

# Phenylbutyrat induziert Lipocalin 2 in einem Maus-Modell für chronische Hepatitis B

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

vorgelegt von Schneider, Franziska  
aus Linz am Rhein  
Gießen, 2019

---

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II  
Schwerpunkt Gastroenterologie  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Leitung: Univ.-Prof. Dr. Elke Roeb MHAC

Gutachterin: Prof. Dr. E. Roeb  
Gutachter: Prof. Dr. St. Pleschka  
Tag der Disputation: 17.12.2019

*„Tu erst das Notwendige, dann das Mögliche, und plötzlich schaffst du das  
Unmögliche.“*

*Franz von Assisi*

Für meine Familie

# Inhaltsverzeichnis

Widmung .....	I
Inhaltsverzeichnis .....	II
1. Einleitung .....	5
1.1 Einführung und Zielsetzung .....	5
1.2 Die Leber.....	6
1.2.1 Anatomie der Leber .....	6
1.2.2 Gefäßversorgung der Leber und Portalkreislauf.....	7
1.2.3 Histologie und Zonierung der Leber.....	7
1.2.4 Funktionen der Leber .....	10
1.3 Hepatitis B.....	11
1.3.1 Allgemeines und Klinik .....	11
1.3.2 Das Hepatitis B Virus .....	12
1.3.3 Das Hepatitis B-Oberflächenantigen (HBsAg) und seine Leberpathogenität .....	14
1.3.4 Das HBs-transgene Maus-Modell.....	16
1.4 ER Stress und die Unfolded Protein Response .....	16
1.5 Das synthetische Chaperon 4-Phenylbutyrat (4-PBA).....	18
1.6 Die Akut-Phase-Antwort der Leber .....	19
1.6.1 Allgemeines .....	19
1.6.2 Zytokine in der Akut-Phase-Antwort.....	21
1.6.3 Das Akut-Phase-Protein Lipocalin 2 (Lcn2).....	23
1.6.4 Der Jak/Stat Signalweg .....	24
1.6.5 Die Interferon-Antwort .....	25
1.7 Studienrelevante Vorarbeiten.....	26
1.7.1 Auflösung von Aggregaten des HBV-Oberflächenproteins in der Zellkultur .....	26
2. Material und Methoden .....	28
2.1 Verwendete Mauslinien .....	28
2.2 Leberzelllinien.....	29
2.2.1 Die murine Hepatozytenzelllinie AML12 .....	29
2.2.2 Kultivierung und Induktion der Zellen .....	29
2.3 Protein-Biochemische Methoden .....	32
2.3.1 Herstellung von Lysaten für Western Blot Analysen .....	32
2.3.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	33
2.3.3 Proteintransfer auf eine PVDF-Membran.....	37
2.3.4 Immundetektion einzelner Proteine .....	38
2.3.5 Wiederverwertbarkeit der PVDF-Membranen ( <i>Stripping</i> ).....	40
2.4 Immunhistochemische Verfahren .....	41

---

2.4.1	Aufbereitung von Paraffin-Schnitten .....	41
2.4.2	Färben von Paraffin-Schnitten .....	42
2.5	Molekularbiologische Methoden .....	45
2.5.1	RNA-Isolation aus Zellen und Gewebe .....	45
2.5.2	RNA-Qualitätskontrolle mittels Agarosegel.....	47
2.5.3	Konzentrationsbestimmung der RNA mittels Spektrophotometrie	48
2.5.4	cDNA Synthese.....	48
2.5.5	Quantitative Real-Time PCR .....	49
2.5.6	Microarray Analyse .....	53
2.6	Statistik und Datenverarbeitung .....	53
3.	Ergebnisse.....	55
3.1	Verteilung des Hepatitis B-Hüllproteins in den Hepatozyten.....	55
3.2	Induktion einer Akut-Phase-Antwort unter PBA-Behandlung .....	57
3.2.1	Microarray-Analyse 12 Wochen alter BALB/c Mäuse .....	57
3.2.2	Ergebnisse des Proteom Profiler Arrays .....	59
3.2.3	Untersuchung der Genexpressions-Level von Lipocalin 2.....	59
3.2.4	Geschlechtsspezifische Analyse der Genexpression von Lipocalin 2 .....	60
3.2.5	Untersuchung von Lipocalin 2 auf Proteinebene.....	62
3.2.6	Immunhistochemische Darstellung von Lipocalin 2 .....	63
3.2.7	Transkriptionelle Analyse weiterer Gene .....	65
3.2.8	Analyse der Genexpression proinflammatorischer Zytokine .....	66
3.2.9	Untersuchung von Genen der Interferon-Antwort auf mRNA-und Proteinexpressionsebene.....	68
3.3	Untersuchung der Stat-Familie (Signal transducer and activator of transcription) .....	71
3.3.1	Untersuchung des Transkriptionsfaktors Stat3 .....	71
3.3.2	Untersuchung des Transkriptionsfaktors Stat5 .....	72
3.3.3	Analyse von Genen und Proteinen des Stat5 Signalwegs.....	74
3.4	Wirkung von 4-PBA auf die Zonierung des Leberparenchyms.....	79
3.5	Behandlung der murinen Hepatozytenzelllinie AML12 mit 4-PBA.....	82
3.5.1	Untersuchung der Akut-Phase-Antwort in der Zelllinie .....	82
4.	Diskussion .....	85
4.1	Bewertung der Hochregulation von Lipocalin 2 unter 4-PBA Behandlung ....	85
4.1.1	Die Induktion von Lipocalin 2 als Hinweis auf eine Akut-Phase- Reaktion .....	85
4.1.2	Beurteilung des initialen Anstiegs proinflammatorischer Zytokine .....	86
4.1.3	Rekonstruktion eines möglichen Signalweges zwischen Stat3 und Lipocalin 2 .....	87
4.1.4	Korrelation der Interferon-Antwort mit der Akut-Phase-Antwort..	89

---

4.1.5 Erkenntnisse aus der Immunhistochemie – Wirkung von 4-PBA auf die Zonierung des Leberparenchyms.....	91
4.1.6 Zusammenhänge zwischen Stat5 und der Akut-Phase-Reaktion....	92
4.1.7 Ursachen und Ideen für die geschlechtsspezifische Reaktion auf 4-PBA.....	94
4.1.8 Rückschlüsse aus den Zellexperimenten .....	96
4.1.9 Rolle der Hochregulation von Lipocalin 2.....	96
4.2 Vergleich der Ergebnisse mit anderen Studien zur ER Stress-Minderung mit 4-PBA.....	98
4.3 Limitationen der Arbeit.....	100
4.3.1 Kritische Betrachtung des Versuchsaufbaus.....	100
4.3.2 Einfluss epigenetischer Methylierungseffekte auf den Versuch....	102
4.4 Ausblick und Ideen zur Versuchsfortführung .....	103
4.5 Fazit	104
Zusammenfassung .....	106
Summary.....	108
Abkürzungsverzeichnis .....	110
Abbildungsverzeichnis .....	116
Tabellenverzeichnis .....	122
Literaturverzeichnis .....	124
Publikationsverzeichnis .....	141
Erklärung zur Dissertation.....	143
Danksagung .....	144

# 1. Einleitung

## 1.1 Einführung und Zielsetzung

Weltweit leiden rund 240 Millionen Menschen an chronischer Hepatitis B <sup>1</sup>. Es sterben jährlich mehr als 686 000 Menschen an den Folgen der Infektion, worunter beispielsweise Leberzirrhose oder Krebs fallen <sup>2</sup>. Über die Struktur und den Replikationszyklus des *Hepatitis B Virus* (HBV) ist bereits Vieles bekannt <sup>3</sup>. Weniger erforscht sind die Mechanismen, durch die es bei chronischer Infektion zur Leberpathologie kommt. Für die Leberpathologie wird vor allem das zelluläre Immunsystem verantwortlich gemacht: Virusspezifische zytotoxische T-Zellen erkennen infizierte Hepatozyten und bedingen die Induktion nekrotischer und inflammatorischer Prozesse in der Leber <sup>4,5</sup>. Jedoch wurde beobachtet, dass chronisch infizierte, immunsupprimierte HBV-Träger ebenso Leberschäden entwickeln <sup>6</sup>. Folglich wird vermutet, dass HBV auch direkte zytopathische Effekte haben muss. Die Leberhistologie in immundefizienten Mäusen mit humanen Leberzellen (uPA-SCID) ähnelt bei Infektion mit HBV dem histopathologischen Muster in Hepatozyten transgener Mäuse, die das HBV Oberflächenprotein, auch *Hepatitis B surface antigen* (HBsAg), exprimieren <sup>7</sup>. Diese transgenen Mäuse wurden 1985 von Chisari etabliert, um die Leberpathologie in chronisch infizierten HBV-Trägern zu untersuchen <sup>8</sup>. Dabei wurden Mäusen unter anderem die Geninformationen für das HBsAg injiziert. Im transgenen Maus-Modell führt die Überexpression des großen HBV Oberflächenproteins *Large hepatitis B surface antigen* (LHBs) zur Akkumulation von *subviralen Partikeln* (SVP) im *endoplasmatischen Retikulum* (ER) der Hepatozyten <sup>8,9</sup>. Die Hepatozyten zeigen sich histologisch vergrößert, hydropisch und eosinophil. Sie nehmen die Form der in HBV Patienten beschriebenen *Ground glass hepatocytes* (GGH) an <sup>10</sup>. Diese Hepatozyten werden nekrotisch und die Mäuse entwickeln Leberschäden mit erhöhten Inflamationsparametern <sup>11</sup>. Folglich wird der Überexpression des großen HBV Oberflächenproteins LHBs eine Bedeutung in der Leberpathologie bei chronischer Hepatitis B zugemessen.

Durch die Akkumulation der Oberflächenproteine im ER der transgenen Mäuse kommt es zum ER Stress, auf den die Zellen mit der *Unfolded Protein Response* (UPR) reagieren <sup>12,13,11</sup>. Daher könnte die Reduktion des ER Stresses eine Möglichkeit darstellen, die Homöostase in Hepatozyten chronisch Infizierter zu verbessern und Folgeschäden zu mindern.

Erstes Ziel in diesem Projekt war es, den ER Stress in den Leberzellen eines HBs-transgenen Maus-Modells durch die Gabe des synthetischen Chaperons *4-Phenylbutyrat* (4-PBA) zu vermindern<sup>14-16</sup>.

Neben der von Chisari etablierten Mauslinie vom genetischen Black 6 Typ wurde ein transgenes Maus-Modell vom genetischen BALB/c Hintergrund untersucht, da dieses Modell eine stärkere Leberfibrose entwickelt<sup>17-19</sup>. In diesem Projekt wurde transgenen Mäusen das synthetische Chaperon 4-PBA appliziert, das als „ER Stress-Inhibitor“ beschrieben wurde<sup>14</sup>.

Hypothese: Das Chaperon 4-PBA entlastet durch seine Fähigkeit als Kofaktor bei der Proteinfaltung das durch Überexpression von Oberflächenprotein überladene ER.

Durch Zusatz des Chaperons sollten sich ER Stress und die Ansammlung fehlgefalteter Proteine vermindern.

Bei erfolgreichem Einsatz des Chaperons 4-PBA im Tiermodell könnte es als neue Therapieoption bei chronischer Hepatitis B in Frage kommen.

Ein zweites Ziel der vorliegenden Arbeit war die Verifizierung der in einer Microarray Analyse identifizierten Induktion des Akut-Phase-Proteins Lipocalin 2 und dessen Charakterisierung in Mäusen unterschiedlicher Altersstufen. So sollten Rückschlüsse der 4-PBA-Wirkung auf die Hepatozyten gezogen und die Homöostase der Leberzellen in einem Maus-Modell für chronische Hepatitis B besser verstanden werden. Außerdem galt es, die Rolle von Lipocalin 2 bei chronischen Leberschäden zu evaluieren.

## 1.2 Die Leber

### 1.2.1 Anatomie der Leber

Die Leber entwickelt sich aus der primitiven Darmwand<sup>20</sup>: Schon in der dritten Woche der Embryonalentwicklung wächst aus der ventralen Wand des Vorderdarms eine Leberknospe aus entodermalen Epithelzellen. Aus den Epithelzellen der primitiven Leberknospe entwickeln sich später die Hepatozytenstränge<sup>21</sup>.

Die Leber liegt im rechten Oberbauch und wiegt beim lebergesunden Menschen zwischen 1,2 und 1,8 kg<sup>22</sup>. Bis zur Medioklavikularlinie fällt der untere Leberrand rechts mit dem

Rippenbogen zusammen. Die Leber gliedert sich in eine dem Zwerchfell zugewandten Seite (Facies diaphragmatica) und in eine den inneren Organen zugewandte Seite (Facies visceralis). Bis auf einen kleinen Abschnitt der Facies diaphragmatica, der Area nuda, liegt die Leber intraperitoneal. An der Area nuda ist die Leber mit dem Diaphragma verwachsen. Daher verschiebt sie sich abhängig von der Atmung und kann bei Inspiration am unteren Leberrand palpirt werden <sup>23</sup>.

Grob unterteilt wird die Leber in vier Lappen: Lobus dexter und Lobus sinister, die durch das Ligamentum falciforme getrennt werden, und die zwei kleineren Lappen Lobus caudatus und quadratus. Von klinischer Bedeutung ist jedoch eher die Unterteilung der Leber in acht funktionelle Segmente. Jedes dieser Segmente wird von einer Abzweigung der „Glisson-Trias“ (s.1.2.2) versorgt und kann daher bei Pathologien (wie Leberkrebs, z.B. Hepatozelluläres Karzinom) blutungsarm reseziert werden <sup>22</sup>.

### 1.2.2 Gefäßversorgung der Leber und Portalkreislauf

Die Leber wird arteriell aus der Arteria hepatica propria versorgt. Diese zweigt aus dem ersten Ast des Truncus coeliacus der Arteria hepatica communis ab und verläuft zusammen mit der Vena portae hepatis im Ligamentum hepatoduodenale zur Leber. An der Leberpforte teilt sich die Arteria hepatica propria in einen rechten und linken Ast <sup>10</sup>.

Die Venae hepaticae und ihre Zuflüsse führen das venöse Blut über die Vena cava inferior zurück zum Herzen. Innerhalb der Leber verlaufen die Lebervenenäste nicht mit den Ästen der sogenannten „Glisson-Trias“ <sup>22</sup>.

Die Besonderheit am Gefäßsystem der Leber ist ihre Einbindung in den Pfortaderkreislauf. Nährstoffreiches, venöses Blut aus Magen, Darm, Pankreas und Milz gelangt nach Zusammenschluss von Vena mesenterica superior und Vena splenica in die Vena portae hepatis. Diese tritt an der Leberpforte ins Organ ein. Äste der Portalvene vermischen sich in den Lebersinusoiden mit dem arteriellen Blut der Arteria hepatica propria <sup>22</sup>.

### 1.2.3 Histologie und Zonierung der Leber

Die Leber-Histologie lässt sich durch drei verschiedenen Erklärungsansätze vermitteln: Das klassische Leberläppchen (Zentralvenenläppchen), den Leberazinus und das Portalvenenläppchen.

Wird vom Zentralvenenläppchen ausgegangen, liegt die Vena centralis im Zentrum. Radial um sie angeordnet, ziehen Stränge aus Leberepithelzellen (Hepatozyten) in die Peripherie<sup>20</sup>.

Beim Portalvenenläppchen liegt das Periportalfeld im Zentrum der Betrachtung. Zum periportalen Feld gehören die Gefäße der *Glisson-Trias*, wozu je eine Arteria interlobularis (ein Ast der A.hepatica propria), eine Vena interlobularis (Ast der Portalvene) und ein oder mehrere Ductuli interlobulares (Äste des Gallengangsystems) gehören<sup>24</sup>. Der Leberazinus hingegen stellt einen Rhombus zwischen zwei gegenüberliegenden Zentralvenen und Periportalfeldern dar<sup>25</sup>. Diese Darstellung fokussiert sich auf die Zonierung des Lebergewebes in Abhängigkeit vom Sauerstoff- und Nährstoffangebot. Zone 1 liegt nahe des Periportalfeldes. Da sich dort arterielles Blut und Pfortaderblut vermischen, ist am Periportalfeld das Angebot an Nährstoffen, O<sub>2</sub> und Hormonen am höchsten. In Richtung Zentralvene reduzieren sich diese Bestandteile im Sinusoid, sodass in Zone 3 kaum Sauerstoff und Nährstoffe vorhanden sind. Dafür ist in dieser Zone, die um die Zentralvene liegt, der Gehalt von Kohlenstoffdioxid und Metaboliten aus den ersten beiden Zonen am höchsten<sup>10</sup>. Da sich Sauerstoff-, Nährstoff- und Hormonangebot zwischen den Hepatozyten nahe des periportalen Feldes und denen nahe der Zentralvene unterscheiden, kann das Leberparenchym auch in funktionelle Zonen, abhängig vom Stoffwechsel der einzelnen Hepatozyten, unterteilt werden. Dies wird als die „Heterogenität des Leberparenchyms“ bezeichnet<sup>26</sup>.

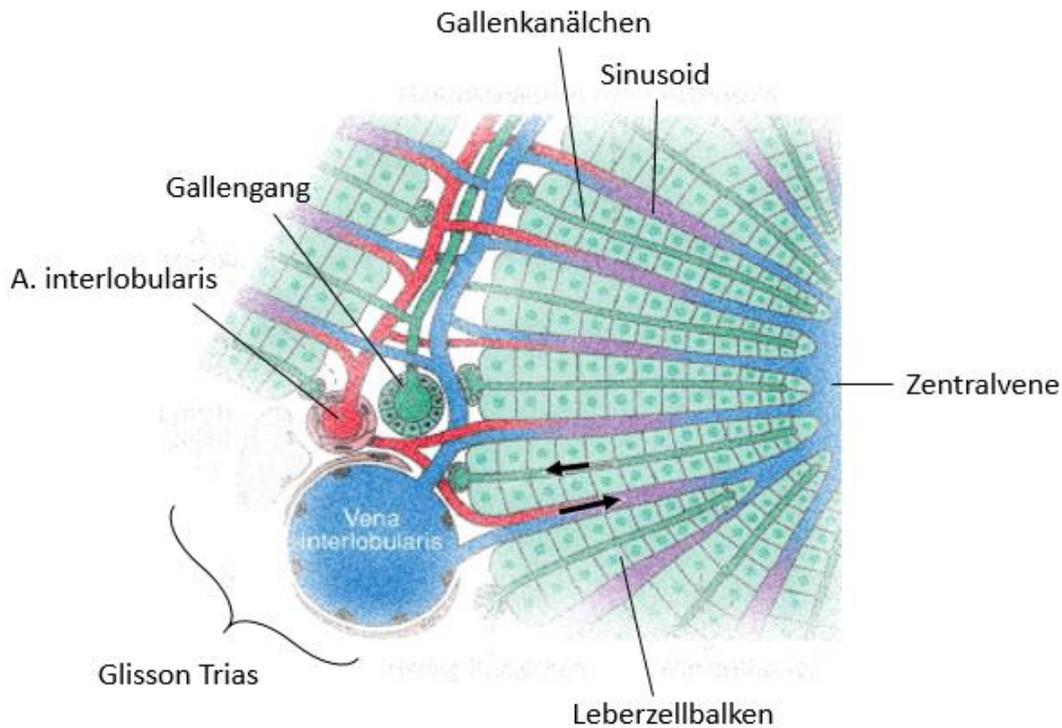


Abbildung 1: Histologische Struktur der Leber modifiziert nach Welsch et al. <sup>20</sup>. Die *Glisson-Trias* setzt sich zusammen aus Vena interlobularis, Arteria interlobularis und einem Gallengang. Die Pfeile markieren die Flussrichtung: Das Blut in den Sinusoiden läuft auf die Zentralvene zu, die in den Leberzellen produzierte Galle läuft entgegengesetzt in Richtung der großen Gallengänge.

Wie in Abbildung 1 ersichtlich verlaufen die Zellbalken aus Hepatozyten strangförmig in Richtung Zentralvene. Hepatozyten sind polygonal geformt, messen 25  $\mu\text{m}$  im Durchmesser und zeichnen sich durch ihren polaren Aufbau aus. Apikal befindet sich der schmale Gallenpol. Dort grenzt die Leberepithelzelle an das Gallenkanälchen. Breiter ist der sogenannte „Blutpol“, an dem der Hepatozyt an den Sinusoid grenzt. Der Blutpol ist Ort intensiven Austausches zwischen Blut und Zelle. Daher ist der Hepatozyt an dieser Stelle reich an Mikrovilli, was der Oberflächenvergrößerung dient <sup>20</sup>.

Zwischen den Hepatozyten und den Sinusoiden befindet sich der „*Disse-Raum*“ <sup>27</sup>. Der *Disse-Raum* ist ein schmaler Bindegewebsraum, der vor allem dem Stoffaustausch dient. Lichtmikroskopisch sichtbar wird er nur, wenn man die dort typisch vorkommenden retikulären Fasern (Typ III Kollagen) anfärbt <sup>20</sup>. Für die Pathologie der Leberfibrose sind die „Hepatischen Sternzellen“, früher auch „*Ito-Zellen*“ genannt, von Bedeutung <sup>28</sup>. Diese liegen im *Disse-Raum* und ähneln morphologisch den Fibroblasten <sup>29</sup>. Hepatische Sternzellen produzieren Proteine der extrazellulären Matrix, wie beispielsweise Kollagen,

speichern Retinolester und spielen eine Rolle bei der Leberregeneration<sup>30,31</sup>. Bei Leberschäden differenzieren sich die hepatischen Sternzellen zu hochproliferativen, extrazelluläre Matrix produzierenden Myofibroblasten, die die Fibrogenese der Leber fördern<sup>32</sup>. In den Sinusoiden der Leber befinden sich außerdem „*Kupffer-Zellen*“. Sie stammen von Monozyten ab und gehören zum mononukleären-phagozytären System. In den Sinusoiden phagozytieren *Kupffer-Zellen* Partikel und Mikroorganismen, die über das Blut in die Leber gelangen<sup>10</sup>. Bei Verlust der Milz sind sie am Abbau der Erythrozyten beteiligt<sup>20</sup>.

#### 1.2.4 Funktionen der Leber

Die Leber ist die größte Drüse des Menschen und ist Ort der Gallenproduktion<sup>33</sup>. In den Hepatozyten werden täglich etwa 500 bis 600 mL Gallenflüssigkeit gebildet und am Gallepol der Zellen über ATP-abhängige ABC Transporter in die intrahepatischen Gallenkanälchen weitergeleitet<sup>20,33</sup>. Eine Funktion der Galle ist die Fettresorption im Darm sowie die Ausscheidung von Cholesterin und Bilirubin. Essentielle Bedeutung hat die Galle auch bei der Aufnahme fettlöslicher Vitamine<sup>10,33</sup>.

Im glatten ER und den Mitochondrien der Leber finden die Reaktionen der Biotransformation statt. Körpereigene und körperfremde lipophile Substanzen werden dabei in wasserlösliche und damit ausscheidungsfähige Metabolite umgewandelt<sup>10</sup>.

Die Leber spielt eine wichtige Rolle bei der Synthese von Lipoproteinen, Bluteiweißen wie Albumin, *Akut-Phase-Proteinen* (APP) wie *C-Reaktives-Protein* (Crp), Prohormonen wie Angiotensinogen und diversen Transportproteinen wie Transferrin oder Transcortin<sup>34</sup>.

Als ein zentrales Organ des Energiehaushaltes ist die Leber Ort der Glukoneogenese. Zucker wird in Form von Glykogen gespeichert und kann bei Bedarf wieder umgebaut werden (Glykogenolyse)<sup>34</sup>.

Die im Folgenden abgebildete Tabelle stellt die Vielzahl der Funktionen der Leber zusammenfassend dar.

Bilirubin-Konjugation
Porphyrin-Stoffwechsel
Gallensäure-Biosynthese
Aminosäuren-Abbau ( <i>Desaminierung</i> )
Proteinsynthese ( <i>u.a. APP, Transport- und Plasmaproteine, Vitamin K-abhängige Gerinnungsfaktoren II, VII, IX, X, Protein C, Protein S</i> )
Kohlenhydratstoffwechsel ( <i>u.a. Glykogenese, Glykogenolyse, Glukoneogenese, Glykolyse</i> )
Ketogenese
Lipidstoffwechsel ( <i>u.a. Prdouktion von Lipoproteinen</i> )
Cholesterol-Biosynthese
Hormon-Stoffwechsel ( <i>z.B. Konversion von T<sub>4</sub> zu T<sub>3</sub></i> )
Vitamin-Stoffwechsel ( <i>z.B. Calcidiol Bildung, Speicherung von Vitamin K</i> )
Einsatz von Spurenelementen
Biotransformation und Entgiftung
Alkohol-Abbau
Ammoniak Abbau im Harnstoffzyklus
Glutamin-Zyklus
Rolle in der pH-Homöostase
Rolle im retikuloendotheliale System (RES)

Tabelle 1: Zusammenstellung wichtiger metabolischer Funktionen der Leber <sup>10</sup>

## 1.3 Hepatitis B

### 1.3.1 Allgemeines und Klinik

Das Hepatitis B Virus ist Auslöser akuter und chronischer Leberentzündungen. Es wird geschätzt, dass weltweit 2 Milliarden Menschen in der Vergangenheit oder akut mit dem Virus infiziert waren bzw. infiziert sind. 240 Millionen dieser Menschen leiden an chronischer Hepatitis B <sup>1</sup>. Während die akute Hepatitis B bei 95% zuvor gesunden Erwachsenen spontan ausheilt, ist die Chronifizierung der Krankheit oft mit schwerwiegenden Fol-

gen belastet: Mindestens ein Drittel der Patienten mit chronischer HBV-Infektion entwickelt eine Leberzirrhose und/oder ein *hepatozelluläres Karzinom* (HCC) <sup>35,36,37</sup>. Das Risiko eines HCC ist bei chronischer Infektion etwa 200-fach erhöht <sup>38</sup>. Eine chronische Hepatitis ist klinisch betrachtet eine Hepatitis, die nach 6 Monaten nicht ausgeheilt ist. Die Bezeichnung „chronische Infektion“ setzt voraus, dass das HBsAg persistiert oder eine aktive Virusreplikation nachgewiesen wird <sup>37</sup>.

Das Hepatitis B Virus überträgt sich sexuell, parenteral sowie perinatal, d.h. HBV positive Mütter übertragen den Erreger auf ihr Kind. In Deutschland ist die sexuelle Übertragung mit 65% derzeit die häufigste Ursache für Neuinfektionen <sup>37</sup>. Die Infektion mit dem Virus kann nach einer Inkubationszeit von 25 bis 180 Tagen klinisch apparent werden. Häufig sind aber auch subklinische und asymptomatische Verläufe <sup>10</sup>.

Klinisch äußert sich die Hepatitis B wie andere Virushepatitiden: Zum Krankheitsbild gehören grippale Symptome und gastrointestinale Beschwerden wie Appetitlosigkeit und Druckschmerz im rechten Oberbauch. Es kann auch zu ikterischen Verläufen kommen. Extrahepatische Manifestationen wie Arthralgien und Exantheme sind bei der Hepatitis B durch Immunkomplexbildung von HBsAg und anti-HBs verursacht <sup>37</sup>.

Die Wahrscheinlichkeit der HBV-Chronifizierung ist abhängig vom Alter bei der Infektion: So werden Neugeborene infizierter Mütter in über 90% zu HBsAg-Trägern und Kleinkinder in 35%. Immunkompetente Erwachsene hingegen leiden nur in 5% der Fälle an der chronischen Form der Krankheit.

Die Therapie der akuten HBV-Infektion erfolgt symptomatisch. Eine antivirale Therapie mit Nukleosid- oder Nukleotidanaloga wird nur bei eingeschränkter Leberfunktion eingeleitet. Bei chronischer Hepatitis B wird mit antiviralen Substanzen wie  $\alpha$ -Interferon oder Nukleosid- und Nukleotidanaloga therapiert. Ziel ist es, die HBV-DNA unterhalb der Nachweisgrenze zu halten und langfristig eine Serokonversion von HBsAg zu anti-HBs-Antikörpern zu erreichen <sup>37</sup>.

Seit 1982 gibt es einen wirksamen Impfstoff gegen Hepatitis B. Er besteht aus HBsAg-Partikeln <sup>35</sup>.

### 1.3.2 Das Hepatitis B Virus

Das Hepatitis B Virus gehört zur Familie der Hepadnaviridae (Gattung Orthohepadnaviridae) und verfügt über ein partiell doppelsträngiges, zirkuläres DNA Molekül <sup>39,40</sup>. Das

Virus misst 42 nm im Durchmesser und kann bei Säugetieren und Vogelarten nachgewiesen werden <sup>41</sup>.

Der Erreger wird von einer Virushülle ummantelt, die aus dem Hepatitis B Oberflächenantigen (HBsAg) besteht. Neben dem Oberflächenantigen besteht das Virus aus einem Nukleokapsid von 27 nm Durchmesser. Das Nukleokapsid beinhaltet das c-Antigen („c“ für *core*) sowie das e-Antigen („e“ für *envelope*) <sup>10</sup>. Der Kern, englisch *core*, ist ikosaedrisch geformt und besteht aus 240 core-Protein Untereinheiten <sup>3</sup>. Das HBV Genom enthält vier *Open reading frames* (ORFs), welche insgesamt für sieben Proteine kodieren: Die DNA-Polymerase, das c-Antigen, das e-Antigen, drei verschiedene Oberflächen-Antigene und das X-Protein <sup>35</sup>.

Das Virus bindet an den *Na<sup>+</sup>-taurocholat-cotransporting-Polypeptid*-Rezeptor (NTCP-Rezeptor) und gelangt so über Endozytose in die Hepatozyten <sup>41</sup>. Im Kern der Wirtszelle wird die DNA freigesetzt. Die DNA wird von ihrer *relaxed* Konformation (rcDNA) in *covalently closed circular DNA* (cccDNA) umgewandelt. Ausgehend von der cccDNA kann dann folgende *messenger RNA* (mRNA) synthetisiert werden: Die 3,5 kb große *precore mRNA* (preC mRNA) und *pregenomic RNA* (pgRNA), die 2,4 kb und 2,1 kb große *preS/S mRNA* und die 0,7 kb große *HBx mRNA* <sup>41</sup>.

Im ER werden aus der *preS/S mRNA* die drei verschiedenen HBV-Hüllproteine hergestellt. Neue virale *Core*-Partikel formieren sich im Cytosol und können dann von den Oberflächenproteinen umhüllt die Zelle wieder verlassen. Infizierte Leberzellen sezernieren nicht nur ganze Viren, sondern auch spherische und filamentöse Partikel, die aus den Oberflächenproteinen bestehen, jedoch keine DNA enthalten und daher nicht infektiös sind (sogenannte *subviral particles* (kurz SVPs)) <sup>3</sup>. Im Serum infizierter Träger können diese SVPs zehntausendfach höher konzentriert vorkommen als die HB-Viren selbst. Es wird angenommen, dass die subviralen Partikel das Immunsystem vom eigentlichen Virus ablenken sollen <sup>42</sup>.

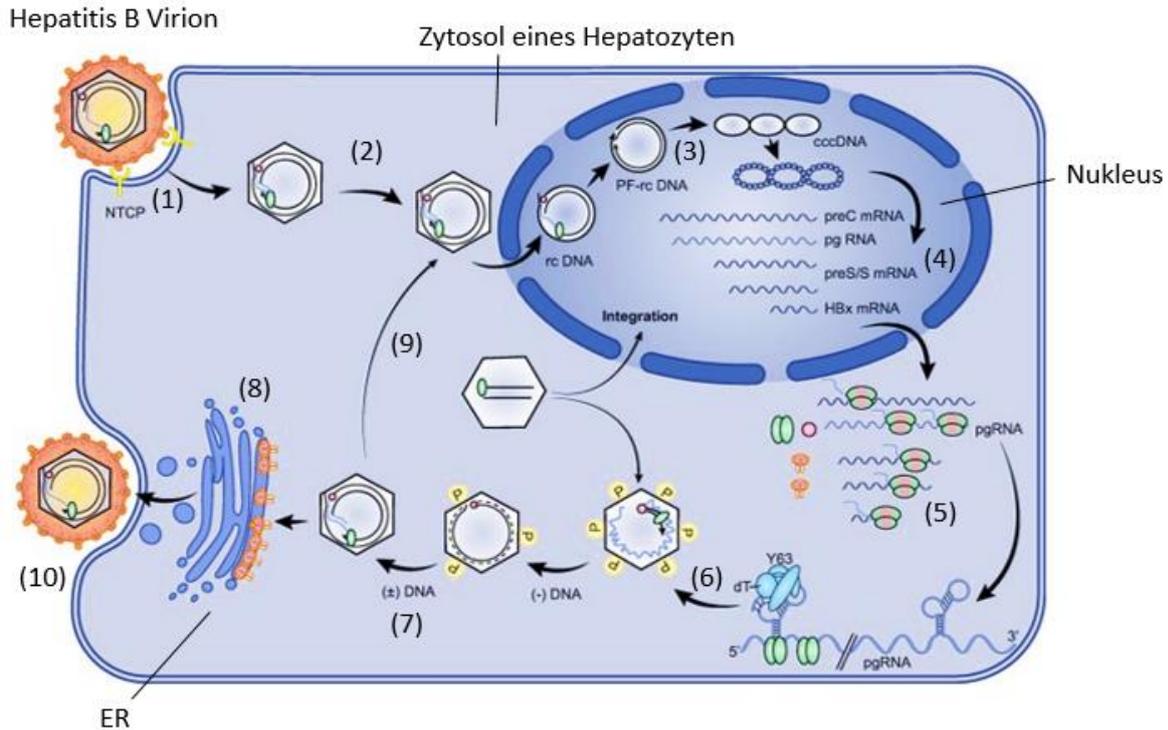


Abbildung 2: Replikationszyklus des Hepatitis B Virus modifiziert nach Tong et al. <sup>41</sup>. (1) Infektion durch Binden an den  $\text{Na}^+$ -taurocholat-cotransporting-Polypeptid-Rezeptor (NTCP-Rezeptor) und Enthüllung des Virus (engl.: *Uncoating*) (2) Transport zum Nucleus (3) Umwandlung der rcDNA in die cccDNA, die das Template für die vier ORFs ist (4) Transkription der preC mRNA, pgRNA, preS/S mRNA und HBx mRNA (5) Translation der pgRNA im Zytosol (6) Das P-Protein wird in ein Core verpackt und synthetisiert die (-)-Strang DNA (Reverse Transkriptase) (7) Die (+)-Strang DNA wird synthetisiert. Nun liegt ein reifes Core-Partikel mit rcDNA vor (8) Umhüllung des Core-Partikels durch die HBV Oberflächenproteine am ER (9) Alternativ tritt der Core-Partikel erneut in den Nucleus um mehr cccDNA zu synthetisieren (10) Das umhüllte Virion verlässt via sekretorischem Signalweg die Zelle

### 1.3.3 Das Hepatitis B-Oberflächenantigen (HBsAg) und seine Leberpathogenität

Das Hepatitis B Hüllprotein wurde schon 1965 im Blut australischer Aborigines gefunden und daher zunächst als „*Australian Antigen*“ bezeichnet <sup>43</sup>.

Das Hüllprotein besteht aus drei Oberflächenproteinen, die aus einem *Open reading frame* (sog. S-ORF) gebildet werden (vgl. Abbildung 3). Die drei Oberflächenproteine werden als *large hepatitis B surface antigen* (LHBs), *middle hepatitis B surface antigen* (MHBs) und *small hepatitis B surface antigen* (SHBs) bezeichnet. Der Genabschnitt am carboxyterminalen Ende des ORFs (sog. S-Region) ist in allen drei Oberflächenproteinen enthalten. Das MHBs wird zusätzlich mittels der Pre-S2-Region kodiert, während das LHBs aus allen Genabschnitten des S-ORFs gebildet wird (Pre-S1, Pre-S2 und S) <sup>11</sup>. Die

Oberflächenproteine lassen sich durch ihre unterschiedliche Glykosylierung unterscheiden<sup>3</sup>.

Die Leberzellen von Trägern des Hepatitis B Virus wurden früh als *Ground glass hepatocytes* (GGH) bezeichnet, da sie histologisch durch ein gläsernes Zytoplasma auffallen. Es stellte sich heraus, dass die Akkumulation von HBsAg im ER der Leberzellen für dieses Charakteristikum verantwortlich ist<sup>44-46</sup>. Inzwischen ist bekannt, dass die GGH Mutationen der Pre-S1 und Pre-S2 Regionen enthalten. Diese Mutationen akkumulieren im ER, da sie nicht richtig gefaltet werden können und führen zum ER Stress sowie oxidativen DNA Schäden in der Zelle. Es wurden verschiedene Typen von GGH beschrieben. GGH vom Typ 2 mit Mutationen in der Pre-S2 Region korrelieren mit der Entstehung eines hepatozellulären Karzinoms<sup>47,48</sup>.

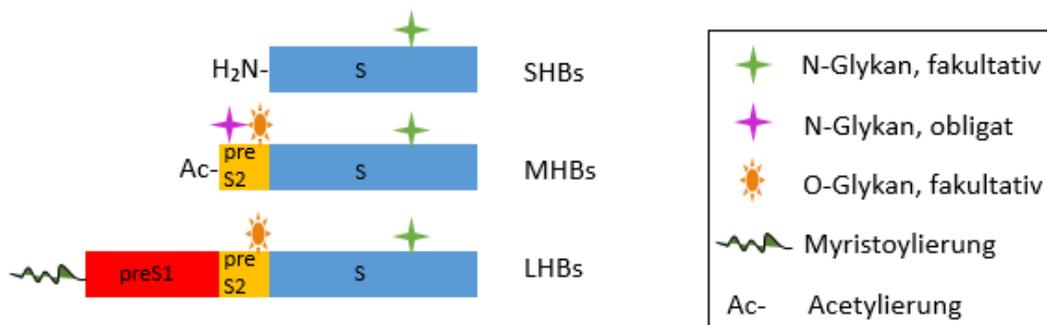


Abbildung 3: Schematische Zusammensetzung der drei Oberflächenproteine aus den Genabschnitten des S-ORFs. Die S-Region besteht aus 226 Aminosäuren, die preS2 Region aus 55 Aminosäuren und die preS1 Region variabel aus 108, 118 oder 119 Aminosäuren. Die Abbildung ist modifiziert nach Glebe et al.<sup>3</sup>

Die Oberflächenproteine werden im ER gebildet. Ihre Funktion liegt hauptsächlich in der Umhüllung neuer Viruscore-Partikel<sup>42</sup>. Die Pre-S Region des LHBs und MHBs spielt auch eine Rolle bei der Infektiosität und der Bindung des Virus an Wirtszellen<sup>11</sup>. Die Pre-S1-Region des LHBs ist verantwortlich für die Bindung des Virus an den NTCP-Rezeptor, einen Gallensäuretransporter der Leber. Da der Rezeptor im Zusammenhang mit LHBs die Infektion mit HBV vermittelt, ist er Gegenstand neuer Forschungsansätze, die sich mit der Unterbindung der Infektion auseinandersetzen<sup>49,50</sup>.

### 1.3.4 Das HBs-transgene Maus-Modell

1985 etablierte Chisari ein HBs-transgenes Maus-Modell. Dazu wurden befruchteten Eizellen Fragmente der HBV DNA injiziert, die die Geninformation für das HBs-, das preS- und X-Antigen enthielten. Die Gene wurden zunächst hinter den Promotor für HBV und *Metallothionein* (Mt) geschaltet<sup>8</sup>. In weiteren Versuchen etablierte man die Genexpression mittels Albumin-Promotor<sup>51</sup>. Das Modell basiert auf einer Kreuzung von C57BL/6 und SJL Mäusen<sup>8</sup>. Experimente bewiesen schließlich, dass lediglich die Überproduktion von HBsAg, wie sie im Modell vorliegt, ausreichend ist, um schwere Leberzellschäden und die Entwicklung eines HCC zu induzieren<sup>52</sup>.

Da gezeigt wurde, dass Mäuse vom BALB/c Stamm schneller eine signifikante Fibrose entwickeln als Mäuse mit genetischem Black 6 Hintergrund, wurde das HBs-transgene Maus-Modell im Labor der AG Roeb über 10 Generationen auf einen BALB/c Stamm zurückgekreuzt<sup>17</sup>. In Vorarbeiten wurde ein Vergleich zwischen den HBVTg/6 Mäusen von Chisari und den HBVTg/c Mäusen durchgeführt: In HBs-transgenen Mäusen mit genetischem BALB/c Hintergrund (HBVTg/c) zeigte sich ein schwererer Leberzellschaden und eine stärkere Fibrose. Pathologische Effekte des Oberflächenproteins sind somit abhängig vom genetischen Stamm. Zudem wurde gezeigt, dass die pathologischen Effekte geschlechtsabhängig sind<sup>17,18</sup>.

## 1.4 ER Stress und die Unfolded Protein Response

Da bereits gezeigt wurde, dass das HBV-Oberflächenprotein in Hepatozytenzelllinien und HBs-transgenen Maus-Modellen ER Stress induziert, sind ER Stress und die *Unfolded Protein Response* (UPR) für das Gesamtverständnis dieser Arbeit von Bedeutung<sup>13,12,17</sup>.

Das ER ist ein Membran-umhülltes Organell in eukaryontischen Zellen. Das glatte ER ist verantwortlich für die Lipidsynthese, den Stoffwechsel von Kohlenhydraten und die Entgiftung körperfremder Substanzen (Xenobiotika)<sup>53</sup>. Das raue ER hingegen ist Ort der Proteinsynthese. Dort werden unter anderem membrangebundene und sekretorische Proteine gebildet, gefaltet und modifiziert<sup>54</sup>.

Zu ER Stress kommt es, wenn die Homöostase der Zelle gestört ist, beispielsweise bei Hypoxie, Hypoglykämie, Azidose oder durch pathogene Keime<sup>55</sup>. Der Stress bewirkt die

Fehlfaltung der Proteine innerhalb des ERs. Unter normalen Bedingungen ist das Chaperon *Glucose regulated protein 78* (Grp78) an die drei Proteine *Activating transcription factor 6* (Atf6), *Proteinkinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase* (Perk) und *Inositol-requiring enzyme 1* (Ire1) gebunden, die in der Membran des ERs sitzen. Akkumulieren unter ER Stress fehlgefaltete Proteine im Organell, dissoziiert Grp78 und bindet die fehlgefalteten Proteine. Das aktiviert Atf6, Perk und Ire1. Diese wiederum aktivieren die Signalwege der UPR. Perk und Ire1 aktivieren die UPR zusätzlich über einen Grp78 unabhängigen Weg, indem sie ungefaltete Proteine direkt erkennen können. Im Rahmen der UPR wird die Expression von Genen gefördert, die die Zelle entweder in den Zelltod steuern oder sie wieder regenerieren, indem die Translation heruntergefahren wird, Proteine vermehrt degradiert und Chaperone zur Faltungshilfe synthetisiert werden <sup>14</sup>.

Atf6 ist hauptsächlich an der Transkription von Genen beteiligt, die die Verbesserung der Faltbarkeit der Proteine im ER fördern, während Perk und Ire1 zusätzlich die Proteinmenge im ER reduzieren können <sup>54</sup>.

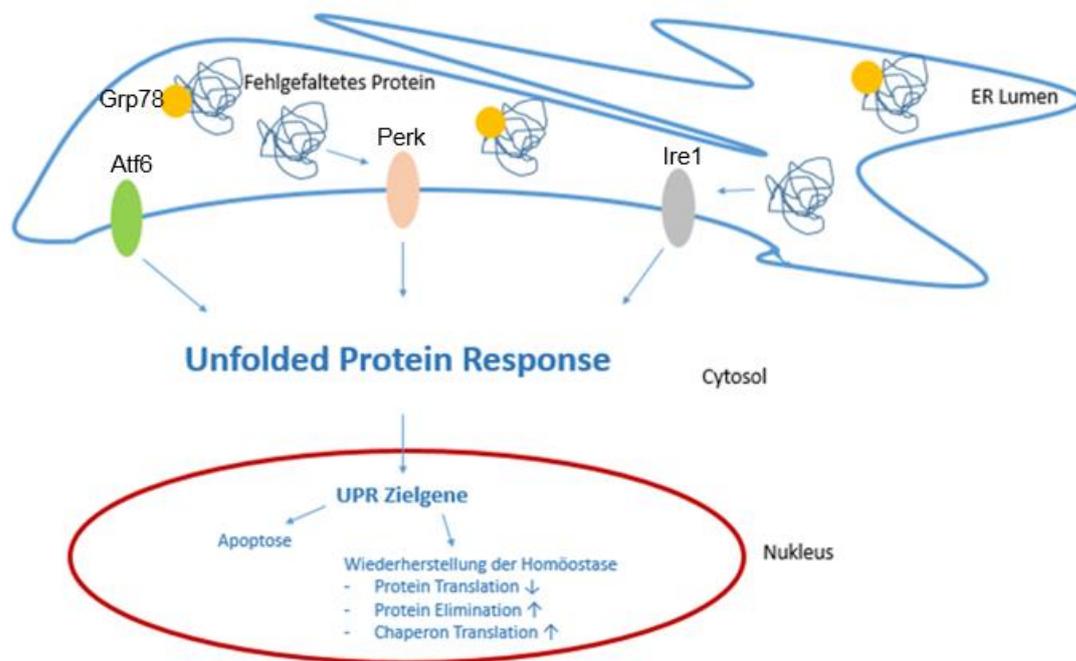


Abbildung 4: Vereinfachte Darstellung der Aktivierung der Unfolded Protein Response modifiziert nach Kolb et al. Die Membranproteine Atf6, Perk und Ire1 führen zur Aktivierung der UPR. UPR-Zielgene sorgen dafür, dass sich die Zelle entweder regeneriert oder den Zelltod antritt <sup>14</sup>.

## 1.5 Das synthetische Chaperon 4-Phenylbutyrat (4-PBA)

4-Phenylbutyrat (Summenformel:  $C_{10}H_{11}NaO_2$ ) gehört chemisch betrachtet zu den aromatischen Fettsäuren. Schon seit einigen Jahrzehnten wird 4-PBA experimentell für viele therapeutische Anwendungen erprobt. Mittlerweile hat der Wirkstoff unter dem Handelsnamen Ammonaps® eine Anwendung in der Therapie von Störungen des Harnstoffzyklus gefunden, unter anderem bei seltenen Enzymdefekten wie Carbamoylphosphatsynthetase-, Argininosuccinatsynthetase- und Ornithintranscarbamylase-Mangel. In Europa ist Natriumphenylbutyrat seit 1999 zugelassen (s. dazu die Arzneimittelinformation der EMA unter: [www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu), Stichwort Ammonaps®, Stand 09.03.2019, letztes Update: 07.03.2019). Grund für den Einsatz bei Störungen des Harnstoffzyklus ist der Abbauweg von 4-PBA, bei dem überflüssiger Stickstoff in Form von Phenylglutamin gebunden wird und über die Nieren ausgeschieden werden kann. So vermindert sich die bei Harnstoffzyklusstörungen problematische Ansammlung von toxischem Ammoniak ( $NH_3$ )<sup>56-58</sup>. Der Abbauweg von 4-PBA wird näher im Diskussionsteil dieser Arbeit erläutert (vgl 4.1.5).

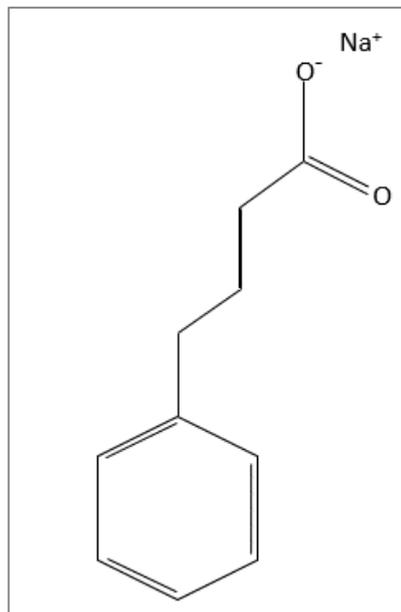


Abbildung 5: Strukturformel des Salzes von 4-PBA, Natriumphenylbutyrat, modifiziert nach Kolb et al.<sup>14</sup>.

Neben der Funktion in der Therapie von Harnstoffzyklusdefekten werden laufend weitere Einsatzmöglichkeiten von 4-PBA untersucht: Der Wirkstoff ist ein Histon-Deacetylase-

Inhibitor (HDACi) und kann somit die Genexpression beeinflussen, weshalb er an Relevanz in der Krebsforschung gewinnt<sup>59,60</sup>. Außerdem ist 4-PBA ein chemisches Chaperon, d.h. es unterstützt die korrekte Faltung von Proteinen in der Zelle. Dies gelingt durch die Interaktion der hydrophoben Regionen von 4-PBA mit den hydrophoben Regionen des zu faltenden Proteins, die so vor einer falschen Aggregation innerhalb des Moleküls bewahrt werden. Die Eigenschaft als HDACi reguliert zudem die Transkription von Genen, die an der UPR beteiligt sind, durch welche wiederum die Synthese natürlicher Chaperone gefördert wird<sup>61</sup>. So wirkt 4-PBA der Fehlfaltung von Proteinen auf zwei Weisen entgegen.

Da ER Stress durch die Akkumulation fehlgefalteter Proteine entsteht, ist 4-PBA fähig diesen ER Stress zu reduzieren<sup>62-64</sup>. Die meisten Studien bezüglich 4-PBA fokussieren sich auf die Funktion als ER Stress-Inhibitor, so beispielsweise in der Adipositasforschung oder zur Reduzierung von Ischämie bedingtem ER-Stress<sup>16,65,15</sup>. Erfolgreichen Einsatz findet 4-PBA auch in experimentellen Modellen zur Therapie von neurodegenerativen Krankheiten wie Morbus Parkinson und Alzheimer<sup>14,61</sup>. Im Hinblick auf die Leber konnte gezeigt werden, dass 4-PBA vor einer durch Tetrachlormethan (CCl<sub>4</sub>) induzierten hepatischen Fibrosierung in Mäusen schützt<sup>66</sup>.

## 1.6 Die Akut-Phase-Antwort der Leber

### 1.6.1 Allgemeines

Die *Akut-Phase-Reaktion* (APR) ist eine systemische Antwort des Organismus auf Gewebeschäden, Infektionen oder Entzündungen. Sie geht unter anderem einher mit Fieber, Neutrophilie, Änderungen im Lipid-Metabolismus, gesteigerter Glukoneogenese, Aktivierung von Komplement und Gerinnungsfaktoren und der Induktion von *Akut Phase Proteinen* (APP)<sup>67</sup>.

Sinn der APR ist es, die Homöostase des Organismus wiederherzustellen: Die veränderte Zusammensetzung von Proteinen, Zytokinen und Hormonen im Kreislauf richtet sich gegen Mikroorganismen, fängt freie Radikale ein, neutralisiert proteolytische Enzyme und aktiviert das Komplementsystem<sup>68</sup>.

