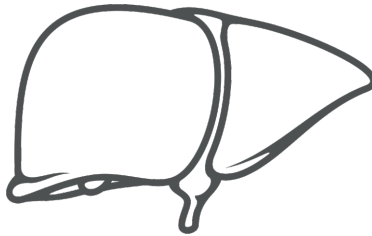


**Köppel, Alica Anna Maria**

---

Das synthetische Chaperon *Phenyl-Butyric-Acid* (PBA) verändert das Verteilungsmuster der HBV-Hüllproteine im Endoplasmatischen Retikulum von Hepatitis B-transgenen Mäusen und führt zu verstärkter Pathogenese



Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

**Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2019

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1<sup>st</sup> Edition 2019

© 2019 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, 35396 GIESSEN, GERMANY  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

**Das synthetische Chaperon *Phenyl-Butyric-Acid* (PBA)  
verändert das Verteilungsmuster der HBV-Hüllproteine im  
Endoplasmatischen Retikulum von Hepatitis B-transgenen  
Mäusen und führt zu verstärkter Pathogenese**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

(Dr.med.)

des Fachbereichs Humanmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

**Köppel, Alica Anna Maria**

aus Rastatt

Gießen 2018

Aus dem Zentrum für Innere Medizin  
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Medizinische Klinik II  
Schwerpunkt Gastroenterologie  
Leiterin: Univ.-Prof. Dr. med. Elke Roeb

Betreuer: Univ.-Prof. Dr. med. Elke Roeb  
PD Dr. Martin Roderfeld  
Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Elke Roeb  
Gutachter: Prof. Dr. Michael Niepmann  
Prüfungsvorsitz: Prof. Dr. med. Henning Schneider  
Prüfungsmitglied: Prof. Dr. rer. nat. Eugen Domann  
Tag der Disputation: 16.04.2019



meinen großartigen Eltern gewidmet

*„Your hardest times often lead to the greatest moments of your life.“*

von Roy T. Bennett



# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung und Zielsetzung</b> .....	1
1.1 Das Hepatitis B Virus .....	1
1.1.1 Epidemiologie .....	1
1.1.2 Virusstruktur .....	2
1.1.3 Replikationszyklus .....	6
1.1.4 Pathogenese .....	8
1.1.4.1 Immunvermittelte Schädigung .....	8
1.1.4.2 Intrinsische Schädigung .....	9
1.1.4.3 Leberfibrose .....	11
1.1.5 Diagnose .....	16
1.1.6 Infektionsverlauf .....	17
1.1.7 Impfprävention.....	18
1.1.8 Therapie .....	19
1.2 ER-Stress und <i>Unfolded Protein Response</i> .....	21
1.3 <i>Phenyl-Butyric-Acid</i> .....	24
1.4 Das HBV-transgene Mausmodell .....	26
1.5 Zielsetzung der Arbeit .....	29
<b>2 Material</b> .....	30
2.1 Geräte.....	30
2.2 Verbrauchsmaterialien.....	31
2.3 Chemikalien.....	32
2.4 Komplettsysteme .....	34
2.5 Größenstandard.....	34
2.6 Primer .....	35
2.7 Antikörper.....	35
2.8 Software.....	36



2.9 Versuchstiere .....	37
2.9.1 Verwendete Mauslinie .....	37
2.9.2 PBA-Gabe .....	38
2.9.3 Probenentnahme und Lagerung .....	38
2.9.4 Versuchsaufbau .....	39
<b>3 Methoden</b> .....	<b>41</b>
3.1 Molekularbiochemische Methoden .....	41
3.1.1 RNA-Isolierung .....	41
3.1.2 RNA-Gel-Elektrophorese .....	43
3.1.3 Synthese von cDNA .....	44
3.1.4 Quantitative <i>Real-Time</i> -Polymerase-Kettenreaktion .....	45
3.1.5 <i>Microarray</i> .....	48
3.2 Proteinbiochemische Methoden .....	49
3.2.1 Lysatherstellung .....	49
3.2.3 Western-Blot-Analyse .....	51
3.2.3.1 Proteinauftrennung durch SDS-PAGE .....	51
3.2.3.2 Proteintransfer auf PVDF-Membran .....	53
3.2.3.3 Proteindetektion .....	54
3.2.3.4 Stripping der Membran .....	56
3.2.4 Proteinfraktionierung .....	57
3.2.5 Zytokin- <i>Array</i> .....	60
3.3 Histologische Methoden .....	62
3.3.1 Einbettung in Paraffin .....	62
3.3.2 Immunhistochemie .....	62
3.3.3 Hämatoxylin- und Eosin-Färbung .....	65
3.4 Analyse der Serum-Transaminasen .....	65
3.5 Statistische Auswertung .....	65

<b>4 Ergebnisse</b> .....	67
4.1 H&E-Färbung .....	67
4.2 Analyse der Serum-Transaminasen zur Einschätzung der Leberintegrität .....	70
4.3 HBsAg-Expression im Lebergewebe .....	72
4.3.1 Immunhistochemische Färbung von HBsAg .....	72
4.3.2 qRT-PCR der HBsAg-Expression .....	73
4.3.3 Western-Blot-Analyse der HBsAg-Expression .....	75
4.3.4 Western-Blot-Analyse der HBsAg-Expression nach Zellkompartimentfraktionierung .....	76
4.4 Analyse der Genexpression per <i>Microarray</i> .....	78
4.4.1 <i>Heatmap</i> -Illustration der 100 am stärksten regulierten Gene .....	79
4.5 Akute-Phase-Reaktion .....	81
4.5.1 qRT-PCR Analyse der Akute-Phase-Proteine .....	81
4.5.2 qRT-PCR Analyse: Zytokine im Lebergewebe .....	84
4.5.3 Zytokin- <i>Array</i> : Zytokine im Serum .....	85
4.6 ER-Stress und <i>Unfolded Protein Response</i> .....	88
4.7 Apoptose .....	90
<b>5 Diskussion</b> .....	93
5.1 Pathophysiologische Rolle der Aggregation der HBV-Oberflächenproteine im ER .....	95
5.2 PBA-induzierte Immunantwort .....	96
5.3 Relevanz der PBA-Behandlungsdauer .....	101
5.4 Limitationen im Versuchsaufbau .....	102
5.5 Ausblick .....	104
<b>6 Zusammenfassung</b> .....	106
<b>7 Summary</b> .....	108
<b>8 Abbildungsverzeichnis</b> .....	110
<b>9 Tabellenverzeichnis</b> .....	112

<b>10 Abkürzungsverzeichnis</b> .....	113
<b>11 Literaturverzeichnis</b> .....	118
<b>12 Publikationsverzeichnis</b> .....	141
<b>13 Ehrenwörtliche Erklärung</b> .....	143
<b>14 Danksagung</b> .....	144



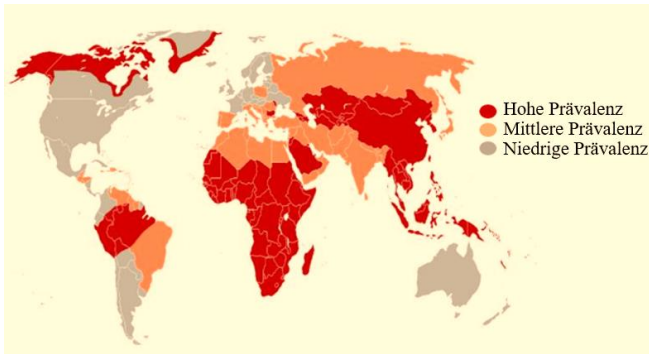
# **1. Einleitung und Zielsetzung**

## **1.1 Das Hepatitis B Virus**

### **1.1.1 Epidemiologie**

Die weltweit häufigste Ursache einer Virushepatitis ist die Infektion mit dem Hepatitis B Virus (HBV) (Dienstag 2008; Ginzberg *et al.* 2018). Zwei Milliarden Menschen waren bereits weltweit an einer HBV-Infektion erkrankt und 250 bis 270 Millionen Menschen der Weltbevölkerung sind mit dem HBV chronisch infiziert (Emery und Feld 2017; Ginzberg *et al.* 2018). Jährlich versterben 1,45 Millionen Menschen an den Folgen einer chronischen HBV-Infektion. Somit sterben jährlich mehr Menschen an einer HBV-Infektion als an einer HIV-, Malaria-, oder Tuberkulose-Infektion (Ginzberg *et al.* 2018). Hintergrund dafür ist die chronisch entzündliche Leberschädigung, die über Leberfibrose zur Leberzirrhose und schließlich zur Entstehung einer portalen Hypertension oder des hepatozellulären Karzinoms (engl. *hepatocellular carcinoma*, HCC) führen kann (Yang *et al.* 2010; Ott *et al.* 2012). Je nach geographischer Lage, ethnischer Zugehörigkeit und Risikokonstellation ergeben sich verschiedene Prävalenzen. Laut Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (engl. *world health organization*, WHO) sind ca. 13 Millionen Menschen innerhalb Europas chronische HBV-Träger. In Nordeuropa sind 0,1 % der Bevölkerung chronisch mit dem HBV infiziert, wohingegen 7 % der Bevölkerung in der Türkei chronische Träger sind (RKI-Ratgeber für Ärzte (August 2018)). Bluttransfusionen zählten in der Vergangenheit zu einer der häufigsten Ursachen für Neuinfektionen in Deutschland. Seit Einführung der HBsAg-Testung Anfang der 70er Jahre, sowie der zusätzlichen Testung der Spender auf Anti-HBc seit dem Jahr 2006, sank das Infektionsrisiko signifikant (RKI-Ratgeber für Ärzte (August 2018)). Heutzutage wird in den meisten Blutspende-Einrichtungen auch die HBV-DNA überprüft, um frisch infizierte Spender zu erkennen. Das Risiko, sich bei einer Bluttransfusion zu infizieren, liegt bei <0,0004 % pro transfundierter Einheit (Rasenack 2014). Neuinfektionen werden vor allem durch sexuelle Übertragung beobachtet. In Ländern mit hoher Promiskuität ist dies der häufigste Übertragungsweg. Weiterhin haben Homosexuelle, intravenös Drogenabhängige und Dialysepatienten ein erhöhtes Infektionsrisiko. In endemischen Gebieten, wie zum Beispiel (z.B.) Afrika und Asien, erfolgt die Infektion meist vertikal von der Mutter auf das Kind oder durch mangelnde Hygiene im medizinischen Bereich. Die Inkubationszeit beträgt durchschnittlich zwischen 60 und 120 Tagen (RKI-Ratgeber

für Ärzte (August 2018)). Entscheidend ist die Viruskonzentration. Schon Mengen von  $<1 \mu\text{l}$  Blut eines hochvirämischen Patienten (Viruslast bis zu  $10^{13}/\text{ml}$ ) können für eine Infektion ausreichend sein (Rasenack 2014).



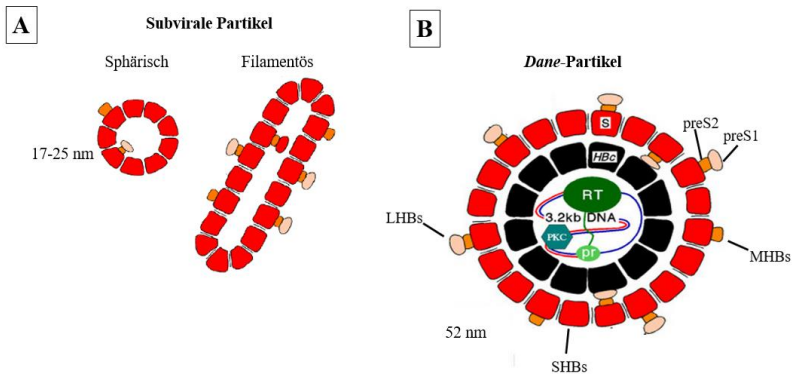
**Abbildung 1: Geografische Verteilung der chronischen HBV-Infektion.**

Die Häufigkeit der HBV-Erkrankung wird bestimmt durch die Prävalenz der Virusträger in einer Bevölkerungsgruppe. Man unterscheidet drei Zonen:  $\geq 8\%$  entspricht hoher Prävalenz,  $2-7\%$  entspricht mittlerer Prävalenz,  $< 2\%$  entspricht niedriger Prävalenz. Endemische Gebiete sind v.a. Südostasien und große Teile Afrikas. Modifiziert nach (Gerlich 2013).

### 1.1.2 Virusstruktur

HBV ist das einzige DNA-Virus aus der Gruppe der Hepatitis Viren. Die anderen Hepatitis Viren umfassen RNA-Viren. Es gehört somit der Familie der Hepatitis-DNA- (*Hepadna*-) Viren, *Genus Orthohepadna*-Viren, an. Mit einem Durchmesser von ca. 52 nm zählt es zu einem der kleinsten umhüllten Viren (Glebe und Bremer 2013). Ein Teil des HBV konnte 1966 erstmals als sogenanntes *Australien*-Antigen nachgewiesen werden (Blumberg *et al.* 1966). Später wurde es als Hepatitis *Surface* Antigen (HBsAg) beschrieben und ab 1970 nach seinem Entdecker als *Dane*-Partikel bezeichnet (*Dane et al.* 1970). Das HBV Genom liegt in einer zirkulären, partiell doppelsträngigen Form vor und hat eine Größe von 3,2 kB. Das Virus ist aus einer Virushülle (engl. *surface*) und einem ikosaedrischen Nukleokapsid zusammengesetzt. Die Hülle besteht aus einer Plasmamembran, die dem endoplasmatischen Retikulum (ER) der Wirtszelle entstammt. In dieser Membran ist das HBsAg eingelagert. Dieses besteht wiederum aus dem kleinen

(SHBs), mittleren (MHBs) und großen (LHBs) HBs-Protein mit den Domänen *S*, *preS1* und *preS2* (Gerlich 2013). Das Nukleokapsid wird vom *core* antigen (HBcAg) gebildet und enthält im Inneren die HBV-DNA, eine Polymerase sowie eine wirtskodierende Proteinkinase C (vgl. Abb. 2) (Seeger und Mason 2015). Eine vermehrte Synthese von Virushüllen im Vergleich zur Anzahl der Corepartikel wird bei infizierten Leberzellen beobachtet. Daher existiert neben den infektiösen *Dane*-Partikeln auch eine große Anzahl an nichtinfektiösen Partikeln. Sie sind aufgrund der hohen Immunogenität ohne Infektiosität Grundlage heutiger Impfstoffe, wobei heute ein gentechnisch hergestelltes HBsAg verwendet wird.



**Abbildung 2: Struktureller Aufbau des HBV. A) Subvirale Partikel; B) HBV (*Dane*-Partikel)**

Die äußere rote Virushülle stellt das HBsAg (S) mit seinen drei Subtypen LHBs, MHBs und SHBs dar. Das Nukleokapsid besteht aus dem in schwarz dargestellten *Core*-Protein (HBc), der zirkulär partiell doppelsträngigen DNA, einer Polymerase mit Primase (Pr) sowie einer wirtskodierenden Proteinkinase C (PKC). Die subviralen Partikel sind nicht infektiös und beinhalten kein Nukleokapsid. Sie werden heutzutage gentechnisch hergestellt und dienen als Bestandteil heutiger Impfstoffe. Modifiziert nach (Gerlich 2013).





RNAse H - verbunden. Der ORF für die virale Polymerase gilt daher auch als der längste ORF der vier viralen ORF (Glebe und Bremer 2013).

Die S-Domäne des HBsAg liegt am carboxyterminalen Ende und wird in allen drei Oberflächenproteinen LHBs, MHBs und SHBs transkribiert. Durch Anlagerung der *preS2*-Domäne am aminoterminalen Ende entsteht das MHBs-Protein. Die weitere aminoterminal Anlagerung der Proteindomäne *preS1* führt zur Entstehung des LHBs-Proteins (Glebe und Urban 2007).

Das ORF des *Precore/Core*-Proteins codiert für das strukturelle *Core-Protein*, sowie für die Synthese des nichtstrukturellen HBe-Proteins (exkretorisches Hepatitis-B Antigen) über das in der Literatur noch wenig bekannt ist (Chen *et al.* 2005). HBe wird eine Mitwirkung bei der Chronifizierung von HBV-Infektionen zugesprochen (Glebe und Bremer 2013). Gemäß des bisherigen Forschungsstandes wurde HBx bisher mit der Entstehung von HBV-induzierter Leberkarzinogenese assoziiert (Kew 2011; Xu *et al.* 2018). HBx fördert hierbei die Metastasierung und Angiogenese und hemmt die Apoptose im Leberzellkarzinom (Xu *et al.* 2018).

Das HBV weist eine hohe Mutationsrate auf, was die Entstehung von resistenten Virus-Varianten begünstigt. Während einer antiviralen Therapie beispielsweise unterliegt das Virus einem starken Selektionsdruck, sodass resistente Virus-Klone schnell selektiert werden können. Für die schnelle Anpassung des HBV können folgende Gründe verantwortlich gemacht werden:

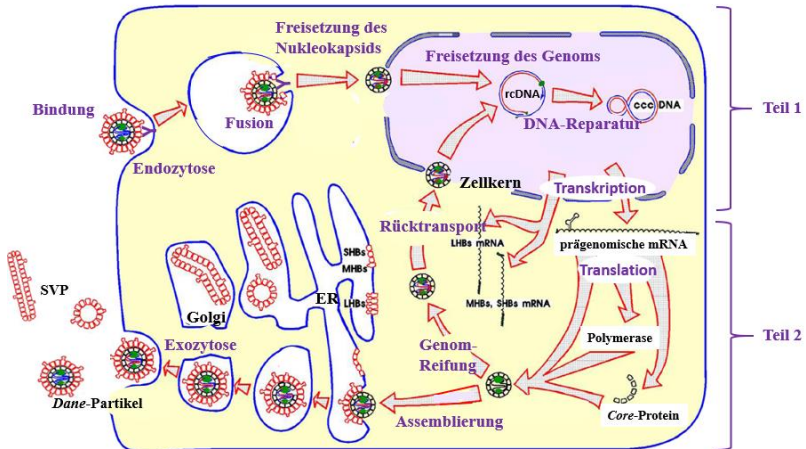
- Das Virus zeichnet sich durch eine hohe Replikationsrate aus, das mit einer täglichen Neusynthese von bis zu  $10^{13}$  Viren einhergeht (Whalley *et al.* 2001).
- Die Polymerasen des HBV haben keine Korrekturfunktion (engl. *proofreading-function*), sodass es bei durchschnittlich 100.000 Basen zu mindestens einem fehlerhaften Einbau kommt (Kim *et al.* 2016).
- Aufgrund des überlappenden genomischen Aufbaus des Virus haben Mutationen in nur einem Codon gravierende Folgen für das darüber bzw. darunterliegende Codon (Tipples 1996).

Diese Viruseigenschaften führten zur Entwicklung von mehreren verschiedenen HBV-Genotypen, was die Therapiemöglichkeiten deutlich erschwert und in der Behandlung zu berücksichtigen ist (Emery und Feld 2017; Lin und Kao 2017).

Es können derzeit mindestens zehn Genotypen (A-J) und bis zu 20 Subgruppen des HBV differenziert werden (Ginzberg *et al.* 2018). Der Genotyp A dominiert in Afrika, Europa, Indien und Amerika, während die Genotypen B und C im asiatisch-pazifischen-Raum gehäuft vorkommen. Der Genotyp D ist hingegen in Afrika, Indien, Europa und im Mittelmeer-Raum stark verbreitet. In Süd- und Mittelamerika, sowie in Alaska findet man den Genotyp F vor. Der Genotyp G wurde bisher in seltenen Fällen in Deutschland, Frankreich und den USA nachgewiesen. Für die Genotypen C, D und F besteht ein höheres Risiko eine Leberzirrhose oder ein HCC zu entwickeln, im Vergleich zu den Genotypen A und B. Seit den späten 1970er Jahren gibt es einen in den USA und Frankreich entwickelten Impfstoff der ersten Generation. Mitte der 1980er Jahre kam ein Impfstoff der zweiten Generation auf den Markt, der aus dem kleinen Oberflächenprotein (SHBs) des HBV-Genotyps A2 besteht und in rekombinanten Hefe-Zellen hergestellt wurde (Shouval *et al.* 2015). Dieser Impfstoff ersetzte weitestgehend Vorherige und gilt als universeller Impfstoff für Neugeborene und Erwachsene in über 170 Ländern weltweit (Lin und Kao 2017; Gerlich 2013; Shouval *et al.* 2015).

### **1.1.3 Replikationszyklus**

Das HBV vermehrt sich nach bisherigen Kenntnissen ausschließlich in der Leber und wird somit als hepatotropes Virus bezeichnet. Der virale Lebenszyklus kann in zwei Abschnitte unterteilt werden: Der erste Teil (vgl. Abb. 4) umfasst die Bindung an leberspezifische Rezeptoren und den endozytotischen Eintritt in die Leberzelle, den zytosolischen Transport des Nukleokapsids zum Zellkern, sowie der Umwandlung der partiell doppelsträngigen DNA (engl. *relaxed circular partially double-stranded DNA*; rcDNA) in die zirkulär geschlossene DNA (engl. *covalently closed circular DNA*; cccDNA). Der zweite Teil (vgl. Abb. 4) umfasst die Transkription der cccDNA in prägenomische und subgenomische mRNAs und die Translation der virusspezifischen Gene, die Umhüllung der prägenomischen RNA, die Assemblierung des *Core*-Proteins, sowie die Freisetzung von *Dane*-Partikeln und subviralen Partikeln (SVP). Gleichzeitig erfolgt der Rücktransport von Genmaterial, das als *Template* für weitere Replikationszyklen dient (Glebe und Bremer 2013; Valaydon und Locarnini 2017; Caballero *et al.* 2018). Die folgende Abbildung gibt eine Übersicht:



**Abbildung 4: Replikationszyklus des HBV.**

Nach Bindung an leberspezifische Rezeptoren dringt das Virus mittels Endozytose in den Hepatozyten ein. Das Nukleokapsid wird danach zum Zellkern transportiert und die rcDNA wird zur cccDNA vervollständigt. Die cccDNA wird in prägenomische und subgenomische mRNAs transkribiert, die ins Zytosol wandern. Die zwei subgenomischen RNAs werden im ER zu den drei HBV-Oberflächenproteinen (LHBs, MHBs, SHBs) translatiert und über den Golgi-Apparat ausgeschleust. Parallel dazu wird die prägenomische mRNA im Zytosol zum HBV Core-Protein und der viralen Polymerase translatiert, die über Reifungsprozesse und reverse Transkription letztendlich zum Core-Protein zusammengesetzt werden. Nach Umhüllung mit dem HBsAg wird das Virus aus dem Hepatozyten mittels Exozytose freigesetzt. Neben infektiösen Dane-Partikeln werden auch nicht-infektiöse subvirale Partikel (SVP) aus der Zelle geschleust. Modifiziert nach (Gerlich 2013; Glebe und Bremer 2013).

Das Virus dringt durch Endozytose zum einen über unspezifische Heparinsulfatproteoglykan (HSPG)-Rezeptoren sowie über hoch spezifische Natrium Taurocholat *Cotransporting* Polypeptid (NTCP)-Rezeptoren in den Hepatozyten ein. Dem unspezifischen HSPG-Rezeptor wird eine wichtige Rolle bei der initialen Bindung des Virus an die Zielzelle durch Antigenloop der S-Domäne zugesagt. Als wichtigster zellulärer Interaktionspartner von HBV wird nach derzeitigem Stand der

Gallensäuretransporter NTCP beschrieben. Die virale *preS1*-Domäne des LHBs tritt hierbei mit dem NTCP in Verbindung und ermöglicht so die Virusabsorption. Der NTCP-Rezeptor gilt als wichtiger Angriffspunkt antiviraler Therapie und ist Bestandteil intensiver Forschung. Die Arbeitsgruppe des Universitätsklinikums Heidelberg von Professor Stephan Urban hat kürzlich den Wirkstoff *Myrcludex B* entwickelt, der sowohl *in vitro* als auch *in vivo* den Eintritt von Hepatitis B in die Hepatozyten blockiert (Lempp und Urban 2014; Valaydon und Locarnini 2017; Blank *et al.* 2016).

### **1.1.4 Pathogenese**

Aus einer akuten HBV-Infektion kann sich eine chronische Hepatitis entwickeln, die über Leberfibrose und Leberzirrhose letztendlich im HCC enden kann. Im Rahmen einer chronischen Entzündungsreaktion kommt es zum apoptotischen Zelltod von Hepatozyten mit der Folge einer exzessiven Produktion von extrazellulärer Matrix und der Ausbildung von Regeneratknoten und fibröser Septen. Diese Umbauvorgänge resultieren in einer Organschädigung, der Leberzirrhose und sind im Spätstadium irreversibel (Ramachandran *et al.* 2015). Bisher wurden für die Leberschädigung allein immunvermittelte Prozesse verantwortlich gemacht (Chisari *et al.* 2010; Churin *et al.* 2014). Eine direkte zytotoxische Wirkung des Virus galt lange Zeit als umstritten (Riviere *et al.* 2014; Oh und Park 2015). Es wurden in den letzten Jahren jedoch einige intrinsische Mechanismen in der Literatur beschrieben, die eine direkte Schädigung durch HBV-Komponenten beweisen (Liu *et al.* 2013; Meuleman *et al.* 2006; Sugiyama *et al.* 2009).

#### **1.1.4.1 Immunvermittelte Schädigung**

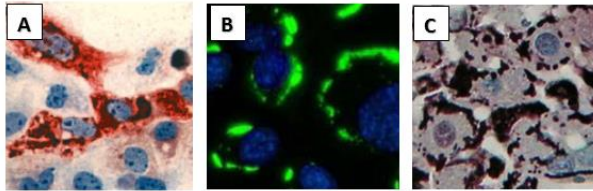
In der Virusbekämpfung sind sowohl das angeborene Immunsystem als auch das adaptive Immunsystem beteiligt (Emery und Feld 2017). Natürliche Killerzellen, CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Lymphozyten (CTL), CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen, B-Zellen und antigenpräsentierende Zellen zählen zu den Komponenten der Virusabwehr (Guidotti und Chisari 2006; Guidotti *et al.* 1996). Natürliche Killerzellen (NKZ) machen einen Großteil der in der Leber agierenden Immunzellen aus und zerstören infizierte Zellen durch Perforine und Proteasen (z.B. Granzyme). Diese werden aus ihren Granula in der Umgebung der infizierten Leberzelle freigesetzt und führen dort zu einer Perforation der Zellmembran und schließlich zum apoptotischen Zelltod. Studien belegen, dass bei

chronisch infizierten Patienten NKZ sowohl Hepatozyten als auch hepatische Sternzellen durch Degranulierung lysieren (Oliviero *et al.* 2009). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Zahl der intrahepatischen NKZ während einer chronischen HBV-Infektion erhöht ist (Bonorino *et al.* 2009; Oliviero *et al.* 2009). HBV-Oberflächenproteine sind hoch immunogen und werden von dendritischen Zellen und Makrophagen, den CD8<sup>+</sup> T-Zellen präsentiert (Bohm *et al.* 1995). HBsAg kann die HBV spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen direkt aktivieren. Somit spielen diese Zellen eine Schlüsselrolle in der immunvermittelten Virusabwehr (Thimme *et al.* 2003). Die HBV-spezifischen CTL erkennen infizierte Hepatozyten über MHC-Klasse I-Moleküle, stoppen die Virusreplikation in den infizierten Zellen und leiten diese in die Apoptose (Ando *et al.* 1994; Baumert *et al.* 2007). Die antivirale Kontrolle durch CTL kann direkt über Zytolyse oder aber über indirekte zytokinvermittelte Mechanismen erfolgen. Die Zytokine Interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- $\alpha$ ), Interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ), sowie Interleukin-6 (IL-6) wirken hierbei antiviral und proinflammatorisch (Guidotti und Chisari 2001). Außerdem sind T-Helferzellen (TH) bei der Virusabwehr involviert. Es wird ein Zusammenhang zwischen der Stärke der Aktivierung von TH und CTL und dem Erkrankungsverlauf (akut *versus* chronisch) diskutiert (Bertoletti und Ferrari 2013). Eine schwache Immunantwort führt zu einem chronischen Krankheitsverlauf, während eine starke Immunantwort in einer akuten Hepatitis B endet (Guidotti und Chisari 2001; Chisari *et al.* 2010). Auch eine verspätete Aktivierung von TH, die durch eine geringe Erregerdosis bedingt sein kann, kann zur HBV-Persistenz und damit zum chronischen Krankheitsverlauf beitragen (Asabe *et al.* 2009). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine verspätete bzw. fehlende Aktivierung von TH eine Inaktivierung, Toleranzentwicklung und Apoptose von CTL zur Folge hat (Bertolino *et al.* 2002; Crispe 2003).

#### **1.1.4.2 Intrinsische Schädigung**

Chronische HBV-Träger weisen nach Leber- (Benner *et al.* 1992), Nieren- (Chen *et al.* 1994) oder Knochenmarkstransplantationen (Davies *et al.* 1991) mit begleitender Immunsuppression eine erhöhte Viruslast im Blut sowie erhöhte Mengen an HBsAg im Lebergewebe auf (Meuleman *et al.* 2006; Shouval und Shibolet 2013; Churin *et al.* 2015). Darüber hinaus erlitten einige Patienten eine fibrosierende, cholestatische Hepatitis (Lau *et al.* 1992; Davies *et al.* 1991), die durch gesteigerte intrahepatische Expression viraler

Proteine, Entstehung von sogenannten Milchglashepatozyten (engl. *ground-glass-cells*, GGC; vgl. Abb. 11), Cholestase und periportale Fibrose gekennzeichnet ist (Pol 2013). Um die Leberschädigung trotz ausgeschaltetem bzw. stark herabgesetztem Immunsystem durch das Virus erklären zu können, wurden HBV-transgene Mausmodelle etabliert (Chisari *et al.* 1986; Chisari *et al.* 1987; Chisari *et al.* 1989). Fank Chisari begründete die intrinsische Schädigung des HBV in seinem Mausmodell mit der intrazellulären Akkumulation der HBV-Oberflächenproteine als unlösliche Aggregate in nicht näher bestimmten Kompartimenten (Chisari *et al.* 1986). Das LHBs Oberflächenprotein wurde in Hepatozyten transgener Mäuse exprimiert und aufgrund eines Sekretionsblocks im ER aggregatweise abgelagert (vgl. Abb. 5) (Wang *et al.* 2003). In HBV infizierten Hepatozyten können sich Proteinaggregate durch Überbelastung des Transkriptionsapparates bilden, was zu ER-Stress führt (Xu *et al.* 1997). Darüber hinaus werden aus überschüssigem Hüllmaterial sphärische und filamentöse SVP gebildet, die sich ebenfalls im ER ablagern. Infolgedessen entstehen GGC mit feingranuliertem und eosinrot gefärbtem Zytoplasma. Dieser Speicherprozess führt im Verlauf zum nekrotischen Untergang infizierter Leberzellen. Die Mäuse entwickeln eine hepatische Entzündung, die mit erhöhten Werten der Lebertransaminasen, histologisch gesicherter Fibrosierung und ansteigendem Risiko für Neoplasien einhergeht. Es kann ein Zusammenhang zwischen der intrazellulären HBsAg Menge und dem Schweregrad der Leberschädigung ermittelt werden (Chisari *et al.* 1987; Churin *et al.* 2014). Die infizierten Leberzellen leiden unter ER-Stress. Zur Kompensation aktivieren sie spezifische Signalkaskaden, die zur Erhöhung der Faltkapazität des ER, zum Translationsstopp und Abbau fehlgefalteter Proteine führen, der sogenannten *unfolded protein response* (UPR) (vgl. Kapitel 1.2). Weiterhin spielen epigenetische Mechanismen, wie z.B. die Methylierung von viraler DNA, eine Rolle in der Virusreplikation (Vivekanandan *et al.* 2008). Es konnte ein Zusammenhang zwischen der Methylierung von bestimmten CpG-Inseln (engl. *Cytosin-Phosphat-Guanin-Islands*) am Genom des HBV und der Entstehung eines HCC gezeigt werden (Kaur *et al.* 2010). Analysen aus dem Labor, Gastroenterologie der JLU Gießen von Frau Prof. Roeb, zeigten, dass die Methylierung an bestimmten Stellen des HBV Genoms für den spontanen, altersabhängigen Verlust der HBV-Oberflächenproteine in HBV-transgenen Mäusen ursächlich ist (Graumann *et al.* 2015).



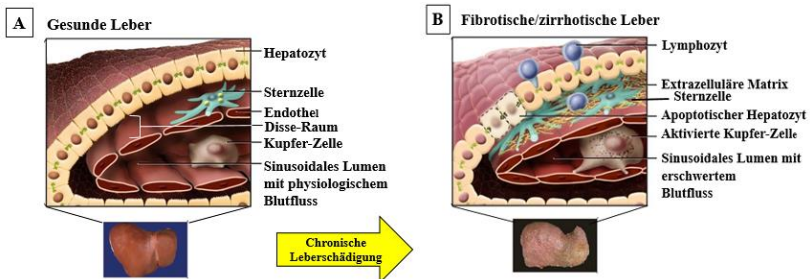
**Abbildung 5: Histologische Färbungen der Akkumulation des großen HBV-Oberflächenproteins (LHBs).**

Dargestellt ist die Akkumulation des LHBs in menschlichen Hepatozyten (A: aus Wang *et al.* 2003 (Wang *et al.* 2003)) und murinen Hepatozyten (B und C: aus dem HBV-transgenen Mausmodell der Tiere aus dem Labor Gastroenterologie der JLU Gießen, Frau Prof. Roeb).

#### **1.1.4.3 Leberfibrose**

Chronische Lebererkrankungen können im Endstadium zu einer Leberfibrose bzw. Leberzirrhose führen. Funktionelle Komplikationen wie die portale Hypertension, die Leberinsuffizienz und die Bildung von intrahepatischen porto-systemischen Shunts zwischen den Lebervenen und den Portalgefäßen können die Folge sein (Bataller und Brenner 2005). Zu den häufigsten Ursachen chronischer Lebererkrankungen zählen die virusbedingten Hepatitiden, die alkoholische wie auch nicht- alkoholische Steatohepatitis (ASH und NASH), Autoimmunhepatitiden, cholestatische und biliäre Pathologien. Die Hämochromatose, die Mukoviszidose und der *Morbus* Wilson gehören zu den seltenen Erkrankungen, die unbehandelt mehrheitlich zu Leberzirrhose führen (Ramachandran *et al.* 2015). Diese Erkrankungen führen im Verlauf über entzündliche Reaktionen zu einer überschießenden Wundheilung mit Vernarbungen des Lebergewebes. Eine Leberfibrose ist im Anfangsstadium noch reversibel. Eliminiert man die schädigenden Trigger jedoch nicht, schreitet die Fibrosierung fort und erreicht das irreversible Stadium der Leberzirrhose mit Zerstörung der Gewearchitektur und Ausbildung von bindegewebigen Septen und Regeneratknoten. Bei der Regulation der Leberfibrose kommt es zu einem umfassenden, dynamischen Zusammenspiel verschiedener Zellen und Botenstoffe. Die bei der Entstehung der Leberfibrose hauptsächlich involvierten Zellen sind Hepatozyten, Leberendothelzellen, Kupfer-Zellen (leberspezifische Makrophagen)

und Sternzellen (engl. *hepatic stellate cells*, HSC). Hepatozyten sind die Zielzellen der meisten hepatotoxischen Stoffe. Bei chronischer Leberschädigung ist die Regenerationsfähigkeit der Hepatozyten überlastet. Geschädigte Hepatozyten sezernieren reaktive Sauerstoffspezies (engl. *reactive oxygen species*, ROS), aktivieren die HSC und gehen in Apoptose. Eine Entzündungsreaktion mit Invasion von neutrophilen Granulozyten ist die Folge (Jaeschke 2002). Histologisch wird die reversible Ablagerung und Umverteilung von extrazellulärer Matrix (EZM) für die hepatische Fibrose verantwortlich gemacht. Die EZM bei Leberfibrose setzt sich aus fibrillenbildendem Kollagen Typ I, Proteoglykanen, Glykosaminoglykanen (v.a. Hyaluronsäure) und Fibronectin als Adhäsionsprotein zusammen (Guo und Friedman 2007). In einer zirrhotischen Leber kann ein zehnfach erhöhter Kollagengehalt im Vergleich zu einem gesunden Organ gemessen werden (Schuppan 2015). Eine zentrale Rolle bei der Produktion von EZM spielen die im Disse-Raum lokalisierten HSC. Wenn diese aktiviert sind, proliferieren sie, transdifferenzieren zu Myofibroblasten (MF) und produzieren EZM (Ramachandran *et al.* 2015). Der Disse-Raum beschreibt den Raum zwischen den Hepatozyten und den die Sinusoide auskleidenden Endothelzellen (vgl. Abb. 6). Durch die Ablagerung der EZM im Disse-Raum ist die Funktion der Endothelzellen gestört und eine Defenestrierung, sowie Kapillarisierung der Endothelzellen ist die Folge (Zhou *et al.* 2014). Dadurch ist der Austausch von Metaboliten und Nährstoffen zwischen den Hepatozyten und den Sinusoiden durch die verlängerte Diffusionsstrecke beeinträchtigt (Ramachandran *et al.* 2015; Appenrodt 2014).



**Abbildung 6: Vergleich zwischen einer gesunden und einer fibrotischen/zirrhotischen Leber.**

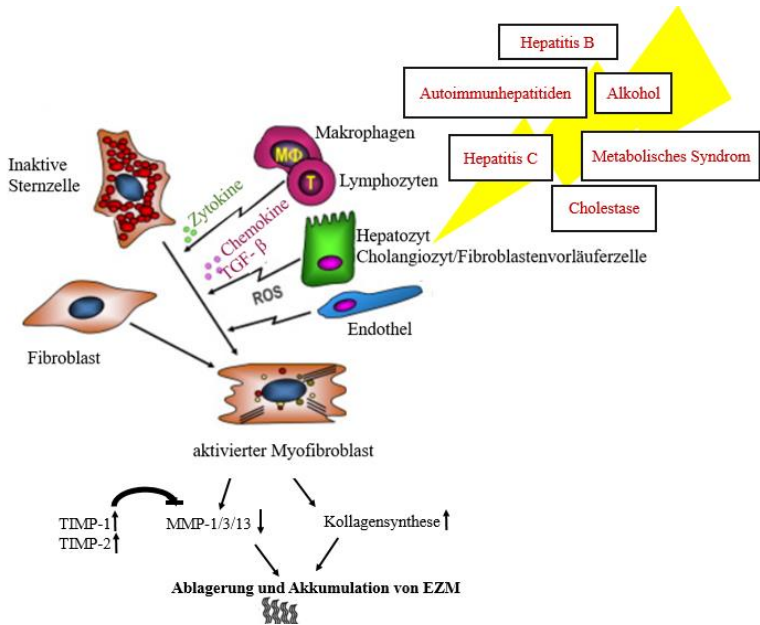
**A) Gesunde Leber:** Makroskopisch ist eine gesunde Leber braun und besitzt eine glatte Oberfläche. Das Leberparenchym besteht aus den zu Leberzellbalken angeordneten



Hepatozyten mit Galle- und Blutpol. Darunter liegt der für den Stoffaustausch wichtige Disse-Raum mit den darin lokalisierten hepatischen Sternzellen. Diese gelten als Hauptproduzenten der EZM bei Leberfibrose. Die Kupfer-Zellen sind leberspezifische Makrophagen und befinden sich im sinusoidalen Lumen, in dem arteriovenöses Mischblut fließt. Das diskontinuierliche fenestrierte Endothel besitzt keine Basalmembran, mit der Folge einer uneingeschränkten Diffusion aller Blutbestandteile (Lüllmann-Rauch 2009). **B) Fibrotische/zirrhotische Leber:** Nach chronischer Leberschädigung ist die Oberflächenbeschaffenheit der Leber narbig verändert. Durch Invasion von Lymphozyten kommt es zu einer Entzündungsreaktion. Die Hepatozyten gehen in Apoptose und Regeneratknoten mit veränderter Gefäßarchitektur bilden sich aus. Bindegewebige Septen, aufgrund vermehrter Synthese und Ablagerung von EZM, entstehen. Das Endothel verliert seine ursprüngliche Fenestrierung und eine Basalmembran bildet sich aus. Zur Folge findet keine effiziente Blutreinigung mehr statt. Der Blutfluss ist durch die fibrotische Veränderung eingeschränkt und es kann zur portalen Hypertension kommen. Modifiziert nach (Bataller und Brenner 2005).

Bei der Leberfibrose liegt ein Ungleichgewicht zwischen Auf- und Abbau der EZM zugunsten der Neubildung von EZM vor. Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) sind Enzyme, die beim Um- und Abbau von EZM bei Tumorinvasion, Angiogenese, Embryogenese, Wundheilung sowie Fibrogenese beteiligt sind. Durch hydrolytische Spaltung von Peptidbindungen in Proteinen tragen sie zum Abbau von EZM bei. Deren Gegenspieler sind die TIMPs (engl. *tissue inhibitors of metalloproteinases*). Durch Hemmung der MMPs wirken sie profibrogen (Robert *et al.* 2016). Bei fortgeschrittener hepatischer Schädigung wird die Sekretion und Aktivität der MMPs (v.a. MMP-1/3/13) herunterreguliert und die Bildung von TIMPs (v.a. TIMP-1/2) gesteigert. Bei Verletzung des Leberparenchyms werden MF und HSC durch profibrogene Zytokine und Wachstumsfaktoren aktiviert, die von diversen Zellen ausgeschüttet werden. Zu diesen Zellen zählen die Cholangiozyten, die Kupfer-Zellen, die Endothelzellen, sowie weitere Zellen des mononukleären Phagozytosesystems. Den aktivierten Cholangiozyten, welche ähnliche Eigenschaften wie Fibroblastenvorläuferzellen aufweisen, wird eine besondere profibrogene Rolle zugesprochen. Sie sekretieren die Wachstumsfaktoren TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 2 (engl. *transforming growth factor beta 1* und *2*) (Milani *et al.* 1991) sowie den stark mitogenen Faktor PDGF-BB (engl. *platelet-derived growth factor BB*) (Pinzani *et al.* 1996). Die Folge ist die Aktivierung und Proliferation der HSC bzw. MF (Schuppan

2015). TGF- $\beta$  hemmt darüber hinaus den Abbau von EZM durch eine Hochregulation von TIMP-1 (Flisiak *et al.* 2002). In Hinblick auf einen therapeutischen Nutzen versucht man in präklinischen Studien die Cholangiozyten mittels spezifischer Antikörper zu blockieren und somit die Produktion von EZM durch HSC bzw. MF zu hemmen (Wang *et al.* 2007). Kupfer-Zellen besitzen sowohl pro- als auch antifibrogene Eigenschaften. Auf der einen Seite rekrutieren sie bei hepatischer Schädigung Monozyten des Blutes, die sich in der Leber zu CD11b<sup>+</sup> Makrophagen entwickeln und proinflammatorische Zytokine wie z.B. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-13 ausschütten. Auf der anderen Seite regulieren sie die MMPs-Expression hoch (Schuppan 2015). Auch Zytokine mit vasoaktiven Eigenschaften tragen zur Regulation der Leberfibrose bei. Gefäßdilatorische Substanzen, wie z.B. Stickstoffmonoxid (NO) und Relaxin weisen antifibrotische Effekte auf, wohingegen gefäßkonstriktorische Substanzen, wie z.B. Angiotensin II, Endothelin-1 und Noradrenalin den gegenteiligen Effekt zeigten (Bataller und Brenner 2005). Interessanterweise spielen auch Hormone des Fettstoffwechsels in der Regulation der Leberfibrose eine Rolle. Das von Adipozyten gebildete Leptin aktiviert die HSC und trägt somit zu verstärkter Fibrogenese bei (Marra 2002). Das in den Glukose- und Insulinstoffwechsel eingreifende Hormon Adiponektin zeigte bei *in vitro* und *in vivo* Experimenten antifibrogene Effekte (Ikejima *et al.* 2002). Dieses Zusammenspiel könnte den negativen Einfluss von Fettleibigkeit auf das Fortschreiten der Leberfibrose bei Hepatitis C infizierten Patienten erklären (Ortiz *et al.* 2002). Einen antifibrotischen Effekt zeigte das anti-entzündliche Zytokin Interleukin-10 (IL-10). In einem Experiment an Ratten wurde gezeigt, dass nach Applikation von IL-10, die Expression von MMP-2 und TGF- $\beta$  abnahm (Zhang *et al.* 2007). Die Therapiemöglichkeiten der Leberfibrose sind, abgesehen von der Behandlung der hepatischen Grunderkrankung, derzeit begrenzt. Es fehlen sensitive, nicht invasive Fibrose-Biomarker und die teils vielversprechenden Tierexperimente befinden sich noch weitestgehend in präklinischen Studien (Schuppan 2015). Die Inaktivierung der HSC durch Hemmung der TGF- $\beta$ 1- und PDGF-B-Signalwege könnte ein therapeutischer Ansatz für die Zukunft sein (Zhou *et al.* 2014). Das Zusammenspiel der an der Entstehung der Leberfibrose beteiligten Mechanismen ist in der folgenden Abbildung dargestellt:



**Abbildung 7: Zellulärer Entstehungsmechanismus der Leberfibrose.**

Bei hepatischer Schädigung werden die im Disse-Raum lokalisierten HSC durch Zytokin- und Chemokinausschüttung stimuliert und aktiviert. Daraufhin transdifferenzieren sie in MF. Die HSC bzw. MF gelten als Hauptproduzenten von EZM in der hepatischen Fibrogenese. Aktivierte Cholangiozyten ähneln Fibroblastenvorläuferzellen und stimulieren die HSC durch Sekretion von profibrogenen Wachstumsfaktoren wie z.B. TGF- $\beta$  und PDGF. Bei der Leberfibrose liegt ein Ungleichgewicht zwischen Auf- und Abbau der EZM zugunsten des vermehrten Bindegewebsaufbaus vor. Bei fortgeschrittener hepatischer Schädigung ist die Aktivität der MMP-1/3/13 runterreguliert, wohingegen die Aktivität von TIMP-1/2 gesteigert ist. EZM: Extrazelluläre Matrix; TGF- $\beta$ : *transforming growth factor beta*; PDGF: *platelet-derived growth factor*; ROS: *reactive oxygen species*; MMP: *Matrixmetalloproteinase*; TIMP: *tissue inhibitor of metalloproteinases*. Modifiziert nach (Schuppan 2015).

