

**Aus dem Institut für Veterinär-Biochemie  
des Fachbereiches Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin**

**Interferenz des Hepatitis-B-Virus mit  
insulinabhängig regulierten Signalwegen**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Thekla Bogenhagen geb. Heinrich  
Tierärztin  
aus Ratzeburg

Berlin 2017  
Journal-Nr.:3928

Gedruckt mit Genehmigung  
des Fachbereiches Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek

Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Ralf Einspanier

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Eberhard Hildt

Dritter Gutachter: Prof. Dr. Benedikt Kaufer

Deskriptoren Hepatitis B virus, liver, insulin, interference, cell cultures, DNA, RNA, ELISA, electrophoresis, polymerase chain reaction, regeneration, western-blotting, fluorescence microscopy, mice, blood parameters, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase

Tag der Promotion: 20.02.2017

# Meinen lieben Eltern

So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig,  
man muß sie für fertig erklären,  
wenn man nach Zeit und Umständen  
das Mögliche getan hat.

Johann Wolfgang von Goethe

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Hepatitis-B-Virus-Infektion . . . . .	1
1.1.1	Epidemiologie . . . . .	1
1.1.2	Pathogenese . . . . .	2
1.1.3	Klinisches Erscheinungsbild . . . . .	4
1.1.4	Diagnose . . . . .	4
1.1.5	Prävention . . . . .	6
1.1.6	Therapieindikationen & Therapie . . . . .	7
1.2	Das Hepatitis-B-Virus . . . . .	9
1.2.1	Geschichte des Hepatitis-B-Virus . . . . .	9
1.2.2	Klassifikation des Hepatitis-B-Virus . . . . .	10
1.2.3	Morphologie und Genomstruktur des Hepatitis-B-Virus . . . . .	12
1.2.4	Der HBV-Lebenszyklus . . . . .	13
1.3	Der Nrf2-ARE-Signalweg . . . . .	16
1.3.1	<i>Nuclear Factor-Erythroid 2-related Factor 2 (NRF2)</i> . . . . .	16
1.3.2	<i>Antioxidant responsive element (ARE)</i> . . . . .	17
1.3.3	ARE-regulierte Gene . . . . .	17
1.3.4	Regulation der Aktivität und Stabilität von Nrf2 . . . . .	19
1.3.4.1	Keap1 . . . . .	19
1.3.4.2	<i>Small Maf</i> -Proteine . . . . .	20
1.3.5	Interaktion von Nrf2 mit intrazellulären Signalwegen . . . . .	21
1.3.5.1	Proteinkinase C . . . . .	21
1.3.5.2	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen . . . . .	22
1.3.5.3	Phosphatidylinositol-3-Kinase . . . . .	23
<b>2</b>	<b>Ziel der Arbeit</b>	<b>27</b>
<b>3</b>	<b>Material</b>	<b>28</b>
3.1	Zellen, Tiere und Gewebeproben . . . . .	28
3.1.1	Prokaryotische Zellen . . . . .	28
3.1.2	Eukaryotische Zellen . . . . .	28
3.1.3	Tiere . . . . .	29
3.1.4	Gewebeproben . . . . .	29

3.2	Plasmide . . . . .	29
3.3	Oligonukleotide . . . . .	29
3.4	Antikörper . . . . .	30
3.5	Größenstandards . . . . .	31
3.6	Enzyme . . . . .	31
3.7	Reagenzien für die Zellkultur . . . . .	32
3.8	Inhibitoren . . . . .	32
3.9	Chemikalien . . . . .	32
3.10	Pharmazeutika und Medizinprodukte . . . . .	33
3.11	Kits . . . . .	33
3.12	Geräte . . . . .	34
3.12.1	Elektrophorese . . . . .	34
3.12.2	Mikroskopie . . . . .	34
3.12.3	Bildgebung . . . . .	34
3.12.4	Real-Time PCR . . . . .	34
3.12.5	Zentrifugen . . . . .	34
3.12.6	Andere Geräte . . . . .	35
3.13	Verbrauchsmaterialien . . . . .	35
3.14	Puffer und Lösungen . . . . .	36
3.15	Software . . . . .	38
<b>4</b>	<b>Methoden</b>	<b>39</b>
4.1	Zellbiologie . . . . .	39
4.1.1	Prokaryotische Zellkultur . . . . .	39
4.1.2	Eukaryotische Zellkultur . . . . .	39
4.1.2.1	Kultivieren und Passagieren . . . . .	39
4.1.2.2	Zellzählung . . . . .	39
4.1.3	Transfektion von Huh7.5-Zellen . . . . .	40
4.1.4	Ernte und Lyse eukaryotischer Zellen . . . . .	40
4.1.4.1	Proteinlysate für Western-Blot-Analysen . . . . .	40
4.1.4.2	Proteinlysate für ELISA . . . . .	40
4.2	Molekularbiologische Methoden . . . . .	40
4.2.1	Agarose-Gel-Elektrophorese . . . . .	40
4.2.2	Bestimmung von DNA- & RNA-Konzentrationen . . . . .	41
4.2.3	Isolierung von Plasmid-DNA . . . . .	41
4.2.4	RNA-Isolierung . . . . .	41
4.2.5	cDNA-Synthese . . . . .	42
4.2.6	<i>Real-Time PCR</i> . . . . .	42
4.3	Proteinbiochemische Methoden . . . . .	43
4.3.1	Protein-Quantifizierung mittels Bradford-Methode . . . . .	43

4.3.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	43
4.3.3	Western-Blot-Analyse	44
4.4	Immunologische Methoden	45
4.4.1	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>	45
4.4.2	Immunfluoreszenz & Immunhistochemie	45
4.4.2.1	Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie	45
4.4.2.2	Indirekte Immunhistochemie	46
4.5	Mikroskopie	46
4.5.1	Konfokale <i>Laser-Scanning</i> -Mikroskopie	46
4.6	Charakterisierung HBV-transgener Mäuse	46
4.6.1	Bestimmung HBV-transgener Mäuse	46
4.6.2	Untersuchung biochemischer Blutparameter	47
4.6.2.1	Untersuchung des AST- und ALT-Gehaltes	47
4.6.3	Partielle 2/3-Hepatektomie	47
4.6.4	Leberentnahme	48
4.6.5	Herstellung von Leberlysaten	48
4.6.6	RNA-Isolierung aus Lebergewebe	49
4.6.7	Histologie	49
4.6.7.1	Hämatoxylin-Eosin- & van Gieson-Färbung	49
4.6.7.2	Indirekte Immunhistochemie	49
4.6.7.3	BrdU-Immunhistochemie	49
4.6.7.4	<i>TUNEL-Assay</i>	50
4.7	Statistik	50
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>51</b>
5.1	Einfluss von HBV auf Proteine der Insulin-Signalkaskade und des Glukosestoffwechsels	51
5.1.1	Erhöhte Menge an Insulin-Rezeptor in HBV-replizierenden Zellen <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	51
5.1.2	HBV beeinflusst nicht die Menge des <i>Insulin-like-growth-factor</i> -Rezeptors und Insulinrezeptor-Substrats-1	54
5.1.3	Vermehrte Expression des Glukose-1-Transporters (GLUT-1) in HBV-positiven Zellen	55
5.1.4	Kein Einfluss von HBV auf die Phosphoglyceratkinase	57
5.2	Analyse des Einflusses von HBV auf die Insulin-/IGF-1-Signalkaskade	58
5.2.1	Phosphorylierung des IR- und IGF-1-Rezeptors nach Stimulation mit Insulin in HBV-replizierenden Zellen	58
5.2.2	Vermehrte Aktivierung des IRS-1-Tyrosin in HBV-positiven Zellen bei gleichzeitiger Stimulation mit Insulin und Glukoseoxidase	61
5.2.3	Keine Phosphorylierung der <i>c-jun N-terminal Kinase</i> durch Stimulation mit Glukoseoxidase in HBV-positiven Zellen	64

---

5.3	Charakterisierung HBV-transgener Mäuse . . . . .	66
5.3.1	Erhöhte Menge des Insulin-Rezeptors in HBV-transgenen Mäusen . . . . .	66
5.3.2	Keine veränderte Expression von GLUT-1 und PGK in HBV-transgenen Mäusen . . . . .	68
5.3.3	Keine histologischen Veränderungen in Lebern von HBV-transgenen Mäusen . . . . .	69
5.3.4	Verminderte Leberregeneration in HBV-transgenen Mäusen nach partieller Hepatektomie . . . . .	71
5.3.5	Keine Apoptoseinduktion durch partielle Hepatektomie in HBV-transgenen Mäusen . . . . .	73
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>76</b>
6.1	Der Insulin-/IGF-1-Signalweg und seine Aktivierung in HBV-replizierenden Zellen . . . . .	77
6.2	Verzögerte Leberregeneration in HBV-transgenen Mäusen . . . . .	82
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>85</b>
<b>8</b>	<b>Abstract</b>	<b>88</b>
<b>9</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>90</b>
<b>10</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>93</b>
<b>11</b>	<b>Publikationsverzeichnis</b>	<b>114</b>
<b>12</b>	<b>Danksagung</b>	<b>115</b>
<b>13</b>	<b>Selbständigkeitserklärung</b>	<b>116</b>

# 1 Einleitung

Als Hepatitis wird eine entzündliche Erkrankung der Leber bezeichnet, die durch bakterielle, virale oder parasitäre Infektionen, radioaktive Strahlung, Lebertoxine, Alkohol oder Arzneimittel, Traumata sowie Autoimmun- oder Systemerkrankungen hervorgerufen werden kann. Die häufigste Ursache für Hepatitiden sind virale Infektionen [WHO]. Neben den Hepatitis A-, B-, C-, D-, E- und G-Viren können ebenfalls einige Herpesviren, Coxsackieviren, das Gelbfiebertvirus, Adenoviren, Paramyxoviren sowie Rubellaviren Hepatitiden auslösen [Gerok, 2000].

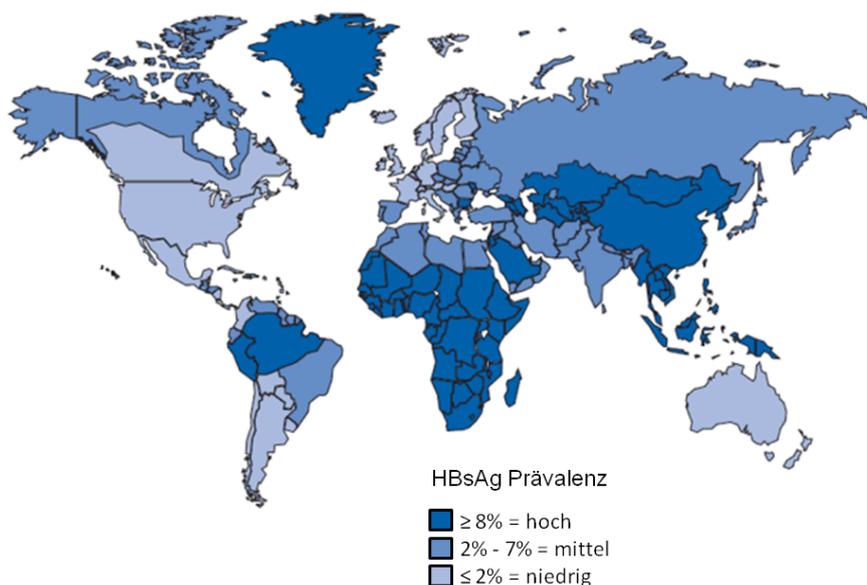
## 1.1 Hepatitis-B-Virus-Infektion

### 1.1.1 Epidemiologie

Hepatitis B ist eine der häufigsten und schwerwiegendsten Infektionskrankheiten weltweit. Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organisation, WHO*) wird geschätzt, dass ein Drittel der Weltbevölkerung eine Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus (HBV) durchgemacht hat (seropositiv für HBcAg) und mehr als 350 Millionen Menschen chronisch mit HBV infiziert sind [Neuveut et al., 2010, WHO, 2002]. Die Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus verursacht mehr als eine Million Todesfälle im Jahr und trotz erhältlicher Vakzine liegt die Anzahl der Neuinfektionen bei vier Millionen jährlich [WHO, 2002]. Das Reservoir der Hepatitis-B-Viren bilden vor allem chronisch HBV-infizierte Personen, die symptomlos sind oder nur geringe klinische Symptome aufweisen [RKI, 2012]. 25 % aller mit HBV infizierten Menschen entwickeln schwerwiegende Lebererkrankungen wie chronische Hepatitiden, Leberzirrhose oder primäre hepatozelluläre Karzinome (HCC) [Lok and McMahon, 2007]. Letzteres ist die häufigste Form der malignen Lebertumoren und in über 50 % der Fälle mit einer chronischen Infektion des Hepatitis-B-Virus assoziiert. Die Zahl der Todesfälle durch HBV-assoziierte hepatozelluläre Karzinome wird auf 650.000 jährlich geschätzt [El-Serag, 2012, Parkin, 2006, Lupberger and Hildt, 2007].

Zu den hochendemischen Regionen, die eine chronische HBV-Prävalenz von über  $\geq 8$  % der Population aufweisen, gehören Grönland, die Amazonasregion, Mittel- und Süd-Afrika, Teile des Mittleren Ostens sowie Zentral- und Südostasien. In den westlichen Ländern liegt die Prävalenz der chronischen HBV Infektion bei  $< 2$  %. Zu diesen niedrigendemischen Regionen gehören Zentral- und Westeuropa, die Türkei, Nord-, Mittel- und Teile Südamerikas, Australien, Neuseeland und Japan. Die übrigen Länder machen circa 43 % der Weltbevölkerung aus und fallen unter die mittleren endemischen Regionen

mit einer Prävalenz von 2-7 % [Weinbaum et al., 2008, El-Serag, 2012]. Abbildung 1.1 zeigt die weltweite Verteilung der chronischen HBV-Infektion anhand der HBsAg-Prävalenz.



**Abbildung 1.1: Geographische Verteilung der chronischen Hepatitis-B-Virus Infektionen anhand der HBsAg Prävalenz;** hohe Prävalenz von  $\geq 8\%$  (dunkelblau), mittlere Prävalenz 2-7 % (blau), niedrige Prävalenz  $< 2\%$  (hellblau), modifiziert nach Weinbaum et al. [2008].

Neben der Seroprävalenz von HBV unterscheidet sich auch der Übertragungsweg weltweit deutlich. Die Übertragung von HBV erfolgt parenteral durch Blut und Blutprodukte, Speichel, Tränenflüssigkeit, venerisch (Samenflüssigkeit und Vaginalsekret), durch kontaminierte medizinische Instrumente, Spritzen und Nadeln sowie perinatal [Hahn et al., 2009]. Während in den hochendemischen Regionen die Übertragung hauptsächlich perinatal und durch Kontakt mit HBV-infizierten Personen im Haushalt im Kindes- beziehungsweise im Jugendalter stattfindet, infizieren sich in niedrig endemischen Gebieten weniger als 20 % der Bevölkerung vor dem 40. Lebensjahr mit HBV und davon der größte Teil durch sexuellen Kontakt oder unsterile Nadeln beim Drogenkonsum. In mittleren endemischen Regionen überwiegt kein bestimmter Übertragungsweg, diese sind sehr vielfältig und reichen von perinataler und sexueller Übertragung über den Drogenkonsum mit unsterilen Nadeln bis hin zur nosokomialen Infektion [Weinbaum et al., 2008, Lavanchy, 2005].

### 1.1.2 Pathogenese

Das Hepatitis-B-Virus ist ein hepatotropes Virus, welches nicht zytotoxisch repliziert. Dies entspricht der Beobachtung, dass HBV-*Healthy Carrier* meist asymptomatisch sind und es nur zu einer minimalen Leberschädigung kommt [de Franchis et al., 1993]. Darüber hinaus repliziert HBV auch in hohem Maße bei immundefizienten oder pharmakologisch immunsupprimierten Patienten, ohne pathologische Veränderungen hervorzurufen [Stevens et al., 1975]. Die Schädigung der Hepatozyten während der

viralen Hepatitis deutet vielmehr auf ein immunmediertes Ereignis hin [Guidotti and Chisari, 2006]. Auch wenn die Immunantworten auf HBV und ihre Rolle in der Pathogenese der Hepatitis B bisher nicht vollständig verstanden sind, weisen Untersuchungen an HBV-infizierten Schimpansen darauf hin, dass HBV das angeborene Immunsystem nicht zu induzieren scheint und bis zum Einsetzen der adaptiven Immunantwort zunächst unentdeckt bleibt. Während der viralen *clearance* wird bei der akuten Hepatitis dann jedoch eine große Anzahl Interferon- $\gamma$ -regulierter Gene von T-Zellen in der Leber aktiviert [Wieland et al., 2004]. Der Grund des fortschreitenden Leberschadens in chronisch infizierten HBV-Patienten ist noch nicht ganz verstanden, es konnte aber nachgewiesen werden, dass chronisch virusspezifische Immunantworten hierbei eine wichtige Rolle spielen [Chisari, 2000]. Auch in klinischen Studien konnten bei Patienten mit akuter, selbstlimitierender Hepatitis B im peripheren Blut viele zytotoxische T-Lymphozyten (*cytotoxic T lymphocytes, CTL*) nachgewiesen werden, wohingegen diese virusspezifischen *CTLs* bei chronisch HBV-infizierten Patienten zumindest im peripheren Blut stark vermindert waren [Chisari and Ferrari, 1995, Ganem and Prince, 2004, Baumert et al., 2007]. Die Menge der antiviralen Zytokine wie beispielsweise Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) und des Tumornekrosefaktors- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), welche die virale Replikation inhibieren und antiviral wirken können, ohne die infizierten Zellen extensiv zu zerstören, scheint hierbei eine entscheidende Rolle zu spielen [Bertoletti et al., 2009]. Zur Eliminierung des Virus scheinen hier vor allem die CD8-positiven T-Zellen essentiell zu sein [Thimme et al., 2003], die jedoch bei persistierenden viralen Infektionen die Fähigkeit verlieren, Zellen zu lysieren, zu proliferieren und verschiedene Zytokine wie TNF- $\alpha$  und Interleukin-2 (IL-2) zu produzieren und nur noch eingeschränkt IFN- $\gamma$  produzieren können [Wherry et al., 2003, Bertoletti et al., 2009]. Diese Erschöpfung der CD8-positiven T-Zellen ist gekennzeichnet durch Überexpression verschiedener inhibitorischer Rezeptoren wie PD-1, Veränderungen des T-Zell-Rezeptors, des Zytokin-Signalweges, der Genexpression von chemotaktischen Faktoren, Adhäsions- und Migrationsfaktoren sowie metabolische und bioenergetische Defizite [Wherry et al., 2007]. B-Lymphozyten und ihre Antikörper als Komponenten des adaptiven Immunsystems sind ebenso wichtig, vor allem um HBV-Infektionen zu kontrollieren [Bertoletti et al., 2009].

Der epidemiologische Zusammenhang zwischen der chronischen HBV-Infektion und dem Auftreten des hepatozellulären Karzinoms ist hinreichend nachgewiesen. Demnach besteht bei chronisch infizierten HBsAg-*Carrier*n ein 25- bis 37-fach höheres Risiko, an einem HCC zu erkranken als bei nicht-infizierten Patienten [Beasley et al., 1981, Beasley and Hwang, 1984, Lupberger and Hildt, 2007]. Zu den Ursachen gehören gleichzeitige mitogene (Regeneration der Hepatozyten) und mutagene (Entzündung) Prozesse, die eine Schädigung der DNA begünstigen und so zu einem HCC führen können. Darüber hinaus können mutagene Insertionen und die Expression viraler, onkogener Proteine zur Deregulierung des Zellwachstums oder der DNA-Reparaturmechanismen führen [Guidotti and Chisari, 2006].

### 1.1.3 Klinisches Erscheinungsbild

Das klinische Erscheinungsbild der Hepatitis-B-Infektion hängt vor allem vom Alter des Patienten zum Infektionszeitpunkt ab. Während bei Erwachsenen eine Infektion in der Regel symptomatisch verläuft und bei >90 % der Patienten ausheilt, verläuft die Infektion bei Kindern meist asymptomatisch und geht anschließend in >90 % der Fälle in eine mild verlaufende chronische Hepatitis über [Gerok et al., 2007]. Die akute Erkrankung kann symptomlos, antiikterisch mit leichten Allgemeinsymptomen, ikterisch und in seltenen Fällen auch fulminant bis hin zum Leberversagen verlaufen. Nach einer Inkubationszeit von vier Wochen bis zu sechs Monaten kommt es meist zu einer Prodromalphase, die wenige Tage anhält. Diese ist häufig durch eine unspezifische Symptomatik wie Abgeschlagenheit, Fieber, Inappetenz, Nausea, Vomitus, Diarrhoe, Obstipation und ein dolentes Abdomen gekennzeichnet. Seltener treten hingegen Kopfschmerzen (20-60 %), Arthralgien (10-30 %), Exantheme und Hepatosplenomegalien auf. Während der Prodromalphase kommt es zudem zu einem meist hochgradigen Anstieg der Leberwerte im Serum, insbesondere der Alanin- (ALT) und Aspartat-Aminotransferase (AST). Ihr Maximum ist meist mit Beginn der ikterischen Phase, die etwa zwei bis vier Wochen anhält, erreicht. In den meisten Fällen kommt es nach circa sechs Wochen zu einer kompletten Ausheilung [Jochum and Gerken, 2011]. Klinisch können zwei chronische Verlaufsformen differenziert werden, eine chronische Form und ein asymptomatischer *Carrierstatus*. Die chronische Form resultiert in 20-30 % der Fälle in einer Leberzirrhose mit hoher Morbidität, Mortalität und einem hohen HCC-Risiko. Zu den unspezifischen Symptomen gehören Müdigkeit, Abgeschlagenheit, Inappetenz, Nausea, ein dolentes Abdomen sowie kognitive Störungen. Darüber hinaus kann es zu extrahepatischen immunkomplexvermittelten Manifestationen wie Arthralgien, Vaskulitiden, Glomerulonephritiden und Kryoglobulinämien kommen. Bei fortgeschrittener Leberschädigung wird das Krankheitsbild von den Folgen der Leberzirrhose bestimmt. Es kommt zu Leberhautzeichen, Splenomegalie, Hämorrhagien, hepatischen Enzephalopathien sowie zu portaler Hypertension und daraus resultierend Ösophagusvarizen und Aszites [Gerok et al., 2007, Jochum and Gerken, 2011, Zeuzem, 2000]. Der asymptomatische *Carrierstatus* entwickelt sich oft bei einer perinatalen oder einer Infektion im Kindesalter. Diese Form ist durch eine sehr geringe Virusreplikation (<100.000 Kopien/ml und HBsAg meist negativ), eine normale Blutchemie und eine nicht oder nur geringgradig veränderte Leberhistologie gekennzeichnet. Der Verlauf ist meist günstig, es kommt sehr selten zu einer Leberzirrhose und das Risiko eines HCC ist gering, wenn auch im Vergleich zur Normalbevölkerung erhöht [Gerok et al., 2007].

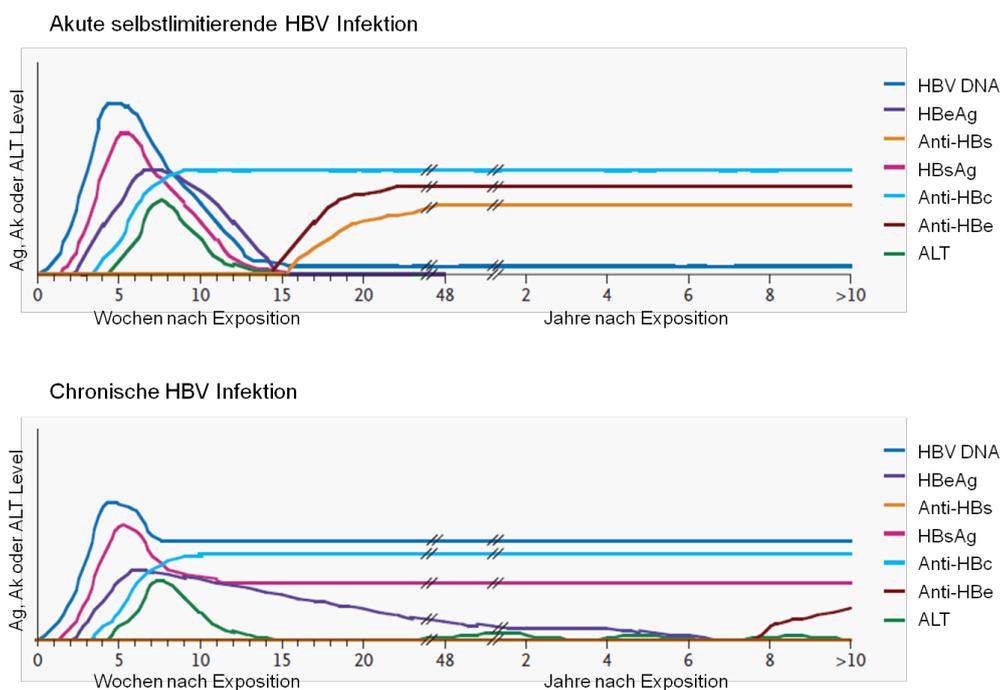
### 1.1.4 Diagnose

Die Diagnose einer Hepatitis-B-Infektion erfolgt aufgrund von klinischen, serologischen, biochemischen und histologischen Markern. Eine eindeutige Diagnose sowie die Bestimmung des Stadiums der Erkrankung sind für die Therapieoptionen und Erfolgskontrollen relevant [Thimme and Blum, 2006]. Tabelle 1.1 fasst die verschiedenen Virusmarker sowie Veränderungen der Alanin-Aminotransferase für die Diagnostik der verschiedenen Verlaufsformen zusammen.

Hepatitis	HBsAg	Anti-HBs	Anti-HBc	Anti-HBc IgM	HBeAg	Anti-HBe	HBV-DNA	ALT
akut	+	-	+	+	+	-	+	↑↑↑
ausgeheilt	-	+	+	-	-	+	-	normal
chronisch	+	-	+	- (+)	+	-	+	normal bis ↑
<i>Carrier</i>	+	-	+	-	-	+	+ (-)	normal oder (↑)
HBe-minus-Variante	+	-	+	- (+)	-	+/-	+	↑(↑)
geimpft	-	+	-	-	-	-	-	normal

Tabelle 1.1: Serologische Marker der akuten und chronischen Hepatitis B, modifiziert nach Jochum and Gerken [2011].

In der Regel besteht bei der akuten Hepatitis-B-Infektion ein charakteristischer Verlauf der Virusmarker im Serum. Als erstes ist HBV-DNA nachweisbar, gefolgt von HBsAg und HBeAg. Das HBeAg verschwindet zuerst, gefolgt von HBV-DNA und HBsAg, die während der klinischen Symptome noch persistieren und mit Genesung des Patienten verschwinden. Die Antikörper gegen HBV-Viruspartikel treten ebenfalls in charakteristischer Reihenfolge auf. So können Anti-HBs- und Anti-HBeAg kurz nach dem Verschwinden ihrer jeweiligen Antigene detektiert werden. Antikörper gegen das Core-Antigen sind bereits kurz vor Beginn der Klinik nachweisbar, meist aber zunächst vom Typ IgM. Der Anti-HBc-IgM-Titer nimmt im weiteren Verlauf ab und die persistierenden Anti-HBc-Antikörper sind nur noch vom Typ IgG [Jochum and Gerken, 2011]. Bei 10-15 % der Patienten kommt es hingegen nicht zu einer HBsAg-Serokonversion, so dass in diesem Fall ein Anti-HBc-Titer Aufschluss über eine Infektion gibt [Jochum and Gerken, 2011]. Bei einer chronischen Hepatitis-B-Infektion kommt es ebenfalls zu keiner Serokonversion und das HBsAg bleibt im Serum nachweisbar; ein Hinweis auf Chronifizierung besteht bereits, wenn noch sechs Wochen nach Krankheitsbeginn HBsAg nachgewiesen werden kann [Miksits and Hahn, 2008]. HBeAg ist ebenfalls bei einem großen Teil der chronisch infizierten Patienten detektierbar und spricht meistens für eine aktivere Erkrankung. Der Nachweis von Anti-HBe und niedriger HBV-DNA weist hingegen auf einen asymptomatischen *Carrier* hin [Jochum and Gerken, 2011]. Eine weitere Möglichkeit der Diagnostik und Verlaufsbeurteilung einer chronischen Infektion ist die Leberbiopsie, die außerdem zum *Grading* (Bestimmung der entzündlichen Aktivität) und *Staging* (Bestimmung des Fibroseausmaßes) herangezogen wird und zur Beurteilung dieser Parameter immer noch als "Gold-Standard" gilt [Schirmacher et al., 2004]. Abbildung 1.2 vergleicht den serologischen Verlauf der Virusmarker bei akuter selbstlimitierender und chronischer Hepatitis.



**Abbildung 1.2: Schema der serologischen und molekularen Marker einer Hepatitis-B-Infektion,** typische Level der Alanin-Aminotransferase, HBV-DNA, HBs- und HBeAg sowie Anti-HBs, Anti-HBe und Anti-HBc bei einer akuten, selbstlimitierenden (oben) und einer chronischen Infektion (unten); modifiziert nach Ganem and Prince [2004].

