

**Modulation der *Unfolded Protein Response* (UPR)
bei Überexpression der Hepatitis-B-Oberflächenantigene
unter Berücksichtigung
des Transkriptionsfaktors ATF6**

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

vorgelegt von Katrin Maria Baier
aus Gießen
Gießen 2018

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Direktor der Klinik: Prof. Dr. Werner Seeger

Gutachterin: Prof. Dr. Elke Roeb

Gutachter: PD Dr. Karl Reuner

Tag der Disputation: 26.09.2018

Meiner Familie gewidmet

„Daß etwas schwer ist, muß ein Grund mehr sein, es zu tun.“

Rainer Maria Rilke (1875-1926)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielsetzung	1
1.1	Übersicht.....	1
1.1.1	Stand der Erkenntnis.....	1
1.1.2	Das Hepatitis-B-Virus	2
1.1.2.1	Virusmorphologie	3
1.1.2.2	Replikationszyklus	5
1.1.2.3	Pathogenese.....	6
1.1.2.4	Autophagie	10
1.1.3	Das endoplasmatische Retikulum und ER-Stress.....	10
1.1.3.1	Die <i>Unfolded Protein Response</i>	12
1.1.3.2	UPR-Signalwege.....	14
1.1.3.2.1	Der ATF6-Signalweg.....	15
1.1.3.2.2	Der IRE1-Signalweg.....	16
1.1.3.2.3	Der PERK-Signalweg	16
1.1.3.2.4	Der IP3R-Signalweg	16
1.1.4	Die Akute-Phase-Reaktion	18
1.1.5	Pathophysiologische Bedeutung der ER-Stress-Antwort.....	19
1.1.6	Therapeutisches Potential chemischer Chaperone	21
1.2	Vorarbeit.....	23
1.3	Zielsetzung.....	25
1.4	Projektdarstellung	28
2	Material und Methoden	31
2.1	Material.....	31
2.1.1	Geräte.....	31
2.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	33
2.1.3	Chemikalien und Reagenzien	34

2.1.4	Puffer und Lösungen	36
2.1.5	Antikörper.....	40
2.1.6	Kommerzielle Kits.....	41
2.1.7	Primer	42
2.1.8	Mauslinie und das HBs-transgene Maus-Modell	44
2.1.9	Zelllinie und das HBs-transgene Zellkultur-Modell.....	46
	2.1.9.1 Medien und Zusatzstoffe.....	46
2.2	Methoden.....	47
2.2.1	Histologische Methoden	47
	2.2.1.1 Paraffineinbettung und Herstellung der Präparate	47
	2.2.1.2 Immunhistochemie.....	47
2.2.2	Zellkultur	49
	2.2.2.1 Auftauen und Einfrieren der Zelllinien.....	49
	2.2.2.2 Kultivierung und Passagieren der Zellen.....	49
	2.2.2.3 Testansätze für <i>q-RT PCR</i> und <i>Western Blot</i>	50
2.2.3	Proteinbiochemische Methoden	51
	2.2.3.1 Herstellung von Gewebelysaten.....	51
	2.2.3.2 Herstellung von Zelllysaten	51
	2.2.3.3 Subzelluläre Protein-Fraktionierung	52
	2.2.3.4 <i>Western Blot</i> -Analyse	52
	2.2.3.4.1 Proteinauftrennung durch <i>SDS-PAGE</i>	53
	2.2.3.4.2 Proteintransfer auf eine Nitrozellulosemembran	53
	2.2.3.4.3 Immunchemischer Nachweis der Proteine.....	53
	2.2.3.5 Proteom <i>Profiler</i> (Cytokin- und Chemokinanalyse).....	54
2.2.4	Molekularbiologische Methoden.....	55
	2.2.4.1 <i>RNA</i> -Isolierung aus Gewebe und Zellen.....	55
	2.2.4.2 <i>RNA</i> -Agarose Gel.....	57

2.2.4.3	Synthese komplementärer <i>DNA</i>	57
2.2.4.4	Quantitative <i>Real-Time</i> Polymerasekettenreaktion.....	58
2.2.4.4.1	Prinzip	58
2.2.4.4.2	Bedingungen und Auswertung.....	59
2.2.4.4.3	<i>Signal Transduction Pathway Finder</i>	60
2.2.5	Elektronenmikroskopie.....	61
2.2.5.1	Prinzip	61
2.2.5.2	Probenvorbereitung.....	61
2.2.6	Statistische Auswertung	63
3	Ergebnisse.....	65
3.1	Verminderung der Expression natürlicher Chaperone im Maus-Lebergewebe.....	66
3.1.1	Reduktion der GRP78-Expression.....	66
3.1.2	Zeitabhängige Reduktion der PDI-Expression	70
3.2	Induktion der Aktivierung und Kernlokalisierung des Transkriptionsfaktors ATF6	73
3.2.1	Aktivierung von ATF6 im Maus-Lebergewebe	73
3.2.2	Kerntranslokation des Transkriptionsfaktors ATF6	74
3.2.2.1	Nukleäre Akkumulation von ATF6	75
3.2.2.2	Immunhistochemischer Nachweis der nukleären Translokation von ATF6.....	77
3.3	Induktion einer hepatischen Akute-Phase-Reaktion.....	79
3.3.1	Induktion der Genexpression von <i>SAA1</i> , <i>SAA</i> und <i>LCN2</i>	79
3.3.2	Induktion einer erhöhten Genexpression von Akute-Phase-Proteinen und proinflammatorischen Cytokinen in Zellkultur	82
3.3.3	Induktion der Proteinexpression von IP-10 und IL-16.....	87
3.3.4	Regulation der Genexpression von <i>XBPI</i> durch PBA-bedingte ATF6-Aktivierung.....	89

3.4	Beeinflussung des Energiestoffwechsels.....	94
3.4.1	Wirkung des HBs-Transgens auf den Energiestoffwechsel	94
3.4.2	Verstärkte IP3R-Expression durch PBA	96
3.4.3	Zeitabhängige Reduktion der ERp44-Expression durch PBA	97
4	Diskussion	102
4.1	Diskussion des Maus-Modells und des Zellkultur-Modells	104
4.2	Limitationen des Projektes	105
4.3	Ergebnisdiskussion	106
4.3.1	Reduktion der Proteinexpression natürlicher Chaperone	106
4.3.2	Aktivierung des Transkriptionsfaktors ATF6.....	109
4.3.3	Hepatische Akute-Phase-Reaktion	112
4.3.4	Modulation des Energiestoffwechsels	118
4.4	Schlussfolgerung und Ausblick.....	122
5	Zusammenfassung.....	124
6	Summary.....	125
7	Abkürzungsverzeichnis	I
8	Abbildungsverzeichnis.....	VI
9	Tabellenverzeichnis.....	VIII
10	Literaturverzeichnis	IX
11	Publikationen und Kongressbeiträge.....	XLIII
11.1	Publikationsbeteiligung	XLIII
11.2	Kongressbeiträge	XLIII
12	Eidesstaatliche Erklärung zur Dissertation.....	XLVII
13	Danksagung	XLVIII

1 Einleitung und Zielsetzung

1.1 Übersicht

1966 gelang es dem Nobelpreisträger Baruch Samuel Blumberg erstmals ein Antigen nachzuweisen, welches später sehr bedeutsam für die Hepatitis-B-Infektion wurde, das sog. *Australia*-Antigen (Blumberg *et al.* 1966). Ein direkter Zusammenhang zwischen dem *Australia*-Antigen und der Serumhepatitis wurde 1968 festgestellt (Prince 1968). Das sog. *Australia*-Antigen wurde später als Hepatitis-B-Oberflächenprotein Antigen (HBsAg) identifiziert (Johnston *et al.* 1971). Elektronenmikroskopische Analysen zeigten zusätzliche größere Partikel auf, die ebenfalls das *Australia*-Antigen enthielten. Die nach ihrem Entdecker benannten *Dane*-Partikel wurden als Hepatitis-B-Virus (HBV) bezeichnet (Dane *et al.* 1970).

Die Infektion mit dem HBV kann eine chronische Hepatitis und in der Folge auch die Entstehung einer Leberzirrhose oder des hepatozellulären Karzinoms (*hepatocellular carcinoma* (HCC)) fördern. Sie ist ein globales Gesundheitsproblem, da sie mit ca. 350 Millionen chronisch infizierten Menschen weltweit, trotz verfügbarer Vakzine, einer der häufigsten chronischen Virusinfektionen darstellt (Perz *et al.* 2006). Die Infektion ist global betrachtet die Hauptursache für Leberzirrhose und ist für die Entwicklung von Folgeerkrankungen wie dem HCC verantwortlich (Dienstag 2008). Mehr als 887.000 Menschen sterben jedes Jahr an den Folgen einer HBV-Infektion (*World Health Organization Hepatitis B* 2017). Daher ist das Verständnis molekularbiologischer Mechanismen der Viruspathologie von grundlegender Bedeutung, um geeignete und wirksame Therapeutika entwickeln zu können.

1.1.1 Stand der Erkenntnis

Das HBV gehört zur Familie der *Hepadnaviridae*. Die Familie der *Hepadnaviridae* wird unterteilt in die Gattungen *Orthohepadnaviridae* (Viren der Säugetiere) und in *Avihepadnaviridae* (Viren der Vögel) (*International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)* 2017). In der Schneegans und in der Pekingente

wurden bekannte Vertreter der *Avihepadnaviridae* gefunden, deren pathologische Eigenschaften eine auffallende Analogie zum menschlichen HBV aufweisen (Chang *et al.* 2015; Mason *et al.* 1980). Charakteristisch für Vertreter der *Hepadnaviridae* sind der ausgeprägte Lebertropismus und die hohe Wirtsspezifität (Block *et al.* 2007).

Zehn verschiedene Genotypen des humanpathogenen HBV sind bekannt (A–J), darunter einige Subgenotypen und verschiedene HBs-Antigen-Subtypen. Diese HBV-Subtypen zeichnen sich u.a. durch eine spezifische geographische Verteilung aus. In Europa dominieren die Genotypen A2 und D, wobei Genotyp A ein ubiquitäres Vorkommen in Europa und Nordamerika aufweist (Sunbul 2014).

1.1.2 Das Hepatitis-B-Virus

Das HBV wird durch Blut, Blutprodukte, sexuellen Kontakt und virushaltige Körperflüssigkeiten übertragen. Eine sehr geringe Menge an Blut ist aufgrund der teilweise sehr hohen Viruslast (bis 10^{10} Viren/ ml Blut) für eine Infektion ausreichend (Lavanchy 2004). In neun von zehn Fällen verläuft die Hepatitis unbemerkt. Akute Symptome gehen mit Fieber, Übelkeit, Appetitlosigkeit, Oberbauchschmerzen und zuweilen Diarrhö einher. In der Folge können auch Ikterus, Dunkelfärbung des Urins und Entfärbung des Stuhls auftreten. Die akute Erkrankung dauert vorwiegend zwei bis zwölf Wochen an. Eine chronische HBV-Infektion zeichnet sich durch das Überdauern des Virus für mehr als sechs Monate im Körper aus (Kimura *et al.* 2002). Dies kann zur Leberfibrose und letztendlich zu Leberkrebs führen (Webster *et al.* 2000). Es kommt selten zur fulminanten Hepatitis, die in 70 % der Fälle unbehandelt zum Tod führen würde (Doerr und Gerlich 2010). Eine perinatale Übertragung von der Mutter auf das Kind kann in eine chronische Hepatitis übergehen, ohne dass eine akute Phase stattgefunden hat (Han *et al.* 2017). Der häufig symptomlose Verlauf einer HBV-Infektion kann dazu führen, dass die Erkrankung lange Zeit unerkannt bleibt.

Die Diagnose kann über einen direkten oder indirekten Erregernachweis erfolgen. Dabei werden direkt HBsAg für die sezernierte Form des Kapsidproteins/ exkretorisch (HBeAg) und indirekt spezifische Antikörper gegen das Virus im Körper nachgewiesen. Ein positiver Befund der HBsAg-Testung ist nach ca. 6-8

Wochen möglich. Eine Infektiösität kann dagegen vorher bestehen (Gerlich und Thomssen 1975). Der Nachweis der HBV-Desoxyribonukleinsäure (*deoxyribonucleic acid (DNA)*) bietet die Möglichkeit, die Infektiösität zu quantifizieren. Dies bietet einen relevanten Faktor zur Kontrolle einer Therapie und deren Verlauf. Durch die Analysen der Serum-Transaminasen Aspartat-Amino-Transferase (AST) und Alanin-Amino-Transferase (ALT), die Hinweise auf eine Leberschädigung liefern, und der zusätzlichen serologischen Methoden, ist es möglich, die Beurteilung zwischen Impfstatus, einer akuten oder einer alten, ausgeheilten Infektion zu unterscheiden (Ma *et al.* 2017; Sandhu *et al.* 2017; Gerlich *et al.* 2007). Seit 1982 ist eine Impfung gegen das HBV verfügbar. Diese führt in 90 % aller Fälle zu einem wirkungsvollen Schutz (Gerlich und Glebe 2016; Lavanchy 2004).

1.1.2.1 Virusmorphologie

HBV ist ein sphärischer Partikel mit einem Durchmesser von ca. 42 nm (Dane *et al.* 1970). Das ikosaedrische Nukleokapsid umschließt das doppelsträngige *DNA*-Genom mit der viralen Polymerase (Locarnini 2004). Die Viruskapside sind von einer Lipidhülle mit den eingelagerten Oberflächenproteinen LHB (großes (*large*) Oberflächenprotein), MHB (mittleres (*middle*) Oberflächenprotein) und SHB (kleines (*small*) Oberflächenprotein) umgeben (Seeger und Mason 2000). Die drei Proteine unterscheiden sich N-terminal, besitzen aber den gleichen C-Terminus. Die subviralen Partikel sind nicht infektiös, da es sich um Hüllproteine ohne Nukleinsäure handelt (Robinson 1977).

Die viralen Oberflächenproteine LHB, MHB und SHB stellen klassische integrale Membranproteine dar und werden am Ende des endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert. Sie bilden disulfidgebundene Homo- und Heterodimere (Bruss 2007). Im Virus ist SHB verglichen mit LHB sowie MHB und in den subviralen Partikeln in großen Mengen vorhanden und bildet somit den Hauptproteinbestandteil der Virushülle (Doerr und Gerlich 2010). SHB besteht nur aus der S-Domäne, wohingegen LHB aus S-, PräS1- und der PräS2-Domäne und MHB aus S- und PräS2-Domäne besteht. MHB ist u.a. verantwortlich für die Induktion des Transkriptionsfaktors *Nuclear Factor* `Kappa-Light-Chain-

Enhancer' of Activated B-cells (NFκB) (Meyer *et al.* 1992). Die PräS-Domänen von LHB können für die Interaktion mit dem Kapsid-Protein in das Lumen und zur HBV-Rezeptorbindung nach außen gerichtet sein (Gripon *et al.* 2005). In der PräS1-Domäne von LHB ist die spezifische Sequenz, über welche die Bindung an den *Sodium-Taurocholate Cotransporting Polypeptide*-Rezeptor (NTCP) stattfindet, lokalisiert (Yan *et al.* 2012).

Das Genom mit einer Größe von 3.200 Basenpaaren setzt sich aus vier Leserastern zusammen. Diese *Open Reading Frames* (ORF's) überlappen sich zum Teil und sind für die geringe Genomgröße verantwortlich. Sie kodieren für folgende HBV-Proteine (vgl. Abb. 1): Kapsidprotein (HBcAg und HBsAg), P-Protein (*DNA*-Polymerase), Oberflächenproteine (LHB, MHB, SHB mit PräS1-, PräS2- und S-Domäne) und das virale X-Protein (HBx) (Glebe und Bremer 2013). Das HBx-Gen, das während der hepatozellulären Karzinogenese in die HBV-*DNA* integriert wird, bleibt funktionell aktiv (Kew 2011). Das HBx-Protein spielt eine wesentliche Rolle bei der Zellproliferation und Apoptose, was im Rahmen der hepatozellulären Karzinogenese von essentieller Bedeutung ist (Murakami 2001). Es induziert die *Unfolded Protein Response* (UPR) über den *Activating Transcription Factor 6* (ATF6) und *Inositol-Requiring Enzyme 1-X-box Binding Protein 1* (IRE1-XBP1)-Weg. Diese HBx-vermittelte Aktivierung fördert vermutlich die HBV-Replikation und Expression in Leberzellen und trägt somit zur Leberpathogenese bei (Li *et al.* 2007).

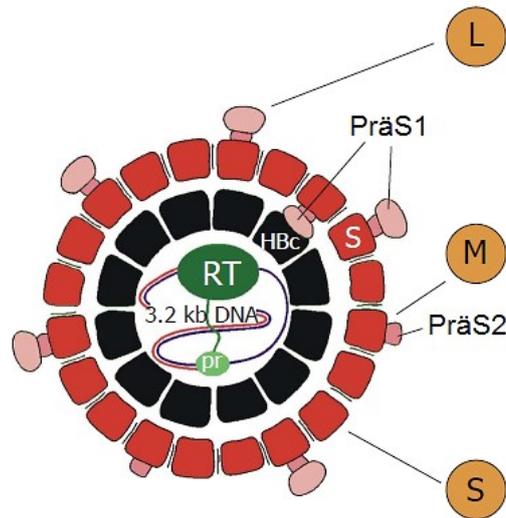


Abbildung 1: Struktur des Hepatitis-B-Virus.

Das Nukleokapsid besteht aus HBcAg und darin enthaltener, teilweise doppelsträngiger *DNA* (Genomgröße von 3.200 Basenpaaren) assoziiert mit der viralen Polymerase (Primerdomäne-pr; reverse Transkriptionsdomäne-RT). Die Virushülle besteht aus den drei HBV-Oberflächenproteinen LHB-L, MHB-M und SHB-S, der S-Domäne (rot), der PräS1- und PräS2-Domäne (rosa). Diese sind in einer Lipiddoppelschicht eingelagert, die dem ER aus der Wirtszelle entstammt. Die Abbildung ist eine modifizierte Version (Glebe und Urban 2007).

1.1.2.2 Replikationszyklus

Die Replikation des Virus findet nur in der Leber statt bzw. in den Hepatozyten des Wirtsorganismus. Die Aufnahme des Virus erfolgt über die initiale Bindung an Heparansulfat-Proteoglykane mit anschließender Bindung an den NTCP-Rezeptor. Es folgt der intrazelluläre Transport des Nukleokapsids zum Zellkern (*Uncoating*). Dabei wird die zum Teil doppelsträngige *DNA* mit Hilfe der wirtseigenen *DNA*-Polymerase in zirkulär geschlossene *supercoiled DNA* (*covalently closed circular DNA (cccDNA)*) transformiert (Köck *et al.* 2010). Im Anschluss wird die *cccDNA* in virale *messenger-RNA* (Ribonukleinsäure/*ribonucleic acid (mRNA)*) mit Unterstützung der zellulären *RNA*-Polymerase II umgeschrieben. Das Transkript besteht aus prä- und subgenomischer *mRNA*. Aus der subgenomischen *mRNA* werden die drei HBV-Oberflächenproteine translatiert. Die prägenomische *mRNA* dient zur Translation der Kapsidproteine

und der viralen Polymerase, welche für die Bildung eines unreifen Nukleokapsids verantwortlich sind. In diesen Nukleokapsiden wird ein negativer *DNA*-Strang, der als Vorlage für den Plusstrang dient, mittels reverser Transkriptase synthetisiert. Dadurch ist die zirkuläre Form des Genoms gegeben (Beck und Nassal 2007).

1.1.2.3 Pathogenese

Die Pathogenese der HBV-Infektion wird primär durch das wirtseigene Immunsystem verursacht. Lange Zeit wurde angenommen, dass das Virus selbst nicht cytopathogen ist. Die T-Zell-vermittelte Elimination infizierter Hepatozyten ist dabei die Ursache für eine akute und chronische Leberschädigung (Maini *et al.* 2000). Neben der durch das Immunsystem vermittelten Leberschädigung kann auch die Akkumulation viraler Proteine im ER des Hepatozyten ER-Stress, UPR und in Folge Apoptose auslösen und die Zellen demzufolge schädigen (Churin *et al.* 2014).

Die akute HBV-Infektion betrifft zu 30 % Erwachsene, jedoch sind auch Kinder ab dem 6. Lebensjahr betroffen. Dabei verläuft die Infektion bei 65 % der Jugendlichen und Erwachsenen unauffällig. 35 % der Patienten entwickeln hingegen eine Hepatitis (Modrow 2010). Eine Heilung der akuten Hepatitis, die in 95 % der Fälle geschieht und mit einer lebenslangen Immunität einhergeht, ist assoziiert mit einer immensen T-Zellantwort. Cytotoxische T-Zellen erkennen die infizierte Zelle, induzieren Apoptose und führen mittels dieser zur Elimination der Zelle (Rehermann 2013; Ferrari *et al.* 1990). Die Viruselimination erfolgt über die Freisetzung anti- und proinflammatorischer Cytokine und Chemokine, wie z.B. Tumornekrosefaktor *alpha* (TNF- α) und Interferon *gamma* (IFN- γ). Dadurch werden die virale Genexpression und die Replikation gehemmt (Guidotti und Chisari 2000). Interleukin 1 *beta* (IL-1 β) und Interleukin 6 (IL-6) sind Entzündungsmediatoren (Guidotti und Chisari 2001), die zudem freigesetzt werden, um der Viruselimination entgegenzuwirken. IL-1 β kann dabei die Induktion von IL-6 bewirken. Eine Entzündungsreaktion kann durch die Hemmung des IL-6-Signalweges unterbunden werden (Dinarello 2005). Eine Studie über die Untersuchung der Proteinspeicherkrankheit *Morbus Alzheimer*

zeigte, dass die IL-6-vermittelte reaktive Gliose frühzeitig im Krankheitsverlauf vorteilhaft sein kann, indem sie die Auflösung der Proteinaggregate möglicherweise verstärkt, anstatt eine neurotoxische Rückkopplungsschleife zu vermitteln, die die Amyloidpathologie verschärft (Chakrabarty *et al.* 2010).

Vermutlich tragen andere Mediatoren, wie z.B. freie Radikale oder Immunzellen wesentlich zur Schädigung der Leber bei, da keine Verbindung zwischen dem Ausmaß der Leberzellschädigung und der Aktivierung der cytotoxischen T-Zellantwort nachgewiesen werden konnte (Baron *et al.* 2002). Die chronische Infektion geht im Allgemeinen mit einer schwachen T-Zellantwort einher (Wieland *et al.* 2004). Die geringe Aktivierung von CD4-positiven (T-Helferzellen) und CD8-positiven (cytotoxische T-Zellen) T-Zellen ist der Grund dafür, dass das Immunsystem die Infektion mit HBV nicht bewältigen kann und zudem zur begrenzten B-Zell-Aktivierung führt (Chisari *et al.* 2010).

Die episomal stabile *cccDNA* im Zellkern der Wirtszelle ist für die Persistenz des Virus verantwortlich. Sie ist auch bei Patienten mit Viruselimination nachweisbar (Werle-Lapostolle *et al.* 2004). Es existieren bereits Mechanismen, die zur Elimination der *cccDNA* erarbeitet wurden. In einer Studie um Lucifora *et al.* wurde ein Therapieverfahren vorgestellt. Die *cccDNA* wird dabei, ohne die Wirtszelle zu zerstören, über die Aktivierung des Lymphotoxin- β -Rezeptors aus den Hepatozyten entfernt. Dadurch besteht die Möglichkeit, eine HBV-Infektion zu behandeln und folglich zu heilen (Lucifora *et al.* 2014).

Bei akuten und chronischen Infektionen werden spezifische Antikörper gegen virale Proteine zur Immunabwehr gebildet. Antikörper gegen HBcAg sind in der Anfangsphase der Infektion nachweisbar und wirken nicht viruseliminierend. Die Antikörper gegen HBeAg können über einen langen Zeitraum im Körper persistieren. Die Entwicklung der Antikörper (Serokonversion) von HBeAg zu Anti-HBe als Folge der Immunantwort, begleitet von einer Erniedrigung der Viruslast und der Reduktion einer Entzündungsreaktion, stellt bei einer chronischen HBV-Infektion eine gute Prognose dar (Zheng *et al.* 2017). Bei chronisch infizierten Patienten mit hoher Viruslast besteht darüber hinaus ein sehr hohes Risiko an einem HCC zu erkranken. Die fortwährende Schädigung des Leberparenchyms und die Zerstörung der Hepatozyten kann zur Entstehung einer Leberfibrose bis hin zur -zirrhose und in der Folge auch zum HCC führen (Blachier *et al.* 2013; Stauffer *et al.* 2012). Charakteristisch für eine hepatische

Fibrose sind die Reaktion des Gewebes mit Anreicherung von extrazellulärer Matrix bei einer andauernden Leberschädigung und die pathologischen Veränderungen der Leberarchitektur. Die langanhaltende Beeinträchtigung und somit Schädigung der Leber führt zur fehlenden Regenerationsfähigkeit dieser, mit der Folge einer erniedrigten hepatozytären Syntheseleistung (Bataller und Brenner 2005). Durch die Verletzung des Parenchyms werden hepatische Stellatzellen durch spezielle Cytokine, z.B. *Transforming Growth Factor beta* (TGF- β), aktiviert und differenzieren zu Myofibroblasten, die extrazelluläre Matrix produzieren (Tacke und Weiskirchen 2012). Bei fortwährender Schädigung der Leber werden die Hepatozyten durch extrazelluläre Matrix ersetzt, und die Fibrogenese führt letztendlich zur irreversiblen Leberzirrhose und in einigen Fällen zum HCC (vgl. Abb. 2) (Xu *et al.* 2012).

Das HCC zählt weltweit zu den dritthäufigsten Ursachen für einen krebsbedingten Tod, und die Behandlungsmöglichkeiten sind derzeit noch begrenzt (Ringelhan *et al.* 2013). Deshalb ist es umso wichtiger, die Pathogenese und die zugrunde liegenden Mechanismen zur Entstehung eines HCC besser zu verstehen. Interessanterweise fördert der sog. Hedgehog-Signalweg viele Prozesse zur Leberreparatur während einer Fibrose (Pereira *et al.* 2010; Jung *et al.* 2008). *In vitro* regulieren durch den Hedgehog-Signalweg-induzierte Myofibroblasten die Expression verschiedener Chemokine und Chemokinrezeptoren in benachbarten unreifen Leberepithelzellen, was die hepatische Rekrutierung bestimmter Arten von Immunzellen erleichtert (Omenetti *et al.* 2009). In der vorliegenden Arbeit hat der Hedgehog-Signalweg durch die Gabe des synthetischen Chaperons eine bedeutende Rolle.

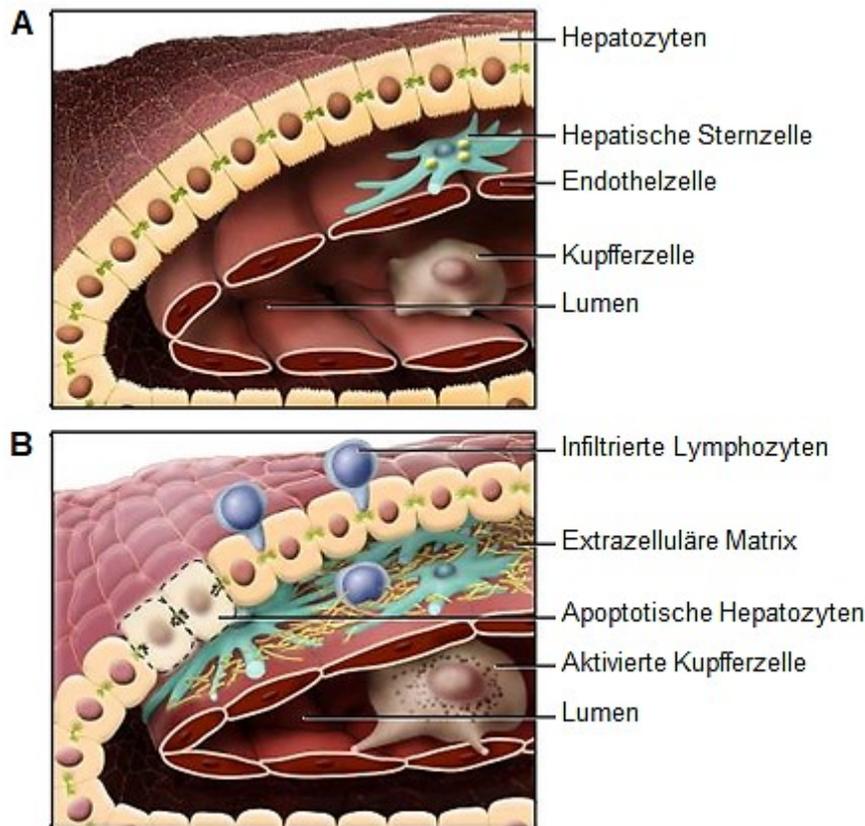


Abbildung 2: Vergleich der Leberarchitektur einer gesunden Leber (A) mit einer fortgeschrittenen Leberfibrose (B).

Bei einer chronischen Leberverletzung infiltrieren Lymphozyten das Leberparenchym. Einige Hepatozyten gehen an Apoptose zugrunde, und aktivierte Kupferzellen setzen fibrogene Mediatoren frei. Hepatische Sternzellen differenzieren zu Myofibroblasten. Diese produzieren extrazelluläre Matrix, welche als Ersatz der Hepatozyten bei andauernder Beeinträchtigung dient. Die Abbildung ist eine modifizierte Version (Bataller und Brenner 2005).

Interessanterweise aktiviert oxidativer Stress auch hepatische Sternzellen (*hepatic stellate cell* (HSC)). Diese chronische Aktivierung, induziert durch virale Replikation, kann zur Entstehung einer Fibrose beitragen sowie zur Aktivierung von Enzymen, die einen wichtigen Faktor in der zellulären Signalübertragung darstellen (Block *et al.* 2003). Hervorzuheben ist, dass in chronisch HBV-infizierten Patienten erhöhte Werte an oxidativem Stress gefunden wurden. Dies trägt zur Förderung einer Fibrose und HCC bei (Marra *et al.* 2011). Finkel *et al.* zeigten in ihren Untersuchungen, dass Mechanismen des oxidativen Stresses Signalkaskaden aktivieren, die u.a. die Regulation des Zellwachstums und die Differenzierung der Zellen wesentlich beeinflussen können und folglich an der

Pathogenese einiger mit oxidativem Stress assoziierten Erkrankungen beteiligt sind (Finkel und Holbrook 2000).

1.1.2.4 Autophagie

Die Autophagie ist ein intrazellulärer Prozess zum Abbau von Zellbestandteilen. Unter verschiedenen pathologischen Bedingungen ist eine Steigerung der Autophagie zu beobachten. Dieser Prozess ist für die Aufrechterhaltung der Zell-Homöostase verantwortlich. Als Reaktion auf Zellstress werden Zellbestandteile abgebaut und verwertet, z.B. ausgelöst durch fehlgefaltete Proteine oder Hypoxie (Huang und Brumell 2009). Es existieren drei Domänen der Autophagie: die Makro-, die Mikro- und die Chaperon-vermittelte Autophagie. Die Makroautophagie dient dem Abbau von Proteinen und Zellorganellen durch Bildung eines Autophagosoms mit anschließender lysosomaler Verdauung. Die Mikroautophagie beschreibt die Einstülpung der Lysosomenmembran mit anschließender Abschnürung des Vesikels. Bei der Chaperon-vermittelten Autophagie werden die abzubauenen Zellbestandteile über eine spezifische Sequenz von Chaperonen (z.B. 78 kDa Glucose-reguliertes Protein (GRP78)) erkannt und rezeptorvermittelt eliminiert (Yang *et al.* 2015; He und Klionsky 2009). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass das HBV die Autophagie induzieren kann, um die Replikation zu erleichtern (Tian *et al.* 2011; Prentice *et al.* 2004). Dabei spielt HBx eine wesentliche Rolle, welches die enzymatische Aktivität der Phosphoinositid-3-Kinasen durch dessen Bindung verstärkt. Das Enzym ist ein wichtiger Faktor für die Initiation der Autophagie (Sir *et al.* 2010). Die Studien um Sir *et al.* zeigen, dass die Hemmung der Phosphoinositid-3-Kinase oder des Enzyms *Autophagy-Related Protein 7* (ATG7), welches essentiell zur Bildung des Autophagosoms ist, eine Verhinderung der Replikation bewirkt.

1.1.3 Das endoplasmatische Retikulum und ER-Stress

Das ER durchzieht als ausgedehntes Membransystem in Form eines Netzwerkes die gesamte Zelle. Dabei bilden die Membranen des ER flächige oder röhrenförmige Hohlräume. Das ER übernimmt wichtige intrazelluläre Funktionen

bei der Synthese von Polypeptiden sowie der korrekten Proteinfaltung. Dieser Prozess findet aufgrund der hohen Proteinbiosynthese gehäuft in sekretorischen Zellen statt (Hetz 2012). Das ER ist mit seinem glatten Anteil an der Biosynthese von Phospholipiden beteiligt (Heinrich *et al.* 2014). Als dynamischer Calciumspeicher reagiert das ER auf Wachstumsfaktoren, Hormone und Reize, die die zelluläre Homöostase oder auch den Redoxstatus stören (Zhang und Kaufman 2008). Dies kann z.B. bei einer Fehlfaltung von Proteinen stattfinden (Cortez und Sim 2014). Da Proteine inhärent strukturell dynamisch sind, können sie sich in ihrer Konformation verfälschen. Dies kann zu Funktionseinschränkungen und folglich zu toxischen Aggregaten in der Zelle führen (Hartl *et al.* 2011). Das Potential zur Fehlfaltung kann durch zellulären Stress und Hypoxie gesteigert werden (Bukau *et al.* 2006).

Chaperone sind evolutionär konservierte Proteine, die die Proteinfaltung unterstützen und die zelluläre Homöostase gewährleisten (Finka *et al.* 2016). Sie werden oft als Stress-Proteine oder Hitzeschock-Proteine bezeichnet, da sie unter zellulären Stressbedingungen hochreguliert werden. Die großen Chaperonfamilien werden nach Molekulargewicht klassifiziert, wie z.B. das Hitzeschockprotein 40 (HSP40) oder das Hitzeschockprotein 70 (HSP70 oder auch GRP78 genannt) (Jee 2016). Sie katalysieren Adenosintriphosphat (ATP)-abhängige Prozesse und koordinieren zelluläre Funktionen, um eine korrekte Proteinfaltung und zelluläre Homöostase zu gewährleisten (Otto *et al.* 2005). GRP78 wird als erster Responder im Fall einer Akkumulation fehlgefalteter Proteine, die zum zellulären Stress führen, bezeichnet (Batulan *et al.* 2003). Das Chaperon besteht aus einer 44-kDa-N-terminalen Nukleotid-Bindungsdomäne, die es ermöglicht, ATP zu binden und zu hydrolysieren (Blond-Elguindi *et al.* 1993). Darüber hinaus kann dieses Chaperon auch eine zusätzliche C-terminale Domäne enthalten, die die Interaktionen mit dem Co-Chaperon HSP40 und die Rückfaltung spezifischer Substrate ermöglicht (Radons 2016). Während der Translokation von Polypeptidketten in das ER bindet das calciumabhängige GRP78 an diese und hilft unter ATP-Verbrauch der korrekten Faltung und Zusammensetzung des Proteins. Bei fehlerhafter Zusammenlagerung ist GRP78 für die Degradierung der Proteine verantwortlich (Wei *et al.* 1995). Die Aktivität von GRP78 wird durch HSP40 reguliert, indem HSP40 die ATP-Hydrolase-Aktivität anregt (Russell *et al.* 1999). Außerdem kann HSP40 direkt als Chaperon wirken und ungefaltete

Proteinsubstrate zu GRP78 steuern und ist in Mitochondrien, im ER sowie anderen Subkompartimenten der Zelle zu finden (Knox *et al.* 2011). Ausnahmslos verfügt HSP40 über eine hochkonservierte J-Domäne, die für die Regulation der ATP-Hydrolase-Aktivität von GRP78 verantwortlich ist. Die J-Domäne entspricht den N-terminalen 70 Aminosäuren des DnaJ-Proteins (Tiwari *et al.* 2015). Das DnaJ-Protein ist ein Chaperon zur Unterstützung der korrekten Faltung der Proteine, der Protein-Translokation beim Transport durch Membranen und der Reaktivierung von bereits teilweise aggregierten Proteinen (Walsh *et al.* 2004). Begünstigt wird die zur Faltung relevante Entwicklung von Disulfidbrücken durch die Proteindisulfid-Isomerase (PDI) (Kozutsumi *et al.* 1988). Die Ausbildung der Disulfidbrücken ist für die Stabilisierung der kovalenten Bindung des Proteins verantwortlich. Somit ist eine korrekte Vernetzung der Cysteine gewährleistet. PDI ist ein Enzym, welches diesen Vorgang katalysiert und als Chaperon die Aggregatbildung hemmt (Wilkinson und Gilbert 2004). Etwa ein Drittel der neu synthetisierten Proteine werden in das Lumen des ER transloziert, um die korrekte dreidimensionale Faltstruktur zu erhalten, bevor diese dann zur Oberfläche der Zelle transportiert werden. Die Proteinmodulation kann dabei durch verschiedene Faktoren im ER gestört werden. Dazu zählen Hypoxie und oxidativer Stress, die einen Einfluss auf die Ausbildung der Disulfidbrücken haben können. Die Veränderung der Calciumionenkonzentration im ER kann die Funktion der Chaperone, wie z.B. GRP78 beeinträchtigen. Infolgedessen kommt es zur Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen. Dies führt zu ER-Stress und damit zu einer zellulären Initiation und Aktivierung der UPR (Schröder und Kaufman 2005). Die UPR überträgt Informationen über den Proteinfaltungszustand im ER zum Kern und Cytosol, um den zellulären Stress abzuf puffern. Bei irreversiblen ER-Stress werden beschädigte Zellen durch Apoptose eliminiert. Das deutet auf die Existenz von Mechanismen hin, die zur Informationsübertragung bei langanhaltendem ER-Stress aktiviert werden (Hetz *et al.* 2011).

1.1.3.1 Die *Unfolded Protein Response*

Um der Proteinbelastung entgegenzuwirken, versucht die Zelle mittels UPR die Transkriptions- und Translationsprogramme in der Zelle positiv zu regulieren

(vgl. Abb. 3). GRP78 bindet an die drei UPR-Sensoren ATF6, IRE1, *Protein Kinase RNA-like Endoplasmic Reticulum Kinase* (PERK) und inaktiviert diese. Anschließend erfolgt die Aktivierung von ATF6 durch die Dissoziation von GRP78 (Ron und Walter 2007). Ein andauernder ER-Stress trotz Aktivierung der UPR-Mechanismen mit der daraus resultierenden Proteinlast kann über Mitochondrien-unabhängige oder -abhängige Wege zur Apoptose der Zelle führen (Malhotra und Kaufman 2011).

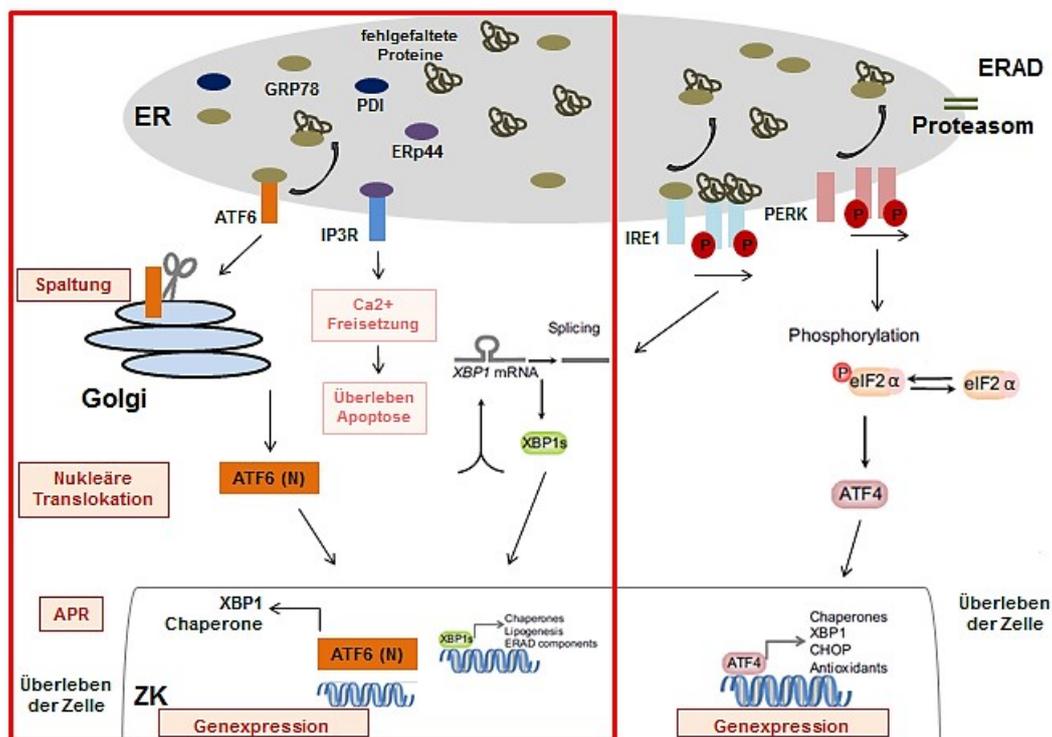


Abbildung 3: Sensoren der *Unfolded Protein Response*.

Die Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen aktiviert die ER-Stress Sensoren: ATF6-/ IP3R-/ IRE1-/ und PERK-Signalweg. ATF6 wird nach vorheriger Spaltung durch S1P und S2P im Golgi-Apparat aktiviert. Aktiviertes ATF6 (N) dient als Transkriptionsfaktor und induziert die Genexpression von Chaperonen und XBP1. Aktiviertes IRE1 induziert das Spleißen von XBP1-*mRNA*. Das gespleißte XBP1-Protein (XBP1s) transloziert zum Kern und kontrolliert die Transkription von ER-residenten Chaperonen und Genen, die an der Lipogenese und dem ER-assoziierten Abbau beteiligt sind (ERAD). Die Dimerisierung und Transautophosphorylierung von PERK aktiviert dessen Kinase-Aktivität. Dies führt zu einer Phosphorylierung der *alpha*-Untereinheit des eukaryotischen Initiierungsfaktors (eIF2) und einer Schwächung der Gesamt-Translation von Proteinen. Ausgewählte *mRNAs*, wie die ATF4-*mRNA*, werden bevorzugt in Gegenwart von phosphoryliertem eIF2 α translatiert. ATF4 wird in den Zellkern transloziert und induziert die Transkription vieler Gene, die für die ER-Qualitätskontrolle erforderlich sind. Die

Abspaltung von GRP78 und IP3R ermöglicht ERp44 mit IP3R zu interagieren. Dies führt zur adaptiven „*prosurvival*“ ER-Stress-Reaktion durch die Abnahme des Calciumionen-Speichers. Die Wiederherstellung der ER-Homöostase und die korrekte Proteinfaltung werden gefördert. Die Abbildung ist eine modifizierte Version (Kadowaki und Nishitoh 2013), (Kiviluoto *et al.* 2013), (Malhi und Kaufman 2011), (Zhang und Kaufman 2008). Abkürzungen: *Activating Transcription Factor 6*-ATF6, *Activating Transcription Factor 4*-ATF4, Akute-Phase-Reaktion-APR, *Eukaryotic Initiation Factor 2 alpha*-eIF2 α , endoplasmatisches Retikulum-ER, *Endoplasmic Reticulum-Associated Protein Degradation*-ERAD, *Endoplasmic Resident Protein 44*-ERp44, Inositol-1,4,5-Trisphosphat-Rezeptor-IP3R, *Inositol-Requiring Enzyme 1*-IRE1, *Protein Kinase RNA-like Endoplasmic Reticulum Kinase*-PERK, Proteindisulfid-Isomerase-PDI, *Sphingosine-1-phosphate Phosphohydrolase*-S1P, *Sphingosine-2-phosphate Phosphohydrolase*-S2P, *X-box Binding Protein 1*-XBP1, Zellkern-ZK.

1.1.3.2 UPR-Signalwege

Für die Replikation von HBV muss die Synthese viraler Proteine garantiert werden. Die Modifikation der translatierten Proteine findet im und am ER statt und die Proteine werden dabei einer Qualitätskontrolle unterzogen. Diese zelluläre Kontrolle übernimmt eine Schutzfunktion in der Zelle, um das Überleben dieser zu sichern. Die Proteinfaltung ist ein oxidativer Prozess. Kommt es zu fehlgefalteten Proteinen und zu einer Akkumulation dieser im ER, werden vermehrt *reactive oxygen species* (ROS)-Moleküle gebildet, die eine Entzündungsreaktion induzieren können (Raha und Robinson 2000). Durch die Ansammlung fehlgefalteter Proteine kommt es zum ER-Stress und die ER-Homöostase wird gestört (Rasheva und Domingos 2009). Durch ER-Stress kommt es zur Initiation und Aktivierung spezieller Signalwege in der Zelle. Diese Reaktion wird als UPR bezeichnet. Die Aktivierung der UPR ist mit verschiedenen regulatorischen Mechanismen, einschließlich der Produktion von ROS oder der Freisetzung von Calcium aus dem ER, verbunden. ROS sind kleine Moleküle und Vermittler von Entzündungen, die bei oxidativem Stress akkumulieren (Roy *et al.* 2017). Des Weiteren werden UPR-Sensoren aktiviert. Durch das Regulatorprotein GRP78 identifiziert die Zelle ER-Stress, da GRP78 an die drei Sensoren ATF6, PERK und IRE1 gebunden ist. Die UPR-Sensoren sind deshalb inaktiviert (Austin 2009). Die Aktivierung dieser erfolgt durch die Dissoziation von GRP78. Beim PERK-Signalweg kommt es zum

Translationsstopp. Der Zelle wird in dieser Zeit ermöglicht, die fehlgefalteten Proteine zu verarbeiten. Bleibt dieser Prozess erfolglos, kommt es zur Aktivierung der Apoptose (Harding *et al.* 2002). Die Aktivierung des IRE1-Signalweges führt zur Expression von Faktoren, die zur Degradierung fehlgefalteter Proteine notwendig sind (Vembar und Brodsky 2008). Der dritte Signalweg, ATF6, ist für die Expressions-Induktion molekularer Chaperone verantwortlich und reguliert diese. ATF6 wird konstitutiv als 90-kDa-Protein synthetisiert, das vor der Aktivierung mit GRP78 in ein 50-kDa-Protein, speziell in ER-gestressten Zellen, umgewandelt wird. Die wesentliche Konsequenz dieser Umwandlung ist die Veränderung der subzellulären Lokalisation von ATF6. 90-kDa-ATF6 ist ein Typ-II-Transmembran-Glykoprotein, welches in das ER über die einzelne Transmembran-Domäne nahe dem Zentrum des Moleküls eingebettet ist, was darauf hindeutet, dass sich der bZIP-haltige N-terminale Bereich auf der cytoplasmatischen Seite befindet. Im Gegensatz dazu ist 50-kDa-ATF6 ein lösliches nukleäres Protein (Yoshida *et al.* 1998).

1.1.3.2.1 Der ATF6-Signalweg

Der Transkriptionsfaktor ATF6, bestehend aus zwei Transmembran-bZIP-Domänen, wird in einem Komplex mit GRP78 gehalten. Die beiden Isoformen von ATF6 sind zum einen für die Genexpression von Chaperonen verantwortlich und zum anderen für die Aktivierung von *X-box Binding Protein 1* (XBP1). Diese Aktivierung führt zur Expression von Proteinen, die bei der ER-assoziierten Degradation eine wesentliche Rolle spielen (Yoshida *et al.* 2000). ER-Stress und die damit verbundene Dissoziation von GRP78 führt zu einer Translokation von ATF6 zum Golgi-Apparat. Dort wird ATF6 proteolytisch von den Proteasen *Sphingosine-1-phosphate Phosphohydrolase* (S1P) und *Sphingosine-2-phosphate Phosphohydrolase* (S2P) in seine aktive Form gespalten. ATF6 transloziert in den Zellkern und bindet an Promotoren von UPR-induzierbaren Genen, wie z.B. GRP78 und XBP1 (Lee *et al.* 2002). Interessanterweise führt gespaltenes ATF6 und die aktive Form von XBP1 auf parallelen Signalwegen zu der Induktion der Genexpression für Chaperone und Proteine, welche die Proteinfaltung fördern (Yamamoto *et al.* 2007).

1.1.3.2.2 Der IRE1-Signalweg

Der IRE1-Signalweg führt zur Expression der Degradierungsfaktoren. IRE-1 ist ein Transmembranprotein mit Proteinkinaseaktivität, lokalisiert im ER, dessen Aktivierung einerseits durch die Dissoziation von GRP78 und andererseits durch die direkte Bindung von fehlgefalteten Proteinen erfolgt. Beide Aktivierungsmodelle, die zur Autophosphorylierung führen, werden in der Literatur aufgeführt (Korennykh und Walter 2012). Phosphoryliertes IRE1 induziert das Spleißen von *XBP1-mRNA*. Das gespleißte XBP1-Protein (XBP1s) transloziert zum Kern und kontrolliert die Transkription von ER-residenten Chaperonen und Genen, die an der Lipogenese und dem ER-assoziierten Abbau beteiligt sind (*Endoplasmic-Reticulum-Associated Protein Degradation (ERAD)*) (Lazar *et al.* 2012).

1.1.3.2.3 Der PERK-Signalweg

PERK besitzt ebenfalls eine Kinase-Aktivität., die über Dimerisierung und Transautophosphorylierung von PERK induziert wird. Dies führt zur Phosphorylierung der *alpha*-Untereinheit des eukaryotischen Initiierungsfaktors (eIF2) und einer Schwächung der Gesamt-Translation von Proteinen. Ausgewählte *mRNAs*, wie die *ATF4-mRNA*, werden bevorzugt in Gegenwart von phosphoryliertem eIF2 α translatiert (Zhang und Kaufman 2008). ATF4 transloziert in den Zellkern und induziert die Transkription vieler Gene, die für die ER-Qualitätskontrolle erforderlich sind. Die Zelle wird vor Proteinüberlastung und oxidativem Stress geschützt (Shi *et al.* 1998).

1.1.3.2.4 Der IP3R-Signalweg

Der IP3R (Inositol-1,4,5-Trisphosphat-Rezeptor) spielt eine zentrale Rolle in den Calciumionen-Signalwegen des ER während der Initiation der UPR. Darüber hinaus kann die IP3R-Aktivierung durch die UPR selbst gesteuert und die Funktion von IP3R-modulierten Proteinen (z.B. GRP78 und *Endoplasmic Resident Protein 44 (ERp44)*) beeinflusst werden. Kommt es zu Änderungen der

Calciumionenkonzentration im ER, was zu ER-Stress und UPR führt, kann die Zelle die Aktivierung von Apoptose induzieren (Bultynck und Krebs 2014). Während ER-Stress kann GRP78 auch von anderen Bindungspartnern wie IP3R rekrutiert werden, was zur Aktivitätsveränderungen von IP3R führen kann. Dies kann sich darin äußern, dass die Dissoziation von GRP78 die Interaktion mit ERp44 bewirkt (Higo *et al.* 2010). Aus diesem Grund kann IP3R als vierter UPR-Sensor angesehen werden. (Kiviluoto *et al.* 2013).

Die Phosphorylierung von IP3R durch die Proteinkinase C (PKC) reguliert dessen Aktivierung (Arguin *et al.* 2007). Die Calciumionenkonzentration im ER befindet sich in einem dynamischen Gleichgewicht und ist das Resultat der Interaktion von Proteinen im ER. Aufgrund von ER-Stress kann es zu einer Verschiebung des Gleichgewichts kommen. Liegt eine Erschöpfung des intrazellulären Calciumspeichers vor, kommt es zu einer Verminderung der IP3R-Sensitivität (Tateishi *et al.* 2005; Finch *et al.* 1991). Beispielsweise kann eine geringe Abnahme der Konzentration für das Überleben der Zellen von Vorteil sein. Es werden weniger Ionen auf die Mitochondrien übertragen, wodurch eine mitochondriale Calciumionenlast mit anschließender Apoptose vermieden wird (Scorrano *et al.* 2003). Die Dissoziation von GRP78 führt zur Stabilisierung der IP3R-Aktivität und zur anhaltenden ATP-Produktion durch Mitochondrien. ATP ist ein relevanter Co-Faktor für Chaperone. Durch die ATP-Stimulation z.B. hemmt das Chaperon ERp44 die Aktivität von IP3R und ist somit von der Calciumkonzentration abhängig. ERp44 ist ein Chaperon und gehört zur Familie der Proteindisulfid-Isomerase im ER. Die Aktivierung von IP3R führt einerseits zur Wiederherstellung der ER-Homöostase und weist andererseits proapoptotische Effektormechanismen auf (Cárdenas *et al.* 2010; Higo *et al.* 2010). Viren können die Calciumionen-Signalwege positiv für die virale Replikation modulieren (Chami *et al.* 2006). In Studien konnte gezeigt werden, dass das HBV HBx-Protein die cytosolische Calciumionenkonzentration moduliert, um die HBV-Replikation in einigen Leberzelllinien zu stimulieren (Bouchard und Navas-Martin 2011). HBx erhöht das cytosolische Calciumionen-Level in Hepatozyten nach einer IP3R-verknüpften Calciumionen-Antwort (Casciano *et al.* 2017).

Mitochondrien und das ER haben unterschiedliche Aufgaben im zellulären Metabolismus. Dennoch treten sie physikalisch durch sog. Mitochondrien-assoziierte ER-Membranen (*mitochondrial associated membranes (MAMs)*) in

Wechselwirkung, die für den Calcium- und Lipidhaushalt unerlässlich sind. Diese Interaktion ermöglicht eine präzise Steuerung des Calciumaustausches. ER-Stress kann zu einer mitochondrialen Calciumüberladung und erhöhtem oxidativen Stress führen. IP3R ist ein *MAM*-spezifischer Rezeptor und sorgt für ein dynamisches Ionengleichgewicht (Arruda *et al.* 2014; Decuypere *et al.* 2011).

