Leber und korreliert mit reduziertem ER-Stress.

Intrahepatische Cholestase ist aufgrund von Gallensäurenakkumulation in der Leber auch mit ER Stress assoziiert. Dies wurde mit einem Mausmodell gezeigt, welches eine Deletion des geflügelten Helix-Transkriptionsfaktors Foxa2, der für die normale Gallensäure-Homöostase unerlässlich ist, enthielt. Die Deletion führte zu einer intrahepatischen Cholestase und zur toxischen Akkumulation von Gallensäuren, ER-Stress und Leberzellschädigung. Hepatische mRNA-Spiegel für die ER-Stress-Transkriptionsfaktoren zeigten sich deutlich erhöht. Dies deutet darauf hin, dass die milde Cholestase aufgrund der Abwesenheit von Foxa2 in der Leber von Mäusen, ausreichte um ER-Stress zu induzieren (Bochkis et al. 2008).

Neuere Studien konzentrieren sich auf die Rolle des ER-Stress bei toxischen, metabolischen und infektiösen Lebererkrankungen (Malhi und Kaufman 2011; Ji und Kaplowitz 2006). Trotzdem bleiben die zellulären Wege, die den hepatischen UPR und den ER-Stress in der Cholestase regulieren, weitgehend unbekannt (Dai et al. 2013).

In der vorliegenden Studie konnte kein direkter Zusammenhang zwischen der Menge des akkumulierten HBsAg und dem Ausmaß des ER-Stress in der Leber gezeigt werden, da die Cholestase als zusätzliche ER-Stress modifizierende Komponente wirkt (vgl. Abb. 20 und 23).

Die Induktion von ER- Stress ist auch für die Hepatokarzinogenese essentiell (Shuda et al. 2003). Die UPR ist generell in soliden Tumoren aktiviert und führt dazu, dass Signalwege, die Apoptose induzieren, in Tumor Zellen ausgeschaltet sind (Tang et al. 2012).
Da für die UPR in den Abcb4$^{-/-}$HBV-tg Mäusen kein additiver Effekt beobachtet wurde, kann im vorliegenden Modell nicht auf einen Zusammenhang zwischen ER-Stress und HCC geschlossen werden.

6.6 Einfluss der HBsAg Expression auf die Karzinogenese im Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Modell

Die Kombination des Abcb4$^{-/-}$ und des HBV-tg- Mausmodells führt nicht nur zu einer verstärkten hepatozellulären Schädigung, ER-Stress, Inflammation und Fibrogenese, sondern in der Folge auch zur Aktivierung karzinogener Signalwege und zur Entstehung von HCC.
In der vorliegenden Arbeit konnte eine fulminante Tumorentwicklung gezeigt werden, ohne dass es vorher zur Entwicklung einer Zirrhose kam. Im Gegensatz dazu entsteht das HCC beim Menschen häufig auf dem Boden einer Inflammation und Fibrosebildung, die zunächst zu einer Zirrhose und erst dann zu einem HCC führt (Waller et al. 2015). Das Risiko der Progression von chronischer Hepatitis-B zur Zirrhose wird durch die Konzentration von HBV-DNA im Blut signifikant beeinflusst. Damit steigt auch das Risiko der HCC Entwicklung. Die Rate der Entwicklung eines HCC steigt proportional zum HBV-DNA-Gehalt im Blut der Patienten (Kawanaka et al. 2014). Die HCC-Inzidenz steigt von 0,6 pro 100 Personen bei chronischen HBV-infizierten Patienten ohne Zirrhose auf 3,7 bei HBV-infizierten Pateinten mit Zirrhose (Kawanaka et al. 2014; Fattovich et al. 2008).
Um die Signalwege, die mit der Tumorentstehung assoziiert sind, zu charakterisieren führten wir Western-Blot-Analysen der wichtigsten Promotoren für das Tumorwachstum durch: c-Jun, c-Jun N-terminale Kinase JNK und STAT3 sowie deren phosphorylierten Varianten in Proteinlysaten von Lebergewebe untersucht.
Die Aktivierung der Tumorpromotoren JNK, c-Jun und STAT-3 zeigte sich, unabhängig vom Geschlecht, im Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Maus Modell gegenüber allen anderen Gruppen deutlich erhöht (vgl. Abb. 26). c-Jun und STAT3 sind als Transkriptionsfaktoren wirksam und in mehrere zelluläre Prozesse einschließlich Proliferation, Überleben und Zelltransformation involviert. c-Jun ist sowohl in chemisch induzierten Lebertumoren bei Mäusen als auch in Lebertumoren beim Menschen aktiviert (Eferl et al. 2003; He et

al. 2010). Ein Fehlen von c-Jun führt in den jeweiligen Zellen zu einem Zellzyklusarrest in der G1-Phase. In Übereinstimmung damit führte die Ablation von c-Jun und STAT3 auch bei HCV-tg Mäusen zu einer additiven und nahezu vollständigen Prävention des HCC. Auch das Hepatitis-C-Virus-Core Protein potenziert chemisch induzierte HCC durch c-Jun- und STAT3-Aktivierung (Machida et al. 2010). Somit ist c-Jun, als auch STAT3 in der HCC Genese als Proto-Onkogen bzw. Karzinogenese-assoziierter Transkriptionsfaktor von großer Bedeutung (Chen et al. 2009; Wang et al. 2011).
Zusammenfassend läßt sich aus den Befunden der vorliegenden Studie schließen, dass die gemeinsame Aktivierung der Tumorpromotoren auf der Basis einer multiplen Schädigung zur HCC Entstehung im Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Modell führt. Diese Schußfolgerung resultiert sowohl aus den makroskopischen Befunden (vgl. Abb. 24), aus den Ergebnissen der molekularbiologischen Analysen (vgl. Abb 26) und auch aus histologischen Färbungen (vgl. Abb. 27).

6.7 Schema zur Übersicht der Schädigung

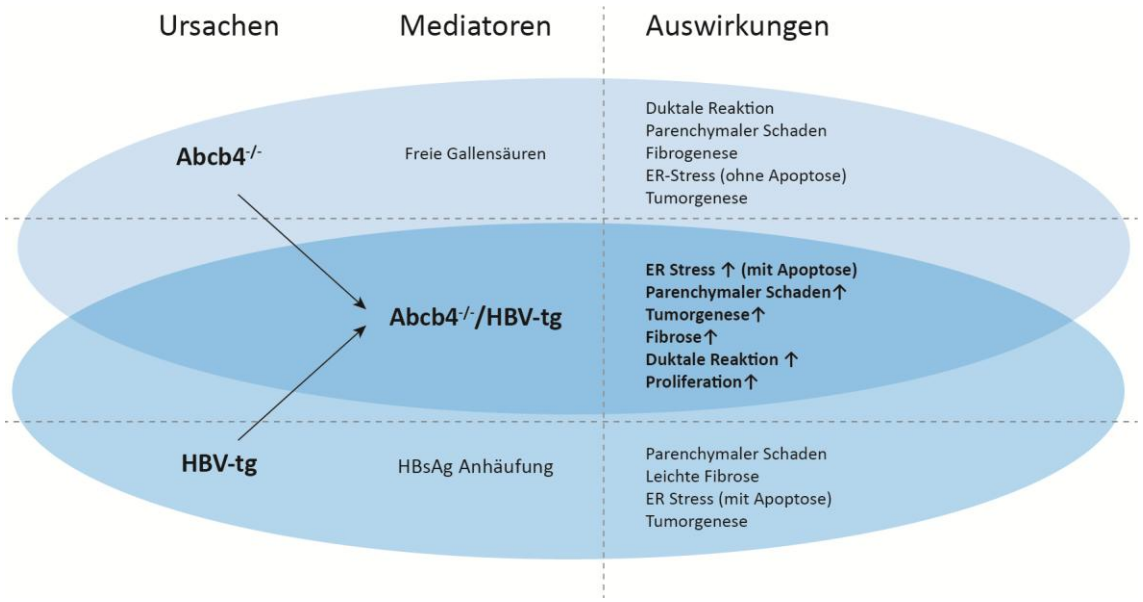

Abbildung 28. Übersichtsschema über die gemischte Pathogenese des Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Modells

Die Abbildung verdeutlicht die Charakteristika der in dieser Arbeit dargestellten Modelle.

6.8 Limitationen der Studie

Im Verlauf der letzten Jahre konnte eine Veränderung der Tumor-Inzidienz im Abcb4$^{-/-}$ Maus- Modell festgestellt werden. In früher veröffentlichten Studien zeigten nahezu 100% aller Abcb4$^{-/-}$ Tiere im Alter von 52 Wochen Leberzelltumore (Roderfeld et al. 2010a). Die Versuchstiere wurden zu dieser Zeit jedoch nicht unter den optimierten *Spezifiziert Pathogen Freien* (SPF)- Bedingungen gehalten, wie es heute der Fall ist. Die Analyse von Maus-Pathogenen sowie die Therapie von Erkrankungen wird stetig verbessert. Einflüsse von Antibiotika und der Darmmikrobiota auf die hepatische Fibrogenese sind bekannt (Xie et al. 2016). Die verringerte HCC-Inzidenz der letzten Jahre in Abcb4$^{-/-}$ Mäusen ist höchstwahrscheinlich auf diese Bedingungen zurück zu führen. Dies ist allerdings für die vergleichenden Analysen der vorliegenden Studie irrelevant, da alle Mausgruppen parallel unter gleichen Bedingungen gehalten wurden und somit alle Tiere in geringerem Maße karzinogenen Noxen ausgesetzt waren.
Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten murinen Modelle besitzen den Vorteil, dass anders als in Zellkulturen Wechselwirkungen des Immunsystems mit dem Virus aufgezeigt werden können. Es bleibt aber offen, in welchem Umfang die Ergebnisse der murinen Modellen auf den Menschen übertragen werden können.

7. Zusammenfassung und Ausblick

HBV-Infektionen gehören zu den meist verbreiteten Infektionen weltweit und sind die häufigste Ursache der Leberzirrhose und des Hepatozellulären Karzinoms.
Die selten vorkommende Primär Sklerosierende Cholangitis gehört zu den chronisch verlaufenden cholestatischen Lebererkrankungen unklarer Ätiologie und kann in der Folge zu progressiver Cholestase und ebenfalls zur Zirrhose führen.
Sowohl das HBV-tg- als auch das Abcb4$^{-/-}$ Mausmodell sind gut etabliert:
HBV-tg Mäuse auf Balb/c Hintergrund, die leberspezifisch das große Hüllenprotein von humanem HBV exprimieren, zeigen eine mit dem Alter zunehmende Akkumulation von viralen Proteinen in den Hepatozyten und in der Folge ER-Stress, eine progrediente Leberschädigung und ein HCC.
Abcb4$^{-/-}$ Mäuse stellen ein gut reproduzierbares Modell für Cholangiopathien dar. Die Tiere zeigen fokale Obliteration der Gallengänge und konzentrische periduktale Fibrose. Diese Merkmale sind mit denen der primär- und sekundär sklerosierenden Cholangitis beim Menschen vergleichbar.