### 1.1.5 Prävention

Die Prävention der chronischen Hepatitis-B-Infektion hat weltweit hohe Priorität. Die Immunisierung mit einer Hepatitis-B-Vakzine ist hierbei der effektivste Weg, um eine HBV-Infektion sowie ihre Folgen und damit verbunden auch eine der wichtigsten Ursachen für die Entstehung eines hepatozellulären Karzinoms zu bekämpfen [WHO, 2002, Lupberger and Hildt, 2007]. Dies konnte in überzeugender Form durch ein in Taiwan durchgeführtes HBV-Vakzinierungsprogramm demonstriert werden. 20 Jahre nach Ende des Programms hatte sich die Prävalenzrate chronischer HBV-Infektionen von 10-17 % auf 0,7-1,7 % verringert und auch die Inzidenzrate des HCC verminderte sich von 0,52-0,54 auf 0,13 - 0,20 pro 100.000 Einwohner [Chang, 2009]. Eine Vakzine gegen Hepatitis B steht seit 1982 zur Verfügung, seitdem wurden weltweit über eine Milliarde Impfstoffdosen verwendet [WHO, 2012]. Die Schutzwirkung dieses HBV-Impfstoffes der derzeit verwendeten 2. Generation, basierend auf dem HBsAg, ist bei gesunden Erwachsenen insgesamt gesehen gut, jedoch tritt bei 5-10 % der gesunden und immunkompetenten Patienten keine (*Non-Responder*) oder eine nicht ausreichende (*Hyporesponder*) Serokonversion ein [Zuckerman, 1996]. Die 3. Generation der HBV-Impfstoffe, die sogenannten PräS-Impfstoffe, zeigen sich bereits in vielen Studien gegenüber denen der 2. Generation deutlich überlegen [Glebe and Gerlich, 2009]. Der derzeit in Israel zugelassene rekombinante Pre-S1/Pre-S2/S Impfstoff Sci-B-Vac™, welcher aus einer Ovarialzelllinie des chinesischen Hamsters (CHO) gewonnen wird, zeigt sich deutlich immunogener und induziert eine schnellere und höhere Seroprotektion [Shouval et al., 2015]. Erste klinische Studien aus Vietnam zeigen sogar, dass monatliche Injektionen mit den

PräS-Impfstoffen auch bei persistierenden HBV-Infektionen mit täglichen Lamivudin-Behandlungen in circa 50 % der Fälle zu einer supprimierten HBV-Replikation und einer anti-HBs-Serokonversion führen [Shouval et al., 2015].

### 1.1.6 Therapieindikationen & Therapie

Eine akute Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus heilt bei 95-99 % der Erwachsenen spontan aus [McMahon et al., 1985]. Aufgrund dieser hohen Spontanheilungsrate der akuten Hepatitis B beim Erwachsenen besteht in der Regel keine Therapieindikation für die aktuell verfügbaren antiviralen Medikamente [Cornberg et al., 2011]. Ausnahmen hiervon stellen die schweren akuten und fulminanten Verlaufsformen dar. In diesen Fällen ist die Lebertransplantation oftmals die einzig verbleibende Therapiemaßnahme, da ohne Transplantation 70 % der Patienten versterben [Tillmann et al., 2006]. Mehrere Fallberichte haben jedoch gezeigt, dass nur in 20 % der Fälle eine Lebertransplantation bei Patienten mit fulminanter Hepatitis B nötig war, wenn eine frühzeitige Therapie mit dem Nukleosidanalogen Lamivudin erfolgte, im Vergleich zu 50 bis 80 % unbehandelter Patienten aus historischen Kontrollen [Cornberg and Manns, 2011]. Daher ist in diesen Fällen eine antivirale Therapie mit Lamivudin gerechtfertigt, um einem Leberversagen vorzubeugen [Cornberg et al., 2011].

HBV hat seinen Lebenszyklus für eine Langzeit-Persistenz in der Leber optimiert [Protzer et al., 2012]. Im Nukleus wird die *relaxed circular DNA* (rcDNA) in eine *covalently closed circular DNA* (cccDNA) umgewandelt, welche als Template für die virale Transkription dient und die HBV-Persistenz sichert [Lucifora et al., 2014]. Bei Patienten mit chronischer Hepatitis-B-Infektion ist grundsätzlich eine antivirale Therapie indiziert. Eine sichere Indikation zur antiviralen Behandlung besteht sowohl bei HBeAg-positiven als auch bei HBeAg-negativen Patienten mit chronischer Hepatitis, wenn eine Virusreplikation von  $\geq 2000$  IU/ml besteht oder eine entzündliche Aktivität mit wiederholt erhöhter Transaminasen-Aktivität im Serum vorliegt. Zudem kann auch unter Berücksichtigung von Lebensalter und Begleiterkrankungen bei Patienten, die ein Risiko besitzen, eine Leberzirrhose und deren Komplikationen wie insbesondere ein HCC zu entwickeln, eine antivirale Therapie indiziert sein [Cornberg et al., 2011]. Das primäre Ziel der chronischen HBV-Therapie ist es, die virale Replikation permanent zu unterdrücken, um entzündliche Reaktionen und die Progression der Fibrose zu reduzieren. Ein weiteres langfristiges Ziel ist die dauerhafte Suppression der HBV-DNA unter die Nachweisgrenze und eine Serokonversion von HBe-Antigenen zu Anti-HBe-Antikörpern sowie HBs-Antigenen zu Anti-HBs-Antikörpern, wobei Zweites bislang nur bei einem kleinen Teil der Patienten erreicht wird [Buster and Janssen, 2006]. Es werden zwei Hauptgruppen antiviraler Therapeutika zur Therapie eingesetzt, dies sind zum einen immunmodulatorische Therapeutika wie beispielsweise Interferone und zum anderen Nukleosid- beziehungsweise Nukleotidanaloga, welche die HBV-Polymerase und somit direkt die Virusreplikation, aber nicht die Persistenz der cccDNA beeinflussen. Deshalb ist die effiziente und nicht-toxische Elimination der cccDNA in Hepatozyten ein Hauptziel der HBV-Forschung [Buster and Janssen, 2006, Lucifora et al., 2014]. Da das pegylierte Interferon- $\alpha$  gegenüber dem Standard-Interferon- $\alpha$  mindestens äquivalente Ansprechraten besitzt, jedoch nur einmal wöchentlich angewandt werden muss, sollten Standard-Interferone nur noch in

Ausnahmefällen eingesetzt werden [Cornberg et al., 2011]. Der Vorteil einer Interferontherapie ist zum einen die limitierte Therapiedauer und zum anderen das Ausbleiben von antiviralen Resistenzen, Nachteile bestehen jedoch in den häufig auftretenden Nebenwirkungen in Form von grippeähnlichen Symptomen, Depressionen oder Blutbildveränderungen sowie in der subkutanen Applikation. Darüber hinaus ist pegyliertes Interferon kontraindiziert bei Patienten mit dekompensierter HBV-assoziiertes Leberzirrhose, Autoimmunkrankheiten, Depressionen, Psychosen oder bei Patientinnen während der Schwangerschaft [European Association For The Study Of The Liver, 2012]. Im Gegensatz zur Interferontherapie treten bei Nukleosid- und Nukleotidanaloga nur selten Nebenwirkungen auf. Bei der Auswahl von Nukleosid- und Nukleotidanaloga sollten die Höhe der HBV-Virämie, eventuelle Vorbehandlungen und das Stadium der Lebererkrankung berücksichtigt werden. Beim Vorliegen einer Viruslast von  $>10^6$  IU/ml oder einer Leberzirrhose ist ein Wirkstoff mit hoher genetischer Resistenzbarriere zu bevorzugen [Cornberg et al., 2011]. Tabelle 1.2 fasst die Medikamente zusammen, die für die chronische Hepatitis-B-Infektion in Deutschland zugelassen sind.

Substanz	Dosierung
<b>Alpha-Interferone</b>	
Pegyliertes Interferon alpha-2a (Pegasys®)	180 µg 1x pro Woche für 48 Wochen
Interferon alpha-2a (Roferon®)*	2,5 –5 Mio. IU pro m <sup>2</sup> Körperoberfläche 3x / Woche für 4 bis 6 Monate
Interferon alpha-2b (Intron A®)*	5 - 10 Mio. IU 3x / Woche (jeden 2. Tag) s.c. 4 bis 6 Monate
<b>Nukleosid-Analoga</b>	
Lamivudin (Zeffix®)	100 mg einmal täglich
Entecavir (Baraclude®)	0,5 mg einmal täglich; 1,0 mg bei Patienten mit Lamivudin-Resistenz
Telbivudin (Sebivo®)	600 mg einmal täglich
<b>Nukleotid-Analoga</b>	
Adefovir dipivoxil (Hepsera®)*	10 mg einmal täglich
Tenofovir dipivoxil (Viread®)	245 mg einmal täglich

**Tabelle 1.2: Medikamente, die für die Behandlung der chronischen Hepatitis B zugelassen sind;** konventionelle Alpha-Interferone (Interferon alpha-2a und -2b) sowie Adefovir dipivoxil werden nicht mehr zur Therapie der Hepatitis B empfohlen und sollten nur noch in Ausnahmefällen eingesetzt werden, nach Cornberg et al. [2011].

## 1.2 Das Hepatitis-B-Virus

### 1.2.1 Geschichte des Hepatitis-B-Virus

Bereits auf den mesopotamischen Tontafeln und im Alten Testament wird die Gelbsucht erwähnt, jedoch waren es die hippokratischen Ärzte, die als Erste dieses Symptom im Detail beschrieben und es einem pathologischen Zustand der Leber zuordneten [Papavramidou et al., 2007]. Die infektiöse Natur der Erkrankung beschrieb Lürmann 1885, als nach einer Pockenimpfung von Werftarbeitern in Bremen gehäuft Fälle von Gelbsucht auftraten [Glebe and Gerlich, 2009]. Dies wird heute als der erste Bericht einer Hepatitis-B-Virusinfektion betrachtet. Der britische Arzt MacCallum beobachtete in den 1940er Jahren eine hohe Inzidenz von Hepatitiden bei Soldaten, welche einige Monate zuvor eine Vakzine, die humanes Serum enthielt, gegen Gelbfieber erhalten hatten. MacCallum waren weitere medizinische Berichte bekannt, bei denen es nach einer Vakzinierung mit humanem Serum zu Hepatitiden kam, und mutmaßte, dass ein Virus im menschlichen Blut Hepatitis auslösen könne [Findlay and MacCallum, 1937, 1939]. MacCallum prägte die Begriffe Hepatitis Typ A für die primär fäkal-oral übertragene Hepatitis, welche immer ausheilte, und Hepatitis Typ B, welche parenteral durch menschliches Blut oder Serum (homologe „Serumhepatitis“) übertragen wurde und in 1–10 % der Fälle chronisch verlief [Doerr and Gerlich, 2010]. 20 Jahre später, 1963, entdeckte der Mediziner B. S. Blumberg, der nach genetischen Unterscheidungsmerkmalen im menschlichen Serum suchte, bei einem australischen Aborigine ein neues Antigen [Blumberg, 1964]. Fälschlicherweise wurde dieses *Australia-Antigen* zunächst mit Leukämie und dem Down-Syndrom assoziiert [Blumberg et al., 1967]. Alfred Prince vom Blutspendedienst des Amerikanischen Roten Kreuzes war der Erste, der das *Australia-Antigen* mit der Hepatitis-Typ-B-Erkrankung assoziierte [Blumberg et al., 1969, Levene, 1969, London et al., 1969a,b, Millman et al., 1969, Prince, 1968]. Über das Australia-Antigen war bekannt, dass es sich um eine circa 20 nm große und virusähnliche Struktur handelte, die jedoch keine Nukleinsäuren zu enthalten schien [Gerin et al., 1969]. 1970 konnte Dane mittels Elektronenmikroskopie das 42 nm große und infektiöse Virus, das auf der Oberfläche das *Australia-Antigen* trägt, heute HBsAg (*Hepatitis B surface antigen*) genannt, nachweisen. Das Virus wird auch heute noch als Dane-Partikel bezeichnet [Dane et al., 1970]. Schon kurze Zeit später schlugen Millman und Blumberg vor, mit HBsAg-Partikeln eine Vakzine aus dem Blut von Hepatitis-B-Trägern herzustellen, und bereits 1975 wurden die ersten Studien zur Vakzinierung mit gereinigten, inaktivierten HBsAg-Partikeln durchgeführt [Millman et al., 1970a,b].

## 1.2.2 Klassifikation des Hepatitis-B-Virus

Das Hepatitis-B-Virus ist ein 42 nm großes DNA-Virus, das der Familie der *Hepadnaviridae* zugeordnet wird. Um dieses Virus mit der partiell doppelsträngigen DNA von den Hepatitisviren mit einem RNA-Genom (Hepatitis A, C, E und D) abzugrenzen, wurde die Familie der Hepadnaviren als Abkürzung für *Hepatitis-DNA-Viren* gebildet [Modrow et al., 2010]. Nachfolgend wurden auch bei anderen Wirbeltieren doppelsträngige DNA-Viren ähnlicher Struktur gefunden. Das humane Hepatitis-B-Virus bildet zusammen mit weiteren Säugetier-Hepatitis-B-Viren das Genus der Orthohepadnaviren. Das zweite Genus der *Hepadnaviridae*, das Avihepadnavirus, beinhaltet ausschließlich aviäre Viren. Im Gegensatz zu den Orthohepadnaviren, deren Infektion oft in einer chronischen Hepatitis und einem HCC mündet, löst eine Infektion mit dem Avihepadnavirus nur eine milde Hepatitis aus [Schuster et al., 2002]. Als Grund hierfür wurde lange angenommen, dass Avihepadnaviren im Gegensatz zu Orthohepadnaviren nicht über ein HBx-Gen verfügen, welches transkriptionsregulatorische Proteine kodiert. Chang et al. konnten jedoch zeigen, dass DHBV über ein verstecktes offenes Leseraster (*open reading frame, ORF*) verfügt, welches sowohl *in vitro* als auch *in vivo* das transkriptionsregulatorische Protein DHBx kodiert. Dieses scheint jedoch weder die virale Proteinexpression, die intrazelluläre DNA-Synthese noch die Virionproduktion zu verstärken [Chang et al., 2001]. Die wichtigsten Vertreter der Ortho- und Avihepadnaviren sind in den Tabellen 1.3 und 1.4 aufgeführt.

<b>Orthohepadnaviren</b>	
Hepatitis-B-Virus	Mensch ( <i>Homo sapiens sapiens</i> ) [Dane et al., 1970]
Schimpanzen-Hepatitis-B-Virus	Schimpanzen ( <i>Pan troglodytes</i> ) [Vaudin et al., 1988]
Gibbon-Hepatitis-B-Virus	Gibbon ( <i>Hylobates lar</i> ) [Norder et al., 1996]
Orangutan-Hepatitis-B-Virus	Orangutan ( <i>Pongo pygmaeus pygmaeus</i> ) [Warren et al., 1999]
Gorilla-Hepatitis-B-Virus	Gorilla ( <i>Gorilla gorilla</i> ) [Grethe et al., 2000]
Wollaffen-Hepatitis-B-Virus	Wollaffe ( <i>Lagothrix lagotricha</i> ) [Lanford et al., 1998]
Waldburmeltier-Hepatitis-B-Virus	Waldburmeltier ( <i>Marmota monax</i> ) [Summers et al., 1978]
Grauhörnchen-Hepatitis-B-Virus	Erdhörnchen ( <i>Spermophilus beecheyi</i> ) [Marion et al., 1980]
Arktisches Erdhörnchen-Hepatitis-B-Virus	Arktisches Erdhörnchen ( <i>Spermophilus parryi kennicotti</i> ) [Testut et al., 1996]

Tabelle 1.3: **Orthohepadnaviren sowie ihre Wirte; nach Schaefer [2007].**

<b>Avihepadnaviren</b>	
Enten-Hepatitis-B-Virus	Enten ( <i>Anas domesticus</i> ) [Mason et al., 1980]
Weißkehlenten-Hepatitis-B-Virus	Weißkehlente ( <i>Anas gibberifrons gracilis</i> ) [Li et al., 1998]
Reiher-Hepatitis-B-Virus	Reiher ( <i>Adrea cinerea</i> ) [Sprengel et al., 1988]
Mähnengans-Hepatitis-B-Virus	Mähnengans ( <i>Chenonetta jubata</i> ) [Li et al., 1998]
Zwergschneegans-Hepatitis-B-Virus	Zwergschneegans ( <i>Anser rossi</i> ) [Naumann et al., 1993]
Schneegans-Hepatitis-B-Virus	Schneegans ( <i>Anser caerulescens</i> ) [Chang et al., 1999]
Storch-Hepatitis-B-Virus	Weißstorch ( <i>Ciconia ciconia</i> ) [Pult et al., 2001]
Kranich-Hepatitis-B-Virus	Jungfernkranich ( <i>Anthropoides virgo</i> ) [Prassolov et al., 2003] Kronenkranich ( <i>Balearica regulorum</i> ) [Prassolov et al., 2003]

**Tabelle 1.4: Avihepadnaviren sowie ihre Wirte; nach Schaefer [2007].**

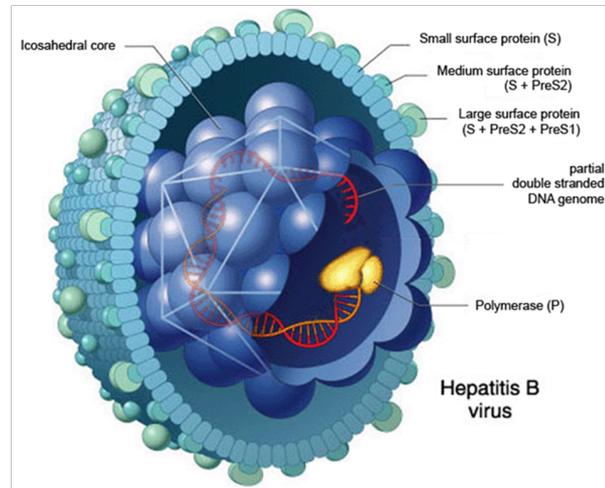
Aufgrund unterschiedlicher Nukleotidsequenzen des Gesamtgenoms von mindestens 8 % wurden zunächst die vier Genotypen A bis D unterschieden [Okamoto et al., 1988]. Später kamen sechs weitere Genotypen E bis J hinzu [Norder et al., 1992, 1994, Stuyver et al., 2000, Arauz-Ruiz et al., 2002, Tran et al., 2008, Tatematsu et al., 2009]. Bereits vor der Definition der Genotypen wurden HBV-Stämme durch serologische Analysen anhand des HBs-Ag (*Hepatitis B surface antigen*) in neun verschiedene Subtypen gegliedert [Norder et al., 2004]. Die verschiedenen Geno- und Serotypen sowie ihr geographisches Vorkommen sind in Tabelle 1.5 dargestellt.

<b>Genotypen</b>	<b>Serotypen</b>	<b>Geographisches Vorkommen</b>
A	adw2, ayw1	Nord-West-Europa, Nordamerika, Zentralafrika
B	adw2, ayw1	Südostasien, China, Japan
C	adw2, adr <sub>q</sub> +, adr <sub>q</sub> -, ayr	Südostasien, China, Japan
D	ayw2, ayw3	Südeuropa, Mittlerer Osten, Indien
E	ayw4	Afrika
F	adw4 <sub>q</sub> -, adw2, ayw4	Mittel- und Südamerika, Polynesien
G	adw2	Frankreich, USA
H		Zentral- und Südafrika
I		Vietnam, Laos
J		Ryukyu, Japan

**Tabelle 1.5: Geno- und Serotypen des Hepatitis-B-Virus, sowie ihre geographische Verteilung, modifiziert nach Chu and Lok [2002].**

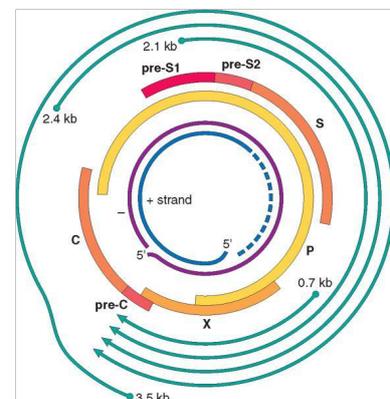
### 1.2.3 Morphologie und Genomstruktur des Hepatitis-B-Virus

Das 42 nm große Hepatitis-B-Virus wird von einer Lipoproteinhülle umgeben, die sich aus drei ähnlichen Glykoproteinen, den HBsAg (*Hepatitis B surface antigen*), zusammensetzt. Innerhalb der Lipoproteinhülle befindet sich das Nukleokapsid, bestehend aus Core-Proteinen (HBcAg) mit der



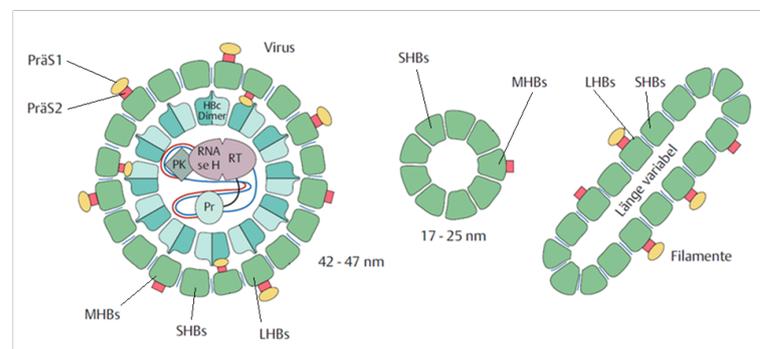
**Abbildung 1.3: Struktur des Hepatitis-B-Virus;** das virale ikosaedrische Kapsid wird von einer Wirtsmembran umgeben, welche die viralen Oberflächenproteine LHBs, MHBs und SHBs beinhaltet. Das Kapsid besteht aus Core-Proteinen und umgibt das partiell doppelsträngige DNA-Genom, welches kovalent an die virale Polymerase gebunden ist; modifiziert nach Perkins 2002.

partiell doppelsträngigen 3,2 kb großen DNA und einer Polymerase, welche für die virale DNA-Synthese zuständig ist [Ganem and Prince, 2004]. Abbildung 1.3 zeigt eine schematische Darstellung des Hepatitis-B-Virus. Das HBV-Genom besitzt vier überlappende *open reading frames*, welche mindestens sieben verschiedene Proteine kodieren (Abbildung 1.4). Die drei Oberflächenproteine (*HBsAg*) LHBs (*large Hepatitis B surface antigen*), MHBs (*middle Hepatitis B surface antigen*) und SHBs (*small Hepatitis B surface antigen*) werden vom *ORF preS1-preS2-S* kodiert. Das LHBs beinhaltet die preS1-, preS2- und S-Domäne. Das MHBs wird von der preS2- und S-Domäne gebildet, während das SHBs nur aus der S-Domäne besteht [Seeger and Mason, 2000]. Der preCC-ORF kodiert zum einen durch die C-Domäne das Core-Protein, welches das Kapsid bildet, und zum anderen durch die preC-Domäne das Nichtstrukturprotein *early-Antigen* (*HBeAg*), welches in die Blutbahn sezerniert wird [Chen et al., 2004, Dandri and Locarnini, 2012]. Ein weiteres Nichtstrukturprotein, das *Hepatitis B*



**Abbildung 1.4: Schematische Darstellung des HBV-Genoms;** von innen nach außen: positiv- und negativsträngige DNA, die vier überlappenden ORFs (preCC, X, P, preS1-preS2-S), RNA-Transkripte des Virions; aus Kumar et al. [2009].

*X protein (HBx)*, scheint mit verschiedenen zellulären Partnern zu interagieren und so diverse zelluläre Prozesse zu modifizieren [Lucifora et al., 2011]. Das Polyprotein, die virale DNA-Polymerase, welche reverse Transkriptaseaktivität, die RNase-H-Domäne sowie eine Primerfunktion beinhaltet, wird vom *ORF "P"* kodiert [Dandri and Locarnini, 2012]. Neben den Virionen werden von HBV-infizierten Zellen auch 17-25 nm große, sphärische und längenvariable, filamentöse subvirale Partikel produziert (Abbildung 1.5), die bis zu 10.000 Mal häufiger im Serum von infizierten Patienten vorkommen als die Virionen [Robinson, 1977, Ganem and Prince, 2004]. Die subviralen Partikel und Virionen bestehen aus den gleichen Oberflächenantigenen, jedoch enthalten die sphärischen nur sehr wenig *LHBs*, die filamentösen etwas mehr und die Virionen die höchste Menge an *LHBs*. Die Relevanz der subviralen Partikel ist bisher nicht geklärt, es wird jedoch vermutet, dass die massive Überproduktion von Oberflächenantigenen in Form von subviralen Partikeln dazu dient, das Immunsystem des Wirts in einer für das Virus positiven Weise zu beeinflussen [Heermann et al., 1984, Bruss, 2007].



**Abbildung 1.5: Schematische Darstellung des Hepatitis-B-Virus und der subviralen Partikel;** modifiziert aus Doerr and Gerlich [2010].

#### 1.2.4 Der HBV-Lebenszyklus

Das Hepatitis-B-Virus, dessen Replikation in den Hepatozyten stattfindet, zeichnet sich durch eine hohe Spezies- und Gewebespezifität aus. Gallengangepithel, das Lymphsystem und extrahepatisches Parenchym, wie beispielsweise der Pankreas oder die Nieren, werden immer wieder als Ziele einer Infektion genannt, jedoch sind Beweise für eine Replikation in extrahepatischem Gewebe bislang unvollständig und umstritten [Seeger and Mason, 2000]. Die Virusinfektion einer Zelle beginnt mit einer energieunabhängigen Anhaftung des Virus an einer Struktur auf der Wirtszelloberfläche, welche meist eine geringe Affinität besitzt und reversibel ist. Nach der primären Anhaftung des Virus folgt die Bindung an einen oder mehrere spezifische Rezeptoren, die die Aufnahme des Virus in die Zelle vermitteln. Während der letzten Jahre gab es eine Vielzahl von Berichten über mögliche zelluläre Bindungspartner, in denen viele Studien zeigten, dass die preS1-Domäne des LHBs für eine Bindung des Virus und damit eine Infektion nötig ist [Glebe and Urban, 2007, Seeger et al., 2006]. So konnten Yan *et al.* 2012 zeigen, dass das *Sodium taurocholate cotransporting polypeptide* (NTCP) ein multipler Transmembrantransporter, welcher hauptsächlich in der Leber exprimiert wird, mit der rezeptorbindenden Region der preS1-Domäne interagiert und ein *Silencing* von NTCP eine HBV-Infektion

verhindert [Yan et al., 2012]. Dennoch bleibt es weiterhin unklar, ob neben NTCP noch zusätzliche zelluläre Faktoren für eine virale Infektion mit HBV erforderlich sind [Watashi et al., 2014]. Nach Rezeptorvermittelter Endozytose werden durch proteolytische Prozesse im Endosom *Translocation Motifs* (TLMs) innerhalb der preS2-Region des LHBs freigelegt. Die TLMs ermöglichen dem Virus die Translokation durch die Membran in das Zytoplasma [Stoeckl et al., 2006]. Wahrscheinlich führen die endosomale Prozessierung und das reduzierende Milieu zum *Uncoating* des Virus. Der finale Import der genomischen DNA in den Nukleus erfolgt über ein *Nuclear Localization Signal* (NLS), welches sich in der terminalen Proteindomäne der HBV-Polymerase befindet [Lupberger et al., 2013]. Im Nukleus wird die *relaxed circular DNA* (rcDNA) von der wirtseigenen DNA-Polymerase in eine *covalently closed circular DNA* (cccDNA) umgewandelt. Die cccDNA liegt im Kern als ein virales Minichromosom vor und ihre Formation definiert die erfolgreiche Infektion einer Zelle [Locarnini and Zoulim, 2010]. Durch Transkription der wirtseigenen RNA-Polymerase II entsteht aus der nukleären cccDNA, welche als Vorlage dient, prägenomische (*pgRNA*) und subgenomische RNA. Die bicistronische *pgRNA* fungiert zum einen als *Template* zur Translation der viralen Polymerase, des Core-Proteins und des HBeAg und zum anderen als *Template* für die reverse Transkription der viralen (-)-DNA, wodurch sie für den Lebenszyklus des HBV unentbehrlich ist. Die subgenomischen RNAs kodieren die Oberflächenproteine und das HBx-Protein [Schädler and Hildt, 2009]. Die Initiation der reversen Transkription erfolgt durch die wirtseigenen Chaperone Hsp90, Hsp70, Hop und Hsp40 sowie durch weitere Faktoren, die die Bindung der viralen Polymerase an das 5'-Ende der *pgRNA* vermitteln. Die reverse Transkriptase (RT) synthetisiert die DNA *de novo* und benutzt hierfür einen Tyrosin-Rest an der N-terminalen Domäne als Primer. Für diese *protein priming*-Reaktion wird eine Interaktion von RT und *pgRNA* benötigt, vermittelt durch das sogenannte Enkapsidierungssignal  $\epsilon$ , welches auf der *pgRNA* lokalisiert ist [Hu et al., 2002, Wang and Seeger, 1993]. Die Bindung der Polymerase am Enkapsidierungssignal  $\epsilon$  löst des Weiteren die Formation des Nukleokapsids aus [Bartenschlager et al., 1990, Nassal, 2008]. Zur Reifung des Nukleokapsids werden die Core-Proteine sowohl phosphoryliert als auch dephosphoryliert [Perlman et al., 2005, Melegari et al., 2005]. Darüber hinaus werden verschiedene zelluläre Kinasen mit der Kapsidreifung in Verbindung gebracht [Schädler and Hildt, 2009]. Die gereiften HBV-Kapside werden anschließend am Prä-Golgi-Kompartiment behüllt und verlassen die Zelle über den sekretorischen Transportweg [Bruss, 2004]. Es wird vermutet, dass in frühen Phasen einer Infektion mit geringen intrazellulären HBsAg-Konzentrationen ein großer Teil der Nukleokapside die Zelle nicht verlässt, sondern direkt wieder in den Zellkern eintritt, um die Menge an cccDNA im Kern zu erhöhen [Newbold et al., 1995].