1.1.4 Die Akute-Phase-Reaktion

Ein wesentliches Merkmal der Akute-Phase-Reaktion (APR) ist die rasche Zunahme an Plasmaproteinen, bekannt als Akute-Phase-(AP)-Proteine. Sie werden ausschließlich in der Leber synthetisiert und sind meist glykosyliert. AP-Proteine dienen nach Infektion oder Entzündung zur Wiederherstellung der zellulären Homöostase (Kushner 1982). Dazu zählt u.a. Lipocalin (LCN2). Die Lipocalin-Familie stellt eine Gruppe von kleinen extrazellulären Proteinen dar, die durch verschiedene molekulare Eigenschaften wie z.B. die Bindung an spezielle Zelloberflächenrezeptoren gekennzeichnet sind (Flower 1996). Außerdem ist LCN2 auch ein AP-Protein, das durch Verletzung, Infektion oder andere entzündliche Reize induziert werden kann (Nilsen-Hamilton *et al.* 2003). ER-Stress wird durch LCN2 gefördert und hat eine UPR zur Folge. Durch die Aktivierung der UPR-Signalwege wird mitunter der ATF6-Signalweg aktiviert (Wang *et al.* 2017), wodurch wiederum die Expression AP-relevanter Gene (Ye *et al.* 2000) induziert wird. Bei einer APR kommt es zur Ausschüttung von Cytokinen, um als Reaktion des Körpers auf eine Entzündung die unspezifische Immunantwort einzuleiten (Koj 1985). Cytokine und Chemokine regen in der Leber die Produktion von verschiedenen Proteinen an und vermindern damit die Gewebeschädigung (Moshage 1997). Es existieren zwei Typen von AP-Proteinen, Typ I und Typ II. Die Serumamyloide A1 und A2 (SAA1 und SAA2), CRP (C-reaktives Protein) und HP (Haptoglobin) z.B. gehören dem Typ I an und werden u.a. durch IL1- β oder TNF- α induziert. Die Bildung von Typ II-Proteinen, wie z.B. Fibrinogen wird u.a. durch IL-6 gesteuert (Baumann und Gauldie 1994). Die durch Cytokine induzierten Signale werden auf NF κ B-Komplexe übertragen und über den NF κ B-Signalweg weitergegeben, z.B. TNF- α und IL-1 β (Wu *et al.* 2010). Dies entscheidet über das Überleben oder die Apoptose der Zelle (Hoesel

und Schmid 2013). Aktuell belegt eine Studie, dass die kooperativen Effekte des HBV und TNF- α , die Aktivierung von NF κ B *in vitro* verstärken und die Expression von stoffwechselfassoziierten Genen in Hepatozyten hochreguliert werden kann. Der Transkriptionsfaktor *Peroxisome proliferator-activated receptor delta* (PPARD) z.B. ist ein wichtiger Regulator des hepatischen Lipidstoffwechsels, der in Kombination mit HBV und TNF- α hochreguliert wurde (Wu *et al.* 2016a). ER-Stress kann einen Einfluss auf die Aktivierung oder Inhibierung spezifischer Signalwege ausüben (Waris *et al.* 2002). In der vorliegenden Arbeit liegt das Hauptaugenmerk auf dem NF κ B-Signalweg, da dieser durch die synthetische Chaperon-Behandlung beeinflusst wurde.

1.1.5 Pathophysiologische Bedeutung der ER-Stress-Antwort

Das ER mit dem Ubiquitin-Proteasom System und molekularen Chaperonen stellt eine intrazelluläre Qualitätskontrolle für die korrekte Faltung der Proteine dar. Wenn fehlgefaltete Proteine im ER akkumulieren, kommt es aufgrund von ER-Stress und der Induktion von UPR zur Hochregulierung von Chaperonen, die den Faltungsprozess unterstützen. Eine Fehlsteuerung der Protein-Qualitätskontrolle führt zu einer Degradierung des Proteins durch das Proteasom (Rutishauser und Spiess 2002).

Für unterschiedliche Krankheitsbilder (z.B. neurodegenerative Erkrankungen, Tumorerkrankungen, virale Infektionen) ist ER-Stress von immenser Bedeutung in Bezug auf die Pathogenese (Kim *et al.* 2008). Speichererkrankungen werden durch die intrazelluläre Ansammlung von endogenen Verbindungen verursacht, die direkt oder indirekt die zelluläre Funktion beeinträchtigt und bis zur Apoptose führen kann. ER-betreffende Speichererkrankungen sind charakterisiert durch die Anhäufung der Proteine, die Defekte in ihrer Biosynthese aufzeigen (Kim und Arvan 1998). Beispielsweise ist der *Alpha-1-Antitrypsin-Mangel* eine autosomal-rezessive Erbkrankheit, bei welcher aufgrund eines Gendefekts Leberzellen das Enzym *Alpha-1-Antitrypsin* fehlerhaft oder in zu geringer Menge bilden oder freisetzen. Da das Protein zu über 90 % in der Leber synthetisiert wird, kann dies u.a. ein Grund dafür sein, dass hepatische Symptome bei Auftreten der Erkrankung zu beobachten sind.

Die Cystische Fibrose gehört ebenfalls zu den Speichererkrankungen und ist eine vererbte Stoffwechselkrankheit. Die Ursache ist die Veränderung eines Gens auf dem sog. *Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator*-Gen (*CFTR*), welches für einen Chloridionen-Transportkanal kodiert. Bei der Cystischen Fibrose ist dieser Kanal defekt oder nicht vorhanden mit daraus resultierenden zähflüssigen Drüsensekreten, die nur schwer aus dem Körper ausgeschieden werden können. Komplikationen dieser Erkrankung können durch erhöhte Konsistenz der Gallenflüssigkeit zu Gallensteinen führen und Entzündungen der Leber bis hin zur Leberzirrhose verursachen (Pasyk und Foskett 1995).

Bei viralen Erkrankungen wird ER-Stress durch die viralen Proteine erzeugt. Die Replikation des Virus wird durch spezielle Mechanismen begünstigt, u.a. ist die Hemmung der ER-Stress-induzierten Apoptose ein primäres Ziel (Pasqual *et al.* 2011). Die Hepatozyten des Leberparenchyms besitzen ein stark ausgeprägtes ER, da ihr Metabolismus eine hohe Aktivität aufgrund sekretorischer Aufgaben aufweist. Eine große Anzahl hepatischer Erkrankungen ist auf ER-Stress zurückzuführen. Das in dieser Studie verwendete HBs-transgene Maus-Modell zeigt durch die Überexpression des großen Oberflächenproteins LHB eine Ansammlung des Proteins im ER. Demzufolge wird ER-Stress ausgelöst. Durch die fehlende Immunreaktion der HBs-transgenen Mäuse werden die Leberparenchymschäden unmittelbar dem Virus zugeordnet (Churin *et al.* 2014). Eine chronische HBV-Infektion kann durch onkogene Funktionen viraler Proteine und durch stetigen ER-Stress sowie oxidativen Stress eine Karzinogenese begünstigen (Arai *et al.* 2006).

Für den Erfolg einer effektiven Therapie ist es von großer Bedeutung, die Signalwege zwischen ER-Stress, UPR und der Entzündungsreaktion zu verstehen. Studien weisen darauf hin, dass die Erhaltung und die Funktion des ER ein relevanter Faktor in der Wiederherstellung der zellulären Homöostase darstellen. Die Modulation der UPR als primärer Indikator ist dabei besonders zu beachten, da sowohl ER-Stress als auch UPR-Aktivierung in vielen verschiedenen menschlichen Krebsarten dokumentiert sind und die UPR als Signalgeber für eine folglich anstehende Apoptose dienen kann (Wang und Kaufman 2014).

1.1.6 Therapeutisches Potential chemischer Chaperone

In Studien konnte *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden, dass die Aktivierung von ER-Stress und UPR durch Phenylbuttersäure (*Phenylbutyric Acid* (PBA)) unterdrückt wurde (Ricobaraza *et al.* 2009). Die Ansammlung viraler Proteine im ER im Falle von HBV kann zu ER-Stress, folglich zur UPR bis hin zur Apoptose führen, was der Zelle großen Schaden zufügt (Wang *et al.* 2006). Bereits im Jahr 1904 beschrieb Franz Knoop zum ersten Mal PBA in seinen biochemischen Experimenten, um den Prozess der β -Oxidation darzustellen (Adler *et al.* 1929). PBA ist eine aromatische Fettsäure, die in der Leber zu Phenylacetat verstoffwechselt wird. Phenylacetat wird sowohl in der Leber als auch in der Niere durch Acetylierung mit Glutamin zu Phenylacetylglutamin konjugiert. Dieses Konjugat ist wasserlöslich und wird über die Nieren ausgeschieden (Wright *et al.* 2011). Mehrere Studien deuten darauf hin, dass PBA die Faltung von Proteinen unterstützt und die Proteinaggregation innerhalb des ER verhindert (Valastyan und Lindquist 2014). PBA bewirkte eine Reduzierung des oxidativen Stresses und der Proteinaggregation bei Proteinspeicherkrankheiten, wodurch folglich eine Verbesserung der Zell-Homöostase beobachtet werden konnte (Kolb *et al.* 2015; Chamcheu *et al.* 2011; Sawada *et al.* 2008). Das Hauptaugenmerk in der vorliegenden Arbeit wurde auf die Wirkung von PBA gesetzt, da in Vorarbeit der Arbeitsgruppe von Frau Univ.-Prof. Roeb eine konsekutive Feinverteilung der schädigenden Proteinaggregate im HBs-transgenen Maus-Modell sowie *in vitro* nachgewiesen werden konnte.

Bei chronischen Lebererkrankungen sind messbare Erfolge durch den Einsatz von PBA eingetreten, weswegen dies ein nützliches therapeutisches Mittel darstellen könnte, um lipid- und stressvermittelten metabolischen Anomalien entgegenzuwirken. Im Fall einer Fettleber (*Steatosis hepatis*) bewirkte PBA die Hemmung von ER-Stress-Markern, wie der Pankreas-eIF2 α -Kinase und c-Jun-N-terminale Kinase (JNK)-Aktivierung. Das führte darüber hinaus dazu, dass PBA den Glukose- und Lipidstoffwechsel positiv regulieren konnte und somit den ER-Stress reduzierte. Es wurde außerdem gezeigt, dass PBA die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase und die TNF- α -Expression reduziert, was darauf hindeutet, dass PBA indirekt die Wege des Glukose- und Lipidstoffwechsels

regulieren könnte, um die Degradierung mit den dafür benötigten Proteinen zu steuern (Rahman *et al.* 2009; Görlach *et al.* 2006).

Auch bei neurodegenerativen Erkrankungen, wie z.B. *Morbus Alzheimer* oder *Morbus Parkinson* erwies sich die Chaperongabe als protektiv (Nemirovsky *et al.* 2011). Neurodegenerative Pathologien entstehen aus der Bildung von Oligomeren oder amyloidogenen Aggregaten mutierter Proteine. Es ist bekannt, dass mutierte und geschädigte zelluläre Polypeptide erste kleine Oligomere mit ausgeprägter Toxizität und dann größeren Polypeptidkomplexen mit fibrillären oder amorphen räumlichen Strukturen bilden. Diese Erkrankungen sind assoziiert mit einer Akkumulation von Proteinaggregaten und der daraus resultierenden funktionellen Störung der Zell-Homöostase (Lazarev *et al.* 2017; Lindholm *et al.* 2006).

Chaperone werden in drei Gruppen eingeteilt: molekulare, pharmakologische und chemische Chaperone. Molekulare Chaperone interagieren mit dem nicht-nativen Zustand der Proteine und sind daher nicht in der endgültigen funktionellen Proteinstruktur vorhanden (Muchowski und Wacker 2005). Sie sind die Hauptkomponenten der intrazellulären Protein-Qualitätskontrolle. Sie besitzen das Potential, Proteine zu stabilisieren und die Proteinfaltung zu erleichtern, ohne selbst Teil der endgültigen funktionellen Proteinstruktur zu werden (Cortez und Sim 2014). Die Überexpression der Hitzeschockproteine stellt z.B. eine wichtige molekulare und intrazelluläre Qualitätskontrolle dar. Pharmakologische Chaperone sind niedermolekulare Verbindungen, die eine Rückfaltung induzieren können und als Enzyme oder Rezeptorliganden zur Strukturstabilisierung dienen (Bernier *et al.* 2004). Chemische Chaperone können in zwei Gruppen unterteilt werden: in Osmolyten und hydrophobe Verbindungen. In einigen Fällen haben sie eine unspezifische Wirkungsweise und können nicht direkt an Proteine binden (Cortez und Sim 2014). Die chemischen Chaperone PBA und Tauroursodeoxycholsäure (*Tauroursodeoxycholic acid* (TUDCA)) z.B. modifizierten die Phosphorylierung der UPR-Sensoren IRE1 und PERK, um die Glukosetoleranz und Insulinsensitivität bei fettleibigen Mäusen zu verbessern (Ozcan *et al.* 2006). TUDCA ist ein Metabolit der Ursodeoxycholsäure und kann die Proteinaggregation durch die Bindung an die hydrophoben Regionen der Proteine verhindern. Dadurch können ungefaltete Proteine stabilisiert werden, die UPR kann aktiviert und zelluläre Abbauege erleichtert werden (Gani *et al.* 2015).

Es existieren keine aktuellen Studien über den therapeutischen Effekt von PBA bei HBV. Das HBV wird aufgrund der persistierenden *cccDNA* nicht vollständig aus der Wirtszelle entfernt. Eine erfolgreiche Behandlung der chronischen HBV ist relevant, um Langzeitfolgen wie der Leberzirrhose und dem HCC vorzubeugen (Nebbia *et al.* 2012). Für die Behandlung der HBV mittels Hemmung der Virusreplikation existiert derzeit u.a. Interferon *alpha* (IFN- α). Diese Therapie ist jedoch mit schwerwiegenden Nebenwirkungen verbunden und deshalb für immunsupprimierte Patienten nicht geeignet. Therapeutisch werden weiterhin Nukleosid- (z.B. Lamivudin) und Nukleotidanaloga (z.B. Tenofovir oder Entecavir) eingesetzt. Entecavir als Nucleosidanalogen wirkt als Hemmstoff für die HBV-Polymerase und ist seit März 2005 für die Behandlung freigegeben. Die deutschen Leitlinien empfehlen weiterhin die Behandlung mit Tenofovir (Cornberg *et al.* 2011).

1.2 Vorarbeit

Ein direkter, intrinsischer Mechanismus der Zellschädigung bei der HBV-Infektion beruht auf der Akkumulation von HBs im ER der Hepatozyten, was zu ER-Stress und Apoptose führen kann (Churin *et al.* 2014). Das synthetische Chaperon PBA bewirkt bei verschiedenen Protein-Aggregationskrankheiten die Auflösung zellschädigender Aggregate (Wiley *et al.* 2011).

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe von Frau Univ.-Prof. Roeb wurde die Wirkungsweise des synthetischen Chaperons PBA im HBs-transgenen Maus-Modell untersucht. Hierbei wurden männliche 12 Wochen alte HBs-transgene Mäuse nach ein- und achtwöchiger PBA-Behandlung analysiert. Die Expression und Verteilung von HBsAg in den Hepatozyten wurde immunhistochemisch untersucht. Verglichen wurde die Proteinexpression von LHB des HBs-transgenen Maus-Lebergewebes mit PBA-behandelten Proben. LHB wurde in HBs-transgenen Mäusen exprimiert und im ER abgelagert. Ein verändertes Expressionsmuster mit konsekutiver Feinverteilung des HBs-Transgens zeigte sich besonders nach einwöchiger PBA-Gabe.

Um einen Überblick über die Regulation der Gene durch PBA zu erhalten, wurden die PBA-behandelten Proben mit denen der HBs-transgenen Mäuse in der

Microarray-Analyse verglichen. Der *Microarray* ist ein molekularbiologisches *Cluster*-Untersuchungssystem, das die Analyse einer großen Anzahl von Genen mit einer geringen Menge an Probenmaterial ermöglicht (Reece *et al.* 2010). Interessanterweise zeigte sich in der *Cluster*-Analyse eine Hochregulation von Genen, die das AP-System betreffen.

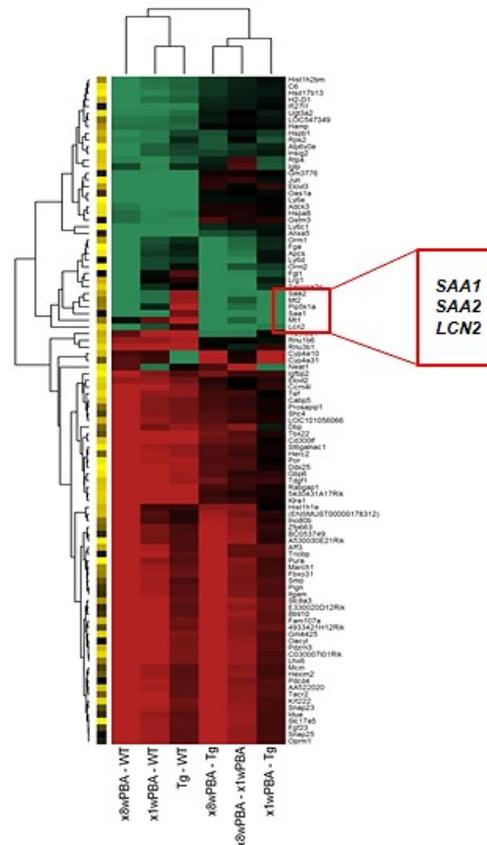


Abbildung 4: Heatmap-Abbildung zur Veranschaulichung des Genexpressionsmusters der *Microarray*-Analyse.

Rote Balken zeigen erhöhte und grüne Balken zeigen eine verminderte Genexpression des getesteten Lebergewebes von HBs-transgenen männlichen 12 Wochen alten Mäusen (Tg). x8wPBA-WT: Vergleich HBs-transgene acht Wochen PBA-behandelte mit Wildtyp Maus (WT); x1wPBA-WT: Vergleich HBs-transgene eine Woche PBA-behandelte mit Wildtyp Maus; Tg-WT: Vergleich HBs-transgene mit Wildtyp Maus; x8wPBA-Tg: Vergleich HBs-transgene acht Wochen PBA behandelte mit HBs-transgene Maus; x8wPBA-x1wPBA: Vergleich HBs-transgene acht Wochen PBA-behandelte mit HBs-transgene eine Woche PBA-behandelte Maus; x1wPBA-Tg: Vergleich HBs-transgene eine Woche PBA-behandelte mit HBs-transgene Maus; Serumamyloid A1 (*SAA1*), Serumamyloid A2 (*SAA2*), Lipocalin 2 (*LCN2*) sind untersuchte Gene, die eine veränderte Genexpression zeigen x8wPBA-Tg Maus (n=4), dargestellt im roten Quadrat. Mit Genehmigung von Alica Köppel, die diesen Befund im Rahmen ihrer Promotionsarbeit erhoben hat.

Die dazugehörige Subanalyse lieferte Daten zur oxidativen Proteinfaltung. Dabei konnte beobachtet werden, dass IPR3 (vgl. Kapitel 1.1.3.2.4) durch die PBA-Gabe im HBs-transgenen Maus-Modell moduliert wurde (mit Genehmigung von PD Dr. Martin Roderfeld, Arbeitsgruppe von Frau Univ.-Prof. Roeb).

1.3 Zielsetzung

Im Rahmen des Projektes wurden HBs-transgene Mäuse über einen Zeitraum von einer bzw. acht Wochen mit PBA behandelt. Die Auswirkungen der PBA-Behandlung auf die HBs-Akkumulation und ER-Stress sollten analysiert werden. In Vorarbeit der Arbeitsgruppe von Frau Univ.-Prof. Roeb wurde gezeigt, dass die Behandlung mit dem synthetischen Chaperon PBA zu einer konsekutiven Feinverteilung der intrazellulären HBs-Aggregate führte, was jedoch keine Verringerung der Leberschädigung bewirkte. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass PBA in HBs-transgenen Mäusen eine APR induziert. Mit der vorliegenden Arbeit sollte der verknüpfende molekularbiologische Mechanismus zwischen der Feinverteilung der Proteinaggregate und der Induktion der APR aufgeklärt werden (vgl. Abb. 5).

1. Welchen Einfluss hat die PBA-Behandlung auf die Expression natürlicher Chaperone und wie wirkt sich das Resultat auf ER-Stress und die Aktivierung von UPR aus?
2. Was ist der verknüpfende Mechanismus zwischen der Feinverteilung der Proteinaggregate im HBs-transgenen Maus-Modell und der Induktion der APR?

Im Folgenden (vgl. Abb. 5) ist das Projekt (*Study Design*) schematisch dargestellt:

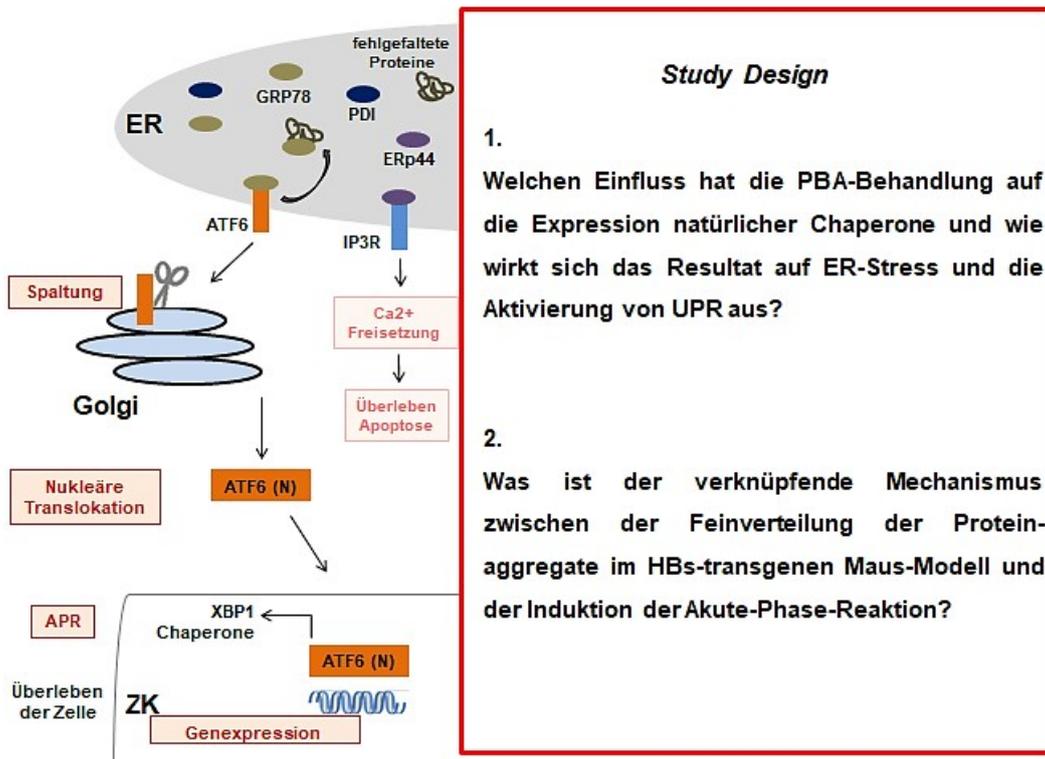


Abbildung 5: *Study Design*.

Die skizzierte Projektdarstellung veranschaulicht die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit schematisch anhand der analysierten Signalkaskade (vgl. Abb.3).

Zu Beginn wurde geprüft, welchen Einfluss die PBA-Behandlung auf die Expression natürlicher Chaperone hat. Dazu wurde das Chaperon GRP78, als erster Effektor auf die Reaktion einer Akkumulation fehlgefalteter Proteine, analysiert. PDI, ein unerlässlicher Faktor zur Proteinfaltung, konnte im Anschluss untersucht werden. Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors ATF6 wurde in diesem Zusammenhang geprüft. ATF6 wirkt im Zellkern als Transkriptionsfaktor, der einen Einfluss auf die Expression natürlicher Chaperone und die Regulation einer APR ausübt (Bravo *et al.* 2013). Aus diesem Grund wurde im nächsten Schritt, die Analyse der APR durchgeführt. Speziell *SAA1* und *SAA2* wurden einer Untersuchung unterzogen. Die Expression dieser zeigte in einer in der Arbeitsgruppe von Frau Univ.-Prof. Roeb durchgeführten *Cluster*-Analyse eine Hochregulation der Mausproben, die mit PBA behandelt wurden. Um die

Induktion der APR nach ATF6-Aktivierung nachweisen zu können, wurde in Zellkultur ein Versuchs-Modell etabliert. PBA induzierte die Expression von ATF6 und dessen aktivierte Form induzierte die Genexpression von *XBP1*. Gespleißtes XBP1-Protein kontrolliert die Transkription von ER-residenten Chaperonen und Genen, die am ER-assoziierten Abbau beteiligt sind.

Im Hinblick auf den Energiestoffwechsel wurde die Analyse nach PBA-Behandlung erarbeitet. Dabei spielten die Proteine IP3R und ERp44 eine wichtige Rolle. Die Abspaltung von GRP78 und IP3R ermöglicht die Interaktion von ERp44 mit IP3R. Dadurch werden die Verbesserung der ER-Homöostase und die korrekte Proteinfaltung begünstigt.

1.4 Projektdarstellung

Die HBs-transgenen Mäuse zeigen eine hepatische Pathologie, die auf zellschädigende Eigenschaften der Oberflächenproteine zurückzuführen sind und eignen sich daher, neue Therapieansätze zur Behandlung der endogenen Schädigung durch HBs zu untersuchen (Meuleman *et al.* 2006). Es existieren keine Studien über den therapeutischen Effekt von PBA bei HBV. Im Maus-Modell wird eine intrazelluläre Aggregation der Oberflächenproteine beobachtet. Auf der Basis dieser Erkenntnisse stellt sich die Frage, ob das Chaperon PBA die hepatische Pathologie im HBs-transgenen Maus-Modell beeinflusst.

Dafür wurde den Mäusen über unterschiedliche Zeiträume PBA über das Trinkwasser appliziert. Bei einem durchschnittlichen Trinkwasserverbrauch von 5,5 ml/ Maus/ d und einer Konzentration von 0,93 g/ L PBA (Molare Masse $M=186$ g/ mol) im Trinkwasser werden so ca. 200 mg/ kg/ d verabreicht (Bachmanov *et al.* 2002). Die Zeitpunkte der Substanzgabe und der Tötungszeitpunkt wurden aus folgenden Gründen gewählt:

Substanzgabe (vgl. Abb. 6):

Um einen direkten Einfluss von PBA auf die pathologische Akkumulation der Proteine in den Hepatozyten untersuchen zu können, wurde die Dauer der Gabe auf eine Woche limitiert. Die längerfristige Gabe über acht Wochen sollte Informationen über das therapeutische Potential des Chaperons aufzeigen.

Alter Versuchsbeginn (vgl. Abb. 6) :

4 Wochen - die Modulation der UPR kann zu einem sehr frühen Zeitpunkt zu Beginn der HBs-Schädigung analysiert werden

11 Wochen - die Untersuchungen beschränken sich hier auf die Entzündung und vor der Manifestation einer signifikanten Fibrose

25 Wochen - Zeitpunkt einer ausgeprägten Fibrose

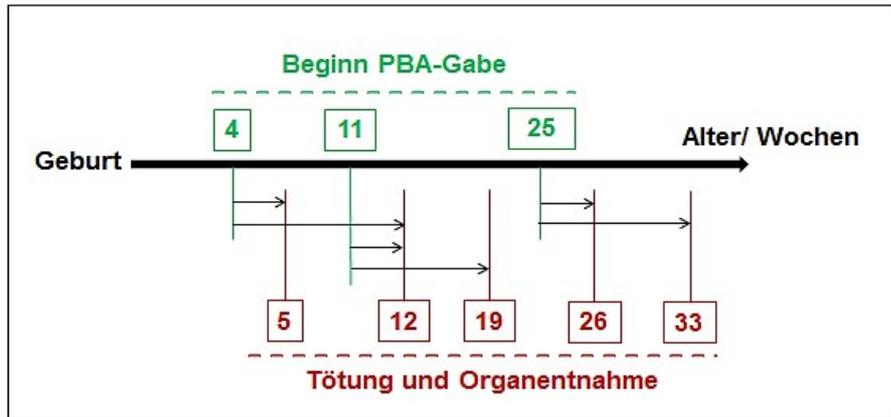


Abbildung 6: Schematische Veranschaulichung der Versuchsdurchführung.

Die grünen Ziffern zeigen das Alter der Mäuse bei PBA-Gabe an und die roten Ziffern das Alter bei Organentnahme. Die dünnen schwarzen Pfeile stellen die Zeiträume der PBA-Behandlung dar.

Im Alter von 5, 12, 19, 26 und 33 Wochen wurden die Mäuse durch Isofluran-Inhalation getötet, und die Leberproben wurden entsprechend der Analyse präpariert und konserviert. In Abbildung 7 ist die Gruppeneinteilung für die Versuche schematisch dargestellt:

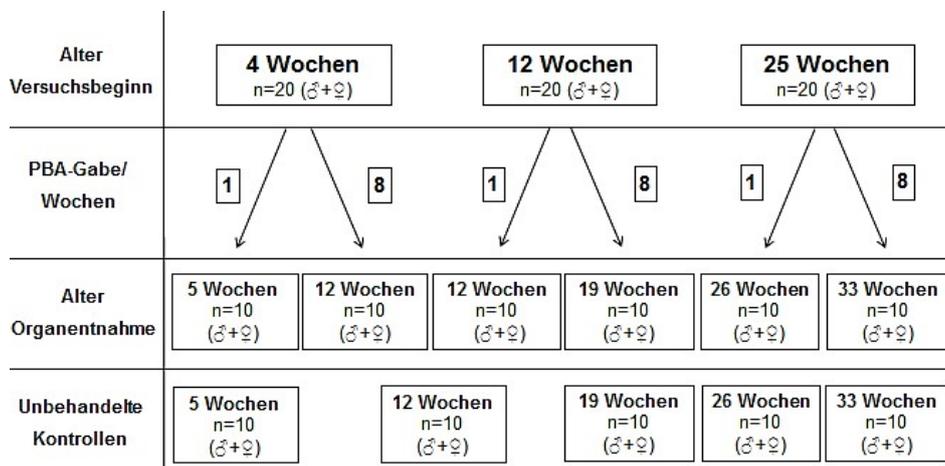


Abbildung 7: Biometrische Gruppeneinteilung des Tierstamms zur Analyse.

Die HBs-transgenen Kontrollen ohne PBA-Behandlung bestehen aus 50 Mäusen. Die Gruppe mit PBA-Gabe setzt sich aus 60 Mäusen zusammen. Pro Geschlecht standen n=10 Mäuse zur Analyse bereit.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit beschriebenen Untersuchungen begrenzten sich auf die männlichen 5, 12 und 19 Wochen alten Mäuse. In einigen Mäusen konnte aufgrund epigenetischer Effekte kein HBsAg nachgewiesen werden (Graumann *et al.* 2015). Aus diesem Grund beschränkte sich die Zahl auf n=3-5 Versuchstiere. Zudem wurde die Kontrollgruppe Wildtyp (WT) als 'Superkontrolle' (ohne PBA-Gabe) zur Untersuchung herangezogen und die erhobenen Daten mit der HBs-transgenen (Tg) und der HBs-transgenen PBA-behandelten Gruppe (eine (1 W PBA) und acht (8 W PBA) Wochen behandelt) verglichen.

Alle durchgeführten Tierversuche unterlagen den geltenden Tierschutz-Richtlinien und wurden vom Regierungspräsidium Gießen im Rahmen des Tierversuchsantrages V54 19c 20-15(1) GI 20/10 Nr. 48/2012/ „Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren“-Versuchsvorhaben: „UPR in HBV“ genehmigt (siehe Tierversuchsantrag anbei).

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

- | | |
|---|--|
| (1) Agarosegelkammer #9938.1 | Fa. Roth, Karlsruhe |
| (2) Analysenwaage Mod. FA #1500-2 | Fa. Sartorius, Göttingen |
| (3) Autoklav 75S | Fa. HP Medizintechnik,
Oberschleißheim |
| (4) <i>Camera Instant System</i> (Polaroid MP4+) | Fa. Decon Science Tec,
Hohengandern |
| (5) Digitalkamera #E5400 | Fa. Nikon, Japan |
| (6) Einbett-Maschine #EG1140H | Fa. Leica, Wetzlar |
| (7) Eismaschine AF-10 | Fa. Scotsman, USA |
| (8) Elektrophoresekammer Multigel
#G44010-230 | Fa. Biometra, Göttingen |
| (9) Elektrophorese Netzgerät #SN78491 | Fa. Fisher Biobloch Scientific,
Illkirch |
| (10) Entwicklungsmaschine AGFA CP1000 | Fa. Tegtmeier, Rinteln |
| (11) Exsikkator UVO 1.5A | Fa. Balzers Union,
Fürstentum Liechtenstein |
| (12) Feinwaage Typ #1801 | Fa. Sartorius, Göttingen |
| (13) Fluoreszenzmikroskop DMRB
+ UV (ebq 100) #DMR13 | Fa. Leica, Wetzlar |
| (14) Gefrierschrank (-80 °C) #907 | Fa. Thermo Scientific, USA |
| (15) Gefrierschrank (-20 °C) #GNP3376 | Fa. Liebherr, Biberach |
| (16) Gefrierschrank (0 °C) PENTAN | Fa. Bosch, Gerlingen-
Schillerhöhe |
| (17) Heizplatte #H1220 | Fa. Leica, Wetzlar |
| (18) Homogenisierer Ultra-Turrax T8
#01.353273 (Netzgerät T8.01-01.364809,
Dispersionswerkzeug #S8N-5G L969000) | Fa. IKA-Werke, Staufen |
| (19) Kühl-Tischzentrifuge <i>MikroSTAR 17R</i>
#521.1647 | Fa. VWR, Darmstadt |

(20) Magnetrührer #RCTB 00.084009	Fa. IKA-Werke, Tuttlingen
(21) Mikrotom #RM2165	Fa. Leica, Wetzlar
(22) Mikrowelle #ART MW 7849	Fa. Severin, Sundern
(23) Phasenkontrastmikroskop DM/ LHC	Fa. Leica, Wetzlar
(24) pH-Messgerät #632/ 5K0234	Fa. Metrohm, Schweiz
(25) Pipetten	Fa. Gilson, USA
(26) Pipettierhilfen Pipetus #81206005	Fa. Hirschmann, Eberstadt
(27) Photometer <i>NanoDrop2000</i>	Fa. Thermo Scientific, USA
(28) Reinstwasseranlage Milli-Q Biocel und Elix 3	Fa. Merck, Darmstadt
(29) Rotator #SB3	Fa. BioCote, England
(30) R-Filmkassette Spezial 200 (18 x 24 cm)	Fa. Rego X-ray, Augsburg
(31) Rüttler #444-0142	Fa. VWR, Darmstadt
(32) <i>Semi-Dry-Fastblot</i> #B44/ 015-200	Fa. Biometra, Göttingen
(33) <i>StepOnePlus/ Real-time PCR</i> #4376592 (<i>Software Vers. 2.2.2</i>)	Fa. Applied Biosystems, USA
(34) Stickstoffbehälter, transportierbar #07/AW/V/26B	Fa. KGW Isotherm, Karlsruhe
(35) Stickstofftank #CFB-160	Fa. Harsco, Husum-Mildstedt
(36) <i>Thermocycler</i> #T3000	Fa. Biometra, Göttingen
(37) Thermomixer #5436	Fa. Eppendorf, Hamburg
(38) Transmissions-Elektronenmikroskop #906 [Digitalkamera: <i>TRS Sharp: Eye Slow-Scan</i> <i>2K CCD camera</i> (TRS; Tröndle, Moorenweis, Deutschland)]	Fa. Zeiss, Oberkochen
(39) Trockenschrank #T12	Fa. Heraeus, Hanau
(40) Ultramikrotom Ultracut E-Reichert #10687558	Fa. Leica, Wetzlar
(41) <i>UV-Transilluminator LAMAG Reprostar 3</i> #022.9620	Fa. Omicron, England
(42) Vortexer #7-2020	Fa. NeoLab, Heidelberg
(43) Wasserbad #H1210	Fa. Leica, Wetzlar
(44) Zellinkubator #IG150	Fa. Jouan, Unterhachingen

(45) Zellkultur-Sterilwerkbank #HBB2448	Fa. Heraeus Instruments, Hanau
(46) Zentrifuge #CR422	Fa. Jouan, Unterhachingen
(47) Zentrifuge #GS-6KR	Fa. Beckman, USA
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	
(48) Aluminiumdosen-Rotilabo #1084.1	Fa. Roth, Karlsruhe
(49) Bechergläser (allg. Glasbehälter, Messzylinder)	Fa. Schott, Mainz
(50) <i>Blotting-Membran Immobilon-P</i> #IPVH00010	Fa. Millipore, Wiesbaden
(51) Deckgläser, rund, Ø12 mm #01-0012/1	Fa. Langenbrinck, Emmendingen
(52) Einbettkassetten Weiß #720-2215E	Fa. VWR, Darmstadt
(53) Entwicklungsfilme Amersham Hyperfilm ECL (18x24 cm) #28906837	Fa. GE Healthcare, England
(54) <i>Gel-Blotting</i> Papier #GB0037026216	Fa. VWR, Darmstadt
(55) Gewebe-Filter Pierce 250 µm	Fa. Thermo Scientific, USA
(56) Gridbox #705525	Fa. Ted Pella, USA
(57) Kupfernetz (Grids) PELCO® #1GC50	Fa. Ted Pella, USA
(58) Kryoröhrchen 2 ml #126263	Fa. Greiner Bio-One, Frickenhausen
(59) Mikrotommesser Ultratrimm/ 45°/ 1mm-s #UT276	Fa. Diatome, Weinheim
(60) Multiwellplatten 6- #657160; 12- #665180; 24-Well #662160	Fa. Greiner Bio-One, Frickenhausen
(61) Objektträger SuperFrost Ultraplus #03.0061	Fa. R. Langenbrinck, Emmendingen
(62) <i>PCR Strips</i> #3418	Fa. Thermo Scientific, USA
(63) Petrischalen Zellkultur 100/ 20mm #664160	Fa. Greiner Bio-One, Frickenhausen
(64) Pipettenspitzen	Fa. Eppendorf, Hamburg

(65) <i>Proteome Profiler Multi-Dish</i> #607544	Fa. R&D Systems, USA
(66) <i>Proteome Profiler Membran</i> #893259	Fa. R&D Systems, USA
(67) Reaktionsgefäße 0,5 ml; 1,5 ml; 2,0 ml	Fa. Eppendorf, Hamburg
(68) Reaktionsgefäße Falcon 15 ml #188261; 50 ml #210270	Fa. Greiner Bio-One, Frickenhausen
(69) RNase-freie Pipettenspitzen mit Filter	Fa. Greiner Bio-One, Frickenhausen
(70) Standard-Objektträger	Fa. Langenbrinck, Emmendingen
(71) Stripetten 2 ml 710180; 5 ml 606180; 10 ml #607180; 25 ml #760180	Fa. Greiner Bio-One, Frickenhausen
(72) Trimmer #TM60	Fa. Reichert, Österreich
(73) Trimm-Messer trim 45	Fa. Diatome, Weinheim
(74) Zellkulturflaschen #658175	Fa. Greiner Bio-One, Frickenhausen
(75) Zellschaber #83.1830	Fa. Sarstedt, Nürnberg

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

(76) 2-Propanol p. A. #33539	Fa. Sigma-Aldrich, München
(77) β -Mercaptoethanol #60242	Fa. Sigma-Aldrich, München
(78) ϵ -Amino-Capronsäure #10466-72-5	Fa. Sigma-Aldrich, München
(79) <i>Acrylamid Rotiphorese</i> Gel30 #3029.1	Fa. Roth, Karlsruhe
(80) Agarose NEEO #2267.1	Fa. Merck, Darmstadt
(81) Ammoniumperoxidsulfat (APS) #7727-54-0	Fa. Roth, Karlsruhe
(82) Bovines Serumalbumin (BSA) #9048-46-8	Fa. Merck, Darmstadt
(83) Bromphenolblau #15375	Fa. Serva, Heidelberg
(84) N-Benzyl dimethylamine (BDMA) #R1062B	Fa. Agar Scientific, England
(85) <i>Complete Mini EDTA-free Protease Inhibitor</i> Cocktail Tabletten #11836170001	Fa. Roche, Schweiz

(86) Citronensäure #1002440500	Fa. Merck, Darmstadt
(87) Dinatriumhydrogenphosphat #10028-24-7	Fa. Roth, Karlsruhe
(88) Dithiothreitol #6908.3	Fa. Roth, Karlsruhe
(89) <i>Dodeceny Succinc Anhydride (DDSA)</i> #R1053	Fa. Agar Scientific, England
(90) Diethyl Pyrocarbonate (<i>DEPC</i>) #1609478	Fa. Merck, Darmstadt
(91) Ethidiumbromid 1 % #2218	Fa. Roth, Karlsruhe
(92) Ethanol 99,9 % p. A. #2246.2500	Fa. Geyer, Renningen
(93) Ethanol 99,9 % vergällt #2522P	Fa. Berkel AHK, Lippstadt
(94) <i>Epoxy Resin Agar</i> #R1031	Fa. Agar Scientific, England
(95) Ficoll 400 # F-2637	Fa. Sigma Aldrich, München
(96) <i>Formaldehyd Load Dye</i> #AM8552	Fa. Thermo Scientific, USA
(97) Formamid #P040.1	Fa. Roth, Karlsruhe
(98) Glutaraldehyd (GDA) #R1011	Fa. Agar Scientific, England
(99) Glycin #3908.2	Fa. Roth, Karlsruhe
(100) Glycerin #1.04093.1000	Fa. Merck, Darmstadt
(101) Hämalaun Sauer nach Mayer #T865.2	Fa. Roth, Karlsruhe
(102) HCl #84422-12	Fa. Sigma-Aldrich, München
(103) HEPES #9105.3	Fa. Roth, Karlsruhe
(104) <i>Horse Serum normal 2,5 %</i> #S-2012	Fa. Vector Lab, USA
(105) Hydrogenperoxid #1.07210.1000	Fa. Merck, Darmstadt
(106) Kaliumchlorid #7447-40-7	Fa. Sigma-Aldrich, München
(107) Kaliumhydrogenphosphat #7778-77-0	Fa. Roth, Karlsruhe
(108) Luminol #A4685	Fa. Sigma-Aldrich, München
(109) Methanol p. A. #32213	Fa. Sigma-Aldrich, München
(110) Methylenblau #159270	Fa. Merck, Darmstadt
(111) Magnesiumchlorid-Lösung (1 M) #M1028	Fa. Sigma-Aldrich, München
(112) Milchpulver #T145.3	Fa. Roth, Karlsruhe
(113) <i>Methyl-Nadic-Anhydride (MNA)</i> #R1083	Fa. Agar Scientific, England
(114) MOPS 99,5 % #M1254	Fa. Sigma-Aldrich, München
(115) Natrium 4-Phenylbutyrat ('PBA') #SRP01502s	Fa. Sequoia, England

(116) Natriumacetat #X891.1	Fa. Roth, Karlsruhe
(117) Natriumchlorid #7647-14-5	Fa. Sigma-Aldrich, München
(118) Natriumhydroxid #6771.1	Fa. Roth, Karlsruhe
(119) Osmiumtetroxid #0223B	Fa. Polysciences, USA
(120) Paraformaldehyd-Lösung 37 % #1.03999.1000	Fa. Merck, Darmstadt
(121) para-Hydroxycoumarinsäure #C9008	Fa. Sigma-Aldrich, München
(122) Pertex Eindeckmedium #UN1866	Fa. Medite, Bergdorf
(123) PhosSTOP Phosphatase-InhibitorTabletten #04906845001	Fa. Roche, Schweiz
(124) Proteinlängenmarker für <i>Western Blot</i> #26620	Fa. Thermo Scientific, USA
(125) Propylenoxid #1.12492.1000	Fa. Merck, Darmstadt
(126) Sodiumdodecylsulfat (SDS) #20765.03	Fa. Serva, Heidelberg
(127) Streptavidin-HRP (<i>high sensitivity</i>) #21130	Fa. Thermo Scientific, USA
(128) Tetramethylethyldiamin (Temed) #110-18-9	Fa. Roth, Karlsruhe
(129) Trinatrium-Dihydrat #6132-04-3	Fa. Merck, Darmstadt
(130) Tris #4855.2	Fa. Roth, Karlsruhe
(131) Tris <i>base</i> #77-86-1	Fa. Sigma-Aldrich, München
(132) Triton-X-100 #9002-93-1	Fa. Sigma-Aldrich, München
(133) Tween20 #P7949	Fa. Sigma-Aldrich, München
(134) Uranylacetat Dihydrat #8473.0025	Fa. Merck, Darmstadt
(135) Xylene #28975.325	Fa. VWR, Darmstadt
(136) Xylene Cyanol #X4126	Fa. Sigma Aldrich, München

2.1.4 Puffer und Lösungen

- (137) 10x PBS: 80 g NaCl (117) (=1,37 M); 2 g KCl (106) (=27 mM); 2,45 g KH₂PO₄ (107) (=18 mM); 11,5 g Na₂HPO₄ (87) (=81 mM); in ca. 900 ml *Aqua* bidest. auflösen; pH-Wert auf 7,4 mit 1 M HCl (102) einstellen; ad 1 L *Aqua* bidest.

- (138) TBS-T: 20 mM Tris pH 7,5 (130); 137 mM NaCl (117); 1 ml Tween20 (133); ad 1 L *Aqua bidest.*
- (139) 10x Elektrophorese-Laufpuffer (SDS-PAGE):
10 g SDS (126) (=0,035 M); 30,3 g Tris base (131) (=0,25 M); 144 g Glycin (99) (=1,92 M); ad 1 L *Aqua bidest.* (pH 8,3)
- (140) 1x Zell-Lysepuffer (Western Blot):
1 % SDS (126); je eine Tablette *Complete Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail* (85) und PhosSTOP Phosphatase-Inhibitor (123)/
10 ml
- (141) 4x Tris-HCl/ SDS pH 6,8 (SDS-PAGE):
6,05 g Tris base (131) (= 0,5 M) in 40 ml *Aqua bidest.* lösen; mit 1 M HCl (102) auf pH 6,8 bringen; ad 100 ml *Aqua bidest.*; Lösung filtrieren (0,45 µm); 0,4 g SDS (126) (=0,4 %) zufügen
- (142) 4x Lämmli-Puffer (SDS-PAGE):
7 ml 4x Tris-HCl/ SDS (141), pH 6,8; 3,8 g (~3 ml) Glycerin (100); 1 g SDS (126) (=10 %); 0,93 g DTT (88) (=0,6 M); 1,2 mg Bromphenolblau (83); β-Mercaptoethanol (77) (20 % v/v); ad 10 ml *Aqua bidest.*
- (143) SDS-PAGE Trenngel-Lösung (10 %/ 2 Gele):
6,6 ml Acrylamid-Lösung (79); 5 ml 4x Trenngel-Puffer; ad 20 ml *Aqua bidest.*; direkt vor dem Gießen 200 µl Ammoniumpersulfat (15 % APS (81)) und 20 µl TEMED (128) zufügen

- (144) SDS-PAGE Sammelgel-Lösung (10 %/ 2 Gele):
0,66 ml Acrylamid-Lösung (79); 1,66 ml 4x
Sammelgelpuffer; 4,26 ml *Aqua bidest.*; direkt vor dem
Gießen 80 µl Ammoniumpersulfat (15 %) APS (81)) und 8
µl TEMED (128) zufügen
- (145) 4x Trenngel-Puffer pH 8,8 (SDS-PAGE):
375 ml 2 M Tris/ HCl (141); pH 8,8 (=1,5 M); 10 ml 20 %
SDS (126) (=0,4 %); ad 500 ml *Aqua bidest.*
- (146) 4x Sammelgel-Puffer pH 6,8 (SDS-PAGE):
125 ml 2 M Tris/ HCl (141), pH 6,8 (=0,5 M); 10 ml 20 %
SDS (126) (=0,4 %); ad 500 ml *Aqua bidest.*
- (147) Anode 1-Puffer (*Semi-Dry-Blotting*):
75 ml 2 M Tris base (=0,3 mM); 100 ml Methanol (109)
(=20 %); ad 500 ml *Aqua bidest.* (pH 10,4)
- (148) Anode 2-Puffer (*Semi-Dry-Blotting*):
6,25 ml 2 M Tris base (=25 mM); 100 ml Methanol (109)
(=20 %); ad 500 ml *Aqua bidest.* (pH 10,4)
- (149) Kathoden-Puffer (*Semi-Dry-Blotting*):
2,63 g ε-Amino-Capronsäure (78) (=40 mM);
100 ml Methanol (109) (= 20 %); 250 µl 20 % SDS (126)
(=0,01 %); ad 500 ml *Aqua bidest.* (pH 7,6)
- (150) ECL-Entwicklungslösung A:
200 ml 0,1 M Tris-HCl (141) (pH 8,6); 50 mg
Luminol (108)
- (151) ECL-Entwicklungslösung B:
11 mg para-Hydroxycoumarinsäure (121) in
10 ml DMSO (173) lösen

(152) 1 % PFA-Lösung für 1 L:

27 ml 37 % PFA-Lösung (120) in 973 ml

Aqua bidest. lösen

(153) 25 % PFA-Lösung für 1 L (EM):

675 ml 37 % PFA-Lösung (120) in 225 ml *Aqua* bidest.

lösen

(154) Fixierungslösung für 1 L (EM):

500 ml HEPES (103) 0,3 M; 60 ml 25 % GDA (98); 60 ml

25 % PFA (153) auf 900 ml *Aqua* bidest. auffüllen; pH-

Wert auf 7,35 mit 1 M HCl (102) einstellen; ad 1 L *Aqua*

bidest.

(155) Epoxy Resin Agar Ansatz (EM):

Epoxy Resin (94) 48 g; *DDSA* (89) 32 g ca. 20 Min.

mischen bei RT; *MNA* (113) 20 g; vor Verarbeitung

Gemisch auftauen bei RT und 0,3 g *BDMA* (84) dazugeben;

20 Min. rühren

(156) Citrat-Puffer: Stammlösung A-21,01 g Citronensäure 0,1 M (86); ad 1 L

Aqua bidest.; pH=2,1; Stammlösung B-29,41 g

Trinatriumcitrat-Dihydrat 0,1 M (129); ad 1 L *Aqua* bidest.;

pH=8,4; Gebrauchslösung-9 ml Stammlösung A; 41 ml

Stammlösung B; ad 500 ml *Aqua* bidest.; pH=6,0

(157) Natriumacetat-Puffer:

1,36 g Natriumacetat (116); *Aqua* bidest.; auf pH=4,2

stellen

(158) RNA-Gel:

1,2 g Agarose (80); 123,75 ml *Aqua* bidest., 15 ml 10x

MOPS (159)

(159) 10x MOPS: 41,8 g MOPS (114); 6,8 g Natriumacetat (116) mit *DEPC*-Wasser (160) auf 1 L mit *Aqua bidest.* auffüllen; pH 7,0

(160) DEPC-Wasser: 1ml *DEPC* (90), 999 ml *Aqua bidest.* über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubieren; danach autoklavieren

(161) 2x RNA-Lade-Puffer:

800 µl 10x MOPS (159); 1330 µl 6x Puffer RT (162);
1600 µl Paraformaldehyd (120); 4000 µl Formamid
(97); 50 µl Ethidiumbromid (91); 250 µl *DEPC*-
Wasser (160) auf 10 ml mit *Aqua bidest.* auffüllen

(162) 6x Puffer-RT: 25 mg Bromphenolblau (83); 25 mg *Xylene Cyanol* (136);
1,5 g Ficoll 400 (95) mit *Aqua bidest.* auf 10 ml auffüllen

2.1.5 Antikörper

(163)

Primärantikörper	Herkunft
<i>rabbit anti-ATF6</i> (H-280) #sc-22799	Fa. Santa Cruz, USA
<i>mouse anti-β-Actin</i> (C-4) #sc-47778	Fa. Santa Cruz, USA
<i>rabbit anti-ERp44</i> #3798	Fa. Cell Signaling, USA
<i>goat anti-GRP78</i> (N-20) #sc-1050	Fa. Santa Cruz, USA
<i>goat anti-HNF4α</i> (C-19) #sc-6556	Fa. Santa Cruz, USA
<i>rabbit anti-IP3R</i> #PA1-901	Fa. Thermo Scientific, USA
<i>mouse anti-LHB</i> (MA18/07)	Med. Virologie, AG Glebe, Justus-Liebig-Universität Gießen
<i>rabbit anti-PDI</i> (C81H6) #3501	Fa. Cell Signaling, USA

Tabelle 1: Auflistung der in der Arbeit verwendeten Primärantikörper.

(164)

Sekundärantikörper	Herkunft
anti <i>mouse</i> IgG HRP #2031	Fa. Cell Signaling, USA
anti <i>rabbit</i> IgG HRP #2054	Fa. Cell Signaling, USA
anti <i>goat</i> IgG HRP #sc-2020	Fa. Santa Cruz, USA

Tabelle 2: Auflistung der in der Arbeit verwendeten Sekundärantikörper.

HRP - Horseradish Peroxidase.

(165)

Antikörper	Herkunft
<i>ChromPure</i> goat IgG #005-000-003 10 mg/ ml	Fa. Jackson Immuno Research, UK
<i>ChromPure</i> mouse IgG #015-000-003 11,2 mg/ ml	Fa. Jackson Immuno Research, UK
<i>ChromPure</i> rabbit IgG #011-000-003 11,2 mg/ ml	Fa. Jackson Immuno Research, UK

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Isotypkontrollen.