Ziel der vorliegenden Studie war es durch Kreuzung der HBV-tg und Abcb4$^{-/-}$-Mauslinien ein *Second Hit* Modell zu entwickeln, welches die Auswirkungen des Zusammenspiels von HBV und Cholestase verstehen lässt.

Um das Ausmaß der Schädigungen und hepatischen Funktionseinschränkungen im Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Modell nachweisen zu können, wurden Leber- und Serumproben der 7-8, 12-16 und 52 Wochen alten Tiere untersucht. Analysiert wurden u.a. die Aktivität der Serumtransaminasen und der Gesamtgehalt an hepatischem Hydroxyprolin. Weiterhin wurden die Konzentrationen verschiedener konjungierter und unkonjugierter Gallensäuren bestimmt. Zudem wurden histologische Analysen mittels Hämatoxylin-Eosin- und Sirius-Red-Färbung durchgeführt. Immunhistochemische Färbungen führten wir für Desmin und GFAP als Marker der Aktivität hepatischer Sternzellen, für die tumorspezifischen Marker Glutamin Synthetase, Typ IV Kollagen, Ki67 und für HBsAg durch. Mittels Western Blot wurden ER-Stress- und Karzinogenese-assoziierte Signaltransduktionswege untersucht.

Im Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Modell zeigte sich gegenüber den Ursprungsmodellen, HBV-tg und Abcb4$^{-/-}$, eine Zunahme der hepatozellulären Schädigung. Dies spiegelte sich in einem Anstieg der Serum- ALT Konzentration, verstärkter Inflammation in der H&E Färbung und Zunahme der Fibrose in der Sirius-Red-Färbung wider. Weiterhin zeigte sich im Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Modell eine verringerte HBsAg Akkumulation, die aber keinen Einfluss auf die mittels Western Blot Analysen bestimmten ER-Stress Marker hatte.

Die Erhöhung der Gesamtkonzentration der Serumgallensäuren und die relative Abnahme der protektiven Gallensäure TUDCA führten im Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Modell zu einer vermehrten Parenchymschädigung.

Die prä-kanzerogene Pathogenese und die Aktivierung HCC-assoziierter Signalwege zeigten sich im Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Modell kumulativ verstärkt. In der Folge potenzierten sich Anzahl und Größe der Lebertumoren.

Wir haben somit erstmals ein murines *Multiple Hit* Modell für Cholestase- und HBV-induzierten Leberschaden beschrieben.

Die vorliegende Studie legt daher nahe, dass eine Senkung der HBsAg Expression bei chronisch HBV- infizierten Patienten mit biliärer Beteiligung eine Verbesserung der Therapie und Prognose bedeuten könnte.

8. Summary

HBV-infections are among the most prevalent infections worldwide and are the most common cause of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. The rare primary

sclerosing cholangitis is one of the chronical cholestatic liver diseases of unclear aetiology and can lead to progressive cholestasis and also causes cirrhosis. The HBV-tg as well as the Abcb4$^{-/-}$-mice strain are well established: HBV-tg mice bred on background BALB/c, which liver-specifically express the envelope protein of human HBV, show an age-related accumulation of viral protein in the hepatocytes. This, in consequence, causes ER-stress, progredient liver damage and hepatocellular carcinoma.

Abcb4$^{-/-}$-mice present a highly reproducible model for cholangiopathy. The animals show focal obliterations of the biliary tracts and concentric periductal fibrosis. These characteristics are comparable to primary and secondary sclerosing cholestasis in humans.

It was the aim of the study at hand to develop a *second hit* model by crossbreeding HBV-tg and Abcb4$^{-/-}$-mice strains, which would illustrate the interaction of HBV and cholestasis.

To be able to show the extent of damage and loss of hepatic function in the Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg model, liver and serum samples of the animals were taken at ages 7-8, 12-16 and 52 weeks. Among other factors, the serumtransaminases activity and the total content of hepatic hydroxyprolin were analysed. Furthermore, different conjugated and unconjugated serum bile acid concentrations were measured. Additionally, histological analyses were carried out via hematoxylin-eosin and sirius-red staining. Immunohistochemical stainings were done for Desmin and GFAP as markers of hepatic stellate cells activity, for the tumorspecific marker glutamine synthestase, type IV collagen, Ki67, and for HBsAg. Via Western Blot, ER-stress- and carcinogenisis-associated signaltransduction were examined.

In comparison to the originary strains, Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg mice show an increase in hepatocellular damage. This became evident in an increase of the Serum-ALT concentration, increased inflammation in the H&E stainings and increased fibrosis in the SR-stainings. The Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg model also shows a reduced HBsAg accumulation, which does not influence certain ER-stress markers, which were analysed via Western Blot.

The increase of the total concentration of serum bile acids and the relative reduction of the protective bile acid TUDCA lead to elevated liver injury in the Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg model.

The precarcinogenic pathogenesis and the activation of HCC-associated signal paths were cumulatively enhanced in the Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg model. In consequence, number and size of associated liver tumors potentiated.

Thus, we have for the first time described a murine Multiple Hit model for cholestasis and HBV-induced liver damage.

The present study therefore indicates that a reduction of the HBsAg expression can lead to an improvement of therapy and prognosis in patients with chronic HBV-infections with biliary involvement.

9. Abkürzungsverzeichnis

A	Arterie
Abb.	Abbildung
ABC Transporter	*ATP binding cassette Transporter*
Abcb4$^{-/-}$	Abcb4-Knockoutmaus
ADL	*Alcoholic Disease of the Liver*
AHB	akute Hepatitis B
AIH	Autoimmun Hepatitis
AK	Antikörper
ALT	Alanin-Aminotransferase
AP	Alkalische Phosphatase
AST	Aspartat-Aminotransferase
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
BIP	binding immunoglobulin protein
CA	Cholsäure
ca.	circa
cDNA	*complementary* DNA
dsDNA	doppelsträngige DANN
cm	Zentimeter
CO_2	Kohlenstoffdioxid
d.h.	das heißt
DNA	Deoxyribonukleinsäure
ECM	extrazelluläre Matrix
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERCP	endoskopisch retrograde Cholangio-Pankreatikografie
eIF2α	*eukaryotic initiation factor 2α*
et al.	et alii
Fa.	Firma
FCH	Fibrosierende cholestatische Hepatitis
g	Gramm
G	Vielfaches der Erdbeschleunigung
GCA	*Glycocholic acid*

GCDCA	*Glycochenodeoxycholic acid*
GDCA	*Glycodeoxycholic acid*
GFAP	*Glial fibrillary acid Protein*
GHDCA	*Glycohyodeoxycholic acid*
γ-GT	γ-Glutamyltransferase
GUDCA	*Glycoursodeoxycholic acid*
GRP 78	*Glucose regulated protein-78kDa*
h	Stunde(n)
HBcAg	Hepatitis B *core* antigen
HBeAg	Hepatiits B *envelope* antigen
HBsAg	Hepatitis B *surface* antigen
HBV-tg	Hepatitis B- transgen
HBV	Hepatitis B Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis C Virus
HDCA	Hyodeoxycholsäure
H&E	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HLA	*Human Leukocyte Antigen*
HSC	Hepatische Sternzelle
HYP	Hydroxyprolin
IFN	Interferon
ICC	*Intrahepatic Colangiocarzinoma*
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
ICP	*Intrahepatic cholestasis of pregnancy*
i.v.	intra venös
JNK	c-Jun N-terminale-Kinase
k	kilo
kb	Kilobase
Konz.	Konzentration
KM	Knochenmark
KMT	Knochenmarktransplantation
l	Liter
LCA	*Lithocholic acid*

LHB	*large* Hepatitis B *surface antigen*
L-Tx	Leber-Transplantation
Lm	Littermate (Kontrollgruppe)
LPAC	*Low Phospholipid associated Cholelithiasis*
m	Meter
M	Molar
Max.	maximal
MDR	*Multi Drug Resistance Protein*
MDCA	*Murideoxycholic acid*
MF	Myofibroblasten
mg	Milligramm
MHB	*medium* Hepatitis B *surface antigen*
min.	Minute
ml	Milliliter
mmol	Millimol
MRT	Magnetresonanz Tomografie
mRNA	*messenger* RNA
MCA	*Muricholic acid*
n	Stichprobenanzahl
NASH	*non-alcoholic steatohepatitis*
NAT	Nukleinsäure-Amplifikations-Techniken
NAFLD	*Non-alcoholic fatty liver disease*
NK	Natürliche Killerzellen
Nm	Nanometer
o.g.	Oben genannt
ORF	Open reading Frame
p	Signifikanzlevel
pANCA	p- Anti-Neutrophile cytoplasmatische Antikörper
PDGF	*platelet-derived growth factor*
PBC	Primäre biliäre Zirrhose
PBS	*Phosphate buffered saline*
PERK	*Protein kinase-like endoplasmatic reticulum Kinase*
PFIC	primär familiäre intrahepatische Cholestase
PSC	Primäre sklerosierende Cholangitis

PVDF	Polyvinylidenflourid
q-PCR	quantitative *polymerase chain reaction*
rel.	relativ
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	reverse Transkriptase
RT-PCR	Real-Time PCR
S	Standardabweichung
SD	Standardabweichung
SDS	Sodium-dodecyl-sulfat
SDS-Page	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sec.	Sekunde
SHB	*small* Hepatitis B *surface antigen*
SOX-9	SRY-box containing gene 9
STAT	*signal transducer and activator*
sog.	so genannt
SSC	sekundär sklerosierende Cholangitis
TBS	Tris Buffered Saline
TBS-T	Tris Buffered Saline Tween
TCA	*Taurocholsäure*
TCDCA	*Taurochenodeoxycholic acid*
TDCA	*Taurodeoxycholic acid*
THCA	*Taurohyocholic acid*
THDCA	*Taurohyodeoxycholic acid*
TLCA	*Taurolithocholic acid*
Tg	transgen
TG	Triglyceride
TGF-ß	*transforming growth factor beta*
TL	T-Lymphozyten
TMDCA	*Tauromurideoxycholic acid*
TNFα	Tumornekrosefaktor alpha
TRIS	Tris(hydoxylmethyl)aminomethan
TUDCA	*Tauroursodeoxycholic acid*
u.a.	unter anderem
UDCA	*Ursodeoxycholic acid*
U	*Unit*