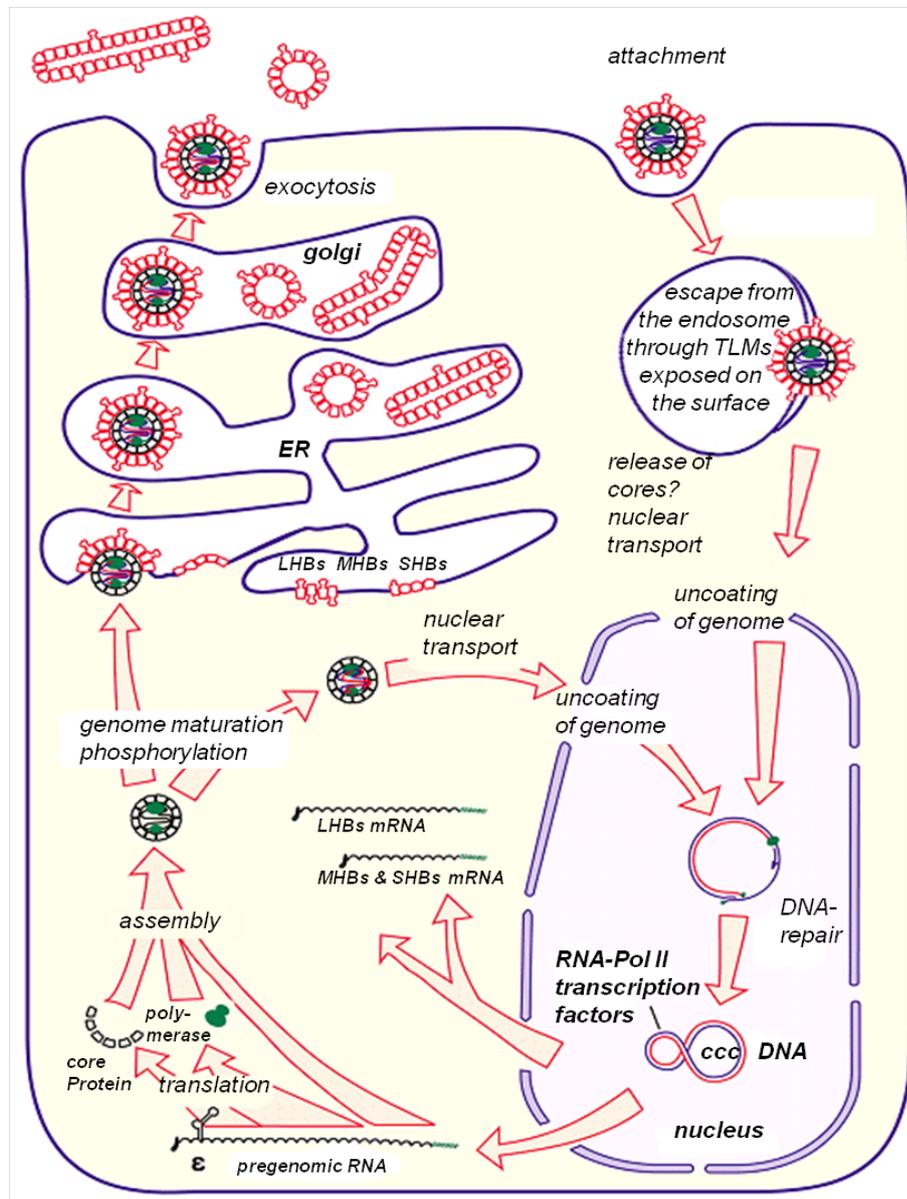


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung des HBV Replikationszyklus; modifiziert nach Kann et al. [1995].

## 1.3 Der Nrf2-ARE-Signalweg

Reaktive Elektrophile werden unter physiologischen Konditionen, aber auch im Rahmen vieler pathologischer Vorgänge, im Körper produziert und verursachen direkte oder indirekte Schäden an Proteinen, Lipiden oder der DNA, die zu verschiedenen pathologischen Erscheinungen wie Entzündungen, neurodegenerativen Erkrankungen, Arteriosklerose sowie Tumorinduktion und -promotion führen können [Niture et al., 2010]. Um reaktive Elektrophile und *Reactive Oxygen Species (ROS)* zu detoxifizieren und die Redox-Homöostase aufrecht zu erhalten, haben sich prokaryotische und eukaryotische Zellen während der Evolution komplexe Verteidigungsmechanismen angeeignet. Zu den zellprotektiven Maßnahmen gehört die Induktion von Genen, die Phase-II-Enzyme und antioxidative Proteine kodieren [Primiano et al., 1997, Talalay et al., 2003]. Die Regulation der Transkription detoxifizierender Enzyme obliegt einer DNA-Sequenz, dem sogenannten *Antioxidant responsive element (ARE)*, welche von Nrf2 (*Nuclear Factor-Erythroid 2-related Factor 2*), den *small Maf*-Proteinen und Keap1 (*Kelch ECH associating protein 1*) als Inhibitor von Nrf2 reguliert wird [Jaiswal, 2004].

### 1.3.1 Nuclear Factor-Erythroid 2-related Factor 2 (NRF2)

Der Transkriptionsfaktor *Nuclear Factor-Erythroid 2-related Factor 2* (Nrf2) gehört zur Familie der *Basic Leucine Zipper Proteine (bZIP)* [Niture et al., 2010]. Die erste Beschreibung des Transkriptionsfaktors sowie der *Locus Control Region (LCR)* erfolgte während Untersuchungen der  $\beta$ -Globin-Genexpression [Forrester et al., 1986, Tuan et al., 1985]. Nrf2 gehört neben weiteren Transkriptionsfaktoren wie Nrf1, Nrf3 sowie p45 NF-E2, Bach1 und Bach2 zur sogenannten '*cap''n''collar'*-Familie (*CNC*) [Motohashi et al., 2002]. Diese Proteine zeichnen sich durch eine hoch konservierte Region aus, die eine starke Sequenzhomologie mit dem '*cap''n''collar'*-Protein der *Drosophila*-Fliege besitzt und deren Funktion bislang unklar ist. Die basische Region direkt neben der *Leucine Zipper*-Region

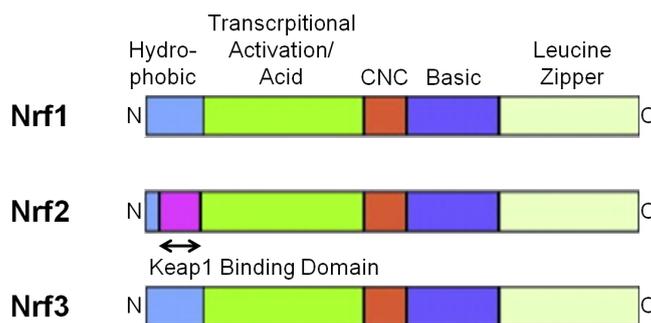


Abbildung 1.7: Schematische Darstellung der *NF-E2 related Factors* modifiziert nach Niture et al. [2010].

ist verantwortlich für die DNA-Bindung, während die azide Region für die Transkriptionsaktivierung verantwortlich ist (siehe Abbildung 1.8) [Niture et al., 2010]. Während Nrf1-knock-out-Mäuse nicht lebensfähig sind und bereits *in utero* an einer Anämie sterben, sind Nrf2-knock-out-Mäuse lebensfähig und phänotypisch unauffällig. Dies weist darauf hin, dass Nrf2 nicht essentiell für Erythropoese, Entwicklung sowie Wachstum ist [Chan et al., 1996, 1998]. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass

Nrf2 an die regulatorische *ARE*-Region verschiedener Gene bindet, welche die Expression von Proteinen kontrolliert, die für Detoxifikation und Elimination von Elektrophilen und *ROS* zuständig sind [Nguyen et al., 2009]. Nrf2 wird deshalb besonders in detoxifizierenden Organen wie der Leber und der Niere sowie in Organen mit Kontakt zur Umwelt wie der Haut, der Lunge oder dem Gastrointestinaltrakt gefunden [Motohashi et al., 2002]. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Expression der zytoprotektiven *ARE*-abhängigen Gene in Nrf2-knock-out-Mäusen hochgradig gestört ist und daraus ein erhöhter oxidativer Stress resultiert [Itoh et al., 1997, McMahon et al., 2001]. Darüber hinaus zeigen sie nach partieller Hepatektomie eine signifikant verzögerte Leberregeneration, dies ist durch eine Aktivierung von JNK 1/2 aufgrund des erhöhten *ROS*-Spiegels bedingt. In der Folge kommt es dann zu einer Phosphorylierung von IRS-1/2 an Serin und Threonin statt an Tyrosin und damit zu einer Hemmung der insulinabhängigen Signaltransduktion [Beyer et al., 2008].

### 1.3.2 *Antioxidant responsive element (ARE)*

Die *ARE*-Region ist eine cis-agierende regulatorische *Enhancer*-Sequenz von *DNA*-Abschnitten, welche verschiedene detoxifizierende Enzyme kodieren und somit auf die Exposition einer Vielzahl von Antioxidantien und Xenobiotika reagieren [Jaiswal, 2004]. Zuerst wurde diese auf  $\beta$ -Naphthoflavon responsive *Enhancer*-Sequenz am 5'-Ende der Glutathion-S-Transferase A2 (GSTA2) der Ratte gefunden und als *xenobiotic responsive element (XRE)* bezeichnet [Telakowski-Hopkins et al., 1988, Rushmore et al., 1990]. Da das *XRE* aber sowohl auf elektrophile und planare aromatische Komponenten sowie phenolische Antioxidantien, also auf ein breites Spektrum diverser Chemikalien, ansprach, wurde diese Sequenz später als *ARE* bezeichnet [Rushmore and Pickett, 1990, Nguyen et al., 2003b]. Um die zelluläre Redox-Homöostase aufrecht zu erhalten, ist *ARE* ebenso für eine konstitutive Genexpression zytoprotektiver Enzyme verantwortlich, da *ROS* und andere endogene reaktive Moleküle auch während des normalen aeroben Stoffwechsels generiert werden [Nguyen et al., 2009].

Durch transiente Transfektionsexperimente konnte als Erstes für die *ARE*-Sequenz der humanen NAD(P)H:Quinone-Oxidoreduktase-1 (NQO1) nachgewiesen werden, dass diese die Transkriptionsfaktoren Nrf1 und Nrf2 binden kann und es zu einer erhöhten Geninduktion von NQO1 kommt [Venugopal and Jaiswal, 1996]. Ähnliche Beobachtungen konnten anschließend für die *ARE*-Sequenzen einer Reihe anderer Gene beobachtet werden, wie zum Beispiel die Glutamat-Cystein-Synthetase (GCS), die Glutathion-Peroxidase (GPx) oder NQO1 [Nguyen et al., 2003b]. Durch *in vivo*-Studien mit *Nrf2-knock-out*-Mäusen, in denen die Expression mehrere *ARE*-abhängiger Gene deutlich vermindert war, konnte bestätigt werden, dass Nrf2 ein wichtiger Regulator *ARE*-abhängiger Gene ist [Itoh et al., 1997, McMahon et al., 2001].

### 1.3.3 *ARE-regulierte Gene*

*ARE*-abhängig exprimierte Gene sind bei einer Vielzahl zellulärer Funktionen involviert, die der Zelle helfen, den Redoxstatus zu kontrollieren und sich gegen oxidativen Stress zu verteidigen. Induziert wird die Transkription einer Reihe verschiedener Proteine, welche als Ziele von Nrf2 identifiziert

wurden und deren Aufgabe die Abwehr freier Radikale, der Metabolismus von Pharmazeutika, die Glutathionhomöostase sowie der Efflux von Redoxproteinen ist [Nguyen et al., 2003b]. Beispiele sind die NAD(P)H:Quinone-Oxidoreduktase-1 (NQO1), die Glutathion-S-Transferase (GST), die Glutathion-Peroxidase (GPx), die Hämoxygenase-1 (HO-1), die Glutamat-Cystein-Synthetase (GCS) sowie die *multidrug resistance-associated proteins* (MRPs) als Membrantransporter [Aleksunes and Manautou, 2007]. Beispiele sind in Tabelle 1.6 aufgeführt.

zellulärer Prozess	Nrf2-reguliertes Gen	Funktion
Glutathion Homöostase	Glutamat-Cystein-Ligase (GCL)	katalysiert die Formation von $\gamma$ -Glutamylcystein
	Glutathionsynthetase (GS)	katalysiert die Addition von Glycin zu $\gamma$ -Glutamylcystein
	Glutathion-S-Transferase (GST)	konjugiert Glutathion an Xenobiotika
	Glutathionperoxidase (GPx)	katalysiert die Reduktion von Peroxiden
Pharmaka- metabolismus	NAD(P)H:Quinone-Oxidoreduktase-1 (NQO1)	reduziert Chinone und endogene Antioxidantien
	UDP-Glucuronosyltransferase (UGT)	glukoronidiert Chemikalien
	mikrosomale Epoxidhydrolase (mEH)	hydrolysiert Epoxide
Stressantwort/ Eisenstoffwechsel	Hämoxygenase-1 (HO-1)	Abbau von Häm
	Ferritin	bindet freies Eisen
Exkretion/ Transporter	Multidrug resistance-associated proteins (MRP)	Abtransport von Chemikalien über die Membran
	Multidrug resistance proteins (MDR)	Abtransport von Chemikalien über die Membran
Proteinabbau	Proteasomuntereinheit PSMB5	Proteinabbau durch das Proteasom

**Tabelle 1.6:** Beispiele Nrf2-regulierter Gene modifiziert nach Aleksunes and Manautou [2007] .

Eine entscheidende Rolle scheint Nrf2 zudem in der verzögerten Leberregeneration einzunehmen, für die eine ROS-vermittelte Insulinresistenz verantwortlich zu sein scheint [Beyer et al., 2008]. Ein Mangel von Nrf2-vermittelter Genexpression erhöht darüber hinaus auch die Anfälligkeit für ein Leberkarzinom [Ramos-Gomez et al., 2001]. In der Wundheilung wurde Nrf2 außerdem als wichtiger regulatorischer Faktor identifiziert, wobei jedoch das Fehlen von Nrf2 keine Wundheilungsstörungen verursachte [Braun et al., 2002].

Auch in der Progression vieler neurodegenerativen Erkrankungen wie beispielsweise Alzheimer, Parkinson oder der autosomal-dominant vererbten Huntington-Krankheit scheint oxidativer Stress eine wichtige pathologische Komponente zu sein [de Vries et al., 2008]. Es wurde beobachtet, dass Astrozyten durch Nrf2-abhängige antioxidative Enzyme vor oxidativem Stress geschützt werden können [Lee et al., 2003] und dass Nrf2-überexprimierende Astrozyten auf die Neuronen einen protektiven Einfluss haben [Desagher et al., 1996, Lucius and Sievers, 1996, Kraft et al., 2004].

### 1.3.4 Regulation der Aktivität und Stabilität von Nrf2

Die Aktivität und Stabilität von Nrf2, welche zu einer Transaktivierung von ARE-abhängigen Genen führt, wird über Interaktionen mit Keap1 und den *small Maf*-Proteinen reguliert. Abbildung 1.8 fasst diese Regulation zusammen.

#### 1.3.4.1 Keap1

Keap1 ist ein Zink-Metalloprotein, welches im Zytoplasma an Aktin gebunden vorliegt [Dinkova-Kostova et al., 2005]. Aufgrund seiner strukturellen Homologie zu dem Drosophila-Protein Kelch wird es als *Kelch-like ECH-associated protein 1* bezeichnet [Itoh et al., 1999]. Durch ein *Yeast Two-Hybrid-Screening* konnte Keap1, welches an die Homologiedomäne Neh2 (*Nrf2-ECHhomology 2*) bindet, als potentieller Interaktionspartner und Aktivitätsregulator von Nrf2 identifiziert werden. Neh2 ist eine der sechs Homologiedomänen (Nhe1-Nhe6) von Nrf2, die in verschiedenen Spezies hoch konserviert sind [Itoh et al., 1999].

Keap1 besteht aus insgesamt fünf verschiedenen Domänen, einer N-terminalen Region (NTR), der Protein-Interaktionsdomäne BTB (*bric-a-brac, tramtrack, broad complex*), der *Intervening Region (IVR)*, der als Kelch oder auch als *DGR (double glycine repeat)* bezeichneten Domäne und einer C-terminalen Region (CTR) [Itoh et al., 2004]. Die BTB-Domäne ist für die Homodimerisation [Zipper and Mulcahy, 2002] sowie für die Polyubiquitinierung [Cullinan et al., 2004] von Keap1 erforderlich. Nrf2 wie auch Aktin werden über die Kelch-Domäne von Keap1 gebunden [Kang et al., 2004], wodurch eine Akkumulation von Nrf2 im Nukleus verhindert und die Transkription der ARE-regulierten Gene gehemmt wird [Nguyen et al., 2004]. Nach dem *two-site molecular recognition*-Modell interagiert die Kelch-Domäne mit zwei Motiven innerhalb des Neh2: zum einen mit dem DLG-Motiv, das mit einer geringen Affinität an die Kelch-Domäne bindet, und zum anderen mit dem ETGE-Motiv, welches mit höherer Affinität bindet [Tong et al., 2006a].

Der Wirkmechanismus, durch den Elektrophile oder oxidativer Stress die Hemmung von Nrf2 durch Keap1 aufheben können, ist noch immer Gegenstand aktueller Diskussionen. Posttranslationale Modifikation von Keap1 und/oder Nrf2, die Degradation sowie der nukleäre Transport beider Proteine sind derzeit diskutierte Mechanismen [Itoh et al., 2010]. Es wurde angenommen, dass der Keap1/Nrf2-Komplex als ein zellulärer Redoxsensor fungiert, der durch Elektrophile oder ROS dissoziiert und Nrf2 dadurch ARE-regulierte Gene aktiviert [Itoh et al., 1999]. Diese Hypothese wurde durch die Beobachtung gestützt, dass die vier Cysteine Cys257, Cys273, Cys288 und Cys297 in der IVR von Keap1 auf Alkylverbindungen reagieren, woraufhin eine Dissoziation des Keap1-Nrf2-Komplexes und die Migration von Nrf2 in den Nukleus erfolgt [Dinkova-Kostova et al., 2002, Tong et al., 2006b]. Es existieren jedoch auch Studien, welche zeigen, dass eine Mutation von Cys273 und Cys288 oder elektrophiler Stress keine Formationsänderungen des Keap1-Nrf2-Komplexes hervorrufen [Eggler et al., 2005, Kobayashi et al., 2006]. Unter physiologischen Umständen fungiert Keap1 zudem als ein Adapter für den *Cullin 3-based E3 Ligase-Komplex (Cul3)* und führt so zu einer Degradation von Nrf2 über den Ubiquitin-Proteasomweg [Cullinan et al., 2004, Kobayashi et al., 2004, Zhang et al.,

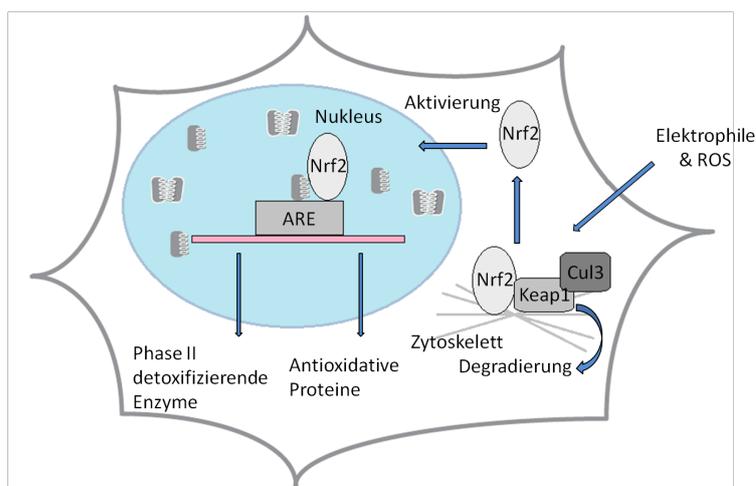
2004]. Aber auch unter oxidativem Stress bei einer Dissoziation von Keap1 wird Nrf2 proteasomal abgebaut [Itoh et al., 2003]. Aufgrund dieser Beobachtung stellten Itoh et al. die These auf, dass es zwei Wege der Nrf2-Degradation gibt, eine homöostatische Keap1-abhängige Nrf2-Degradation im Zytoplasma und eine Keap1-unabhängige Nrf2-Degradation während des oxidativen Stresses, welche im Nukleus stattfindet [Itoh et al., 2003, 2010, Nguyen et al., 2009, Sun et al., 2007].

Ein weiteres intrazelluläres Protein, welches mit Nrf2 um die Bindung an Keap1 konkurriert, ist das Protein p62, welches ebenfalls als Sequestosome-1 (SQSTM1), A170 und *zeta interacting protein* (ZIP) bekannt ist. p62 besitzt multiple Domänen mit Funktionen in Signaltransduktion, Zellüberleben und Zelltod. Eine Interaktion von p62 mit Keap1 resultiert in der Dissoziation von Nrf2 von Keap1, wodurch eine Translokation von Nrf2 in den Nukleus erfolgt. Darum gilt phospho-p62 auch als ein positiver Regulator für die Nrf2-Aktivierung [Komatsu et al., 2012, Manley et al., 2013].

#### 1.3.4.2 *Small Maf-Proteine*

Die Maf-Proteine wurden nach dem v-Maf Onkogen benannt, welches ursprünglich aus dem aviären *musculoaponeurotic fibrosarcoma* Virus AS42 isoliert wurde [Nishizawa et al., 1989]. Nach der Isolation des v-Maf wurden auch dessen zelluläres Gegenstück, das c-Maf und noch weitere v-Maf-verwandte Gene, identifiziert [Motohashi et al., 2002]. Die Familie der Maf-Proteine wird in zwei Gruppen eingeteilt. Die *large* Maf-Proteine bestehend aus c-Maf, MafA, MafB und NRL, welche alle eine markante azide Domäne besitzen, die eine Aktivierung der Transkription bedingt, und die sMaf mit MafF, MafG, MafK und MafT [Itoh et al., 2010], welche 18 kDa groß und im Nukleus lokalisiert sind [Blank and Andrews, 1997, Igarashi et al., 1994]. Die *large* Maf-Proteine sind vor allem für die gewebsspezifische Genexpression sowie die Zelldifferenzierung in den Knochen, dem zentralen Nervensystem (ZNS), den Nieren, dem Pankreas, dem Blut wie auch der Linse und der Retina notwendig und spielen darüber hinaus eine wichtige Rolle in der Onkogenese. *Small* Maf-Proteine hingegen stellen obligatorische Bindungspartner für *CNC*-Proteine und andere *basic leucine zipper*-Proteine (*bZip*-Proteine) dar [Blank, 2008]. Im Gegensatz zu den *large* Maf-Proteinen besitzen die sMaf-Proteine selbst keine transaktivierenden Domänen [Motohashi and Yamamoto, 2004]. Sowohl die *large* als auch die *small* Maf-Proteine besitzen eine basische Region, die zusammen mit der *extended homology region* (*EHR*) eine DNA-Bindung ermöglicht, und eine *leucine zipper region*, welche für die Bildung von Dimeren notwendig ist [Blank, 2008]. Die sMafs besitzen sowohl die Fähigkeit, Homodimere als auch Heterodimere mit einer Vielzahl von *bZip*-Proteinen zu bilden und an der palindromischen DNA-Sequenz (TGCTGAC(G)TCAGCA) zu binden, welche als *Maf recognition element* (*MARE*) bezeichnet wird [Kataoka et al., 1995, Motohashi et al., 2002]. Durch verschiedene Modelle konnte nachgewiesen werden, dass sMafs mit den *CNC*-Proteinen p45, Nrf1, Nrf2, Nrf3 sowie Bach 1 und Bach 2 dimerisieren [Igarashi et al., 1994, Itoh et al., 1995, Johnsen et al., 1996, Marini et al., 1997, Oyake et al., 1996]. Nrf2 bindet mit einer hohen Affinität nur als Heterodimer mit einem sMaf an ARE und aktiviert so die ARE-regulierten Gene [Itoh et al., 1997, Li et al., 2008]. Jedoch konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression der sMaf-Proteine bei einem normalen Level von Nrf2 eine Hemmung der ARE-Genexpression bewirkt [Dhakshinamoorthy and Jaiswal, 2000, Nguyen

et al., 2000, Wild et al., 1999]. Dies deutet darauf hin, dass sMaf-Homodimere die DNA-Bindung von aktivierenden Herterodimeren kompetitiv hemmen [Motohashi et al., 2000].



**Abbildung 1.8: Schematische Darstellung des molekularen Mechanismus des Nrf2/Keap1-Systems;** in unstimulierten Zellen liegt Nrf2 durch Keap1 gebunden an Actinfilamenten im Zytoplasma vor. Durch Exposition von Elektrophilen oder ROS transloziert Nrf2 in den Nucleus, bildet Heterodimere mit den *small* Maf-Proteinen und bindet an ARE. Dies führt zur transkriptionellen Aktivierung von Phase-II-Enzymen und antioxidativen Proteinen. Modifiziert nach Motohashi and Yamamoto [2004].

### 1.3.5 Interaktion von Nrf2 mit intrazellulären Signalwegen

In der Literatur sind bisher drei Signalkaskaden beschrieben, die bei der Regulation von ARE involviert sind. Dies sind die mitogen-aktivierten Proteinkinase-Kaskade, die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und die Proteinkinase C (PKC). Die Phosphorylierung von Proteinen, eine der wichtigsten Mechanismen der posttranslationalen Signaltransduktion, scheint zudem auch eine Rolle bei der Regulation der Aktivität von Nrf2 zu spielen. Abbildung 1.9 gibt einen Überblick über die beteiligten Signalwege.

#### 1.3.5.1 Proteinkinase C

Die Phosphorylierung von Nrf2 an Serin 40 durch die klassischen Proteinkinase C bei oxidativem oder elektrophilem Stress ist ein gut untersuchter und akzeptierter Mechanismus für die Aktivierung von Nrf2 und damit für die Aktivierung *ARE*-abhängiger Gene [Niture et al., 2010]. In Versuchen mit der humanen Hepatoblastom-Zelllinie HepG2 konnte eine erhöhte Phosphorylierung von Nrf2 nach Stimulation mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), einem potenten PKC-Aktivator, oder *tert*-Butylhydrochinon (tBHQ), welches *ARE*-medierte Gene induziert, hervorgerufen werden. Bei Verwendung von PKC-Inhibitoren hingegen verminderte sich die Menge an phosphoryliertem Nrf2. Darüber hinaus konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von Nrf2 durch PKC zu einer nukleären Akkumulation und Aktivierung von *ARE*-abhängigen Genen führt [Huang et al., 2000]. Durch weitere *in vitro*-Experimente konnte anschließend demonstriert werden, dass die

Phosphorylierung am Ser40 der hoch konservierten Proteindomäne Neh2 erfolgt, welche auch die Bindung an Keap1 vermittelt [Huang et al., 2002]. Andere Studien hingegen zeigen, dass eine Hemmung der Proteinkinase C durch Staurosporin bei gleichzeitiger Stimulation durch tBHQ zwar eine Dissoziation von Nrf2 und Keap1 bewirkt, jedoch keinen Effekt auf die nukleäre Akkumulation und Aktivierung ARE-abhängiger Gene durch Nrf2 hat [Bloom and Jaiswal, 2003, Nguyen et al., 2003a].

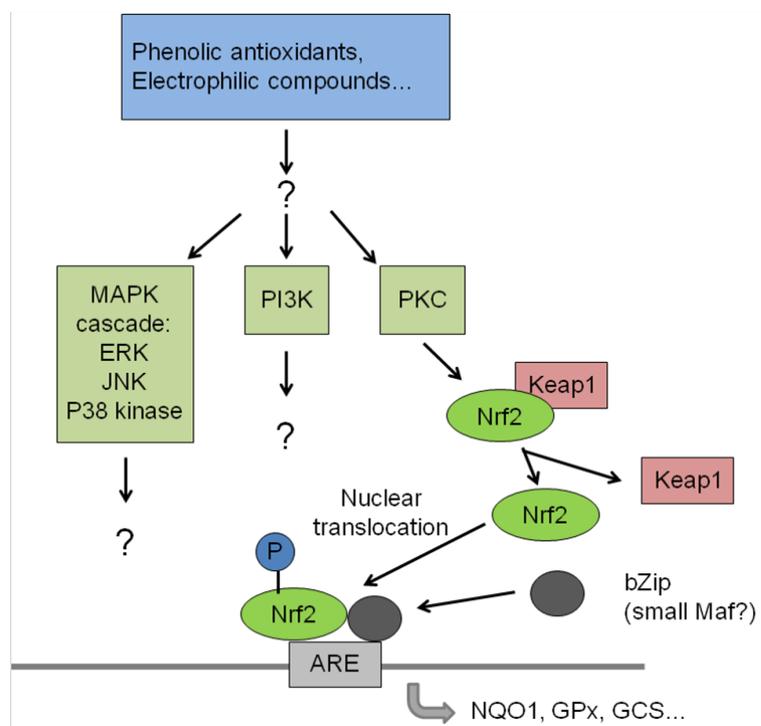


Abbildung 1.9: Signalwege, die bei der transkriptionellen Regulation ARE-mediierter Genexpression involviert sind; modifiziert nach Nguyen et al. [2003b].

### 1.3.5.2 Mitogen-aktivierte Proteinkinasen

Die mitogen-aktivierten Proteinkinasen sind eine Familie eng verwandter Kinasen, welche eine zentrale Rolle bei der Übermittlung zahlreicher extrazellulärer Signale zum Nukleus spielen. Dazu gehören unter anderem die *extracellular signal-regulated protein kinases* (ERKs), die *c-jun N-terminal kinases* (JNKs), die p38- und die p57-MAP Kinase [Cobb and Goldsmith, 1995]. Es konnte gezeigt werden, dass die MAPK-Signalkaskade, welche durch die *mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1* (MAP3K1), die *transforming growth factor- $\beta$ -activated kinase* (TAK1) und die *apoptosis signal-regulating kinase* (ASK1) aktiviert wird, über Nrf2 zu einer Aktivierung der ARE-abhängigen Genexpression führt [Yu et al., 2000a]. Eine weitere Studie zeigt jedoch, dass der p38-Kinase-Signalweg im Gegensatz dazu als ein Negativregulator der ARE-medierten Induktion von Phase-II-detoxifizierenden Enzymen zu wirken scheint [Yu et al., 2000b].