Gewebeschäden, Inflammation und Infektion führen dazu, dass Endotoxine, reaktive Sauerstoffspezies und Wachstumshormone im Organismus zirkulieren oder ein verändertes

Redoxverhältnis vorliegt. Diese Veränderungen bewirken eine Zytokinausschüttung. Moshage et al. unterscheiden dabei grob in „*Il1-like-Cytokines*“ und „*Il6-like-Cytokines*“. Diese induzieren in den Leberzellen verschiedene Wege der Signaltransduktion, die zur Aktivierung der Genexpression der APP führen. Typ 1 Akut Phase Proteine wie *Serum-amyloid A* (Saa), Crp und C3 sind dabei vorwiegend durch die Il1-artigen Zytokine induziert, wobei die Typ 2 Akut Phase Proteine wie Fibrinogen, Haptoglobin und  $\alpha$ 1-Antitrypsin aus dem Il6-Zytokin-Signaltransduktionsweg hervorgehen <sup>67</sup>. Die Zytokine *Interleukin 1* (Il1), *Interleukin 6* (Il6) und *Tumornekrosefaktor* (Tnf) führen über *Prostaglandin E<sub>2</sub>* (PgE<sub>2</sub>) zur Fieberantwort des Organismus. Il1 und Il6 aktivieren zusätzlich die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse. Die dadurch induzierte Cortisol Ausschüttung stellt einen Negativ-Feedback-Mechanismus dar, da Glucocorticoide die Zytokininduktion unterdrücken <sup>69</sup>.



Abbildung 6: Schematischer Ablauf der Akut Phase Reaktion. Die *Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse* (HPA-Achse) bewirkt die Ausschüttung von Glucocorticoiden in der Nebennierenrinde. Diese inhibieren die Zytokin-Ausschüttung im Sinne eines Negativ-Feedbacks. Die Abbildung ist modifiziert nach Cray et al <sup>70</sup> und unter Berücksichtigung von Moshage, Baumann und Gauldie sowie Gruys et al <sup>67,69,68</sup>

Werden die Zytokin-Rezeptoren der Hepatozyten regelmäßig getriggert, kann es zu einer chronischen APR kommen <sup>68</sup>. Bakterielle Infektionen bewirken eine stärkere Akut-Phase-Reaktion als virale Infektionen <sup>71,72</sup>.

Proteine, deren Konzentration im Serum während der APR ansteigen, werden als positive APP bezeichnet. Negative APP gehen mit sinkenden Konzentrationen einher <sup>73</sup>. In fast allen Spezies ist Albumin der Hauptrepräsentant der negativen APP <sup>70</sup>. Zu den Haupt-

Akut-Phase-Proteinen gehören Crp, Saa und *Serumamyloid P* (SaP). Darüber hinaus gehören Metall-bindende Proteine zu den APP, so beispielsweise Haptoglobin und Ceruloplasmin. Proteine des Komplement-Systems und der Gerinnung wie zum Beispiel Fibrinogen zählen ebenfalls zu den Proteinen der APR. Eine weitere Gruppe der APP stellen Proteinase-Inhibitoren wie  $\alpha_1$ -Antitrypsin und  $\alpha_1$ -Antichymotrypsin dar <sup>73</sup>. Insgesamt sind über 200 Proteine bekannt, die ihre Konzentration im Verlauf der APR ändern <sup>70</sup>.

Im Mensch ist das *C-reaktive Protein* (Crp) der populärste Vertreter der Akut-Phase-Proteine. In der Klinik hat das Protein einen sehr wichtigen Stellenwert als Entzündungsparameter. Es dient als Opsonin, d.h. strukturelle Eigenschaften eines Pathogens werden detektiert und gebunden. Daraufhin wird das Komplement System aktiviert und die Phagozytose des Pathogens eingeleitet <sup>70</sup>.

Die folgende Tabelle zeigt, dass das Vorkommen von APP auch abhängig von der Spezies ist. Da in dieser Arbeit mit murinen Lebern gearbeitet wurde, spielt das Crp im Gegensatz zur humanen Leber eine untergeordnete Rolle.

Spezies	>10-fach erhöhte APP	1 bis 10-fach erhöhte APP
Mensch	Crp Saa	$\alpha_1$ -Acid-Glykoprotein Fibrinogen Haptoglobin
Maus	Haptoglobin Saa SaP	Crp Fibrinogen

Tabelle 2: Quantitative Unterschiede im Anstieg verschiedener APP während der Akut-Phase-Reaktion in Maus und Mensch <sup>70</sup>

### 1.6.2 Zytokine in der Akut-Phase-Antwort

Wie bereits in Kapitel 1.6.1 erwähnt, spielt die Zytokinausschüttung eine maßgebliche Rolle bei der Induktion der APR.

Werden die leberspezifischen Makrophagen, die *Kupffer-Zellen*, aktiviert, so reagieren sie mit der Ausschüttung von Zytokinen. Grund für die Aktivierung von *Kupffer-Zellen* können Viren, Bakterien, Parasiten sowie geschädigte und nekrotische Zellen sein <sup>74</sup>. Die ausgeschütteten Zytokine initiieren die Akut-Phase-Antwort sowie inflammatorische Prozesse: Akut-Phase-Proteine und Komplementfaktoren steigen an und aktivieren weitere Kaskaden. Abbildung 7 skizziert grob den Zusammenhang zwischen Akut-Phase-Antwort und proinflammatorischen Zytokinen. Zytokine sind nicht nur an der Auslösung

der APR beteiligt, sie werden auch durch die APP selbst, wie beispielsweise durch Saa1 und Lcn2, induziert <sup>75-77</sup>.

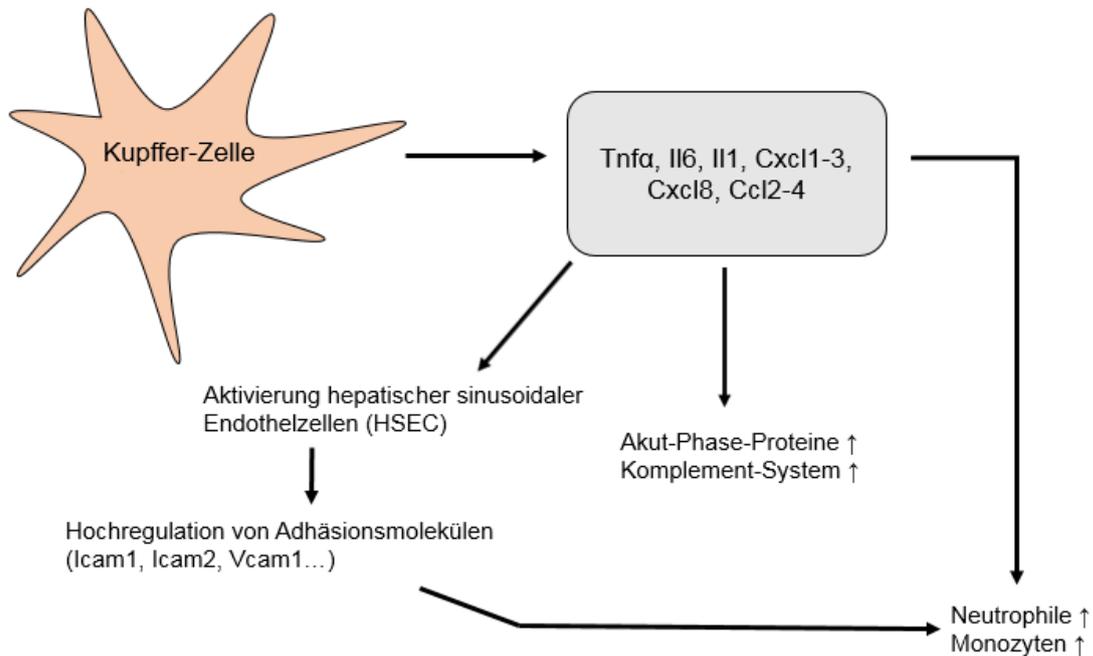


Abbildung 7: Schematische Darstellung zum Anstieg der Akut-Phase-Proteine (APP) im Zusammenhang mit proinflammatorischen Zytokinen. Eine aktivierte *Kupfer-Zelle* setzt proinflammatorische Zytokine frei, die den Anstieg der APP und der Komplementfaktoren bewirken und Immunzellen anlocken. Außerdem werden die Endothelzellen der Lebersinusoide stimuliert, Adhäsionsmoleküle auf ihrer Zelloberfläche zu präsentieren. Diese ermöglichen den Eintritt von Leukozyten ins Gewebe (Leukodiapedese). Diese Abbildung ist modifiziert nach Liaskou et al <sup>74</sup>.

Die in dieser Arbeit untersuchten proinflammatorischen Zytokine sollen an dieser Stelle kurz vorgestellt werden:

*Intercellular adhesion molecule 1 (Icam1)*: Nach Stimulation durch proinflammatorische Zytokine wie Il1, Il6, Tnf $\alpha$ , Inf $\gamma$  oder LPS wird Icam1 vermehrt produziert. Es wird in vaskulären Endothelzellen exprimiert und vermittelt die Leukodiapedese <sup>78</sup>.

*C-c-motif ligand 3 (Ccl3) und C-c motif ligand 4 (Ccl4)*: Aktivierte B-Zellen, Monozyten, Mastzellen, Epithelzellen und Fibroblasten können diese Zytokine produzieren. Wie andere Zytokine induzieren sie die Infiltration verschiedener Immunzellen wie Neutrophile, Makrophagen, NK-Zellen und T-Zellen ins Gewebe <sup>79</sup>. Da Ccl3-defiziente Mäuse eine weniger starke Hepatitis entwickeln, wird Ccl3 eine inflammatorische Rolle bei T-Zell-induzierten Lebererkrankungen zugesprochen <sup>80</sup>.

*Interferon- $\gamma$ -inducible protein 10 (Ip10)*: In Antwort auf Inflammation induziert *Interferon  $\gamma$*  (Inf $\gamma$ ) die Ausschüttung von Ip10 aus Neutrophilen, Eosinophilen, Monozyten, Epithel-, Endothel- und Stromazellen. Ip10 bindet den *C-x-c motif Chemokinrezeptor 3* (Cxcr3) und bewirkt Chemotaxis, Apoptose, Zellwachstum und Angiostase. Hohe Ip10-Level wurden bei Infektionen mit Viren, Bakterien, Pilzen und Parasiten nachgewiesen<sup>81</sup>.

*Monocyte chemoattractant protein 1 (Mcp1, auch C-c motif ligand 2 (Ccl2))*: Dieses Zytokin ist hauptsächlich an der Migration und Infiltration von Monozyten und Makrophagen ins Gewebe beteiligt. Es wird von vielen verschiedenen Zelltypen produziert, vor allem aber von Monozyten und Makrophagen selbst<sup>82</sup>.

*C-x-c motif ligand 1 (Cxcl1)*: Cxcl1 rekrutiert Neutrophile zum Ort der Entzündung und aktiviert außerdem reaktive Sauerstoffspezies und Proteasen, um Pathogene zu beseitigen. Cxcl1 wirkt am *C-x-c motif Chemokinrezeptor 2* (Cxcr2) neutrophiler Granulozyten und an Glykosaminoglykanen der extrazellulären Matrix von Endothel- bzw. Epithelzellen<sup>83</sup>.

### 1.6.3 Das Akut-Phase-Protein Lipocalin 2 (Lcn2)

Lipocalin 2 ist ein 25 kDA großes Protein, dessen Vorkommen in spezifischen Granula aktivierter humaner Neutrophiler entdeckt wurde. Lcn2 wurde daher zunächst als „*Neutrophil gelatinase associated lipocalin*“ (Ngal) bezeichnet<sup>84,85</sup>. Proteine der Lipocalin-Familie binden kleine, hydrophobe Moleküle und Rezeptoren an Zelloberflächen<sup>86</sup>. In Mäusen ist Lcn2 unter dem Namen 24p3 oder Uterocalin schon länger bekannt<sup>87</sup>. 1995 wurde 24p3 als Akut-Phase-Protein beschrieben<sup>88</sup>. Lcn2 wirkt bakteriostatisch, indem die bakterielle Eisenaufnahme unterbunden wird<sup>89,90</sup>. Darüber hinaus wird Lcn2 immer wieder im Zusammenhang mit inflammatorischen Prozessen erwähnt: Bei akuten und chronischen Leberschäden steigen die Lcn2-Level an<sup>91</sup>. Klinisch wird Lcn2 als Biomarker für akutes Nierenversagen (ANV, engl. AKI) genutzt<sup>92</sup>. Neben Leberzellschäden, Inflammation und Endotoxinen können auch reaktive Sauerstoffspezies ursächlich für eine Induktion von Lcn2 sein<sup>93,94</sup>. Jüngere Publikationen mutmaßen, dass Lipocalin 2 protektive Effekte in der Leber haben könnte, indem es beispielsweise bei Leberzellschäden bei der Chemotaxis neutrophiler Granulozyten eine Rolle spielt<sup>95,96</sup>.

#### 1.6.4 Der Jak/Stat Signalweg

Der Jak/Stat Signalweg wurde als intrazelluläre Antwort auf die Induktion von *Interferon- $\alpha$*  (Inf $\alpha$ ) und *Interferon- $\gamma$*  (Inf $\gamma$ ) entdeckt. Die dadurch hervorgerufene Signaltransduktion führt zur Transkription bestimmter Gene <sup>97</sup>. Der Signalweg soll an dieser Stelle nur kurz in Zusammenhang mit der APR und ER Stress erwähnt werden.

Extrazelluläre Signale wie beispielsweise Inf $\alpha$  und Inf $\gamma$  aktivieren einen Rezeptor in der Zellmembran. Dieser aktiviert *Janus-Kinasen* (Jak), die ihrerseits Proteine aus der *Signal transducer and activator of transcription*-Familie (Stat) phosphorylieren. Die Stats bilden Homodimere oder Heterodimere mit anderen Stats, gelangen in den Zellkern und wirken dort als Transkriptionsfaktor. In Antwort auf Inf $\alpha$  wird im Kern das *Interferon stimulated response element* (ISRE) aktiviert. Aus diesem Genabschnitt geht auch das in dieser Arbeit untersuchte Protein Isg15 hervor. Inzwischen sind viele weitere Liganden bekannt, die den Jak/Stat Signalweg aktivieren, beispielsweise Proteine aus der *Growth hormone*-Familie, Interleukine und Faktoren wie *Epidermal growth factor* (Egf) oder *Platelet derived growth factor* (Pdgf) <sup>98</sup>.

Stat3 ist ursprünglich unter dem Namen *Acute phase response factor* (APRF) bekannt gewesen, da das Protein nach Il6-Aktivierung die Expression von Genen fördert, die an der APR beteiligt sind (vgl. Abbildung 8) <sup>99</sup>. Später wurde das Protein der Stat-Familie untergeordnet <sup>100</sup>. Neben Il6 wird Stat3 auch durch andere Cytokine und Hormone induziert, wie beispielsweise durch Inf $\alpha$ , Inf $\gamma$ , Egf und *Colony stimulating factor 1* (Csf1) <sup>101</sup>. Auch Stat5b wurde im Zusammenhang mit der APR und dem Binden an *Il6 response elements* beschrieben <sup>102</sup>. Zu diesen *Il6 response elements* gehört auch das bereits beschriebene Akut-Phase-Protein Lipocalin 2 <sup>103</sup>.

Stat3 sowie Stat5 wurden bereits in Verbindung mit ER-Stress in der Literatur erwähnt <sup>104,105</sup>: Bei beiden Proteinen führt ER-Stress zu einer Verstärkung des Signalweges.

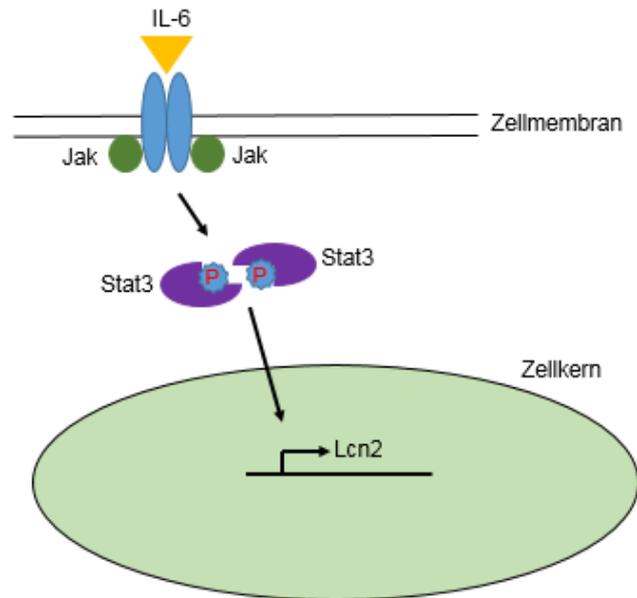


Abbildung 8: Grob vereinfachter Zusammenhang zwischen phosphoryliertem Stat3 und der Genexpression von APP. Als Auslöser des Jak/Stat Signalweges wurde u.a. Il6 beschrieben<sup>103</sup>. Nach Dimerisierung zweier Stat3-Proteine wird im Kern die Transkription von Akut-Phase-Proteinen induziert. Lcn2 ist hier repräsentativ für ein APP dargestellt.

### 1.6.5 Die Interferon-Antwort

1957 beschrieben Isaacs und Lindemann einen Faktor, der nach Inkubation von hitzeinaktivierten Influenzaviren in Eihäuten frei wurde und andere Zellen vor Infektion schützen konnte. Sie nannten den Faktor „*Interferon*“<sup>106</sup>. Interferone sind inzwischen für ihre hauptsächlich antiviralen Eigenschaften und immunmodulierenden Fähigkeiten bekannt<sup>107</sup>.

Interferone werden in zwei Typen unterteilt, abhängig davon, an welchen Membranrezeptor sie binden. Interferone vom Typ 1 binden an die Untereinheiten des *Interferon- $\alpha$  receptors* (Ifnar). Typ 2 Interferone (Inf $\gamma$ ) binden an die Untereinheiten des *Interferon- $\gamma$  receptors* (Ifngr)<sup>108</sup>. Beide Interferon-Typen führen über die Rezeptoraktivierung zur Induktion des Jak/Stat-Signalweges. Der Signalweg leitet dann die Expression von Genen ein, die für die Immunantwort von Bedeutung sind<sup>108</sup>.

Typ 1 Interferone werden von infizierten Zellen ausgeschüttet. Sie versetzen die infizierten Zellen selbst und benachbarte Zellen in einen antiviralen Status. Das angeborene Immunsystem wird gefördert, indem die Antigenpräsentation beeinflusst wird, NK-Zellen aktiviert und Zytokine ausgeschüttet werden. Darüber hinaus aktivieren Typ 1 Interferone das adaptive Immunsystem. Neben der antiviralen Funktion haben Typ 1 Interferone auch

eine protektive Bedeutung bei bakteriellen Infekten und Autoimmunkrankheiten <sup>109</sup>. *Infα* und *Interferon-β* (*Infβ*) sind die häufigsten und am besten untersuchten Typ 1 Interferone <sup>110</sup>. Am Ende des Typ 1 Interferon-Signalwegs steht die Aktivierung des ISRE <sup>111</sup>.

Typ 2 Interferone (*Infγ*) haben ihre Funktion hauptsächlich an Makrophagen und fördern antimikrobielle Eigenschaften. Während Typ 1 Interferone von den meisten Zelltypen synthetisiert werden können, wird *Infγ* nur von bestimmten Immunzellen wie zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen produziert <sup>108,107</sup>. Ein bekannter Genabschnitt, der durch *Infγ* aktiviert wird, wurde als *Gamma activating site* (GAS) <sup>112</sup>.

Aus den Signalwegen der Interferone gehen die *Interferon stimulated genes* (Isg) hervor <sup>107</sup>. Zu den Isg gehören auch die in dieser Arbeit untersuchten Proteine *Interferon stimulated gene 15* (Isg15) und *Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1* (Ifit1, auch *Interferon stimulated gene 56* (Isg56)).

## 1.7 Studienrelevante Vorarbeiten

### 1.7.1 Auflösung von Aggregaten des HBV-Oberflächenproteins in der Zellkultur

In bisher unveröffentlichten Vorversuchen des Schwerpunkts Gastroenterologie konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von Zellen mit 4-PBA intrazelluläre Akkumulationen von HBsAg auflöst. Stabil transfizierte Huh7 und NIH 3T3 Zellen exprimieren und akkumulieren das Oberflächenprotein HBsAg nach Expressions-Induktion durch Doxycyclin. Wurde den Zellen 4-PBA hinzugefügt, konnte in Huh7 Zellen eine verminderte Anfärbbarkeit der HBsAg-Aggregate beobachtet werden. Dieser Effekt wurde auf die Wirkung des Chaperons im Sinne einer Auflösung der Aggregate interpretiert.

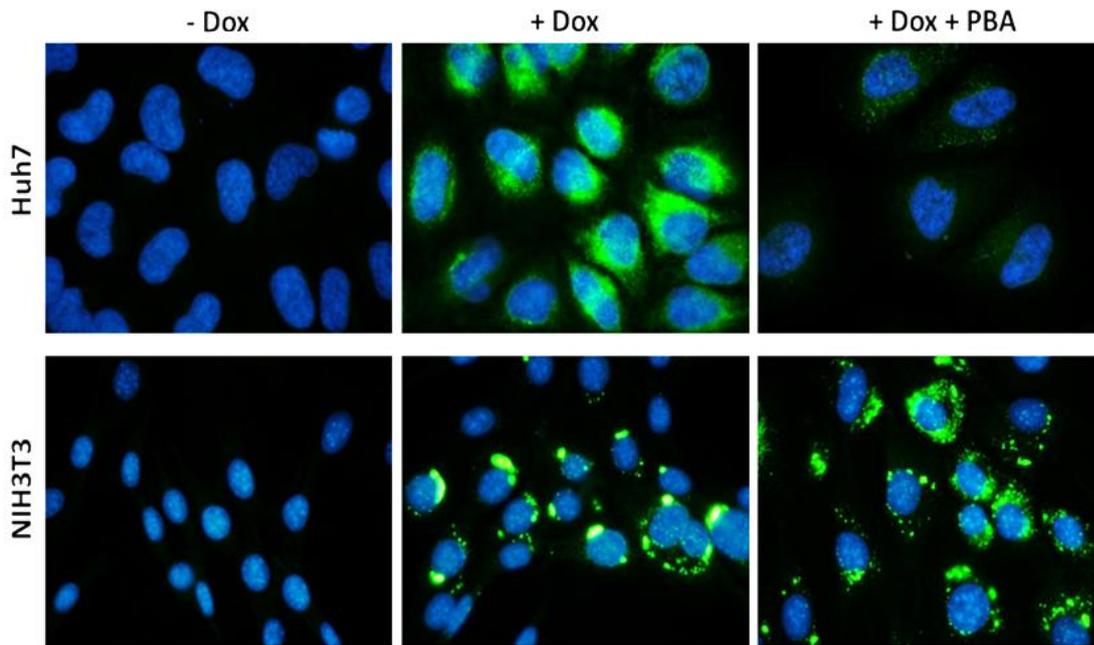


Abbildung 9: Diese Vorversuche zeigen den Einfluss des Chaperons 4-PBA auf stabil transfizierte Huh 7 und NIH3T3 Zellen, die durch Induktion mit Doxycyclin das HBV Oberflächenprotein HBsAg exprimieren. Die Zellkerne sind in dieser Färbung blau dargestellt. Das HBsAg ist grün angefärbt und akkumuliert nach Doxycyclin Gabe. Durch Zugabe von 4-PBA ist eine verminderte Anfärbbarkeit des Oberflächenproteins in Huh7 Zellen zu beobachten, die als Auflösung der Aggregate interpretiert wurde. Modifiziert nach Tierversuchsantrag 48/2012.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Verwendete Mauslinien

In dieser Arbeit wurden Lebergewebe sowie Seren eines HBs-transgenen Maus-Modells untersucht. Die Mäuse wurden im zentralen Tierstall der Justus-Liebig-Universität Gießen gehalten. Unsere Arbeitsgruppe hat die HBs-transgenen „Chisari-Mäuse“ C57BL/6J-Tg (Alb1HBV)44Bri/J auf eine Fibrose-suszeptible Mauslinie vom genetischen BALB/cJ Hintergrund zurückgekreuzt <sup>8,17</sup>.

Die Mäuse wurden im Alter von 5, 12, 19, 26 und 33 Wochen getötet. Im Alter von 4, 11 und 25 Wochen wurden sie mit dem Wirkstoff 4-Phenylbutyrat (4-PBA) behandelt, entweder für den Zeitraum von 1 Woche oder für den Zeitraum von 8 Wochen. Verwendet wurde 4-PBA in seiner Form als Natriumsalz (Na-PBA). Pro Tag wurden 200 mg Na-PBA pro Kilogramm Körpergewicht über das Trinkwasser appliziert. Dabei wurde im Voraus ein Trinkwasserverbrauch von 5,5 mL/Maus/d einkalkuliert, basierend auf zuvor durchgeführten Maus-Studien <sup>113</sup>. Die Konzentration des Na-PBA im Trinkwasser betrug 0,93 g/L (186 g/mol). Studien konnte bereits demonstrieren, dass die Gabe von bis zu 1000 mg PBA/kg/d nicht zu verändertem Trinkverhalten der Mäuse führt <sup>114</sup>.

Nach Abschluss der Behandlung mit 4-PBA wurden die Mäuse getötet. Leber und Seren der Mäuse wurden bei -80 °C gelagert.

Zu jeder Behandlungsgruppe wurden unbehandelte HBs-transgene Kontrollen gleichen Alters und gleicher Mauslinie hinzugezogen. Weitere Informationen bezüglich des Behandlungsschemas sind der Abbildung 10 zu entnehmen. Neben den behandelten Gruppen und den unbehandelten Kontrollen, die transgen für das Hüllprotein sind, wurden Wildtypen im Alter von 5, 12, 19, 26 und 33 Wochen getötet (nicht in der Abbildung eingezeichnet). Für diese Arbeit wurden hauptsächlich die Proben 12 Wochen alter Mäuse analysiert.

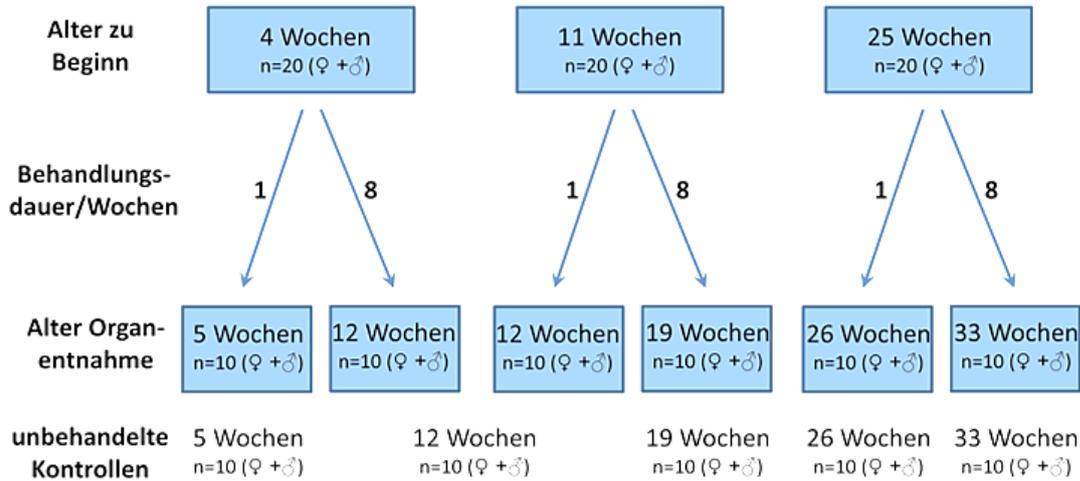


Abbildung 10: Behandlungsschema der HBs-transgenen Mäuse (C57BL/6J-Tg (Alb1HBV)44Bri/J), die auf BALB/cJ zurückgekreuzt wurden, zur Planung der 4-PBA-Versuche. Modifiziert nach Tierversuchsantrag 48/2012.

## 2.2 Leberzelllinien

### 2.2.1 Die murine Hepatozytenzelllinie AML12

In dieser Arbeit wurde mit der murinen Hepatozytenzelllinie AML12 (1) gearbeitet. Diese Zellen entwickeln typische Hepatozyten-Charakteristika wie Peroxisomen und Strukturen, die den Gallenkanälchen ähneln. Außerdem produzieren sie mRNA für Serumbestandteile wie Albumin, Transferrin und  $\alpha$ 1-Antitrypsin<sup>115</sup>. Die AML12-Zelllinie ist zudem transgen für den humanen *Transforming growth factor  $\beta$*  (Tgfb).

Die Zelllinie AML12 wurde so modifiziert, dass sie nach Induktion durch Doxycyclin LHBs stabil exprimieren konnte<sup>116</sup>. Somit wurde eine murine hepatozytäre Zelllinie geschaffen, die in ihren Eigenschaften einer Leberzelle unter chronischer HBV-Infektion nahe kommt. Sie wird im Folgenden als AML12-LHBs bezeichnet.

### 2.2.2 Kultivierung und Induktion der Zellen

Die Zelllinie AML12-LHBs wurde im Stickstofftank eingefroren und für die Versuche neu aufgetaut und kultiviert. Als geeignetes Nährmedium für die AML12 Zellen diente die vom Hersteller empfohlene 1:1 Mischung aus DMEM und F12 Medium (2), zusammen mit 10% fötalem Kälberserum (FBS) (3). Außerdem wurde dem Nährmedium 1% Penicillin/Streptomycin (4) hinzugefügt, um das Wachstum von Bakterien zu hemmen.

Das Nährmedium musste in einer Laminar Air Flow Sicherheitswerkbank (5) zusammengestellt werden, da im Umgang mit Zellen sterile Arbeitsbedingungen erforderlich sind. Das FBS enthält die notwendigen Wachstumsfaktoren für die Kultivierung von Zellen. 2 mL der im Stickstoffbehälter eingefrorenen Zellklone wurden für den Versuch aufgetaut und in einer Kultivierflasche (6) mit 12 mL des angefertigten Nährmediums versetzt. Anschließend wurden die Zellen im CO<sub>2</sub>-Inkubator (7) bei 37 °C gelagert. Das Wachstum der Zellpopulation wurde täglich beobachtet. Bei ausreichender Größe der Zellkultur mussten die Zellen auf zwei bis drei neue Kultivierflaschen verteilt werden. Um sie vom Boden der Kultivierflasche zu lösen, wurden die Zellen nach Entfernung des Nährmediums kurz in Trypsin (8) inkubiert. Die nun aufgetrennte Zellpopulation wurde dann in neue Kultivierflaschen überführt, mit Nährmedium versetzt und erneut im Brutschrank gelagert. Um die Funktion der LHBs Expression nach Gabe eines Tetracyclins zu überprüfen, wurden zwei Deckgläser (9) in einem 12-well mit 1 mL Zellen überschichtet. In eine der beiden Wells wurde zusätzlich Doxycyclin (10) gegeben, um die Expression des großen Hüllproteins zu aktivieren. Nach 48 Stunden konnten die Deckgläser immunhistochemisch mit Fluoreszenzfarbstoffen gefärbt werden. Dazu wurde das Medium in den Wells abgesogen und die Deckgläser mit den Zellen 15 Minuten lang in -20 °C kaltem Methanol (11) fixiert, bevor sie mit 1×PBS (12) gewaschen wurden. Anschließend wurde 1 Stunde lang mit 1% BSA (13) in PBS geblockt. Der gegen LHBs gerichtete Primär-Antikörper (14) wurde im Verhältnis 1/1000 in 1% BSA in PBS verdünnt und auf die Deckgläser pipettiert. Nach einer Stunde Inkubationszeit wurde mit 1×PBS gewaschen und schließlich der Sekundär-Antikörper (15) aufgetragen. Nach weiteren Waschschritten mit PBS erfolgte eine 5-minütige Inkubation mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) (16). Dieses fluoreszierende Reagenz färbt die DNA und markiert daher die Zellkerne<sup>117</sup>. Die Deckplättchen mit den Zellen wurden erneut mit PBS gewaschen, auf einen Objektträger überführt und mit Mounting Medium (17) eingedeckt. Danach konnten die Zellen unter dem Mikroskop begutachtet werden.

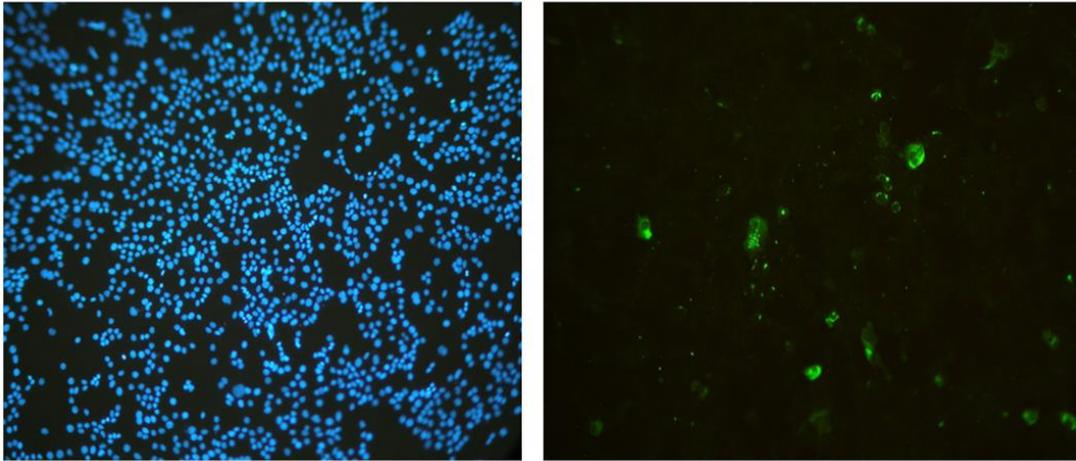


Abbildung 11: Beispiel einer Immunfluoreszenz-Färbung an AML12-LHBs Zellen. Das linke Bild zeigt die Zellkerne (DAPI-Kernfärbung). Im rechten Bild sind derselbe Bildausschnitt sowie dieselbe Vergrößerung gewählt. Grün gefärbt sind die mit LHBs-Antikörper markierten Bereiche (Immunfluoreszenzfärbung mit Alexa 488). Verglichen mit der Anzahl gefärbter Zellkerne exprimieren in diesem Beispiel nur wenige Zellen das große HBV-Hüllprotein.

Um ein Zellexperiment durchzuführen, mussten die Zellen in Medium verdünnt auf vier Wells einer 6-Well-Platte (18) aufgeteilt werden. Dem Schema in Abbildung 12 entsprechend wurden die Zellen mit Doxycyclin, 4-PBA oder Methanol versehen. Sie wurden mit 2 mM 4-PBA behandelt. Die Behandlung mit Methanol sollte dabei die unbehandelte Kontrolle darstellen. Zwei Wells wurden nicht mit Doxycyclin versehen, um mögliche Effekte des Antibiotikums zu detektieren. Außerdem wurde ein Kontrollklon behandelt, der kein LHBs nach Induktion durch Doxycyclin exprimiert (nicht in der Abbildung eingezeichnet).

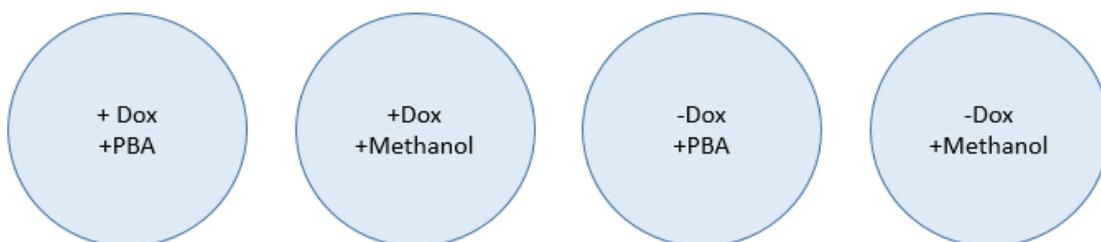


Abbildung 12: Pipettierschema der Versuche in der Zellkultur (Dox: Abkürzung für Doxycyclin)

72 Stunden nach der Induktion konnte die mRNA der Zellen isoliert werden. Die Arbeitsschritte sind dem Kapitel 2.5.1 zu entnehmen und richten sich nach der *Standard operating procedure* (SOP) des Labors der AG Roeb. Um Protein-Lysate für Western Blot-

Analysen herzustellen, wurde das Medium in den Wells abgesogen und die Zellen mit 1×Lämmli Puffer versetzt (s. 2.3.1). Danach wurde das Lysat in einen Eppendorf-Cup überführt und 15 Minuten bei 99 °C im Thermomixer erhitzt (für Geräte und Materialien vgl. 2.3.1).

Verwendete Geräte und Materialien:

- (1) AML12, CRL-2254™, Fa. ATCC®, Manassas
- (2) DMEM:F12 Medium, 30-2006™, Fa. ATCC®, Manassas
- (3) Fetales Kälberserum Tetracyclin-frei, #P30-3602, Fa. PAN Biotech, Aidenbach
- (4) Streptomycin/ Penicillin, # P06-07100, Fa. PAN Biotech, Aidenbach
- (5) Laminar Air Flow Sicherheitswerkbank HBB 2448, Fa. Heraeus Instruments, Hanau
- (6) Cell culture flask, # 658170, Fa. Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
- (7) CO<sub>2</sub>-Inkubator HERAcell 150i, Fa. Thermo Scientific, Dreieich
- (8) Trypsin/EDTA, #PB-10-023100, Fa. PAN Biotech, Aidenbach
- (9) Deckgläser, # 01-0012/1, Fa. R. Langenbrick, Emmendingen
- (10) Doxycyclin, # 631311, Fa. Clontech
- (11) Methanol, >99,8%, #STBF2109V, Fa. Sigma Aldrich, Steinheim
- (12) zur PBS Herstellung s. 2.4.2
- (13) BSA, # K41-001-500, Fa. PAA, Pasching, Österreich
- (14) mouse anti LHB, MA 18/07, Virologie Justus-Liebig-Universität-Gießen
- (15) Alexa Fluor ® 488, Fa. Invitrogen, Karlsruhe
- (16) DAPI, #D9564-10MG, Fa. Sigma Aldrich, Steinheim
- (17) Fluorescence Mounting Medium, #S3023, Fa. Dako, Hamburg
- (18) TC-Platte 6-well, Standard F, # 83.3920, Fa. Sarstedt, Nümbrecht

## 2.3 Protein-Biochemische Methoden

### 2.3.1 Herstellung von Lysaten für Western Blot Analysen

Zur Herstellung der Lysate aus Lebergewebe wurden ca. 30 mg feingemörserte Mausleber eingewogen (1). Die gemörserte Leber wurde in einen zuvor mit Flüssigstickstoff abgekühlten 1,5 mL Eppendorf-Cup gefüllt und sofort auf Trockeneis gelagert. Anschließend wurde das gemörserte Gewebe mit 1×Lämmli-Puffer versetzt. Dazu wurde der genaue Wert der Einwaage mit dem Faktor 20 multipliziert und der entsprechende Wert in Mikroliter wurde dem gemörserten Lebergewebe hinzugegeben. Die Proben wurden gevortext (2), bis sich das Gewebe vollständig im Lämmli-Puffer aufgelöst hatte. Anschließend wurden die Proben kurz auf Trockeneis abgekühlt und dann bei 99 °C für 15 Minuten im Thermomixer (3) erhitzt.

Danach wurde die Suspension bei 14 000 rpm 5 Minuten lang zentrifugiert (4). Der Überstand wurde in neue Eppendorf-Cups überführt, die bei -20 °C gelagert wurden oder sofort für einen Western Blot eingesetzt werden konnten.

Zur Herstellung von Lysaten aus den Seren der Mäuse wurde ähnlich verfahren: 20 µL Serum wurden mit 20 µL 2×Lämmli-Puffer vermischt und dann ebenfalls im Thermomixer erhitzt.

**Lämmli-Puffer (4×):**

- 40% Glycin
- 20% Mercaptoethanol
- 8% SDS
- 0,25 M Tris HCl pH 6,8
- 0,02% Bromphenolblau

**Lämmli-Puffer (2×):**

- 3 mL Lämmli-Puffer (4×)
- 3 mL Aqua dest.

**Lämmli-Puffer (1×):**

- 2 mL Lämmli-Puffer (4x)
- 6 mL Aqua dest.

Tabelle 3: Zusammensetzung und Verdünnung des Lämmli-Puffers

Verwendete Geräte und Materialien:

- (1) Feinwaage A200S, Fa. Satorius, Göttingen
- (2) Vortexer, VF2, Fa. IKA® Labortechnik, Staufen
- (3) Thermomixer comfort, Fa. Eppendorf, Hamburg
- (4) Mikro 120, Fa. Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

### 2.3.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die *Polyacrylamid-Gelelektrophorese* (PAGE) ist eine Methode, Proteine abhängig von ihrer Konformation, elektrischen Ladung und Molekulargröße voneinander zu trennen<sup>118</sup>. Dies gelingt durch Anlegen eines elektrischen Feldes. Bei der diskontinuierlichen Gelelektrophorese werden zwei Gele unterschiedlichen pH-Wertes gegossen, die die Proteine während der Gelelektrophorese durchwandern. Oben auf liegt das Sammelgel, in dem

die Proteine zunächst nach dem Prinzip der Isotachophorese konzentriert werden: Zwischen einem schnell (Chlorid) und einem langsam wandernden Ion (Glycin) werden die Proteine der zu untersuchenden Probe wie ein Sandwich in der Reihenfolge ihrer relativen Beweglichkeit gestapelt <sup>119</sup>.

Nach Durchlaufen der Sammelgel-Schicht gelangt die Probe in die Trenngel-Schicht. Die sich ändernden Bedingungen im Gel (pH-Wert sowie Porengröße) führen dazu, dass das zunächst langsamer wandernde Glycin nun schneller wandert, da es als relativ kleines Molekül leichter das feinporige Gel durchdringen kann als die meisten anderen Moleküle der Probe und daher die Proteine der Probe überholt. Dabei werden die Proteine der Probe ihrer Größe entsprechend im Gel aufgetrennt <sup>119</sup>.

Die Trenngel-Schicht ist variierbar: Hochprozentige Gele mit einem höheren Polyacrylamid Anteil eignen sich für kleinere Proteine. Die Poren des Gels sind kleiner. Niedrigprozentige Gele haben große Poren und eignen sich für große Proteine <sup>120</sup>.

Zunächst wurde das Trenngel zwischen zwei Glasplatten gegossen und mit Ethanol überschichtet. Nachdem das Gel polymerisiert war, wurde das Ethanol dekantiert und Reste vorsichtig mit Filterpapier aufgesogen. Das Sammelgel wurde hergestellt und dann über das Trenngel gegossen. In das Sammelgel wurde ein Kamm gesteckt, der die Taschen für die Lysate in das Gel geformt hat.

Nach 30 Minuten wurde der Kamm entfernt und die Glasplatten mit dem Gel wurden in eine mit Laufpuffer gefüllte Gelelektrophoresekammer (1) gestellt. Neben der Möglichkeit mit einem Tris-Glycin Laufpuffer zu arbeiten, bietet sich für kleinere Proteine von 5 bis 20 kDA Größe die Methode des Tris-Tricin Puffersystems an <sup>121</sup>. Größere Proteine verbleiben im Sammelgel, während die kleineren Proteine beide Gelschichten sauber passieren und so durch die größeren nicht so stark beeinflusst werden können.

Im Unterschied zum Tris-Glycin Laufpuffer wurden bei dieser Methode zwei verschiedene Puffer für die Anode und Kathode der Gelelektrophoresekammer genutzt. Der Kathode-Puffer wurde in den oberen Teil der Kammer gefüllt, der Anode-Puffer hingegen in den unteren Teil. Für das Tris-Tricin Puffersystem wurden Trenn- und Sammelgel nach einer anderen Rezeptur zusammengestellt (s. Tabelle 5).

In die erste Tasche des Gels wurden etwa 7  $\mu\text{L}$  eines Page Rulers (2) pipettiert. Dieser teilt sich während der Elektrophorese in farbige Banden, die der Größenmarkierung dienen. In die weiteren Taschen wurden die zuvor hergestellten Lämmli-Lysate aus Zellen oder Lebergewebe pipettiert (ca. 15  $\mu\text{L}$ ). Die Gelelektrophoresekammer wurde dann auf eine Spannung von 130 Volt für 1 Stunde eingestellt.

**Tris-Glycin Puffersystem:****4×Trenngel-Puffer (500 mL):**

115 mL Aqua dest.

375 mL 2 M Tris pH 8,8 (=1,5 M) (3)

10 mL 20% SDS (=0,4%) (4)

**Trenngel (10%):**

6,66 mL Rotiphorese® Gel 30 37,5:1 (5)

5 mL Trenngel-Puffer

200 µL APS 10% (6)

20 µL TEMED (7)

Auf 20 mL mit Aqua dest. auffüllen

**Trenngel (12%):**

8 mL Rotiphorese® Gel 30 37,5:1

5 mL Trenngel-Puffer

200 µL APS 10%

20 µL TEMED

Auf 20 mL mit Aqua dest. auffüllen

**Trenngel (15%):**

10 mL Rotiphorese® Gel 30 37,5:1

5 mL Trenngel-Puffer

200 µL APS 10%

20 µL TEMED

Auf 20 mL mit Aqua dest. auffüllen

**4×Sammelgel-Puffer (500 mL):**

365 mL Aqua dest.

125 mL 2 M Tris pH 6,8 (=0,5M)

10 mL 20% SDS (=0,4%)

**Sammelgel (6,6 mL):**

0,66 mL Rotiphorese® Gel 30 37,5:1

1,66 mL Sammelgel-Puffer

3,6 mL Aqua dest.

80 µL APS 10%

8 µL TEMED

**Tris-Glycin Laufpuffer (10×):**

10 g SDS

30 g Tris

144 g Glycin

Auf 1000 mL Aqua dest. auffüllen

Tabelle 4: Zusammensetzung der Gele und Puffer im Tris-Glycin-Puffersystem (Menge für zwei Gele)

**Tris-Tricin Puffersystem:****Trenngel (15%):**

3,75 mL Rotiphorese® Gel 40 29:1 (8)  
5 mL 2 M Tris pH 8,5  
100 µL APS 10%  
10 µL TEMED  
Auf 20 mL mit Aqua dest. auffüllen

**Sammelgel (6,6 mL):**

0,66 mL Rotiphorese® Gel 40 29:1  
2,475 mL 2M Tris pH 8,5  
3,425 mL Aqua dest.  
80 µL APS 10%  
8 µL TEMED

**Kathode Puffer (10×):**

242 g Tris Base  
358 g Tricin (9)  
Auf 2 L mit Aqua dest. auffüllen  
20 g SDS

**Kathode Puffer (1×):**

100 mL Kathode Puffer (10×)  
Auf 1 L mit Aqua dest. auffüllen

**Anode Puffer (10×):**

484 g Tris base  
Mit etwas Aqua dest. auffüllen (weniger als 2 L)  
pH auf 8,9 einstellen mit konzentrierter Salzsäure  
auf 2 L mit Aqua dest. auffüllen

**Anode Puffer (1×):**

100 mL Anode Puffer (10×)  
auf 1 L mit Aqua dest. auffüllen

Tabelle 5: Zusammensetzung der Gele und Puffer im Tris-Tricin-Puffersystem. Der Puffer ist geeignet für die Darstellung kleiner Proteine im Bereich von 5-20 kDA. Die Menge des Trenn- und Sammelgels wurde für zwei Gele kalkuliert.

**Verwendete Geräte und Materialien:**

- (1) Multigel, Fa. Biometra, Göttingen
- (2) Page Ruler™ Plus, Prestained Protein, Fa. Thermo Scientific, Dreieich
- (3) Tris, #4855.2, Fa. Roth, Karlsruhe
- (4) Dodecylsulfate-Na-Salt, >99,9%, Fa. Serva, Heidelberg
- (5) Rotiphorese® Gel 30 37, 5:1, #A3029.1, Fa. Roth, Karlsruhe

- (6) Ammoniumperoxodisulfate (APS), #9592.2, Fa. Roth, Karlsruhe
- (7) N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamine (TEMED), #35925.01, Fa. Serva, Heidelberg
- (8) Rotiphorese® Gel 40 29:1, # A515.1, Fa. Roth, Karlsruhe
- (9) Tricin, Pufferan®, #6977.4, Fa. Roth, Karlsruhe

### 2.3.3 Proteintransfer auf eine PVDF-Membran

Das *Blotten* beschreibt den Vorgang, bei dem die Proteine im Gel auf eine *Polyvinylidenfluorid*-Membran (PVDF-Membran (1)) übertragen werden. Dazu wurde die Membran zunächst in 100% Methanol (2) aktiviert, kurz mit destilliertem Wasser abgespült und schließlich in Anode 2 Lösung getränkt. Des Weiteren wurden pro Gel sechs Filterpapiere (3) benötigt: Zwei Filterpapiere wurden in Anode 1 Lösung gelegt, ein Filterpapier in Anode 2 Lösung und drei weitere in die Kathode Lösung. In einer Blot-Kammer (4) wurden zunächst die zwei mit Anode 1 Lösung getränkten Filterpapiere gestapelt und mit dem Papier aus der Anode 2 Lösung bedeckt. Die PVDF-Membran wurde dann möglichst luftblasenfrei auf diesen Stapel gelegt. Das Gel wurde vorsichtig von den Glasplatten entfernt und auf die Membran überführt und mit den restlichen drei Filterpapieren überdeckt. Wurden zwei Membranen einer Größe von 6×12 cm gleichzeitig geblottet, wurde die Blot-Kammer auf eine Stromstärke von 144 mA eingestellt. Eine Stunde reichte aus, um die Proteine auf dem Gel vollständig auf die Membran zu übertragen.

#### **Anode 1 Lösung (500 mL)**

75 mL 2 M Tris base (=0,3M)

100 mL Methanol (=20%)

pH 10,4

#### **Anode 2 Lösung (500 mL)**

6,25 mL 2M Tris base (=25mM)

100 mL Methanol (=20%)

pH 10,4

#### **Kathode Lösung (500 mL)**

2,6 Aminocaproic acid (=40mM) (5)

100 mL Methanol (=20%)

250 µL 20% SDS

pH 7,6

Tabelle 6: Zusammensetzung der Lösungen, in denen die Filterpapiere getränkt werden

### Verwendete Geräte und Materialien:

- (1) PVDF Transfer Membran, Immobilon®-P, Fa. Merck Millipore, Darmstadt
- (2) Methanol, >99,8%, #STBF2109V, Fa. Sigma Aldrich, Steinheim
- (3) Gel blotting paper, GB 003, #10426892, Fa. Whatman®,
- (4) Fastblot B44, Fa. Biometra
- (5) epsilon-Aminocaproic acid, #130512, Fa. Serva, Heidelberg

#### 2.3.4 Immundetektion einzelner Proteine

Um freie, unspezifische Bindungsstellen auszuschalten, wurde die PVDF-Membran eine Stunde lang in einer Suspension aus 5% Milchpulver (1) gelöst in TBS-Tween geblockt. Danach wurde die Membran für eine Stunde (oder eine Nacht bei 4 °C) mit dem Primär-Antikörper inkubiert. Der Antikörper musste den Herstellerangaben entsprechend in 10 mL der fünfprozentigen Milchpulver-TBS-Tween Suspension verdünnt werden. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Membran 3×10 Minuten in TBS-Tween gewaschen, bevor sie eine weitere Stunde lang mit dem Sekundär-Antikörper inkubiert wurde. Der Sekundär-Antikörper richtet sich gegen den Fc-Teil des Primär-Antikörpers. Stammt der Primär-Antikörper beispielsweise aus einer Maus, so muss der Sekundär-Antikörper gegen den Fc-Teil von Maus-IgG gerichtet sein. Da es zwei verschiedenen Entwicklungsmethoden zur Darstellung der Proteinbanden gibt, musste der Sekundär-Antikörper entsprechend der gewünschten Entwicklungsmethode gewählt werden: Es gibt die Entwicklung mit *Alkalischer Phosphatase* (AP) sowie die Entwicklung mit *Merretich-Peroxidase* (HRP).