UPR	*Unfolded Protein Response*
u.v.m.	und viele mehr
Vergr.	Vergrößerung
V	Vene
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
z.B.	Zum Beispiel
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µmol	Mikromol

10. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Mikroarchitektur der gesunden Leber (modifiziert nach Bataller und Brenner 2005) 4
Abbildung 2. Gliederung der Leber in verschiedene Baueinheiten (modifiziert nach Tzanakakis et al. 2000) 5
Abbildung 3. Mikroarchitektur der fibrotischen Leber (modifiziert nach Bataller und Brenner 2005). 7
Abbildung 4. Modell des Hepatitis-B-Virus und der filamentösen und sphärischen HBsAg-Partikel (modifiziert nach Gerlich 2013) 16
Abbildung 5. Genomorganisation des HB-Virus (Subtyp awy) (modifiziert nach Modrow et al. 2010) 17
Abbildung 6. Serologische Parameter einer akuten Hepatitis-B-Virusinfektion und deren Ausheilung (modifiziert nach Modrow et al. 2010) 21
Abbildung 7. Stadieneinteilung des Hepatozellulären Karzinoms nach den BCLC Kriterien (modifiziert nach EASL 2015) 27
Abbildung 8. Temperaturprofil der PCR (Bild: Screenshot der Software MXpro [3]).... 39
Abbildung 9. Darstellung der hepatischen Schädigung anhand der Serum ALT-Konzentrationen. 59
Abbildung 10. Gesteigerte portale Inflammation in Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Tieren. 61
Abbildung 11. Verstärkte Fibrose im Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Modell. 63
Abbildung 12. Quantifizierung Sirius-Red positiver Areale. 65
Abbildung 13. Signifikant erhöhter hepatischer Hydroxyprolin-Gehalt in Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Tieren verglichen mit dem WT. 66
Abbildung 14. HSC Aktivierung und periduktale Reaktion in 12-16 Wochen alten WT, Abcb4$^{-/-}$, HBV-tg und Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Tieren. 67
Abbildung 15. Erhöhte Gesamtkonzentration der Taurin-konjugierten Gallensäuren im Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Modell. 69
Abbildung 16. Abnahme der relativen Konzentrationen der protektiven Gallensäure TUDCA im Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Modell. 70
Abbildung 17. Absolute Serumkonzentrationen der 8 häufigsten Gallensäuren. 71
Abbildung 18. Korrelation der Serum-ALT mit der Gesamtkonzentration der Serum-Gallensäuren. 72
Abbildung 19. Korrelation der Serum-ALT mit der Gesamtkonzentration der Serum-Gallensäuren in HBV-tg Tieren. 73
Abbildung 20. Western-Blot-Analyse der HBsAg-Expression. 74
Abbildung 21. Vergleich der HBsAg Expression in HBV-tg und Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Tieren. 75
Abbildung 22. HBsAg Färbung in WT und Abcb4$^{-/-}$Tieren. 76
Abbildung 23. Western-Blot-Analyse der ER-Stress Marker. 77
Abbildung 24. Tumorgenese in Abcb4$^{-/-}$ und Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Tieren. 78
Abbildung 25. Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Tiere entwickeln größere Tumore als Abcb4$^{-/-}$-Tiere. .. 79
Abbildung 26. Western-Blot-Analyse von Karzinogenese-assoziierten Signaltrans-duktionswegen. 80
Abbildung 27. Nachweis histologischer Charakteristika von HCC in 52 Wochen alten Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Tieren. 82
Abbildung 28. Übersichtsschema über die gemischte Pathogenese des Abcb4$^{-/-}$/HBV-tg Modells 91

11. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Mauslinien 33
Tabelle 2. In der q-PCR verwendete Primer sowie deren Annealingtemperatur..... 41
Tabelle 3. In der Immunhistochemie verwendete sekundäre Antiköper 44
Tabelle 4. Übersicht über die verwendeten Kits..... 44
Tabelle 5. Im Western Blot verwendete Antikörper und deren Verdünnung..... 53

12. Literaturverzeichnis

Adachi, Tetsuo; Kaminaga, Tomoyuki; Yasuda, Hiroyuki; Kamiya, Tetsuro; Hara, Hirokazu (2014): The involvement of endoplasmic reticulum stress in bile acid-induced hepatocellular injury. In: *Journal of clinical biochemistry and nutrition* 54 (2), S. 129–135. DOI: 10.3164/jcbn.13-46.

Arai, Masaaki; Kondoh, Nobuo; Imazeki, Nobuo; Hada, Akiyuki; Hatsuse, Kazuo; Kimura, Fumihiro; Matsubara, Osamu; Mori, Kazutoshi; Wakatsuki, Toru; Yamamoto, Mikio (2006): Transformation-associated gene regulation by ATF6alpha during hepatocarcinogenesis. In: *FEBS letters* 580 (1), S. 184–190. DOI: 10.1016/j.febslet.2005.11.072.

Arastéh, Keikawus; Baenkler, Hanns-Wolf (2009): Innere Medizin. 2., vollständig überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Thieme (Duale Reihe). Online verfügbar unter http://dx.doi.org/10.1055/b-001-3193.

Aron, Jonathan H.; Bowlus, Christopher L. (2009): The immunobiology of primary sclerosing cholangitis. In: *Seminars in immunopathology* 31 (3), S. 383–397. DOI: 10.1007/s00281-009-0154-7.

Arriazu, Elena; Ruiz de Galarreta, Marina; Cubero, Francisco Javier; Varela-Rey, Marta; Perez de Obanos, Maria Pilar; Leung, Tung Ming; Lopategi, Aritz; Benedicto, Aitor; Abraham-Enachescu, Ioana; Nieto, Natalia (2014): Extracellular matrix and liver disease. In: *Antioxidants & redox signaling* 21 (7), S. 1078–1097. DOI: 10.1089/ars.2013.5697.

Atta, Hussein M. (2015): Reversibility and heritability of liver fibrosis. Implications for research and therapy. In: *World journal of gastroenterology* 21 (17), S. 5138–5148. DOI: 10.3748/wjg.v21.i17.5138.

Attili, A. F.; Angelico, M.; Cantafora, A.; Alvaro, D.; Capocaccia, L. (1986): Bile acid-induced liver toxicity. Relation to the hydrophobic-hydrophilic balance of bile acids. In: *Medical hypotheses* 19 (1), S. 57–69.

Avwioro, G. (2011): Histochemical uses of of Hämatoxylin - A Review. In: *Journal of Pharmacy and Clinical Sience*, S. 24–34.

Baghdasaryan, Anna; Fickert, Peter; Fuchsbichler, Andrea; Silbert, Dagmar; Gumhold, Judith; Horl, Gerd; Langner, Cord; Moustafa, Tarek; Halilbasic, Emina; Claudel, Thierry; Trauner, Michael (2008): Role of hepatic phospholipids in development of liver injury in Mdr2 (Abcb4) knockout mice. In: *Liver Int* 28 (7), S. 948–958. DOI: 10.1111/j.1478-3231.2008.01758.x.

Balfe, D. M.; Ralls, P. W.; Bree, R. L.; DiSantis, D. J.; Glick, S. N.; Levine, M. S.; Megibow, A. J.; Saini, S.; Shuman, W. P.; Greene, F. L.; Laine, L. A.; Lillemoe, K.; Kidd, R. (2000): Imaging strategies in the initial evaluation of the jaundiced patient. American College of Radiology. ACR Appropriateness Criteria. In: *Radiology* 215 Suppl, S. 125–133.

Balogh, Julius; Victor, David 3rd; Asham, Emad H.; Burroughs, Sherilyn Gordon; Boktour, Maha; Saharia, Ashish; Li, Xian; Ghobrial, R. Mark; Monsour, Howard P., JR (2016): Hepatocellular carcinoma. A review. In: *Journal of hepatocellular carcinoma* 3, S. 41–53. DOI: 10.2147/JHC.S61146.

Barker, L. F.; Maynard, J. E.; Purcell, R. H.; Hoofnagle, J. H.; Berquist, K. R.; London, W. T. (1975): Viral hepatitis, type B, in experimental animals. In: *Am.J.Med.Sci.* 270 (1), S. 189–195.

Basaranoglu, M.; Basaranoglu, G.; Senturk, H. (2013): From fatty liver to fibrosis: a tale of "second hit". In: *World J.Gastroenterol.* 19 (8), S. 1158–1165.

Bataller, R.; Brenner, D. A. (2005): Liver fibrosis. In: *J.Clin.Invest* 115 (2), S. 209–218.

Baumert, T. F.; Thimme, R.; von, Weizsacker F. (2007): Pathogenesis of hepatitis B virus infection. In: *World J.Gastroenterol.* 13 (1), S. 82–90.

Bedossa, Pierre (2015): Reversibility of hepatitis B virus cirrhosis after therapy. Who and why? In: *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 35 Suppl 1, S. 78–81. DOI: 10.1111/liv.12710.

Bertolotti, A.; Zhang, Y.; Hendershot, L. M.; Harding, H. P.; Ron, D. (2000): Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. In: *Nature cell biology* 2 (6), S. 326–332. DOI: 10.1038/35014014.

Bhamidimarri, Kalyan Ram; Schiff, Eugene (2013): Drug-induced cholestasis. In: *Clinics in liver disease* 17 (4), 519-31, vii. DOI: 10.1016/j.cld.2013.07.015.

Bissell, D. M.; Gores, G. J.; Laskin, D. L.; Hoofnagle, J. H. (2001): Drug-induced liver injury: mechanisms and test systems. In: *Hepatology* 33 (4), S. 1009–1013.

Blachier, M.; Leleu, H.; Peck-Radosavljevic, M.; Valla, D. C.; Roudot-Thoraval, F. (2013): The burden of liver disease in Europe: a review of available epidemiological data. In: *J.Hepatol.* 58 (3), S. 593–608.

Bochkis, Irina M.; Rubins, Nir E.; White, Peter; Furth, Emma E.; Friedman, Joshua R.; Kaestner, Klaus H. (2008): Hepatocyte-specific ablation of Foxa2 alters bile acid homeostasis and results in endoplasmic reticulum stress. In: *Nat.Med.* 14 (8), S. 828–836. DOI: 10.1038/nm.1853.

Bödeker, Rolf-Hasso; Frenz, I. (2001): Einführung in die medizinische Statistik. Skript zur Vorlesung Biomathematik. Giessen: Ferber.