Die ERK-Signalkaskade wird hauptsächlich durch Mitogene und Wachstumsfaktoren aktiviert, hat aber darüber hinaus auch eine wichtige Funktion bei der Abwehr von oxidativem Stress [Junttila et al., 2008]. Aktivierung des ERK- als auch des JNK-Signalwegs führt zu einer erhöhten Transkription von

Nrf2-Target-Proteinen [Shen et al., 2004, Xu et al., 2006, Zipper and Mulcahy, 2000]. Die Inhibition von MAPK in HepG2-Zellen vor der Stimulation mit Pyrrolidindithiokarbamat (PDTC) führt zwar zu einer verminderten Translokation von Nrf2 in den Nukleus, aber eine Mutation aller konservierter Phosphorylierungsstellen von Nrf2 hatte hingegen keinen Einfluss auf die ARE-medierte Genexpression [Zipper and Mulcahy, 2003]. Es ist anzunehmen, dass Nrf2 ein Ziel der MAPK ist; dieses scheint jedoch nicht obligatorisch für die Nrf2-Aktivierung und die ARE-abhängige Genexpression zu sein.

### 1.3.5.3 Phosphatidylinositol-3-Kinase

Die Phosphatidylinositol-3-Kinase ist eine Lipidkinase, welche eine wichtige Rolle bei der Aktivierung diverser zellulärer *survival signals* spielt und darüber hinaus als *second messenger* für viele Kinasen inklusive der Akt- sowie der ribosomalen S6-Kinase fungiert [Daulhac et al., 1999, Lin et al., 1999]. Des Weiteren ist der pro-mitogene und anti-apoptotische Insulin/*Insulin-like-growth-factor* Rezeptor-Signalweg ein wichtiger Bestandteil des PI3K-Signalwegs [LeRoith and Roberts, 2003]. Eine essentielle Rolle konnte der PI3-Kinase ebenfalls bei der ARE-abhängigen Glutathion-S-Transferase A2-Genexpression durch oxidativen Stress nachgewiesen werden [Kang et al., 2000]. In humanen Neuroblastomzellen konnte durch eine selektive Inhibition der PI3-Kinase gezeigt werden, dass hierdurch gleichermaßen die ARE-abhängige Genexpression nach tBHQ-Stimulation vermindert war [Lee et al., 2001].

Die Leber ist häufig oxidativem Stress ausgesetzt, welcher die Leberfunktion beeinträchtigt, den Zelltod induziert und das Regenerationspotential der Leber deutlich herabsetzen kann [Fausto, 2000, Parola and Robino, 2001, Weber et al., 2003]. Eine Vielzahl von Zytokinen und Wachstumsfaktoren können inzwischen mit der Leberregeneration in Verbindung gebracht werden, wobei Insulin hierbei eine Sonderstellung einnimmt, indem es sowohl den Metabolismus als auch die Proliferation in der Leber steuert [Amaya et al., 2014, Taub, 2004]. So konnten Beyer *et al.* in hepatektomierten Nrf2<sup>-/-</sup> Mäusen zeigen, dass diese durch eine ROS-medierte Insulin-/IGF-Resistenz eine verzögerte Leberregeneration aufwiesen [Beyer et al., 2008]. Die Wirkung des Insulins wird über den IR/IGF-R-Signalweg vermittelt und soll im Folgenden kurz dargestellt werden.

#### 1.3.5.3.1 Insulin

Insulin ist das bekannteste anabole Hormon, welches essentiell für Glukosehomöostase, Wachstum und Gewebeentwicklung ist [Pessin and Saltiel, 2000]. Das Präproinsulin, welches von den  $\beta$ -Zellen der Langerhans'schen Inseln im Pankreas gebildet wird, besteht zunächst aus einem Signalpeptid (*leader peptide*), der B-Kette (30 Aminosäuren), dem C-Peptid (*connecting peptide*) und der A-Kette (21 Aminosäuren). Nach Abspaltung des Signalpeptides im ER entsteht das Proinsulin und im Anschluss durch Abspaltung des C-Peptides mittels Prohormonkonvertasen das reife Insulin [Ahmad, 2014, Guo et al., 2014]. Ein erhöhter Plasmaglukosespiegel stellt den stärksten Reiz zur Sezernierung von Insulin dar, aber auch Aminosäuren und Acetylcholin steigern die Freisetzung von Insulin, wohingegen Somatostatin und Adrenalin diese hemmen [Rorsman and Braun, 2013]. Insulin vermindert darüber hinaus die Gluconeogenese in der Leber und fördert gleichzeitig die

Glukoseaufnahme sowie die Glukoseverwertung und -speicherung in Muskulatur und Fettgewebe [Saltiel and Kahn, 2001]. Dysfunktionen in der Insulin-Signalkaskade können zu einer Insulinresistenz in der Skelettmuskulatur führen, die eine der ersten erkennbaren Veränderungen bei Individuen mit einem metabolischen Syndrom ist und zu einer Prädisposition der Entwicklung eines Typ-II-Diabetes gehört [Geetha et al., 2012].

Nach der Bindung von Insulin an den Insulin-Rezeptor auf der Zelloberfläche wird dieser an mehreren Tyrosinresten autophosphoryliert und somit aktiviert. Nachfolgend werden dann intrazelluläre Substrate wie Proteine der Insulin-Rezeptor-Substrat-Familie (IRS-1-IRS-4) phosphoryliert. IRS-1/2 aktiviert den PI3-Kinase-Signalweg und nachfolgend unter anderem Akt, wodurch es zu einem vermehrten Einbau von GLUT4 in die Zellmembran und damit zu einer erhöhten Glukoseaufnahme in die Zelle kommt [Geetha et al., 2012, Leney and Tavaré, 2009]. p62, welches als ein positiver Regulator für die Nrf2-Aktivierung gilt (siehe Kapitel 1.3.4.1), ist ebenfalls bei der Regulation der Insulin-Signalkaskade beteiligt. Es interagiert mit IRS-1 und führt bei Überexpression zur vermehrten Phosphorylierung von Akt und damit zum vermehrten Einbau von GLUT4 in die Zellmembran. Genauso ist in p62-Knockout-Mäusen die IRS-1-Phosphorylierung an Tyrosin sowohl im Muskel als auch im Fettgewebe nach Injektion von Insulin deutlich reduziert. Dies zeigt, dass p62 eine Rolle bei der Insulinsensitivität in der Insulin-Signalkaskade spielt und ein potentielles Ziel in der Therapie von Diabetes sein könnte [Geetha et al., 2012, Komatsu et al., 2012, Manley et al., 2013]. Ein negativer Regulator von IRS ist die *c-jun N-terminal kinase* (JNK), welche eine erhöhte Aktivität bei diversen Stimuli wie Zytokinen, ROS, Xenobiotika und metabolische Veränderungen aufweist. Bei Aktivierung von JNK kommt es zu einer Phosphorylierung von IRS-1/2 an Serin und Threonin statt an Tyrosin und somit zu einer Hemmung der insulinabhängigen Signaltransduktion [Beyer and Werner, 2008, Manley et al., 2013]. JNK beteiligt sich darüber hinaus bei der Aktivierung der Autophagie. Während noch nicht klar ist, ob p62 JNK aktiviert, reguliert JNK jedoch eventuell p62 indirekt durch Aktivierung der Autophagie, welche eine Degradation von p62 bewirkt [Ding et al., 2007, Manley et al., 2013].

#### 1.3.5.3.2 Insulin-Rezeptor

Der Insulin-Rezeptor ist auf praktisch allen Gewebearten der Säugetiere zu finden, dabei variiert jedoch seine Anzahl von wenigen 40 Rezeptoren auf zirkulierenden Erythrozyten bis hin zu mehr als 200.000 Rezeptoren auf Adipozyten und Hepatozyten [Kahn and White, 1988]. Der Insulin-Rezeptor ist ein Heterotetramer bestehend aus je zwei insulinbindenden, extrazellulären  $\alpha$ - sowie zwei transmembranen  $\beta$ -Untereinheiten mit intrazellulärer Tyrosinkinaseaktivität, welche über Disulfidbrücken verbunden sind [Youngren, 2007]. Nach der Bindung von Insulin wird innerhalb von Sekunden die  $\beta$ -Untereinheit des Insulin-Rezeptors an verschiedenen Tyrosinresten autophosphoryliert, wobei das Tyrosin 960, ein Tyrosin der  $\beta$ -Untereinheit innerhalb der Membran, ein NPXpY-Motif für die PTB-Domäne (*phosphotyrosine-binding*) des IRS darstellt. Eine Modifikation dieses Tyrosins verhindert eine Phosphorylierung des IRS-1 und anderer IRS-Proteine und führt so zu einem kompletten Verlust von insulinabhängigen Prozessen. Interessanterweise ist die NPXY-Sequenz ebenfalls ein Motiv für die Rezeptorinternalisierung, die sich der Phosphorylierung anschließt [Khan et al., 1989, Virkamäki et al., 1999]. Beeinträchtigungen der Funktion des Insulin-Rezeptors sind sowohl in Geweben von

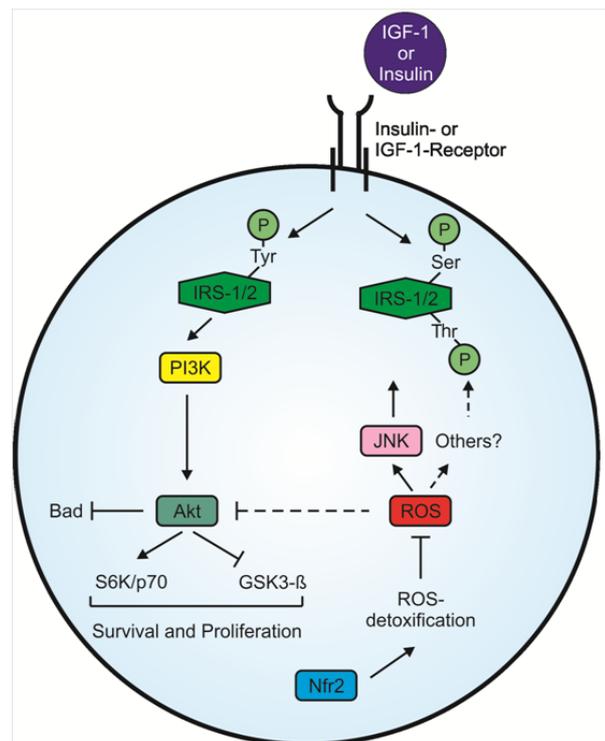
insulinresistenten Menschen als auch bei Tieren bekannt. Reduzierte Autophosphorylierung wurde bei von Insulin stimulierten Insulin-Rezeptoren sowohl *in vivo* als auch *in vitro* beobachtet. *In vivo* ist die reduzierte Phosphorylierung des IRS eine häufige Ursache für Insulin-Resistenzen, auch wenn dies nicht eine veränderte IR-Funktion selbst darstellt [Youngren, 2007].

#### 1.3.5.3.3 *Insulin-like growth factor-1-Rezeptor*

Der *Insulin-like growth factor-1-Rezeptor* (IGF-1R) wird während der Embryogenese auf fast allen Geweben und Zelltypen exprimiert und spielt hier eine entscheidende Rolle bei Wachstum und Entwicklung, aber auch bei vielen pathologischen Vorgängen, insbesondere bei der Tumorgenese hat er hohe Relevanz [Bondy et al., 1990, LeRoith and Roberts, 2003]. Wie der Insulin-Rezeptor besitzt der IGF-1R eine  $\alpha\beta_2$ -heterotetramerische Struktur und bildet mit dem Insulin-Rezeptor sogar chimäre Hybridrezeptoren. Die  $\beta$ -Untereinheit weist ebenfalls eine intrazelluläre Tyrosinkinaseaktivität auf, welche eine 80-95%ige Sequenzhomologie zum Insulin-Rezeptor zeigt [Butler and LeRoith, 2001, LeRoith et al., 1995, Virkamäki et al., 1999]. Wie bei anderen Wachstumsfaktorrezeptoren führt die Substratbindung zur Autophosphorylierung an Tyrosinresten der  $\beta$ -Untereinheit und kann somit andere Tyrosin enthaltende Substrate phosphorylieren, das dominierende Substrat ist wie beim Insulin-Rezeptor auch das Insulin-Rezeptor-Substrat [LeRoith et al., 1995]. Physiologisch vermittelt der IR jedoch eher eine metabolische Funktion, während der IGF-1R eine mitogene Funktionen vermittelt. Wie dies geschieht, ist noch immer nicht bekannt. Eine Möglichkeit wäre beispielsweise eine zusätzliche Phosphorylierung an einem COOH-Terminus des IR, welcher beim IGF-1R nicht vorliegt, aber auch eine selektive Beteiligung von akzessorischen Signalwegen oder Modulatoren wäre denkbar [Siddle, 2012, Virkamäki et al., 1999].

#### 1.3.5.3.4 *Insulin-Rezeptor-Substrat*

Es sind derzeit neun intrazelluläre Substrate der Insulin-/IGF-1-Rezeptorkinasen identifiziert. Vier von diesen gehören zu den Insulin-Rezeptor-Substrat-Proteinen, weitere Proteine sind Gab-1, p60dok, Cbl, APS und Isoformen von Shc10. Auch wenn die Gruppe der Insulin-Rezeptor-Substrate sehr homolog ist, zeigen Versuche *in vivo* und *in vitro*, dass diese eher komplementäre als redundante Funktionen im Insulin-/IGF-Rezeptor-Signalweg haben [Saltiel and Kahn, 2001]. Während IRS-3- und IRS-4-*knockout*-Mäuse einen nahezu normalen Metabolismus und ein normales Wachstum aufweisen, zeigen IRS-1-*knockout*-Mäuse eine prae- und postnatale Wachstumsverzögerung sowie Insulin-Resistenzen im peripheren Gewebe und eine verminderte Glukosetoleranz. IRS-2-*knockout*-Mäuse haben nur in wenigen Geweben wie dem Gehirn und der Retina ein vermindertes Wachstum sowie Insulin-Resistenzen im peripheren Gewebe und der Leber [Araki et al., 1994, Fantin et al., 2000, Kido et al., 2000, Saltiel and Kahn, 2001, Tamemoto et al., 1994, Withers et al., 1998]. IRS-1 und IRS-2 haben bis zu 20 potentielle Tyrosin-Phosphorylierungsstellen, wobei nicht für alle eine Phosphorylierung nach Insulin-/IGF-Stimulation nachgewiesen werden kann [Siddle, 2012]. In Nrf2 -/- Mäusen war die Phosphorylierung an Tyrosin sowohl des IRS-1 als auch des IRS-2 als Folge einer Insulin-/IGF-Stimulation stark reduziert [Beyer and Werner, 2008]. Oxidativer Stress resultiert



**Abbildung 1.10: Schematische Darstellung des Insulin-/IGF-Rezeptor Signalwegs in der regenerierenden Leber und dessen Beeinträchtigung in der Abwesenheit von Nrf2; modifiziert nach Beyer and Werner [2008]**

jedoch in einer vermehrten Aktivität von Serin- und Threonin-Kinasen, welche IRS-1 und IRS-2 phosphorylieren, was zu einer Beeinträchtigung des Insulin-/IGF-1-Signalweges führt und damit auch für die Hemmung der PI3-Kinase verantwortlich ist [Beyer and Werner, 2008, Zick, 2005]. Die *c-jun N-terminal kinase* (JNK), welche durch oxidativen Stress aktiviert wird, scheint eine der auf IRS inhibitorisch wirkenden Serin- und Threonin-Kinasen zu sein, zumal diese eine erhöhte und prolongierte Aktivierung in hepatektomierten Nrf2  $-/-$  Mäusen aufweist [Beyer and Werner, 2008, Beyer et al., 2008]. Abbildung 1.10 zeigt schematisch die Beteiligung von Nrf2 im Insulin-/IGF-Rezeptor-Signalweg in der regenerierenden Leber, modifiziert nach Beyer and Werner [2008].

## 2 Ziel der Arbeit

Eine Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus verursacht eine Entzündung der Leber, welche zur Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms (HCC) führen kann. Eine verminderte Leberregeneration begünstigt hierbei die Entstehung einer Leberfibrose beziehungsweise -zirrhose und führt zu einem Verlust von funktionellem Leberparenchym [Lok and McMahon, 2007]. Eine Schlüsselrolle in der Leberregeneration stellt der Insulin-medierte Signalweg dar [Beyer et al., 2008].

Kürzlich konnte beobachtet werden, dass *nuclear factor E2-related factor 2 knockout*-Mäuse eine verminderte Leberregeneration aufweisen, bedingt durch ein erhöhtes *reactive oxygen stress*-Level (ROS), welches zu einer Insulin- und *Insulin-like growth factor*-Rezeptor-Resistenz führt [Beyer et al., 2008]. Nrf2 ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor, der eine wesentliche Rolle bei der Detoxifikation von ROS spielt. Er bindet an *antioxidant response elements* (ARE) und leitet so die Expression zytoprotektiver Proteine ein [Nguyen et al., 2009]. Es wird vielfach diskutiert, dass ROS nicht nur ein Mediator regulatorischer Proteine ist, sondern auch eine wichtige Rolle bei der HBV-abhängigen Karzinogenese spielt [Chemin and Zoulim, 2009, Schaedler et al., 2010]. Es konnte jedoch unerwarteterweise gezeigt werden, dass dieser wichtige Transkriptionsfaktor in HBV-positiven Zellen vermehrt exprimiert wird und diese somit besser gegen ROS geschützt sind. Durch die Deregulation von Nrf2 kommt dieser somit als direkter, ursächlicher Faktor für die HBV-assoziierte Pathogenese nicht in Frage [Schaedler et al., 2010].

Im Rahmen dieser Arbeit soll *in vitro* und *in vivo* untersucht werden, ob das Hepatitis-B-Virus mit Proteinen oder der Aktivierung der Insulin-/IGF-1-Signalkaskade interferiert. Darüber hinaus soll unter Verwendung von HBV-transgenen-Mäusen beziehungsweise der entsprechenden HBV-negativen Kontrolltiere der Effekt von HBV auf die Leberregeneration analysiert werden.

# 3 Material

## 3.1 Zellen, Tiere und Gewebeproben

### 3.1.1 Prokaryotische Zellen

Strain	Genotyp	Hersteller
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	F- $\phi$ 80/ <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> )U169 <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>hsdR17</i> ( <i>rK</i> <sup>-</sup> , <i>mK</i> <sup>+</sup> ) <i>phoA</i> <i>supE44</i> <i>thi-1</i> <i>gyrA</i> 96 <i>relA1</i> $\lambda$ -	Invitrogen, Karlsruhe

### 3.1.2 Eukaryotische Zellen

Zelllinie	Beschreibung
Huh7.5	eine von der Huh7-Zelllinie abstammende humane Hepatoblastom-Zelllinie [Blight et al., 2002]
HepG2	eine humane Hepatoblastom-Zelllinie [Knowles et al., 1980]
HepAD38	eine humane Hepatoblastom-Zelllinie, die von der HepG2-Zelllinie abstammt; sie beinhaltet das 1,2-fache HBV-Genom [Ladner et al., 1997]
HepG2.2.15	eine humane Hepatoblastom-Zelllinie, die von der HepG2-Zelllinie abstammt; sie beinhaltet das 2,15-fache HBV-Genom [Sells et al., 1987]

### 3.1.3 Tiere

Die während dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche wurden von dem Regierungspräsidium Darmstadt genehmigt. Es wurden Mäuse des Inzuchtstamms C57BL/6 und C57BL/6, welche als Transgen ein 1,3-faches HBV-Genom enthalten [Guidotti et al., 1995], verwendet. Die Mäuse entstammten alle der Zentralen Tierhaltung des Paul-Ehrlich-Institutes in Langen.

### 3.1.4 Gewebeproben

Die in Paraffin eingebetteten Leberproben von chronisch HBV-infizierten und gesunden Patienten wurden uns freundlicherweise von Frau Prof. Dr. med. Karin Klingel, Abteilung für Molekulare Pathologie der Eberhard Karls Universität Tübingen, zur Verfügung gestellt.

## 3.2 Plasmide

Plasmid	Eigenschaft	Herkunft
pUC18	Kontrollvektor	Invitrogen, Karlsruhe
pJO19	beinhaltet das 1,2-fache HBV Genom, Serotyp ayw, Genotyp D	Joachim Lupberger [Lupberger et al., 2013]

## 3.3 Oligonukleotide

Nummer	Name	Sequenz (5' → 3')	Amplikongröße (in bp)
#42	GAPDH fwd	gac ccc ttc att gac ctc aac	434
#43	GAPDH rev	tgg act gtg gtc atg agt cc	
#185	HBV fwd	aac atg gag aac atc aca tca g	677
#186	HBV rev	tat acc aa aga caa aag aaa att gg	
#375	GLUT1 human fwd	cca ggt gtt cgg cct gga ct	240
#376	GLUT1 human rev	atc tgc cga ctc tct tcc tt	
#391	GLUT1 MM fwd	gca ggc tgt gct gtg ctc t	177
#392	GLUT1 MM rev	agc agc agg acg ggg cc	
#393	PGK MM fwd	tgt ggt cga gct aag cag a	130
#394	PGK MM rev	gat agt gat gca acc cct ag	
#399	Insulin Receptor human fwd	gcc acc ggg ggc cgg cgg	175
#400	Insulin Receptor human rev	atg gtc ctt cga tga cag ag	
#401	Insulin Receptor MM fwd	ggc ttc ggg aga gga tgt g	175
#402	Insulin Receptor MM rev	gat ggc cct caa tga ctg ag	

Nummer	Name	Sequenz (5' → 3')	Amplikongröße (in bp)
	Random Hexamer Primer (Fermentas)		

Alle synthetischen Oligonukleotide wurden mit Hilfe von VectorNTI® entworfen und von Biomers.net in Ulm synthetisiert.

### 3.4 Antikörper

Antikörper	Spezies/ Klonalität	Verdünnung (WB/IF/IHC)	Hersteller
<b>primäre Antikörper</b>			
Anti-β-Actin	Maus, monoklonal	1:10.000/ -/ -	Sigma-Aldrich, USA
Anti-BrdU [IIB5]	Maus, monoklonal	-/ 1:200/ -	Abcam, Cambridge, GB
Anti-BrdU [IIB5]	Maus, monoklonal	-/ -/ 1:150	Roche, Mannheim
Anti-Glucose Transporter GLUT1 [SPM498]	Maus, monoklonal	1:5000/ 1:200/ -	Abcam, Cambridge, GB
Anti-HBsAg	Maus, monoklonal	-/ 1:100/ -	Dako, Glostrup, Dänemark
Anti-IGF-1 Rezeptor β	Kaninchen, polyklonal	1:1.000/ 1:200/ -	Cell Signaling, Danvers, USA
Anti-p-IGF-IR (Tyr 1161)	Kaninchen, polyklonal	1:300/ -/ -	St. Cruz Biotech, USA
Anti-Insulin Rβ (C-19)	Kaninchen, polyklonal	1:300/ 1:80/ 1:30	St. Cruz Biotech, USA
Anti-p-Insulin Rβ (Tyr 1162/1163)	Kaninchen, polyklonal	1:300/ -/ -	St. Cruz Biotech, USA
Anti-IRS-1 (C-20)	Kaninchen, polyklonal	1:300/ -/ -	St. Cruz Biotech, USA
Anti-p-IRS-1 (Ser 307)	Kaninchen, polyklonal	1:300/ -/ -	St. Cruz Biotech, USA
Anti-p-IRS-1 (Tyr 1229)	Kaninchen, polyklonal	1:300/ -/ -	St. Cruz Biotech, USA
Anti-JNK1/2 (E-5)	Kaninchen, polyklonal	1:300/ -/ -	St. Cruz Biotech, USA
Anti-ACTIVE® JNK	Kaninchen, polyklonal	1:10.000/ -/ -	Promega, Madison, USA
Anti-Lamin A (H-102)	Kaninchen, polyklonal	1:300/ -/ -	St. Cruz Biotech, USA
Ma 18/7	Maus, monoklonal	1:300/ 1/100/ -	Georg-August-Universität Göttingen (Heermann <i>et al.</i> , 1984)
Anti-PARP 1/2 (H-250)	Kaninchen, polyklonal	1:300/ -/ -	St. Cruz Biotech, USA
Anti-PGK	Kaninchen, polyklonal	1:5.000/ 1:200/ -	Abcam, Cambridge, GB
<b>sekundäre Antikörper</b>			
Anti-Kaninchen IgG-Alexa488	Esel, polyklonal	-/ 1:1.000/ 1:1.000	Invitrogen, Karlsruhe

Antikörper	Spezies/ Klonalität	Verdünnung (WB/IF/IHC)	Hersteller
Anti-Kaninchen IgG-Cy3	Esel, polyklonal	-/ 1:400/ 1:400	Jackson ImmunoResearch Europe, Suffolk, UK
Anti-Kaninchen IgG-HRP	Esel, polyklonal	1:2.000/ -/ -	GE Healthcare, Freiburg
Anti-Kaninchen IRDye® 680LT	Esel, polyklonal	1:5.000/-/ -	LI-COR, Lincoln, USA
Anti-Kaninchen IRDye® 800CW	Esel, polyklonal	1:5.000/-/ -	LI-COR, Lincoln, USA
Anti-Maus IgG-Alexa488	Esel, polyklonal	-/ 1:1.000	Invitrogen, Karlsruhe
Anti-Maus IgG-Cy3	Esel, polyklonal	-/ 1:400	Jackson ImmunoResearch Europe, Suffolk, UK
Anti-Maus IgG-HRP	Esel, polyklonal	1:2.000/ -	GE Healthcare, Freiburg
Anti-Kaninchen IRDye® 680LT	Esel, polyklonal	1:5.000/-/ -	LI-COR, Lincoln, USA
Anti-Maus IRDye® 800CW	Esel, polyklonal	1:5.000/-/ -	LI-COR, Lincoln, USA
DAPI (0.1 mg/ml stock in PBS)		-/1:400	

HRP = Horseradish Peroxidase (Meerrettich Peroxidase); Cy3 = Cyanin 3; Cy5 = Cyanin 5

### 3.5 Größenstandards

für Proteine	Hersteller
PageRuler <sup>TM</sup> Prestained Protein Ladder	Fermentas, St.-Leon-Rot
PageRuler <sup>TM</sup> Plus Prestained Protein Ladder	Fermentas, St.-Leon-Rot

### 3.6 Enzyme

Enzyme	Hersteller
DNase I	PeqLab, Erlangen
Glukoseoxidase	Sigma-Aldrich, Seelze
M-MuIV Reverse Transcriptase	Fermentas, St.-Leon-Rot
Trypsin/ EDTA	Biochrom, Berlin

### 3.7 Reagenzien für die Zellkultur

Reagenz	Hersteller
DMEM Medium (4,5 g/l Glukose ohne L-Glutamin)	BioWhittaker®Lonza, Verviers, Belgien
DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)	Eigenherstellung Medienküche PEI
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA, Linz, Österreich
Glukoseoxidase	Sigma-Aldrich, Seelze
L-Glutamin	Biochrom, Berlin
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Carl-Roth®, Karlsruhe
Hydrokortison	Sigma-Aldrich, Seelze
Insulin	Sigma-Aldrich, Seelze
Opti-MEM I	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/ Streptomycin	Biochrom, Berlin
Trypsin/ EDTA	Biochrom, Berlin

### 3.8 Inhibitoren

Inhibitor	Inhibition von	Hersteller
<b>Proteaseinhibitoren</b>		
Leupeptin	Serin- & Cysteinproteasen	Sigma-Aldrich, Seelze
Pepstatin	Azid- & Aspartaticproteasen	Sigma-Aldrich, Seelze
PMSF	Serinproteasen	Carl-Roth, Karlsruhe
<b>Phosphataseinhibitoren</b>		
Phosphataseinhibitorcocktail	Phosphatasen	Sigma-Aldrich, Seelze

### 3.9 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden von Carl-Roth, Karlsruhe oder Sigma-Aldrich, Seelze bezogen. Ausnahmen sind hier aufgelistet:

GenAgarose LE	Genaxxon, Biberach/Riß
Bovines Serum Albumin (BSA) Fraktion V	PAA, Linz, Österreich
dNTP Mix	Fermentas, St. Leon-Rot
Ethidiumbromid	Applichem, Darmstadt
peqGOLD TriFast	PeqLab, Erlangen
TEMED (Tetramethylethylendiamin)	Merck, Darmstadt
Tween-20	Serva, Heidelberg

### 3.10 Pharmazeutika und Medizinprodukte

Warenname	Wirkstoff	Wirkstoffklasse	Hersteller
Dolorex®	Butorphanol	Opioid	MSD-Tiergesundheit, Unterschleißheim
Ethilon, monofil, 2 metric	-	-	Ethicon, Johnson & Johnson Medical, Norderstedt
Isofluran CP®	Isofluran	Inhalationsanästhetikum	CP-Pharma®, Burgdorf
Surgibond®	-	-	SMI, St. Vith, Belgien
Vicryl®, pseudomonofil, 2 metric	-	-	Ethicon, Johnson & Johnson Medical, Norderstedt