### 1.1.5 Diagnose

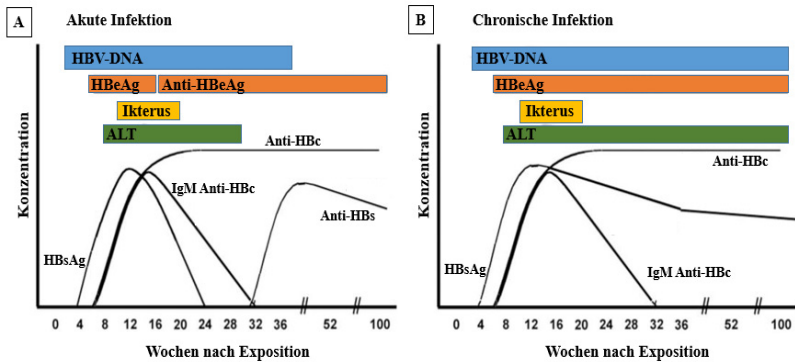
Neben Anamnese und Klinik spielt vor allem die Serologie in der Hepatitis B-Diagnostik eine entscheidende Rolle. Serologische Marker sind HBsAg, anti-HBs, HBeAg, anti-HBe, anti-HBc IgM und anti-HBc IgG. Darüberhinaus ist die Messung von HBV-DNA essentiell (Ponde 2015).

Antigennachweis: Das HBsAg wird nach ca. sechs Wochen *post infectionem* positiv und ist in der Mehrzahl der Fälle nach vier Monaten *post infectionem* im Serum nicht mehr nachweisbar. Bei akuter Hepatitis B Infektion ist das HBsAg in 90 % der Fälle positiv. In den ersten Behandlungsmonaten der Interferontherapie gilt der HBsAg-Titer als prognostischer Marker. Das HBeAg misst man bei der akuten Hepatitis B Infektion nur kurzzeitig im Serum. Beim chronischen Verlauf zeigt es eine fortbestehende Virusreplikation an (Glebe und Bremer 2013; Höner Christian zu Siederdisen *et al.* 2017).

Antikörpernachweis: Als Serokonversion bezeichnet man das Verschwinden von HBsAg und das Auftauchen von Anti-HBs Antikörpern. Es signalisiert eine Ausheilung der Hepatitis B. In wenigen Fällen ist HBsAg schon nicht mehr nachweisbar und Anti-HBs noch nicht vorhanden. In dieser Situation, die als „diagnostisches Fenster“ bezeichnet wird, ist die Diagnostik von Anti-HBc IgM der einzige Nachweis einer akuten Hepatitis B Infektion. Anti-HBc-Antikörper der IgM-Klasse zeigen eine akute Infektion an, während die Antikörper der IgG-Klasse auf einen schon länger bestehenden Infekt hinweisen. Bei einer akuten Hepatitis B Infektion ist die anti-HBc IgM-Messung immer positiv. Die Präsenz von Anti-HBs zeigt eine stattgefundene Impfung an, sowie eine ausgeheilte Infektion in Kombination mit Anti-HBc IgG (Eberle 2016; Höner Christian zu Siederdisen *et al.* 2017).

HBV-DNA: Die Messung der HBV-DNA zeigt die Viruslast, d.h. die Konzentration von Virusgenom im Patientenserum an. Die HBV-DNA gibt Aufschluss über die Replikationsaktivität des HBV und ist zwei bis vier Wochen vor dem HBsAg nachweisbar (Hyams 1995). Gemessen wird die HBV-DNA mittels qPCR. Es können hiermit schon geringste Mengen (Sensitivität 5-10 IU/ml) nachgewiesen werden. Die Bestimmung der Virus-DNA ist von Bedeutung bei der Therapiekontrolle einer antiviralen Therapie, bei der Diagnosestellung von HBsAg negativen Patienten, bei der

Klärung von Infektiosität HBsAg positiver- und HBeAg-negativer Patienten, sowie bei der Bestimmung des Ausmaßes der Leberschädigung (Villa *et al.* 2011; Eberle 2016).



**Abbildung 8: Zeitlicher Verlauf der viralen Marker nach HBV-Infektion.**

**A) Akute HBV-Infektion:** HBsAg und HBV-DNA können nach ungefähr vier bis sechs Wochen, HBeAg kurze Zeit später im Blutserum nachgewiesen werden. Gleichzeitig steigt die Konzentration der Transaminase ALT an. **B) Chronische HBV-Infektion:** Der Verlauf ist variabel. Charakteristisch ist das anhaltend positive HBsAg. HBeAg kann durch Serokonversion negativ werden oder aber weiterhin im Blut persistieren. Modifiziert nach (Liang 2009).

### 1.1.6 Infektionsverlauf

Der Verlauf einer HBV-Infektion ist abhängig von Alter, Infektionsdosis und Immunstatus des Patienten. Mehr als 65 % der Hepatitis B Infektionen heilen spontan und asymptomatisch aus. Bei ca. 30 % der Erwachsenen kommt es zu einer akuten Hepatitis mit grippeähnlichen Symptomen, wie Fieber, Müdigkeit, Kopf- und Gliederschmerzen. Begleitend können Kapselspannungsschmerz im rechten Oberbauch sowie Ikterus auftreten. Bei weniger als einem Prozent der Infizierten führt die akute Infektion zu einer fulminanten Hepatitis mit plötzlichem Beginn von Fieber, Erbrechen und abdominellen Schmerzen. In weiterem Verlauf kann eine HBV-Infektion zu Leberversagen bis hin zu hepatischem Koma führen. Bei ca. 5 bis 10 % der HBV-Infizierten Erwachsenen findet eine Viruspersistenz statt, die folglich zu einer chronischen Hepatitis führt. Bei Neugeborenen verlaufen jedoch 90 % der Fälle chronisch

(RKI-Ratgeber für Ärzte (August 2018)). Von einer chronischen Hepatitis spricht man, wenn die Ausheilung der Hepatitis länger als sechs Monate andauert; demnach eine HBsAg-Persistenz über sechs Monate vorliegt. Die chronische HBV-Infektion kann über Jahre symptomfrei verlaufen, wobei 20 % der Patienten mit chronischem Krankheitsverlauf nach zehn Jahren eine Leberfibrose entwickeln. HBeAg-positive Patienten erkranken laut Hochrechnungen zu 8-10 % an einer Leberzirrhose, wohingegen HBeAg-negative Patienten ein Risiko von 2-5 % aufweisen. Das Risiko für die Entstehung eines HCC liegt bei Vorhandensein einer Leberzirrhose bei 2-7 % pro Jahr (Kumar *et al.* 2016; RKI-Ratgeber für Ärzte (August 2018)). Beim natürlichen Verlauf eines HBsAg-Trägers können drei Phasen unterschieden werden: eine hoch replikative Frühphase, eine spätere niedrig-replikative Phase und die Ausheilungsphase. Die Frühphase ist durch eine komplette HB-Virenproduktion gekennzeichnet, was sich in Transaminasenanstieg und histologischen Entzündungszeichen äußert. Wichtige Marker in dieser Phase sind HBV-DNA und HBeAg. In dieser Phase sind die Patienten hoch kontagiös. In der späten niedrig replikativen Phase werden meist nur noch Oberflächenproteine (HBsAg) produziert. Die Transaminasen-Konzentrationen normalisieren sich und HBe ist im Serum nicht mehr nachweisbar. Es entsteht anti-HBe. Unter Interferon  $\alpha$ -Therapie zeigen 40 % der Patienten einen Übergang von der hoch- zur niedrig-replikativen Phase. In der Ausheilungsphase findet die Serkonversion, d.h. Verlust von HBsAg und Ausbildung von Anti-HBs, statt (Ganem und Prince 2004).

### **1.1.7 Impfprävention**

Zur Vorbeugung einer HBV-Infektion ist seit den späten 1970er Jahren ein in den USA und Frankreich entwickelter Impfstoff der ersten Generation erhältlich. Der sogenannte Plasma-*derived* Hepatitis-B Impfstoff. Mitte der 1980er Jahre kam ein Impfstoff der zweiten Generation auf den Markt. Dieser HBV-Impfstoff beinhaltet nur das SHBs-Protein (Genotyp A2) und wurde industriell mittels Hefezellen hergestellt (Shouval *et al.* 2015; McAleer *et al.* 1984). Er ersetzte weitgehend die vorherigen Impfstoffe und gilt als universeller Impfstoff für Neugeborene und Erwachsene in über 170 Ländern weltweit (Zuckerman *et al.* 2001; Zanetti *et al.* 2008; Ginzberg *et al.* 2018). Von einem zu 95 % erfolgreichen Impfschutz für 10 bis 15 Jahre geht man bei einem Anti-HBs Titer von  $\geq 10$  mIU/ml aus (Zuckerman *et al.* 2001; World Health Organization 09.08.17). Nach einer aus drei Impfungen bestehenden Grundimmunisierung wird dieser Titer im Normalfall

stark überschritten. Verschiedene Personengruppen, wie z.B. Ältere, Raucher, stark Übergewichtige, Immunsupprimierte, HIV-Infizierte, Patienten mit Niereneinschränkung, Diabetes mellitus oder chronisch entzündlichen Darmerkrankungen können nach erfolgter Vakzination keine effiziente Antikörperantwort ausbilden (Kubba *et al.* 2003; Laurence 2005; Fabrizi *et al.* 2004; Alavian und Tabatabaei 2010; Gisbert *et al.* 2011). Diese sogenannten *Non-* bzw. *Low-Responder* sind somit nicht ausreichend gegen eine HBV-Infektion geschützt. Hierfür wird eine Immun-*Escape*-Mutation innerhalb des kleinen Oberflächenproteins (SHBs) verantwortlich gemacht. Bei der Translation wird das SHBs-Protein über vier transmembran liegende Domänen in die Membran des ER integriert. Diese Domänen sind über Schleifen miteinander verbunden. Liegt nun eine Mutation in der zytosolisch gelegenen Antigen-Schleife vor, können die Impfantikörper nicht mehr effizient an das Epitop der Antigen-Schleife binden und die Viren neutralisieren. Die häufigste Mutation entsteht hierbei durch den Aminosäure-Austausch von Glycin und Arginin an Position 145 (Protzer und Schaller 2000; Cooreman *et al.* 2001). Bei Nichtansprechen auf die Hepatitis B-Impfung (Anti-HBs Titer nach Grundimmunisierung <10 mIU/ml), sollte vier bis acht Wochen nach der Grundimmunisierung erneut geimpft werden (Wismans *et al.* 1988; Krawczyk *et al.* 2014; Jilg *et al.* 1990).

### 1.1.8 Therapie

Um leitliniengerecht zu therapieren, muss man zwischen akuter und chronischer Infektion differenzieren. Bei der akuten Infektion mit HBV steht die symptomorientierte Therapie im Vordergrund. Patienten, die an der fulminant verlaufenden Form erkranken, sollten stationär aufgenommen werden. Eine antivirale Therapie wird nicht empfohlen (Jindal *et al.* 2013). Eine spontane Ausheilung findet in ca. 90 % der Fälle statt und führt anschließend zur Immunität. Beim chronischen Infektionsverlauf ist es hingegen wichtig, die Viruslast mittels antiviraler Medikamente unter die Virusnachweisgrenze zu senken. Das Risiko an einer Leberzirrhose oder an einem HCC zu erkranken, ist ohne Therapie stark erhöht (Tang *et al.* 2018; Cornberg *et al.* 2011; Budzinska *et al.* 2018). Ziel der Therapie ist es daher, eine dauerhafte Suppression der HBV-DNA unterhalb der Virusnachweisgrenze zu erreichen. Langfristig wird die Abnahme des ALT-Spiegels, die Stimulierung des Immunsystems und die HBeAg- sowie HBsAg-Serokonversion erzielt. Liegt bereits eine Leberzirrhose vor, wird bei jeder nachweisbaren Viruslast therapiert

(EASL 2012). Die derzeit auf dem Markt verfügbaren Medikamente sind pegyliertes Alpha-Interferon und Nucleosid- bzw. Nucleotidanaloga. Peginterferon wird einmal wöchentlich subkutan injiziert und ist bei Patienten mit hoher entzündlicher Aktivität, erhöhten Transaminasen-Werten, einer niedrigen Viruslast, positivem HBeAg und Patienten mit Genotyp A indiziert. Bei diesen Patienten findet bei ca. 40 % ein Stopp der Virusreplikation statt (Wong 1993; Perrillo 2009; Tipples 1996). Die Behandlungsdauer mit Interferon variiert zwischen 24 und 48 Wochen. Zu den zahlreichen Nebenwirkungen von Interferon zählen u.a. grippeähnliche Symptome, Thrombo- und Leukozytopenie, Haarausfall, Störungen der Konzentrationsfähigkeit und Depressionen (Perrillo *et al.* 1990). Nucleos(t)idischen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (engl. *Nucleos(t)ide Reverse Transcriptase Inhibitors*, NRTI) kommen bei Versagen der Interferontherapie, bei Patienten mit niedriger Entzündungsaktivität, bei Leberzirrhose oder einer Viruslast von  $>10^6$  IU/ml, sowie bei HIV-koinfizierten in Betracht (M. Cornberg, U. Protzer, J. Petersen, H. Wedemeyer 2011; Zoulim und Locarnini 2009). Nucleosid- und Nucleotidanaloga werden als Vorstufen verabreicht und erst im Körper durch Kinasen in der Leber zu den aktiven Formen umgewandelt. Dort stehen sie in Konkurrenz mit den natürlichen Nucleosidtriphosphaten und führen beim Einbau in die DNA zu Kettenabbruch und Replikationsstopp des Virus. Zu diesen Wirkstoffen zählen Lamivudin, Telbivudin, Entecavir, Adefovir und Tenofovir (Gish 2009). Gegen Lamivudin entwickeln viele Patienten bei Monotherapie Resistenzen, sodass es heute kaum noch zum Einsatz kommt. Entecavir wirkt stark antiviral und zeigt eine geringe Resistenzbildung (Yang *et al.* 2016). Adefovir ist stark nephrotoxisch und kann daher nur sehr gering dosiert werden. Dies führt auf Dauer zu einer Resistenzentwicklung bei geringem therapeutischem Effekt (Gish 2009). Tenofovir kann in sehr hohen Konzentrationen dosiert werden, was zu einem guten Therapieerfolg führt (Reynaud *et al.* 2009). Es wird derzeit kaum eine Resistenzentwicklung beobachtet, was dieses Medikament zusammen mit Entecavir zu dem am stärksten Erfolg versprechenden Therapieansatz macht (Mohanty *et al.* 2006). Bei HIV-Koinfizierten sollte Tenofovir jedoch vermieden werden, da die Gefahr einer HIV-Resistenzbildung besteht (Phung *et al.* 2014). Bei der Therapie mit Telbivudin wird eine Myopathie beobachtet, weswegen die Kreatinkinase regelmäßig kontrolliert werden sollte (McKeage und Keam 2010).



## 1.2 ER-Stress und *Unfolded Protein Response*

Das ER hat neben der Aufgabe der Proteinsynthese und Proteinfaltung, die Aufgabe des rechtzeitigen Erkennens von ER-Stress und der daraus folgenden Abwehrreaktion, die als UPR bezeichnet wird (Bergmann und Molinari 2018). ER-Stress kann beispielsweise durch Hypoxie, virale Infektionen (u.a die HBV-Infektion) (Li *et al.* 2007), Hypoglykämie, Störungen des Calciumhaushaltes und oxidativen Stress entstehen (Schroder und Kaufman 2005). Diese pathophysiologischen Ereignisse führen durch übermäßige Proteinsynthese zur Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen im ER (Zhang und Kaufman 2008; Almanza *et al.* 2018). Die UPR umfasst drei Hauptsignalwege, die durch drei transmembran liegende Rezeptoren aktiviert werden: IRE1 $\alpha$  (engl. *inositol-requiring protein-1 $\alpha$* ), ATF6 (engl. *activating transcription factor-6*) und PERK (engl. *protein kinase-like endoplasmatic reticulum kinase*) (Li *et al.* 2007).

Im Folgenden sind diese Signalwege schematisch dargestellt:

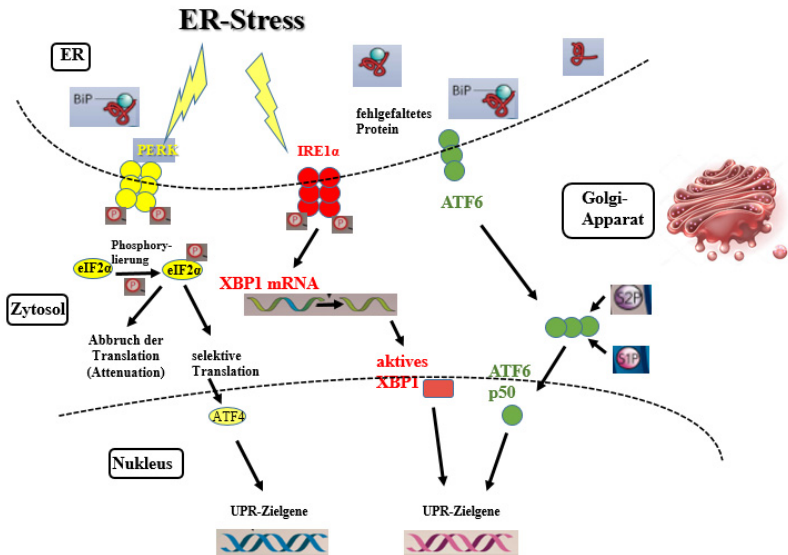


Abbildung 9: *Unfolded Protein Response*.

Dargestellt sind die drei Signalwege der UPR, die bei ER-Stress aktiviert werden. Die drei transmembran liegenden Rezeptoren PERK (engl. *protein kinase-like endoplasmatic reticulum kinase*), IRE1 $\alpha$  (engl. *inositol-requiring protein-1 $\alpha$* ) und ATF6 (engl.

*activating transcription factor-6*) sind die Initiatoren der drei Signalkaskaden. Das Signal wird vom ER-Lumen über das Zytosol zum Nukleus weitergeleitet. BiP: *Immunoglobulin-heavy chain-binding protein*, eIF2 $\alpha$ : *eucaryotic-initiation-factor-2 $\alpha$* , XBP1: *X-box-binding protein 1*, S1P und S2P: *site-1 protease* und *site-2 protease*; Modifiziert nach (Zhang und Kaufman 2008).

Jeder dieser Rezeptoren setzt sich aus einer ins ER-Lumen gelegenen Domäne, einer transmembranären, sowie einer zytosolisch gelegenen Domäne zusammen. Die zum ER-Lumen gerichtete Seite erkennt fehlgefaltete Proteine, leitet das entstandene Signal über die Membran zur zytosolischen Seite, wo es zum Transkriptions- oder Translationsapparat übermittelt wird. In Hepatozyten, die keinem ER-Stress ausgesetzt sind, bindet das ER Chaperon BiP (engl. *immunoglobulin-heavy-chain-binding protein*) an die luminal gelegene Domäne der ER-Stress Sensoren IRE1 $\alpha$ , PERK und ATF6 und hält diese dadurch in einem inaktiven Zustand (Zhang und Kaufman 2008). Unter ER-Stress löst sich diese Bindung und BiP bindet nun an fehlgefaltete Proteine im Lumen des ER. Dadurch werden die drei Signalkaskaden in Gang gesetzt. PERK dimerisiert und autophosphoryliert, kann anschließend die  $\alpha$ -Subunit des Translationsfaktors eIF2 $\alpha$  (engl. *eucaryotic-initiation-factor-2 $\alpha$* ) phosphorylieren und beeinflusst dadurch die mRNA Translation der Zelle. Desweiteren hat der Faktor IRE1 $\alpha$  eine Kinase- und Endoribonuklease-Aktivität (Rutishauser J, Spiess M). Nach einem Splicevorgang wandert die gesplittede XBP1 (engl. *X-box-binding protein 1*)- mRNA zum Nukleus und aktiviert dort weitere Zielgene. ATF6 wandert nach dem Ablösen von BiP zum Golgi-Apparat, wo es von den zwei Proteasen S1P und S2P (engl. *Site-1 Protease* und *Site-2 Protease*) gespalten wird (Li *et al.* 2007). Das Fragment ATF6p50 wandert dann zum Nukleus, wo es ebenfalls die Transkription von Zielgenen begünstigt. Die Aktivierung solcher Zielgene kann zusammengefasst zu folgenden Reaktionen (UPR) führen:

- Gene, die die Proteinfaltung erleichtern (sogenannte Chaperone), werden hochreguliert.
- Bei anhaltendem und nicht durch die Zelle zu kompensierendem ER-Stress wird die Apoptose eingeleitet.
- Es findet eine allgemeine Inhibierung der mRNA-Translation statt, um die Bildung neuer Proteine zu verringern.

Durch Modulation dieser Abwehrreaktionen können Viren ihre Virusreplikation und Proteinsynthese aufrecht erhalten (Kim *et al.* 2008). Chaperone, wie z.B. CHOP (engl. *C/EBP homologous protein*) oder GRP-78 (engl. *glucose-regulated-protein-78kD*) sind Proteine, die zur korrekten Faltung und Stabilisierung von neu synthetisierten Proteinen beitragen (Hetz 2012). Von diesen drei gerade aufgezeigten UPR Signalwegen wird besonders der erstbeschriebene PERK-Weg in der Leber von HBV-transgenen Mäusen aktiviert (Churin *et al.* 2014). Die beiden anderen Wege, beginnend mit IRE1 $\alpha$  und ATF6, spielen im HBV-transgenen Mausmodell eine untergeordnete Rolle (Churin *et al.* 2015). In Studien wurde gezeigt, dass anhaltender ER-Stress die IRE1 $\alpha$  und ATF6 Signalkaskaden abschwächt und den PERK-Weg aktiviert (Lin *et al.* 2007). Dies bestätigt die Bildung von PERK bei anhaltendem ER-Stress durch dauerhafte HBsAg-Expression in der Leber. ER-Speicherkrankheiten (engl. *ER-storage diseases*) werden damit assoziiert und resultieren aus den direkt zytotoxischen Effekten der im ER abgelagerten und fehlgefalteten Proteine (Rutishauser J, Spiess M). ER-Stress steht mit Inflammation und Akute-Phase-Reaktion (APR) durch die Bildung von ROS, die Aktivierung von NF $\kappa$ B (engl. *nuclear factor  $\kappa$ B*) und MAPK (engl. *mitogen-activated protein kinase*) in enger Beziehung (Zhang und Kaufman 2008). ER-Stress führt in der Leber vor allem durch die Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 sowie die Serumamyloide und CRP (C-reaktives Protein) zur APR (Zhang *et al.* 2006; Zhang und Kaufman 2008). Besonders bei neurodegenerativen Erkrankungen wie der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS), dem *Morbus* Parkinson (MP), der Alzheimer-Krankheit (AK) und Chorea Huntington (HD) sind direkte Schädigungsmechanismen durch Proteinablagerungen im ER erforscht (Lindholm *et al.* 2006). An Tiermodellen versucht man therapeutische Ansätze durch Eingreifen in die Signalkaskaden der UPR zu finden (Valenzuela *et al.* 2016). So konnte bei der ALS eine Reduktion apoptotischer Motoneurone durch Hemmung des IRE1 $\alpha$ -Signalwegs erzielt werden (Nishitoh *et al.* 2008). In einer experimentellen Untersuchung zur HD demonstrierte man an IRE1 $\alpha$ -Knockout-Mäusen einen Anstieg der neuronalen Autophagie. Dies wirkte sich auf die HD protektiv aus (Vidal *et al.* 2012). Für die histologische Pathogenese von MP können Ablagerungen von neuronalen Einschlusskörperchen, den sogenannten *Lewy*-Körperchen, bestehend aus  $\alpha$ -Synuklein, verantwortlich gemacht werden. In  $\alpha$ -Synuklein-transgenen Mäusen beobachtete man im frühen Erkrankungsverlauf erhöhte ER-Stress Level (Valenzuela *et al.* 2016). Histopathologisch kommt es bei der AK zu einer extrazellulären Ablagerung von Amyloid-Plaques, sowie zur Entstehung von intrazellulären Neurofibrillen (engl.

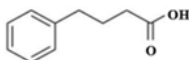
*neurofibrillary tangles*). Diese Neurofibrillen setzen sich aus hyperphosphorylierten Tau-Proteinen zusammen. Bei Untersuchungen an kortikalen Neuronen von Alzheimer-Patienten wurde eine positive Korrelation zwischen der Menge an hyperphosphorylierten Tau-Proteinen und ER-Stress Markern (v.a. p-PERK) ermittelt (Scheper und Hoozemans 2015). Weiterhin führte eine verstärkte Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$  zu verminderter Synthese von synaptischen Proteinen mit der Folge kognitiver Einschränkung (Jiang *et al.* 2010). Mit Hinblick auf die Leber konnte in einer Arbeit aus unserer Forschungsgruppe an HBV/LHBs-transgenen Mäusen gezeigt werden, dass die Menge der HBsAg-Expression mit dem Schweregrad von ER-Stress korreliert. In Mäusen mit einer verminderten Expression von HBsAg wurden auch geringere Mengen von CHOP, p-PERK und p-eIF2 $\alpha$  mittels Western-Blot detektiert. Während der Apoptosemarker CHOP immunhistochemisch in HBsAg-exprimierenden Hepatozyten nachgewiesen werden konnte, zeigten sich in HBsAg-freien Hepatozyten keine CHOP-Kernfärbungen (Graumann *et al.* 2015). Die chronische HBV-Infektion wirkt sich somit direkt, durch die Bildung von HBsAg und ER-Stress, negativ auf das Leberparenchym aus (Churin *et al.* 2014). Im Rahmen der UPR kommt es zur Aktivierung des S-Promotors, welcher die Transkription von SHBs und MHBs hervorruft. Zur Folge steigt die Menge an sekretierbaren Oberflächenproteinen (Xu *et al.* 1997). Es gilt in dieser Arbeit eine Übertragung der bisherigen Studienerkenntnisse auf das HBV zu untersuchen.

### **1.3 Phenyl-Butyric-Acid**

In den letzten Jahren wird zunehmend nach Substanzen/Therapeutika geforscht, die die Funktion des ER aufrechterhalten und ER-Stress mindern sollen. Chaperone stellen eine Gruppe von synthetisch hergestellten Molekülen dar, die die Proteinfaltung erleichtern und beschleunigen (Almanza *et al.* 2018). Modifikationen in der Proteinfaltung von beispielsweise  $\alpha$ 1-Antitrypsin, von CFTR (engl. *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) oder auch von Aquaporin-2 können Alpha-1-Antitrypsin-Mangel, Zystische Fibrose und Diabetes insipidus hervorrufen (Schroder und Kaufman 2005; Kubota *et al.* 2006). Diese Erkrankungen werden zu den ER-Speichererkrankungen gezählt. *4-Phenyl-Butyric-Acid* (4-PBA, deutsch Phenylbuttersäure) ist ein synthetisches Chaperon, das in verschiedenen Studien einen positiven Einfluss auf ER-Stress gezeigt hat (Rubenstein und Lyons 2001). PBA wird heutzutage zur Behandlung von Störungen des Harnstoffzyklus eingesetzt (Smith *et al.* 2013; Brusilow und Maestri 1996). Darüber

hinaus wird PBA derzeit als erfolgsversprechendes Medikament in der Behandlung von *Morbus Parkinson* verwendet (Zhou *et al.* 2011). PBA wirkt hier in der Auflösung zellschädigender Proteinaggregate mit und reduziert ER-Stress (Zhou *et al.* 2011; Zhang und Kaufman 2008). In Insulin-resistenten/Typ2-Diabetes Mausmodellen führte die Behandlung mit PBA zu verminderter Phosphorylierung von PERK und IRE1 $\alpha$  und damit zu einer Verbesserung der Glukosetoleranz und Insulinsensitivität (Ozcan *et al.* 2006). Die Bildung von fetalem Hämoglobin ist laut Dover *et al.* (Resar *et al.* 2002) bei PBA therapierten Säuglingen angestiegen. Das therapeutische Potential von PBA wird derzeit an verschiedenen Erkrankungen, wie z.B. der Lunge (Stewart *et al.* 2012), des Herzens (Ayala *et al.* 2012; Luo *et al.* 2015) und der Leber (Ben Mosbah *et al.* 2010; van den Berghe *et al.* 2009; Rahman *et al.* 2009; Morinaga *et al.* 2015; Ren *et al.* 2015) erforscht. PBA verminderte bei steatotisch veränderten Rattenlebern Entzündungsreaktionen und Apoptose und verbesserte somit die Leberregeneration (Ben Mosbah *et al.* 2010). Weiterhin untersuchten Rahman *et al.* (Rahman *et al.* 2009) in einem Hepatitis C assoziierten Steatose-Zellkulturexperiment die Wirkung von PBA auf die Regulation der Adiponektinrezeptoren. Adiponektinrezeptoren nehmen eine Schlüsselrolle bei Steatose (Synonym: Leberverfettung) und Inflammation der Leber ein und korrelieren positiv mit ER-Stress. PBA reduzierte in dieser Studie die Phosphorylierung des ER-Stressmarkers eIF2- $\alpha$ , was mit weniger ER-Stress gleichzusetzen ist. Keine dieser Studien hat bisher einen Zusammenhang zwischen Hepatitis B und PBA untersucht, wobei Daten über Leberzirrhose und PBA bereits existieren (McGuire *et al.* 2010). Hierzu wurde die pharmakologische Unbedenklichkeit von PBA und eines seiner Prodrugs (Glycerol-Phenylbutyrat) in einer klinischen Studie an gesunden Erwachsenen, sowie an Leberzirrhose erkrankten Testpersonen bewiesen (McGuire *et al.* 2010).

#### **4-Phenyl-Butyric-Acid (4-PBA)**



**Abbildung 10: Strukturformel von 4-PBA.**

Modifiziert nach (Zhang *et al.* 2013).

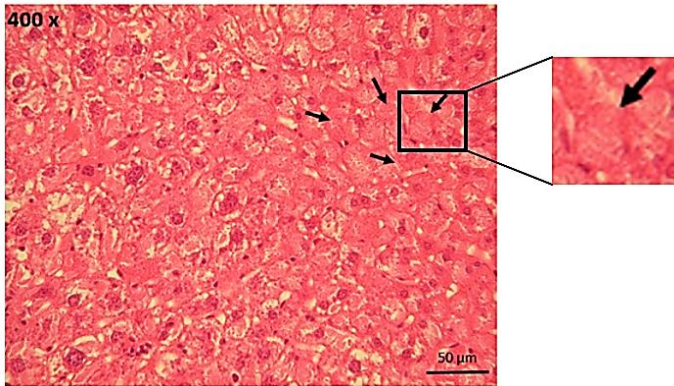
## 1.4 Das HBV-transgene Mausmodell

Das HBV ist durch seinen ausgeprägten Lebertropismus und seine Wirtsspezifität charakterisiert. Neben dem Menschen sind Schimpansen die einzigen Primaten, die für eine Infektion mit dem humanen HBV voll empfänglich sind. Aus ethischen und wirtschaftlichen Gründen werden sie aber kaum zu Forschungszwecken herangezogen (Dandri *et al.* 2006; Chayama *et al.* 2011). Weiterhin ist *Tupaia belangeri*, ein Säugetier aus der Familie der Spitzhörnchen, für eine *in vivo* und *in vitro* HBV-Infektion suszeptibel. Die aussagekräftigsten Erkenntnisse über den Replikationszyklus und die hepatische Karzinogenese des HBV lieferten die mit HBV verwandten Virusstämme DHBV (*duck* Hepatitis B Virus) und WHV (*woodchuck* Hepatitis Virus) (Menne *et al.* 1997; Budzinska *et al.* 2018). Diese Virusstämme können die Pekingente (engl. *duck*) bzw. das Waldmurmeltier (engl. *woodchuck*) infizieren und dienen zur Erprobung antiviraler Medikamente und Impfstoffe (Feng *et al.* 2010). Für *in vitro* Infektionsmodelle sind primäre humane Hepatozyten sowie HepaRG Zellen in Verwendung. HepaRG Zellen werden aus Hepatitis C assoziierten Lebertumoren gewonnen und eröffneten neue Möglichkeiten in der Entwicklung antiviraler Medikamente (Allweiss und Dandri 2016). Primäre humane Hepatozyten verlieren schnell ihre leberspezifischen Eigenschaften sowie ihre ursprüngliche Differenzierung, sodass Langzeitstudien schwierig durchführbar sind (Gripon *et al.* 1988). Für *in vitro* Replikationsmodelle dienen HBV-DNA transfizierte Hepatoma Zelllinien. Um die Frühphase des viralen Lebenszyklus zu verstehen, sind Hepatoma Zelllinien, die den NTCP-Rezeptor exprimieren, in Gebrauch (Allweiss und Dandri 2016). Da die Pathogenese der HBV-Infektion eine systemische Beteiligung vieler Zellen und Botenstoffe des Gesamtorganismus erfordert, ist es schwierig nur anhand von Zellkulturen die notwendigen Zusammenhänge in der Interaktion zu verstehen und Langzeitstudien durchzuführen. In Zellkulturexperimenten fehlt die dreidimensionale Architektur der Systeme und somit kann keine Interaktion zwischen Hepatomzellen und Nichtparenchymzellen stattfinden (Allweiss und Dandri 2016).

Die ersten *in vivo* Experimente konnten mit der Etablierung von chimären Mäusen erfolgen. Dies gelang durch Transplantation von humanen Hepatozyten in die Lebern von immundefizienten Mäusen (uPA/SCID) (Petersen *et al.* 1998). Das Transgen uPA (Uroplasinogen-Aktivator) wirkt lebertoxisch, indem es die murinen Hepatozyten abtötet. Das adaptive Immunsystem wird durch einen ausgeprägten kombinierten Immundefekt (engl. *severe combined immune deficient*, SCID) ausgeschaltet (Tateno *et*

*al.* 2004). In Folge nehmen die transplantierten humanen Hepatozyten den Platz der erkrankten murinen Hepatozyten ein (Dandri *et al.* 2001; Allweiss und Dandri 2016). Mit diesem Modell konnten Schritte der Virusreplikation im Modellorganismus erforscht werden. Bereits 1985 wurde das heute wohl bedeutendste *in vivo* Modell von Chisari *et al.* entwickelt (Chisari *et al.* 1985). Dieses transgene Mausmodell basiert auf einer Mikroinjektion von subgenomischen Fragmenten der HBV-DNA (Genotyp D, Subtyp ayw) in gesunde Mäuse. Die HBV-Fragmente codieren für Regionen der viralen Hüllproteine *preS1*, *preS2*, *S* und HBx, welche durch den murinen und leberspezifischen Albuminpromotor konstant exprimiert werden. Die Mäuse sind in Bezug auf das postnatal aktivierte Transgen tolerant. Antikörper gegen HBsAg können somit im Blutserum der transgenen Tiere nicht nachgewiesen werden (Chisari *et al.* 1985). HBV-LHBs-transgene Mäuse exprimieren das große Hüllprotein in Hepatozyten, was zur Akkumulation des LHBs im ER der Mäuse führt (Chisari *et al.* 1989). Die Ansammlung toxischer HBV-Partikel führt zum Untergang der Hepatozyten. Die übermäßige Synthese von HBsAg korreliert positiv mit dem Ausmaß des Leberschadens. Außerdem schwellen die Hepatozyten hydropisch an, was mit humanen GGC bei chronischer Hepatitis zu vergleichen ist (Wang *et al.* 2003; Chisari *et al.* 1987). GGC sind durch eine fehlende Färbbarkeit mit Eosin, eine Hyperplasie des glatten ER und eine massive Vermehrung der Oberflächenproteine im Zytoplasma gekennzeichnet (vgl. Abb. 11) (Gerber *et al.* 1974; Denk *et al.* 2013). Weiterhin weisen sie Einzelzellnekrosen, sogenannte Councilman-Körperchen, und inflammatorische Infiltrate auf (Chisari *et al.* 1989). Durch die massenhafte Synthese von LHBs und der darauffolgenden Ansammlung im ER bzw. Pre-Golgi-Kompartiment wird die regelrechte Bildung und Sekretion von HBsAg erschwert (Chisari *et al.* 1987).

Karzinogenese: Die *preS2* Domäne des großen Oberflächenproteins besitzt eine transkriptionsaktivierende Sequenz. Diese bewirkt eine Proteinkinase C-vermittelte Aktivierung des c-Raf-1/Erk2-Signalweges, was wiederum eine Aktivierung von NFκB und AP-1 (Aktivator-Protein-1) zur Folge hat (Hildt *et al.* 2002; Hildt *et al.* 1996). Dies führt zu einer gesteigerten Zellproliferation und schließlich zur Leberkarzinogenese (Chisari *et al.* 1989; Chisari *et al.* 1987). Neben der Entwicklung einer Leberfibrose beginnen die Mäuse im Alter von 12 Monaten an Leberkrebs zu erkranken. Zwischen 18 und 21 Monaten ist bei 95 % der Tiere ein Lebertumor nachzuweisen. Vor allem männliche, transgene Mäuse entwickeln ein HCC (Dunsford *et al.* 1990).



**Abbildung 11: Darstellung von Milchglashepatozyten (engl. *ground-glass-cells*, GGC) in einem mit H&E angefärbtem Leberschnitt.**

Lichtmikroskopische Aufnahme eines H&E angefärbten Leberschnitts einer IRF3-*Knockout*-Maus aus dem Labor Gastroenterologie der JLU Gießen, Frau Prof. Roeb. Im rechten vergrößerten Bildausschnitt ist eine GGC dargestellt. IRF3: *Interferon regulatory factor 3*. Pfeil markiert GGC. Maßeinheit: 50μm, Vergrößerung: 400 x.

Der von Chisari etablierte Mausstamm wird als C57BL/6J-Tg(Alb1HBV)44Bri/J bezeichnet. Dieser Mausstamm wurde von der AG Roeb über zehn Generationen auf BALB/cJ zurückgekreuzt. Durch den genetischen Hintergrund BALB/c wird die Entwicklung von Leberfibrose gefördert und damit ähnelt das Modell phänotypisch der chronischen HBV-Infektion beim Menschen (Graumann *et al.* 2015; Churin *et al.* 2015; Churin *et al.* 2014). Die Ausprägung der Leberschädigung sowie das Auftreten von ER-Stress ist abhängig vom genetischen Hintergrund der Mäuse. Dies wurde im Rahmen einer Vergleichsstudie zwischen den HBV-transgenen Mausstämmen BALB/cJ-Tg und C57BL/6J-Tg gezeigt (Churin *et al.* 2014). Beide Stämme wiesen eine gesteigerte PERK- und eIF2 $\alpha$ -Expression auf. Während die BALB/c-Mäuse mit einer stärkeren Aktivierung des PERK-Signalweges und einer gesteigerten CHOP-Expression reagierten, zeigten die Mäuse auf C57BL/6-Hintergrund keine erhöhte Aktivierung des Apoptosemarkers CHOP. Weiterhin war die hepatozelluläre Schädigung im C57BL/6-Stamm von geringerem Ausmaß (Churin *et al.* 2014).



## 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin zu klären, ob PBA eine therapeutische Wirkung im HBV-transgenen Mausmodell zeigt und Potential in der klinischen Anwendung bei HBV induzierter Hepatitis besitzt. Mit den durchgeführten Experimenten sollten die Auswirkungen und Effekte des synthetischen Chaperons PBA im HBV-transgenen Mausmodell untersucht werden. Der in dieser Arbeit verwendete HBV-LHBs-transgene Mausstamm mit genetischem Hintergrund BALB/c überexprimiert das große Hüllprotein (LHBs) in Leberzellen und induziert Leberfibrose und Leberzellkarzinogenese. Die Rückkreuzung auf den genetischen Hintergrund BALB/cJ fördert die Entwicklung der Leberfibrose und spiegelt die beim Menschen auftretende chronische HBV-Hepatitis trefflich wieder. Mit diesem Mausmodell war somit ein Abbild der humanen chronischen Hepatitis geschaffen und konnte für die Forschungsarbeiten herangezogen werden.

Die Tiere wurden über einen Zeitraum von einer und acht Wochen mit PBA oral behandelt und im Alter von zwölf Wochen getötet. Ein direkter, akut eintretender Einfluss der Behandlung sollte mit der Kurzzeitbehandlung über eine Woche untersucht werden. Langfristige Auswirkungen in Hinblick auf Inflammation (Hepatitis) und Fibrogenese sollten mit der achtwöchigen Behandlung analysiert werden. Die allgemeine Leberintegrität wurde mittels der Messung der Aktivität der Lebertransaminasen im Serum untersucht. Die H&E-Färbung erbrachte einen Einblick in die Lebermorphologie und -pathologie der HBV-transgenen Tiere in Abhängigkeit von PBA. Die Immunhistochemie umfasste die Analyse HBsAg positiver Hepatozyten sowie Kernfärbungen von Apoptosemarkern, vor und nach PBA-Behandlung, um direkte Auswirkungen von PBA mikroskopisch zu beurteilen. Die HBsAg Menge wurde auf DNA- und Proteinebene mittels qPCR bzw. Western-Blot untersucht. Die hepatische Genexpression der Mäuse wurde mittels einer *Microarray*-Analyse auf interessante Muster analysiert. Ergebnisse dieser Genanalyse wurden mittels qPCR bestätigt. Um den ER-Stress der Hepatozyten zu messen wurden Schlüsselmoleküle, die ER-Stress anzeigen (z.B. p-eIF2 $\alpha$  und p-PERK) untersucht. Leberentzündung wurde mit Hilfe von Zytokin- und Chemokinuntersuchungen dargestellt.

## 2 Material

### 2.1 Geräte

Tabelle 1: Verwendete Geräte.