Vor der Entwicklung wurde die Membran erneut 3×10 Minuten gewaschen, um unspezifisch gebundene Antikörper von der Membran zu lösen. Zur Entwicklung mit HRP wurde die Membran eine Minute lang in einer Lösung inkubiert, die zuvor nach ECL-Protokoll (s. Tabelle 7) angefertigt wurde. Danach wurde die Membran mit einer Pinzette in einen Autoklavierbeutel überführt. Dieser wurde in einer Kasette (2) fixiert. Die Kasette wurde verschlossen, um lichtabhängige Reaktionen auf der Membran zu unterbinden. In einer mit Rotlicht ausgestatteten Dunkelkammer wurde ein Röntgenfilm (3) auf die Membran gelegt, nach kurzer Zeit wieder entfernt und in einen Entwickler (4) gesteckt. Wie lange der Röntgenfilm auf der Membran liegen bleiben musste, um ein gutes Bild zu erzeugen, musste erprobt werden und war abhängig von den verwendeten Antikörpern oder dem Protein-Gehalt der Proben.

Bei der Entwicklung mit der Alkalischen Phosphatase werden die Proteinbanden auf der Membran selbst abgebildet. Dazu wurde die Membran in ein Gemisch aus 10 mL Inkubationspuffer, 66  $\mu\text{L}$  NBT (Nitroblau-Tetrazoliumchlorid) (5) und 33  $\mu\text{L}$  BCIP (5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat) (6) gelegt, bis die Banden in ausreichender Stärke erschienen. Anschließend wurde die Membran in destilliertes Wasser gelegt. So konnte die Reaktion zusätzlich verstärkt werden.

**TBS (10 $\times$ ) pH 7,5:**

200 mM Tris pH 7,5

1,37 M NaCl

Auf 1 L mit Aqua dest. auffüllen

**TBS-Tween:**

200 mL 10x TBS pH 7,5

Auf 2 L mit Aqua dest. auffüllen

2 mL Tween 20 (7)

**ECL-Protokoll:**

10 mL Aqua dest.

0,5 mL 2 M Tris pH 8,5

2,6  $\mu\text{L}$  30% Wasserstoffperoxid (8)50  $\mu\text{L}$  250 mM Luminol (9)25  $\mu\text{L}$  90 mM Coumeric acid (10)

Inkubationspuffer (500 mL)

10 mL aus 5 mM NaCl

2,5 mL 1 M  $\text{MgCl}_2$ 

50 mL 1 M Tris pH 9,5

Auf 500 mL mit Aqua dest. auffüllen

Tabelle 7: Zusammensetzung von Puffern und Gemischen, die für die Antikörper-Detektion notwendig sind

Primär-Antikörper	Verdünnung	Firma	Sekundär-Antikörper	Firma
Lcn2	1/1000	R&D	Donkey anti goat IgG HRP	Santa Cruz, sc-2056
Isg15	1/400	Santa Cruz	Goat anti mouse IgG HRP	Santa Cruz, sc-2009
pStat3	1/2000	Cell Signaling	Goat anti rabbit IgG HRP	Santa Cruz, sc-2054
Stat3	1/1000	Cell Signaling	Goat anti rabbit IgG AP	Santa Cruz, sc-2057
$\beta$ -Actin	1/400	Santa Cruz	Goat anti mouse IgG AP	Santa Cruz, sc-2008
pStat5	1/1000	Cell Signaling	Goat anti rabbit IgG HRP	Santa Cruz, sc-2054
Stat5	1/1000	Cell signaling	Goat anti rabbit IgG AP	Santa Cruz, sc-2057

pJak2	1/1000	Cell signaling	Goat anti rabbit IgG HRP	Santa Cruz, sc-2054
pErk (p-p44/42)	1/2000	Cell signaling	Goat anti rabbit IgG HRP	Santa Cruz, sc-2054
p-c-src	1/1000	Cell signaling	Goat anti rabbit IgG HRP	Santa Cruz, sc-2054
Bcl6	1/400	Santa Cruz	Goat anti rabbit IgG HRP	Santa Cruz, sc-2054
pAkt	1/1000	Cell signaling	Goat anti rabbit IgG HRP	Santa Cruz, sc-2054
Ghr	1/1000	Sino Biological	Goat anti mouse IgG HRP	Santa Cruz, sc-2009
Shp2	1/400	Santa Cruz	Goat anti rabbit IgG HRP	Santa Cruz, sc-2054
Ptp1b	1/1000	Proteintech	Goat anti rabbit IgG HRP	Santa Cruz, sc-2054
$\alpha$ -Tubulin	1/400	Cell signaling	Goat anti rabbit IgG AP	Santa Cruz, sc-2057

Tabelle 8: Auflistung der in dieser Arbeit genutzten Primär-Antikörper zusammen mit den entsprechend verwendeten Sekundär-Antikörpern

#### Verwendete Geräte und Materialien:

- (1) Milchpulver, Fa. Roth GmbH, Karlsruhe
- (2) Röntgenkassette, Fa. Roth, Karlsruhe
- (3) Amersham Hyperfilm™ ECL, Fa. GE Healthcare Life Sciences,
- (4) Curix 60, Fa. AGFA Health Care, Greenville
- (5) NBT, Fa. Roth, Karlsruhe
- (6) BCIP-p-Toluidinsalz, Fa. Roth, Karlsruhe
- (7) Tween® 20, Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim
- (8) Wasserstoffperoxid 30%, Fa. Merck KGaA, Darmstadt
- (9) Luminol, # A8511-5G, Fa. Sigma Aldrich, Steinheim
- (10) p-coumeric acid C9008-10G, Fa. Sigma Aldrich, Steinheim

#### 2.3.5 Wiederverwertbarkeit der PVDF-Membranen (*Stripping*)

Wurde eine Membran einmal für einen Western Blot genutzt, gab es die Möglichkeit die Antikörper sowie die Chemilumineszens-Reagenzien abzuwaschen, um das Expressionsmuster anderer Proteine auf derselben Membran zu testen. Diese Methode wird als *Stripping* bezeichnet. Dazu wurde die PVDF-Membran nach folgendem Protokoll inkubiert:

- 2x 15 Minuten Inkubation in mildem Stripping Puffer
- 2x 10 Minuten Inkubation in 1x PBS
- 2x 5 Minuten Inkubation in TBS-Tween
- 1 Stunde Inkubation in 5% Milchpulver in TBS-Tween

Nach diesen Waschschritten konnte die Membran in einem neuen Primär-Antikörper inkubiert werden.

**Stripping Puffer:**

15 g Glyzin (1)

1 g SDS

Auf ca. 950 mL mit Aqua dest. auffüllen

pH mit konzentrierter HCl (2) auf 2,2 einstellen

Auf 1 L mit Aqua dest. auffüllen

Tabelle 9: Zusammensetzung des genutzten Stripping Puffers

Verwendete Geräte und Materialien:

- (1) Glycin, Pufferan®, Fa. Roth, Karlsruhe
- (2) HCl, Fa. Sigma Aldrich, Steinheim

## 2.4 Immunhistochemische Verfahren

Bei der Immunhistochemie macht man sich die Bindung zwischen Antigen und Antikörper zu Nutze, um Lage, Vorhandensein und Verteilung bestimmter Proteine auf zellulärer Ebene mittels eines markierten Antikörpers sichtbar zu machen.

### 2.4.1 Aufbereitung von Paraffin-Schnitten

Für die Herstellung von Paraffin-Schnitten wurden die Mauslebern über Nacht in 1% *Paraformaldehyd* (PFA) (1) gelagert. Am darauffolgenden Tag erfolgten Wasch- und Entwässerungsschritte, bevor die Lebern mittels einer speziellen Maschine (2) in Paraffin eingebettet wurden. Mittels eines Mikrotoms (3) wurden die Proben schließlich in 3-5 µm große Scheiben geschnitten und auf Objektträger (4) überführt.

Verwendete Geräte und Materialien:

- (1) 37% Paraformaldehyd, # 103999, Fa. Merck Millipore, Darmstadt
- (2) Einbett-Maschine EG1140H, Fa. Leica, Wetzlar
- (3) Mikrotom KM2165, Fa. Leica, Wetzlar
- (4) Objektträger Super Frost Ultra Plus, Fa. Langenbrinck, Emmendingen

### 2.4.2 Färben von Paraffin-Schnitten

Auf jeden Objektträger wurden jeweils zwei Schnitte einer Leberprobe überführt. Um sie zu färben, mussten sie zunächst in der sogenannten „absteigenden Reihe“ gewässert und entparaffinisiert werden. Nach der absteigenden Reihe wurden die Objektträger unter fließendem Leitungswasser für 5 Minuten gewässert, ehe man mit der Antigendemaskierung beginnen konnte. Die Antigendemaskierung diente dazu, die zuvor verlorene Immunreaktivität wiederherzustellen. Dies gelingt entweder durch den Einsatz von Proteasen (Trypsin, Proteinase K), oder wie in dieser Arbeit so durchgeführt, mit Citrat-Puffer. Dazu wurden die Objektträger in eine mit Citrat-Puffer gefüllte Küvette gesteckt, die dann 10 Minuten in der Mikrowelle (1) erhitzt wurde. Danach wurde die Küvette samt Objektträgern für 5 Minuten mit Leitungswasser gespült und daraufhin 2x 5 Minuten mit 1x *Phosphate buffered saline* (PBS) gewaschen. Um die endogenen Peroxidasen auf den Schnitten zu blockieren wurde eine 3% Lösung aus Wasserstoffperoxid hergestellt: Die 30% Wasserstoffperoxid-Stammlösung (2) wurde mit PBS verdünnt und dann mit einer Pipette auf die Schnitte überführt, sodass die Leberproben vollständig von der Flüssigkeit bedeckt waren. Die Schnitte wurden so für 10 Minuten in einer feuchten Dunkelkammer gelagert. Anschließend wurde die Küvette mit den Objektträgern für 5 Minuten unter fließendem Leitungswasser gespült. Danach wurden die Objektträger 2x 2 Minuten in PBS gewaschen. Um unspezifische Bindungen zu blockieren, musste 2,5% Horse Serum (3) auf die Leberschnitte pipettiert werden und eine Stunde inkubieren. Bevor der Primär-Antikörper auf die Schnitte pipettiert werden konnte, wurden die Objektträger 3x 2 Minuten mit PBS gewaschen.

Der verwendete Antikörper wurde gemäß der Herstellerempfehlung in einem bestimmten Verhältnis in 10% *bovinem Serumalbumin* (BSA) (4) verdünnt. Pro Objektträger wurde ein Schnitt zur Isotyp-Kontrolle genutzt, d.h. es wurde eine Antikörper-Verdünnung aufgetragen, die nicht gegen das Zielgewebe spezifisch ist, sodass keine Antigen-Antikörper-Bindung eingegangen werden konnte. Die Negativkontrolle sollte vom gleichen Isotyp wie der zu untersuchende Primär-Antikörper sein und dient dazu unspezifische Färbungen detektieren zu können. Etwa 50 µL Primär-Antikörper wurden auf die Leberschnitte pipettiert. Die Objektträger wurden dann über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank in einer feuchten Kammer gelagert. Der Primär-Antikörper wurde am Folgetag dekantiert. Daraufhin wurde 3x 5 Minuten mit 1xPBS gewaschen.

Der Sekundär-Antikörper wurde dem Impress Reagent Kit der Firma Vector (5) entnommen. Er muss gegen den Fc-Teil derjenigen Spezies gerichtet sein, aus welcher der Primär-Antikörper stammt. Die Schnitte wurden 30 Minuten mit dem Sekundär-Antikörper inkubiert. Danach folgten weitere Waschschrirte mit 1× PBS (3× 5 Minuten). Schließlich konnte mithilfe verschiedener Färbe-Kits entwickelt werden, d.h. die Lage des Sekundär-Antikörpers wurde durch eine Farbreaktion sichtbar gemacht. Am häufigsten verwendet wurde in dieser Arbeit das Vector® VIP Peroxidase Substrate Kit (6). Die Lösung wurde den Herstellerangaben entsprechend gemischt und konnte dann auf alle Schnitte pipettiert werden. Unter einem Mikroskop (7) wurde der Fortschritt der Entwicklung verfolgt. Sobald die Farbreaktion zufriedenstellend eingetreten war, wurde die Reaktion auf allen Schnitten zeitgleich gestoppt, indem die Objektträger in eine Küvette mit Wasser gesteckt wurden. Anschließend gab es die Möglichkeit der Kernfärbung: Dazu wurden die Schnitte 1 Minute lang in Hämalau-Lösung (8) inkubiert.

Nach der aufsteigenden Reihe (siehe Tabelle 10) konnten die Schnitte mit Pertex (9) eingedeckt werden.

**Absteigende Reihe:**

10 Minuten in Xylol (10)  
10 Minuten in Xylol  
5 Minuten in Xylol  
5 Minuten in 99,6% Ethanol (11)  
5 Minuten in 99,6% Ethanol  
5 Minuten in 96% Ethanol (12)  
2-5 Minuten in 70% Ethanol (13)

**Aufsteigende Reihe:**

2 Minuten in 96% Ethanol  
2 Minuten in Isopropanol (14)  
5 Minuten in Isopropanol  
5 Minuten in Isopropanol  
5 Minuten in Xylol  
5 Minuten in Xylol  
5 Minuten in Xylol

**PBS (10 ×):**

80g NaCl (137 mM) (15)  
2g KCl (2,7 mM) (16)  
2,45 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (17)  
11,5 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (18)  
Auf 1 Liter mit Aqua dest. auffüllen

**PBS (1×):**

100 mL PBS (10×)

Auf 1 Liter mit Aqua dest. auffüllen

pH auf 7,4 einstellen

**Citrat-Puffer:**

- Stammlösung A: 0,1 M Zitronensäure (19) auf 1 Liter auffüllen, pH= 2,1
- Stammlösung B: 0,1 M tri-Na-Citratdihydrat (20) auf 1 Liter auffüllen, pH= 8,4
- Citratpuffer pH=6,0: 9 mL Stammlösung A + 41 mL Stammlösung B
- Gebrauchslösung: 100 mL Citratpuffer pH 6,0 auf 1 L mit Aqua dest. auffüllen

Tabelle 10: Reihenfolge der auf- und absteigenden Reihe bei der Färbung von Paraffinschnitten (oben), Zusammensetzung der benötigten Puffer für die Färbung (unten)

**Verwendete Geräte und Materialien:**

- (1) Mikrowelle, Fa. Severin, Sundern
- (2) Wasserstoffperoxid 30%, Fa. Merck KGaA, Darmstadt
- (3) 2,5% Horse serum, ImPRESS™ REAGENT KIT, Fa. Vector, Burlingame
- (4) BSA, # K41-001-500, Fa. PAA, Pasching
- (5) ImPRESS™ REAGENT KIT, Fa. Vector, Burlingame
- (6) Vector® VIP Peroxidase Substrate Kit, Fa. Vector, Burlingame
- (7) Mikroskop DMIL, Fa. Leica, Wetzlar
- (8) Hämalalaun Sauer nach Mayer, # T865.2, Fa. Carl Roth, Karlsruhe
- (9) Pertex® Eindeckmedium, Fa. Medite, Burgdorf
- (10) Xylol, Fa. VWR, Darmstadt
- (11) 99,6% Ethanol, Fa. Berkel AHK, Ludwigshafen
- (12) 96% Ethanol, Fa. Fischer, Saarbrücken
- (13) 70% Ethanol, Fa. Sigma Aldrich, Steinheim
- (14) Isopropanol, Fa. Sigma Aldrich, Steinheim
- (15) NaCl, #31434, Fa. Sigma Aldrich, Steinheim
- (16) KCL, #67813, Fa. Sigma Aldrich, Steinheim
- (17) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, #P030.1, Fa. Roth, Karlsruhe
- (18) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, #3904.2, Fa. Roth, Karlsruhe
- (19) Zitronensäure, Fa. Sigma Aldrich, Steinheim
- (20) tri-Na-Citratdihydrat, #H1.06448.100, Fa. Merck Darmstadt

Primär-Antikörper	Verdünnung	Firma	Sekundär-Antikörper
Lcn2	1/50	R&D	Anti-Goat Ig, Vector Im-PRESS™ REAGENT KIT, PEROXIDASE, Cat. No. MP-7405
Ptp1b	1/50	Proteintech	Anti-Rabbit IgG, Vector Im-mPRESS™HRP REAGENT KIT, PEROXIDASE, Cat. No. MP-7401
Pepck	1/100	Abgent	Anti-Rabbit IgG, Vector Im-mPRESS™HRP REAGENT KIT, PEROXIDASE, Cat. No. MP-7401
Glutamin-Synthetase	1/100	GeneTex	Anti-Rabbit IgG, Vector Im-mPRESS™HRP REAGENT KIT, PEROXIDASE, Cat. No. MP-7401

Tabelle 11: Liste der in der Immunhistochemie verwendeten Antikörper und ihrer entsprechenden Verdünnung

## 2.5 Molekularbiologische Methoden

### 2.5.1 RNA-Isolation aus Zellen und Gewebe

Bei der RNA-Isolation aus Lebergewebe wurden zunächst 20 bis 30 mg gemörserte Leber eingewogen und in einen 1,5 mL Eppendorf-Cup überführt. Die weiteren Arbeitsschritte erfolgten mithilfe des RNeasy Mini Kit 250 (1) und QIAShredder (2) der Firma Qiagen. Das Kit enthält RLT-Puffer zur Lyse der Zellen und des Gewebes. Diesem Puffer musste  $\beta$ -Mercaptoethanol im Verhältnis 1/100 hinzugefügt werden. Der fertig hergestellte Lysepuffer wurde auf das abgewogene Lebergewebe gegeben (600  $\mu$ L pro Probe). Um mRNA aus Zellen zu isolieren, wurde der Lysepuffer direkt auf die zuvor mit *Dulbecco's phosphate buffered saline* (DPBS) (3) gewaschenen Zellen pipettiert (350  $\mu$ L pro 6-well (4)). Der Lysepuffer musste gut auf die Zellen verteilt werden. Danach wurde das Gemisch aus Zellen und Puffer abgeschabt (5) und in ein Reaktionsgefäß überführt.

Mit Lysepuffer versetztes Lebergewebe musste vor den folgenden Arbeitsschritten noch mit einem Turax (6) homogenisiert werden. Im Unterschied zur RNA-Isolation aus Gewebe wurde bei der Isolation aus Zellen in den folgenden Schritten weniger Puffer verwendet. Das Lysat aus Zellen sowie aus Lebergewebe wurde zunächst auf den Shredder pipettiert. Daraufhin wurden die Proben für 2 Minuten bei 14 000 g zentrifugiert (7). Der

Shredder konnte dann verworfen werden. Das Lysat im Collection Tube wurde mit 600  $\mu\text{L}$  (350  $\mu\text{L}$  bei Zellen) 70% RNasefreiem Ethanol versetzt, bevor es auf die rosa Säule des Kits gegeben wurde. Die rosa Säulen wurden dann für 15 Sekunden bei 8000 g zentrifugiert. Bei der RNA-Isolation aus Lebergewebe musste die rosa Säule zwei Mal beladen werden und folglich auch zwei Mal zentrifugiert werden. Nach der Zentrifugation wurde der Durchfluss im Collection Tube verworfen, da sich die zu isolierenden Nukleinsäuren in der Säule befinden. Die Säule wurde daraufhin mit dem RW1 Waschpuffer des Kits beladen (700  $\mu\text{L}$  für Gewebe und 350  $\mu\text{L}$  für Zellen) und erneut 15 Sekunden lang bei 8000 g zentrifugiert. Schließlich wurde die Säule zwei Mal mit dem ethanolhaltigen RPE Waschpuffer gewaschen. Nach dem ersten Waschgang wurde für 15 Sekunden bei 8000 g zentrifugiert, nach dem zweiten Waschgang ein weiteres Mal für 2 Minuten. Es wurden jeweils 500  $\mu\text{L}$  RPE Puffer für Gewebe und 300  $\mu\text{L}$  RPE Puffer für Zellen verwendet. Abschließend wurde für 15 Sekunden bei 8000 g trocken zentrifugiert. Die Säulen wurden dann in neue Eppendorf Cups überführt und 5 Minuten lang mit nukleasfreiem Wasser inkubiert (40  $\mu\text{L}$  bei Gewebe und 30  $\mu\text{L}$  bei Zellen). Nach der Inkubation wurde 1 Minute lang bei 8000 g zentrifugiert. Die rosa Säule konnte nun verworfen werden.

Mit dem Turbo DNA-free Kit (8) wurden die in der RNA enthaltenen DNasen degradiert. Dazu wurde pro Probe 1/10 des Volumens 10 $\times$ Turbo DNase Puffer sowie 1  $\mu\text{L}$  Turbo DNase in die Eppendorf Cups gegeben, bevor die RNA 30 Minuten lang bei 37 °C im Thermomixer (9) inkubiert werden musste. Anschließend wurde den Proben 1/10 des Volumens an DNase Inactivation Reagent hinzugefügt. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die RNA bei 10 000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde dann in ein neues Eppendorf Cup überführt und konnte bei -80 °C eingefroren werden. Während der ganzen Prozedur musste darauf geachtet werden, dass keine RNasen aus der Umgebung in die Probe gelangen konnten. Der Arbeitsplatz und die verwendeten Pipetten mussten daher zuvor mit Ethanol und RNase AWAY (10) gereinigt werden.

Verwendete Geräte und Materialien:

- (1) RNeasy Mini Kit 250, Fa. Quiagen, Hilden
- (2) QIA Schredder, Fa. Quiagen, Hilden
- (3) BioWhittaker® DPBS, # BE17-512F, Fa. Lonza, Köln
- (4) TC-Platte, 6-well, #83.3920, Fa. Sarstedt, Nümbrecht
- (5) Zellschaber, #83.1830, Fa. Sarstedt, Nümbrecht
- (6) Homogenizer Ultra Turrax T8, Fa. IKA, Staufen

- (7) Zentrifuge Microstar 17R, Fa. VWR, Darmstadt
- (8) Turbo DNA-free Kit, Fa. Ambion
- (9) Thermomixer Comfort, Fa. Eppendorf, Hamburg
- (10) RNase AWAY™, Cat. No. 7002, Fa. Thermo Scientific, Dreieich

### 2.5.2 RNA-Qualitätskontrolle mittels Agarosegel

Um das Vorhandensein von RNA in den Proben zu überprüfen, wurde eine Qualitätskontrolle mittels Agarosegel angefertigt. Pro Gelschlitten wurden 0,75 g Agarose (1) benötigt, die mit 46,25 mL 3-(*N*-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS) 1× gemischt wurde. Das Gemisch wurde bei 900 Watt drei Mal in der Mikrowelle (2) aufgeköcht, sodass keine Schlieren mehr in der Flüssigkeit zu sehen waren. Unter dem Abzug wurde die Flüssigkeit auf etwa 60 °C abgekühlt. Dann wurde 3,75 mL Formaldehyd (3) hinzugefügt. Sobald Formaldehyd hinzugegeben wurde, polymerisierte das Gel. Daher wurde es zügig in einen Gelschlitten gegossen, in dem ein Kamm für die Geltaschen fixiert wurde. Während das Gel polymerisierte (ca. 30 Minuten), wurde je 1 µL der isolierten RNA mit 4 µL RNA Ladepuffer (4) versetzt. Diese Mixtur wurde 10 Minuten lang bei 65 °C im Thermomixer (5) erhitzt und daraufhin kurz anzentrifugiert.

Diese Proben wurden anschließend vollständig in die Geltasche pipettiert. Für ein kleines Gel wurde die Elektrophoresevorrichtung (6) auf eine Spannung von 65 V für 40 Minuten eingestellt. Als Laufpuffer in der Elektrophoresevorrichtung wurde MOPS genutzt. Nach Ablauf der Gelelektrophorese konnte das Gel mit einer Schaufel unter einer UV-Lampe positioniert werden und mit einer Kamera (7) fotografiert werden. Idealerweise konnte dann pro Probe die 18S und 28S RNA gesehen werden.

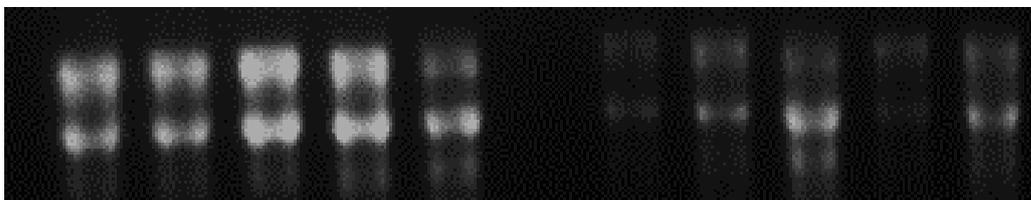


Abbildung 13: RNA Gel mit Auftrennung der mRNA in die 28S (oben) und 18S Untereinheit (unten).

#### Verwendete Geräte und Materialien:

- (1) Agarose Broad Range, Roti@garose, T846.3, Fa. Roth, Kalsruhe
- (2) Mikrowelle, Fa. Severin, Sundern
- (3) 37% Formaldehyd, 1.04003.1000, Fa. Merck, Darmstadt

- (4) Formaldehyd Load Dye
- (5) Thermomixer Comfort, Fa. Eppendorf, Hamburg
- (6) Elektrophoresekammer HU6, SN: 4192, Fa. Roth, Karlsruhe
- (7) Reprostar 3, Fa. Camag, Berlin

### 2.5.3 Konzentrationsbestimmung der RNA mittels Spektrophotometrie

Das Nano Drop Spectrometer (1) dient dazu den RNA Gehalt der einzelnen Proben zu bestimmen sowie Aussagen über die Reinheit der RNA zu machen. Dazu wurde je 1  $\mu\text{L}$  der Probe auf eine Messzelle pipettiert. Das Verhältnis der optischen Dichten bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm gibt Aufschluss über die Reinheit der RNA. Der Wert sollte über 2,0 sein um Verunreinigungen der Proben ausschließen zu können. Die RNA Konzentration wurde mittels einer modifizierten Lambert-Beer-Formel durch den Computer des Gerätes berechnet.

Verwendete Geräte und Materialien:

(1) Nano Drop Spectrophotometer ND-1000, Fa. Thermo Scientific, Dreieich

### 2.5.4 cDNA Synthese

Mittels eines cDNA-Synthese-Kits (1) konnte die mRNA in *complementary* DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Das Kit besteht aus dem 5 $\times$  iScript reaction mix, der iScript Reversen Transcriptase sowie aus nukleasefreiem Wasser. Die Nanodrop-Werte der umzuschreibenden mRNA mussten zunächst in  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  umgerechnet werden. Mit dem nukleasenfreien Wasser wurde dann eine 15  $\mu\text{L}$  umfassende Probenverdünnung der mRNA hergestellt. Es sollte pro Probe je ein Mikrogramm mRNA vorliegen: Betrag der Nanodrop-Wert beispielsweise 0,2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , musste der fünffache Wert pipettiert werden um auf ein Mikrogramm mRNA zu kommen, d.h. 5  $\mu\text{L}$  mRNA und 10  $\mu\text{L}$  nukleasefreies Wasser wurden in einem 0,5 mL Eppendorf-Cup zusammengeführt. Diese Umrechnung wurde mithilfe einer Excel-Tabelle für jede Probe gemacht.

Abhängig davon wie viele Proben insgesamt zur Verfügung standen, wurde ein Master-Mix aus dem iScript Reaction Mix und der iScript Reverse Transcriptase hergestellt. Pro Probe wurden laut Herstellerinformationen 4  $\mu\text{L}$  Reaktionsmix und 1  $\mu\text{L}$  der RT benötigt. Für 20 Proben wurden zum Beispiel einen Master-Mix aus 23 $\times$ 4  $\mu\text{L}$  Reaktionsmix und 23 $\times$  1  $\mu\text{L}$  RT pipettiert. 5  $\mu\text{L}$  aus dem Master-Mix wurden schließlich jeder mRNA Probenverdünnung hinzugefügt, sodass jede Probe 20  $\mu\text{L}$  umfasste. Diese Proben wurden im

Thermocycler (2) in cDNA umgeschrieben. Das im Thermocycler eingestellte Programm richtete sich nach der Empfehlung des Kit Herstellers Bio-Rad:

- 5 Minuten Inkubation bei 25 °C
- 30 Minuten Inkubation bei 42 °C
- 5 Minuten Inkubation bei 85 °C
- Abkühlung der Proben auf 4 °C

Waren die Proben umgeschrieben, konnte die cDNA bei -20 °C gelagert werden.

Verwendete Geräte und Materialien:

- (1) iscript™ cDNA-Synthesis Kit, Fa. Bio Rad, München
- (2) Thermocycler T3000, Fa. Biometra, Göttingen

### 2.5.5 Quantitative Real-Time PCR

Die *quantitative Real-Time Polymerase Kettenreaktion* (qRT-PCR) stellt eine Methode dar, Nukleinsäuren zu amplifizieren und ermöglicht so relative Unterschiede im Vorhandensein bestimmter cDNA in der zu untersuchenden Probe zu detektieren. Der Vorteil der qRT-PCR liegt in ihrer großen Sensitivität <sup>122</sup>.

Da die cDNA zuvor aus der mRNA des Lebergewebes synthetisiert wird, ist diese ein Spiegel der in der Zelle transkriptionell regulierten Gene. Bei einer PCR werden die Proben zuerst erhitzt (96 °C), damit die DNA-Doppelhelix denaturiert und sich die zwei Stränge voneinander trennen. Dadurch liegen Basenabfolgen frei, an denen spezifische Primer hybridisieren können. Die Primer hybridisieren temperaturabhängig, beispielsweise bei 59 °C. Nur durch die Primer ist die DNA-Amplifikation durch das Enzym DNA-Polymerase möglich: Die Verlängerung bzw. Synthese eines komplementären Strangs kann nur von einem freien 3'OH-Ende des DNA-Rückgrates ausgehen. Dieses liefert der Primer.

Bei der PCR wird die thermostabile Taq-Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus* verwendet, die im Vergleich zur menschlichen DNA-Polymerase ein höheres Temperaturoptimum besitzt <sup>123</sup>. Die Elongation durch die Polymerase findet bei circa 72 °C statt. Im Gegensatz zur herkömmlichen PCR wird bei der qRT-PCR die Amplifikation in „Echtzeit“ aufgenommen, indem die DNA durch Sonden markiert wird. In dieser Arbeit wurde ausschließlich mit Fluoreszenzfarbstoffen als Sonde gearbeitet. Der angewandte Fluoreszenz-Farbstoff SYBR® Green reagiert auf die Interkalierung in Nukleinsäuren mit einer Verstärkung der Fluoreszenz <sup>124</sup>.

Die amplifizierte DNA wurde mit dem StepOnePlus RT-PCR Gerät (1) gemessen. Pipettiert wurde auf eine 96-Well-Platte. Die verwendeten Primer, SYBR® Green/Rox (2) sowie die cDNA mussten während der Arbeitsschritte auf Eis gelagert werden. Zunächst wurden die Primer, die jeweils in einer Sense- und Antisense-Formation vorlagen, im Verhältnis 1:10 mit nukleasefreiem Wasser verdünnt. Pro Probe wurde folgender Ansatz pipettiert:

- 6,3 µL SYBR® Green/Rox
- 0,25 µL des Sense Primers (1:10 Verdünnung)
- 0,25 µL des Antisense Primers (1:10 Verdünnung)
- 5,2 µL nukleasefreies Wasser (3)

Um Ungenauigkeiten beim Pipettieren zu vermeiden, wurde ein Ansatz für alle Proben zusammen hergestellt und je 12 µL dieses Gemisches in die Reaktionsgefäße (4) pipettiert. Danach wurden diese mit 0,5 µL cDNA versehen. Als Negativkontrolle wurde ein Reaktionsgefäß mit 0,5 µL Wasser anstelle von cDNA versetzt. Die Reaktionsgefäße wurden abschließend mit speziellen Deckeln (5) verschlossen und dann kurz anzentrifugiert (6).

Mit dem StepOnePlus RT-PCR Gerät konnten abhängig von den verwendeten Primern, Proben und Sonden individuell konfiguriert werden. Nach Ablauf der PCR-Zyklen wurde eine Schmelzkurve durch die Software des StepOnePlus bestimmt. Dazu wurde das Produkt der Amplifikation am Ende jeder qRT-PCR auf eine bestimmte Temperatur erhitzt, bei der sich der DNA-Doppelstrang voneinander trennt. Länge und Form der Schmelzkurve können genutzt werden, um gewünschte Amplifikations-Produkte von ungewünschten zu unterscheiden<sup>125</sup>. Die Software hat zudem einen *Amplification Plot* ermittelt (vgl. Abbildung 14). Dieser Graph stellt die gemessene Fluoreszenz (y-Achse) in Abhängigkeit von der Zeit dar (x-Achse), welche in der Anzahl der durchgeführten Zyklen widergegeben wird<sup>126</sup>. Mit zunehmender Anzahl der Zyklen steigt die Menge der amplifizierten cDNA und die Fluoreszenzmission steigt ebenso.

Zur Analyse der qRT-PCR konnten die durch den Amplification Plot ermittelten *Cycle threshold*-Werte (CT-Wert) genutzt werden. Um den CT-Wert zu definieren, wurde im Amplification Plot ein willkürlicher Schwellenwert festgelegt. Die Anzahl der bereits durchgeführten Zyklen zu dem Zeitpunkt, in dem der Graph den Schwellenwert schneidet, wird als CT-Wert bezeichnet<sup>126</sup>.

Anhand der CT-Werte wurde dann die relative Genexpression mittels der  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Formel berechnet<sup>127</sup>. Daher war es notwendig zuvor die Expression eines *Housekeeping-Genes*

als Referenz zu bestimmen, damit die CT-Werte dieses konstitutiv exprimierten Genes, mit denen der zu untersuchenden Gene verglichen werden konnten.

Primer	Sequenz	Firma
<i>β-Actin</i>	For 5'-ggc tgt att ccc ctc cat cg-3' Rev 5'-cca gtt ggt aac aat gcc atg t -3'	Invitrogen
<i>Mt1</i>	For 5'-gct gtc ctc taa gcg tca cc-3' Rev 5'-agg agc agc agc tct tct tg-3'	Invitrogen
<i>Mt2</i>	For 5'-caa acc gat ctc tcg tcg at-3' Rev 5'-agg agc agc agc ttt tct tg-3'	Invitrogen
<i>Saa1</i>	For 5'-cat ttg ttc acg agg ctt tcc aag-3' Rev 5'-ttc ctg aaa ggc ctc tct tcc atc ac-3'	Invitrogen
<i>Saa2</i>	For 5'-agc tgg ctg gaa aga tgg aga caa-3' Rev 5'-tgt cct ctg ccg aag aat tcc tga-3'	Invitrogen
<i>Saa3</i>	For 5'-tgc cat cat tct ttg cat ctt ga-3' Rev 5'-ccg tga tct gaa cag cct-3'	Microsynth
<i>Lcn2</i>	For 5'-tgg ccc tga gtg tca tgt g-3' Rev 5'-ctc ttg tag ctc ata gat ggt gc-3'	Invitrogen
<i>Fgl1</i>	For 5'-ccc tgt cag gaa ctt ttc atc c-3' Rev 5'-cgg tag taa aca ccg ttc agg t-3'	Invitrogen
<i>Pip5k1a</i>	For 5'-acc-tga-agg-gtt-caa-ctt-aca-ag-3' Rev 5'-aca-gtc-acg-ctg-tag-agt-ctt-3'	Invitrogen
<i>Orm1</i>	For 5'-cga-gta-cag-gca-ggc-aat-tca-3' Rev 5'-acc-tat-tgt-ttg-aga-ctc-ccg-a-3'	Invitrogen
<i>Isg15</i>	Cat.-No: QT1772876*	Qiagen
<i>C5a/C5</i>	For 5'-gaa caa acc tac gtc att tca gc-3' Rev 5'-gtc aac agt gcc gcg ttt t-3'	Invitrogen
<i>Icam1</i>	For 5'-gtg atg ctc agg tat cca tcc a-3' Rev 5'-cac agt tct caa agc aca gcg-3'	Invitrogen
<i>Cxcl10</i>	For 5'-cca agt gct gcc gtc att ttc-3' Rev 5'-ggc tcg cag gga tga ttt caa-3'	Invitrogen
<i>Mcp1</i>	For 5'-tta aaa acc tgg atc gga acc aa-3' Rev 5'-gca tta gct tca gat tta cgg gt-3'	Invitrogen
<i>Ccl3</i>	For 5'-ttc tct gta cca tga cac tct gc-3' Rev 5'-cgt gga atc ttc cgg ctg tag-3'	Invitrogen
<i>Ccl4</i>	For 5'-ttc ctg ctg ttt ctc tta cac ct-3' Rev 5'-ctg tct gcc tct ttt ggt cag-3'	Invitrogen
<i>Cxcl1</i>	For 5'-ctg gga ttc acc tca aga aca tc-3' Rev 5'-cag ggt caa ggc aag cct c3'	Invitrogen
<i>Ifit1</i>	For 5'ctg-aga-tgt-cac-ttc-aca-tgg-aa-3' Rev 5'gtg-cat-ccc-caa-tgg-gtt-ct-3'	Invitrogen
<i>Ccl11</i>	For 5'-gaa tca cca aca aca gat gca c-3' Rev 5'-atc ctg gac cca ctt ctt ctt-3'	Invitrogen
<i>C3</i>	For 5'-cca-gct-ccc-cat-tag-ctc-tg-3' Rev 5'-gca-ctt-gcc-tct-tta-gga-agt-c-3'	Invitrogen
<i>Il6</i>	For 5'-tcc agt tgc ctt ctt ggg ac-3' Rev 5'gta ctc cag aag acc aga gg-3'	Invitrogen
<i>Cyclin D1</i>	For 5'- tca tcg aac act tcc tct cc -3' Rev 5'- tga ctc tgg aaa gaa agt gc -3'	Eurofins
<i>Socs2</i>	For 5'-agt tcg cat tca gac tac cta ct-3' Rev 5'-tgg tac tca aat ccg cag gtt ag-3'	Invitrogen

<i>Cish</i>	For 5'-atg gtc ctt tgc gta cag gg-3' Rev 5'-gga atg ccc cag tgg gta ag-3'	Invitrogen
<i>Ghr</i>	For 5'-ctg caa aga atc aat cca agc c-3' Rev 5'-cag ttc agg gga acg aca ctt-3'	Invitrogen
<i>Igf1</i>	For 5'-ctg gac cag aga ccc ttt gc-3' Rev 5'-gga cgg gga ctt ctg agt ctt-3'	Invitrogen
<i>Ly6d</i>	For 5'-gcc tgg gca ctt cga atg tc-3' Rev 5'-tga gtt tgc aca ctg ttt cct c-3'	Invitrogen
<i>Stat1</i>	For 5'-cgg agt cgg agg ccc taa t-3' Rev 5'-aca gca ggt gct tct taa tga g-3'	Invitrogen
<i>Fgf21</i>	Cat.-No: QT00132202*	Qiagen

Tabelle 12: Auflistung der genutzten Primer in dieser Arbeit. \*Da die Firma Qiagen, die Sequenzen der Primer nicht veröffentlicht, wurden hier ersatzweise die Katalognummern genannt.

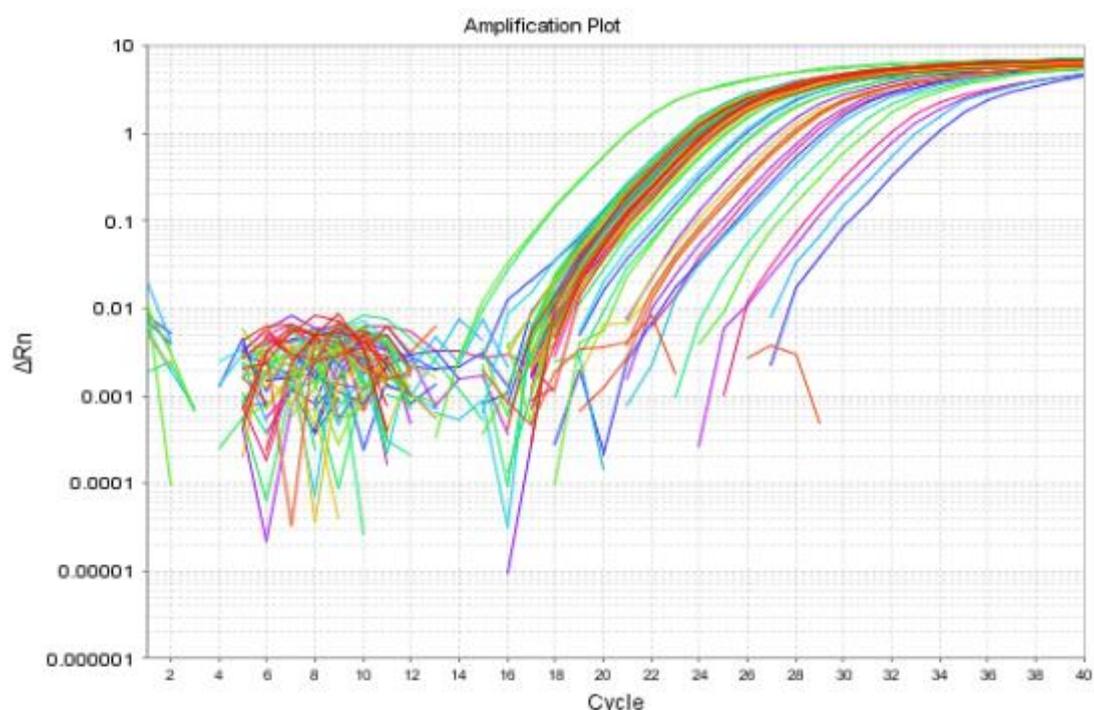


Abbildung 14: Amplification Plot der StepOnePlus Software. Die y-Achse ist ein Maß für die Fluoreszenzintensität. Die x-Achse kennzeichnet die Anzahl der durchgeführten Zyklen.

#### Verwendete Geräte und Materialien:

- (1) StepOnePlus™, Fa. Applied Biosystems ® by life technologies™, Carlsbad
- (2) SYBR® Green/ Rox
- (3) Aqua bidest aus Millipak® 20 Anlage, MPPG02601, Fa. Merck-Millipore, Darmstadt
- (4) Micro Amp® Fast Reaction Tubes, Fa. Applied Biosystems by life technologies™, Carlsbad

- (5) Micro Amp® Optical 8-Cap Strip, Fa. Applied Biosystems by life technologies, Carlsbad
- (6) Micro Zentrifuge, SN: 080384, Fa. Roth, Karlsruhe

### 2.5.6 Microarray Analyse

Die Microarray-Analyse ermöglicht es, die Expression vieler Gene gleichzeitig zu testen<sup>128</sup>. In dieser Arbeit dienten die Array-Daten vor allem der Orientierung. Stark hoch- oder herunterregulierte Gene im Microarray wurden näher untersucht (beispielsweise durch qRT-PCR, Immunhistochemie und Western Blot).

Ein ebenso gebräuchlicher Name für diese Methode lautet „DNA-Chip-Technologie“, da die cDNA bekannter Gene auf die Felder eines kleinen Chips überführt wird. Die zu untersuchende cDNA wird mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert und schließlich werden die Gene detektiert, mit der die cDNA des Untersuchungsmaterials hybridisiert.

Zur Microarray-Analyse wurden ausschließlich Leberproben von RNA männlicher 12 Wochen alter BALB/c Mäuse verwendet (n=5 pro Gruppe).

Die Microarray-Analyse dieser Arbeit wurde von der Arbeitsgruppe von Dr. Jochen Wilhelm (German Center of Lung Research, Justus-Liebig-Universität Gießen) angefertigt.

## 2.6 Statistik und Datenverarbeitung

Die statistische Auswertung der qRT-PCR erfolgte mit der Statistiksoftware SPSS<sup>129</sup>. In allen Analysen wurde der Kruskal Wallis Test, auch H-Test, verwendet<sup>130</sup>. Da unsere Proben nicht normalverteilt sind, musste ein nicht parametrischer Test zur Signifikanzprüfung erfolgen. Der Kruskal Wallis Test wurde gewählt, da er sich für den Vergleich von mehr als zwei unabhängigen Stichproben eignet. In der vorliegenden Arbeit mussten 4 verschiedene Gruppen verglichen werden: BALB/c Wildtypen (Wt), HBs-transgene BALB/c Mäuse ohne Behandlung (Tg), einwöchig mit 4-PBA behandelte, HBs-transgene BALB/c Mäuse (1W PBA) und achtwöchig behandelte, HBs-transgene BALB/c Mäuse (8W PBA). P-Werte unter 0,05 wurden als statistisch signifikant bewertet. Zur statistischen Analyse war eine Probenzahl von mindestens n=3 notwendig.

Des Weiteren wurden die Daten in Tabellen von Microsoft Excel zu Graphen formatiert. Die Bilder aus der Immunhistochemie sowie die Western Blots wurden zum Teil mit dem

Bildverarbeitungsprogramm von Microsoft Powerpoint und Word modifiziert: So wurden beispielsweise Techniken der Kontrastverstärkung bei zu hellen Bildern verwendet.

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Verteilung des Hepatitis B-Hüllproteins in den Hepatozyten

Da in Vorversuchen (vgl. 1.7.1) in Zellkulturen eine Verminderung intrazellulärer HBsAg Aggregate durch den Einfluss von 4-PBA beobachtet wurde, haben wir zu Beginn des Projektes Lebergewebe HBs-transgener Mäuse (HBVTg/c) immunhistochemisch untersucht.

In Lebern 12 Wochen alter HBs-transgener BALB/c Mäuse wurde das HBsAg angefärbt, um dessen intrazelluläre Verteilung mit und ohne orale 4-PBA Behandlung beurteilen zu können (s. Abbildung 15). Dabei konnten Unterschiede zwischen den Proben unbehandelter und mit 4-PBA behandelter Mäuse gesehen werden.

Abbildung 15 A zeigt das Lebergewebe einer unbehandelten Maus. Das HBsAg ist dort in der Zellperipherie zu finden und akkumuliert. In den Hepatozyten um die Glisson-Trias ist das Hüllprotein weniger stark akkumuliert und wirkt innerhalb der Zelle feiner verteilt. Abbildung 15 B zeigt die immunhistochemische Färbung eines Leberschnittes einer Maus, die eine Woche mit 4-PBA behandelt wurde. Wie in 15 A akkumuliert HBsAg vermehrt am Zellrand. Nach achtwöchiger Behandlung mit 4-PBA stellt sich ein anderes Bild dar (15 C): Es sind flächenhafte Aussparungen vorhanden, in denen HBsAg nicht exprimiert wird. Dieser Effekt ist vermutlich auf epigenetische Modifikationen zurückzuführen und nicht durch den Einfluss von 4-PBA bedingt<sup>131</sup>. Wie in den anderen Abbildungen ist das Hüllprotein, sofern es in der Zelle vorhanden ist, größtenteils in der Zellperipherie lokalisiert. Außerdem erscheinen die Hepatozyten nach achtwöchiger PBA-Behandlung vergrößert und die Zonierung bzw. die Leberarchitektur ist nahezu aufgehoben.

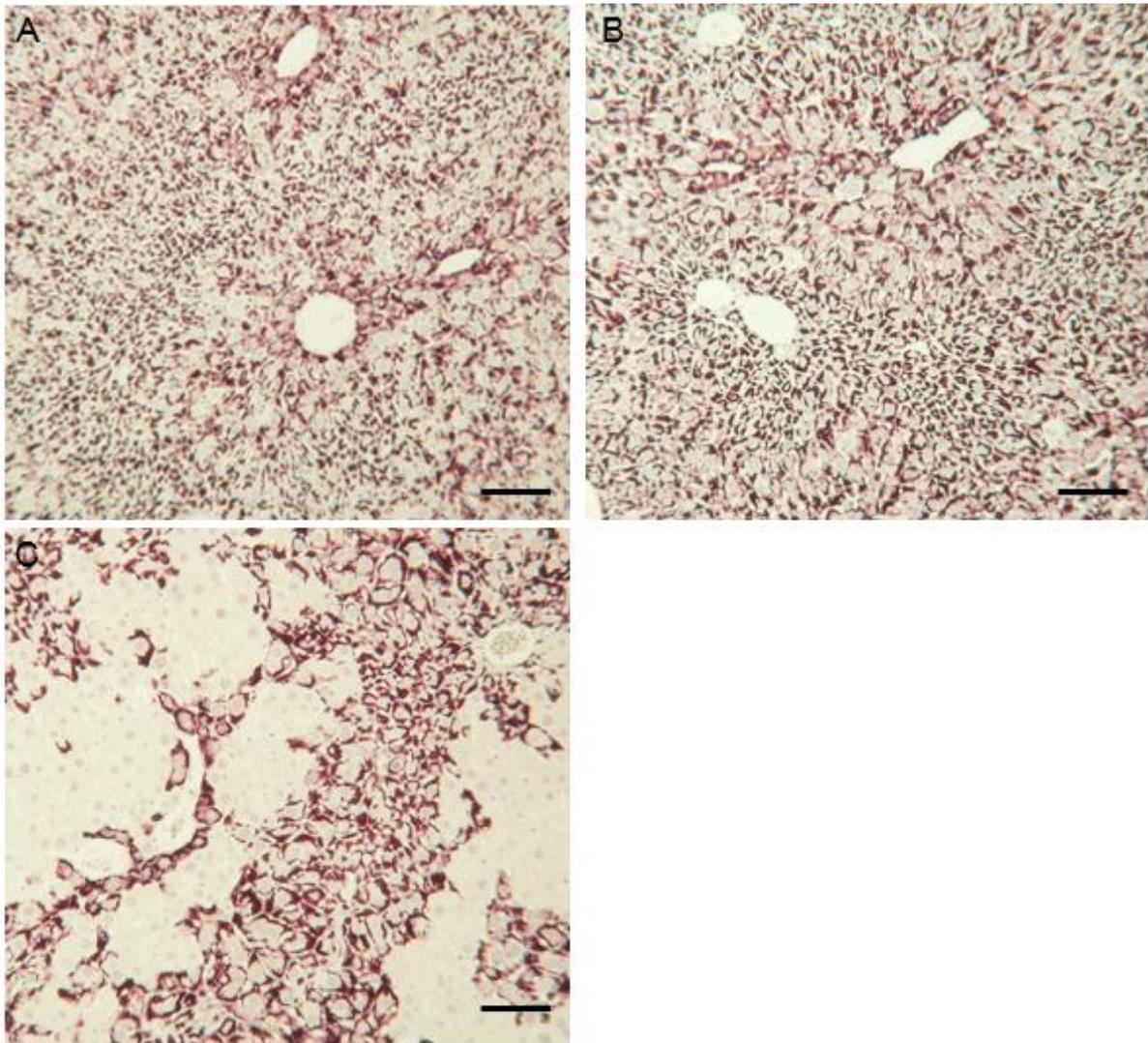


Abbildung 15: Die Immunhistochemie von HBsAg (hier rötlich gefärbt) zeigt eine vermehrte Akkumulation des Oberflächenproteins in der Zellperipherie von Hepatozyten HBs-transgener Mäuse. Nach achtwöchiger Behandlung mit 4-PBA fallen in den Leberschnitten Bereiche auf, die kein HBsAg exprimieren. Untersucht wurden Leberproben 12 Wochen alter, männlicher HBs-transgener BALB/c Mäuse. Vergrößerung 200×. Messbalken  $\cong$  50  $\mu$ m, A) HBs-transgen (HBs-tg), B) HBs-transgen, 1 Woche PBA-Behandlung (1 W PBA), C) HBs-transgen, 8 Wochen-PBA Behandlung (8 W PBA)

Aus der Immunhistochemie können folgende Schlüsse gezogen werden:

- Unter einwöchiger Behandlung der HBs-transgenen Mäuse mit 4-PBA verändert sich die Verteilung des HBV Oberflächenproteins nur marginal.
- Die nach achtwöchiger Behandlung vorhandenen flächenhaften Aussparungen ohne Anfärbung sind vermutlich auf eine Modulation der epigenetischen Regulation von HBsAg zurückzuführen<sup>131</sup> (vgl. 4.3.2).