2.1.6 Kommerzielle Kits

<u>(166) Cytokin- und Chemokinanalyse</u>	
<i>Proteome Profiler, Mouse Cytokine Array Kit, Panel A</i> #ARY006	Fa. R&D Systems, USA
<i>RT² Profiler PCR Array, Human Signal Transduction Pathway Finder</i> #PAHS-014ZC-2	Fa. Qiagen, Hilden
<i>RT² First Strand Kit (12)</i> #330401	Fa. Qiagen, Hilden

<u>(167) Immunhistochemie</u>	
<i>DAB Peroxidase Substrate Kit</i> #SK-4100	Fa. Vector Lab, USA
<i>HighDef red ICH chromogen (AP)</i> #ADI-950-140-0030	Fa. Enzo, Lörrach
<i>ImmPACT SG Peroxidase Substrate Kit</i> #SK-4705	Fa. Vector Lab, USA
<i>ImmPRESS Reagent AP Kit</i> #MP-5401	Fa. Vector Lab, USA

(167) Immunhistochemie

ImmPRESS Reagent Peroxidase Kit Fa. Vector Lab, USA
#MP-7401 (anti-rabbit), #MP-7402 (anti-mouse), Fa. Vector Lab, USA
#MP-7405 (anti-goat)
M.O.M Kit # PK-2200
VECTOR VIP Peroxidase Substrate Kit Fa. Vector Lab, USA
#Sk-4600

(168) RNA-Isolierung & cDNA-Umschreibung

RNeasy Mini Kit #74104 Fa. Qiagen, Hilden
Turbo DNA-free # AM 1907 Fa. Ambion, USA
iScript cDNA Synthesis Kit #170-8891 Fa. Biorad, USA

(169) Protein-Fraktionierung

Subcellular Protein Fractionation Kit for Tissues Fa. Thermo Scientific, USA
#87790

(170) q-RT PCR

Platinum SYBR-Green qPCR SuperMix-UDG Fa. Invitrogen, USA
#11733-046

2.1.7 Primer

(171)

Gen	Sequenz (5' - 3')	Herkunft
<i>β-Actin for</i>	5'-CAG CTT CTT TGC AGC TCC TT-3'	Fa. Qiagen, Hilden <i>GenBank accession:</i> NM_007393
<i>β-Actin rev</i>	5'-AGT CCT TCT GAC CCA TTC CC-3'	
<i>BIRC3 for</i>	5'-GCC ATT GAC TTT TCT GTC GCC-3'	Fa. Microsynth, Schweiz #2598173
<i>BIRC3 rev</i>	5'-GCA AAG CAA GCC ACT CTG T-3'	Fa. Microsynth, Schweiz #2598174
<i>CPT2 for</i>	5'-CTG GAG CCA GAA GTG TTC CAC-3'	Fa. Microsynth, Schweiz #2598167

<i>CPT2 rev</i>	5'-AGG CAC AAA GCG TAT GAG TCT-3'	Fa. Microsynth, Schweiz #2598168
<i>CRP for</i>	5'-ACG TGA CCA TGG AGA AGC TGT TGT-3'	Fa. Microsynth, Schweiz #2527127
<i>CRP rev</i>	5'-AGG CAC ACA GTG AAG GCT TTG AGA-3'	Fa. Microsynth, Schweiz #2527128
<i>FAS for</i>	5'-AGA TTG TGT GAT GAA GGA CAT GG-3'	Fa. Microsynth, Schweiz #2598165
<i>FAS rev</i>	5'-TGT TGC TGG TGA GTG TGC ATT-3'	Fa. Microsynth, Schweiz #2598166
<i>GAPDH for</i>	5'-GAT GCT GGC GAG TAC GTC G-3'	Fa. Microsynth, Schweiz #2527133
<i>GAPDH rev</i>	5'-GAG GAG ACC ACC TGG TGC TCA G-3'	Fa. Microsynth, Schweiz #2527134
<i>GSR for</i>	5'-TTC CAG AAT ACC AAC GTC AAA GG-3'	Fa. Microsynth, Schweiz #2598163
<i>GSR rev</i>	5'-GTT TTC GGC CAG CAG CTA TTG-3'	Fa. Microsynth, Schweiz #2598164
<i>HEY1 for</i>	5'-CGA GGT GGA GAA GGA GAG TG-3'	Fa. Microsynth, Schweiz #2598171
<i>HEY1 rev</i>	5'-CTG GGT ACC AGC CTT CTC AG-3'	Fa. Microsynth, Schweiz #2598172
<i>HP for</i>	5'-AAA GAA ACC GAA GAG CCC TGT-3'	Fa. Microsynth, Schweiz #2527129
<i>HP rev</i>	5'-TCA GCC ACA GCA CAG CTC TTA TCA-3'	Fa. Microsynth, Schweiz #2527130
<i>ISG56 for</i>	5'-AAG CTT GAG CCT CCT TGG GTT CGT-3'	Fa. Microsynth, Schweiz #2527131
<i>ISG56 rev</i>	5'-TCA AAG TCA GCA GCC AGT CTC AGG-3'	Fa. Microsynth, Schweiz #2527132
<i>LCN2 for</i>	5'-CCA CCT CAG ACC TGA TCC CA-3'	Fa. Microsynth, Schweiz #2527135
<i>LCN2 rev</i>	5'-CCC CTG GAA TTG GTT GTC CTG-3'	Fa. Microsynth, Schweiz #2527136
<i>PPARD for</i>	5'-ACT GAG TTC GCC AAG AGC ATC-3'	Fa. Microsynth, Schweiz #2598155
<i>PPARD rev</i>	5'-ACG CCA TAC TTG AGA AGG GTA A-3'	Fa. Microsynth, Schweiz #2598156
<i>SAA1 for</i>	5'-CAT TTG TTC ACG AGG CTT TCC AAG GG- 3'	Fa. Invitrogen, USA #A0651A04
<i>SAA1 rev</i>	5'-TTC CTG AAA GGC CTC TCT TCC ATC AC-3'	Fa. Invitrogen, USA #A0651A05

<i>SAA2 for</i>	5'-AGC TGG CTG GAA AGA TGG AGA CAA3'	Fa. Invitrogen, USA #A0651A06
<i>SAA2 rev</i>	5'-TGT CCT CTG CCG AAG AAT TCC TGA-3'	Fa. Invitrogen, USA #A0651A07
<i>WNT2B for</i>	5'-ATT TCC CGC TCT GGA GAT TT-3'	Fa. Microsynth, Schweiz #2598157
<i>WNT2B rev</i>	5'-AAG CTG GTG CAA AGG AAA GA-3'	Fa. Microsynth, Schweiz #2598158
<i>XBPIu for</i>	5'-ACA TCT TCC CAT GGA CTC TG-3'	Fa. Microsynth, Schweiz #2533970
<i>XBPIu rev</i>	5'-TAG GTC CTT CTG GGT AGA CC-3'	Fa. Microsynth, Schweiz #2533971
<i>XBPIs for</i>	5'-GAG TCC GCA GCA GGT G-3'	Fa. Microsynth, Schweiz #2533972
<i>XBPIs rev</i>	5'-GTG TCA GAG TCC ATG GGA-3'	Fa. Microsynth, Schweiz #2533973

Tabelle 4: In der Arbeit verwendete Primer. *for* - forward; *rev* - reverse.

2.1.8 Mauslinie und das HBs-transgene Maus-Modell

Zur Erforschung der HBV-Infektion und der daraus entwickelbaren, therapeutischen Anwendung musste ein Tier-Modell ausgewählt werden, welches Aufschluss über die Vorgänge der Immunpathogenese gibt. Aus finanziellen und organisatorischen Gründen bietet sich dafür das Maus-Modell an. Hierüber existieren umfangreiche genetische Informationen. Ziel ist es, eine repräsentative und nachvollziehbare Studie zu bieten, anhand derer die akute und chronische HBV-Infektion erforscht werden kann und die einen Einblick über die Beeinflussung des Immunsystems gewährt (Protzer und Schaller 2000).

Zur Untersuchung an Mäusen wurden deshalb HBV-transgene Mäuse gezüchtet. Diese eignen sich als Modell zur Erforschung von Hepatitis-B aufgrund ihrer erworbenen Toleranz während der Embryonalphase (Guidotti *et al.* 1995; Chisari *et al.* 1985). Aus phänotypisch gesunden Mäusen wurde mit dem Stamm C57BL6J-Tg(Alb1HBV)44Bri/J eine transgene Mauslinie geschaffen. Die injizierten HBV-DNA-Fragmente PräS1, PräS2, S, X sind für die leberspezifische, murine Albuminpromotor-Expression von LHB, MHB, SHB und HBx verantwortlich (Chisari *et al.* 1985). LHB wird in den Hepatozyten der HBs-

transgenen Maus überexprimiert. Durch die Aktivierung spezieller Signalkaskaden kommt es zur gesteigerten Zellproliferation und final zum HCC. Die Anhäufung des LHB im ER führt zur zellulären Strukturveränderung in diesem Organell, die ebenso zur HCC-Entwicklung beiträgt. In den älteren Mäusen entsteht durch die dauerhafte Leberschädigung mit Nekrose, Inflammation sowie Regeneration eine chronische Hepatitis und HCCs (Chisari *et al.* 1986).

Der Mediziner Francis Vincent Chisari beschreibt in seiner 1987 erschienenen Veröffentlichung (Chisari *et al.* 1987) eine HBV-transgene Maus (C57BL/6-Alb1HBV-LHBs), die in unserer Arbeitsgruppe von Frau Univ.-Prof. Roeb in mindestens sechs Generationen auf einen BALB/c-Hintergrund zurückgekreuzt wurde (BALB/c-Tg(Alb1HBV)). Seit 1989 ist dieser transgene Mausstamm auf C57BL/6J-Hintergrund für HBV-induzierte Leberfibrose und -karzinogenese als Mausmodell etabliert (Chisari *et al.* 1989).

Stamm:

BALB/HBV-LHB-transgene Maus auf Stamm BALB/c (durch Arbeitsgruppe von Frau Univ.-Prof. Roeb mindestens über sechs Generationen von C57BL/6J-Tg(Alb1HBV-LHBs)44Bri/J auf BALB/c zurückgekreuzt), Modell für immunsupprimierte chronische HBV

Geschlecht: männlich und weiblich

Alter: 4, 11 und 25 Wochen

Gewicht: zwischen 14 und 30 g

Die Mäuse stammten aus dem zentralen Tierstall der Justus-Liebig-Universität Gießen. Der Tierstall befand sich in der Frankfurter-Straße 105 in 35392 Gießen und die Mäuse wurden unter speziellen pathogenfreien Bedingungen gepflegt.

Alle hier beschriebenen Informationen zur Mauslinie und zum HBV-transgenen Maus-Modell können dem Tierversuchsantrag anbei nachgelesen werden; Geschäftszeichen: V 54 19 c 20 15 h 01GI 20/10 Nr. 48/ 2012/ „Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren“-Versuchsvorhaben: „UPR in HBV“.

2.1.9 Zelllinie und das HBs-transgene Zellkultur-Modell

In dieser Arbeit wurden *in vitro*-Versuche mit einer menschlichen Leberkarzinom-Zelllinie (humane Hepatomzellen/ *Hepato Cellular Carcinoma Cells* (HuH7)) durchgeführt. Die Zellen sind verantwortlich für die Aufrechterhaltung spezieller Funktionen *in vivo*. Sie produzieren leberspezifische Proteine und einige Plasmaproteine. Gewonnen wurden die Zellen aus einem differenzierten hepatozellulären Karzinom eines 57-jährigen männlichen Japaners und dienen der Untersuchung des Wachstums und des Metabolismus humaner Hepatomzellen *in vitro* (Nakabayashi *et al.* 1982).

LHBs/ HBx-transgene HuH7-Zellen wurden mittels Co-Transfektion des klonierten lentiviralen Transfer-Plasmids *pLVX Tight-Puro* plus LHBs/ HBx-Transgenesequenz (besteht aus einem kleinen Cytomegalievirus (CMV)-Promotor (Tokushige *et al.* 1997)) und des lentiviralen Regulator-Plasmids *pLVX Tet-On Advanced* hergestellt und über Doxyzyklin (Dox) gesteuert (Urlinger *et al.* 2000). Eine Expressionsinduktion (*Tet-On-System*: Tetrazyklin-gesteuerte Genregulation) des HBs-Antigens mit Dox (174) erfolgte in stabil transfizierten HuH7-Zellen. Die Konzentration von Dox betrug 2 mg/ ml.

2.1.9.1 Medien und Zusatzstoffe

(172) DMEM-Medium #P04-3609	Fa. PAN-Biotech, Aidenbach
(173) Dimethylsulfoxid (DMSO) #442187178	Fa. Roth, Karlsruhe
(174) Doxyzyklin (Dox) #631311	Fa. Clontech, USA
(175) Fetales Kälberserum (Tetrazyklinfrei) #P30-3602	Fa. PAN-Biotech, Aidenbach
(176) Geneticin (G418) #10131027	Fa. Thermo Scientific, USA
(177) Penicillin/ Streptomycin, 100x #P06-07100	Fa. PAN-Biotech, Aidenbach
(178) Puromycin #0240.3	Fa. Roth, Karlsruhe
(179) Trypsin/ EDTA, Ø Ca/ Mg (10x) #P10-023100	Fa. PAN-Biotech, Aidenbach

2.2 Methoden

2.2.1 Histologische Methoden

Zur Analyse mittels Immunhistochemie (Schmitz *et al.* 2010; Luttmann *et al.* 2004) wurden die Maus-Leberproben in Paraffin eingebettet und bei -80 °C gelagert.

2.2.1.1 Paraffineinbettung und Herstellung der Präparate

Kleine Stücke der Leberproben wurden über Nacht in 1 % Paraformaldehyd (152) gelagert. Danach wurden diese mit PBS gewaschen. Für histologische Fragestellungen wurden diese im Anschluss in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und in Paraffin eingebettet. Nach der Einbettung folgte das Schneiden der Proben am Mikrotom (21). 3-5 µm dünne Schnitte wurden angefertigt. Die Schnitte blieben zur Glättung einen kurzen Moment im Wasserbad (40 °C), wurden danach auf einen Objektträger (61/ 70) aufgenommen und auf der Heizplatte (40 °C) (17) angetrocknet. Im Brutschrank erfolgte die komplette Trocknung bei 37 °C über Nacht. Am folgenden Tag konnten die Präparate bei Raumtemperatur gelagert werden.

2.2.1.2 Immunhistochemie

Die Mikrotom-Schnitte von Maus-Leberproben wurden im ersten Schritt entwässert. Dies erfolgte mittels einer absteigenden Alkoholreihe (135/ 93): Xylol 3x (10-10-5 Min.); Ethanol absolut 99,6 % 1x 5 Min.; Ethanol 96 % 1x 5 Min.; Ethanol 70 % 1x 2 Minuten. Danach wurden die Proben 10 Min. unter fließendem Leitungswasser gewaschen. Die darauffolgende Antigendemaskierung fand 10 Min. bei 750 W in der Mikrowelle (22) in kochendem Citratpuffer statt (156). Der nächste Waschschriff erfolgte 2x 5 Min. in PBS. Zur Blockierung der Peroxidasen wurden die Proben für 15 Min. in einem 7 %igen H₂O₂-PBS-Gemisch unter Schwenken inkubiert und dann 5 Min. gewässert. Folglich passierten die Proben erneut zwei Waschschriffe für 5 Min. in PBS. Um unspezifische Bindungsstellen

der Proben abzusättigen, wurden diese 20 Min. mit 2,5 % *normal horse serum* inkubiert, jeweils auf die einzelnen Antikörper abgestimmt (163). Stammen beide Antikörper aus der Maus, wurde gleichzeitig ein „*mouse-on-mouse*“-Block durchgeführt (167). Die Objektträger wurden danach dekantiert und zweimal für 5 Min. mit PBS gewaschen. Im nächsten Schritt folgte unter ständigem Schwenken die Inkubation des Primärantikörpers bei 4 °C über Nacht. In dieser Arbeit verwendete Primärantikörper wurden wie folgt verdünnt: *goat anti-GRP78-1:100*; *rabbit anti-PDI-1:100*; *rabbit anti-ATF6-1:50*; *rabbit anti-ERp44-1:50*; *mouse anti-LHB-1:100* (Heermann *et al.* 1984). Die 30-minütige Inkubation des entsprechenden Sekundärantikörpers (164) in der Feuchtkammer bei Raumtemperatur erfolgte nach drei 5-minütigen Waschschritten mit PBS. Um zwei Antigene lichtmikroskopisch voneinander unterscheiden zu können, wurden zwei unterschiedliche Substrate (167) für die Färbung der Schnitte genutzt. Die Intensität der Färbung wurde unter dem Mikroskop (23) kontrolliert und in *Aqua bidest.* gestoppt. Der anschließende Waschschrift erfolgte 10 Min. unter fließendem Leitungswasser. Danach erfolgte eine 10-minütige Kerngegenfärbung mit Hämalaun Sauer nach Mayer (101) (Hennenberg *et al.* 2011). Die Kerngegenfärbung wurde mit *Aqua bidest.* abgestoppt. Bei einer Co-Färbung (hier: *rabbit anti-ERp44* und *mouse anti-LHB*) wurde lediglich ein anderes Substrat gewählt, und die Proben wurden zwischen der Inkubation mit den Antikörpern dreimal 5 Min. mit PBS gewaschen. Nach der Kerngegenfärbung wurden die Proben 10 Min. gewässert und durchliefen dann eine aufsteigende Alkoholreihe: Ethanol 96 % 1x 2 Min.; Isopropanol 2x 5 Min.; Xylol 3x 5 Minuten. Die Proben wurden im Anschluss mit Pertex (122) eingedeckt und mit einem Deckglas (51) abgedeckt. Die Mikroskopie erfolgte am Phasenkontrastmikroskop (23).

Die Isotypkontrollen wurden bei jeder Färbung mitgeführt. Diese dienten zum Ausschluss einer unspezifischen Bindung des Primärantikörpers. Verwendet wurde dabei anstatt des Antikörpers ein IgG-Antikörper der gleichen Spezies. Sie durchliefen denselben Analyseweg wie die zu untersuchenden Gewebeproben. Die Isotypkontrollen waren durchweg alle negativ.

2.2.2 Zellkultur

Die Versuche mit humanen Hepatomzellen HuH7 (Nakabayashi *et al.* 1982) erfolgten an einer Sterilwerkbank (45) mit Abzug. Es wurden steril verpackte Einwegmaterialien verwendet. Mehrfach eingesetzte Materialien wurden vor Gebrauch autoklaviert. Alle für die Versuche verwendeten Komponenten wurden vor ihrem Einsatz mit 70 % Ethanol (92) gereinigt. Die Testansätze sind im entsprechenden Analyseabschnitt näher beschrieben (Schmitz 2007).

2.2.2.1 Auftauen und Einfrieren der Zelllinien

Zum Auftauen wurden Kryoröhrchen mit gefrorenen Zellen aus dem Stickstofftank (35) entnommen und sofort im 37 °C warmen Wasserbad (43) geschwenkt. Nach kurzzeitigem Auftauen wurde die Suspension in ein Falcon-Röhrchen (68) überführt und mit DMEM-Medium (172) versehen. Die anschließende Zentrifugation erfolgte bei 1.200 g für 5 Minuten. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen in eine Zellkulturflasche (74) überführt und mit Kultivierungsmedium vermischt. Am folgenden Tag erfolgte ein Mediumwechsel. Zum Einfrieren wurde zur Zellernte das Medium abgesaugt, mit 10 ml PBS (137) gewaschen und anschließend 3-5 Min. für ein leichteres Ablösen mit 2 ml Trypsin/ EDTA (179) im Brutschrank inkubiert. Nach Zugabe desselbigem Volumens an Medium erfolgte eine Zentrifugation bei 1.200 g für 5 Minuten. Anschließend wurde das Pellet nach Resuspendieren in 1,5 ml Einfriermedium aufgenommen. Das Einfriermedium bestand aus DMEM-Medium mit 10 % FCS (175) und 10 % DMSO (173). Die Kryoröhrchen wurden über Nacht in -80 °C (14) gelagert und danach für die Langzeitlagerung im Stickstofftank aufbewahrt.

2.2.2.2 Kultivierung und Passagieren der Zellen

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden in Zellkulturflaschen (74) mit Zellkulturmedium gehalten. Die Kultivierung erfolgte in 15 ml Medium (DMEM-Medium supplementiert mit 10 % FCS) bei 37 °C, 5 % CO₂ Begasung und 95 % Luftfeuchtigkeit. 100 IE/ ml Penicillin und 100 µg/ ml Streptomycin (177) wurde

dem Medium zur Vermeidung einer bakteriellen Kontamination hinzugefügt. Als Selektionsantibiotika wurden 300 µg/ ml Geneticin (G418) (176) und 3 µg/ ml Puromycin (178) hinzugegeben.

Nach drei Tagen erreichten die Zellen eine 80 %ige Konfluenz und konnten mit einer Verdünnung von 1:10 passagiert werden. Dafür musste das Medium abgesaugt werden. Die Zellen wurden einmal mit 10 ml PBS gewaschen und anschließend 3-5 Min. für ein leichteres Ablösen mit 2 ml Trypsin/ EDTA im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden in einem dem Versuchsansatz entsprechenden Volumen an Medium aufgenommen. Die Zellkulturflasche wurde schließlich vorsichtig geschwenkt, um eine gleichmäßige Verteilung zu gewährleisten.

2.2.2.3 Testansätze für *q-RT PCR* und *Western Blot*

Zur Analyse der *mRNA*-Expression spezieller Gene wurden die Tests wie folgt angesetzt (Joppien *et al.* 2011): nach dem Passagieren der Zellen wurden diese mit einer Verdünnung von 1:3 in eine Multiwellplatte (60) überführt. Die Konzentration von Dox zur Induktion von HBs betrug 2 mg/ ml. PBA wurde in einer Konzentration von 2 mM eingesetzt. Die Versuche enthielten folgende Ansätze: Versuchs- und Kontrollgruppen - Dox, + Dox, - Dox/ + PBA, + Dox/ + PBA. Die Versuchs- und Kontrollgruppen sind u.a. in Kapitel 2.2.6 beschrieben.

- Zellen ohne Dox-Induktion (- Dox)
- Zellen mit Dox-Induktion (+ Dox)
- Zellen ohne Dox-Induktion und mit PBA-Gabe (- Dox/ + PBA)
- Zellen mit Dox-Induktion und mit PBA-Gabe (+ Dox/ + PBA)

Nach dreitägiger Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die Zellen lysiert und, wie in 2.2.4.1 beschrieben, isoliert. Die Testansätze für den *Signal Transduction Pathway Finder* waren identisch. Für den *Western Blot* (Towbin *et al.* 1979) wurden die Zellen auf gleiche Weise behandelt und wie in 2.2.3.4 analysiert.

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

In dieser Arbeit wurden Analysen aus Maus-Leberproben und Zellkultur untersucht.

2.2.3.1 Herstellung von Gewebelysaten

20 mg Maus-Lebergewebe wurden unter Stickstoff (34) auf der Feinwaage (12) eingewogen. An das eingewogene Volumen wurde die Menge an 1-fach Lämmli-Puffer mit einer Verdünnung von 1:20 angepasst (Laemmli 1970). Die Proben wurden mit dem Ultra-Turrax auf Eis homogenisiert. Danach wurden sie im Thermomixer bei 95 °C für 10 Min. unter ständigem Rütteln denaturiert. Vor Ansatz des *Western Blots* wurde die Proteinmengenbestimmung zur Kontrolle am Photometer *NanoDrop2000* durchgeführt.

2.2.3.2 Herstellung von Zellysaten

Nach Beendigung des Testverfahrens wurde das Medium in der Multiwellplatte abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Zur Lyse wurde SDS-Lysepuffer (140) hinzugefügt und die Zellen mithilfe eines Zellschabers (75) vorsichtig abgeschabt. Die Homogenisierung erfolgte nach Einfrieren bei -20 °C und Auftauen (15) mit dem Ultra-Turrax (18). Die Proteinmengenbestimmung wurde am Photometer *NanoDrop2000* (27) durchgeführt. Der *NanoDrop2000* ist ein Vollspektrum-UV-Vis-Spektralphotometer zur Quantifizierung von u.a. Proteinen bei einer Wellenlänge von 280 nm. Nach Überprüfung und Anpassung der Proteinmenge wurden die Proben im Anschluss mit 1-fach Lämmli-Puffer (142) versetzt und im Thermomixer (37) bei 95 °C für 10 Min. unter ständigem Rütteln denaturiert.

2.2.3.3 Subzelluläre Protein-Fraktionierung

Das Kit (169) umfasste alle Reagenzien und Gewebesiebe, die für die Zellfraktionierung und Proteinanreicherung aus den verschiedenen zellulären Kompartimenten notwendig waren. Die Proben wurden nach Herstellerempfehlung bearbeitet (Sasaki-Osugi *et al.* 2013). Zunächst mussten 100 mg Maus-Lebergewebe unter Stickstoff auf der Feinwaage eingewogen werden. Mit kaltem PBS und im Kit enthaltenen Proteaseinhibitor (Leung *et al.* 2000) wurden die Proben vorsichtig mit dem Ultra-Turrax auf Eis homogenisiert. Dies hatte eine Membranpermeabilisierung zur Folge und lösliche cytoplasmatische Inhalte wurden freigesetzt. Das Homogenisat wurde auf ein Gewebesieb übertragen, um überschüssige Gewebereste zu entfernen. Im nächsten Schritt wurden die Plasma-, Mitochondrien- und ER-Golgi-Apparat-Membranen aufgelöst. Da die Kernmembran bei diesem Schritt intakt bleibt, erfolgte danach eine Zentrifugation (1.000 g für 5 Min.), die die Auflösung der Kernmembran zur Folge hatte. Eine zusätzliche nukleäre Extraktion wurde mit der Mikrokokken-Nuklease durchgeführt. Dadurch wurden chromatingebundene Proteine freigesetzt. Im letzten Schritt wurde das unlösliche Pellet extrahiert, um Proteine des Cytoskeletts zu isolieren. Für diese Arbeit war die Membranfraktion zur Verifizierung der Kerntranslokation des Transkriptionsfaktors ATF6 relevant. Zur Untersuchung der Proteine erfolgte nach Fraktionierung der Nachweis mit der *Western Blot*-Analyse. Die Proben wurden volumenabhängig im Vorfeld mit 1-fach Lämmli-Puffer versetzt und im Thermomixer bei 95 °C 10 Min. unter ständigem Rütteln denaturiert.

2.2.3.4 *Western Blot*-Analyse

Nach der Proteinisolierung erfolgten die gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine und der Transfer vom Gel auf die Membran mit anschließendem Nachweis durch spezifische Antikörper (Towbin *et al.* 1979).

2.2.3.4.1 Proteinauftrennung durch SDS-PAGE

Die aus dem Probenmaterial isolierten Proteine wurden durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Lämmli aufgetrennt (Smith 1984; Laemmli 1970). Zum Aufbau der Apparatur wurden zwei Glasplatten (8) aufeinandergesetzt und die Trenngel-Lösung (143) ca. 2 cm unterhalb des oberen Glasplattenrandes gegossen. Isopropanol (76) wurde auf die Trenngel-Lösung pipettiert, um die Oberfläche luftblasenfrei polymerisieren zu lassen (30 Min.). Nach der Polymerisation wurde das Isopropanol abgegossen und mit *Aqua bidest.* gespült. Nach Trocknung wurde die Sammelgel-Lösung (144) darauf pipettiert. Um die Auftragstaschen für die Proben zu erhalten, wurde ein Gelkamm eingeführt. Nach 30-minütiger vollständiger Polymerisation wurde die Apparatur (8) mit Elektrophorese-Laufpuffer (139) bis zur Abdeckung der Auftragstaschen befüllt. Das Gel wurde mit den Proben (20 µl Lysat) bestückt und ein farbiger Proteinlängenmarker (124) diente zur Kontrolle. Die Auftrennung erfolgte ca. eine Stunde bei 130 V für zwei Gele. Im Anschluss fand der Proteintransfer statt.

2.2.3.4.2 Proteintransfer auf eine Nitrozellulosemembran

Der Transfer der im Gel aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran (50) erfolgte nach dem Prinzip des *Semi-Dry-Blottings* (Kurien und Scofield 2009). Die Membran musste im Vorfeld für ca. 5 sec in Methanol (109) aktiviert werden. Nach kurzzeitigem Spülen in *Aqua bidest.* wurde die Apparatur (32) aufgebaut. Das Gel-*Blotting*-Papier (54) und das Gel wurden in Transferpuffer äquilibriert (Anode 1, 2 Puffer (147/ 148) und Kathoden-Puffer (149)). Der eigentliche Aufbau des Blotvorgangs geschah wie folgt: Anode · 3x Gel-*Blotting* Papier · PVDF-Membran · Gel · 3x Gel-*Blotting* Papier · Kathode. Der Transfer erfolgte bei 144 mA für zwei Membranen (1 mA/ cm²) für ca. eine Stunde.

2.2.3.4.3 Immunchemischer Nachweis der Proteine

Um unspezifische Bindungsstellen zu blocken, wurde die Membran für eine Stunde in einer Lösung aus 5 % Milchpulver (112) in TBS-T (138) inkubiert.

Danach folgte die Inkubation des Primärantikörpers. Der Primärantikörper wurde wie folgt verdünnt: *rabbit* anti-ATF6 1:500; *mouse* anti- β -Actin 1:1000; *goat* anti-HNF4 α 1:1000; *rabbit* anti-IP3R 1:500. Über Nacht wurde die Membran bei 4 °C unter ständigem Schwenken inkubiert. Nach der Inkubation folgte ein Waschschrift für 10 Min. und zwei Waschschriffe für 5 Min. mit TBS-T. Im Anschluss wurde die Membran mit dem entsprechenden gegen die Spezies des Primärantikörpers gerichteten *HRP*-gekoppelten Sekundärantikörper für 30 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen (1x 10 Min. und 2x 5 Min. mit TBS-T) wurde die Membran mit ECL-Detektionslösung (ECL-Entwicklungslösung A (150) + H₂O₂ (105) + ECL-Entwicklungslösung B (151)) für eine Minute bei Raumtemperatur unter Schwenken inkubiert. Die ECL-Detektionslösung enthielt ein Reagenz, welches zur Anregung von *HRP* diente. Luminol wurde durch die Anregung und Umsetzung von H₂O₂ oxidiert und das dabei emittierte Licht ermöglichte die Detektion des Proteins über Belichtung der Entwicklungsfilme (53). Die Belichtung der Filme hing vom jeweiligen Antikörper ab. Die Membran wurde anschließend in eine Filmkassette (30) gelegt und der Nachweis spezifischer Banden konnte mithilfe der Entwicklungsfilme in einer Dunkelkammer erfolgen. Die Entwicklung der Filme passierte automatisch mit der Entwicklungsmaschine (10) (Joppien *et al.* 2011; Schmitz 2007; Campbell 2000).

2.2.3.5 Proteom *Profiler* (Cytokin- und Chemokinanalyse)

Um Aussagen über extrazelluläre Signalmoleküle treffen zu können, die die Zell-Zell-Kommunikation vermitteln, wurde der membranbasierte *Sandwich-Immunoassay* für die Analyse zur Bestimmung von Cytokinen und Chemokinen gewählt (Yang *et al.* 2009). Alle Reagenzien entsprechen dem Analyse-Kit (65/66/166), und die Proben wurden nach Herstellerempfehlung mit diesen bearbeitet. 15 mg Maus-Lebergewebe wurden unter Stickstoff auf der Feinwaage eingewogen. Mit PBS und einem Protease- und Phosphatase-Inhibitor wurden die Proben mit dem Ultra-Turrax auf Eis homogenisiert. Triton-X-100 (mit PBS) wurde mit einer finalen Konzentration von 1 % hinzugefügt. Vor Ansatz des *Arrays* wurde die Proteinmengenbestimmung zur Kontrolle am Photometer

NanoDrop2000 durchgeführt. Die Proben wurden verdünnt und mit einem Cocktail aus biotinylierten Detektions-Antikörpern inkubiert. Es folgte eine Inkubation des Gemisches aus Proben und Detektions-Antikörpern mit der Cytokin- und Chemokin-*Array*-Membran, die im Vorfeld geblockt wurde, um unspezifische Bindungen zu vermeiden. Die Membran wurde danach gewaschen, um ungebundenes Material zu entfernen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit Streptavidin-*HRP* und Nachweisreagenzien für die Chemo-Lumineszenz. Das emittierte Licht der positiven Spots auf der Membran ist proportional der Menge an Cytokin oder Chemokin. Der Nachweis erfolgte mithilfe der Entwicklungsfilm. Die Membran wurde in eine Filmkassette gelegt und die Entwicklung der Filme fand automatisch mit der Entwicklungsmaschine statt. Zur Datenanalyse wurden die positiven Signale auf dem Film mit einer *Array*-Schablone ausgewertet.

2.2.4 Molekularbiologische Methoden

Um eine *q-RT PCR* (*quantitative Real-Time Polymerase-Chain-Reaction*) (Bustin 2000) durchführen zu können, musste im Vorfeld *RNA* aus Maus-Leberproben und Zellkultur gewonnen werden. Im Anschluss erfolgte die Synthese komplementärer *DNA*. Zu beachten war, dass bei jeglichen Arbeitsschritten eine Verunreinigung mit *RNase* so gering wie möglich gehalten werden musste.

2.2.4.1 *RNA*-Isolierung aus Gewebe und Zellen

Bei dieser Methode kam es unter Einsatz eines Größenfilters zur Anreicherung von *mRNA*. Die *RNA* aus Zellen wurde aus drei Tage alten Zellkultur-Ansätzen mittels *RNeasy Mini Kit* (168) nach den Angaben des Herstellers isoliert. Dabei wurden die Überstände abpipettiert und die Zellen in der Zellkulturschale mit 600 μ l RLT-Puffer/ β -Mercaptoethanol-Gemisch lysiert und für 5 Min. auf Eis gestellt. Um *mRNA* aus Gewebe zu isolieren, wurden 20 mg gemörsertes Maus-Lebergewebe unter Stickstoff auf der Feinwaage eingewogen. Die Isolierung erfolgte in diesem Fall ebenfalls nach den Angaben des Herstellers mittels *RNeasy*

Mini Kit. Zum Lysieren des Gewebes wurden die Proben mit 600 µl RLT-Puffer/ β -Mercaptoethanol versetzt und auf Eis mit dem Ultra-Turrax homogenisiert.

Die Homogenisate aus Gewebe und Zellkultur wurden im Folgenden auf die gleiche Art und Weise bearbeitet: im Anschluss wurde das Homogenisat auf eine Schredder-Säule gegeben und bei 14.000 g 2 Min. zentrifugiert. Die Schredder-Säule wurde verworfen und das Lysat wurde mit 600 µl RNase-freiem 70 %igem Ethanol gereinigt. Dabei wurde das Gemisch auf eine *Easyspin*-Säule übertragen und 20 sec bei 8.000 g zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen, 700 µl Waschpuffer wurde dazu pipettiert und erneut zentrifugiert. Das Auffanggefäß wurde gewechselt und der Waschvorgang wiederholt, um sicherzustellen, dass Ethanol die anschließende Elution nicht stört. Die Säulen wurden in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß (67) überführt und die Membran mit 40 µl RNase-freiem Wasser benetzt. Die Elution erfolgte nach einer Inkubation von 5 Min. und der anschließenden Zentrifugation von 8.000 g für eine Minute. Zur Inaktivierung von DNasen wurde nach Herstellerangaben das *Turbo DNA-free Kit* verwendet. 40 µl der eluierten *RNA* wurden mit 4 µl 10x DNase Turbo Puffer sowie 1 µl Turbo DNase versetzt und für 30 Min. bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 4,5 µl *DNase Inactivation Reagent* und 1 µl RNase freiem Wasser und eine 5-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Nach der Zentrifugation bei 10.000 g für 90 sec wurde die gewonnene *RNA* in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

Nach der Isolierung wurde die Quantifizierung mittels des Photometers *NanoDrop2000* durchgeführt, da der Gehalt an *RNA* vor der *cDNA*-Synthese analysiert werden muss. Dabei wurde 1 µl der *RNA* auf das Photometer aufgetragen und die Menge bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Die Gesamtkonzentration konnte wie folgt berechnet werden:

$-x \mu\text{g RNA} / \mu\text{l} = \text{Absorption } 260 \text{ nm} * 40 \text{ (Verdünnungsfaktor)} * 0,04 \text{ (RNA-Faktor)}$.

Zur Kontrolle der Reinheit erfolgte eine erneute Messung bei 280 nm. Bei dieser Wellenlänge absorbieren Proteine Licht. Der Quotient aus der Absorption von 260 nm und 280 nm ergab den Reinheitsgrad (zw. 1,6-2,0).

2.2.4.2 RNA-Agarose Gel

Aus Gewebe und Zellen wurde *mRNA* isoliert. Die isolierte *mRNA* wurde auf Qualität mittels 1,2 %igem Agarose Gels geprüft (Wang *et al.* 2009). Gewonnen wurde dies durch Aufkochen des MOPS-Puffers (1x) (159) mit der entsprechenden Menge an Agarose (80). Die RNasen wurden hierbei durch das enthaltene *DEPC* inaktiviert. Das Gießen in die Gelkammer (1) erfolgte nach Zugabe von Ethidiumbromid. Ethidiumbromid interkaliert in die *RNA* und fluoresziert unter UV-Licht. Nach der Polymerisation wurde die Laufkammer vorbereitet und mit MOPS-Puffer und Proben bestückt. Die Laufzeit betrug ca. 45 Min. bei 65 V. Probenvorbereitung: die Mischung aus 1 μ l *RNA* + 4 μ l *Formaldehyd Load Dye* (96) wurde für 10 Min. bei 65 °C denaturiert.

Die unter UV-Licht sichtbar gemachte Differenzierung der Banden wurde einer Prüfung unterzogen. Dabei wurden die 28S- und 18S-Banden erkennbar (vgl. Abb. 8).

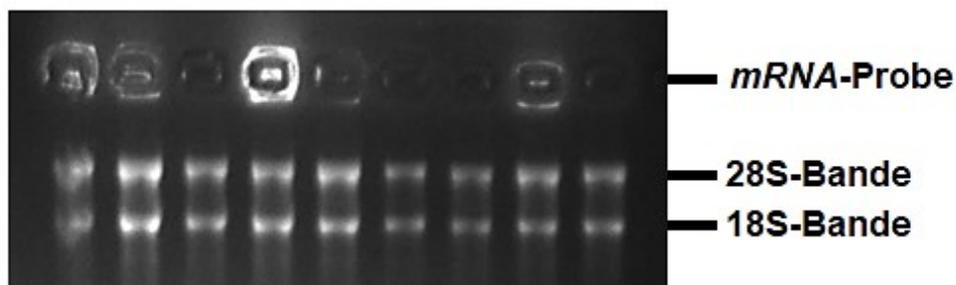


Abbildung 8: Trennung der *mRNA* in eine 28S- und 18S-Bande.

Die Abbildung zeigt die unter UV-Licht mittels Ethidiumbromid sichtbar gemachte Auftrennung der *mRNA* in 28S- und 18S-Untereinheiten auf. Eine Verunreinigung mit *DNA* konnte daher ausgeschlossen werden, weil eine saubere Auftrennung der beiden Banden zu erkennen ist.

2.2.4.3 Synthese komplementärer *DNA*

Die Umschreibung der *mRNA* in komplementäre *DNA* (*complementary DNA* (*cDNA*)) erfolgte nach Herstellerangaben mittels *iScript cDNA Synthesis Kit* (168). Dieser Vorgang ist für die Analyse mit *q-RT PCR* notwendig, weil *RNA* nicht als Grundlage verwendet werden kann. Der Ansatz für eine Probe setzt sich

wie folgt zusammen: 4 μ l 5x *iScript Reaction Mix* + 1 μ l *iScript Reverse Transcriptase* + -x μ l nukleasefreies Wasser + x μ l *mRNA*. Das Gesamtvolumen betrug 20 μ l. 1 μ g *mRNA* wurde eingesetzt und anhand der vorherigen Konzentrationsbestimmung wurde die entsprechende Menge an nukleasefreiem Wasser hinzugefügt. Die Synthese fand im Anschluss im Thermocycler statt. Die Stufen wurden wie folgt eingestellt: 5 Min. 25 °C (Anlagern des Primers an *RNA*), 30 Min. 42 °C (reverse Transkription der *cDNA*), 5 Min. 85 °C (Denaturierung der reversen Transkriptase).

2.2.4.4 Quantitative *Real-Time* Polymerasekettenreaktion

Nach der Durchführung der *q-RT PCR* lässt sich ursprüngliche Menge an *DNA* berechnen, weil nach jedem Zyklus doppelt so viel *DNA* vorliegen muss. Mittels *q-RT PCR* kann ermittelt werden, ob und in welcher Menge ein bestimmter *DNA*-Abschnitt in einer Probe vorhanden ist. Bei dieser Methode kann nach jedem Zyklus die Anzahl der neugebildeten *DNA* erfasst werden. Dabei spricht man von einer Echtzeit (*Real-Time*)-*PCR* (Joppien *et al.* 2011).

2.2.4.4.1 Prinzip

Das Prinzip der *q-RT PCR* basiert auf einer *DNA*-Amplifikation. Erforderlich sind Primer, an welche die Nukleotide angebaut werden und das *Template*, der zu amplifizierende Abschnitt. Die *DNA*-Polymerase ist verantwortlich für die Vervielfältigung und verbindet die einzelnen Bestandteile zu einem langen *DNA*-Molekül. Die *PCR* besteht aus einem Zyklus und drei Teilschritten, die fortlaufend wiederholt werden: *Annealing*, *Elongation* und *Denaturierung*. Dadurch wird eine exponentielle Amplifikation gewährleistet. Bei der Hybridisierung der Primer (*Annealing*) an das *Template* ist die *Annealing*-Temperatur relevant und richtet sich nach der Länge der Primer. In dieser Arbeit betrug diese Temperatur 59 °C. Es folgt die *Elongation* bei 72 °C, die optimale Arbeitstemperatur für die Polymerase. Die bestmögliche *Elongationszeit* ist an die Länge des gewünschten Produktes angepasst, 30 sec-1 Min. für je 500-1.000 Basenpaare. Das neu entstandene *DNA*-Molekül wird im nächsten Schritt getrennt

(Denaturierung bei 95 °C) und eine Anlagerung der Primer wird ermöglicht. Die Quantifizierung der *PCR*-Produkte wird mit dem interkalierenden Farbstoff *SYBR-Green* vorgenommen. Die Zunahme der Fluoreszenz von Zyklus zu Zyklus ist proportional zu der Zunahme der vervielfältigten *DNA*.

2.2.4.4.2 Bedingungen und Auswertung

Der *Mastermix* für die *q-RT PCR* bestand aus 6,3 µl *SYBR-Green/ ROX* (170); 0,25 µl Primer (*forward*); 0,25 µl Primer (*reverse*) (171) und 5,2 µl *Aqua bidest.* 12 µl *Mastermix* wurden mit 0,5 µl *cDNA* auf Eis vermischt. Als Negativkontrolle diente ein Reaktionsansatz ohne *cDNA*. Danach wurden diese kurz an zentrifugiert und in das *PCR*-Gerät *StepOnePlus* eingelegt. Das Programm wurde wie folgt gestartet:

- Denaturierung bei 95 °C für 10 Min. mit einem Zyklus
- *Annealing* bei 95 °C für 10 sec mit 40 Zyklen/ bei 59 °C für 30 sec mit 40 Zyklen
- Elongation bei 72 °C für 10 sec mit einem Zyklus/ 95 °C für eine Min. mit einem Zyklus/bei 55 °C für 30 sec mit einem Zyklus

Für jeden Primer wurde zur Kontrolle eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die darauffolgende Schmelzpunktanalyse mit ihrer entsprechenden Dissoziationskurve diente zur Kontrolle der Primer-Aktivität und ließ auf Vermutungen über Verunreinigungen der Analyse schließen. Zur Freisetzung des Farbstoffes wurde das *PCR*-Produkt auf 95 °C erhitzt, um diese anschließend in 1 °C Schritten zu bestimmen. Die unterschiedlichen Schmelzpunkte der *PCR*-Produkte sind dabei abhängig von der Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen.

Zur Auswertung wurde die *StepOne Software 2.2.2* verwendet. Im Anschluss erfolgte anhand der Berechnung des *Fold Change* mit *Microsoft Excel 2010*, die quantitative Bestimmung der Genexpression. Die errechneten Mittelwerte wurden auf die mRNA-Expression der *housekeeping*-Gene normalisiert (Tricarico *et al.* 2002). Der Primer für *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH)* (17) wurde als Kontrolle humaner Leberzellen und β -*Actin* (171) als Kontrolle der

Maus-Leberproben verwendet. Dabei handelt es sich um *housekeeping*-Gene, wobei es sich um nicht-regulierte Gene handelt, die ein ubiquitäres Vorkommen aufweisen. Das Gen *Hepatocyte Nuclear Factor 4 alpha (HNF4α)* wird nur im Zellkern exprimiert und diente zur Kontrolle der nukleären Translokation des Transkriptionsfaktors ATF6 (Gonzalez 2008). Als Rechenformel diente der delta-delta-Cycle-Threshold (ddCT)-Wert (Livak und Schmittgen 2001):

$$\text{ddCT} = 2^{-[(\text{CT}_{xA} - \text{CT}_{yA}) - (\text{CT}_{xB} - \text{CT}_{yB})]}$$

Dabei steht *x* für das zu untersuchende Gen und *y* für das *housekeeping*-Gen. *A* entspricht dem veränderten Zielgen und *B* der dazugehörigen Kontrolle. CT ist eine theoretische Variable, die den Beginn des exponentiellen Wachstums der Amplifikationskurve in der *q-RT PCR* anzeigt (Pfaffl 2001).

2.2.4.4.3 *Signal Transduction Pathway Finder*

Das *RT² Profiler PCR Array Kit* (166) basiert auf der Grundlage einer *q-RT PCR*. Der Test wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt und ausgewertet. Ein Vorteil des Verfahrens ist die Kombination einer Analyse mittels *RT PCR* und die Fähigkeit der *Microarrays*, die Expression vieler verschiedener Gene parallel detektieren zu können. Die Untersuchung erfolgte in einer 96-Well Platte, die mit spezifischen Primern (*Primer-Assay*) und fünf *housekeeping*-Genen ausgestattet waren. Als weitere Kontrollen waren angegeben die *DNA*- und reverse Transkriptionskontrolle sowie drei positive *PCR*-Kontrollen. Jede, mit einem *Primer-Assay* bestückte Vertiefung der Platte war mit einem inerten Farbstoff kombiniert. Der Farbstoff diente der Qualitätskontrolle.

Die Testung begann mit der Umschreibung der zu testenden *mRNA* (1 µg) in *cDNA*. Dafür wurde das zugehörige Kit nach Herstellerangaben verwendet. Im Anschluss folgte die Herstellung des *Mastermixes: cDNA + RT² SYBR-Green*. Der *Mastermix* wurde in die Vertiefungen der 96-Well-Platte pipettiert und die *q-RT PCR* konnte gestartet werden. Die relative Genexpression wurde ermittelt und statistisch ausgewertet.

2.2.5 Elektronenmikroskopie

Die ultrastrukturellen Untersuchungen wurden in der Zentralabteilung Elektronenmikroskopie (AR Dr. Ulrich Gärtner) am Institut für Anatomie und Zellbiologie des Fachbereiches Medizin, Aulweg 123 in 35392 Gießen durchgeführt.

2.2.5.1 Prinzip

Mithilfe der Elektronenmikroskopie wird ein Objekt mit Elektronen hochaufgelöst dargestellt. Das Lichtmikroskop kann hingegen aufgrund des Auflösungsvermögens, welches durch die Wellenlänge des Lichtes limitiert ist, kleine Objekte nur begrenzt darstellen. Um das Auflösungsvermögen zu erhöhen, benötigt man einen Strahlengang mit entsprechend kurzer Wellenlänge. Dafür sind Elektronen aufgrund ihrer Ladung geeignet, weil sie beschleunigt werden können und weil Elektronenstrahlen durch technische Mittel (z.B. spezielles Linsensystem) einfach beeinflusst werden können (Broglie 1947; Broglie 1946). Die von einer Kathode erzeugten Elektronen werden durch Hochspannung beschleunigt. Mit Hilfe eines speziellen Linsensystems in Kombination mit einem Vakuum wird der Elektronenstrahl gebündelt und auf die Probe gelenkt. Das Vakuum dient dazu, Brechungseignisse von Elektronen an Luftmolekülen zu reduzieren. Der konzentrierte Strahl durchdringt die Probe und trifft auf den Leuchtschirm, welcher das Bild sichtbar macht (Thomas und Gemming 2013).

2.2.5.2 Probenvorbereitung

Ein ca. 1 mm² großes Stück Maus-Lebergewebe wurde über Nacht in der Fixierungslösung (154) eingelegt. Es folgte die Routine-Epon-Einbettung des Gewebes. Nach Fixierung erfolgten fünf 10-minütige Waschvorgänge in 0,15 M HEPES-Puffer (103). Danach wurde das Gewebe für zwei Stunden in 1 % Osmiumtetroxid (119) inkubiert. Nach 3-maligem Waschen für 10 Min. in *Aqua bidest.* erfolgte die Blockkontrastierung über Nacht mit Uranylacetat (134). Durch die Behandlung des Gewebes in einer aufsteigenden Alkoholreihe wurde dieses

entwässert: 30/ 50/ 70/ 90/ 100 % Ethanol für je 10 Minuten. Vor der Einbettung wurde das Gewebe 15 Min. mit einem 100 % Ethanol + Propylenoxid-Gemisch (1+1) (92/ 125) inkubiert. Danach erfolgte eine einstündige Inkubation in einem Propylen-Epon-Gemisch (1+1). Über Nacht wurde das Gewebe in Epon eingelegt. Das Entgasen fand darauffolgend im Exsikkator (11) statt.

Die Polymerisation des Epoxidharzes erfolgte in einem Wärmeschrank bei einer Temperatur von 60 °C für 48 Stunden. Bevor Ultradünnschnitte von ca. 70 nm Dicke hergestellt werden konnten, musste der Eponblock getrimmt werden. Dafür wurde mit einem Trimm-Messer (73) das Vorbereiten des Blockes an einem Trimmer (72) vollzogen. Der Block wurde pyramidenförmig zugespitzt. Mit einem Diamantmesser (59) wurden danach am Mikrotom (40) zunächst Semidünnschnitte von 0,75 µm angefertigt, um diese mit Methylenblau (110) zu färben und zur Kontrolle unter dem Lichtmikroskop mit einer 100- und 400-fachen Vergrößerung begutachten zu können. Nachdem die Ultradünnschnitte hergestellt worden waren, zog man diese auf Kupfernetze (Grids) (57) und trocknete diese, bevor die Mikroskopie am Transmissions-Elektronenmikroskop (TEM) begann (Xu *et al.* 2016; Kasprzak *et al.* 2002). Es wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen der Zellstruktur im Lebergewebe 12 Wochen alter männlicher Mäuse mit einer 16.7000-fachen Vergrößerung erstellt. Die Kupfernetze wurden am TEM zunächst in die Probenkammer geschleust, um sie im Hochvakuum betrachten zu können. Danach wurden diese am Probentisch in den Fokus des Elektronenstrahls gebracht, um eine Übersicht der Probenstruktur zu erhalten. Im Anschluss wurde mit dem Stigmator, einer speziellen Linse, der Abbildungsfehler korrigiert, in X- und Y- Richtung das Bild erneut scharf und unverzerrt dargestellt (Scherzer 1936). Zur Bilderfassung wurde eine CCD-Kamera (*Charge-Coupled Device*) verwendet (TRS Sharp: *Eye Slow-Scan 2K CCD camera* (TRS; Tröndle, Moorenweis, Deutschland)). Um diese am TEM anwenden zu können, musste das Elektronenbild mit Hilfe eines Szintillators in eine Photonenverteilung umgewandelt werden. Diese wurde auf den CCD-Chip durch eine spezielle Glasfaseroptik übertragen (Lee 1984).

2.2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit dem Programm *IBM SPSS Statistics 22.Ink* (USA) und mittels *Mann-Whitney-U-Test* (Mann und Whitney 1947) für unabhängige Stichproben durchgeführt. Dieser Test prüft die Proben und die Untergruppen auf Signifikanz. Im Fall von nicht-normalen Verteilungen der Werte überprüft der Test die Mittelwerte auf die Gleichheit. Als Voraussetzung gilt die Bedingung, dass die Form der Verteilungen der zu vergleichenden Proben gleich und stetig sein müssen. Folgende Nullhypothese wurde geprüft: Die Wahrscheinlichkeit eines identischen Ergebnisses aus den beiden Verteilungen ist für jede der beiden Verteilungen gleich. Die Nullhypothese beschreibt demnach die Stichproben, die sich nicht unterscheiden. Die gegenläufige Hypothese beschreibt die Stichproben, die einen Unterschied aufweisen. Die Nullhypothese wird verworfen, wenn die Verteilungen nicht gleich sind. Daraus resultiert, dass die Mittelwerte ungleich sein müssen. Der Wert $p < 0.05$ gibt einen signifikanten Unterschied an. Die Anzahl der Stichproben aller Untersuchungen betrug $n=3-5$. Bei dieser geringen Stichprobenanzahl (Graumann *et al.* 2015) wurde zur Beurteilung der Signifikanz die 'exakte Signifikanz' von *SPSS* genutzt. Die darauffolgende graphische Darstellung erfolgte mit dem Programm *Microsoft Excel 2010* und ein signifikanter Unterschied wurde mit einem Stern (*) markiert. Die Ergebnisse sind als Balkendiagramme des Mittelwertes für die einzelnen Maus-Gruppen gezeigt: Kontrollgruppe Wildtyp (WT), Kontrollgruppe HBs-transgen (Tg), Versuchsgruppe HBs-transgen mit einwöchiger PBA-Gabe (1 W PBA), Versuchsgruppe HBs-transgen mit achtwöchiger PBA-Gabe (8 W PBA). Dabei wurden pro Maus-Gruppe einzelne Messungen ($n=3-5$) durchgeführt. Die Fehlerbalken entsprechen dem einfachen Standardfehler (\pm *standard error of the mean* (SEM)) (Altman und Bland 2005).

Zusätzlich wurden die Ergebnisse zur Übersicht als *Box-Whisker-Plots* dargestellt, um die Streuung der erhobenen Daten aufzuzeigen. Die obere Grenze der Box (75 %-Perzentile) stellt das obere Quartil dar und die untere Grenze (25 %-Perzentile) das untere Quartil. Innerhalb der *Box-Plots* ist der Median der Daten gezeigt. Liegt der Median nahe der Mitte, handelt es sich um eine symmetrische Verteilung (Stengel 2010).