Gerät	Hersteller
Autoklav 75S Varioklav	Fa. H+P Medizintechnik, Oberschleißheim
Brutschrank IG 150	Fa. <i>Jouan</i> , Unterhaching
Einbett-Maschine EG1140H	Fa. Leica, Wetzlar
Eismaschine	Fa. <i>Manitowoc</i> , New Port Richey/USA
Elektrophorese-Kammer (RNA-Gel) Netzgerät <i>Consort EV243</i>	Fa. Roth, Karlsruhe Fa. <i>Pharmacia Biotech</i> , Cambridge/UK
Elektrophorese-Kammer Multigel (Western-Blot)	Fa. Biometra, Göttingen
Gelelektrophorese-Kammer (RNA-Gel)	Fa. Roth, Karlsruhe
Feinwaage Sartorius A200S	Fa. Sartorius, Göttingen
Fotokammer mit Geldokumentationssystem <i>ReproStar3</i>	Fa. <i>Camag</i> , MuttENZ/Schweiz
Gefrierschrank -20°C GN 2856	Fa. Liebherr, Bulle/Schweiz
Gefrierschrank -80°C MDF-U60865	Fa. <i>Sanyo</i> , Moriguchi/Japan
Gelgießstand (RNA-Gel)	Fa. Roth, Karlsruhe
Heizplatte H1220	Fa. Leica, Wetzlar
Homogenisator Ultra-Turrax T8	Fa. IKA-Werke, Staufen
Kühl-Tischzentrifuge Mikro 200R	Fa. Hettich, Tuttlingen
Magnetrührer	Fa. IKA-Werke, Staufen
Mikroskop DMIL	Fa. Leica, Wetzlar
Mikrotom RM 2165	Fa. Leica, Wetzlar
Mikrowelle 900	Fa. <i>Severin</i> , Sundern
Mini-Zentrifuge Rotilabo	Fa. Roth, Karlsruhe
Multipette	Fa. Eppendorf, Hamburg
pH-Meter 632	Fa. Metrohm, Schweiz
Pipetten Typ <i>Research</i>	Fa. Eppendorf, Hamburg
<i>Real-Time-PCR-System AB StepOnePlus</i>	Fa. <i>Thermo Fisher Scientific</i> , Waltham/USA
Reflotron Plus <i>Analyzer</i>	Fa. Roche, Mannheim
Reinstwasseranlage Milli-Q-Biocel und Elix 3	Fa. Merck Millipore, Darmstadt
Rüttler Vibrax VXR	Fa. IKA, Staufen
<i>Semi-Dry-Fastblot B34</i>	Fa. Biometra, Göttingen
Spektrophotometer <i>Nanodrop 1000</i>	Fa. <i>Thermo Fisher Scientific</i> , Waltham/USA
Stickstoffbehälter	Fa. KGW, Karlsruhe
Stickstofftank <i>Cryo Speed MED</i>	Fa. Linde, München
<i>Thermocycler T3000</i>	Fa. Biometra, Göttingen
Thermomixer Typ <i>Comfort 5436</i>	Fa. Eppendorf, Hamburg

Trockenschrank T12	Fa. Heraeus, Hanau
UV-Lichtkamera <i>Infinity2-2</i>	Fa. <i>Lumenera Corporation</i> , Ottawa/Canada
UV-Transilluminator LAMAG <i>Reprostar 3</i>	Fa. <i>Omicron</i> , Stafford/UK
Vortexer VF-2	Fa. IKA, Staufen
Waage FA-1500-2	Fa. Faust, Schaffhausen/Schweiz
Wasserbad H1210	Fa. Leica, Wetzlar

## 2.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsgegenstand	Hersteller
Deckgläser	R. Langenbrinck, Emmendingen
PVDF (Polyvinylidendifluorid)- Membran	Fa. Sarstedt, Nümbrecht
<i>Easy-Spin</i> -Säule ( <i>RNeasy mini Kit 250</i> )	Fa. Qiagen, Hilden
Entwicklungsfilm CL-X <i>Posure</i>	Fa. <i>Thermo Fisher Scientific</i> , Waltham/USA
Entwicklungsfilm <i>Hyperfilm Amersham ECL</i>	Fa. <i>GE Healthcare</i> , Buckinghamshire/UK
Eppendorf Cups (0,5ml;1,5ml)	Fa. Eppendorf, Hamburg
Filmkassette Spezial 200	Fa. <i>Rego X-ray</i> , Augsburg
Handschuhe <i>NitraTex</i>	Fa. <i>Ansell</i> , Brüssel/Belgien
Handschuhe <i>Peha Soft</i> , puderfrei	Fa. Hartmann, Neudorf/Österreich
Objektträger <i>Super Frost Ultraplus</i>	Fa. R. Langenbrinck, Emmendingen
Parafilm M	Fa. <i>Sigma-Aldrich</i> , St.Louis/USA
PCR-Reaktionsgefäße	Fa. <i>Thermo Fisher Scientific</i> , Waltham/USA
PCR-Reaktionsgefäß-Verschlusskappen	Fa. <i>Thermo Fisher Scientific</i> , Waltham/USA
<i>PCR-Tube Capping Tool</i>	Fa. <i>BioRad</i> , Hercules/USA
<i>Pierce Tissue Strainer (Subcellular Protein Fractionation Kit for Tissues)</i>	Fa. <i>Thermo Fisher Scientific</i> , Waltham, USA
Pipettenspitzen	Fa. Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen für Multipette	Fa. Ritter, Schwabmünchen
Reaktionsgefäße <i>Falcon</i> (15ml,50ml)	Fa. Greiner, Essen
Reaktionsgefäße <i>Safe Seal</i>	Fa. Sarstedt, Nümbrecht
Reflotron Teststreifen: ALT, AST	Fa. Roche, Mannheim
RNase-freie Pipettenspitzen mit Filter	Fa. Greiner, Essen
Shredder-Säule ( <i>RNeasy mini Kit 250</i> )	Fa. Qiagen, Hilden
Stickstoff (flüssig)	Fa. Linde, Pullach
Trockeneis	Apotheke der JLU-Gießen
<i>Whatman</i> Papiere	Fa. Sarstedt, Nümbrecht

## 2.3 Chemikalien

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien.

Chemikalie	Hersteller
Acrylamidgel 30	Fa. Sigma Aldrich, Steinheim
Agarose <i>Broad Range Pulver</i>	Fa. Roth, Karlsruhe
Amidoschwarz-Pulver 10 B	Fa. Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Fa. Roth, Karlsruhe
<i>Array Buffer 4 (Kit Mouse Cytokine Array Panel A)</i>	Fa. R&D Systems , Minneapolis/USA
<i>Array Buffer 6 (Kit Mouse Cytokine Array Panel A)</i>	Fa. R&D Systems , Minneapolis/USA
BCIP (5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat)	Fa. Roth, Karlsruhe
Bovines Serumalbumin (BSA)	Fa. PAA, Pasching/Österreich
Bromphenolblau	Fa. Serva, Heidelberg
<i>Chemi Reagent Mix (Kit Mouse Cytokine Array Panel A)</i>	Fa. R&D Systems , Minneapolis/USA
Chloroform	Apotheke der JLU-Gießen
<i>Coumaric Acid</i>	Fa. Sigma Aldrich, Steinheim
<i>ECL Detection Reagent</i>	Fa. Amersham Biosciences, Freiburg
Eisessig 100 %	Fa. Merck, Darmstadt
Essigsäure	Fa. Merck, Darmstadt
Ethanol absolut, 96 %	Apotheke der JLU-Gießen
Ethidiumbromidlösung 1 %	Fa. Roth, Karlsruhe
<i>Extraktions-Puffer CEB, MEB, NEB, PEB (Subcellular Protein Fractionation Kit for Tissues)</i>	Fa. Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
ε-Aminocapronsäure	Fa. Serva, Heidelberg
Eosin Y, 0,5 %	Fa. Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Formaldehyd min. 37 %	Fa. Merck, Darmstadt
Glycerin	Apotheke der JLU-Gießen
Glycin	Apotheke der JLU-Gießen
<i>Halt Protease Inhibitor Cocktail (Subcellular Protein Fractionation Kit for Tissues)</i>	Fa. Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
HCL	Fa. Sigma Aldrich, Steinheim
Hämalaun Sauer nach Mayer	Fa. Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Apotheke der JLU-Gießen
KCl	Fa. Roth, Karlsruhe
KH <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fa. Roth, Karlsruhe
Luminol	Fa. Sigma Aldrich, Steinheim
β-Mercaptoethanol	Fa. Roth, Karlsruhe

Methanol	Apotheke der JLU-Gießen
Methylgrün	Fa. <i>Vector Laboratories</i> , Burlingame/USA
<i>Micrococcal Nuklease (Subcellular Protein Fractionation Kit for Tissues)</i>	Fa. <i>Thermo Fisher Scientific</i> , Waltham, USA
Milchpulver, fettarm	Fa. Roth, Karlsruhe
Morpholinopropan sulfonsäure 99,5 % (MOPS)	Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>Mouse Cytokine Array Panel A Detection Antibody Cocktail (Kit Mouse Cytokine Array Panel A)</i>	Fa. <i>R&amp;D Systems</i> , Minneapolis/USA
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fa. Roth, Karlsruhe
NaCl	Fa. Sigma Aldrich, Steinheim
Natriumacetat	Fa. Merck, Darmstadt
Natriumchlorid 0,9 %	Fa. B. Braun, Melsungen
<i>NBT (Nitro-Blue Tetrazolium Chloride)</i>	Fa. Roth, Karlsruhe
Paraformaldehyd-Pulver (PFA)	Fa. Merck, Darmstadt
Pertex Eindeckmedium	Fa. <i>Medite</i> , Bergdorf
RLT-Puffer ( <i>RNeasy mini Kit 250</i> )	Fa. Qiagen, Hilden
RNA-Ladepuffer <i>NorthernMax® Formaldehyde Load Dye</i>	Fa. <i>Life Technologies</i> , Carlsbad/USA
RNase-freies Wasser	Fa. <i>Biorad</i> , Hercules/USA
<i>RNaseway</i>	Fa. Roth, Karlsruhe
RPE-Puffer ( <i>RNeasy mini Kit 250</i> )	Fa. Qiagen, Hilden
KH <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fa. Roth, Karlsruhe
RW1-Puffer ( <i>RNeasy mini Kit 250</i> )	Fa. Qiagen, Hilden
Sodiumdodecylsulfate (SDS)	Fa. Roth, Karlsruhe
<i>Streptavidin-HRP (Kit Mouse Cytokine Array Panel A)</i>	Fa. <i>R&amp;D Systems</i> , Minneapolis/USA
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Fa. Serva, Heidelberg
<i>Tissue-Tek O.C.T. Compound</i>	Fa. <i>Sakura</i> , Leiden/Holland
Trichloressigsäure 100 %	Fa. Roth, Karlsruhe
Trinatriumcitrat-Dihydrat	Fa. Merck, Darmstadt
Tris Base	Fa. Roth, Karlsruhe
Tris HCL	Fa. Roth, Karlsruhe
<i>Turbo DNase 10x (TURBO DNA-free Kit)</i>	Fa. <i>Thermo Fisher Scientific</i> , Waltham/USA
<i>Turbo DNase 1x (TURBO DNA-free Kit)</i>	Fa. <i>Thermo Fisher Scientific</i> , Waltham/USA
<i>Turbo DNase Inactivation Reagent (TURBO DNA-free Kit)</i>	Fa. <i>Thermo Fisher Scientific</i> , Waltham/USA
<i>Tween 20</i>	Fa. Serva, Heidelberg
<i>Wash Buffer (Kit Mouse Cytokine Array Panel A)</i>	Fa. <i>R&amp;D Systems</i> , Minneapolis/USA
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Fa. Merck, Darmstadt
Xylol	Apotheke der JLU-Gießen
Zitronensäure	Fa. Merck, Darmstadt

## 2.4 Komplettsysteme

Tabelle 4: Verwendete Komplettsysteme.

Komplettsystem	Hersteller
<i>iScript cDNA Synthesis Kit</i>	Fa. <i>Bio Rad</i> , Hercules/Canada
<i>Mouse Cytokine Array Panel A, Proteom Profiler</i>	Fa. <i>R&amp;D Systems</i> , Minneapolis/USA
<i>RNeasy mini Kit 250</i>	Fa. <i>Qiagen</i> , Hilden
<i>Subcellular Protein Fractionation Kit for Tissues</i>	Fa. <i>Thermo Fisher Scientific</i> , Waltham/USA
<i>Platinum SYBR Green qPCR Super Mix UDG</i>	Fa. <i>Life Technologies</i> , Carlsbad, USA
<i>Turbo DNA-free Kit</i>	Fa. <i>Life Technologies</i> , Carlsbad, USA
<i>VECTOR VIP Peroxidase (HRP) Substrate Kit</i>	Fa. <i>Vector Laboratories</i> , Burlingame/USA
<i>Impress HRP Anti-Rabbit IgG (Peroxidase) Polymer Detection Kit</i>	Fa. <i>Vector Laboratories</i> , Burlingame/USA
<i>2,5 % normal horse-serum</i>	Fa. <i>Vector Laboratories</i> , Burlingame/USA

## 2.5 Größenstandard

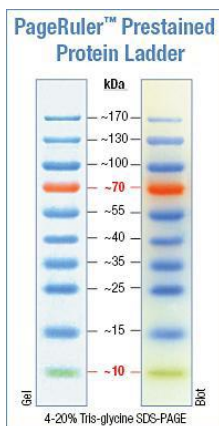


Abbildung 12: Verwendeter Proteinmolekulargewichtsmarker der Firma *Thermo Fisher Scientific*.

## 2.6 Primer

Tabelle 5: Die für die qRT-PCR verwendeten Primer.

Gen	Sequenz (5' → 3')	Hersteller
<i>β-Aktin</i>	Fw: GGC TGT ATT CCC CTC CAT CG Rev: CCA GTT GGT AAC AAT GCC ATG T	Fa. <i>Invitrogen</i> <sup>TM</sup> Waltham/USA
<i>SHBs</i>	Fw: CCC AAC CTC CAA TCA CTC AC Rev: GCA GCA GGA TGA AGA GGA AG	Fa. <i>Invitrogen</i> <sup>TM</sup> Waltham/USA
<i>LHBs</i>	Fw: GTT GGA TCC AGC CTT CAG AG Rev: TCC AGC TCC TAC CTT GTT GG	Fa. <i>Invitrogen</i> <sup>TM</sup> Waltham/USA
<i>SAA1</i>	Fw: CAT TTG TTC ACG AGG CTT TCC AAG GG Rev: TTC CTG AAA GGC CTC TCT TCC ATC AC	Fa. <i>Invitrogen</i> <sup>TM</sup> Waltham/USA
<i>SAA2</i>	Fw: AGC TGG CTG GAA AGA TGG AGA CAA Rev: TGT CCT CTG CCG AAG AAT TCC TGA	Fa. <i>Invitrogen</i> <sup>TM</sup> Waltham/USA
<i>MT1</i>	Fw: GCT GTC CTC TAA GCG TCA CC Rev: AGG AGC AGC AGC TCT TCT TG	Fa. <i>Invitrogen</i> <sup>TM</sup> Waltham/USA
<i>MT2</i>	Fw: CAA ACC GAT CTC TCG TCG AT Rev: AGG AGC AGC AGC TTT TCT TG	Fa. <i>Invitrogen</i> <sup>TM</sup> Waltham/USA
<i>IL-6</i>	Fw: TCC AGT TGC CTT CTT GGG AC Rev: GTA CTC CAG AAG ACC AGA GG	Fa. <i>Invitrogen</i> <sup>TM</sup> Waltham/USA
<i>IL-1β</i>	Cat. No. QT 01048355	Fa. <i>Qiagen</i> , Waltham/USA
<i>TNF-α</i>	Cat. No. QT 00104006	Fa. <i>Qiagen</i> , Waltham/USA

## 2.7 Antikörper

Tabelle 6: Die verwendeten Primärantikörper.

Antikörpername	Spezies	Hersteller	WB Verdünnung in 5 % Milch *	IHC Verdünnung in 10 % BSA**
β-Aktin (sc-47778)	Maus	Fa. <i>Santa Cruz Biotech</i> , Dallas/USA	1:1000	-
α-Tubulin (sc-5286)	Maus	Fa. <i>Santa Cruz Biotech</i> , Dallas/USA	1:1000	-
p-eIF2α (#9721)	Kaninchen	Fa. <i>Cell signalling</i> , Cambridge/UK	1:1000	-

eIF2 $\alpha$ (#5324P)	Kaninchen	Fa. <i>Cell signalling</i> , Cambridge/UK	1:1000	-
p-PERK (#3179)	Kaninchen	Fa. <i>Cell signalling</i> , Cambridge/UK	1:500	-
PERK (sc-13073)	Kaninchen	Fa. <i>Santa Cruz Biotech</i> , Dallas/USA	1:1000	-
HBsAg (20-HR20)	Kaninchen	Fa. <i>Fitzgerald</i> , Acton/USA	1:1000	1:500
LHBs	Maus	Medizinische Virologie, AG Glebe Gießen (Heermann <i>et al.</i> 1984)	1:1000	-
CHOP (sc-575)	Kaninchen	Fa. <i>Santa Cruz Biotech</i> , Dallas/USA	-	1:100
<i>ChromPure Rabbit IgG</i> -Antikörper (81374)	Kaninchen	Fa. <i>Jackson Immuno Research</i> , Suffolk/UK	-	variabel

\* Milchpulver in TBS/T-Waschpuffer gelöst. \*\* BSA-Pulver in 1x PBS-Puffer gelöst.

**Tabelle 7: Die verwendeten Sekundärantikörper.**

Antikörpername	Herkunft	Hersteller	Verdünnung in 5 % Milch *
<i>Goat anti rabbit HRP</i>	Ziege	<i>Santa Cruz</i> (sc-2030)	1:3000
<i>Goat anti rabbit AP</i>	Ziege	<i>Santa Cruz</i> (sc-2034)	1:3000
<i>Goat anti mouse HRP</i>	Ziege	<i>Santa Cruz</i> (sc-2005)	1:3000
<i>Goat anti mouse AP</i>	Ziege	<i>Santa Cruz</i> (sc-2047)	1:3000

\* 2,5 g Milchpulver in 50 ml TBS/T-Waschpuffer gelöst.

## 2.8 Software

**Tabelle 8: Die verwendeten Software-Programme.**

Programm	Hersteller
<i>BioDoc Analyze 2.1</i>	Fa. Analytik Jena AG Jena
<i>ELISA-Reader Software Gen5</i> (Version 1.05.11)	Fa. BioTek, Bad Friedrichshall
<i>Microsoft Office 2013</i>	<i>Microsoft</i>



Real-Time-PCR-Software AB StepOne Software 2.2	Fa. <i>Thermo Fisher Scientific</i> , Waltham/USA
Spektrophotometer-Software <i>Thermo Scientific</i> ND-1000 v3.3.7	Fa. <i>Thermo Fisher Scientific</i> , Waltham/USA
SPSS 22.0	Fa. <i>IBM/SPSS Inc.</i> , Chicago/USA
USB-Fotokamera Software <i>Phytec Vision Demo</i> v2.2	Fa. <i>Phytec</i> , Mainz

## 2.9 Versuchstiere

### 2.9.1 Verwendete Mauslinie

Die in dieser Arbeit untersuchten Versuchstiere wurden im Zentralen Tierlabor der JLU Gießen (Frankfurter Straße 105, 35392 Gießen) artgerecht gezüchtet. Die Tierhaltung erfolgte unter festgelegten keimfreien Bedingungen. Bei der Pflege und den Untersuchungen der Tiere wurden die Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes strikt befolgt. Weitere Informationen zur Tierhaltung können aus der Tierversuchsgenehmigung (Nr. V54 19c 20-15(1) GI 20/10; 48/2012) entnommen werden.

Die HBV-transgenen Mauslinien wurden der AG Roeb freundlicherweise von Herrn Professor Dr. Kurt Reifenberg, Leiter der zentralen Versuchstiereinrichtung der Universität in Mainz, zur Verfügung gestellt. Die HBV-transgenen Mäuse exprimieren die HBV-Oberflächenproteine in den Hepatozyten unter Kontrolle des Albumin-Promotors. Der genetische Hintergrund der ursprünglichen Mauslinie wird als C57BL/6J-Tg(Alb1HBV)44Bri/J bezeichnet. Da dieser Mausstamm lediglich eine leicht-entzündliche Leberfibrose entwickelt, wurde er von der AG Roeb über zehn Generationen auf den Leberfibrose-suszeptiblen Stamm BALB/c rückgekreuzt (Shi *et al.* 1997). Diese Rückkreuzung auf BALB/c Hintergrund erfolgte zwischen Mäusen vom Stamm C57BL/6J-Tg(Alb1HBV)44Bri/J und Mäusen vom Stamm C57BL/6J-Tg. In Folge entstanden die für diese Arbeit verwendeten HBV-transgenen Mäuse BALB/c-Tg(Alb1HBV). Diese HBV-transgenen Mäuse stellen die unbehandelten Kontrollen dar (Kontrollgruppe Tg n=10). Sie wurden über einen Zeitraum von einer (Gruppe Tg+1W PBA n=10) oder acht Wochen (Gruppe Tg+8W PBA n=10) mit dem künstlichen Chaperon PBA behandelt und im Alter von zwölf Wochen getötet.

### **Tabelle 9: Auflistung der verwendeten Mausmodelle.**

Es wurden HBV-transgene Mäuse auf genetischem Hintergrund BALB/c verwendet, die über eine und acht Wochen mit PBA gefüttert wurden.

<b>Mauslinie</b>	<b>Behandlung</b>
BALB/c-Tg(Alb1HBV)	<u>Kontrollgruppe Tg</u> Transgene HBV-Mauslinie auf genetischem Hintergrund BALB/c Abkürzung: <b>Tg</b>
BALB/c-Tg(Alb1HBV) + 1 Woche PBA	<u>Gruppe Tg+1W PBA</u> Transgene HBV-Mauslinie auf genetischem Hintergrund BALB/c mit einer Woche PBA-Behandlung Abkürzung: <b>Tg+1W PBA</b>
BALB/c-Tg(Alb1HBV) + 8 Wochen PBA	<u>Gruppe Tg+8W PBA</u> Transgene HBV-Mauslinie auf genetischem Hintergrund BALB/c mit acht Wochen PBA-Behandlung Abkürzung: <b>Tg+8W PBA</b>

### **2.9.2 PBA-Gabe**

PBA wurde den Mäusen in einer Dosierung von 200 mg/kg/d mit dem Trinkwasser appliziert. Bei einer täglichen Trinkmenge von ca. 5,5 ml/Maus (Bachmanov *et al.* 2002) und einer Konzentration von 0,93g/L Na-PBA (M=186 g/mol) im Trinkwasser wurden so ungefähr 200 mg/kg/d verfüttert. Diese Dosierungen gelten in humanen Studien als optimierte Werte (Ben Mosbah *et al.* 2010; McGuire *et al.* 2010). Es wurde im Mausversuch bereits gezeigt, dass täglich bis zu 1000 mg/kg appliziert werden können, ohne dass es zu einer Veränderung im Trinkverhalten durch z.B. Geschmacksbeeinflussung kommt (Wiley *et al.* 2011).

### **2.9.3 Probenentnahme und Lagerung**

Die Mäuse wurden per Isofluran Inhalation und anschließend Genickbruch getötet. Danach wurden die Lebern entnommen sowie venöses Blut aus der *Vena cava inferior* abgenommen. Die Lebern und die Serumproben wurden letztlich in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

## 2.9.4 Versuchsaufbau

HBV-transgene Mäuse auf genetischem Hintergrund BALB/c wurden über eine und acht Wochen mit dem synthetischen Chaperon PBA behandelt. Diese HBV-transgenen Mäuse stellten die Kontrollgruppe dar (Kontrollgruppe Tg, n=10). Für die Analysen standen insgesamt n=30 Versuchstiere zur Verfügung. Von diesen 30 Mäusen waren 15 weiblich und 15 männlich. Sämtliche Untersuchungen wurden mindestens zweimal durchgeführt. Bei der Auswertung wurden männliche und weibliche Versuchstiere getrennt voneinander analysiert, da sich die Geschlechter hinsichtlich der Leberpathologie sowie der Reaktion auf PBA voneinander unterschieden (Churin *et al.* 2014). Der schematische Versuchsaufbau ist in den folgenden Abbildungen dargestellt.

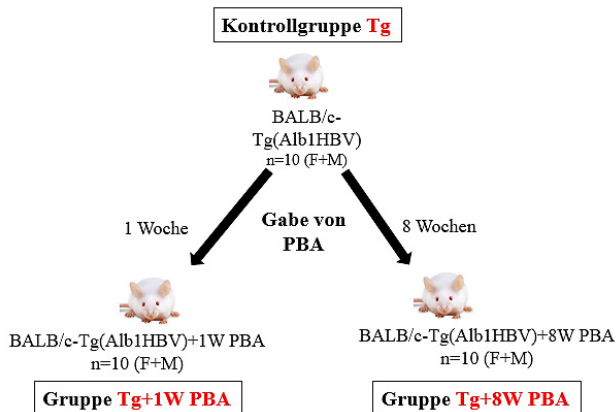
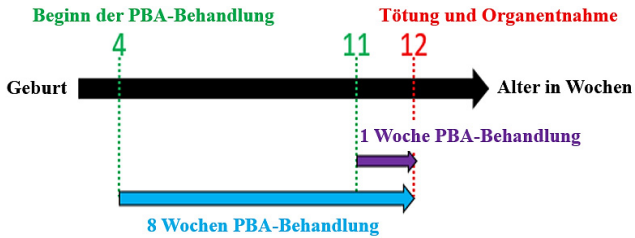


Abbildung 13: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus.

Die drei in dieser Arbeit untersuchten Gruppen umfassen die transgene Kontrollgruppe (Tg), die transgenen Mäuse, die eine Woche mit PBA behandelt wurden (Tg+1W PBA) und die transgenen Mäuse, die acht Wochen mit PBA gefüttert wurden (Tg+8W PBA). Die ursprüngliche Gruppengröße aller drei Gruppen beträgt je n=10 (weibliche Mäuse (F) und männliche Mäuse (M)).



**Abbildung 14: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs.**

Im Alter von 4 bzw. 11 Wochen begann die Behandlung mit PBA über eine bzw. acht Wochen. Im Alter von 12 Wochen wurden die Mäuse getötet und Leber und Serum für die Analysen asserviert.

## 3 Methoden

### 3.1 Molekularbiochemische Methoden

#### 3.1.1 RNA-Isolierung

Die Isolierung der RNA aus Mauslebern erfolgte mithilfe des *RNeasy Mini Kit 250* der Firma Qiagen. Bei dieser Art der RNA-Isolierung werden nur RNA-Längen über 200 Nukleotide angereichert. Das mit dieser Methode extrahierte Endprodukt bezeichnet man als *total-RNA*. Die Durchführung erfolgte mit individuellen Modifikationen gemäß Herstellerprotokoll. Hierzu wurden 20 bis 30 mg von den bei  $-80^{\circ}\text{C}$  tiefgefrorenen und gemörserten Lebern abgewogen (Feinwaage Sartorius) und auf Trockeneis in 1,5 ml Eppendorf-Cups überführt. Die Eppendorf-Cups wurden zuvor in flüssigem Stickstoff heruntergekühlt. Bei den nachfolgenden Arbeitsschritten wurde darauf geachtet, dass möglichst wenig RNase-Kontamination stattfand. Hierzu wurden puderfreie Handschuhe, RNase-freie Pipettenspitzen mit Filter sowie mit RNase freiem Wasser gesäuberte Pipetten benutzt. Im ersten Schritt der RNA-Isolierung erfolgte die mechanische Homogenisierung mittels Ultra-Turrax des Lebergewebes in 600  $\mu\text{l}$  eines Lysepuffers, welcher aus RLT Puffer und  $\beta$ -Mercaptoethanol im Verhältnis 10:1 hergestellt wurde. Dieser Schritt fand auf Eis statt. Die Zeit des Homogenisierens betrug etwa drei Sekunden. Der Stab des Ultra-Turrax wurde zwischen den einzelnen Mausproben mit *Aqua dest.* gesäubert um ein Vermischen der einzelnen Mausproben zu vermeiden. Von nun an wurden alle Schritte bei Raumtemperatur durchgeführt. Das Leberlysate wurde auf die Shredder-Säule übertragen und 2 Minuten bei 12.000 x g zentrifugiert. Danach wurde der Shredder verworfen. Zum Durchlauf wurden 600  $\mu\text{l}$  70 % RNase-freies Ethanol hinzugegeben und durch Pipettieren vermischt. Eine *Easy-Spin*-Säule wurde mit diesem Gemisch beladen und 15 Sekunden bei 8.000 x g zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und der vorherige Schritt erneut wiederholt. Das Ziel dieses Schrittes war die Gewinnung der RNA. Anschließend wurde die Säule in ein neues Sammelröhrchen überführt und 700  $\mu\text{l}$  eines weiteren Waschpuffers RW1 hinzugegeben. Die Säule wurde nun 15 Sekunden bei 8.000 x g zentrifugiert und der Durchlauf erneut verworfen. Danach erfolgte das Überführen der Säule in ein neues Sammelröhrchen, die Zugabe von 500  $\mu\text{l}$  eines Waschpuffers RPE und eine 15 Sekunden lange Zentrifugation bei 8.000 x g. Nach Verwerfen des Durchlaufs wurde dieser Waschschrift mit RPE Puffer und darauffolgender Zentrifugation wiederholt. Eine Trocken-zentrifugation von 2 Minuten bei 8.000 x g beendete die Waschschrift. Abschließend erfolgte das Eluieren der RNA.

Hierzu wurden die trocken zentrifugierten Säulen in neue 1,5 ml Eppendorf-Cups überführt und mit 30 µl RNase-freiem Wasser benetzt. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben 1 Minute lang bei 8.000 x g zentrifugiert. Mit diesem Schritt wurde die RNA eluiert und befand sich nun im Eppendorf-Cup.

Um potentiell vorhandene DNA zu eliminieren, schloss sich der DNase-Verdau mittels des Turbo DNA-free Kits an. Die isolierte RNA, sowie die für den DNase-Verdau benötigten Reagenzien wurden im Eisbad aufbewahrt. Zu der isolierten RNA (30 µl) wurden 3 µl 10x Turbo DNase Puffer und 1 µl 1x Turbo DNase pipettiert. Das Gemisch wurde gemischt und bei 37°C für 30 Minuten im Thermomixer Typ Comfort inkubiert. Anschließend wurde die Probe mit 3 µl DNase Inactivation Reagent versetzt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Letztlich wurde das Gemisch 1,5 Minuten bei 10.000 x g zentrifugiert und der Überstand in einen neuen Eppendorf-Cup überführt. Um Degradation zu verhindern, wurden die nun gereinigten RNA-Proben bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert und anschließend bei einer Temperatur von -80°C eingefroren.

Die RNA-Konzentration wurde photometrisch per Nano-Drop-Photometer bestimmt. Der Nukleinsäure-Gehalt und die Reinheit einer Probe können spektralphotometrisch bestimmt werden. Als Referenzwert diente RNase-freies Wasser, wobei je 1 µl der neu gewonnenen RNA-Proben zur Analyse verwendet wurden. Die Messung der Absorption erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 nm ( $A_{260}$ ). Eine hohe Absorption bei 280 nm ( $A_{280}$ ) zeigt eine Verunreinigung mit Proteinen an (Gallagher, SR und Desjardins 2006). Durch den errechneten Quotienten lässt sich die Reinheit der RNA-Probe abschätzen. Bei einem  $A_{260}/A_{280}$  - Verhältnis zwischen 1,7 und 2,1 geht man von reiner RNA aus.

Die folgende modifizierte Lambert-Beer-Formel diente zur Konzentrationsbestimmung von RNA in µg/µl. Mithilfe dieser Formel berechnet sich die Menge an einzusetzender RNA für die cDNA-Synthese (vgl. Kapitel 3.1.3):

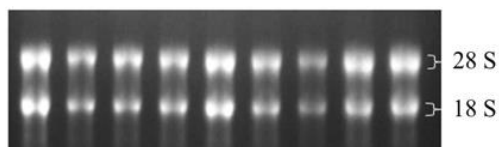
$$C_{\text{RNA}} = (A_{260} - A_{\text{LW}}) * 40 * V$$

$C_{\text{RNA}}$  = RNA-Konzentration in µg/µl  
 $A_{260}$  = Absorption der Probe bei einer Wellenlänge von 260 nm  
 $A_{\text{LW}}$  = Absorption der Leerwert-Probe bei einer Wellenlänge von 260 nm  
 $40$  = RNA-spezifischer Multiplikationsfaktor  
 $V$  = Verdünnungsfaktor

### 3.1.2 RNA-Gel-Elektrophorese

Zur Abschätzung der RNA-Qualität und -Quantität wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Bei angelegter Spannung werden Nucleinsäuren nach ihrer Größe und Konformation aufgetrennt. Die negativ geladenen Phosphatgruppen der Nucleinsäuren wandern in Richtung positiv geladene Anode und werden hierbei durch das Netz der Agarose-Gelmatrix in ihrer Wanderung beeinflusst. Große Nucleinsäure-Fragmente wandern im Vergleich zu kleinen Fragmenten langsamer durch das Agarose-Gel.

Das Agarose-Gel wurde etwa eine Stunde vor der Elektrophorese gegossen. Zur Herstellung des Gels wurden 0,9 g Agarosepulver in 46,25 ml 1x MOPS-Puffer mittels Mikrowelle gelöst. In diesem Fall genügte ein dreimaliges Aufkochen. Anschließend wurde das Gemisch unter dem Abzug auf 60°C abgekühlt und mit 3,75 ml 7,5 % Formaldehyd versetzt. Das Gemisch wurde leicht geschwenkt. Im Anschluss wurde das Gel in einen Gelgießstand gegossen und ein taschenformender Kamm vorsichtig eingesetzt. Die vollständige Polymerisation des Gels betrug 30 Minuten. In der Zwischenzeit wurden die zu untersuchenden RNA-Proben mit einem Ethidiumbromid-haltigen Ladepuffer versetzt. Ethidiumbromid hat die Eigenschaft mit der RNA zu interkalieren und unter UV-Licht zu fluoreszieren. Infolgedessen werden die 18S- und 28S -rRNAs als Banden sichtbar (vgl. Abb. 15). Hierzu wurden je 1 µl der zu untersuchenden RNA-Probe mit 4 µl Ethidiumbromid-haltigem 5x RNA-Ladepuffer in einem 0,5 ml Eppendorf-Cup vermengt. Die Mischung wurde für 10 Minuten bei 65°C im Thermomixer erhitzt und anschließend auf Eis gelagert. Der Kamm wurde aus dem polymerisierten Gel entfernt und einfach konzentrierter MOPS-Puffer in die Elektrophorese-Kammer gefüllt. Die Geltaschen wurden mit dem Probengemisch beladen, worauf die elektrophoretische Auftrennung bei einer Spannung von 65 Volt über 35 Minuten erfolgte. Anschließend wurde das Gel unter ultraviolettem Licht in einer Fotokammer sichtbar gemacht und die Auftrennung in die 18S und 28S rRNAs beurteilt und fotografiert (Fotokammer mit Geldokumentationssystem *ReproStar3*).



### Abbildung 15: Beispiel einer RNA-Gelelektrophorese zur Überprüfung der RNA-Integrität.

Erkennbar sind die Banden der 28S und 18S rRNAs; Foto selbst hergestellt und fotografiert.

<b>1,5 % Agarose-Gel</b>	
Agarosepulver	0,9 g
1x MOPS-Puffer	46,25 ml
Formaldehyd	3,75 ml
<b>10x MOPS</b>	
200 mM MOPS	41,8 g
50 mM Natriumacetat	6,8 g
<i>Aqua dest.</i>	ad 1 l
pH 7,0 einstellen (mittels 10 M NaOH)	
<b>5x RNA-Ladepuffer</b>	
<i>NorthernMax® Formaldehyde Load Dye</i>	
1 % Ethidiumbromidlösung	50µl

#### 3.1.3 Synthese von cDNA

Um die genetische Information der isolierten RNA für die folgende quantitative *Real-Time*-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) zugänglich zu machen, ist eine Reverse Transkription notwendig. Die isolierte RNA dient hierbei als Vorlage (Matrize) für die Synthese der einzelsträngigen cDNA. Mittels des Enzyms Reverse Transkriptase (RT) erfolgt die Transkription von RNA in cDNA. Die RT benötigt als Startsequenz einen kurzen komplementären Nukleinsäurebereich, der mit dem Poly-A Schwanz der RNA in Verbindung tritt. Diese Startsequenz wird als Primer bezeichnet. Ist die Basenabfolge der zu analysierenden RNA bekannt, kann ein dafür passender Primer konstruiert werden, der sich folglich an die komplementäre Basenabfolge lagert und den Startbereich für die RT markiert. Die RT transkribiert mit Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) die vorliegende mRNA zur cDNA. Die Durchführung des Versuchs erfolgte mit dem *iScript cDNA Synthesis KIT*. Der Reaktionsansatz wurde gemäß Herstellerangaben in einem autoklavierten Eppendorf-Cup vermengt. Hierzu wurden 1µg/µl RNA mit RNase-freiem Wasser verdünnt, z.B. 2,5 µl RNA + 12,5 µl RNase-freies Wasser. Diese



Probenverdünnung wurde mit 4  $\mu$ l 5x *iScript Reaction Mix* und 1  $\mu$ l *iScript Reverse Transcriptase* versetzt.

Der schematische Versuchsansatz pro Probe ist nachfolgend aufgeführt:

5x <i>iScript Reaction Mix</i>	4 $\mu$ l
<i>iScript Reverse Transcriptase</i>	1 $\mu$ l
RNase-freies Wasser	variabel
RNA Probe	variabel
Gesamtvolumen	20 $\mu$ l

Die Proben wurden kurz anzentrifugiert und im *Thermocycler* T3000 wie folgt inkubiert:

**Tabelle 10: Protokoll des Ablaufs des *Thermocyclers*.**

Phase	Dauer	Temperatur
Anlagerung des Primers	5 Minuten	25°C
Reverse Transkription	30 Minuten	42°C
Denaturierung der RT	5 Minuten	85°C

Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20°C. Die letztlich gewonnene cDNA konnte nun in der qRT-PCR eingesetzt werden. Die Umschreibung für alle Mausproben erfolgte in einem einzigen Umschreibvorgang um gleiche Versuchsbedingungen zu schaffen.

### 3.1.4 Quantitative *Real-Time*-Polymerase-Kettenreaktion

Die qRT-PCR stellt ein molekulares Verfahren zur exponentiellen Amplifizierung und Analyse spezifischer DNA-Fragmente dar. Das Prinzip der Methode beruht auf der genspezifischen Primer-Hybridisierung und der anschließenden Amplifizierung von DNA-Strängen (Bustin 2000). Benötigt werden bei dieser Methode Primer, die komplementär zum amplifizierenden DNA-Fragment (zu analysierendes Gen) sind, *dNTPs* zur Elongation des Komplementärstrangs, eine hitzestabile Polymerase, welche die Reaktion katalysiert, sowie entsprechende Chemikalien zur Herstellung eines geeigneten Milieus. Der Ablauf der qRT-PCR gliedert sich in drei Schritte, die in 40 Zyklen wiederholt werden:

Denaturierung, Annealing (Primer-Hybridisierung) und Elongation.

Das Erhitzen auf 95°C trennt durch Aufspaltung der Wasserstoffbrückenbindungen die doppelsträngige DNA in Einzelstränge (Denaturierung). Infolgedessen können sich die Primer bei einer Temperatur von etwa 58°C an die komplementären DNA-Abschnitte anlagern (Annealing). Der Primer legt über seine freie OH-Gruppe am 5' Ende den Startpunkt für die Polymerase fest. Die hitzestabile Polymerase mit einem Wirkoptimum bei 72°C katalysiert die DNA-Synthese durch Anlagerung und Polymerisation der *dNTPs* (Elongation). Unter idealen Voraussetzungen verdoppelt sich der DNA-Gehalt nach jedem Elongationsschritt. Daher steigt die amplifizierte DNA-Menge zu Beginn exponentiell an, während sie im Verlauf, durch Verbrauch der Substrate eine Grenze erreicht. Der Zyklus wiederholt sich durch erneute Denaturierung der DNA. Im *Real-Time-PCR-System StepOne Plus* wurde folgendes Temperaturprofil verwendet:

**Tabelle 11: Temperaturprofil des *Real-Time-PCR-System StepOne Plus*.**

Phase	Dauer	Temperatur
Initiale Denaturierung	10 Minuten	95°C
Denaturierung	10 Sekunden	95°C
Annealing	1 Minute	58°C
Elongation	10 Sekunden	72°C
Schmelzkurve	30 Sekunden	55°C bis
	15 Sekunden	95°C (in 0,5°C-Schritten)

Durch die Verwendung des fluoreszierenden Farbstoffs *SYBR Green*, der sich in die kleine Furche der DNA-Doppelhelix einlagert, wird eine Quantifizierung der Genprodukte möglich. Der hierbei gebildete Fluoreszenzfarbstoff-DNA-Komplex absorbiert blaues Licht mit einer Wellenlänge von 494 nm und sendet grünes Licht mit einer Wellenlänge von 521 nm aus. Pro Zyklus steigt die Intensität der Fluoreszenz proportional zur Menge an synthetisierten PCR-Produkten, demzufolge proportional zur Genexpression des Analyse-Gens. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgt in Echtzeit, also in jedem PCR-Schritt, was den Namen dieser Methode *real time PCR*, begründet. Über die Software *AB StepOne* wurde ein CT-Wert (engl. *Cycle Threshold*) errechnet. Der CT-Wert bezeichnet den Zyklus, bei dem die Intensität des Fluoreszenzsignals erheblich über den Hintergrundwert ansteigt, demnach den konstant definierten Fluoreszenzwert erreicht. Aufgrund der Farbstoffeinlagerung lässt sich also ableiten, dass je niedriger der

CT-Wert desto größer die Menge an PCR-Produkten und dementsprechend höher die Genexpression ist. Weiterhin wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, die eine Verifizierung des Genprodukts anhand der spezifischen Schmelztemperatur erlaubt. Durch allmähliche Erhöhung der Temperatur wird ein *Peak* der Steigung der Fluoreszenzintensität erreicht. Dieser verdeutlicht die Denaturierung der synthetisierten DNA-Stränge mit der Freisetzung des *SYBR Green* Farbstoffs. Bei dieser qRT-PCR wurde eine relative Quantifizierung vorgenommen, wobei einerseits auf das *Housekeeping Gene*  $\beta$ -Aktin Bezug genommen wurde.  $\beta$ -Aktin wird konstitutiv exprimiert, unterliegt keinem äußeren Einfluss und wird folglich nicht reguliert. Andererseits wird auf eine Kontrollgruppe normiert. In der vorliegenden Arbeit wurde immer auf die Kontrollgruppe Tg ohne PBA-Behandlung normiert (vgl. Kapitel 2.9). Die Berechnung der Unterschiede in der Genexpression erfolgte mittels der  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Methode (Livak und Schmittgen 2001).

Die benötigten Reagenzien wurden auf Eis aufgetaut und der Versuchsansatz wie folgt in eine 96-PCR-Wellplatte pipettiert:

<b>Versuchsansatz für eine Probe mit Primern der Firma <i>Invitrogen</i></b>	
<i>SYBR Green Super Mix</i>	6,30 $\mu$ l
Primer <i>Forward</i>	0,25 $\mu$ l
Primer <i>Reverse</i>	0,25 $\mu$ l
<i>Aqua dest.</i>	5,20 $\mu$ l
cDNA	0,50 $\mu$ l
Gesamtvolumen	12,5 $\mu$ l

<b>Versuchsansatz für eine Probe mit Primern der Firma <i>Quiagen</i></b>	
<i>SYBR Green Super Mix</i>	6,30 $\mu$ l
Primer	1,25 $\mu$ l
<i>Aqua dest.</i>	4,50 $\mu$ l
cDNA	0,50 $\mu$ l
Gesamtvolumen	12,55 $\mu$ l

Für diesen Versuch wurde der *Platinum SYBR Green qPCR Super Mix* verwendet. Dieser Mix beinhaltet die hitzestabile DNA-Polymerase, *dNTPs* und *SYBR Green*-Farbstoff. Um Ungenauigkeiten beim Pipettieren auszugleichen, erfolgte die Messung jedes Versuchsansatzes in Duplikaten. Deren Mittelwerte wurden zur Ergebnisauswertung verwendet. Außerdem wurde bei jeder Analyse eine zweifache Negativkontrolle (RNase-

freies Wasser anstelle der cDNA) mitgeführt. Nachdem der Pipettiervorgang abgeschlossen war, wurden die PCR-Reaktionsgefäße mittels *Capping Tool* verschlossen, kurz abzentrifugiert und auf Eis gelagert. Anschließend konnte das *Real-Time-PCR*-Gerät (*AB StepOnePlus*) mit den Proben beladen werden.

### 3.1.5 *Microarray*

Die *Microarray*-Analyse sowie die Auswertung der Ergebnisse wurden von Dr. Jochen Wilhelm durchgeführt (Deutsches Zentrum für Lungenforschung, Biostatistik und Bioinformatik der JLU Gießen). Zur Analyse wurde *total*-RNA der zu untersuchenden Mausproben zur Verfügung gestellt. Hierzu wurde die RNA-Aufbereitung der Mausebern, wie im Kapitel 3.1.1 beschrieben, vorgenommen.