### 3.11 Kits

Kit	Hersteller
<b>Plasmidpräparation</b>	
Qiagen Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
<b>Light Cycler</b>	
Maxima <sup>TM</sup> SYBR Green/ ROX qPCR Master Mix	Fermentas, St.-Leon-Rot
<b>ELISA-Kits</b>	
Cell Proliferation ELISA, BrdU	Roche, Mannheim
Enzygnost HBsAg 6.0	Siemens Healthcare Diagnostics, Inc., Malvern, USA
IGF-1 Receptor Human ELISA Kit	Abcam, Cambridge, GB
IGF-1R [pYpY1135/1136] Human ELISA Kit	Invitrogen, Karlsruhe
IR (β-Subunit) Human ELISA Kit	Invitrogen, Karlsruhe
IR [pY1334] Human ELISA Kit	Invitrogen, Karlsruhe
IRS (Total) Human ELISA Kit	Invitrogen, Karlsruhe
IRS [pS312] Human ELISA Kit	Invitrogen, Karlsruhe
PathScan®Phospho-IRS-1 (panTyr)	Cell Signaling, Danvers, USA
PARP Cleavage [214/215] Human ELISA Kit	Invitrogen, Karlsruhe
<b>Apoptose-Kit</b>	
ApoAlert <sup>TM</sup> DNA Fragmentation Assay Kit	Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich

## 3.12 Geräte

### 3.12.1 Elektrophorese

Electrophoresis Power Supply - EPS 301	GE Healthcare, Freiburg
HE 33 mini Submarine Electrophoresis Unit	Hofer, Holliston, USA
Standard Power Pack P25	Biometra®, Göttingen
SE 250 Mighty Small II, complete	Hofer, Holliston, USA
TE77 ECL-Semi-Dry Transfer Unit	GE Healthcare, Freiburg

### 3.12.2 Mikroskopie

Axiophot	Zeiss, Jena
Axiovert 40C	Zeiss, Jena
Laser-Scanning-Mikroskop 510 mit Axiovert 200M	Zeiss, Jena
Leica DMRBE	Leica, Solms

### 3.12.3 Bildgebung

AGFA Curix60 film developer	Agfa Healthcare, Mortsel, Belgien
Hypercassette <sup>TM</sup>	Amersham Life Science, Freiburg
Hyperfilm ECL Chemiluminescence	GE Healthcare, Freiburg
INTAS-Imaging system (Agarosegele)	Intas, Göttingen
Odyssey®	LI-COR, Lincoln, USA

### 3.12.4 Real-Time PCR

LightCycler® 1.5 Instrument	Roche, Mannheim
LightCycler® 480 System	Roche, Mannheim

### 3.12.5 Zentrifugen

Cryofuge 8500	Hereaus, Osterode
Hereaus Fresco17 Centrifuge	Thermo Scientific, Schwerte
Micro Centrifuge	Carl Roth®, Karlsruhe
Multifuge 1S-R	Hereaus, Osterode

### 3.12.6 Andere Geräte

---

BBD 6220	Heraeus®, Osterode
Captair®	Erlab®, Köln
Dounce-Homogenisator	B. Braun, Melsungen
DU®730 Life Science UV/VIS Spectrophotometer	Beckman Coulter®, Krefeld
HLB 2448 BS	Thermo, Schwerte
RCT basic	IKA®, Staufen
Innova® 44	Eppendorf, Hamburg
Photometer Ultrospec 1100 pro	GE Healthcare
Photometer Ultrospec 3000	GE Healthcare, Freiburg
Polymax 1040	Heidolph, Schwabach
Reflotron® Plus	Roche, Mannheim
Rocking Platform	Biometra®, Göttingen
S20 - SevenEasy <sup>TM</sup> pH	Mettler-Toledo, Gießen
Satorius VWR 1502	Satorius, Göttingen
Sonoplus HD 2200	Bandelin, Berlin
SterilGard® III Advance°	The Baker Company, Sanford, USA
Stuart® Roller mixer SRT6	Bibby Scientific, Staffordshire UK
Stuart® Roller mixer SRT9	Bibby Scientific, Staffordshire UK
Tecan Infinite M1000	Tecan, Crailsheim
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
UNO Micro Ventilator-03	UNO Roestvaststaal, Zevenaar, Niederlande
Vacusaft comfort	Integra Biosciences, Zizers, Schweiz
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Z1 Coulter® Particle Counter	Beckman Coulter®, Krefeld

---

### 3.13 Verbrauchsmaterialien

---

Amersham Hyperfilm <sup>TM</sup> ECL	GE Healthcare, Freiburg
Biosphere® Filter Tips 0,5-20 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Biosphere® Filter Tips 2-100 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Biosphere® Filter Tips 1250 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Cellstar® 6-well cell culture plate	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Cellstar® 12-well cell culture plate	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Cellstar® 96-well cell culture plate	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Cellstar® Cell Culture Flask 75 cm <sup>2</sup>	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Cellstar® Cell Culture Flask 175 cm <sup>2</sup>	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Cellstar® Serological Pipette 5 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen

Cellstar® Serological Pipette 10 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Cellstar® Serological Pipette 25 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Cellstar® Tubes 15 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Cellstar® Tubes 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Deckgläser Ø 18 mm	Menzel, Braunschweig
Deckgläser 24 mm x 50 mm	Menzel, Braunschweig
epT.I.P.S.® Pipettenspitzen 0,5-20 µl	Eppendorf, Hamburg
epT.I.P.S.® Pipettenspitzen 2-200 µl	Eppendorf, Hamburg
epT.I.P.S.® Pipettenspitzen 50-1000 µl	Eppendorf, Hamburg
EUROMED E 1000	Ernst Christiansen, Planegg
EUROMED F 1000	Ernst Christiansen, Planegg
FrameStar® 96 PCR Platte für LC 480	GeneON, Ludwigshafen
Immobilon® -P Transfer Membrane	Millipore, Billerica, USA
Immobilon <sup>TM</sup> Western HRP-Substrate	Millipore, Billerica, USA
Li-Heparin Mikro-Probengefäß 1,3 ml	Sarstedt, Nümbrecht
LightCycler capillaries (Polycarbonate)	Genaxxon, Biberach/Riß
Luminata <sup>TM</sup> Forte Western HRP Substrat	Millipore, Billerica, USA
Objektträger SuperFrost®	Carl Roth®, Karlsruhe
Objektträger Superfrost® Plus	Menzel, Braunschweig
Parafilm®	Pechiney Plastik Packing, Menasha, USA
Phase Lock Gel Heavy, 2 ml	5Prime, Hamburg
Reflotron® Glucose	Roche, Mannheim
Reflotron® GPT (ALT)	Roche, Mannheim
Reflotron® GOT (AST)	Roche, Mannheim
SafeSeal Reagiergefäß 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
SafeSeal Reagiergefäß 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
SuperSignal® West Pico	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Whatman® Cellulose Chromatography Paper 3MM	GE Healthcare, Freiburg
Zellschaber S	TPP, Trasadingen, Schweiz

### 3.14 Puffer und Lösungen

#### Agarose Ladepuffer 6x

6x TAE-Puffer  
 30 % Glycerol (w/v)  
 0,1 mg/ml Bromphenolblau

#### Anoden-Puffer I

20 % Ethanol (v/v)  
 300 mM TRIS (Trisaminomethan)

#### Anoden-Puffer II

20 % Ethanol (v/v)

	25 mM TRIS (Trisaminomethan)
<b>Kathoden-Puffer</b>	20 % Ethanol (v/v) 40 mM 6-Aminocapronsäure
<b>Lysogeny broth Medium (LB Medium)</b>	1 % Trypton (w/v) 0,5 % Hefeextrakt (w/v) 1 % Natriumchlorid (w/v) pH 7,0
<b>Mowiol</b>	10 % Mowiol (w/v) 25 % Glycerol (w/v) 2.5 % DABCO 100 mM TRIS/HCl pH 8,5
<b>Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) 10x</b>	80,0 g NaCl 2,0 g Kaliumchlorid 14,4 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2,4 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,4 ad 1 l H <sub>2</sub> O
<b>RIPA Puffer</b>	50 mM TRIS-HCl pH 7.2 150 mM NaCl 0,1 % SDS (w/v) 1 % Sodium desoxycholate (w/v) 1 % TritonX 100
<b>SDS-Ladepuffer</b>	4 % SDS (w/v) 125 mM TRIS-HCl pH 6,8 10 % Glycerol (v/v) 10 % β-Mercaptoethanol (v/v) 0,02 % Bromphenolblau (w/v)
<b>SDS-Laufpuffer (10x)</b>	0,25 M TRIS 2 M Glycin 1 % SDS (w/v) pH 8,3
<b>Sammelgelpuffer</b>	0,5 M TRIS 0,4 % SDS (w/v) pH 6,7
<b>TAE-Puffer (50x)</b>	2 M TRIS 1 M NaAc 50 mM EDTA

	pH 8,0
<b>TBST (10x)</b>	200 mM TRIS-HCl pH 7,8 1,5 M Sodium chloride 0,5 % Tween
<b>Trenngelpuffer</b>	1,5 M TRIS-HCl 0,4 % SDS (w/v) pH 8,8

### 3.15 Software

<b>Programm</b>	<b>Herausgeber</b>
AxioVision 4.8	Zeiss, Jena
LightCycler® Software Version 3.5	Roche, Mannheim
LightCycler® 480 Software release 1.5.0	Roche, Mannheim
LSM Image Browser	Zeiss, Jena
Microsoft Office Excel 2007	Microsoft, Redmont, USA
Odyssey Infrared Imaging System 2.1	LI-COR, Lincoln, USA
Photoshop CS5	Adobe, San Jose, USA
SPSS Statistics	IBM, Armonk, USA
Tecan i-control 1.8	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
VectorNTI®	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

# 4 Methoden

## 4.1 Zellbiologie

### 4.1.1 Prokaryotische Zellkultur

*E. coli*-DH5 $\alpha$ -Zellen wurden in einem Erlenmeyerkolben mit LB-Medium für 16 h bei 37 °C in einem Inkubationsschüttler inkubiert. Zur Selektion der transformierten Bakterien wurde dem LB-Medium 100  $\mu$ g/ml Ampicillin zugesetzt. Vorräte wurden mit 30 % (v/v) Glycerol versetzt und bei -80 °C gelagert.

### 4.1.2 Eukaryotische Zellkultur

#### 4.1.2.1 Kultivieren und Passagieren

Für diese Arbeit wurden die humane Hepatoblastom-Zelllinien Huh7.5, HepG2, HepG AD38 und HepG2.2.15 verwendet. Die Zelllinien Huh7.5, HepG2 und HepG2.2.15 wurden in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) mit 4.5 g/l Glucose, 10 % FCS, 2 mM L-Glutamine, 0.1 U/ml Penicillin und 100  $\mu$ g/ml Streptomycin bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und einer Luftfeuchte von  $\geq$  90 % kultiviert. Dem Medium für die Zelllinie HepG AD38 wurden zusätzlich 25  $\mu$ g/ml Hydrokortison zugesetzt; auf eine Zugabe von 5  $\mu$ g/ml Insulin zu diesem Medium wurde im Hinblick auf die Untersuchung von insulinabhängigen Signalwegen während dieser Arbeit verzichtet.

Zur Passagierung der Zellen wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit PBS (phosphatgepufferte Salzlösung) gewaschen. Anschließend erfolgte die Lösung der adhärennten Zellen vom Flaschenboden durch Zugabe von Trypsin/EDTA für 2-5 min bei 37 °C. Die Aktivität des Trypsins wurde durch Zusatz von 8-10 ml DMEM gestoppt. Durch vorsichtiges Resuspendieren wurden die gelösten Zellen vereinzelt und in neuem Medium bei Verdünnungen von 1:5 bis 1:10 neu kultiviert.

#### 4.1.2.2 Zellzählung

Die eukaryotischen Zellen wurden mit Hilfe des Z1 Coulter® Particle Counter, Beckmann Counter oder einer Neubauer-Kammer gezählt.

### 4.1.3 Transfektion von Huh7.5-Zellen

Zur Transfektion der humanen Hepatoblastom-Zelllinie Huh7.5 wurden einen Tag vor Transfektion  $1 \times 10^4$  Huh7.5-Zellen in eine 12-Kavitäten-Platte ausgesät. Als Plasmide wurden pJO19 und pUC18 als Kontrollvektor verwendet. Es wurden pro Kavität 100  $\mu$ l PBS mit 0,5  $\mu$ g des entsprechenden Plasmids und 3  $\mu$ l PEI (lineares Polyethylenamin) durch Vortexen gemischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde dieses auf die Zellen zu dem Kulturmedium gegeben. Das Kulturmedium wurde nach 8 h erneuert und die Zellen 48 h post Transfektion mittels indirekter Immunfluoreszenz analysiert (siehe Kapitel 4.4.2.1).

### 4.1.4 Ernte und Lyse eukaryotischer Zellen

#### 4.1.4.1 Proteinlysate für Western-Blot-Analysen

Für die Herstellung von Proteinlysat wurden die in einer 6-Kavitäten-Platte ausgesäten Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit 300-400  $\mu$ l RIPA Puffer pro Kavität lysiert. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen mit einem Zellschaber aus den Kavitäten gelöst und in ein Standard-Reaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden anschließend sonifiziert, 5 min bei 13.300 rpm und 4°C zentrifugiert und eine Proteinquantifizierung mittels Bradford-Methode durchgeführt (siehe Kapitel 4.3.1). Alle Schritte wurden auf Eis ausgeführt.

#### 4.1.4.2 Proteinlysate für ELISA

Zur Herstellung von Proteinlysaten für *Enzyme Linked-Immunesorbent Assays* wurde der *Cell Extraction Buffer* der Firma Invitrogen verwendet. Diesem wurden kurz vor Gebrauch Proteaseinhibitoren zugesetzt (siehe Kapitel 3.8). Nach Beendigung der Stimulation wurden die Zellen, die in einer 6-Kavitäten-Platte ausgesät wurden, mit PBS gewaschen und mit 400  $\mu$ l *Cell Extraction Buffer* pro Kavität lysiert. Mit einem Zellschaber wurden diese aus den Kavitäten gelöst und in ein Standard-Reaktionsgefäß überführt. Das Lysat wurde 30 min auf Eis inkubiert und während dieser Zeit alle 10 min gemischt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei 13.300 rpm und 4 °C. Der Überstand wurde in neue Reaktionsgefäße überführt und eine Proteinquantifizierung mittels Bradford-Methode durchgeführt (siehe Kapitel 4.3.1).

## 4.2 Molekularbiologische Methoden

### 4.2.1 Agarose-Gel-Elektrophorese

Die Agarose-Gel-Elektrophorese wurde verwendet, um die Qualität der isolierten RNA (Ribonukleinsäure) und DNA (Desoxyribonukleinsäure) zu überprüfen. Hierfür wurden 2% (w/v) Agarose (Genaxxon, Biberach/Riß) in 1x TAE-Puffer resuspendiert und durch Erhitzen gelöst. Um die DNA

unter UV-Licht sichtbar zu machen, wurde der flüssigen Agarose 0.1 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt und diese anschließend zur Aushärtung in einen Schlitten gegossen, welcher mit einem Kamm versehen wurde. Das ausgehärtete Gel wurde in eine horizontale Gelelektrophoresekammer mit 1x TAE-Puffer überführt. Die RNA-Proben wurden mit 6x-Ladepuffer gemischt, auf das Gel aufgetragen und anschließend bei 80 Volt separiert. Die RNA-Banden wurden unter UV-Licht (254/365 nm) begutachtet und mit dem *INTAS-Imaging System* dokumentiert.

#### 4.2.2 Bestimmung von DNA- & RNA-Konzentrationen

Die Bestimmung von DNA- oder RNA-Konzentrationen kann durch die Absorption bei  $\lambda = 260$  nm erfolgen. Eine Extinktion  $OD_{260}$  von 1,0 entspricht dabei 50 µg/ml doppelsträngiger DNA oder 40 µg/ml einzelsträngiger RNA. Ein Maß für die Reinheit stellt das Verhältnis von  $OD_{260}$  zu  $OD_{280}$  dar. Dieses sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen, niedrigere Werte sind ein Indikator für Phenol- oder Proteinkontamination.

Für diese Arbeit wurden DNA- und RNA-Konzentrationen mit dem Ultraspec 1100 pro von GE Healthcare gemessen.

#### 4.2.3 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Plasmid-DNA wurde von 200-300 ml einer Übernachtskultur (siehe Kapitel 4.1.1) mit Hilfe des *Qiagen Plasmid Maxi Kit* nach Herstellerangaben isoliert. Die Bakterien werden bei diesem Verfahren unter alkalischen Bedingungen lysiert und Proteine sowie DNA denaturiert (Birnboim et Doly, 1979). Durch einen Zentrifugationsschritt werden Zellreste und Proteine entfernt und die im Überstand enthaltene DNA über eine Anionenaustauscher-Säule gereinigt. Die Plasmid-DNA wird anschließend eluiert, mit Isopropanol gefällt und in ddH<sub>2</sub>O gelöst.

Die Konzentration wurde durch Absorption bei  $\lambda = 260$  nm gemessen und die Qualität der isolierten Plasmid-DNA mittels eines Agarosegels überprüft (siehe Kapitel 4.2.1).

#### 4.2.4 RNA-Isolierung

Zur Isolierung von zellulärer RNA wurde *peqGOLD TriFast* (PeqLab) verwendet. Das enthaltene Trizol lysiert Zellen und Zellkomponenten, während die Integrität der RNA unbeschädigt bleibt.  $1 \times 10^7$  Zellen wurden in 800 µl *peqGOLD TriFast* lysiert und anschließend für 5 min bei 4 °C und 13.300 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, mit 160 µl Chloroform versetzt und in einem Phase Lock (5 Prime) erneut 5 min bei 4 °C und 13.300 rpm zentrifugiert. Danach befindet sich die gelöste RNA in der wässrigen Phase oberhalb der organischen Phase. Diese wurde abgenommen und die RNA mit 400 µl Isopropanol präzipitiert. Nach 30 min Zentrifugation bei 4 °C und 13.300 rpm wurde die RNA mit 75 % Ethanol gewaschen und danach in DEPC-Wasser gelöst.

Die Qualität der RNA wurde mittels eines Agarosegels überprüft (siehe Kapitel 4.2.1).

#### 4.2.5 cDNA-Synthese

Nach der Isolation der RNA wurde ein DNase-Verdau durchgeführt, um etwaige DNA-Kontaminationen zu entfernen. Hierfür wurden 5 µg RNA mit 1,0 µl DNase I (PeqLab), 1,2 µl *DNase-Buffer* (PeqLab) und DEPC-Wasser auf ein Endvolumen von 12 µl aufgefüllt. Der Verdau wurde für eine Stunde bei 37 °C durchgeführt und die DNase I anschließend durch 5 min Inkubation bei 90 °C inaktiviert.

Anschließend erfolgte die cDNA-Synthese. Dazu wurden 1,0 µl *Random Hexamer Primer*, 1,0 µl *M-MuLV Reverse Transcriptase* (Fermentas), 2,0 µl 10 mM dNTPs (Fermentas) und 4,0 µl *RT-Buffer* (Fermentas) zunächst 10 min bei Raumtemperatur und anschließend eine Stunde bei 42 °C inkubiert. Die Deaktivierung der *M-MuLV Reverse Transcriptase* erfolgte für 10 min bei 72 °C.

#### 4.2.6 Real-Time PCR

Die *Real-Time PCR* (Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion) wird genutzt, um Nukleinsäuren mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen zu quantifizieren.

Die *PCR* beginnt mit einem Denaturierungsschritt, bei dem die doppelsträngige DNA zwischen den komplementären Basen aufgelöst wird und anschließend als Einzelstrang vorliegt. Bei dem nachfolgenden Hybridisieren binden Primer am Anfangspunkt der zu vervielfältigenden DNA-Abschnitte und stellen den Startpunkt für Polymerasen dar, welche die DNA-Stränge wieder komplettieren. Es folgt eine erneute Denaturierung und ein neuer PCR-Zyklus beginnt. Bei der *Real-Time PCR* wird in das Amplifikat ein Fluoreszenzfarbstoff (SYBR Green) eingebaut und nach jedem PCR-Zyklus die Zunahme der Fluoreszenz detektiert, welche direkt mit der Menge des Amplikons korreliert. Über den Vergleich der Fluoreszenzzunahme mit definierten cDNA-Standardverdünnungen erfolgt die Quantifizierung.

Für die *Real-Time PCR* wurden während dieser Arbeit die LightCycler® 1.5- und LightCycler® 480-Systeme der Firma Roche sowie das Maxima<sup>TM</sup> SYBR Green qPCR-Kit von Fermentas verwendet. Das Reaktionsgemisch wurde nach Herstellerangaben erstellt und enthielt 5 µl 2x Maxima<sup>TM</sup> SYBR Green qPCR Master Mix und je 0,25 µl fwd- und rev-Primer (10 µM). Es wurden 2,5 µl Probe hinzugefügt und mit ultrapur ddH<sub>2</sub>O auf 10 µl Endvolumen aufgefüllt. Alle Proben wurden auf GAPDH normalisiert.

Das folgende Programm wurde für beide LightCycler® verwendet (Tabelle 4.1).

Programm	Temperatur (°C)	Haltedauer (Sek.)	Temperaturanstieg/-abfall (°C/Sek.)	Datenerfassung	Wiederholungen
Denaturierung	95	600	20	keine	1
PCR-Zyklen	95	15	20	keine	45
	56	30	20	keine	
	72	30	5	nach jedem Zyklus	
Schmelzen	95	60	20	keine	1
	60	30	20	keine	
	95	0	0,1	kontinuierlich	
Kühlen	40	30	20	keine	

Tabelle 4.1: *Real-Time PCR* Programm

## 4.3 Proteinbiochemische Methoden

### 4.3.1 Protein-Quantifizierung mittels Bradford-Methode

Zur Quantifizierung der Proteinmenge in Lysaten wurde die Bradford-Methode [Bradford, 1976] verwendet. Diese Methode beruht auf einer Anlagerungsreaktion der Proteine, bei der das Absorptionsmaximum des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250 von 465 nm zu 595 nm verschoben wird. Die Verschiebung des Absorptionsmaximums kann bei 595 nm gemessen werden.

Die Methode wurde nach Herstellerangaben durchgeführt, verwendet wurde das Bradford-Reagenz von Sigma-Aldrich, Seelze.

### 4.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

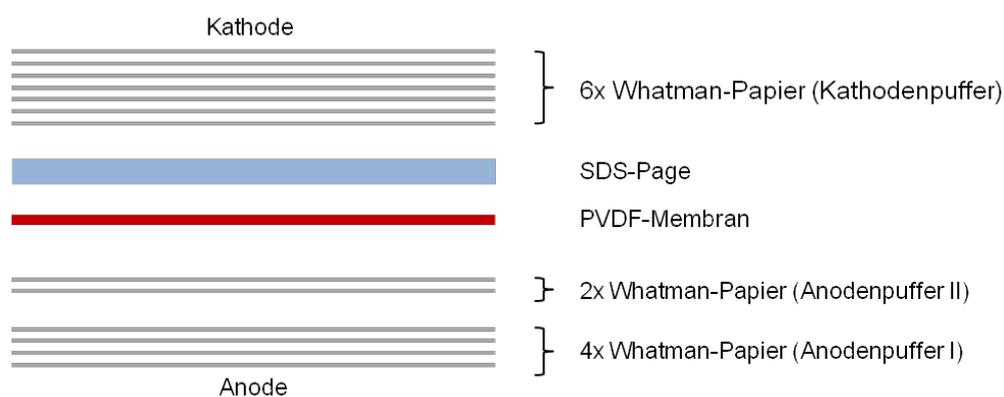
Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wird verwendet, um Proteine entsprechend ihres Molekulargewichtes (MW) zu separieren (Laemmli, 1970). Die hier verwendeten Gele bestehen aus einem Trenngel, dessen Zusammensetzung (8-15 %) sich nach der Größe des gesuchten Proteins richtet, und einem darüberliegenden Sammelgel (4 %). Für Proteine mit einem Molekulargewicht >150 kDa wurden 8%-Trenngele, mit einem MW zwischen 30 kDa und 150 kDa 10%-Trenngele und mit einem MW < 30 kDa 15 %-Trenngele verwendet (Zusammensetzung siehe Tabelle 4.2). Proteinmengen zwischen 75-100 µg wurden mit 4X SDS-Ladepuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 80 mA für circa 2 h. Als Größenstandard wurden Page Ruler<sup>TM</sup> Prestained Protein Ladder oder Page Ruler<sup>TM</sup> Prestained Plus Protein Ladder der Firma Fermentas verwendet.

Trenngel	8 %	10 %	15 %	Sammelgel	4 %
Trenngelpuffer (4x)	20 ml	20 ml	20 ml	Sammelgelpuffer (4x)	15 ml
Rotiphorese 40	16 ml	20 ml	30 ml	Rotiphorese 40	6 ml
H <sub>2</sub> O	44 ml	40 ml	30 ml	H <sub>2</sub> O	45 ml
TEMED	80 µl	80 µl	80 µl	TEMED	40 µl
APS	SSp	SSp	SSp	APS	SSp

Tabelle 4.2: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgelen

### 4.3.3 Western-Blot-Analyse

Die entsprechend ihres Molekulargewichtes durch die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese separierten Proteine wurden nachfolgend auf eine PVDF-Membran (Immobilion-P, Millipore) überführt (Towbin et al. 1992). Hierfür wurde das *Semi-dry*-Verfahren und ein diskontinuierliches Puffersystem verwendet (Abbildung 4.1).

Abbildung 4.1: schematischer Aufbau des *Semi-Dry*-Blots

Die Proteine wurden innerhalb einer Stunde bei 1,3 mA/ cm<sup>2</sup> aus dem Gel auf die mit Methanol aktivierte PVDF-Membran geblottet. Nach dem Blotten wurden die Membranen für 1 h bei Raumtemperatur blockiert, um eine Sättigung unspezifischer Bindungsstellen zu erlangen. Als Blockierungspuffer wurde abhängig vom Antikörper 10 % (w/v) Milchpulver in 1x TBST-Puffer oder bei phosphospezifischen Antikörpern 5 % (w/v) BSA in 1x TBST-Puffer verwendet.

Die Inkubation des primären Antikörpers erfolgte in entsprechendem Blockierungspuffer für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C. Nicht gebundene Antikörper wurden durch dreimal 5 min Waschen in 1x TBST entfernt und anschließend die Membran mit einem HRP-gekoppelten oder einem IRDye-gekoppelten Antikörper für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen für 3x 10 min in 1x TBST erfolgte die Detektion der Immunmarkierung durch einen Chemilumineszenz Film oder das Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR). Für die Detektion durch Auflegen eines Chemilumineszenz-Filmes wurde je nach Antikörper das Chemilumineszenz-Substrat (ECL) SuperSignal® West Pico oder das Immobilon<sup>TM</sup> Western verwendet.

## 4.4 Immunologische Methoden

### 4.4.1 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Ein *Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay* (ELISA) ist ein immunologisch enzymatisches Verfahren, das sich zum Nachweis von Proteinen und Proteinfragmenten eignet [Ausubel et al., 2012]. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten ELISA sind sogenannte Sandwich-ELISA. Bei diesem Nachweisverfahren werden die Proteine beziehungsweise Proteinfragmente von zwei Antikörpern, die gegen verschiedene Epitope gerichtet sind, erkannt. Der erste sogenannte *capture*-Antikörper ist an eine Mikrotiterplatte gebunden und bindet das gewünschte Protein aus der Probe. Nach einem Waschschrift, der die ungebundenen Proteine entfernt, bindet ein *detection*-Antikörper das Protein bzw. Fragment an einem anderen Epitop. Ein dritter HRP-gekoppelter-Antikörper (*Horseradish Peroxidase*/Merrettich-Peroxidase) bindet den *detection*-Antikörper und sorgt nach Zugabe eines Substrates für einen enzymatischen Farbumschlag; dieser wird durch Zugabe einer Stopplösung angehalten und anschließend mittels eines Photometers bei 450 nm gemessen.

Die für diese Arbeit verwendeten ELISA (Cell Proliferation ELISA, BrdU; Enzygnost HBsAg 6.0; IGF-1 Receptor Human ELISA Kit; IGF-1R [pYpY1135/1136] Human ELISA Kit; IR ( $\beta$ -Subunit) Human ELISA Kit; IR [pY1334] Human ELISA Kit; IRS (Total) Human ELISA Kit; IRS [pS312] Human ELISA Kit; PathScan®Phospho-IRS-1 (panTyr) Cell Signaling; PARP Cleavage [214/215] Human ELISA Kit) stammen von den Herstellern Siemens Healthcare Diagnostics, Invitrogen, Abcam und CellSignaling und wurden nach Herstellerangaben durchgeführt.

### 4.4.2 Immunfluoreszenz & Immunhistochemie

#### 4.4.2.1 Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie

Mittels der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie können intrazelluläres Vorkommen und Lokalisation von Proteinen dargestellt werden. Hierzu wurden die humanen Hepatoblastomzellen Huh7.5 auf Deckgläsern in 12-Kavitäten-Platten ausgesät und transfiziert (siehe Kapitel 4.1.3). Die Fixierung erfolgte je nach Protein und später verwendetem Antikörper für 10 min mit 3,7 % Formaldehyd in PBS oder mit eiskaltem Ethanol-Aceton (1:1). Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und für 1 h bei Raumtemperatur mit 10 % BSA in 1x TBST permeabilisiert und unspezifische Antikörperbindungen geblockt. Die Inkubation des primären und sekundären fluoreszenzgekoppelten Antikörpers erfolgte in einer Feuchtkammer für eine Stunde. Die Zellkerne wurden nach der Inkubation des sekundären Antikörpers für 10 min mit DAPI-Lösung (4,6- Diamidino-2-Phenylindol) gefärbt (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). Die verwendeten Antikörper und die DAPI-Lösung wurden in 10 % BSA in 1x TBST verdünnt. Um nicht gebundene Antikörper zu entfernen, wurden die Zellen zwischen und nach den Inkubationen dreimal 10 min in 1x TBST gewaschen. Die Deckgläser mit den fixierten und gefärbten Zellen wurden mit Mowiol auf Objektträgern befestigt und die Immunfluoreszenz mittels konfokaler *Laser-Scanning*-Mikroskopie (LSM 510, Zeiss) ausgewertet.