Boonstra, Kirsten; Beuers, Ulrich; Ponsioen, Cyriel Y. (2012): Epidemiology of primary sclerosing cholangitis and primary biliary cirrhosis. A systematic review. In: *Journal of hepatology* 56 (5), S. 1181–1188. DOI: 10.1016/j.jhep.2011.10.025.

Brew, Keith; Nagase, Hideaki (2010): The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs). An ancient family with structural and functional diversity. In: *Biochimica et biophysica acta* 1803 (1), S. 55–71. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2010.01.003.

Burgart, L. J. (1998): Cholangitis in viral disease. In: *Mayo Clin.Proc.* 73 (5), S. 479–482.

Burnette, W. N. (1981): "Western blotting". Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. In: *Analytical biochemistry* 112 (2), S. 195–203.

Busse, H. J.; Drescher, T.; Kroner, M.; Heine, R.; Schlee, H.; Dietrich, R. (1993): Stellenwert der Ultraschalldiagnostik in der Differentialdiagnostik der Cholestase. In: *Z.Gastroenterol.* 31 Suppl 2, S. 39–41.

Buzzetti, Elena; Pinzani, Massimo; Tsochatzis, Emmanuel A. (2016): The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). In: *Metabolism: clinical and experimental* 65 (8), S. 1038–1048. DOI: 10.1016/j.metabol.2015.12.012.

Caligiuri, Alessandra; Gentilini, Alessandra; Marra, Fabio (2016): Molecular Pathogenesis of NASH. In: *International journal of molecular sciences* 17 (9). DOI: 10.3390/ijms17091575.

Calvaruso, Vincenza; Craxi, Antonio (2014): Regression of fibrosis after HBV antiviral therapy. Is cirrhosis reversible? In: *Liver Int* 34 Suppl 1, S. 85–90. DOI: 10.1111/liv.12395.

Chapman, R.; Cullen, S. (2008): Etiopathogenesis of primary sclerosing cholangitis. In: *World J.Gastroenterol.* 14 (21), S. 3350–3359.

Chen, Fei; Beezhold, Kevin; Castranova, Vince (2009): JNK1, a potential therapeutic target for hepatocellular carcinoma. In: *Biochimica et biophysica acta* 1796 (2), S. 242–251. DOI: 10.1016/j.bbcan.2009.06.005.

Chen, Yongyan; Sun, Rui; Jiang, Wei; Wei, Haiming; Tian, Zhigang (2007): Liver-specific HBsAg transgenic mice are over-sensitive to Poly(I:C)-induced liver injury in NK cell- and IFN-gamma-dependent manner. In: *Journal of hepatology* 47 (2), S. 183–190. DOI: 10.1016/j.jhep.2007.02.020.

Chisari, F. V. (1989): Hepatitis B virus gene expression in transgenic mice. In: *Mol.Biol.Med.* 6 (2), S. 143–149.

Chisari, F. V.; Filippi, P.; Buras, J.; McLachlan, A.; Popper, H.; Pinkert, C. A.; Palmiter, R. D.; Brinster, R. L. (1987): Structural and pathological effects of synthesis of hepatitis B virus large envelope polypeptide in transgenic mice. In: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 84 (19), S. 6909–6913.

Chisari, F. V.; Filippi, P.; McLachlan, A.; Milich, D. R.; Riggs, M.; Lee, S.; Palmiter, R. D.; Pinkert, C. A.; Brinster, R. L. (1986): Expression of hepatitis B virus large envelope polypeptide inhibits hepatitis B surface antigen secretion in transgenic mice. In: *J.Virol.* 60 (3), S. 880–887.

Chisari, F. V.; Isogawa, M.; Wieland, S. F. (2010): Pathogenesis of hepatitis B virus infection. In: *Pathologie-biologie* 58 (4), S. 258–266. DOI: 10.1016/j.patbio.2009.11.001.

Chisari, F. V.; Klopchin, K.; Moriyama, T.; Pasquinelli, C.; Dunsford, H. A.; Sell, S.; Pinkert, C. A.; Brinster, R. L.; Palmiter, R. D. (1989): Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus transgenic mice. In: *Cell* 59 (6), S. 1145–1156.

Chisari, F. V.; Pinkert, C. A.; Milich, D. R.; Filippi, P.; McLachlan, A.; Palmiter, R. D.; Brinster, R. L. (1985): A transgenic mouse model of the chronic hepatitis B surface antigen carrier state. In: *Science* 230 (4730), S. 1157–1160.

Churin, Yuri; Roderfeld, Martin; Roeb, Elke (2015): Hepatitis B virus large surface protein. Function and fame. In: *Hepatobiliary surgery and nutrition* 4 (1), S. 1–10. DOI: 10.3978/j.issn.2304-3881.2014.12.08.

Churin, Yuri; Roderfeld, Martin; Stiefel, Johannes; Wurger, Tilman; Schroder, Dirk; Matono, Tomomitsu; Mollenkopf, Hans-Joachim; Montalbano, Roberta; Pompaiah, Malvika; Reifenberg, Kurt; Zahner, Daniel; Ocker, Matthias; Gerlich, Wolfram; Glebe, Dieter; Roeb, Elke (2014): Pathological impact of hepatitis B virus surface proteins on the liver is associated with the host genetic background. In: *PloS one* 9 (3), e90608. DOI: 10.1371/journal.pone.0090608.

Dai, B-H; Geng, L.; Wang, Y.; Sui, C-J; Xie, F.; Shen, R-X; Shen, W-F; Yang, J-M (2013): microRNA-199a-5p protects hepatocytes from bile acid-induced sustained endoplasmic reticulum stress. In: *Cell death & disease* 4, e604. DOI: 10.1038/cddis.2013.134.

Dandri, M.; Volz, T. K.; Lütgehetmann, M.; Petersen, J. (2005): Animal models for the study of HBV replication and its variants. In: *Journal of Clinical Virology* 34, S54-S62. DOI: 10.1016/S1386-6532(05)80011-3.

Dane, D. S.; Cameron, C. H.; Briggs, M. (1970): Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. In: *Lancet* 1 (7649), S. 695–698.

Day, C. P. (2002): Non-alcoholic steatohepatitis (NASH): where are we now and where are we going? In: *Gut* 50 (5), S. 585–588.

Day, C. P.; James, O. F. (1998): Steatohepatitis: a tale of two "hits"? In: *Gastroenterology* 114 (4), S. 842–845.

Degiorgio, Dario; Crosignani, Andrea; Colombo, Carla; Bordo, Domenico; Zuin, Massimo; Vassallo, Emanuela; Syren, Marie-Louise; Coviello, Domenico A.; Battezzati, Pier Maria (2016): ABCB4 mutations in adult patients with cholestatic liver disease. Impact and phenotypic expression. In: *Journal of gastroenterology* 51 (3), S. 271–280. DOI: 10.1007/s00535-015-1110-z.

Denk, Gerald Ulrich; Kleiss, Carl Philipp; Wimmer, Ralf; Vennegeerts, Timo; Reiter, Florian Paul; Schulz, Sabine; Zischka, Hans; Rust, Christian (2012): Tauro-beta-muricholic acid restricts bile acid-induced hepatocellular apoptosis by preserving the mitochondrial membrane potential. In: *Biochemical and biophysical research communications* 424 (4), S. 758–764. DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.07.029.

Duarte, Sergio; Baber, John; Fujii, Takehiro; Coito, Ana J. (2015): Matrix metalloproteinases in liver injury, repair and fibrosis. In: *Matrix Biol* 44-46, S. 147–156. DOI: 10.1016/j.matbio.2015.01.004.

EASL. Clinical Practice Guidelines for Hepatocellular Carcinoma Differ between Japan, United States, and Europe (2015). In: *Journal of hepatology* 64 (6), S. 1388–1402.

EASL 2011. Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma 2011. Online verfügbar unter http://www.easl.eu/medias/cpg/issue7/English-Report.pdf, zuletzt geprüft am 23.05.2017.

Eferl, Robert; Ricci, Romeo; Kenner, Lukas; Zenz, Rainer; David, Jean-Pierre; Rath, Martina; Wagner, Erwin F. (2003): Liver tumor development. c-Jun antagonizes the proapoptotic activity of p53. In: *Cell* 112 (2), S. 181–192.

Elpek, Gulsum Ozlem (2014): Cellular and molecular mechanisms in the pathogenesis of liver fibrosis. An update. In: *World journal of gastroenterology* 20 (23), S. 7260–7276. DOI: 10.3748/wjg.v20.i23.7260.

Fakruddin, M.; Mannan, K. S.; Chowdhury, A.; Mazumdar, R. M.; Hossain, M. N.; Islam, S.; Chowdhury, M. A. (2013): Nucleic acid amplification: Alternative methods of polymerase chain reaction. In: *J.Pharm.Bioallied.Sci.* 5 (4), S. 245–252.

Fattovich, Giovanna; Bortolotti, Flavia; Donato, Francesco (2008): Natural history of chronic hepatitis B. Special emphasis on disease progression and prognostic factors. In: *Journal of hepatology* 48 (2), S. 335–352. DOI: 10.1016/j.jhep.2007.11.011.

Faubion, W. A.; Guicciardi, M. E.; Miyoshi, H.; Bronk, S. F.; Roberts, P. J.; Svingen, P. A.; Kaufmann, S. H.; Gores, G. J. (1999): Toxic bile salts induce rodent hepatocyte apoptosis via direct activation of Fas. In: *The Journal of clinical investigation* 103 (1), S. 137–145. DOI: 10.1172/JCI4765.

Fickert, P.; Fuchsbichler, A.; Wagner, M.; Zollner, G.; Kaser, A.; Tilg, H.; Krause, R.; Lammert, F.; Langner, C.; Zatloukal, K.; Marschall, H. U.; Denk, H.; Trauner, M. (2004): Regurgitation of bile acids from leaky bile ducts causes sclerosing cholangitis in Mdr2 (Abcb4) knockout mice. In: *Gastroenterology* 127 (1), S. 261–274.

Flowers, Matthew T.; Keller, Mark P.; Choi, YounJeong; Lan, Hong; Kendziorski, Christina; Ntambi, James M.; Attie, Alan D. (2008): Liver gene expression analysis reveals endoplasmic reticulum stress and metabolic dysfunction in SCD1-deficient mice fed a very low-fat diet. In: *Physiological genomics* 33 (3), S. 361–372. DOI: 10.1152/physiolgenomics.00139.2007.