Die Auswertung der immunhistochemischen Analysen erfolgte nach Auszählen der Untersuchung entsprechend der positiven Zellen mittels Mikroskop (13) pro Sichtfeld. Dabei wurden bei einer 100-fachen Vergrößerung n=3 Auszählungen vorgenommen. Die positiv-markierten Zellen wurden gegen die nicht-gefärbten Zellen ausgezählt. *Western Blot*-Untersuchungen sowie die Cytokin- und Chemokinanalyse wurden im Vorfeld mit dem Programm *BioDoc Analyze 2.1* (Fa. Analytik, Jena) ausgewertet. Dabei wurde ein Graustufenabgleich der Banden vorgenommen. Die Darstellung der Ergebnisse von *q-RT PCR* wurde als *Fold Change* gezeigt. Der *Fold Change* stellt das quantitative Ergebnis der *mRNA*-Expression dar und lässt somit mengenmäßige Aussagen über die Genexpression des betreffenden Gens zu. Ein positiver bzw. negativer Wert gibt an, dass die Expression eines Gens in der Versuchsgruppe höher bzw. niedriger liegt als in der Kontrollgruppe. In dieser Arbeit wurde die *mRNA*-Expression der analysierten Versuchsgruppen im HBs-transgenen Maus-Modell mit der *mRNA*-Expression der Kontrollgruppen verglichen und berechnet. Die *mRNA*-Expression der Kontrollgruppe WT wurde zudem mit *mRNA*-Expression der Kontrollgruppe Tg verglichen und berechnet. In Zellkultur wurde zunächst die Genexpression der Kontrollgruppe - Dox und der Versuchsgruppe + Dox verglichen und berechnet. Der Vergleich zeigte eine erfolgreiche Induktion des HBs-Transgens mit Dox an. Danach erfolgte der Vergleich der Kontrollgruppe - Dox/ + PBA und der Versuchsgruppe + Dox/ + PBA. Die anschließende Berechnung der Kontrollgruppe + Dox und der Versuchsgruppe + Dox/ + PBA zeigte den gleichzeitigen Einfluss von HBs-Transgen und PBA-Gabe.

Die Prüfung der Genexpression mittels *Signal Transduction Pathway Finder* wurde nach Berechnung der Zellkultur-Versuchsgruppen im Streudiagramm gezeigt. Das Streudiagramm vergleicht die normalisierte Expression jedes Gens auf einem *PCR-Array* zwischen zwei Gruppen (Kontrollgruppe und Versuchsgruppe) und zeigt Genexpressionsänderungen an. Die gelben Punkte zeigten eine Hochregulation der untersuchten Gene, die schwarze Markierung zeigte keine Regulation und die blauen Punkte zeigten eine verminderte Regulation an. Verglichen wurden zum einen die Ansätze der Zellen mit und ohne Dox-Induktion (Kontrollgruppe - Dox/ Versuchsgruppe + Dox) und zum anderen Zellen, die eine Dox-Induktion erhielten und eine zusätzliche Stimulation durch PBA (Kontrollgruppe + Dox/ Versuchsgruppe + Dox/ + PBA).

3 Ergebnisse

Ein direkter, intrinsischer Mechanismus der Zellschädigung bei der HBV-Infektion beruht auf der Akkumulation von HBs im ER der Hepatozyten, was zu ER-Stress und Apoptose führen kann (Churin *et al.* 2014). Das synthetische Chaperon PBA bewirkt bei verschiedenen Protein-Aggregationskrankheiten die Auflösung zellschädigender Aggregate (Wiley *et al.* 2011).

Im Rahmen des Projektes wurden HBs-transgene Mäuse über einen Zeitraum von einer bzw. acht Wochen mit PBA oral behandelt. Daraufhin wurden die Auswirkungen der PBA-Behandlung auf die HBs-Akkumulation und den ER-Stress im Lebergewebe analysiert. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe von Frau Univ.-Prof. Roeb (im Rahmen einer weiteren Doktorarbeit) wurde gezeigt, dass die Behandlung mit dem synthetischen Chaperon PBA zu einer konsekutiven Feinverteilung der intrazellulären HBs-Aggregate in Hepatozyten führt, was jedoch keine Verringerung der Leberschädigung bewirkte. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass PBA in HBs-transgenen Mäusen eine APR induziert.

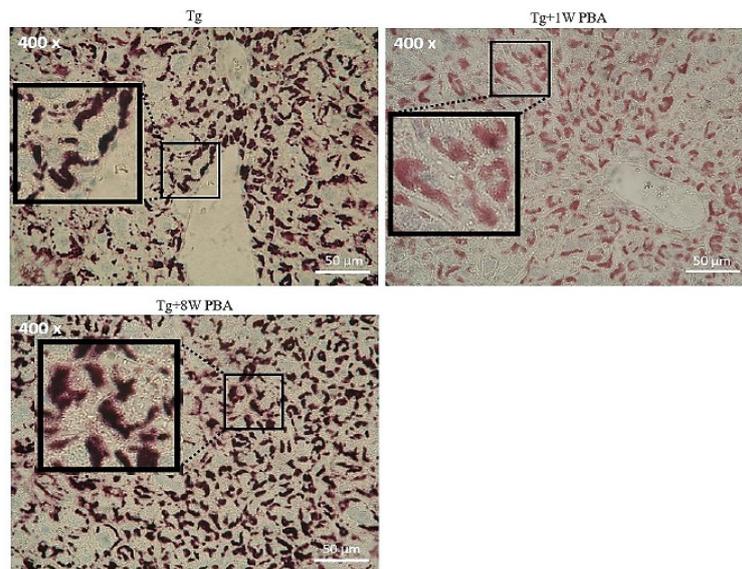


Abbildung 9: Immunhistochemische Auswertung von HBsAg (rot).

Untersucht wurde das Lebergewebe 12 Wochen alter männlicher HBs-transgener Mäuse. HBs-transgene Gruppe (Tg), HBs-transgene Gruppe nach einwöchiger PBA-Behandlung (Tg+1WPBA), HBs-transgene Gruppe nach achtwöchiger PBA-Behandlung (Tg+8WPBA). Die Analyse verdeutlicht eine Akkumulation der HBV-Oberflächenproteinen im ER. Die PBA-Gabe induziert eine Auflockerung der Proteinaggregate. Vergrößerung Ausschnitt 400x, Messbalken 50 μm. Mit Genehmigung von Alica Köppel, die diesen Befund im Rahmen ihrer Promotionsarbeit erhoben hat.

Im Folgenden sind die Ergebnisse des HBs-transgenen Maus-Modells nach PBA-Behandlung aufgezeigt, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit ermittelt wurden (vgl. Abb. 5/ Kapitel 1.3):

3.1 Verminderung der Expression natürlicher Chaperone im Maus-Lebergewebe

Die PBA-Behandlung verminderte die Expression natürlicher Chaperone im Maus-Lebergewebe. Die natürlichen Chaperone vermitteln im ER die korrekte Konformation fehlgefalteter Proteine (Cortez und Sim 2014). Aus diesem Grund wurde die Proteinexpression von GRP78 und PDI immunhistochemisch untersucht.

3.1.1 Reduktion der GRP78-Expression

Die PBA-Behandlung reduzierte die Expression von GRP78 in HBs-transgenen Mäusen. Die Expression von GRP78 wurde im Lebergewebe 12 Wochen alter männlicher Wildtyp- und HBs-transgener Mäuse vor und nach PBA-Behandlung analysiert. Dabei zeigte die immunhistochemische Untersuchung der Leber-Paraffinschnitte Unterschiede zwischen Wildtyp, HBs-transgenen und PBA-behandelten Mäusen.

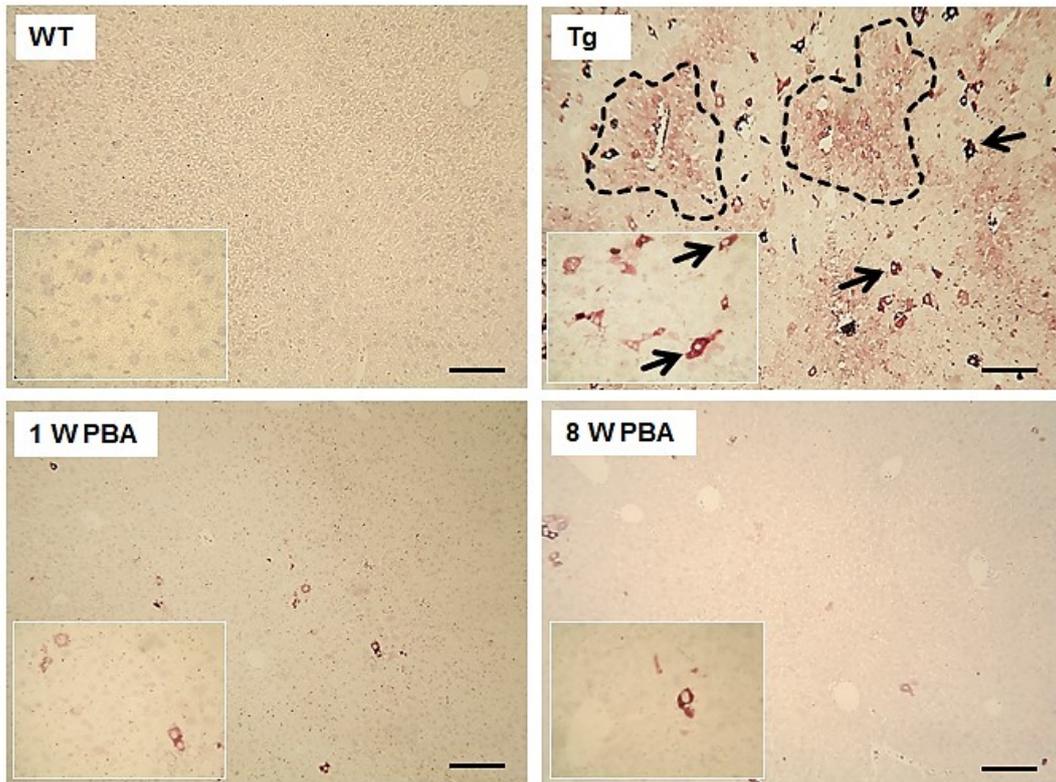


Abbildung 10: PBA reduzierte die Expression von GRP78 im Lebergewebe von HBs-transgenen Mäusen.

Immunhistochemische Färbung (rot) von GRP78 im Lebergewebe 12 Wochen alter männlicher HBs-transgener Mäuse. Die Expression des HBs-Transgens (Tg) induzierte die Expression von GRP78 im Vergleich zum Wildtyp (WT). Eine starke Induktion von GRP78 war in einzelnen Hepatozyten (Pfeile) zu beobachten. Daneben wurde die Expression im Bereich der Portalfelder verstärkt (gestrichelte Linie). Die Expression von GRP78 verringerte sich zeitabhängig nach einer Woche (1 W PBA) und acht Wochen (8 W PBA) PBA-Behandlung. Hämalaun-Kernfärbung, Vergrößerung 100x, Ausschnitt 400x, Messbalken 100 µm. 12 Wochen: WT n=4, Tg n=3, 1 W PBA n=5, 8 W PBA n=4.

Abbildung 10 zeigt die immunhistochemische Färbung der Leber im Vergleich einer Wildtyp- und einer unbehandelten Maus mit geringer Expression von GRP78. Dagegen konnte in HBs-transgenen Mäusen eine deutlich erhöhte Expression des Proteins im Bereich der Portalfelder und vereinzelt auch in anderen Hepatozyten nachgewiesen werden. Die Expression des HBs-Transgens induzierte somit die Expression von GRP78 im Vergleich zum Wildtyp. Nach einwöchiger Behandlung mit PBA war die Expression von GRP78 reduziert und wurde nach achtwöchiger Behandlung weiter verstärkt (vgl. Abb. 10). Die

zeitabhängige, reduzierte Expression von GRP78 nach achtwöchiger PBA-Behandlung ist in Abbildung 10 und 11 dargestellt. Im Folgenden wurden GRP78-positive Zellen ausgezählt. Dabei ergab die statistische Analyse einen signifikanten Anstieg der GRP78-positiven Zellen im HBs-transgenen Maus-Modell im Vergleich zum Wildtyp. Außerdem zeigte sich eine signifikante Abnahme der GRP78-Expression in HBs-transgenen Mäusen nach der Behandlung mit PBA (vgl. Abb. 11).

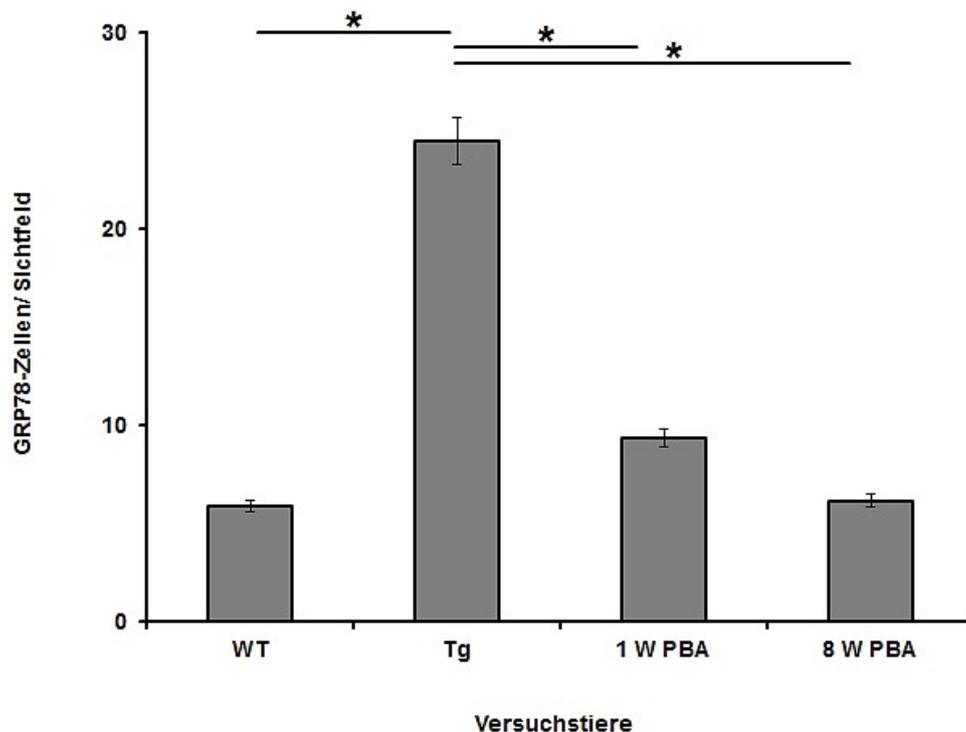


Abbildung 11: PBA reduzierte die relative Zellzahl GRP78-positiver Hepatozyten in HBs-transgenen Mäusen.

Statistische Analyse positiv gefärbter Zellen aus Leber-Paraffinschnitten 12 Wochen alter männlicher Mäuse. Ein signifikanter Anstieg zeigt der Vergleich zwischen Wildtyp (WT) und HBs-transgener (Tg) Maus. Nach einer (1 W PBA) und acht Wochen (8 W PBA) PBA-Behandlung wurde eine signifikante Abnahme GRP78-positiver Zellen deutlich. $p^* < 0.05$, Mittelwerte \pm SEM, 12 Wochen: WT n=4, Tg n=3, 1 W PBA n=5, 8 W PBA n=4.

Die *mRNA*-Expression von 5, 12 und 19 Wochen alten männlichen Wildtyp- und HBs-transgener Mäuse wurde analysiert, um einen Überblick in den verschiedenen Altersstufen zu erhalten. Die jungen 5 Wochen alten Mäuse

wurden nur eine Woche mit PBA behandelt. Die 12 Wochen Gruppe erhielt Behandlungen von einer und acht Wochen. 19 Wochen alten Mäusen wurde PBA über einen Zeitraum von acht Wochen gegeben.

Um auf transkriptioneller Ebene Aussagen hinsichtlich der *GRP78*-Genexpression treffen zu können, wurde die Auswirkung von PBA in 5, 12 und 19 Wochen alten Mäusen mittels *q-RT PCR* untersucht. Auf transkriptioneller Ebene wurde keine signifikante Beeinflussung der *GRP78 mRNA*-Expression detektiert (vgl. Abb. 12). Abbildung 12 veranschaulicht das Ergebnis zur Genregulation von *GRP78*. Die *mRNA*-Expression ist auf der Ordinate dargestellt und die untersuchten Versuchstiere auf der Abszisse. Der Vergleich der PBA-behandelten und HBs-transgenen 5 Wochen alten Mäuse zum Wildtyp-Modell zeigte einen minimalen Anstieg der *mRNA*-Expression von *GRP78* auf, hingegen der 12 Wochen alten Mäuse, die eine leichte Verringerung der Expression nach Induktion des Transgens und einwöchiger PBA-Behandlung aufwiesen. Nach acht Wochen PBA-Gabe stieg das Genexpressions-Level wieder minimal an. Die 19 Wochen alten HBs-transgenen Mäuse wiesen eine leichte Erhöhung der Genregulation auf, die nach acht Wochen Behandlung die Tendenz zur Abnahme sichtbar machte. Trotz dessen zeigte die PBA-Gabe und die Expression von HBs keine Beeinflussung der *GRP78*-Genregulation.

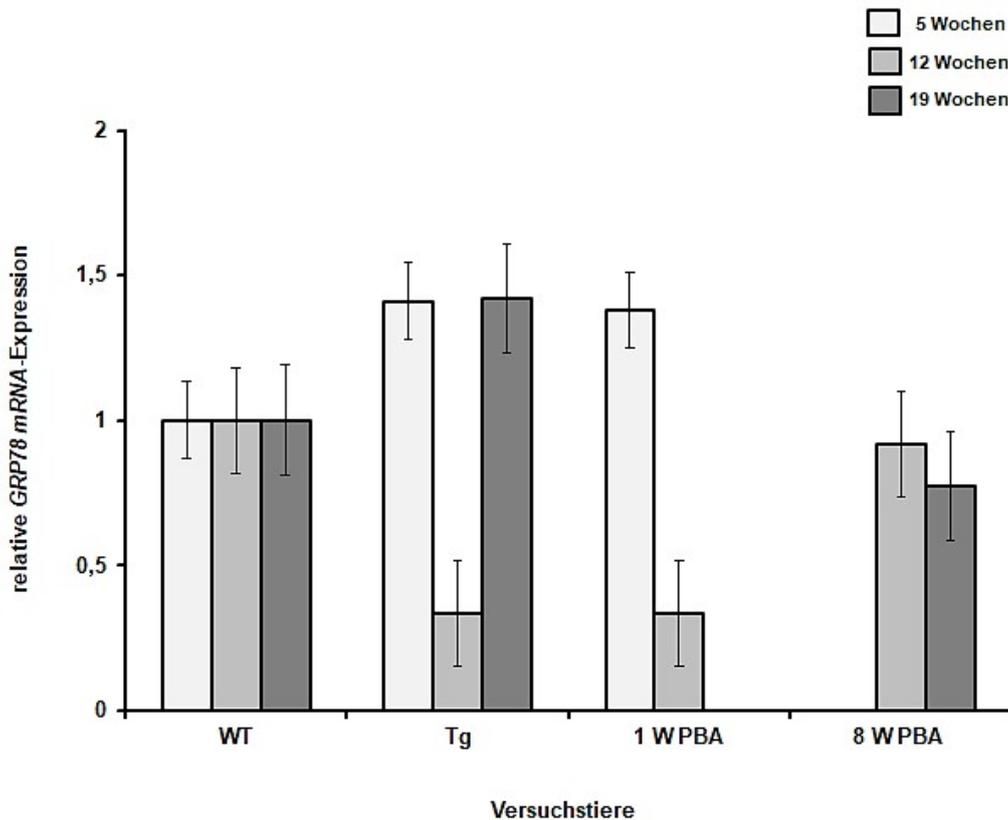


Abbildung 12: PBA und HBs-Expression zeigten keinen Effekt auf die *GRP78*-Genregulation in HBs-transgenen Mäusen.

mRNA-Expression von *GRP78* gemessen an 5, 12 und 19 Wochen alten männlichen HBV-Mäusen mittels *q-RT PCR* (siehe Legende oben rechts). Im Gegensatz zur Proteinexpression in 12 Wochen alten Mäusen (vgl. Abb. 10+11) wurde die *GRP78*-Genexpression weder durch die Expression des Transgens noch durch die PBA-Behandlung beeinflusst. Mittelwerte \pm SEM, 5 Wochen: WT n=3, Tg n=4, 1 W PBA n=4, 12 Wochen: WT n=3, Tg n=3, 1 W PBA n=5, 8 W PBA n=4, 19 Wochen: WT n=3, Tg n=4, 8 W PBA n=4.

3.1.2 Zeitabhängige Reduktion der PDI-Expression

Die PBA-Behandlung reduzierte die Expression von PDI und die relative Zellzahl PDI-positiver Hepatozyten in HBs-transgenen Mäusen. PDI ist ein wichtiges Chaperon, welches die korrekte Faltung von Proteinen fördert (Wilkinson und Gilbert 2004).

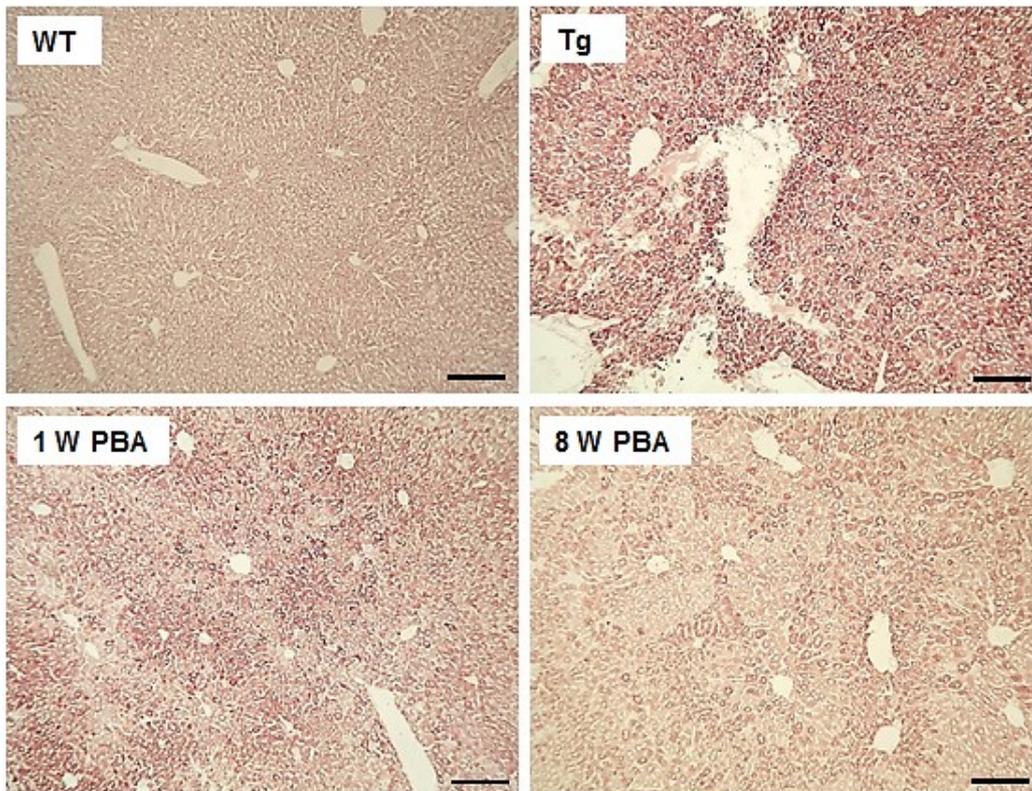


Abbildung 13: PBA reduzierte zeitabhängig die Expression von PDI im Lebergewebe von HBs-transgenen Mäusen.

Immunhistochemische Färbung (rot) von PDI im Lebergewebe 12 Wochen alter männlicher HBs-transgener Mäuse. In der Leber HBs-transgener Mäuse (Tg) stieg die Expression von PDI verglichen zum Wildtyp (WT). Die Expression verringerte sich zeitabhängig nach einer Woche (1 W PBA) und acht Wochen (8 W PBA) PBA-Behandlung. Hämalaun-Kernfärbung, Vergrößerung 100x, Messbalken 100 μm . 12 Wochen: WT n=4, Tg n=3, 1 W PBA n=5, 8 W PBA n=4.

In Abbildung 13 ist die Proteinexpression von PDI gezeigt, die immunhistochemisch sowie quantitativ (vgl. Abb. 14) an Lebergewebe 12 Wochen alter männlicher Wildtyp- und HBs-transgener Mäuse untersucht wurde. Verglichen wurden die Ergebnisse mit den PBA-behandelten Proben der Mäuse, die über einen Zeitraum von einer bzw. acht Wochen PBA über das Trinkwasser erhielten. Abbildung 13 zeigt die niedrige PDI-Expression der Wildtyp-Gruppe auf. Die Hepatozyten zeigten eine geringe Färbung des Proteins. Durch das HBs-Transgen wurde eine signifikant verstärkte Expression von PDI deutlich. Zeitabhängig nach ein- und achtwöchiger PBA-Behandlung war vereinzelt eine

flächenhafte Verminderung der PDI-Expression in den Hepatozyten zu beobachten.

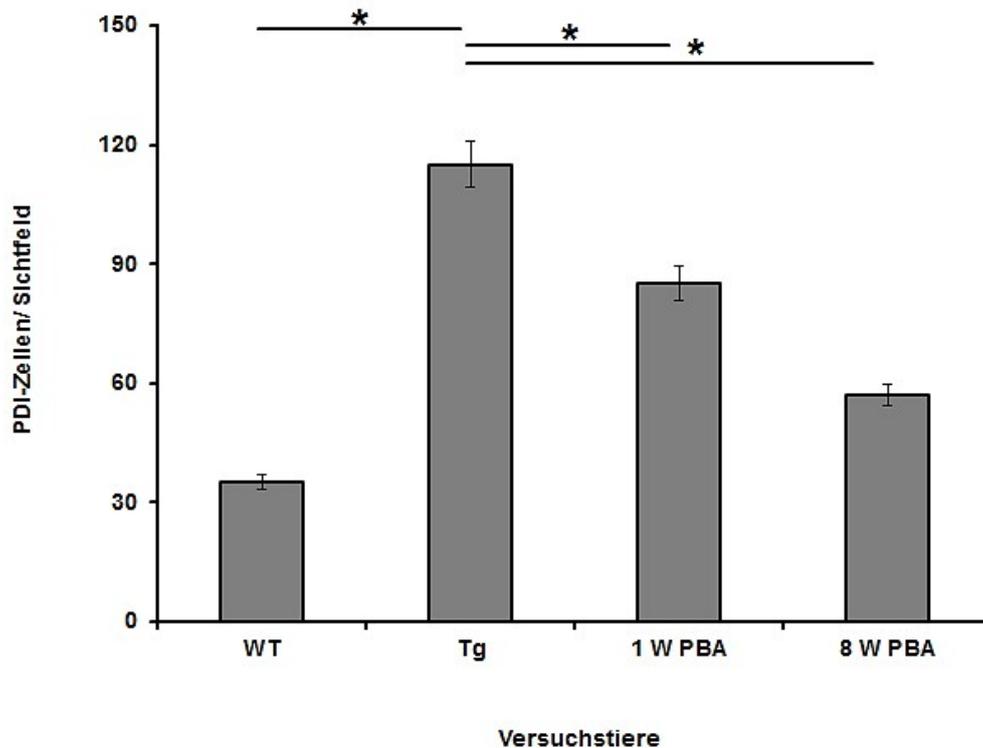


Abbildung 14: PBA reduzierte zeitabhängig die relative Zellzahl PDI-positiver Hepatozyten in HBs-transgenen Mäusen.

Statistische Analyse positiv gefärbter Zellen aus Leber-Paraffinschnitten 12 Wochen alter männlicher Mäuse. In der HBs-transgenen Maus-Leber exprimierten signifikant mehr Zellen PDI als in der Leber von Wildtyp-Mäusen (WT). Nach einer (1 W PBA) und acht Wochen (8 W PBA) PBA-Behandlung wurde eine signifikante Abnahme PDI-positiver Zellen deutlich. $p < 0.05$, Mittelwerte \pm SEM, 12 Wochen: WT n=4, Tg n=3, 1 W PBA n=5, 8 W PBA n=4.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die Expression des HBs-Transgens die Protein-Expression der Chaperone GRP78 und PDI induzierte. Die durch PBA verringerte Proteinaggregation ging wiederum mit einer Verringerung der Expression dieser Chaperone einher. Über GRP78 konnte die Aktivierung verschiedener ER-Stress-Wege ausgelöst werden. Im Folgenden wurde daher die Beeinflussung des ATF6-Signalweges durch die Expression des HBs-Transgens und die zusätzliche PBA-Behandlung untersucht. Unter ER-Stress versucht die Zelle mit Hilfe der UPR die ER-Homöostase wiederherzustellen. Dabei bindet

GRP78 an ATF6 und inaktiviert diesen UPR-Sensor. Die Aktivierung von ATF6 erfolgt durch die Dissoziation von GRP78 (Ron und Walter 2007).

3.2 Induktion der Aktivierung und Kernlokalisierung des Transkriptionsfaktors ATF6

Die PBA-Behandlung induzierte die Aktivierung und Kernlokalisierung des Transkriptionsfaktors ATF6 im HBs-transgenen Maus-Modell. ATF6 ist ein ER-Stress-regulierender Transkriptionsfaktor (vgl. Abb. 8/ Kapitel 1.1.3.2.1). Wird die Bindung an GRP78 gelöst, wandert ATF6 in den Golgi-Apparat, wo es durch proteolytische Spaltung aktiviert wird. Der cytosolische Teil von ATF6 wird in den Zellkern transportiert und wirkt als Transkriptionsfaktor, der u.a. eine APR induzieren kann, aber auch die Expression natürlicher Chaperone beeinflusst (Bravo *et al.* 2013).

3.2.1 Aktivierung von ATF6 im Maus-Lebergewebe

Die PBA-Behandlung aktivierte ATF6 im HBs-transgenen Maus-Modell. Der Proteinnachweis von ATF6 im murinen Lebergewebe erfolgte über die *Western Blot*-Analyse (vgl. Abb. 15). Getestet wurden Leberlysate 12 Wochen alter männlicher Wildtyp- und HBs-transgener Mäuse sowie von HBs-transgener Mäusen, die eine bzw. acht Wochen mit PBA behandelt wurden. Alle Proben wiesen eine gleichmäßige Expression von ungespaltenem ATF6 bei einer Größe von 90 kDa auf. Die 55 kDa Banden (vgl. Abb. 15/ roter Pfeil) im *Western Blot* zeigten die Spaltung von ATF6 und damit dessen Aktivierung nach ein- und achtwöchiger PBA-Behandlung an. β -Actin (42 kDa) veranschaulichte als Kontrolle die gleichmäßige Beladung.

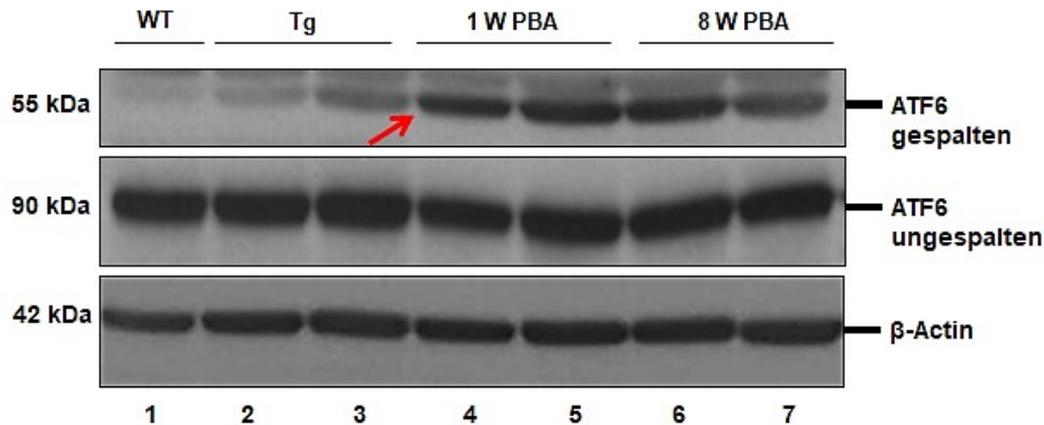


Abbildung 15: PBA aktivierte ATF6 im HBs-transgenen Maus-Modell.

Protein-Expressionsmuster von ATF6 aus Leberlysaten 12 Wochen alter männlicher Wildtyp- (WT) und HBs-transgener (Tg) Mäusen sowie HBs-transgener Mäusen, die eine (1 W PBA) und acht Wochen (8 W PBA) mit PBA behandelt wurden. Repräsentative *Western Blot*-Analyse der Lysate mit Antikörper gerichtet gegen ATF6 und β -Actin. 12 Wochen: 1- WT; 2-3 Tg; 4-5 Tg + 1 W PBA behandelt; 6-7 Tg + 8 W PBA. Die Expression von ungespaltenem ATF6 zeigte nach Aktivierung eine Spaltung des Transkriptionsfaktors nach PBA-Behandlung (roter Pfeil). Die *Western Blot*-Banden zeigen repräsentative Mäuse aus den Gruppen. 12 Wochen: WT n=4, Tg n=4, 1 W PBA n=5, 8 W PBA n=5. β -Actin zeigte die gleichmäßige Beladung.

Zusammenfassend konnte mittels *Western Blot*-Analyse der Maus-Leberproben eine proteolytische Spaltung von ATF6 nach PBA-Gabe im HBs-transgenen Maus-Modell nachgewiesen werden.

3.2.2 Kerntranslokation des Transkriptionsfaktors ATF6

Die PBA-Behandlung führte zu einer Kerntranslokation des Transkriptionsfaktors ATF6. Die Feinverteilung der intrazellulären HBs-Aggregate führte zu ER-Stress, folglich zu UPR und der Aktivierung von ATF6, was durch die Kerntranslokation des Faktors bestätigt wurde.

3.2.2.1 Nukleäre Akkumulation von ATF6

Die PBA-Behandlung induzierte die nukleäre Akkumulation von ATF6. Mittels *Western Blot*-Analyse wurden die Leberlysate 12 Wochen alter männlicher HBs-transgener-Mäuse nach subzellulärer Fraktionierung untersucht, um die nukleäre Translokation von ATF6 zu aufzuklären (vgl. Kapitel 2.2.3.3). Abbildung 16 zeigt die nukleäre Fraktion mit dem Proteinbandenmuster der Leberlysate beider PBA-behandelter Mausproben. Zu erkennen ist eine gesteigerte Expression von gespaltenem ATF6 im Vergleich zur Wildtyp- und HBs-transgenen Gruppe bei einer Größe von 55 kDa. In der nukleären Fraktion der PBA-behandelten Mäuse wurde eine größere Menge des gespaltenen ATF6 nachgewiesen. HNF4 α (nukleäre Expression/ 55 kDa) zeigte als Kontrolle die gleichmäßige Beladung der Proteine an (vgl. Abb. 16).

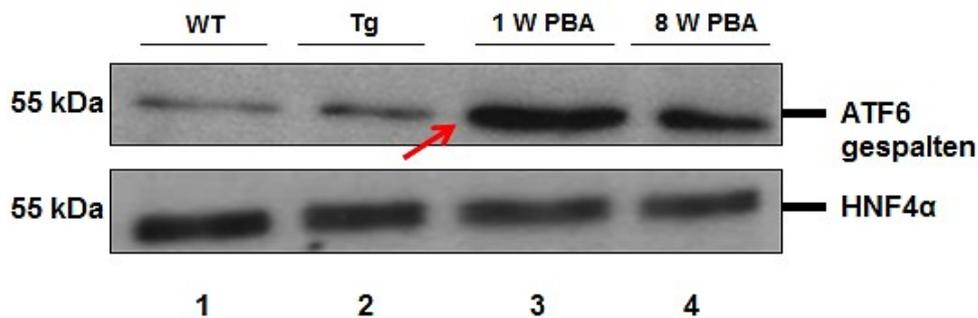


Abbildung 16: PBA induzierte die Spaltung und die nukleäre Translokation von ATF6 im HBs-transgenen Maus-Modell.

Protein-Expressionsmuster aus nukleärer Fraktion von ATF6 und HNF4 α aus Leberlysaten 12 Wochen alter männlicher Wildtyp- (WT) und HBs-transgener (Tg) Mäusen sowie HBs-transgener Mäusen, die eine (1 W PBA) und acht Wochen (8 W PBA) mit PBA behandelt wurden. Repräsentativer *Western Blot* mit Antikörper gerichtet gegen ATF6 und HNF4 α . 1- WT; 2- Tg; 3- Tg + 1 W PBA; 4- Tg + 8 W PBA. Nach PBA Behandlung zeigte sich eine erhöhte Expression von ATF6 in den Lysaten HBs-transgener Mäuse (roter Pfeil). Die *Western Blot*-Banden zeigen repräsentative Mäuse aus den Gruppen. 12 Wochen: WT n=4, Tg n=4, 1 W PBA n=5, 8 W PBA n=5. HNF4 α zeigte die gleichmäßige Beladung an.

Die densitometrische Analyse der *Western Blot*-Untersuchungen zeigte die signifikante nukleäre Translokation des Transkriptionsfaktors nach PBA-Behandlung (vgl. Abb. 17).

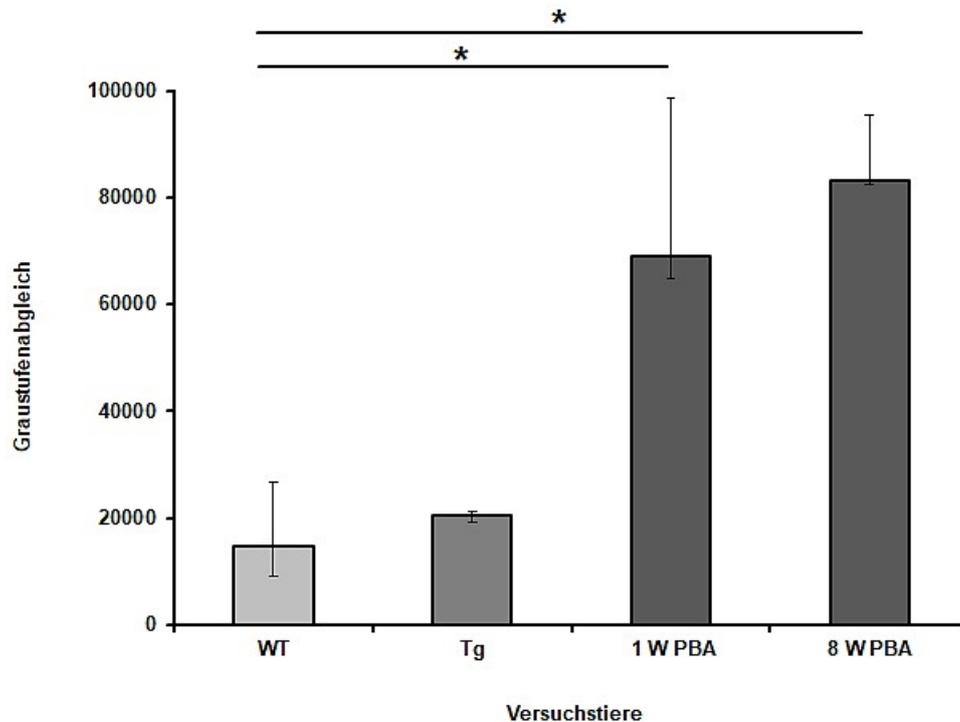


Abbildung 17: Die semiquantitative Auswertung der *Western Blot*-Analysen zeigte eine signifikante nukleäre Translokation von ATF6 durch PBA.

Graustufenabgleich: Analysiert wurde der *Western Blot* 12 Wochen alter männlicher Wildtyp- (WT) und HBs-transgener Mäuse (Tg) (vgl. Abb. 16). Die PBA-Behandlung induzierte zeitabhängig nach einer Woche (1 W PBA) und acht Wochen (8 W PBA) die Spaltung und nukleäre Translokation des Transkriptionsfaktors im Vergleich zur Wildtyp- und HBs-transgenen Maus. $p^* < 0.05$, Mittelwerte \pm SEM, 12 Wochen: WT n=4, Tg n=4, 1 W PBA n=5, 8 W PBA n=5.

Die Signifikanz wurde als $p^* < 0.05$ definiert. Abbildung 18 zeigt die Ergebnisse dargestellt als *Box-and-Whisker-Plots*. Der hellgraue Balken repräsentiert die Kontrollgruppe WT und der graue Balken die Kontrollgruppe HBs-transgen. Die dunkelgrauen Balken zeigen die Werte der Versuchsgruppen nach zeitabhängiger PBA-Behandlung an. Eine Signifikanz der Versuchsgruppen im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen wurde diesem Fall bestätigt.

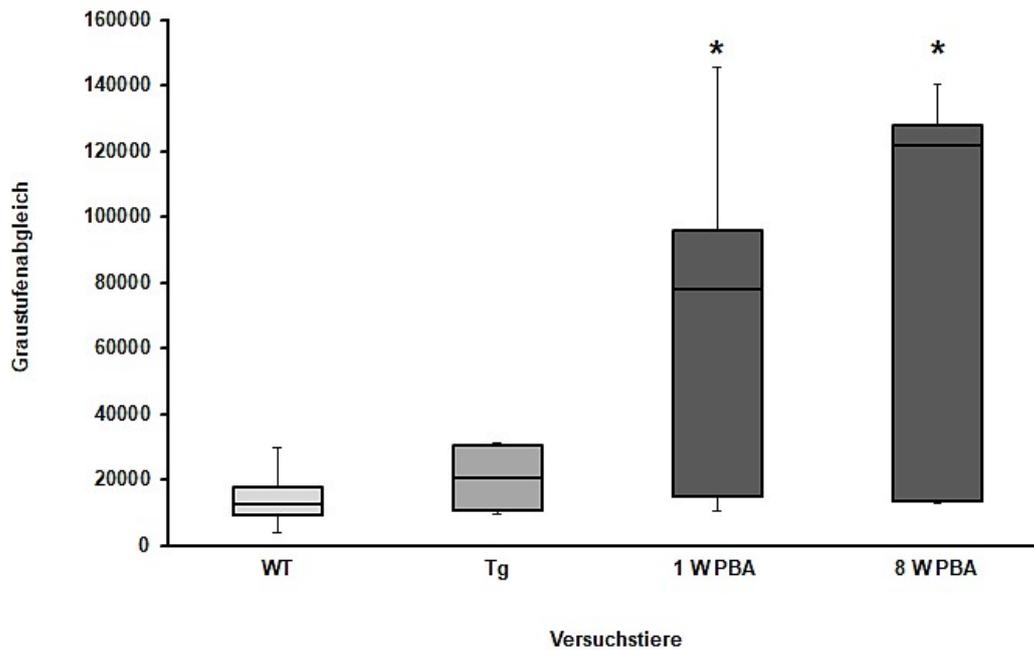


Abbildung 18: Die statistische Auswertung der *Western Blot*-Untersuchungen nach densitometrischer Analyse ist dargestellt als *Box-Whisker-Plots*.

Die PBA-Behandlung induzierte zeitabhängig nach einer Woche (1 W PBA) und acht Wochen (8 W PBA) die Spaltung und nukleäre Translokation des Transkriptionsfaktors im Vergleich zur Wildtyp- (WT) und HBs-transgenen (Tg) Maus. $p < 0.05$, Mittelwerte \pm SEM, 12 Wochen: WT $n=4$, Tg $n=4$, 1 W PBA $n=5$, 8 W PBA $n=5$.

Um die nukleäre Translokation zu visualisieren, wurden daraufhin immunhistochemische Analysen an Maus-Leberschnitten durchgeführt.

3.2.2.2 Immunhistochemischer Nachweis der nukleären Translokation von ATF6

Abbildung 19 veranschaulicht die immunhistochemische Färbung von ATF6 an Lebergewebe 12 Wochen alter männlicher Wildtyp- und HBs-transgener Mäuse. Diese Leberparaffin-Proben zeigten keine eindeutige Färbung und dementsprechende Lokalisation des Proteins im Zellkern. Das HBs-Transgen induzierte keine Kernlokalisierung des Transkriptionsfaktors verglichen zum Wildtyp. Die Proben PBA-behandelter Mäuse wiesen nach ein- und achtwöchiger Induktion eine Kernfärbung des Proteins auf. Dies entsprach den Ergebnissen der *Western Blot*-Analyse von ATF6 in HBs-transgenen Mäusen (vgl. Abb. 16)

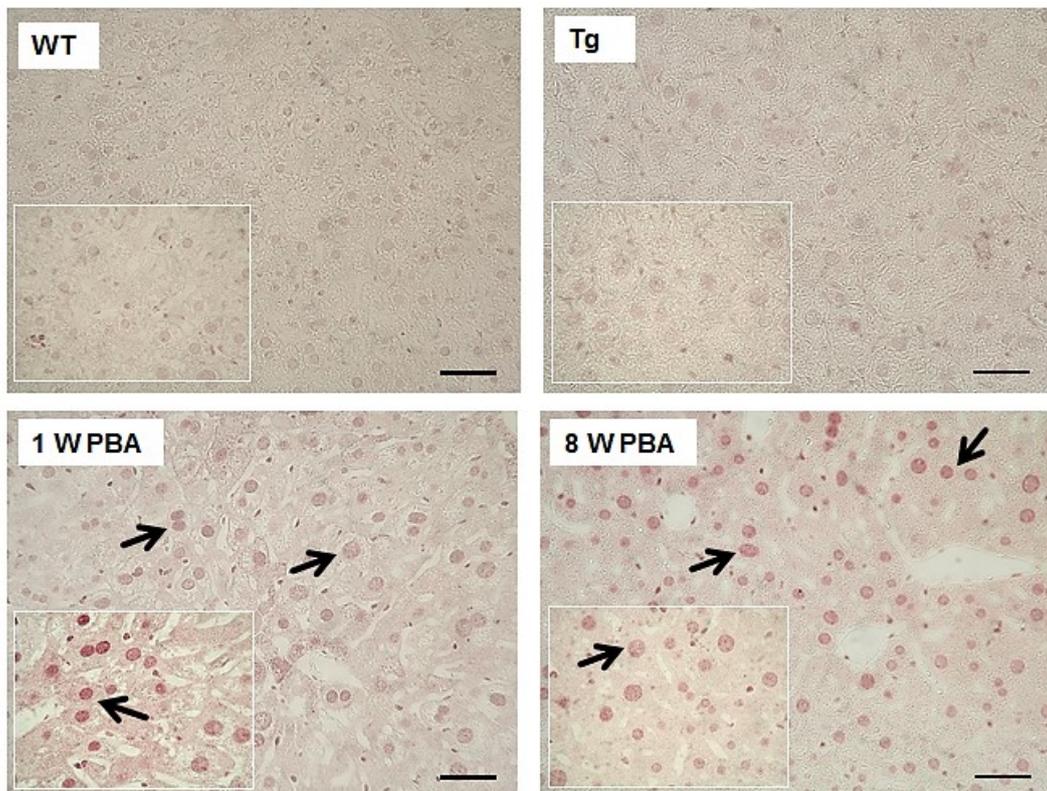


Abbildung 19: PBA induzierte die nukleäre Translokation von ATF6 im Lebergewebe von HBs-transgenen Mäusen.

Immunhistochemische Färbung von ATF6 in Lebergewebebeobachten 12 Wochen alter männlicher Mäuse. Die Proben der Wildtyp- (WT) und HBs-transgenen Maus (Tg) zeigten eine geringere Kernlokalisierung des aktivierten ATF6 im Vergleich zu den PBA-behandelten Proben, (eine Woche PBA-Behandlung = 1 W PBA und acht Wochen PBA-Behandlung = 8 W PBA). Die nukleäre Translokation des Spaltproduktes von ATF6 ist in den PBA-behandelten Proben der HBs-transgenen Maus gezeigt. Vergrößerung 200x, Ausschnitt 400x, Messbalken 100 µm.

Die Behandlung mit PBA induzierte die Spaltung und Aktivierung des Transkriptionsfaktors in HBs-transgenen Mäusen. Die anschließende nukleäre Translokation induzierte die Genexpression von AP-Proteinen und *XBPI*. Gespleißtes *XBPI*-Protein kontrolliert die Transkription von ER-residenten Chaperonen und Genen, die u.a. an der Degradation akkumulierter Proteine im ER beteiligt sind. Es ist bekannt, dass die ATF6-Aktivierung die Induktion einer APR sowie die Expression von *XBPI* auslösen kann (Malhi und Kaufman 2011).

3.3 Induktion einer hepatischen Akute-Phase-Reaktion

In vorausgegangenen Studien an Mausfibroblasten konnte die Induktion von AP-Proteinen durch ATF6-Aktivierung gezeigt werden (Zhang und Kaufman 2008). *Microarray*-Analysen wurden in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe von Frau Univ.-Prof. Roeb durchgeführt und bioinformatisch ausgewertet (vgl. Abb. 4/ Kapitel 1.2). Dadurch wurde ein Überblick über die Regulation des Lebertranskriptoms durch PBA gewonnen. Zu den am stärksten durch PBA in der HBs-transgenen Leber induzierten AP-Proteine zählten dabei SAA1, SAA2 und LCN2. Diese Ergebnisse wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit auf transkriptioneller Ebene validiert. Die PBA-Behandlung induzierte eine hepatische Akute-Phase-Reaktion.

3.3.1 Induktion der Genexpression von *SAA1*, *SAA* und *LCN2*

Die PBA-Behandlung induzierte die Genexpression von *SAA1*, *SAA* und *LCN2*. Die *mRNA*-Expression von *SAA1* und *SAA2* 5 und 19 Wochen alter männlicher Wildtyp- und HBs-transgener Mäuse wurde mittels *q-RT PCR* untersucht. Die *mRNA*-Expression von *SAA2* wurde durch das Transgen und durch PBA in 5 Wochen alten HBs-transgenen Mäusen um das 3-fache gesteigert. In jungen Mäusen wies die Genexpression von *SAA1* keine Regulation auf (vgl. Abb. 20).

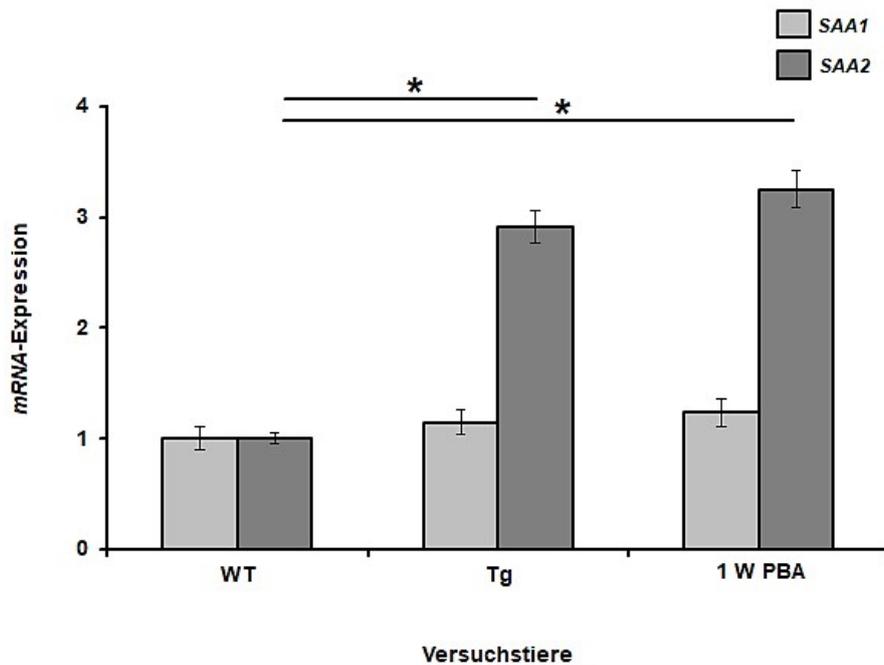


Abbildung 20: PBA induzierte die *mRNA*-Expression von *SAA2* in 5 Wochen alten HBs-transgenen Mäusen.

Die Expression von *SAA2-mRNA* ist im Vergleich zum Wildtyp (WT) in männlichen HBs-transgenen Mäusen (Tg) und in HBs-transgenen Mäusen nach einwöchiger PBA-Behandlung (1 W PBA) ca. 3-fach induziert (*SAA1* und *SAA2* siehe Legende oben rechts). Die Genexpression von *SAA1* wurde weder durch die Expression des HBs-Transgens noch durch PBA reguliert. $p^* < 0.05$, Mittelwerte \pm SEM, 5 Wochen: WT n=3, Tg n=4, 1 W PBA n=4.

Des Weiteren wurden beide Serumamyloide in älteren Mäusen untersucht. Interessanterweise wurden *SAA1* und *SAA2* in den 19 Wochen alten HBs-transgenen Mäusen im Vergleich zum Wildtyp nicht reguliert. Die PBA-Behandlung über acht Wochen induzierte jedoch eine ca. 6-fach gesteigerte *mRNA*-Expression von *SAA1* und *SAA2* (vgl. Abb. 21). Somit unterstreicht die längerfristige PBA-Gabe von acht Wochen die signifikante Hochregulation der Genexpression von *SAA1* und *SAA2* in diesem Maus-Modell. Zu berücksichtigen war, dass die 5 Wochen alten Mäuse ausschließlich eine einwöchige PBA-Gabe erhielten und die 19 Wochen alten Mäuse ausschließlich eine achtwöchige Behandlung.

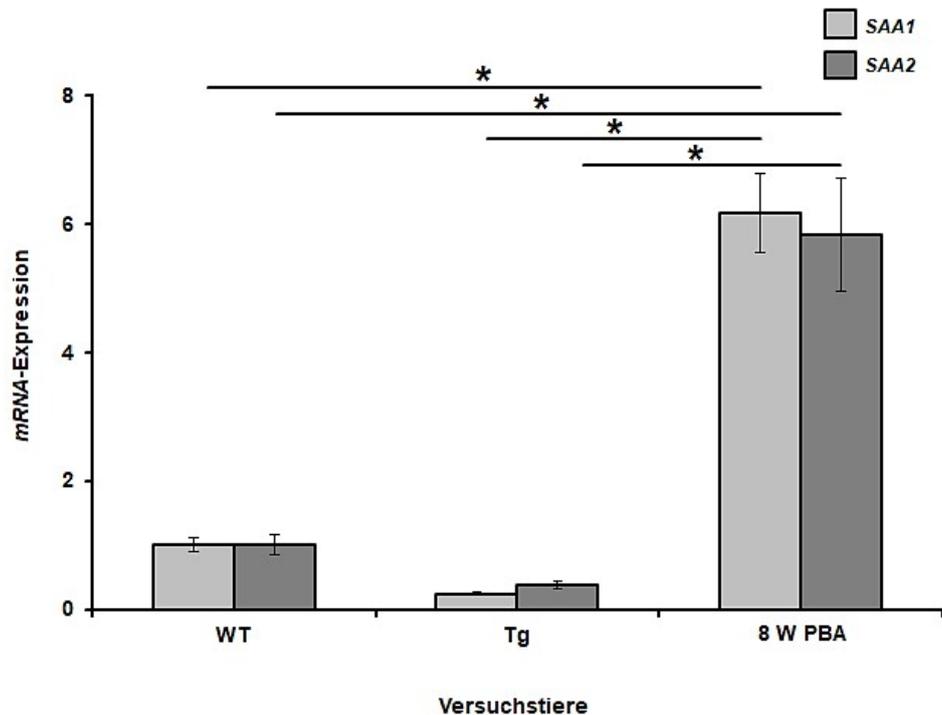


Abbildung 21: PBA induzierte eine gesteigerte *mRNA*-Expression von *SAA1* und *SAA2* in 19 Wochen alten HBs-transgenen Mäusen.