#### 4.4.2.2 Indirekte Immunhistochemie

Die in Paraffin eingebetteten Leberproben von chronisch HBV-infizierten und gesunden Patienten wurden zunächst für 15 min in Xylol deparaffiniert und anschließend mit einer absteigenden Alkoholreihe für 10 min in 99 % Ethanol, 10 min in 75 % Ethanol und 5 min in ddH<sub>2</sub>O rehydratisiert.

Zur Reduktion der Autofluoreszenz wurden die Schnitte für 30 min mit 3,7 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol gebleicht und anschließend für 1 h bei Raumtemperatur mit 10 % BSA in 1x TBST permeabilisiert und unspezifische Antikörperbindungen geblockt. Die Inkubation des primären und sekundären fluoreszenzgekoppelten Antikörpers erfolgte in einer Feuchtkammer für eine Stunde. Die Zellkerne wurden nach der Inkubation des sekundären Antikörpers für 10 min mit DAPI-Lösung (4,6- Diamidino-2-Phenylindol) gefärbt (1 µg/µl). Die verwendeten Antikörper und die DAPI-Lösung wurden in 10 % BSA in 1x TBST verdünnt. Um nicht gebundene Antikörper zu entfernen, wurden die Leberschnitte zwischen und nach den Inkubationen dreimal 10 min in 1x TBST gewaschen. Im Anschluss wurde die Immunfluoreszenz mittels konfokaler *Laser-Scanning*-Mikroskopie (LSM 510, Zeiss) ausgewertet.

### 4.5 Mikroskopie

#### 4.5.1 Konfokale *Laser-Scanning*-Mikroskopie

Zur Analyse von Immunfluoreszenzen und immunhistochemischer Schnitte wurde die konfokale *Laser-Scanning*-Mikroskopie (LSM) verwendet. Im Gegensatz zur konventionellen Mikroskopie werden bei der konfokalen *Laser-Scanning*-Mikroskopie nur Fluoreszenz-markierte Proteine einer bestimmten Ebene detektiert. Dadurch wird das Fluoreszenzlicht nicht von Molekülen ober- oder unterhalb der Brennebene emittiert und es kommt nicht mehr zu einer Überlagerung der Bilder. Es entsteht ein wesentlich schärferes Bild und durch Überlagerung der Einzelbilder eine präzise dreidimensionale Anordnung, die es erlaubt, Rückschlüsse auf Kollokationen von verschiedenen Proteinen innerhalb der Zellen zu ziehen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das LSM-510 mit dem Axiovert 200M der Firma Zeiss verwendet.

### 4.6 Charakterisierung HBV-transgener Mäuse

#### 4.6.1 Bestimmung HBV-transgener Mäuse

Zur Unterscheidung HBV-transgener von nicht-transgenen Mäusen wurde Mäusen im Alter von 4-6 Wochen Blut aus der Vena caudalis mediana entnommen und die Schwanzspitze abgesetzt. Den Blutproben wurde 50 µl 0,5 M EDTA hinzugefügt und das Vollblut bei -20 °C gelagert. Um HBV-transgene Mäuse zu bestimmen, wurde unter Verwendung von Schwanzspitzen eine PCR mit HBV-spezifischen Primern und mit dem Vollblut ein HBsAg-ELISA durchgeführt (siehe Kapitel 4.4.1).

## 4.6.2 Untersuchung biochemischer Blutparameter

### 4.6.2.1 Untersuchung des AST- und ALT-Gehaltes

Die Alaninamino-Transferase (ALT), die früher auch Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) genannt wurde, gilt bei der Maus als zuverlässiger Parameter für Veränderungen des Leberparenchyms. ALT kommt im Zytoplasma der Zellen vor und ist somit bereits bei Membranschädigung im Serum erhöht [Kraft and Dürr, 2005].

Die Aspartatamino-Transferase (AST), früher Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT), ist in verschiedenen Geweben und Organen zu finden. Da AST sowohl im Zytoplasma als auch in den Mitochondrien vorkommt, kann dieser Parameter bereits bei Membranschädigung erhöht sein, steigt aber vor allem bei Zellnekrosen stark an. Bei Leberschädigung, aber auch bei Muskelerkrankungen oder Traumata, steigt der Gehalt an AST im Blut an und gilt daher nicht als rein leberspezifischer Parameter. AST kann jedoch zusammen mit leberspezifischen Parametern wie zum Beispiel ALT als ein Indikator für Leberschädigung herangezogen werden [Kraft and Dürr, 2005, Willard and Tvedten, 2006]. Tabelle 4.3 gibt einen Überblick über die ALT- und AST-Referenzwerte bei C57Bl6-Mäusen. Die Messungen von AST und ALT wurden mit dem Reflotron® Plus der Firma Roche, Mannheim, nach Herstellerangaben durchgeführt.

	Alanin-Aminotransferase in U/l	Aspartat-Aminotransferase in U/l
Weiblich	68	131
Männlich	57	133

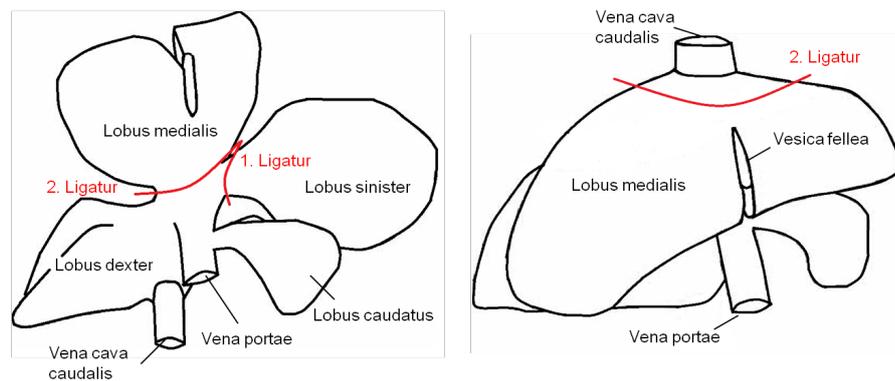
**Tabelle 4.3: Referenzwerte der Alanin- und Aspartat-Aminotransferase in U/l bei C57BL6 Mäusen; nach River [2012].**

### 4.6.3 Partielle 2/3-Hepatektomie

Die Reduktion des funktionellen Leberparenchyms durch eine partielle Hepatektomie (PH) induziert eine starke Regeneration im verbleibenden Lebergewebe. Diese bereits 1931 von Higgins und Anderson beschriebene Methode stellt eine sehr einfache, gut tolerierte und leicht reproduzierbare Methode zur Induktion der Leberregeneration dar [Higgins and Anderson, 1931].

Es wurden gleich große Gruppen männlicher und weiblicher sowie HBV-transgener und nicht-transgener Mäuse zwischen 8 und 10 Wochen verwendet. Da ein präanästhetisches Fasten die Leberregeneration beeinflussen kann [Mitchell and Willenbring, 2008], wurde den Versuchstieren bis zur PH Futter und Wasser ad libitum zur Verfügung gestellt. Einleitung und Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte über Isofluran, des Weiteren wurde Butorphanol (5 mg/kg s.c.) zur ausreichenden Analgesie eingesetzt [Kraft, 2011]. Die Mäuse wurden in Rückenlage fixiert, das Operationsfeld geschoren und anschließend mit 70 % Ethanol desinfiziert. Die Laparotomie erfolgte über die Linea alba mittels einer 2 cm langen Inzision direkt caudal des Processus xyphoideus. Zur besseren Übersicht wurde das Ligamentum falciforme durchtrennt. Anschließend wurde der Lobus lateralis sinister und mit Hilfe einer zweiten

Ligatur auch die Lobi mediales sinister und dexter nahe dem Hilus hepatis ligiert und reseziert (Abbildung 4.2).



**Abbildung 4.2: Schematische Darstellung der Anatomie der Mäuseleber und der Ligaturen;** modifiziert nach Mitchell und Willenbring, 2008.

Die Bauchhöhle wurde zweischichtig mit Vicryl® (pseudomonofil, USP 4-0) und Ethilon (monofil, USP 4-0) der Firma Ethicon verschlossen. Bei Tieren, die nach 24 h getötet wurden, wurde die Haut mit Hilfe des Gewebeklebers Surgibond® verschlossen.

Die Tötung der Tiere erfolgte 24, 48, 72 und 120 h post Hepatektomie durch CO<sub>2</sub> - Narkose. Post mortem wurde zunächst eine Blutentnahme durch Herzpunktion durchgeführt, um das Serum detailliert zu analysieren (siehe Kapitel 4.6.2). Die intra- und postoperativ entnommenen Lobi wurden sowohl für histologische Untersuchungen in 3,7 % Formaldehyd fixiert als auch zur Herstellung von Proteinlysaten schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Den Mäusen wurde 1 h vor Tötung 5-Bromo-2'-deoxyuridin (50 mg/kg Körpergewicht in 0,5 ml steriler Natriumchloridlösung) intraperitoneal gespritzt, um die Zellproliferation mittels Immunhistochemie zu untersuchen.

#### 4.6.4 Leberentnahme

Es wurden zusätzlich auch nicht-hepatektomierte HBV-transgene und nicht-transgene Mäuse mit CO<sub>2</sub>-Narkose getötet. Post mortem erfolgte eine Blutentnahme durch Herzpunktion und die Entnahme der Leber. Es wurde wie in Kapitel 4.6.3 beschrieben verfahren.

#### 4.6.5 Herstellung von Leberlysaten

Zur Herstellung von Leberlysaten für Western-Blot-Analysen und ELISA wurde schockgefrorenes Leberparenchym in einem *Douncer* mit RIPA-Puffer und Proteaseinhibitoren lysiert und 10 min auf Eis inkubiert. Die Proben wurden anschließend sonifiziert, 5 min bei 13.300 rpm und 4 °C zentrifugiert und eine Proteinquantifizierung mittels Bradford-Methode durchgeführt (siehe Kapitel 4.3.1).

#### 4.6.6 RNA-Isolierung aus Lebergewebe

Für die Isolation von RNA aus schockgefrorenem Leberparenchym wurde dieses mit 1 ml *peqGOLD TriFast* in einem *Dounce*-Homogenisator, B. Braun lysiert und danach wie in Kapitel 4.2.4 verfahren.

#### 4.6.7 Histologie

Die in Paraffin eingebetteten Leberschnitte wurden freundlicherweise von Frau Wingerter unter Leitung von Herrn Dr. Roland Plesker, Abteilung 4/ZT des Paul-Ehrlich-Institutes in Langen, angefertigt.

##### 4.6.7.1 Hämatoxylin-Eosin- & van Gieson-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung nach Mayer und die van Gieson-Färbung [Mulisch and Welsch, 2010] der Leberschnitte wurden ebenfalls freundlicherweise von Frau Wingerter unter Leitung von Herrn Dr. Roland Plesker, Abteilung 4/ZT des Paul-Ehrlich-Institutes in Langen, angefertigt.

##### 4.6.7.2 Indirekte Immunhistochemie

Für die indirekte Immunhistochemie wurden die Leberschnitte der Mäuse wie in Kapitel 4.4.2.2 beschrieben deparaffiniert, rehydratisiert und gefärbt.

##### 4.6.7.3 BrdU-Immunhistochemie

Das Thymidin-Analogon-BrdU wird nach intraperitonealer Injektion von proliferierenden Zellen während der S-Phase in die DNA eingebaut. Für die BrdU-Immunhistochemie der HBV-transgenen und nicht-transgenen Mäuse zur Analyse der Zellproliferation wurden die in Paraffin eingebetteten Leberschnitte zunächst wie in Kapitel 4.4.2.2 beschrieben deparaffiniert, rehydratisiert und gebleicht. Um mittels anti-BrdU-Antikörper in die DNA integriertes BrdU detektieren zu können, muss die DNA zunächst denaturiert werden. Die Schnitte wurden hierfür für 10 min in 1 M HCl auf Eis inkubiert. Es folgte eine Inkubation für 10 min in 2 M HCl bei Raumtemperatur und anschließend für 20 min bei 37 °C. Zur Neutralisation der Salzsäure wurden die Leberschnitte anschließend für 10 min bei Raumtemperatur mit 0,1 M Boratpuffer versetzt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen wie in Kapitel 4.4.2.1 beschrieben permeabilisiert, geblockt und die Kerne mit DAPI gefärbt.

#### 4.6.7.4 TUNEL-Assay

Mit Hilfe des TUNEL-Assay (*Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end-labeling*) können nukleäre DNA-Fragmente histochemisch dargestellt werden, die während der Apoptose durch intrazelluläre Endonukleasen gespalten wurden. An das 3'Hydroxylende der Fragmente wird durch die terminale Deoxynucleotidyltransferase Fluorescin-dUTP angelagert. Die Kerne werden anschließend mit DAPI gefärbt. Die Analyse der degradierten DNA erfolgte anschließend mittels Fluoreszenzmikroskopie. Das für diese Arbeit verwendete Kit stammt von der Firma Clontech und wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

### 4.7 Statistik

Die während dieser Arbeit erhobenen Daten wurden mit Hilfe des Programmes Exel 2007 von Microsoft graphisch dargestellt. Mit diesem wurde auch die Berechnung des arithmetischen Mittels (Mittelwert) und der Standardabweichung erstellt. Die weiteren statistischen Untersuchungen wurden mit SPSS von IBM durchgeführt. Die Untersuchungen zwischen zwei unabhängigen Proben erfolgte mittels Levene - und t - Test. Bei mehr Proben wurde die einfaktorielle Varianzanalyse ANOVA (Analysis of Variance) und bei vorliegender Signifikanz anschließend ein post-hoc Mehrfachvergleich nach Bonferroni durchgeführt, um die Gruppen paarweise miteinander zu vergleichen und zu bestimmen, welche Gruppen zueinander signifikante Unterschiede aufweisen. Das Signifikanzniveau lag für alle Tests bei  $p < 0,05$ .

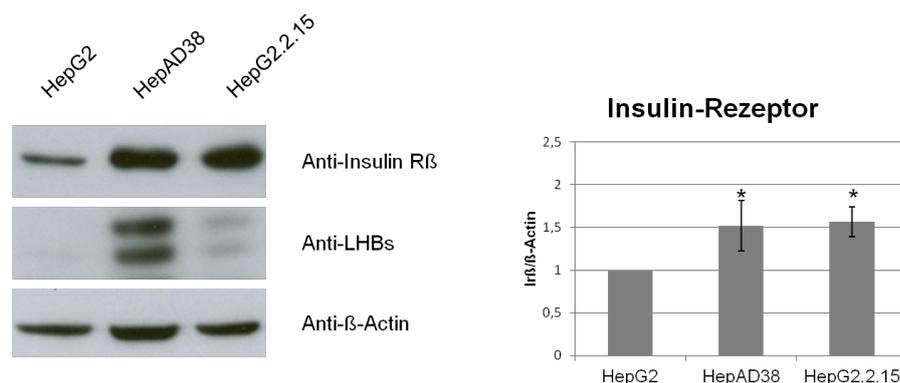
## 5 Ergebnisse

### 5.1 Einfluss von HBV auf Proteine der Insulin-Signalkaskade und des Glukosestoffwechsels

Die Infektion mit dem humanen Hepatitis-B-Virus kann zu einer Entzündung der Leber führen, aus welcher ein hepatozelluläres Karzinom resultieren kann. Eine verminderte Leberregeneration begünstigt die Entstehung von Leberfibrose und -zirrhose und führt demzufolge zu einem Verlust von funktionellem Leberparenchym [Lok and McMahon, 2007]. Ein wichtiger regulatorischer Faktor der Leberregeneration ist der Insulin-vermittelte Signalweg [Beyer et al., 2008]. Um den Einfluss von HBV auf die Leberregeneration zu analysieren, wurden zunächst wichtige Proteine der Insulin-Signalkaskade und des Glukosestoffwechsels untersucht.

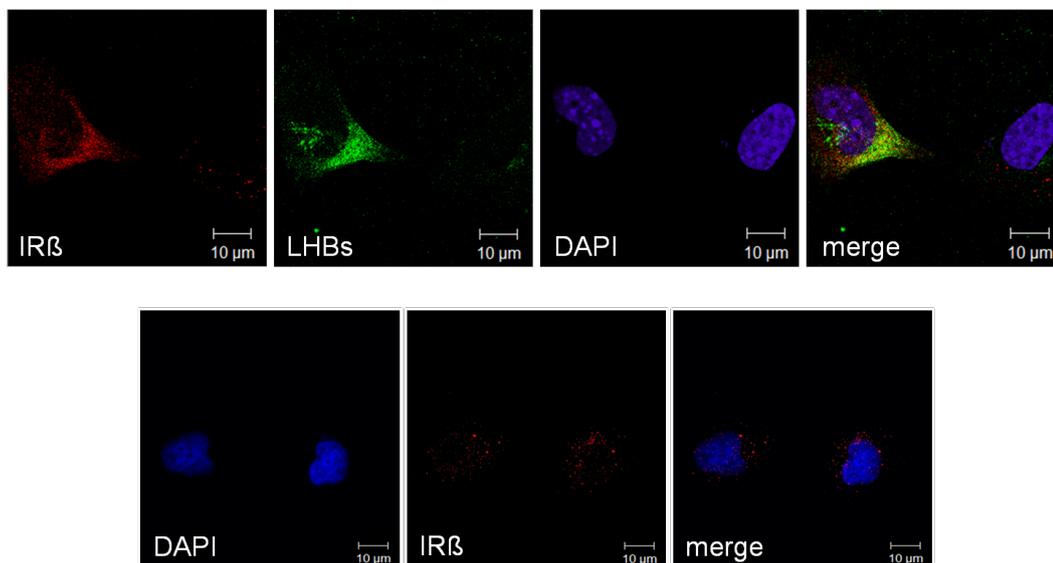
#### 5.1.1 Erhöhte Menge an Insulin-Rezeptor in HBV-replizierenden Zellen *in vitro* und *in vivo*

Die Menge des Insulinrezeptors wurde zunächst im Western Blot mit Zelllysaten der stabil HBV-replizierenden humanen Hepatoblastom-Zelllinien HepAD38 und HepG2.2.15 untersucht, die Hepatoblastom-Zelllinie HepG2 diente als Kontrolle.



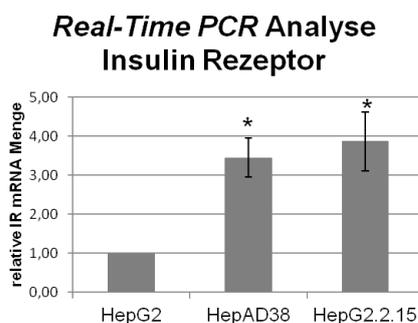
**Abbildung 5.1: Erhöhte Menge an Insulin-Rezeptor in HBV-replizierenden Zellen;** links Western Blot der HBV-replizierenden Zelllinien HepAD38 und HepG2.2.15 sowie der negativen Zelllinie HepG2, es wurden Anti-Insulin R $\beta$  und Anti-LHBs (MA18/7) verwendet, Anti- $\beta$ -Actin diente als Ladekontrolle; rechts Mittelwerte der Proteinmengen aus fünf unabhängigen Experimenten ( $n=5$ ) inklusive Standardabweichung (SD, *standard deviation*), die mit einem Stern (\*) markierten Säulen zeigen einen signifikanten Unterschied im Vergleich zu der Zelllinie HepG2,  $p \leq 0,05$ .

Es konnte beobachtet werden, dass die HBV-replizierenden Zellen eine signifikant höhere Menge an Insulin-Rezeptor enthalten. Darüber hinaus wurden Huh7.5 mit dem 1,2-fachen HBV-Genom (Plasmid pJO19) beziehungsweise dem Kontrollvektor pUC18 transfiziert und die Zellen 48 h post Transfektion mittels indirekter Immunfluoreszenz analysiert. Sowohl im Western Blot als auch in der Immunfluoreszenz zeigt sich, dass in HBV-positiven Zellen eine signifikant höhere Menge an Insulin-Rezeptor vorliegt.



**Abbildung 5.2: Indirekte Immunfluoreszenz der HBV-negativen Huh7.5-Zelllinie oben:** transfiziert mit pJO19, verwendet wurden spezifische Antikörper gegen IR $\beta$  und LHBs (MA18/7), die Kerne wurden mit DAPI gefärbt; **unten:** untransfizierte Huh7.5-Zellen, verwendet wurde ein spezifischer Antikörper gegen IR $\beta$ , die Kerne wurden mit DAPI gefärbt.

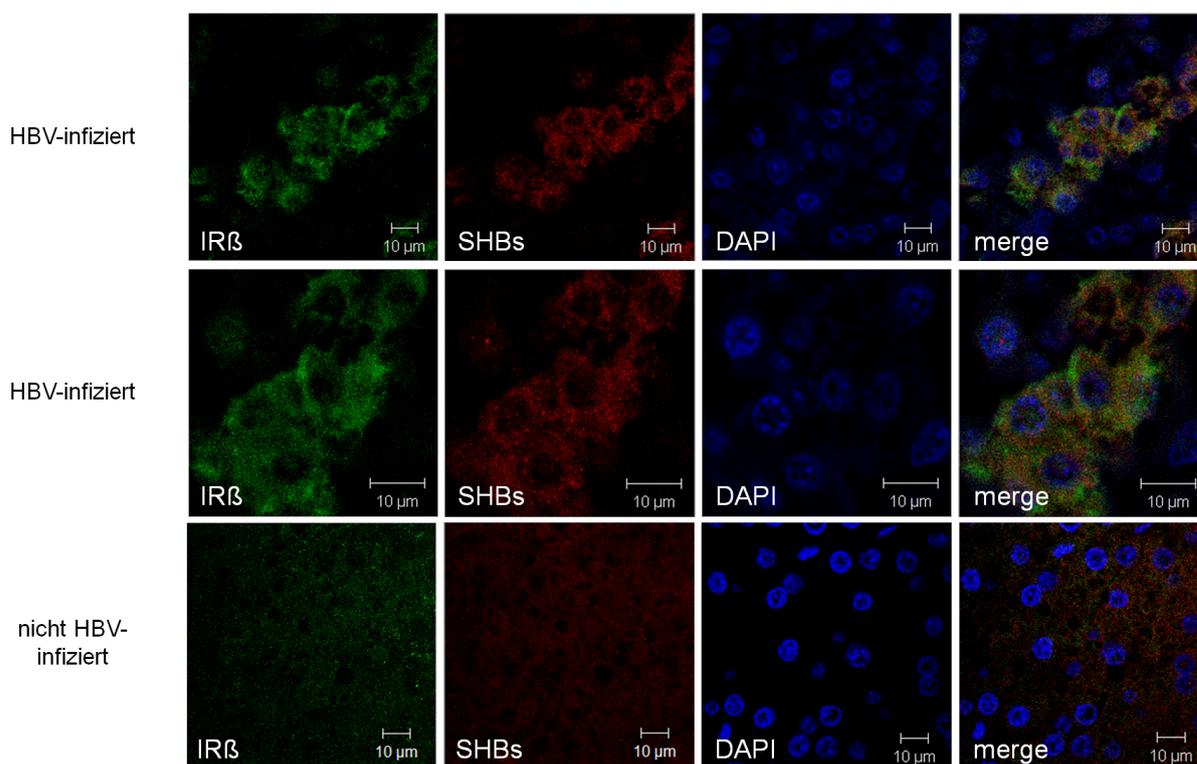
Um den Effekt von HBV auf die Expression des Insulin-Rezeptors detaillierter zu untersuchen, wurde zusätzlich RNA der Hepatoblastom-Zelllinien HepG2 sowie der stabil HBV-replizierenden Zellen HepAD38 und HepG2.2.15 isoliert. Nach der Isolierung wurde diese in cDNA transkribiert und die Menge der Insulin-Rezeptor-Transkripte mittels *Real Time-PCR* quantifiziert. Hierfür wurden Insulin-Rezeptor-spezifische Primer verwendet (# 399, # 400) und die Menge der IR-Transkripte auf die Menge der GAPDH-Transkripte (Glycerinaldehyd-3phosphat-Dehydrogenase) als nicht reguliertes Gen normalisiert (# 42, # 43). Die *RT-PCR* zeigt, dass in HBV-replizierenden Zellen ebenfalls eine höhere Expression des Insulin-Rezeptor-Gens vorliegt.



**Abbildung 5.3: Quantifizierung der Insulin-Rezeptor spezifischen mRNA durch *Real-Time PCR*;** die Menge der Insulin-Rezeptor-spezifischen mRNA-Transkripte wurde auf die Menge der GAPDH-Transkripte bezogen, dargestellt sind die Mittelwerte der IR-mRNA-Mengen aus vier unabhängigen Experimenten (n=4) inklusive Standardabweichung (SD, *standard deviation*), die mit einem Stern (\*) markierten Säulen zeigen einen signifikanten Unterschied im Vergleich zu der Zelllinie HepG2,  $p \leq 0,05$ .

Zusammenfassend weisen diese Daten darauf hin, dass in HBV-replizierenden Zellen im Gegensatz zu den HBV-negativen Kontrollzellen sowohl eine höhere Expression des Insulin-Rezeptors vorliegt als auch eine intrazellulär erhöhte Proteinmenge.

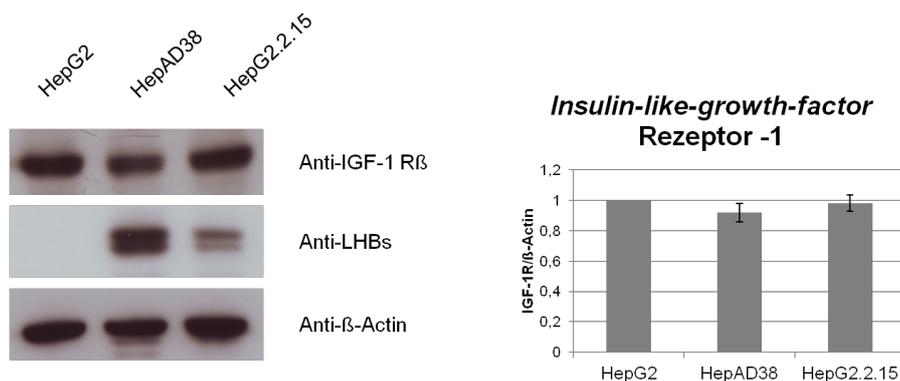
Da *in vitro* eine erhöhte Menge an Insulin-Rezeptor in HBV-replizierenden Zellen nachgewiesen werden konnte, sollte im Anschluss auch die *in vivo* Expression des Insulin-Rezeptors genauer analysiert werden. Dafür wurden zum einen Lebergewebeproben von Patienten mit chronischer HBV-Infektion mittels indirekter Immunhistochemie untersucht. Die folgenden Abbildungen zeigen, dass eine erhöhte Menge an Insulin-Rezeptor vorliegt und die Expression von HBV anscheinend in einer erhöhten Expression des Insulin-Rezeptors *in vivo* und *in vitro* resultiert.



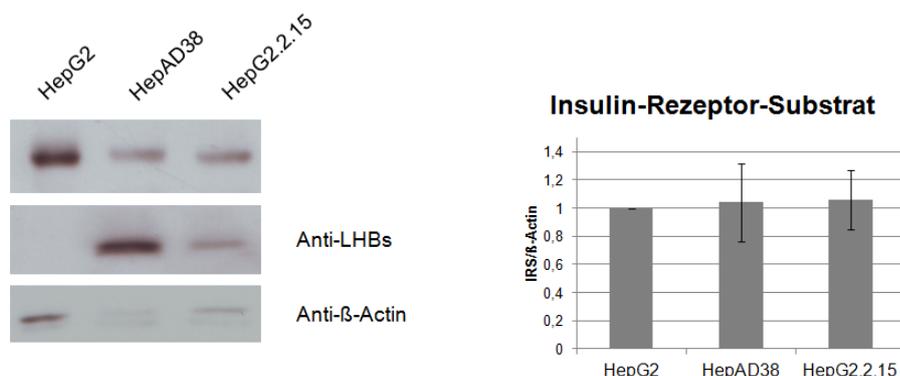
**Abbildung 5.4: Indirekte Immunhistochemie eines chronisch HBV-infizierten und eines nicht HBV-infizierten Patienten;** verwendet wurden Anti-SHBs- und Anti-IR $\beta$ -spezifische Antikörper, die Kerne wurden mit DAPI gefärbt.

### 5.1.2 HBV beeinflusst nicht die Menge des *Insulin-like-growth-factor*-Rezeptors und Insulinrezeptor-Substrats-1

Zur Untersuchung weiterer Schlüsselproteine der Insulinsignalkaskade wurden Zelllysate der stabil HBV-replizierenden humanen Hepatoblastom-Zelllinien HepAD38 und HepG2.2.15 darüber hinaus auf die Menge des *Insulin-like-growth-factor* Rezeptors (IGF-Rezeptors) und des Insulinrezeptor-Substrats-1 (IRS-1) untersucht, die Hepatoblastom-Zelllinie HepG2 diente als Kontrolle. Die Western-Blot-Analysen der Zelllysate zeigen, dass weder die Menge des IGF-1-Rezeptors (Abbildung 5.5) noch die Menge des IRS-1 (Abbildung 5.6) in HBV-replizierenden Zellen signifikant verändert ist.



**Abbildung 5.5: HBV beeinflusst nicht die Menge des *Insulin-like-growth-factor* Rezeptors;** links Western Blot der HBV-replizierenden Zellen HepAD38 und HepG2.2.15 sowie der HBV-negativen Zelllinie HepG2, es wurden Anti-IGF-1 R $\beta$  und Anti-LHBs (MA18/7) verwendet,  $\beta$ -Actin diente als Ladekontrolle; **rechts** Mittelwerte der Proteinmengen aus drei unabhängigen Experimenten (n=3) inklusive Standardabweichung (SD, standard deviation),  $p \leq 0,05$ .