Die *Microarray*-Technologie ermöglicht Analysen des Transkriptoms, also der Gesamtheit aller in der Maus transkribierter Gene. Dank dieses Verfahrens erhält man große Mengen an Informationen über das Genom, die das Verständnis von komplexen zellulären Vorgängen erweitern. Das Prinzip dieser Methode basiert auf einem Chip, der mit mehreren Oligonukleotid-Sonden bekannter Sequenz beladen ist. Diese Oligonukleotide repräsentieren viele Gene. Nach der Inkubation der RNA-Proben auf dem *Microarray Chip*, die vom externen Dienstleister spezifisch aufbereitet wurden, hybridisieren RNA-Sequenzen mit den passenden komplementären Oligonukleotid-Sonden, wodurch unterschiedliche Spots fluoreszieren. Die Intensität der Fluoreszenz wird hierbei gemessen. Je stärker das gemessene Fluoreszenz-Signal, desto mehr hybridisierte RNA wird erfasst, wodurch auf eine stärkere Genexpression geschlossen werden kann (Schütt und Bröker 2011). Da sich dieses Verfahren vor allem für vergleichende Genanalysen eignet, wurden in der vorliegenden Arbeit die drei Mausgruppen Tg, Tg+1W PBA und Tg+8W PBA miteinander verglichen. Hierbei wurden die Gruppen parallel untersucht und anschließend die Fluoreszenzintensität korrespondierender Spots vergleichend analysiert. Aufgrund der Unterschiede in der Fluoreszenzintensität können Rückschlüsse auf die verschiedenen Genexpressions-Muster der unterschiedlichen Mausgruppen gezogen werden. Es wurde ein Pool pro Gruppe gebildet, was bedeutet, dass je vier männliche Mäuse eine Gruppe repräsentieren. Bei der Auswertung wurde eine FDR (engl. *false discovery rate*) von 1 % und eine *Average Expression* ab 5 akzeptiert. Die *AveExp* zeigt, wie stark das analysierte Gen

generell exprimiert wird. Ab einem Wert von 5 kann man von einer adäquaten Gen-Expression ausgehen.

## 3.2 Proteinbiochemische Methoden

### 3.2.1 Lysatherstellung

Für die proteinbiochemischen Analysen werden Leberlysate benötigt. Hierzu wurden pro Mausprobe je 40 mg Lebergewebe auf Trockeneis, in mit flüssigem Stickstoff heruntergekühlte, 1,5 ml Eppendorf-Cups eingewogen. Die Proben wurden mit je 600  $\mu$ l 1x Laemmli-Puffer (Laemmli 1970) versetzt und so lange gevortext, bis sich das Gewebe vollständig aufgelöst hatte. Die Proben wurden nach dem Vortexen sofort auf Trockeneis zwischengelagert und im nächsten Schritt direkt vom Trockeneis bei 99°C im Thermomixer für 10 Minuten erhitzt. Danach erfolgte eine Zentrifugation bei 1400 x g für eine Dauer von 5 Minuten. Abschließend fand die Aliquotierung des Überstandes in neue Eppendorf-Cups statt, die bei -20°C gelagert wurden.

#### **4 x Lämmli-Puffer**

0,25 M Tris/HCl pH 6,8

40 % Glycerin

8 % SDS

0,02 % Bromphenolblau-Lösung

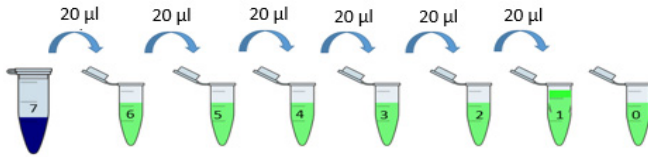
#### **1 x Lämmli-Puffer**

4 x Lämmli-Puffer      2 ml

*Aqua dest.*              6 ml

### 3.2.2 Amido-Schwarz-Bestimmung

Zur Quantifizierung der Proteinmenge der hergestellten Leberlysate wurde die Amidoschwarz-Methode (Popov *et al.* 1975) angewandt. Die Entscheidung fiel auf diese Methode, da herkömmliche Quantifizierungsmethoden, wie z.B. die Methode nach *Bradford*, aufgrund des im Lämmli-Puffers enthaltenen Detergenz SDS ungeeignet sind (Westermeier 2016; Andrea). Zunächst wurde eine 1:2 Verdünnungsreihe mit einer BSA-Stammlösung (50  $\mu$ g/ $\mu$ l) im Konzentrationsbereich von 0,78  $\mu$ g/ $\mu$ l bis 50  $\mu$ g/ $\mu$ l erstellt (7 Standardwerte + 1 *Blank*). Für die Stammlösung wurden 50 mg/ml BSA in 1x Lämmli-Puffer gelöst. Eine Übersicht der Verdünnungsreihe ist im folgenden Schema visualisiert:



E-Cup	7	6	5	4	3	2	1	<i>Blank</i>
µg/µl	50	25	12,5	6,25	3,13	1,56	0,78	0

**Abbildung 16: Herstellung der Verdünnungsreihe.**

Der *Blank*-Leerwert beinhaltet nur 1 x Lämmli-Puffer. Die E-Cups 1-7 sind mit 20 µl der Stammlösung (BSA/Lämmli-Puffer) befüllt.

Die Messung der Standardreihe erfolgte in Duplikaten, die der Mausproben hingegen als Einfachbestimmung. Zur Durchführung wurden je 1 µl der Probe bzw. der BSA-Standardwerte auf eine Nitrozellulosemembran pipettiert. Die Membran wurde an der Luft getrocknet und anschließend für 10 Minuten mit der unten aufgeführten Amidoschwarz-Stammlösung auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurde die Amidoschwarz-Stammlösung abgossen, und ein dreimaliger Waschvorgang à 5 Minuten mit der Entfärber-Lösung folgte. Da Amidoschwarz kovalent an basische Aminosäuren der Proteine bindet, verbleibt der Farbstoff nach dem Waschen auch nur an den Stellen, an denen das Protein gebunden hat. Diese angefärbten Spots wurden mit Hilfe eines Skalpell ausge schnitten und in Eppendorf-Cups überführt. Sie wurden unter dem Abzug mit je 600 µl Zellulose-Acetat-Auflöser versetzt und so lange gevortext, bis sich die Membran vollständig aufgelöst hatte. Letztlich wurde die Extinktion der Proben sowie der Standardproben am Photometer gegen den Probenleerwert ermittelt. Gemessen wurde bei einer Wellenlänge von 630 nm.

**4 x Lämmli-Puffer**  
 0,25 M Tris/HCl pH 6,8  
 40 % Glycerin  
 8 % SDS  
 0,02 % Bromphenolblau-Lösung

<b>Amidoschwarz-Stammlösung</b>	
Amidoschwarz	0,5 g
Methanol	90 ml
Eisessig	20 ml
<i>Aqua dest.</i>	90 ml
<b>Entfärber-Lösung</b>	
Methanol	90 ml
Eisessig	20 ml
<i>Aqua dest.</i>	90 ml
<b>Zellulose-Acetat-Auflöser</b>	
Methansäure	80 ml
Eisessig	10 ml
TCA	1 ml

### 3.2.3 Western-Blot-Analyse

#### 3.2.3.1 Proteinauftrennung durch SDS-PAGE

Im Anschluss an die oben erläuterten Schritte erfolgte die Proteinseparation durch SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) nach Lämmli. Das Prinzip nach Lämmli beschreibt die SDS-PAGE als ein diskontinuierliches System aus zwei Gelen. Zu Beginn werden die Proteine im Sammelgel konzentriert, bevor sie anschließend im Trenngel der Größe nach aufgetrennt und mit geeigneten Proteingrößenmarkern verglichen werden (Laemmli 1970). Die Polymerisation des dreidimensionalen Polyacrylamid-Gels wird durch Ammoniumpersulfat (APS) und TEMED katalysiert. Es wurden Gelkonzentrationen zwischen 7,5 % und 15 % genutzt. Gele mit niedrigem Acrylamid-Gehalt sind für die Proteinseparation von großen Proteinen geeignet. Für kleine Proteingrößen werden hochprozentige Gele gewählt. In der Probenaufbereitung und im Gel wurde das anionische Detergenz SDS verwendet. SDS ist negativ geladen und bindet an die Proteine, die diese Ladung annehmen. Folglich wandern die Proteine bei angelegter elektrischer Spannung zur Anode und werden im Gel ausschließlich nach ihrer Größe aufgetrennt. Zur Durchführung wurde die Elektrophorese-Apparatur Biometra Multigel verwendet. Zur Vorbereitung der Gelelektrophorese wurden die Glasplatten mit Ethanol gesäubert und in die Vorrichtung gespannt. Zwischen die Glasplatten wurde ein Gummi gelegt, der zur luftdichten Abdichtung diente. Die Lösung für das gewünschte Trenngel

wurde bis 2 cm unterhalb der Oberkante der Glasplatten gegossen und mit 1 cm Isopropanol überschichtet. Nach 20 Minuten war die Polymerisation abgeschlossen und das Isopropanol wurde abgegossen. Mit einem Filterpapier wurden Restbestände von Isopropanol entfernt. Das Sammelgel wurde anschließend auf das Trenngel geschichtet und ein mit Ethanol gesäuerter Kamm wurde luftblasenfrei zügig eingesetzt. Nach 30 minütiger Polymerisation konnte der Kamm durch vorsichtiges senkrechtes Herausziehen entfernt werden. Die Gelelektrophorese-Kammer wurde mit Elektrophorese-Laufpuffer aufgefüllt. In die Geltaschen wurden je 15 µl der vorbereiteten Proben aufgetragen. 7 µl eines Proteinmolekulargewichtmarkers wurden zusätzlich in die erste Tasche pipettiert, um die Banden nach der Elektrophorese auswerten zu können. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 130 V und 75 mA. Die Elektrophorese lief über einen Zeitraum von einer Stunde. Diese Zeit benötigte die Lauffront, um vollständig durch das Gel zu wandern.

**Tabelle 12: Zusammensetzung des Trenngels zur Herstellung von zwei Gelen.**

<b>Trenngelkonzentration</b>	<b>7,5 %</b>	<b>10 %</b>	<b>12 %</b>	<b>12,5 %</b>	<b>15 %</b>
<i>Aqua dest.</i>	10 ml	8,3 ml	7 ml	6,7 ml	5 ml
Trenngelpuffer	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml
Acrylamidgel 30	5 ml	6,7 ml	8 ml	8,3 ml	10 ml
Ammoniumpersulfat 10 %	300 µl	175 µl	160 µl	150 µl	125 µl
TEMED	7,5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl

**Tabelle 13: Zusammensetzung des Sammelgels zur Herstellung von zwei Gelen.**

<i>Aqua dest.</i>	4 ml
Acrylamidgel 30	635 µl
2M Tris HCL pH= 6,8	313 µl
SDS 20 %	25 µl
Ammoniumpersulfat 10 %	80 µl
TEMED	7 µl

**Trenngelpuffer**

2M TrisHCl pH= 8,8 375 ml  
 SDS-Lösung (20 %) 10 ml  
*Aqua dest.* ad 500 ml

**Elektrophorese-Laufpuffer**

Tris gepuffert 30,2 g  
 Glycin 188 g  
*Aqua dest.* Ad 1 l



### 3.2.3.2 Proteintransfer auf PVDF-Membran

Die durch Elektrophorese separierten Proteine wurden in diesem Schritt von dem Polyacrylamid-Gel auf eine PVDF-Membran transferiert (*Blotting*). Dieses Übertragungsverfahren beschreibt den eigentlichen Western-Blot (Towbin *et al.* 1979). Auch hier wandern die Proteine von der Kathode zur Anode und dementsprechend von dem Gel auf die Membran. Das Gel wurde zwischen den Glasplatten herausgenommen, wobei das Sammelgel mittels Papiertücher vom Trenngel entfernt wurde. Die PVDF-Membran wurde zunächst in 100 % Methanol für 5 Sekunden aktiviert und anschließend für 5 Minuten in *Aqua dest.* gespült. Danach wurde die Membran für 10 Minuten in Anode-Puffer 2 und das Gel für 5 Minuten in Kathode-Puffer äquilibriert. Der Ablauf des Western-Blots ist nachfolgend erläutert:

1. Zwei *Whatman*-Papiere in Anode-Puffer 1 tränken und blasenfrei auf die Blotting Apparatur legen.
2. Ein *Whatman*-Papier in Anode-Puffer 2 tränken und blasenfrei darüber platzieren.
3. Die aktivierte PVDF-Membran blasenfrei auf die drei darunter liegenden *Whatman*-Papiere legen.
4. Gel auflegen.
5. Weitere drei in Kathode-Puffer getränkte *Whatman*-Papiere luftblasenfrei auflegen.
6. Bevor die *Blotting*-Apparatur geschlossen wird, mit einem *Falcon* über den Aufbau rollen, so dass alle Luftblasen entfernt werden.

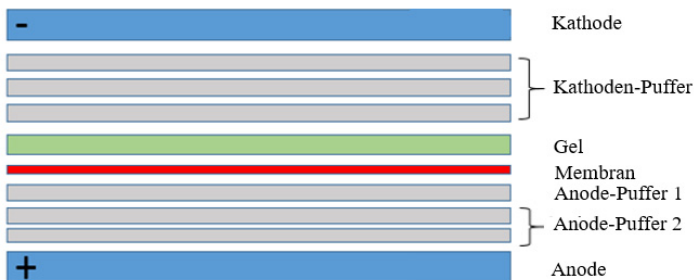


Abbildung 17: Schematischer Aufbau des Western-Blots.

Die *Whatman*-Papiere sind in grau, das Acrylamidgel in grün und die PVDF-Membran in rot dargestellt.

Der Transfer von einem Gel wurde bei einer Stromstärke von 72 mA durchgeführt. Für zwei Gele betrug die Stromstärke 144 mA. Die Dauer des Blottens belief sich auf eine Stunde. Nach dem Transfer wurde die Membran bei Raumtemperatur für eine Stunde in 5 % *Blocking*-Puffer inkubiert. Mit diesem Vorgang wurden unspezifische Bindungen auf der Membran gesättigt.

<b>Anode-Puffer 1</b>	
2M Tris Base	75 ml
Methanol (20 %)	100 ml
<i>Aqua dest.</i>	ad 500 ml
<b>Anode-Puffer 2</b>	
2M Tris Base	6,25 ml
Methanol (20 %)	100 ml
<i>Aqua dest.</i>	ad 500 ml
<b>Kathode-Puffer</b>	
40 mM $\epsilon$ -Aminocapronsäure	2,63 g
Methanol (20 %)	100 ml
SDS (20 %)	250 $\mu$ l
<i>Aqua dest.</i>	ad 500 ml
<b>5 % <i>Blocking</i>-Puffer</b>	
Magermilchpulver	2,5 g
TBS/T-Waschpuffer	50 ml
<b>TBS/T-Waschpuffer</b>	
10 x TBS pH 7,5	200 ml
<i>Tween 20</i>	2 ml
<i>Aqua dest.</i>	ad 2 l

### 3.2.3.3 *Proteindetektion*

Das Prinzip der indirekten Protein-Detektion beruht auf einem Primärantikörper, der durch einen markierten Sekundärantikörper erkannt wird. Diese sind entweder mit den Enzymen HRP (engl. *horse radish peroxidase*) oder AP (alkalische Phosphatase) gekoppelt. Nach dem Blocken der PVDF-Membran erfolgte die Dekoration mit den Antikörpern. Hierzu wurde die Membran bei 4°C über Nacht auf dem Schüttler mit dem antigenspezifischen Primärantikörper inkubiert. Ein dreimaliger Waschvorgang à 10, 5 und 5 Minuten mit 1 x TBS/T-Waschpuffer schloss daran an. Anschließend erfolgte die einstündige Inkubation mit dem passenden Sekundärantikörper. Dieser Schritt fand bei Raumtemperatur auf dem Schüttler statt. Danach wurde die Membran erneut mit 1 x

TBS/T gewaschen (1 x 15 Minuten, gefolgt von 3 x 5 Minuten). Letztlich fand die Detektion mittels selbst hergestellter ECL (engl. *enhanced chemiluminescence*)-Lösung bei Verwendung eines HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers statt. Die Membran wurde hierzu eine Minute lang mit der ECL-Lösung inkubiert und anschließend in eine mit Plastikfolie ausgekleidete Filmkassette überführt. Die Entwicklung des Films erfolgte in einer Dunkelkammer mit Hilfe von einer Entwicklermaschine. In Abhängigkeit des nachzuweisenden Proteins wurde der Film auf der Membran unterschiedlich lange exponiert. Die Visualisierung der Antikörperbindung mittels ECL-Entwicklung basiert auf der Anregung der HRP durch ein in der Detektionslösung enthaltenes Starterreagenz. Die dabei entstehende Chemolumineszenz wurde durch Umsetzung von Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und Oxidation von Luminol hervorgerufen. Das bei der Reaktion emittierte Licht belichtete einen Röntgenfilm.

Alternativ können die Banden mit einem Alkalische Phosphatase (AP)-gekoppelten Sekundärantikörper gefärbt werden. Dies erfolgte durch Inkubation mit einer AP-Lösung. Diese beinhaltet BCIP (5-Brom-4 Chlor-3 Indolylphosphat) und NBT (Nitroblau-Tetrazoliumsals). Hierbei wird BCIP durch enzymatische Abspaltung der Phosphatgruppe (katalysiert durch die alkalische Phosphatase) in Indoxyl überführt. Folglich tautomerisiert Indoxyl zu einem Keton, das in basischem Milieu (durch den AP-Inkubationspuffer bewerkstelligt) dimerisiert und unter Abspaltung von Protonen eine blaue Farbe entwickelt. Das freigesetzte Proton ( $H^+$ ) reduziert anschließend das zur Farbverstärkung eingesetzte NBT zu Diformazan (purpurfarben). Infolgedessen werden die Banden durch Ausfällung dieser beiden Farbstoffe an den Antikörper gebundenen Stellen in bläulicher Farbe sichtbar.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antikörper sind unter Kapitel 2.7 aufgelistet.

<b>TBS/T-Waschpuffer</b>	
10 x TBS pH 7,5	200ml
20 Tween	2 ml
Aqua dest.	ad 2 l
<b>10 x TBS pH 7,5</b>	
2 M Tris pH=7,5	100 ml
5 M NaCl	274 ml
Aqua dest.	Ad 1 l
<b>ECL-Lösung für 1 Membran</b>	
1M Tris HCL pH 8,5	1ml
90 mM Coumaric Acid	25 µl
250 mM Luminol	50 µl
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2,6 µl
Aqua dest.	ad 10 ml
<b>AP-Lösung für 1 Membran</b>	
AP-Inkubations-Puffer	10 ml
BCIP	33 µl
NBT	66 µl
<b>AP-Inkubationspuffer</b>	
100 mM NaCl <sub>2</sub>	
5mM MgCl <sub>2</sub>	
10 mM Tris pH 9,5	

### 3.2.3.4 Stripping der Membran

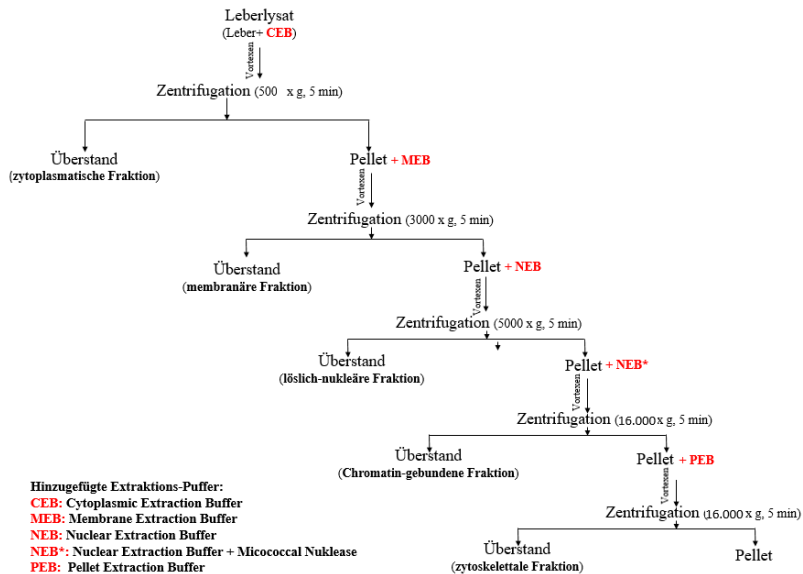
Um eine bereits mit Antikörpern benetzte Membran erneut für andere Proteinanalysen verwenden zu können, gibt es die Möglichkeit, schon gebundene Antikörper von der Membran zu lösen. Bei diesem *Stripping* werden sowohl Primär- und Sekundärantikörper als auch die zum Blocken verwendeten Milcheiweiße von der Membran entfernt. Daher ist eine erneute Inkubation mit *Blocking*-Puffer nötig. *Stripping* wird beispielsweise bei der Proteindetektion der entsprechenden Ladekontrollen angewandt. In der vorliegenden Arbeit wurden  $\beta$ -Aktin,  $\alpha$ -Tubulin oder die unphosphorylierten Formen der analysierten Antikörper als Ladekontrollen verwendet. Zur Durchführung dieser Methode wurde die Membran dreimal à 10 Minuten in TBS/T-Waschpuffer gewaschen. Es folgte die 30-minütige Inkubation in *Stripping*-Puffer auf dem Schüttler bei Raumtemperatur. Danach erfolgte erneut ein dreimaliger Waschvorgang mit TBS/T mit je 5 Minuten. Zuletzt fand das einstündige Blocken der Membran mit 5 % *Blocking*-Puffer statt, gefolgt von der erneuten Dekoration mit den gewünschten Antikörpern.

<b>Stripping-Puffer</b>	
Glycin	15 g
SDS	1g
<i>Tween 20</i>	10 ml
<i>Aqua dest.</i>	Ad 1 l
pH 2,2 einstellen	
<b>5 % Blocking-Puffer</b>	
Magermilchpulver	5 g
TBS/T-Waschpuffer	100 ml

### 3.2.4 Proteinfraktionierung

Mittels *Subcellular-Protein-Fraktionierungs-Kit* erfolgte die Separierung und Anreicherung von Proteinen aus fünf verschiedenen Zellkompartimenten. Mit dieser Methode können die Hepatoyzten in die zytoplasmatische-, membranäre-, löslich nukleäre-, Chromatin-gebundene-und zytoskelettale Fraktionen aufgetrennt werden. Das Prinzip der Methode basiert auf mehreren aufeinanderfolgenden Zentrifugationen mit Weiterbehandlung des Pellets und Gewinnung des Überstandes. Zur Durchführung wurden die Leberlysate mit spezifischen mitgelieferten Extraktionspuffern versetzt und das Gemisch anschließend zentrifugiert. Folglich befanden sich die löslichen Proteine im Überstand und das unlösliche Material setzte sich im Pellet ab und wurde weiterbehandelt. So erfolgte die stufenweise Trennung von Proteinen aus unterschiedlichen Zellkompartimenten.

Folgende Abbildung stellt die subzelluläre Fraktionierung schematisch dar:



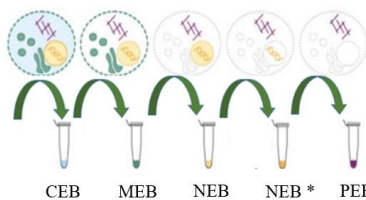
**Abbildung 18: Arbeitsschritte der Proteinfractionierung.**

Mittels *Subcellular*-Fraktionierungs-Kit der Firma *Thermo Fisher Scientific* erfolgte die Separierung und Anreicherung von Proteinen aus fünf verschiedenen Zellkompartimenten des Hepatozyten.

Anfangs wurden je 50 mg Lebergewebe auf Trockeneis eingewogen und in mit flüssigem Stickstoff heruntergekühlte 1,5 ml Eppendorf-Cups überführt. Die im Kit mitgelieferten Extraktions-Puffer (CEB, MEB, NEB, PEB) wurden vor Gebrauch mit den beigelegten Protease-Inhibitoren (*Halt Protease Inhibitor Cocktail*) im Verhältnis 1:100 versetzt. Die Reagenzien wurden bis zum weiteren Gebrauch auf Eis gelagert. Die nachfolgenden Zentrifugationen erfolgten bei 4°C.

Zu Beginn wurden die eingewogenen Leberproben mit je 505 µl CEB versetzt und 5 Sekunden gevortext. Das Gemisch wurde über ein Sieb (*Pierce Tissue Strainer*, 250µm) bei 500 x g und 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues vorgekühltes 1,5 ml Eppendorf-Cup gefüllt und beinhaltete die zytoplasmatische Fraktion. Im

Anschluss wurde das Pellet mit 328,5 µl MEB versetzt und erneut 5 Sekunden gevortext. Während der folgenden 10 Minuten wurden die Proben alle 2 Minuten für je 5 Sekunden gevortext und zwischenzeitlich auf Eis gelagert. Im Anschluss erfolgte eine weitere Zentrifugation bei 3000 x g und 5 Minuten. Der Überstand umfasste die membranäre Fraktion. Zum Pellet wurden 111,1 µl NEB pipettiert und anschließend 15 Sekunden gevortext. Eine 30-minütige Inkubation der Proben bei 4°C folgte. Während dieser Inkubationszeit wurden die Proben alle 5 bis 10 Minuten gevortext. Danach wurde eine Zentrifugation bei 5000 x g und 5 Minuten vorgenommen. Der Überstand wurde erneut in ein vorgekühltes Eppendorf-Gefäß überführt und stellte die lösliche Kern-Fraktion dar. Um die Chromatin-gebundene Fraktion herauszulösen, wurden zum Pellet 87,2 µl NEB\* (NEB+ *Micrococcal Nuklease*) hinzugegeben und 15 Sekunden gemischt. Die Proben wurden bei Raumtemperatur 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Proben gevortext und bei Raumtemperatur und 16.000 x g, 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand umfasste die Chromatin-gebundene Fraktion. Im Anschluss daran wurden zum Pellet 60,8 µl PEB pipettiert und das Gemisch 15 Sekunden gevortext. Die Proben wurden 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und abschließend 5 Minuten mit 16.000 x g zentrifugiert. Der am Ende gewonnene Überstand beschreibt die Zytoskelett-Fraktion. Bis zur weiteren Verwendung wurden die neu gewonnenen Proben bei -80°C gelagert.



**Abbildung 19: Schematische Darstellung der subzellulären Fraktionierung.**

CEB: *Cytoplasmic Extraction Buffer*, MEB: *Membrane Extraction Buffer*, NEB: *Nuclear Extraction Buffer*, NEB\*: *Nuclear Extraction Buffer + Micrococcal Nuklease*, PEB: *Pellet Extraction Buffer*. Modifiziert nach (Subcellular Protein Fractionation Kit for Cultured Cells - Thermo Fisher Scientific).

Um die mit dieser Fraktionierungsmethode gewonnenen Proteinlysate für spätere Western-Blot Analysen nutzen zu können, wurden sie in einem 3:1 Verhältnis mit 1x Lämmli-Puffer versetzt. Hierzu wurden je 33 µl des Proteinlysats mit 11 µl 1 x Lämmli-

Puffer in einem neuen Eppendorf-Cup vermischt und anschließend im Thermomixer bei 99°C für 5 Minuten aufgekocht. Die Taschen des Gels wurden mit je 20 µl Probenauftrag beladen.

### 3.2.5 Zytokin-Array

Zytokine und Chemokine sind extrazelluläre Signalmoleküle, über die die Zell-Zell-Kommunikation stattfinden kann. Sie werden von diversen Zellen ausgeschüttet und spielen eine wichtige Rolle in vielen biologischen Prozessen, z.B. beim Zellwachstum, der Zelldifferenzierung, der Genexpression, der Migration sowie bei Immun- und Entzündungsreaktionen. Bei den meisten biologischen Prozessen interagieren unzählige Zytokine wie in einem Netzwerk, deren Regulation wiederum durch die An- bzw. Abwesenheit von anderen Zytokinen gesteuert wird (Cheng *et al.* 2017). Das Kit *Mouse Cytokine Array Panel A* stellt eine sensitive Methode dar, um Zytokine aus murinen Blutseren zu detektieren und zwischen unterschiedlichen Proben zu vergleichen. Mithilfe dieses Zytokin-Arrays lässt sich eine quantitative und qualitative Aussage über die im Serum der Mäuse enthaltenen Zytokine machen. Dieses Verfahren stellt prinzipiell eine Variation der ELISA-Methode dar. Auf einer Nitrozellulosemembran sind 40 Antikörper, die 40 verschiedene Zytokine detektieren, gebunden. Diese immobilisierten Antikörper sind in verschiedenen runden Feldern auf der Membran gebunden. Durch Inkubation der Nitrozellulosemembran mit den zu analysierenden Blutseren werden die darin befindlichen Zytokine von den auf der Membran fixierten Antikörpern spezifisch gebunden. Die zu untersuchenden Seren wurden zuvor mit einem im Kit beigelieferten Antikörpermix versetzt. Dieser enthält Biotin-gekoppelte Antikörper, die mit den auf der Membran fixierten Primärantikörpern einen Primärantikörper-Zytokin-Sekundärantikörper-Komplex bilden. Durch anschließende Inkubation mit einem mitgelieferten Streptavidin-HRP-Reagenz sowie nachfolgender Chemilumineszenz konnte dieser „Sandwich-Komplex“ sichtbar gemacht werden. Es wurden die drei Gruppen Tg, Tg+1W PBA und Tg+8W PBA durch Bildung von Pools untersucht. Aufgrund der begrenzten Menge an Blutserum sowie der zu erwartenden stärker ausgeprägten Reaktion bei männlichen Tieren, wurden nur männliche Mäuse untersucht. Zur Analyse wurden pro Gruppe insgesamt 200 µl Mausserum verwendet. Die einzelnen Pools setzten sich wie folgt zusammen:



- Gruppe Tg: n = 3, 66,6 µl Blutserum pro Maus
- Gruppe Tg+1W PBA: n = 5, 40 µl Blutserum pro Maus
- Gruppe Tg+8W PBA: n = 4, 50 µl Blutserum pro Maus

Zur Durchführung des Versuchs wurden alle benötigten Reagenzien des Kits auf Raumtemperatur gebracht und nach Herstellerprotokoll vorbereitet. Die Blutseren wurden auf Eis aufgetaut. Zur Analyse von einer Gruppe wurde je eine im Kit mitgelieferte Membran benötigt. Die Behandlung der drei Membranen erfolgte parallel, sodass während des gesamten Experiments gleiche Versuchsbedingungen herrschten und die Ergebnisse letztlich miteinander verglichen werden konnten. Die nachfolgend beschriebene Durchführung gilt für die Behandlung von einer Membran, dementsprechend für die Analyse von einer Mausgruppe.

Zu Beginn wurde die Membran eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler in 2 ml mitgeliefertem *Array Buffer 6 (Blocking-Puffer)* inkubiert. Währenddessen fand die Vorbereitung der zu analysierenden Seren statt. Hierzu wurden in einem Falcon 200 µl gepooltes Mausserum mit 0,5 ml *Array Buffer 4* versetzt und anschließend mit *Array Buffer 6* auf 1,5 ml aufgefüllt. Danach wurden 15 µl des mitgelieferten *Mouse Cytokine Array Panel A Detection Antibody Cocktail* dazu pipettiert. Die Proben wurden gemischt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem einstündigen Block der Membran wurde der *Array Buffer 6* abgegossen und die vorbereitete Serumprobe auf die Membran pipettiert. Die Inkubation der Membran erfolgte bei 4°C auf dem Schüttler über Nacht. Am nächsten Tag erfolgte ein dreimaliger Waschvorgang mit 1 x *Wash Buffer* (im Kit mitgeliefert) zu je 10 Minuten. Im Anschluss daran wurde die Membran mit 2 ml Streptavidin-HRP-Puffer (4 µl Streptavidin-HRP + 8 ml *Array Buffer 6*) für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Ein erneuter dreimaliger Waschvorgang zu je 10 Minuten schloss sich an. Zuletzt wurde die Membran in eine mit Folie ausgekleidete Röntgenfilmkassette gelegt und mit 1 ml *Chemi Reagent Mix* (im Kit mitgeliefert) begossen. Die Filmentwicklung in der Dunkelkammer schloss sich an. Die Zeit der Membranexposition betrug 1-10 Minuten. Die Auswertung erfolgte anhand der Intensität der Graustufen der sichtbar gemachten Spots. Hierzu wurde das Programm *BioDoc-Analyzer* verwendet, welches die Graustufen der einzelnen Spots errechnet. Hierdurch können die detektierten Zytokine quantifiziert und die drei analysierten Gruppen miteinander verglichen werden.

### **3.3 Histologische Methoden**

#### **3.3.1 Einbettung in Paraffin**

Vor der eigentlichen immunhistologischen Färbung erfolgte die gewebeerhaltende Fixierung in Formalin sowie die Einbettung in Paraffin des zu analysierenden Lebergewebes (Schmitz *et al.* 2010). Hierzu wurden die entnommenen Lebern über Nacht im Kühlschrank mit 1 % Paraformaldehyd-Lösung (PFA) fixiert und am folgenden Tag 5 x in PBS/T-Puffer gewaschen. Im Anschluss daran erfolgte die Entwässerung anhand einer aufsteigenden Alkoholreihe und die Einbettung in Paraffin. Mittels Mikrotom wurden 3-5 µm dicke Schnitte angefertigt. Die Objektträger wurden bis zur weiteren Bearbeitung bei Raumtemperatur gelagert.

#### **3.3.2 Immunhistochemie**

Die Leberschnitte wurden mittels absteigender Alkoholreihe entparaffiniert und rehydriert. Der Aufbau der Alkoholreihe sah wie folgt aus: 2 x 10 Minuten Xylol, 1 x 5 Minuten Xylol, 2 x 5 Minuten 99,6 % Ethanol, 1 x 5 Minuten 96 % Ethanol, 1 x 2 Minuten 70 % Ethanol. Danach wurden die Schnitte ca. 5 Minuten in kaltem Leitungswasser fließend gewässert. Aufgrund der beim Fixierungsprozess entstandenen Maskierung der Antigenepitope erfolgte im nächsten Schritt die Freilegung der Epitope mittels Zitratpuffer. Dieser Schritt wird als Antigen-Demaskierung bezeichnet. Die in Zitratpuffer getränkten Schnitte wurden 5 x 2 Minuten in der Mikrowelle bei 750 Watt erhitzt und anschließend ca. 30 Minuten abgekühlt. Ein 5-minütiger Waschvorgang in PBS/T-Puffer folgte. Im nächsten Schritt erfolgte der 15-minütige Block der endogenen hepatischen Peroxidasen durch eine 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung. Danach wurde erneut 5 Minuten mit kaltem Leitungswasser fließend gewässert. Es schloss sich ein zweimaliger Waschvorgang mit PBS/T-Puffer zu je 2 Minuten an. Im Anschluss daran wurden die Objektträger für eine Stunde mit 2,5 % *normal horse-serum* (Kit) inkubiert. Dadurch wurden unspezifische Bindungen blockiert. Die Objektträger wurden anschließend auf Papiertüchern dekantiert und erneut für 3 x 2 Minuten in PBS/T-Puffer gewaschen. Nun erfolgte die nächtliche Inkubation bei 4°C mit dem Primärantikörper bzw. der spezifischen Isotypen-Kontrolle. Für letztere werden spezifische IgG-Antikörper der gleichen Spezies verwendet. Man führte diese Kontrolle durch, um unspezifische Bindungsstellen des Erstantikörpers aufzudecken. Zur Isotypen-Kontrolle diente in dieser Arbeit der *ChromPure Rabbit* IgG-Antikörper, der vom Hersteller mit einer

Konzentration von 11,2 mg/ml beschrieben ist. Demnach ergibt sich ein Verdünnungsverhältnis von 1:5600 für die Isotypenkontrolle bei einem 1:100 verdünnten Primärantikörper. Analog dazu lag eine 1:28000 Verdünnung bei einem 1:500 verdünnten Primärantikörper vor.

*Rechenerklärung für einen 1:100 verdünnten Primärantikörper:*

*Stamm-Konzentration des Primärantikörpers: 200µg/ml, d.h. 200:100=2 µg IgG sind in der Verdünnung des Antikörpers gelöst, Stammkonzentration der Isotypenkontrolle: 11,2 mg/ml, d.h. 11200:2=5600 und somit eine 1:5600 Verdünnung.*

Die Isotypen-Kontrolle war durchweg negativ, sodass unspezifische Bindungen der Primärantikörper ausgeschlossen werden konnten.

Nach 24 Stunden wurden die Objektträger auf einem Papiertuch dekantiert. Um eine Kontamination zwischen IgG- und Primärantikörper zu vermeiden, wurden die Objektträger in einer separaten Küvette mit PBS/T-Waschpuffer vorgespült. Das Überführen in eine weitere Küvette und viermaliges Waschen in PBS/T-Puffer zu je 5 Minuten folgten. Im Anschluss daran erfolgte die 20-minütige Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Kit *Impress Reagent*). Nach erneutem Waschen (3 x 5 Minuten) folgte das Entwickeln der Schnitte mit dem *VectorVip* Kit nach Herstellerprotokoll. Dieses erfolgte unter ständiger Sichtkontrolle am Mikroskop. Durch die Entwicklung mit *VectorVip* stellen sich die eingesetzten Primärantikörper histologisch in lila dar. Die Schnitte wurden danach 5 Minuten in Leitungswasser fließend gewässert. Der nächste Schritt umfasste die 1,5-minütige Kernfärbung mit Methylgrün bei 60°C auf einer Heizplatte. Der sich anschließende Waschvorgang in fließendem Leitungswasser erfolgte so lange bis die erwünschte Farbintensität der Schnitte erreicht war. Letztlich wurden die Schnitte mit einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert. Hierzu wurden die Objektträger wie folgt getränkt: 2 Minuten 96 % Ethanol, 2 x 5 Minuten Isopropanol und 3 x 5 Minuten Xylol. Abschließend erfolgte die Eindeckung in Pertex, die Bedeckung mit Deckgläsern und die Trocknung der Objektträger. Alle verwendeten Antikörper sind im Kapitel 2.7 aufgelistet.

**1 % PFA-Lösung**

PFA-Pulver 1g  
*Aqua dest.* 100 ml

**3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung**

PBS 54 ml  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 6 ml

**PBS/T-Waschpuffer**

10xPBS 200ml  
*Tween 20* 1 ml  
*Aqua dest.* Ad 2 l

**10x PBS**

NaCl 80 g  
KCl<sub>2</sub> 2 g  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 11,5 g  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,45 g  
*Aqua dest.* Ad 1 l

**Zitratpuffer**

Zitratlösung 1 9 ml  
Zitratlösung 2 41 ml  
*Aqua dest.* 500 ml  
pH 6,9

**Zitratlösung 1**

0,1 M Zitronensäure 21,01 g  
*Aqua dest.* Ad 1 l  
pH 2,1

**Zitratlösung 2**

0,1 M Trinatriumcitrat-  
Dihydrat (C<sub>6</sub>H<sub>9</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>9</sub>) 29,41 g  
*Aqua dest.* Ad 1 l  
pH 8,4

**Methylgrün-Lösung**

Methylgrün 0,5 g  
0,1 M Natriumacetat-Puffer 100ml

**0,1 M Natriumacetat-Puffer**

Natriumacetat, Trihydrat 1,36 g  
*Aqua dest.* 100 ml

### 3.3.3 Hämatoxylin- und Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin- und Eosin-Färbung (H&E-Färbung) dient als routinemäßig durchgeführte Übersichtsfärbung. Während der Farbstoff Hämatoxylin alle basophilen Strukturen blau färbt, werden azidophile Strukturen durch den Farbstoff Eosin rot dargestellt. Dementsprechend färben sich beispielsweise DNA, Zellkern und Ribosomen blau und zytoplasmatische Komponenten rot. Die zu untersuchenden Leberproben wurden wie in Kapitel 3.3.2 beschrieben entparaffiniert und rehydriert. Im Anschluss daran erfolgte die 5-minütige Inkubation der Objektträger mit Hämalaun-Lösung. Danach wurden sie unter fließendem Leitungswasser 5 Minuten gewässert. Im nächsten Schritt wurden die Objektträger mit Eosin-Lösung für 5 Minuten bedeckt und anschließend erneut unter fließendem Leitungswasser gewässert. Nun erfolgte die Dehydrierung mittels aufsteigender Alkoholreihe (2 Minuten 96 % Ethanol, 2 x 5 Minuten Isopropanol und 3 x 5 Minuten Xylol). Letztlich wurden die Objektträger, wie auch bei der Immunhistologie, mit Pertex und Deckgläsern beschichtet und getrocknet.

### 3.4 Analyse der Serum-Transaminasen

Die Alanin-Transaminase (ALT) und Aspartat-Transaminase (AST) wurden mittels Teststreifen am Reflotron®-Analyzer gemessen. Für jede Probe wurden Doppelmessungen durchgeführt und anschließend wurde der Mittelwert gebildet.

### 3.5 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung diente das Programm SPSS Version 22, wobei zur statistischen Ergebnisanalyse der *Mann-Whitney-U-Test* für unabhängige Stichproben angewandt wurde. Aufgrund der geringen Gruppengröße von  $n=4-10$  wurde ein nichtparametrischer Test durchgeführt. Über diesen Test lassen sich Mittelwerte und Standardabweichungen zweier Gruppen miteinander vergleichen und auf mögliche Signifikanzen prüfen. In dieser Arbeit wurde immer auf die Kontrollgruppe (Tg) Bezug genommen. Die Nullhypothese  $H_0$  lautete „die Stichproben unterscheiden sich nicht“. Die Alternativhypothese  $H_1$  lautete „die Stichproben unterscheiden sich“. Von der Annahme der Alternativhypothese konnte ausgegangen werden, wenn sich die Gruppen voneinander signifikant unterschieden. Eine 2-seitige Signifikanz von  $p \leq 0,05$  wurde dabei als signifikanter Unterschied definiert. Grafisch wurde dieses Signifikanzniveau mit \* für  $p \leq 0,05$  dargestellt. Die Stichprobenanzahl  $n$  der einzelnen Messungen ist bei

jeder Ergebnisauswertung explizit angegeben. Es wurde durchschnittlich ein Stichprobenumfang von  $n=4-5$  pro Subgruppe (Tg, Tg+1W PBA, Tg+8W PBA) gewählt. Da es sich um eine explorative Studie handelte, wurde auf ein multiples Testverfahren verzichtet, was allerdings in Folgearbeiten unserer Arbeitsgruppe angestrebt wird.

Die grafische Darstellung der Ergebnisse, in Form von *Box-and-Whisker Plots*, erfolgte ebenfalls mit dem Programm *SPSS* Version 22 anhand der vorgegebenen Standardeinstellungen. Hierbei stellt der obere Balken des *Boxplots* die 75 %-Perzentile dar, der untere die 25 %-Perzentile. Der Querbalken innerhalb der Box kennzeichnet den Medianwert der Daten. Die Enden der vertikalen Linien (*Whiskers*) zeigen das Maximum und das Minimum der Verteilung an. Jeder Datenpunkt, der vom Mittelwert mehr als 1,5 Standardabweichungen entfernt ist, ist durch einen Kreis um die Fallnummer im *Boxplot* gekennzeichnet. Diese Datenpunkte gelten als leichte Ausreißer. Sind die Werte vom Mittelwert mehr als 3 Standardabweichungen entfernt, sind sie mit einem Sternchen (\*) markiert und gelten als extreme Ausreißer. Die Messergebnisse der qRT-PCR und des *Microarrays* wurden als *fold change* (entspricht der  $x$ -fachen Änderung) dargestellt. Die Berechnung der relativen Änderung erfolgte hierbei nach der  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode (Livak und Schmittgen 2001). Der *fold change* wird hierbei positiv, wenn das analysierte Gen einer bestimmten Fallgruppe im Vergleich zu einer Kontrollgruppe vermehrt transkribiert wird. Analog dazu liegt ein negativer *fold change* bei einer verminderten Gen-Transkription vor. Die Kontrollgruppe Tg nimmt hierbei einen *fold change* Wert von 1 an.