- Nach achtwöchiger Behandlung der Mäuse mit 4-PBA ist eine Veränderung der Histomorphologie der Leber, im Sinne einer Hepatozytenvergrößerung und Aufhebung der Zonierung, sichtbar.
- Eine Verminderung der Akkumulation des Oberflächenproteins unter PBA-Behandlung, wie in Vorarbeiten an hepatischen Zellen demonstriert (vgl. 1.7.1), konnte im vorliegenden Maus-Modell nicht reproduziert werden.

## 3.2 Induktion einer Akut-Phase-Antwort unter PBA-Behandlung

### 3.2.1 Microarray-Analyse 12 Wochen alter BALB/c Mäuse

Zu Beginn der Untersuchungen wurde eine Microarray-Analyse durchgeführt, um Cluster hochregulierter und Cluster herunterregulierter Gene zu detektieren. Dabei wurde die Genexpression in Leberproben 12 Wochen alter männlicher Mäuse vom genetischen BALB/c Hintergrund untersucht. Die Analyse zeigte, dass unter Behandlung mit 4-PBA eine Hochregulation von Genen verschiedener Akut-Phase-Proteine erfolgte.

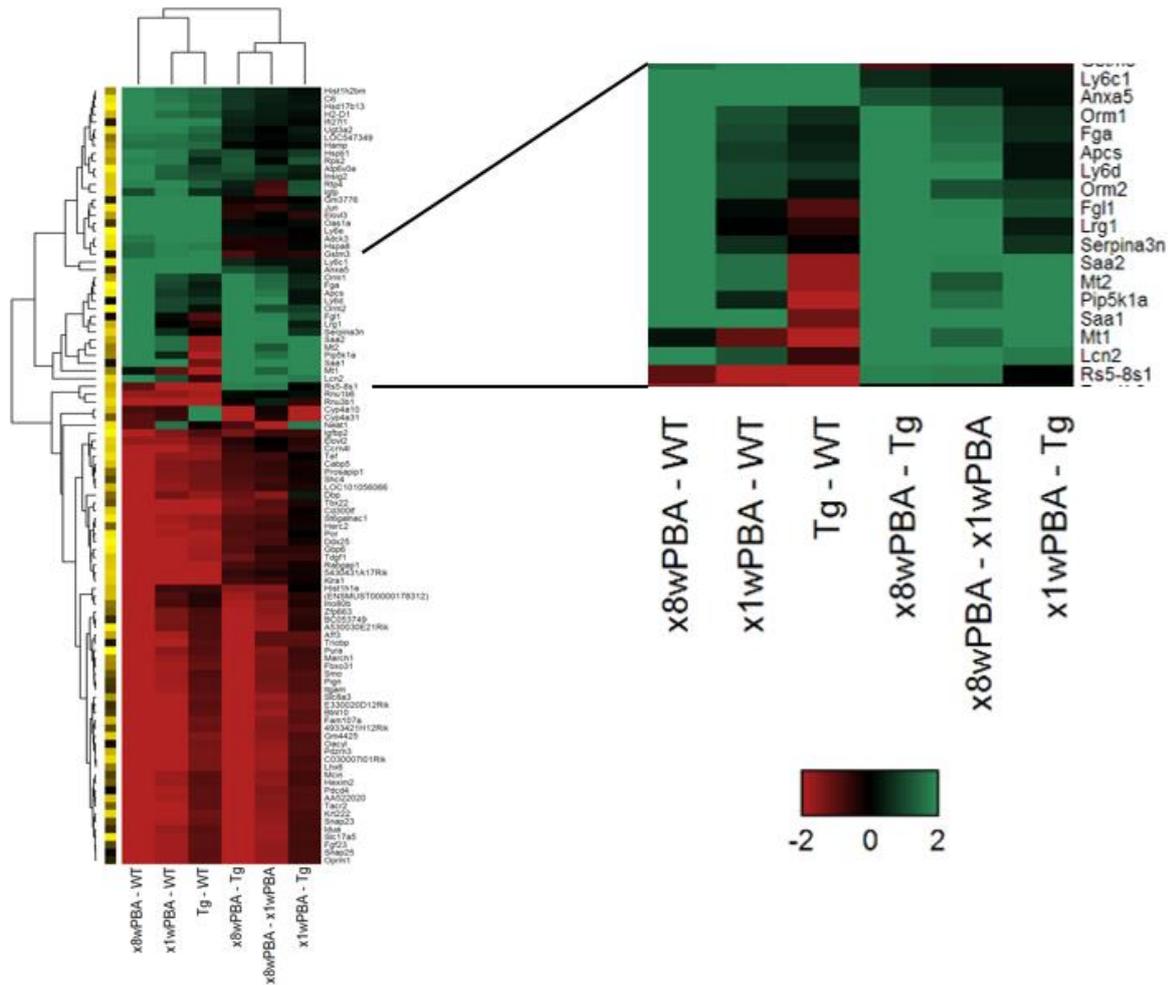


Abbildung 16: Dargestellt ist die Heat Map der durchgeführten Microarray-Analyse. Die relevanten Bereiche sind vergrößert hervorgehoben. Hochregulierte Gene sind grün dargestellt, herunterregulierte Gene rot. Untersucht wurde Leber-mRNA männlicher, 12 Wochen alter BALB/c Mäuse. Die transkriptionelle Genregulation der einzelnen Versuchsgruppen wurde vergleichend mit den jeweils anderen Gruppen analysiert, z.B. bezieht sich „x8wPBA - WT“ auf die Veränderung der Genregulation achtwöchig behandelter HBs-transgener BALB/c Mäuse (=x8wPBA) im Vergleich auf die unbehandelten Wildtyp BALB/c Mäuse (=WT). WT= Wildtyp, Tg= HBs-transgen, x1wPBA= HBs-transgen, 1 Woche PBA-Behandlung, x8wPBA= HBs-transgen, 8 Wochen PBA-Behandlung, n=5

Im vergrößerten Bereich der Abbildung 16 sind die relevanten Gene hervorgehoben: Zu diesen gehören unter anderem die Gene für Serumamyloid A (*saa1*, *saa2*) und Lipocalin 2 (*lcn2*).

In der Tabelle 13 sind die acht am stärksten hochregulierten Gene nach achtwöchiger PBA-Behandlung dargestellt. Das unter den untersuchten Genen am stärksten hochregulierte Gen lautet *lcn2*.

Die im Microarray identifizierten Genregulationen wurden mittels qRT-PCR validiert. Während in der Microarray-Analyse nur die Genexpression in männlichen Mäusen beurteilt wurde, konnte nun durch die qRT-PCR auch das Genexpressionsmuster der Leberproben weiblicher Mäuse hinzugezogen werden. Zum Teil wurden die Ergebnisse der Microarray-Analyse durch die qRT-PCR bestätigt (vgl. 3.2.3, 3.2.7).

Gen	log <sub>2</sub> FC
<i>lcn2</i>	6,42
<i>saa1</i>	5,59
<i>saa2</i>	5,13
<i>pip5k1a</i>	4,62
<i>mt2</i>	4,51
<i>saa3</i>	4,20
<i>mt1</i>	4,01
<i>fgl1</i>	2,98

Tabelle 13: Hochregulierte Gene unter achtwöchiger PBA-Behandlung in 12 Wochen alten HBs-transgenen, männlichen Mäusen verglichen mit unbehandelten HBs-transgenen Mäusen (x8wPBA-Tg). Die Tabelle zeigt die acht am stärksten hochregulierten Gene aus der Microarray Analyse. Die log<sub>2</sub>FC-Werte wurden auf die zweite Kommastelle gerundet.

### 3.2.2 Ergebnisse des Proteom Profiler Arrays

Im Vorfeld wurde mit Seren der 12 Wochen alten BALB/c Mäuse ein Proteom Profiler Array durchgeführt. Unter PBA-Behandlung zeigte sich dort ein vermehrtes Vorkommen verschiedener Zytokine im Serum<sup>132,133</sup>. Diese regulierten Zytokine (u.a. *ip10*, *mcp1* und *cxcl1*) wurden im Rahmen einer anderen Untersuchung zusätzlich auf Genexpressionsebene (qRT-PCR) (s. 3.2.8) in der Leber untersucht. Auf diese Weise konnten die Ergebnisse validiert werden und insbesondere der hepatische Ursprung der Zytokine nachgewiesen werden.

### 3.2.3 Untersuchung der Genexpressions-Level von Lipocalin 2

Da Lipocalin 2 in der Microarray-Analyse hochreguliert war, wurde dieses Gen zunächst mittels qRT-PCR näher untersucht: In den drei untersuchten Altersstufen von 5, 12 und 26 Wochen alten Mäusen fällt auf, dass *lcn2* im HBs-transgenen Modell (oranger Balken) im Gegensatz zum Wildtyp (blauer Balken) erhöht ist. In der Gruppe der 5 Wochen alten Mäuse ist dieser Unterschied statistisch signifikant. Unter einwöchiger Behandlung mit

4-PBA ist in allen Altersstufen ein Anstieg der Genexpression von *lcn2* zu beobachten (grauer Balken). In der Gruppe der 26 Wochen alten Mäuse ist die *lcn2*-Genexpression nach einwöchiger 4-PBA Behandlung signifikant erhöht im Gegensatz zum HBs-transgenen Modell ohne Behandlung. Auch unter achtwöchiger Behandlung mit 4-PBA in 12 Wochen alten Mäusen (gelber Balken) ist die *lcn2*-Genexpression signifikant erhöht.

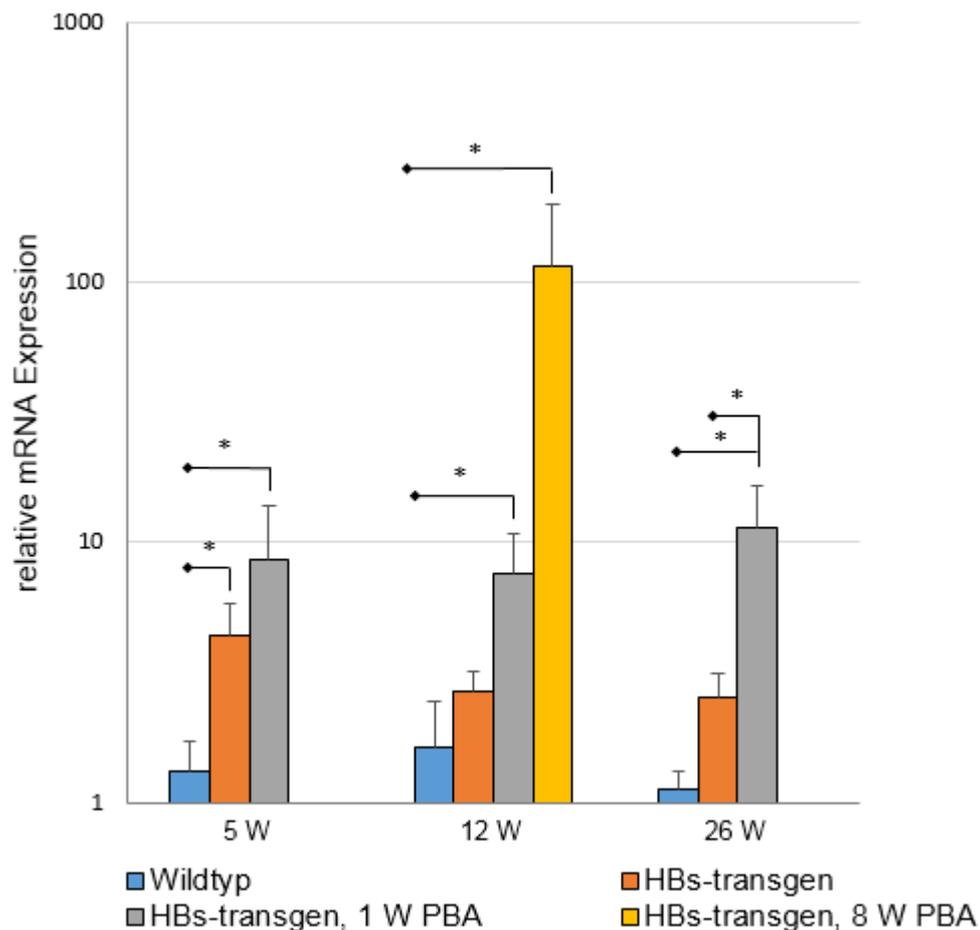


Abbildung 17: Die quantitative Beurteilung der differentiellen Genexpression von *lcn2* zeigt eine Hochregulation des Gens im HBs-transgenen Maus-Modell und unter PBA-Behandlung. Untersucht wurde hepatische mRNA 5, 12 und 26 Wochen alter BALB/c Mäuse (♂+♀). Der Fehlerbalken repräsentiert den Standardfehler. Zur Vereinfachung der Darstellung wurde eine Logarithmus-Skala gewählt. **Blau:** Wildtyp BALB/c, **Orange:** HBs-transgen, **Grau:** HBs-transgen, 1 Woche PBA Behandlung (1 W PBA), **Gelb:** HBs-transgen, 8 Wochen PBA Behandlung (8 W PBA). Statistische Signifikanzen: \* p-Wert < 0,05

### 3.2.4 Geschlechtsspezifische Analyse der Genexpression von Lipocalin 2

Die Genexpression von Lipocalin 2 wurde in 12 Wochen alten BALB/c Mäusen auch in Bezug auf Geschlechtsunterschiede hin analysiert. Die Induktion der Genexpression des Akut-Phase-Proteins ist in männlichen Proben im Vergleich zu den weiblichen Proben

höher – Zwischen der Genexpression von *lcn2* in weiblichen, unbehandelten HBs-transgenen Mäusen und der männlicher, unbehandelter Kontrollen besteht ein statistisch signifikanter Unterschied. Darüber hinaus weisen die Proben männlicher Tiere unter PBA-Behandlung höhere Expressionslevel auf. Der Anstieg von *lcn2* unter 4-PBA in den männlichen Mäusen ist mit und ohne Behandlung statistisch signifikant im Vergleich zum Wildtyp.

Zusammenfassend sind die Resultate dieser Analyse:

- Die Genexpression von *lcn2* ist in männlichen HBs-transgenen Mäusen signifikant erhöht.
- Die männlichen Mäuse erreichen unbehandelt sowie unter Behandlung mit 4-PBA höhere Level der *lcn2*-mRNA verglichen mit der mRNA weiblicher Mäuse. Somit reagieren männliche Tiere stärker und sensitiver auf die intrazellulären Veränderungen, die durch die Behandlung mit dem Chaperon verursacht werden.

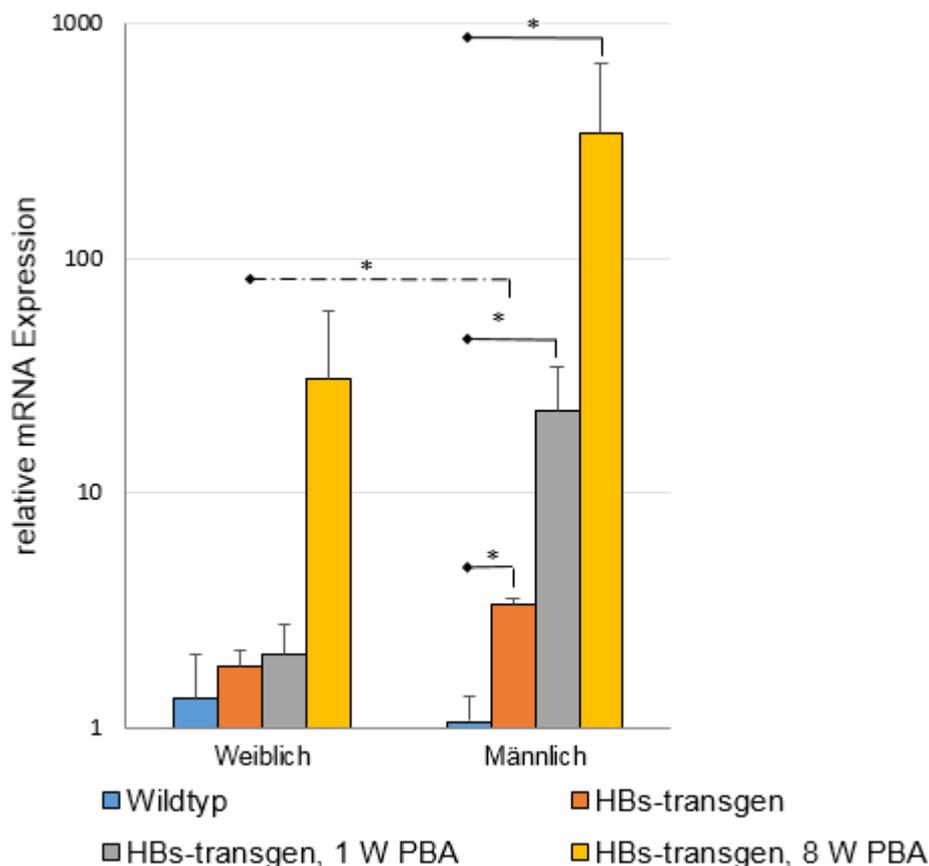


Abbildung 18: Die quantitative Darstellung der differentiellen Genexpression von *lcn2* zeigt eine verstärkte Hochregulation des Gens in Lebern männlicher BALB/c Mäuse verglichen mit weiblichen Mäusen. Untersucht wurde hepatische mRNA 12 Wochen alter BALB/c Mäuse. Der gestrichelte Balken zeigt einen Signifikanzunterschied zwischen HBs-transgenen unbehandelten weiblichen Proben und den unbehandelten männlichen Proben. Der Fehlerbalken repräsentiert den Standardfehler. Zur Vereinfachung der Darstellung

wurde eine Logarithmus-Skala gewählt. **Blau:** Wildtyp BALB/c, **Orange:** HBs-transgen, **Grau:** HBs-transgen, 1 Woche PBA Behandlung (1 W PBA), **Gelb:** HBs-transgen, 8 Wochen PBA Behandlung (8 W PBA). Statistische Signifikanzen: \* p-Wert < 0,05

### 3.2.5 Untersuchung von Lipocalin 2 auf Proteinebene

Um die transkriptionellen Ergebnisse zu bestätigen, wurden Western Blot Analysen zum Nachweis von Lcn2 von Lebergewebe-Lysaten der 12 Wochen alten BALB/c Mäuse durchgeführt (s. Abbildung 19 oben). Auf Proteinebene zeigte sich, dass die Expression von Lcn2 bei den weiblichen Individuen inhomogen ist (links dargestellt). Im Vergleich zu den männlichen HBs-transgenen Proben ohne 4-PBA Behandlung ist Lcn2 in den weiblichen transgenen Mäusen stärker exprimiert. Unter einwöchiger und achtwöchiger Behandlung mit 4-PBA ist die Lcn2 Expression in männlichen Mäusen deutlich verstärkt. Darüber hinaus lässt sich eine stärkere Proteinexpression von Lcn2 nach längerer Behandlungsdauer mit 4-PBA beobachten. Wie bei den Ergebnissen der qRT-PCR zeigt sich in den männlichen Tieren ein Unterschied zwischen Wildtyp und den HBs-transgenen Mäusen: Unbehandelte HBs-transgene Mäuse auf genetischem BALB/c Hintergrund exprimieren demnach mehr Lcn2 als BALB/c Wildtypen. Das Expressionsmuster von Lcn2 in männlichen Mäusen korreliert im Alter von 12 Wochen mit der transkriptionellen Regulation (vgl. Kapitel 3.2.4, Abbildung 18).

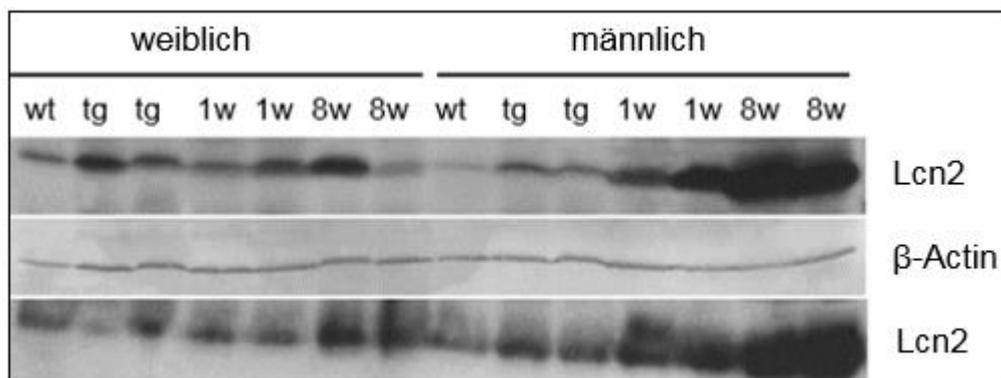


Abbildung 19: Die Proteinexpression von Lcn2 steigt unter PBA-Behandlung in HBs-transgenen Mäusen an. Die Western Blot-Analysen wurden mit Proteinlysaten von Leberproben (oberer Blot) und Serumproben (unterer Blot) 12 Wochen alter BALB/c Mäuse durchgeführt. Als Ladekontrolle des oberen Blots diente  $\beta$ -Actin; der untere Blot ist durch die Auftragung gleicher Serum-Mengen normiert. Wt = Wildtyp; tg = HBs-transgen; 1w = HBs-transgen, 1 Woche PBA Behandlung; 8w = HBs-transgen, 8 Wochen PBA Behandlung

Weiterhin wurde ein Western Blot von Serum-Proben der Gruppe der 12 Wochen alten Mäuse unternommen (s. Abbildung 19 unten). Auch im Serum steigt die Proteinexpression von Lcn2 in männlichen Mäusen abhängig von der Behandlungsdauer mit 4-PBA an und spiegelt das Ergebnis des oberen Blots wider. Im Serum weiblicher Mausproben zeigen sich keine Unterschiede zwischen HBs-transgenen Mäusen und den Mäusen, die eine Woche mit 4-PBA behandelt wurden. Nach 8 Wochen Behandlung ist die Expression von Lcn2 auch bei den weiblichen Individuen erhöht, was für einen PBA-Effekt sprechen könnte. Die erhöhte Proteinexpression von Lcn2 im Serum der über acht Wochen behandelten weiblichen HBs-transgenen Mäuse korreliert mit der Erhöhung der Lcn2-mRNA in der Leber dieser Mäuse (vgl. Kapitel 3.2.4, Abbildung 18).

Die Ergebnisse der Western Blots zeigen, dass die Lcn2 Expression im HBs-transgenen Maus-Modell ohne Behandlung verglichen mit dem Wildtyp erhöht ist. Unter Behandlung mit 4-PBA steigt die Lcn2 Expression weiter an, insbesondere bei Proben männlicher Mäuse. Die Dauer der Behandlungszeit korreliert mit der Höhe des Lcn2-Levels. Der Serum-Blot zeigt außerdem, dass hepatisches Lcn2 über das Blut im gesamten Organismus verteilt wird und unter Umständen auch extrahepatische Prozesse beeinflussen kann.

### 3.2.6 Immunhistochemische Darstellung von Lipocalin 2

Die immunhistochemische Untersuchung von Lcn2 in der Leber wurde an Proben 12 und 26 Wochen alter HBs-transgener BALB/c Mäuse durchgeführt. Es sollte die intrahepatische Verteilung von Lcn2 in behandelten und unbehandelten Mäusen verglichen werden. In den Abbildungen ist ein deutlicher Unterschied zwischen der Probe der Leber einer HBs-transgenen, unbehandelten Maus (A) und den Proben der Mäuse zu sehen, die mit 4-PBA behandelt wurden (B-D).

In Abbildung 20 A ist Lebergewebe einer HBs-transgenen, unbehandelten BALB/c Maus dargestellt: Dort sind nur vereinzelt Zellen angefärbt. Diese Zellen sind bildmorphologisch kleiner als die benachbarten Hepatozyten. Da Lcn2 in den Granula neutrophiler Granulozyten vorkommt, könnte es sich bei den einzeln angefärbten Zellen um Leukozyten handeln<sup>84</sup>. Unter einwöchiger Behandlung mit 4-PBA (B) sind auch die Hepatozyten angefärbt. Einige Areale in der Leber sind stärker gefärbt als andere. Auch in diesem Bild fallen zusätzliche stark angefärbte Zellen auf, bei denen es sich am ehesten um neutrophile Granulozyten handeln könnte. In den Abbildungen 20 C und 20 D zeigt sich, dass

Lcn2 bei fortdauernder Behandlung in den Hepatozyten um die Glisson-Trias stärker exprimiert ist und dass die Expression im Bereich der Zentralvene schwächer wird. Des Weiteren fällt auf, dass unter achtwöchiger Behandlung (C) keine vereinzelt Zellen Lcn2 positiv gefärbt sind.

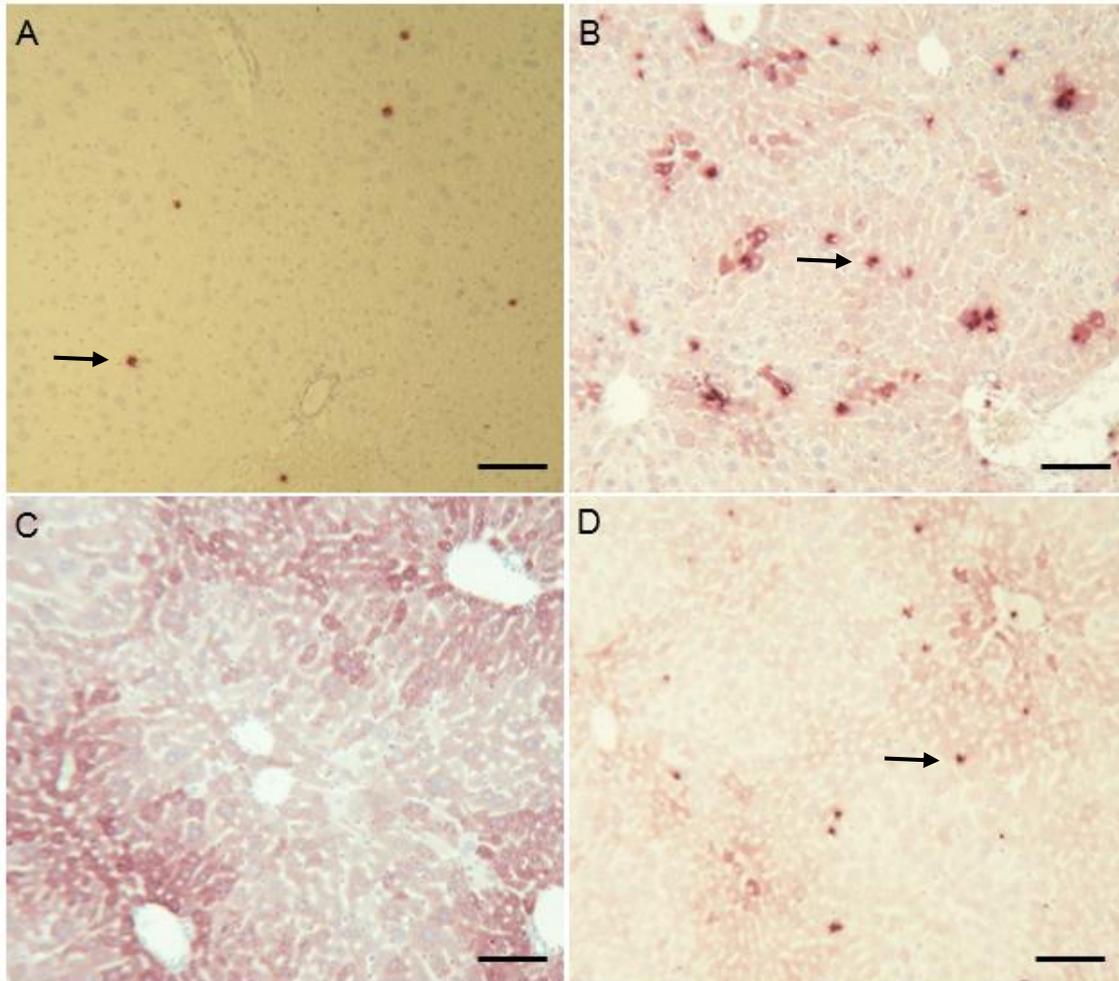


Abbildung 20: Die immunhistochemische Färbung von Lcn2 (hier rötlich gefärbt) in Leberschnitten zeigt eine **periportale Anreicherung** des Proteins unter achtwöchiger Behandlung mit 4-PBA (C). Untersucht wurden Leberproben 12 Wochen alter, männlicher BALB/c Mäuse (A-C) und einer 26 Wochen alten BALB/c Maus (D). Die Pfeile markieren Lcn2-positive Zellen, bei denen es sich um neutrophile Granulozyten handeln könnte. Vergrößerung 200 $\times$ . Messbalken  $\cong$  50  $\mu$ m. A) HBs-transgen, B) HBs-transgen, 1 Woche PBA-Behandlung, C) HBs-transgen, 8 Wochen PBA-Behandlung, D) HBs-transgen, 1 Woche PBA-Behandlung

Insgesamt korrelieren die Ergebnisse der *Immunhistochemie* (IHC) mit denen aus den qRT-PCR und Western Blot Experimenten bezüglich Lcn2. Eine längere Behandlung mit 4-PBA bewirkt eine gesteigerte Lcn2 Expression in der Leber. Zudem suggeriert dieser Versuch einen neuen Befund: 4-PBA scheint in den unterschiedlichen Zonen der Leber

unterschiedlich stark zu wirken. Dieser Aspekt wurde auch in weiteren Analysen beobachtet und berücksichtigt.

### 3.2.7 Transkriptionelle Analyse weiterer Gene

Neben dem *lcn2*-Gen waren in der bereits genannten Microarray-Analyse (vgl. 3.2.1) weitere Gene nach PBA-Behandlung im HBs-transgenen Maus-Modell hochreguliert. Diese sollten auf Genexpressionsebene mittels qRT-PCR untersucht werden, um die Ergebnisse aus der Microarray-Analyse zu validieren. Einige der hochregulierten Gene, wie beispielsweise *saa1* und *saa2*, wurden bereits in Vorarbeiten untersucht<sup>132,133</sup>. In der vorliegenden Arbeit sollten diese Untersuchungen an hepatischer mRNA 12 Wochen alter BALB/c Mäuse fortgesetzt werden.

Gen	Fold change HBs-transgen	Fold change HBs-transgen, 1 W PBA	Fold change HBs-transgen, 8 W PBA
<i>saa3</i>	2,51(*)	4,36 (*)	1,64 (~)
<i>pip5k1α</i>	0,73	0,81 (#)	0,63 (*;~)
<i>fgl1</i>	0,76	1,32	2,06
<i>ly6d</i>	43,1 (*)	50,96 (*)	46,53 (*)
<i>fgf21</i>	6,98 (*)	2,92 (*;#)	5,85 (*;~)
<i>orm1</i>	0,84	1,49	1,45

Tabelle 14: Die quantitative Beurteilung der differentiellen Genexpression ausgewählter Gene ist hier tabellarisch dargestellt. Alle dargestellten Gene waren in der Microarray-Analyse durch eine Hochregulation nach achtwöchiger PBA-Behandlung aufgefallen. Die Ergebnisse der hier gezeigten qRT-PCR korrelieren kaum mit den Ergebnissen der Microarray-Analyse. Untersucht wurde Leber-mRNA 12 Wochen alter BALB/c Mäuse. Abkürzungen: 1 W PBA = HBs transgen, 1 Woche PBA Behandlung, 8 W PBA = HBs transgen, 8 Wochen PBA Behandlung, Statistische Signifikanzen: \* p-Wert<0,05 im Vergleich zum Wildtyp, # p-Wert<0,05 im Vergleich zu HBs-transgen, ~ p-Wert<0,05 im Vergleich zu 1 Woche PBA Behandlung

Mit Ausnahme der Genexpression von *Fibrinogen like protein 1 (fgl1)* korrelieren die Ergebnisse nicht mit den Ergebnissen der Microarray-Analyse. Bei der Microarray-Analyse war die Genexpression von *saa3*, *pip5k1α*, *fgl1*, *ly6d*, *fgf21* und *orm1* nach achtwöchiger PBA-Behandlung im Vergleich zum unbehandelten, transgenen Modell hochreguliert. Nach Durchführung der qRT-PCR kann eine Hochregulation nach achtwöchiger Behandlung nur für *fgl1* bestätigt werden. Da für die Microarray-Analyse ausschließlich Leber-mRNA männlicher Proben verwendet wurden, ist diese nur bedingt vergleichbar mit der qRT-PCR, in der auch weibliche Proben hinzugezogen worden sind. Ein weiterer

Grund für die Diskrepanz der Ergebnisse zwischen Microarray und qRT-PCR könnte die erhöhte Störanfälligkeit des Arrays sein, da diese Methode viele Gene gleichzeitig untersucht und so ein massives Datenvolumen produziert.

In der qRT-PCR sind *Serumamyloid A3 (saa3)* und *Fibroblast growth factor 21 (fgf21)* jedoch nach einwöchiger PBA-Gabe hochreguliert. Da beides Gene der APR sind, wird somit dennoch ein positiver Zusammenhang zwischen der Gabe von PBA und der Auslösung der APR bestätigt. Die Genexpression von *saa3* ist nach einwöchiger Behandlung mit 4-PBA hochreguliert, wohingegen sie nach achtwöchiger Behandlung herunterreguliert ist. Die relative mRNA-Expression von *fgf21* ist im unbehandelten, HBs-transgenen Maus-Modell verglichen mit dem Wildtyp signifikant erhöht. Nach einer Woche Behandlung mit dem Chaperon ist die Expression des Gens signifikant herunterreguliert. Achtwöchige Behandlung mit 4-PBA bewirkt einen erneuten signifikanten Anstieg der Genexpression von *fgf21*. Auffällig ist zudem die deutliche Hochregulation von *Lymphocyte antigen 6 family member D (ly6d)* im HBs-transgenen Maus-Modell verglichen zum Wildtyp. Die Regulation ist nicht durch 4-PBA beeinflusst. *Ly6d* spielt eine Rolle bei der Differenzierung von B-Lymphozyten aus Progenitorzellen<sup>134</sup>.

### 3.2.8 Analyse der Genexpression proinflammatorischer Zytokine

Zytokine sind an der Initiation der Akut-Phase-Antwort beteiligt. Sie können aber auch durch Akut-Phase-Proteine wie *Saa1* und *Lcn2* induziert werden<sup>75-77</sup>. Ihre Expression sollte daher näher untersucht werden. In Vorarbeiten wurde ein Proteom Profiler Array aus Seren 12 Wochen alter BALB/c Mäuse durchgeführt. In den mit 4-PBA behandelten Mäusen konnte ein Anstieg der proinflammatorischen Zytokine (u.a. *ip10*, *mcp1* und *cxcl1*) beobachtet werden<sup>132,133</sup>. Ob der Anstieg dieser Zytokine im Serum bedingt ist durch vermehrte Synthese in der Leber, sollte im folgenden Experiment evaluiert werden: Die relative mRNA Expression von Genen verschiedener Zytokine wurde mittels qRT-PCR analysiert.

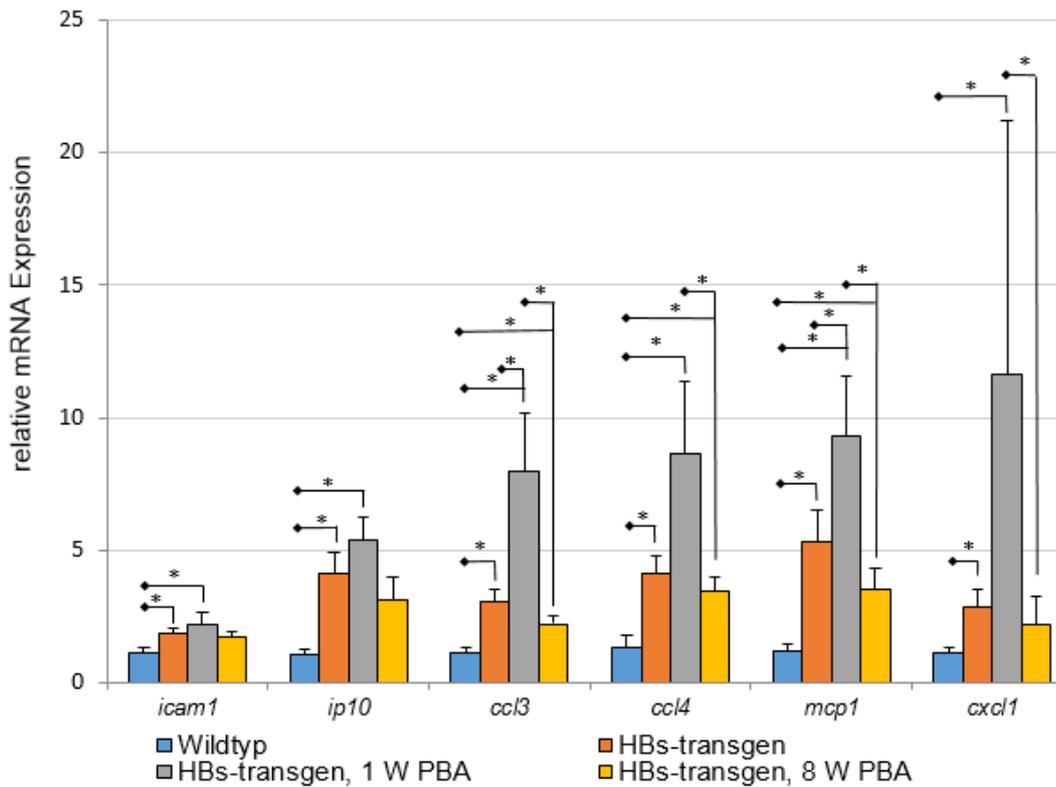


Abbildung 21: Die quantitative Beurteilung der differentiellen Genexpression ausgewählter **Zytokine** zeigt eine Hochregulation in HBs-transgenen Mäusen nach einwöchiger PBA-Behandlung und eine Herunterregulation nach achtwöchiger Behandlung mit 4-PBA. Untersucht wurde Leber-mRNA 12 Wochen alter HBs-transgener BALB/c Mäuse. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. **Blau:** Wildtyp BALB/c, **Orange:** HBs-transgen, **Grau:** HBs-transgen, 1 Woche PBA Behandlung (1 W PBA), **Gelb:** HBs-transgen, 8 Wochen PBA Behandlung (8 W PBA). Statistische Signifikanzen: \* p-Wert<0,05

Die Analyse der Genexpression verschiedener Zytokine in der Leber 12 Wochen alter BALB/c Mäuse zeigt, dass die einwöchige Behandlung mit 4-PBA zu erhöhten Zytokin-Leveln führt (grauer Balken). Nach achtwöchiger Behandlungsdauer (gelber Balken) sinken diese Level wieder auf das Niveau der unbehandelten transgenen Tiere und unterscheiden sich zum Teil signifikant von den Werten der einwöchig behandelten HBs-transgenen Mäuse (*ccl3*, *ccl4*, *ccl2*, *cxcl1*). Außerdem wird deutlich, dass HBs-transgene Mäuse ohne Behandlung (oranger Balken) erhöhte Zytokin-Werte im Vergleich zum Wildtyp (blauer Balken) vorweisen. Dieser Unterschied ist in allen dargestellten Zytokinen signifikant.

Gen	Fold change HBs-transgen	Fold change HBs-transgen, 1 W PBA	Fold change HBs- transgen,8 W PBA
<i>c3/c3a</i>	0,71	0,75	0,74
<i>c5/c5a</i>	1,07	1,21	0,75 #~
<i>cxcl13</i>	0,71	0,71	0,49
<i>ccl11</i>	2,66	1,43	0,96

Tabelle 15: Die quantitative Beurteilung der differentiellen Genexpression von Genen des Komplementsystems und weiterer proinflammatorischer Zytokine zeigte keine relevanten Unterschiede. Untersucht wurde Leber-mRNA 12 Wochen alter BALB/c Mäuse. Abkürzungen: 1 W PBA = HBs transgen, 1 Woche PBA Behandlung, 8 W PBA = HBs transgen, 8 Wochen PBA Behandlung. Statistische Signifikanzen: \* p-Wert<0,05 im Vergleich zum Wildtyp, # p-Wert<0,05 im Vergleich zu HBs-transgen, ~ p-Wert<0,05 im Vergleich zu 1 Woche PBA

Auch die Genexpression der Komplementfaktoren *C3/C3a* und *C5/C5a* wurde analysiert. Deren Genexpression war im Vergleich zum Wildtyp jedoch kaum verändert. Die mRNA des Komplementfaktors *C3/C3a* war in den Proben des Maus-Modells (HBs-transgen, 1 W PBA, 8 W PBA) verglichen mit der Expression im Wildtyp herunterreguliert (vgl. Tabelle 15).

Zusammenfassend können aus diesem Experiment folgende Schlüsse gezogen werden:

- In HBs-transgenen Mäusen kommt es auch ohne PBA-Behandlung zu einem inflammatorischen Prozess, denn die Genexpression der Zytokine steigt verglichen mit der Genexpression der Zytokine in Wildtypen an. Dieser inflammatorische Prozess nimmt nach einwöchiger Behandlung mit 4-PBA zu.
- Die nach achtwöchiger Behandlung mit 4-PBA verminderten Level der Genexpression von Zytokinen könnten für einen Rückgang der inflammatorischen Prozesse in der Leber sprechen.

### 3.2.9 Untersuchung von Genen der Interferon-Antwort auf mRNA- und Proteinexpressionsebene

Auch Interferone gehören zu den Zytokinen, die während der Initiation der APR freigesetzt werden <sup>68</sup>. Darum wurden zwei Gene der Interferon-Antwort, *ifit1* und *isg15*, auf Gen- und Proteinexpressionsebene untersucht.

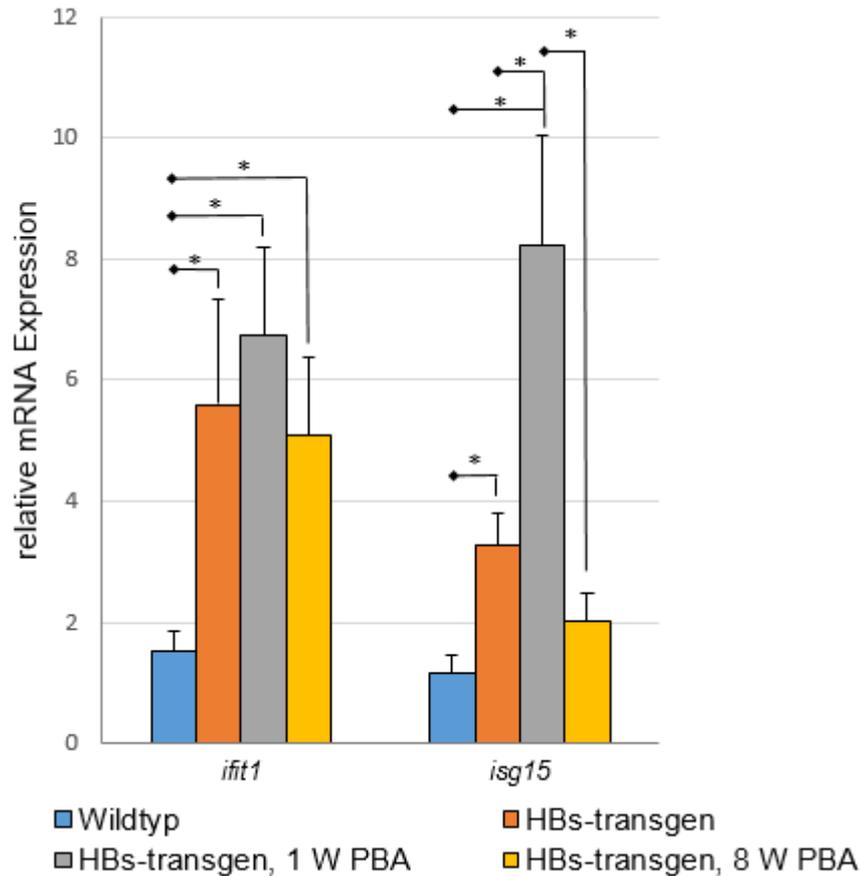


Abbildung 22: Die quantitative Beurteilung der differentiellen Genexpression von **Genen der Interferon-Antwort** zeigt eine Hochregulation in HBs-transgenen Mäusen unter einwöchiger Behandlung mit 4-PBA und eine Herunterregulation nach achtwöchiger PBA Behandlung. Untersucht wurde hepatische mRNA 12 Wochen alter BALB/c Mäuse. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. **Blau:** Wildtyp BALB/c, **Orange:** HBs-transgen, **Grau:** HBs-transgen, 1 Woche PBA Behandlung (1 W PBA), **Gelb:** HBs-transgen, 8 Wochen PBA Behandlung (8 W PBA). Statistische Signifikanzen: \* p-Wert<0,05

Die Genexpression von *ifit1* ist im HBs-transgenen Modell unabhängig von der Behandlung mit 4-PBA signifikant hochreguliert im Vergleich zum Wildtyp. Die PBA-Behandlung bewirkt nur geringe Unterschiede in der Genexpression, wobei die höchsten Werte der relativen mRNA Expression nach einwöchiger Behandlung detektiert wurden. Die Genexpression von *isg15* hingegen ist stärker durch 4-PBA reguliert. Nach einer Woche 4-PBA Behandlung ist *isg15* im Vergleich zum HBs-transgenen, unbehandelten Modell signifikant erhöht. Nach 8 Wochen Behandlung ist die Genexpression signifikant herunterreguliert verglichen mit der Genexpression in einwöchig behandelten HBs-transgenen Mäusen.

Das Muster der Genexpression von *ifit1* und *isg15* ähnelt den Ergebnissen der qRT-PCR-Analysen der proinflammatorischen Zytokine (vgl. 3.2.8) und setzt ihren Trend fort: Auf

eine verstärkte Zytokin-Expression nach 1 Woche PBA-Behandlung folgt eine Verminderung der Genexpression nach achtwöchiger Behandlung.

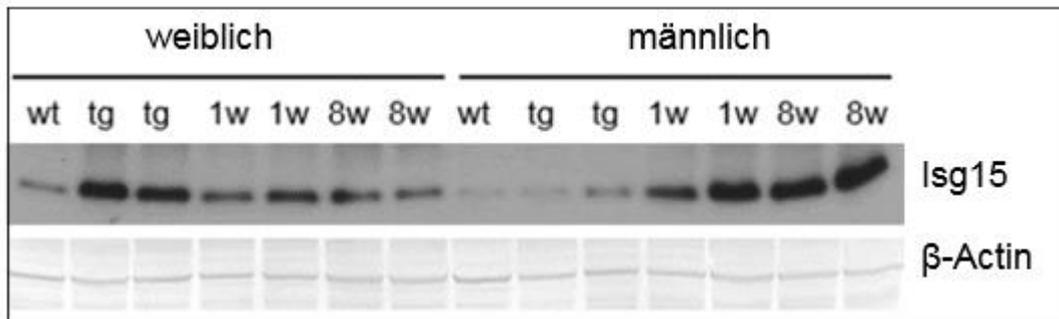


Abbildung 23: Die Proteinexpression von Isg15 in der Leber nimmt in den Proben weiblicher HBs-transgener Mäuse unter PBA-Behandlung ab und in den männlichen transgenen Mäusen unter PBA-Behandlung zu. Als Ladekontrolle diente der Blot mit  $\beta$ -Actin. Wt = Wildtyp; tg = HBs-transgen; 1w = HBs-transgen, 1 Woche PBA Behandlung; 8w = HBs-transgen, 8 Wochen PBA Behandlung

Um den möglichen Effekt von 4-PBA auf Isg15 zu bestätigen, wurde die Proteinexpression überprüft (s. Abbildung 23). Das Ergebnis des Western Blots korreliert nicht mit der Genexpressions-Analyse aus den Versuchen der qRT-PCR. Jedoch zeigt der Western Blot interessante Aspekte im Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Mäusen. Erwartungsgemäß ist in beiden Geschlechtern die Expression des Proteins im Wildtyp schwach. In HBs-transgenen, unbehandelten weiblichen Mäusen ist Isg15 stark erhöht, während es in den männlichen Mäusen dieser Gruppe deutlich schwächer exprimiert wird. Unter PBA-Behandlung nimmt die Expression von Isg15 bei weiblichen Mäusen im Vergleich zur unbehandelten Maus ab. In männlichen Mäusen verhält sich der Effekt konträr: Unter Behandlung steigt die Expression des Isg15 Proteins an.

Die Ergebnisse der qRT-PCR und des Western Blots von Isg15 zeigen, dass 4-PBA Einfluss auf die Interferon-Antwort hat. Der Western Blot zeigt zudem, dass der Verlauf der Immunreaktion geschlechtsabhängig ist. Unter 4-PBA Behandlung konnte die Interferon-Antwort bei weiblichen Mäusen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle abgeschwächt werden, wohingegen sie bei männlichen Mäusen unter Behandlung verstärkt wird. Die bisherigen Ergebnisse suggerieren, dass 4-PBA eine verstärkte Interferon-Antwort und Akut-Phase-Antwort in männlichen Mäusen bewirkt.

### 3.3 Untersuchung der Stat-Familie (Signal transducer and activator of transcription)

#### 3.3.1 Untersuchung des Transkriptionsfaktors Stat3

Stat3 ist ein Protein, das nach Aktivierung durch Il6 die Expression von Genen der Akut-Phase-Antwort fördert. Daher wurde Stat3 anfangs als *Acute phase response factor* (APRF) beschrieben<sup>99</sup>. Da phosphoryliertes Stat3 als Transkriptionsfaktor an der Regulation der in dieser Arbeit hochregulierten Gene, insbesondere Lcn2, beteiligt sein könnte, wurde es auf Proteineexpressionsebene in 12 Wochen alten BALB/c Mäusen geprüft.

Der Western Blot in Abbildung 24 zeigt, dass die Phosphorylierung des Proteins bei männlichen Mäusen unter ein- und achtwöchiger Behandlung mit 4-PBA erhöht ist. In den Wildtypen ist keine Bande zu sehen. In weiblichen und männlichen HBs-transgenen Mäusen ohne Behandlung (tg) zeigt die Western Blot-Analyse kaum erkennbare Banden. Somit liegt kaum phosphoryliertes Stat3 in den Lebern dieser Mäuse vor. Unter Behandlung mit 4-PBA ist die Expression in den weiblichen Mäusen genau so schwach wie in den unbehandelten Kontrollen. Das Muster der Phosphorylierung von Stat3 in männlichen Mäusen korreliert mit den Western Blot-Analysen von Lcn2 und Isg15. Eine längere Behandlung männlicher HBs-transgener BALB/c Mäuse mit 4-PBA bewirkt eine stärkere Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors Stat3.