Eine längerfristige PBA-Behandlung (hier: acht Wochen/ 8 W PBA) zeigte eine signifikante Hochregulation der *mRNA*-Expression (*SAA1* und *SAA2* siehe Legende oben rechts) in männlichen HBs-transgenen Mäusen verglichen zum Wildtyp (WT) und HBs-transgenen Maus-Modell (Tg). $p^* < 0.05$, Mittelwerte \pm SEM, 19 Wochen: WT n=3, Tg n=4, 8 W PBA n=4.

Ferner wurde das Genexpressions-Level von *LCN2* in 19 Wochen alten männlichen HBs-transgenen Mäusen untersucht, da die *Cluster*-Analyse mittels *Microarray* eine starke Beeinflussung durch PBA zeigte. Dabei konnte bereits in Vorarbeit der Arbeitsgruppe von Univ.-Prof. Roeb nachgewiesen werden, dass *LCN2* in 5, 12 und 26 Wochen alten Mäusen im HBs-transgenen und PBA-behandelten Maus-Modell im Gegensatz zum Wildtyp erhöht ist.

Die *q-RT PCR*-Analysen der vorliegenden Arbeit von 19 Wochen alten Mäusen zeigten, dass weder die Expression des HBs-Transgens noch die PBA-Behandlung über acht Wochen eine signifikante Veränderung der Regulation der Genexpression von *LCN2-mRNA* aufweist (hier nicht gezeigt).

Zusammenfassend wird deutlich, dass die PBA-Behandlung zeitabhängig die hepatische Genexpression von AP-Proteinen in den unterschiedlichen Altersstufen hochregulierte.

3.3.2 Induktion einer erhöhten Genexpression von Akute-Phase-Proteinen und proinflammatorischen Cytokinen in Zellkultur

Die PBA-Behandlung induzierte eine erhöhte Genexpression von Akute-Phase-Proteinen und proinflammatorischen Cytokine in Zellkultur. Die Induktion einer APR wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit im Zellkultur-Modell untersucht. Als Modell wurden stabil HBs-transgene HuH7-Zellen mit PBA behandelt (vgl. Kapitel 2.2.2/ Kapitel 2.2.2.3). Eine Tetrazyklin-gesteuerte Expressionsinduktion des HBs-Antigens mit Dox erfolgte in stabil transfizierten HuH7-Zellen und ermöglichte dadurch die Untersuchung des Wachstums und des Metabolismus humaner Hepatomzellen *in vitro*.

In Zellkultur wurden die AP-Gene *HP*, *CRP* und *IFN-Stimulated Gene 56 (ISG56)* in HuH7-Zellen überprüft. ISG56 hemmt die Virusreplikation durch Bindung und Regulierung der Funktionen von zellulären und viralen Proteinen und *RNAs* und ist ein wichtiger Regulator der Virusreplikation (Fensterl und Sen 2015). Die Genexpression wurde mittels *q-RT PCR* nach Induktion der Expression des HBs-Transgens mit Dox und Zugabe von PBA analysiert. Abbildung 22 zeigt, dass die *mRNA*-Expression der AP-Gene *HP*, *CRP* und *ISG56* nach PBA-Behandlung (+ Dox/ + PBA) hochreguliert waren. Die reine PBA-Gabe (- Dox/ + PBA) löste bei *CRP* und *ISG56* eine ca. 6-fach gesteigerte *mRNA*-Expression aus, bei PBA in Kombination mit dem HBs-Transgen eine 33-fach gesteigerte *mRNA*-Expression von *ISG56*.

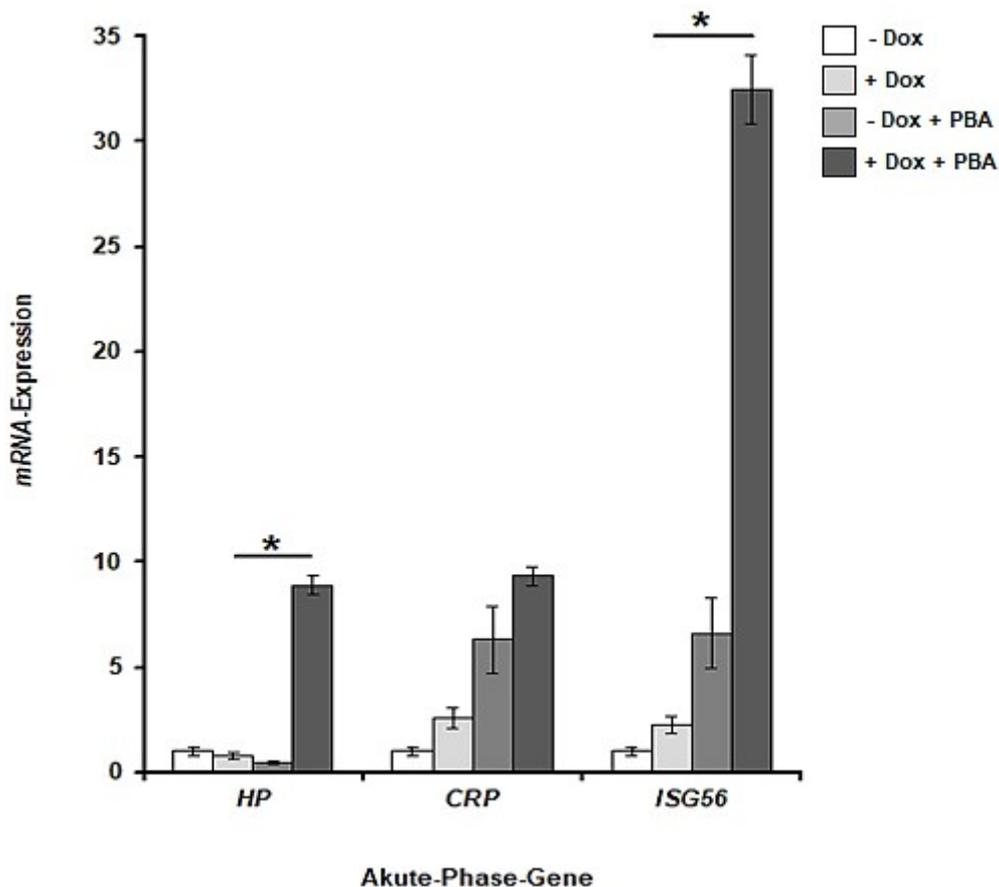


Abbildung 22: PBA beeinflusste die Genexpression von *HP*, *CRP*, *ISG56* in Zellkultur.

Dargestellt ist die *mRNA*-Expression der AP-Gene Haptoglobin (*HP*), C-reaktives Protein (*CRP*), *IFN-Stimulated Gene 56* (*ISG56*) aus Zellkulturproben der stabil transfizierten Zelllinie HuH7. Die Genexpression wurde nach Induktion der Zellen mit Dox [2 mg/ ml] und Zugabe von PBA [2 mM/ml] analysiert (siehe Legende oben rechts). Die Genexpression von *HP*, *CRP* und *ISG56* wurde durch das HBs-Transgen und die PBA-Behandlung induziert. $p^* < 0.05$, Mittelwerte \pm SEM, *HP*, *CRP*, *ISG56* n=3.

Dieser Versuch veranschaulichte, dass die PBA-Behandlung in unserem Zellkultur-Modell AP-Gene induzierte. Im *Signal Transduction Pathway Finder* wurde die Genexpression von 96 weiteren Genen analysiert, unter denen sich viele AP-Gene befanden. Die Induktion ist in Abbildung 23 gezeigt.

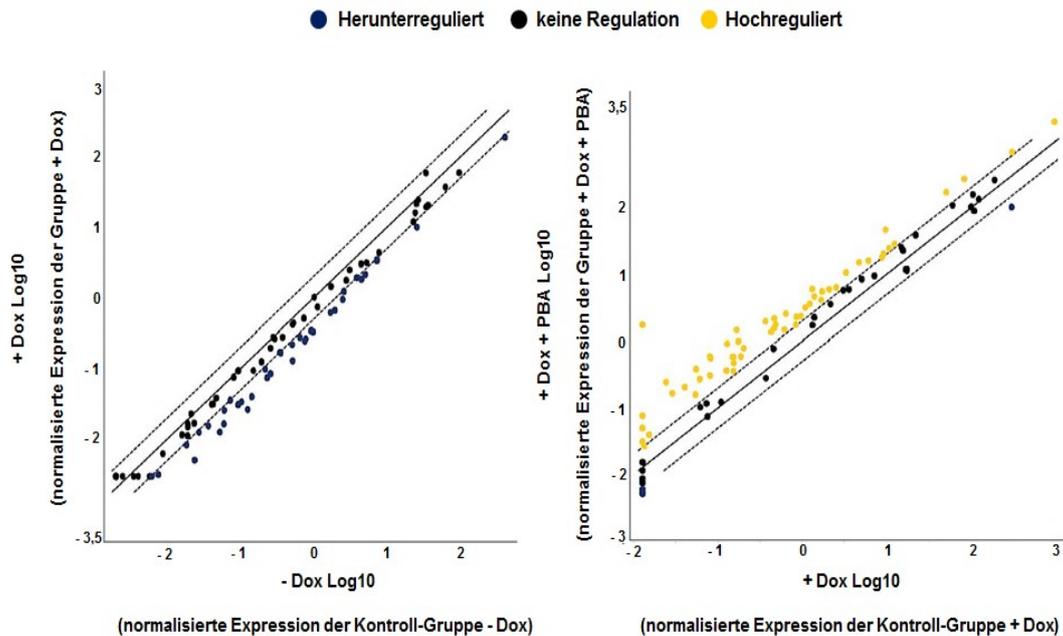


Abbildung 23: PBA induzierte eine Hochregulation proinflammatorischer Gene in Zellkultur.

Dargestellt ist die *mRNA*-Expression im Streudiagramm. Das Streudiagramm vergleicht die normalisierte Expression jedes Gens auf einem *PCR-Array* zwischen zwei Gruppen (Ordinate: Versuchsgruppe; Abszisse: Kontrollgruppe). Jeder Gen-spezifische $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Wert in einer Gruppe ist auf einer Achse gegen den entsprechenden Wert in der anderen Gruppe auf der anderen Achse (Log-Basis-10-Skala) aufgetragen, um die Genexpressionsänderungen darzustellen. Die gelben Punkte zeigen eine Hochregulation der untersuchten Gene, die schwarze Markierung zeigt keine Regulation und die blauen Punkte zeigen eine Herunterregulation an. Analysiert wurde die Genexpression nach Induktion der Expression des HBs-Transgens in HuH7 und Zugabe von PBA. PBA beeinflusste die Expression von AP-Genen auf *mRNA*-Ebene.

Abbildung 23 stellt die *mRNA*-Expression der analysierten Gene in einem Streudiagramm logarithmisch dar. Hierbei wurde die Expression jedes Gens auf dem *Array* zwischen den beiden ausgewählten Gruppen (Ordinate: Versuchsgruppe; Abszisse: Kontrollgruppe) verglichen, um die Genexpressionsänderung zu visualisieren. Die gelben Punkte zeigten eine Hochregulation der untersuchten Gene, die schwarze Markierung zeigte keine Regulation und die blauen Punkte zeigten eine verminderte Regulation an. Verglichen wurden zum einen die Ansätze der Zellen mit und ohne Dox-Induktion (Kontrollgruppe - Dox/ Versuchsgruppe + Dox) und zum anderen Zellen, die eine Dox-Induktion erhielten und eine zusätzliche Stimulation durch PBA

(Kontrollgruppe + Dox/ Versuchsgruppe + Dox/ + PBA). Die Analyse zeigte, dass die PBA-Gabe die *mRNA*-Expression proinflammatorischer Gene in Zellkultur anregt.

Im Anschluss wurde der Einfluss der PBA-Gabe auf die sieben am stärksten regulierten Gene mittels *q-RT PCR* validiert (vgl. Abb. 24).

Am stärksten reguliert waren hierbei: *Peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPARD)*; *Wingless-type MMTV Integration Site Family, Member 2B (WNT2B)*; *Glutathione Reductase (GSR)*; *Fas TNF Receptor Superfamily, Member 6 (FAS)*; *Carnitine Palmitoyltransferase 2 (CPT2)*; *Hairy/Enhancer-of-split related with YRPW Motif 1 (HEY1)* und *Baculoviral IAP Repeat Containing 3 (BIRC3)*. Die hier identifizierten Gene spielen eine Rolle im Hedgehog- und NF κ B-Signalweg. Die *CPT2*- und *BIRC3-mRNA* ist 3-fach und die *HEY1-mRNA* 2-fach induziert. Die reine PBA-Behandlung der Zellen veränderte die untersuchten *mRNA*-Expressionen nicht. Die PBA-Behandlung in Verbindung mit der Expression des HBs-Transgens löste die *mRNA*-Expression der beschriebenen Gene aus.

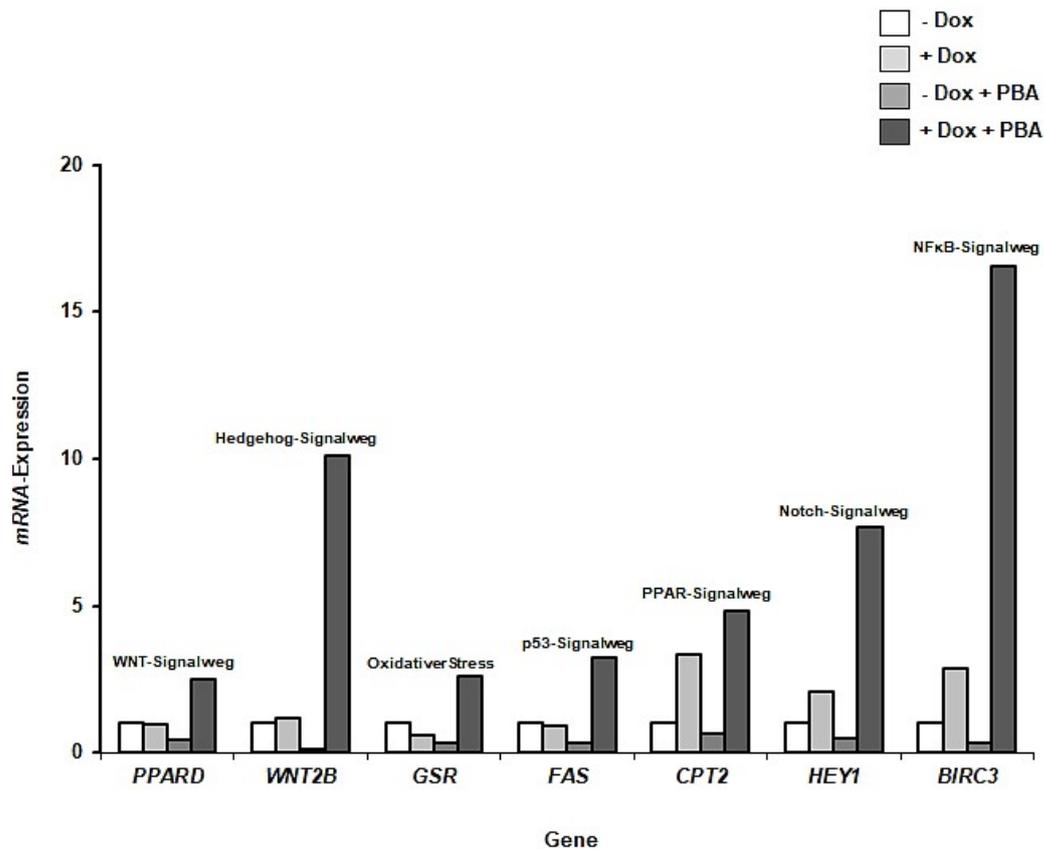


Abbildung 24: PBA induzierte Signalwege in HBs-transgenen Zellen.

Gezeigt ist die *mRNA*-Expression der Gene, die in Voranalysen des *Signal Transduction Pathway Finders* am stärksten reguliert waren: *Peroxisome proliferator-activated receptor delta* (*PPARD* +2,5x), *Wingless-type MMTV Integration Site Family, Member 2B* (*WNT2B* +10,1), *Glutathione Reductase* (*GSR* +2,6), *Fas TNF Receptor Superfamily, Member 6* (*FAS* +3,3), *Carnitine Palmitoyltransferase 2* (*CPT2* +4,8), *Hairy/Enhancer-of-split related with YRPW Motif 1* (*HEY1* +7,7) und *Baculoviral IAP Repeat Containing 3* (*BIRC3* +16,6). Untersucht wurden Zellkulturproben stabiler HBs-transgener HuH7-Zellen. Nach Induktion der Zellen mit Dox [2 mg/ml] und Zugabe von PBA [2 mM/ml] erfolgte die Analyse (siehe Legende oben rechts). Die Expression aller untersuchten Gene zeigte eine Hochregulation nach PBA-Behandlung in Zellkultur mit HuH7-Zellen.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass das Chaperon PBA die Expression von AP-Genen in HBs-transgenen Mäusen induzierte. Dabei wurde die Genexpression von *SAA1*, *SAA2* und *LCN2* zeitabhängig in unterschiedlichen Altersstufen der Mäuse verstärkt. In HBs-transgenen Zellen wurden Hedgehog- und NFκB-Signalwege deutlich durch PBA induziert.

3.3.3 Induktion der Proteinexpression von IP-10 und IL-16

Die PBA-Behandlung induzierte die Proteinexpression von IP-10 und IL-16. Im Rahmen einer APR kommt es zur Freisetzung proinflammatorischer Cytokine und Chemokine (Moshage 1997). In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe von Frau Univ.-Prof. Roeb wurde das Serum von 12 Wochen alten männlichen HBs-transgenen Mäusen mit und ohne PBA-Gabe mittels Proteom *Profilers* auf Cyto- und Chemokine analysiert. Die Mehrzahl der Cytokine und Chemokine stieg dabei durch die PBA-Behandlung an. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das Serum von 5 Wochen alten Wildtyp-, sowie HBs-transgenen Mäusen mit und ohne PBA-Gabe hinsichtlich der Cytokin- und Chemokin-Induktion durch PBA untersucht.

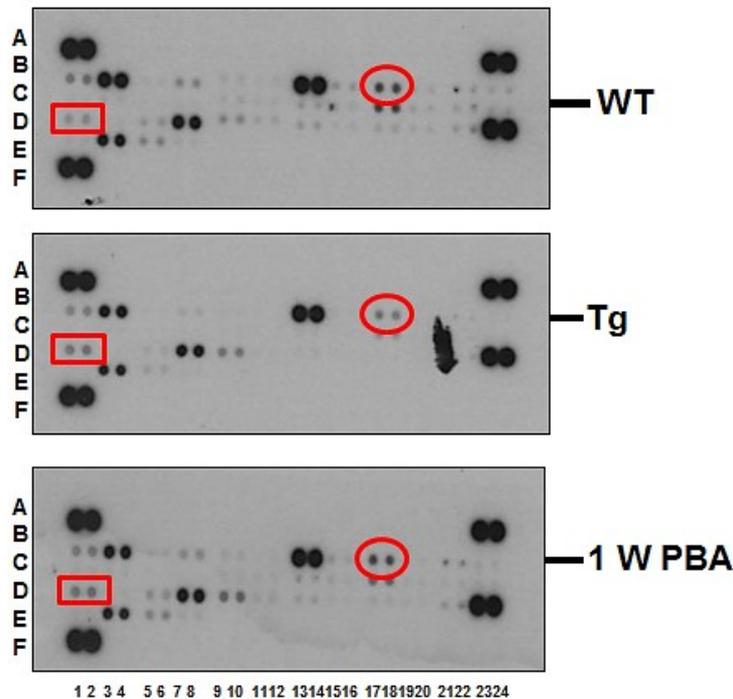


Abbildung 25: PBA verstärkte die Proteinexpression von IP-10 und IL-16 im Serum 5 Wochen alter HBs-transgener Mäusen.

Protein-Expressionsmuster von Cytokinen und Chemokinen aus Seren 5 Wochen alter männlicher HBs-transgener Mäuse (Serumpool n=3). WT (Wildtyp), Tg (HBs-transgen), 1 W PBA (HBs-transgen eine Woche PBA-behandelt). Die Spots D1/2 repräsentieren das Expressionsmuster für IP-10 (rotes Quadrat). Die PBA-Gabe steigerte die Expression von IP-10. Die Spots C17/18 stellen das Expressionsmuster für IL-16 dar (roter Kreis). Nach PBA-Behandlung war eine deutlich erhöhte Expression zu beobachten. Die Spots A1, A2, A23 und A24 zeigen die Positivkontrollen.

Die Expression des Proteins IP-10 im Serum 5 Wochen alter HBs-transgener Mäuse wurde im Vergleich zum Wildtyp durch das HBs-Transgen und PBA tendenziell reguliert. Das HBs-Transgen reduzierte die Expression, wohingegen diese durch die PBA-Gabe verstärkt wurde (vgl. Abb. 25/ Abb. 26). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Expression von IL-16 durch die PBA-Behandlung induziert wurde. Abbildung 25 veranschaulicht die dazugehörige Graustufenanalyse (Ordinate: Graustufenabgleich/ Abszisse: Versuchstiere).

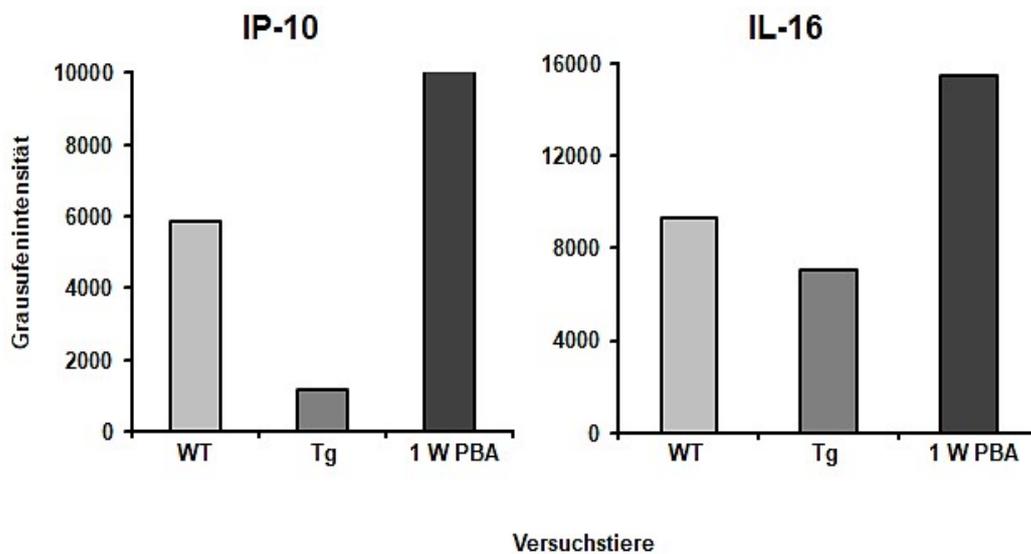


Abbildung 26: Die semiquantitative Auswertung des Proteom *Profilers* zeigte die verstärkte Proteinexpression von IP-10 und IL-16 im Serum 5 Wochen alter männlicher HBs-transgener Maus nach PBA-Behandlung.

Die quantitative Analyse der Graustufenintensität einer Wildtyp- (WT), einer HBs-transgenen (Tg) und für eine Woche mit PBA-behandelten Maus (1 W PBA) zeigte eine tendenzielle Zunahme der Proteine nach PBA-Gabe. Das HBs-Transgen reduzierte die Expression von IP-10 im Vergleich zur Expression von IL-16.

Die Ergebnisse zeigen zusammenfassend, dass die Freisetzung von proinflammatorischen Cytokinen und Chemokinen durch PBA-Gabe in 5 Wochen alten HBs-transgenen Mäusen hochreguliert war.

3.3.4 Regulation der Genexpression von *XBPI* durch PBA-bedingte ATF6-Aktivierung

Im Rahmen der ATF6-vermittelten APR diente der aktivierte Transkriptionsfaktor u.a. zur Induktion der Genexpression von *XBPI* (Zhang und Kaufman 2008). Die PBA-bedingte ATF6-Aktivierung regulierte die Genexpression von *XBPI* im Lebergewebe 19 Wochen alter männlicher HBs-transgener Mäuse. Die Genregulation von *XBPI* in 12 Wochen alten Mäusen blieb nahezu unverändert und die jungen Mäuse (5 Wochen) zeigten eine Regulation durch das Transgen. Abbildungen 27, 28 und 29 zeigen die Ergebnisse der *q-RT PCR*-Analysen von ungespleißter (*XBPIu*) und gespleißter *XBPI-mRNA* (*XBPIs*), (vgl. Abb. 5).

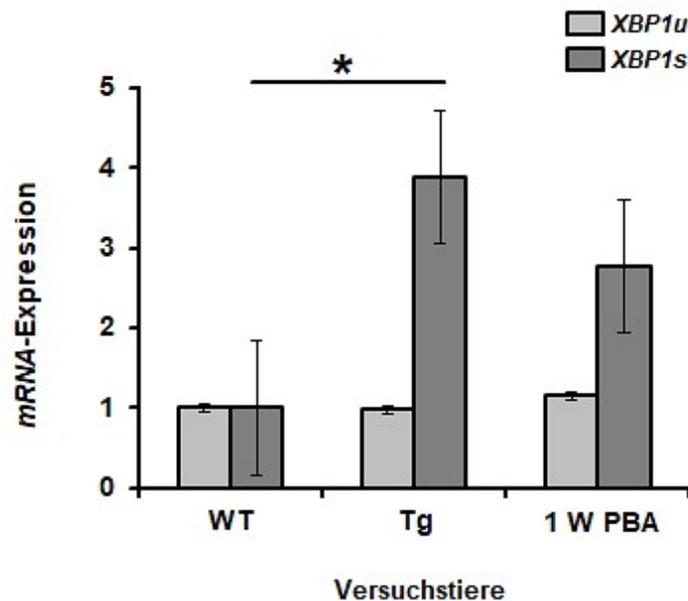


Abbildung 27: Die *mRNA*-Expression von *XBPIs* wurde durch das HBs-Transgen in 5 Wochen alten HBs-transgenen Mäusen gesteigert.

In HBs-transgenen (Tg) männlichen 5 Wochen alten Mäusen wurde eine signifikant höhere *mRNA*-Expression von *XBPIs* (gespleißt, siehe Legende oben rechts) im Vergleich zum Wildtyp (WT) beobachtet. Nach einer Woche PBA-Behandlung (1 W PBA) war eine tendenzielle Abnahme der *mRNA*-Expression zu beobachten. $p < 0.05$, Mittelwerte \pm SEM, 5 Wochen: WT n=3, Tg n=4, 1 W PBA n=4.

Nur *XBPIs* kann in den Kern transloziert werden und dort seine Funktion als Transkriptionsfaktor ausüben. Das HBs-Transgen induzierte eine Hochregulation der gespleißten Variante von *XBPI* (vgl. Abb. 27). Verglichen zum HBs-Transgen

wurde eine tendenzielle Abnahme der *mRNA*-Expression von *XBPIs* nach einwöchiger PBA-Gabe beobachtet. Die Genexpression des ungespleißten Produktes blieb hingegen nahezu unverändert.

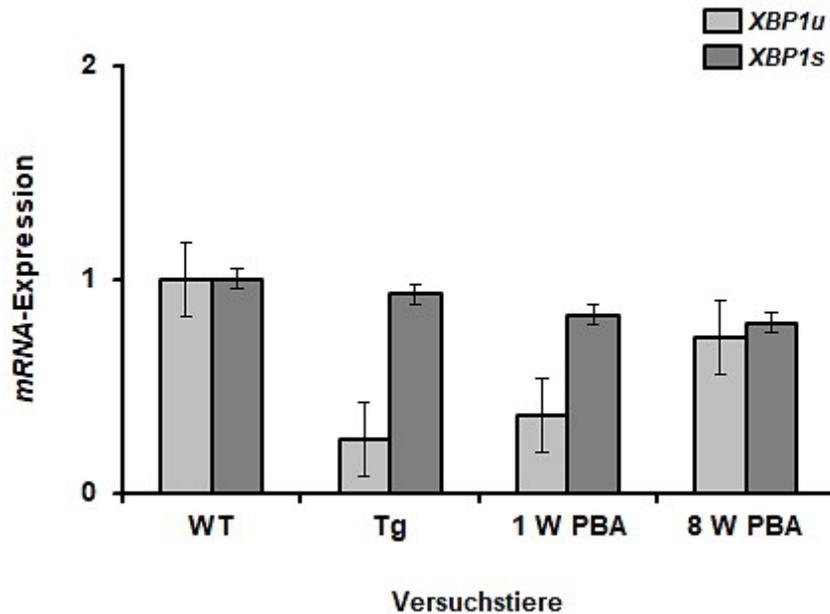


Abbildung 28: PBA bewirkte in 12 Wochen alten HBs-transgenen Mäusen eine tendenzielle Zunahme der *mRNA*-Expression von *XBPIu*.

Wildtyp (WT), HBs-transgen (Tg), HBs-transgen behandelt mit PBA für eine Woche (1 W PBA) und acht Wochen (8 W PBA). In den HBs-transgenen Mäusen wurde eine niedrige *mRNA*-Expression des ungespleißten *XBPIu* (ungespleißt, siehe Legende oben rechts) beobachtet. Nach ein- und achtwöchiger PBA-Behandlung war eine tendenzielle Zunahme der *mRNA*-Expression zu beobachten. Mittelwerte \pm SEM, 12 Wochen: WT n=3, Tg n=3, 1 W PBA n=5, 8 W PBA n=4.

In 12 Wochen alten männlichen HBs-transgenen Mäusen war die *mRNA*-Expression des *XBPIu* tendenziell herabgesetzt, während *XBPIs* unverändert exprimiert wurde. Durch eine ein- bzw. achtwöchige PBA-Behandlung wurde die *mRNA*-Expression von *XBPIu* im Vergleich zum Wildtyp tendenziell angeglichen. In 19 Wochen alten HBs-transgenen Mäusen wurde die Expression von *XBPIs* um ein 3,5-faches verstärkt während die Expression von *XBPIu* keine Veränderung zeigte. Die Induktion von *XBPIs* wurde durch die achtwöchige PBA-Behandlung auf Wildtyp-Level reduziert (vgl. Abb.29).

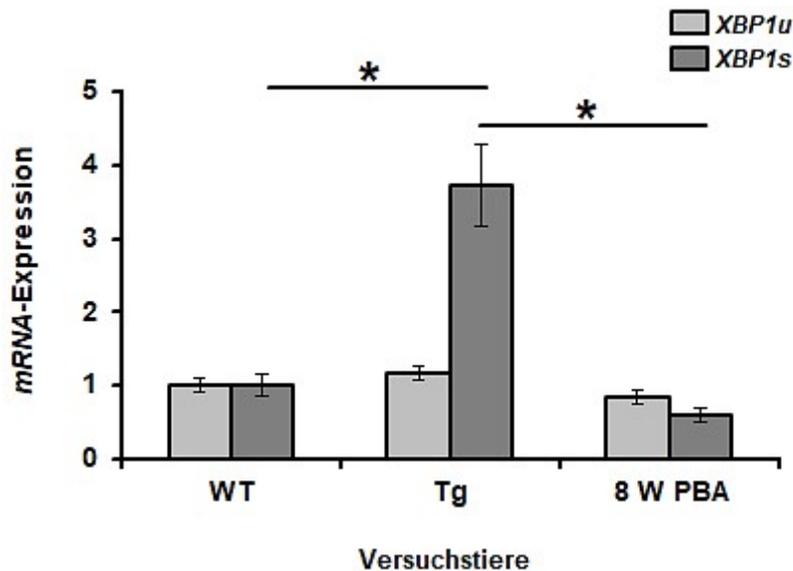


Abbildung 29: PBA normalisierte die durch das HBs-Transgen induzierte Genexpression von *XBP1s* in 19 Wochen alten HBs-transgenen Mäusen.

XBP1s (gespleißt) wurde in männlichen HBs-transgenen Mäusen (Tg) im Vergleich zum Wildtyp (WT) 3,5x verstärkt exprimiert, wohingegen keine veränderte Expression von *XBP1u* (ungespleißt) beobachtet werden konnte. Nach achtwöchiger PBA-Behandlung (8 W PBA) war die *XBP1s*-Genexpression normalisiert (siehe Legende oben rechts). $p^* < 0.05$, Mittelwerte \pm SEM, 19 Wochen: WT n=3, Tg n=4, 8 W PBA n=4.

Der Quotient aus beiden PCR-Produkten lässt eine Aussage über die funktionelle Regulation von *XBP1* zu (vgl. Tab. 5). Das *XBP1u*/*XBP1s*-Verhältnis korreliert mit dem Genexpressions-Level von exprimierten Proteinen, um die Faltungskapazität des ER an die jeweiligen Anforderungen anzupassen (Calfon *et al.* 2002). Gespleißte *XBP1-mRNA* fördert die Aktivierung der Expression spezifischer Gene, um den ER-Stress zu lindern (Tsuru *et al.* 2016). Der Quotient wies eine höhere Menge an gespleißtem *XBP1*-Produkt auf. Es wurde deutlich, dass in allen Altersstufen die höchste Regulation von *XBP1* im HBs-transgenen Modell mit einem Quotienten von 4,3 und 3 zu beobachten war. Die für eine Woche mit PBA behandelten Mäuse zeigten einen Quotienten von 2,5 und 2. Der Quotient mit dem Wert 1,1 und 0,75 wurde in den Proben der Mäuse ermittelt, die acht Wochen eine PBA-Gabe erhielten.

Quotient aus <i>mRNA-XBP1u</i> & <i>mRNA-XBP1s</i>	5 Wochen	12 Wochen	19 Wochen
Transgen (Tg)	4,3	3	3
Eine Woche PBA-behandelt (1 W PBA)	2,5	2	-
Acht Wochen PBA-behandelt (8 W PBA)	-	1,1	0,75

Tabelle 5: Der Quotient aus ungespleißtem und gespleißtem *q-RT PCR*-Produkt zeigte eine Regulation der *mRNA*-Expression von *XBPI* durch PBA-Behandlung der HBs-transgenen Mäuse an.

Die Genregulation von *XBPIu* (ungespleißt) und *XBPIs* (gespleißt) von 5-, 12- und 19-Wochen alten HBs-transgenen (Tg) männlichen Mäusen wurde analysiert und der Wildtyp (WT) gleich 1 gesetzt. Dargestellt ist das Verhältnis ungespleißter zu gespleißter *mRNA* im HBs-transgenen, eine Woche (1 W PBA) und acht Wochen PBA-behandelten (8 W PBA) HBs-transgenen Maus-Modell. In jeder Altersklasse war eine Regulation des Gens erkennbar. Die höchste Regulation zeigte sich im HBs-transgenen Modell verglichen zum Wildtyp. 5 Wochen: WT n=3, Tg n=4, 1 W PBA n=4, 12 Wochen: WT n=3, Tg n=3, 1 W PBA n=5, 8 W PBA n=4, 19 Wochen: WT n=3, Tg n=4, 8 W PBA n=4.

Der Quotient aus *XBPIu* und *XBPIs* zeigte die höchste Genexpression von *XBPI* im HBs-transgenen Maus-Modell und die geringste nach PBA-Gabe.

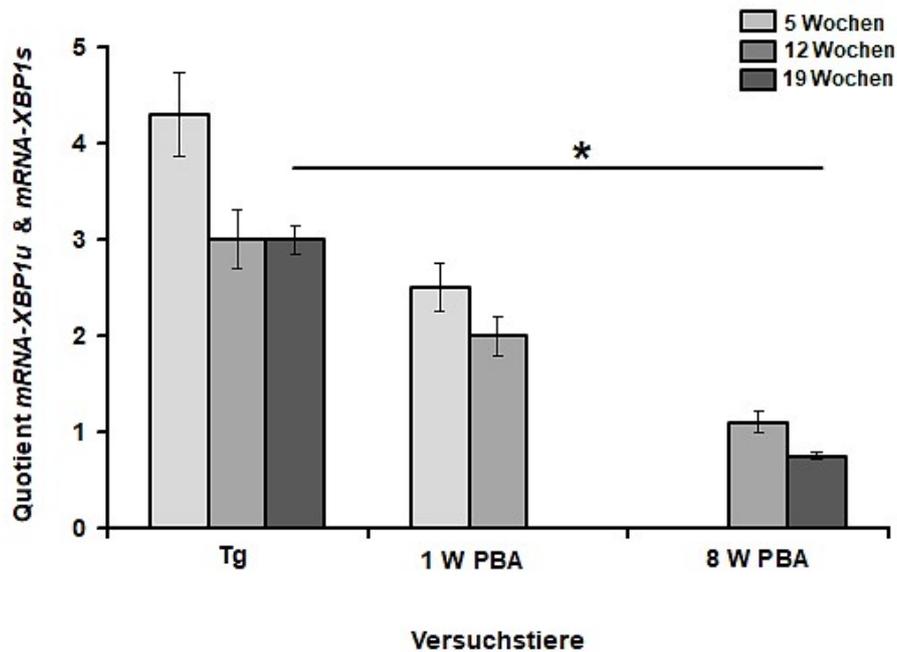


Abbildung 30: Der Quotient aus *mRNA-XBP1u* und *mRNA-XBP1s* zeigte die höchste Genregulation von *XBPI* im HBs-transgenen Maus-Modell.

Abgebildet ist das Verhältnis ungespleißter (*XBPIu*) zu gespleißter (*XBPIs*) *mRNA* im HBs-transgenen (Tg), eine (1 W PBA) und acht Wochen PBA-behandelten (8 W PBA) HBs-transgenen Maus-Modell (siehe Legende oben rechts). Der Wildtyp (WT) wurde zur Analyse gleich 1 gesetzt. Getestet wurden 5-, 12- und 19 Wochen alte männliche HBs-transgene Mäuse. In allen Altersgruppen war eine tendenzielle zeitabhängige Abnahme des Quotienten nach PBA-Gabe zu beobachten. $p^* < 0.05$, Mittelwerte \pm SEM, 5 Wochen: WT n=3, Tg n=4, 1 W PBA n=4, 12 Wochen: WT n=3, Tg n=3, 1 W PBA n=5, 8 W PBA n=4, 19 Wochen: WT n=3, Tg n=4, 8 W PBA n=4.

Die Berechnung des Quotienten der verschiedenen Altersgruppen zeigte einen Unterschied in der Regulation von ungespleißtem und gespleißtem *XBPI* PCR-Produkt im HBs-transgenen und dessen PBA-behandelten Maus-Modell. Die 5 Wochen HBs-transgene Gruppe wies eine 4,3-fache Erhöhung der Genexpression von *XBPIs* auf, die PBA-Probe hingegen eine 2,5-fache erhöhte Expression (vgl. Tab. 5). In der Altersklasse der 12 Wochen alten Mäuse (vgl. Abb. 28) wurde deutlich, dass der Quotient eine wesentliche Rolle spielte. Im HBs-transgenen Modell war eine 3-fach höhere *mRNA*-Expression an *XBPIs* zu erkennen. Die einwöchig behandelte PBA-Gabe wies eine 2-fache und die achtwöchig behandelte Probe eine 1,1-fache höhere *mRNA*-Menge auf. Die Berechnung der Altersklasse von 19 Wochen zeigte im HBs-transgenen Modell eine 3-fache

höhere Menge an *XBPIs* auf. Nach achtwöchiger PBA-Gabe sank der Quotient auf 0,75.

3.4 Beeinflussung des Energiestoffwechsels

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe von Frau Univ.-Prof. Roeb wurde gezeigt, dass HBs-transgene Mäuse mehr Lipide speichern als Wildtyp-Mäuse. Die PBA-Behandlung beeinflusste den Energiestoffwechsel. Daher wurde im weiteren Verlauf die durch den modulierten Energiestoffwechsel veränderte Mitochondrien-Struktur untersucht, um Rückschlüsse zwischen der Kommunikation der Organellen und ER-Stress ziehen zu können.

3.4.1 Wirkung des HBs-Transgens auf den Energiestoffwechsel

Das HBs-Transgen in männlichen HBV-Mäusen beeinflusste die Struktur der Mitochondrien und war für eine vermehrte Lipidspeicherung verantwortlich (vgl. Abb. 31). Abbildung 31 zeigt elektronenmikroskopische Aufnahmen von Lebergewebe einer 12 Wochen alten Wildtyp- und HBs-transgenen Maus. Die abgebildete Zellstruktur des Wildtyps zeigt den Zellkern (ZK), die Mitochondrien (M) und das ER. Das HBs-transgene Maus-Modell wies eine morphologische Veränderung der Mitochondrien durch Abrundung auf (gestrichelte Linie). Überdies sind im vergrößerten Ausschnitt vermehrt Lipideinlagerungen zu sehen. Das HBs-Transgen beeinflusste den Energiestoffwechsel in HBs-transgenen Mäusen.

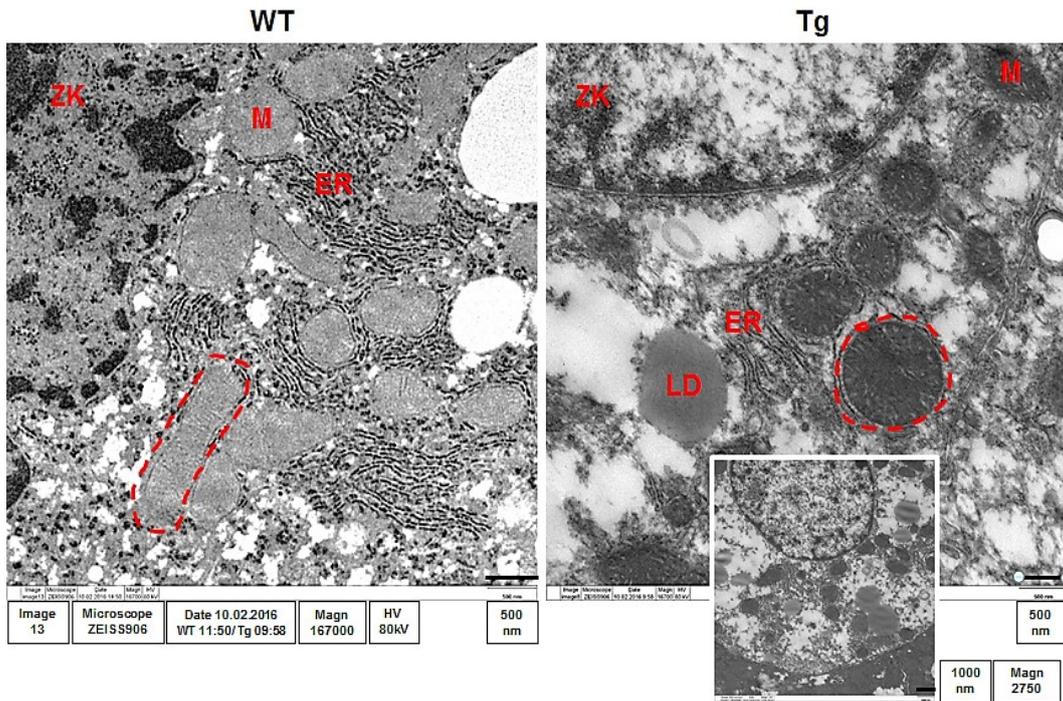


Abbildung 31: Das HBS-Transgen veränderte die Struktur der Mitochondrien und verursachte eine vermehrte Lipidspeicherung im HBS-transgenen Maus-Modell.

Repräsentative elektronenmikroskopische Aufnahme der Zellstruktur im Lebergewebe 12 Wochen alter männlicher Mäuse. Wildtyp (WT) und HBS-transgen (Tg). Der WT wies eine normale Struktur des Zellkerns (ZK), der Mitochondrien (M) und des endoplasmatischen Retikulums (ER) auf. Im HBS-transgenen Maus-Modell war eine morphologische Veränderung der Mitochondrien durch Abrundung und eine erhöhte Lipidspeicherung (Lipid-Droplets (LD)) in der Zelle erkennbar. Vergrößerung: 16700x, Messbalken 500 nm. Ausschnitt: Vergrößerung hier: 2750x, Messbalken 1000 nm. Die Aufnahme zeigt repräsentative Mäuse aus den Gruppen. 12 Wochen: n=4.

Mitochondrien und das ER interagieren sowohl physiologisch als auch funktionell miteinander. Ein wichtiger Aspekt dieser Interaktion sind die Calciumionen-Signalwege zwischen den beiden Organellen. Die Kommunikation findet über *MAMs* statt (Malhotra und Kaufman 2011). IP3R ist ein *MAM*-spezifisches Protein, welches im nächsten Schritt untersucht wurde (vgl. Abb. 5).

3.4.2 Verstärkte IP3R-Expression durch PBA

Die PBA-Behandlung induzierte eine verstärkte Proteinexpression von IP3R in männlichen HBs-transgenen Mäusen. Zu Beginn der UPR übernimmt IP3R eine wesentliche Rolle in den Calciumionen-Signalwegen des ER und die IP3R-Aktivierung kann spezielle Proteine wie GRP78 und ERp44 beeinflussen. Aufgrund der veränderten *MAM*-Struktur, kommt es dort zu Veränderungen der Calciumionenkonzentration. In vorherigen Studien der *Microarray*-Subanalyse (vgl. Kapitel 1.2) konnte auf transkriptioneller Ebene eine Hochregulation von *IP3R-mRNA* nach PBA-Induktion gezeigt werden.

Der Proteinnachweis von IP3R erfolgte über die *Western Blot*-Analyse (vgl. Abb. 32). Dafür wurden Leberlysate 12 Wochen alter Mäuse getestet: Wildtyp, HBs-transgen und HBs-transgen mit PBA behandelt (einwöchige und achtwöchige Gabe). Die PBA-behandelten Maus-Gruppen wiesen eine verstärkte Expression des Proteins bei 320 kDa im Vergleich zum Wildtyp auf. Das HBs-Transgen bewirkte eine geringe Expressionszunahme. β -Actin (42 kDa) veranschaulichte als Kontrolle die gleichmäßige Beladung der Proteine.

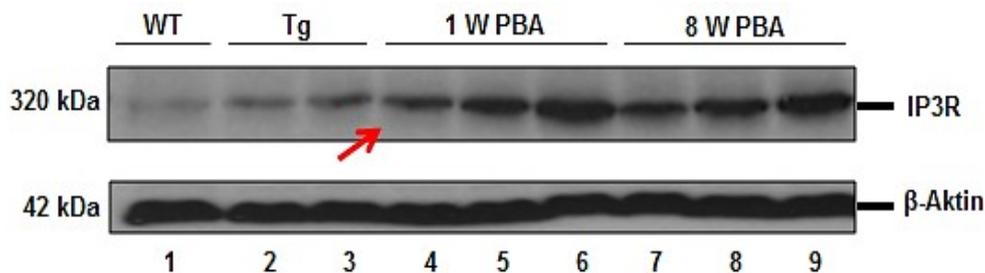


Abbildung 32: PBA aktivierte IP3R im HBs-transgenen Maus-Modell.

Protein-Expressionsmuster von IP3R aus Leberlysaten 12 Wochen alter männlicher Wildtyp- (WT), HBs-transgener (Tg) und HBs-transgener PBA-behandelter Mäuse (eine Woche behandelt (1 W PBA) und acht Wochen behandelt (8 W PBA)). Repräsentative *Western Blot*-Analyse mit Antikörper gerichtet gegen IP3R und β -Actin. Das HBs-Transgen induzierte eine geringe Zunahme der Expression von IP3R, während die PBA-Behandlung die Expression von IP3R deutlich steigert. 12 Wochen: 1- WT; 2-3 Tg; 4-6 Tg + 1 W PBA behandelt; 7-9 Tg + 8 W PBA; 8- Tg + 8 W PBA; 9- Tg + 8 W PBA. Die *Western Blot*-Banden zeigen repräsentative Mäuse aus den Gruppen. 12 Wochen: WT n=4, Tg n=4, 1 W PBA n=5, 8 W PBA n=5. β -Actin diente der gleichmäßigen Beladung.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass das HBs-Transgen die Mitochondrien-Struktur der Hepatozyten veränderte. PBA induzierte die Aktivierung von IP3R, welches u.U. eine Erhöhung des Calciumionenflusses zur Folge haben kann. IP3R gehört wie ATF6 zu den ER-Stress-Sensoren (Kiviluoto *et al.* 2013). Während der UPR wird ERp44 hochreguliert, um den Calciumionenaustausch zwischen den Mitochondrien und dem ER zu regulieren (Tateishi *et al.* 2005). Die Bindung von ERp44 an IP3R hängt von der Calciumionenkonzentration und somit vom Energiemetabolismus ab (Malhotra und Kaufman 2011). In diesem Zusammenhang wurde ERp44 und das große HBV-Oberflächenprotein LHB im Maus-Lebergewebe untersucht.

3.4.3 Zeitabhängige Reduktion der ERp44-Expression durch PBA

Die Expression von ERp44 verringerte sich zeitabhängig nach einer Woche und acht Wochen PBA-Behandlung. Abbildung 33 zeigt die immunhistochemische Co-Färbung von ERp44 (rot) und LHB (grau). Das HBs-Transgen induziert die Expression von ERp44 und LHB. Auffällig war die Expression beider Proteine in einem bestimmten abgegrenzten Reaktionsraum (Kompartiment) im Lebergewebe der HBs-transgenen und HBs-transgenen PBA-behandelten Maus. Es konnte keine Reduktion der Proteinexpression von LHB nach PBA-Gabe beobachtet werden.

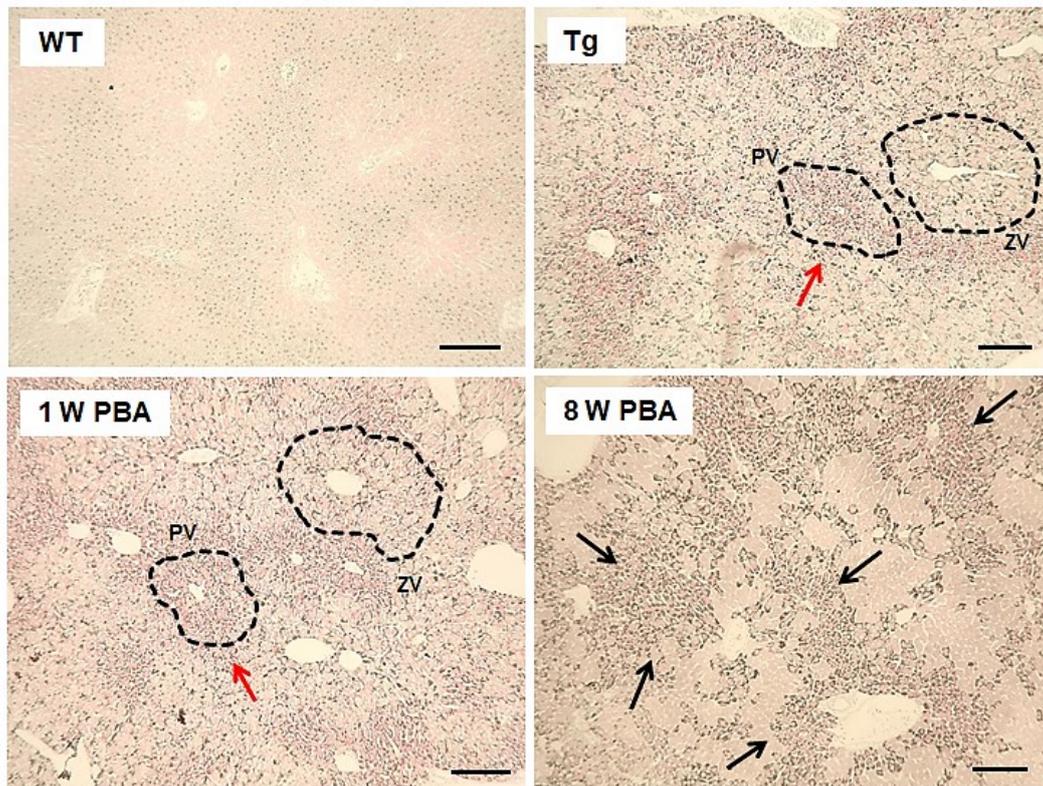


Abbildung 33: PBA reduzierte zeitabhängig die Expression von ERp44 im Lebergewebe von HBs-transgenen Mäusen.

Immunhistochemische Co-Färbung von ERp44 (rot) und LHB (grau) im Lebergewebe 12 Wochen alter männlicher HBs-transgener Mäuse. Das HBs-Transgen (Tg) induzierte die Expression von ERp44 und LHB im Vergleich zum Wildtyp (WT). Eine starke Induktion beider Proteine war anhand der Kompartimentierung (gestrichelte Linie PV) zu beobachten und um die Portalvene (PV) stark erhöht (roter Pfeil), um die Zentralvene (ZV) hingegen nicht (Abb. Tg/ 1 W PBA). Die Expression von ERp44 verringerte sich zeitabhängig nach einer Woche (1 W PBA) und acht Wochen PBA-Behandlung (8 W PBA) (schwarze Pfeile). Die PBA-Gabe hatte keinen Einfluss auf die Reduzierung der LHB-Expression. Hämalaun-Kernfärbung, Vergrößerung 100x, Messbalken 100 μ m.