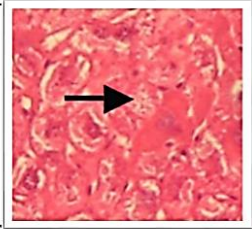
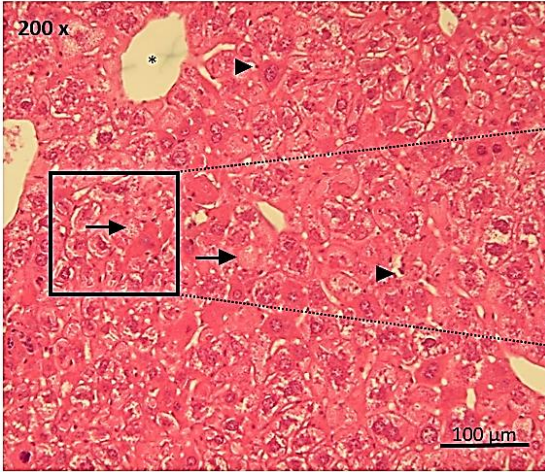
## **4 Ergebnisse**

### **4.1 H&E-Färbung**

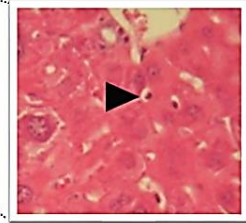
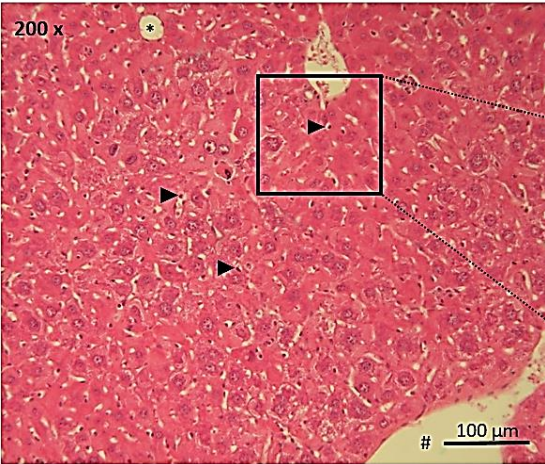
Die H&E-Färbung diente der genauen Betrachtung der Lebermorphologie und -pathologie. Es wurden alle 30 Versuchstiere histologisch analysiert, wobei je eine repräsentative Maus aus jeder Gruppe abgebildet wurde.

Der Grundaufbau des Leberparenchyms wurde in diesen Leberschnitten sehr gut ersichtlich: das Leberläppchen mit Zentralvene in der Mitte als morphologische Baueinheit, die radiär auf die Zentralvene zulaufenden Lebersinusoiden, sowie Gefäßanschnitte der Portalvene. Das Bindegewebe ist im Vergleich zum Menschen bei der Maus weniger stark ausgeprägt, sodass die Abgrenzung der einzelnen Leberläppchen nur eingeschränkt möglich war. Die Glisson-Trias ist bei den murinen Leberfärbungen aufgrund der spärlich ausgebildeten Bindegewebszwickeln, an den Ecken zusammentreffender Leberläppchen, schwierig aber dennoch eindeutig zu identifizieren. Weiterhin zeigten die angefärbten Leberschnitte, in der Abbildung 20 dargestellt, Milchglashepatozyten (vgl. Kapitel 1.4) sowie eine solitäre inflammatorische Leukozyteninfiltration. Ein Milchglashepatozyt ist im vergrößerten Ausschnitt der Abbildung 20 in der Gruppe Tg ersichtlich. Die Leberschnitte der Gruppen Tg+1W PBA und Tg+8W PBA weisen ebenfalls Milchglashepatozyten auf (nicht abgebildet). Die Entzündungszellen sind nahe der Portalfelder und Septen lokalisiert. Nach PBA-Behandlung wurden vermehrt Leukozyten ermittelt.

Tg

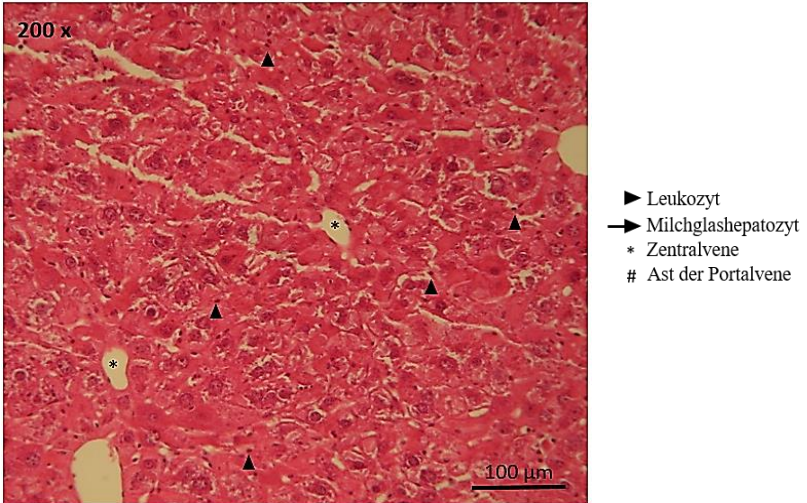


Tg+1W PBA





### Tg+8W PBA



**Abbildung 20: H&E-Färbung des Lebergewebes zur Übersichtsdarstellung.**

In der H&E-Färbung wird der Grundaufbau des murinen Leberparenchyms ersichtlich. Abgebildet sind drei repräsentative männliche Mäuse aus den Gruppen Tg, Tg+1W PBA und Tg+8W PBA. Man erkennt das Leberläppchen mit Zentralvene in der Mitte als morphologische Baueinheit, die radiär auf die Zentralvene zulaufenden Lebersinusoiden, sowie Gefäßanschnitte der Portalvene. Die Lebermorphologie der HBV-transgenen Mäuse zeigte das Milchglasphänomen (abgebildet in der unbehandelten Gruppe Tg) (Chisari *et al.* 1989). Das Bindegewebe ist im Vergleich zum Menschen bei der Maus weniger ausgeprägt. Die Leberschnitte zeigen Leukozyten, welche nahe der Portalfelder und Septen lokalisiert sind. Nach PBA-Behandlung ermittelt man eine erhöhte Anzahl an Leukozyten. Die Leberschnitte der Gruppen Tg+1 W PBA und Tg+8 W PBA weisen mehr Leukozyten als die Gruppe Tg auf. Das Milchglasphänomen wurde in den unbehandelten und behandelten Gruppen detektiert und unterscheidet sich nicht in Abhängigkeit der PBA-Behandlung. Nekrotische Areale sind weder in der unbehandelten Gruppe noch in den PBA-behandelten Gruppen erkennbar. Die vergrößerten Bildausschnitte am rechten Rand zeigen in der Gruppe Tg beispielhaft einen Milchglashepatozyten und in der Gruppe Tg+1W PBA einen Leukozyten. Maßeinheit: 100 µm, Vergrößerung: 200 x.

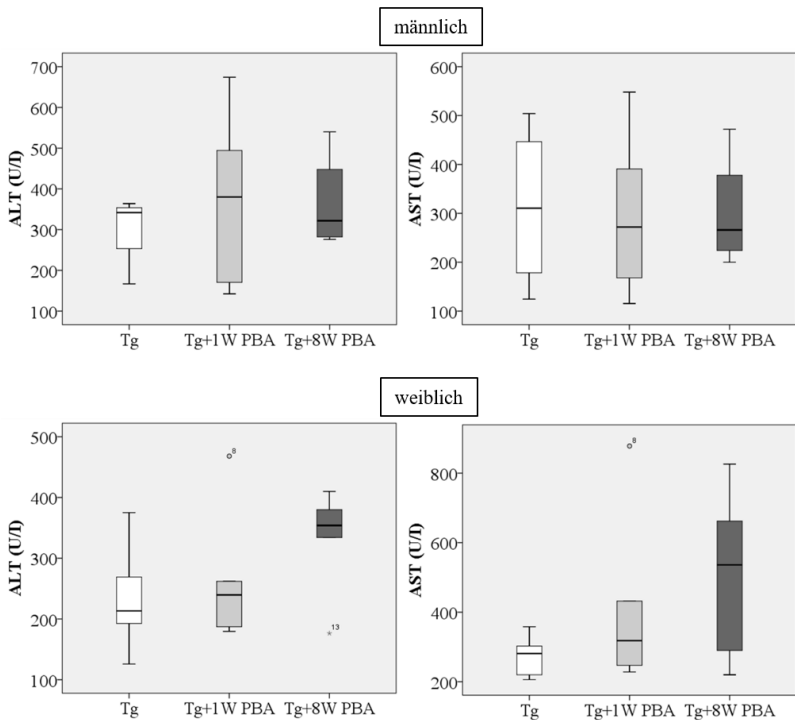
## 4.2 Analyse der Serum-Transaminasen zur Einschätzung der

### Leberintegrität

Um die Auswirkungen der PBA-Behandlung auf die allgemeine Leberintegrität zu analysieren, wurden die Transaminasen ALT und AST mittels Teststreifen am Reflotron®-Gerät gemessen. Es wurden hierbei die Mittelwerte der drei Gruppen miteinander verglichen.

Ein Anstieg der Transaminasen-Konzentration ist auf eine hepatische Schädigung zurückzuführen, da geschädigte Hepatozyten eine permeable Zellmembran aufweisen und so vermehrt Enzyme ins Blut übertreten. Die AST ist im Zytoplasma der Hepatozyten lokalisiert. Die ALT stammt sowohl aus dem Zytoplasma, als auch aus den Mitochondrien und spiegelt daher eine ausgeprägtere Schädigung wider. Die Höhe der ALT-Konzentration gilt als sensitiver Marker einer hepatozellulären Schädigung (Blomeyer *et al.* 2014).

Beim Vergleich der mit PBA behandelten männlichen, sowie weiblichen Mäuse mit der unbehandelten Kontrollgruppe wurde kein signifikanter Unterschied bei der Transaminasenmessung detektiert. Bei den weiblichen Tieren kam es zu einem tendenziellen Anstieg der Mittelwerte von ALT und AST nach PBA-Behandlung, wobei das Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$  nicht erreicht wurde (ALT: Tg gegen Tg+1W PBA 1,15-facher Anstieg, Tg gegen Tg+8W PBA 1,43-facher Anstieg; AST: Tg gegen Tg+1W PBA 1,52-facher Anstieg, Tg gegen Tg+8W PBA 1,83-facher Anstieg). Bei einem größeren Stichprobenumfang  $n$  hätte man vermutlich signifikante Werte bei der Messung der Transaminasen weiblicher Tiere erzielt.



**Abbildung 21: Analyse der Transaminasen im Blutserum der Mäuse.**

Die Leberserumparameter zeigten keine signifikante Veränderung nach PBA-Gabe. Die Mittelwerte der Transaminasen ALT (links) und AST (rechts) der männlichen und weiblichen Mäuse sind anhand von Boxplots dargestellt. Die männlichen Tiere weisen keine Veränderung der Transaminasen nach PBA-Behandlung auf. Bei den weiblichen Tieren kommt es zu einem tendenziellen Anstieg der Transaminasen nach PBA-Behandlung (ALT: Tg gegen Tg+1W PBA 1,15-facher Anstieg, Tg gegen Tg+8W PBA 1,43-facher Anstieg und AST: Tg gegen Tg+1W PBA 1,52-facher Anstieg, Tg gegen Tg+8W PBA 1,83-facher Anstieg). Das Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$  wurde nicht erreicht; männlich: Tg n=4, Tg+1W PBA n=5, Tg+8W PBA n=4; weiblich: Tg n=5, Tg+1W PBA n=5, Tg+8W PBA n=5.

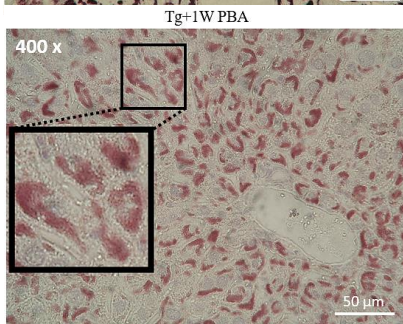
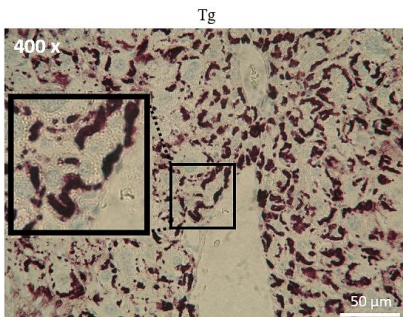
Aus diesen Ergebnissen wurde deutlich, dass die Lebern PBA-behandelter Mäuse keinen gravierenden Schaden von der PBA-Behandlung nahmen.

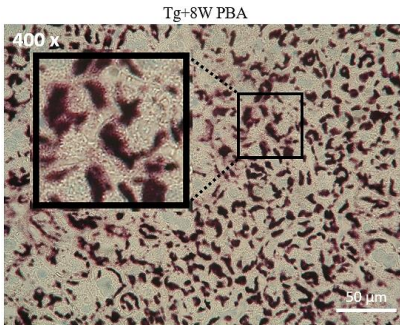
## 4.3 HBsAg-Expression im Lebergewebe

### 4.3.1 Immunhistochemische Färbung von HBsAg

Mittels der immunhistochemischen Färbungen konnte die Akkumulation der HBV-Hüllproteine im ER der Hepatozyten illustriert werden (Li *et al.* 2016).

In Abbildung 22 ist die immunhistochemische Färbung von HBsAg (lila) im Lebergewebe männlicher HBV-transgener Mäuse dargestellt. Verglichen wurden die Leberschnitte unbehandelter Mäuse (Tg) mit PBA-behandelten Mäusen (Tg+1W PBA und Tg+8W PBA). Die Hepatozyten zeigten eine Färbung des HBV-Hüllproteins im ER. In der Gruppe Tg liegen diese HBV-Oberflächenproteine als scharf abgrenzbare und dunkellila gefärbte Aggregate im ER der Hepatozyten vor. Die Leberschnitte PBA-behandelter Mäuse zeigten ein verändertes intrazelluläres Aggregationsmuster mit konsekutiver Feinverteilung der durch Überexpression akkumulierenden HBV-Hüllproteine im ER. Diese Feinverteilung wird durch die unscharfe Abgrenzbarkeit (Auflockerung) der HBsAg-Aggregate sowie deren hellere Farbe in der Gruppen Tg+1W PBA sichtbar gemacht. Die Auflösung der Aggregate ist in den über eine Woche mit PBA behandelten Mäusen stärker ausgeprägt als in den Mäusen, die über acht Wochen mit PBA behandelt wurden.





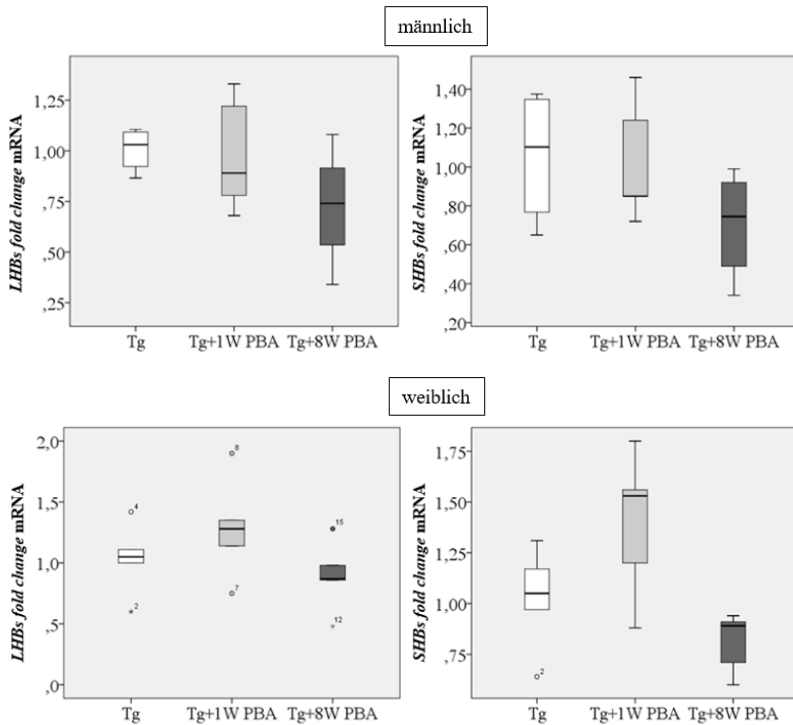
**Abbildung 22: Immunhistochemische Färbung von HBsAg im Lebergewebe.**

Abgebildet sind drei repräsentative männliche Mäuse aus den Gruppen Tg, Tg+1W PBA und Tg+8W PBA. Die Färbungen zeigen eine Akkumulation der HBV-Oberflächenproteine im ER. In der Gruppe Tg liegen diese HBV-Oberflächenproteine als scharf abgrenzbare und dunkellila gefärbte Aggregate im ER der Hepatozyten vor (siehe Vergrößerungs-Ausschnitt). Eine Auflockerung dieser Proteinaggregate wurde durch die PBA-Behandlung induziert. Diese Auflockerung wird durch die unscharfe Abgrenzbarkeit der HBsAg-Aggregate sowie deren hellere Farbe in der Gruppen Tg+1W PBA sichtbar gemacht. Maßeinheit: 50 µm, Vergrößerung: 400 x.

#### 4.3.2 qRT-PCR der HBsAg-Expression

Die transkriptionelle Regulation der HBsAg-Expression wurde mittels qRT-PCR überprüft.

Signifikante Unterschiede der *LHBs*- und *SHBs*-Expression nach PBA-Gabe wurden hierbei bei den männlichen und weiblichen Tieren nicht ermittelt (*LHBs*/männlich: Tg gegen Tg+1W PBA  $p=0,81$ , Tg gegen Tg+8W PBA  $p=0,11$ ; *SHBs*/männlich: Tg gegen Tg+1W PBA  $p=0,80$ , Tg gegen Tg+8W PBA  $p=0,15$ ; *LHBs*/weiblich: Tg gegen Tg+1W PBA  $p=0,25$ , Tg gegen Tg+8W PBA  $p=0,25$ ; *SHBs*/weiblich: Tg gegen Tg+1W PBA  $p=0,12$ , Tg gegen Tg+8W PBA  $p=0,07$ ).



**Abbildung 23: mRNA-Expression von *LHBs* und *SHBs* im Lebergewebe.**

Mittels qRT-PCR wurde die Genexpression von *HbS*Ag gemessen und als *fold change* (x-fache Expression) abgebildet. Die mRNA-Expression in den PBA-behandelten Gruppen Tg+1W PBA und Tg+8W PBA war im Vergleich zur unbehandelten Gruppe Tg bei beiden Geschlechtern nicht signifikant verändert. Als Kontrolle diente  $\beta$ -*Aktin*; männlich: Tg n=4, Tg+1W PBA n=5, Tg+8W PBA n=4; weiblich: Tg n=5, Tg+1W PBA n=5, Tg+8W PBA n=5.

### 4.3.3 Western-Blot-Analyse der HBsAg-Expression

Die immunhistochemischen Beobachtungen wurden im nächsten Schritt mit einer semiquantitativen Western-Blot-Analyse an repräsentativen Mäusen überprüft. Der hierzu genutzte polyklonale Antikörper Anti-HBsAg richtet sich gegen die drei Oberflächenproteine LHBs, MHBs und SHBs. Bei der HBsAg-transgenen Maus werden hauptsächlich LHBs und SHBs exprimiert.

Die einwöchige PBA-Behandlung induzierte einen Anstieg der Oberflächenproteine im Lebergewebe. Es zeigten sich stärkere SHBs-Banden bei den transgenen Tieren, die über eine Woche mit PBA gefüttert wurden (vgl. Abb. 24). Die hepatische LHBs-Menge wurde durch die einwöchige PBA-Behandlung nicht verändert.  $\alpha$ -Tubulin diene in diesem *Assay* als Housekeeping Gen und bestätigt die gleichmäßige Beladung der Proben.

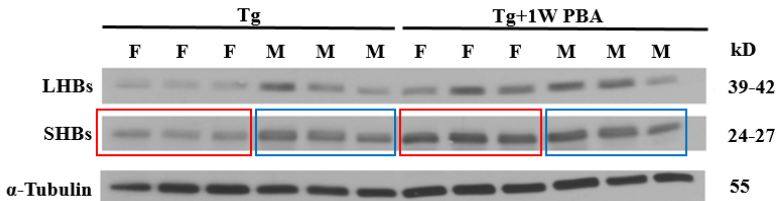


Abbildung 24: Western-Blot-Analyse der hepatischen HBsAg-Expression in der Tg+1W PBA-Gruppe.

Die Western-Blot-Banden zeigen je drei repräsentative männliche (M) und drei weibliche (F) Mäuse aus den Versuchsgruppen Tg und Tg+1W PBA. Die Antikörper sind gegen LHBs und SHBs gerichtet. Als Ladekontrolle diente  $\alpha$ -Tubulin. Es zeigten sich stärkere SHBs-Banden bei den transgenen Tieren, die über eine Woche mit PBA gefüttert wurden. Die roten bzw. blauen Rahmen heben diese Banden hervor. Die PBA-Behandlung führte zu keiner Veränderung in der LHBs-Menge; Tg n=3, Tg+1W PBA n=3, Tg+8W PBA n=3.

Die Western-Blot-Analyse nach achtwöchiger PBA-Behandlung ist in Abbildung 25 dargestellt. Es zeigten sich keine Veränderungen in der LHBs- und SHBs-Menge im Lebergewebe beider Geschlechter.



**Abbildung 25: Western-Blot-Analyse der hepatischen HBsAg-Expression in der Tg+8W PBA-Gruppe.**

Die Western-Blot-Banden zeigen je drei repräsentative männliche (M) und drei weibliche (F) Mäuse aus den Versuchsgruppen Tg und Tg+8W PBA. Die Antikörper sind gegen LHBs und SHBs gerichtet. Als House-Keeping-Gen diente  $\alpha$ -Tubulin. Es wurde kein Unterschied in der HBsAg-Menge nach achtwöchiger PBA-Gabe ermittelt. Tg n=3, Tg+1W PBA n=3, Tg+8W PBA n=3.

Die Daten aus der Western-Blot-Analyse zeigen, dass höhere Mengen an SHBs nach einwöchiger PBA-Gabe in den Lebern der Versuchstiere akkumulierten.

#### **4.3.4 Western-Blot-Analyse der HBsAg-Expression nach Zellkompartimentfraktionierung**

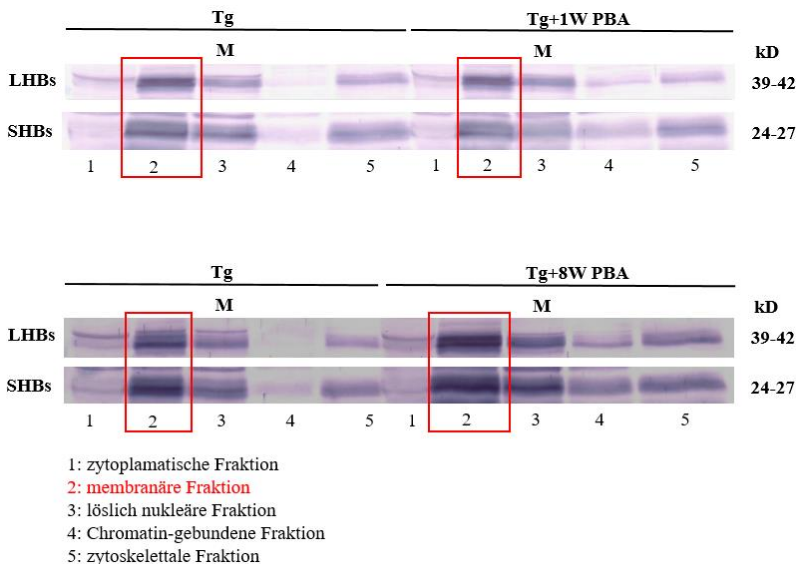
Nun stellte sich die Frage, ob der Anstieg der Menge der HBV-Oberflächenproteine nach PBA-Gabe die Lokalisation der Proteinaggregate im Hepatozyten beeinflusst.

Mittels *Subcellular*-Protein-Fraktionierungs-Kit erfolgte die Separierung und Anreicherung von Proteinen aus fünf verschiedenen Zellkompartimenten. Die Hepatozyten wurden hierbei in die zytoplasmatische-, membranäre-, löslich nukleäre-, Chromatin-gebundene- und zytoskelettale Fraktion aufgetrennt. Der Fokus lag hierbei auf der membranären Fraktion, da diese das ER, in welchem die HBV-Aggregate lokalisiert



sind, beinhaltet. Es wurde je eine repräsentative männliche Maus aus jeder Subgruppe (d.h. Tg, Tg+1W PBA und Tg+8W PBA) in der Abbildung 26 dargestellt.

Die Leberprobe jeder Maus wurde in fünf verschiedene Zellkompartimente aufgetrennt und mittels Western-Blot-Analyse auf Veränderungen der HBsAg-Expression untersucht. Der wie schon im vorherigen Kapitel beschriebene polyklonale Antikörper Anti-HBsAg richtet sich auch hier gegen die Oberflächenproteine LHBs und SHBs. Die PBA-Behandlung führte zu keiner nachweisbaren Veränderung bzw. Verschiebung der HBV-Oberflächenproteine zwischen den unterschiedlichen Zellkompartimenten. Dies wird durch gleiche Bandenstärken in den Gruppen Tg, Tg+1W PBA und Tg+8W PBA veranschaulicht. Der rote Rahmen hebt die membranäre Fraktion, in der das ER lokalisiert ist, hervor.



**Abbildung 26: Western-Blot-Analyse der hepatischen HBsAg-Expression nach Zellkompartimentfraktionierung.**

Das Lebergewebe je einer repräsentativen männlichen Maus aus den Gruppen Tg, Tg+1W PBA und Tg+8W PBA wurde in fünf verschiedene Zellkompartimente aufgetrennt und mittels Western-Blot-Analyse auf eine mögliche Veränderung der HBsAg-Expression untersucht. Die membranäre Fraktion, in der das ER lokalisiert ist, ist

durch einen roten Rahmen hervorgehoben. Es zeigten sich keine Unterschiede bzw. Veränderungen in der Lokalisation der HBV-Oberflächenproteine.

#### **4.4 Analyse der Genexpression per *Microarray***

Um eine große Anzahl an Genen der Maus zu untersuchen, wurde eine *Microarray*-Analyse der Mauslebern durchgeführt und bioinformatisch ausgewertet. Die *Microarray*-Analyse gibt einen Überblick über hepatische Genregulationsmuster in Abhängigkeit der PBA-Behandlung. Der Fokus bei der Auswertung der *Microarray*-Ergebnisse lag auf dem Vergleich der Mausgruppen Tg und Tg+1W PBA, sowie Tg und Tg+8W PBA. Die *Microarray*-Analyse beschränkte sich auf die männlichen Mäuse. Die *AveExpr* gibt an, wie stark ein Gen exprimiert wird. Bei der Auswertung der *Microarray*-Analyse wurden Gene berücksichtigt, die eine *AveExpr* von  $\geq 5$  aufwiesen. Somit lag das Augenmerk bei der nachfolgenden Auswertung auf den am stärksten regulierten Genen (vgl. Kapitel. 3.1.5).

Die Analyse zeigte, dass durch PBA-Behandlung diverse Gene aus der Gruppe der Akute-Phase-Proteine (APP) vermehrt exprimiert wurden (Wait *et al.* 2005; Schultz und Arnold 1990). Hierzu zählen vor allem die Serumamyloide A1-A3 (*SAA1-3*), die Metallothioneine 1 und 2 (*MT1* und *MT2*), Lipocalin 2 (*LCN2*) sowie Phosphatidylinositol-4-Phosphat-5-Kinase (*PIP5K1A*). In der vorliegenden Arbeit wurden die Serumamyloide und Metallothioneine aufgrund ihrer mehr als fünffachen Überexpression einer weiteren Untersuchung unterzogen.

Die Akute-Phase-Gene waren sowohl nach ein- als auch achtwöchiger PBA-Behandlung deutlich erhöht exprimiert (vgl. Tab. 14 und 15). *SAA1* wurde nach einwöchiger PBA-Gabe um den Faktor 10 und nach acht Wochen um den Faktor 48 im Vergleich zu den unbehandelten Tieren gesteigert. Die Induktion der APP korrelierte somit mit der Dauer der PBA-Behandlung.

**Tabelle 14: Die am stärksten regulierten Gene der Gruppen Tg gegenüber Tg+1W PBA.**

Der Wert des logarithmischen *fold change* gibt die x-fache Änderung an; Tg n=4, Tg+1W PBA n=4.

<b>Gen-Name</b>	<b>Gen-Symbol</b>	<b>log <i>fold change</i></b>
<i>Serumamyloid A 1</i>	<i>SAA1</i>	9,97
<i>Metallothionein 2</i>	<i>MT2</i>	9,72
<i>Serumamyloid A 2</i>	<i>SAA2</i>	9,2
<i>Metallothionein 1</i>	<i>MT1</i>	6,05

**Tabelle 15: Die am stärksten regulierten Gene der Gruppen Tg gegenüber Tg+8W PBA.**

Der Wert des logarithmischen *fold change* gibt die x-fache Änderung an; Tg n=4, Tg+8W PBA n=4.

<b>Gen-Name</b>	<b>Gen-Symbol</b>	<b>log <i>fold change</i></b>
<i>Serumamyloid A 1</i>	<i>SAA1</i>	48,10
<i>Serumamyloid A 2</i>	<i>SAA2</i>	34,94
<i>Metallothionein 2</i>	<i>MT2</i>	22,78
<i>Serumamyloid A 3</i>	<i>SAA3</i>	18,42
<i>Metallothionein 1</i>	<i>MT1</i>	16,06

#### **4.4.1 Heatmap-Illustration der 100 am stärksten regulierten Gene**

Eine visuelle Darstellung des Expressionsmusters erfolgte mittels *Heatmap*-Illustration. Hierbei wurden die 100 am stärksten regulierten Gene in funktionellen Gruppen angeordnet und farblich codiert.

Die Farbe rot zeigt verminderte und die Farbe grün zeigt erhöhte Genexpression des untersuchten mRNA im Vergleich der Subgruppen an. Die Farbe schwarz illustriert eine unveränderte Genexpression zwischen den untersuchten Gruppen. Im vergrößerten rechten Auszug der Abbildung 27 sind unter den Balken die untersuchten

Vergleichsgruppen kenntlich gemacht. Das Augenmerk in der vorliegenden Arbeit liegt auf dem Vergleich zwischen den PBA behandelten Gruppen (Tg+1W PBA und Tg+8W PBA) mit den unbehandelten transgenen Tieren (Tg). Daher sind diese beiden Vergleichsgruppen in rot unterstrichen. Der grüne Balken im Vergleich der Gruppen Tg+8W PBA gegen Tg visualisiert eine erhöhte Genexpression in der acht Wochen PBA-behandelten Gruppe gegenüber den unbehandelten HBV-transgenen Tieren. Der rote Balken im Vergleich Tg gegen WT visualisiert eine verminderte Genexpression in den Wildtyp-Mäusen gegenüber den HBV-transgenen Mäusen.

Mittels dieser Darstellung können funktionelle Gruppen in Clustern charakterisiert werden. Die APP werden beispielsweise als funktionelle Gruppe definiert und sind daher nebeneinander aufgeführt.

In dieser Illustration wurde ersichtlich, wie sich die Überexpression des HBV-Transgens (Tg) im Vergleich zur Wildtyp-Maus (WT) verhielt. Der Vergleich der Gruppe Tg gegen WT zeigte eine verminderte Genexpression der APP an, das in einem roten Balken dargestellt ist. Die Serumamyloide *SAA1* und *SAA2* sowie die Metallothioneine *MT1* und *MT2* waren nach einwöchiger und achtwöchiger PBA-Gabe hochreguliert (grüne Balken). Interessant ist der Vergleich zwischen den PBA-behandelten Gruppen (Tg+1W PBA und Tg+8W PBA) mit der WT-Gruppe. Der schwarze Balken links über dem Vergleich Tg+8W PBA gegen WT zeigt ein unverändertes Expressionsmuster des APP *MT1* an. Dies lässt den Rückschluss zu, dass durch die PBA-Behandlung eine ähnliche Situation wie bei nicht-transgenen Wildtyp Mäusen hinsichtlich der *MT1*-Genexpression vorliegt.

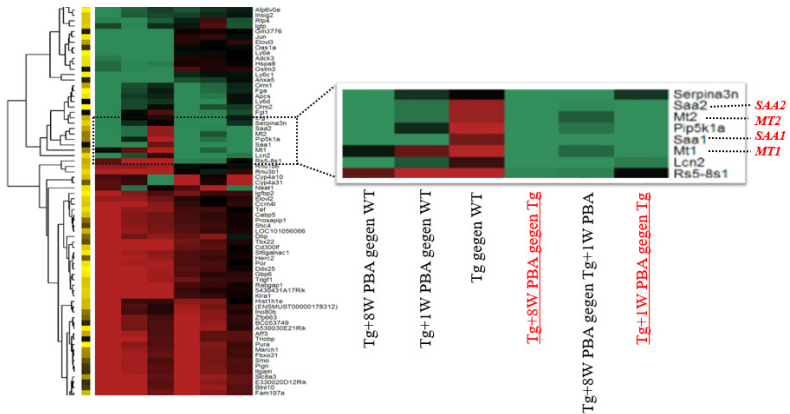


Abbildung 27: Heatmap-Darstellung der hepatischen Genregulation der PBA-behandelten Mäuse.

Die in dieser Arbeit untersuchten Gene sind in dem vergrößerten rechten Bildausschnitt dargestellt. Detektiert wurde eine Hochregulation der transkriptionellen Akute-Phase-Proteine *SAA1*, *SAA2*, *MT1* und *MT2* in den Gruppen Tg+1W PBA gegen Tg und Tg+8W PBA gegen Tg (rot unterstrichen). Grün verdeutlicht eine verstärkte Genexpression, wohingegen rot für eine verminderte Genexpression steht. Die Farbe schwarz illustriert unveränderte Genexpression. WT: Wildtyp; Tg n=4, Tg+1W PBA n=4, Tg+8W PBA n=4.

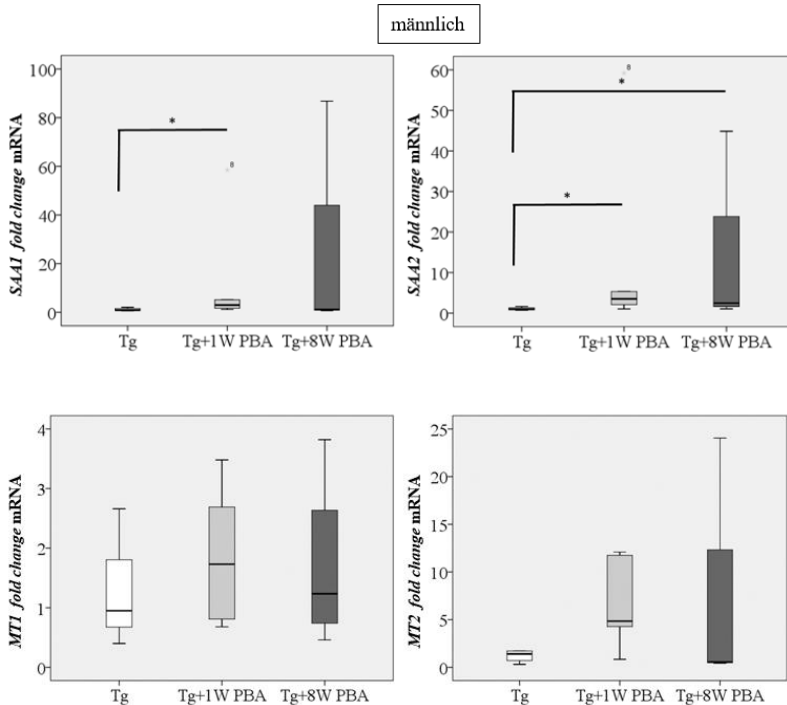
## 4.5 Akute-Phase-Reaktion

### 4.5.1 qRT-PCR Analyse der Akute-Phase-Proteine

Die im *Microarray* identifizierte Aktivierung der APP *SAA1*, *SAA2*, *MT1* und *MT2* in den PBA-behandelten Gruppen gegenüber der unbehandelten HBV transgenen Gruppe wurde mittels qRT-PCR validiert.

Bei den männlichen Mäusen bewirkte die einwöchige PBA-Behandlung einen ca. 13,5-fachen Anstieg der mRNA-Expression von *SAA1* ( $p=0,05$ ) und einen ca. 14-fachen Anstieg von *SAA2* ( $p=0,027$ ). Nach achtwöchiger PBA-Behandlung reduzierte sich die Induktion der mRNA-Expression von *SAA2* (13-fach,  $p=0,043$ ). Auch die Expression von *SAA1* war nach achtwöchiger Behandlung nur noch tendenziell erhöht ( $p=0,38$ ). Die

Expression von *MT1* und *MT2* war nach einwöchiger PBA-Behandlung bei den männlichen Mäusen tendenziell erhöht (*MT2*  $p=0,086$ ). Die über acht Wochen mit PBA behandelten Mäuse zeigten ebenfalls keinen signifikanten Unterschied der *MT1*-, und *MT2*-mRNA-Expression gegenüber den unbehandelten männlichen Mäusen. Unter den gemessenen APP wurde *SAA1* am stärksten und *MT2* mehr als *MT1* exprimiert. Dies bestätigte die Ergebnisse der *Microarray*-Analyse.

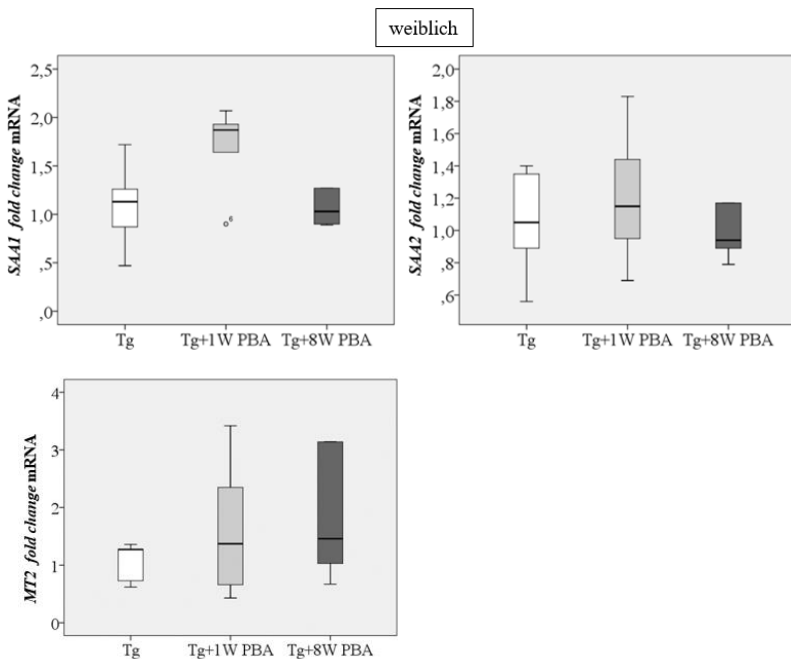


**Abbildung 28:** qRT-PCR Analyse der mRNA-Expression von den Akute-Phase-Proteinen *SAA1*, *SAA2*, *MT1* und *MT2* im Lebergewebe der männlichen Mäuse.

Die Analyse zeigte teilweise signifikante Unterschiede in der exprimierten *SAA1*- und *SAA2*-Menge zwischen den drei untersuchten Gruppen: Die  $p$ -Werte bei *SAA1* betragen für den Expressionsunterschied zwischen Tg und Tg+1W PBA  $p=0,05$  bei einem 13-fachen Anstieg und zwischen Tg und Tg+8W PBA  $p=0,386$ . Bei *SAA2* betragen die  $p$ -Werte für den Expressionsunterschied zwischen Tg und Tg+1W PBA  $p=0,027$  bei 14-

facher Hochregulation und zwischen Tg und Tg+8W PBA  $p=0,043$  bei 13-facher Hochregulation. Es wurden keine signifikanten Unterschiede in der Regulation der *MT1*- und *MT2*-Transkription detektiert, wobei ein tendenzieller Anstieg der *MT2*-Genexpression in der Gruppe Tg+1W PBA zu verzeichnen war ( $p=0,086$ ). Als Kontrolle diente  $\beta$ -Aktin; Tg  $n=4$ , Tg+1W PBA  $n=5$ , Tg+8W PBA  $n=4$ .  $p^* < 0,05$ .

Die weiblichen Tiere zeigten nach einwöchiger Behandlung mit PBA einen tendenziellen Anstieg der *SAA1*-mRNA-Expression, wobei das Signifikanzniveau fast erreicht wurde ( $p=0,076$ ). Nach einwöchiger Gabe von PBA war keine Regulation in der *SAA2*-Expression zu messen ( $p=0,456$ ). Die Behandlung über einen Zeitraum von acht Wochen führte zu keinem signifikanten Unterschied in der *SAA1*- und *SAA2*-Menge (*SAA1*:  $p=0,62$ ; *SAA2*:  $p=1,00$ ). Eine mögliche Regulation der *MT2*-Transkription wurde abschließend untersucht, jedoch lagen auch hier keine signifikanten Unterschiede in beiden Versuchsgruppen (Tg gegen Tg+1W PBA  $p=0,456$ ; Tg gegen Tg+8W PBA  $p=0,21$ ) vor. Es wurde keine Genexpression von *MT1* detektiert (CT-Werte größer 30).



**Abbildung 29: qRT-PCR Analyse der mRNA-Expression von *SAAI*, *SAA2* und *MT2* im Lebergewebe der weiblichen Mäuse.**

Die Analyse zeigte keine signifikanten Unterschiede bei der Genexpression von *SAAI*-, *SAA2*- und *MT2* zwischen den drei untersuchten Gruppen. Ein tendenzieller Anstieg der *SAAI*-mRNA war nach einwöchiger PBA-Gabe zu verzeichnen ( $p=0,076$ ). Als Kontrolle diente  $\beta$ -*Aktin*; Tg n=5, Tg+1W PBA n=5, Tg+8W PBA n=5.

Aus diesen Ergebnissen kann gefolgert werden, dass eine stärkere APR bei den männlichen im Vergleich zu den weiblichen Mäusen abließ. Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen somit eine APR in der Leber männlicher HBV-transgener Mäuse nach PBA-Gabe.

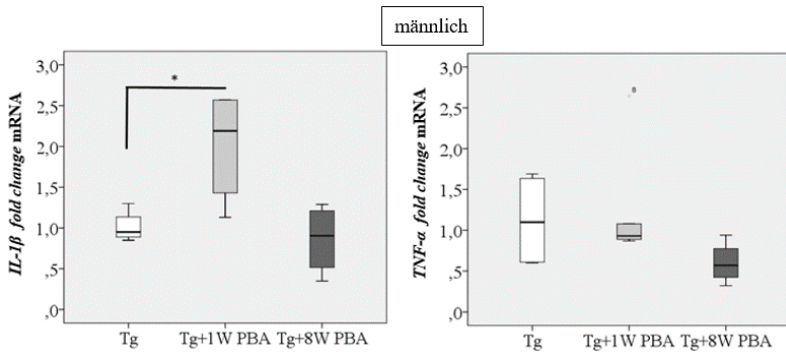
**4.5.2 qRT-PCR Analyse: Zytokine im Lebergewebe**

Im Allgemeinen geht eine Akute-Phase-Reaktion (APR) mit der Freisetzung von Zytokinen einher. Serumamyloide der Gruppe A können durch Stimulierung der Expression proinflammatorischer Zytokine, wie z.B. IL-1, IL-6 und TNF- $\alpha$ , regulatorische T-Zellen aktivieren (Nguyen *et al.* 2014; Gruys *et al.* 2005; Lopetuso *et al.* 2018).

Im Folgenden wurden wichtige Zytokine und Chemokine im Lebergewebe, sowie im Blutserum der Mäuse gemessen. Die Analyse des Lebergewebes diente der Überprüfung intrahepatischer Entzündung, wohingegen die Untersuchung des Blutserums eine mögliche systemisch, zirkulatorische Entzündung nachweisen sollte.

Durch qRT-PCR wurde die genomische Expression der Zytokine *IL-1 $\beta$* , *TNF- $\alpha$*  und *IL-6* im Lebergewebe bestimmt. Bei den männlichen Mäusen war nach einwöchiger PBA-Behandlung ein signifikanter Anstieg der *IL-1 $\beta$* -mRNA zu ermitteln ( $p=0,027$ ). Nach achtwöchiger PBA-Behandlung war keine veränderte Regulation gegenüber den unbehandelten Mäusen zu verzeichnen. Eine Regulation der *TNF- $\alpha$* -mRNA wurde durch PBA nicht induziert. Es wurde keine messbare *IL-6*-mRNA-Expression in der Leber männlicher Mäuse detektiert (CT-Werte größer 30).





**Abbildung 30: qRT-PCR Analyse der mRNA-Expression von *IL-1β* und *TNF-α* im Lebergewebe der männlichen Mäuse.**

Die Daten der qRT-PCR-Analyse zeigen einen signifikanten Anstieg der exprimierten *IL-1β*-mRNA nach einwöchiger PBA-Behandlung ( $p=0,027$ ). Nach achtwöchiger Behandlung war kein signifikanter Unterschied im Vergleich zu den unbehandelten transgenen Mäusen zu detektieren. Es wurde keine Regulation bei der *TNF-α*-Genexpression gemessen. Als Kontrolle diente  $\beta$ -*Aktin*; Tg n=4, Tg+1W PBA n=5, Tg+8W PBA n=4.  $p^* < 0,05$ .