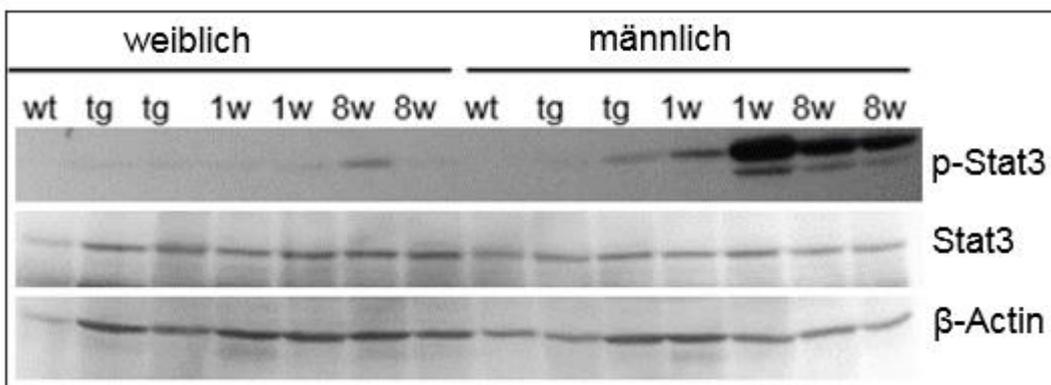


Abbildung 24: Die Phosphorylierung von Stat3 in Leberproben männlicher Mäuse nimmt unter PBA-Behandlung zu. Die Western-Blot Analysen wurden mit Proteinlysaten von Leberproben 12 Wochen alter BALB/c Mäuse durchgeführt. Als Ladekontrollen dienten die Blots mit Stat3 und  $\beta$ -Actin. Wt = Wildtyp; tg = HBs-transgen; 1w = HBs-transgen, 1 Woche PBA Behandlung; 8w = HBs-transgen, 8 Wochen PBA Behandlung

### 3.3.2 Untersuchung des Transkriptionsfaktors Stat5

Zunächst wurde die Phosphorylierung von Stat5 in 12 Wochen alten BALB/c mittels Western Blot untersucht (Abbildung 25). Dabei wurde beobachtet, dass Stat5 in HBs-transgenen, männlichen Mäusen ohne PBA-Behandlung kaum phosphoryliert ist. Im männlichen Wildtyp sowie in allen Proben weiblicher Mäuse konnte hingegen eine starke Phosphorylierung von Stat5 nachgewiesen werden. Unter Behandlung mit 4-PBA in männlichen, HBs-transgenen BALB/c Mäusen kommt es verglichen mit den unbehandelten, männlichen Mäusen wieder zu einer Phosphorylierung von Stat5.

Außerdem ist zu erkennen, dass die Phosphorylierung von Stat5 in den weiblichen Mäusen im Gegensatz zu den männlichen Mäusen verstärkt ist. Bei den weiblichen Proben ist kein Effekt durch 4-PBA zu beobachten. Es zeigte sich außerdem eine Heterogenität der Proteinexpression innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen.

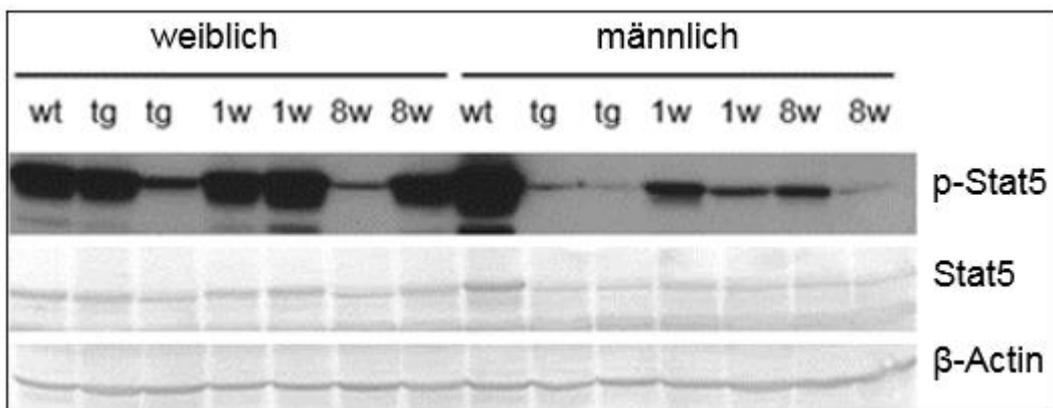


Abbildung 25: Eine verminderte Phosphorylierung von Stat5 in männlichen HBs-transgenen Mäusen ohne PBA-Behandlung konnte gezeigt werden. Die Western-Blot Analysen wurden mit Proteinlysaten von Leberproben 12 Wochen alter BALB/c Mäuse durchgeführt. Als Ladekontrolle dienten die Blots mit Stat5 und  $\beta$ -Actin. Wt = Wildtyp; tg = HBs-transgen; 1w = HBs-transgen, 1 Woche PBA Behandlung; 8w = HBs-transgen, 8 Wochen PBA Behandlung

Weiterhin wurden auch die 5 und 26 Wochen alten BALB/c Mäuse überprüft (vgl. Abbildung 26). Die Ergebnisse sind inhomogen. Ähnlichkeiten zu dem Western Blot der 12 Wochen alten Mäuse gibt es dennoch: Die männlichen Wildtypen in den Gruppen der 5 und 26 Wochen alten BALB/c Mäuse weisen wie der 12 Wochen alte BALB/c Wildtyp eine starke Phosphorylierung von Stat5 auf. Die Phosphorylierung von Stat5 in den HBs-transgenen, unbehandelten männlichen Proben wirkt daneben eher schwach. Ähnlich verhält es sich im unbehandelten HBs-transgenen Modell der 12 Wochen alten männlichen

BALB/c Mäuse. Verglichen mit der Phosphorylierung von Stat5 in 12 Wochen alten, weiblichen BALB/c Mäusen, ist Stat5 in den 5 und 26 Wochen alten, weiblichen Mäusen weniger phosphoryliert.

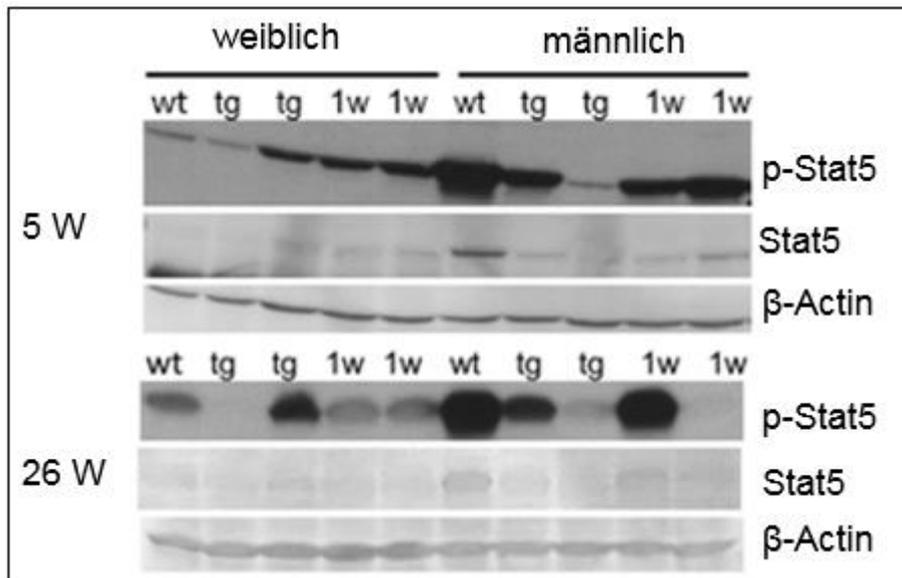


Abbildung 26: Dargestellt ist die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Stat5. Die Western Blot-Analysen wurden mit Proteinlysaten von Leberproben 5 Wochen (5 W) und 26 Wochen (26 W) alter BALB/c Mäuse durchgeführt. Als Ladekontrollen dienten die Blots mit Stat5 und  $\beta$ -Actin. Wt = Wildtyp; tg = HBs-transgen; 1w = HBs-transgen, 1 Woche PBA Behandlung; 8w = HBs-transgen, 8 Wochen PBA Behandlung

Die Experimente mit phosphoryliertem Stat5 zeigen, dass die Behandlung mit 4-PBA in weiblichen sowie in männlichen Mäusen teils zu einer vermehrten Phosphorylierung von Stat5 führt. Der Effekt, der in den 12 Wochen alten, männlichen Mäusen beobachtet wurde, konnte in den anderen Altersgruppen weniger deutlich beobachtet werden. Interessant ist zudem, dass die Phosphorylierung von Stat5 nur in der Gruppe der 12 Wochen alten, weiblichen Mäuse verstärkt ist.

Die Ergebnisse werfen die Frage auf, wie es zu der verminderten Phosphorylierung von Stat5 in 12 Wochen alten HBs-transgenen, männlichen Mäusen kommt und warum nach Behandlung mit 4-PBA Stat5 wieder phosphoryliert und somit aktiviert wird. Die folgenden Versuche beschäftigen sich daher mit Proteinen, die mit der Aktivierung oder Deaktivierung von Stat5 in Verbindung gebracht werden, aber auch mit Up- und Downstream-Elementen des Signalweges, um die aufgeworfenen Fragestellungen zu beantworten.

### 3.3.3 Analyse von Genen und Proteinen des Stat5 Signalwegs

Der Stat5 Signalweg wurde mit dem Fokus auf die HBs-transgenen, männlichen 12 Wochen alten Mäuse untersucht. In der Abbildung ist grob dargestellt, inwiefern die untersuchten Gene und Proteine mit Stat5 in Verbindung gebracht werden können.

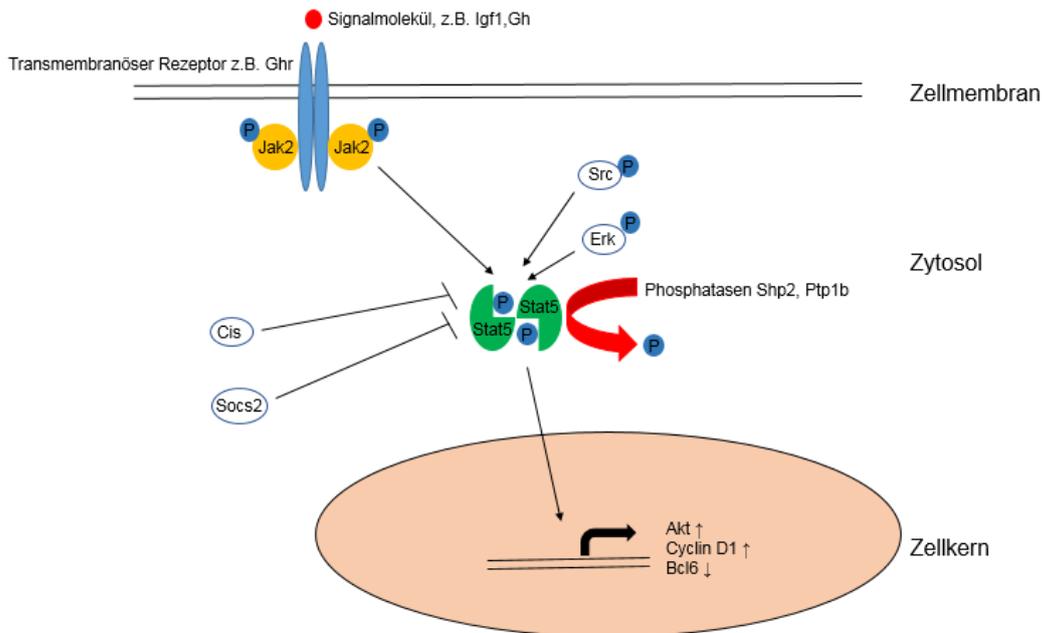


Abbildung 27: Stark vereinfachte Abbildung zum Verständnis des Zusammenhangs zwischen Stat5 und den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Genen und Proteinen. Extrazelluläre Signalmoleküle wie beispielsweise Gh und Igf1 aktivieren Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Deren Kinaseaktivität führt zur Phosphorylierung und Aktivierung von rezeptorassoziierten Kinasen. Da in dieser Arbeit Jak2 untersucht wurde, ist diese Kinase in der Abbildung gezeigt. Wenn sie aktiv ist, phosphoryliert sie Stat5. Stat5 kann jedoch auch durch andere Kinasen aktiviert werden, beispielsweise Erk oder der Tyrosinkinase Src. Cis und Socs2 wirken hemmend auf die Phosphorylierung von Stat5. Ist Stat5 phosphoryliert, bildet es Dimere, transloziert in den Nukleus und wirkt dort als Transkriptionsfaktor. Aktiviertes Stat5 fördert zum Beispiel die Genexpression von *Akt* und *Cyclin D1*, vermindert aber die Expression von *Bcl6*. Aktiviertes Stat5 kann durch Dephosphorylierung durch Phosphatasen wie Shp2 und Ptp1b deaktiviert werden.<sup>135–137,105,138–147</sup>

Die Genexpression von *igf1*, *cis* und *socs2* wurden mittels qRT-PCR in Leber mRNA 12 Wochen alter BALB/c Mäuse untersucht. Die Ergebnisse sind hier nicht dargestellt. Sie vermitteln, dass *igf1* nicht durch 4-PBA reguliert wird. Bei der Genexpressionsanalyse von *socs2* und *cis* war die Hypothese, dass ihre mRNA in HBs-transgenen, unbehandelten männlichen Mäusen hochreguliert ist: Da diese Gene hemmend auf die Aktivierung von Stat5 wirken, hätte sich so die verminderte Phosphorylierung von Stat5 in den männlichen, HBs-transgenen BALB/c Mäusen ohne Behandlung erklären können. Diese Hypothese wurde jedoch nicht bestätigt: die Genexpression von *cis* war inhomogen reguliert

und die Genexpression von *socs2* in 12 Wochen alten BALB/c mit einwöchiger PBA-Behandlung im Vergleich zum Wildtyp signifikant geringer.

Zusammenfassend zeigte sich, dass die Genexpression von *igf1*, *socs2* und *cis* nicht mit dem Muster der Phosphorylierung von Stat5 in männlichen 12 Wochen alten BALB/c Mäusen korreliert.

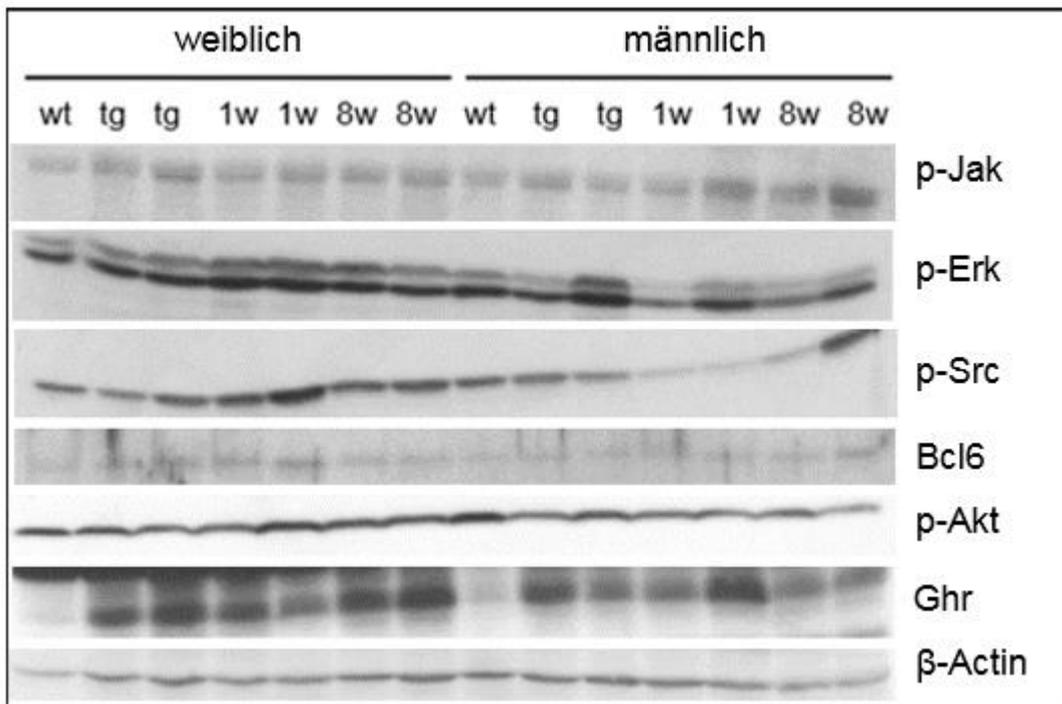


Abbildung 28: Die Aktivierung ausgewählter Proteine des Stat5 Signalwegs ist dargestellt. Die Western Blot-Analysen wurden mit Proteinlysaten von Leberproben 12 Wochen alter BALB/c Mäuse durchgeführt. Als Ladekontrolle diente der Blot mit  $\beta$ -Actin. Wt = Wildtyp; tg = HBs-transgen; 1w = HBs-transgen, 1 Woche PBA Behandlung; 8w = HBs-transgen, 8 Wochen PBA Behandlung

Des Weiteren wurden einige der Gene, die mit dem Stat5 Signalweg assoziiert sind (vgl. Abb. 27), auf ihre Proteinexpression in der Leber untersucht. Diese Untersuchungen sind in Abbildung 28 dargestellt. Das Expressionsmuster von *B cell lymphoma 6* (Bcl6) und *Growth hormone receptor* (Ghr) sowie das Muster der Phosphorylierung der Kinasen Src, *Extracellular-signal regulated kinase* (Erk), Akt und Jak2 korrelieren nicht mit dem Muster der Phosphorylierung von Stat5 in 12 Wochen alten BALB/c Mäusen. Die Analyse zeigte jedoch andere Aspekte: In mit 4-PBA behandelten, HBs-transgenen männlichen BALB/c Mäusen ist Jak2 stärker phosphoryliert. Die Phosphorylierung von Erk und der Tyrosinkinase Src ist in mit 4-PBA behandelten, männlichen 12 Wochen alten BALB/c Mäusen niedriger als in HBs-transgenen BALB/c ohne Behandlung sowie in Wildtypen

und allen weiblichen Mäusen (wt, tg, 1w, 8w). Die Phosphorylierung von Akt ist schwächer in männlichen HBs-transgenen Mäusen, unabhängig von ihrer Behandlung mit PBA. In diesem Experiment zeigten sich nicht nur Effekte durch die Behandlung mit 4-PBA sondern es konnten auch Unterschiede der Proteinexpression in der Leber HBs-transgener Mäuse verglichen mit den BALB/c Wildtypen nachgewiesen werden: So ist der Rezeptor des Wachstumsfaktors Somatotropin, Ghr, in den HBs-transgenen Mäusen unabhängig von Geschlecht und PBA-Behandlung im Gegensatz zum Wildtyp hochreguliert.

Zusammenfassend geht aus diesen Experimenten hervor, dass die Behandlung mit 4-PBA in männlichen Mäusen auf die Phosphorylierung der drei Kinasen Jak2, Erk und Src Einfluss nimmt.

Des Weiteren wurden Phosphatasen untersucht, die im Jak/Stat-Signalweg in Verbindung mit der Dephosphorylierung von phosphoryliertem Stat5 eine Rolle spielen (Abbildung 29). Dazu wurden die Phosphatasen *Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11* (Ptpn11, auch Shp2) und *Protein tyrosine phosphatase 1b* (Ptp1b) getestet<sup>144,146</sup>. Shp2 wurde in der Literatur speziell als Stat5a Phosphatase identifiziert<sup>145</sup>.

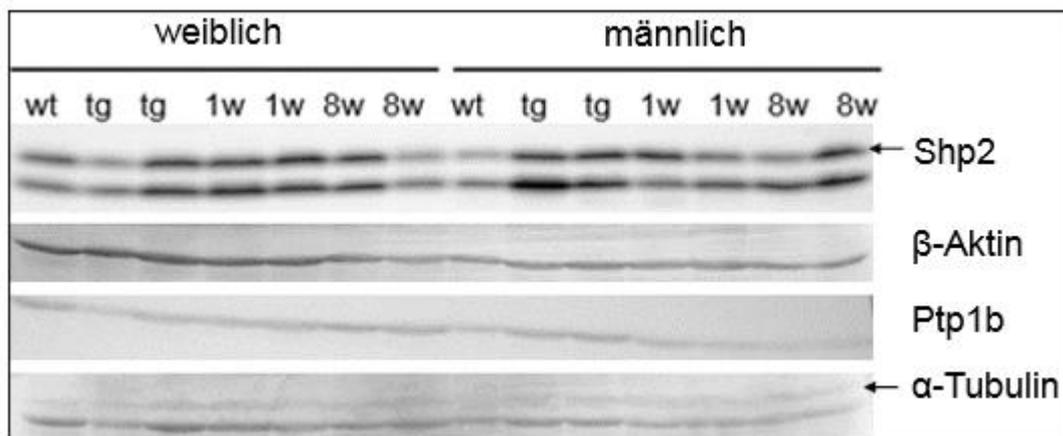


Abbildung 29: Die Phosphatasen Shp2 und Ptp1b sind in weiblichen, behandelten Mäusen vermehrt exprimiert sowie in männlichen Mäusen ohne Behandlung mit 4-PBA. Die Western Blot-Analysen wurden mit Proteinlysaten von Leberproben 12 Wochen alter BALB/c durchgeführt. Als Ladekontrollen dienten  $\beta$ -Actin und  $\alpha$ -Tubulin. Wt = Wildtyp; tg = HBs-transgen; 1w = HBs-transgen, 1 Woche PBA Behandlung; 8w = HBs-transgen, 8 Wochen PBA Behandlung

Die Western Blots zeigen, dass die Phosphatase Ptp1b in den HBs-transgenen, unbehandelten männlichen BALB/c Mäusen im Gegensatz zu den behandelten Proben leicht erhöht ist. Bei der Phosphatase Shp2 verhält es sich ähnlich. Die Aktivität der Phosphatasen in diesen Proben korreliert demnach mit der verminderten Phosphorylierung von Stat5 in

der Leber HBs-transgener, männlicher 12 Wochen alter BALB/c Mäuse, die nicht mit 4-PBA behandelt wurden (vgl. 3.3.2).

Zusätzlich wurden die Phosphatasen in den Lebern männlicher Mäuse immunhistochemisch untersucht. Dargestellt ist hier die Immunhistochemie von Ptp1b in Lebergewebe 12 Wochen alter BALB/c Mäuse (vgl. Abbildung 30): In der IHC zeigen sich Unterschiede zwischen dem BALB/c Wildtyp (30 A) und der HBs-transgenen Kontrolle ohne Behandlung mit 4-PBA (B). In der Kontrolle ist das Protein im Zytoplasma verteilt, während es im Wildtyp nur im Bereich der Zellmembran vorkommt und retikulär ins Zellinnere einstrahlt. Es fällt zudem auf, dass die Hepatozyten in der HBs-transgenen Kontrolle größer sind als im Wildtyp. Dieses Phänomen wurde bereits früher in allen HBs-transgenen Mäusen unserer Arbeitsgruppe beobachtet (unveröffentlichte Daten).

Unter einwöchiger Behandlung mit 4-PBA (30 C) ähnelt die IHC von Ptp1b eher der des Wildtyps, jedoch sind einzelne Hepatozyten erkennbar, in denen die Phosphatase im gesamten Zytoplasma verteilt ist. In Abbildung 30 D zeigt sich, dass die Hepatozyten in acht Wochen behandelten HBs-transgenen Mäusen Ptp1b am stärksten anreichern. Innerhalb des Zytoplasmas sind Kompartimente zu erkennen, in denen die Phosphatase vermehrt vorkommt. Das Ergebnis dieser IHC ließ sich allerdings in den Western Blot-Analysen von Ptp1b nicht darstellen. Ein vermindertes Vorkommen der Phosphatase konnte hier nur nach einer Woche Behandlung mit 4-PBA beobachtet werden.

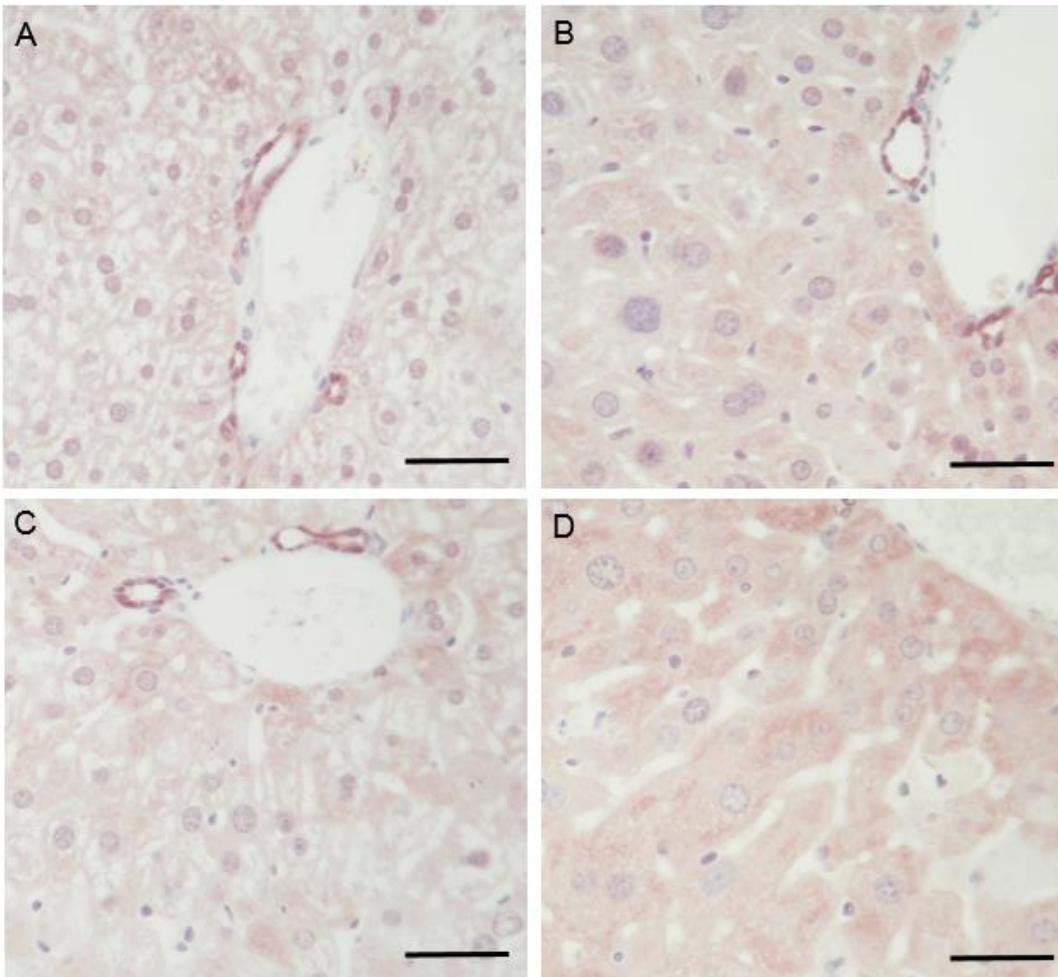


Abbildung 30: Die Immunhistochemie der Phosphatase Ptp1b (hier hellrot gefärbt) zeigt eine verstärkte zytoplasmatische Anreicherung in Hepatozyten aus HBs-transgenen Mäusen, die über acht Wochen mit PBA behandelt wurden. Untersucht wurden Leberproben 12 Wochen alter, männlicher BALB/c-Mäuse. Vergrößerung 400 $\times$ . Messbalken  $\cong$  40  $\mu$ m. A) Wildtyp B) HBs-transgen C) HBs-transgen, 1 Woche PBA Behandlung D) HBs-transgen, 8 Wochen PBA Behandlung

Unsere Analysen und Daten rund um den Stat5 Signalweg führen zusammengefasst zu folgenden Ergebnissen: Es besteht kein offensichtlicher Zusammenhang zwischen der verminderten Phosphorylierung von Stat5 in männlichen, unbehandelten BALB/c mit *Insulin-like growth factor* (Igf1), *Suppressor of cytokine signaling 2* (Socs2), *Cytokine-inducible SH2-containing protein* (Cis), Akt, Ghr und Bcl6. Die Phosphorylierung von Jak2, Erk und der Tyrosinkinase Src ist unter 4-PBA Behandlung in männlichen BALB/c Mäusen verändert. Folglich könnte ein Zusammenspiel zwischen der Phosphorylierung von Jak2, die unter PBA-Behandlung in Lebern männlicher Mäuse ansteigt, und den Phosphatasen Shp2 und Ptp1b, für die vermehrte Phosphorylierung von Stat5 verantwortlich sein.

### 3.4 Wirkung von 4-PBA auf die Zonierung des Leberparenchyms

Schon in der IHC von Lipocalin 2 wurde deutlich, dass Lcn2 im Bereich der Glisson-Trias stärker angefärbt ist (s. Kapitel 3.2.6). Möglicherweise ist die Wirkung von 4-PBA in den Hepatozyten um das Periportalfeld stärker und in Richtung Zentralvene abnehmend. Diese Hypothese sollte an Enzymen, die für die Homöostase des hepatischen Metabolismus essentiell sind, untersucht werden.

Zunächst wurde die *Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase* (Pepck) immunhistochemisch untersucht (Abbildung 31). Das Protein ist ein Schlüsselenzym der Gluconeogenese, welches physiologischerweise rund um die Glisson-Trias stärker exprimiert wird<sup>148</sup>. Zusammenfassend zeigten sich bei diesem Versuch ähnliche Beobachtungen wie bei Lcn2: Dort zeigte die IHC ebenso eine verstärkte Anreicherung von Lcn2 periportal und eine verminderte Anreicherung im Bereich der Zentralvene unter PBA-Behandlung.

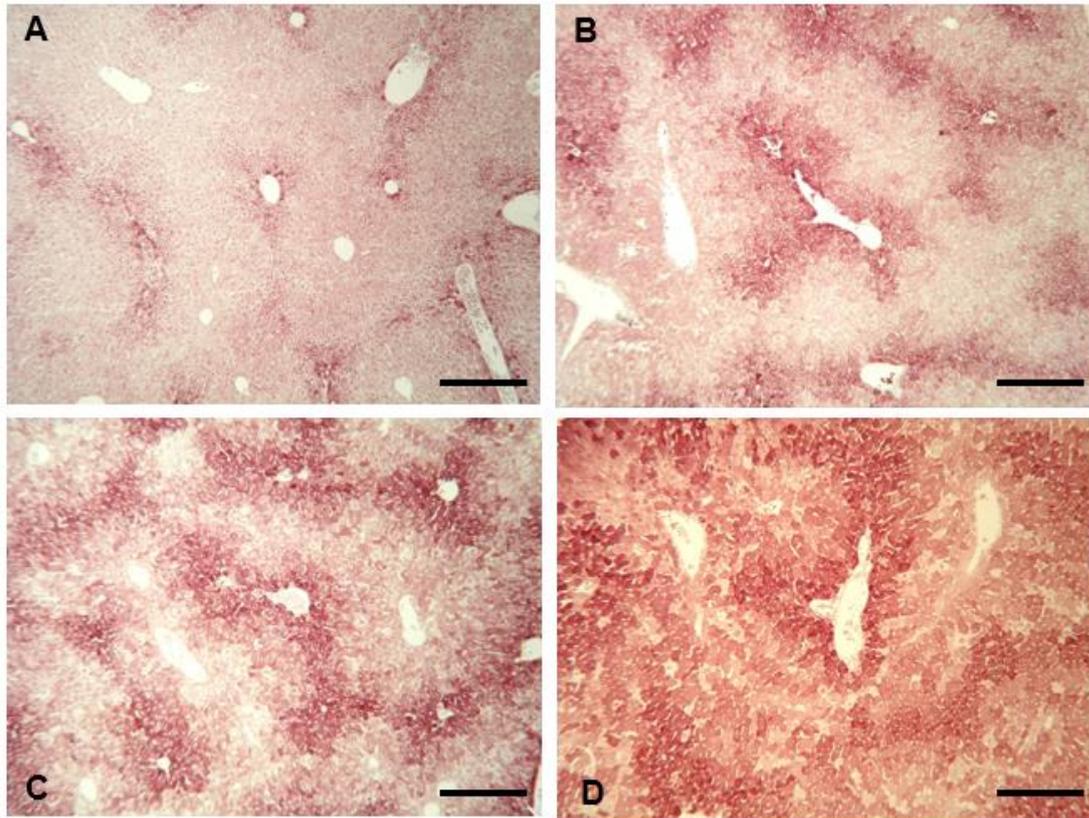


Abbildung 31: Die Immunhistochemie der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (hier rötlich gefärbt) zeigt eine zunehmende Anreicherung des Enzyms in Hepatozyten ein- und achtwöchig behandelter HBs transgener Mäuse. Nach einwöchiger Behandlung mit 4-PBA (C) korreliert die Verteilung der Pepck weitgehend mit der Verteilung in den unbehandelten transgenen Mäusen (B). Die Zonierung des Leberparenchyms ist in diesen Proben gut zu erkennen. Nach achtwöchiger Behandlung der HBs transgenen Mäuse mit 4-PBA (D) hingegen ist die Zonierung etwas schlechter zu erkennen, da die Anreicherung der Pepck in Bereichen um die Zentralvene verstärkt ist. Untersucht wurden Leberproben 12 Wochen alter, männlicher BALB/c-Mäuse. Vergrößerung 100 $\times$ . Messbalken  $\hat{=}$  100 $\mu$ m. A) Wildtyp, B) HBs-transgen, C) HBs-transgen, 1 Woche PBA Behandlung, D) HBs-transgen 8 Wochen PBA Behandlung

Im Wildtyp (31 A) sind die Zellen um die Glisson-Trias stärker gefärbt, was mit der physiologischen Lokalisation des Enzyms korreliert. Wird der Wildtyp (31 A) mit der HBs-transgenen Kontrolle (31 B) verglichen, fällt zunächst auf, dass die Hepatozyten im HBs-transgenen Maus-Modell vergrößert sind und die Struktur des Gewebes diffuser wirkt. Außerdem zeigt sich eine verstärkte Färbung der Pepck in Hepatozyten um die Portalgefäße. Die Verhältnisse unter einwöchiger PBA-Behandlung (31 C) ähneln der HBs-transgenen Kontrolle (31 B). Es entsteht dennoch der Eindruck, dass in Richtung Zentralvene mehr Zellen gefärbt sind. Unter achtwöchiger PBA-Behandlung (31 D) ist das Muster der Zonierung kaum noch zu erkennen – ein schwach gefärbter Bereich um die Zentralvene,

wie es in den Bildern zuvor zu sehen war, existiert nicht. Außerdem wirken die Hepatozyten unter achtwöchiger Behandlung mit 4-PBA größer.

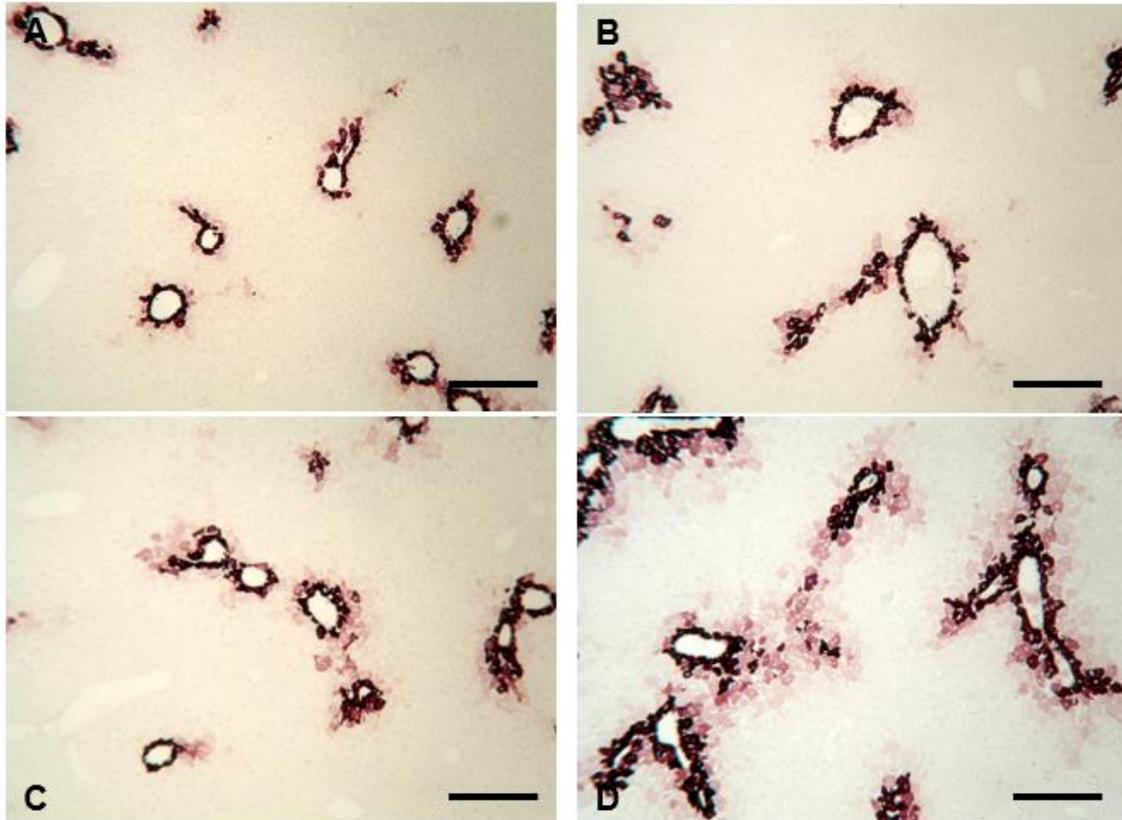


Abbildung 32: Die Immunhistochemie der Glutamin-Synthetase (hier rötlich angefärbt) zeigt eine vermehrte Anfarbung perivenöser Areale in achtwöchig behandelten Mäusen. Untersucht wurden Leberproben 12 Wochen alter, männlicher BALB/c-Mäuse. Vergrößerung 100 $\times$ . Messbalken  $\cong$  100 $\mu$ m. A) Wildtyp, B) HBs-transgen, C) HBs-transgen, 1 Woche PBA Behandlung, D) HBs-transgen, 8 Wochen PBA Behandlung

Ebenso getestet wurde die Glutamin-Synthetase (Abbildung 32). Die Glutamin-Synthetase katalysiert die Reaktion von Glutamat und Ammoniak, wobei Glutamin gebildet wird. Diese Reaktion findet in den perivenösen Arealen der Leber statt <sup>149,150</sup>. In der Abbildung 32 sind die Ergebnisse der IHC der Glutamin-Synthetase dargestellt. Die Färbung rund um die Zentralvene im Wildtyp (32 A) ist gut zu erkennen. In Richtung des periportalen Felds sind die Hepatozyten schwächer gefärbt. Dort ist kaum Glutamin-Synthetase exprimiert. Der Umfang angefarbter Zellen im Bereich der Zentralvene nimmt unter 4-PBA-Behandlung leicht zu, wie in den Abbildungen 32 C und 32 D zu erkennen ist. Besonders nach 8 Wochen Behandlung sind im Bereich der Zentralvenen vermehrt Zellen zu erkennen, die die Glutamin-Synthetase exprimieren. Wieder wirken die Zellen nach

achtwöchiger Behandlung größer. Im Gegensatz zur Färbung mit der Pepck ist in diesen Färbungen auch unter 4-PBA-Behandlung das Muster der einzelnen Leberzonen nicht aufgehoben.

Aus diesen Experimenten geht hervor, dass sowohl die Pepck als auch die Glutaminsynthetase unter langfristigem PBA-Einfluss vermehrt exprimiert werden. Die physiologische Zonierung der Leber wirkt aufgehoben und die Mechanismen der zellulären Energiebereitstellung durch Gluconeogenese nehmen zu.

### 3.5 Behandlung der murinen Hepatozytenzelllinie AML12 mit 4-PBA

#### 3.5.1 Untersuchung der Akut-Phase-Antwort in der Zelllinie

Um die Ergebnisse bezüglich der Auslösung einer Akut-Phase-Antwort in mit 4-PBA behandelten Mäusen (vgl. 3.2, Abb. 16-19, 21-23) funktionell zu bestätigen, wurden Versuche mit der murinen Hepatozyten-Zelllinie AML12 durchgeführt. AML12 Zellen entwickeln typische Hepatozyten-Charakteristika und sind daher als Modell für Leberzellen geeignet<sup>115</sup>. Diese Zelllinie wurde in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe so modifiziert, dass sie nach Induktion mit Doxycyclin LHBs stabil exprimieren konnte (stabile Transfektion). Die Zellen eignen sich daher gut dazu, die Verhältnisse in den Leberzellen der HBs-transgenen Mäuse zu simulieren.

Im folgenden Experiment wurde diesen stabil transfizierten Zellen 4-PBA appliziert (PBA+/Dox+). Mittels qRT-PCR wurden anschließend hauptsächlich die Gene (*fgl1*, *lcn2*, *mt1*, *saa2*, *fgf21*, *isg15*) untersucht, die in Micorarray und vorherigen Analysen in den HBs-transgenen Mäusen identifiziert wurden.

Abbildung 33 zeigt exemplarisch die Genexpression von *fgl1*, *lcn2*, *mt1*, *saa2*, *fgf21* und *isg15* in stabil transfizierten AML12 Zellen. Der blaue Balken in der Abbildung stellt die relative mRNA Expression in LHBs exprimierenden Zellen mit PBA-Behandlung im Vergleich zu diesen Zellen ohne Behandlung dar. Die Gene *fgl1*, *saa2*, *fgf21* und *isg15* wurden stark hochreguliert, *lcn2* und *mt1* nur tendentiell. Im Balkendiagramm sind die Resultate der Zellen, die mit 4-PBA behandelt wurden aber kein LHBs exprimieren, orange dargestellt: Hier sind die Werte der Genexpression von *fgl1*, *lcn2*, *mt1*, *fgf21* und

*isg15* höher als unter Doxycyclin-Induktion. Die Effekte von 4-PBA sind demnach stärker in den Zellen, in denen das große HBV-Hüllprotein nicht vorliegt.

Die grauen und gelben Balken in der Grafik stellen die relative mRNA Expression von Zellen dar, die unter dem Einfluss der Doxycyclin-Induktion standen. Die Genexpression ist in Zellen, die mit Doxycyclin induziert wurden, im Vergleich zu Zellen, die nicht mit Doxycyclin induziert wurden, weniger hochreguliert. Daraus kann geschlossen werden, dass die oben erwähnten Effekte nicht durch Doxycyclin hervorgerufen werden, sondern ein Effekt der Behandlung der Zellen mit 4-PBA sind.

Es wurden außerdem AML12 Zellen mit 4-PBA behandelt, die nicht stabil transfiziert wurden. Diese Zellen dienten der Kontrolle. Die Ergebnisse, die mittels qRT-PCR ermittelt wurden, sind in Tabelle 16 zusammengefasst. Auch in diesen Zellen ist zu sehen, dass 4-PBA die Expression von *fgl1*, *lcn2*, *mt1*, *fgf21* und *isg15* hochreguliert (Spalte PBA+/Dox- vs Dox-). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die Genexpression von *fgl1*, *lcn2*, *saa2*, *fgf21* und *isg15* nicht durch die Hinzugabe von Doxycyclin beeinflusst wurde (Spalte Dox+ vs Dox-).

Die Ergebnisse zeigen, dass 4-PBA auch in einer murinen Hepatozyten-Zelllinie zur Induktion von Genen führt, die in Verbindung mit der Akuten-Phase-Antwort stehen.

Die Gene der Serumamyloide (*saa1* und *saa3*) zeigen in Zellkultur (im Gegensatz zum murinen Tiermodell) keine Regulation unter 4-PBA.

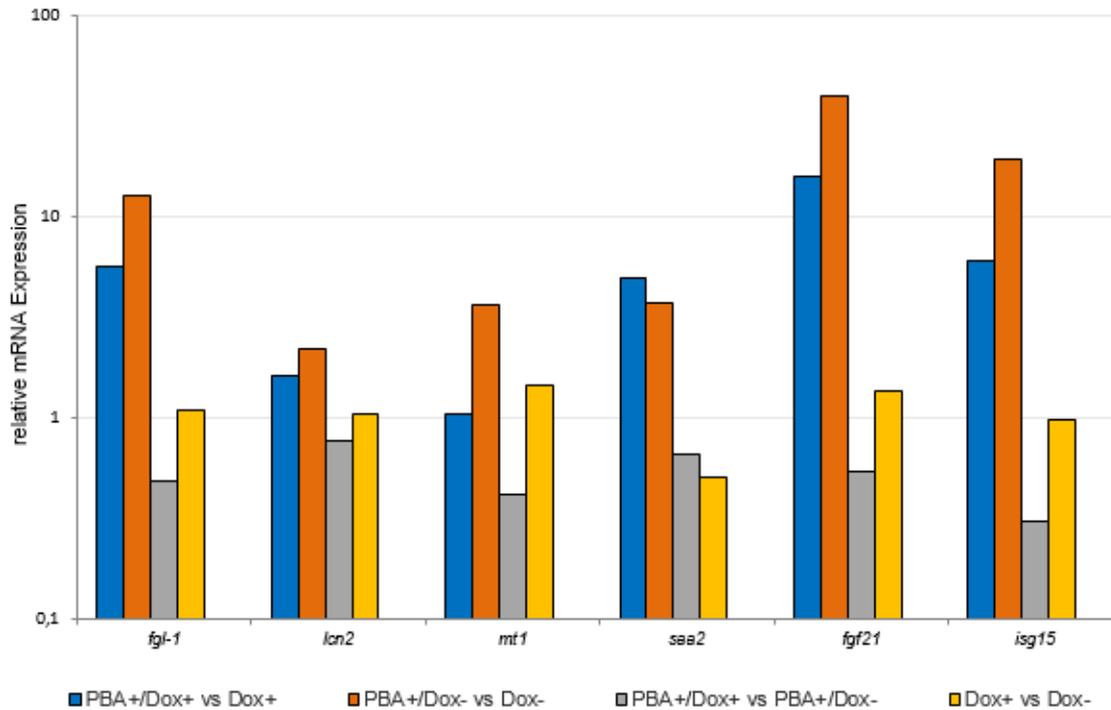


Abbildung 33: Die quantitative Beurteilung der differentiellen Genexpression ausgewählter **Gene der APR** in stabil transfizierten AML12 Zellen zeigt eine Hochregulation nach der Behandlung mit 4-PBA. Durch Doxycyclin-Gabe exprimieren die Zellen LHBs.

Gen	Fold change in PBA+/Dox- vs Dox-	Fold change in Dox+ vs Dox-
<i>fgl1</i>	23,94	1,02
<i>lcn2</i>	4,74	1,18
<i>mt1</i>	16,07	4,50
<i>saa2</i>	0,97	0,99
<i>fgf21</i>	167,35	1,69
<i>isg15</i>	1,5	0,55

Tabelle 16: Die quantitative Beurteilung der differentiellen Genexpression ausgewählter Gene der APR in AML12 Zellen ohne Transfektion zeigt eine Hochregulation nach Behandlung mit 4-PBA. Diese Zellen exprimieren kein LHBs bei Doxycyclin-Applikation.

## 4. Diskussion

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse, dass die Behandlung HBs-transgener Mäuse mit dem synthetischen Chaperon 4-PBA zu einer Induktion von Akut-Phase-Proteinen in der Leber führte. Insbesondere das Protein Lipocalin 2 war unter PBA-Behandlung signifikant erhöht. Außerdem konnte eine Aktivierung von Genen der Interferon-Antwort und proinflammatorischer Zytokine beobachtet werden. Insgesamt konnten stärkere Expressionslevel hepatischer Gene und Proteine in männlichen Mäusen detektiert werden. Die Ergebnisse der Immunhistochemie zeigten eine verstärkte periportale Anreicherung von Lcn2 und Pepck, insbesondere nach achtwöchiger PBA-Behandlung. Die Zonierung des Leberparenchyms war hierunter schlechter zu erkennen.

Neben dem Maus-Modell konnte auch eine Hochregulation von Genen der Akut-Phase-Antwort in der murinen Hepatozyten-Zelllinie AML12 gezeigt werden.

### 4.1 Bewertung der Hochregulation von Lipocalin 2 unter 4-PBA Behandlung

#### 4.1.1 Die Induktion von Lipocalin 2 als Hinweis auf eine Akut-Phase-Reaktion

Die initial durchgeführte Microarray-Analyse zeigte, dass die am stärksten hochregulierten hepatischen Gene nach achtwöchiger PBA-Behandlung HBs-transgener Mäuse zu Genen der Akut-Phase-Reaktion gehören. Lipocalin 2 war in dieser Auswertung unter den Genen der APR am stärksten hochreguliert und wurde daher näher untersucht.

In der qRT-PCR konnte das Ergebnis der Microarray-Analyse bestätigt werden. Außerdem zeigte sich der *lcn2*-Anstieg auch in 5 Wochen und 26 Wochen alten mit 4-PBA behandelten Mäusen. Auch die unbehandelten HBs-transgenen Mäuse zeigten eine zum Teil signifikante Hochregulation von *lcn2*. Der Vergleich männlicher und weiblicher Mäuse zeigte, dass die Regulation in den männlichen Mäusen stärker ausfiel. In den Ergebnissen des Western Blots bestätigten sich diese Ergebnisse auf Proteinebene. Der Western Blot von Serumproben zeigte dasselbe Induktionsmuster.

Zusammengefasst lässt sich postulieren: 1. Lcn2 ist erhöht im HBs-transgenen Maus-Modell. 2. Im Serum und auf Genexpressions- und Proteinebene stieg das Akut-Phase-

Protein Lcn2 unter Behandlung mit 4-PBA an. 3. In männlichen Mäusen war die Lcn2 Erhöhung stärker ausgeprägt.

Mittels *Immunhistochemie* (IHC) können außerdem Aussagen zur Verteilung von Lcn2 gemacht werden: Die Verteilung des Proteins ist, wie in Kapitel 3.2.6 dargestellt, abhängig von der Zonierung der Leber. Da 4-PBA nach seiner Resorption im Magen-Darm-Trakt über die Portalvene in die Leber gelangt, wird es vermutlich im Bereich des Periportalfeldes stärker verstoffwechselt als im Bereich um die Zentralvene. Dies könnte erklären, warum Lcn2 im Bereich um das Glisson-Trias stärker exprimiert wurde: 4-PBA ist im Bereich des Periportalfeldes höher konzentriert und löst dort die Expression von Lcn2 in den Hepatozyten aus.

#### 4.1.2 Beurteilung des initialen Anstiegs proinflammatorischer Zytokine

Unter einwöchiger Behandlung mit 4-PBA konnte auf Genexpressionsebene ein Anstieg der Expression der Zytokine *ccl3*, *ccl4*, *ip10*, *icam1*, *mcp1* und *cxcl1* beobachtet werden. Nach achtwöchiger Behandlung waren diese Zytokine wieder normal reguliert.