Die Induktion beider Proteine war anhand der Kompartimentierung zu beobachten und ist um die Portalvene (PV) stark erhöht. Der Bereich um die Zentralvene (ZV) zeigte den Effekt hingegen nicht. Die PBA-Behandlung verringerte die Expression von ERp44 zeitabhängig, die Expression von LHB jedoch nicht.

Zusammenfassend zeigten sich betreffend den Energiestoffwechsel eine minimale Aktivierung von IP3R und eine starke Expression von ERp44 in HBs-transgenen Mäusen im Vergleich zum Wildtyp. Die PBA-Behandlung bewirkte eine eindeutige Aktivierung von IP3R und eine zeitabhängige Reduzierung des Proteins ERp44. Auffallend war die erhöhte Proteinexpression von ERp44 und LHB im Bereich der Portalvene (vgl. Abb. 33 Tg/ 1 W PBA). In diesem Bereich herrschen sauerstoffreiche Bedingungen. Das Sauerstoffangebot wird bis hin zur Zentralvene geringer (Hypoxie).

ERp44 und die Aktivierung von IP3R sind für die Calciumionenhomöostase in den Zellen verantwortlich. Da IP3R ebenfalls ein ER-Stress Sensor wie ATF6 ist, wurde folglich in Zellkultur die Expression des Transkriptionsfaktors unter Hypoxiebedingungen getestet.

3.5.4. PBA reduzierte die Expression von ATF6 in Zellkultur

Zellkulturlysate der stabil HBs-transgenen HuH7-Zellen wurden mittels der *Western Blot*-Analyse unter Hypoxiebedingungen und PBA-Gabe untersucht. Abbildung 34 veranschaulicht das Ergebnis. Dabei konnte eine reduzierte Expression von ATF6 nach Induktion des HBs-Transgens und PBA-Gabe beobachtet werden (roter Pfeil).

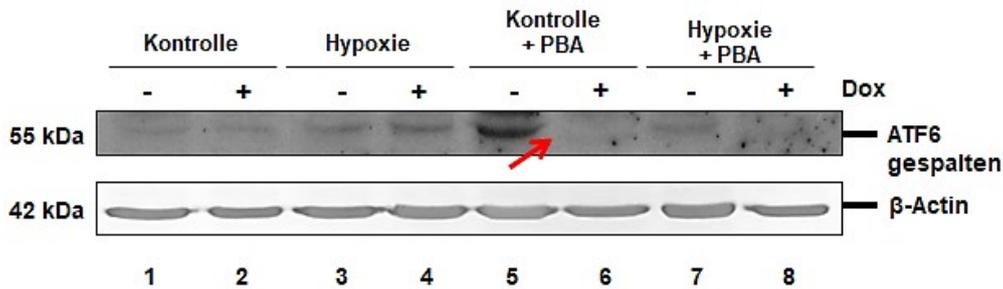


Abbildung 34: Die Expression von ATF6 wurde durch das HBs-Transgen und die PBA-Gabe in Zellkultur reduziert.

Protein-Expressionsmuster des Transkriptionsfaktors ATF6 aus Zellkulturlysaten stabiler HBs-transgener HuH7-Zellen. *Western Blot*-Analyse unter Hypoxiebedingungen (HyB), Dox-Induktion [2 mg/ ml] und PBA-Gabe [2 mM/ ml]. Antikörper gerichtet gegen ATF6 und β -Actin. PBA hatte einen Einfluss auf die Expression von ATF6 nach Induktion mit Dox in HuH7 Zellen. Die Expression wurde reduziert (roter Pfeil). Die Zellen ohne Dox-Induktion zeigten nach alleiniger PBA-Gabe eine deutliche Aktivierung von ATF6. β -Actin diente zur Ladungskontrolle. 1- HuH7 Lx ohne Zugabe von Dox; 2- HuH7 Lx mit Zugabe von Dox; 3- HuH7 Lx unter HyB ohne Zugabe von Dox ; 4- HuH7 Lx unter HyB mit Zugabe von Dox; 5- HuH7 Lx ohne Zugabe von Dox + PBA; 6- HuH7 Lx mit Zugabe von Dox + PBA; 7- HuH7 Lx unter HyB ohne Zugabe von Dox + PBA ; 8- HuH7 Lx unter HyB mit Zugabe von Dox + PBA. n=3.

Die Ergebnisse zeigen, dass die PBA-Behandlung gegebenenfalls einen Einfluss auf den Energiestoffwechsel in Hepatozyten HBs-transgener Mäuse hatte. Morphologische Veränderungen der Mitochondrien durch Abrundung und eine vermehrte hepatische Lipidspeicherung waren im HBs-transgenen Maus-Modell elektronenmikroskopisch erkennbar. Überdies aktivierte die PBA-Behandlung das *MAM*-Protein IP3R im Lebergewebe. Unter ER-Stress Bedingungen hängt die Bindung von ERp44 an IP3R vom Energiemetabolismus ab (Decuypere *et al.* 2011). Das HBs-Transgen induzierte die Expression von ERp44, die sich nach PBA-Behandlung zeitabhängig reduzierte.

Da IP3R genauso wie ATF6 zu den UPR-Sensoren zählt (Kiviluoto *et al.* 2013), wurde ATF6 unter sauerstoffarmen Bedingungen *in vitro* geprüft. PBA reduzierte in Kombination mit dem HBs-Transgen die Expression von ATF6 in Zellkultur und induzierte die Proteinexpression nach alleiniger PBA-Gabe.

Fazit: Das synthetische Chaperon PBA verringerte die Expression natürlicher Chaperone und aktivierte den ATF6-Signalweg sowie eine APR in HBs-transgenen Mäusen und in Zellkultur.

4 Diskussion

Global leiden ca. 350 Millionen Menschen an einer chronischen HBV-Infektion, welche weltweit die Hauptursache für Leberzirrhose und die Entwicklung von Folgeerkrankungen wie das HCC ist (Dienstag 2008). Die Leber-Pathologie bei der HBV-Infektion wird im Wesentlichen von der Reaktion des Immunsystems gegen infizierte Hepatozyten bestimmt (Meuleman *et al.* 2006). Weiterhin können auch Komponenten des Virus, wie z.B. die Akkumulation der HBV-Hüllproteine im ER zellschädigende Wirkung verursachen. Dieser direkte virale Schädigungsmechanismus kann in den Zellen zu ER-Stress, Apoptose und letztendlich zur Schädigung der Leber führen (Montalbano *et al.* 2016; Scheper und Hoozemans 2009). Das in dieser Arbeit analysierte HBs-transgene Maus-Modell simuliert die Pathologie der direkten zellschädigenden Wirkung der Expression der HBV-Hüllproteine. LHB, das große HBV-Oberflächenprotein, wird in den Hepatozyten der HBs-transgenen Maus überexprimiert. Das synthetische Chaperon PBA bewirkt bei verschiedenen Protein-Aggregationskrankheiten den Abbau zellschädigender Aggregate und hat daher ein hohes therapeutisches Potential bei der Behandlung von Proteinspeicherkrankheiten (Kolb *et al.* 2015; Wiley *et al.* 2011).

In der vorliegenden Arbeit sollte daher das therapeutische Potential von PBA im HBs-transgenen Maus-Modell untersucht werden, um Aussagen über eine Verbesserung der Leber-Pathologie treffen zu können. Die HBs-transgenen Mäuse wurden im Alter von 5, 12 und 19 Wochen mit dem Chaperon PBA über einen Zeitraum von einer Woche und acht Wochen oral behandelt. In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe von Frau Univ.-Prof. Roeb wurde bereits die konsekutive Feinverteilung der intrazellulären HBs-Aggregate durch PBA gezeigt. Die durch PBA aus den Aggregaten freigesetzten Oberflächenproteine führten zu ER-Stress und der daraus resultierenden Zellantwort, der UPR (Hetz 2012).

An diesem Modell wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Mechanismen zwischen der Feinverteilung der intrazellulären HBs-Aggregate und der Induktion einer APR unter besonderer Berücksichtigung des Transkriptionsfaktors ATF6 im HBs-transgenen Maus-Modell untersucht.

Dabei konnte gezeigt werden, dass das synthetische Chaperon PBA die Proteinexpression der natürlichen Chaperone GRP78 und PDI reduziert und den

ATF6-Signalweg aktiviert. Als direkte Folge der Aktivierung des ATF6-Signalweges wurde eine APR in HBs-transgenen Mäusen nachgewiesen. Es konnte eine Hochregulation der Genexpression von *SAA1* und *SAA2* und der AP-Proteine *HP* und *ISG56* in Zellkultur gezeigt werden.

Im Einzelnen bedeutet dies:

1. PBA verringerte die Proteinexpression natürlicher Chaperone im Maus-Lebergewebe
2. PBA induzierte die Aktivierung und Kernlokalisierung des Transkriptionsfaktors ATF6
3. PBA induzierte vermutlich über den ATF6-Signalweg eine hepatische APR
4. Die Induktion der APR durch Freisetzung der Oberflächenproteine aus den Aggregaten könnte die Ursache für die fehlende therapeutische Wirkung von PBA im HBs-transgenen Maus-Modell sein
5. PBA beeinflusste den Energiestoffwechsel via *MAMs*
6. Die Proteinexpression von IP3R und ERp44 wurde durch PBA beeinflusst

Verglichen mit dem *Study Design* aus Abbildung 5 kann folgendes zusammengefasst werden:

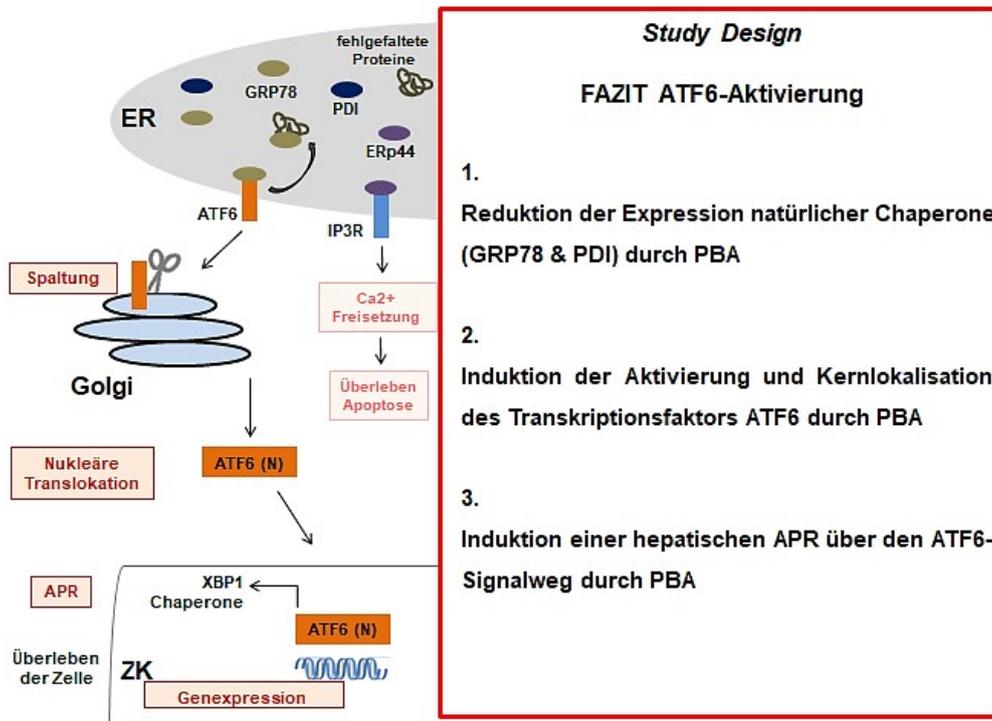


Abbildung 35: *Study Design*. Fazit ATF6-Aktivierung nach PBA-Gabe.

Abbildung 35 zeigt schematisch und komprimiert die Zusammenfassung der Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit anhand der analysierten ATF6-Signalkaskade im HBs-transgenen Maus-Modell und in Zellkultur nach PBA-Behandlung (vgl. Abb.3).

4.1 Diskussion des Maus-Modells und des Zellkultur-Modells

Die Analysen der Studie wurden am HBs-transgenen Maus-Modell und an humanen Hepatomzellen HuH7 (Sun und Nassal 2006) mit HBs-Expressionsinduktion durchgeführt.

Das Maus-Modell bietet gegenüber der Zellkultur den Vorteil, dass die Mäuse tolerant gegenüber dem HBs-Transgen und nicht von einer immunologischen Leberschädigung betroffen sind (Dandri *et al.* 2013). Im Versuchsansatz sollte die klinische Relevanz des synthetischen Chaperons PBA bei HBV zur Aufklärung spezieller Signalkaskaden analysiert werden. In dem hier beschriebenen Maus-Modell war es möglich, die direkte durch HBs-Aggregate ausgelöste Pathologie und den Einfluss von PBA darauf zu untersuchen. Dennoch besteht in der

Methodik nur eine limitierte Interpretation der Ergebnisse, da in dem Modell keine Virusinfektion vorliegt. Eine weitere Einschränkung war die fehlende Expression von HBx-Protein. HBx ist im Transgen des Maus-Modells vorhanden, es konnte jedoch keine Expression nachgewiesen werden (hier nicht gezeigt). Demzufolge konnte keine Interpretation der Wirkung von PBA auf die Expression von HBx erfolgen.

LHBs/HBx-transgene HuH7-Zellen wurden mittels Co-Transfektion eines klonierten lentiviralen Transfer-Plasmids, bestehend aus einem kleinen CMV-Promotor (Tokushige *et al.* 1997) und eines lentiviralen Regulator-Plasmids, hergestellt und über Dox gesteuert (Urlinger *et al.* 2000). Dadurch bestand die Möglichkeit, durch verschiedene Konzentrationen von Dox die Expression des HBs-Transgens zu regulieren (Tetrazyklin-gesteuerte Genregulation (*Tet-On-System*)). Eine Interpretation der Wirkung von PBA auf die HBx-Expression konnte auch in Zellkultur nicht nachgewiesen werden. Aufgrund der dreidimensionalen Struktur der menschlichen Zellen im Gegensatz zu 2D-Zellkultur-Modellen ist das Ergebnis nicht vollständig auf den menschlichen Organismus übertragbar.

4.2 Limitationen des Projektes

Den Mäusen wurde im Tierversuch über unterschiedliche Zeiträume PBA über das Trinkwasser appliziert (vgl. Kapitel 1.4) (Bachmanov *et al.* 2002). Durch das unterschiedliche Trinkverhalten der Mäuse könnten voneinander abweichende Ergebnisse, die im Laufe der Arbeit beobachtet wurden, erklärt werden. Eine Verbesserung der Homogenität könnte durch eine intraperitoneale Applikation von PBA erreicht werden (Wang *et al.* 2013a). Gleichwohl sind deutliche Effekte durch PBA im Mausversuch erkennbar und auswertbar.

Ferner wurden die Ergebnisse mit der Kontrollgruppe der Wildtyp-Mäuse verglichen, um Rückschlüsse auf das HBs-Transgen und die PBA-Behandlung ziehen zu können. Um die Aussagekraft der Ergebnisse zu verstärken und PBA-induzierte Veränderungen zu analysieren, wäre ein Vergleich der Kontrollgruppe Wildtyp-Maus mit und ohne PBA-Gabe sowie die Untersuchungen im weiblichen HBs-transgenen Maus-Modell erforderlich.

Da aufgrund epigenetischer Effekte in einigen Mäusen kein HBsAg nachgewiesen werden konnte (Graumann *et al.* 2015), beschränkte sich die Zahl auf n=3-5 Versuchstiere. Mit einem höheren Stichprobenumfang wären die Ergebnisse aussagekräftiger.

Die ATF6-Expression unter HBs-Transgen-Induktion und PBA-Gabe auf Proteinebene konnte in Zellkultur nicht nachgewiesen werden. Die Experimente spiegelten die komplexen Vorgänge in humanen Hepatomzellen nicht wider. Eine Etablierung des Modells und eine spezifische Herunterregulierung von ATF6 durch *RNA*-Interferenz in Zellkultur könnten einen wesentlichen Effekt von ATF6 aufzeigen. Erschwerend kommt hinzu, dass die Einwirkungen in Zellkultur ein differentes Verhalten im Vergleich zu Hepatozyten im Lebergewebe (hier murinen Ursprungs) aufweisen. Begründet wird dies u.a. anhand der fehlenden dreidimensionalen Zellarchitektur und den Interaktionen mit Nichtparenchymzellen (Dandri *et al.* 2006). Deshalb lassen sich die gewonnenen Erkenntnisse nur mit Einschränkungen auf den lebenden Organismus übertragen.

4.3 Ergebnisdiskussion

Aktuell findet PBA bei Harnstoffzyklusstörungen klinische Anwendung (Ayala *et al.* 2012). Das synthetische Chaperon hemmt ER-Stress durch die Stabilisation der Peptidstrukturen von Proteinen und reduziert dadurch Zellschäden in einem Maus- (Koyama *et al.* 2014) und Ratten-Modell (Wu *et al.* 2016b) der Pulmonalen arteriellen Hypertonie. Bei Proteinspeicherkrankheiten, wie z.B. *Morbus Alzheimer*, bewirkte PBA eine Verbesserung der kognitiven Defizite und reduzierte die Tau-Pathologie im Maus-Modell (Ricobaraza *et al.* 2009). Es existieren keine Studien über den therapeutischen Effekt von PBA bei HBV. Im folgenden Kapitel wird dieser Effekt im HB-transgenen Maus-Modell diskutiert.

4.3.1 Reduktion der Proteinexpression natürlicher Chaperone

Chaperone besitzen die Fähigkeit, fehlgefaltete Proteine zu stabilisieren und agieren zum Teil als intrazelluläre Qualitätskontrolle (Welch und Brown 1996). In Vorarbeit der Arbeitsgruppe von Frau Univ.-Prof. Roeb wurde eine Auflockerung

und intrazelluläre Verteilung des in Aggregaten akkumulierten HBs-Transgens durch das synthetische Chaperon PBA gezeigt (vgl. Abb. 9).

Die Expression des HBs-Transgens und dessen intrazelluläre Aggregation bewirken die vermehrte Expression der natürlichen Chaperone GRP78 und PDI auf Proteinebene (vgl. Abb. 10/ 13). Die Hepatozyten versuchen dadurch die richtige Faltung und damit die Ausschleusung der aggregierten Proteine zu induzieren, um sich vor einer weiteren, möglicherweise zellschädigenden Ansammlung der HBs-Proteine zu schützen (Cortez und Sim 2014). Ferner schützt GRP78 das Gewebe vor Hypoxieschäden (Liu *et al.* 2016). Das synthetische Chaperon PBA kann die Expression natürlicher Chaperone induzieren (Gong *et al.* 2010). GRP78 wird bei ER-Stress überexprimiert (Bertolotti *et al.* 2000). Besonders im Bereich der Portalfelder wurde eine starke Induktion von GRP78 durch Expression der HBs-Proteine (ohne virale Infektion) nachgewiesen (vgl. Abb. 10/ Tg). Es ist bekannt, dass chronisch entzündliche Prozesse in den Portalfeldern mit zunehmender Kollagenbildung und Vernarbung bis zur Leberzirrhose führen können (Baenkler *et al.* 2015).

Immunhistochemisch konnte im HBs-transgenen Maus-Modell gezeigt werden, dass die Proteinexpression der natürlichen Chaperone GRP78 und PDI zeitabhängig nach einer und acht Wochen mit PBA-Gabe reduziert wurde (vgl. Abb. 10-14). Diese Befunde suggerieren, dass das synthetische Chaperon PBA die natürliche Chaperon-Funktion von GRP78 übernimmt und deshalb eine Verminderung der GRP78-Expression zu beobachten ist. Das sollte eine Reduktion von ER-Stress bedeuten. In dem hier beschriebenen Maus-Modell erhöht sich der ER-Stress nach PBA-Gabe. Die reduzierte Proteinexpression natürlicher Chaperone durch PBA im Vergleich zur HBs-Transgen-Kontrolle ist also vermutlich auf das fehlende therapeutische Potential von PBA im HBs-transgenen Maus-Modell zurückzuführen. Die Feinverteilung der Proteinaggregate ist nicht mit einer verringerten Akkumulation von HBs verknüpft, sondern eher mit einer verstärkten Anreicherung dieser (vgl. Abb. 9). Erhöhter ER-Stress führt folglich zur Aktivierung der UPR und damit zum programmierten Zelltod, falls die Stresssituation in der Zelle bestehen bleibt (Rutkowski und Kaufman 2004). Es besteht die Annahme, dass durch die Reduktion der natürlichen Chaperone eine Dissoziation dieser von den UPR-Sensoren einhergeht und die intrazelluläre Signalkaskade der UPR aktiviert

werden kann. ATF6 spielt als Transkriptionsfaktor eine zentrale Rolle in der Regulation der UPR (Walter und Ron 2011). In der vorliegenden Arbeit wird ATF6 durch PBA im HBs-transgenen Maus-Modell aktiviert und unterstreicht die Annahme (vgl. Abb. 15).

Die *Microarray*-Analyse konnte belegen (vgl. Kapitel 1.2), dass die Expression des Hitzeschockproteins HSP40 auf transkriptioneller Ebene nach PBA-Behandlung reduziert ist. HSP40 ist verantwortlich für die ATP-Hydrolase-Aktivität, wodurch die Aktivität von GRP78 reguliert wird. Aus diesem Grund fungiert HSP40 auch als Co-Chaperon von GRP78 (Shiber und Ravid 2014). Die gleichsam reduzierte Expression des Co-Chaperons HSP40 auf transkriptioneller und GRP78 auf Proteinebene nach PBA-Behandlung unterstreicht die funktionelle Assoziation der beiden Chaperone bei der UPR als Folge der Expression der HBs-Transgene.

Die Untersuchung der Proteinexpression von GRP78 in verschiedenen Altersgruppen verdeutlicht eine frühe Beeinflussung der UPR durch PBA. Obwohl auf transkriptioneller Ebene keine signifikante Beeinflussung der *GRP78-mRNA*-Expression durch HBs und PBA-Gabe nachgewiesen werden konnte (vgl. Abb. 12), spiegelt die Proteinexpression von GRP78 die von der Behandlungsdauer abhängige Beeinflussung durch PBA wider (Abb. 10 und 13). Die achtwöchige PBA-Gabe führte zu einer geringeren Proteinexpression im Vergleich zur einwöchigen.

Das HBs-Transgen induziert außerdem eine signifikant verstärkte Proteinexpression von PDI (vgl. Abb. 13). PDI katalysiert die Umlagerung fehlerhafter Disulfidbrücken im Protein und wirkt dadurch ebenfalls als Chaperon, was darauf schließen lässt, dass eine erhöhte Chaperonaktivität zur Wiederherstellung der Zell-Homöostase entgegenwirken soll. Für die Faltung und Qualitätskontrolle der Proteine ist die korrekte Ausbildung von Disulfidbrücken notwendig, da diese die Stabilität der nativen Konformation erhöhen (Fassio und Sitia 2002). PDI kann u.a. die ATP-Hydrolase-Aktivität verstärken und die Regulation von GRP78 dadurch beeinflussen (Mayer *et al.* 2000). Die Reduktion der PDI-Proteinexpression nach PBA-Gabe ist von der Behandlungsdauer mit PBA abhängig (vgl. Abb. 13/ 14). Da diese Veränderungen der PDI-Aktivität mit ER-Stress assoziiert sind (Uehara *et al.* 2006) wird deutlich, dass der Effekt von PBA im HBs-transgenen Maus-Modell mit einer Reduktion der natürlichen

Chaperonaktivität dem ER-Stress nicht entgegenwirkt. ERp44 gehört wie GRP78 auch zur Klasse der Proteindisulfid-Isomerasen. Die Proteinexpression von ERp44 (vgl. Abb. 33) wurde ebenfalls zeitabhängig durch PBA reduziert.

Nach Induktion von ER-Stress und der daraus resultierenden Aktivierung von UPR in dem hier beschriebenen Maus-Modell werden im nächsten Abschnitt die Auswirkungen der HBs-Expression und der PBA-Behandlung auf den ATF6-Signalweg beschrieben.

4.3.2 Aktivierung des Transkriptionsfaktors ATF6

Die UPR-Signalkaskaden werden durch drei ER-Transmembranproteine aktiviert (Li *et al.* 2007). Folgende ER-Stress-Sensoren spielen dabei eine wesentliche Rolle: ATF6, IRE1 und PERK. Werden diese aktiviert, kommt es zum Abbau fehlgefalteter Proteine, die Proteinbiosynthese wird reguliert und ER-Stress reduziert. Kann dieser nicht verringert werden und die Homöostase in der Zelle nicht mehr hergestellt werden, kommt es zur Apoptose (Mori 2009). Der ATF6-Signalweg zählt zu einer der wichtigsten Signalkaskaden der UPR (Zhang und Kaufman 2008). Die Aktivierung natürlicher Chaperone kann eine direkte Folge der UPR darstellen, um z.B. die korrekte Faltung von Proteinen zu fördern (McMillan *et al.* 1994). Unter stressfreien Bedingungen ist GRP78 in der ER-Membran an ATF6 gebunden und erhält so dessen Latenz aufrecht (Shen *et al.* 2005). ATF6 ist ein ER-Stress-regulierender Transkriptionsfaktor. Die Ansammlung falsch gefalteter Proteine im ER führt zur Dissoziation von GRP78 und ATF6 (Basseri und Austin 2012). In der Folge wandert ATF6 zum Golgi-Apparat, wo es proteolytisch gespalten wird (Ye *et al.* 2000). Der cytosolische Teil wird in den Zellkern transportiert und wirkt als Transkriptionsfaktor, der an Promotoren von UPR-induzierbaren Genen, wie z.B. XBP1 bindet (Lee *et al.* 2002). Die Abbildungen 15, 16 und 19 zeigen die proteolytische Spaltung des Transkriptionsfaktors und die nukleäre Translokation der Spaltprodukte durch PBA in HBs-transgenen Mäusen. Die zeitabhängige Induktion der Spaltung und nukleäre Translokation von ATF6 betont die Induktion von ER-Stress mit anschließender Aktivierung der UPR nach PBA-Behandlung.

Abbildung 15 zeigt auf Proteinebene eine deutliche Aktivierung von ATF6 nach PBA-Gabe im Maus-Lebergewebe. Andere Studien, in welchen PBA allerdings zur Verringerung von ER-Stress eingesetzt wurde (Ratten-Modell), konnten nach PBA-Gabe auch eine gesteigerte Proteinexpression von ATF6 nachweisen (Yi *et al.* 2017; Zhou *et al.* 2017). Die Aktivierung von ATF6 spiegelt im Allgemeinen erhöhten ER-Stress und die damit einhergehende UPR, wie im beschriebenen HBs-transgenen Maus-Modell, wider. Das unterstreicht das Resultat der reduzierten Proteinexpression natürlicher Chaperone (vgl. Kapitel 3.1), wie auch der verminderten Aktivierung von *XBPI* durch PBA-Behandlung auf transkriptioneller Ebene (vgl. Tab. 5/ Kapitel 3.3.4). Unter ER-Stress-Bedingungen reguliert ATF6 die Expression von *XBPI*-Genen, die die UPR fördern (Yoshida *et al.* 2001). Kürzlich wurde auch durch eine andere Studie gezeigt, dass die ATF6-abhängige *XBPI*-Expression eine APR im Lebergewebe der Maus induzieren kann (Argemí *et al.* 2017). Die ATF6- und *XBPI*-Signalkaskaden sind mitverantwortlich für die Expression von GRP78 (Shang und Lehrman 2004). Dazu kommt, dass durch die konsekutive Feinverteilung der HBs-Aggregate mehr fehlgefaltete HBs-Proteine für die natürlichen Chaperone zugänglich sind und damit von der Bindung an ATF6 abgezogen werden könnten und zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors führt.

Ferner konnte in Studien gezeigt werden, dass Antikörper gegen IP-10 den ATF6-Signalweg und die Expression von GRP78 positiv beeinflussen können (Geng *et al.* 2015). Die Proteinexpression von IP-10 und IL-16 wurde durch das HBs-Transgen und PBA verstärkt (vgl. Abb. 25 und 26). IP-10 gehört zur Gruppe der Chemokine. Eine erhöhte Expression führt zur Infiltration von Immunzellen wie Lymphozyten, Neutrophilen und Monozyten. Chemokine spielen bei Lebererkrankungen wie Hepatitis eine wichtige Rolle (Simpson *et al.* 2003).

Zur Etablierung des Zellkultur-Modells wurden HBs-transgene humane Hepatomzellen unter PBA-Gabe hinsichtlich der ATF6-Expression auf Proteinebene untersucht (vgl. Abb. 34). Es zeigte sich eine tendenziell geringere Expression von ATF6 nach Induktion des HBs-Transgens mit PBA-Gabe und eine verstärkte ATF6-Expression nach alleiniger PBA-Gabe. Das steht im Widerspruch zu den Beobachtungen aus dem Maus-Modell (vgl. Abb. 15/ Kapitel 3.2) (Foufelle und Fromenty 2016; Franceschelli *et al.* 2011). Vermutlich kann

PBA in humanen Hepatomzellen in Kombination mit dem HBs-Transgen einen anderen Wirkmechanismus aktivieren, da unter alleiniger PBA-Gabe eine ATF6-Expression beobachtet werden konnte. Die Zellkulturexperimente konnten die komplexen Vorgänge unter Hypoxiebedingungen nicht widerspiegeln. In weiteren Studien sollte daher ein Zellkultur-Modell etabliert werden, mit dem die Sachverhalte aus dem Maus-Modell mechanistisch untersucht werden können.

Die Glykosylierung eines Proteins kann in Bezug auf das hier beschriebene Zellkultur-Modell eine wesentliche Rolle spielen. Die N-Glykosylierung stellt eine posttranslationale Modifikation eines Proteins durch Anbringen eines Zuckerrestes dar. ER-Veränderungen, verursacht durch fehlgefaltete Proteine, können als Folge einer reduzierten N-Glykosylierung entstehen (Zanni *et al.* 2015). Wenn ATF6 nicht N-glykosyliert wird, findet die proteolytische Spaltung nicht statt und das Protein wird in der ER-Membran zurückgehalten (Bravo *et al.* 2013; Guan *et al.* 2009). Die Bindung an Promotoren von UPR-induzierbaren Genen kann demnach nicht erfolgen (Lee *et al.* 2002). In unserer Arbeitsgruppe von Frau Univ.-Prof. Roeb wurde auch die Wirkung von PBA auf die N-Glykosylierung untersucht. Die Expressionsinduktion von HBsAg erfolgte dabei in stabil transfizierten Mausfibroblasten. Diese wurden mit PBA behandelt und die Glykosylierung von LHB wurde mittels *Western Blot* nach Enzymbehandlung analysiert. Dabei konnte eine Deglykosylierung von LHB durch PBA-Behandlung nachgewiesen werden (Ergebnisse hier nicht gezeigt). Das bedeutet u.a., dass die Größe der Proteine (kDA) reduziert wird, da ein Zuckerrest durch enzymatische Spaltung entfernt worden ist. Dieser Befund führte zur Hypothese, dass PBA die N-Glykosylierung eines Proteins beeinflussen kann. Es besteht daher die Vermutung, dass ATF6 durch PBA glykosyliert werden kann und deshalb eine starke Proteinexpression in den HBs-transgenen Mäusen zu beobachten ist. Die Glykosylierungsversuche in unserer Arbeitsgruppe von Frau Univ.-Prof. Roeb wurden jedoch nicht wie in der vorliegenden Arbeit mit der humanen Hepatom-Zelllinie durchgeführt, sondern mit der Zelllinie NIH 3T3. Diese immortale, nicht transformierte Standard-Fibroblasten-Zelllinie entstammt aus embryonalen Mausfibroblasten (Todaro und Green 1963). Eine detaillierte Untersuchung könnte in auf diesen Ergebnissen aufbauenden Studien stattfinden. Interessanterweise führte die Arbeitsgruppe um Kuang *et al.* Untersuchungen mit der Zelllinie NIH 3T3 hinsichtlich PBA und der Akkumulation von fehlgefalteten

Proteinen bei neurodegenerativen Erkrankungen durch (Kuang *et al.* 2010). Dabei konnte gezeigt werden, dass PBA den ER-Stress vermindert und zu einer erhöhten Proteinexpression von natürlichen Chaperonen wie PDI und ERp44 führte, was im hier beschriebenen HBs-transgenen Maus-Modell nicht bestätigt werden konnte.

Die ATF6-Aktivierung kann außerdem die Induktion einer APR auslösen (Zhang *et al.* 2006). PBA induziert vermutlich über den ATF6-Signalweg eine hepatische APR (vgl. Kapitel 3.3). Interessanterweise können Viren die Aktivierung des ATF6-Signalweges inhibieren (Buchkovich *et al.* 2010). Dadurch kann die Proteinbiosynthese aufrechterhalten werden. Der Aspekt, dass in dem hier verwendeten Maus-Modell keine Virusinfektion vorliegt, sondern lediglich HBs exprimiert wird, ist für weitere Studien zu berücksichtigen. Dennoch ist dieser Punkt ein möglicher Ansatz, um das therapeutische Potential von PBA zur Aktivierung von ATF6 bei einer Virusinfektion zu untersuchen.

4.3.3 Hepatische Akute-Phase-Reaktion

In früheren Studien wurde bereits gezeigt, dass die APR durch die ATF6-Aktivierung ausgelöst wird (Zhang und Kaufman 2008). Die APR stellt einen wichtigen adaptiven Baustein bei Infektionen und Störungen der Zell-Homöostase dar. Vor allem innerhalb der Leber kommt es zu deutlichen Veränderungen der Genexpression (Patel *et al.* 2009). AP-Proteine haben wichtige Funktionen und dienen zur Wiederherstellung der Homöostase sowie der Bildung proinflammatorischer Cytokine (Baumann und Gauldie 1994).

Zu den AP-Proteinen gehören u.a. SAA1, SAA2, LCN2, HP und CRP (Borkham-Kamphorst *et al.* 2011; Moshage 1997). Neben diesen dazugehörigen Genen wurde in der vorliegenden Arbeit auch das *ISG56* analysiert. *ISG56* reguliert zelluläre und virale Funktionen während einer Infektion (Fensterl und Sen 2011). PBA induzierte zeitabhängig die Genexpression von *SAA1*, *SAA2* und *LCN2* in unterschiedlichen Altersstufen des HBs-transgenen Maus-Modells. Die *SAA1*-Genexpression wurde in jungen Mäusen (5 Wochen) durch das HBs-Transgen und PBA im Gegensatz zu *SAA2* nicht moduliert (vgl. Abb. 20). Die Genexpression von *SAA2* war in beiden Fällen signifikant erhöht. Die älteren Mäuse (19

Wochen) zeigten eine signifikant stärkere Expression beider Gene nach längerfristiger PBA-Gabe, jedoch bestand keine Beeinflussung durch das HBs-Transgen (vgl. Abb. 21). Interessanterweise zeigten in Vorarbeit der Arbeitsgruppe von Frau Univ.-Prof. Roeb auch die männlichen 12 Wochen alten Mäuse eine signifikante Steigerung der Genexpression der Serumamyloide nach acht Wochen PBA-Behandlung. Diese Mäuse zeigen in diesem Alter eine beginnende hepatische Fibrose (Churin *et al.* 2014). Die unterschiedliche Genexpression der verschiedenen Altersgruppen hängt vermutlich mit Beginn einer Entzündung und der Manifestation einer Fibrose bzw. der Regeneration des Lebergewebes zusammen. Die AP-Proteine SAA1 und SAA2 werden von Hepatozyten als Antwort auf eine Infektion produziert und wirken als Aktivatoren wie auch Inhibitoren und können auf diesem Wege zur Verbesserung des geschädigten Lebergewebes beitragen (Wallraff 1969). Dies erweist sich für die Gruppe der älteren Versuchstiere als vorteilhaft (vgl. Abb. 21). Die unterschiedliche Aktivierung in den Altersgruppen kann möglicherweise ein entscheidender Faktor für eine deutlich schnellere Geweberegeneration sein. Es stellt sich die Frage, ob in diesem Fall PBA den Vorgang durch die ATF6-vermittelte Induktion einer APR positiv beeinflussen kann? Die Arbeitsgruppe um Cheng *et al.* hat in humanen Zellkultur-Modellen und humanisierten (*severe combined immunodeficiency scid*) SCID-Mäuse herausgefunden, dass das HBV sich als 'stiller' Virus vor dem Immunsystem versteckt und von Hepatozyten weder wahrgenommen noch beeinflusst werden kann (Cheng *et al.* 2017). Wenn PBA eine APR auslöst, besteht die Annahme, dass das synthetische Chaperon als therapeutisches Mittel nicht in Frage kommt. Es wäre in weiteren Studien und anderen Maus-Modellen sehr interessant zu untersuchen, inwieweit PBA mittels APR die Hepatozyten auf die HBV-Infektion aufmerksam machen kann.

In Vorarbeit der Arbeitsgruppe von Frau Univ.-Prof. Roeb konnte bereits nachgewiesen werden, dass die Genexpression von *LCN2* durch das HBs-Transgen und nach PBA-Gabe in 5 und 12 Wochen alten männlichen HBs-transgenen Mäusen erhöht ist. Die in dieser Arbeit untersuchten 19 Wochen alten Mäuse zeigten nur eine Tendenz zur Steigerung der Genexpression (vgl. Kapitel 3.3.1) durch das HBs-Transgen und die PBA-Gabe. *LCN2* ist ein zuverlässiger Indikator für Leberschäden und hat bei akuten Leberverletzungen eine schützende Wirkung (Borkham-Kamphorst *et al.* 2013). Dies betont die gesteigerte

Expression durch das HBs-Transgen in den Hepatozyten und lässt darauf schließen, dass PBA für die Induktion von ER-Stress verantwortlich sein kann.

Die ATF6-Proteinexpression wird in HBs-transgenen Mäusen nach PBA-Behandlung hochreguliert, um dadurch die Aktivierung relevanter UPR-Gene zu steuern (Shang und Lehrman 2004). Die Arbeitsgruppe um Wang *et al.* hat sich mitunter in ihrer Studie mit der Aktivierung von LCN2 während ER-Stress bei Pulmonaler Hypertonie bzgl. der proteolytischen Spaltung von ATF6 und dessen nukleäre Translokation beschäftigt. Dabei konnte die Gruppe zeigen, dass LCN2 den ER-Stress fördert, was wiederum eine UPR zur Folge hat und damit eine Aktivierung der UPR-Signalwege, mitunter die ATF6-Aktivierung (Wang *et al.* 2017). Im Rahmen der APR ist zu ATF6 das *Cyclic-AMP-Responsive-Element-Binding Protein H* (CREBH) erwähnenswert. Die Signalkaskade, die beginnend mit ER-Stress zur Rekrutierung von AP-Proteinen und letztendlich zur APR führt, geht von dem Faktor CREBH aus (Bailey *et al.* 2007). Interessanterweise wird auch der Transkriptionsfaktor CREBH durch Hepatozyten exprimiert und dessen Expression durch Cytokine wie TNF- α , IL-1 β und IL-6 induziert. Dabei erfolgt eine gleichzeitige Aktivierung von ATF6. Bei ER-Stress wird CREBH aktiviert und vermittelt eine APR (Zhang *et al.* 2006; Kushner 1982). Studien haben neue Transkriptionsfaktoren der ATF-Familie analysiert und herausgefunden, dass diese strukturell ähnlich zu ATF6 sind. Sie verfügen über die Transkriptionsaktivierungsdomäne bZIP. CREBH wurde dabei als ein Hepatozyten-spezifischer bZIP-Transkriptionsfaktor identifiziert. Zur Aktivierung wird CREBH ebenso wie ATF6 bei der UPR proteolytisch gespalten und ist für die Induktion der AP-Antwort verantwortlich (Kondo *et al.* 2011; Omori *et al.* 2001; Ye *et al.* 2000). Die Tatsache, dass ATF6 genauso wie der Faktor CREBH für die Aktivierung der APR verantwortlich ist, könnte den Anstieg der AP-Gene in der vorliegenden Arbeit nach PBA-Behandlung erklären. PBA induziert die Aktivierung von ATF6 (vgl. Abb. 15/ 16). In einem murinen Modell der hepatischen Ischämie wurde gezeigt, dass ER-Stress ursächlich für die ATF6-Aktivierung war und eine entzündliche Immunantwort induziert (Rao *et al.* 2014). Dies unterstütze die durch PBA ATF6-vermittelte APR.

In Zellkultur konnte gezeigt werden, dass die PBA-Gabe die Induktion der AP-Gene regulieren kann, wobei ein Einfluss auf die Genexpression von *HP*, *CRP* und *ISG56* beobachtet werden konnte (vgl. Abb. 22). Die AP-Proteine HP und

CRP werden als Indikatoren für eine Entzündung genutzt (Yang *et al.* 1983). CRP ist ein AP-Protein, das von der Leber als Reaktion auf akute und chronische Entzündungen synthetisiert wird (Shameem *et al.* 2011). Des Weiteren wurde ein Expressionsanstieg von *ISG56* beobachtet. Die Genexpression von *ISG56* in Zellkultur ist um ein dreifaches stärker reguliert im Vergleich zu *HP* und *CRP* (vgl. Abb. 22). *ISG56* gehört zur Familie der IFIT-Proteine, die keine eigene Enzymaktivität aufweisen und hemmen die Virusreplikation durch Bindung sowie Regulierung der Funktionen von zellulären und viralen Proteinen. Sie sind ein wichtiger Regulator der Virusreplikation (Fensterl und Sen 2015; Li *et al.* 2009). Somit besteht die Annahme, dass PBA die Induktion einer APR auslösen kann, da in dem Maus-Modell keine Virusinfektion vorliegt und ein Anstieg von *ISG56* zu beobachten ist.

Zur weiteren Bestätigung der Induktion einer APR durch PBA wurde die Genexpression verschiedener beteiligter Signalwege in Zellkultur analysiert (vgl. Abb. 23 und 24). Darüber hinaus wurde die Induktion proinflammatorischer Gene nach PBA-Behandlung festgestellt. Die PBA-Behandlung induziert verschiedene Signalwege in HBs-transgenen Zellen. Interessanterweise bewirkte hier das HBs-Transgen alleine keine Regulation von AP-spezifischen Genen oder assoziierter Signalwege. Ausschließlich in Kombination mit PBA konnte eine Steigerung der Genexpression beobachtet werden. Die Verifizierung erfolgte anhand der Gene, die am stärksten reguliert waren (vgl. Abb. 24): *PPARD*, *WNT2B*, *GSR*, *FAS*, *CPT2*, *HEY1* und *BIRC3*. Die wichtigsten der identifizierten Gene spielen eine Rolle im Hedgehog- und NFκB-Signalweg. Der Hedgehog-Signalweg fördert viele Prozesse, die zur Leberreparatur während einer Fibrose beitragen (Pereira *et al.* 2010). Studien in Zellkultur und im Tier-Modell belegen, dass die Aktivierung des Hedgehog-Signalweges Mechanismen induziert, die der Verbesserung des fibrogenen Gewebes dienen (Jung *et al.* 2008). NFκB kann sowohl antiapoptotisch als auch proapoptotisch wirken. Die Aktivierung des Faktors induziert die Produktion von entzündungshemmenden Cytokinen (Wu *et al.* 2010). Durch die Freisetzung der Cytokine kann ein langanhaltender Stress für die Zelle entstehen. Dieser persistierende pathophysiologische Zustand, gekoppelt mit anhaltender AP-Induktion, kann in älteren Mäusen zur chronischen Hepatitis und folglich zur Leberzirrhose führen (Patel *et al.* 2009). In HBs-transgenen Zellen wurde der NFκB-Signalweg durch PBA deutlich induziert. Bei einer HBV-

Infektion wurde bereits ein Zusammenhang zwischen Hypoxie und der Aktivierung des NFκB-Signalweges und des Notch-Signalweges beschrieben (Hu *et al.* 2016; Katrinli *et al.* 2016). Dies unterstützt die Annahme einer Wirkung von PBA auf die APR. In Vorarbeit der Arbeitsgruppe von Frau Univ.-Prof. Roeb konnte im Serum 12 Wochen alter Mäusen gezeigt werden, dass im HBs-transgenen Maus-Modell TNF-α und IL-1β nach PBA-Gabe hochreguliert waren und somit die Induktion des NFκB-Signalweges durch HBs unterstreichen. In einer aktuellen Studie wurde beobachtet, dass die kooperativen Effekte des HBV und TNF-α die Aktivierung von NFκB verstärken und die Expression von stoffwechsellassozierten Genen in Hepatozyten hochreguliert wird (Wu *et al.* 2016a). Unsere Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass die PBA-Gabe zur Induktion beider Signalwege beiträgt.

TNF-α gehört zu den IL-16-verwandten funktionellen Proteinen (Richmond *et al.* 2014; Liu *et al.* 2007). IL-16 wurde im Serum 5 Wochen alter männlicher HBs-transgener Mäuse nach PBA-Gabe erhöht nachgewiesen (vgl. Abb. 26). Das multifunktionale Cytokin IL-16 besitzt eine wichtige Rolle in der Immunabwehr. Im Rahmen einer Virus-Abwehr spielen insbesondere CD4-positive T-Helferzellen eine wichtige Rolle, wobei das Cytokin IL-16 an der Regulation dieser T-Zellantwort beteiligt ist (Urbani *et al.* 2005). IL-16-Gensequenz Mutationen können eine Fehlsteuerung bei der Immunantwort gegen eine HBV-Infektion bewirken (Wilson *et al.* 2004). Dies kann bedeuten, dass im frühen Stadium schon proapoptische Effekte im Laufe der PBA-Behandlung entstehen können (5 Wochen alte Mäuse). In älteren Mäusen (19 und 26 Wochen) wurde schon in Vorarbeit der Arbeitsgruppe von Frau Univ.-Prof. Roeb eine Vielzahl von Cytokinen und Chemokinen nachgewiesen.

Im Rahmen einer UPR bis hin zur Induktion einer APR ist der Transkriptionsfaktor XBP1 ein relevantes Element (Lazar *et al.* 2014; Haze *et al.* 1999). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das HBs-Transgen und die PBA-bedingte ATF6-Aktivierung die Genexpression von *XBPI* im Maus-Lebergewebe reguliert (vgl. Tab. 5/ Abb. 27-30). In jungen Mäusen (5 Wochen) zeigte PBA keine Regulation der Genexpression von XBP1, wohingegen in älteren Mäusen (19 Wochen) PBA die durch das HBs-Transgen induzierte Genexpression normalisierte. Es ist erkennbar, dass das synthetische Chaperon in Verbindung mit dem HBs-Transgen einen Effekt zeigt. Der Quotient aus den

PCR-Produkten des Transkriptionsfaktors lässt weitere Aussagen über die Genexpression von *XBPI* zu. *XBPI* wird gespleißt, woraufhin das gespleißte *XBPI*-Produkt zum Kern transloziert und dort die Transkription von ER-residenten Chaperonen und Genen kontrolliert, die am Proteinabbau beteiligt sind (vgl. Abb. 5/ Kapitel 1.3). In Tabelle 5 ist der Quotient aus ungespleißtem und gespleißtem *XBPI*-PCR-Produkt gezeigt. Hervorzuheben ist, dass eine Hochregulation von *XBPI* durch das HBs-Transgen erfolgt. Dies lässt vermuten, dass die Zell-Homöostase zu diesem Zustand wiederhergestellt werden muss. Akkumulierte Proteine sammeln sich im ER an und müssen, um der Apoptose entgegenzuwirken, degradiert werden. *XBPI* wird in einem erhöhtem Maße benötigt, um den Proteinabbau zu fördern (Margariti *et al.* 2013; Zhang und Kaufman 2008). PBA allein hatte dabei keinen Effekt, wohingegen nur in Verbindung mit der Expression des HBs-Transgens die Signalwege induziert wurden. Nach PBA-Gabe sank die *XBPI*-Genexpression zeitabhängig. Dies lässt darauf schließen, dass die PBA-Gabe vermutlich nicht zur Reduzierung von ER-Stress in der Zelle beisteuerte. PBA aktiviert ATF6, welches wie *XBPI* bei einer UPR über den gleichen Mediator aktiviert wird (Li *et al.* 2007; Yoshida *et al.* 2001). *XBPI*-mRNA wird dabei durch die Aktivierung von IRE1 gespleißt (Tsuru *et al.* 2016; Yamamoto *et al.* 2004), während die Spaltung von ATF6 für die IRE1-abhängige Induktion der UPR-Transkription notwendig ist (Lee *et al.* 2002). Die Spaltung von ATF6 durch PBA wurde im Rahmen dieser Arbeit auf Proteinebene nachgewiesen (vgl. Abb. 15/ 16). Dieses Ergebnis liefert indirekt einen Hinweis auf eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors *XBPI*.

Zusammenfassend zeigte sich, dass die PBA-Behandlung die Proteinexpression natürlicher Chaperone reduziert und den ATF6-Signalweg, wodurch folglich in HBs-transgenen Mäusen und in Zellkultur auf eine APR geschlossen werden kann, aktiviert. Dabei stellt sich die Frage, wie sich die Induktion der beteiligten Signalwege auf den Energiestoffwechsel (ER-Mitochondrien) im Maus-Modell und in Zellkultur auswirken? Durch UPR werden vermehrt ROS produziert, da die Proteinfaltung ein oxidativer Prozess ist und zur Entstehung von ROS beiträgt. Die Regulation der Chaperone und der ER-Calciumionenfluss können dadurch beeinflusst werden, was zur Folge haben kann, dass eine erhöhte Calciumionenkonzentration die Aktivität der Mitochondrien stört und ein

toxisches Level an ROS in der Zelle erreicht werden kann (Zhang und Kaufman 2008).

4.3.4 Modulation des Energiestoffwechsels

Die hepatische Homöostase bedarf biologischer Mechanismen, die ein Gleichgewicht zwischen dem Anabolismus und dem Katabolismus der Zelle schaffen (Heymann 2006). Wird das Gleichgewicht der Zelle gestört, kann dies zu Entzündungsreaktionen bis hin zur Apoptose führen (Baccino *et al.* 1984). Zur Regulation der Protein-Homöostase werden das Ubiquitin-Proteasom und das lysosomale System benötigt. Das lysosomale System lässt sich weiterhin unterteilen in Makroautophagie und Mikroautophagie, in der Gesamtheit die Autophagozytose (Wang *et al.* 2013b). Diese molekularen Mechanismen stellen die intrazelluläre Qualitätskontrolle dar, um fehlgefaltete Proteine zu reparieren oder toxische Effekte zu reduzieren, die aufgrund der fehlerhaften Proteine entstanden sind. Dadurch besteht die Möglichkeit, Immun- und Zellreaktionen an den Entzündungsstress anzupassen (Heymann 2006). Die PBA-induzierte APR ist eine Reaktion auf den ER-Stress, der in den Hepatozyten des HBs-transgenen Maus-Modells vorherrscht und vermutlich notwendig, um ein Überleben der Zelle zu gewährleisten.

Interessanterweise hat die Autophagozytose einen Einfluss auf den mitochondrialen Signalweg und kann die hepatische Apoptose über diesen modulieren. Dabei werden u.a. proinflammatorische Cytokine freigesetzt (Wang 2015). In Abbildung 31 ist die Ultrastruktur von Organellen aus den Hepatozyten des Maus-Lebergewebes von der Wildtyp- und HBs-transgenen Gruppe aufgezeigt. Dabei konnte beobachtet werden, dass das HBs-Transgen die Struktur der Mitochondrien verändert. Dies kann zu funktionellen Abwandlungen in der Zelle und den Organellen führen (Foschini *et al.* 1998). Mitochondrien und das ER interagieren sowohl physiologisch als auch funktionell miteinander. Ein relevanter Aspekt dieser Interaktion ist die Calcium-Signalisierung zwischen den beiden Organellen (Rowland und Voeltz 2012). Die Kommunikation dieser findet über *MAMs* statt (Arruda *et al.* 2014; Malhotra und Kaufman 2011), wobei IP3R ein *MAM*-spezifisches Protein darstellt (Kiviluoto *et al.* 2013). Auf Proteinebene

wurde in der vorliegenden Arbeit festgestellt, dass IP3R nach PBA-Gabe verstärkt exprimiert wird (vgl. Abb. 32). Das könnte eine Erhöhung des Calcium-Flusses zur Folge haben. Dadurch wird die mitochondriale Aktivität erhöht, um die Zell-Homöostase wieder herzustellen (Bravo *et al.* 2013). PBA induziert die Aktivierung von IP3R im HBs-transgenen Maus-Modell ebenso wie ATF6. Beide Faktoren gehören zu den ER-Stress-Sensoren (Ron und Walter 2007). Das zeigt, dass PBA auch in diesem Fall einen UPR-Signalweg aktivieren kann (vgl. Abb. 5). Mittels *Microarray*-Subanalyse konnte in Vorarbeit der Arbeitsgruppe von Frau Univ.-Prof. Roeb eine Hochregulation von *IP3R* auf transkriptioneller Ebene nach PBA-Gabe gezeigt werden. Ferner wurde in diesem Zusammenhang in der vorliegenden Arbeit eine *Western Blot*-Analyse der PKC vorgenommen (hier nicht gezeigt). PKC phosphoryliert IP3R, wodurch dieses aktiviert wird (Arguin *et al.* 2007). Die Proteinexpression von PKC konnte verstärkt durch das HBs-Transgen und PBA festgestellt werden und unterstützt die erhöhte Expression von IP3R (vgl. Abb. 32).