Die Zytokine *IL-1β*, *TNF-α* und *IL-6* waren in den Lebern weiblicher Mäuse nicht messbar (CT-Werte größer 30).

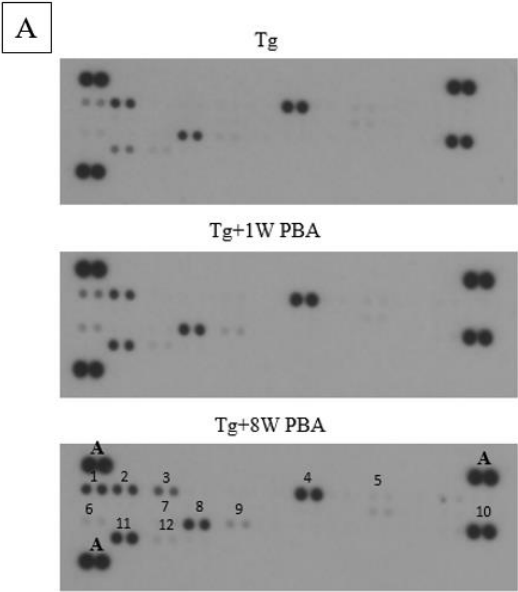
Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass die Expression des Zytokins *IL-1β* nach PBA-Gabe anstieg. Die anderen in der Literatur beschriebenen Zytokine *IL-6* und *TNF-α* waren im Lebergewebe nicht ausreichend messbar.

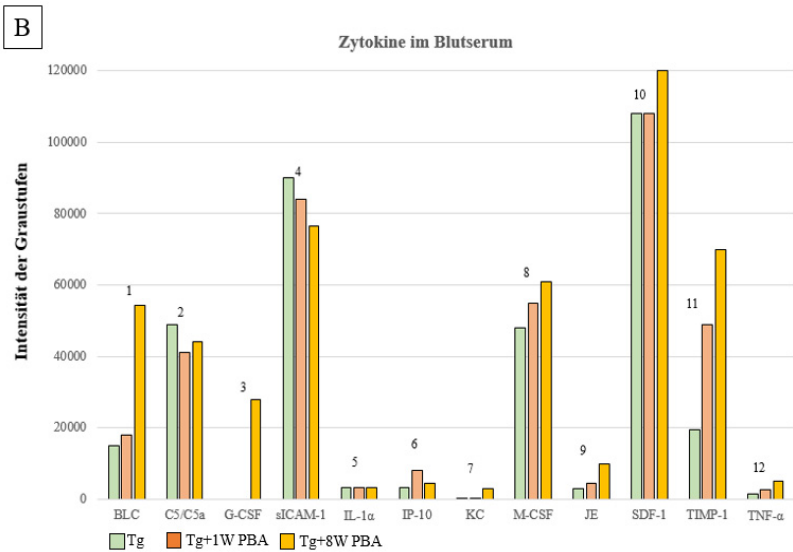
#### 4.5.3 Zytokin-Array: Zytokine im Serum

Bei den meisten biologischen Prozessen interagieren Zytokine wie in einem Netzwerk, deren Regulation wiederum durch die An- bzw. Abwesenheit von anderen Zytokinen gesteuert wird. Um einen Überblick über die in diesem Tierexperiment agierenden Moleküle zu bekommen, erfolgte im nächsten Schritt eine Detektion der im Blutserum der Mäuse zirkulierenden Zytokine und Chemokine. Mithilfe dieses Zytokin-Arrays konnte eine semiquantitative und qualitative Aussage über die im Serum der Mäuse

enthaltenen Zytokine und Chemokine in Abhängigkeit von PBA gemacht werden. Eine anschließend durchgeführte Graustufenanalyse der detektierten Spots diente der semiquantitativen Auswertung der Ergebnisse.

Die Zytokine und Chemokine TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  (Interleukin-1alpha), G-CSF (Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor), M-CSF (Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor), JE (Makrophagen-Chemoattraktorprotein-1), SDF-1 (Stromazell-Faktor-1) und BLC (B Lymphozyten Chemoattraktorprotein) sowie das Glykoprotein TIMP-1 wurden nach PBA-Behandlung verstärkt detektiert. Die Behandlungsdauer korrelierte mit der Menge der untersuchten Moleküle. D.h. je länger die PBA-Behandlung andauerte, desto höher ist die Zytokin- und Chemokinkonzentration im Serum. Der Komplementfaktor C5 sowie das Adhäsionsmolekül s-ICAM (lösliches interzelluläres Adhäsionsmolekül-1) waren nach PBA-Behandlung vermindert.





**Abbildung 31: Zytokin-Array zur Bestimmung von Zytokinen und Chemokinen im Blutserum der männlichen Mäuse.**

**A)** Es wurden die Blutseren der drei Gruppen Tg, Tg+1W PBA und Tg+8W PBA durch Bildung von Pools semiquantitativ untersucht (Serumpool n=3-5, vgl. 3.2.5). Die mit Zahlen beschrifteten Spots repräsentieren die Zytokine und Chemokine, die durch PBA reguliert wurden. Die mit A bezeichneten Spots stellen die Positivkontrollen dar. Eine erhöhte Expression von Zytokinen und Chemokinen war nach PBA-Behandlung zu beobachten, was durch die dunkleren Spots in den PBA-behandelten Gruppen zum Ausdruck kommt.

**B) Semiquantitative Auswertung des Zytokin-Arrays per optischer Densitometrie.** Die Auswertung der detektierten Spots wurde durch Analyse der Intensität der Spots erfasst. Die Auswertung des Zytokin-Arrays illustrierte einen Anstieg der Mehrzahl der detektierten Moleküle/Proteine nach PBA-Behandlung. Die Balkendiagramme sind mit Zahlen beschriftet, die die markierten Spots aus A) anzeigen. Die Moleküle/Proteine BLC, G-CSF, IL-1 $\alpha$ , KC, JE, SDF-1, TIMP-1 und TNF- $\alpha$  wurden nach PBA-Behandlung verstärkt detektiert. Die Behandlungsdauer beeinflusste bei diesen Molekülen die Proteinsynthese gleichgerichtet: Je länger PBA appliziert wurde, desto mehr Zytokine und Chemokine wurden gemessen (analog: desto intensiver die Graustufe). Die Proteinmenge von C5/C5a sowie sICAM-1 war nach PBA-Gabe vermindert. **BLC:** B

Lymphozyten Chemoattraktorprotein, **C5**: Komplementfaktor 5, **G-CSF**: Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor, **sICAM-1**: Lösliches interzelluläres Adhäsionsmolekül-1, **IL-1 $\alpha$** : Interleukin-1alpha, **IP-10**: Interferon gamma induziertes Protein-10, **KC**: entspricht CXCL-1 (Chemokin-Ligand-1), **M-CSF**: Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor, **JE**: entspricht MCP-1 (Makrophagen-Chemoattraktorprotein-1), **SDF-1**: Stromazell-Faktor-1, **TIMP-1**: engl. *tissue inhibitor of metalloproteinases*, **TNF- $\alpha$** : Tumornekrose-Faktor-alpha.

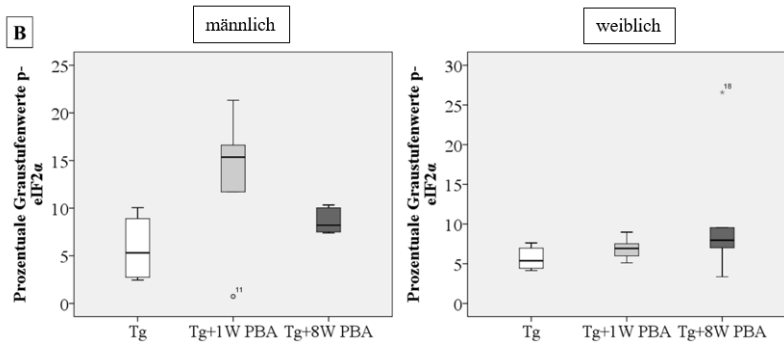
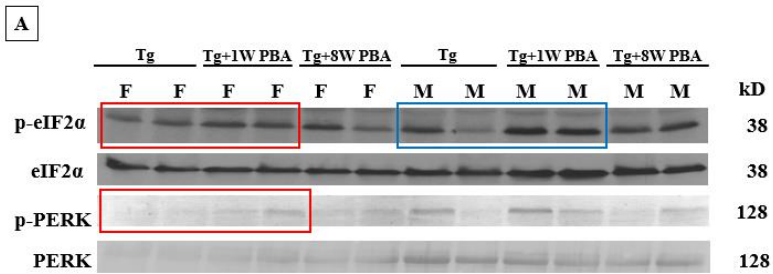
Die Vermutung, dass PBA inflammatorische Prozesse induzieren kann, wurde mit diesem Zytokin-Array unterstützt.

#### **4.6 ER-Stress und *Unfolded Protein Response***

In HBV infizierten Hepatozyten kommt es zur Akkumulation des LHBs im ER (vgl. Kapitel 4.3.1). Dies kann zu ER-Stress und der Aktivierung der UPR-Signalkaskaden führen (vgl. Kapitel 1.2) (Graumann *et al.* 2015; Xu *et al.* 1997; Churin *et al.* 2014; Bergmann und Molinari 2018).

Um die Beeinflussung des ER-Stresses der Hepatozyten in Abhängigkeit von PBA zu messen, wurden die Schlüssel-moleküle p-eIF2 $\alpha$  und p-PERK mittels Western-Blot-Analyse untersucht.

Die Analyse zeigte einen Anstieg der ER-Stressmarker p-eIF2 $\alpha$  und p-PERK in den PBA-behandelten Gruppen. Dieser Effekt betraf beide Geschlechter und war nach einwöchiger PBA-Behandlung stärker als nach achtwöchiger Behandlung ausgeprägt. Die Phosphorylierung des ER-Stressmarkers eIF2 $\alpha$  lief im Vergleich zur Phosphorylierung von PERK verstärkt ab. Die männlichen Tiere zeigten im Vergleich zu den weiblichen erhöhten ER-Stress. Es wurde ein 2,8-facher Anstieg des ER-Stressmarkers p-eIF2 $\alpha$  nach einwöchiger PBA-Behandlung und ein 1,6-facher Anstieg nach achtwöchiger PBA-Behandlung bei den männlichen Tieren berechnet. Das Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$  wurde in der Gruppe Tg+1W PBA mit  $p=0,068$  fast erreicht. Bei den weiblichen Tieren ist ein 1,6-facher Anstieg nach einwöchiger und ein 1,3-facher Anstieg nach achtwöchiger PBA-Behandlung zu verzeichnen.



**Abbildung 32: Western-Blot-Analyse der ER-Stressmarker eIF2 $\alpha$ /p-eIF2 $\alpha$  und PERK/p-PERK.**

A) Die Western-Blot-Banden zeigen je zwei repräsentative weibliche (F) und männliche (M) Mäuse aus den Versuchsgruppen Tg, Tg+1W PBA und Tg+8W PBA. Für p-eIF2 $\alpha$  und p-PERK konnte ein Zusammenhang mit der PBA-Behandlung gezeigt werden. Sowohl eIF2 $\alpha$  als auch PERK sind nach einwöchiger PBA-Behandlung stärker phosphoryliert als in den unbehandelten Mäusen (mit Rahmen hervorgehoben). Nach achtwöchiger Behandlung mit PBA ist die Aktivierung von eIF2 $\alpha$  und PERK gegenüber der einwöchigen PBA-Behandlung abgeschwächt aber noch deutlich erkennbar. Als Ladekontrolle dienten die unphosphorylierten Formen eIF2 $\alpha$  und PERK. Von einer Regulation der analysierten ER-Stressmarker konnte ausgegangen werden, da die Banden der Kontrollproteine (eIF2 $\alpha$  und PERK) innerhalb eines Geschlechts eine gleichmäßige Expression zeigten. Der ER-Stressmarker PERK wird bei den hier untersuchten 12

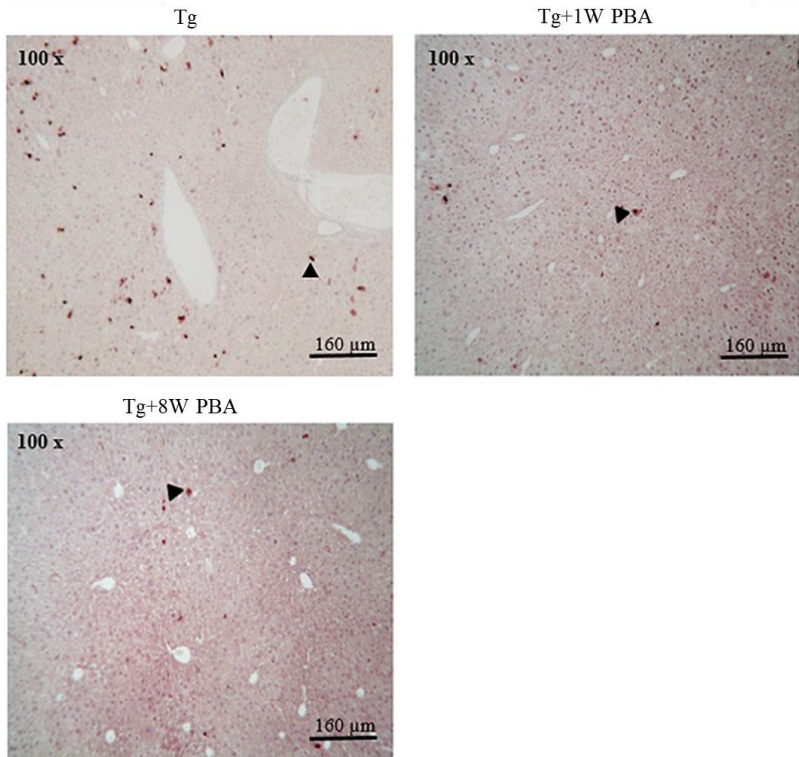
Wochen alten HBV-transgenen Mäusen in sehr geringem Maße phosphoryliert, sodass die Banden gegenüber eIF2 $\alpha$ /p-eIF2 $\alpha$  insgesamt heller erschienen.

**B)** Semiquantitative Auswertung des ER-Stressmarkers p-eIF2 $\alpha$  per optischer Densitometrie. Es wurden alle Mäuse aus jeder Subgruppe densitometrisch analysiert und als prozentualen Graustufen-Anteil des Gesamtblots dargestellt (männlich: Tg n=4, Tg+1W PBA n=5, Tg+8W PBA n=4; weiblich: Tg n=5, Tg+1W PBA n=5, Tg+8W PBA n=5). Die Analyse zeigte bei den männlichen Mäusen einen Anstieg des ER-Stressmarkers p-eIF2 $\alpha$  nach einwöchiger PBA-Behandlung (Tg: 5,9 %, Tg+1W PBA: 13,5 % der Gesamt-Graustufe). Das Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$  wurde hierbei mit  $p = 0,068$  fast erreicht. Die Graustufenanalyse der weiblichen Mäuse zeigte eine tendenzielle Aktivierung des ER-Stressmarkers (Tg gegenüber Tg+1W PBA  $p = 0,229$ ; Tg gegenüber Tg+8W PBA  $p = 0,109$ ).

#### **4.7 Apoptose**

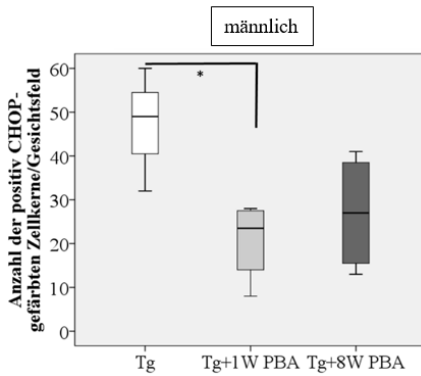
Das proapoptotische Protein CHOP (engl. *C/EBP homologous protein*) zählt zu einem der Zielgene der Signalkaskaden der *Unfolded Protein Response* und wird bei dauerhaftem ER-Stress überexprimiert. CHOP kann bei dauerhaftem hepatischen ER-Stress die Apoptose der Hepatozyten induzieren (vgl. Kapitel 1.2).

Mittels immunhistochemischer Kernfärbung von CHOP wurde nach einwöchiger PBA-Gabe eine signifikante ( $p = 0,034$ ) Reduktion der Anzahl gefärbter Kerne gezeigt. Die Behandlung über einen Zeitraum von acht Wochen verminderte die CHOP-gefärbten Zellkerne tendenziell ( $p = 0,157$ ). Für jede Maus wurde der Mittelwert aus der Anzahl der gezählten Kernfärbungen pro vier Gesichtsfelder errechnet und in Boxplots dargestellt.



**Abbildung 33: Immunhistochemische Färbung des Apoptosemarkers CHOP im Lebergewebe männlicher HBV-transgener Mäuse.**

Abgebildet sind drei repräsentative männliche Mäuse aus den Gruppen Tg, Tg+1W PBA und Tg+8W PBA. Die Kernfärbung CHOP nahm nach PBA-Behandlung ab. Die Pfeilspitze markiert die positiv CHOP-gefärbten Zellkerne. Maßeinheit: 160 $\mu$ m, Vergrößerung: 100 x.



**Abbildung 34: Auszählung positiv CHOP-gefärbter Zellkerne im Lebergewebe HBV-transgener männlicher Mäuse.**

Die immunhistochemischen Färbungen der Abb. 33 wurden mittels Kernzählung ausgewertet. Der Vergleich zwischen den Gruppen Tg und Tg+1W PBA zeigte eine signifikante Abnahme der Anzahl positiv CHOP-gefärbter Zellkerne ( $p=0,034$ ). Nach achtwöchiger PBA-Behandlung wurde keine signifikante Reduktion CHOP-gefärbter Zellkerne ermittelt ( $p=0,157$ ). Es wurden je vier Gesichtsfelder pro Maus ausgezählt und die Mittelwerte gebildet; Tg  $n=4$ , Tg+1W PBA  $n=4$ , Tg+8W PBA  $n=4$ .  $p^*<0,05$ .



## 5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnten folgende Ergebnisse erzielt werden:

- Die Akkumulierung der HBV-Hüllproteine im ER der Hepatozyten transgener Mäuse (Linie: BALB/c-Tg(Alb1HBV)) konnte mittels immunhistochemischer Färbung illustriert werden.
- Die Leberschnitte PBA-behandelter männlicher und weiblicher HBV-transgener Mäuse (Gruppe Tg+1W PBA und Gruppe Tg+8W PBA) zeigten ein verändertes intrazelluläres Aggregationsmuster mit konsekutiver Feinverteilung der durch Überexpression akkumulierenden HBV-Hüllproteine im ER.
- Die orale PBA-Behandlung HBV-transgener Mäuse induzierte einen Anstieg von Akute-Phase-Proteinen (SAA1, SAA2, MT1 und MT2) sowie von inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen (v.a. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , G-CSF und BLC).
- Es zeigte sich ein Anstieg der ER-Stressmarker p-eIF2 $\alpha$  und p-PERK nach einwöchiger PBA-Behandlung.
- Hinweise auf Hepatotoxizität nach PBA-Behandlung ergaben sich bei normwertigen Transaminasen und negativer Apoptose nicht.
- Die männlichen Versuchstiere zeigten im Vergleich zu den weiblichen eine stärkere Reaktion auf die PBA-Behandlung. Dies äußerte sich durch erhöhte Mengen an Akute-Phase-Proteinen, vermehrter Zytokin- und Chemokinausschüttung sowie verstärktem ER-Stress bei den männlichen Tieren.
- Die Behandlungszeit über eine Woche führte zu stärkeren Veränderungen in der Leberpathologie als die Behandlung über acht Wochen. So war die Feinverteilung und Auflockerung der HBV-Oberflächenproteine in der Gruppe Tg+1W PBA stärker ausgeprägt als in der Gruppe Tg+8W PBA. Weiterhin war weniger ER-

Stress in der Gruppe Tg+8W PBA im Vergleich zur Gruppe Tg+1W PBA zu messen.

Das nachfolgende Flussdiagramm veranschaulicht die erhobenen Ergebnisse:

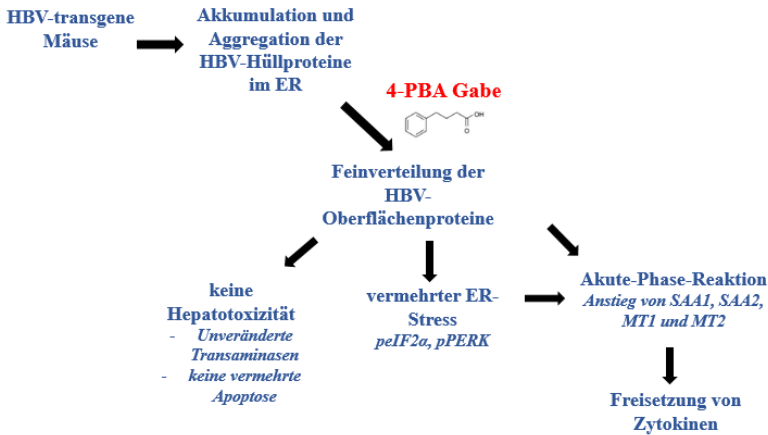


Abbildung 35: Zusammenfassung der Ergebnisse in einem Flussdiagramm.

Im HBV-transgenen Mausmodell lagern sich die Oberflächenproteine des HBV aggregatweise im ER ab. Die Behandlung mit PBA führt zu einer Auflockerung dieser Proteinaggregate und zur Verteilung der transgenen Proteine über die gesamte Zelle, zur Akute-Phase-Reaktion mit Freisetzung von Zytokinen sowie zu vermehrtem ER-Stress. Die Messung der Transaminasen zeigte unveränderte Werte.

Aus diesen Ergebnissen ergaben sich im Wesentlichen drei Fragen, die nachfolgend diskutiert werden.

## 5.1 Pathophysiologische Rolle der Aggregation der HBV-Oberflächenproteine im ER

Die HBV-Oberflächenproteine akkumulieren im ER der Hepatozyten. Durch Behandlung mit PBA wurden die Aggregate aufgelockert und die transgenen Proteine über die gesamte Zelle verteilt. Nachfolgend kam es zu überwiegend inflammatorischen Stress-Reaktionen. **Stellt die Aggregation der Oberflächenproteine im ER ein Schutzmechanismus der Zelle dar?**

Diverse Studien zu Proteinspeichererkrankungen beschreiben positive Effekte von PBA. Beim  $\alpha$ 1-Antitrypsin-Mangel beispielsweise kommt es aufgrund einer Genmutation zur Konformationsänderung und gestörten Sekretion des  $\alpha$ 1-Antitrypsins in den Hepatozyten. Fehlgefaltete Proteine akkumulieren im ER und führen längerfristig zur Leberschädigung. In *in vitro* und *in vivo* Studien konnte gezeigt werden, dass PBA die Fehlfaltung dieser Proteine aufhebt, die Sekretion aus dem ER fördert und zu einer Milderung der Krankheit führt (van den Berghe *et al.* 2009). Weiterhin wurde die Wirkung von PBA in Zellkulturexperimenten zu *Morbus* Wilson untersucht. Bei dieser Erkrankung kommt es zu einer Akkumulation von Kupfer im Körper, insbesondere der Leber. Die Folge sind Hepatitis und Leberzirrhose. PBA führte hierbei ebenfalls zu einer Verminderung mutierter Proteine und zu erleichterter Sekretion aus der Leberzelle heraus (van den Berghe *et al.* 2009). Die Situation im HBV-transgenen Mausmodell ähnelt der Pathophysiologie dieser beiden Krankheiten. Das LHBs wurde in Hepatozyten transgener Mäuse exprimiert und aufgrund eines Sekretionsblocks im ER aggregatweise abgelagert (Chisari *et al.* 1987). PBA zeigte in der vorliegenden Arbeit initial eine ähnliche Wirkung wie bei den Studien zum  $\alpha$ 1-Antitrypsin-Mangel und zu *Morbus* Wilson. Das in Aggregaten abgelagerte Protein wurde durch das synthetische Chaperon PBA aus den Aggregaten mobilisiert und verteilte sich in der gesamten Zelle (vgl. Abb. 22). Im Gegensatz zum  $\alpha$ 1-Antitrypsin-Mangel benötigt der Organismus das HBs-Transgen nicht, profitiert also nicht von seiner Mobilisation aus den Aggregaten. HBsAg scheint durch die Mobilisierung eine APR auszulösen (vgl. Kapitel 4.4 und 4.5). Die transkriptionelle Regulation der HBsAg-Expression wurde mittels qRT-PCR und die hepatische Proteinakkumulation immunhistochemisch sowie mittels Western-Blot überprüft. Die Western-Blot-Analyse zeigte, dass erhöhte Mengen an SHBs und LHBs nach einwöchiger PBA-Gabe in den Lebern messbar waren (vgl. Abb. 24). Es stellte sich die Frage, was zur Erhöhung der Menge an HBV-Oberflächenproteinen in der Western-

Blot Analyse führte. Wird intrazellulär mehr HBsAg nach PBA-Gabe produziert? Somit wäre dies ein Effekt, welcher die Transkription und Translation betrifft. Auf transkriptioneller Ebene wurden allerdings keine signifikanten Unterschiede der LHBs- und SHBs-Expression nach PBA-Gabe ermittelt (vgl. Abb. 23). Hinsichtlich der gezeigten Auflockerung und Feinverteilung der HBs-Protein-Aggregate im ER wäre es interessant zu klären, ob aus diesen HBs-Aggregaten vermehrt subvirale Partikel gebildet werden und dann in das Serum der Mäuse sekretiert werden. In Folgestudien könnte man dieser Frage mit Serum-Analysen mittels HBsAg-ELISA nachgehen. Mit Stand der aktuell erhobenen Ergebnisse wird davon ausgegangen, dass nach einwöchiger PBA-Behandlung mehr Proteine in der Leber akkumulieren und die Wirkung von PBA auf die HBsAg-Expression vermutlich auf Proteinebene erfolgt.

Ein entscheidender Unterschied zwischen diesen Studien und der vorliegenden Arbeit ist, dass im vorliegenden Experiment exogene virale Proteine akkumulieren. Im Gegensatz hierzu handelt es sich bei  $\alpha$ 1-Antitrypsin und Kupfer um intrinsische körpereigene Substanzen. Eine direkte Übertragbarkeit dieser Erkenntnisse auf die HBV-transgene Situation kann somit nicht erfolgen. Es wird angenommen, dass dieser Unterschied ursächlich für die ausbleibende therapeutische Wirkung von PBA ist. ER-Stress wurde nicht wie anfänglich vermutet durch PBA reduziert, sondern stieg nach einwöchiger PBA-Behandlung an (vgl. Kapitel 4.6). PBA induzierte außerdem die Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen sowie die Produktion von APP (vgl. Kapitel 4.4 und 4.5).

Diese Überlegungen kumulieren in der Hypothese, dass die Aggregation der zellfremden HBs Proteine im ER einen Schutzmechanismus darstellt, der durch die Behandlung mit dem synthetischen Chaperon PBA durchbrochen wird.

## **5.2 PBA-induzierte Immunantwort**

Die PBA-Behandlung induzierte in den LHBs-transgenen Mäusen eine APR in der Leber. **Moduliert PBA, als künstliches Chaperon, durch Verstärkung des ER-Stress die intrinsische Immunantwort?**

Die Ergebnisse dieser Arbeit demonstrieren, dass PBA proinflammatorische Reaktionen in der Leber hervorruft. Die Serumamyloide *SAA1* und *SAA2* sowie die Metallothioneine *MT1* und *MT2* waren nach PBA-Gabe hochreguliert (vgl. Kapitel 4.4 und 4.5). Derzeit sind drei murine Isoformen der Serumamyloide bekannt (Chen *et al.* 2014). Bei

inflammatorischen Prozessen werden vornehmlich SAA1 und SAA2 in der Leber produziert, wohingegen SAA3 in extrahepatischen Organen in geringer Menge gebildet wird (Zhang *et al.* 2005). In den durchgeführten Analysen wurden ebenfalls hauptsächlich SAA1 und SAA2 im Lebergewebe HBV-transgener Mäuse nachgewiesen. SAA3 wurde nur in geringen Mengen exprimiert (vgl. Tab. 15).

Die Serumamyloide gehören den APP an, zählen zu den Frühmarkern einer Entzündung und sind mit dem humanen CRP vergleichbar (Zhang *et al.* 2005b). Serumamyloide spielen bei Erkrankungen wie der Amyloidose, der Atherosklerose und der Rheumatoiden Arthritis eine Rolle in der Immunantwort. Sie interagieren bei diesen Erkrankungen mit Makrophagen und neutrophilen Granulozyten (Marhaug und Dowton 1994). Durch die vorliegenden Ergebnisse konnte ebenfalls auf eine Interaktion der Serumamyloide mit Makrophagen und neutrophilen Granulozyten im HBV-transgenen Tiermodell geschlossen werden. Die Serumamyloide sowie diverse Zytokine und Chemokine, welche durch Makrophagen ausgeschüttet werden, waren im HBV-transgenen Mausmodell nach PBA-Gabe verändert (Lake *et al.* 1994). Es wurde ein Anstieg von SAA1, SAA2, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  sowie von weiteren Molekülen/Proteinen nach PBA-Gabe nachgewiesen (vgl. Abb. 30 und 31).

Die Metallothioneine sind zytoplasmatische Proteine, die Toxine wie z.B. Schwermetalle, binden und eliminieren. Weiterhin sind sie an der Zellantwort gegen oxidativen Stress beteiligt (Lynes *et al.* 2014). ER-Stress steht mit Inflammation und APR durch die Bildung von ROS, die Aktivierung von NF $\kappa$ B und MAPK in enger Beziehung (Zhang und Kaufman 2008; Almanza *et al.* 2018). Die dauerhafte HBsAg-Überexpression führte im vorliegenden Mausmodell zu ER-Stress (Kuscuoglu *et al.* 2018; Kim *et al.* 2017). In der Leber von HBV-transgenen Mäusen wird vor allem der PERK-eIF2 $\alpha$ -Signalweg aktiviert (Churin *et al.* 2014). Folglich wurde dieser Weg in der vorliegenden Arbeit analysiert (vgl. Kapitel 4.6). In Western-Blot-Analysen konnte vermehrt ER-Stress durch eine stärkere Phosphorylierung der ER-Stress-Marker PERK und eIF2 $\alpha$  nach einwöchiger PBA-Gabe ermittelt werden (vgl. Abb. 32).

Bei verschiedenen Erkrankungen, wie z.B. bei Lungen-, Leber- und Herzerkrankungen, verminderte PBA ER-Stress und verbesserte den Proteintransport (vgl. Kapitel 1.3) (Rubenstein und Lyons 2001; Rahman *et al.* 2009). Beispielsweise haben die Arbeitsgruppen um Rubenstein *et al.* oder um Rahman *et al.* positive Effekte von PBA

auf ER-Stress durch Zellkulturexperimente erzielt, wohingegen die vorliegenden Untersuchungen am Tiermodell durchgeführt wurden (Rubenstein und Lyons 2001; Rahman *et al.* 2009). Mosbah *et al.* experimentierte zwar am Tiermodell (hemihепatektomierte Rattenlebern), applizierte PBA allerdings intravenös, sodass auch hier kein direkter Vergleich auf den vorliegenden Versuchsaufbau mit oraler PBA-Behandlung angestellt werden kann (Ben Mosbah *et al.* 2010; van den Berghe *et al.* 2009; Rahman *et al.* 2009; Morinaga *et al.* 2015; Ren *et al.* 2015). Die verabreichte PBA-Dosierung bei Mosbah *et al.* von 200 mg/kg pro Tier war identisch zur vorliegenden Arbeit (Ben Mosbah *et al.* 2010; van den Berghe *et al.* 2009; Rahman *et al.* 2009; Morinaga *et al.* 2015; Ren *et al.* 2015). Weiterhin wurde in seiner Versuchsdurchführung neben PBA TUDCA (engl. *tauroursodeoxycholic acid*), ein weiteres chemisches Chaperon, appliziert. TUDCA erzielte im Vergleich zu PBA stärkere Einflüsse auf ER-Stress (Ben Mosbah *et al.* 2010; van den Berghe *et al.* 2009; Rahman *et al.* 2009; Morinaga *et al.* 2015; Ren *et al.* 2015).

Es kann davon ausgegangen werden, dass neben den Proteinaggregaten, die ER-Stress erzeugen, die durch den Albumin-Promotor hervorgerufene permanente Produktion des Transgens (LHBs) in der Zelle translationalen Stress hervorruft (Kuscuoglu *et al.* 2018). Durch die PBA-Behandlung wird eIF2 $\alpha$  stärker phosphoryliert, wodurch die Translation gesenkt wird (Kuscuoglu *et al.* 2018). Es ist bekannt, dass die Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$  die gesamte mRNA-Translation des Zellzyklus reduziert und die Transkription von Genen für die Verbesserung der Proteinfaltung und *UPR* aktiviert (Kuscuoglu *et al.* 2018).

Der durch Proteinspeicherkrankheiten hervorgerufene proteotoxische-Stress führt zur Bildung von APP in der Leber (Kuscuoglu *et al.* 2018; Lebeaupin *et al.* 2018). Die APP erleichtern die Wiederherstellung der zellulären Homöostase durch Bildung von proinflammatorischen Zytokinen (Baumann und Gauldie 1994). Es besteht die Annahme, dass der durch PBA induzierte ER-Stress die APR im HBV-transgenen Mausmodell triggert. ER-Stress führt zur Rekrutierung von APP über den Transkriptionsfaktor CREBH (engl. *cyclic-AMP-Responsive-Element-Binding Protein H*) welcher von Hepatozyten exprimiert wird (Kuscuoglu *et al.* 2018). Interessanterweise wird dessen Transkription durch die Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 sowie durch die Aktivierung der PERK-eIF2 $\alpha$ -Signalkaskade getriggert (Zhang *et al.* 2006). Diese Aktivatoren wurden in der vorliegenden Arbeit untersucht (vgl. Abb. 30-32). Die Tatsache, dass

PERK und eIF2 $\alpha$  sowie CREBH für die Induktion der APR verantwortlich sind, könnte die Erhöhung der APP nach PBA-Behandlung in den vorliegenden Ergebnissen erklären.

Durch Zellschädigung kommt es zur Stimulierung der Expression proinflammatorischer Zytokine, wie z.B. *IL-1*, *IL-6* und *TNF- $\alpha$* , was in der Leber zur Produktion und Sekretion von APP, u.a. der Serumamyloide der Gruppe A, führt (Nguyen *et al.* 2014; Gruys *et al.* 2005). Die Moleküle *IL-1 $\alpha$*  und *TNF- $\alpha$*  wurden nach PBA-Behandlung in den vorliegenden Untersuchungen ebenfalls verstärkt im Blutserum der Mäuse detektiert (vgl. Abb. 31). Weiterhin wurde ein Anstieg von BLC, G-CSF, KC, JE, SDF-1 und TIMP-1 nach PBA-Gabe gemessen (vgl. Abb. 31). Die meisten in der Literatur veröffentlichten Ergebnisse schreiben PBA eine antiinflammatorische Wirkung zu (Ono *et al.* 2014; Roy *et al.* 2012), konträr dazu werden in einer Studie zu zystischer Fibrose durch PBA proinflammatorische Effekte induziert (Roque *et al.* 2008).

Man kann die APP in 2 Klassen unterteilen (Moshage 1997). Die Typ I APP, wie z.B. der Komplementfaktor C3 und die Serumamyloide, werden durch *IL-1* und *TNF- $\alpha$*  reguliert. Zu den Typ II APP zählen Fibrinogen,  $\alpha$ 1-Antitrypsin und Hepsidin, deren Produktion durch *IL-6*, *IL-11* und *leukemia inhibitory factor* stimuliert wird. In der vorliegenden Arbeit wurden die Typ I APP SAA1 und SAA2 nachgewiesen (vgl. Tab. 14 und 15, Abb. 28). Typ I APP steigen beim Menschen innerhalb von 4 Stunden nach einer Entzündung an und erreichen ihr Maximum nach 24 bis 72 Stunden. Die Typ II APP steigen erst nach 24 bis 28 Stunden an und erreichen ihr Maximum nach 7-10 Tagen. Die Konzentrationen der Serumamyloide (Typ I APP) können im Rahmen einer APR um das 1000-fache des normalen Levels ansteigen, wohingegen Typ II APP in der Regel nur um den Faktor 2-5 ansteigen (Farah Aziz Khan Mohd Fareed Khan). Dies könnte erklären, wieso in den PBA-behandelten Gruppen nur Typ I APP nachweisbar waren. Die vermutlich nur geringe Veränderung der Typ II APP nach PBA-Behandlung war mit den angewandten Methoden nicht eindeutig messbar.

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wurde deutlich, dass trotz der Hochregulation von APP und Inflammation-assoziierten Molekülen die Transaminasenmessung sowie die Messung des proapoptotischen Markers CHOP keine negativen Veränderungen nach PBA-Behandlung ergaben (vgl. Abb. 21 und 34). Aktuell gilt die Höhe der ALT als sehr sensitiver Marker einer hepatozellulären Schädigung

(Blomeyer *et al.* 2014). Spannend wäre es zu eruieren, ob die Serumamyloide noch sensitivere Biomarker für hepatische Schädigung als die bisher angewandten Biomarker darstellen. Zur Messung des Leberschadens bedient man sich heute invasiver und nichtinvasiver Methoden (Valva *et al.* 2016). Gold-Standard der invasiven Diagnostik ist die Leberbiopsie. Zu den nicht-invasiven Diagnostik-Tools zählen die Bildgebung (z. B. die transiente Elastografie und Dopplersonografie) sowie die Messung von Klasse I und Klasse II Biomarkern (Qi *et al.* 2018). Die Klasse I Biomarker umfassen die Hyaluronsäure, Prokollagen Typ III, Typ IV Kollagen, MMP und TIMPs. Die Menge von TIMP-1 war in den PBA-behandelten Gruppen ebenfalls vermehrt nachweisbar (vgl. Abb. 31). Zu den Klasse II Biomarkern zählen beispielsweise die AST/ALT-Ratio (AAR) und der AST/Thrombozyten-Ratio-Index (APRI). TNF- $\alpha$  und lösliches Zytokeratin-18 dienen als Apoptose-Marker (Valva *et al.* 2016). TNF- $\alpha$  war in den durchgeführten Analysen nach PBA-Behandlung im Blutserum der Mäuse erhöht messbar (vgl. Abb. 31). Die Messung der Serumamyloide weist auf APR hin, dient aktuell aber noch nicht zur Einschätzung des Leberschadens. Die Anwendung der SAA als Biomarker für Leberschaden wäre in Zukunft denkbar. Weiterhin könnte eine Übertragung auf humane Gewebeproben in Folgestudien angestrebt werden (Nallagangula *et al.* 2018).

Aufgrund der chronischen Vorschädigung der Leber durch das Transgen und die direkten Auswirkungen der PBA-Behandlung auf die Verteilung des Transgens ist davon auszugehen, dass die PBA-induzierte APR auf das hepatische Geschehen zurück zu führen ist. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass PBA auch extrahepatische Prozesse induziert, die zu den ansteigenden Entzündungsreaktionen beitragen, obwohl hierzu weder klinische noch experimentelle Daten vorliegen. In Folgestudien könnte man weitere Organe diesbezüglich untersuchen.

In den vorliegenden Untersuchungen zeigten sich geschlechtsspezifische Unterschiede in der hepatischen Immunreaktion auf die PBA-Behandlung. Während die männlichen Tiere nach PBA-Gabe mit vermehrtem ER-Stress und der Produktion von APP reagierten, zeigten die weiblichen Tiere eine sehr schwache bis keine APR nach PBA-Behandlung (vgl. Abb. 29 und 32). Eine chronische HBV-Infektion kann zum HCC führen (Tu *et al.* 2017). In murinen Studien wurden nach Gabe des Kanzerogens Diethylnitrosamin erhöhte IL-6-Konzentrationen gemessen. Die Zytokinproduktion war bei den männlichen Mäusen stärker ausgeprägt als bei den weiblichen Tieren. Eine wichtige protektive Rolle wird hierbei den Östrogenen zugesprochen. Es konnte gezeigt werden, dass Östrogene



die IL-6 Produktion aus den Kupfer-Zellen in nekrotischen Hepatozyten senken und somit das Entstehungsrisiko eines HCCs mindern (Naugler *et al.* 2007).

Es ist bekannt, dass sich HBV als „stilles“ Virus dem Immunsystem entzieht und von Hepatozyten weder erkannt noch bekämpft werden kann (Cheng *et al.* 2017). Dies stellt ein Problem bei der körpereigenen Abwehrreaktion dar, weil das HBV nicht als körperfremd wahrgenommen wird. Wenn PBA, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, eine APR auslöst, stellt sich die Frage, ob PBA die infizierten Zellen auf das exogene Protein aufmerksam macht und somit dem „Versteckspiel“ des Virus entgegenwirkt. So könnte PBA trotz induzierter APR eine positive Rolle zugeschrieben werden.

### **5.3 Relevanz der PBA-Behandlungsdauer**

#### **Inwieweit spielt die PBA-Behandlungsdauer eine Rolle in der Leberpathologie?**

PBA wird derzeit als erfolgsversprechendes Therapeutikum in der Parkinson-Forschung eingesetzt. Die Wirkungsweise ist hier mit der Auflösung zellschädigender Proteinaggregate und der Verringerung von Zellstress verbunden (Zhou *et al.* 2011). Die Arbeitsgruppe um Zhou *et al.* führte Analysen an 4-6 Monaten alten Mäusen des genetischen Hintergrunds C57BL/6 sowie in Zellkultur durch. Nach PBA-Gabe wurde eine vermehrte Expression des DJ-1 Proteins im Gehirn der Mäuse ermittelt. Das Protein DJ-1 wirkt protektiv auf oxidativen Stress und verbessert die kognitive Situation im Rahmen der Parkinson-Erkrankung (Zhou *et al.* 2011). In dieser Studie wurde PBA den Mäusen zwar auch über das Trinkwasser appliziert, allerdings unterschieden sich die verwendeten PBA-Konzentrationen sowie die Behandlungsdauer. In den Analysen von Zhou *et al.* wurden Konzentrationen von 500, 1000, 1500, und 2000 mg/l verwendet, wohingegen im vorliegenden Mausversuch eine konstante PBA-Konzentration von ca. 930 mg/l gewählt wurde (vgl. Kapitel 2.9.2). Interessanterweise zeigten sich die markantesten Ergebnisse in den Analysen von Zhou *et al.* bei einer Konzentration von 1000 mg/l, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die in der vorliegenden Arbeit verwendete Konzentration von 930 mg/l gut gewählt wurde. PBA wurde in den Untersuchungen zu *Morbus* Parkinson über einen Zeitraum von zwei Wochen den Mäusen mit dem Trinkwasser verfüttert (Zhou *et al.* 2011). Es stellt sich die Frage, ob ein positiver Effekt von PBA abhängig von der Behandlungsdauer der Mäuse ist. Die Vermutung liegt nahe, dass nach Kurzzeitbehandlung (eine und acht Wochen) der proinflammatorische Effekt von PBA überwiegt und das therapeutische Potential erst nach Langzeitbehandlung

apparent wird. Eine Hypothese hierzu ist, dass der Organismus PBA nach Gewöhnung schneller metabolisiert, sodass geringere Wirkmengen den Effekt nach acht Wochen wieder nivellieren. Initial kommt es zu einer transienten Mobilisierung von HBsAg durch das PBA-induzierte Auflösen der HBsAg-Aggregate. Die Auflösung der Aggregate ist in den über eine Woche mit PBA behandelten Mäusen deutlicher ausgeprägt als in den Mäusen, die über acht Wochen mit PBA behandelt wurden (vgl. Kapitel 4.3.1). Es wird weiterhin vermutet, dass sich die Leberpathologie nach achtwöchiger PBA-Behandlung verbessert und die Aggregatbildung nach acht Wochen erneut einsetzt. Der Organismus steuert der Wirkung von PBA entgegen und geht wieder zur „gesünderen“ Aggregation der Fremdproteine über, sodass nach achtwöchiger Behandlung der Effekt nivelliert ist. Unterstützt wird diese Annahme auch durch die Messung des ER-Stress-Level. Nach einer Woche wurde vermehrt ER-Stress gemessen, der nach acht Wochen auf fast normale Spiegel zurück ging (vgl. Kapitel 4.6).