In Publikationen wurden bereits Zusammenhänge zwischen erhöhtem Lcn2 und proinflammatorischen Zytokinen ermittelt. So wird die Genexpression des Zytokins *C-x-c motif ligand 1 (cxcl1)* in Alveolar-Makrophagen in Abhängigkeit von Lcn2 reguliert und fördert auf diese Weise die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten<sup>151</sup>. Die Genregulation von *Monocyte chemoattractant protein 1 (mcp1)* steigt in der Endometrium-Zelllinie RL95-2 unter erhöhten Lcn2-Leveln an<sup>76</sup>. Die Behandlung humaner Endothelzellen mit Lcn2 führte zur Hochregulation von *mcp1* und weiteren Zytokinen wie *Interleukin 6 (il6)* und *Interleukin 8 (il8)*<sup>152</sup>. Des Weiteren konnte in neuronalen Zellen nach Lcn2-Induktion eine vermehrte Genexpression von *mcp1*, *cxcl1*, *ccl3* und *cxcl10* gemessen werden. Die Genexpression von *cxcl1* und *mcp1* stieg dabei in Abhängigkeit von der gewählten Lcn2-Dosis<sup>153</sup>. Interessant sind auch die Ergebnisse von Pacifico et al.<sup>154</sup>: Es konnte gezeigt werden, dass Lcn2 die Rekrutierung von Leukozyten durch die Induktion von Zytokinen fördert. Die humane Schilddrüsen-Karzinom Zelllinie BHT101 wurde so modifiziert, dass sie kaum Lcn2 exprimiert. Durch diese Lcn2-Depletion wurde eine verminderte Monozyten-Migration beobachtet, die auf die verringerte Genexpression verschiedener Zytokine zurückgeführt wird. Zu diesen Zytokinen gehören unter anderem *cxcl1*, *mcp1*, *ccl3* und *ip10*. Ihre Genexpression zeigte sich unter Ausschalten von Lcn2 herunterreguliert, wohingegen es in der vorliegenden Arbeit unter erhöhten Lcn2-Leveln zu

erhöhter Genexpression von *cxcl1*, *mcp1*, *ccl3* und *ip10* kam (vgl. 3.2.8). Die Ergebnisse unserer Arbeit suggerieren eine Lcn2-abhängige Zytokin-Induktion und korrelieren folglich mit den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen. Allerdings gilt dies nur für die Verhältnisse unter einwöchiger Behandlung mit 4-PBA. Obwohl nach 8 Wochen PBA-Behandlung eine noch höhere Lcn2-Expression vorlag als nach einwöchiger Behandlung, waren die Werte der Zytokine in der qRT-PCR vermindert. Dies widerspricht auf den ersten Blick dem in der Literatur beschriebenen Zusammenhang zwischen erhöhtem Lcn2 und dem davon abhängigen Anstieg der Genexpression proinflammatorischer Zytokine. Jedoch sind in den genannten Literaturquellen stets Versuche mit kurzfristig erhöhten Lcn2-Leveln beschrieben. In der vorliegenden Arbeit hingegen waren die Lcn2-Level nach achtwöchiger PBA-Behandlung über einen langen Zeitraum erhöht. Es finden sich keine Publikationen zu langfristig hohem Lcn2 und dessen Einfluss auf die Produktion der oben genannten, chemotaktisch wirksamen Zytokine. Zudem ist die Expression von Zytokinen typischerweise kurzfristig<sup>155</sup>. Bei Zytokinen wie *Interleukin-1 $\beta$*  (IL1 $\beta$ ), IL6 und *Tnfa*, die maßgeblich an der Induktion der APR beteiligt sind, bewirkt der Anstieg ihrer eigenen Produktion und die Synthese von APP eine Gegenregulation, sodass ihre Genexpression inhibiert wird<sup>156</sup>. Möglicherweise sind auch die hier untersuchten Zytokine nach 8 Wochen herunterreguliert, da ihre Induktion durch sie selbst und durch Lcn2 gehemmt wurde.

Die Hochregulation der Genexpression von Zytokinen wie *mcp1*, *ccl3*, *ccl4*, *ip10* und *cxcl1* in der Leber ist insbesondere bedingt durch Gewebeschäden und Inflammation. Wie bereits erwähnt, spielen sie eine Rolle bei der Rekrutierung von Immunzellen. Weiterhin sind ihre Funktionen advers: Sie führen zu Zelldifferenzierung, Überleben von Zellen, Leberschäden und -regeneration, wirken pro- und antifibrotisch<sup>157</sup>. Lcn2 wurde bereits als „*Help-me signal*“ für Leberschäden bezeichnet, da es durch die Induktion von Zytokinen zur Rekrutierung neutrophiler Granulozyten führt<sup>95</sup>. Möglicherweise fungierte Lcn2 auch in dieser Arbeit als „*Help-me-signal*“ und führte durch das Wirken der Zytokine zur Immunmodulation.

#### 4.1.3 Rekonstruktion eines möglichen Signalweges zwischen Stat3 und Lipocalin 2

Wie schon in der Einleitung dargestellt (vgl. 1.6.4), ist Stat3 als Transkriptionsfaktor an der Regulation der APR beteiligt und wurde daher zunächst als *Acute phase response*

*factor* (APRF) bezeichnet<sup>99,100</sup>. Lcn2 und phosphoryliertes Stat3 korrelieren bezüglich des Expressionsmusters im Western Blot. Somit liegt es nahe, dass die Genregulation des Akut Phase Proteins Lcn2 in diesem Versuch mithilfe des Transkriptionsfaktors Stat3 induziert wurde. Auch in jüngerer Vergangenheit konnte der Signalweg zwischen Stat3 und Lcn2 nachgewiesen werden<sup>103,158</sup>.

Weiterhin stellt sich die Frage, wie es zur Aktivierung von Stat3 und folglich auch Lcn2 kommt. Zytokine wie beispielsweise Il6, Tnfa, Il1 $\beta$  sowie Inf $\gamma$  stehen als extrazelluläre Signalgeber am Anfang einer Signalkaskade, die zur Lcn2-Produktion führen könnte<sup>159,103,91,88,156</sup>. Insbesondere Il6 wird häufig in Zusammenhang mit der APR und Stat3 erwähnt und kommt daher als Signalgeber in Frage<sup>99,100,103</sup>. In der vorliegenden Arbeit konnte Il6 nicht nachgewiesen werden. Das kann auf die kurze Halbwertszeit des Zytokins zurückzuführen sein. In einer klinischen Studie erreichte Il6 bereits 6 Stunden nach einem operativen Eingriff seinen Spitzenwert und fiel daraufhin wieder rasch ab<sup>160</sup>. Im Maus-Modell könnte Il6 also ähnlich schnell abgefallen sein und war daher nicht mehr detektierbar.

Die Genexpression der Zytokine *tnfa* sowie *il1 $\beta$*  wurden in Vorarbeiten der AG Roeb untersucht<sup>132,133</sup>: Unter einwöchiger Behandlung waren die Expressionslevel ansteigend und unter achtwöchiger Behandlung fielen sie wieder, ähnlich der Regulation der in dieser Arbeit getesteten Zytokine (vgl. 3.2.8). Daraus folgt, dass Tnfa und Il1 $\beta$  vermutlich nicht für die starke Induktion von Stat3 und Lcn2 unter achtwöchiger Behandlung verantwortlich gemacht werden können.

Auch *reaktive Sauerstoffspezies* (ROS) können für einen Lcn2 Anstieg verantwortlich sein<sup>94</sup>: Die humane Leberkrebszelllinie HepG2 und Lebergewebe wurden mit Röntgenstrahlen sowie Wasserstoffperoxid behandelt. In Folge kam es zur Induktion von Lcn2, die auf die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies zurückgeführt wurde. *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (Nrf2) ist ein Transkriptionsfaktor, der bei oxidativem Stress gebildet wird<sup>161</sup>. In der Gruppe der 12 Wochen alten BALB/c wurde Nrf2 daher auf der Ebene der Proteinexpression untersucht. Die Expression von Nrf2 zeigte sich weder durch die Expression von HBsAg im transgenen Maus-Modell noch durch 4-PBA beeinflusst (hier nicht gezeigt). Daraus folgt die Annahme, dass die Behandlung der Mäuse mit 4-PBA nicht zu oxidativem Stress führte und oxidativer Stress somit kein Auslöser der Lcn2-Erhöhung war.

Zusammenfassend wurde die Genregulation von *lcn2* in diesem Versuch am ehesten durch aktiviertes Stat3 gesteuert. Welches Zytokin oder welcher andere Faktor wiederum

Stat3 aktiviert hat, bleibt unklar. Die Signaltransduktion sollte in Folgeversuchen beispielsweise in mit 4-PBA behandelten Hepatozytenzelllinien forciert untersucht werden. Das im Versuch nicht detektierbare Il6 käme weiterhin als Induktor in Frage<sup>99,100,103</sup>. Neben Zytokinen können auch Wachstumsfaktoren, Glukokortikoide und Insulin zur Lcn2-Synthese führen<sup>162</sup>.

#### 4.1.4 Korrelation der Interferon-Antwort mit der Akut-Phase-Antwort

Isg15 hat eine ähnliche Funktion wie Ubiquitin und führt zu einer Veränderung der Proteinstabilität<sup>163,164</sup>. Induziert wird Isg15 durch Interferone, Viren, Endotoxine oder genotoxischen Stress<sup>164,165</sup>. Das Protein spielt eine Rolle in der Immunantwort, so markiert Isg15 beispielsweise virale Proteinen und macht sie unwirksam<sup>166-169</sup>.

In den männlichen Mäusen korrelierte das Ergebnis von Isg15 im Western Blot mit den Ergebnissen der Proteinexpressions-Analysen von Lcn2 und Stat3: Isg15 stieg unter Behandlung mit 4-PBA an und suggeriert eine durch das Chaperon induzierte gesteigerte Interferon-Antwort. Es stellt sich daher die Frage, ob ein gemeinsamer Induktor für beide Antworten vorliegt. Aktiviertes Stat3 könnte in beiden Signalwegen als Transkriptionsfaktor eine Rolle spielen: So wird die Genregulation der Akut-Phase-Proteine wie Lcn2 unter anderem durch aktiviertes Stat3 induziert<sup>99,100,103</sup>. Außerdem wird berichtet, dass antivirale Proteine wie Isg15 in Abhängigkeit von phosphoryliertem Stat3 gebildet werden<sup>170,171</sup>. Mahony et al. ermittelten, dass der Knockdown von Stat3 *small hairpin RNA* (shRNA) nicht nur zur vermehrten Influenzavirus Replikation führte sondern auch zur verminderten Induktion einiger Isgs wie Isg15<sup>170</sup>. Somit konnte dem Transkriptionsfaktor Stat3 erstmal eine antivirale Rolle zugesprochen werden. Isg15 wird vor allem in Antwort auf Stat1 und Stat2 gebildet. Hier konnte gezeigt werden, dass es auch in Antwort auf Stat3 induziert wird<sup>170</sup>. Diese Ergebnisse suggerieren, dass entweder 4-PBA oder das HBV-Hüllprotein in den Leberzellen männlicher Mäuse eine Antwort hervorruft, die einer antiviralen Stressreaktion ähnelt. Im Zellversuch der vorliegenden Arbeit zeigten AML12 Zellen, die kein LHBs exprimierten, eine Erhöhung von Genen der APR sowie von *isg15* unter PBA-Behandlung. Das spricht zunächst gegen das HBV-Hüllprotein als Auslöser für die Induktion dieser Gene. Folglich kommt 4-PBA als Auslöser der APR und der Isg15-Induktion in Frage.

Abbildung 34 skizziert grob den möglichen Signalweg: PBA-Behandlung bewirkt, dass eines der in 4.1.3 diskutierten Zytokine oder Faktoren wie beispielsweise Il6 die Phosphorylierung von Stat3 induziert. Dimerisiertes, aktiviertes Stat3 fungiert schließlich sowohl als Mediator der APR als auch der Interferon-Antwort.

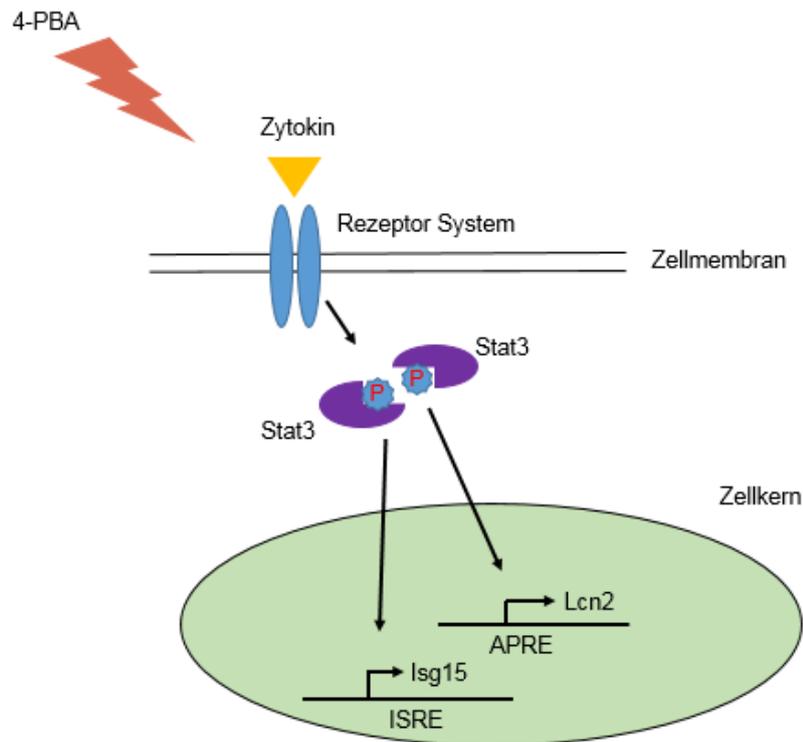


Abbildung 34: Grobe Darstellung des möglichen Signalwegs nach Behandlung der HBs-transgenen Mäuse mit 4-PBA. PBA-Behandlung bedingt die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Stat3, der nach Dimerisierung die Genregulation von Genen der Interferon-Antwort (z.B. Isg15 über den Genabschnitt *Interferon response sensitive element* (ISRE)<sup>166,172</sup>) und der Akut-Phase-Antwort (z.B. Lcn2 über den Genabschnitt *Acute phase response element* (APRE)<sup>99</sup>) fördert.

Zusammenfassend suggeriert die Korrelation der Proteinexpression von Lcn2 und Isg15 aktiviertes Stat3 als gemeinsamen Transkriptionsfaktor für die Auslösung der APR und Interferon-Antwort. Durch welche Zytokine oder Faktoren Stat3 aktiviert wurde, bleibt ungeklärt. In Folgearbeiten sollte ein entsprechendes Zytokins oder ein entsprechender Faktor identifiziert werden. Da Il6 im Versuch nicht detektierbar war, sollte dieser Versuch wiederholt werden. Bevor an einem Nachweis im Maus-Modell geforscht wird, würde sich ein Zellversuch anbieten: Welche Zytokine induziert eine Hepatozytenzelllinie wie beispielsweise AML12 nach Gabe von 4-PBA? Wie unterscheidet sich das Zytokinprofil, wenn die Zellen zusätzlich LHBs stabil transfizieren? Kommt es dabei auch zu

dem in Abbildung 34 skizzierten Signalweg mit Aktivierung von Stat3 und der Auslösung einer APR und Interferon-Antwort?

#### 4.1.5 Erkenntnisse aus der Immunhistochemie – Wirkung von 4-PBA auf die Zonierung des Leberparenchyms

Die Hepatozyten zeigten sich im HBs-transgenen Maus-Modell im Gegensatz zum Wildtyp vergrößert (vgl. Abbildungen 20, 30, 31 und 32). Nach achtwöchiger Behandlung mit 4-PBA wurden sogar noch größere Hepatozyten beobachtet als in Leberproben HBs-transgener Mäuse, die nicht behandelt wurden. Diese Zellvergrößerung kann auf eine hepatische Schädigung hinweisen: Bei oxidativem Stress oder Anoxie wird eine Zellvergrößerung von Hepatozyten beschrieben. Das Anschwellen der Hepatozyten wird hierbei auf eine intrazelluläre Natriumakkumulation zurückgeführt. Diese Elektrolytverschiebung wird für die Zellnekrose mitverantwortlich gemacht <sup>173</sup>.

Optisch ähneln die vergrößerten Hepatozyten in der IHC den so beschriebenen „ballooning hepatocytes“, die ein histopathologisches Charakteristikum der *nichtalkoholischen Fettleberhepatitis* (NASH) darstellen. Zum Anschwellen der Zellen kommt es bei der NASH unter anderem durch Umlagerung der Intermediärfilamente und durch eine Vergrößerung des ERs. Die Zellvergrößerung wird bei dieser Krankheit als „schlecht definiertes“ Zeichen des Leberzellschadens gewertet <sup>174</sup>. Möglicherweise führte in unseren Versuchen eine Vergrößerung des ERs ebenso zum Anschwellen der Zellen: 4-PBA führte zur verstärkten Synthese von APP, sodass das ER in den Hepatozyten angeschwollen ist.

Wie auch Lcn2 wurde die Pepck unter PBA-Behandlung stärker exprimiert (vgl. Abbildung 31). Besonders die Zellen um das Periportalfeld wurden unter Behandlung stärker angefärbt. Dieser Effekt ist am ehesten auf die erhöhte 4-PBA-Konzentration in den Leberzellen um das Periportalfeld zurückzuführen. Nach der Darmpassage und der Resorption des Medikamentes 4-PBA erreichte es über die Portalvene die Hepatozyten um die Glisson-Trias als erstes. Dort wird 4-PBA verstoffwechselt (s. Abbildung 35) und löst vermutlich einen Anstieg der Akut-Phase-Proteine wie Lcn2 aus. Die Erhöhung der Pepck könnte im Zusammenhang mit einer erhöhten Stoffwechselrate stehen: Der Glucose-Bedarf ist in diesen Zellen um das Periportalfeld erhöht. Bei langer Behandlungsdauer mit 4-PBA weitet sich der Effekt auch auf die weiter zentral gelegenen Hepatozyten aus.

Es wurde bereits gezeigt, dass Lcn2-Injektionen in C57BL/6-Mäusen die Mobilisation neutrophiler Granulozyten stimuliert<sup>175</sup>. In der Immunhistochemie von Lcn2 sind sowohl unter einwöchiger PBA-Behandlung als auch im unbehandelten HBs-transgenen Modell infiltrierende Immunzellen angefärbt (vgl. 3.2.6). Unter achtwöchiger Behandlung sind trotz starker Lcn2 Expression keine Immunzellen angefärbt. Das könnte im Einklang mit der Herunterregulation der Zytokine *ip10*, *ccl3*, *ccl4*, *mcp1* und *cxcl1* nach 8 Wochen 4-PBA stehen: Die chemotaktischen Eigenschaften von Lcn2 wurden in Abhängigkeit von Cxcl1, Mcp1, Ip10, Ccl3, G-Csf und weiteren Chemokinen sowie ihren Rezeptoren beschrieben<sup>151,154,176</sup> (vgl. 4.1.2).

Die Färbungen der Glutamin-Synthetase zeigten ein vermehrtes Vorkommen des Enzyms in den mit 4-PBA behandelten Mausgruppen. Dieser Effekt lässt sich durch den Eliminationsprozess von 4-PBA erklären (s. Abbildung 35): Phenylbutyrat wird via  $\beta$ -Oxidation in Phenylacetat umgewandelt. Im nächsten Schritt wird Glutamin eingebaut, sodass Phenylacetylglutamin entsteht. Da Glutamin zur Elimination von 4-PBA benötigt wird, ließe sich so der Anstieg der Synthetase im perivenösen Bereich erklären.

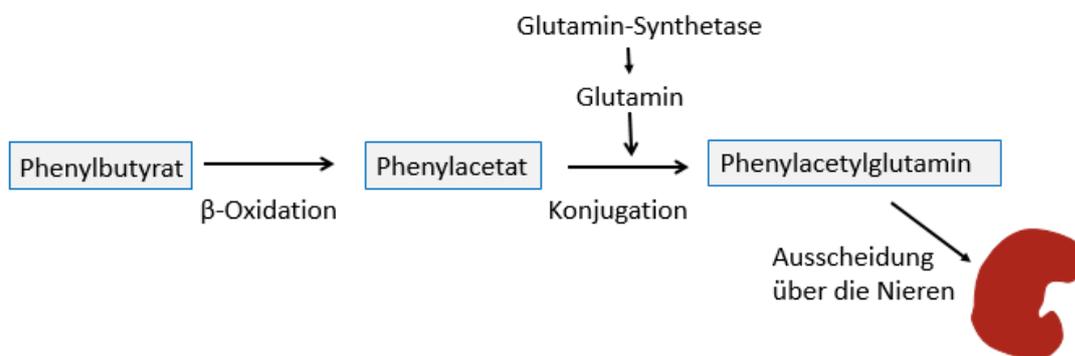


Abbildung 35: Die Darstellung zeigt den Eliminationsprozess von 4-PBA und den Zusammenhang mit der Glutamin-Synthetase für diesen Vorgang<sup>57,58</sup>

#### 4.1.6 Zusammenhänge zwischen Stat5 und der Akut-Phase-Reaktion

In Kapitel 3.3.2 wurde gezeigt, dass in männlichen 12 Wochen alten HBs-transgenen BALB/c Mäusen wenig phosphoryliertes Stat5 vorliegt. Der Einsatz von 4-PBA bewirkte, dass Stat5 in den behandelten Mäusen wieder vermehrt phosphoryliert wurde.

Wie den Ergebnissen in Kapitel 3.3.3 zu entnehmen ist, könnten die Kinasen Erk und Jak2 bei der Aktivierung in männlichen Mäusen eine Rolle spielen: Diese Kinasen sind

an der Aktivierung von Stat5 beteiligt und zeigten in den vorliegenden Versuchen eine leicht vermehrte Proteinexpression unter Behandlung mit 4-PBA<sup>140,105</sup>. Für die verminderte Phosphorylierung von Stat5 in den unbehandelten, männlichen Mäusen könnten die Phosphatasen Shp und Ptp1b eine Rolle spielen. Sie sind an der Dephosphorylierung von Stat5 beteiligt und sind bei den männlichen, HBs-transgenen Mäusen ohne PBA-Behandlung stärker exprimiert<sup>144-146</sup>.

Ein Zusammenhang zwischen der APR und Stat5b wurde bereits nachgewiesen<sup>177</sup>: In Rattenlebern zeigte sich, dass neben Stat3 auch Stat5b im Zellkern in der Spätantwort der APR beteiligt ist und dort sogenannte „*Il6 Response Elements*“ bindet. Auf diesem Genabschnitt sind die Promotoren verschiedener APP lokalisiert<sup>178</sup>.

Möglicherweise spielt Stat5b auch in Mäuselebern eine Rolle als Transkriptionsfaktor, der die Regulation von Genen der APR fördert. Dieser Zusammenhang könnte erklären, warum Stat5b unter PBA-Behandlung stärker phosphoryliert wurde. Der Einsatz von 4-PBA würde durch Aktivierung der Transkriptionsfaktoren Stat3 und Stat5b zur vermehrten Regulation der Gene der APR führen. Auch die 5 und 26 Wochen alten BALB/c Mäuse zeigten den Trend, dass Stat5 unter PBA-Behandlung stärker phosphoryliert wurde. Jedoch waren die Ergebnisse teilweise inhomogen und zeigten starke Geschlechts- und Altersunterschiede – dies lässt sich am ehesten damit begründen, dass Stat5 vom Wachstumshormon Gh reguliert und in den verschiedenen Geschlechtern unterschiedlich ausgeschüttet wird<sup>179,180</sup>.

Interessant bleibt die Frage, weshalb die männlichen 12 Wochen alten HBs-transgenen Kontrollmäuse wenig phosphoryliertes Stat5 aufwiesen, wohingegen Stat5 im Wildtyp vermehrt phosphoryliert war. Insgesamt wurde Stat5 sowohl in männlichen als auch in weiblichen HBs-transgenen Mäusen schwächer phosphoryliert. Möglicherweise inhibiert das HBV-Hüllprotein Wachstums- und Proliferationsprozesse in der Leber, an denen Stat5 als Transkriptionsfaktor normalerweise beteiligt wäre. Für diese Hypothese gibt es allerdings keinen Hinweis aus der Literatur. Es zeigte sich vielmehr, dass HBsAg Überexpression in Leberkrebszellen zur Proliferation und Tumorzellprogression führt<sup>181</sup>.

Zusammengefasst wurde unter dem Einfluss von 4-PBA in den männlichen Modell-Mäusen eine Stat5 Aktivierung hervorgerufen. Sowohl die Überaktivierung als auch die Inaktivierung von Stat5 konnten bereits in Zusammenhang mit der Entwicklung eines HCC gebracht werden<sup>182</sup>. Da die Depletion von Stat5 zu Leberfibrose, Leberverfettung und verschlechterter Leberregeneration führen kann, ist die Aktivierung von Stat5 unter 4-PBA als positiver Effekt zu betrachten<sup>183</sup>. Publikationen zeigten, dass aktiviertes Stat5

die Entwicklung von Leberverfettung und Leberzellkrebs verhindert <sup>184</sup>. Außerdem kommt es unter Ausschaltung von Stat5 in einem Maus-Modell für Cholestase zur reduzierten Expression hepatoprotektiver Gene <sup>185</sup>.

#### 4.1.7 Ursachen und Ideen für die geschlechtsspezifische Reaktion auf 4-PBA

Schon Vorarbeiten mit dem in unserer Arbeitsgruppe etablierten HBs-transgenen Maus-Modell zeigten, dass es geschlechtsspezifische Reaktionen in Bezug auf die Phosphorylierung von Stat3 gibt <sup>17</sup>: In Lebern unbehandelter männlicher Mäuse wurde Stat3 phosphoryliert, in Lebergewebe weiblicher Mäuse jedoch kaum. In den Ergebnissen dieser Vorarbeiten korrelierte die vermehrte Aktivierung von Stat3 in den männlichen HBs-transgenen Mäusen mit einer erhöhten Tumorentwicklung in Lebern männlicher Mäuse. Weibliche HBs-transgene Mäuse aktivierten weniger Stat3 und entwickelten seltener Leberzellkarzinome.

In der vorliegenden Arbeit wurde Stat3 in männlichen Mäusen ebenso vermehrt phosphoryliert und die Proteinexpression von Lcn2 und Isg15 war in den männlichen HBs-transgenen Mäusen höher als in weiblichen Mäusen. Unter PBA-Behandlung stiegen die Expressionen von Lcn2 und Isg15 sowie die Phosphorylierung von Stat3 sogar noch weiter an.

Geschlechtsspezifische Immunantworten sind in der Literatur vielfältig beschrieben: Beim Menschen finden 80% der Autoimmunerkrankungen bei Frauen statt, Männer hingegen sind anfälliger für Grippe, septischen Schock oder Tod durch Malignome <sup>186,187</sup>. Ursächlich für die gesteigerte Immunantwort bei Frauen, die ihnen Überlebensvorteile bietet, jedoch ihre Anfälligkeit für Autoimmunprozesse erhöht, ist möglicherweise das X-Chromosom und die dort lokalisierte *micro RNA* (miRNA) <sup>188,189</sup>. *Micro RNA* sind kurze, nichtkodierende doppelsträngige RNA-Fragmente, die eine Länge von circa 19 bis 23 Nukleotiden haben <sup>190</sup>. Sie spielen eine Rolle bei der negativen Regulierung der Genexpression <sup>188,189</sup>. Einige miRNAs sind ausschließlich auf dem X-Chromosom lokalisiert und können daher für geschlechtsspezifische Unterschiede in der Genexpression verantwortlich sein. So sind beispielsweise miRNA 106b, miRNA 20b und miRNA 513 auf dem X-Chromosom lokalisiert und supprimieren die Genregulation des *Programmed cell death ligand 1* (PD-L1), der an der Apoptose von T-Zellen beteiligt ist. Der Verlust der T-Zellen begünstigt die Tumorprogression <sup>191</sup>. Einige miRNAs, wie miRNA 106a, miRNA 20b, miRNA 221 und miRNA 222, die auf dem X-Chromosom lokalisiert sind,

sind an der Regulation von Stat3 beteiligt<sup>191</sup>. MiRNA 221 und miRNA 222 wurden bereits in Zusammenhang mit der Progression zum HCC erwähnt<sup>192</sup>. Da in der vorliegenden Arbeit in der Regulation von Stat3 Unterschiede zwischen weiblichen und männlichen Mäusen vorlagen, könnte die Untersuchung dieser miRNA neue Erkenntnisse zu geschlechtsspezifischen Immunreaktion und Tumorentwicklung in der Leber hervorbringen.

Auch andere Versuche zeigen Geschlechtsunterschiede in der APR: Männliche Mäuse weisen nach in vivo Exposition mit *Lipopolysaccharid* (LPS) höhere Level an Il6 und dem Akut-Phase-Protein *LPS-binding protein* (Lbp) auf als weibliche Mäuse<sup>187</sup>. LPS kommt als Bestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien in der vorliegenden Arbeit nicht als Auslöser der APR in Frage, jedoch zeigt der beschriebene Versuch eine Parallele bezüglich der sensitiveren Reaktion des männlichen Geschlechts auf einen „pathogenen Faktor“<sup>193</sup>.

Gründe für geschlechtsspezifische Immunantworten hängen ebenso mit der Regulation der Sexualhormone zusammen. Östrogene haben nachweislich anti-inflammatorische Effekte<sup>194</sup>. Für die höhere Inzidenz des HCC im männlichen Geschlecht macht man stimulatorische Effekte der Androgene und den fehlenden schützenden Effekt der Östrogene verantwortlich. Es konnte gezeigt werden, dass Östrogene via Blockade des Il6/Stat3-Signalwegs vor der malignen Entartung der Hepatozyten schützen<sup>195,196</sup>. Caetano et al. kreuzten ein Maus-Modell mit Mutation des Onkogens K-ras mit einem Stat3-Knockout-Maus-Modell. Männliche Mäuse entwickelten in diesem Experiment häufiger Tumore als weibliche Mäuse. Daraus schlussfolgerte man, dass Stat3 einer genderspezifischen Regulation unterliegt. Weiterhin blockierte die Arbeitsgruppe den Östrogenrezeptor in weiblichen Mäusen mit Tamoxifen, woraufhin auch im weiblichen Maus-Modell häufiger Tumore beobachtet wurden. Auch hier zeigte sich also ein protektiver Effekt des weiblichen Sexualhormons, die Caetano et al. auf die Hemmung des NF-κB-Signalwegs mit folglich reduzierter Ausschüttung von Il-6 zurückführen<sup>197</sup>. In der vorliegenden Arbeit wird Stat3 in männlichen HBs-transgenen Mäusen vermehrt phosphoryliert. Die Aktivierung von Stat3 nimmt unter PBA-Behandlung zu. Weibliche HBs-transgene Mäuse weisen hingegen kaum phosphoryliertes Stat3 auf. Möglicherweise haben sie von dem schützenden Effekt des Östrogens profitiert. Verifizieren könnte man dies in einem weiteren Mausversuch: Weibliche HBs-transgene Mäuse müssten mit Tamoxifen behandelt werden und anschließend die Aktivierung von Stat3 auf Proteinexpressionsebene geprüft werden.

#### 4.1.8 Rückschlüsse aus den Zellexperimenten

In den Zellversuchen wurde eine Hochregulation von *fgl1*, *saa2*, *fgf21*, *isg15*, *lcn2* und *mt1* beobachtet. Neben *Lcn2* und *Saa2* gehören auch *Fibrinogen-like-protein-1* (*Fgl1*) und *Fibroblast growth factor 21* (*Fgf21*) zu den positiven Akut-Phase-Proteinen in Mäusen<sup>198,199</sup>.

Die Hochregulation durch 4-PBA wurde auch in den Zellen beobachtet, in denen LHBs nicht exprimiert wurde. Dort wurden sogar noch höhere Werte unter Behandlung gemessen. Durch dieses Ergebnis entsteht der Eindruck, dass das große Hüllprotein, sofern es in den Zellen vorhanden ist, einen protektiven Effekt auf das Ausmaß der Akut-Phase-Reaktion hat. Im Mausexperiment wurden die Wildtypen nicht mit 4-PBA behandelt. Um die Hypothese eines protektiven Effekts des großen Hüllproteins auf die APR zu erweitern, wäre eine Untersuchung der Wirkung von 4-PBA auf die Synthese von APP in BALB/c Wildtypen sinnvoll.

Zusammenfassend bestätigt dieses Zellexperiment jedoch die Aussage, die aus den Mausexperimenten hervorgeht: 4-PBA induziert in Leberzellen Akut-Phase-Proteine. Ein protektiver Effekt des großen HBV Oberflächenproteins wurde in der Literatur bisher noch nicht beschrieben.

#### 4.1.9 Rolle der Hochregulation von Lipocalin 2

In der Literatur wird *Lcn2* bereits als Biomarker für Schäden anderer Organsysteme und Erkrankungen beschrieben bzw. diskutiert, wie beispielsweise als Marker für akutes Nierenversagen und Lupus-Nephritis<sup>92,200,201</sup>. In einer klinischen Studie konnte humanes *Lcn2* als Biomarker und Prognoseindikator für *Akut-auf-chronisches Leberversagen* (ACLF) überzeugen<sup>202</sup>.

Diskussionen rund um *Lcn2* beschäftigen sich mit der Frage, welche Rolle die Hochregulation des Proteins spielt, denn die genaue Funktion ist noch unklar. Ist die Hochregulation positiv oder negativ zu bewerten? Auch für das Fazit dieser Arbeit muss diese Frage gestellt werden.

*Lcn2* defiziente Mäuse (*Lcn2*<sup>-/-</sup>), die mit *Tetrachlormethan* (*CCL4*), LPS, Concanavalin A behandelt oder einer Gallengangsligatur unterzogen wurden, zeigten stärkere Leberschäden als Kontrollmäuse. Diese Forschungsergebnisse sowie weitere weisen auf einen hepatoprotektiven Effekt von *Lcn2* hin<sup>96,91</sup>. Des Weiteren misst man *Lcn2* eine Funktion

als „*Help me-signal*“ in der Leber zu, da das Protein eine Rolle bei der Rekrutierung von Immunzellen ins Gewebe spielt <sup>162,203,95</sup>. Eine Hochregulation von Lcn2 wurde bereits im Zusammenhang mit der Erhöhung der Genexpression der Zytokine *mcp1* und *cxcl1* beschrieben <sup>95,96,153</sup>. In der vorliegenden Arbeit korrelierte der Lcn2-Anstieg nach einwöchiger PBA-Behandlung mit dem Anstieg proinflammatorischer Zytokine. Dieser Anstieg proinflammatorischer Zytokine könnte folglich Ausdruck des oben beschriebenen „*Help me-signals*“ zur Rekrutierung von Immunzellen sein. Möglicherweise führte die PBA-Behandlung zur Lcn2 Proteinexpression in den Hepatozyten und löste schließlich Lcn2 induzierte Genexpression von Zytokinen aus, die an der Rekrutierung von Immunzellen beteiligt sind. So wirkt die Hochregulation von Lcn2 negativ wie positiv zugleich: Negativ, im Hinblick als Indikator für hepatozelluläre Schäden <sup>202</sup>. Positiv, durch den von Lcn2 vermittelten Aufruf zur „Selbsthilfe“.

Nach 8 Wochen PBA-Behandlung war die relative mRNA Expression der Zytokine *mcp1*, *ip10*, *ccl3*, *ccl4* und *cxcl1* im Vergleich zur einwöchigen Behandlung signifikant erniedrigt (vgl. 3.2.8 und 4.1.2), obwohl Lcn2 noch stärker hochreguliert war. Bei Inhibition von *Mcp1* konnten positive Effekte für die Leber nachgewiesen werden: Die Hemmung von *Mcp1* fördert den Rückgang toxisch und metabolisch induzierter Leberfibrosen, indem die Infiltration Ly-6C positiver Makrophagen unterdrückt wird und schützt die Leber vor alkoholinduzierten Leberschäden <sup>204,205</sup>. Die verminderte Genexpression von *mcp1* nach achtwöchiger PBA-Behandlung könnte somit schon ein Effekt der von Lcn2 initiierten „Selbsthilfe“ sein.

Zusammengefasst liegt also eine Reihe von Ergebnissen vor, die für positive Auswirkungen der Lcn2 Hochregulation in der Leber sprechen.

Neben den o.g. hepatoprotektiven Effekten von Lcn2 sind auch negative Effekte beschrieben wurden: So wird dem Protein eine schädliche Rolle bei der alkoholverursachten Fettleber zugeschrieben und eine Beteiligung bei der ER-Stress-induzierten Apoptose in pulmonalen Krebszellen <sup>206,207</sup>. Außerdem ist beschrieben worden, dass Lcn2 das Fortschreiten von Brust- und Prostatakrebs fördere, indem die *epithelial-mesenchymale Transition* (EMT) induziert werde <sup>208,209</sup>. Beim HCC hingegen scheint Lcn2 diese Transition negativ zu modulieren und wirkt sich daher positiv aus <sup>210</sup>. Eine Erhöhung von Lcn2 ist mit hepatischen Pathologien wie NASH, *alkoholische Fettleberhepatitis* (ASH), HCC, Hepatitis C, Leberfibrose und Inflammation allgemein assoziiert <sup>211–214,91,96</sup>.

Publikationen bezüglich Hepatitis B oder HBV-spezifischen Maus-Modellen im Zusammenhang mit einer Lcn2-Erhöhung liegen bislang noch nicht vor. In der vorliegenden

Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass die Akkumulation des HBsAg im ER von HBs-transgenen Mäusen in männlichen Mäusen zu einer Erhöhung von Lcn2 führt. Diesbezüglich wären weitere Versuche interessant, um einen Zusammenhang zwischen HBV und Lcn2 zu evaluieren, beispielsweise die Kreuzung HBs-transgener Mäuse mit Lcn2 defizienten Modellen. Es stellt sich außerdem die Frage, ob Lcn2 ein Schlüsselement zelleigener Mechanismen zur „Selbsthilfe“ bei Leberschäden ist. Da Lcn2 so stark auf die Veränderungen der Leberzellen durch 4-PBA reagiert, muss das Protein auch weiterhin als Biomarker oder Prognoseindikator für Leberzellschäden und Lebererkrankungen diskutiert werden.

## 4.2 Vergleich der Ergebnisse mit anderen Studien zur ER Stress-Minderung mit 4-PBA

ER Stress führt über die Anhäufung fehlgefalteter Proteine zur Auslösung der Unfolded Proteine Response (UPR). Die UPR wird über drei prominente Signalwege vermittelt, an dessen Auslösung die in der Membran des ER lokalisierten Proteine Atf6, Perk und Ire1 beteiligt sind (vgl. 1.4, Abbildung 4). Die Signalwege der UPR fördern die Expression von Genen, die die Zelle entweder in den Zelltod steuern oder sie wieder regenerieren, indem die Translation heruntergefahren wird, Proteine vermehrt degradiert und Chaperone zur Faltungshilfe synthetisiert werden<sup>14,54</sup>. In Teilarbeiten dieses Projektes wurden ER Stress Marker untersucht: Auf Proteinexpressionsebene zeigte sich die Aktivierung der ER Stress Marker eIF2 $\alpha$ , Perk und Atf6 unter PBA-Behandlung<sup>132,133,215</sup>. Auf Genexpressionsebene konnte unter achtwöchiger PBA-Behandlung eine Hochregulation von gespleißtem *X-box binding protein 1 (Xbp1s)* nachgewiesen werden<sup>215</sup>. *Xbp1* wird nach Aktivierung des Ire1-Signalweges gespleißt und wirkt im Kern als Transkriptionsfaktor, der die Genexpression von z.B. Chaperonen bewirkt<sup>54</sup>. Diese Ergebnisse demonstrierten in allen drei UPR Signalwegen eine vermehrte Aktivität unter PBA-Behandlung. Demnach führte 4-PBA in diesem Projekt nicht zur gewünschten ER Stress Minderung sondern bewirkt die Auslösung von ER Stress.

Im Hinblick auf die Forschungsergebnisse der letzten Jahre verwundert dieses Ergebnis. Schließlich zeigte sich weitgehend, dass 4-PBA den ER Stress in Zellen erfolgreich vermindern kann<sup>15,16,62,63,65</sup>. In der vorliegenden Arbeit wurden die Mäuse mit 200 mg 4-PBA pro Kilogramm Körpergewicht pro Tag behandelt. 4-PBA wurde eine Woche oder

acht Wochen oral über das Trinkwasser appliziert. Es stellt sich also zunächst die Frage, ob die gewählte Dosierung nicht ausreichend war, um den ER Stress zu vermindern. Allerdings orientierte man sich bei der Planung des Tierversuchs an Publikationen, bei denen 200 mg 4-PBA pro Kilogramm Körpergewicht ausreichend waren, um ER Stress zu reduzieren: Mosbah et al. gelang die ER-Stress Minderung in Fettlebern und gesunden Lebern nach Leberteilektomie und 60-minütiger Ischämie der Lebern mit 200 mg 4-PBA/kg Körpergewicht. Der Wirkstoff wurde vor dem chirurgischen Eingriff einmalig appliziert. Die genaue Applikationsform wird in der Publikation nicht beschrieben. Als Tiermodell dienten hier Ratten anstelle von Mäusen<sup>216</sup>. Die von uns angewandte Dosis wurde zudem bereits in klinischen Studien zur Anwendung bei Harnstoffwechselstörungen auf Sicherheit und Pharmakokinetik an Menschen getestet<sup>217</sup>. Somit ließe sich diese Dosis bei Erreichen eines therapeutischen Effekts im Tiermodell auch umstandslos in klinische Studien übertragen.

Mosbah et al. verabreichten 4-PBA nur einmal<sup>216</sup>. Eine Darreichung über einen längeren Zeitraum könnte eine ganz andere Wirkung auf die Leber haben. In einer anderen Forschungsarbeit gelang es ER Stress im Fettgewebe mit 4-PBA zu reduzieren: Hier wurde Mäusen 4-PBA zu einem in einer höheren Dosis (1g/kg Körpergewicht pro Tag) und zum anderen für einen Zeitraum von 6 Wochen appliziert. Die Applikation erfolgte oral und aufgeteilt in 2×500 mg Dosen pro Tag<sup>64</sup>. Das Ergebnis dieser Arbeit zeigt, dass eine ER Stress-Inhibition bei einer langen Darreichungsdauer von 6 Wochen möglich ist. Doch wurde der ER Stress in diesem Fall in einem anderen Organ, dem Fettgewebe, vermindert. Da 4-PBA nach seiner Resorption im Darm in den Hepatozyten via  $\beta$ -Oxidation rasch zu Phenylacetat verstoffwechselt wird (vgl. 4.1.5, Abbildung 35), könnte die Leber als erste Anlaufstelle in der Metabolisierung viel empfindlicher auf eine längerfristige Applikation reagieren als andere Organe<sup>57,58</sup>. Außerdem interessant sind die Arbeiten von El Karoui et al.: Hier wurde Mäusen 4-PBA wie in unserer Arbeit über das Trinkwasser appliziert. Auch bei El Karoui wurde mit einer höheren Dosis gearbeitet (1g/kg Körpergewicht pro Tag). Die Applikationsdauer betrug insgesamt 4 Wochen. Es zeigte sich, dass Calcium-Freisetzung aus dem ER von Nierentubulizellen zum ER Stress führt. Der ER Stress korreliert mit einer Überexpression von Lcn2. Durch die PBA-Behandlung konnte sowohl der ER Stress als auch die Lcn2 Überexpression vermindert werden<sup>218</sup>. Interessant ist vor allem die Parallele zur vorliegenden Arbeit: Die Aktivierung von ER Stress geht mit einer verstärkten Lcn2 Expression einher. Die Inhibition des ER Stress erfolgt aber auch hier nicht in der Leber sondern in Zellen der Nierentubuli und vielleicht wurde ein Teil des

Wirkstoffes 4-PBA bei Erreichen der Niere schon zu Phenylacetat oder Phenyacetylglutamin metabolisiert<sup>57,58</sup>. Daher relativiert sich die Annahme, man habe in der vorliegenden Arbeit eine zu geringe Dosis 4-PBA verabreicht.

In anderen Versuchen wurde 4-PBA intraperitoneal appliziert<sup>66,219</sup>. Beispielsweise konnte durch CCl<sub>4</sub> induzierter ER Stress in Mäuselebern mittels intraperitonealer PBA-Injektion abgeschwächt werden. In diesem Beispiel wurde eine Dosis von 150 mg 4-PBA/kg Körpergewicht zwei Mal täglich über insgesamt 8 Wochen verabreicht<sup>66</sup>. Folglich stimmen Darreichungsdauer und das betroffene Organsystem, die Leber, mit unserem Tierversuch zum Teil überein. Bei einer Tagesdosis von 300 mg 4-PBA/kg Körpergewicht liegt die Dosierung etwas höher als im vorliegenden Projekt. Lediglich die Applikationsform ist anders gewählt.

Zusammengefasst entsteht im Vergleich mit anderen Arbeiten der Eindruck, dass eine höhere Dosierung 4-PBA hätte gewählt werden müssen, um ER Stress in Hepatozyten zu vermindern. In zu „niedrigen“ Dosierungen könnte 4-PBA hingegen ER Stress in der Leber auslösen, weil die Hepatozyten durch die fortwährende Behandlung stetig mit dem metabolischen Abbau des Fremdstoffes belastet werden.

### 4.3 Limitationen der Arbeit

#### 4.3.1 Kritische Betrachtung des Versuchsaufbaus

In dieser Arbeit wurde Mäusen für den Zeitraum von einer bzw. acht Wochen 200 mg des synthetischen Chaperons 4-PBA pro Kilogramm Körpergewicht oral über das Trinkwasser verabreicht. Diese Applikationsform weist Vor- und Nachteile auf.

Von Vorteil ist, dass der Wirkstoff 4-PBA im Darm gut resorbiert wird und über den Pfortaderkreislauf zügig an den gewünschten Wirkort, die Leber, gelangt, wo er weiter verstoffwechselt wird<sup>57</sup>. Es ist jedoch auch bekannt, dass 4-PBA beim Menschen nur eine Prodrug darstellt: Der Wirkstoff wird in der Leber schnell zu Phenylacetat umgewandelt (s. dazu die Arzneimittelinformation der EMA unter: [www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu), Stichwort Ammonaps®, Stand 09.03.2019, letztes Update: 07.03.2019). Möglicherweise konnte 4-PBA seine Funktion als Chaperon also gar nicht ausführen, da es zu schnell in Phenylacetat verstoffwechselt wurde. Dagegen spricht jedoch, dass 4-PBA als erfolgreicher ER Stress-Inhibitor im Maus-Modell bereits erprobt ist<sup>64,218</sup>. Die oben genannten

pharmakokinetischen Daten beziehen sich außerdem auf die Verstoffwechslung von 4-PBA im Menschen. In Mäusen könnte die Umwandlung von 4-PBA zu Phenylacetat mit einer anderen Geschwindigkeit ablaufen. Vorteil am Versuchsaufbau mit oraler Aufnahme des Wirkstoffes ist zudem, dass es die bevorzugte Applikationsform bei einem möglichen Einsatz am Menschen darstellen würde.

Ungünstig am Versuchsaufbau ist hingegen, dass das Trinkverhalten von Mäusen individuell ist. In Versuchen wurde bereits gezeigt, dass 4-PBA das Trinkverhalten von Mäusen nicht beeinflusst<sup>114</sup>. Dennoch konnte in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden, dass jede Maus dieselbe Menge Wasser mit Wirkstoff getrunken hat. Das ist möglicherweise der Grund dafür, dass die Proben in der Regulation verschiedener Gene und Proteine auch innerhalb einer Behandlungsgruppe oft sehr inhomogene Ergebnisse aufwiesen.

Im vorliegenden Projekt wurden Wildtyp BALB/c Mäuse, unbehandelte HBs-transgene Mäuse und mit 4-PBA behandelte HBs-transgene Mäuse verglichen. Um den Einfluss von 4-PBA auf die Leber besser beurteilen zu können, wäre der Vergleich mit einer weiteren Kontrollgruppe hilfreich gewesen. So hätte man zusätzlich BALB/c Wildtypen mit 4-PBA behandeln können. Damit hätte sich die Wirkung von 4-PBA auf eine gesunde, stressfreie Leber besser beurteilen lassen. Im Zellversuch mit der murinen Hepatozytenzelllinie AML12 kam es nach PBA-Behandlung auch in den Zellen zur APR, die kein LHBs stabil transfizierten. Nun stellt sich die Frage, ob PBA-Behandlung auch in Wildtyp-Mäusen zur Auslösung einer Akut-Phase-Antwort führt. Grundsätzlich beschreiben Reviews, die den klinischen und experimentellen Einsatz von 4-PBA analysieren, keine Hinweise auf leberschädliche Nebenwirkungen oder eine gesteigerte Inflammation unter Behandlung<sup>60</sup>. Die Fachinformation vom Handelsprodukt Ammonaps® weist auf mögliche Transaminasenerhöhungen unter der Behandlung beim Menschen hin (s. dazu die Arzneimittelinformation der EMA unter: [www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu), Stichwort Ammonaps®, Stand 09.03.2019, letztes Update: 07.03.2019). Desweiteren demonstriert die Arbeit von Holecek et al. einen negativen Effekt von 4-PBA auf die Leber: In gesunden Ratten, die einer partiellen Hepatektomie unterzogen wurden, kam es unter PBA-Behandlung zur verschlechterten Leberregeneration und gesteigerten Apoptose verglichen mit Ratten, die nicht mit 4-PBA behandelt wurden. Als Ursache für diesen Effekt wird ein verändertes Verhältnis der Konzentrationen der verzweigt-kettigen Aminosäuren (Valin, Leucin, Iso-

leucin) zu den aromatischen Aminosäuren (Phenylalanin und Tyrosin) unter PBA-Behandlung vermutet <sup>220</sup>. Die quantitative Analyse der Aminosäuren aus dem Blutplasma der Mäuse stellt daher eine interessante Option für Folgeversuche in diesem Projekt dar.

Demgegenüber gibt es Versuche, die einen hepatoprotektiven Effekt durch PBA-Behandlung in Mäusen demonstrieren: Es konnte gezeigt werden, dass männliche C57BL/6 Mäuse mit durch Acetaminophen induziertem Leberschaden von der intraperitonealen Behandlung mit 4-PBA profitierten. Sie zeigten eine verringerte hepatozelluläre DNA-Fragmentation <sup>221</sup>. Das Ausmaß degradierter DNA-Fragmente gilt als biochemischer Nachweis des programmierten Zelltodes, der Apoptose <sup>222</sup>. Somit demonstrierte die Arbeit einen positiven Effekt der PBA-Behandlung auf die Leber. Diese Diskrepanzen zum Einfluss von 4-PBA auf die Leber veranlassen dazu die leberspezifische Wirkung des Chaperons zu reevaluieren.

#### 4.3.2 Einfluss epigenetischer Methylierungseffekte auf den Versuch

In der Immunhistochemie HBs-transgener Mäuse zeigte sich, dass es innerhalb der Leber Bereiche gibt, in denen sich kein HBsAg befindet (vgl. Kapitel 3.1, Abbildung 16, Bild C). Dies beruht auf einem Effekt, der bereits in diesem Maus-Modell entdeckt und beschrieben wurde: Epigenetische Veränderungen, unter Anderem die Methylierung spezifischer CpG-Inseln im Genom HBs-transgener Mäuse, führen zum Verlust von HBsAg in der Leber des Maus-Modells. Dieses „*Silencing*“ ist spontan und altersabhängig. In 20% der 12 Wochen alten HBs-transgenen Mäuse konnte das Fehlen von HBsAg in der Leber beobachtet werden. Im Hinblick auf die unterschiedlichen Ergebnisse männlicher und weiblicher Mäuse in der vorliegenden Arbeit sei zu erwähnen, dass die Methylierungseffekte nicht genderabhängig sind <sup>131</sup>.

Für diese Doktorarbeit bedeutet der beschriebene epigenetische Effekt, dass in den behandelten Mausgruppen sowie in den unbehandelten Kontrollen das Hepatitis B Hüllprotein in unterschiedlichem Ausmaß exprimiert wurde. Folglich sind die Proteinfehlfaltung und der ER Stress durch das HBsAg in jeder Maus anders ausgeprägt. Somit sind insbesondere die Ergebnisse quantitativer Analyseverfahren (Microarray, qRT-PCR, Western Blot) kritisch zu betrachten, da sie abhängig vom Ausmaß der HBsAg Expression sind. In der IHC hingegen lassen sich exprimierende Bereiche und nicht exprimierende Berei-

che gut voneinander differenzieren und beurteilen. Da in der vorliegenden Arbeit hauptsächlich mit 12 Wochen alten Mäusen gearbeitet wurde, ist der Methylierungseffekt zu ungefähr 20% vorhanden. In den zum Teil durchgeführten Experimenten an 5 Wochen alten Mäusen (vgl. 3.3.2) ist keine Beeinflussung durch das „*Silencing*“ zu erwarten. In 26 Wochen alten Mäusen hingegen wurde der Effekt mit Verlust des HBsAg in 45% beschrieben<sup>131</sup>. Von diesem Gesichtspunkt aus sind die 5 Wochen alten Mäuse am Besten für Versuche geeignet, da sie unbeeinflusst vom Methylierungseffekt sind und kein Verlust des HBsAg aufweisen. Für das Gesamtkonzept des Versuches sind die 5 Wochen alten Mäusen hingegen weniger gut geeignet: Leberzellschäden in HBs-transgenen Mäusen sind altersabhängig. Verglichen mit Wildtypen sind Leberhistologien 4 Wochen alter Mäuse unauffällig<sup>52,223</sup>. Somit waren die in dieser Arbeit hauptsächlich untersuchten 12 Wochen alten Mäuse für den Versuch am Besten geeignet.