Friedman, Scott L.; Neuschwander-Tetri, Brent A.; Rinella, Mary; Sanyal, Arun J. (2018): Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. In: *Nature medicine* 24 (7), S. 908–922. DOI: 10.1038/s41591-018-0104-9.

Gallagher, Sean R.; Desjardins, Philippe R. (2006): Quantitation of DNA and RNA with absorption and fluorescence spectroscopy. In: *Current protocols in molecular biology* Appendix 3, Appendix 3D. DOI: 10.1002/0471142727.mba03ds76.

Ganem, D.; Prince, A. M. (2004): Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. In: *N.Engl.J.Med.* 350 (11), S. 1118–1129.

Georgiadou, S. P.; Zachou, K.; Liaskos, C.; Gabeta, S.; Rigopoulou, E. I.; Dalekos, G. N. (2009): Occult hepatitis B virus infection in patients with autoimmune liver diseases. In: *Liver Int* 29 (3), S. 434–442.

Gerlich, W. H.; Glebe, Dieter; Schüttler, C. (2012): Hepatitis&More - 2012/1 - Infektiosität des Hepatitis-B-Virus. Online verfügbar unter http://www.hepatitisandmore.de/archiv/2012-1/infektiositaet-des-hepatitis-b-virus.shtml, zuletzt geprüft am 19.05.2017.

Gerlich, Wolfram H. (2013): Medical virology of hepatitis B. How it began and where we are now. In: *Virology journal* 10, S. 239. DOI: 10.1186/1743-422X-10-239.

Gething, M. J.; Sambrook, J. (1992): Protein folding in the cell. In: *Nature* 355 (6355), S. 33–45. DOI: 10.1038/355033a0.

Glebe, Dieter; Bremer, Corinna M. (2013): The molecular virology of hepatitis B virus. In: *Semin.Liver Dis.* 33 (2), S. 103–112. DOI: 10.1055/s-0033-1345717.

Graumann, Franziska; Churin, Yuri; Tschuschner, Annette; Reifenberg, Kurt; Glebe, Dieter; Roderfeld, Martin; Roeb, Elke (2015): Genomic Methylation Inhibits Expression of Hepatitis B Virus Envelope Protein in Transgenic Mice. A Non-Infectious Mouse Model to Study Silencing of HBV Surface Antigen Genes. In: *PloS one* 10 (12), e0146099. DOI: 10.1371/journal.pone.0146099.

Gupta, E.; Chakravarti, A. (2008): Viral infections of the biliary tract. In: *Saudi.J.Gastroenterol.* 14 (3), S. 158–160.

He, Guobin; Karin, Michael (2011): NF-kappaB and STAT3 - key players in liver inflammation and cancer. In: *Cell research* 21 (1), S. 159–168. DOI: 10.1038/cr.2010.183.

He, Guobin; Yu, Guann-Yi; Temkin, Vladislav; Ogata, Hisanobu; Kuntzen, Christian; Sakurai, Toshiharu; Sieghart, Wolfgang; Peck-Radosavljevic, Markus; Leffert, Hyam L.; Karin, Michael (2010): Hepatocyte IKKbeta/NF-kappaB inhibits tumor promotion and progression by preventing oxidative stress-driven STAT3 activation. In: *Cancer cell* 17 (3), S. 286–297. DOI: 10.1016/j.ccr.2009.12.048.

Heermann, K. H.; Goldmann, U.; Schwartz, W.; Seyffarth, T.; Baumgarten, H.; Gerlich, W. H. (1984): Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-s sequence. In: *J.Virol.* 52 (2), S. 396–402.

Heimbach, Julie; Kulik, Laura M.; Finn, Richard; Sirlin, Claude B.; Abecassis, Michael; Roberts, Lewis R.; Zhu, Andrew; Murad, M. Hassan; Marrero, Jorge (2017): Aasld guidelines for the treatment of hepatocellular carcinoma. In: *Hepatology (Baltimore, Md.). DOI:* 10.1002/hep.29086.

Hemmann, S.; Graf, J.; Roderfeld, M.; Roeb, E. (2007): Expression of MMPs and TIMPs in liver fibrosis - a systematic review with special emphasis on anti-fibrotic strategies. In: *J.Hepatol.* 46 (5), S. 955–975.

Hirschfield, G. M.; Heathcote, E. J.; Gershwin, M. E. (2010): Pathogenesis of cholestatic liver disease and therapeutic approaches. In: *Gastroenterology* 139 (5), S. 1481–1496.

Hofmann, A. F. (1984): Chemistry and enterohepatic circulation of bile acids. In: *Hepatology* 4 (5 Suppl), 4S-14S.

Ikenaga, Naoki; Liu, Susan B.; Sverdlov, Deanna Y.; Yoshida, Shuhei; Nasser, Imad; Ke, Qingen; Kang, Peter M.; Popov, Yury (2015): A new Mdr2(-/-) mouse model of sclerosing cholangitis with rapid fibrosis progression, early-onset portal hypertension, and liver cancer. In: *The American journal of pathology* 185 (2), S. 325–334. DOI: 10.1016/j.ajpath.2014.10.013.

Jacquemin, E. (1999): Progressive familial intrahepatic cholestasis. In: *J.Gastroenterol.Hepatol.* 14 (6), S. 594–599.

Ji, Cheng; Kaplowitz, Neil (2006): ER stress. Can the liver cope? In: *Journal of hepatology* 45 (2), S. 321–333. DOI: 10.1016/j.jhep.2006.06.004.

Junqueira, L. C.; Bignolas, G.; Brentani, R. R. (1979): Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. In: *Histochem.J.* 11 (4), S. 447–455.

Juza, Ryan M.; Pauli, Eric M. (2014): Clinical and surgical anatomy of the liver. A review for clinicians. In: *Clinical anatomy (New York, N.Y.)* 27 (5), S. 764–769. DOI: 10.1002/ca.22350.

Katarey, Dev; Verma, Sumita (2016): Drug-induced liver injury. In: *Clinical medicine (London, England)* 16 (Suppl 6), s104-s109. DOI: 10.7861/clinmedicine.16-6-s104.

Katzenellenbogen, Mark; Mizrahi, Lina; Pappo, Orit; Klopstock, Naama; Olam, Devorah; Jacob-Hirsch, Jasmine; Amariglio, Ninette; Rechavi, Gideon; Domany, Eytan; Galun, Eithan; Goldenberg, Daniel (2007): Molecular mechanisms of liver carcinogenesis in the mdr2-knockout mice. In: *Molecular cancer research : MCR* 5 (11), S. 1159–1170. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-07-0172.

Kawanaka, Miwa; Nishino, Ken; Nakamura, Jun; Oka, Takahito; Urata, Noriyo; Goto, Daisuke; Suehiro, Mitsuhiko; Kawamoto, Hirofumi; Kudo, Masatoshi; Yamada, Gotaro (2014): Quantitative Levels of Hepatitis B Virus DNA and Surface Antigen and the Risk of Hepatocellular Carcinoma in Patients with Hepatitis B Receiving Long-Term Nucleos(t)ide Analogue Therapy. In: *Liver cancer* 3 (1), S. 41–52. DOI: 10.1159/000343857.

Kew, M. C. (2011): Hepatitis B virus x protein in the pathogenesis of hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma. In: *J.Gastroenterol.Hepatol.* 26 Suppl 1, S. 144–152.

Kim, Inki; Xu, Wenjie; Reed, John C. (2008): Cell death and endoplasmic reticulum stress. Disease relevance and therapeutic opportunities. In: *Nature reviews. Drug discovery* 7 (12), S. 1013–1030. DOI: 10.1038/nrd2755.

Kitani, K.; Kanai, S.; Sato, Y.; Ohta, M. (1994): Tauro alpha-muricholate is as effective as tauro beta-muricholate and tauroursodeoxycholate in preventing

taurochenodeoxycholate-induced liver damage in the rat. In: *Hepatology* 19 (4), S. 1007–1012.

Kolly, Philippe; Dufour, Jean-Francois (2016): Surveillance for Hepatocellular Carcinoma in Patients with NASH. In: *Diagnostics (Basel, Switzerland)* 6 (2). DOI: 10.3390/diagnostics6020022.

Kordes, Claus; Sawitza, Iris; Götze, Silke; Herebian, Diran; Häussinger, Dieter (2014): Hepatic stellate cells contribute to progenitor cells and liver regeneration. In: *The Journal of clinical investigation* 124 (12), S. 5503–5515. DOI: 10.1172/JCI74119.

Kremsdorf, D.; Soussan, P.; Paterlini-Brechot, P.; Brechot, C. (2006): Hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: paradigms for viral-related human carcinogenesis. In: *Oncogene* 25 (27), S. 3823–3833.

Kuntz, E.; Kuntz, H.-D. (2008): Hepathologie Textbook and Atlas: Springer Medizin Verlag Heidelberg.

Lampertico, Pietro; Agarwal, Kosh; Berg, Thomas; Buti, Maria; Janssen, Harry L. A.; Papatheodoridis, George; Zoulim, Fabien; Tacke, Frank (2011): EASL. Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. In: *Journal of hepatology. DOI:* 10.1016/j.jhep.2017.03.021.

Lang, C.; Meier, Y.; Stieger, B.; Beuers, U.; Lang, T.; Kerb, R.; Kullak-Ublick, G. A.; Meier, P. J.; Pauli-Magnus, C. (2007): Mutations and polymorphisms in the bile salt export pump and the multidrug resistance protein 3 associated with drug-induced liver injury. In: *Pharmacogenet.Genomics* 17 (1), S. 47–60.

LaRusso, Nicholas F.; Shneider, Benjamin L.; Black, Dennis; Gores, Gregory J.; James, Stephen P.; Doo, Edward; Hoofnagle, Jay H. (2006): Primary sclerosing cholangitis. Summary of a workshop. In: *Hepatology* 44 (3), S. 746–764. DOI: 10.1002/hep.21337.

Lavanchy, Daniel (2012): Viral hepatitis. Global goals for vaccination. In: *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 55 (4), S. 296–302. DOI: 10.1016/j.jcv.2012.08.022.

Lazaridis, K. N. (2008): Sclerosing cholangitis epidemiology and etiology. In: *J.Gastrointest.Surg.* 12 (3), S. 417–419.

Li, Yan; Tang, Zhao-You; Hou, Jin-Xuan (2011): Hepatocellular carcinoma. Insight from animal models. In: *Nat.Rev.Gastroenterol.Hepatol.* 9 (1), S. 32–43. DOI: 10.1038/nrgastro.2011.196.

Liang, T. Jake (2009): Hepatitis B. The virus and disease. In: *Hepatology* 49 (5 Suppl), S13-21. DOI: 10.1002/hep.22881.