#### **5.4 Limitationen im Versuchsaufbau**

Für die vorliegende Arbeit stand ein murines Tiermodell zur Verfügung, welches gegenüber der Zellkultur den Vorteil hat, Zellinteraktionen und Gewebeverbände darzustellen. Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Organen, wie z.B. über das Blut durch Botenstoffe, lassen sich hiermit abbilden (Chisari *et al.* 1985). Ein Anspruch auf vollständige Übertragbarkeit der murinen Situation auf das humane System kann natürlich nicht erhoben werden. Dennoch können pathologische Aspekte der humanen HBV-Infektion mit der in dieser Arbeit vorliegenden Mauslinie sehr gut abgebildet werden. Durch den vorliegenden genetischen Hintergrund der verwendeten Mauslinie (BALB/c) wird die Entwicklung von Leberfibrose gefördert und damit ähnelt das Modell phänotypisch der chronischen HBV-Infektion beim Menschen (vgl. Kapitel 1.4). Das HBV-transgene Mausmodell hat den Vorteil, dass keine immunologische Leberschädigung bei den Tieren auftritt, da sie tolerant gegenüber dem eingebrachten Transgen schon vor Reifung des adaptiven Immunsystems sind (Dandri *et al.* 2006). Grundlage des vorliegenden Mausmodells ist das von Chisari etablierte Modell (Chisari *et al.* 1989), welches auf einer Mikroinjektion von subgenomischen Fragmenten der HBV-DNA in gesunde Mäuse basiert. Die HBV-Fragmente codieren für Regionen der viralen Hüllproteine *preS1*, *preS2*, *S* und HBx, welche durch den murinen und leberspezifischen Albuminpromotor konstant exprimiert werden (vgl. Kapitel 1.4). Daher

konnte mit unserem Modell die direkte zytotoxische Wirkung des HBV auf die Leberpathologie in Abhängigkeit von PBA untersucht werden (Churin *et al.* 2014).

Die im Verlauf beobachtete Heterogenität der Versuchsergebnisse bei den Geschlechtern resultierte in einer geschlechtsspezifischen Unterteilung der Versuchsgruppen, was die ursprüngliche Anzahl (n=10) der Tiere pro Subgruppe verminderte. In der männlichen Gruppe Tg sowie Tg+8W PBA musste aufgrund von denaturiertem Lebergewebe je eine Maus aus den Analysen herausgenommen werden. Daher war die geringe Stichprobenzahl von n=4-5 pro Subgruppe eine Limitation dieser Studie. Hätte man männliche und weibliche Tiere pro Subgruppe zusammen ausgewertet, würden sich Regulationsmuster ausgleichen und PBA-abhängige Effekte wären nicht zu eruieren gewesen. Ein höherer Stichproben-Umfang hätte aussagekräftigere Ergebnisse erzielt sowie Standardabweichungen verringert. Aufgrund ethischer Gründe wurde hoher Wert darauf gelegt möglichst wenige Tiere für diese Studie zu töten. Weiterhin ist die Tierhaltung- und Zucht transgener Tiere sehr aufwendig, sodass nicht mehr Tiere zur Verfügung gestellt werden konnten.

Die folgende Tabelle zeigt, wie viele Tiere für die unterschiedlichen Analysen verwendet wurden:

**Tabelle 16: Stichprobenzahl n der unterschiedlichen Analysen.**

<b>Analyse</b>	<b>Stichprobenzahl n der männlichen Mäuse</b>	<b>Stichprobenzahl n der weiblichen Mäuse</b>
Transaminasenmessung (Kapitel 4.2)	Tg n=4 Tg+1W PBA n=5 Tg+8W PBA n=4	Tg n=5 Tg+1W PBA n=5 Tg+8W PBA n=5
H&E-Färbung und Immunhistochemie (Kapitel 4.1, 4.3.1, 4.7)	Tg n=4 Tg+1W PBA n=5 Tg+8W PBA n=4	Tg n=5 Tg+1W PBA n=5 Tg+8W PBA n=5
Western-Blot-Analyse und densitometrische Auswertung (Kapitel 4.6)	Tg n=4 Tg+1W PBA n=5 Tg+8W PBA n=4	Tg n=5 Tg+1W PBA n=5 Tg+8W PBA n=5
<i>Microarray</i> -Analyse (Kapitel 4.4)	Tg n=4 (mRNA-Pool)	nicht analysiert

	Tg+1W PBA n=4 (mRNA-Pool) Tg+8W PBA n=4 (mRNA-Pool)	
qRT-PCR-Analysen (Kapitel 4.3.2 und 4.5)	Tg n=4 Tg+1W PBA n=5 Tg+8W PBA n=4	Tg n=5 Tg+1W PBA n=5 Tg+8W PBA n=5
Zytokin-Array (Kapitel 4.5.3)	Tg n=3 (Serum-Pool) Tg+1W PBA n=5 (Serum-Pool) Tg+8W PBA n=4 (Serum-Pool)	nicht analysiert

Darüber hinaus wäre es interessant gewesen, eine zusätzliche Wildtyp-Gruppe - also ohne HBV-Transgen - zu untersuchen. Folglich hätte man die Auswirkungen von PBA auf eine gesunde/nicht transgene Maus explorieren können.

Die orale Applikation von PBA mit dem Trinkwasser stellt eine natürliche, leicht durchführbare, nichtinvasive und auf den Menschen gut übertragbare Verabreichungsart dar. Da das Trinkverhalten der Mäuse variiert, kann angenommen werden, dass auch die aufgenommene PBA-Menge unter den einzelnen Mäusen different ist. Dies kann für die Heterogenität der Ergebnisse innerhalb einer Gruppe verantwortlich sein. Allerdings wurde durch Gründe der höheren auftretenden Belastung der Tiere, sowie Komplikationen wie Peritonitis oder Thrombophlebitis, von einer invasiven Verabreichungsart über Venen-oder Peritonealkatheter abgesehen.

## 5.5 Ausblick

Die aktuellen Therapieansätze der chronischen HBV-Infektion begrenzen sich auf die Senkung der Viruslast und folglich der Verhinderung von Langzeitfolgen einer chronischen Infektion. Keine der momentan verfügbaren Medikamente gegen die HBV-Infektion greift an den direkt zytotoxischen Effekten der akkumulierenden Virusproteine an. Wie in den vorliegenden Ergebnissen gezeigt, greift PBA direkt an der Modulation der HBsAg-Aggregate ein (vgl. Abb. 22) und bietet eine solide Grundlage weiterer

Forschung. Die gezielte Immunmodulation durch synthetische Chaperone eröffnet neue Perspektiven für die antivirale Therapie. Weiterhin könnte es für die Krebsforschung von Bedeutung sein, die Zusammenhänge zwischen Inflammation, ER-Stress und der darauffolgenden UPR bei chronischer HBV-Infektion zu verstehen. Die Modulation der UPR durch synthetische Chaperone könnte als Signalgeber für nachfolgende apoptotische Vorgänge dienen.

In dieser Arbeit wird ein *in vivo* Mausmodell präsentiert, an welchem sich die direkt zytopathischen Auswirkungen der HBV-Oberflächenproteine ausgezeichnet untersuchen lassen. In Folgestudien könnte z.B. eruiert werden, welche Auswirkungen eine PBA-Langzeitbehandlung über mehrere Monate auf das Aggregationsmuster der HBV-Hüllproteine hat. Ergänzend sind Analysen von humanen Leberproben in Abhängigkeit von PBA denkbar. Die resultierenden Erkenntnisse könnten pharmakologische Therapieansätze eröffnen, welche an der übermäßigen Akkumulation viraler Hüllproteine ansetzen.

## 6 Zusammenfassung

Trotz effektiver Vakzinierung sowie antiviraler Medikamente gegen das Hepatitis B Virus beträgt die Zahl chronisch infizierter Menschen weltweit rund 250 bis 270 Millionen. Die Schädigung Hepatitis B Virus infizierter Hepatozyten durch immunvermittelte Prozesse ist gut charakterisiert. Dagegen ist wenig über die direkte zytotoxische Wirkung von HBV Proteinen bekannt. In HBV infizierten Hepatozyten bilden sich Proteinaggregate durch Überbelastung des Translations- und Proteinexportapparates und führen zu ER-Stress. Zur Kompensation aktivieren Hepatozyten spezifische Signalkaskaden, die zur Erhöhung der Faltkapazität des ER, zum Translationsstopp und Abbau fehlgefalteter Proteine führen, der sogenannten *unfolded protein response* (UPR). Aktuell wird zunehmend nach Substanzen geforscht, die die Funktion des ER aufrechterhalten und ER-Stress mindern sollen. Chaperone erleichtern und beschleunigen die Proteinfaltung. PBA zählt zu den synthetischen Chaperonen und fand bereits Anwendung in der experimentellen Therapie von Proteinspeichererkrankungen.

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin zu klären, ob PBA eine therapeutische Wirkung im HBV-LHBs-transgenen Mausmodell zeigt. Die Leberpathologie wurde in Abhängigkeit von der Dauer der PBA-Behandlung analysiert. Die Tiere wurden über einen Zeitraum von einer und acht Wochen oral über das Trinkwasser mit PBA behandelt und im Alter von zwölf Wochen getötet. Die H&E-Färbung diente der Analyse von Lebermorphologie und -pathologie. Die allgemeine Leberintegrität wurde mittels der Messung der Lebertransaminasen im Serum untersucht. Die Immunhistochemie umfasste die Analyse HBsAg positiver Hepatozyten sowie Kernfärbungen des Apoptosemarkers CHOP. Die HBsAg Menge wurde auf RNA- und Proteinebene untersucht und die hepatische Genexpression mittels einer *Microarray*-Analyse auf auffällige Muster hin analysiert. ER-Stress und Leberentzündung wurden in Abhängigkeit von der PBA-Behandlung dargestellt.

HBV-LHBs-transgene Mäuse exprimieren das große Hüllprotein (LHBs) in den Hepatozyten, was zur Akkumulation des LHBs im ER der Mäuse führte. Die Leberschnitte PBA-behandelter Mäuse zeigten ein verändertes intrazelluläres Aggregationsmuster mit konsekutiver Feinverteilung der durch Überexpression akkumulierenden HBV-Hüllproteine im ER. Nachfolgend kam es zu überwiegend

inflammatorischen Stress-Reaktionen, gemessen durch den Anstieg der Akute-Phase-Proteine SAA1, SAA2, MT1 und MT2 sowie von inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen (v.a. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , G-CSF und BLC). ER-Stress wurde mittels Western-Blot-Analyse nach PBA-Behandlung vermehrt detektiert. Bei normwertigen Transaminasen und negativer Apoptose ergaben sich keine Hinweise auf Hepatotoxizität nach PBA-Behandlung. Es bestand eine Heterogenität der Geschlechter in der Akute-Phase-Reaktion. Die Behandlungszeit über eine Woche führte überwiegend zu stärkeren Veränderungen in der Leberpathologie als die Behandlung über acht Wochen.

**Schlussfolgerung:** Das synthetische Chaperon PBA beeinflusst die hepatogene Zellphysiologie. Eine Auflösung und Feinverteilung der HBsAg-Aggregate nach PBA-Behandlung verstärkt die systemische Entzündung. Die Aggregation der zellfremden HBs Proteine im ER stellt vermutlich einen Schutzmechanismus der Zelle dar, der durch die Behandlung mit dem synthetischen Chaperon PBA durchbrochen wird. Es wird vermutet, dass das therapeutische Potential von PBA erst im Rahmen einer Langzeitbehandlung apparent werden kann.

## ***7 Summary***

Despite an effective vaccination, as well as antiviral medications against the hepatitis B virus, the number of chronically infected human beings amounts to 250-270 million worldwide. The impairment of hepatocytes infected with hepatitis B by immune-mediated processes is well characterized. However, little is known about the direct cytotoxic effect of HBV proteins. In HBV infected hepatocytes, protein aggregates are formed by an overload of the translational apparatus and causes ER-stress. As a compensation, the cell activates specific signal cascades which lead to an increase of the folding capacity of the ER, to a translational stop and to a depletion of misfolded proteins, the so-called unfolded protein response (UPR). Currently, the search for substances that are supposed to maintain the functioning of the ER while reducing ER-stress increases. Chaperones represent a group of molecules that facilitate and accelerate the protein folding. PBA ranks amongst these synthetic chaperones and has already been applied in the experimental therapy of protein storage diseases.

The overall aim of this thesis was to elucidate whether PBA shows a therapeutic effect in the transgenic mouse model. The hepatic pathology was examined as a function of the PBA treatment. Over a period of one and eight weeks, the animals were treated with PBA and killed at the age of twelve weeks. The general liver integrity was examined by means of a measurement of the activity of the liver transaminases in the serum. The H&E-staining yielded insights into the liver morphology and -pathology. The immunohistochemistry comprised the analyses of HBsAg positive hepatocytes as well as nuclear stainings of apoptosis markers. The HBsAg mass was examined on RNA- and protein level, and the hepatic gene expression was analysed concerning interesting patterns through a microarray analysis. ER-stress and hepatic inflammation were depicted as a function of the PBA-treatment.

The liver sections of mice treated with PBA showed an altered intracellular aggregation pattern with a consecutive dispersion of the HBV-coating proteins that are accumulating due to overexpression in the ER. Subsequently, there were predominantly inflammatory stress reactions such as the increase in the acute-phase-proteins SAA1, SAA2, MT1 and MT2 as well as in inflammatory cytokines and chemokines (e.g. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , G-CSF und BLC). ER-stress has increasingly been detected after the PBA treatment. With transaminases of standard value and a negative apoptosis, there was no indication of



hepatotoxicity following the PBA treatment. There was a heterogeneity of sexes regarding the immune response. The one-week treatment lead to a stronger alteration of the hepatic pathology than the treatment over an eight-week course.

**Conclusion:** The synthetic chaperon PBA has a high impact on the hepatogenic cell physiology. The dissolution and dispersion of the HBsAg aggregates reinforces the systemic inflammation. This leads to the conclusion that the aggregation of the viral HBs proteins in the ER represents a protective mechanism of the cell that is disrupted by the treatment with the synthetic chaperon PBA. It is assumed that the therapeutic potential of PBA will only become apparent in the course of a long-term treatment.

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Geografische Verteilung der chronischen HBV-Infektion. ....	2
Abbildung 2: Struktureller Aufbau des HBV. A) Subvirale Partikel; B) HBV ( <i>Dane-</i> Partikel).....	3
Abbildung 3: Genomischer Aufbau des HBV.....	4
Abbildung 4: Replikationszyklus des HBV. ....	7
Abbildung 5: Histologische Färbungen der Akkumulation des großen HBV- Oberflächenproteins (LHBs).....	11
Abbildung 6: Vergleich zwischen einer gesunden und einer fibrotischen/zirrhotischen Leber. ....	12
Abbildung 7: Zellulärer Entstehungsmechanismus der Leberfibrose. ....	15
Abbildung 8: Zeitlicher Verlauf der viralen Marker nach HBV-Infektion. ....	17
Abbildung 9: <i>Unfolded Protein Response</i> .....	21
Abbildung 10: Strukturformel von 4-PBA.....	25
Abbildung 11: Darstellung von Milchglashepatozyten (engl. <i>ground-glass-cells</i> , GGC) in einem mit H&E angefärbtem Leberschnitt. ....	28
Abbildung 12: Verwendeter Proteinmolekulargewichtsmarker.....	34
Abbildung 13: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. ....	39
Abbildung 14: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs. ....	40
Abbildung 15: Beispiel einer RNA-Gelelektrophorese zur Überprüfung der RNA- Integrität.....	44
Abbildung 16: Herstellung der Verdünnungsreihe .....	50
Abbildung 17: Schematischer Aufbau des Western-Blots.....	53
Abbildung 18: Arbeitsschritte der Proteinfractionierung.....	58
Abbildung 19: Schematische Darstellung der subzellulären Fraktionierung.....	59
Abbildung 20: H&E-Färbung des Lebergewebes zur Übersichtsdarstellung. ....	69
Abbildung 21: Analyse der Transaminasen im Blutserum der Mäuse.....	71
Abbildung 22: Immunhistochemische Färbung von HBsAg im Lebergewebe. ....	73
Abbildung 23: mRNA-Expression von <i>LHBs</i> und <i>SHBs</i> im Lebergewebe. ....	74
Abbildung 24: Western-Blot-Analyse der hepatischen HBsAg-Expression in der Tg+1W PBA-Gruppe.....	75

Abbildung 25: Western-Blot-Analyse der hepatischen HBsAg-Expression in der Tg+8W PBA-Gruppe. ....	76
Abbildung 26: Western-Blot-Analyse der hepatischen HBsAg-Expression nach Zellkompartimentfraktionierung. ....	77
Abbildung 27: <i>Heatmap</i> -Darstellung der hepatischen Genregulation der PBA-behandelten Mäuse. ....	81
Abbildung 28: qRT-PCR Analyse der mRNA-Expression von den Akute-Phase-Proteinen <i>SAA1</i> , <i>SAA2</i> , <i>MT1</i> und <i>MT2</i> im Lebergewebe der männlichen Mäuse. .	82
Abbildung 29: qRT-PCR Analyse der mRNA-Expression von <i>SAA1</i> , <i>SAA2</i> und <i>MT2</i> im Lebergewebe der weiblichen Mäuse. ....	84
Abbildung 30: qRT-PCR Analyse der mRNA-Expression von <i>IL-1<math>\beta</math></i> und <i>TNF-<math>\alpha</math></i> im Lebergewebe der männlichen Mäuse. ....	85
Abbildung 31: Zytokin- <i>Array</i> zur Bestimmung von Zytokinen und Chemokinen im Blutserum der männlichen Mäuse. ....	87
Abbildung 32: Western-Blot-Analyse der ER-Stressmarker eIF2 $\alpha$ /p-eIF2 $\alpha$ und PERK/p-PERK. ....	89
Abbildung 33: Immunhistochemische Färbung des Apoptosemarkers CHOP im Lebergewebe männlicher HBV-transgener Mäuse. ....	91
Abbildung 34: Auszählung positiv CHOP-gefärbter Zellkerne im Lebergewebe HBV-transgener männlicher Mäuse. ....	92
Abbildung 35: Zusammenfassung der Ergebnisse in einem Flussdiagramm. ....	94

## 9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte.....	30
Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	31
Tabelle 3: Verwendete Chemikalien.....	32
Tabelle 4: Verwendete Komplettsysteme.....	34
Tabelle 5: Die für die qRT-PCR verwendeten Primer.....	35
Tabelle 6: Die verwendeten Primärantikörper.....	35
Tabelle 7: Die verwendeten Sekundärantikörper.....	36
Tabelle 8: Die verwendeten Software-Programme.....	36
Tabelle 9: Auflistung der verwendeten Mausmodelle.....	38
Tabelle 10: Protokoll des Ablaufs des <i>Thermocyclers</i> .....	45
Tabelle 11: Temperaturprofil des <i>Real-Time-PCR</i> -System <i>StepOne Plus</i> .....	46
Tabelle 12: Zusammensetzung des Trenngels zur Herstellung von zwei Gelen.....	52
Tabelle 13: Zusammensetzung des Sammelgels zur Herstellung von zwei Gelen.....	52
Tabelle 14: Die am stärksten regulierten Gene der Gruppen Tg gegenüber Tg+1W PBA. .....	79
Tabelle 15: Die am stärksten regulierten Gene der Gruppen Tg gegenüber Tg+8W PBA. .....	79
Tabelle 16: Stichprobenzahl n der unterschiedlichen Analysen.....	103

## 10 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
AG	Arbeitsgemeinschaft
AK	Alzheimer-Krankheit
Alb	Albumin
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
ALT	Alanin-Aminotransferase
AP	alkalische Phosphatase
AP-1	Aktivator-Protein-1
APP	Akute-Phase-Proteine
APR	Akute-Phase-Reaktion
APS	Ammoniumpersulfat
ASH	alkoholische Steatohepatitis
AST	Aspartat-Transaminase
ATF6	<i>activating transcription factor-6</i>
AveExpr	<i>Average expression</i>
BCIP	5-Brom-4 Chlor-3 Indolyphosphat
BiP	<i>Immunglobulin-heavy chain- binding protein</i>
BLC	B Lymphozyten Chemoattraktorprotein
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
C5	Komplementfaktor 5
ca.	circa
cccDNA	<i>covalently closed circular DNA</i>
CD4 <sup>+</sup>	<i>cluster of differentiation 4 positiv</i>
CD8 <sup>+</sup>	<i>cluster of differentiation 8 positiv</i>
cDNA	<i>complementary</i> Desoxyribonukleinsäure
CEB	<i>cytoplasmic extraction buffer</i>
CFTR	<i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>

CHOP .....	<i>C/EBP homologous protein</i>
CpG .....	Cytosin-Phosphatidyl-Guanin
CREBH .....	<i>ER bound cAMP responsive-element-binding protein H</i>
CRP .....	C reaktives Protein
CT.....	<i>Cycle Threshold</i>
CTL .....	zytotoxische T-Lymphozyten
CXCL .....	Chemokin-Ligand-1
d .....	<i>day</i>
d.h. ....	das heißt
DHBV.....	<i>duck</i> Hepatitis B Virus
DNA .....	Desoxyrubiukleinsäure
dNTPs .....	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ECL .....	<i>enhanced chemiluminescence</i>
eIF2 $\alpha$ .....	<i>eucaryotic initiation factor 2alpha</i>
ELISA .....	<i>Enzyme Linked Immunosorbant Assay</i>
engl. ....	englisch
ER .....	Endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i> .....	<i>et alii</i>
EZM .....	extrazelluläre Matrix
F .....	weiblich
Fa.....	Firma
FDR .....	<i>false discovery rate</i>
g .....	Schleuderziffer
G-CSF .....	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor
GGC .....	<i>ground-glass-cells</i>
GRE .....	<i>glucocorticoid response element</i>
GRP-78 .....	<i>glucose regulated protein 78kD</i>
h .....	<i>hour</i>
H&E .....	Hämatoxylin und Eosin
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	Wasserstoffperoxid
HBcAg .....	Hepatitis B <i>core</i> Antigen
HBcAg.....	Hepatitis-B Antigen für die sezernierte Form des Kapsidproteins/ exkretorisch
HBsAg.....	Hepatitis B <i>surface</i> Antigen
HBV .....	Hepatitis B Virus

HCC.....	<i>hepatocellular carcinoma</i>
HCL .....	Salzsäure
HD .....	Huntington Disease
HIV.....	<i>human immunodeficiency virus</i>
HRP.....	<i>horse radish peroxidase</i>
HSC.....	<i>hepatic stellate cells</i>
HSPG.....	Heparinsulfatproteoglykan
IL .....	Interleukin
IL-1 $\beta$ .....	Interleukin-1 beta
INF- $\gamma$ .....	Interferon-gamma
IP-10.....	Interferon gamma induziertes Protein-10
IRE1 $\alpha$ .....	<i>inositol requiring protein 1 alpha</i>
JLU .....	Justus-Liebig-Universität
k .....	kilo
kD .....	kilo Dalton
l .....	Liter
Lcn .....	Lipocalin
LHBs .....	<i>large hepatitis B surface antigen</i>
M .....	männlich, Molar
MCP-1 .....	Makrophagen-Chemoattraktorprotein-1
M-CSF.....	Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor
MEB .....	<i>membrane extraction buffer</i>
MF .....	Myofibroblasten
MHBs .....	<i>middle hepatitis B surface antigen</i>
MHC .....	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
min. ....	mindestens
MMPs .....	Matrix-Metalloproteinasen
MP.....	<i>Morbus Parkinson</i>
mRNA .....	<i>messenger RNA</i>
MT .....	Metallothioneine
n .....	Stichprobenzahl
NASH .....	nicht alkoholische Steatohepatitis
NBT .....	Nitroblau-Tetrazoliumsalz
NEB .....	<i>nuclear extraction buffer</i>

NFκB	.....	<i>nuclear factor kappa B</i>
NKZ	.....	Natürliche Killerzellen
NO	.....	Stickstoffmonoxid
NRTI	.....	<i>Nucleos(t)ide Reverse Transcriptase Inhibitors</i>
NTCP	.....	<i>Natrium Taurocholat Cotransporting Polypeptide</i>
ORF	.....	<i>open reading frame</i>
PBA	.....	<i>Phenyl-Butyric-Acid</i>
PDGF	.....	<i>platelet-derived growth factor</i>
PEB	.....	<i>pellet extraction buffer</i>
PERK	.....	<i>protein kinase-like endoplasmatic reticulum kinase</i>
PFA	.....	Paraformaldehyd
Pip5K	.....	Phosphatidylinositol-4-Phosphat-5-Kinase
PKC	.....	Proteinkinase C
Pr	.....	Primase
qRT-PCR	.....	<i>quantitative real time polymerase chain reaction</i>
rcDNA	.....	<i>relaxed circular partially double-stranded DNA</i>
RNA	.....	Ribonukleinsäure
ROS	.....	<i>reactive oxygen species</i>
S1/2 P	.....	<i>site-1/2 protease</i>
SAA	.....	Serumamyloid
SCID	.....	<i>severe combined immune deficiency</i>
SDF-1	.....	Stromazell-Faktor-1
SDS-PAGE	.....	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SHBs	.....	<i>small hepatitis B surface antigen</i>
sICAM-1	.....	Lösliches interzelluläres Adhäsionsmolekül-1
SVP	.....	subviralen Partikel
Tg	.....	Transgen
TGF	.....	<i>transforming growth factor</i>
TH	.....	T-Helferzellen
TIMPs	.....	<i>tissue inhibitors of metalloproteinases</i>
TNF-α	.....	Tumornekrosefaktor-alpha
uPA	.....	Uroplasminogenaktivator
UPR	.....	<i>unfolded protein response</i>
USA	.....	<i>United States of America</i>



v.a. .... vor allem  
W ..... Woche  
WHO ..... Weltgesundheitsorganisation  
WHV ..... *woodchuck* Hepatitis Virus  
WT ..... Wildtyp  
XBP1 ..... *X-box-binding protein 1*  
z.B. .... zum Beispiel

## 11 Literaturverzeichnis

**Alavian**, Seyed-Moayed; Tabatabaei, Seyed Vahid (2010): The effect of diabetes mellitus on immunological response to hepatitis B virus vaccine in individuals with chronic kidney disease: A meta-analysis of current literature. In: *Vaccine* 28 (22), S. 3773–3777. DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.03.038.

**Allweiss**, Lena; Dandri, Maura (2016): Experimental in vitro and in vivo models for the study of human hepatitis B virus infection. In: *Journal of hepatology* 64 (1 Suppl), S. 31. DOI: 10.1016/j.jhep.2016.02.012.

**Almanza**, Aitor; Carlesso, Antonio; Chintha, Chetan; Creedican, Stuart; Doultinos, Dimitrios; Leuzzi, Brian *et al.* (2018): Endoplasmic reticulum stress signalling - from basic mechanisms to clinical applications. In: *The FEBS journal*. DOI: 10.1111/febs.14608.

**Ando**, K.; Guidotti, L. G.; Wirth, S.; Ishikawa, T.; Missale, G.; Moriyama, T. *et al.* (1994): Class I-restricted cytotoxic T lymphocytes are directly cytopathic for their target cells in vivo. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 152 (7), S. 3245–3253.

**Andrea**: Microsoft Word - Implen Application Note Protein Analysis on OD600 DiluPhotometer.doc. Online verfügbar unter [http://www.implen.de/wp-content/uploads/2015/03/Implen\\_Application\\_Note\\_Protein\\_Analysis\\_on\\_OD600\\_DiluPhotometer.pdf](http://www.implen.de/wp-content/uploads/2015/03/Implen_Application_Note_Protein_Analysis_on_OD600_DiluPhotometer.pdf), zuletzt geprüft am 07.10.2016.

**Appenrodt**, Beate (2014): Klinisches Management der Leberzirrhose und ihrer Komplikationen. Hg. v. Marcus Schuchmann. Stuttgart: Thieme.

**Asabe**, S.; Wieland, S. F.; Chattopadhyay, P. K.; Roederer, M.; Engle, R. E.; Purcell, R. H.; Chisari, F. V. (2009): The size of the viral inoculum contributes to the outcome of hepatitis B virus infection. In: *Journal of virology* 83 (19), S. 9652–9662. DOI: 10.1128/JVI.00867-09.

**Ayala**, Pedro; Montenegro, Jose; Vivar, Raul; Letelier, Alan; Urroz, Pablo Aranguiz; Copaja, Miguel *et al.* (2012): Attenuation of endoplasmic reticulum stress using the chemical chaperone 4-phenylbutyric acid prevents cardiac fibrosis induced by isoproterenol. In: *Experimental and molecular pathology* 92 (1), S. 97–104. DOI: 10.1016/j.yexmp.2011.10.012.

- Bachmanov**, Alexander A.; Reed, Danielle R.; Beauchamp, Gary K.; Tordoff, Michael G. (2002): Food intake, water intake, and drinking spout side preference of 28 mouse strains. In: *Behav Genet* 32 (6), S. 435–443.
- Battaler**, Ramon; Brenner, David A. (2005): Liver fibrosis. In: *The Journal of clinical investigation* 115 (2), S. 209–218. DOI: 10.1172/JCI24282.
- Baumann**, Heinz; Gauldie, Jack (1994): The acute phase response. In: *Immunology Today* 15 (2), S. 74–80. DOI: 10.1016/0167-5699(94)90137-6.
- Baumert**, Thomas F.; Thimme, Robert; von Weizsäcker, Fritz (2007): Pathogenesis of hepatitis B virus infection. In: *World journal of gastroenterology : WJG* 13 (1), S. 82–90.
- Ben Mosbah**, I.; Alfany-Fernandez, I.; Martel, C.; Zaouali, M. A.; Bintanel-Morcillo, M.; Rimola, A. *et al.* (2010): Endoplasmic reticulum stress inhibition protects steatotic and non-steatotic livers in partial hepatectomy under ischemia-reperfusion. In: *Cell Death Dis* 1, S. e52. DOI: 10.1038/cddis.2010.29.
- Benner**, K. G.; Lee, R. G.; Keeffe, E. B.; Lopez, R. R.; Sasaki, A. W.; Pinson, C. W. (1992): Fibrosing cytolytic liver failure secondary to recurrent hepatitis B after liver transplantation. In: *Gastroenterology* 103 (4), S. 1307–1312.
- Bergmann**, Timothy J.; Molinari, Maurizio (2018): Three branches to rule them all? UPR signalling in response to chemically versus misfolded proteins-induced ER stress. In: *Biology of the cell*. DOI: 10.1111/boc.201800029.
- Bertoletti**, Antonio; Ferrari, Carlo (2013): Innate and adaptive immune responses in chronic hepatitis B virus infections: towards restoration of immune control of viral infection. In: *Postgraduate medical journal* 89 (1051), S. 294–304. DOI: 10.1136/postgradmedj-2011-301073rep.
- Bertolino**, P.; McCaughan, G. W.; Bowen, D. G. (2002): Role of primary intrahepatic T-cell activation in the 'liver tolerance effect'. In: *Immunology and cell biology* 80 (1), S. 84–92. DOI: 10.1046/j.0818-9641.2001.01048.x.
- Blank**, Antje; Markert, Christoph; Hohmann, Nicolas; Carls, Alexandra; Mikus, Gerd; Lehr, Thorsten *et al.* (2016): First-in-human application of the novel hepatitis B and hepatitis D virus entry inhibitor myrcludex B. In: *Journal of Hepatology* 65 (3), S. 483–489. DOI: 10.1016/j.jhep.2016.04.013.

**Blomeyer, S.;** Best, J.; Bechmann, L. P.; Canbay, A. (2014): Diagnostischer Algorithmus bei erhöhten Leberwerten. In: *Gastroenterologie* 9 (2), S. 101–111. DOI: 10.1007/s11377-013-0835-6.

**Blumberg, B. S.;** Melartin, L.; Guint, R. A.; Werner, B. (1966): Family studies of a human serum isoantigen system (Australia antigen). In: *American Journal of Human Genetics* 18 (6), S. 594–608.

**Bohm, W.;** Schirmbeck, R.; Elbe, A.; Melber, K.; Diminky, D.; Kraal, G. *et al.* (1995): Exogenous hepatitis B surface antigen particles processed by dendritic cells or macrophages prime murine MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes in vivo. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 155 (7), S. 3313–3321.

**Bonorino, Paula;** Ramzan, Muhammad; Camous, Xavier; Dufeu-Duchesne, Tania; Thélu, Marie-Ange; Sturm, Nathalie *et al.* (2009): Fine characterization of intrahepatic NK cells expressing natural killer receptors in chronic hepatitis B and C. In: *Journal of hepatology* 51 (3), S. 458–467. DOI: 10.1016/j.jhep.2009.05.030.

**Brusilow, S. W.;** Maestri, N. E. (1996): Urea cycle disorders: diagnosis, pathophysiology, and therapy. In: *Advances in pediatrics* 43, S. 127–170.

**Budzinska, Magdalena A.;** Shackel, Nicholas A.; Urban, Stephan; Tu, Thomas (2018): Cellular Genomic Sites of Hepatitis B Virus DNA Integration. In: *Genes* 9 (7). DOI: 10.3390/genes9070365.

**Bustin, S. A.** (2000): Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. In: *Journal of molecular endocrinology* 25 (2), S. 169–193.

**Caballero, Andrea;** Tabernero, David; Buti, Maria; Rodriguez-Frias, Francisco (2018): Hepatitis B virus. The challenge of an ancient virus with multiple faces and a remarkable replication strategy. In: *Antiviral research*. DOI: 10.1016/j.antiviral.2018.07.019.

**Chayama, Kazuaki;** Hayes, C. Nelson; Hiraga, Nobuhiko; Abe, Hiromi; Tsuge, Masataka; Imamura, Michio (2011): Animal model for study of human hepatitis viruses. In: *Journal of gastroenterology and hepatology* 26 (1), S. 13–18. DOI: 10.1111/j.1440-1746.2010.06470.x.

- Chen, C. H.;** Chen, P. J.; Chu, J. S.; Yeh, K. H.; Lai, M. Y.; Chen, D. S. (1994): Fibrosing cholestatic hepatitis in a hepatitis B surface antigen carrier after renal transplantation. In: *Gastroenterology* 107 (5), S. 1514–1518.
- Chen, Margaret;** Sallberg, Matti; Hughes, Janice; Jones, Joyce; Guidotti, Luca G.; Chisari, Francis V. *et al.* (2005): Immune tolerance split between hepatitis B virus precore and core proteins. In: *Journal of virology* 79 (5), S. 3016–3027. DOI: 10.1128/JVI.79.5.3016-3027.2005.
- Chen, Mingjie;** Zhou, Huibing; Cheng, Ni; Qian, Feng; Ye, Richard D. (2014): Serum amyloid A1 isoforms display different efficacy at Toll-like receptor 2 and formyl peptide receptor 2. In: *Immunobiology* 219 (12), S. 916–923. DOI: 10.1016/j.imbio.2014.08.002.
- Cheng, Xiaoming;** Xia, Yuchen; Serti, Elisavet; Block, Peter Daniel; Chung, Michelle; Chayama, Kazuaki *et al.* (2017): Hepatitis B virus evades innate immunity of hepatocytes but activates cytokine production by macrophages. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 66 (6), S. 1779–1793. DOI: 10.1002/hep.29348.
- Chisari, F. V.;** Filippi, P.; Buras, J.; McLachlan, A.; Popper, H.; Pinkert, C. A. *et al.* (1987): Structural and pathological effects of synthesis of hepatitis B virus large envelope polypeptide in transgenic mice. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84 (19), S. 6909–6913.
- Chisari, F. V.;** Filippi, P.; McLachlan, A.; Milich, D. R.; Riggs, M.; Lee, S. *et al.* (1986): Expression of hepatitis B virus large envelope polypeptide inhibits hepatitis B surface antigen secretion in transgenic mice. In: *Journal of virology* 60 (3), S. 880–887.
- Chisari, F. V.;** Klopchin, K.; Moriyama, T.; Pasquinelli, C.; Dunsford, H. A.; Sell, S. *et al.* (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 (New York, N.Y.)* 230 (4730), S. 1157–1160.
- Chisari, F. V.;** Isogawa, Masanori; Wieland, Stefan F. (2010): Pathogenesis of Hepatitis B Virus Infection. In: *Pathologie-biologie* 58 (4), S. 258–266. DOI: 10.1016/j.patbio.2009.11.001.

**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 et al. (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.

**Cooreman, M. P.; Leroux-Roels, G.; Paulij, W. P. (2001):** Vaccine- and hepatitis B immune globulin-induced escape mutations of hepatitis B virus surface antigen. In: *Journal of biomedical science* 8 (3), S. 237–247.

**Cornberg, M.; Protzer, U.; Petersen, J.; Wedemeyer, H.; Berg, T.; Jilg, W. et al. (2011):** Aktualisierung der S 3-Leitlinie zur Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Hepatitis-B-Virusinfektion. In: *Zeitschrift für Gastroenterologie* 49 (7), S. 871–930. DOI: 10.1055/s-0031-1273462.

**Crispe, I. N. (2003):** Hepatic T cells and liver tolerance. In: *Nature reviews. Immunology* 3 (1), S. 51–62. DOI: 10.1038/nri981.

**Dandri, M.; Burda, M. R.; Torok, E.; Pollok, J. M.; Iwanska, A.; Sommer, G. et al. (2001):** Repopulation of mouse liver with human hepatocytes and in vivo infection with hepatitis B virus. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 33 (4), S. 981–988. DOI: 10.1053/jhep.2001.23314.

**Dandri, Maura; Lutgehetmann, Marc; Volz, Tassilo; Petersen, Jorg (2006):** Small animal model systems for studying hepatitis B virus replication and pathogenesis. In: *Seminars in liver disease* 26 (2), S. 181–191. DOI: 10.1055/s-2006-939760.

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

**Davies, S. E.; Portmann, B. C.; O'Grady, J. G.; Aldis, P. M.; Chaggar, K.; Alexander, G. J.; Williams, R. (1991):** Hepatic histological findings after transplantation for chronic hepatitis B virus infection, including a unique pattern of fibrosing cholestatic hepatitis. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 13 (1), S. 150–157.

**Denk, H.; Dienes, H. P.; Düllmann, J.; Fischer, H. P.; Klinge, O.; Lierse, W. et al. (2013):** Pathologie der Leber und Gallenwege: Springer Berlin Heidelberg. Online verfügbar unter <https://books.google.de/books?id=2E33BQAAQBAJ>.

**Dienstag, Jules L. (2008):** Hepatitis B virus infection. In: *The New England journal of medicine* 359 (14), S. 1486–1500. DOI: 10.1056/NEJMra0801644.

**Dunsford, H. A.; Sell, S.; Chisari, F. V. (1990):** Hepatocarcinogenesis due to chronic liver cell injury in hepatitis B virus transgenic mice. In: *Cancer Research* 50 (11), S. 3400–3407.

**EASL clinical practice guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection (2012).** In: *Journal of hepatology* 57 (1), S. 167–185.

**Eberle, Josef (2016):** Hepatitis B virus--diagnostic update. In: *MMW Fortschritte der Medizin* 158 (6), S. 60–63. DOI: 10.1007/s15006-016-8006-6.

**Emery, Joel S.; Feld, Jordan J. (2017):** Treatment of hepatitis B virus with combination therapy now and in the future. In: *Best practice & research. Clinical gastroenterology* 31 (3), S. 347–355. DOI: 10.1016/j.bpg.2017.04.007.

**Fabrizi, F.; Martin, P.; Dixit, V.; Bunnapradist, S.; Dulai, G. (2004):** Meta-analysis: the effect of age on immunological response to hepatitis B vaccine in end-stage renal disease. In: *Alimentary pharmacology & therapeutics* 20 (10), S. 1053–1062. DOI: 10.1111/j.1365-2036.2004.02264.x.

**Farah Aziz Khan Mohd Fareed Khan:** Inflammation and acute phase response. <http://ijabpt.com/pdf/1215-khan%20manuscript.pdf>. ISSN 0976-4550. Online verfügbar unter <http://ijabpt.com/pdf/1215-khan%20manuscript.pdf>, zuletzt geprüft am 06.08.2018.

**Feng, Feng; Teoh, Chee Quin; Qiao, Qiao; Boyle, David; Jilbert, Allison R. (2010):** The development of persistent duck hepatitis B virus infection can be prevented using antiviral therapy combined with DNA or recombinant fowlpoxvirus vaccines. In: *Vaccine* 28 (46), S. 7436–7443. DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.08.091.

**Flisiak, Robert; Maxwell, Paul; Prokopowicz, Danuta; Timms, Peter M.; Panasiuk, Anatol (2002):** Plasma tissue inhibitor of metalloproteinases-1 and transforming growth factor beta 1--possible non-invasive biomarkers of hepatic fibrosis in patients with chronic B and C hepatitis. In: *Hepato-gastroenterology* 49 (47), S. 1369–1372.

- Gallagher, SR; Desjardins, P. R. (2006):** Quantitation of DNA and RNA with absorption and fluorescence spectroscopy. In: *Current protocols in molecular biology / edited by Frederick M. Ausubel ... [et al.]* Appendix 3, Appendix 3D. DOI: 10.1002/0471142727.mba03ds76.
- Ganem, Don; Prince, Alfred M. (2004):** Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. In: *The New England journal of medicine* 350 (11), S. 1118–1129. DOI: 10.1056/NEJMra031087.
- Gerber, M. A.; Hadziyannis, S.; Vissoulis, C.; Schaffner, F.; Paronetto, F.; Popper, H. (1974):** Electron microscopy and immunoelectronmicroscopy of cytoplasmic hepatitis B antigen in hepatocytes. In: *The American Journal of Pathology* 75 (3), S. 489–502.
- 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.
- Ginzberg, Dina; Wong, Robert J.; Gish, Robert (2018):** Global HBV burden. Guesstimates and facts. In: *Hepatology international* 12 (4), S. 315–329. DOI: 10.1007/s12072-018-9884-8.
- Gisbert, J. P.; Chaparro, M.; Esteve, M. (2011):** Review article: prevention and management of hepatitis B and C infection in patients with inflammatory bowel disease. In: *Alimentary pharmacology & therapeutics* 33 (6), S. 619–633.
- Gish, Robert G. (2009):** Hepatitis B treatment: Current best practices, avoiding resistance. In: *Cleveland Clinic journal of medicine* 76 Suppl 3, S14-9. DOI: 10.3949/ccjm.76.s3.04.
- Glebe, Dieter; Bremer, Corinna M. (2013):** The molecular virology of hepatitis B virus. In: *Seminars in liver disease* 33 (2), S. 103–112. DOI: 10.1055/s-0033-1345717.
- Glebe, Dieter; Urban, Stephan (2007):** Viral and cellular determinants involved in hepadnaviral entry. In: *World journal of gastroenterology : WJG* 13 (1), S. 22–38.
- Graumann, F.; Churin, Y.; Tschuschner, A.; Reifenberg, K.; Glebe, D.; Roderfeld, M.; Roeb, E. (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), S. e0146099. DOI: 10.1371/journal.pone.0146099.



- Gripon, P.**; Diot, C.; Theze, N.; Fourel, I.; Loreal, O.; Brechot, C.; Guguen-Guillouzo, C. (1988): Hepatitis B virus infection of adult human hepatocytes cultured in the presence of dimethyl sulfoxide. In: *Journal of virology* 62 (11), S. 4136–4143.
- Gruys, E.**; Toussaint, M. J. M.; Niewold, T. A.; Koopmans, S. J. (2005): Acute phase reaction and acute phase proteins. In: *Journal of Zhejiang University. Science. B* 6 (11), S. 1045–1056. DOI: 10.1631/jzus.2005.B1045.
- Guidotti, L. G.**; Chisari, F. V. (2001): Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. In: *Annual review of immunology* 19, S. 65–91. DOI: 10.1146/annurev.immunol.19.1.65.
- Guidotti, Luca G.**; Chisari, Francis V. (2006): Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. In: *Annual review of pathology* 1, S. 23–61. DOI: 10.1146/annurev.pathol.1.110304.100230.
- Guidotti, Luca G.**; Ishikawa, Tetsuya; Hobbs, Monte V.; Matzke, Brent; Schreiber, Robert; Chisari, Francis V. (1996): Intracellular Inactivation of the Hepatitis B Virus by Cytotoxic T Lymphocytes. In: *Immunity* 4 (1), S. 25–36. DOI: 10.1016/S1074-7613(00)80295-2.
- Guo, Jinsheng**; Friedman, Scott L. (2007): Hepatic fibrogenesis. In: *Seminars in liver disease* 27 (4), S. 413–426. DOI: 10.1055/s-2007-991517.
- 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.
- Hetz, Claudio** (2012): The unfolded protein response. Controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 13 (2), S. 89–102. DOI: 10.1038/nrm3270.
- Hildt, E.**; Munz, B.; Saher, G.; Reifenberg, K.; Hofschneider, P. H. (2002): The PreS2 activator MHBs(t) of hepatitis B virus activates c-raf-1/Erk2 signaling in transgenic mice. In: *The EMBO journal* 21 (4), S. 525–535.
- Hildt, E.**; Saher, G.; Bruss, V.; Hofschneider, P. H. (1996): The hepatitis B virus large surface protein (LHBs) is a transcriptional activator. In: *Virology* 225 (1), S. 235–239. DOI: 10.1006/viro.1996.0594.