Die Studien um Volgyi *et al.* deuten darauf hin, dass *MAMs* und die UPR-Signalwege (mitunter ATF6 und IP3R) ein therapeutisches Ziel darstellen, um Proteinspeicherkrankheiten zu behandeln. PBA beeinflusst im HBs-transgenen Maus-Modell diese beiden Signalwege. Es wäre interessant zu untersuchen, ob PBA in anderen Tier-Modellen betreffend Proteinspeicherkrankheiten diese Signalkaskaden beeinflusst. Die Proteinefehlfaltungen im ER sind verantwortlich für ER-Stress, resultieren in einer UPR und haben mitunter einen Einfluss auf den mitochondrialen Energiemetabolismus (Volgyi *et al.* 2015). Calcium-Kanäle im ER und der Rezeptor IP3R sind involviert in die HBV-Replikation und stellen somit einen guten Angriffspunkt einer Therapie dar (Xia *et al.* 2006). Interessanterweise wurde eine Modulation im Calciumionen-Signalweg und eine erhöhte Calciumionenkonzentration in Zellen mit replizierendem HBV beobachtet. Diese Beobachtungen unterstützen die Annahme, dass die virale Modulation von zellulären Calciumionen-Signalwegen die Entwicklung von virusassoziierten Erkrankungen direkt beeinflussen könnte (Casciano *et al.* 2017). In diesem Kontext konnte gezeigt werden, dass PBA in HBs-transgenen Mäusen (ohne virale Infektion) eine verstärkte Proteinexpression von ERp44 bewirkt (vgl. Abb. 33). ERp44 gehört zu den Chaperonen und reguliert die intrazelluläre Freisetzung von Calciumionen (Chang *et al.* 2015). Während der UPR wird

ERp44 hochreguliert, um den Calciumionenaustausch zu regulieren (Tateishi *et al.* 2005). Die Regulation erfolgt dabei über den Rezeptor IP3R (Hisatsune *et al.* 2015). Die Bindung von ERp44 an IP3R hängt von der Calciumionenkonzentration und folglich vom Energiemetabolismus ab (Mikoshiha 2007; Higo *et al.* 2005). Das HBs-Transgen induzierte eine verstärkte Expression von ERp44. In diesem Fall ist eine große Anzahl an Proteinaggregaten vorhanden und die Hepatozyten versuchen die Homöostase der Zelle aufrecht zu erhalten. Die Expression wurde zeitabhängig unter PBA-Gabe vermindert (vgl. 3.1 GRP78/ PDI). Die Proteinexpression von ERp44 und des HBV-Oberflächenproteins LHB wurde in diesem Kontext immunhistochemisch mittels einer Co-Färbung untersucht (vgl. Abb. 33). Interessanterweise zeigte sich die Expression beider Proteine in einem bestimmten abgegrenzten Reaktionsraum (Kompartiment) im Lebergewebe der HBs-transgenen und HBs-transgenen PBA-behandelten Maus (vgl. Abb. 33 Tg/ 1 W PBA). Das HBs-Transgen induziert die Expression von ERp44 und LHB. Die PBA-Behandlung verringerte die Expression von ERp44 zeitabhängig. Es konnte keine Reduktion der Expression von LHB nach PBA-Gabe beobachtet werden. ER-Stress wurde nicht reduziert. Auffallend war die erhöhte Proteinexpression von ERp44 und LHB im Bereich der Portalvene (vgl. Abb. 33 Tg/ 1 W PBA). In diesem Bereich herrschen sauerstoffreiche Bedingungen. Das Sauerstoffangebot wird bis hin zur Zentralvene geringer (Hypoxie). Es besteht daher die Annahme, dass die Hypoxiebedingungen einen Effekt auf die Regulation von ER-Stress ausüben und deshalb durch PBA-Gabe eine verminderte ERp44-Expression zu beobachten ist. Die Mitochondrien vermitteln eine zelluläre Reaktionen auf Hypoxie durch Redox- und Calcium-Signalmechanismen und stellen deshalb einen wichtigen Faktor für diese Signalkaskaden dar (Kaufman und Crowder 2015). Die Proteinfaltung ist ein oxidativer Prozess, bei dem ROS entstehen können, die die Regulation der Chaperone und den ER-Calciumionenfluss beeinflussen. Kommt es zur Störung der Proteinfaltung oder der Ansammlung von Proteinen im ER werden dadurch vermehrt ROS produziert (Raha und Robinson 2000). Die Oxidationsbedingungen sind für die Bildung von intramolekularen Disulfidbindungen erforderlich. Dabei wird dieser Prozess von PDI katalysiert (Tu und Weissman 2004). In Kapitel 3.1 wurde die durch PBA reduzierte Expression der natürlichen Chaperone beschrieben. Es konnte gezeigt werden,

dass die Proteinexpression von PDI nach PBA-Gabe in HBs-transgenen Mäusen reduziert wurde und dementsprechend nicht zur Reduktion von ER-Stress führte. In einer Studie um Lehtonen *et. al* wurde in einem Tier-Modell zur Erforschung von neurodegenerativen Erkrankungen (*Morbus Parkinson*) u.a. die PDI-Aktivität untersucht. Durch die verminderte Expression von PDI und die daraus resultierende reduzierte Aktivität wird die Akkumulation der Proteine gehemmt (Lehtonen *et al.* 2016). Die Analyse der PDI-Aktivität bietet möglicherweise einen denkbaren therapeutischen Ansatz (z.B. PDI-Inhibitoren).

Abbildung 36 stellt zusammengefasst die Ergebnisse des Energiestoffwechsels dar:

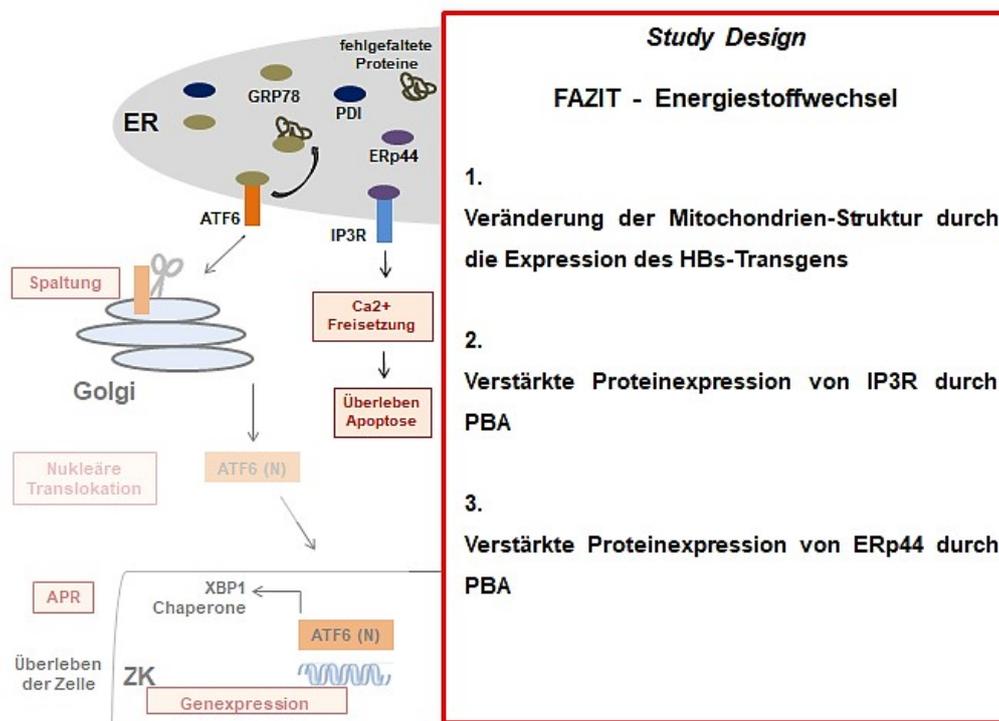


Abbildung 36: Study Design. Fazit Modulation des Energiestoffwechsels nach PBA-Gabe.

Abbildung 36 zeigt schematisch und komprimiert die Zusammenfassung der Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit anhand der analysierten Signalkaskade im HBs-transgenen Maus-Modell. Der Energiestoffwechsel wird durch PBA beeinflusst. Speziell die Proteinexpression von IP3R und ERp44 zeigt eine Modulation durch das synthetische Chaperon PBA. Die vermutlich damit verbundene Calciumionenfreisetzung steuert u.a. das Überleben oder Absterben der Zelle (vgl. Abb.3).

In diesem Zusammenhang konnte außerdem elektronenmikroskopisch beobachtet werden, dass die Expression von HBV-Proteinen zu einer Akkumulation von Lipiden in Leberzellen führen kann (vgl. Abb. 31). Studien belegen, dass

metabolische Veränderungen in der Leber relevante Ursachen für eine HBV-assoziierte hepatische Steatose darstellen. HBV-Antigene können den Lipid-Metabolismus beeinträchtigen (Pais *et al.* 2015; Yang *et al.* 2008). Die UPR-Signalwege sind an der Regulierung der Leber-Lipogenese und des Lipidspeichers beteiligt (Zhang *et al.* 2015; Bravo *et al.* 2013). Der Transkriptionsfaktor ATF6 ist dabei für die verminderte Speicherung von Lipiden in der Leber verantwortlich (Zeng *et al.* 2004). Das HBs-Transgen ist für eine vermehrte Lipidspeicherung entscheidend (vgl. Abb. 31). Es eröffnet sich die Frage für weiterführende Studien, inwieweit sich die PBA-Gabe für eine HBV-assoziierte hepatische Steatose als therapeutisch wirksam darstellt (Henkel und Green 2013; Basseri und Austin 2012; Basseri *et al.* 2009).

4.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Mit der vorliegenden Arbeit sollte der verknüpfende molekularbiologische Mechanismus zwischen der Feinverteilung der HBs-Aggregate und der Induktion der APR aufgeklärt werden. Die Wirkungsweise des synthetischen Chaperons PBA ist mit der Auflösung zellschädigender Proteinaggregate und der daraus resultierenden Verringerung von Zellstress assoziiert. Eine geeignete Therapie bei HBV wäre dadurch denkbar. Eine HBV-Infektion wird über *Alpha*-Interferone, Nukleosid- und Nukleotid-Analoga therapiert. Für die Schädigung des Leberparenchyms wurde lange Zeit die Reaktion des Immunsystems gegen infizierte Hepatozyten verantwortlich gemacht. Die unmittelbaren pathologischen Effekte der HBV-Oberflächenproteine wurden nicht berücksichtigt.

Das synthetische Chaperon PBA verringerte die Expression natürlicher Chaperone und aktivierte vermutlich über den ATF6-Signalweg eine APR in HBs-transgenen Mäusen und Zellen. Für den Erfolg einer effektiven Therapie ist es von großer Bedeutung, die Signalwege zwischen ER-Stress, UPR und der Entzündungsreaktion zu verstehen. Die Erhaltung und die Funktion des ER ist ein entscheidender Faktor in der Wiederherstellung der Zell-Homöostase. Die Modulation der UPR als primärer Indikator ist dabei besonders zu beachten, da sowohl ER-Stress als auch UPR-Aktivierung in vielen verschiedenen

menschlichen Krebsarten dokumentiert sind und die UPR als Signalgeber für eine folglich anstehende Apoptose dienen kann.

Die Induktion der APR durch Freisetzung der Oberflächenproteine aus den Aggregaten könnte die Ursache für die fehlende therapeutische Wirkung von PBA im HBs-transgenen Maus-Modell sein. PBA führte zu einer verstärkten Zellstress-Reaktion in Hepatozyten und kann daher nicht für die Therapie der mit HBs-Proteinaggregaten assoziierten hepatozellulären Schädigung herangezogen werden. Die deutliche Aktivierung von ATF6 durch PBA und die damit verbundenen Erkenntnisse, bieten einen denkbaren therapeutischen Ansatz für andere Krankheitsbilder mit Proteinaggregation. Interessant ist u.a. die Etablierung des hier beschriebenen Zellkultur-Modells, um andere synthetische Chaperone, wie z.B. TUDCA (Uppala *et al.* 2017), zu analysieren.

5 Zusammenfassung

Eine Hepatitis-B-Infektion ist verantwortlich für ca. 350 Millionen chronisch infizierte Menschen. Mehr als 686.000 Menschen sterben an den Folgen der Infektion (Leberzirrhose/ hepatozelluläres Karzinom), weshalb die Mechanismen der intrazellulären Kommunikation dieser Infektion intensiver Forschung bedürfen. Ein direkter, intrinsischer Mechanismus der Zellschädigung bei der Hepatitis-B-Infektion beruht auf der Akkumulation der HBV-Hüllproteine (HBs) im Endoplasmatischen Retikulum (ER) der Hepatozyten, was zu *Unfolded Protein Response* (UPR), ER-Stress und Apoptose führen kann. Das synthetische Chaperon Phenylbuttersäure (*Phenylbutyric acid* (PBA)) bewirkt in verschiedenen Modellen für Protein-Aggregationskrankheiten die Auflösung zellschädigender Aggregate.

Activating Transcription Factor 6 (ATF6) ist ein ER-Stress regulierender Transkriptionsfaktor. Die Akkumulation von falsch gefalteten Proteinen im ER führt zur proteolytischen Spaltung von ATF6. Der cytosolische Teil von ATF6 wird in den Zellkern transportiert und wirkt als Transkriptionsfaktor zur Bildung von Chaperonen. Das Ziel dieser Studie war die Untersuchung der Wirkung von PBA auf die Aktivierung von ATF6. Die Auswirkungen der PBA-Behandlung auf die HBs-Akkumulation und ER-Stress wurden in HBs-transgenen Mäusen analysiert. Der verknüpfende molekularbiologische Mechanismus zwischen der konsekutiven Feinverteilung sowie der intrazellulären HBs-Aggregate und der Induktion der Akute-Phase-Reaktion sollte zudem aufgeklärt werden.

Es konnte gezeigt werden, dass PBA die Proteinexpression natürlicher Chaperone im Maus-Lebergewebe verringerte und die Aktivierung und Kernlokalisation des Transkriptionsfaktors ATF6 induzierte. Das synthetische Chaperon aktivierte vermutlich über den ATF6-Signalweg eine hepatische Akute-Phase-Reaktion. Die Induktion der Akute-Phase-Reaktion durch Freisetzung der Oberflächenproteine aus den Aggregaten könnte die Ursache für die fehlende therapeutische Wirkung von PBA im HBs-transgenen Maus-Modell sein. Zudem beeinflusste PBA den Energiestoffwechsel, der in diesem Zusammenhang für die Proteinfaltung als oxidativer Prozess einen relevanten Faktor darstellt. PBA kann daher nicht für die Therapie der mit HBs-Proteinaggregaten assoziierten hepatozellulären Schädigung herangezogen werden.

6 Summary

Hepatitis-B-infection is responsible for approx. 350 million chronically infected people. More than 686.000 people die suffering from effects of the infection (liver cirrhosis/ hepatocellular carcinoma). The mechanism of intracellular communication regarding the infection requires further research. The synthetically chaperone Phenylbutyric Acid (PBA) dissolves cell-damaging aggregates in different models for protein-aggregation diseases. Accumulation of HBV envelope proteins (HBs) in the endoplasmic reticulum (ER) of hepatocytes in patients suffering from chronic HBV-infection may cause a direct, intrinsic mechanism of cell damage. Unfolded Protein Response (UPR), ER-stress and apoptosis could be the outcome of intracellular HBs-accumulation.

Activating Transcription Factor 6 (ATF6) is an ER-stress regulating transcription factor. Accumulation of misfolded proteins in the ER causes proteolytic cleavage of ATF6. The cleavage product acts as a transcription factor for the formation of chaperones. The effects of PBA on HBs-accumulation and ER-stress were analyzed in HBs-transgenic mice. The aim of the present study was to investigate the effect of the chemical chaperone PBA on the activation of ATF6. It was very important to set the focus on examination the interlinking molecular biological-mechanism between the distribution of the protein aggregates and the induction of acute-phase-response.

The results show that PBA reduced the protein-expression of natural chaperones in liver of HBs-transgenic mice. The activation and translocation of ATF6 to the nucleus was induced. Furthermore PBA probably activates a hepatic acute-phase-response via ATF6-signaling-pathway. The induction of acute-phase-response by releasing surface proteins from aggregates could be one reason for the missing therapeutically effect of PBA in the HBs-transgenic mouse-model. In addition, PBA influenced the energy metabolism, which represents a relevant factor for protein-folding as an oxidative process in this context. Therefore, PBA cannot be used to treat hepatocellular damage associated with HBs-protein aggregates.

7 Abkürzungsverzeichnis

ALT	Alanin-Amino-Transferase
ATP	Adenosintriphosphat
AP	Akute-Phase
APR	Akute-Phase-Reaktion
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ASH	Alkoholische Steatohepatitis
AST	Aspartat-Amino-Transferase
ATF4	Activating Transcription Factor 4
ATF6	Activating Transcription Factor 6
ATF6 (N)	aktiviertes ATF6 im Nucleus
ATG7	Autophagy-Related Protein 7
Aqua bidest.	bidestilliertes Wasser
BDMA	N-Benzyl dimethylamine
BIRC3	Baculoviral IAP Repeat Containing 3
BSA	bovines Serumalbumin
CCD	Charge-Coupled Device
cccDNA	covalently closed circular DNA
CD	Cluster of differentiation
CMV	Cytomegalievirus
CPT2	Carnitine Palmitoyltransferase 2
CREBH	Cyclic-AMP-Responsive-Element-Binding Protein H
CRP	C-reaktives Protein
CT	Cycle Threshold
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator
d	day
DDSA	Dodecanyl Succinc Anhydride
DEPC	Diethyl Pyrocarbonate
DNA	deoxyribonucleic acid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid

Dox	Doxyzyklin
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
eIF2 α	Eukaryotic Initiation Factor 2 alpha
EM	Elektronenmikroskopie
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERp44	Endoplasmic Reticulum Resident Protein 44
ERAD	Endoplasmic-Reticulum-Associated Protein Degradation
FAS	Fas TNF Receptor Superfamily, Member 6
g	Gramm
xg	Gravity
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
GDA	Glutaraldehyd
GRP78	78 kDa Glucose-reguliertes Protein
GSR	Glutathione Reductase
HBs	HBV-Oberflächenproteine
HBsAg	Hepatitis-B-Oberflächenprotein Antigen
HBcAg	Hepatitis-B-Core Antigen (Kapsidprotein)
HBeAg	Hepatitis-B Antigen für sezernierte Form des Kapsidproteins/ exkretorisch
HBx	HBV-X-Protein
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCC	hepatocellular carcinoma
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HEY1	Hairy/Enhancer-of-split related with YRPW Motif 1
HNF4 α	Hepatocyte Nuclear Factor 4 alpha
HP	Haptoglobin
HRP	Horseradish Peroxidase
HSC	hepatic stellate cell
HSP40	Hitzeschockprotein 40
HuH7	Hepato Cellular Carcinoma Cells
HyB	Hypoxiebedingungen

IE	Internationale Einheit
IL	Interleukin
IFN- α	Interferon alpha
IFN- γ	Interferon gamma
IP3R	Inositol-1,4,5-Trisphosphat-Rezeptor
IP-10	Interferon-gamma-induziertes Protein 10
IRE1	Inositol-Requiring Enzyme 1
ISG56	IFN-Stimulated Gene 56
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
L	Liter
LCN2	Lipocalin 2
LD	Lipid-Droplets
LHB	großes (large) HBV-Oberflächenprotein
M	Mitochondrien
M	molar, molare Masse
MAMs	mitochondrial associated membranes
mA	Milliampere
mM	Millimolar
MHB	mittleres (middle) HBV-Oberflächenprotein
Min.	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MNA	Methyl-Nadic-Anhydride
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	messenger-RNA
Mt2	Metallothionein 2
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NAFLD	Nicht alkoholische Fettlebererkrankung

NF κ B	Nuclear Factor `Kappa-Light-Chain-Enhancer` of Activated B-cells
nm	Nanometer
NTCP	Natrium-Taurocholate Cotransporting Polypeptide
ORF	Open Reading Frames
PBA	Phenylbutyric Acid
1 W PBA	Eine Woche mit PBA behandelt
8 W PBA	Acht Wochen mit PBA behandelt
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Chain-Reaction
PERK	Protein Kinase RNA-like Endoplasmic Reticulum Kinase
PFA	Paraformaldehyd
PDI	Proteindisulfid-Isomerase
PKC	Proteinkinase C
PPARD	Peroxisome proliferator-activated receptor delta
q-RT PCR	quantitative Real Time PCR
PV	Portalvene
RNA	ribonucleic acid
ROS	reactive oxygen species
RT	reverse Transkriptase
SCID	severe combined immunodeficiency
S1P	Sphingosine-1-phosphate Phosphohydrolase
S2P	Sphingosine-2-phosphate Phosphohydrolase
SAA1	Serumamyloid A1
SAA2	Serumamyloid A2
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	seconds
SHB	kleines (small) HBV-Oberflächenprotein
tet-O	Tetrazyklin-Operator-Sequenz
TBS-T	Tris-Buffered Saline with Tween20
TEM	Transmissions-Elektronenmikroskop
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tg	Transgen
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha

TUDCA	Tauroursodeoxycholic Acid/ Tauroursodeoxycholsäure
TGF- β	Transforming Growth Factor beta
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UPR	Unfolded Protein Response
V	Volt
v/v	Volume per Volume
W	Watt
WNT2B	Wingless-type MMTV Integration Site Family, Member 2B
WT	Wildtyp
XBP1u	X-box Binding Protein 1 unspliced
XBP1s	X-box Binding Protein 1 spliced
ZK	Zellkern
ZV	Zentralvene

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur des Hepatitis-B-Virus.	5
Abbildung 2: Vergleich der Leberarchitektur einer gesunden Leber (A) mit einer fortgeschrittenen Leberfibrose (B).	9
Abbildung 3: Sensoren der <i>Unfolded Protein Response</i>	13
Abbildung 4: <i>Heatmap</i> -Abbildung zur Veranschaulichung des Genexpressionsmusters der <i>Microarray</i> -Analyse.	24
Abbildung 5: <i>Study Design</i>	26
Abbildung 6: Schematische Veranschaulichung der Versuchsdurchführung.	29
Abbildung 7: Biometrische Gruppeneinteilung des Tierstamms zur Analyse.	29
Abbildung 8: Trennung der <i>mRNA</i> in eine 28S- und 18S-Bande.	57
Abbildung 9: Immunhistochemische Auswertung von HBsAg (rot).	65
Abbildung 10: PBA reduzierte die Expression von GRP78 im Lebergewebe von HBs-transgenen Mäusen.	67
Abbildung 11: PBA reduzierte die relative Zellzahl GRP78-positiver Hepatozyten in HBs-transgenen Mäusen.	68
Abbildung 12: PBA und HBs-Expression zeigten keinen Effekt auf die <i>GRP78</i> -Genregulation in HBs-transgenen Mäusen.	70
Abbildung 13: PBA reduzierte zeitabhängig die Expression von PDI im Lebergewebe von HBs-transgenen Mäusen.	71
Abbildung 14: PBA reduzierte zeitabhängig die relative Zellzahl PDI-positiver Hepatozyten in HBs-transgenen Mäusen.	72
Abbildung 15: PBA aktivierte ATF6 im HBs-transgenen Maus-Modell.	74
Abbildung 16: PBA induzierte die Spaltung und die nukleäre Translokation von ATF6 im HBs-transgenen Maus-Modell.	75
Abbildung 17: Die semiquantitative Auswertung der <i>Western Blot</i> -Analysen zeigte eine signifikante nukleäre Translokation von ATF6 durch PBA.	76
Abbildung 18: Die statistische Auswertung der <i>Western Blot</i> -Untersuchungen nach densitometrischer Analyse ist dargestellt als <i>Box-Whisker-Plots</i>	77
Abbildung 19: PBA induzierte die nukleäre Translokation von ATF6 im Lebergewebe von HBs-transgenen Mäusen.	78

Abbildung 20: PBA induzierte die <i>mRNA</i> -Expression von <i>SAA2</i> in 5 Wochen alten HBs-transgenen Mäusen.	80
Abbildung 21: PBA induzierte eine gesteigerte <i>mRNA</i> -Expression von <i>SAA1</i> und <i>SAA2</i> in 19 Wochen alten HBs-transgenen Mäusen.	81
Abbildung 22: PBA beeinflusste die Genexpression von <i>HP</i> , <i>CRP</i> , <i>ISG56</i> in Zellkultur.	83
Abbildung 23: PBA induzierte eine Hochregulation proinflammatorischer Gene in Zellkultur.	84
Abbildung 24: PBA induzierte Signalwege in HBs-transgenen Zellen.....	86
Abbildung 25: PBA verstärkte die Proteinexpression von IP-10 und IL-16 im Serum 5 Wochen alter HBs-transgener Mäusen.	87
Abbildung 26: Die semiquantitative Auswertung des Proteom <i>Profilers</i> zeigte die verstärkte Proteinexpression von IP-10 und IL-16 im Serum 5 Wochen alter männlicher HBs-transgener Maus nach PBA-Behandlung.	88
Abbildung 27: Die <i>mRNA</i> -Expression von <i>XBPIs</i> wurde durch das HBs-Transgen in 5 Wochen alten HBs-transgenen Mäusen gesteigert.	89
Abbildung 28: PBA bewirkte in 12 Wochen alten HBs-transgenen Mäusen eine tendenzielle Zunahme der <i>mRNA</i> -Expression von <i>XBPIu</i>	90
Abbildung 29: PBA normalisierte die durch das HBs-Transgen induzierte Genexpression von <i>XBPIs</i> in 19 Wochen alten HBs-transgenen Mäusen.	91
Abbildung 30: Der Quotient aus <i>mRNA-XBPIu</i> und <i>mRNA-XBPIs</i> zeigte die höchste Genregulation von <i>XBPI</i> im HBs-transgenen Maus-Modell.	93
Abbildung 31: Das HBs-Transgen veränderte die Struktur der Mitochondrien und verursachte eine vermehrte Lipidspeicherung im HBs-transgenen Maus-Modell.	95
Abbildung 32: PBA aktivierte IP3R im HBs-transgenen Maus-Modell.	96
Abbildung 33: PBA reduzierte zeitabhängig die Expression von ERp44 im Lebergewebe von HBs-transgenen Mäusen.	98
Abbildung 34: Die Expression von ATF6 wurde durch das HBs-Transgen und die PBA-Gabe in Zellkultur reduziert.....	100
Abbildung 35: <i>Study Design</i> . Fazit ATF6-Aktivierung nach PBA-Gabe.....	104
Abbildung 36: <i>Study Design</i> . Fazit Modulation des Energiestoffwechsels nach PBA-Gabe.....	121

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der in der Arbeit verwendeten Primärantikörper.	40
Tabelle 2: Auflistung der in der Arbeit verwendeten Sekundärantikörper.	41
Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Isotypkontrollen.....	41
Tabelle 4: In der Arbeit verwendete Primer. <i>for</i> - <i>forward</i> ; <i>rev</i> - <i>reverse</i>	44
Tabelle 5: Der Quotient aus ungespleißtem und gespleißtem <i>q-RT PCR</i> -Produkt zeigte eine Regulation der <i>mRNA</i> -Expression von <i>XBPI</i> durch PBA-Behandlung der HBs-transgenen Mäuse an.	92

10 Literaturverzeichnis

Adler, A.; Ellinger, P.; Fürth, O.; Jordan, H.; Lichtwitz, L.; Möllendorff, W. *et al.* Adler, A.; Ellinger, P.; Fürth, O.; Jordan, H.; Lichtwitz, L.; Möllendorff, W.; Mond, R.; Rothman, S.; Schmitz, E.; Schwenkenbecher, A.; Seyderhelm, R.; Strasburger, J.; Trendelenburg, P.; Verzár, F. Adler, A.; Ellinger, P.; Fürth, O.; Jordan, H.; Lichtwitz, L.; Möllendorff, W.; Mond, R.; Rothman, S.; Schmitz, E.; Schwenkenbecher, A.; Seyderhelm, R.; Strasburger, J.; Trendelenburg, P.; Verzár, F. (1929): Resorption und Exkretion. Berlin, Heidelberg, s.l.: Springer Berlin Heidelberg. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-91029-6>.

Altman, D. G.; Bland, J. M. (2005): Standard deviations and standard errors. In: *BMJ (Clinical research ed.)* 331 (7521), S. 903. DOI: 10.1136/bmj.331.7521.903.

Arai, M.; Kondoh, N.; Imazeki, N.; Hada, A.; Hatsuse, K.; Kimura, F. *et al.* (2006): Transformation-associated gene regulation by ATF6alpha during hepatocarcinogenesis. In: *FEBS letters* 580 (1), S. 184–190. DOI: 10.1016/j.febslet.2005.11.072.

Argemí, J.; Kress, T. R.; Chang, H. C. Y.; Ferrero, R.; Bértolo, C.; Moreno, H. *et al.* (2017): X-box Binding Protein 1 Regulates Unfolded Protein, Acute-Phase, and DNA Damage Responses During Regeneration of Mouse Liver. In: *Gastroenterology* 152 (5), 1203-1216.e15. DOI: 10.1053/j.gastro.2016.12.040.

Arguin, G.; Regimbald-Dumas, Y.; Fregeau, M.-O.; Caron, A. Z.; Guillemette, G. (2007): Protein kinase C phosphorylates the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 2 and decreases the mobilization of Ca²⁺ in pancreatoma AR4-2J cells. In: *The Journal of endocrinology* 192 (3), S. 659–668. DOI: 10.1677/JOE-06-0179.

Arruda, A. P.; Pers, B. M.; Parlakgöl, G.; Güney, E.; Inouye, K.; Hotamisligil, G. S. (2014): Chronic enrichment of hepatic endoplasmic reticulum-mitochondria contact leads to mitochondrial dysfunction in obesity. In: *Nature medicine* 20 (12), S. 1427–1435. DOI: 10.1038/nm.3735.

- Austin**, R. C. (2009): The unfolded protein response in health and disease. In: *Antioxidants & redox signaling* 11 (9), S. 2279–2287. DOI: 10.1089/ars.2009.2686.
- Ayala**, P.; Montenegro, J.; Vivar, R.; Letelier, A.; Urroz, P. A.; Copaja, M. *et al.* (2012): Attenuation of endoplasmic reticulum stress using the chemical chaperone 4-phenylbutyric acid prevents cardiac fibrosis induced by isoproterenol. In: *Experimental and molecular pathology* 92 (1), S. 97–104. DOI: 10.1016/j.yexmp.2011.10.012.
- Baccino**, F. M.; Tessitore, L.; Bonelli, G. (1984): Control of protein degradation and growth phase in normal and neoplastic cells. In: *Toxicologic pathology* 12 (3), S. 281–287. DOI: 10.1177/019262338401200312.
- Bachmanov**, A. A.; Reed, D. R.; Beauchamp, G. K.; Tordoff, M. G. (2002): Food intake, water intake, and drinking spout side preference of 28 mouse strains. In: *Behavior genetics* 32 (6), S. 435–443.
- Baenkler**, H.-W.; **Goldschmidt**, H. (2015): Kurzlehrbuch Innere Medizin. 3. Aufl. s.l.: Georg Thieme Verlag KG. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1055/b-003-104354>.
- Bailey**, D.; Barreca, C.; O'Hare, P. (2007): Trafficking of the bZIP transmembrane transcription factor CREB-H into alternate pathways of ERAD and stress-regulated intramembrane proteolysis. In: *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 8 (12), S. 1796–1814. DOI: 10.1111/j.1600-0854.2007.00654.x.
- Baron**, J. L.; Gardiner, L.; Nishimura, S.; Shinkai, K.; Locksley, R.; Ganem, D. (2002): Activation of a nonclassical NKT cell subset in a transgenic mouse model of hepatitis B virus infection. In: *Immunity* 16 (4), S. 583–594.
- Basseri**, S.; Austin, R. C. (2012): Endoplasmic reticulum stress and lipid metabolism. Mechanisms and therapeutic potential. In: *Biochemistry research international* 2012, S. 841362. DOI: 10.1155/2012/841362.
- Basseri**, S.; Lhoták, S.; Sharma, A. M.; Austin, R. C. (2009): The chemical chaperone 4-phenylbutyrate inhibits adipogenesis by modulating the unfolded protein response. In: *Journal of lipid research* 50 (12), S. 2486–2501. DOI: 10.1194/jlr.M900216-JLR200.

- Bataller, R.; Brenner, D. A. (2005):** Liver fibrosis. In: *The Journal of clinical investigation* 115 (2), S. 209–218. DOI: 10.1172/JCI24282.
- Batulan, Z.; Shinder, G. A.; Minotti, S.; He, B. P.; Doroudchi, M. M.; Nalbantoglu, J. et al. (2003):** High threshold for induction of the stress response in motor neurons is associated with failure to activate HSF1. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23 (13), S. 5789–5798.
- Baumann, H.; Gauldie, J. (1994):** The acute phase response. In: *Immunology today* 15 (2), S. 74–80. DOI: 10.1016/0167-5699(94)90137-6.
- Beck, J.; Nassal, M. (2007):** Hepatitis B virus replication. In: *World journal of gastroenterology* 13 (1), S. 48–64.
- Bernier, V.; Lagacé, M.; Bichet, D. G.; Bouvier, M. (2004):** Pharmacological chaperones: potential treatment for conformational diseases. In: *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 15 (5), S. 222–228. DOI: 10.1016/j.tem.2004.05.003.
- Bertolotti, A.; Zhang, Y.; Hendershot, L. M.; Harding, H. P.; Ron, D. (2000):** Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. In: *Nature cell biology* 2 (6), S. 326–332. DOI: 10.1038/35014014.
- Blachier, M.; Leleu, H.; Peck-Radosavljevic, M.; Valla, D.-C.; Roudot-Thoraval, F. (2013):** The burden of liver disease in Europe. A review of available epidemiological data. In: *Journal of hepatology* 58 (3), S. 593–608. DOI: 10.1016/j.jhep.2012.12.005.
- Block, T. M.; Guo, H.; Guo, J.-T. (2007):** Molecular virology of hepatitis B virus for clinicians. In: *Clinics in liver disease* 11 (4), 685-706, vii. DOI: 10.1016/j.cld.2007.08.002.
- Block, T. M.; Mehta, A. S.; Fimmel, C. J.; Jordan, R. (2003):** Molecular viral oncology of hepatocellular carcinoma. In: *Oncogene* 22 (33), S. 5093–5107. DOI: 10.1038/sj.onc.1206557.

Blond-Elguindi, S.; Cwirla, S. E.; Dower, W. J.; Lipshutz, R. J.; Sprang, S. R.; Sambrook, J. F.; Gething, M. J. (1993): Affinity panning of a library of peptides displayed on bacteriophages reveals the binding specificity of BiP. In: *Cell* 75 (4), S. 717–728.

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

Borkham-Kamphorst, E.; Drews, F.; Weiskirchen, R. (2011): Induction of lipocalin-2 expression in acute and chronic experimental liver injury moderated by pro-inflammatory cytokines interleukin-1 β through nuclear factor- κ B activation. In: *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 31 (5), S. 656–665. DOI: 10.1111/j.1478-3231.2011.02495.x.

Borkham-Kamphorst, E.; van de Leur, E.; Zimmermann, H. W.; Karlmark, K. R.; Tihaa, L.; Haas, U. *et al.* (2013): Protective effects of lipocalin-2 (LCN2) in acute liver injury suggest a novel function in liver homeostasis. In: *Biochimica et biophysica acta* 1832 (5), S. 660–673. DOI: 10.1016/j.bbadis.2013.01.014.

Bouchard, M. J.; Navas-Martin, S. (2011): Hepatitis B and C virus hepatocarcinogenesis: lessons learned and future challenges. In: *Cancer letters* 305 (2), S. 123–143. DOI: 10.1016/j.canlet.2010.11.014.

Bravo, R.; Parra, V.; Gatica, D.; Rodriguez, A. E.; Torrealba, N.; Paredes, F. *et al.* (2013): Endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. Dynamics and metabolic integration. In: *International review of cell and molecular biology* 301, S. 215–290. DOI: 10.1016/B978-0-12-407704-1.00005-1.

Broglie, L. de (1947): La diffusion cohérente et le microscope corpusculaire. In: *Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des sciences* 224 (25), S. 1743.

Broglie, M. de (1946): Les rayons X et la recherche scientifique. In: *Journal de radiologie, d'electrologie & archives d'electricite medicale* 27 (3-4), S. 141–144.

Bruss, V. (2007): Hepatitis B virus morphogenesis. In: *World journal of gastroenterology* 13 (1), S. 65–73.

- Buchkovich**, N. J.; Yu, Y.; Pierciey, F. J.; Alwine, J. C. (2010): Human cytomegalovirus induces the endoplasmic reticulum chaperone BiP through increased transcription and activation of translation by using the BiP internal ribosome entry site. In: *Journal of virology* 84 (21), S. 11479–11486. DOI: 10.1128/JVI.01330-10.
- Bukau**, B.; Weissman, J.; Horwich, A. (2006): Molecular chaperones and protein quality control. In: *Cell* 125 (3), S. 443–451. DOI: 10.1016/j.cell.2006.04.014.
- Bultynck**, G.; Krebs, J. (2014): "Ca(2+) signaling and cell death": the ECS 2013 workshop in Leuven and a tribute to Humbert De Smedt. In: *Biochimica et biophysica acta* 1843 (10), S. 2139–2142. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2014.05.015.
- Bustin**, S. A. (2000): Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. In: *Journal of molecular endocrinology* 25 (2), S. 169–193.
- Calfon**, M.; Zeng, H.; Urano, F.; Till, J. H.; Hubbard, S. R.; Harding, H. P. *et al.* (2002): IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. In: *Nature* 415 (6867), S. 92–96. DOI: 10.1038/415092a.
- Campbell**, N. A. (2000): Prüfungs-Trainer Biologie. Heidelberg: Spektrum Akad. Verl.
- Cárdenas**, C.; Miller, R. A.; Smith, I.; Bui, T.; Molgó, J.; Müller, M. *et al.* (2010): Essential regulation of cell bioenergetics by constitutive InsP3 receptor Ca²⁺ transfer to mitochondria. In: *Cell* 142 (2), S. 270–283. DOI: 10.1016/j.cell.2010.06.007.
- Casciano**, J. C.; Duchemin, N. J.; Lamontagne, R. J.; Steel, L. F.; Bouchard, M. J. (2017): Hepatitis B virus modulates store-operated calcium entry to enhance viral replication in primary hepatocytes. In: *PloS one* 12 (2), e0168328. DOI: 10.1371/journal.pone.0168328.

Chakrabarty, P.; Jansen-West, K.; Beccard, A.; Ceballos-Diaz, C.; Levites, Y.; Verbeeck, C. *et al.* (2010): Massive gliosis induced by interleukin-6 suppresses Abeta deposition in vivo: evidence against inflammation as a driving force for amyloid deposition. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 24 (2), S. 548–559. DOI: 10.1096/fj.09-141754.

Chamcheu, J. C.; Navsaria, H.; Pihl-Lundin, I.; Liovic, M.; Vahlquist, A.; Törmä, H. (2011): Chemical chaperones protect epidermolysis bullosa simplex keratinocytes from heat stress-induced keratin aggregation. Involvement of heat shock proteins and MAP kinases. In: *The Journal of investigative dermatology* 131 (8), S. 1684–1691. DOI: 10.1038/jid.2011.93.

Chami, M.; Oulès, B.; Paterlini-Bréchet, P. (2006): Cytobiological consequences of calcium-signaling alterations induced by human viral proteins. In: *Biochimica et biophysica acta* 1763 (11), S. 1344–1362. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2006.09.025.

Chang, Y.; Wu, Y.; Liu, W.; Ji, G. (2015): Knockdown of ERp44 leads to apoptosis via activation of ER stress in HeLa cells. In: *Biochemical and biophysical research communications* 463 (4), S. 606–611. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.05.106.

Cheng, X.; Xia, Y.; Serti, E.; Block, P. D.; Chung, M.; Chayama, K. *et al.* (2017): Hepatitis B virus evades innate immunity of hepatocytes but activates cytokine production by macrophages. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 66 (6), S. 1779–1793. DOI: 10.1002/hep.29348.

Chisari, F. V.; Filippi, P.; Buras, J.; McLachlan, A.; Popper, H.; Pinkert, C. A. *et al.* (1987): Structural and pathological effects of synthesis of hepatitis B virus large envelope polypeptide in transgenic mice. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84 (19), S. 6909–6913.

Chisari, F. V.; Filippi, P.; McLachlan, A.; Milich, D. R.; Riggs, M.; Lee, S. *et al.* (1986): Expression of hepatitis B virus large envelope polypeptide inhibits hepatitis B surface antigen secretion in transgenic mice. In: *Journal of virology* 60 (3), S. 880–887.

- Chisari, F. V.;** Isogawa, M.; Wieland, S. F. (2010): Pathogenesis of hepatitis B virus infection. In: *Pathologie-biologie* 58 (4), S. 258–266. DOI: 10.1016/j.patbio.2009.11.001.
- Chisari, F. V.;** Klopchin, K.; Moriyama, T.; Pasquinelli, C.; Dunsford, H. A.; Sell, S. *et al.* (1989): Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus transgenic mice. In: *Cell* 59 (6), S. 1145–1156.
- Chisari, F. V.;** Pinkert, C. A.; Milich, D. R.; Filippi, P.; McLachlan, A.; Palmiter, R. D.; Brinster, R. L. (1985): A transgenic mouse model of the chronic hepatitis B surface antigen carrier state. In: *Science (New York, N.Y.)* 230 (4730), S. 1157–1160.
- Churin, Y.;** Roderfeld, M.; Stiefel, J.; Wurger, T.; Schroder, D.; Matono, T. *et al.* (2014): Pathological impact of hepatitis B virus surface proteins on the liver is associated with the host genetic background. In: *PloS one* 9 (3), e90608. DOI: 10.1371/journal.pone.0090608.
- Cornberg, M.;** Protzer, U.; Petersen, J.; Wedemeyer, H.; Berg, T.; Jilg, W. *et al.* (2011): Aktualisierung der S 3-Leitlinie zur Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Hepatitis-B-Virusinfektion. In: *Zeitschrift für Gastroenterologie* 49 (7), S. 871–930. DOI: 10.1055/s-0031-1273462.
- Cortez, L.;** Sim, V. (2014): The therapeutic potential of chemical chaperones in protein folding diseases. In: *Prion* 8 (2).
- Dandri, M.;** Lutgehetmann, M.; Volz, T.; Petersen, J. (2006): Small animal model systems for studying hepatitis B virus replication and pathogenesis. In: *Seminars in liver disease* 26 (2), S. 181–191. DOI: 10.1055/s-2006-939760.
- Dandri, M.;** Lütgehetmann, M.; Petersen, J. (2013): Experimental models and therapeutic approaches for HBV. In: *Seminars in immunopathology* 35 (1), S. 7–21. DOI: 10.1007/s00281-012-0335-7.
- Dane, D. S.;** Cameron, C. H.; Briggs, M. (1970): Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. In: *Lancet (London, England)* 1 (7649), S. 695–698.

Decuypere, J.-P.; Monaco, G.; Bultynck, G.; Missiaen, L.; Smedt, H. de; Parys, J. B. (2011): The IP(3) receptor-mitochondria connection in apoptosis and autophagy. In: *Biochimica et biophysica acta* 1813 (5), S. 1003–1013. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2010.11.023.

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

Dinarello, C. A. (2005): Blocking IL-1 in systemic inflammation. In: *The Journal of experimental medicine* 201 (9), S. 1355–1359. DOI: 10.1084/jem.20050640.

Doerr, H. W.; Gerlich, W. H. (2010): Medizinische Virologie. 2., komplett überarbeitete und erweiterte Auflage. s.l.: THIEME. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1055/b-001-2163>.

Fassio, A.; Sitia, R. (2002): Formation, isomerisation and reduction of disulphide bonds during protein quality control in the endoplasmic reticulum. In: *Histochemistry and cell biology* 117 (2), S. 151–157. DOI: 10.1007/s00418-001-0364-0.

Fensterl, V.; Sen, G. C. (2011): The ISG56/IFIT1 gene family. In: *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 31 (1), S. 71–78. DOI: 10.1089/jir.2010.0101.

Fensterl, V.; Sen, G. C. (2015): Interferon-induced Ifit proteins. Their role in viral pathogenesis. In: *Journal of virology* 89 (5), S. 2462–2468. DOI: 10.1128/JVI.02744-14.

Ferrari, C.; Penna, A.; Bertoletti, A.; Valli, A.; Antoni, A. D.; Giuberti, T. *et al.* (1990): Cellular immune response to hepatitis B virus-encoded antigens in acute and chronic hepatitis B virus infection. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 145 (10), S. 3442–3449.

Finch, E. A.; Turner, T. J.; Goldin, S. M. (1991): Calcium as a coagonist of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced calcium release. In: *Science (New York, N.Y.)* 252 (5004), S. 443–446.

- Finka**, A.; Mattoo, R. U. H.; Goloubinoff, P. (2016): Experimental Milestones in the Discovery of Molecular Chaperones as Polypeptide Unfolding Enzymes. In: *Annual review of biochemistry* 85, S. 715–742. DOI: 10.1146/annurev-biochem-060815-014124.
- Finkel**, T.; Holbrook, N. J. (2000): Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. In: *Nature* 408 (6809), S. 239–247. DOI: 10.1038/35041687.
- Flower**, D. R. (1996): The lipocalin protein family: structure and function. In: *The Biochemical journal* 318 (Pt 1), S. 1–14.
- Foschini**, M. P.; Macchia, S.; Losi, L.; Dei Tos, A. P.; Pasquinelli, G.; Di Tommaso, L. *et al.* (1998): Identification of mitochondria in liver biopsies. A study by immunohistochemistry, immunogold and Western blot analysis. In: *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 433 (3), S. 267–273.
- Foufelle**, F.; Fromenty, B. (2016): Role of endoplasmic reticulum stress in drug-induced toxicity. In: *Pharmacology research & perspectives* 4 (1), e00211. DOI: 10.1002/prp2.211.
- Franceschelli**, S.; Molledo, O.; Amodio, G.; Tajana, G.; Remondelli, P. (2011): In the Huh7 Hepatoma Cells Diclofenac and Indomethacin Activate Differently the Unfolded Protein Response and Induce ER Stress Apoptosis. In: *The open biochemistry journal* 5, S. 45–51. DOI: 10.2174/1874091X01105010045.
- Gani**, A. R.; Uppala, J. K.; Ramaiah, K. V. A. (2015): Tauroursodeoxycholic acid prevents stress induced aggregation of proteins in vitro and promotes PERK activation in HepG2 cells. In: *Archives of biochemistry and biophysics* 568, S. 8–15. DOI: 10.1016/j.abb.2014.12.031.
- Geng**, W.; Lo, C.-M.; Ng, K. T. P.; Ling, C.-C.; Qi, X.; Li, C.-X. *et al.* (2015): Interferon-gamma inducible protein 10 (IP10) induced cisplatin resistance of HCC after liver transplantation through ER stress signaling pathway. In: *Oncotarget* 6 (29), S. 28042–28056. DOI: 10.18632/oncotarget.4832.
- Gerlich**, W.; Thomssen, R. (1975): Standardized detection of hepatitis B surface antigen: determination of its serum concentration in weight units per volume. In: *Developments in biological standardization* 30, S. 78–87.

- Gerlich, W. H.; Glebe, D. (2016):** Development of an Allergy Immunotherapy Leads to a New Type of Hepatitis B Vaccine. In: *EBioMedicine* 11, S. 5–6. DOI: 10.1016/j.ebiom.2016.07.032.
- Gerlich, W. H.; Glebe, D.; Schüttler, C. G. (2007):** Deficiencies in the standardization and sensitivity of diagnostic tests for hepatitis B virus. In: *Journal of viral hepatitis* 14 Suppl 1, S. 16–21. DOI: 10.1111/j.1365-2893.2007.00912.x.
- Glebe, D.; Bremer, C. M. (2013):** The molecular virology of hepatitis B virus. In: *Seminars in liver disease* 33 (2), S. 103–112. DOI: 10.1055/s-0033-1345717.
- Glebe, D.; Urban, S. (2007):** Viral and cellular determinants involved in hepadnaviral entry. In: *World journal of gastroenterology* 13 (1), S. 22–38.
- Gong, B.; Zhang, L.-Y.; Lam, D. S.-C.; Pang, C.-P.; Yam, G. H.-F. (2010):** Sodium 4-phenylbutyrate ameliorates the effects of cataract-causing mutant gammaD-crystallin in cultured cells. In: *Molecular vision* 16, S. 997–1003.
- Gonzalez, F. J. (2008):** Regulation of hepatocyte nuclear factor 4 alpha-mediated transcription. In: *Drug metabolism and pharmacokinetics* 23 (1), S. 2–7.
- Görlach, A.; Klappa, P.; Kietzmann, T. (2006):** The endoplasmic reticulum: folding, calcium homeostasis, signaling, and redox control. In: *Antioxidants & redox signaling* 8 (9-10), S. 1391–1418. DOI: 10.1089/ars.2006.8.1391.
- Graumann, F.; Churin, Y.; Tschuschner, A.; Reifenberg, K.; Glebe, D.; Roderfeld, M.; Roeb, E. (2015):** Genomic Methylation Inhibits Expression of Hepatitis B Virus Envelope Protein in Transgenic Mice: A Non-Infectious Mouse Model to Study Silencing of HBV Surface Antigen Genes. In: *PloS one* 10 (12), e0146099. DOI: 10.1371/journal.pone.0146099.
- Gripon, P.; Cannie, I.; Urban, S. (2005):** Efficient inhibition of hepatitis B virus infection by acylated peptides derived from the large viral surface protein. In: *Journal of virology* 79 (3), S. 1613–1622. DOI: 10.1128/JVI.79.3.1613-1622.2005.
- Guan, D.; Wang, H.; Li, V. E.; Xu, Y.; Yang, M.; Shen, Z. (2009):** N-glycosylation of ATF6beta is essential for its proteolytic cleavage and transcriptional repressor function to ATF6alpha. In: *Journal of cellular biochemistry* 108 (4), S. 825–831. DOI: 10.1002/jcb.22310.

Guidotti, L. G.; Chisari, F. V. (2000): Cytokine-mediated control of viral infections. In: *Virology* 273 (2), S. 221–227. DOI: 10.1006/viro.2000.0442.

Guidotti, L. G.; Chisari, F. V. (2001): Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. In: *Annual review of immunology* 19, S. 65–91. DOI: 10.1146/annurev.immunol.19.1.65.

Guidotti, L. G.; Matzke, B.; Schaller, H.; Chisari, F. V. (1995): High-level hepatitis B virus replication in transgenic mice. In: *Journal of virology* 69 (10), S. 6158–6169.

Han, Z.; Yin, Y.; Zhang, Y.; Ehrhardt, S.; Thio, C. L.; Nelson, K. E. et al. (2017): Knowledge of and attitudes towards hepatitis B and its transmission from mother to child among pregnant women in Guangdong Province, China. In: *PloS one* 12 (6), e0178671. DOI: 10.1371/journal.pone.0178671.

Harding, H. P.; Calfon, M.; Urano, F.; Novoa, I.; Ron, D. (2002): Transcriptional and translational control in the Mammalian unfolded protein response. In: *Annual review of cell and developmental biology* 18, S. 575–599. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.18.011402.160624.

Hartl, F. U.; Bracher, A.; Hayer-Hartl, M. (2011): Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. In: *Nature* 475 (7356), S. 324–332. DOI: 10.1038/nature10317.

Haze, K.; Yoshida, H.; Yanagi, H.; Yura, T.; Mori, K. (1999): Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. In: *Molecular biology of the cell* 10 (11), S. 3787–3799.

He, C.; Klionsky, D. J. (2009): Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. In: *Annual review of genetics* 43, S. 67–93. DOI: 10.1146/annurev-genet-102808-114910.

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

Heinrich, Peter C.; **Müller**, Matthias; **Graeve**, Lutz; **Löffler**, Georg (Hg.) (2014): Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. 9., vollst. überarb. Aufl. Berlin: Springer (Springer-Lehrbuch). Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-17972-3>.

Henkel, A.; Green, R. M. (2013): The unfolded protein response in fatty liver disease. In: *Seminars in liver disease* 33 (4), S. 321–329. DOI: 10.1055/s-0033-1358522.

Hennenberg, M.; Trebicka, J.; Kohistani, Z.; Stark, C.; Nischalke, H.-D.; Krämer, B. *et al.* (2011): Hepatic and HSC-specific sorafenib effects in rats with established secondary biliary cirrhosis. In: *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 91 (2), S. 241–251. DOI: 10.1038/labinvest.2010.148.

Hetz, C. (2012): The unfolded protein response. Controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 13 (2), S. 89–102. DOI: 10.1038/nrm3270.

Hetz, C.; Martinon, F.; Rodriguez, D.; Glimcher, L. H. (2011): The unfolded protein response: integrating stress signals through the stress sensor IRE1 α . In: *Physiological reviews* 91 (4), S. 1219–1243. DOI: 10.1152/physrev.00001.2011.

Heymann, D. (2006): Autophagy. A protective mechanism in response to stress and inflammation. In: *Current opinion in investigational drugs (London, England : 2000)* 7 (5), S. 443–450.

Higo, T.; Hamada, K.; Hisatsune, C.; Nukina, N.; Hashikawa, T.; Hattori, M. *et al.* (2010): Mechanism of ER stress-induced brain damage by IP(3) receptor. In: *Neuron* 68 (5), S. 865–878. DOI: 10.1016/j.neuron.2010.11.010.

Higo, T.; Hattori, M.; Nakamura, T.; Natsume, T.; Michikawa, T.; Mikoshiba, K. (2005): Subtype-specific and ER luminal environment-dependent regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 by ERp44. In: *Cell* 120 (1), S. 85–98. DOI: 10.1016/j.cell.2004.11.048.

Hisatsune, C.; Ebisui, E.; Usui, M.; Ogawa, N.; Suzuki, A.; Mataga, N. *et al.* (2015): ERp44 Exerts Redox-Dependent Control of Blood Pressure at the ER. In: *Molecular cell* 58 (6), S. 1015–1027. DOI: 10.1016/j.molcel.2015.04.008.

- Hoesel, B.; Schmid, J. A. (2013):** The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer. In: *Molecular cancer* 12, S. 86. DOI: 10.1186/1476-4598-12-86.
- Hu, J.-L.; Liu, L.-P.; Yang, S.-L.; Fang, X.; Wen, L.; Ren, Q.-G.; Yu, C. (2016):** Hepatitis B virus induces hypoxia-inducible factor-2 α expression through hepatitis B virus X protein. In: *Oncology reports* 35 (3), S. 1443–1448. DOI: 10.3892/or.2015.4480.
- Huang, J.; Brumell, J. H. (2009):** Autophagy in immunity against intracellular bacteria. In: *Current topics in microbiology and immunology* 335, S. 189–215. DOI: 10.1007/978-3-642-00302-8_9.
- International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) (2017).** Online verfügbar unter <https://talk.ictvonline.org/>, zuletzt geprüft am 18.06.2017.
- Jee, H. (2016):** Size dependent classification of heat shock proteins: a mini-review. In: *Journal of exercise rehabilitation* 12 (4), S. 255–259. DOI: 10.12965/jer.1632642.321.
- Johnston, D. G.; Powell, N.; Gitnick, G. (1971):** Australia antigen and liver function tests following infectious hepatitis. A study of 111 patients in quest of aids in blood donor screening. In: *California medicine* 114 (4), S. 14–18.
- Joppien, S.; Maier, S. L.; Wendling, D. (2011):** BASICS experimentelle Doktorarbeit. 1. Aufl. München: Elsevier Urban & Fischer. Online verfügbar unter http://sub-hh.ciando.com/book/?bok_id=341395.
- Jung, Y.; Brown, K. D.; Witek, R. P.; Omenetti, A.; Yang, L.; Vandongen, M. et al. (2008):** Accumulation of hedgehog-responsive progenitors parallels alcoholic liver disease severity in mice and humans. In: *Gastroenterology* 134 (5), S. 1532–1543. DOI: 10.1053/j.gastro.2008.02.022.
- Kadowaki, H.; Nishitoh, H. (2013):** Signaling pathways from the endoplasmic reticulum and their roles in disease. In: *Genes* 4 (3), S. 306–333. DOI: 10.3390/genes4030306.