#### 4.4 Ausblick und Ideen zur Versuchsfortführung

Zunächst wäre es wichtig ein Zellkulturmodell für die Versuche mit 4-PBA zu etablieren. Verschiedene Zelltypen könnten neben der murinen Hepatozytenzelllinie AML12 zum Einsatz kommen. Darüber hinaus müsste die Behandlung mit 4-PBA in unterschiedlichen Konzentrationen und unterschiedlich lange (beispielsweise 12 Stunden, 24 Stunden, 48 Stunden, 72 Stunden) erfolgen. So könnte ermittelt werden, unter welchen Umständen genau 4-PBA zur Induktion einer APR führt. Welcher Faktor oder welches Zytokin zur Aktivierung von Stat3 und darüber zur Expression der APP wie Lcn2 führt, konnte bislang noch nicht geklärt werden. Mittels Zellversuch könnte der Signalweg vollständig rekonstruiert werden.

Im Zellversuch zeigten Zellen ohne LHBs eine Hochregulation von APP. Die Hochregulation fiel stärker aus als in den Zellen, die LHBs exprimierten. Darum wäre es wichtig herauszufinden, ob das Hepatitis B Oberflächenprotein einen schützenden Effekt bei der Behandlung mit 4-PBA hat. Außerdem wäre es interessant, Wildtyp BALB/c Mäuse mit 4-PBA zu behandeln. So könnte der Einfluss des Wirkstoffes auf eine gesunde Leber besser beurteilt werden (vgl. 4.3.1).

Um zu evaluieren, welche Rolle Lcn2 im Zusammenhang mit der Akkumulation von HBsAg spielt, wäre ein weiterer Tierversuch eine interessante Option: Wie in 4.2.9 vorgeschlagen, könnten Lcn2 defiziente Mäuse (Lcn2<sup>-/-</sup>) mit dem HBs-transgenen Maus-

Modell gekreuzt werden. Dieses Vorgehen würde keine Akkumulation fehlgefalteter Proteine vermindern, wie ursprünglich in diesem Projekt vorgesehen, aber es würde neue Erkenntnisse über die Bedeutung und Funktion einer Lcn2 Hochregulation liefern. Zudem gibt es bislang noch keine Studien, die einen Zusammenhang zwischen HBsAg und Lcn2 beschreiben. Da Lcn2 so sensitiv auf Inflammation reagiert, wäre es wichtig zu ermitteln, ob das Protein als Biomarker bei Lebererkrankungen eine Rolle spielen kann. Ein weiterer interessanter Ansatz zur Versuchsfortführung wäre der Einsatz eines anderen Chaperons: *Tauroursodeoxycholic acid* (TUDCA) ist ein Gallensäurederivat, das wie 4-PBA Potential zur Auflösung von Proteinaggregaten hat und zur Inhibition von ER Stress führen kann <sup>61,62,64,224</sup>. Daher wurde TUDCA in Teilarbeiten dieses Projekts bereits am Zellmodell untersucht. Die Aggregation überexprimierter HBV-Hüllproteine konnte durch Zugabe von TUDCA in der Fibroblastenzelllinie NIH 3T3 vermindert werden <sup>225</sup>. Der Einsatz von TUDCA am HBs-transgenen Maus-Modell könnte möglicherweise zur gewünschten ER Stress Minderung im Maus-Modell führen und die Leberpathologie verbessern.

#### 4.5 Fazit

Ziel in diesem Projekt war es den ER Stress in Hepatozyten im HBs-transgenen Maus-Modell mit dem synthetischen Chaperon 4-PBA zu vermindern. Bei erfolgreichem Einsatz von 4-PBA im Maus-Modell käme der Wirkstoff als Therapieoption bei chronischer Hepatitis B in Frage. Anders als bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Parkinson oder Alzheimer kann das synthetische Chaperon 4-PBA den ER Stress bei HBs-transgenen Mäusen nicht vermindern. Somit stellt der Wirkstoff keine Therapieoption für die chronische Hepatitis B dar. Stattdessen verursachte das Chaperon eine Akut-Phase-Antwort in der Leber, angeführt von einer signifikanten Hochregulation von Lcn2 in männlichen Mäusen. Der Signalweg, der zur Hochregulation führte, konnte zum Teil rekonstruiert werden: Aktiviertes Stat3 spielt eine Rolle als Transkriptionsfaktor bei der Induktion von Lcn2. Durch welche Faktoren Stat3 wiederum aktiviert wurde, konnte im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen nicht abschließend geklärt werden. Außerdem zeigte sich unter einwöchiger PBA-Behandlung eine gesteigerte Genexpression proinflammatorischer Zytokine. Die Induktion dieser chemotaktisch wirksamen Zytokine,

könnte durch Lcn2 bedingt sein und untermauert die bereits beschriebene Funktion des Proteins als „Help-me signal“ in der Leber <sup>95</sup>.

In den Versuchen mit der murinen Leberzelllinie AML12 wurde ebenfalls ein Anstieg von mRNA von Genen der Akut-Phase-Antwort beobachtet. Der Anstieg zeigte sich auch in den Zellen, die kein HBs-Oberflächenprotein exprimierten. Diese Beobachtung ist ein Hinweis darauf, dass 4-PBA für die signifikante Reaktion im Lebergewebe verantwortlich gemacht werden kann. Da die APR in den Hepatozyten ohne Oberflächenprotein stärker ausfiel, ist noch unklar, ob das HBsAg einen schützenden Effekt auf die Leberzellen ausübt.

Auf der Basis der hier zusammengefassten Ergebnisse empfiehlt sich der Wirkstoff 4-PBA vermutlich nicht für den langfristigen klinischen Einsatz. Die erhöhten Lcn2-Level suggerieren verstärkte Leberzellschäden. Insbesondere bei vorgeschädigter Leber sollte das Chaperon mit Vorsicht dosiert werden.

Lcn2 kommt hingegen als potentieller Biomarker für Leberpathologien in Frage. In den Mausversuchen imponierte außerdem ein starker Geschlechtsunterschied. Daher muss evaluiert werden, ob das Protein Lcn2 besonders sensitiv auf Schäden im männlichen Geschlecht reagiert. Interessant ist weiterhin die Frage, wie Lcn2 bei humanen Leberzellschäden exprimiert wird, insbesondere bei chronischer Hepatitis B, und ob es dort ebenfalls einen Geschlechtsunterschied in der Expression gibt.

Die vorliegende Arbeit hebt Lcn2 als prominentes Akut-Phase-Protein im Maus-Modell hervor. Da Lcn2 auch in HBs-transgenen Mäusen ohne PBA-Behandlung hochreguliert ist, kann erstmalig ein Zusammenhang zwischen dem Hepatitis B Oberflächenantigen und dem Vorkommen von Lcn2 hergestellt werden. Die Bedeutung dieses Zusammenhangs kann von nun an genauer analysiert werden und einen positiven Beitrag zum Verständnis der Leberpathologie der chronischen Hepatitis B leisten.

## Zusammenfassung

Weltweit leiden circa 240 Millionen Menschen an chronischer Hepatitis B. An den Folgen der Krankheit, wozu Leberzirrhose und das *hepatozelluläre Karzinom* (HCC) gehören, sterben jährlich über 686 000 Menschen. Neben der Prävention durch die Schutzimpfung ist es daher besonders wichtig, den Fokus auf Therapiemöglichkeiten zur Verhinderung dieser Folgekrankheiten zu legen.

Für die Leberpathologie der chronischen Hepatitis B wird vor allem das zelluläre Immunsystem verantwortlich gemacht. Es wird zudem vermutet, dass das *Hepatitis B Virus* (HBV) direkte zytopathische Effekte hat, die auf der Akkumulation der HBV Oberflächenproteine im *endoplasmatischen Retikulum* (ER) der Hepatozyten beruhen.

Diese Akkumulationen führen in Mäusen, die transgen für das HBV Oberflächenprotein HBsAg sind, zu ER Stress. In dieser Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob der ER Stress mithilfe des synthetischen Chaperons *4-Phenylbutyrat* (4-PBA) im Maus-Modell vermindert werden kann. 4-PBA könnte bei chronisch infizierten HBV Trägern eine Möglichkeit darstellen, die Entwicklung typischer Folgeschäden aufzuhalten. Dazu wurde ein HBs-transgenes Maus-Modell auf genetischem BALB/c Hintergrund etabliert und für eine Woche und acht Wochen mit 4-PBA behandelt. Leber und Seren der Mäuse wurden konserviert und mittels Microarray, qRT-PCR, Western Blot und Immunhistochemie untersucht.

Im HBs-transgenen Maus-Modell wurde der ER Stress mit 4-PBA entgegen der initialen Hypothese nicht vermindert. Der Wirkstoff verursachte vielmehr eine Akut-Phase-Antwort im Lebergewebe. Unter den hochregulierten Akut-Phase-Proteinen imponierte vor allem eine signifikante Hochregulation des *Lipocalin 2* (Lcn2) in männlichen Mäusen. Somit wurde im Rahmen dieses Projektes zunächst Lcn2 als prominentes Akut-Phase-Protein in männlichen Mäusen unter Einfluss der HBV Oberflächenproteine identifiziert. Der Transkriptionsfaktor Stat3 war maßgeblich an der Genregulation von Lcn2 beteiligt. Außerdem kam es unter PBA Behandlung zur signifikanten Hochregulation von Genen der Interferon-Antwort. Korrelationen in der Proteinexpression von Stat3, Lcn2 und dem *Interferon-stimulated gene 15* (Isg15) suggerieren, dass Stat3 gemeinsamer Transkriptionsfaktor von Genen der APR sowie der Interferon-Antwort ist. Durch die Gabe von 4-

PBA kam es zudem zu einer teils signifikant gesteigerten Genexpression proinflammatorischer Zytokine, die vermutlich durch Lcn2 induziert wurde und Ausdruck eines Hilfesignals der Hepatozyten sein könnte.

Die erhöhten Lcn2-Level weisen auf Leberzellschäden im HBs-transgenen Maus-Modell unter PBA-Behandlung hin. Da Lcn2 sensitiv auf Schäden im männlichen Geschlecht reagiert, könnte Lcn2 als potentieller Biomarker bei Leberpathologien in Frage kommen. Darüber hinaus haben wir erstmals einen Zusammenhang zwischen dem HBV-Oberflächenprotein HBsAg und erhöhten Lcn2-Leveln beschrieben. Dieser Zusammenhang muss noch weiter analysiert werden um mögliche Anwendungen in Diagnostik und Therapie der chronischen Hepatitis B zu eruieren.

## Summary

About 240 million people worldwide suffer from chronic hepatitis B. Nearly 686 000 people die every year in consequence of this chronic infection, for example because of liver cirrhosis or *hepatocellular carcinoma* (HCC). Therefore, not only the hepatitis B vaccination but also the prevention of severe liver pathologies caused by infection is important. Liver pathology in chronic hepatitis B is mainly caused by the cellular immune response. However, direct cytopathic effects of the hepatitis B virus are also supposed to take part in liver pathology. Accumulations of hepatitis B surface antigens in the *endoplasmic reticulum* (ER) of hepatocytes are a reason for ER stress resulting in impaired liver homeostasis.

In a HBs-transgenic mouse model of chronic hepatitis B *Hepatitis B surface proteins* (HBsAg) aggregate within the ER of hepatocytes leading to ER stress. The aim of this project was to attenuate ER stress by treating these mice with the synthetic chaperon *4-Phenylbutyric acid* (4-PBA) in order to present a novel possibility to treat liver pathologies in chronic hepatitis B. Therefore a HBs-transgenic mouse model on genetic BALB/c background was created and treated with 4-PBA for one week or eight weeks. Liver and serum samples were stored and analysed via microarray, qRT-PCR, western blot and immunohistochemistry.

4-PBA is not able to reduce ER stress in HBs-transgenic mice. Instead, 4-PBA induces an acute phase response in the liver accompanied by a significant upregulation of *Lipocalin 2* (Lcn2) in male mice. Here we emphasize Lcn2 as an important acute phase protein in mice. Lcn2 upregulation is probably promoted by the transcription factor Stat3. Besides 4-PBA treatment induces a significant upregulation of interferon response genes. Correlations between the protein expression pattern of Stat3, Lcn2 and *Interferon-stimulated gene 15* (Isg15) suggest Stat3 being a common transcription factor for both, the acute phase and the interferone response. Furthermore an upregulated gene expression of proinflammatory cytokines was observed and is presumably induced by Lcn2 revealing its properties as “help-me” signal for cellular homeostasis.

Upregulated Lcn2-levels indicate liver damage in HBs-transgenic mice and in PBA-treated HBs-transgenic mice. Since Lcn2 is so sensitively upregulated by liver damage in males, it may play a role as a biomarker for liver pathologies.

Moreover, we show for the first time that upregulated Lcn2-levels are associated with the hepatitis B surface antigen. From now on these outcomes can be studied extensively and they may reveal new insights into diagnostic and therapy of chronic hepatitis B.

## Abkürzungsverzeichnis

### A

ABC-Transporter	ATP binding cassette-Transporter
ACLF	Acute on chronic liver failure, (Akut-auf-chronisches Leberversagen)
AG	Arbeitsgemeinschaft
AKI	Acute kidney injury
Akt	<i>Auch Proteinkinase B</i>
AML12	Alpha mouse liver 12 (murine Hepatozytenzelllinie)
ANV	Akutes Nierenversagen
Anti-HBs	Antikörper gegen das HBs-Antigen
AP	Alkalische Phosphatase
APP	Akut-Phase-Protein
APR	Akut-Phase-Reaktion
APRF	Akut-Phase-Response-Faktor, <i>auch Stat3</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ASH	Alkoholische Steatohepatitis
Atf6	Activating transcription factor 6
ATP	Adenosintriphosphat
Aqua dest.	Aqua destillata

### B

BALB/c	Ein Albino-Mausstamm
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
Bcl6	B cell lymphoma 6
BL6	Mausstamm Black 6, <i>auch C57BL6</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
Bzw.	beziehungsweise

### C

C57BL/6	Ein Mausstamm
C3	Komplementfaktor C3
C5	Komplementfaktor C5
Ca.	Circa
cDNA	Complementary DNA
cccDNA	Covalently closed circular DNA
CHOP	C/EBP homologous protein
Ccl2	C-c motif ligand 2, <i>auch Mcp1</i>
Ccl3	C-c motif ligand 3, <i>auch Mip1a</i>
Ccl4	C-c motif ligand 4, <i>auch Mip1β</i>
CCl <sub>4</sub>	Summenformel von Tetrachlormethan

---

Ccl11	C-c motif ligand 11
Cis	Cytokin-induced Stat inhibitor
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Crp	C-reaktives Protein
Csf1	Colony stimulating factor 1
CT	Cycle treshold
Cxcl11	C-x-c motif ligand 11, <i>auch Gro-α</i>
Cxcl13	C-x-c motif ligand 13, <i>auch Blc</i>
Cxcr2	C-x-c motif Chemokinrezeptor 2
Cxcr3	C-x-c motif Chemokinrezeptor 3
<b>D</b>	
d	Tag
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
D.h.	Das heißt
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
<b>E</b>	
ECL	Elektrochemilumineszens
Egf	Epidermal growth factor
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Erk	Extracellular signal regulated kinase
<b>F</b>	
Fa.	Firma
FBS	Fetal bovine serum
FC	Fold change
Fgf21	Fibroblast growth factor 21
Fgl1	Fibrinogen-like protein 1
<b>G</b>	
GAS	Gamma activating site
G-Csf	Granulocyte-Colony stimulating factor
GGH	Ground glass hepatocytes
Gh	Growth hormon
Ghr	Growth hormon receptor
Grp78	78 kDa glucose regulated protein, <i>auch BiP oder HspA5</i>
<b>H</b>	
HBsAg	Hepatitis B surface Antigen
HBV	Hepatitis B Virus
HBVTg/6	HBs-transgene Maus vom genetischen Black 6 Hintergrund

---

HBVTG/c	HBs-transgene Maus vom genetischen BALB/c Hintergrund
HCC	Engl. Hepatocellular Carcinoma
HDACi	Histondeacetylase Inhibitor
HPA-Achse	Hypophysen-Hypothalamus-Nebennieren-Achse (engl. Hypothalamic-pituitary-adrenal-axis)
HRP	Horseradish peroxidase
Hsp40	Heat shock protein 40, <i>auch DnaJ</i>
Huh7	Humane Leberzelllinie
<b>I</b>	
Icam1	Intercellular adhesion molecule-1, <i>auch CD54</i>
Ifit1	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1
Ifnar	Interferon $\alpha/\beta$ receptor alpha chain
Ifngr	Interferon $\gamma$ receptor
Igf1	Insulin-like growth factor 1
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
Il1	Interleukin-1
Il1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
Il6	Interleukin-6
Inf $\alpha$	Interferon $\alpha$
Inf $\beta$	Interferon $\beta$
Inf $\gamma$	Interferon $\gamma$
Ire1	Inositol-requiring-enzyme 1
Isg	Interferon stimulated gene
Isg15	Interferon stimulated gene 15
ISRE	Interferon stimulated response elements
Ip10	Interferon $\gamma$ -induced protein 10, <i>auch Cxcl10</i>
<b>J</b>	
Jak	Januskinase
Jak2	Januskinase 2
<b>K</b>	
kb	kilobase
kDa	Kilodalton
<b>L</b>	
Lbp	Lipopolysaccharide-binding protein
Lcn2	Lipocalin 2
LHBs	Large HBV surface protein
log	Logarithmus von
LPS	Lipopolysaccharide
Ly6c	Lymphocyte antigen 6 complex, locus C

Ly6d	Lymphocyte antigen 6 complex, locus D
<b>M</b>	
mA	Mili-Ampère
Mcp1	Monocyte chemoattractant protein-1, <i>auch Ccl2</i>
MHBs	Middle HBV surface protein
miRNA	Micro RNA
mL	Mililiter
MOPS	3-N-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	Messenger RNA
Mt1	Metallothionein 1
Mt2	Metallothionein 2
<b>N</b>	
n	Anzahl
Na-PBA	Natrium-Phenylbutyric acid
NASH	Nichtalkoholische Steatohepatitis
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
Ngal	Neutrophil gelatinase-associated protein
NIH 3T3	Murine Fibroblastenzelllinie
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
Nrf2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
NTCP	Natrium-taurocholate-cotransporting-polypeptide
<b>O</b>	
o.g.	Oben genannt/e
ORF	Open reading frame
Orm1	Orosomucoid 1, <i>auch alpha-1-acid glycoprotein 1</i>
<b>P</b>	
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
4-PBA	4-Phenylbutyric acid
PBS	Phosphate buffered saline
Pdgf	Plateled derived growth factor
Pdl1	Programmed cell death ligand 1
Pepck	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
Perk	Proteinkinase RNA-like endoplasmic reticulum Kinase
PFA	Paraformaldehyd
PgE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
pg RNA	Pregenomic ribunucleic acid
Pip5k1 $\alpha$	Phosphatidylinositol-4-phosphat 5-kinase 1 $\alpha$
pre RNA	Precore ribunucleic acid
Ptp1b	Protein-tyrosine phosphatase 1b, <i>auch Ptpn1</i>

PVDF-Membran	Polyvinylidendifluorid-Membran
<b>Q</b>	
qRT-PCR	Quantitative realtime polymerase chain reaction
<b>R</b>	
rc DNA	Relaxed circular DNA
RES	Retikuloendotheliales System
RNA	Ribonucleic acid
ROS	Reactive Oxygen species
rpm	Revolutions per minute
RT	Reverse Transcriptase
<b>S</b>	
s.	siehe
Saa	Serumamyloid A
Saa1	Serumamyloid A1
Saa2	Serumamyloid A2
Saa3	Serumamyloid A3
SaP	Serumamyloid P component
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SHBs	Small HBV surface protein
Shp2	Src-homology 2 domain containing protein tyrosine kinase, <i>auch Ptpn11</i>
shRNA	Small hairpin RNA
SJL	Mausstamm Swiss Jim Lambert
Src	Tyrosinkinase, <i>auch c-src</i> , Akronym aus <i>cellular</i> und <i>sarcoma</i>
Stat	Signal transducer and activator of transcription
Stat3	Signal transducer and activator of transcription 3
Stat5	Signal transducer and activator of transcription 5
Socs2	Suppressor of cytokine signaling 2
Sog.	Sogenannt
SOP	Standard operating procedure
SVP	Subviral particles
<b>T</b>	
T <sub>3</sub>	Trijodthyronin
T <sub>4</sub>	Tetrajodthyronin
TBS	Tris buffered saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tg	transgen
Tgfβ	Transforming Growth Factor β
Tris	Abkürzung von Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tnfα	Tumornekrosefaktor α
TUDCA	Tauroursodeoxychlic acid

**U**

UPR

Unfolded protein response

uPA-SCID

Name eines Mausmodells: Urokinase Plasminogen  
Aktivator -Severe combined immunodeficiency dis-  
ease

UV

Ultraviolett

**V**

Vgl.

vergleiche

**W**

WT

Wildtyp

## Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Histologische Struktur der Leber modifiziert nach Welsch et al. <sup>20</sup>. Die *Glisson-Trias* setzt sich zusammen aus Vena interlobularis, Arteria interlobularis und einem Gallengang. Die Pfeile markieren die Flussrichtung: Das Blut in den Sinusoiden läuft auf die Zentralvene zu, die in den Leberzellen produzierte Galle läuft entgegengesetzt in Richtung der großen Gallengänge. ....9
- Abbildung 2: Replikationszyklus des Hepatitis B Virus modifiziert nach Tong et al. <sup>41</sup>. (1) Infektion durch Binden an den *Na<sup>+</sup>-taurocholat-cotransporting-Polypeptid*-Rezeptor (NTCP-Rezeptor) und Enthüllung des Virus (engl.: *Uncoating*) (2) Transport zum Nukleus (3) Umwandlung der rcDNA in die cccDNA, die das Template für die vier ORFs ist (4) Transkription der preC mRNA, pgRNA, preS/S mRNA und HBx mRNA (5) Translation der pgRNA im Zytosol (6) Das P-Protein wird in ein *Core* verpackt und synthetisiert die (-)-Strang DNA (Reverse Transkriptase) (7) Die (+)-Strang DNA wird synthetisiert. Nun liegt ein reifes *Core*-Partikel mit rcDNA vor (8) Umhüllung des *Core*-Partikels durch die HBV Oberflächenproteine am ER (9) Alternativ tritt der *Core*-Partikel erneut in den Nukleus um mehr cccDNA zu synthetisieren (10) Das umhüllte Virion verlässt via sekretorischem Signalweg die Zelle ..... 14
- Abbildung 3: Schematische Zusammensetzung der drei Oberflächenproteine aus den Genabschnitten des S-ORFs. Die S-Region besteht aus 226 Aminosäuren, die preS2 Region aus 55 Aminosäuren und die preS1 Region variabel aus 108, 118 oder 119 Aminosäuren. Die Abbildung ist modifiziert nach Glebe et al. <sup>3</sup> ..... 15
- Abbildung 4: Vereinfachte Darstellung der Aktivierung der Unfolded Protein Response modifiziert nach Kolb et al. Die Membranproteine Atf6, Perk und Ire1 führen zur Aktivierung der UPR. UPR-Zielgene sorgen dafür, dass sich die Zelle entweder regeneriert oder den Zelltod antritt <sup>14</sup>. ..... 17
- Abbildung 5: Strukturformel des Salzes von 4-PBA, Natriumphenylbutyrat, modifiziert nach Kolb et al. <sup>14</sup>. ..... 18
- Abbildung 6: Schematischer Ablauf der Akut Phase Reaktion. Die *Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse* (HPA-Achse) bewirkt die Ausschüttung von Glucocorticoiden in der Nebennierenrinde. Diese inhibieren die Zytokin-Ausschüttung im Sinne eines Negativ-Feedbacks. Die Abbildung ist modifiziert nach Cray et al <sup>70</sup> und unter Berücksichtigung von Moshage, Baumann und Gauldie sowie Gruys et al <sup>67,69,68</sup> ..... 20
- Abbildung 7: Schematische Darstellung zum Anstieg der Akut-Phase-Proteine (APP) im Zusammenhang mit proinflammatorischen Zytokinen. Eine aktivierte *Kupffer-Zelle* setzt proinflammatorische Zytokine frei, die den Anstieg der APP und der Komplementfaktoren bewirken und Immunzellen anlocken. Außerdem werden die Endothelzellen der Lebersinusoiden stimuliert, Adhäsionsmoleküle auf ihrer

Zelloberfläche zu präsentieren. Diese ermöglichen den Eintritt von Leukozyten ins Gewebe (Leukodiapedese). Diese Abbildung ist modifiziert nach Liaskou et al <sup>74</sup> .....	22
Abbildung 8: Grob vereinfachter Zusammenhang zwischen phosphoryliertem Stat3 und der Genexpression von APP. Als Auslöser des Jak/Stat Signalweges wurde u.a. Il6 beschrieben <sup>103</sup> . Nach Dimerisierung zweier Stat3-Proteine wird im Kern die Transkription von Akut-Phase-Proteinen induziert. Lcn2 ist hier repräsentativ für ein APP dargestellt.....	25
Abbildung 9: Diese Vorversuche zeigen den Einfluss des Chaperons 4-PBA auf stabil transfizierte Huh 7 und NIH3T3 Zellen, die durch Induktion mit Doxycyclin das HBV Oberflächenprotein HBsAg exprimieren. Die Zellkerne sind in dieser Färbung blau dargestellt. Das HBsAg ist grün angefärbt und akkumuliert nach Doxycyclin Gabe. Durch Zugabe von 4-PBA ist eine verminderte Anfärbbarkeit des Oberflächenproteins in Huh7 Zellen zu beobachten, die als Auflösung der Aggregate interpretiert wurde. Modifiziert nach Tierversuchsantrag 48/2012. ....	27
Abbildung 10: Behandlungsschema der HBs-transgenen Mäuse (C57BL/6J-Tg (Alb1HBV)44Bri/J), die auf BALB/cJ zurückgekreuzt wurden, zur Planung der 4-PBA-Versuche. Modifiziert nach Tierversuchsantrag 48/2012.....	29
Abbildung 11: Beispiel einer Immunfluoreszenz-Färbung an AML12-LHBs Zellen. Das linke Bild zeigt die Zellkerne (DAPI-Kernfärbung). Im rechten Bild sind derselbe Bildausschnitt sowie dieselbe Vergrößerung gewählt. Grün gefärbt sind die mit LHBs-Antikörper markierten Bereiche (Immunfluoreszenzfärbung mit Alexa 488). Verglichen mit der Anzahl gefärbter Zellkerne exprimieren in diesem Beispiel nur wenige Zellen das große HBV-Hüllprotein.....	31
Abbildung 12: Pipettierschema der Versuche in der Zellkultur (Dox: Abkürzung für Doxycyclin) .....	31
Abbildung 13: RNA Gel mit Auftrennung der mRNA in die 28S (oben) und 18S Untereinheit (unten).....	47
Abbildung 14: Amplification Plot der StepOnePlus Software. Die y-Achse ist ein Maß für die Fluoreszenzintensität. Die x-Achse kennzeichnet die Anzahl der durchgeführten Zyklen.....	52
Abbildung 15: Die Immunhistochemie von HBsAg (hier rötlich gefärbt) zeigt eine vermehrte Akkumulation des Oberflächenproteins in der Zellperipherie von Hepatozyten HBs-transgener Mäuse. Nach achtwöchiger Behandlung mit 4-PBA fallen in den Leberschnitten Bereiche auf, die kein HBsAg exprimieren. Untersucht wurden Leberproben 12 Wochen alter, männlicher HBs-transgener BALB/c Mäuse. Vergrößerung 200×. Messbalken $\hat{=}$ 50 $\mu$ m, A) HBs-transgen (HBs-tg), B) HBs-transgen, 1 Woche PBA-Behandlung (1 W PBA), C) HBs-transgen, 8 Wochen-PBA Behandlung (8 W PBA).....	56
Abbildung 16: Dargestellt ist die Heat Map der durchgeführten Microarray-Analyse. Die relevanten Bereiche sind vergrößert hervorgehoben. Hochregulierte Gene sind grün dargestellt, herunterregulierte Gene rot. Untersucht wurde Leber-mRNA	

- männlicher, 12 Wochen alter BALB/c Mäuse. Die transkriptionelle Genexpression der einzelnen Versuchsgruppen wurde vergleichend mit den jeweils anderen Gruppen analysiert, z.B. bezieht sich „x8wPBA - WT“ auf die Veränderung der Genexpression achtwöchig behandelter HBs-transgener BALB/c Mäuse (=x8wPBA) im Vergleich auf die unbehandelten Wildtyp BALB/c Mäuse (=WT). WT= Wildtyp, Tg= HBs-transgen, x1wPBA= HBs-transgen, 1 Woche PBA-Behandlung, x8wPBA= HBs-transgen, 8 Wochen PBA-Behandlung, n=5 .58
- Abbildung 17: Die quantitative Beurteilung der differentiellen Genexpression von *lcn2* zeigt eine Hochregulation des Gens im HBs-transgenen Maus-Modell und unter PBA-Behandlung. Untersucht wurde hepatische mRNA 5, 12 und 26 Wochen alter BALB/c Mäuse (♂+♀). Der Fehlerbalken repräsentiert den Standardfehler. Zur Vereinfachung der Darstellung wurde eine Logarithmus-Skala gewählt. **Blau:** Wildtyp BALB/c, **Orange:** HBs-transgen, **Grau:** HBs-transgen, 1 Woche PBA Behandlung (1 W PBA), **Gelb:** HBs-transgen, 8 Wochen PBA Behandlung (8 W PBA). Statistische Signifikanzen: \* p-Wert < 0,05 .....60
- Abbildung 18: Die quantitative Darstellung der differentiellen Genexpression von *lcn2* zeigt eine verstärkte Hochregulation des Gens in Lebern männlicher BALB/c Mäuse verglichen mit weiblichen Mäusen. Untersucht wurde hepatische mRNA 12 Wochen alter BALB/c Mäuse. Der gestrichelte Balken zeigt einen Signifikanzunterschied zwischen HBs-transgenen unbehandelten weiblichen Proben und den unbehandelten männlichen Proben. Der Fehlerbalken repräsentiert den Standardfehler. Zur Vereinfachung der Darstellung wurde eine Logarithmus-Skala gewählt. **Blau:** Wildtyp BALB/c, **Orange:** HBs-transgen, **Grau:** HBs-transgen, 1 Woche PBA Behandlung (1 W PBA), **Gelb:** HBs-transgen, 8 Wochen PBA Behandlung (8 W PBA). Statistische Signifikanzen: \* p-Wert < 0,05 .....61
- Abbildung 19: Die Proteinexpression von *Lcn2* steigt unter PBA-Behandlung in HBs-transgenen Mäusen an. Die Western Blot-Analysen wurden mit Proteinlysaten von Leberproben (oberer Blot) und Serumproben (unterer Blot) 12 Wochen alter BALB/c Mäuse durchgeführt. Als Ladekontrolle des oberen Blots diente  $\beta$ -Actin; der untere Blot ist durch die Auftragung gleicher Serum-Mengen normiert. Wt = Wildtyp; tg = HBs-transgen; 1w = HBs-transgen, 1 Woche PBA Behandlung; 8w = HBs-transgen, 8 Wochen PBA Behandlung.....62
- Abbildung 20: Die immunhistochemische Färbung von *Lcn2* (hier rötlich gefärbt) in Leberschnitten zeigt eine **periportale Anreicherung** des Proteins unter achtwöchiger Behandlung mit 4-PBA (C). Untersucht wurden Leberproben 12 Wochen alter, männlicher BALB/c Mäuse (A-C) und einer 26 Wochen alten BALB/c Maus (D). Die Pfeile markieren *Lcn2*-positive Zellen, bei denen es sich um neutrophile Granulozyten handeln könnte. Vergrößerung 200 $\times$ . Messbalken  $\cong$  50  $\mu$ m. A) HBs-transgen, B) HBs-transgen, 1 Woche PBA-Behandlung, C) HBs-transgen, 8 Wochen PBA-Behandlung, D) HBs-transgen, 1 Woche PBA-Behandlung .....64

- Abbildung 21: Die quantitative Beurteilung der differentiellen Genexpression ausgewählter **Zytokine** zeigt eine Hochregulation in HBs-transgenen Mäusen nach einwöchiger PBA-Behandlung und eine Herunterregulation nach achtwöchiger Behandlung mit 4-PBA. Untersucht wurde Leber-mRNA 12 Wochen alter HBs-transgener BALB/c Mäuse. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. **Blau:** Wildtyp BALB/c, **Orange:** HBs-transgen, **Grau:** HBs-transgen, 1 Woche PBA Behandlung (1 W PBA), **Gelb:** HBs-transgen, 8 Wochen PBA Behandlung (8 W PBA). Statistische Signifikanzen: \* p-Wert<0,05 .....67
- Abbildung 22: Die quantitative Beurteilung der differentiellen Genexpression von **Genen der Interferon-Antwort** zeigt eine Hochregulation in HBs-transgenen Mäusen unter einwöchiger Behandlung mit 4-PBA und eine Herunterregulation nach achtwöchiger PBA Behandlung. Untersucht wurde hepatische mRNA 12 Wochen alter BALB/c Mäuse. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. **Blau:** Wildtyp BALB/c, **Orange:** HBs-transgen, **Grau:** HBs-transgen, 1 Woche PBA Behandlung (1 W PBA), **Gelb:** HBs-transgen, 8 Wochen PBA Behandlung (8 W PBA). Statistische Signifikanzen: \* p-Wert<0,05 .....69
- Abbildung 23: Die Proteinexpression von Isg15 in der Leber nimmt in den Proben weiblicher HBs-transgener Mäuse unter PBA-Behandlung ab und in den männlichen transgenen Mäusen unter PBA-Behandlung zu. Als Ladekontrolle diente der Blot mit  $\beta$ -Actin. Wt = Wildtyp; tg = HBs-transgen; 1w = HBs-transgen, 1 Woche PBA Behandlung; 8w = HBs-transgen, 8 Wochen PBA Behandlung .....70
- Abbildung 24: Die Phosphorylierung von Stat3 in Leberproben männlicher Mäuse nimmt unter PBA-Behandlung zu. Die Western-Blot Analysen wurden mit Proteinlysaten von Leberproben 12 Wochen alter BALB/c Mäuse durchgeführt. Als Ladekontrollen dienten die Blots mit Stat3 und  $\beta$ -Actin. Wt = Wildtyp; tg = HBs-transgen; 1w = HBs-transgen, 1 Woche PBA Behandlung; 8w = HBs-transgen, 8 Wochen PBA Behandlung .....71
- Abbildung 25: Eine verminderte Phosphorylierung von Stat5 in männlichen HBs-transgenen Mäusen ohne PBA-Behandlung konnte gezeigt werden. Die Western-Blot Analysen wurden mit Proteinlysaten von Leberproben 12 Wochen alter BALB/c Mäuse durchgeführt. Als Ladekontrolle dienten die Blots mit Stat5 und  $\beta$ -Actin. Wt = Wildtyp; tg = HBs-transgen; 1w = HBs-transgen, 1 Woche PBA Behandlung; 8w = HBs-transgen, 8 Wochen PBA Behandlung .....72
- Abbildung 26: Dargestellt ist die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Stat5. Die Western Blot-Analysen wurden mit Proteinlysaten von Leberproben 5 Wochen (5 W) und 26 Wochen (26 W) alter BALB/c Mäuse durchgeführt. Als Ladekontrollen dienten die Blots mit Stat5 und  $\beta$ -Actin. Wt = Wildtyp; tg = HBs-transgen; 1w = HBs-transgen, 1 Woche PBA Behandlung; 8w = HBs-transgen, 8 Wochen PBA Behandlung .....73
- Abbildung 27: Stark vereinfachte Abbildung zum Verständnis des Zusammenhangs zwischen Stat5 und den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Genen und

- Proteinen. Extrazelluläre Signalmoleküle wie beispielsweise Gh und Igf1 aktivieren Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Deren Kinaseaktivität führt zur Phosphorylierung und Aktivierung von rezeptorassoziierten Kinasen. Da in dieser Arbeit Jak2 untersucht wurde, ist diese Kinase in der Abbildung gezeigt. Wenn sie aktiv ist, phosphoryliert sie Stat5. Stat5 kann jedoch auch durch andere Kinasen aktiviert werden, beispielsweise Erk oder der Tyrosinkinase Src. Cis und Socs2 wirken hemmend auf die Phosphorylierung von Stat5. Ist Stat5 phosphoryliert, bildet es Dimere, transloziert in den Nukleus und wirkt dort als Transkriptionsfaktor. Aktiviertes Stat5 fördert zum Beispiel die Genexpression von *Akt* und *Cyclin D1*, vermindert aber die Expression von *Bcl6*. Aktiviertes Stat5 kann durch Dephosphorylierung durch Phosphatasen wie Shp2 und Ptp1b deaktiviert werden.<sup>135–137,105,138–147</sup> ..... 74
- Abbildung 28: Die Aktivierung ausgewählter Proteine des Stat5 Signalwegs ist dargestellt. Die Western Blot-Analysen wurden mit Proteinlysaten von Leberproben 12 Wochen alter BALB/c Mäuse durchgeführt. Als Ladekontrolle diente der Blot mit  $\beta$ -Actin. Wt = Wildtyp; tg = HBs-transgen; 1w = HBs-transgen, 1 Woche PBA Behandlung; 8w = HBs-transgen, 8 Wochen PBA Behandlung ..... 75
- Abbildung 29: Die Phosphatasen Shp2 und Ptp1b sind in weiblichen, behandelten Mäusen vermehrt exprimiert sowie in männlichen Mäusen ohne Behandlung mit 4-PBA. Die Western Blot-Analysen wurden mit Proteinlysaten von Leberproben 12 Wochen alter BALB/c durchgeführt. Als Ladekontrollen dienten  $\beta$ -Actin und  $\alpha$ -Tubulin. Wt = Wildtyp; tg = HBs-transgen; 1w = HBs-transgen, 1 Woche PBA Behandlung; 8w = HBs-transgen, 8 Wochen PBA Behandlung ..... 76
- Abbildung 30: Die Immunhistochemie der Phosphatase Ptp1b (hier hellrot gefärbt) zeigt eine verstärkte zytoplasmatische Anreicherung in Hepatozyten aus HBs-transgenen Mäusen, die über acht Wochen mit PBA behandelt wurden. Untersucht wurden Leberproben 12 Wochen alter, männlicher BALB/c-Mäuse. Vergrößerung 400 $\times$ . Messbalken  $\hat{=}$  40  $\mu$ m. A) Wildtyp B) HBs-transgen C) HBs-transgen, 1 Woche PBA Behandlung D) HBs-transgen, 8 Wochen PBA Behandlung ..... 78
- Abbildung 31: Die Immunhistochemie der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (hier rötlich gefärbt) zeigt eine zunehmende Anreicherung des Enzyms in Hepatozyten ein- und achtwöchig behandelter HBs transgener Mäuse. Nach einwöchiger Behandlung mit 4-PBA (C) korreliert die Verteilung der Pepck weitgehend mit der Verteilung in den unbehandelten transgenen Mäusen (B). Die Zonierung des Leberparenchyms ist in diesen Proben gut zu erkennen. Nach achtwöchiger Behandlung der HBs transgenen Mäuse mit 4-PBA (D) hingegen ist die Zonierung etwas schlechter zu erkennen, da die Anreicherung der Pepck in Bereichen um die Zentralvene verstärkt ist. Untersucht wurden Leberproben 12 Wochen alter, männlicher BALB/c-Mäuse. Vergrößerung 100 $\times$ . Messbalken  $\hat{=}$  100 $\mu$ m. A) Wildtyp, B) HBs-transgen, C) HBs-transgen, 1 Woche PBA Behandlung, D) HBs-transgen 8 Wochen PBA Behandlung ..... 80

- Abbildung 32: Die Immunhistochemie der Glutamin-Synthetase (hier rötlich angefärbt) zeigt eine vermehrte Anfärbung perivenöser Areale in achtwöchig behandelten Mäusen. Untersucht wurden Leberproben 12 Wochen alter, männlicher BALB/c-Mäuse. Vergrößerung 100×. Messbalken  $\cong 100\mu\text{m}$ . A) Wildtyp, B) HBs-transgen, C) HBs-transgen, 1 Woche PBA Behandlung, D) HBs-transgen, 8 Wochen PBA Behandlung ..... 81
- Abbildung 33: Die quantitative Beurteilung der differentiellen Genexpression ausgewählter **Gene der APR** in stabil transfizierten AML12 Zellen zeigt eine Hochregulation nach der Behandlung mit 4-PBA. Durch Doxycyclin-Gabe exprimieren die Zellen LHBs. .... 84
- Abbildung 34: Grobe Darstellung des möglichen Signalwegs nach Behandlung der HBs-transgenen Mäuse mit 4-PBA. PBA-Behandlung bedingt die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Stat3, der nach Dimerisierung die Genregulation von Genen der Interferon-Antwort (z.B. Isg15 über den Genabschnitt *Interferon response sensitive element* (ISRE) <sup>166,172</sup>) und der Akut-Phase-Antwort (z.B. Lcn2 über den Genabschnitt *Acute phase response element* (APRE) <sup>99</sup>) fördert. .... 90
- Abbildung 35: Die Darstellung zeigt den Eliminationsprozess von 4-PBA und den Zusammenhang mit der Glutamin-Synthetase für diesen Vorgang <sup>57,58</sup> ..... 92

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammenstellung wichtiger metabolischer Funktionen der Leber <sup>10</sup> .....	11
Tabelle 2: Quantitative Unterschiede im Anstieg verschiedener APP während der Akut-Phase-Reaktion in Maus und Mensch <sup>70</sup> .....	21
Tabelle 3: Zusammensetzung und Verdünnung des Lämmli-Puffers .....	33
Tabelle 4: Zusammensetzung der Gele und Puffer im Tris-Glycin-Puffersystem (Menge für zwei Gele) .....	35
Tabelle 5: Zusammensetzung der Gele und Puffer im Tris-Tricin-Puffersystem. Der Puffer ist geeignet für die Darstellung kleiner Proteine im Bereich von 5-20 kDA. Die Menge des Trenn- und Sammelgels wurde für zwei Gele kalkuliert.....	36
Tabelle 6: Zusammensetzung der Lösungen, in denen die Filterpapiere getränkt werden .....	37
Tabelle 7: Zusammensetzung von Puffern und Gemischen, die für die Antikörper-Detektion notwendig sind .....	39
Tabelle 8: Auflistung der in dieser Arbeit genutzten Primär-Antikörper zusammen mit den entsprechend verwendeten Sekundär-Antikörpern .....	40
Tabelle 9: Zusammensetzung des genutzten Stripping Puffers .....	41
Tabelle 10: Reihenfolge der auf- und absteigenden Reihe bei der Färbung von Paraffinschnitten (oben), Zusammensetzung der benötigten Puffer für die Färbung (unten).....	44
Tabelle 11: Liste der in der Immunhistochemie verwendeten Antikörper und ihrer entsprechenden Verdünnung.....	45
Tabelle 12: Auflistung der genutzten Primer in dieser Arbeit. <i>*Da die Firma Qiagen, die Sequenzen der Primer nicht veröffentlicht, wurden hier ersatzweise die Katalognummern genannt.....</i>	52
Tabelle 13: Hochregulierte Gene unter achtwöchiger PBA-Behandlung in 12 Wochen alten HBs-transgenen, männlichen Mäusen verglichen mit unbehandelten transgenen Mäusen (x8wPBA-Tg). Die Tabelle zeigt die acht am stärksten hochregulierten Gene aus der Microarray Analyse. Die log <sub>2</sub> FC-Werte wurden auf die zweite Kommastelle gerundet.....	59
Tabelle 14: Die quantitative Beurteilung der differentiellen Genexpression ausgewählter Gene ist hier tabellarisch dargestellt. Alle dargestellten Gene waren in der Microarray-Analyse durch eine Hochregulation nach achtwöchiger PBA-Behandlung aufgefallen. Die Ergebnisse der hier gezeigten qRT-PCR korrelieren kaum mit den Ergebnissen der Microarray-Analyse. Untersucht wurde Leber-mRNA 12 Wochen alter BALB/c Mäuse. Statistische Signifikanzen: * p-Wert<0,05 im Vergleich zum Wildtyp, # p-Wert<0,05 im Vergleich zu HBs-transgen, ~ p-Wert<0,05 im Vergleich zu 1 Woche PBA .....	65

- Tabelle 15: Die quantitative Beurteilung der differentiellen Genexpression von Genen des Komplementsystems und weiterer proinflammatorischer Zytokine zeigte keine relevanten Unterschiede. Untersucht wurde Leber-mRNA 12 Wochen alter BALB/c Mäuse. Statistische Signifikanzen: \* p-Wert<0,05 im Vergleich zum Wildtyp, # p-Wert<0,05 im Vergleich zu HBs-transgen, ~ p-Wert<0,05 im Vergleich zu 1 Woche PBA..... 68
- Tabelle 16: Die quantitative Beurteilung der differentiellen Genexpression ausgewählter Gene der APR in AML12 Zellen ohne Transfektion zeigt eine Hochregulation nach Behandlung mit 4-PBA. Diese Zellen exprimieren kein LHBs bei Doxycyclin-Applikation. .... 84

## Literaturverzeichnis

1. WHO. Guidelines for the prevention, care and treatment of persons with chronic hepatitis B infection, 2015.
2. GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* 2014;385:117–171; [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61682-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61682-2).
3. Glebe D, Bremer CM. The Molecular Virology of Hepatitis B Virus. *Semin Liver Dis* 2013;33:103-112; <http://dx.doi.org/10.1055/s-0033-1345717>.
4. Chisari FV, Ferrari C. Hepatitis B Virus Immunopathogenesis. *Annu. Rev. Immunol.* 1995;13:29–60; <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.iy.13.040195.000333>.
5. Chisari FV, Isogawa M, Wieland SF. Pathogenesis of Hepatitis B Virus Infection. *Pathologie-biologie* 2010;58:258–266; <http://dx.doi.org/10.1016/j.pat-bio.2009.11.001>.
6. Pol S. Management of HBV in immunocompromised patients. *Liver International* 2013;33:182–187; <http://dx.doi.org/10.1111/liv.12055>.
7. Meuleman P, Libbrecht L, Wieland S, Vos R de, Habib N, Kramvis A, et al. Immune Suppression Uncovers Endogenous Cytopathic Effects of the Hepatitis B Virus. *Journal of Virology* 2005;80:2797–2807; <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.80.6.2797-2807.2006>.
8. Chisari FV, Pinkert CA, Milich, Filippi P, McLachlan A, Palmiter RD, et al. A transgenic mouse model of the chronic hepatitis B surface antigen carrier state. *Science* 1985;230:1157–1160; <http://dx.doi.org/10.1126/science.3865369>.
9. Chisari FV, Filippi P, Buras J, McLachlan A, POPPER H, Pinkert CA, et al. Structural and pathological effects of synthesis of hepatitis B virus large envelope polypeptide in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1987;84:6909–6913.
10. Kuntz E, Kuntz H, eds. *Hepatology*. Heidelberg: Springer Medizin, 2008.
11. Churin Y, Roderfeld M, Roeb E. Hepatitis B virus large surface protein: function and fame. *Hepatobiliary Surgery and Nutrition* 2015;4:1–10; <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2304-3881.2014.12.08>.
12. Wang H, Chang W, Chang W, Wu H, Huang W, Lei H, et al. Hepatitis B virus pre-S2 mutant upregulates cyclin A expression and induces nodular proliferation of hepatocytes. *Hepatology* 2005;41:761–770; <http://dx.doi.org/10.1002/hep.20615>.
13. Xu Z, Jensen G, Yen TS. Activation of hepatitis B virus S promoter by the viral large surface protein via induction of stress in the endoplasmic reticulum. *Journal of Virology* 1997;71:7387–7392.

14. Kolb PS, Ayaub EA, Zhou W, Yum V, Dickhout JG, Ask K. The therapeutic effects of 4-phenylbutyric acid in maintaining proteostasis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2015;61:45–52; <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2015.01.015>.
15. Basseri S, Lhoták Š, Sharma AM, Austin RC. The chemical chaperone 4-phenylbutyrate inhibits adipogenesis by modulating the unfolded protein response. *Journal of Lipid Research* 2009;50:2486–2501; <http://dx.doi.org/10.1194/jlr.M900216-JLR200>.
16. Vilatoba M, Eckstein C, Bilbao G, Smyth CA, Jenkins S, Thompson, J. Anthony, et al. Sodium 4-phenylbutyrate protects against liver ischemia reperfusion injury by inhibition of endoplasmic reticulum-stress mediated apoptosis. *Surgery* 2005;138:342–351; <http://dx.doi.org/10.1016/j.surg.2005.04.019>.
17. Churin Y, Roderfeld M, Stiefel J, Würger T, Schröder D, Matono T, et al. Pathological impact of hepatitis B virus surface proteins on the liver is associated with the host genetic background. *PLoS ONE* 2014;9:e90608; PMID:24594856; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0090608>.
18. Shi Z, Wakil AE, Rockey DC. Strain-specific differences in mouse hepatic wound healing are mediated by divergent T helper cytokine responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997;94:10663–10668.
19. Walkin L, Herrick SE, Summers A, Brenchley PE, Hoff CM, Korstanje R, et al. The role of mouse strain differences in the susceptibility to fibrosis: a systematic review. *Fibrogenesis & Tissue Repair* 2013;6:18; <http://dx.doi.org/10.1186/1755-1536-6-18>.
20. Welsch U, ed. *Sobotta Lehrbuch Histologie: Zytologie Histologie Mikroskopische Anatomie*. München: Elsevier GmbH, Urban & Fisher, 2006.
21. Ulfing N, ed. *Kurzlehrbuch Embryologie*. Stuttgart: Thieme, 2009.
22. Paulsen F, Waschke J, eds. *Sobotta Atlas der Anatomie des Menschen: Innere Organe*. München: Urban & Fisher, 2010.
23. Aumüller G, Aust G, Doll A, Engele J, Kirsch J, Mense S, et al., eds. *Duale Reihe Anatomie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, 2010.
24. Glisson F. *Anatomia hepatis*. Typis Du-Gardianis 1654.
25. Ulfing N, ed. *Kurzlehrbuch Histologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, 2005.
26. Jungermann K, Sasse D. Heterogeneity of liver parenchymal cells. *Trends in Biochemical Sciences* 1978;3:198–202; [http://dx.doi.org/10.1016/S0968-0004\(78\)91764-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0968-0004(78)91764-4).
27. Disse J. Über die Lymphbahnen der Säugetierleber. *Archiv für die mikroskopische Anatomie* 1890;36:203–224.
28. Ballardini G, Degli Esposti S, Bianchi, F. B., De Giorgi, Lucilla Badiali, Faccani A, Biolchini L, et al. Correlation between Ito cells and fibrogenesis in an experimental model of hepatic fibrosis. A sequential stereological study. *Liver* 1983;3:58–63; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0676.1983.tb00850.x>.