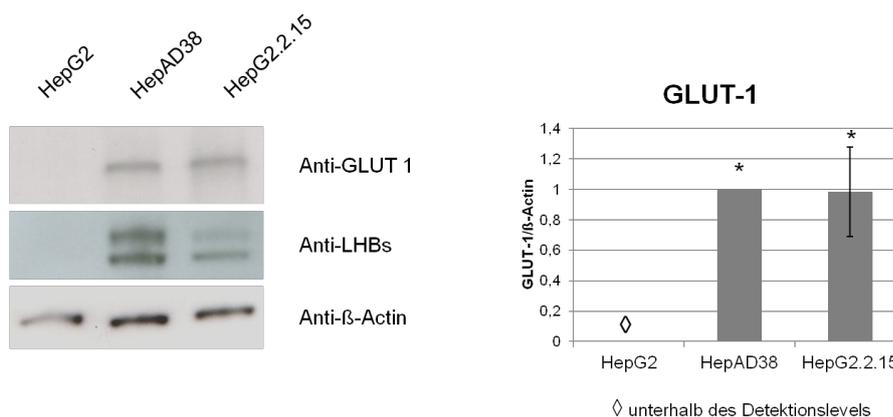
**Abbildung 5.6: HBV beeinflusst nicht die Menge des Insulinrezeptor-Substrats-1;** links Western Blot der HBV-replizierenden Zellen HepAD38 und HepG2.2.15 sowie der HBV-negativen Zelllinie HepG2, es wurden Anti-IRS-1- und Anti-LHBs- (MA18/7) spezifische Antikörper verwendet, Anti- $\beta$ -Actin diente als Ladekontrolle; **rechts** Mittelwerte der Proteinmengen aus drei unabhängigen Experimenten (n=3) inklusive Standardabweichung (SD, standard deviation),  $p \leq 0,05$ .

### 5.1.3 Vermehrte Expression des Glukose-1-Transporters (GLUT-1) in HBV-positiven Zellen

Derzeit sind 14 verschiedene Glukosetransporter identifiziert, welche aufgrund ihrer Transportcharakteristika und Sequenzhomologien in die verschiedenen Klassen I, II und III eingeteilt werden können [Karim et al., 2012, Joost and Thorens, 2001]. Der insulinunabhängige GLUT-1 gehört, neben GLUT-2 bis 4 sowie 14, zu den Klasse-I-Glukose-Transportern und wird von den meisten Zellen in geringem Maße exprimiert. Höhere Expressionen werden in Erythrozyten, Zellen der Blut-Hirn-Schranke, Neuronenmembranen, den Nierentubuli, im Auge, in der Placenta, in der Mamma und in einer Vielzahl von malignen Tumoren inklusive dem hepatozellulären Karzinom gefunden [Joost and Thorens, 2001, Kasai et al., 2009]. Da Infektionen mit dem Hepatitis-C-Virus die Expression von IRS-1 vermindert, die

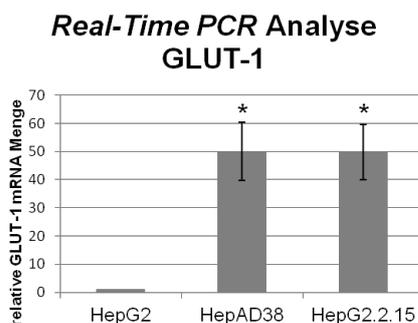
Phosphorylierung von IRS an Serin begünstigt, aber auch die Glukoseaufnahme durch *Downregulation* des GLUT-1 Transporters vermindert [Banerjee et al., 2008, Kasai et al., 2009, Paziienza et al., 2007], sollte im Folgenden auch die Relevanz des Hepatitis-B-Virus auf den Glukosestoffwechsel detaillierter charakterisiert werden.

Hierzu wurde die Menge von GLUT-1 in Zelllysaten der humanen Hepatoblastom-Zelllinie HepG2 sowie der HBV-replizierenden Zelllinien HepAD38 und HepG2.2.15 mittels Western Blot analysiert. In der Western-Blot-Analyse zeigt sich, dass in den HBV-replizierenden Zellen im Gegensatz zu den HepG2-Kontrollzellen eine vermehrte Menge an GLUT-1 vorliegt (Abbildung 5.7). Die Menge des GLUT-1 lag in allen drei Experimenten bei der Kontrollzelllinie HepG2 unterhalb des Detektionslevels.



**Abbildung 5.7: Erhöhte Menge des Glukose-1-Transporters in HBV-replizierenden Zellen; links** Western Blot der HBV-replizierenden Zellen HepAD38 und HepG2.2.15 sowie der HBV-negativen Zelllinie HepG2, es wurden Anti-GLUT-1- und Anti-LHBs- (MA18/7) spezifische Antikörper verwendet, Anti- $\beta$ -Actin diente als Ladekontrolle; **rechts** Mittelwerte der Proteinmengen aus drei unabhängigen Experimenten (n=3) inklusive Standardabweichung (SD, standard deviation), die mit einem Stern (\*) markierten Säulen zeigen einen signifikanten Unterschied im Vergleich zu der Zelllinie HepG2,  $p \leq 0,05$ .

Zusätzlich wurde RNA aus den HBV-replizierenden Zellen HepAD38 und HepG2.2.15 sowie aus der Hepatoblastom-Zelllinie HepG2 als Kontrolle isoliert. Diese wurde anschließend in cDNA transkribiert und die Menge der GLUT-1-Transkripte mittels *Real-Time PCR* quantifiziert. Hierfür wurden GLUT-1-spezifische Primer verwendet (# 375, # 376) und die Menge der GLUT-1-Transkripte auf die Menge der GAPDH-Transkripte normalisiert (# 42, # 43). Die *RT-PCR* zeigt, dass in HBV-exprimierenden Zellen eine höhere Expression des Glukose-1-Transporters vorliegt (Abbildung 5.8).

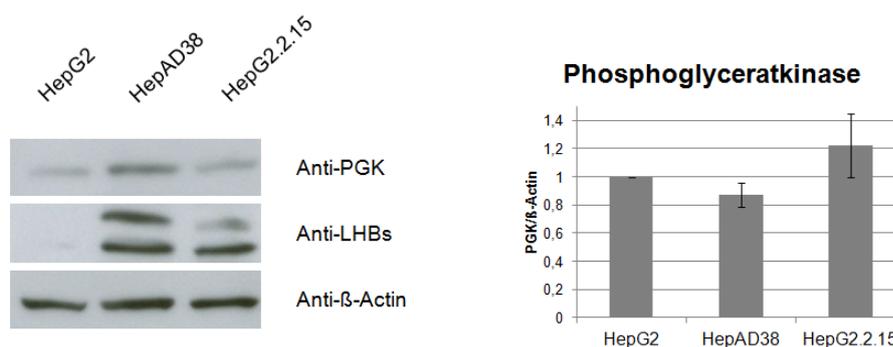


**Abbildung 5.8: Quantifizierung der GLUT-1 spezifischen mRNA durch Real-Time PCR;** die Menge der GLUT-1-spezifischen mRNA-Transkripte wurde auf die Menge der GAPDH-Transkripte bezogen, dargestellt sind die Mittelwerte der GLUT-1-mRNA-Mengen aus vier unabhängigen Experimenten ( $n=4$ ) inklusive Standardabweichung (SD, *standard deviation*), die mit einem Stern (\*) markierten Säulen zeigen einen signifikanten Unterschied im Vergleich zu der Zelllinie HepG2,  $p \leq 0,05$ .

Die Daten weisen darauf hin, dass in HBV-replizierenden Zellen im Gegensatz zu den HBV-negativen Kontrollzellen sowohl eine höhere Expression des Glukose-1-Transporters vorliegt als auch eine erhöhte Proteinmenge.

#### 5.1.4 Kein Einfluss von HBV auf die Phosphoglyceratkinase

Im Gegensatz zum Glukose-1-Transporter scheint das Hepatitis-B-Virus keinen Einfluss auf die Phosphoglyceratkinase (PGK) als wichtiges Enzym der Glykolyse zu nehmen. Zur näheren Charakterisierung wurden auch hier Zellysate der HBV-replizierenden Zelllinien HepAD38 und HepG2.2.15 sowie HepG2 als Kontrollzelllinie mittels Western Blot analysiert. Wie in Abbildung ersichtlich, liegt keine signifikant vermehrte oder verminderte Proteinmenge in den HBV-replizierenden Zelllinien vor.



**Abbildung 5.9: Kein Einfluss von HBV auf die Proteinmenge der Phosphoglyceratkinase;** links Western Blot der HBV-replizierenden Zellen HepAD38 und HepG2.2.15 sowie der negativen Zelllinie HepG2, es wurden Anti-PGK- und Anti-LHBs- (MA18/7) spezifische Antikörper verwendet,  $\beta$ -Actin diente als Ladekontrolle; rechts Mittelwerte der Proteinmengen aus drei unabhängigen Experimenten ( $n=3$ ) inklusive Standardabweichung (SD, *standard deviation*),  $p \leq 0,05$ .

## 5.2 Analyse des Einflusses von HBV auf die Insulin-/IGF-1-Signalkaskade

Neben der basalen Expression wichtiger Proteine der Insulin-Signalkaskade sollte im Anschluss auch in HBV-replizierenden Zellen und den entsprechenden Kontrollzelllinien ihre Aktivierung durch Insulin beziehungsweise eine mögliche Resistenz durch oxidativen Stress untersucht werden.

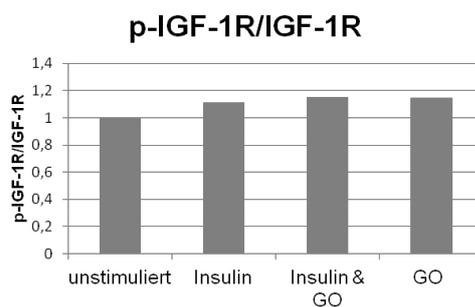
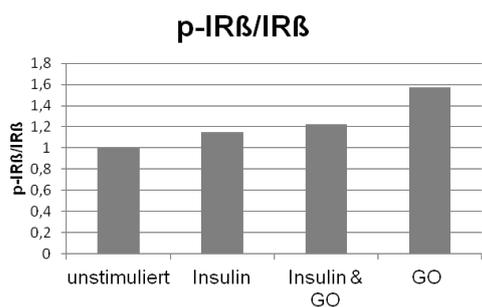
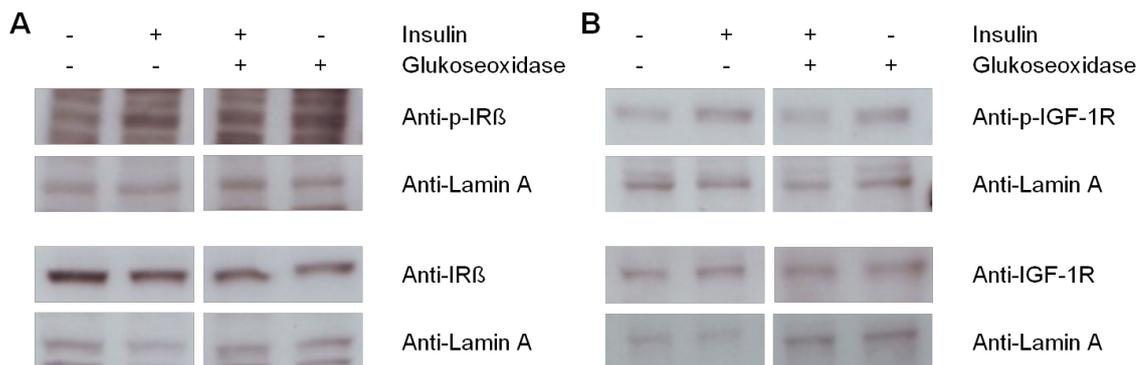
### 5.2.1 Phosphorylierung des IR- und IGF-1-Rezeptors nach Stimulation mit Insulin in HBV-replizierenden Zellen

In Experimenten mit primären Hepatozyten konnten Beyer et al. zeigen, dass ROS direkt für die Hemmung des Insulin-/IGF-1-Signalweges und somit auch für die Inhibierung des PI3K-Akt Signalweges verantwortlich ist [Beyer et al., 2008].

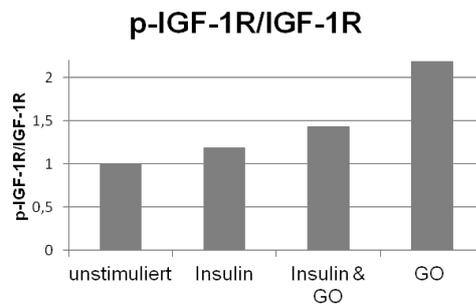
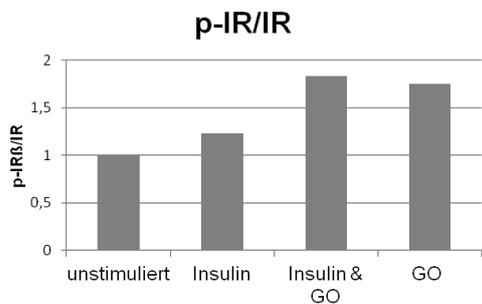
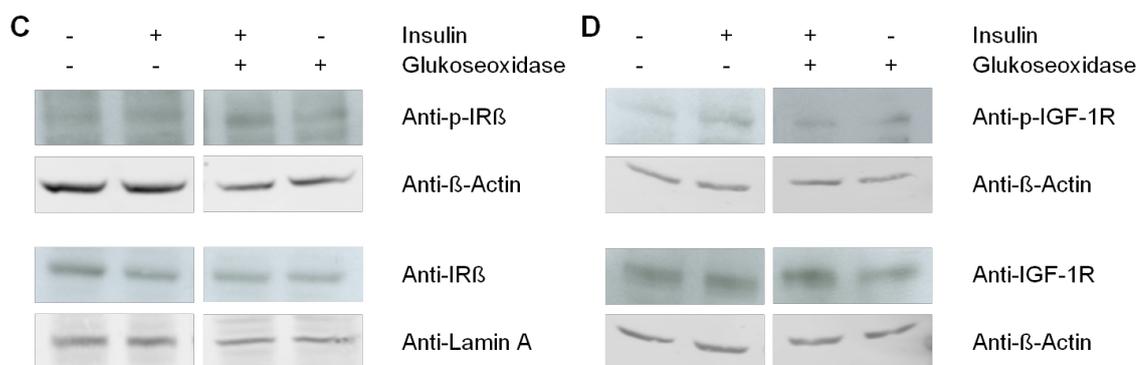
Da HBV eine Aktivierung der Nrf2-/ARE-regulierten Gene auslöst [Schaedler et al., 2010], sollte in einem exemplarischen Experiment analysiert werden, ob HBV die Insulin-/IGF-1-Signalkaskade beeinflusst.

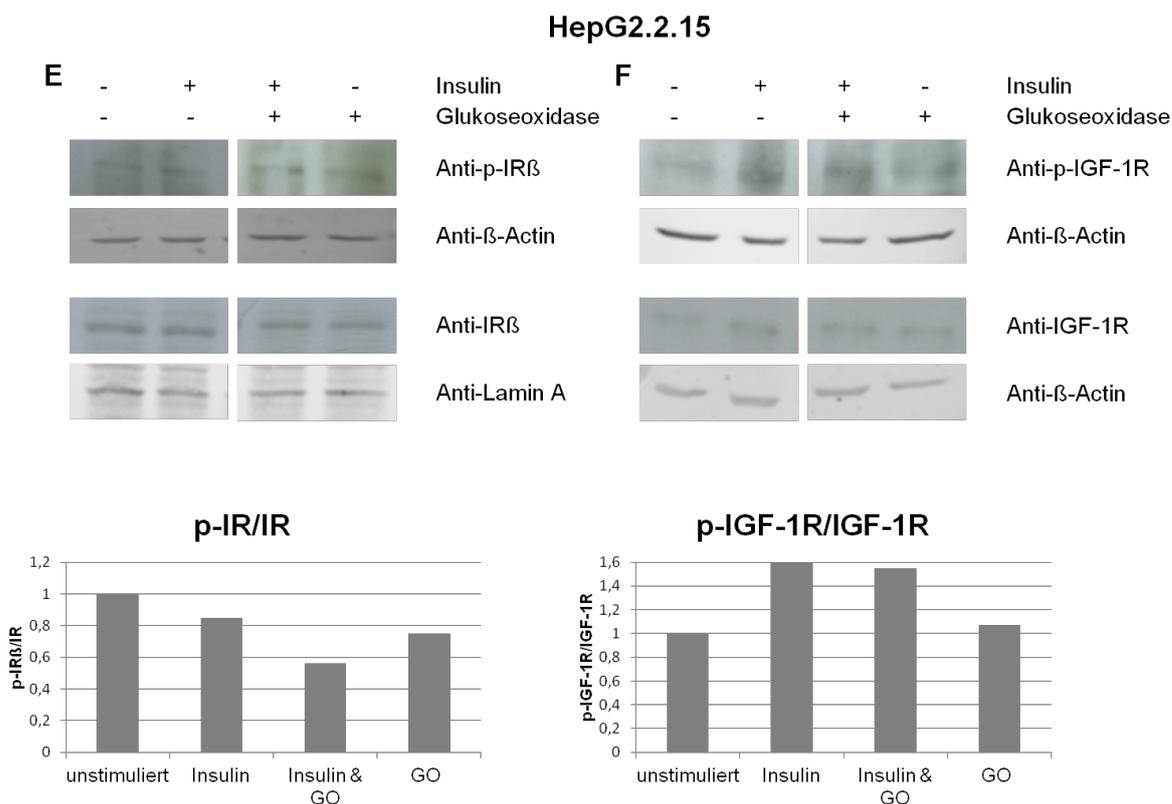
Hierzu wurden die HBV-replizierenden Zellen HepAD38 und HepG2.2.15 sowie die Kontrollzelllinie HepG2 jeweils 24 Stunden vor der Stimulation in ein Hungermedium mit 0,5 % FCS überführt, da eine Hungerung die Expression des Insulinrezeptors noch weiter verstärkt [Puig and Tjian, 2005] und erst anschließend 220 Minuten mit Glukoseoxidase (GO) und danach für 20 Minuten mit Insulin stimuliert. Wie aus Abbildung 5.10 ersichtlich wird, werden sowohl der Insulin- als auch der IGF-1-Rezeptor nach Stimulation mit Insulin in HepG2 und HepAD38 aktiviert, bei den HepG2.2.15 nur der IGF-1-Rezeptor. Die HepAD38 zeigen zudem eine deutlich stärkere Aktivierung bei Stimulation mit Insulin und Glukoseoxidase als nur bei Insulin. Darüber hinaus ist in den HepG2 und HepAD38 eine deutliche Aktivierung im Vergleich zu den unstimulierten Zellen der IGF-1R- und IR-Rezeptoren durch Stimulation mit Glukoseoxidase zu erkennen. Es erfolgte ebenfalls eine Stimulation mit Wasserstoffperoxid. Die Ergebnisse zeigen die gleiche Tendenz wie bei der Stimulation mit Glukoseoxidase, sind jedoch nicht derart ausgeprägt (Daten nicht gezeigt).

### HepG2



### HepAD38

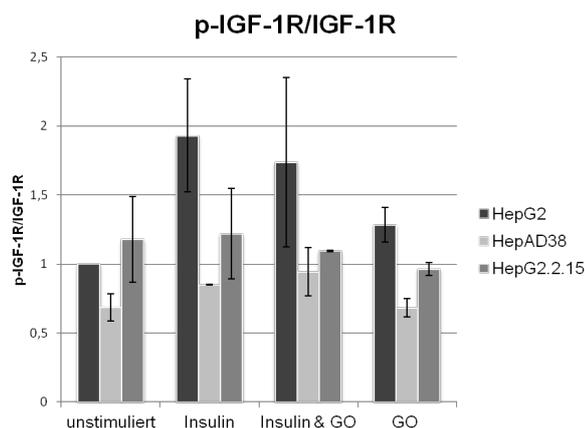




**Abbildung 5.10: Aktivierung des IR- und IGF-1-Rezeptors nach Stimulation mit Insulin in HBV-replizierenden Zellen;** Western-Blot-Analysen der Kontrollzelllinie HepG2 (A und B) sowie der HBV-replizierenden Zellen HepAD38 (C und D) und HepG2.2.15 (E und F); die Zellen wurden jeweils 24 Stunden vor der Stimulation in ein Hungermedium überführt und anschließend erst 220 Minuten mit Glukoseoxidase und danach für 20 Minuten mit Insulin stimuliert; die Zellen wurden lysiert und die Proteinlysate im Western Blot analysiert, hierfür wurden Anti-p-Insulin R $\beta$ -, Anti-Insulin R $\beta$ -, Anti-p-IGF-1R- und Anti-IGF-1R-spezifische Antikörper verwendet, Anti- $\beta$ -Actin und Anti-Lamin A diente als Ladekontrolle; die Graphen zeigen die Menge der phosphorylierten Rezeptoren im Bezug zu ihrer jeweiligen nicht aktivierten Gesamtmenge aus einem exemplarischen Experimenten (n=1)

In weiteren analog durchgeführten Experimenten wurden die Lysate mittels p-IR-, IR-, p-IGF-1R- und IGF-1R-ELISA ausgewertet. Auch hier zeigen sich ähnliche Ergebnisse wie im Western Blot. Die Stimulation mit Insulin bewirkt in HepG2 und HepGAD38 Zellen einen deutlichen Anstieg des p-IGF-1R und p-IR (Daten nicht gezeigt). Auch in den Zellen, welche nur mit Glukoseoxidase stimuliert wurden, liegt eine deutliche Aktivierung des IGF-1R und IR vor (Daten nicht gezeigt). Das Experiment wurde im Duplikat durchgeführt und zeigt gleiche Tendenzen (Abbildung 5.11). Da die ELISA-Ergebnisse für den unphosphorylierten IR-Rezeptor fraglich sind, wurden nur die Daten des p-IR verwendet (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass auf Ebene der Rezeptoren sowohl in HBV-negativen wie auch in HBV-positiven Zellen der Insulin-/IGF-1-Signalweg physiologisch aktiviert wird. Darüber hinaus scheint in den HBV-positiven Zellen die Aktivierung der Rezeptoren durch gleichzeitige Stimulation mit Insulin und Glukoseoxidase noch stärker zu sein, was auf einen erhöhten Schutz vor oxidativem Stress hindeutet.

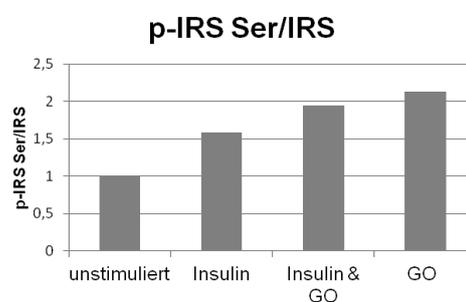
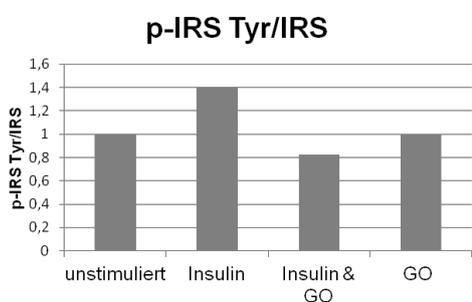
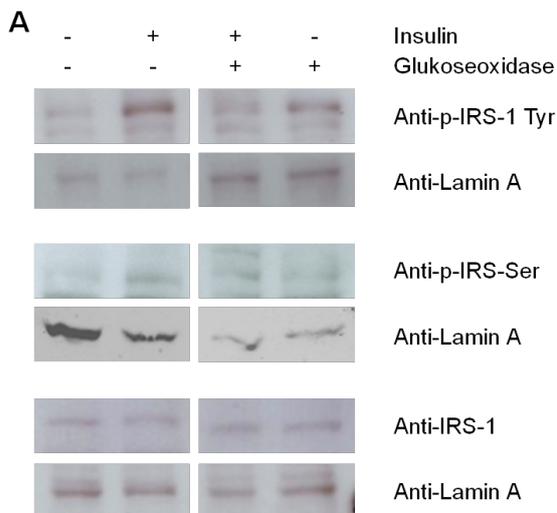


**Abbildung 5.11: Phosphorylierung des IGF-1-Rezeptors in HBV-positiven Zellen nach Insulinstimulation;** Darstellung der ELISA-Ergebnisse der Kontrollzelllinie HepG2 sowie der HBV-replizierenden Zellen HepAD38 und HepG2.2.15; 24 Stunden vor der Stimulation wurden die Zellen in ein Hungermedium überführt und anschließend erst 220 Minuten mit Glukoseoxidase und danach für 20 Minuten mit Insulin stimuliert; anschließend wurden die Zellen lysiert und mittels p-IGF-1R- und IGF-1R-ELISA ausgewertet, dargestellt ist die Absorption normalisiert auf die jeweilige Proteinmenge aus zwei unabhängigen Experimenten ( $n=2$ ), inklusive Standardabweichung (SD, standard deviation),  $p \leq 0,05$ .

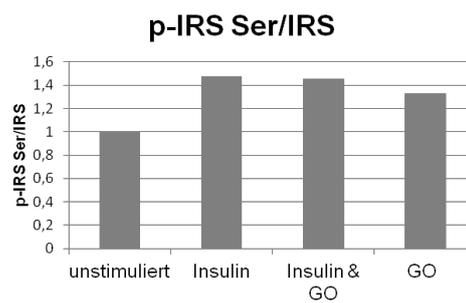
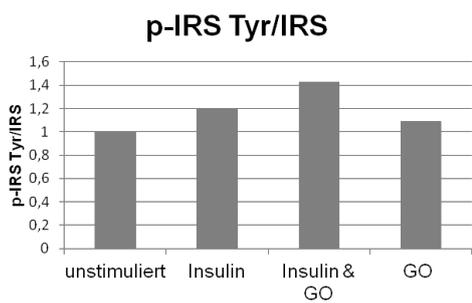
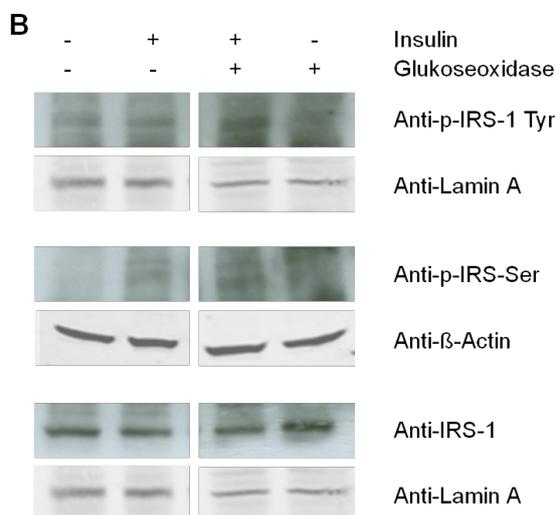
### 5.2.2 Vermehrte Aktivierung des IRS-1-Tyrosin in HBV-positiven Zellen bei gleichzeitiger Stimulation mit Insulin und Glukoseoxidase

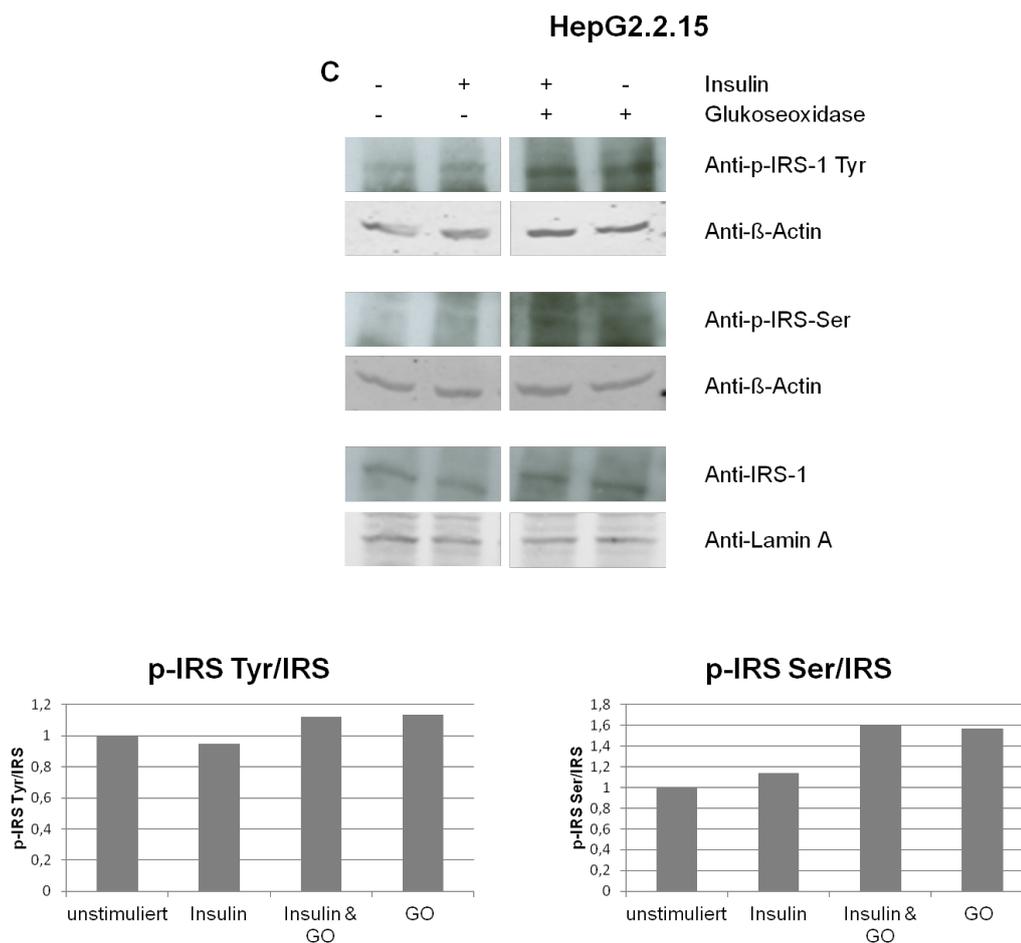
Eine normale Phosphorylierung des Insulin-Rezeptors bei verminderter PI3K-Aktivität konnte auch in Experimenten mit primären Hepatozyten von Nrf2-knockout Mäusen nachgewiesen werden. Die Inhibierung des Insulin-/IGF-1-Signalweges durch oxidativem Stress scheint folglich direkt durch die Aktivierung von Kinasen ausgelöst zu werden, welche IRS an Serin-/Threonin-Resten phosphorylieren [Beyer et al., 2008, Zick, 2005]. Dieselben Lysate aus 5.2.1 wurden deshalb ebenfalls bezüglich der Phosphorylierung des Insulin-Rezeptor-Substrates untersucht. Wie die Western-Blot-Analysen in Abbildung 5.12 zeigen, erfolgt nach Stimulation mit Insulin in HepG2 sowohl eine Aktivierung des IRS an Tyrosin wie auch an Serin. Bei gleichzeitiger Stimulation mit Glukoseoxidase ist die Phosphorylierung an IRS-Serin deutlich erhöht, jedoch auch bei alleiniger Stimulation mit Glukoseoxidase. In den HBV-positiven Zellen HepAD38 kann durch Stimulation mit Insulin ebenfalls eine erhöhte Menge an p-IRS-Tyr nachgewiesen werden, diese ist aber im Gegensatz zu den HepG2 auch bei gleichzeitiger Stimulation mit Glukoseoxidase und Insulin erhöht. Die Phosphorylierung an Serin sowohl bei den HepAD38 als auch den HepG2.2.15 bei den Glukoseoxidase-behandelten ist hingegen im Vergleich zu den HBV-negativen Zellen geringer. Die Aktivierung des p-IRS-Tyr bei den HepG2.2.15 ist bei allen Stimulationen hingegen sehr gering. Auch die durchgeführten ELISAs zur Bestimmung der Phosphorylierung des Insulin-Rezeptor-Substrates an Serin und Tyrosin weisen ähnliche Ergebnisse wie im Western Blot auf. Das Experiment wurde ebenfalls im Duplikat durchgeführt und zeigt gleiche Tendenzen (Abbildung 5.13).