Lindor, Keith D.; Kowdley, Kris V.; Harrison, M. Edwyn (2015): ACG Clinical Guideline. Primary Sclerosing Cholangitis. In: *The American journal of gastroenterology* 110 (5), 646-59; quiz 660. DOI: 10.1038/ajg.2015.112.

Linton, Kenneth J. (2015): Lipid flopping in the liver. In: *Biochemical Society transactions* 43 (5), S. 1003–1010. DOI: 10.1042/BST20150132.

Livak, K. J.; Schmittgen, T. D. (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. In: *Methods* 25 (4), S. 402–408.

Llovet, J. M.; Bru, C.; Bruix, J. (1999): Prognosis of hepatocellular carcinoma. The BCLC staging classification. In: *Semin.Liver Dis.* 19 (3), S. 329–338. DOI: 10.1055/s-2007-1007122.

Lüllmann-Rauch, R. (2006): Histologie: Georg Thieme Verlag KG.

Machida, Keigo; Tsukamoto, Hidekazu; Liu, Jian-Chang; Han, Yuan-Ping; Govindarajan, Sugantha; Lai, Michael M. C.; Akira, Shizuo; Ou, Jing-Hsiung James (2010): c-Jun mediates hepatitis C virus hepatocarcinogenesis through signal transducer and activator of transcription 3 and nitric oxide-dependent impairment of oxidative DNA repair. In: *Hepatology* 52 (2), S. 480–492. DOI: 10.1002/hep.23697.

Malhi, Harmeet; Kaufman, Randal J. (2011): Endoplasmic reticulum stress in liver disease. In: *Journal of hepatology* 54 (4), S. 795–809. DOI: 10.1016/j.jhep.2010.11.005.

Mencin, Ali; Seki, Ekihiro; Osawa, Yosuke; Kodama, Yuzo; Minicis, Samuele de; Knowles, Michael; Brenner, David A. (2007): Alpha-1 antitrypsin Z protein (PiZ) increases hepatic fibrosis in a murine model of cholestasis. In: *Hepatology* 46 (5), S. 1443–1452. DOI: 10.1002/hep.21832.

Meuleman, Philip; Libbrecht, Louis; Wieland, Stefan; Vos, Rita de; Habib, Nagy; Kramvis, Anna; Roskams, Tania; Leroux-Roels, Geert (2006): Immune suppression uncovers endogenous cytopathic effects of the hepatitis B virus. In: *Journal of virology* 80 (6), S. 2797–2807. DOI: 10.1128/JVI.80.6.2797-2807.2006.

Modrow, S.; Falke, D.; Truyen, U. SchätzlH. (2010): Molekulare Virologie.

Montet, J. C.; Parquet, M.; Sacquet, E.; Montet, A. M.; Infante, R.; Amic, J. (1987): beta-Muricholic acid; potentiometric and cholesterol-dissolving properties. In: *Biochimica et biophysica acta* 918 (1), S. 1–10.

Nagase, Hideaki; Visse, Robert; Murphy, Gillian (2006): Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. In: *Cardiovascular research* 69 (3), S. 562–573. DOI: 10.1016/j.cardiores.2005.12.002.

Noureddin, Mazen; Rinella, Mary E. (2015): Nonalcoholic Fatty liver disease, diabetes, obesity, and hepatocellular carcinoma. In: *Clinics in liver disease* 19 (2), S. 361–379. DOI: 10.1016/j.cld.2015.01.012.

Ocama, P.; Opio, C. K.; Lee, W. M. (2005): Hepatitis B virus infection: current status. In: *Am.J.Med.* 118 (12), S. 1413.

Okazaki, Isao; Noro, Takuji; Tsutsui, Nobuhiro; Yamanouchi, Eigoro; Kuroda, Hajime; Nakano, Masayuki; Yokomori, Hiroaki; Inagaki, Yutaka (2014): Fibrogenesis and Carcinogenesis in Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH). Involvement of Matrix Metalloproteinases (MMPs) and Tissue Inhibitors of Metalloproteinase (TIMPs). In: *Cancers* 6 (3), S. 1220–1255. DOI: 10.3390/cancers6031220.

Onkologie Leitlinienprogramm (2013): S3-Leitlinie hepatozelluläres Karzinom.

Oseini, Abdul M.; Sanyal, Arun J. (2017): Therapies in non-alcoholic steatohepatitis (NASH). In: *Liver Int* 37 Suppl 1, S. 97–103. DOI: 10.1111/liv.13302.

Oyadomari, S.; Mori, M. (2004): Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. In: *Cell death and differentiation* 11 (4), S. 381–389. DOI: 10.1038/sj.cdd.4401373.

Patel, Pavan; Schutzer, Steven E.; Pyrsopoulos, Nikolaos (2016): Immunobiology of hepatocarcinogenesis. Ways to go or almost there? In: *World journal of gastrointestinal pathophysiology* 7 (3), S. 242–255. DOI: 10.4291/wjgp.v7.i3.242.

Paumgartner, Gustav (2006): Medical treatment of cholestatic liver diseases. From pathobiology to pharmacological targets. In: *World journal of gastroenterology* 12 (28), S. 4445–4451.

Pausch, J.; Rösch, W. (2009): Duale Reihe Innere Medizin.

Perez, Maria-J; Briz, Oscar (2009): Bile-acid-induced cell injury and protection. In: *World journal of gastroenterology* 15 (14), S. 1677–1689.

Perz, Joseph F.; Armstrong, Gregory L.; Farrington, Leigh A.; Hutin, Yvan J. F.; Bell, Beth P. (2006): The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. In: *J.Hepatol.* 45 (4), S. 529–538. DOI: 10.1016/j.jhep.2006.05.013.

Pol, Stanislas (2013): Management of HBV in immunocompromised patients. In: *Liver Int* 33 Suppl 1, S. 182–187. DOI: 10.1111/liv.12055.

Pollheimer, Marion J.; Halilbasic, Emina; Fickert, Peter; Trauner, Michael (2011): Pathogenesis of primary sclerosing cholangitis. In: *Best practice & research. Clinical gastroenterology* 25 (6), S. 727–739. DOI: 10.1016/j.bpg.2011.10.009.

Popov, Y.; Patsenker, E.; Fickert, P.; Trauner, M.; Schuppan, D. (2005): Mdr2 (Abcb4)-/- mice spontaneously develop severe biliary fibrosis via massive dysregulation of pro- and antifibrogenic genes. In: *J.Hepatol.* 43 (6), S. 1045–1054.

Prange, Reinhild (2012): Host factors involved in hepatitis B virus maturation, assembly, and egress. In: *Medical microbiology and immunology* 201 (4), S. 449–461. DOI: 10.1007/s00430-012-0267-9.

Raza, Ali; Sood, Gagan K. (2014): Hepatocellular carcinoma review. Current treatment, and evidence-based medicine. In: *World journal of gastroenterology* 20 (15), S. 4115–4127. DOI: 10.3748/wjg.v20.i15.4115.

Reichl, Patrick; Mikulits, Wolfgang (2016): Accuracy of novel diagnostic biomarkers for hepatocellular carcinoma. An update for clinicians (Review). In: *Oncology reports* 36 (2), S. 613–625. DOI: 10.3892/or.2016.4842.

Reifenberg, Kurt; Hildt, Eberhard; Lecher, Bernd; Wiese, Elena; Nusser, Petra; Ott, Sibylle; Yamamura, Ken-Ichi; Rutter, Gabriel; Lohler, Jurgen (2006): IFNgamma expression inhibits LHBs storage disease and ground glass hepatocyte appearance, but exacerbates inflammation and apoptosis in HBV surface protein-accumulating transgenic livers. In: *Liver Int* 26 (8), S. 986–993. DOI: 10.1111/j.1478-3231.2006.01317.x.

Rigopoulou, Eirini I.; Zachou, Kalliopi; Gatselis, Nikolaos K.; Papadamou, Georgia; Koukoulis, George K.; Dalekos, George N. (2013): Primary biliary cirrhosis in HBV and HCV patients. Clinical characteristics and outcome. In: *World journal of hepatology* 5 (10), S. 577–583. DOI: 10.4254/wjh.v5.i10.577.

RKI. Ratgeber für Ärzte Hepatitis B und D (2016). Online verfügbar unter http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_HepatitisB.html#doc2390050bodyText24, zuletzt geprüft am 19.05.2017.

Roderfeld, M.; Hemmann, S.; Roeb, E. (2007): Mechanisms of fibrinolysis in chronic liver injury (with special emphasis on MMPs and TIMPs). In: *Z.Gastroenterol.* 45 (1), S. 25–33.

Roderfeld, M.; Rath, T.; Lammert, F.; Dierkes, C.; Graf, J.; Roeb, E. (2010a): Innovative immunohistochemistry identifies MMP-9 expressing macrophages at the invasive front of murine HCC. In: *World J.Hepatol.* 2 (5), S. 175–179.

Roderfeld, M.; Rath, T.; Voswinckel, R.; Dierkes, C.; Dietrich, H.; Zahner, D.; Graf, J.; Roeb, E. (2010b): Bone marrow transplantation demonstrates medullar origin of CD34+ fibrocytes and ameliorates hepatic fibrosis in Abcb4-/- mice. In: *Hepatology* 51 (1), S. 267–276.

Rodriguez, David; Morrison, Charlotte J.; Overall, Christopher M. (2010): Matrix metalloproteinases. What do they not do? New substrates and biological roles

identified by murine models and proteomics. In: *Biochimica et biophysica acta* 1803 (1), S. 39–54. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2009.09.015.

Roeb, E.; Steffen, H. M.; Bantel, H.; Baumann, U.; Canbay, A.; Demir, M.; Drebber, U.; Geier, A.; Hampe, J.; Hellerbrand, C.; Pathil-Warth, A.; Schattenberg, J. M.; Schramm, C.; Seitz, H. K.; Stefan, N.; Tacke, F.; Tannapfel, A.; Lynen Jansen, P.; Bojunga, J. (2015): S2k-Leitlinie nicht alkoholische Fettlebererkrankungen. In: *Zeitschrift fur Gastroenterologie* 53 (7), S. 668–723. DOI: 10.1055/s-0035-1553193.

Ron, David; Walter, Peter (2007): Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 8 (7), S. 519–529. DOI: 10.1038/nrm2199.

Rosmorduc, O.; Poupon, R. (2007): Low phospholipid associated cholelithiasis: association with mutation in the MDR3/ABCB4 gene. In: *Orphanet.J.Rare.Dis.* 2, S. 29.