**Höner** Zu Siederdisen, Christian; Maasoumy, Benjamin; Cornberg, Markus (2017): What is new on HBsAg and other diagnostic markers in HBV infection? In: *Best practice & research. Clinical gastroenterology* 31 (3), S. 281–289. DOI: 10.1016/j.bpg.2017.04.009.

**Hyams**, K. C. (1995): Risks of chronicity following acute hepatitis B virus infection: a review. In: *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 20 (4), S. 992–1000.

**Ikejima**, Kenichi; Takei, Yoshiyuki; Honda, Hajime; Hirose, Miyoko; Yoshikawa, Mutsuko; Zhang, Yan-Jun *et al.* (2002): Leptin receptor-mediated signaling regulates hepatic fibrogenesis and remodeling of extracellular matrix in the rat. In: *Gastroenterology* 122 (5), S. 1399–1410.

**Jaeschke**, Hartmut (2002): Inflammation in response to hepatocellular apoptosis. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 35 (4), S. 964–966. DOI: 10.1053/jhep.2002.0350964.

**Jiang**, Zhihong; Belforte, Juan E.; Lu, Yuan; Yabe, Yoko; Pickel, James; Smith, Carolyn Beebe *et al.* (2010): eIF2alpha Phosphorylation-dependent translation in CA1 pyramidal cells impairs hippocampal memory consolidation without affecting general translation. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30 (7), S. 2582–2594. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3971-09.2010.

**Jilg**, W.; Schmidt, M.; Deinhardt, F. (1990): Inoculation failure following hepatitis B vaccination. The effect of additional vaccinations. In: *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)* 115 (41), S. 1545–1548. DOI: 10.1055/s-2008-1065189.

**Jindal**, Ankur; Kumar, Manoj; Sarin, Shiv K. (2013): Management of acute hepatitis B and reactivation of hepatitis B. In: *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 33 Suppl 1, S. 164–175. DOI: 10.1111/liv.12081.

**Kaur**, Pushpinder; Paliwal, Anupam; Durantel, David; Hainaut, Pierre; Scoazec, Jean-Yves; Zoulim, Fabien *et al.* (2010): DNA methylation of hepatitis B virus (HBV) genome associated with the development of hepatocellular carcinoma and occult HBV infection. In: *The Journal of infectious diseases* 202 (5), S. 700–704. DOI: 10.1086/655398.

- Kew**, Michael C. (2011): Hepatitis B virus x protein in the pathogenesis of hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma. In: *Journal of gastroenterology and hepatology* 26 Suppl 1, S. 144–152. DOI: 10.1111/j.1440-1746.2010.06546.x.
- Kim**, H.; Lee, S. A.; Do, S. Y.; Kim, B. J. (2016): Precore/core region mutations of hepatitis B virus related to clinical severity. In: *World journal of gastroenterology* 22 (17), S. 4287–4296. DOI: 10.3748/wjg.v22.i17.4287.
- 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.
- Kim**, So Young; Kyaw, Yi Yi; Cheong, Jaehun (2017): Functional interaction of endoplasmic reticulum stress and hepatitis B virus in the pathogenesis of liver diseases. In: *World journal of gastroenterology* 23 (43), S. 7657–7665. DOI: 10.3748/wjg.v23.i43.7657.
- Krawczyk**, Adalbert; Ludwig, Charlotte; Jochum, Christoph; Fiedler, Melanie; Heinemann, Falko M.; Shouval, Daniel *et al.* (2014): Induction of a robust T- and B-cell immune response in non- and low-responders to conventional vaccination against hepatitis B by using a third generation PreS/S vaccine. In: *Vaccine* 32 (39), S. 5077–5082. DOI: 10.1016/j.vaccine.2014.06.076.
- Kubba**, A. K.; Taylor, P.; Graneek, B.; Strobel, S. (2003): Non-responders to hepatitis B vaccination: a review. In: *Communicable disease and public health / PHLS* 6 (2), S. 106–112.
- Kubota**, Kyoko; Niinuma, Yoshifumi; Kaneko, Masayuki; Okuma, Yasunobu; Sugai, Mami; Omura, Tomohiro *et al.* (2006): Suppressive effects of 4-phenylbutyrate on the aggregation of Pael receptors and endoplasmic reticulum stress. In: *Journal of neurochemistry* 97 (5), S. 1259–1268. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2006.03782.x.
- Kumar**, Rajneesh; Perez-Del-Pulgar, Sofia; Testoni, Barbara; Lebosse, Fanny; Zoulim, Fabien (2016): Clinical relevance of the study of hepatitis B virus covalently closed circular DNA. In: *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 36 Suppl 1, S. 72–77. DOI: 10.1111/liv.13001.

**Kuscuoglu**, Deniz; Janciauskiene, Sabina; Hamesch, Karim; Haybaeck, Johannes; Trautwein, Christian; Strnad, Pavel (2018): Liver- master and servant of serum proteome. In: *Journal of hepatology*. DOI: 10.1016/j.jhep.2018.04.018.

**Laemml**, U. K. (1970): Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (5259), S. 680–685. DOI: 10.1038/227680a0.

**Lake**, F. R.; Noble, P. W.; Henson, P. M.; Riches, D. W. (1994): Functional switching of macrophage responses to tumor necrosis factor-alpha (TNF alpha) by interferons. Implications for the pleiotropic activities of TNF alpha. In: *The Journal of clinical investigation* 93 (4), S. 1661–1669. DOI: 10.1172/JCI117148.

**Lau**, J. Y.; Bain, V. G.; Davies, S. E.; O'Grady, J. G.; Alberti, A.; Alexander, G. J.; Williams, R. (1992): High-level expression of hepatitis B viral antigens in fibrosing cholestatic hepatitis. In: *Gastroenterology* 102 (3), S. 956–962.

**Laurence**, Jeffrey C. (2005): Hepatitis A and B immunizations of individuals infected with human immunodeficiency virus. In: *The American journal of medicine* 118 Suppl 10A, S. 75–83. DOI: 10.1016/j.amjmed.2005.07.024.

**Lebeaupin**, Cynthia; Vallee, Deborah; Hazari, Younis; Hetz, Claudio; Chevet, Eric; Bailly-Maitre, Beatrice (2018): Endoplasmic Reticulum stress signaling and the pathogenesis of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. In: *Journal of hepatology*. DOI: 10.1016/j.jhep.2018.06.008.

**Lempp**, Florian A.; Urban, Stephan (2014): Inhibitors of hepatitis B virus attachment and entry. In: *Intervirology* 57 (3-4), S. 151–157. DOI: 10.1159/000360948.

**Li**, Baozong; Gao, Bo; Ye, Linbai; Han, Xue; Wang, Wei; Kong, Lingbao *et al.* (2007): Hepatitis B virus X protein (HBx) activates ATF6 and IRE1-XBP1 pathways of unfolded protein response. In: *Virus research* 124 (1-2), S. 44–49. DOI: 10.1016/j.virusres.2006.09.011.

**Li**, Yang-Xia; Ren, Yan-Li; Fu, Hai-Jing; Zou, Ling; Yang, Ying; Chen, Zhi (2016): Hepatitis B Virus Middle Protein Enhances IL-6 Production via p38 MAPK/NF-kappaB Pathways in an ER Stress-Dependent Manner. In: *PLoS ONE* 11 (7), e0159089. DOI: 10.1371/journal.pone.0159089.

**Liang**, T. Jake (2009): Hepatitis B: the virus and disease. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 49 (5 Suppl), S. 21. DOI: 10.1002/hep.22881.

- Lin**, Chih-Lin; Kao, Jia-Horng (2017): Natural history of acute and chronic hepatitis B. The role of HBV genotypes and mutants. In: *Best practice & research. Clinical gastroenterology* 31 (3), S. 249–255. DOI: 10.1016/j.bpg.2017.04.010.
- Lin**, Jonathan H.; Li, Han; Yasumura, Douglas; Cohen, Hannah R.; Zhang, Chao; Panning, Barbara *et al.* (2007): IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response. In: *Science (New York, N.Y.)* 318 (5852), S. 944–949. DOI: 10.1126/science.1146361.
- Lindholm**, D.; Wootz, H.; Korhonen, L. (2006): ER stress and neurodegenerative diseases. In: *Cell death and differentiation* 13 (3), S. 385–392. DOI: 10.1038/sj.cdd.4401778.
- Liu**, Wenxiang; Cao, Yongmei; Wang, Tao; Xiang, Guoan; Lu, Jiayang; Zhang, Jinqian; Hou, Peng (2013): The N-Glycosylation Modification of LHBs (Large Surface Proteins of HBV) Effects on Endoplasmic Reticulum Stress, Cell Proliferation and its Secretion. In: *Hepat Mon* 13 (9). DOI: 10.5812/hepatmon.12280.
- Livak**, Kenneth J.; Schmittgen, Thomas D. (2001): Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. In: *Methods* 25 (4), S. 402–408. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
- Lopetuso**, Loris Riccardo; Mocchi, Giammarco; Marzo, Manuela; D'Aversa, Francesca; Rapaccini, Gian Lodovico; Guidi, Luisa *et al.* (2018): Harmful Effects and Potential Benefits of Anti-Tumor Necrosis Factor (TNF)-alpha on the Liver. In: *International journal of molecular sciences* 19 (8). DOI: 10.3390/ijms19082199.
- Lüllmann-Rauch**, Renate (2009): Taschenlehrbuch Histologie. 10 Tabellen. 3., vollst. überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme.
- Luo**, Tao; Chen, Baihe; Wang, Xianbao (2015): 4-PBA prevents pressure overload-induced myocardial hypertrophy and interstitial fibrosis by attenuating endoplasmic reticulum stress. In: *Chemico-biological interactions* 242, S. 99–106. DOI: 10.1016/j.cbi.2015.09.025.
- Lynes**, Michael A.; Hidalgo, Juan; Manso, Yasmina; Devisscher, Lindsey; Laukens, Debby; Lawrence, David A. (2014): Metallothionein and stress combine to affect multiple organ systems. In: *Cell Stress Chaperones* 19 (5), S. 605–611. DOI: 10.1007/s12192-014-0501-z.

- M. Cornberg**, U. Protzer, J. Petersen, H. Wedemeyer (2011): Aktualisierung der S3-Leitlinie zur Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Hepatitis-B-Virusinfektion. In: *Z Gastroenterol*, S. 871–930. Online verfügbar unter [http://www.dgvs.de/fileadmin/user\\_upload/Leitlinien/Hepatitis\\_B/Leitlinie\\_Hepatitis\\_B.pdf](http://www.dgvs.de/fileadmin/user_upload/Leitlinien/Hepatitis_B/Leitlinie_Hepatitis_B.pdf), zuletzt geprüft am 27.01.2016.
- Marhaug**, G.; Downton, S. B. (1994): Serum amyloid A: an acute phase apolipoprotein and precursor of AA amyloid. In: *Baillieres Clin Rheumatol* 8 (3), S. 553–573.
- Marra**, Fabio (2002): Leptin and liver fibrosis: a matter of fat. In: *Gastroenterology* 122 (5), S. 1529–1532.
- McAleer**, William J.; Buynak, Eugene B.; Maigetter, Robert Z.; Wampler, D. Eugene; Miller, William J.; Hilleman, Maurice R. (1984): Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. In: *Nature* 307 (5947), S. 178–180. DOI: 10.1038/307178a0.
- McGuire**, Brendan M.; Zupanets, Igor A.; Lowe, Mark E.; Xiao, Xunjun; Sypliyviy, Vasyliy A.; Monteleone, Jon *et al.* (2010): Pharmacology and safety of glycerol phenylbutyrate in healthy adults and adults with cirrhosis. In: *Hepatology* 51 (6), S. 2077–2085. DOI: 10.1002/hep.23589.
- McKeage**, K.; Keam, S. J. (2010): Telbivudine: a review of its use in compensated chronic hepatitis B. In: *Drugs* 70 (14), S. 1857–1883. DOI: 10.2165/11204330-000000000-00000.
- Menne**, S.; Maschke, J.; Tolle, T. K.; Lu, M.; Roggendorf, M. (1997): Characterization of T-cell response to woodchuck hepatitis virus core protein and protection of woodchucks from infection by immunization with peptides containing a T-cell epitope. In: *Journal of virology* 71 (1), S. 65–74.
- Meuleman**, Philip; Libbrecht, Louis; Wieland, Stefan; Vos, Rita de; Habib, Nagy; Kramvis, Anna *et al.* (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.
- Milani**, S.; Herbst, H.; Schuppan, D.; Stein, H.; Surrenti, C. (1991): Transforming growth factors beta 1 and beta 2 are differentially expressed in fibrotic liver disease. In: *The American Journal of Pathology* 139 (6), S. 1221–1229.

- Mohanty**, Smruti R.; Kupfer, Sonia S.; Khiani, Vijay (2006): Treatment of chronic hepatitis B. In: *Nature clinical practice. Gastroenterology & hepatology* 3 (8), S. 446–458. DOI: 10.1038/ncpgasthep0550.
- Morinaga**, Maki; Kon, Kazuyoshi; Saito, Hiroaki; Arai, Kumiko; Kusama, Hiromi; Uchiyama, Akira *et al.* (2015): Sodium 4-phenylbutyrate prevents murine dietary steatohepatitis caused by trans-fatty acid plus fructose. In: *Journal of clinical biochemistry and nutrition* 57 (3), S. 183–191. DOI: 10.3164/jcfn.15-75.
- Moshage**, H. (1997): Cytokines and the hepatic acute phase response. In: *The Journal of pathology* 181 (3), S. 257–266. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9896(199703)181:3<257::AID-PATH756>3.0.CO;2-U.
- Nallagangula**, Krishna Sumanth; Nagaraj, Shashidhar Kurpad; Venkataswamy, Lakshmaiah; Chandrappa, Muninarayana (2018): Liver fibrosis. A compilation on the biomarkers status and their significance during disease progression. In: *Future science OA* 4 (1), FSO250. DOI: 10.4155/fsoa-2017-0083.
- Naugler**, Willscott E.; Sakurai, Toshiharu; Kim, Sunhwa; Maeda, Shin; Kim, Kyoungyun; Elsharkawy, Ahmed M.; Karin, Michael (2007): Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production. In: *Science (New York, N.Y.)* 317 (5834), S. 121–124. DOI: 10.1126/science.1140485.
- Nguyen**, Khoa D.; Macaubas, Claudia; Truong, Phi; Wang, Nan; Hou, Tieying; Yoon, Taejin; Mellins, Elizabeth D. (2014): Serum amyloid A induces mitogenic signals in regulatory T cells via monocyte activation. In: *Molecular Immunology* 59 (2), S. 172–179. DOI: 10.1016/j.molimm.2014.02.011.
- Nishitoh**, Hideki; Kadowaki, Hisae; Nagai, Atsushi; Maruyama, Takeshi; Yokota, Takanori; Fukutomi, Hisashi *et al.* (2008): ALS-linked mutant SOD1 induces ER stress- and ASK1-dependent motor neuron death by targeting Derlin-1. In: *Genes & development* 22 (11), S. 1451–1464. DOI: 10.1101/gad.1640108.
- Oh**, In Soo; Park, Su-Hyung (2015): Immune-mediated Liver Injury in Hepatitis B Virus Infection. In: *Immune network* 15 (4), S. 191–198. DOI: 10.4110/in.2015.15.4.191.
- Oliviero**, Barbara; Varchetta, Stefania; Paudice, Enrica; Michelone, Giuseppe; Zaramella, Marco; Mavilio, Domenico *et al.* (2009): Natural killer cell functional

dichotomy in chronic hepatitis B and chronic hepatitis C virus infections. In: *Gastroenterology* 137 (3), S. 1151. DOI: 10.1053/j.gastro.2009.05.047.

**Ono**, Kazuhiko; Nimura, Satoshi; Nishinakagawa, Takuya; Hideshima, Yuko; Enjoji, Munechika; Nabeshima, Kazuki; Nakashima, Manabu (2014): Sodium 4-phenylbutyrate suppresses the development of dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. In: *Experimental and therapeutic medicine* 7 (3), S. 573–578. DOI: 10.3892/etm.2013.1456.

**Ortiz**, Vicente; Berenguer, Marina; Rayon, Jose M.; Carrasco, Domingo; Berenguer, Joaquin (2002): Contribution of obesity to hepatitis C-related fibrosis progression. In: *The American journal of gastroenterology* 97 (9), S. 2408–2414. DOI: 10.1111/j.1572-0241.2002.05995.x.

**Ott**, J. J.; Stevens, G. A.; Groeger, J.; Wiersma, S. T. (2012): Global epidemiology of hepatitis B virus infection: new estimates of age-specific HBsAg seroprevalence and endemicity. In: *Vaccine* 30 (12), S. 2212–2219. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.12.116.

**Ozcan**, Umut; Yilmaz, Erkan; Ozcan, Lale; Furuhashi, Masato; Vaillancourt, Eric; Smith, Ross O. *et al.* (2006): Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. In: *Science (New York, N.Y.)* 313 (5790), S. 1137–1140. DOI: 10.1126/science.1128294.

**Perrillo**, R. P.; Schiff, E. R.; Davis, G. L.; Bodenheimer, H. C., JR; Lindsay, K.; Payne, J. *et al.* (1990): A randomized, controlled trial of interferon alfa-2b alone and after prednisone withdrawal for the treatment of chronic hepatitis B. The Hepatitis Interventional Therapy Group. In: *The New England journal of medicine* 323 (5), S. 295–301. DOI: 10.1056/NEJM199008023230503.

**Perrillo**, Robert (2009): Benefits and risks of interferon therapy for hepatitis B. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 49 (5 Suppl), S103-11. DOI: 10.1002/hep.22956.

**Petersen**, J.; Dandri, M.; Gupta, S.; Rogler, C. E. (1998): Liver repopulation with xenogenic hepatocytes in B and T cell-deficient mice leads to chronic hepadnavirus infection and clonal growth of hepatocellular carcinoma. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (1), S. 310–315.

**Phung**, Bao-Chau; Sogni, Philippe; Launay, Odile (2014): Hepatitis B and human immunodeficiency virus co-infection. In: *World journal of gastroenterology* 20 (46), S. 17360–17367. DOI: 10.3748/wjg.v20.i46.17360.



**Pinzani, M.;** Milani, S.; Herbst, H.; DeFranco, R.; Grappone, C.; Gentilini, A. *et al.* (1996): Expression of platelet-derived growth factor and its receptors in normal human liver and during active hepatic fibrogenesis. In: *The American Journal of Pathology* 148 (3), S. 785–800.

**Pol, Stanislas** (2013): Management of HBV in immunocompromised patients. In: *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 33 Suppl 1, S. 182–187. DOI: 10.1111/liv.12055.

**Ponde, R. A. A.** (2015): Acute hepatitis B virus infection or acute exacerbation of chronic hepatitis B infection: the differential serological diagnosis. In: *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*. DOI: 10.1007/s10096-015-2522-7.

**Popov, N.;** Schmitt, M.; Schulzeck, S.; Matthies, H. (1975): Reliable micromethod for determination of the protein content in tissue homogenates. In: *Acta biologica et medica Germanica* 34 (9), S. 1441–1446.

**Protzer, U.;** Schaller, H. (2000): Immune escape by hepatitis B viruses. In: *Virus genes* 21 (1-2), S. 27–37.

**Qi, Xiaolong;** An, Min; Wu, Tongwei; Jiang, Deke; Peng, Mengyun; Wang, Weidong *et al.* (2018): Transient Elastography for Significant Liver Fibrosis and Cirrhosis in Chronic Hepatitis B. A Meta-Analysis. In: *Canadian journal of gastroenterology & hepatology* 2018, S. 3406789. DOI: 10.1155/2018/3406789.

**Rahman, Shaikh Mizanoor;** Qadri, Ishtiaq; Janssen, Rachel C.; Friedman, Jacob E. (2009): Fenofibrate and PBA prevent fatty acid-induced loss of adiponectin receptor and pAMPK in human hepatoma cells and in hepatitis C virus-induced steatosis. In: *Journal of lipid research* 50 (11), S. 2193–2202. DOI: 10.1194/jlr.M800633-JLR200.

**Ramachandran, Prakash;** Iredale, John P.; Fallowfield, Jonathan A. (2015): Resolution of liver fibrosis: basic mechanisms and clinical relevance. In: *Seminars in liver disease* 35 (2), S. 119–131. DOI: 10.1055/s-0035-1550057.

**Rasenack, J.** (2014): Diagnostik der viralen Hepatitis. Unter Mitarbeit von Freiburg Medizinische Universitätsklinik.

**Ren, Feng;** Zhou, Li; Zhang, Xiangying; Wen, Tao; Shi, Hongbo; Xie, Bangxiang *et al.* (2015): Endoplasmic reticulum stress-activated glycogen synthase kinase 3beta

aggravates liver inflammation and hepatotoxicity in mice with acute liver failure. In: *Inflammation* 38 (3), S. 1151–1165. DOI: 10.1007/s10753-014-0080-2.

**Resar**, Linda M. S.; Segal, Jodi B.; Fitzpatrick, Lorna K.; Friedmann, Alison; Brusilow, Saul W.; Dover, George J. (2002): Induction of fetal hemoglobin synthesis in children with sickle cell anemia on low-dose oral sodium phenylbutyrate therapy. In: *Journal of pediatric hematology/oncology* 24 (9), S. 737–741.

**Reynaud**, L.; Carleo, M. A.; Talamo, M.; Borgia, G. (2009): Tenofovir and its potential in the treatment of hepatitis B virus. In: *Therapeutics and Clinical Risk Management* 5, S. 177–185.

**Riviere**, Lise; Ducroux, Aurelie; Buendia, Marie Annick (2014): The oncogenic role of hepatitis B virus. In: *Recent results in cancer research. Fortschritte der Krebsforschung. Progres dans les recherches sur le cancer* 193, S. 59–74. DOI: 10.1007/978-3-642-38965-8\_4.

**RKI-Ratgeber für Ärzte**; Hepatitis B und D (August 2018): Infektionsschutz. [https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber\\_HepatitisB.html?sessionid=0586BB81CB80C452296D7E71465FE14D.1\\_cid381#doc2390050bodyText3](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_HepatitisB.html?sessionid=0586BB81CB80C452296D7E71465FE14D.1_cid381#doc2390050bodyText3).

**Robert**, Sacha; Gicquel, Thomas; Victoni, Tatiana; Valenca, Samuel; Barreto, Emiliano; Bailly-Maitre, Beatrice *et al.* (2016): Involvement of matrix metalloproteinases (MMPs) and inflammasome pathway in molecular mechanisms of fibrosis. In: *Bioscience reports* 36 (4). DOI: 10.1042/BSR20160107.

**Roque**, Telma; Boncoeur, Emilie; Saint-Criq, Vinciane; Bonvin, Elise; Clement, Annick; Tabary, Olivier; Jacquot, Jacky (2008): Proinflammatory effect of sodium 4-phenylbutyrate in deltaF508-cystic fibrosis transmembrane conductance regulator lung epithelial cells. Involvement of extracellular signal-regulated protein kinase 1/2 and c-Jun-NH2-terminal kinase signaling. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 326 (3), S. 949–956. DOI: 10.1124/jpet.107.135186.

**Roy**, Avik; Ghosh, Anamitra; Jana, Arundhati; Liu, Xiaojuan; Brahmachari, Saurav; Gendelman, Howard E.; Pahan, Kalipada (2012): Sodium phenylbutyrate controls neuroinflammatory and antioxidant activities and protects dopaminergic neurons in mouse models of Parkinson's disease. In: *PLoS ONE* 7 (6), e38113. DOI: 10.1371/journal.pone.0038113.

- Rubenstein**, R. C.; Lyons, B. M. (2001): Sodium 4-phenylbutyrate downregulates HSC70 expression by facilitating mRNA degradation. In: *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 281 (1), S. 51.
- Rutishauser** J, Spiess M: Endoplasmic reticulum storage diseases.
- Scheper**, Wiep; Hoozemans, Jeroen J. M. (2015): The unfolded protein response in neurodegenerative diseases: a neuropathological perspective. In: *Acta neuropathologica* 130 (3), S. 315–331. DOI: 10.1007/s00401-015-1462-8.
- Schmitz**, N.; Laverty, S.; Kraus, V. B.; Aigner, T. (2010): Basic methods in histopathology of joint tissues. In: *Osteoarthritis and cartilage* 18 Suppl 3, S113-6. DOI: 10.1016/j.joca.2010.05.026.
- Schroder**, Martin; Kaufman, Randal J. (2005): ER stress and the unfolded protein response. In: *Mutation research* 569 (1-2), S. 29–63. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2004.06.056.
- Schultz**, D. R.; Arnold, P. I. (1990): Properties of four acute phase proteins: C-reactive protein, serum amyloid A protein, alpha 1-acid glycoprotein, and fibrinogen. In: *Semin Arthritis Rheum* 20 (3), S. 129–147.
- Schuppan**, Detlef (2015): Liver fibrosis: Common mechanisms and antifibrotic therapies. In: *Clinics and research in hepatology and gastroenterology* 39 Suppl 1, S. 9. DOI: 10.1016/j.clinre.2015.05.005.
- Schütt**, C.; Bröker, B. (2011): Grundwissen Immunologie: Spektrum Akademischer Verlag. Online verfügbar unter <https://books.google.de/books?id=50UeBAAAQBAJ>.
- 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.
- 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: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (20), S. 10663–10668.
- Shouval**, Daniel; Roggendorf, Hedwig; Roggendorf, Michael (2015): Enhanced immune response to hepatitis B vaccination through immunization with a Pre-S1/Pre-S2/S vaccine. In: *Medical microbiology and immunology* 204 (1), S. 57–68. DOI: 10.1007/s00430-014-0374-x.

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

**Smith**, Wendy; Diaz, George A.; Lichter-Konecki, Uta; Berry, Susan A.; Harding, Cary O.; McCandless, Shawn E. *et al.* (2013): Ammonia control in children ages 2 months through 5 years with urea cycle disorders: comparison of sodium phenylbutyrate and glycerol phenylbutyrate. In: *The Journal of pediatrics* 162 (6), S. 1228. DOI: 10.1016/j.jpeds.2012.11.084.

**Stewart**, Gareth A.; Ridsdale, Ross; Martin, Emily P.; Na, Cheng-Lun; Xu, Yan; Mandapaka, Karunyakanth; Weaver, Timothy E. (2012): 4-Phenylbutyric acid treatment rescues trafficking and processing of a mutant surfactant protein-C. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 47 (3), S. 324–331. DOI: 10.1165/rcmb.2012-0003OC.

**Subcellular** Protein Fractionation Kit for Cultured Cells - Thermo Fisher Scientific. Online verfügbar unter <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/78840>, zuletzt geprüft am 03.10.2016.

**Sugiyama**, Masaya; Tanaka, Yasuhito; Kurbanov, Fuat; Maruyama, Isao; Shimada, Takashi; Takahashi, Satoru *et al.* (2009): Direct cytopathic effects of particular hepatitis B virus genotypes in severe combined immunodeficiency transgenic with urokinase-type plasminogen activator mouse with human hepatocytes. In: *Gastroenterology* 136 (2), 652-62.e3. DOI: 10.1053/j.gastro.2008.10.048.

**Tang**, Lydia S. Y.; Covert, Emily; Wilson, Eleanor; Kottlil, Shyam (2018): Chronic Hepatitis B Infection. A Review. In: *JAMA* 319 (17), S. 1802–1813. DOI: 10.1001/jama.2018.3795.

**Tateno**, C.; Yoshizane, Y.; Saito, N.; Kataoka, M.; Utoh, R.; Yamasaki, C. *et al.* (2004): Near completely humanized liver in mice shows human-type metabolic responses to drugs. In: *The American Journal of Pathology* 165 (3), S. 901–912. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)63352-4.

**Thimme**, Robert; Wieland, Stefan; Steiger, Carola; Ghrayeb, John; Reimann, Keith A.; Purcell, Robert H.; Chisari, Francis V. (2003): CD8(+) T cells mediate viral clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis B virus infection. In: *Journal of virology* 77 (1), S. 68–76.

- Tipples, G.** (1996): Mutation in HBV RNA-dependent DNA polymerase confers resistance to lamivudine in vivo. In: *Hepatology* 24 (3), S. 714–717. DOI: 10.1053/jhep.1996.v24.pm0008781348.
- Towbin, H.;** Staehelin, T.; Gordon, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76 (9), S. 4350–4354.
- Tu, Thomas;** Bühler, Sandra; Bartenschlager, Ralf (2017): Chronic viral hepatitis and its association with liver cancer. In: *Biological chemistry* 398 (8), S. 817–837. DOI: 10.1515/hsz-2017-0118.
- Valaydon, Zina S.;** Locarnini, Stephen A. (2017): The virological aspects of hepatitis B. In: *Best practice & research. Clinical gastroenterology* 31 (3), S. 257–264. DOI: 10.1016/j.bpg.2017.04.013.
- Valenzuela, Vicente;** Martinez, Gabriela; Duran-Aniotz, Claudia; Hetz, Claudio (2016): Gene therapy to target ER stress in brain diseases. In: *Brain research*. DOI: 10.1016/j.brainres.2016.04.064.
- Valva, Pamela;** Ríos, Daniela A.; Matteo, Elena de; Preciado, Maria V. (2016): Chronic hepatitis C virus infection. Serum biomarkers in predicting liver damage. In: *World journal of gastroenterology* 22 (4), S. 1367–1381. DOI: 10.3748/wjg.v22.i4.1367.
- van den Berghe, Peter V. E.;** Stapelbroek, Janneke M.; Krieger, Elmar; Bie, Prim de; van de Graaf, Stan F. J.; Groot, Reinoud E. A. de *et al.* (2009): Reduced expression of ATP7B affected by Wilson disease-causing mutations is rescued by pharmacological folding chaperones 4-phenylbutyrate and curcumin. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 50 (6), S. 1783–1795. DOI: 10.1002/hep.23209.
- Vidal, Rene L.;** Figueroa, Alicia; Court, Felipe A.; Thielen, Peter; Molina, Claudia; Wirth, Craig *et al.* (2012): Targeting the UPR transcription factor XBP1 protects against Huntington's disease through the regulation of FoxO1 and autophagy. In: *Human molecular genetics* 21 (10), S. 2245–2262. DOI: 10.1093/hmg/dds040.
- Villa, Erica;** Fattovich, Giovanna; Mauro, Antonella; Pasino, Michela (2011): Natural history of chronic HBV infection: special emphasis on the prognostic implications of the inactive carrier state versus chronic hepatitis. In: *Digestive and liver disease : official*

*Journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver* 43 Suppl 1, S. 14. DOI: 10.1016/S1590-8658(10)60686-X.

**Vivekanandan, P.**; Thomas, D.; Torbenson, M. (2008): Hepatitis B viral DNA is methylated in liver tissues. In: *Journal of viral hepatitis* 15 (2), S. 103–107. DOI: 10.1111/j.1365-2893.2007.00905.x.

**Wait, Robin**; Chiesa, Giulia; Parolini, Cinzia; Miller, Ingrid; Begum, Shajna; Brambilla, Daniela *et al.* (2005): Reference maps of mouse serum acute-phase proteins: Changes with LPS-induced inflammation and apolipoprotein A-I and A-II transgenes. In: *Proteomics* 5 (16), S. 4245–4253. DOI: 10.1002/pmic.200401292.

**Wang, Bruce**; Dolinski, Brian M.; Kikuchi, Noriko; Leone, Diane R.; Peters, Marion G.; Weinreb, Paul H. *et al.* (2007): Role of alphavbeta6 integrin in acute biliary fibrosis. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 46 (5), S. 1404–1412. DOI: 10.1002/hep.21849.

**Wang, Hui-Ching**; Wu, Han-Chieh; Chen, Chien-Fu; Fausto, Nelson; Lei, Huan-Yao; Su, Ih-Jen (2003): Different Types of Ground Glass Hepatocytes in Chronic Hepatitis B Virus Infection Contain Specific Pre-S Mutants that May Induce Endoplasmic Reticulum Stress. In: *The American Journal of Pathology* 163 (6), S. 2441–2449. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)63599-7.

**Westermeier, R.** (2016): Elektrophorese leicht gemacht: Ein Praxisbuch für Anwender: Wiley. Online verfügbar unter <https://books.google.de/books?id=7rglDQAAQBAJ>.

**Whalley, Simon A.**; Murray, John M.; Brown, Dave; Webster, George J.M.; Emery, Vincent C.; Dusheiko, Geoffrey M.; Perelson, Alan S. (2001): Kinetics of Acute Hepatitis B Virus Infection in Humans. In: *The Journal of Experimental Medicine* 193 (7), S. 847–854.

**Wiley, Jesse C.**; Pettan-Brewer, Christina; Ladiges, Warren C. (2011): Phenylbutyric acid reduces amyloid plaques and rescues cognitive behavior in AD transgenic mice. In: *Aging Cell* 10 (3), S. 418–428. DOI: 10.1111/j.1474-9726.2011.00680.x.

**Wismans, P.**; van Hattum, J.; Stelling, T.; Poel, J.; Gast, G. C. de (1988): Effect of supplementary vaccination in healthy non-responders to hepatitis B vaccination. In: *Hepato-gastroenterology* 35 (2), S. 78–79.

**Wong,** David K. H. (1993): Effect of Alpha-Interferon Treatment in Patients with Hepatitis B e Antigen-Positive Chronic Hepatitis B. In: *Ann Intern Med* 119 (4), S. 312. DOI: 10.7326/0003-4819-119-4-199308150-00011.

**World Health Organization** (09.08.17): Hepatitis B Fact Sheet. Online verfügbar unter <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>, zuletzt aktualisiert am 09.08.17, zuletzt geprüft am July 2017.

**Xu,** Qiaodong; Gu, Songgang; Liang, Jiahong; Lin, Zhihua; Zheng, Shaodong; Yan, Jiang (2018): The biological function of Hepatitis B virus X protein in hepatocellular carcinoma. In: *Oncology research*. DOI: 10.3727/096504018X15278771272963.

**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.

**Yang,** Hwai-I; Sherman, Morris; Su, Jun; Chen, Pei-Jer; Liaw, Yun-Fan; Iloeje, Uchenna H.; Chen, Chien-Jen (2010): Nomograms for risk of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B virus infection. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 28 (14), S. 2437–2444. DOI: 10.1200/JCO.2009.27.4456.

**Yang,** Jiao; Sun, Hang; Liu, Qi (2016): The Comparative Efficacy and Safety of Entecavir and Lamivudine in Patients with HBV-Associated Acute-on-Chronic Liver Failure: A Systematic Review and Meta-Analysis. In: *Gastroenterology Research and Practice* 2016. DOI: 10.1155/2016/5802674.

**Zanetti,** Alessandro R.; van Damme, Pierre; Shouval, Daniel (2008): The global impact of vaccination against hepatitis B: a historical overview. In: *Vaccine* 26 (49), S. 6266–6273. DOI: 10.1016/j.vaccine.2008.09.056.

**Zhang,** Hui; Nakajima, Shotaro; Kato, Hironori; Gu, Liubao; Yoshitomi, Tatsuya; Nagai, Kaoru *et al.* (2013): Selective, potent blockade of the IRE1 and ATF6 pathways by 4-phenylbutyric acid analogues. In: *Br J Pharmacol* 170 (4), S. 822–834. DOI: 10.1111/bph.12306.

**Zhang,** Kezhong; Kaufman, Randal J. (2008): From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. In: *Nature* 454 (7203), S. 455–462. DOI: 10.1038/nature07203.

**Zhang**, Kezhong; Shen, Xiaohua; Wu, Jun; Sakaki, Kenjiro; Saunders, Thomas; Rutkowski, D. Thomas *et al.* (2006): Endoplasmic reticulum stress activates cleavage of CREBH to induce a systemic inflammatory response. In: *Cell* 124 (3), S. 587–599. DOI: 10.1016/j.cell.2005.11.040.

**Zhang**, Li-Juan; Zheng, Wei-Da; Chen, Yun-Xin; Huang, Yue-Hong; Chen, Zhi-Xin; Zhang, Sheng-Jun *et al.* (2007): Antifibrotic effects of interleukin-10 on experimental hepatic fibrosis. In: *Hepato-gastroenterology* 54 (79), S. 2092–2098.

**Zhang**, N.; Ahsan, M. H.; Purchio, A. F.; West, D. B. (2005): Serum Amyloid A-Luciferase Transgenic Mice. Response to Sepsis, Acute Arthritis, and Contact Hypersensitivity and the Effects of Proteasome Inhibition. In: *The Journal of Immunology* 174 (12), S. 8125–8134. DOI: 10.4049/jimmunol.174.12.8125.

**Zhou**, Wenbo; Bercury, Kathryn; Cumiskey, Jessica; Luong, Nancy; Lebin, Jacob; Freed, Curt R. (2011): Phenylbutyrate up-regulates the DJ-1 protein and protects neurons in cell culture and in animal models of Parkinson disease. In: *The Journal of biological chemistry* 286 (17), S. 14941–14951. DOI: 10.1074/jbc.M110.211029.

**Zhou**, Wen-Ce; Zhang, Quan-Bao; Qiao, Liang (2014): Pathogenesis of liver cirrhosis. In: *World journal of gastroenterology* 20 (23), S. 7312–7324. DOI: 10.3748/wjg.v20.i23.7312.

**Zoulim**, Fabien; Locarnini, Stephen (2009): Hepatitis B virus resistance to nucleos(t)ide analogues. In: *Gastroenterology* 137 (5), 1593-608.e1-2. DOI: 10.1053/j.gastro.2009.08.063.

**Zuckerman**, J. N.; Zuckerman, A. J.; Symington, I.; Du, W.; Williams, A.; Dickson, B.; Young, M. D. (2001): Evaluation of a new hepatitis B triple-antigen vaccine in inadequate responders to current vaccines. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 34 (4 Pt 1), S. 798–802. DOI: 10.1053/jhep.2001.27564.



## 12 Publikationsverzeichnis

**Köppel A**, Baier KM, Glebe D, Schröder D, Churin Y, Tschuschner A, Roderfeld M, Roeb E. Das synthetische Chaperon 4-PBA verändert das Verteilungsmuster der HBV-Hüllproteine im Endoplasmatischen Retikulum von Hepatitis B transgenen Mäusen und führt zu verstärkter Pathogenese.

*Z Gastroenterol* 2016; 54 - KV169, DOI: 10.1055/s-0036-1586945, *Abstract/Vortrag DGVS* 2016.

**Köppel A**, Baier KM, Glebe D, Schröder D, Churin Y, Tschuschner A, Roderfeld M, Roeb E. Das synthetische Chaperon PBA steigert ER Stress und Inflammation in Hepatitis B transgenen Mäusen. Z

*Gastroenterol* 2015; 53 - KG131; DOI: 10.1055/s-0035-1559157, *Abstract/Vortrag DGVS* 2015.

**Köppel A**, Roderfeld M, Glebe D, Schröder D, Churin Y, Tschuschner A, Baier KM, Roeb E. Das synthetische Chaperon PBA steigert ER Stress und Apoptose in Hepatitis B transgenen Mäusen.

*Der Internist* 2015 [Suppl 1]56: 27. DOI 10.1007/s00108-015-3699-7, *Abstract/Poster DGIM* 2015.

Schneider F, Churin Y, **Köppel A**, Baier KM, Tschuschner A, Roderfeld M, Roeb E. Das synthetische Chaperon 4-PBA induziert eine Akut-Phase-Reaktion im Maus-Modell für Protein-Speicherkrankheiten.

*Z Gastroenterol* 2015; 53 - A1\_11; DOI: 10.1055/s-0035-1567941, *Abstract/Poster GASL* 2016.

Schneider F, Churin Y, **Köppel A**, Baier KM, Tschuschner A, Roderfeld M, Roeb E. Das synthetische Chaperon 4-PBA führt zur Akut-Phase-Reaktion in einem HBs-transgenen Maus-Modell.

*Z Gastroenterol* 2016; 54 - KV171. DOI: 10.1055/s-0036-1586947. *Abstract/Vortrag DGVS* 2016.

Baier KM, Churin Y, Schneider F, **Köppel A**, Leder D, Tschuschner A, Roderfeld M, Roeb E. Modulation der Unfolded Protein Response (UPR) im murinen HBV-Modell durch Aktivierung des Transkriptions-faktors ATF6.

*Z Gastroenterol* 2016; 54(12): 1343-1404. DOI: 10.1055/s-0036-1597446.

*Abstract/Poster GASL 2017.*

Baier KM, Churin Y, Schneider F, **Köppel A**, Leder D, Tschuschner A, Roderfeld M, Roeb E. 4-PBA, ein synthetisches Chaperon, aktiviert den Transkriptionsfaktor ATF6 im murinen HBV-Modell.

*Der Internist* 2017 (Suppl 1): 58: 20. DOI: 10.1007/s00108-017-0235-y. *Abstract/Poster*

*DGIM 2017.*

### **13 Ehrenwörtliche Erklärung**

„Hiermit versichere ich, dass ich die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe angefertigt habe. Alle verwendeten Hilfen habe ich in der Arbeit angegeben und Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichter oder nicht veröffentlichter Literatur entnommen sind, sowie Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Analysen habe ich die Grundsätze wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten. Tierschutzrechtliche, ethische und datenschutzrechtliche Grundsätze wurden von mir stets befolgt. Ich versichere, dass keine geldwerten Leistungen für Arbeiten in Zusammenhang mit dieser Dissertation an Dritte erbracht wurden. Gemäß § 25 Abs. 6 der Allgemeinen Bestimmungen für modularisierte Studiengänge bin ich mit der Überprüfung meiner Arbeit mittels Anti-Plagiatssoftware einverstanden.“



Rastatt, 30.09.2018

Alica Anna Maria Köppel

## 14 Danksagung

An erster Stelle danke ich Frau Univ.-Prof. Dr. med. Elke Roeb, dass sie mir ermöglicht hat, meine Dissertation zu einem sehr interessanten Thema innerhalb ihrer Arbeitsgruppe anzufertigen. Sie ist eine sehr zuverlässige, äußerst empathische und hilfsbereite Doktormutter, die ich jedem Doktoranden nur weiter empfehlen kann. Ihre Betreuung war ausgezeichnet.

Ein riesengroßes Dankeschön gilt meinem Betreuer und Laborleiter, PD Dr. Martin Roderfeld, der mir wirklich immer mit konstruktiven Tipps und mit seinem Fachwissen zur Verfügung stand. Ich konnte ihn jeder Zeit um Rat fragen und bekam trotz seines vollen Terminkalenders sehr rasch eine Antwort. Ohne Martin, hätte ich die Promotion nicht geschafft.

Des Weiteren danke ich Yury Churin, der mit seinen großartigen Ideen zum roten Faden der Arbeit beitrug und bewundere sein außerordentliches wissenschaftliches Können.

Sehr dankbar bin ich auch Annette Tschuschner für ihre Geduld bei meiner Einarbeitungszeit und ihre guten Ratschläge bezüglich verschiedenster Methoden. Ich danke außerdem Herrn Prof. Dr. Glebe für seine Expertise zum HBV und für die zur Verfügung gestellten Antikörper.

Außerdem möchte ich mich für die lustige und wunderschöne Zeit, sowie die vielen kleinen Hilfen im Labor bei allen Mitgliedern und Mitdoktoranden der AG Roeb danken. Wir hatten unvergessliche Abende bei den von Frau Prof. Dr. med. Roeb jährlich veranstalteten Weihnachtsfeiern oder bei den Bierbrauerei-Besichtigungen in Lich. Eine Weihnachtsfeier wird mir immer in Erinnerung bleiben und ein Lächeln auf das Gesicht zaubern.

Die Zeit im Labor war für mich sehr lehrreich und erbrachte wertvolle Einblicke in die Grundlagenforschung, die mich auf meinem weiteren Weg als Ärztin bereichern. Abschließend möchte ich meinen großartigen Eltern, meiner Schwester, meiner Oma und meinen Freunden danken, die mich während meines ganzen Medizinstudiums stets unterstützt und motiviert haben. Gerade in schwierigen Zeiten waren sie eine große Stütze und halfen mir meinen Traum Ärztin zu werden, zu erfüllen.



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6791-5



9 783835 196791 5