- Kasprzak**, A.; Biczysko, W.; Adamek, A.; Zabel, M. (2002): Morphological lesions detected by light and electron microscopies in chronic type B hepatitis. In: *Polish journal of pathology : official journal of the Polish Society of Pathologists* 53 (3), S. 103–115.
- Katrinli**, S.; Ozdil, K.; Sahin, A.; Ozturk, O.; Kir, G.; Baykal, A. T. *et al.* (2016): Proteomic profiling of HBV infected liver biopsies with different fibrotic stages. In: *Proteome science* 15, S. 7. DOI: 10.1186/s12953-017-0114-4.
- Kaufman**, D. M.; Crowder, C. M. (2015): Mitochondrial Proteostatic Collapse Leads to Hypoxic Injury. In: *Current biology : CB* 25 (16), S. 2171–2176. DOI: 10.1016/j.cub.2015.06.062.
- Kew**, M. C. (2011): Hepatitis B virus x protein in the pathogenesis of hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma. In: *Journal of gastroenterology and hepatology* 26 Suppl 1, S. 144–152. DOI: 10.1111/j.1440-1746.2010.06546.x.
- Kim**, I.; Xu, W.; Reed, J. C. (2008): Cell death and endoplasmic reticulum stress. Disease relevance and therapeutic opportunities. In: *Nature reviews. Drug discovery* 7 (12), S. 1013–1030. DOI: 10.1038/nrd2755.
- Kim**, P. S.; Arvan, P. (1998): Endocrinopathies in the family of endoplasmic reticulum (ER) storage diseases. Disorders of protein trafficking and the role of ER molecular chaperones. In: *Endocrine reviews* 19 (2), S. 173–202. DOI: 10.1210/edrv.19.2.0327.
- Kimura**, K.; Kakimi, K.; Wieland, S.; Guidotti, L. G.; Chisari, F. V. (2002): Interleukin-18 inhibits hepatitis B virus replication in the livers of transgenic mice. In: *Journal of virology* 76 (21), S. 10702–10707.
- Kiviluoto**, S.; Vervliet, T.; Ivanova, H.; Decuypere, J.-P.; Smedt, H. de; Missiaen, L. *et al.* (2013): Regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors during endoplasmic reticulum stress. In: *Biochimica et biophysica acta* 1833 (7), S. 1612–1624. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2013.01.026.
- Knox**, C.; Luke, G. A.; Blatch, G. L.; Pesce, E.-R. (2011): Heat shock protein 40 (Hsp40) plays a key role in the virus life cycle. In: *Virus research* 160 (1-2), S. 15–24. DOI: 10.1016/j.virusres.2011.06.013.

- Köck, J.;** Rösler, C.; Zhang, J.-J.; Blum, H. E.; Nassal, M.; Thoma, C. (2010): Generation of covalently closed circular DNA of hepatitis B viruses via intracellular recycling is regulated in a virus specific manner. In: *PLoS pathogens* 6 (9), e1001082. DOI: 10.1371/journal.ppat.1001082.
- Koj, A.** (1985): Cytokines regulating acute inflammation and synthesis of acute phase proteins. In: *Blut* 51 (4), S. 267–274.
- Kolb, P. S.;** Ayoub, E. A.; Zhou, W.; Yum, V.; Dickhout, J. G.; Ask, K. (2015): The therapeutic effects of 4-phenylbutyric acid in maintaining proteostasis. In: *The international journal of biochemistry & cell biology* 61, S. 45–52. DOI: 10.1016/j.biocel.2015.01.015.
- Kondo, S.;** Saito, A.; Asada, R.; Kanemoto, S.; Imaizumi, K. (2011): Physiological unfolded protein response regulated by OASIS family members, transmembrane bZIP transcription factors. In: *IUBMB life* 63 (4), S. 233–239. DOI: 10.1002/iub.433.
- Korenykh, A.;** Walter, P. (2012): Structural basis of the unfolded protein response. In: *Annual review of cell and developmental biology* 28, S. 251–277. DOI: 10.1146/annurev-cellbio-101011-155826.
- Koyama, M.;** Furuhashi, M.; Ishimura, S.; Mita, T.; Fuseya, T.; Okazaki, Y. *et al.* (2014): Reduction of endoplasmic reticulum stress by 4-phenylbutyric acid prevents the development of hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension. In: *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 306 (9), H1314-23. DOI: 10.1152/ajpheart.00869.2013.
- Kozutsumi, Y.;** Segal, M.; Normington, K.; Gething, M. J.; Sambrook, J. (1988): The presence of malfolded proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. In: *Nature* 332 (6163), S. 462–464. DOI: 10.1038/332462a0.
- Kuang, X.;** Hu, W.; Yan, M.; Wong, P. K. Y. (2010): Phenylbutyric acid suppresses protein accumulation-mediated ER stress in retrovirus-infected astrocytes and delays onset of paralysis in infected mice. In: *Neurochemistry international* 57 (7), S. 738–748. DOI: 10.1016/j.neuint.2010.08.010.

- Kurien**, B. T.; Scofield, R. H. (2009): A brief review of other notable protein blotting methods. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 536, S. 367–384. DOI: 10.1007/978-1-59745-542-8_38.
- Kushner**, I. (1982): The phenomenon of the acute phase response. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 389, S. 39–48.
- Laemmli**, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (5259), S. 680–685.
- Lavanchy**, D. (2004): Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. In: *Journal of viral hepatitis* 11 (2), S. 97–107.
- Lazar**, C.; Macovei, A.; Petrescu, S.; Branza-Nichita, N. (2012): Activation of ERAD pathway by human hepatitis B virus modulates viral and subviral particle production. In: *PloS one* 7 (3), e34169. DOI: 10.1371/journal.pone.0034169.
- Lazar**, C.; Uta, M.; Branza-Nichita, N. (2014): Modulation of the unfolded protein response by the human hepatitis B virus. In: *Frontiers in microbiology* 5, S. 433. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00433.
- Lazarev**, V. F.; Mikhaylova, E. R.; Guzhova, I. V.; Margulis, B. A. (2017): Possible Function of Molecular Chaperones in Diseases Caused by Propagating Amyloid Aggregates. In: *Frontiers in neuroscience* 11, S. 277. DOI: 10.3389/fnins.2017.00277.
- Lee**, K.; Tirasophon, W.; Shen, X.; Michalak, M.; Prywes, R.; Okada, T. *et al.* (2002): IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response. In: *Genes & development* 16 (4), S. 452–466. DOI: 10.1101/gad.964702.
- Lee**, W. H. (1984): Signal processing techniques for CCD image sensors. In: *Applied optics* 23 (23), S. 4280–4284.
- Lehtonen**, Š.; Jaronen, M.; Vehviläinen, P.; Lakso, M.; Rudgalvyte, M.; Keksa-Goldsteine, V. *et al.* (2016): Inhibition of Excessive Oxidative Protein Folding Is Protective in MPP(+) Toxicity-Induced Parkinson's Disease Models. In: *Antioxidants & redox signaling* 25 (8), S. 485–497. DOI: 10.1089/ars.2015.6402.

- Leung, D.;** Abbenante, G.; Fairlie, D. P. (2000): Protease inhibitors: current status and future prospects. In: *Journal of medicinal chemistry* 43 (3), S. 305–341.
- Li, B.;** Gao, B.; Ye, L.; Han, X.; Wang, W.; Kong, L. *et al.* (2007): Hepatitis B virus X protein (HBx) activates ATF6 and IRE1-XBP1 pathways of unfolded protein response. In: *Virus research* 124 (1-2), S. 44–49. DOI: 10.1016/j.virusres.2006.09.011.
- Li, Y.;** Li, C.; Xue, P.; Zhong, B.; Mao, A.-P.; Ran, Y. *et al.* (2009): ISG56 is a negative-feedback regulator of virus-triggered signaling and cellular antiviral response. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (19), S. 7945–7950. DOI: 10.1073/pnas.0900818106.
- Lindholm, D.;** Wootz, H.; Korhonen, L. (2006): ER stress and neurodegenerative diseases. In: *Cell death and differentiation* 13 (3), S. 385–392. DOI: 10.1038/sj.cdd.4401778.
- Liu, C.;** Mills, J.; Dixon, K.; Vennarini, J.; Cunningham, M.; Del Vecchio, A. *et al.* (2007): IL-16 signaling specifically induces STAT6 activation through CD4. In: *Cytokine* 38 (3), S. 145–150. DOI: 10.1016/j.cyto.2007.05.016.
- Liu, Y.;** Wang, X.-C.; Hu, D.; Huang, S.-R.; Li, Q.-S.; Li, Z.; Qu, Y. (2016): Heat shock protein 70 protects PC12 cells against ischemia-hypoxia/reoxygenation by maintaining intracellular Ca(2+) homeostasis. In: *Neural regeneration research* 11 (7), S. 1134–1140. DOI: 10.4103/1673-5374.187051.
- Livak, K. J.;** Schmittgen, T. D. (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. In: *Methods (San Diego, Calif.)* 25 (4), S. 402–408. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
- Locarnini, S.** (2004): Molecular virology of hepatitis B virus. In: *Seminars in liver disease* 24 Suppl 1, S. 3–10. DOI: 10.1055/s-2004-828672.
- Lucifora, J.;** Xia, Y.; Reisinger, F.; Zhang, K.; Stadler, D.; Cheng, X. *et al.* (2014): Specific and nonhepatotoxic degradation of nuclear hepatitis B virus cccDNA. In: *Science (New York, N.Y.)* 343 (6176), S. 1221–1228. DOI: 10.1126/science.1243462.

- Luttmann, W.; Bratke, K.; Küpper, M.; Myrtek, D.** (2004): *Der Experimentator: Immunologie*. 1. Aufl. Heidelberg: Elsevier Spektrum Akad. Verl. (Der Experimentator).
- Ma, L.-N.; Liu, X.-Y.; Lu, Z.-H.; Wu, L.-G.; Tang, Y.-Y.; Luo, X. et al.** (2017): Assessment of high-sensitivity C-reactive protein tests for the diagnosis of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis B-associated liver cirrhosis. In: *Oncology letters* 13 (5), S. 3457–3464. DOI: 10.3892/ol.2017.5890.
- Maini, M. K.; Boni, C.; Lee, C. K.; Larrubia, J. R.; Reignat, S.; Ogg, G. S. et al.** (2000): The role of virus-specific CD8(+) cells in liver damage and viral control during persistent hepatitis B virus infection. In: *The Journal of experimental medicine* 191 (8), S. 1269–1280.
- Malhi, H.; Kaufman, R. J.** (2011): Endoplasmic reticulum stress in liver disease. In: *Journal of hepatology* 54 (4), S. 795–809. DOI: 10.1016/j.jhep.2010.11.005.
- Malhotra, J. D.; Kaufman, R. J.** (2011): ER stress and its functional link to mitochondria. Role in cell survival and death. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3 (9), a004424. DOI: 10.1101/cshperspect.a004424.
- Mann, H. B.; Whitney, D. R.** (1947): On a Test of Whether one of Two Random Variables is Stochastically Larger than the Other. In: *Ann. Math. Statist.* 18 (1), S. 50–60. DOI: 10.1214/aoms/1177730491.
- Margariti, A.; Li, H.; Chen, T.; Martin, D.; Vizcay-Barrena, G.; Alam, S. et al.** (2013): XBP1 mRNA splicing triggers an autophagic response in endothelial cells through BECLIN-1 transcriptional activation. In: *The Journal of biological chemistry* 288 (2), S. 859–872. DOI: 10.1074/jbc.M112.412783.
- Marra, M.; Sordelli, I. M.; Lombardi, A.; Lamberti, M.; Tarantino, L.; Giudice, A. et al.** (2011): Molecular targets and oxidative stress biomarkers in hepatocellular carcinoma. An overview. In: *Journal of translational medicine* 9, S. 171. DOI: 10.1186/1479-5876-9-171.
- Mason, W. S.; Seal, G.; Summers, J.** (1980): Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. In: *Journal of virology* 36 (3), S. 829–836.

- Mayer, M.;** Kies, U.; Kammermeier, R.; Buchner, J. (2000): BiP and PDI cooperate in the oxidative folding of antibodies in vitro. In: *The Journal of biological chemistry* 275 (38), S. 29421–29425. DOI: 10.1074/jbc.M002655200.
- McMillan, D. R.;** Gething, M. J.; Sambrook, J. (1994): The cellular response to unfolded proteins. Intercompartmental signaling. In: *Current opinion in biotechnology* 5 (5), S. 540–545.
- Meuleman, P.;** Libbrecht, L.; Wieland, S.; Vos, R. de; Habib, N.; Kramvis, A. *et al.* (2006): Immune suppression uncovers endogenous cytopathic effects of the hepatitis B virus. In: *Journal of virology* 80 (6), S. 2797–2807. DOI: 10.1128/JVI.80.6.2797-2807.2006.
- Meyer, M.;** Caselmann, W. H.; Schlüter, V.; Schreck, R.; Hofschneider, P. H.; Baeuerle, P. A. (1992): Hepatitis B virus transactivator MHBst: activation of NF-kappa B, selective inhibition by antioxidants and integral membrane localization. In: *The EMBO journal* 11 (8), S. 2991–3001.
- Mikoshiba, K.** (2007): The IP3 receptor/Ca²⁺ channel and its cellular function. In: *Biochemical Society symposium* (74), S. 9–22. DOI: 10.1042/BSS0740009.
- Modrow, S.** (2010): Molekulare Virologie. 3. Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag. Online verfügbar unter <http://site.ebrary.com/lib/alltitles/docDetail.action?docID=10403692>.
- Montalbano, R.;** Honrath, B.; Wissniowski, T. T.; Elxnat, M.; Roth, S.; Ocker, M. *et al.* (2016): Exogenous hepatitis B virus envelope proteins induce endoplasmic reticulum stress. Involvement of cannabinoid axis in liver cancer cells. In: *Oncotarget* 7 (15), S. 20312–20323. DOI: 10.18632/oncotarget.7950.
- Mori, K.** (2009): Signalling pathways in the unfolded protein response. Development from yeast to mammals. In: *Journal of biochemistry* 146 (6), S. 743–750. DOI: 10.1093/jb/mvp166.
- Moshage, H.** (1997): Cytokines and the hepatic acute phase response. In: *The Journal of pathology* 181 (3), S. 257–266. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9896(199703)181:3<257::AID-PATH756>3.0.CO;2-U.

- Muchowski, P. J.; Wacker, J. L. (2005):** Modulation of neurodegeneration by molecular chaperones. In: *Nature reviews. Neuroscience* 6 (1), S. 11–22. DOI: 10.1038/nrn1587.
- Murakami, S. (2001):** Hepatitis B virus X protein. A multifunctional viral regulator. In: *Journal of gastroenterology* 36 (10), S. 651–660.
- Nakabayashi, H.; Taketa, K.; Miyano, K.; Yamane, T.; Sato, J. (1982):** Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. In: *Cancer research* 42 (9), S. 3858–3863.
- Nebbia, G.; Peppia, D.; Maini, M. K. (2012):** Hepatitis B infection: current concepts and future challenges. In: *QJM : monthly journal of the Association of Physicians* 105 (2), S. 109–113. DOI: 10.1093/qjmed/hcr270.
- Nemirovsky, A.; Fisher, Y.; Baron, R.; Cohen, I. R.; Monsonego, A. (2011):** Amyloid beta-HSP60 peptide conjugate vaccine treats a mouse model of Alzheimer's disease. In: *Vaccine* 29 (23), S. 4043–4050. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.03.033.
- Nilsen-Hamilton, M.; Liu, Q.; Ryon, J.; Bendickson, L.; Lepont, P.; Chang, Q. (2003):** Tissue involution and the acute phase response. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 995, S. 94–108.
- Omenetti, A.; Syn, W.-K.; Jung, Y.; Francis, H.; Porrello, A.; Witek, R. P. et al. (2009):** Repair-related activation of hedgehog signaling promotes cholangiocyte chemokine production. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 50 (2), S. 518–527. DOI: 10.1002/hep.23019.
- Omori, Y.; Imai, J.; Watanabe, M.; Komatsu, T.; Suzuki, Y.; Kataoka, K. et al. (2001):** CREB-H. A novel mammalian transcription factor belonging to the CREB/ATF family and functioning via the box-B element with a liver-specific expression. In: *Nucleic acids research* 29 (10), S. 2154–2162.
- Otto, H.; Conz, C.; Maier, P.; Wolfle, T.; Suzuki, C. K.; Jenö, P. et al. (2005):** The chaperones MPP11 and Hsp70L1 form the mammalian ribosome-associated complex. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (29), S. 10064–10069. DOI: 10.1073/pnas.0504400102.

- Ozcan, U.;** Yilmaz, E.; Ozcan, L.; Furuhashi, M.; Vaillancourt, E.; Smith, R. O. *et al.* (2006): Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. In: *Science (New York, N.Y.)* 313 (5790), S. 1137–1140. DOI: 10.1126/science.1128294.
- Pais, R.;** Rusu, E.; Zilisteanu, D.; Circiumaru, A.; Micu, L.; Voiculescu, M. *et al.* (2015): Prevalence of steatosis and insulin resistance in patients with chronic hepatitis B compared with chronic hepatitis C and non-alcoholic fatty liver disease. In: *European journal of internal medicine* 26 (1), S. 30–36. DOI: 10.1016/j.ejim.2014.12.001.
- Pasqual, G.;** Burri, D. J.; Pasquato, A.; La Torre, J. C. de; Kunz, S. (2011): Role of the host cell's unfolded protein response in arenavirus infection. In: *Journal of virology* 85 (4), S. 1662–1670. DOI: 10.1128/JVI.01782-10.
- Pasyk, E. A.;** Foskett, J. K. (1995): Mutant (delta F508) cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel is functional when retained in endoplasmic reticulum of mammalian cells. In: *The Journal of biological chemistry* 270 (21), S. 12347–12350.
- Patel, R. D.;** Murray, I. A.; Flaveny, C. A.; Kusnadi, A.; Perdew, G. H. (2009): Ah receptor represses acute-phase response gene expression without binding to its cognate response element. In: *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 89 (6), S. 695–707. DOI: 10.1038/labinvest.2009.24.
- Pereira, T. d. A.;** Witek, R. P.; Syn, W.-K.; Choi, S. S.; Bradrick, S.; Karaca, G. F. *et al.* (2010): Viral factors induce Hedgehog pathway activation in humans with viral hepatitis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma. In: *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 90 (12), S. 1690–1703. DOI: 10.1038/labinvest.2010.147.
- Perz, J. F.;** Armstrong, G. L.; Farrington, L. A.; Hutin, Y. J. F.; Bell, B. P. (2006): The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. In: *Journal of hepatology* 45 (4), S. 529–538. DOI: 10.1016/j.jhep.2006.05.013.
- Pfaffl, M. W.** (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. In: *Nucleic acids research* 29 (9), e45.

- Prentice**, E.; Jerome, W. G.; Yoshimori, T.; Mizushima, N.; Denison, M. R. (2004): Coronavirus replication complex formation utilizes components of cellular autophagy. In: *The Journal of biological chemistry* 279 (11), S. 10136–10141. DOI: 10.1074/jbc.M306124200.
- Prince**, A. M. (1968): An antigen detected in the blood during the incubation period of serum hepatitis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 60 (3), S. 814–821.
- Protzer**, U.; Schaller, H. (2000): Immune escape by hepatitis B viruses. In: *Virus genes* 21 (1-2), S. 27–37.
- Radons**, J. (2016): The human HSP70 family of chaperones: where do we stand? In: *Cell stress & chaperones* 21 (3), S. 379–404. DOI: 10.1007/s12192-016-0676-6.
- Raha**, S.; Robinson, B. H. (2000): Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. In: *Trends in biochemical sciences* 25 (10), S. 502–508.
- Rahman**, S. M.; Qadri, I.; Janssen, R. C.; Friedman, J. E. (2009): Fenofibrate and PBA prevent fatty acid-induced loss of adiponectin receptor and pAMPK in human hepatoma cells and in hepatitis C virus-induced steatosis. In: *Journal of lipid research* 50 (11), S. 2193–2202. DOI: 10.1194/jlr.M800633-JLR200.
- Rao**, J.; Yue, S.; Fu, Y.; Zhu, J.; Wang, X.; Busuttil, R. W. *et al.* (2014): ATF6 mediates a pro-inflammatory synergy between ER stress and TLR activation in the pathogenesis of liver ischemia-reperfusion injury. In: *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 14 (7), S. 1552–1561. DOI: 10.1111/ajt.12711.
- Rasheva**, V. I.; Domingos, P. M. (2009): Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis. In: *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 14 (8), S. 996–1007. DOI: 10.1007/s10495-009-0341-y.
- Reece**, S. T.; Loddenkemper, C.; Askew, D. J.; Zedler, U.; Schommer-Leitner, S.; Stein, M. *et al.* (2010): Serine protease activity contributes to control of Mycobacterium tuberculosis in hypoxic lung granulomas in mice. In: *The Journal of clinical investigation* 120 (9), S. 3365–3376. DOI: 10.1172/JCI42796.

- Rehermann, B.** (2013): Pathogenesis of chronic viral hepatitis: differential roles of T cells and NK cells. In: *Nature medicine* 19 (7), S. 859–868. DOI: 10.1038/nm.3251.
- Richmond, J.; Tuzova, M.; Cruikshank, W.; Center, D.** (2014): Regulation of cellular processes by interleukin-16 in homeostasis and cancer. In: *Journal of cellular physiology* 229 (2), S. 139–147. DOI: 10.1002/jcp.24441.
- Ricobaraza, A.; Cuadrado-Tejedor, M.; Pérez-Mediavilla, A.; Frechilla, D.; Del Río, J.; García-Osta, A.** (2009): Phenylbutyrate ameliorates cognitive deficit and reduces tau pathology in an Alzheimer's disease mouse model. In: *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 34 (7), S. 1721–1732. DOI: 10.1038/npp.2008.229.
- Ringelhan, M.; Heikenwalder, M.; Protzer, U.** (2013): Direct effects of hepatitis B virus-encoded proteins and chronic infection in liver cancer development. In: *Digestive diseases (Basel, Switzerland)* 31 (1), S. 138–151. DOI: 10.1159/000347209.
- Robinson, W. S.** (1977): The genome of hepatitis B virus. In: *Annual review of microbiology* 31, S. 357–377. DOI: 10.1146/annurev.mi.31.100177.002041.
- Ron, D.; Walter, P.** (2007): Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 8 (7), S. 519–529. DOI: 10.1038/nrm2199.
- Rowland, A. A.; Voeltz, G. K.** (2012): Endoplasmic reticulum-mitochondria contacts. Function of the junction. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 13 (10), S. 607–625. DOI: 10.1038/nrm3440.
- Roy, J.; Galano, J.-M.; Durand, T.; Le Guennec, J.-Y.; Lee, J. C.-Y.** (2017): Physiological role of reactive oxygen species as promoters of natural defenses. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. DOI: 10.1096/fj.201700170R.
- Russell, R.; Karzai, A. W.; Mehl, A. F.; McMacken, R.** (1999): DnaJ Dramatically Stimulates ATP Hydrolysis by DnaK. Insight into Targeting of Hsp70 Proteins to Polypeptide Substrates †. In: *Biochemistry* 38 (13), S. 4165–4176. DOI: 10.1021/bi9824036.

Rutishauser, J.; Spiess, M. (2002): Endoplasmic reticulum storage diseases. In: *Swiss medical weekly* 132 (17-18), S. 211–222.

Rutkowski, D. T.; Kaufman, R. J. (2004): A trip to the ER. Coping with stress. In: *Trends in cell biology* 14 (1), S. 20–28.

Sandhu, P.; Haque, M.; Humphries-Bickley, T.; Ravi, S.; Song, J. (2017): Hepatitis B Virus Immunopathology, Model Systems, and Current Therapies. In: *Frontiers in immunology* 8, S. 436. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00436.

Sasaki-Osugi, K.; Imoto, C.; Takahara, T.; Shibata, H.; Maki, M. (2013): Nuclear ALG-2 protein interacts with Ca²⁺ homeostasis endoplasmic reticulum protein (CHERP) Ca²⁺-dependently and participates in regulation of alternative splicing of inositol trisphosphate receptor type 1 (IP3R1) pre-mRNA. In: *The Journal of biological chemistry* 288 (46), S. 33361–33375. DOI: 10.1074/jbc.M113.497479.

Sawada, N.; Yao, J.; Hiramatsu, N.; Hayakawa, K.; Araki, I.; Takeda, M.; Kitamura, M. (2008): Involvement of hypoxia-triggered endoplasmic reticulum stress in outlet obstruction-induced apoptosis in the urinary bladder. In: *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 88 (5), S. 553–563. DOI: 10.1038/labinvest.2008.21.

Scheper, W.; Hoozemans, J. J. M. (2009): Endoplasmic reticulum protein quality control in neurodegenerative disease. The good, the bad and the therapy. In: *Current medicinal chemistry* 16 (5), S. 615–626.

Scherzer, O. (1936): ?ber einige Fehler von Elektronenlinsen. In: *Z. Physik* 101 (9-10), S. 593–603. DOI: 10.1007/BF01349606.

Schmitz, N.; Laverty, S.; Kraus, V. B.; Aigner, T. (2010): Basic methods in histopathology of joint tissues. In: *Osteoarthritis and cartilage* 18 Suppl 3, S113–6. DOI: 10.1016/j.joca.2010.05.026.

Schmitz, S. (2007): *Der Experimentator: Zellkultur*. 1. Aufl. München: Elsevier Spektrum Akad. Verl. (Der Experimentator).

Schröder, M.; Kaufman, R. J. (2005): The mammalian unfolded protein response. In: *Annual review of biochemistry* 74, S. 739–789. DOI: 10.1146/annurev.biochem.73.011303.074134.

Scorrano, L.; Oakes, S. A.; Opferman, J. T.; Cheng, E. H.; Sorcinelli, M. D.; Pozzan, T.; Korsmeyer, S. J. (2003): BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺. A control point for apoptosis. In: *Science (New York, N.Y.)* 300 (5616), S. 135–139. DOI: 10.1126/science.1081208.

Seeger, C.; Mason, W. S. (2000): Hepatitis B virus biology. In: *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 64 (1), S. 51–68.

Shameem, M.; Bhargava, R.; Ahmad, Z.; Saad, T.; Fatima, N.; Malik, A. (2011): Association between serum C- reactive protein levels and other important predictive markers of outcome in COPD. In: *Acta medica Iranica* 49 (1), S. 18–20.

Shang, J.; Lehrman, M. A. (2004): Discordance of UPR signaling by ATF6 and Ire1p-XBP1 with levels of target transcripts. In: *Biochemical and biophysical research communications* 317 (2), S. 390–396. DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.03.058.

Shen, J.; Snapp, E. L.; Lippincott-Schwartz, J.; Prywes, R. (2005): Stable binding of ATF6 to BiP in the endoplasmic reticulum stress response. In: *Molecular and cellular biology* 25 (3), S. 921–932. DOI: 10.1128/MCB.25.3.921-932.2005.

Shi, Y.; Vattem, K. M.; Sood, R.; An, J.; Liang, J.; Stramm, L.; Wek, R. C. (1998): Identification and characterization of pancreatic eukaryotic initiation factor 2 alpha-subunit kinase, PEK, involved in translational control. In: *Molecular and cellular biology* 18 (12), S. 7499–7509.

Shiber, A.; Ravid, T. (2014): Chaperoning proteins for destruction. Diverse roles of Hsp70 chaperones and their co-chaperones in targeting misfolded proteins to the proteasome. In: *Biomolecules* 4 (3), S. 704–724. DOI: 10.3390/biom4030704.

Simpson, K. J.; Henderson, N. C.; Bone-Larson, C. L.; Lukacs, N. W.; Hogaboam, C. M.; Kunkel, S. L. (2003): Chemokines in the pathogenesis of liver disease. So many players with poorly defined roles. In: *Clinical science (London, England : 1979)* 104 (1), S. 47–63.

Sir, D.; Tian, Y.; Chen, W.-l.; Ann, D. K.; Yen, T.-S. B.; Ou, J.-H. J. (2010): The early autophagic pathway is activated by hepatitis B virus and required for viral DNA replication. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (9), S. 4383–4388. DOI: 10.1073/pnas.0911373107.

Smith, B. J. (1984): SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1, S. 41–55. DOI: 10.1385/0-89603-062-8:41.

Stauffer, J. K.; Scarzello, A. J.; Jiang, Q.; Wilttrout, R. H. (2012): Chronic inflammation, immune escape, and oncogenesis in the liver. A unique neighborhood for novel intersections. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 56 (4), S. 1567–1574. DOI: 10.1002/hep.25674.

Stengel, Dirk (Hg.) (2010): Statistik und Aufbereitung klinischer Daten. Stuttgart: THIEME.

Sun, D.; Nassal, M. (2006): Stable HepG2- and Huh7-based human hepatoma cell lines for efficient regulated expression of infectious hepatitis B virus. In: *Journal of hepatology* 45 (5), S. 636–645. DOI: 10.1016/j.jhep.2006.05.019.

Sunbul, M. (2014): Hepatitis B virus genotypes. Global distribution and clinical importance. In: *World journal of gastroenterology* 20 (18), S. 5427–5434. DOI: 10.3748/wjg.v20.i18.5427.

Tacke, F.; Weiskirchen, R. (2012): Update on hepatic stellate cells: pathogenic role in liver fibrosis and novel isolation techniques. In: *Expert review of gastroenterology & hepatology* 6 (1), S. 67–80. DOI: 10.1586/egh.11.92.

Tateishi, Y.; Hattori, M.; Nakayama, T.; Iwai, M.; Bannai, H.; Nakamura, T. *et al.* (2005): Cluster formation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor requires its transition to open state. In: *The Journal of biological chemistry* 280 (8), S. 6816–6822. DOI: 10.1074/jbc.M405469200.

Thomas, J.; **Gemming**, T. (2013): Analytische Transmissionselektronenmikroskopie. Eine Einführung für den Praktiker. Vienna: Springer. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-7091-1440-7>.

Tian, Y.; Sir, D.; Kuo, C.-F.; Ann, D. K.; Ou, J.-H. J. (2011): Autophagy required for hepatitis B virus replication in transgenic mice. In: *Journal of virology* 85 (24), S. 13453–13456. DOI: 10.1128/JVI.06064-11.

Todaro, G. J.; **Green**, H. (1963): Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. In: *The Journal of cell biology* 17, S. 299–313.

- Tokushige, K.;** Moradpour, D.; Wakita, T.; Geissler, M.; Hayashi, N.; Wands, J. R. (1997): Comparison between cytomegalovirus promoter and elongation factor-1 alpha promoter-driven constructs in the establishment of cell lines expressing hepatitis C virus core protein. In: *Journal of virological methods* 64 (1), S. 73–80.
- Towbin, H.;** Staehelin, T.; Gordon, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76 (9), S. 4350–4354.
- Tricarico, C.;** Pinzani, P.; Bianchi, S.; Paglierani, M.; Distante, V.; Pazzagli, M. *et al.* (2002): Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies. In: *Analytical biochemistry* 309 (2), S. 293–300.
- Tsuru, A.;** Imai, Y.; Saito, M.; Kohno, K. (2016): Novel mechanism of enhancing IRE1alpha-XBP1 signalling via the PERK-ATF4 pathway. In: *Scientific reports* 6, S. 24217. DOI: 10.1038/srep24217.
- Tu, B. P.;** Weissman, J. S. (2004): Oxidative protein folding in eukaryotes. Mechanisms and consequences. In: *The Journal of cell biology* 164 (3), S. 341–346. DOI: 10.1083/jcb.200311055.
- Uehara, T.;** Nakamura, T.; Yao, D.; Shi, Z.-Q.; Gu, Z.; Ma, Y. *et al.* (2006): S-nitrosylated protein-disulphide isomerase links protein misfolding to neurodegeneration. In: *Nature* 441 (7092), S. 513–517. DOI: 10.1038/nature04782.
- Uppala, J. K.;** Gani, A. R.; Ramaiah, K. V. A. (2017): Chemical chaperone, TUDCA unlike PBA, mitigates protein aggregation efficiently and resists ER and non-ER stress induced HepG2 cell death. In: *Scientific reports* 7 (1), S. 3831. DOI: 10.1038/s41598-017-03940-1.
- Urbani, S.;** Boni, C.; Amadei, B.; Fisticaro, P.; Cerioni, S.; Valli, M. A. *et al.* (2005): Acute phase HBV-specific T cell responses associated with HBV persistence after HBV/HCV coinfection. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 41 (4), S. 826–831. DOI: 10.1002/hep.20614.

- Urlinger, S.;** Baron, U.; Thellmann, M.; Hasan, M. T.; Bujard, H.; Hillen, W. (2000): Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators. Novel mutations yield expanded range and sensitivity. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (14), S. 7963–7968. DOI: 10.1073/pnas.130192197.
- Valastyan, J. S.;** Lindquist, S. (2014): Mechanisms of protein-folding diseases at a glance. In: *Disease models & mechanisms* 7 (1), S. 9–14. DOI: 10.1242/dmm.013474.
- Vembar, S. S.;** Brodsky, J. L. (2008): One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 9 (12), S. 944–957. DOI: 10.1038/nrm2546.
- Volgyi, K.;** Juhász, G.; Kovacs, Z.; Penke, B. (2015): Dysfunction of Endoplasmic Reticulum (ER) and Mitochondria (MT) in Alzheimer's Disease. The Role of the ER-MT Cross-Talk. In: *Current Alzheimer research* 12 (7), S. 655–672.
- Wallraff, J.** (1969): Verdauungsapparat Atmungsapparat. Vierter Teil Die Leber - Gallengangsystem, Gallenblase und Galle Ergänzung zu Band V/2. Berlin, Heidelberg, s.l.: Springer Berlin Heidelberg (Handbuch der Mikroskopischen Anatomie des Menschen, 5 / 4). Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-662-30579-9>.
- Walsh, P.;** Bursac, D.; Law, Y. C.; Cyr, D.; Lithgow, T. (2004): The J-protein family: modulating protein assembly, disassembly and translocation. In: *EMBO reports* 5 (6), S. 567–571. DOI: 10.1038/sj.embor.7400172.
- Walter, P.;** Ron, D. (2011): The unfolded protein response. From stress pathway to homeostatic regulation. In: *Science (New York, N.Y.)* 334 (6059), S. 1081–1086. DOI: 10.1126/science.1209038.
- Wang, G.;** Liu, S.; Wang, L.; Meng, L.; Cui, C.; Zhang, H. *et al.* (2017): Lipocalin-2 Promotes Endoplasmic Reticulum Stress and Proliferation by Augmenting Intracellular Iron in Human Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells. In: *International journal of biological sciences* 13 (2), S. 135–144. DOI: 10.7150/ijbs.17758.

- Wang, H.-C.;** Huang, W.; Lai, M.-D.; Su, I.-J. (2006): Hepatitis B virus pre-S mutants, endoplasmic reticulum stress and hepatocarcinogenesis. In: *Cancer science* 97 (8), S. 683–688. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2006.00235.x.
- Wang, J.-Q.;** Chen, X.; Zhang, C.; Tao, L.; Zhang, Z.-H.; Liu, X.-Q. *et al.* (2013a): Phenylbutyric acid protects against carbon tetrachloride-induced hepatic fibrogenesis in mice. In: *Toxicology and applied pharmacology* 266 (2), S. 307–316. DOI: 10.1016/j.taap.2012.11.007.
- Wang, K.** (2015): Autophagy and apoptosis in liver injury. In: *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 14 (11), S. 1631–1642. DOI: 10.1080/15384101.2015.1038685.
- Wang, M.;** Kaufman, R. J. (2014): The impact of the endoplasmic reticulum protein-folding environment on cancer development. In: *Nature reviews. Cancer* 14 (9), S. 581–597. DOI: 10.1038/nrc3800.
- Wang, W.;** Peng, J. X.; Yang, J. Q.; Yang, L. Y. (2009): Identification of gene expression profiling in hepatocellular carcinoma using cDNA microarrays. In: *Digestive diseases and sciences* 54 (12), S. 2729–2735. DOI: 10.1007/s10620-008-0667-2.
- Wang, X.;** Pattison, J. S.; Su, H. (2013b): Posttranslational modification and quality control. In: *Circulation research* 112 (2), S. 367–381. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.112.268706.
- Waris, G.;** Tardif, K. D.; Siddiqui, A. (2002): Endoplasmic reticulum (ER) stress. Hepatitis C virus induces an ER-nucleus signal transduction pathway and activates NF-kappaB and STAT-3. In: *Biochemical pharmacology* 64 (10), S. 1425–1430.
- Webster, G. J.;** Reignat, S.; Maini, M. K.; Whalley, S. A.; Ogg, G. S.; King, A. *et al.* (2000): Incubation phase of acute hepatitis B in man. Dynamic of cellular immune mechanisms. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 32 (5), S. 1117–1124. DOI: 10.1053/jhep.2000.19324.

Wei, J.; Gaut, J. R.; Hendershot, L. M. (1995): In vitro dissociation of BiP-peptide complexes requires a conformational change in BiP after ATP binding but does not require ATP hydrolysis. In: *The Journal of biological chemistry* 270 (44), S. 26677–26682.

Welch, W. J.; Brown, C. R. (1996): Influence of molecular and chemical chaperones on protein folding. In: *Cell stress & chaperones* 1 (2), S. 109–115.

Werle-Lapostolle, B.; Bowden, S.; Locarnini, S.; Wurstorn, K.; Petersen, J.; Lau, G. *et al.* (2004): Persistence of cccDNA during the natural history of chronic hepatitis B and decline during adefovir dipivoxil therapy. In: *Gastroenterology* 126 (7), S. 1750–1758.

Wieland, S.; Thimme, R.; Purcell, R. H.; Chisari, F. V. (2004): Genomic analysis of the host response to hepatitis B virus infection. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (17), S. 6669–6674. DOI: 10.1073/pnas.0401771101.

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

Wilkinson, B.; Gilbert, H. F. (2004): Protein disulfide isomerase. In: *Biochimica et biophysica acta* 1699 (1-2), S. 35–44. DOI: 10.1016/j.bbapap.2004.02.017.

Wilson, K. C.; Center, D. M.; Cruikshank, W. W. (2004): The effect of interleukin-16 and its precursor on T lymphocyte activation and growth. In: *Growth factors (Chur, Switzerland)* 22 (2), S. 97–104.

World Health Organization (2017): Hepatitis B. Online verfügbar unter <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>, zuletzt aktualisiert am 18.06.2017, zuletzt geprüft am 18.06.2017.

Wright, G.; Noiret, L.; Olde Damink, S. W. M.; Jalan, R. (2011): Interorgan ammonia metabolism in liver failure: the basis of current and future therapies. In: *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 31 (2), S. 163–175. DOI: 10.1111/j.1478-3231.2010.02302.x.

- Wu, S.;** Kanda, T.; Imazeki, F.; Arai, M.; Yonemitsu, Y.; Nakamoto, S. *et al.* (2010): Hepatitis B virus e antigen downregulates cytokine production in human hepatoma cell lines. In: *Viral immunology* 23 (5), S. 467–476. DOI: 10.1089/vim.2010.0042.
- Wu, S.;** Kanda, T.; Nakamoto, S.; Jiang, X.; Nakamura, M.; Sasaki, R. *et al.* (2016a): Cooperative effects of hepatitis B virus and TNF may play important roles in the activation of metabolic pathways through the activation of NF- κ B. In: *International journal of molecular medicine* 38 (2), S. 475–481. DOI: 10.3892/ijmm.2016.2643.
- Wu, Y.;** Adi, D.; Long, M.; Wang, J.; Liu, F.; Gai, M.-T. *et al.* (2016b): 4-Phenylbutyric Acid Induces Protection against Pulmonary Arterial Hypertension in Rats. In: *PloS one* 11 (6), e0157538. DOI: 10.1371/journal.pone.0157538.
- Xia, W.;** Shen, Y.; Xie, H.; Zheng, S. (2006): Involvement of endoplasmic reticulum in hepatitis B virus replication. In: *Virus research* 121 (2), S. 116–121. DOI: 10.1016/j.virusres.2006.01.020.
- Xu, R.;** Zhang, Z.; Wang, F.-S. (2012): Liver fibrosis: mechanisms of immune-mediated liver injury. In: *Cellular & molecular immunology* 9 (4), S. 296–301. DOI: 10.1038/cmi.2011.53.
- Xu, W.;** Wang, N.-R.; Wang, H.-F.; Feng, Q.; Deng, J.; Gong, Z.-Q. *et al.* (2016): Analysis of epithelial-mesenchymal transition markers in the histogenesis of hepatic progenitor cell in HBV-related liver diseases. In: *Diagnostic pathology* 11 (1), S. 136. DOI: 10.1186/s13000-016-0587-y.
- Yamamoto, K.;** Sato, T.; Matsui, T.; Sato, M.; Okada, T.; Yoshida, H. *et al.* (2007): Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6 α and XBP1. In: *Developmental cell* 13 (3), S. 365–376. DOI: 10.1016/j.devcel.2007.07.018.
- Yamamoto, K.;** Yoshida, H.; Kokame, K.; Kaufman, R. J.; Mori, K. (2004): Differential contributions of ATF6 and XBP1 to the activation of endoplasmic reticulum stress-responsive cis-acting elements ERSE, UPRE and ERSE-II. In: *Journal of biochemistry* 136 (3), S. 343–350. DOI: 10.1093/jb/mvh122.

- Yan, H.;** Zhong, G.; Xu, G.; He, W.; Jing, Z.; Gao, Z. *et al.* (2012): Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. In: *eLife* 1, e00049. DOI: 10.7554/eLife.00049.
- Yang, F.;** Brune, J. L.; Baldwin, W. D.; Barnett, D. R.; Bowman, B. H. (1983): Identification and characterization of human haptoglobin cDNA. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80 (19), S. 5875–5879.
- Yang, F.;** Yan, S.; He, Y.; Wang, F.; Song, S.; Guo, Y. *et al.* (2008): Expression of hepatitis B virus proteins in transgenic mice alters lipid metabolism and induces oxidative stress in the liver. In: *Journal of hepatology* 48 (1), S. 12–19. DOI: 10.1016/j.jhep.2007.06.021.
- Yang, H.;** Fu, Q.; Liu, C.; Li, T.; Wang, Y.; Zhang, H. *et al.* (2015): Hepatitis B virus promotes autophagic degradation but not replication in autophagosome. In: *Bioscience trends* 9 (2), S. 111–116. DOI: 10.5582/bst.2015.01049.
- Yang, S. J.;** IglayReger, H. B.; Kadouh, H. C.; Bodary, P. F. (2009): Inhibition of the chemokine (C-C motif) ligand 2/chemokine (C-C motif) receptor 2 pathway attenuates hyperglycaemia and inflammation in a mouse model of hepatic steatosis and lipodystrophy. In: *Diabetologia* 52 (5), S. 972–981. DOI: 10.1007/s00125-009-1309-8.
- Ye, J.;** Rawson, R. B.; Komuro, R.; Chen, X.; Dave, U. P.; Prywes, R. *et al.* (2000): ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. In: *Molecular cell* 6 (6), S. 1355–1364.
- Yi, H.;** Gu, C.; Li, M.; Zhang, Z.; Li, Q.; Feng, J. *et al.* (2017): PERK/eIF2 α contributes to changes of insulin signaling in HepG2 cell induced by intermittent hypoxia. In: *Life sciences*. DOI: 10.1016/j.lfs.2017.04.022.
- Yoshida, H.;** Haze, K.; Yanagi, H.; Yura, T.; Mori, K. (1998): Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. In: *The Journal of biological chemistry* 273 (50), S. 33741–33749.

- Yoshida**, H.; Matsui, T.; Yamamoto, A.; Okada, T.; Mori, K. (2001): XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. In: *Cell* 107 (7), S. 881–891.
- Yoshida**, H.; Okada, T.; Haze, K.; Yanagi, H.; Yura, T.; Negishi, M.; Mori, K. (2000): ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response. In: *Molecular and cellular biology* 20 (18), S. 6755–6767.
- Zanni**, E.; Maulucci, G.; Pomata, D.; Buiarelli, F.; Krasnowska, E. K.; Parasassi, T. *et al.* (2015): ER stress induced by the OCH1 mutation triggers changes in lipid homeostasis in *Kluyveromyces lactis*. In: *Research in microbiology* 166 (2), S. 84–92. DOI: 10.1016/j.resmic.2014.12.011.
- Zeng**, L.; Lu, M.; Mori, K.; Luo, S.; Lee, A. S.; Zhu, Y.; Shyy, J. Y.-J. (2004): ATF6 modulates SREBP2-mediated lipogenesis. In: *The EMBO journal* 23 (4), S. 950–958. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600106.
- Zhang**, K.; Kaufman, R. J. (2008): From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. In: *Nature* 454 (7203), S. 455–462. DOI: 10.1038/nature07203.
- Zhang**, K.; Shen, X.; Wu, J.; Sakaki, K.; Saunders, T.; Rutkowski, D. T. *et al.* (2006): Endoplasmic reticulum stress activates cleavage of CREBH to induce a systemic inflammatory response. In: *Cell* 124 (3), S. 587–599. DOI: 10.1016/j.cell.2005.11.040.
- Zhang**, Q.; Li, Y.; Liang, T.; Lu, X.; Zhang, C.; Liu, X. *et al.* (2015): ER stress and autophagy dysfunction contribute to fatty liver in diabetic mice. In: *International journal of biological sciences* 11 (5), S. 559–568. DOI: 10.7150/ijbs.10690.
- Zheng**, N. Q.; Zheng, Z. H.; Xu, H. X.; Huang, M. X.; Peng, X. M. (2017): Glucose-regulated protein 78 demonstrates antiviral effects but is more suitable for hepatocellular carcinoma prevention in hepatitis B. In: *Virology journal* 14 (1), S. 77. DOI: 10.1186/s12985-017-0747-z.

Zhou, F.; Zhang, W.; Zhou, J.; Li, M.; Zhong, F.; Zhang, Y. *et al.* (2017): Involvement of endoplasmic reticulum stress in formalin-induced pain is attenuated by 4-phenylbutyric acid. In: *Journal of pain research* 10, S. 653–662. DOI: 10.2147/JPR.S125805.

11 Publikationen und Kongressbeiträge

11.1 Publikationsbeteiligung

BAIER KM, KÖPPEL A, SCHNEIDER F, CHURIN Y, SCHROEDER D, RODERFELD M, ROEB E. *Phenylbutyric acid induced PERK and ATF-6 pathways of ER-stress and Acute Phase Response in HBsAg-transgenic mice. Manuscript in preparation.* 2017.

BAIER KM, KREUTZ K, VERHOFF MA. Diagnoseschema zur Bestimmung von morphologischen Gesichtszügen und deren Ausprägungen unter Berücksichtigung älterer und neuerer Fachliteratur. Archiv für Kriminologie 2017; Band 240: Heft 1 und 2.

BAKCHOUL T, WALEK K, KRAUTWURST A, RUMMEL M, BEIN G, SANTOSO S, SACHS UJ. *Glycosylation of autoantibodies: Insights into the mechanism of immune thrombocytopenia.* Thromb Haemost 2013; 110: 1259-1266.

BAIER KM, KREUTZ K, VERHOFF MA. Analyse morphologischer Gesichtszüge eineiiger Zwillinge. Archiv für Kriminologie 2017. In Korrektur.

11.2 Kongressbeiträge

BAIER KM, CHURIN Y, SCHNEIDER F, KÖPPEL A, LEDER D, TSCHUSCHNER A, RODERFELD M, ROEB E. 4-PBA, ein synthetisches Chaperon, aktiviert den Transkriptionsfaktor ATF6 im murinen HBV-Modell. 123. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin (DGIM). 2017. Postervortrag & Reisestipendium

BAIER KM, CHURIN Y, SCHNEIDER F, KÖPPEL A, LEDER D, TSCHUSCHNER A, RODERFELD M, ROEB E. Modulation der Unfolded Protein Response (UPR) im murinen HBV-Modell durch Aktivierung des Transkriptions-faktors ATF6. 33. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber (GASL). 2017. Postervortrag

BAIER KM, CHURIN Y, SCHNEIDER F, KÖPPEL A, LEDER D, TSCHUSCHNER A, RODERFELD M, ROEB E. *Modulation of the Unfolded Protein Response (UPR) in HBV-mouse-model by activation of transcription factor ATF6. Workshop Communication and System Relevance in Liver Damage and Regeneration. FALK Foundation.* 2017. Postervortrag

BAIER KM, CHURIN Y, SCHNEIDER F, TSCHUSCHNER A, RODERFELD M, ROEB E. Tauroursodeoxycholsäure aktiviert das Ubiquitin-Proteasom System in Hepatitis B transgenen Zellen. 32. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber (GASL). 2016. Postervortrag

BAIER KM, CHURIN Y, SCHNEIDER F, TSCHUSCHNER A, RODERFELD M, ROEB E. *Tauroursodeoxycholic acid activates the ubiquitin-proteasome system in hepatitis B transgenic cells. Workshop Communication and System Relevance in Liver Damage and Regeneration. FALK Foundation.* 2016. Postervortrag

BAIER KM, KÖPPEL A, GLEBE D, CHURIN Y, SCHRÖDER D, TSCHUSCHNER A, RODERFELD M, ROEB E. Synthetisches Chaperon PBA steigert Transgen Expression und Akut-Phase-Reaktion in Hepatitis B transgenen Mäusen. 70. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten mit Sektion Endoskopie (DGVS). 2015. Postervortrag

BAKCHOUL T, **WALEK K**, KRAUTWURST A, SANTOSO S, BEIN G, SACHS UJ. N-Glycan of Antiplatelet Autoantibodies in ITP-Patients is Essentially Required for Complement and Phagocytosis-Mediated Platelet Destruction. 44. Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie (DGTI). 2011. Kongressvortrag

SCHNEIDER F, CHURIN Y, KÖPPEL A, **BAIER KM**, TSCHUSCHNER A, RODERFELD M, ROEB E. Das synthetische Chaperon 4-PBA induziert eine Akut-Phase-Reaktion im Maus-Modell für Protein-Speicherkrankheiten. 32. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber (GASL). 2016.

SCHNEIDER F, CHURIN Y, KÖPPEL A, **BAIER KM**, TSCHUSCHNER A, RODERFELD M, ROEB E. *The synthetic chaperon 4-PBA induces an acute phase response in a mouse model of protein storage diseases. Workshop Communication and System Relevance in Liver Damage and Regeneration. FALK Foundation.* 2016.

SCHNEIDER F, CHURIN Y, KÖPPEL A, **BAIER KM**, TSCHUSCHNER A, RODERFELD M, ROEB E. Das synthetische Chaperon 4-PBA führt zur Akut-Phase-Reaktion in einem HBs-transgenen Maus-Modell. 71. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten mit Sektion Endoskopie (DGVS). 2016.

KÖPPEL A, **BAIER KM**, Glebe D, Churin Y, TSCHUSCHNER A, RODERFELD M, ROEB E. Das synthetische Chaperon 4-PBA verändert das Verteilungsmuster der HBV-Hüllproteine im Endoplasmatischen Retikulum von Hepatitis B transgenen Mäusen und führt zu verstärkter Pathogenese. 71. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten mit Sektion Endoskopie (DGVS). 2016.

KÖPPEL A, **BAIER KM**, GLEBE D, CHURIN Y, SCHRÖDER D, TSCHUSCHNER A, RODERFELD M, ROEB E. Das synthetische Chaperon PBA steigert ER Stress und Inflammation in Hepatitis B transgenen Mäusen. 70. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten mit Sektion Endoskopie (DGVS). 2015.

12 Eidesstaatliche 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 Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Gießen, 20.12.2017

Ort, Datum

Unterschrift

13 Danksagung

Frau Univ.-Prof. Dr. Elke Roeb danke ich herzlichst für die Überlassung des Themas und die freundliche Betreuung sowie für die fachlichen Anregungen und Schaffung optimaler Bedingungen zur Anfertigung dieser Arbeit.

Herrn PD Dr. Martin Roderfeld für die Diskussionsbereitschaft und die umfassende Betreuung und Förderung meiner Arbeit.

Herrn Dr. Yuri Curin für seine anregenden Ideen, der steten Gesprächsbereitschaft und Geduld mit mir.

Frau Annette Tschuschner, Frau Dagmar Leder und Ingrid Breitenborn-Müller für praktische und moralische Unterstützung bei den Experimenten und eine lehrreiche Zeit im Labor.

Frau Alica Köppel und Frau Franziska Schneider für die erfolgreiche Zusammenarbeit, Frau Katharina Wernicke, Herr Tilman Würger und Herr Fabian Schwill für die schöne Zeit.

Herrn Prof. Dr. Joybrato Mukherjee, Frau Dr. Nadyne Stritzke, Frau Julia Mohr, Frau Stefanie Armbrrecht und Team für die Unterstützung für das Stipendium zur Promotionsabschlussförderung im Rahmen des Gleichstellungskonzepts der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Herrn AR Dr. Ulrich Gärtner und seiner Arbeitsgruppe für die Bereitstellung des Elektronenmikroskops und den fachlichen Rat.

Herrn Prof. Dr. Tamam Bakchoul und meiner ehemaligen Arbeitsgruppe danke ich für die fachlichen Gespräche und stärkenden Worte.

Von Herzen danke ich Frau Dr. Sabine Mehlmann als meine Mentorin, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Besonderen Dank an meinem Ehemann Adrian Baier für den unglaublichen Rückhalt, meiner Tochter Aurelia Toni-Josefine Baier, die mich unendlich glücklich macht und meinen Eltern und Schwiegereltern für jegliche Unterstützung.