Ruemmele, P.; Hofstaedter, F.; Gelbmann, C. M. (2009): Secondary sclerosing cholangitis. In: *Nat.Rev.Gastroenterol.Hepatol.* 6 (5), S. 287–295.

Sawitza, Iris; Kordes, Claus; Gotze, Silke; Herebian, Diran; Haussinger, Dieter (2015): Bile acids induce hepatic differentiation of mesenchymal stem cells. In: *Scientific reports* 5, S. 13320. DOI: 10.1038/srep13320.

Schmitz, N.; Laverty, S.; Kraus, V. B.; Aigner, T. (2010): Basic methods in histopathology of joint tissues. In: *Osteoarthritis.Cartilage.* 18 Suppl 3, S113-S116.

Schoemaker, Marieke H.; La Conde de Rosa, Laura; Buist-Homan, Manon; Vrenken, Titia E.; Havinga, Rick; Poelstra, Klaas; Haisma, Hidde J.; Jansen, Peter L. M.; Moshage, Han (2004): Tauroursodeoxycholic acid protects rat hepatocytes from bile acid-induced apoptosis via activation of survival pathways. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 39 (6), S. 1563–1573. DOI: 10.1002/hep.20246.

Schramm, C.; Strassburg, C. P. (2017): S2k Leitlinie Autoimmune Lebererkrankungen. In: *Zeitschrift fur Gastroenterologie* 55 (11), S. 1135–1226. DOI: 10.1055/s-0043-120199.

Schuch, Anita; Hoh, Alexander; Thimme, Robert (2014): The role of natural killer cells and CD8(+) T cells in hepatitis B virus infection. In: *Frontiers in immunology* 5, S. 258. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00258.

Schuppan, D.; Ruehl, M.; Somasundaram, R.; Hahn, E. G. (2001): Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis. In: *Semin.Liver Dis.* 21 (3), S. 351–372. DOI: 10.1055/s-2001-17556.

Seeger, Christoph; Mason, William S. (2015): Molecular biology of hepatitis B virus infection. In: *Virology* 479-480, S. 672–686. DOI: 10.1016/j.virol.2015.02.031.

Serviddio, Gaetano; Pereda, Javier; Pallardo, Federico V.; Carretero, Julian; Borras, Consuelo; Cutrin, Juan; Vendemiale, Gianluigi; Poli, Giuseppe; Vina, Jose; Sastre, Juan (2004): Ursodeoxycholic acid protects against secondary biliary cirrhosis in rats by preventing mitochondrial oxidative stress. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 39 (3), S. 711–720. DOI: 10.1002/hep.20101.

Shi, Ying-Hui; Shi, Chang-He (2009): Molecular characteristics and stages of chronic hepatitis B virus infection. In: *World journal of gastroenterology* 15 (25), S. 3099–3105.

Shi, Z.; Wakil, A. E.; Rockey, D. C. (1997): Strain-specific differences in mouse hepatic wound healing are mediated by divergent T helper cytokine responses. In: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94 (20), S. 10663–10668.

Shouval, Daniel; Shibolet, Oren (2013): Immunosuppression and HBV reactivation. In: *Semin.Liver Dis.* 33 (2), S. 167–177. DOI: 10.1055/s-0033-1345722.

Shuda, Masahiro; Kondoh, Nobuo; Imazeki, Nobuo; Tanaka, Kenji; Okada, Tetsuya; Mori, Kazutoshi; Hada, Akiyuki; Arai, Masaaki; Wakatsuki, Toru; Matsubara, Osamu; Yamamoto, Naoki; Yamamoto, Mikio (2003): Activation of the ATF6, XBP1 and grp78 genes in human hepatocellular carcinoma. A possible involvement of the ER stress pathway in hepatocarcinogenesis. In: *Journal of hepatology* 38 (5), S. 605–614.

Singal, A.; Volk, M. L.; Waljee, A.; Salgia, R.; Higgins, P.; Rogers, M. A. M.; Marrero, J. A. (2009): Meta-analysis. Surveillance with ultrasound for early-stage hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. In: *Alimentary pharmacology & therapeutics* 30 (1), S. 37–47. DOI: 10.1111/j.1365-2036.2009.04014.x.

Smith, A. J.; van, Helvoort A.; van, Meer G.; Szabo, K.; Welker, E.; Szakacs, G.; Varadi, A.; Sarkadi, B.; Borst, P. (2000): MDR3 P-glycoprotein, a phosphatidylcholine translocase, transports several cytotoxic drugs and directly interacts with drugs as judged by interference with nucleotide trapping. In: *J.Biol.Chem.* 275 (31), S. 23530–23539.

Sohrabpour, A. A.; Mohamadnejad, M.; Malekzadeh, R. (2012): Review article. The reversibility of cirrhosis. In: *Alimentary pharmacology & therapeutics* 36 (9), S. 824–832. DOI: 10.1111/apt.12044.

Sokol, Ronald J.; Devereaux, Michael; Dahl, Rolf; Gumpricht, Eric (2006): "Let there be bile"--understanding hepatic injury in cholestasis. In: *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 43 Suppl 1, S4-9. DOI: 10.1097/01.mpg.0000226384.71859.16.

Song, Peizhen; Zhang, Youcai; Klaassen, Curtis D. (2011): Dose-response of five bile acids on serum and liver bile Acid concentrations and hepatotoxicty in mice. In: *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 123 (2), S. 359–367. DOI: 10.1093/toxsci/kfr177.

Srivastava, Anshu (2014): Progressive familial intrahepatic cholestasis. In: *Journal of clinical and experimental hepatology* 4 (1), S. 25–36. DOI: 10.1016/j.jceh.2013.10.005.

Statistisches Bundesamt (2015a): Sterbefälle Sterbeziffern. Online verfügbar unter http://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/dboowasys921.xwdevkit/xwd_init?gbe.isgbetol/xs_start_neu/&p_aid=3&p_aid=68424047&nummer=6&p_sprache=D&p_indsp=-&p_aid=48159275, zuletzt aktualisiert am 14.05.2017, zuletzt geprüft am 14.05.2017.

Statistisches Bundesamt (2015b): Sterbefälle Sterbeziffern. Online verfügbar unter http://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/dboowasys921.xwdevkit/xwd_init?gbe.isgbetol/xs_start_neu/&p_aid=i&p_aid=91335304&nummer=6&p_sprache=D&p_indsp=-&p_aid=87460270, zuletzt aktualisiert am 14.05.2017, zuletzt geprüft am 14.05.2017.

Stegemann, H.; Stalder, K. (1967): Determination of hydroxyproline. In: *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 18 (2), S. 267–273.

Stieger, Bruno (2011): The role of the sodium-taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) and of the bile salt export pump (BSEP) in physiology and pathophysiology of bile formation. In: *Handbook of experimental pharmacology* (201), S. 205–259. DOI: 10.1007/978-3-642-14541-4_5.

Tabas, Ira; Ron, David (2011): Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. In: *Nature cell biology* 13 (3), S. 184–190. DOI: 10.1038/ncb0311-184.

Takaki, Akinobu; Kawai, Daisuke; Yamamoto, Kazuhide (2013): Multiple hits, including oxidative stress, as pathogenesis and treatment target in non-alcoholic steatohepatitis

(NASH). In: *International journal of molecular sciences* 14 (10), S. 20704–20728. DOI: 10.3390/ijms141020704.

Tanaka, M.; Ishikawa, T.; Sakaguchi, M. (1993): The pathogenesis of biliary atresia in Japan: immunohistochemical study of HBV-associated antigen. In: *Acta Pathol.Jpn.* 43 (7-8), S. 360–366.

Tang, J.; Guo, Y-S; Zhang, Y.; Yu, X-L; Li, L.; Huang, W.; Li, Y.; Chen, B.; Jiang, J-L; Chen, Z-N (2012): CD147 induces UPR to inhibit apoptosis and chemosensitivity by increasing the transcription of Bip in hepatocellular carcinoma. In: *Cell death and differentiation* 19 (11), S. 1779–1790. DOI: 10.1038/cdd.2012.60.

Trauner, M.; Fickert, P.; Halilbasic, E.; Moustafa, T. (2008): Lessons from the toxic bile concept for the pathogenesis and treatment of cholestatic liver diseases. In: *Wien.Med.Wochenschr.* 158 (19-20), S. 542–548.

Trauner, M.; Fickert, P.; Wagner, M. (2007): MDR3 (ABCB4) defects: a paradigm for the genetics of adult cholestatic syndromes. In: *Semin.Liver Dis.* 27 (1), S. 77–98.

Trauner, Michael; Fickert, Peter; Baghdasaryan, Anna; Claudel, Thierry; Halilbasic, Emina; Moustafa, Tarek; Wagner, Martin; Zollner, Gernot (2010): New insights into autoimmune cholangitis through animal models. In: *Dig.Dis.* 28 (1), S. 99–104. DOI: 10.1159/000282072.

Trierweiler, C.; Hockenjos, B.; Zatloukal, K.; Thimme, R.; Blum, H. E.; Wagner, E. F.; Hasselblatt, P. (2016): The transcription factor c-JUN/AP-1 promotes HBV-related liver tumorigenesis in mice. In: *Cell death and differentiation* 23 (4), S. 576–582. DOI: 10.1038/cdd.2015.121.

Tscheke, R. (2001): Toxische Leberschäden durch Arzneimittel. In: *Deutsches Ärzteblatt* 40, S. 2584–2589.

Tseng, Tai-Chung; Liu, Chun-Jen; Yang, Hung-Chih; Su, Tung-Hung; Wang, Chia-Chi; Chen, Chi-Ling; Hsu, Cheng-An; Kuo, Stephanie Fang-Tzu; Liu, Chen-Hua; Chen, Pei-Jer; Chen, Ding-Shinn; Kao, Jia-Horng (2013): Serum hepatitis B surface antigen levels help predict disease progression in patients with low hepatitis B virus loads. In: *Hepatology* 57 (2), S. 441–450. DOI: 10.1002/hep.26041.

Tsukamoto, H.; Machida, K.; Dynnyk, A.; Mkrtchyan, H. (2009): "Second hit" models of alcoholic liver disease. In: *Semin.Liver Dis.* 29 (2), S. 178–187.

Tzanakakis, E. S.; Hess, D. J.; Sielaff, T. D.; Hu, W. S. (2000): Extracorporeal tissue engineered liver-assist devices. In: *Annual review of biomedical engineering* 2, S. 607–632. DOI: 10.1146/annurev.bioeng.2.1.607.