29. Weiner FR, Giambrone M, Czaja MJ, Shah A, Annoni G, Takahashi S, et al. Ito-cell gene expression and collagen regulation. *Hepatology* 1990;11:111–117; <http://dx.doi.org/10.1002/hep.1840110119>.
30. Burt AD. Pathobiology of hepatic stellate cells. *J Gastroenterol* 1999;34:299-304; <http://dx.doi.org/10.1007/s005350050264>.
31. Schirmacher P, Geerts A, Pietrangelo A, Dienes HP, Rogler CE. Hepatocyte growth factor/hepatopoietin A is expressed in fat-storing cells from rat liver but not myofibroblast-like cells derived from fat-storing cells. *Hepatology* 1992;15:5–11; <http://dx.doi.org/10.1002/hep.1840150103>.
32. Tacke F, Weiskirchen R. Update on hepatic stellate cells: pathogenic role in liver fibrosis and novel isolation techniques. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology* 2012;6:67–80; <http://dx.doi.org/10.1586/egh.11.92>.
33. Lüllmann-Rauch R. Taschenlehrbuch Histologie: 10 Tabellen 2012. <http://dx.doi.org/10.1055/b-002-11390>.
34. G. Löffler, P.E. Petrides, P.C. Heinrich. *Biochemie und Pathobiochemie*: Springer, 2007.
35. Block TM, Guo J, London, W. Thomas. *Clinical Implications of the Molecular Biology of Hepatitis B Virus. The Liver*: John Wiley & Sons, Ltd, 2009:859–876.
36. McMahon BJ. Epidemiology and Natural History of Hepatitis B. *Semin Liver Dis* 2005;25:3-8; <http://dx.doi.org/10.1055/s-2005-915644>.
37. Gerd Herold und Mitarbeiter. *Innere Medizin*, 2015.
38. Beasley RP, Lin C, Hwang L, Chien C. HEPATOCELLULAR CARCINOMA AND HEPATITIS B VIRUS. *The Lancet* 1981;318:1129–1133; [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(81\)90585-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(81)90585-7).
39. Summers J, O'Connell A, Millman I. Genome of hepatitis B virus: restriction enzyme cleavage and structure of DNA extracted from Dane particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1975;72:4597–4601.
40. Seeger C, Mason WS. Hepatitis B Virus Biology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2000;64:51–68.
41. Tong S, Revill P. Overview of hepatitis B viral replication and genetic variability. *Journal of Hepatology* 2016;64:S4; <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2016.01.027>.
42. Lamontagne RJ, Bagga S, Bouchard MJ. Hepatitis B virus molecular biology and pathogenesis. *Hepatoma research* 2016;2:163–186; <http://dx.doi.org/10.20517/2394-5079.2016.05>.
43. Blumberg BS, Alter HJ. A "new" antigen in leukemia sera. *JAMA* 1965;191:541–546; <http://dx.doi.org/10.1001/jama.1965.03080070025007>.
44. Cohen C. "Ground-glass" hepatocytes. *South African medical journal= Suid-Afrikaanse tydskrif vir geneeskunde* 1975;49:1401–1403.
45. Gerber MA, Hadziyannis S, Vissoulis C, Schaffner F, Paronetto F, Popper H. Electron Microscopy and Immunoelectronmicroscopy of Cytoplasmic Hepatitis B Antigen in Hepatocytes. *The American Journal of Pathology* 1974;75:489–502.

46. HADZIYANNIS S, GERBER, M. A., VISSOULIS C, POPPER H. Cytoplasmic hepatitis B antigen in " ground-glass " hepatocytes of carriers. *Arch. Pathol.* 1973;96:327-30.
47. Su I, Wang H, Wu H, Huang W. Ground glass hepatocytes contain pre-S mutants and represent preneoplastic lesions in chronic hepatitis B virus infection. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2008;23:1169–1174; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-1746.2008.05348.x>.
48. Li Y, Yang F, Lu H, Zhang J. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B surface protein. *World Journal of Gastroenterology* 2015;22:1943–1952; <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v22.i6.1943>.
49. Yan H, Liu Y, Sui J, Li W. NTCP opens the door for hepatitis B virus infection. *Antiviral Research* 2015;121:24–30; <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.06.002>.
50. Yan H, Zhong G, Xu G, He W, Jing Z, Gao Z, et al. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *eLife* 2012;1:e00049; <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.00049>.
51. Chisari FV, Filippi P, McLachlan A, Milich DR, Riggs M, Lee S, et al. Expression of hepatitis B virus large envelope polypeptide inhibits hepatitis B surface antigen secretion in transgenic mice. *Journal of Virology* 1986;60:880–887.
52. Chisari FV, Klopchin K, Moriyama T, Pasquinelli C, Dunsford HA, Sell S, et al. Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus transgenic mice. *Cell* 1989;59:1145–1156; [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90770-8](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(89)90770-8).
53. Wei J, Rahman S, Ayaub EA, Dickhout JG, Ask K. Protein Misfolding and Endoplasmic Reticulum Stress in Chronic Lung Disease. *Chest* 2013;143:1098–1105; <http://dx.doi.org/10.1378/chest.12-2133>.
54. Walter P, Ron D. The Unfolded Protein Response: From Stress Pathway to Homeostatic Regulation. *Science* 2011;334:1081–1086; <http://dx.doi.org/10.1126/science.1209038>.
55. Schönthal AH. Endoplasmic Reticulum Stress: Its Role in Disease and Novel Prospects for Therapy. *Scientifica* 2012;2012:857516; <http://dx.doi.org/10.6064/2012/857516>.
56. Brusilow SW. Phenylacetylglutamine May Replace Urea as a Vehicle for Waste Nitrogen Excretion. *Pediatr Res* 1991;29:147–150.
57. Feillet F, Leonard JV. Alternative pathway therapy for urea cycle disorders. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 1998;21:101–111; <http://dx.doi.org/10.1023/A:1005365825875>.
58. Wright G, Noiret L, Olde Damink, Steven W. M., Jalan R. Interorgan ammonia metabolism in liver failure: the basis of current and future therapies. *Liver International* 2011;31:163–175; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1478-3231.2010.02302.x>.
59. Konstantinopoulos PA, Karamouzis MV, Papavassiliou AG. Focus on acetylation: the role of histone deacetylase inhibitors in cancer therapy and beyond. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 2007;16:569–571; <http://dx.doi.org/10.1517/13543784.16.5.569>.

60. Iannitti T, Palmieri B. Clinical and Experimental Applications of Sodium Phenylbutyrate. *Drugs in R&D* 2012;11:227–249; <http://dx.doi.org/10.2165/11591280-000000000-00000>.
61. Cortez L, Sim V. The therapeutic potential of chemical chaperones in protein folding diseases. *Prion* 2014;8:197–202; <http://dx.doi.org/10.4161/pri.28938>.
62. de Almeida, Sérgio F., Picarote G, Fleming JV, Carmo-Fonseca M, Azevedo JE, Sousa M de. Chemical Chaperones Reduce Endoplasmic Reticulum Stress and Prevent Mutant HFE Aggregate Formation. *Journal of Biological Chemistry* 2007;282:27905–27912; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M702672200>.
63. Park CS, Cha H, Kwon EJ, Sreenivasaiiah PK, Kim DH. The chemical chaperone 4-phenylbutyric acid attenuates pressure-overload cardiac hypertrophy by alleviating endoplasmic reticulum stress. *Biochemical and biophysical research communications* 2012;421:578–584; <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.04.048>.
64. Chen Y, Wu Z, Zhao S, Xiang R. Chemical chaperones reduce ER stress and adipose tissue inflammation in high fat diet-induced mouse model of obesity. *Scientific Reports* 2016;6:27486 EP -.
65. Mizukami T, Orihashi K, Herlambang B, Takahashi S, Hamaishi M, Okada K, et al. Sodium 4-phenylbutyrate protects against spinal cord ischemia by inhibition of endoplasmic reticulum stress. *Journal of Vascular Surgery* 2010;52:1580–1586; <http://dx.doi.org/10.1016/j.jvs.2010.06.172>.
66. Wang J, Chen X, Zhang C, Tao L, Zhang Z, Liu X, et al. Phenylbutyric acid protects against carbon tetrachloride-induced hepatic fibrogenesis in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2013;266:307–316; <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2012.11.007>.
67. Moshage H. Cytokines and the hepatic acute phase response. *J. Pathol.* 1997;181:257–266; [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9896\(199703\)181:3<257::AID-PATH756>3.0.CO;2-U](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(199703)181:3<257::AID-PATH756>3.0.CO;2-U).
68. Gruys E, Toussaint MJ, Niewold TA, Koopmans SJ. Acute phase reaction and acute phase proteins. *Journal of Zhejiang University. Science. B* 2005;6:1045–1056; <http://dx.doi.org/10.1631/jzus.2005.B1045>.
69. Baumann H, Gauldie J. The acute phase response. *Immunology Today* 1994;15:74–80; [http://dx.doi.org/10.1016/0167-5699\(94\)90137-6](http://dx.doi.org/10.1016/0167-5699(94)90137-6).
70. Cray C, Zaias J, Altman NH. Acute Phase Response in Animals: A Review. *Comparative Medicine* 2009;59:517–526.
71. Kimura M, Toth LA, Agostini H, Cady AB, Majde JA, Krueger JM. Comparison of acute phase responses induced in rabbits by lipopolysaccharide and double-stranded RNA. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 1994;267:R1596-R1605.
72. Nakayama T, Sonoda S, Urano T, Yamada T, Okada M. Monitoring both serum amyloid protein A and C-reactive protein as inflammatory markers in infectious diseases. *Clinical Chemistry* 1993;39:293–297.
73. Steel DM, Whitehead AS. The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. *Immunology Today* 1994;15:81–88; [http://dx.doi.org/10.1016/0167-5699\(94\)90138-4](http://dx.doi.org/10.1016/0167-5699(94)90138-4).

74. Liaskou E, Wilson DV, Oo YH. Innate Immune Cells in Liver Inflammation. *Mediators of Inflammation* 2012;2012:949157; <http://dx.doi.org/10.1155/2012/949157>.
75. Lee S, Kim J, Kim J, Seo J, Han H, Lee W, et al. Lipocalin-2 Is a Chemokine Inducer in the Central Nervous System: ROLE OF CHEMOKINE LIGAND 10 (CXCL10) IN LIPOCALIN-2-INDUCED CELL MIGRATION. *The Journal of Biological Chemistry* 2011;286:43855–43870; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M111.299248>.
76. Lin H, Liao C, Lee Y, Hu K, Meng H, Chu S. Lipocalin-2-induced cytokine production enhances endometrial carcinoma cell survival and migration. *International Journal of Biological Sciences* 2011;7:74–86.
77. Ji YR, Kim HJ, Bae KB, Lee S, Kim MO, Ryoo ZY. Hepatic Serum Amyloid A1 Aggravates T Cell-mediated Hepatitis by Inducing Chemokines via Toll-like Receptor 2 in Mice. *Journal of Biological Chemistry* 2015;290:12804–12811; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M114.635763>.
78. Sumagin R, Sarelius IH. A role for ICAM-1 in maintenance of leukocyte-endothelial cell rolling interactions in inflamed arterioles. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 2007;293:H2786-H2798; <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.00720.2007>.
79. Cittera E, Leidi M, Buracchi C, Pasqualini F, Sozzani S, Vecchi A, et al. The CCL3 Family of Chemokines and Innate Immunity Cooperate In Vivo in the Eradication of an Established Lymphoma Xenograft by Rituximab. *The Journal of Immunology* 2007;178:6616–6623; <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.178.10.6616>.
80. Ajuebor MN, Hogaboam CM, Le T, Proudfoot, Amanda E. I., Swain MG. CCL3/MIP-1 $\alpha$  is pro-inflammatory in murine T cell-mediated hepatitis by recruiting CCR1-expressing CD4<sup>+</sup> T cells to the liver. *Eur. J. Immunol.* 2004;34:2907–2918; <http://dx.doi.org/10.1002/eji.200425071>.
81. Liu M, Guo S, Hibbert JM, Jain V, Singh N, Wilson NO, et al. CXCL10/IP-10 in Infectious Diseases Pathogenesis and Potential Therapeutic Implications. *Cytokine & growth factor reviews* 2011;22:121–130; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cytogfr.2011.06.001>.
82. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 2008;29:313–326; <http://dx.doi.org/10.1089/jir.2008.0027>.
83. Sawant KV, Poluri KM, Dutta AK, Sepuru KM, Troshkina A, Garofalo RP, et al. Chemokine CXCL1 mediated neutrophil recruitment: Role of glycosaminoglycan interactions. *Scientific Reports* 2016;6:33123; <http://dx.doi.org/10.1038/srep33123>.
84. Kjeldsen L, Johnsen AH, Sengeløv H, Borregaard N. Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. *Journal of Biological Chemistry* 1993;268:10425–10432.
85. Kjeldsen L, Cowland JB, Borregaard N. Human neutrophil gelatinase-associated lipocalin and homologous proteins in rat and mouse. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 2000;1482:272–283; [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-4838\(00\)00152-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-4838(00)00152-7).

86. Flower D. The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem. J* 1996;318:1–14.
87. Hraba-Renevey S, Türler H, Kress M, Salomon C, Weil R. SV40-induced expression of mouse gene 24p3 involves a post-transcriptional mechanism. *Oncogene* 1989;4:601–608.
88. Liu Q, Nilsen-Hamilton M. Identification of a New Acute Phase Protein. *Journal of Biological Chemistry* 1995;270:22565–22570; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.270.38.22565>.
89. Goetz DH, Holmes MA, Borregaard N, Bluhm ME, Raymond KN, Strong RK. The Neutrophil Lipocalin NGAL Is a Bacteriostatic Agent that Interferes with Siderophore-Mediated Iron Acquisition. *Molecular Cell* 2002;10:1033–1043; [http://dx.doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00708-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00708-6).
90. Flo TH, Smith KD, Sato S, Rodriguez DJ, Holmes MA, Strong RK, et al. Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature* 2004;432:917–921; <http://dx.doi.org/10.1038/nature03104>.
91. Borkham-Kamphorst E, Drews F, Weiskirchen R. Induction of lipocalin-2 expression in acute and chronic experimental liver injury moderated by pro-inflammatory cytokines interleukin-1 $\beta$  through nuclear factor- $\kappa$ B activation. *Liver International* 2011;31:656–665; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1478-3231.2011.02495.x>.
92. Janice Giasson, Guo Hua Li, Yu Chen. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) as a New Biomarker for Non – Acute Kidney Injury (AKI) Diseases. *Inflammation & Allergy-Drug Targets* 2011;10:272–282; <http://dx.doi.org/10.2174/187152811796117753>.
93. Sunil VR, Patel KJ, Nilsen-Hamilton M, Heck DE, Laskin JD, Laskin DL. Acute endotoxemia is associated with upregulation of lipocalin 24p3/Lcn2 in lung and liver. *Experimental and molecular pathology* 2007;83:177–187; <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexmp.2007.03.004>.
94. Roudkenar MH, Kuwahara Y, Baba T, Roushandeh AM, Ebishima S, Abe S, et al. Oxidative Stress Induced Lipocalin 2 Gene Expression: Addressing its Expression under the Harmful Conditions. *Journal of Radiation Research* 2007;48:39–44; <http://dx.doi.org/10.1269/jrr.06057>.
95. Asimakopoulou A, Borkham-Kamphorst E, Tacke F, Weiskirchen R. Lipocalin-2 (NGAL/LCN2), a “help-me” signal in organ inflammation. *Hepatology* 2015;n/a; <http://dx.doi.org/10.1002/hep.27930>.
96. Borkham-Kamphorst E, van de Leur, Eddy, Zimmermann HW, Karlmark KR, Tihaa L, Haas U, et al. Protective effects of lipocalin-2 (LCN2) in acute liver injury suggest a novel function in liver homeostasis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 2013;1832:660–673; <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.01.014>.
97. Darnell JE, Kerr IM, Stark GR. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 1994;264:1415–1421.

98. Schindler C, Darnell JE. Transcriptional Responses to Polypeptide Ligands: The JAK-STAT Pathway. *Annual Review of Biochemistry* 1995;64:621–652; <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.bi.64.070195.003201>.
99. Wegenka UM, Buschmann J, Lütticken C, Heinrich PC, Horn F. Acute-phase response factor, a nuclear factor binding to acute-phase response elements, is rapidly activated by interleukin-6 at the posttranslational level. *Molecular and Cellular Biology* 1993;13:276–288; <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.13.1.276>.
100. Wegenka UM, Lütticken C, Buschmann J, Yuan J, Lottspeich F, Müller-Esterl W, et al. The interleukin-6-activated acute-phase response factor is antigenically and functionally related to members of the signal transducer and activator of transcription (STAT) family. *Molecular and Cellular Biology* 1994;14:3186–3196; <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.14.5.3186>.
101. Raz R, Durbin JE, Levy DE. Acute phase response factor and additional members of the interferon-stimulated gene factor 3 family integrate diverse signals from cytokines, interferons, and growth factors. *Journal of Biological Chemistry* 1994;269:24391–24395.
102. Ripperger JA, Fritz S, Richter K, Hocke GM, Lottspeich F, Fey GH. Transcription Factors Stat3 and Stat5b Are Present in Rat Liver Nuclei Late in an Acute Phase Response and Bind Interleukin-6 Response Elements. *Journal of Biological Chemistry* 1995;270:29998–30006.
103. Xu M, Feng D, Wu H, Wang H, Chan Y, Kolls J, et al. Liver is the major source of elevated serum lipocalin-2 levels after bacterial infection or partial hepatectomy: A critical role for IL-6/STAT3. *Hepatology* 2015;61:692–702; <http://dx.doi.org/10.1002/hep.27447>.
104. Meares GP, Liu Y, Rajbhandari R, Qin H, Nozell SE, Mobley JA, et al. PERK-Dependent Activation of JAK1 and STAT3 Contributes to Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Inflammation. *Molecular and Cellular Biology* 2014;34:3911–3925; <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.00980-14>.
105. Flores-Morales A, Fernández L, Rico-Bautista E, Umana A, Negrín C, Zhang J, et al. Endoplasmic Reticulum Stress Prolongs GH-Induced Janus Kinase (JAK2)/Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT5) Signaling Pathway. *Molecular Endocrinology* 2001;15:1471–1483; <http://dx.doi.org/10.1210/mend.15.9.0699>.
106. Isaacs A, Lindenmann J. Virus interference. I. The interferon. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 1957;147:258–267.
107. Katze MG, He Y, Gale M. Viruses and interferon: a fight for supremacy. *Nat Rev Immunol* 2002;2:675–687; <http://dx.doi.org/10.1038/nri888>.
108. Decker T, Muller M, Stockinger S. The Yin and Yang of type I interferon activity in bacterial infection. *Nat Rev Immunol* 2005;5:675–687; <http://dx.doi.org/10.1038/nri1684>.
109. Ivashkiv LB, Donlin LT. Regulation of type I interferon responses. *Nat Rev Immunol* 2014;14:36–49.
110. Trinchieri G. Type I interferon: friend or foe? *The Journal of Experimental Medicine* 2010;207:2053–2063; <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20101664>.

111. Levy DE, Kessler DS, Pine R, Reich N, Darnell JE. Interferon-induced nuclear factors that bind a shared promoter element correlate with positive and negative transcriptional control. *Genes & Development* 1988;2:383–393; <http://dx.doi.org/10.1101/gad.2.4.383>.
112. Decker T, KOVARIK P, MEINKE A. GAS Elements: A Few Nucleotides with a Major Impact on Cytokine-Induced Gene Expression. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 1997;17:121–134; <http://dx.doi.org/10.1089/jir.1997.17.121>.
113. Bachmanov AA, Reed DR, Beauchamp GK, Tordoff MG. Food Intake, Water Intake, and Drinking Spout Side Preference of 28 Mouse Strains. *Behavior genetics* 2002;32:435–443.
114. Wiley JC, Pettan-Brewer C, Ladiges WC. Phenylbutyric acid reduces amyloid plaques and rescues cognitive behavior in AD transgenic mice. *Aging Cell* 2011;10:418–428; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1474-9726.2011.00680.x>.
115. Wu JC, Merlino G, Fausto N. Establishment and characterization of differentiated, nontransformed hepatocyte cell lines derived from mice transgenic for transforming growth factor alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994;91:674–678.
116. Gossen M, Bujard H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992;89:5547–5551.
117. RUSSELL, W. C., NEWMAN C, WILLIAMSON, D. H. A simple cytochemical technique for demonstration of DNA in cells infected with mycoplasmas and viruses. *Nature* 1975;253:461–462; <http://dx.doi.org/10.1038/253461a0>.
118. LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680–685; <http://dx.doi.org/10.1038/227680a0>.
119. Davis BJ. DISC ELECTROPHORESIS – II METHOD AND APPLICATION TO HUMAN SERUM PROTEINS\*. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1964;121:404–427; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.1964.tb14213.x>.
120. Ornstein L. DISC ELECTROPHORESIS-I BACKGROUND AND THEORY\*. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1964;121:321–349; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.1964.tb14207.x>.
121. Schägger H, Jagow G von. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry* 1987;166:368–379; [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90587-2](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(87)90587-2).
122. Raeymaekers L. Basic principles of quantitative PCR. *Mol Biotechnol* 2000;15:115–122; <http://dx.doi.org/10.1385/MB:15:2:115>.
123. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988;239:487–491; <http://dx.doi.org/10.1126/science.2448875>.
124. Haugland RP, Yue ST, Millard PJ, Roth BL. Cyclic-substituted unsymmetrical cyanine dyes 1995. <http://www.google.com/patents/US5436134>.

125. Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product Differentiation by Analysis of DNA Melting Curves during the Polymerase Chain Reaction. *Analytical Biochemistry* 1997;245:154–160; <http://dx.doi.org/10.1006/abio.1996.9916>.
126. Heid, Stevens, Livak, Williams. *Real Time Quantitative PCR* 1996.
127. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods* 2001;25:402–408; <http://dx.doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
128. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995:467–469.
129. Janssen J, Laatz W. *Statistische Datenanalyse mit SPSS für Windows: eine anwendungsorientierte Einführung in das Basissystem Version 8 und das Modul Exakte Tests*: Springer-Verlag, 2013.
130. Kruskal WH, Wallis, W. Allen. Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis. *Journal of the American Statistical Association* 1952;47:583–621; <http://dx.doi.org/10.1080/01621459.1952.10483441>.
131. Graumann F, Churin Y, Tschuschner A, Reifenberg K, Glebe D, Roderfeld M, et al. 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. *PLoS ONE* 2016;10:e0146099; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0146099>.
132. Köppel A, Baier K, Glebe D, Schröder D, Churin Y, Annette T, et al. Das synthetische Chaperon PBA steigert ER Stress und Inflammation in Hepatitis B transgenen Mäusen. *Z Gastroenterol* 2015;53:KG131; <http://dx.doi.org/10.1055/s-0035-1559157>.
133. Köppel A, Baier K, Glebe D, Roderfeld M, Churin Y, Tschuschner A, et al. 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; <http://dx.doi.org/10.1055/s-0036-1586945>.
134. Zhang Q, Esplin BL, Iida R, Garrett KP, Huang ZL, Medina KL, et al. RAG-1 and Ly6D Independently Reflect Progression in the B Lymphoid Lineage. *PLoS ONE* 2013;8:e72397; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0072397>.
135. Susana Constantino Rosa Santos<sup>1</sup>, Virginie Lacronique<sup>2</sup>, Isabelle Bouchaert<sup>1</sup>, Richard Monni<sup>2</sup>, Olivier Bernard<sup>2</sup>, Sylvie Gisselbrecht<sup>1</sup> and Fabrice Gouilleux<sup>1</sup>. Constitutively active STAT5 variants induce growth and survival of hematopoietic cells through a PI 3-kinase/Akt dependent pathway. *Oncogene* 2001:2080–2090.
136. Wagner K, Schmidt J. The two faces of Janus kinases and their respective STATs in mammary gland development and cancer 01.01.2011;10. <http://www.carcinogenesis.com/article.asp?issn=1477-3163;year=2011;volume=10;issue=1;page=32;epage=32;aulast=Wagner>.

137. Finidori J, Kelly PA. Cytokine receptor signalling through two novel families of transducer molecules: Janus kinases, and signal transducers and activators of transcription. *Journal of Endocrinology* 1995;147:11–23; <http://dx.doi.org/10.1677/joe.0.1470011>.
138. Winston LA, Hunter T. JAK2, Ras, and Raf Are Required for Activation of Extracellular Signal-regulated Kinase/Mitogen-activated Protein Kinase by Growth Hormone. *Journal of Biological Chemistry* 1995;270:30837–30840; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.270.52.30837>.
139. Walker SR, Nelson EA, Frank DA. STAT5 represses BCL6 expression by binding to a regulatory region frequently mutated in lymphomas. *Oncogene* 2006;26:224–233.
140. Pircher TJ, Petersen H, Gustafsson J, Haldosén L. Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK) Interacts with Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT) 5a. *Molecular Endocrinology* 1999;13:555–565; <http://dx.doi.org/10.1210/mend.13.4.0263>.
141. Naka T, Narazaki M, Hirata M, Matsumoto T, Minamoto S, Aono A, et al. Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature* 1997;387:924–929.
142. Matsumoto A, Masuhara M, Mitsui K, Yokouchi M, Ohtsubo M, Misawa H, et al. CIS, a Cytokine Inducible SH2 Protein, Is a Target of the JAK-STAT5 Pathway and Modulates STAT5 Activation. *Blood* 1997;89:3148–3154.
143. Kalita A, Gupta S, Singh P, Suroliya A, Banerjee K. IGF-1 stimulated upregulation of cyclin D1 is mediated via STAT5 signaling pathway in neuronal cells. *IUBMB Life* 2013;65:462–471; <http://dx.doi.org/10.1002/iub.1152>.
144. Yu C, Jin Y, Burakoff SJ. Cytosolic Tyrosine Dephosphorylation of STAT5: POTENTIAL ROLE OF SHP-2 IN STAT5 REGULATION. *Journal of Biological Chemistry* 2000;275:599–604; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.275.1.599>.
145. Chen Y, Wen R, Yang S, Schuman J, Zhang EE, Yi T, et al. Identification of Shp-2 as a Stat5A Phosphatase. *Journal of Biological Chemistry* 2003;278:16520–16527; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M210572200>.
146. Aoki N, Matsuda T. A Cytosolic Protein-tyrosine Phosphatase PTP1B Specifically Dephosphorylates and Deactivates Prolactin-activated STAT5a and STAT5b. *Journal of Biological Chemistry* 2000;275:39718–39726; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M005615200>.
147. Santos SC, Lacronique V, Bouchaert I, Monni R, Bernard O, Gisselbrecht S, et al. Constitutively active STAT5 variants induce growth and survival of hematopoietic cells through a PI 3-kinase/Akt dependent pathway. *Oncogene* 2001;20:2080–2090; <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1204308>.
148. Bartels H, Linnemann H, Jungermann K. Predominant localization of phosphoenolpyruvate carboxykinase mRNA in the periportal zone of rat liver parenchyma demonstrated by in situ hybridization. *FEBS Letters* 1989;248:188–194; [http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793\(89\)80459-4](http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793(89)80459-4).
149. Elliott WH. Studies on the enzymic synthesis of glutamine. *Biochemical Journal* 1951;49:106–112.

150. Gebhardt R, Mecke D. Heterogeneous distribution of glutamine synthetase among rat liver parenchymal cells in situ and in primary culture. *The EMBO Journal* 1983;2:567–570.
151. Guglani L, Gopal R, Rangel-Moreno J, Junecko BF, Lin Y, Berger T, et al. Lipocalin 2 Regulates Inflammation during Pulmonary Mycobacterial Infections. *PLoS ONE* 2012;7:e50052 EP -; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0050052>.
152. Eilenberg W, Stojkovic S, Piechota-Polanczyk A, Kaun C, Rauscher S, Gröger M, et al. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) is Associated with Symptomatic Carotid Atherosclerosis and Drives Pro-inflammatory State In Vitro. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery* 2016;51:623–631; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejvs.2016.01.009>.
153. Jeon S, Jha MK, Ock J, Seo J, Jin M, Cho H, et al. Role of Lipocalin-2-Chemokine Axis in the Development of Neuropathic Pain following Peripheral Nerve Injury. *Journal of Biological Chemistry* 2013;288:24116–24127; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M113.454140>.
154. Pacifico F, Pisa L, Mellone S, Cillo M, Lepore A, Leonardi A. NGAL promotes recruitment of tumor infiltrating leukocytes. *Oncotarget* 2018;9:30761–30772; <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.25625>.
155. Allen SJ, Crown SE, Handel TM. Chemokine:Receptor Structure, Interactions, and Antagonism. *Annu. Rev. Immunol.* 2007;25:787–820; <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.24.021605.090529>.
156. Ramadori G, Christ B. Cytokines and the Hepatic Acute-Phase Response. *Semin Liver Dis* 1999;19:141–155; <http://dx.doi.org/10.1055/s-2007-1007106>.
157. Saiman Y, Friedman SL. The role of chemokines in acute liver injury. *Frontiers in Physiology* 2012;3:213; <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2012.00213>.
158. Guo H, Jin D, Chen X. Lipocalin 2 is a regulator of macrophage polarization and NF- $\kappa$ B/STAT3 pathway activation. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 2014;28:1616–1628; <http://dx.doi.org/10.1210/me.2014-1092>.
159. Zhao P, Elks CM, Stephens JM. The Induction of Lipocalin-2 Protein Expression in Vivo and in Vitro. *The Journal of Biological Chemistry* 2013;289:5960–5969; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M113.532234>.
160. Wirtz, D. C., Heller K, Miltner O, Zilkens K, Wolff, J. M. Interleukin-6: a potential inflammatory marker after total joint replacement. *International Orthopaedics* 2000;24:194–196; <http://dx.doi.org/10.1007/s002640000136>.
161. Motohashi H, Yamamoto M. Nrf2–Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends in Molecular Medicine* 2004;10:549–557; <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2004.09.003>.
162. Asimakopoulou A, Weiskirchen S, Weiskirchen R. Lipocalin 2 (LCN2) Expression in Hepatic Malfunction and Therapy. *Frontiers in Physiology* 2016;7:430; <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2016.00430>.
163. FARRELL PJ, BROEZE RJ, LENGYEL P. Accumulation of an mRNA and protein in interferon-treated Ehrlich ascites tumour cells. *Nature* 1979;279:523–525; <http://dx.doi.org/10.1038/279523a0>.

164. Haas AL, Ahrens P, Bright PM, Ankel H. Interferon induces a 15-kilodalton protein exhibiting marked homology to ubiquitin. *Journal of Biological Chemistry* 1987;262:11315–11323.
165. Osiak A, Utermöhlen O, Niendorf S, Horak I, Knobeloch K. ISG15, an Interferon-Stimulated Ubiquitin-Like Protein, Is Not Essential for STAT1 Signaling and Responses against Vesicular Stomatitis and Lymphocytic Choriomeningitis Virus. *Molecular and Cellular Biology* 2005;25:6338–6345; <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.25.15.6338-6345.2005>.
166. Jeon YJ, Yoo HM, Chung CH. ISG15 and immune diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 2010;1802:485–496; <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.02.006>.
167. Malakhova OA, Zhang D. ISG15 Inhibits Nedd4 Ubiquitin E3 Activity and Enhances the Innate Antiviral Response. *The Journal of Biological Chemistry* 2008;283:8783–8787; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.C800030200>.
168. Okumura A, Lu G, Pitha-Rowe I, Pitha PM. Innate antiviral response targets HIV-1 release by the induction of ubiquitin-like protein ISG15. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005;103:1440–1445; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0510518103>.
169. Hsiang T, Zhao C, Krug RM. Interferon-Induced ISG15 Conjugation Inhibits Influenza A Virus Gene Expression and Replication in Human Cells. *Journal of Virology* 2009;83:5971–5977; <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.01667-08>.
170. Mahony R, Gargan S, Roberts KL, Bourke N, Keating SE, Bowie AG, et al. A novel anti-viral role for STAT3 in IFN- $\alpha$  signalling responses. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2017;74:1755–1764; <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-016-2435-3>.
171. Kuchipudi SV. The Complex Role of STAT3 in Viral Infections. *Journal of Immunology Research* 2015;2015:9; <http://dx.doi.org/10.1155/2015/272359>.
172. Reich N, Evans B, Levy D, Fahey D, Knight, E, Jr, Darnell, J E, Jr. Interferon-induced transcription of a gene encoding a 15-kDa protein depends on an upstream enhancer element. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1987;84:6394–6398.
173. Carini R, Autelli R, Bellomo G, Albano E. Alterations of Cell Volume Regulation in the Development of Hepatocyte Necrosis. *Experimental Cell Research* 1999;248:280–293; <http://dx.doi.org/10.1006/excr.1999.4408>.
174. Lackner C. Hepatocellular ballooning in nonalcoholic steatohepatitis: the pathologist's perspective. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology* 2011;5:223–231; <http://dx.doi.org/10.1586/egh.11.8>.
175. Schroll A, Eller K, Feistritz C, Nairz M, Sonnweber T, Moser PA, et al. Lipocalin-2 ameliorates granulocyte functionality. *Eur. J. Immunol.* 2012;42:3346–3357; <http://dx.doi.org/10.1002/eji.201142351>.
176. Sickinger S, Maier H, König S, Vallant N, Kofler M, Schumpp P, et al. Lipocalin-2 as mediator of chemokine expression and granulocyte infiltration during ischemia and reperfusion. *Transpl Int* 2013;26:761–769; <http://dx.doi.org/10.1111/tri.12116>.

177. Ripperger JA, Fritz S, Richter K, Hocke GM, Lottspeich F, Fey GH. Transcription Factors Stat3 and Stat5b Are Present in Rat Liver Nuclei Late in an Acute Phase Response and Bind Interleukin-6 Response Elements. *Journal of Biological Chemistry* 1995;270:29998–30006.
178. Akira S, Nishio Y, Inoue M, Wang X, We S, Matsusaka T, et al. Molecular cloning of APRF, a novel IFN-stimulated gene factor 3 p91-related transcription factor involved in the gp130-mediated signaling pathway. *Cell* 1994;77:63–71; [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90235-6](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(94)90235-6).
179. Waxman DJ, O'Connor C. Growth Hormone Regulation of Sex-Dependent Liver Gene Expression. *Molecular Endocrinology* 2006;20:2613–2629; <http://dx.doi.org/10.1210/me.2006-0007>.
180. Zhang Y, Laz EV, Waxman DJ. Dynamic, Sex-Differential STAT5 and BCL6 Binding to Sex-Biased, Growth Hormone-Regulated Genes in Adult Mouse Liver. *Molecular and Cellular Biology* 2012;32:880–896; <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.06312-11>.
181. Song J, Zhang X, Ge Q, Yuan C, Chu L, Liang H, et al. CRISPR/Cas9-mediated knockout of HBsAg inhibits proliferation and tumorigenicity of HBV-positive hepatocellular carcinoma cells. *J. Cell. Biochem.* 2018;119:8419–8431; <http://dx.doi.org/10.1002/jcb.27050>.
182. Friedbichler K, Themanns M, Mueller KM, Schleder M, Kornfeld J, Terracciano LM, et al. Growth-hormone-induced signal transducer and activator of transcription 5 signaling causes gigantism, inflammation, and premature death but protects mice from aggressive liver cancer. *Hepatology* 2012;55:941–952; <http://dx.doi.org/10.1002/hep.24765>.
183. Baik M, Yu JH, Hennighausen L. Growth hormone-STAT5 regulation of growth, hepatocellular carcinoma, and liver metabolism. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2011;1229:29–37; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06100.x>.
184. Barclay JL, Nelson CN, Ishikawa M, Murray LA, Kerr LM, McPhee TR, et al. GH-Dependent STAT5 Signaling Plays an Important Role in Hepatic Lipid Metabolism. *Endocrinology* 2011;152:181–192; <http://dx.doi.org/10.1210/en.2010-0537>.
185. Blaas L, Kornfeld J, Schramek D, Musteanu M, Zollner G, Gumhold J, et al. Disruption of the growth hormone--signal transducer and activator of transcription 5--insulinlike growth factor 1 axis severely aggravates liver fibrosis in a mouse model of cholestasis. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 2010;51:1319–1326; <http://dx.doi.org/10.1002/hep.23469>.
186. Klein SL, Flanagan KL. Sex differences in immune responses. *Nat Rev Immunol* 2016;16:626–638.
187. Marriott I, Bost KL, Huet-Hudson YM. Sexual dimorphism in expression of receptors for bacterial lipopolysaccharides in murine macrophages: A possible mechanism for gender-based differences in endotoxic shock susceptibility. *Journal of Reproductive Immunology* 2006;71:12–27; <http://dx.doi.org/10.1016/j.jri.2006.01.004>.

188. Pinheiro I, Dejager L, Libert C. X-chromosome-located microRNAs in immunity: Might they explain male/female differences? *Bioessays* 2011;33:791–802; <http://dx.doi.org/10.1002/bies.201100047>.
189. Libert C, Dejager L, Pinheiro I. The X chromosome in immune functions: when a chromosome makes the difference. *Nat Rev Immunol* 2010;10:594–604; <http://dx.doi.org/10.1038/nri2815>.
190. Lindsay MA. microRNAs and the immune response. *Trends in Immunology* 2008;29:343–351; <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2008.04.004>.
191. Carè A, Bellenghi M, Matarrese P, Gabriele L, Salvioli S, Malorni W. Sex disparity in cancer: roles of microRNAs and related functional players. *Cell death and differentiation* 2018;25:477–485; <http://dx.doi.org/10.1038/s41418-017-0051-x>.
192. Huang S, He X. The role of microRNAs in liver cancer progression. *British Journal Of Cancer* 2010;104:235 EP -.
193. Alexander C, Rietschel ET. Invited review: Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *Journal of Endotoxin Research* 2001;7:167–202; <http://dx.doi.org/10.1177/09680519010070030101>.
194. Villa A, Rizzi N, Vegeto E, Ciana P, Maggi A. Estrogen accelerates the resolution of inflammation in macrophagic cells. *Scientific Reports* 2015;5:15224 EP -.
195. Yeh S, Chen P. Gender Disparity of Hepatocellular Carcinoma: The Roles of Sex Hormones. *Oncology* 2010;78(suppl 1):172–179; <http://dx.doi.org/10.1159/000315247>.
196. Shi L, Feng Y, Lin H, Ma R, Cai X. Role of estrogen in hepatocellular carcinoma: is inflammation the key? *Journal of translational medicine* 2014;12:93; <http://dx.doi.org/10.1186/1479-5876-12-93>.
197. Caetano MS, Hassane M, Van HT, Bugarin E, Cumpian AM, McDowell CL, et al. Sex specific function of epithelial STAT3 signaling in pathogenesis of K-ras mutant lung cancer. *Nature Communications* 2018;9:4589; <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-018-07042-y>.
198. Feingold KR, Grunfeld C, Heuer JG, Gupta A, Cramer M, Zhang T, et al. FGF21 Is Increased by Inflammatory Stimuli and Protects Leptin-Deficient ob/ob Mice from the Toxicity of Sepsis. *Endocrinology* 2012;153:2689–2700; <http://dx.doi.org/10.1210/en.2011-1496>.
199. Liu Z, Ukomadu C. Fibrinogen-like-protein 1, a hepatocyte derived protein is an acute phase reactant. *Biochemical and biophysical research communications* 2007;365:729–734; <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.11.069>.
200. DEVARAJAN P. Review: Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: A troponin-like biomarker for human acute kidney injury. *Nephrology* 2010;15:419–428; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-1797.2010.01317.x>.
201. Rubinstein T, Pitashny M, Levine B, Schwartz N, Schwartzman J, Weinstein E, et al. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel biomarker for disease activity in lupus nephritis. *Rheumatology* 2010;49:960–971; <http://dx.doi.org/10.1093/rheumatology/kep468>.
202. Ariza X, Graupera I, Coll M, Solà E, Barreto R, Garcá-a E, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is a biomarker of acute-on-chronic liver failure and

- prognosis in cirrhosis. *Journal of Hepatology* 2016;65:57–65;  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2016.03.002>.
203. Schroll A, Eller K, Feistritz C, Nairz M, Sonnweber T, Moser PA, et al. Lipocalin-2 ameliorates granulocyte functionality. *Eur. J. Immunol.* 2012;42:3346–3357; <http://dx.doi.org/10.1002/eji.201142351>.
204. Baeck C, Wei X, Bartneck M, Fech V, Heymann F, Gassler N, et al. Pharmacological inhibition of the chemokine C-C motif chemokine ligand 2 (monocyte chemoattractant protein 1) accelerates liver fibrosis regression by suppressing Ly-6C+ macrophage infiltration in mice. *Hepatology* 2014;59:1060–1072; <http://dx.doi.org/10.1002/hep.26783>.
205. Mandrekar P, Ambade A, Lim A, Szabo G, Catalano D. An essential role for MCP-1 in alcoholic liver injury: regulation of pro-inflammatory cytokines and hepatic steatosis. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 2011;54:2185–2197; <http://dx.doi.org/10.1002/hep.24599>.
206. Cai Y, Jogasuria A, Yin H, Xu M, Hu X, Wang J, et al. The Detrimental Role Played by Lipocalin-2 in Alcoholic Fatty Liver in Mice. *The American Journal of Pathology* 2016;186:2417–2428; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2016.05.006>.
207. Hsin I, Hsiao Y, Wu M, Jan M, Tang S, Lin Y, et al. Lipocalin 2, a new GADD153 target gene, as an apoptosis inducer of endoplasmic reticulum stress in lung cancer cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2012;263:330–337; <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2012.07.005>.
208. Yang J, Bielenberg DR, Rodig SJ, Doiron R, Clifton MC, Kung AL, et al. Lipocalin 2 promotes breast cancer progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008;106:3913–3918; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0810617106>.
209. Ding G, Fang J, Tong S, Qu L, Jiang H, Ding Q, et al. Over-expression of lipocalin 2 promotes cell migration and invasion through activating ERK signaling to increase SLUG expression in prostate cancer. *Prostate* 2015;75:957–968; <http://dx.doi.org/10.1002/pros.22978>.
210. Wang Y, Yu G, Lee M, Lee S, Chu I, Leem S, et al. Lipocalin-2 negatively modulates the epithelial-to-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma through the epidermal growth factor (TGF-beta1)/Lcn2/Twist1 pathway. *Hepatology* 2013;58:1349–1361; <http://dx.doi.org/10.1002/hep.26467>.
211. El Moety, Hoda Aly Abd, El Sharkawy, Rania Mahamed, Hussein, Nevin Abd El Menem. Lipocalin: A Novel Diagnostic Marker for Hepatocellular Carcinoma in Chronic Liver Disease Patients in Egypt. *International Journal of Clinical Medicine* 2013;4:440.
212. Wieser V, Tymoszyk P, Adolph TE, Grandner C, Grabherr F, Enrich B, et al. Lipocalin 2 drives neutrophilic inflammation in alcoholic liver disease. *Journal of Hepatology*;64:872–880; <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2015.11.037>.
213. Ye D, Yang K, Zang S, Lin Z, Chau H, Wang Y, et al. Lipocalin-2 mediates non-alcoholic steatohepatitis by promoting neutrophil-macrophage crosstalk via the induction of CXCR2. *Journal of Hepatology*;65:988–997; <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2016.05.041>.

214. Kim J, Lee SH, Jeong S, Kim H, Ahn KS, Cho JY, et al. Increased urinary lipocalin-2 reflects matrix metalloproteinase-9 activity in chronic hepatitis C with hepatic fibrosis. *The Tohoku journal of experimental medicine* 2010;222:319–327.
215. Baier KM. Modulation der Unfolded Protein Response (UPR) bei Überexpression der Hepatitis-B-Oberflächenantigene unter Berücksichtigung des Transkriptionsfaktors ATF6. Gießen, 2018.
216. Mosbah IB, Alfany-Fernández I, Martel C, Zaouali MA, Bintanel-Morcillo M, Rimola A, et al. Endoplasmic reticulum stress inhibition protects steatotic and non-steatotic livers in partial hepatectomy under ischemia–reperfusion. *Cell Death & Disease* 2010;1:e52; <http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2010.29>.
217. MCGuire BM, Zupanets IA, Lowe ME, Xiao X, Sypliyvi VA, Monteleone J, et al. Pharmacology and Safety of Glycerol Phenylbutyrate in Healthy Adults and Adults with Cirrhosis. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 2010;51:2077–2085; <http://dx.doi.org/10.1002/hep.23589>.
218. El Karoui K, Viau A, Dellis O, Bagattin A, Nguyen C, Baron W, et al. Endoplasmic reticulum stress drives proteinuria-induced kidney lesions via Lipocalin 2. *Nature Communications* 2016;7:10330 EP -.
219. Ren F, Zhou L, Zhang X, Wen T, Shi H, Xie B, et al. Endoplasmic Reticulum Stress-Activated Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$  Aggravates Liver Inflammation and Hepatotoxicity in Mice with Acute Liver Failure. *Inflammation* 2015;38:1151–1165; <http://dx.doi.org/10.1007/s10753-014-0080-2>.
220. Holecek M, Vodenicarovova M. Phenylbutyrate exerts adverse effects on liver regeneration and amino acid concentrations in partially hepatectomized rats. *International journal of experimental pathology* 2016;97:278–284; <http://dx.doi.org/10.1111/iep.12190>.
221. Shimizu D, Ishitsuka Y, Miyata K, Tomishima Y, Kondo Y, Irikura M, et al. Protection afforded by pre- or post-treatment with 4-phenylbutyrate against liver injury induced by acetaminophen overdose in mice. *Pharmacological Research* 2014;87:26–41; <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2014.06.003>.
222. Nagata S. Apoptotic DNA Fragmentation. *Experimental Cell Research* 2000;256:12–18; <http://dx.doi.org/10.1006/excr.2000.4834>.
223. Dunsford HA, Sell S, Chisari FV. Hepatocarcinogenesis Due to Chronic Liver Cell Injury in Hepatitis B Virus Transgenic Mice. *Cancer Res* 1990;50:3400.
224. Uppala JK, Gani AR, Ramaiah, Kolluru V A. Chemical chaperone, TUDCA unlike PBA, mitigates protein aggregation efficiently and resists ER and non-ER stress induced HepG2 cell death. *Scientific Reports* 2017;7:3831; <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-03940-1>.
225. Baier KM, Churin Y, Schneider F, Tschuschner A, Roderfeld M, Roeb E. Tauroursodeoxycholsäure aktiviert das Ubiquitin-Proteasom System in Hepatitis B transgenen Zellen. *Z Gastroenterol* 2015;53:A2\_43; <http://dx.doi.org/10.1055/s-0035-1568015>.

## Publikationsverzeichnis

Teile dieser Arbeit wurden unter folgenden Titeln veröffentlicht:

Publizierte Abstracts:

- KM Baier, Y Churin, **F Schneider**, A Köppel, D Leder, A Tschuschner, M Roderfeld, E Roeb: Der Effekt des synthetischen Chaperons 4-PBA im murinen HBV-Modell auf die Aktivierung des Transkriptionsfaktors ATF6; *Der Internist 2017, Supplement 1*, PS37, S. 20
- **F Schneider**, Y Churin, A Köppel, KM Baier, A Tschuschner, M Roderfeld, E Roeb: Das synthetische Chaperon 4-PBA führt zur Akut-Phase-Reaktion in einem HBs-transgenen Maus-Modell; *Z Gastroenterol 2016*; 54 - KV171
- KM Baier, Y Churin, **F Schneider**, A Köppel, D Leder, A Tschuschner, M Roderfeld, E Roeb: Modulation der Unfolded Protein Response (UPR) im murinen HBV-Modell durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors ATF6; *Z Gastroenterol 2016*, 54 (12): 1343-1404
- A Köppel, **F Schneider**, KM Baier, D Glebe, M Roderfeld, Y Churin, A Tschuschner, E Roeb: Das synthetische Chaperon 4-PBA verändert das Verteilungsmuster der HBV-Hüllproteine im Endoplasmatischen Retikulum von Hepatitis B transgenen Mäusen und führt zu verstärkter Pathogenese; *DGVS 2016*, 54 - KV169
- **F Schneider**, Y Churin, A Köppel, KM Baier, A Tschuschner, M Roderfeld, E Roeb: Das synthetische Chaperon 4-PBA induziert eine Akut-Phase-Reaktion im Maus-Modell für Protein-Speicherkrankheiten; *Z Gastroenterol 2015*; 53 - A1\_11
- KM Baier, Y Churin, **F Schneider**, A Tschuschner, M Roderfeld, E Roeb: Tauroursodeoxycholsäure aktiviert das Ubiquitin-Proteasom System in Hepatitis B transgenen Zellen; *Z Gastroenterol 2015*, 53 - A2\_43

## Weitere Veröffentlichungen:

- **Schneider F**, Irungbam K, Churin Y, Roderfeld M, Roeb E: Das Ausschalten des Endocannabinoid Rezeptor 1 Signalweges reduziert die hepatische Steatose im Maus Modell für Hepatitis B; *Z Gastroenterol* 2018; 56(01): E2-E89

## Nicht-Publizierte Abstracts:

- **Schneider F**, Irungbam K, Churin Y, Roderfeld M, Roeb E: Knockout of endocannabinoid receptor 1 reduces hepatic steatosis in a mouse model of chronic Hepatitis B; Poster-Präsentation auf dem Falk-Symposium 2018 in Hamburg
- KM Baier, Y Churin, **F Schneider**, A Köppel, D Leder, A Tschuschner, M Rodefeld, E Roeb: Modulation of the Unfolded Protein Response (UPR) in HBV-mouse-model concerning the transcription factor ATF6; Poster-Präsentation auf dem Falk-Symposium 2017 in Essen
- **F Schneider**, Y Churin, A Köppel, KM Baier, A Tschuschner, M Roderfeld, E Roeb: The synthetic chaperon 4-PBA induces an acute phase response in a mouse model of protein storage diseases, Poster-Präsentation auf dem Falk-Symposium 2016 in Düsseldorf
- KM Baier, Y Churin, **F Schneider**, A Tschuschner, M Roderfeld, E Roeb: Tau-roursodeoxycholic acid activates the ubiquitin-proteasome system in hepatitis B transgenic cells, Poster-Präsentation auf dem Falk-Symposium 2016 in Düsseldorf

## Erklärung zur Dissertation

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

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

## Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Univ. Prof. Dr. med. Elke Roeb für die gute und herzliche Zusammenarbeit bedanken. Danke, dass Sie stets für Fragen erreichbar waren. Vielen Dank für Ihre Zuverlässigkeit und Hilfsbereitschaft.

Mein Dank gilt auch besonders Dr. rer. nat Yury Churin. Danke Jura für das Einweisen in die Methoden, für die Ideen und für das Beantworten jeglicher Fragen. Danke für interessante Diskussionen zu Wissenschaft, Politik, Sport und Musik. Danke, dass ich dein Weltbild verändern durfte und danke für die Freundschaft!

Desweiteren möchte ich mich bei Dr. Martin Roderfeld bedanken. Vor allem, was organisatorische Fragen und Bildbearbeitung am Computer anbelangt, warst du mir immer ein zuverlässiger, hilfsbereiter und geduldiger Ansprechpartner. Danke schön!

Anette, ein ganz großes Dankeschön, für die Hilfe im Labor, das Einweisen in Methoden und praktische Tipps beim Arbeiten. Danke aber auch für viel Freude und nette Gespräche.

Mein Dank gilt besonders auch den anderen Doktoranden. Nora, Katrin, David, Alexandra, Luisa und Karuna. Danke für die gute Zusammenarbeit und die schöne gemeinsame Zeit.

Zu guter Letzt: Danke an meine Familie und Freunde für die großartige Unterstützung während meines Studiums. Vielen Dank!