Waller, Lisa P.; Deshpande, Vrushak; Pyrsopoulos, Nikolaos (2015): Hepatocellular carcinoma: A comprehensive review. In: *World journal of hepatology* 7 (26), S. 2648–2663. DOI: 10.4254/wjh.v7.i26.2648.

Wang, David Q-H; Tazuma, Susumu (2002): Effect of beta-muricholic acid on the prevention and dissolution of cholesterol gallstones in C57L/J mice. In: *Journal of lipid research* 43 (11), S. 1960–1968.

Wang, Hua; Lafdil, Fouad; Kong, Xiaoni; Gao, Bin (2011): Signal transducer and activator of transcription 3 in liver diseases. A novel therapeutic target. In: *International journal of biological sciences* 7 (5), S. 536–550.

Wang, Hui-Ching; Chang, Wen-Tsan; Chang, Wen-Wei; Wu, Han-Chieh; Huang, Wenya; Lei, Huan-Yao; Lai, Ming-Derg; Fausto, Nelson; Su, Ih-Jen (2005): Hepatitis B virus pre-S2 mutant upregulates cyclin A expression and induces nodular proliferation of hepatocytes. In: *Hepatology* 41 (4), S. 761–770. DOI: 10.1002/hep.20615.

Wasmuth, H. E.; Glantz, A.; Keppeler, H.; Simon, E.; Bartz, C.; Rath, W.; Mattsson, L-A; Marschall, H-U; Lammert, F. (2007): Intrahepatic cholestasis of pregnancy: the severe form is associated with common variants of the hepatobiliary phospholipid transporter ABCB4 gene. In: *Gut* 56 (2), S. 265–270. DOI: 10.1136/gut.2006.092742.

Weber, M.; Bronsema, V.; Bartos, H.; Bosserhoff, A.; Bartenschlager, R.; Schaller, H. (1994): Hepadnavirus P protein utilizes a tyrosine residue in the TP domain to prime reverse transcription. In: *J.Virol.* 68 (5), S. 2994–2999.

Weinmann, A.; Wörns, M. (2009): Hepatitis & More. Sorafenib bei fortgeschrittenem HCC. Online verfügbar unter http://www.hepatitisandmore.de/archiv/2009-1/Hep1_09_FoBiSorafenib.shtml, zuletzt geprüft am 23.05.2017.

Welsch, Ulrich; Deller, Thomas; Kummer, Wolfgang (2014): Lehrbuch Histologie. 4. Aufl. München: Elsevier Urban & Fischer. Online verfügbar unter http://institut.elsevierelibrary.de/pdfreader/sobotta-lehrbuch-histologie-4.

Wendum, D.; Barbu, V.; Rosmorduc, O.; Arrive, L.; Flejou, J. F.; Poupon, R. (2012): Aspects of liver pathology in adult patients with MDR3/ABCB4 gene mutations. In: *Virchows Arch* 460 (3), S. 291–298.

WHO (2015): Guidelines for the Prevention Care and Treatment of Persons with Chronic Hepatitis B Virus Infection. Mar-15. Geneva: World Health Organization (DOCUMENTS FOR SALE). Online verfügbar unter http://gbv.eblib.com/patron/FullRecord.aspx?p=2033880.

Winer, Benjamin Y.; Ding, Qiang; Gaska, Jenna M.; Ploss, Alexander (2016): In vivo models of hepatitis B and C virus infection. In: *FEBS letters* 590 (13), S. 1987–1999. DOI: 10.1002/1873-3468.12157.

Wirth, S.; Guidotti, L. G.; Ando, K.; Schlicht, H. J.; Chisari, F. V. (1995): Breaking tolerance leads to autoantibody production but not autoimmune liver disease in hepatitis B virus envelope transgenic mice. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 154 (5), S. 2504–2515.

Woessner, J. F. (1961): The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. In: *Archives of biochemistry and biophysics* 93, S. 440–447.

Xie, Guoxiang; Wang, Xiaoning; Liu, Ping; Wei, Runmin; Chen, Wenlian; Rajani, Cynthia; Hernandez, Brenda Y.; Alegado, Rosanna; Dong, Bing; Li, Defa; Jia, Wei (2016): Distinctly altered gut microbiota in the progression of liver disease. In: *Oncotarget* 7 (15), S. 19355–19366. DOI: 10.18632/oncotarget.8466.

Xu, Ruonan; Zhang, Zheng; Wang, Fu-Sheng (2012): Liver fibrosis. Mechanisms of immune-mediated liver injury. In: *Cellular & molecular immunology* 9 (4), S. 296–301. DOI: 10.1038/cmi.2011.53.

Xu, Z.; Jensen, G.; Yen, T. S. (1997): Activation of hepatitis B virus S promoter by the viral large surface protein via induction of stress in the endoplasmic reticulum. In: *Journal of virology* 71 (10), S. 7387–7392.

Yaghobi, R.; Didari, M.; Gramizadeh, B.; Rahsaz, M.; Heidari, T.; Banihashemi, M.; Kargar, M. (2011): Study of viral infections in infants with biliary atresia. In: *Indian J.Pediatr.* 78 (4), S. 478–481.

Yan, Huan; Zhong, Guocai; Xu, Guangwei; He, Wenhui; Jing, Zhiyi; Gao, Zhenchao; Huang, Yi; Qi, Yonghe; Peng, Bo; Wang, Haimin; Fu, Liran; Song, Mei; Chen, Pan; Gao, Wenqing; Ren, Bijie; Sun, Yinyan; Cai, Tao; Feng, Xiaofeng; Sui, Jianhua; Li, Wenhui (2012): Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. In: *eLife* 1, e00049. DOI: 10.7554/eLife.00049.

Yang, Kyunghee; Kock, Kathleen; Sedykh, Alexander; Tropsha, Alexander; Brouwer, Kim L. R. (2013): An updated review on drug-induced cholestasis. Mechanisms and investigation of physicochemical properties and pharmacokinetic parameters. In: *Journal of pharmaceutical sciences* 102 (9), S. 3037–3057. DOI: 10.1002/jps.23584.

Yerushalmi, B.; Dahl, R.; Devereaux, M. W.; Gumpricht, E.; Sokol, R. J. (2001): Bile acid-induced rat hepatocyte apoptosis is inhibited by antioxidants and blockers of the mitochondrial permeability transition. In: *Hepatology* 33 (3), S. 616–626. DOI: 10.1053/jhep.2001.22702.

Yin, Chunyue (2017): Molecular mechanisms of Sox transcription factors during the development of liver, bile duct, and pancreas. In: *Seminars in cell & developmental biology* 63, S. 68–78. DOI: 10.1016/j.semcdb.2016.08.015.

Yin, Chunyue; Evason, Kimberley J.; Asahina, Kinji; Stainier, Didier Y. R. (2013): Hepatic stellate cells in liver development, regeneration, and cancer. In: *The Journal of clinical investigation* 123 (5), S. 1902–1910. DOI: 10.1172/JCI66369.

You, Chan Ran; Lee, Sung Won; Jang, Jeong Won; Yoon, Seung Kew (2014): Update on hepatitis B virus infection. In: *World journal of gastroenterology* 20 (37), S. 13293–13305. DOI: 10.3748/wjg.v20.i37.13293.

Zhou, Hua-Bang; Hu, Jing-Yi; Hu, He-Ping (2014a): Hepatitis B virus infection and intrahepatic cholangiocarcinoma. In: *World journal of gastroenterology* 20 (19), S. 5721–5729. DOI: 10.3748/wjg.v20.i19.5721.

Zhou, W. C.; Zhang, Q. B.; Qiao, L. (2014b): Pathogenesis of liver cirrhosis. In: *World J.Gastroenterol.* 20 (23), S. 7312–7324.

Ziol, M.; Barbu, V.; Rosmorduc, O.; Frassati-Biaggi, A.; Barget, N.; Hermelin, B.; Scheffer, G. L.; Bennouna, S.; Trinchet, J. C.; Beaugrand, M.; Ganne-Carrie, N. (2008): ABCB4 heterozygous gene mutations associated with fibrosing cholestatic liver disease in adults. In: *Gastroenterology* 135 (1), S. 131–141.

Zollner, G.; Trauner, M. (2008): Mechanisms of cholestasis. In: *Clin.Liver Dis.* 12 (1), 1-26, vii.

13. Publikationsverzeichnis

Teile aus der vorliegenden Arbeit wurden unter folgenden Titeln veröffentlicht

Originalarbeit:

“Hepatitis B virus surface proteins accelerate cholestatic injury and tumor progression in Abcb4-knockout mice.”

Zahner D*, **Glimm H***, Matono T*, Churin Y, Herebian D, Mayatepek E, Köhler K, Gattenlöhner S, Stinn A, Tschuschner A, Roderfeld M, Roeb E.

Oncotarget. 2/2017. DOI: 10.18632/oncotarget.15003. * geteilte Erstautorenschaft

Abstract/ Poster:

“Etablierung und Charakterisierung eines murinen second hit Modells für die virale medikamentös-toxische Leberschädigung.“

Reinhard H, Roderfeld M, Pasupuleti S, Tschuschner A, Kopsch K, Krämer S, Churin Y, Roeb E

Z Gastroenterol 2013; 51 - P_1_41, DOI: 10.1055/s-0032-1331941, Georg Thieme Verlag KG Stuttgart New York

“Signaling pathways involved in carcinogenesis in a double hit mouse model of cholangiopathy and hepatitis B virus”

Matono T, Churin Y, **Reinhard H**, Roderfeld M, Schröder D, Zahner D, Glebe D, Roeb E; Z Gastroenterol 2014; 52 - P_5_43, DOI: 10.1055/s-0033-1361052, Georg Thieme Verlag KG Stuttgart New York

„Gesteigerte Karzinogenese im Abcb4$^{-/-}$/HBV$^{+/--}$Hybrid-Maus Modell“

Schröder F, Churin Y, **Reinhard H**, Roderfeld M, Schröder D, Zahner D, Roeb E;

Z Gastroenterol 2014; 52 - KG095; DOI: 10.1055/s-0034-1386117, Georg Thieme Verlag KG Stuttgart New York

“Eine Transgen induzierte unfolded protein response (UPR) steigert Leberschädigung und Karzinogenese im Cholestase-Maus Modell”

Roderfeld M, Zahner D, **Glimm H**, Churin Y, Tschuschner A, Herebian D, Mayatepek E, Roeb E; Z Gastroenterol 2016; 54(12): 1343-1404, DOI: 10.1055/s-0036-1597344, Georg Thieme Verlag KG Stuttgart New York

14. Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

_____ _____

Ort, Datum Unterschrift