### HepG2

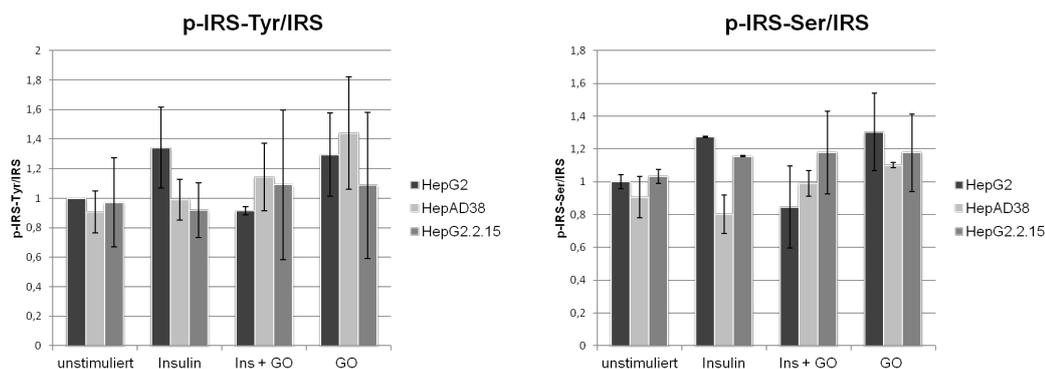


### HepAD38





**Abbildung 5.12: Aktivierung des IRS nach Stimulation mit Insulin in HBV-replizierenden Zellen;** Western-Blot-Analysen der Kontrollzelllinie HepG2 (A) sowie der HBV-replizierenden Zellen HepAD38 (B) und HepG2.2.15 (C); die Zellen wurden jeweils 24 Stunden vor der Stimulation in ein Hungermedium überführt und anschließend erst 220 Minuten mit Glukoseoxidase und danach für 20 Minuten mit Insulin stimuliert; die Zellen wurden lysiert und die Proteinlysate im Western Blot analysiert, hierfür wurden Anti-IRS-1-, Anti-p-IRS-1 (Ser)- und Anti-p-IRS-1 (Tyr)- spezifische Antikörper verwendet, Anti-β-Actin und Anti-Lamin A diente als Ladekontrolle; die Graphen zeigen die Menge des phosphorylierten IRS in Bezug zu dessen jeweiliger nicht aktivierten Gesamtmenge aus einem exemplarischen Experimenten (n=1)

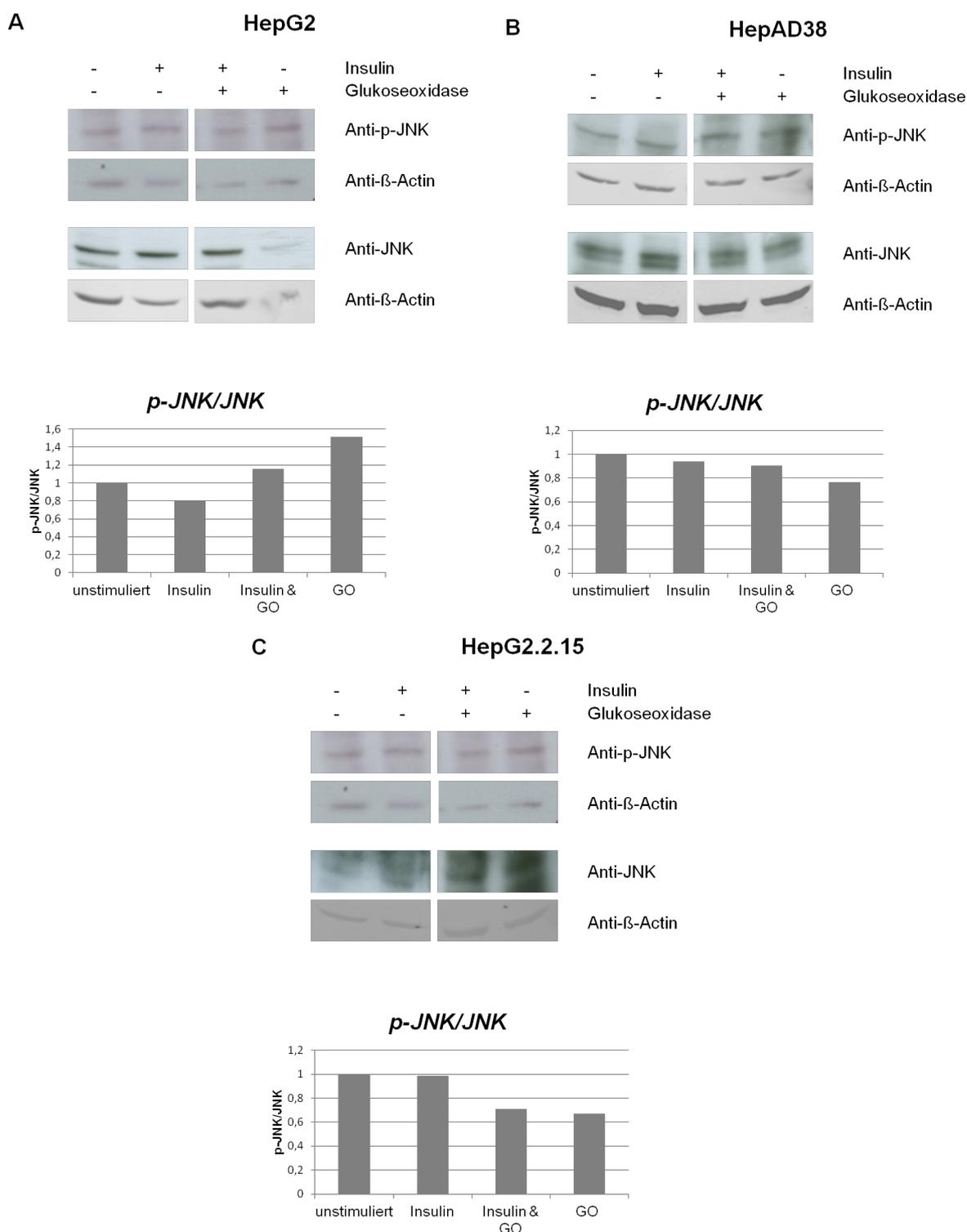


**Abbildung 5.13: Phosphorylierung des Insulin-Rezeptorsubstrates in HBV-positiven Zellen nach Insulinstimulation;** Darstellung der ELISA-Ergebnisse der Kontrollzelllinie HepG2 sowie der HBV-replizierenden Zellen HepAD38 und HepG2.2.15; 24 Stunden vor der Stimulation wurden die Zellen in ein Hungermedium überführt und anschließend erst 220 Minuten mit Glukoseoxidase und danach für 20 Minuten mit Insulin stimuliert; anschließend wurden die Zellen lysiert und mittels p-IRS-Tyr-, p-IRS-Ser- und IRS-ELISA ausgewertet, dargestellt ist die Absorption normalisiert auf die jeweilige Proteinmenge, aus zwei unabhängigen Experimenten ( $n=2$ ), inklusive Standardabweichung (SD, standard deviation),  $p \leq 0,05$ .

Abschließend zeigen die Daten, dass bei Stimulation mit Glukoseoxidase bei den HBV-positiven Zellen im Gegensatz zu den HBV-negativen Zellen eine vermehrte Aktivierung des p-IRS-Tyr vorliegt, wohingegen die Aktivierung an Serin geringer zu sein scheint. Dies spricht für einen besseren Schutz der HBV-positiven Zellen gegenüber ROS.

### 5.2.3 Keine Phosphorylierung der *c-jun N-terminal Kinase* durch Stimulation mit Glukoseoxidase in HBV-positiven Zellen

Eine der inhibitorisch auf IRS wirkenden Kinasen ist die *c-jun N-terminal Kinase* JNK, welche durch oxidativen Stress aktiviert wird [Beyer and Werner, 2008, Hirosumi et al., 2002]. Beyer et al. konnten bei Versuchen mit Lebern von Nrf2-knock-out-Mäusen zeigen, dass eine erhöhte und verlängerte Aktivierung der JNK vorlag [Beyer et al., 2008]. Deshalb sollte als nächstes untersucht werden, ob die Aktivität der JNK durch oxidativen Stress auch in HBV-positiven Zellen verändert ist. Wie aus Abbildung 5.14 ersichtlich wird, nimmt das Verhältnis von aktivierter zur gesamten JNK in HepG2 bei Stimulation mit Insulin deutlich ab, während es in HBV-positiven Zellen nur sehr wenig bis gar nicht abnimmt. Bei Erzeugung von oxidativem Stress mittels Glukoseoxidase wird die Aktivität der JNK hingegen in den HBV-replizierenden Zellen reduziert, während ihre Aktivität in der Kontrollzelllinie HepG2 zunimmt. Diese Daten zeigen, dass die HBV-replizierenden Zellen gegenüber oxidativem Stress widerstandsfähiger sind und es somit nicht zu einer vermehrten Aktivierung der JNK kommt.



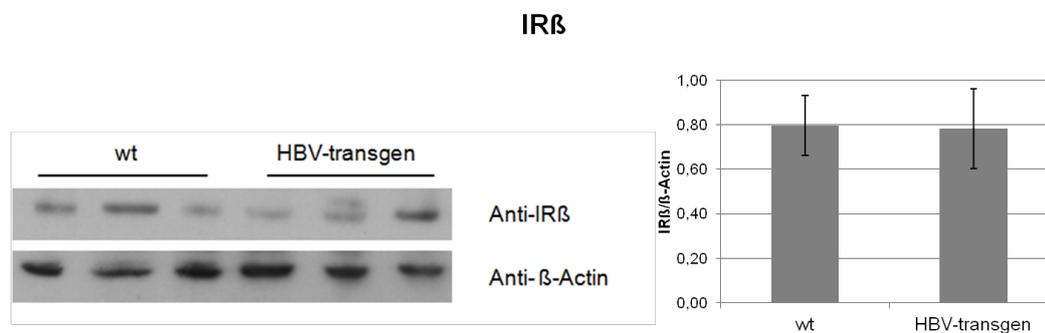
**Abbildung 5.14: Keine Aktivierung von JNK durch Stimulation mit Glukoseoxidase in HBV-positiven Zellen;** Western-Blot-Analysen der negativen Zelllinie HepG2 (A) und den HBV-positiven Zellen HepAD38 (B) und HepG2.2.15 (C); 24 Stunden vor Stimulation wurden die Zellen in ein Hungermedium überführt und danach 220 Minuten mit Glukoseoxidase und anschließend für 20 Minuten mit Insulin stimuliert; die Proteinlysate wurden mittels Western Blot analysiert, dafür wurden Anti-p-JNK- und Anti-JNK-spezifische Antikörper verwendet, β-Actin diente als Ladekontrolle; die Graphen zeigen die Menge der aktivierten Kinase in Bezug zu ihrer jeweiligen nicht aktivierten Gesamtmenge aus einem exemplarischen Experimenten (n=1)

### 5.3 Charakterisierung HBV-transgener Mäuse

Durch Versuche mit HBV-transgenen Mäusen beziehungsweise der entsprechenden HBV-negativen Kontrolltiere sollten die HBV-transgenen Mäusen hinsichtlich des Einflusses auf den Insulin-Signalweg charakterisiert und der Effekt von HBV auf die Leberregeneration *in vivo* analysiert werden.

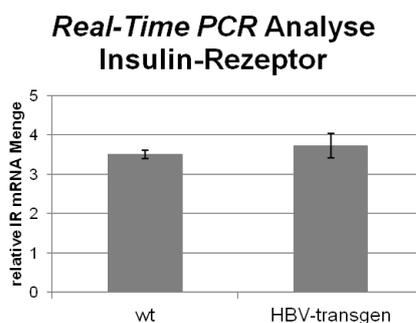
#### 5.3.1 Erhöhte Menge des Insulin-Rezeptors in HBV-transgenen Mäusen

Nachdem in *in vitro*-Versuchen gezeigt werden konnte, dass in HBV-positiven Zellen mehr Insulin-Rezeptor vorhanden ist, sollte die Expression des Insulin-Rezeptors auch *in vivo* detaillierter untersucht werden. Hierzu wurden aus den Lebern HBV-transgener Mäuse sowie den C57BL/6-Kontrollmäusen Zelllysate hergestellt und diese mittels Western Blot ausgewertet. Im Western Blot stellt sich die Proteinmenge des Insulin-Rezeptors nicht als signifikant erhöht dar, wie Abbildung 5.15 zeigt.



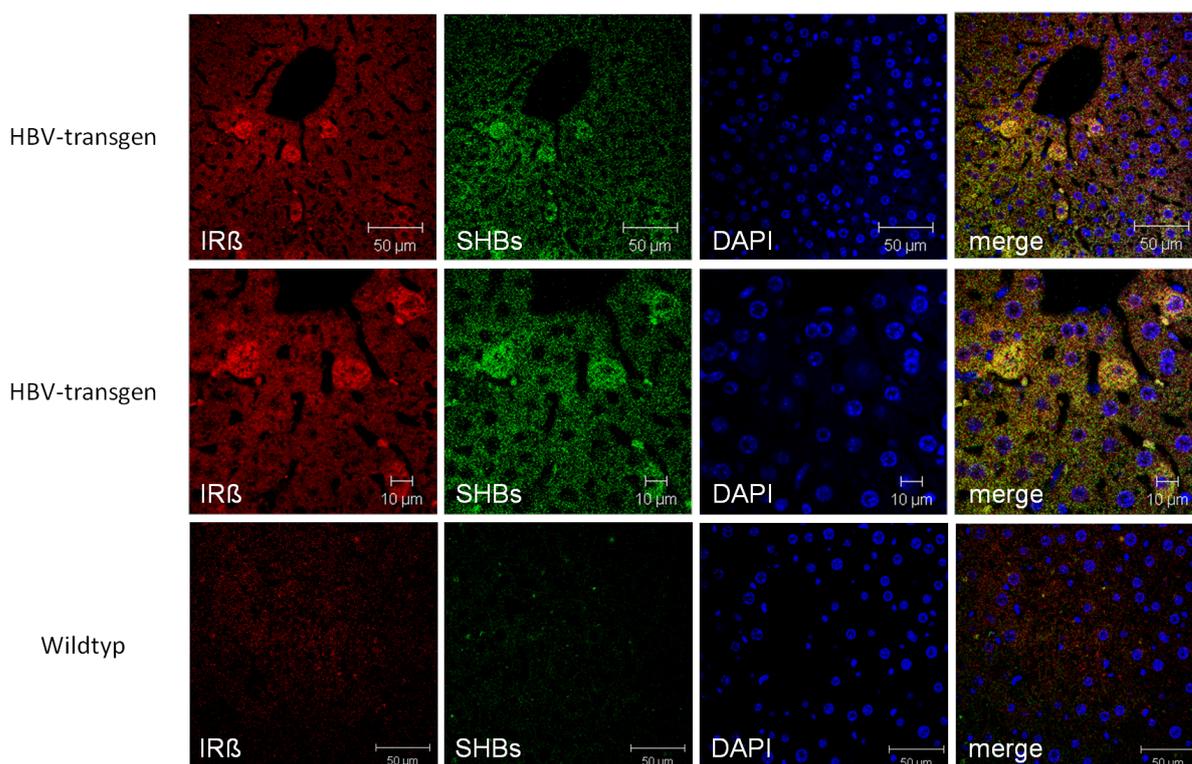
**Abbildung 5.15: Keine erhöhte Proteinmenge des Insulin-Rezeptors in HBV-transgenen Mäusen gegenüber den C57BL/6-Kontrollmäusen; links** Western Blot der HBV-transgenen Mäuse (n=3) und der C57BL/6-Kontrollmäuse (n=3), es wurde Anti-Insulin R $\beta$  verwendet,  $\beta$ -Actin diente als Ladekontrolle; **rechts** Mittelwerte der Proteinmengen von drei wt- (n=3) und drei HBV-transgenen Mäusen (n=3) inklusive Standardabweichung (SD, standard deviation),  $p \leq 0,05$ .

Darüber hinaus wurden aus den gleichen Lebern der HBV-transgenen Mäuse und der Kontrolltiere RNA isoliert und nach reverser Transkription die Menge der Insulin-Rezeptor-Transkripte (# 401, # 402) mit Hilfe der *Real-Time PCR* quantifiziert (Abbildung 5.16). Die Menge der IR-Transkripte wurde auf die Menge der GAPDH-Transkripte normalisiert und zeigt ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen HBV-transgenen und wt-Mäusen.



**Abbildung 5.16: Relative mRNA-Mengen des Insulin-Rezeptors in HBV-transgenen- und C57BL/6-Kontrollmäusen;** Mittelwerte der relativen mRNA-IR-Mengen auf die Menge der GAPDH-Transkripte normalisiert zeigen keinen signifikanten Unterschied zwischen HBV-transgenen (n=3) und C57BL/6-Kontrollmäusen (n=3), inklusive Standardabweichung (SD, standard deviation)  $p \leq 0,05$ .

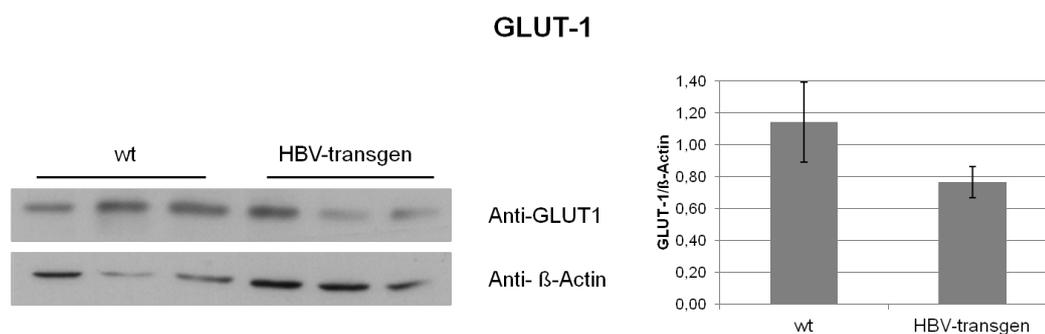
Zur weiteren Charakterisierung der Menge des Insulin-Rezeptors in Hepatozyten HBV-transgener Mäuse wurden anschließend aus formalinfixierten Anteilen der gleichen Lebern Leberschnitte angefertigt und diese mittels indirekter Immunhistochemie analysiert. In den HBV-replizierenden Hepatozyten der HBV-transgenen Tiere liegt hierbei gleichermaßen eine erhöhte Proteinmenge des Insulin-Rezeptors vor.



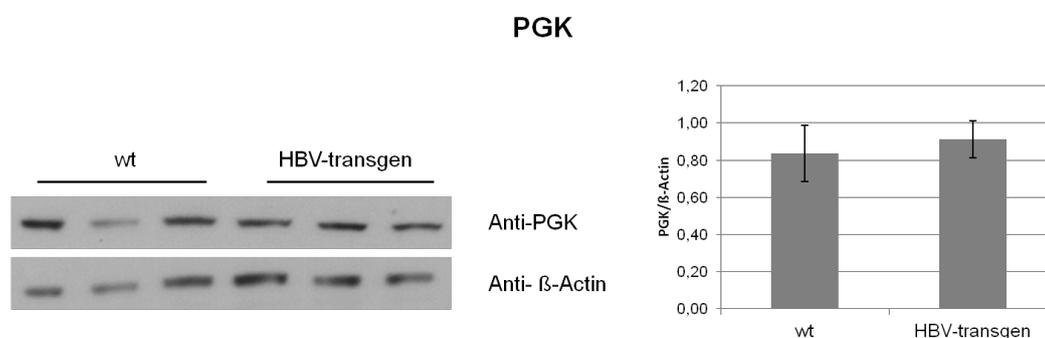
**Abbildung 5.17: Erhöhte Menge des Insulin-Rezeptors in HBV-replizierenden Hepatozyten HBV-transgener Mäuse;** sowie Darstellung einer Leber einer C57BL/6-Kontrollmaus, verwendet wurde Anti-SHBs und Anti-IR $\beta$ , die Kerne wurden mit DAPI gefärbt.

### 5.3.2 Keine veränderte Expression von GLUT-1 und PGK in HBV-transgenen Mäusen

Um die Relevanz des Hepatitis-B-Virus auf den Glukosestoffwechsel auch *in vivo* zu charakterisieren, wurde in Leberlysaten HBV-transgener Mäuse sowie den C57BL/6-Kontrolltieren sowohl die Menge des Glukose-1-Transporters (GLUT-1) als auch die Menge der Phosphoglyceratkinase (PGK) bestimmt. Wie die Western-Blot-Analysen in Abbildungen 5.18 und 5.19 zeigen, sind weder die Proteinmenge des GLUT-1 noch die der PGK in HBV-transgenen Mäusen in Vergleich zu wt-Mäusen verändert.



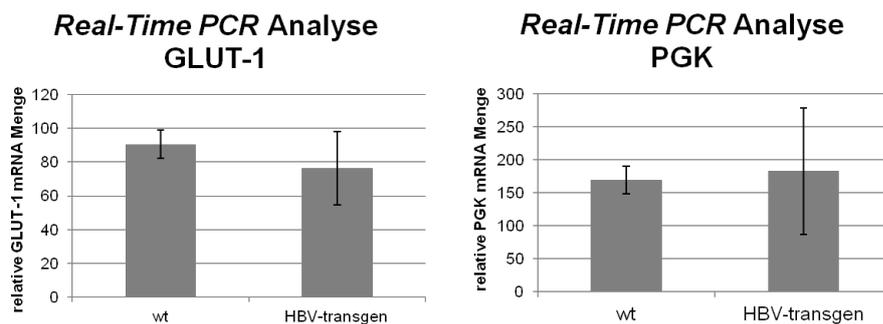
**Abbildung 5.18: Keine erhöhte Proteinmenge des Glukose Transporters-1 in HBV-transgenen Mäusen gegenüber C57BL/6-Kontrollmäusen; links** Western Blot von drei HBV-transgenen Mäuse sowie drei Kontrollmäusen, es wurde Anti-GLUT-1-spezifische Antikörper verwendet, Anti-β-Actin diente als Ladekontrolle; **rechts** Mittelwerte der Proteinmengen von drei wt- (n=3) und drei HBV-transgenen Mäusen (n=3) ohne signifikanten Unterschied, inklusive Standardabweichung (SD, standard deviation),  $p \leq 0,05$ .



**Abbildung 5.19: Keine erhöhte Proteinmenge der Phosphoglyceratkinase in HBV-transgenen Mäusen gegenüber C57BL/6-Kontrollmäusen; links** Western Blot von drei HBV-transgenen Mäuse sowie drei Kontrollmäusen, es wurden Anti-PGK-spezifische Antikörper verwendet, Anti-β-Actin diente als Ladekontrolle; **rechts** Mittelwerte der Proteinmengen von drei wt- (n=3) und drei HBV-transgenen Mäusen (n=3) zeigen keinen signifikanten Unterschied, inklusive Standardabweichung (SD, standard deviation),  $p \leq 0,05$ .

Zusätzlich wurde RNA aus den HBV-transgenen Lebern und den Kontrolllebern isoliert und diese mittels *Real-Time PCR* unter Verwendung von GLUT-1- (# 391, # 392) und PGK- (# 393, # 394) spezifischer Primer quantifiziert. Die Menge der GLUT-1- und PGK-Transkripte wurde auf die Menge der GAPDH-Transkripte normalisiert (# 42, # 43). Auch in der *Real-Time PCR* konnte kein

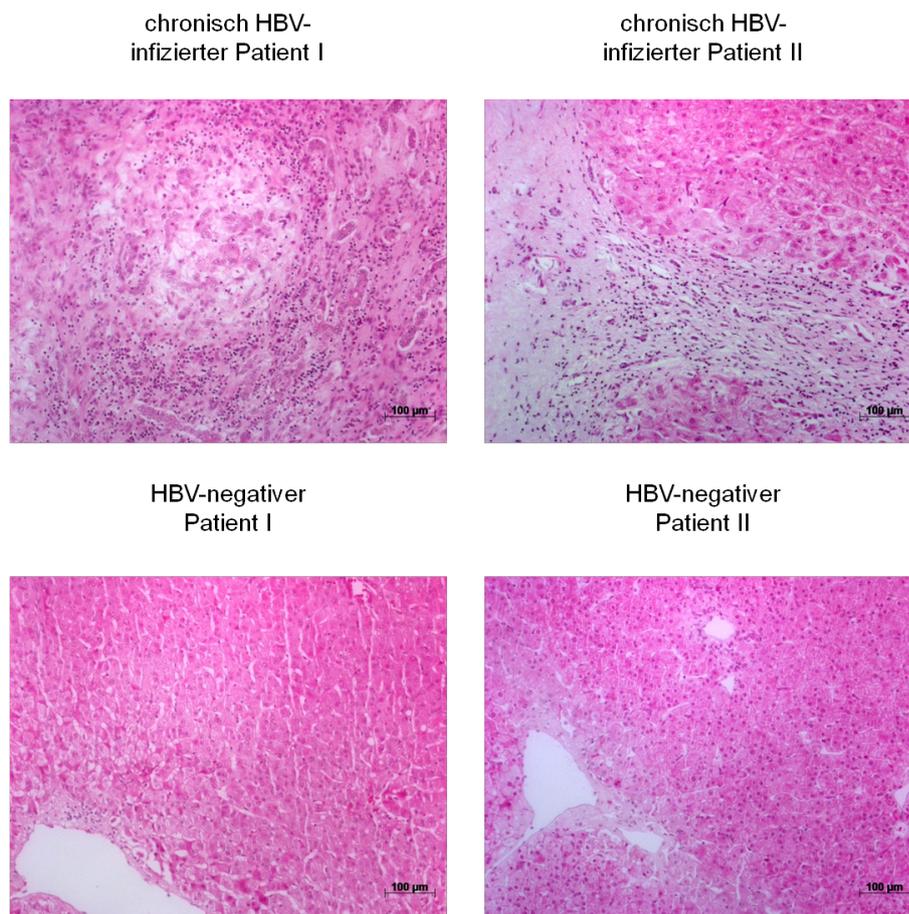
signifikanter Unterschied zwischen der Menge der GLUT-1- und PGK-Transkripte in HBV-transgenen Mäuse gegenüber den Kontrolltieren beobachtet werden.



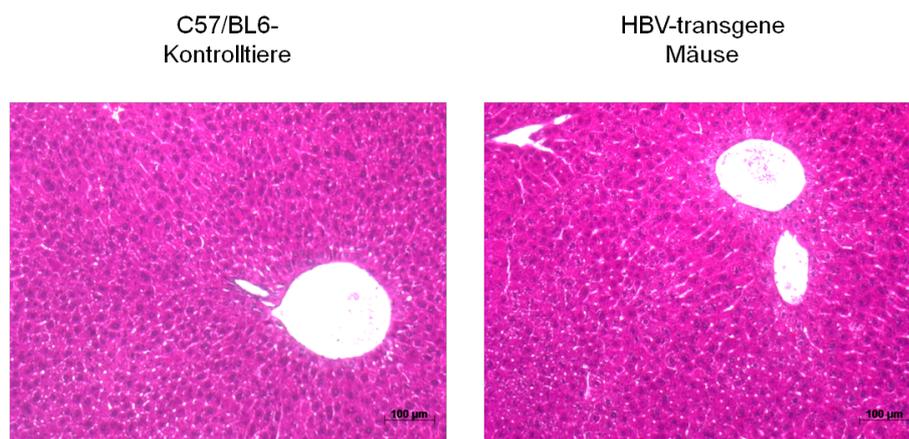
**Abbildung 5.20: Relative mRNA-Mengen des Glukose-1-Transporters und der Phosphoglyceratkinase in HBV-transgenen- und wt-Mäusen; links** relative mRNA-GLUT-1-Menge auf die Menge der GAPDH-Transkripte normalisiert von drei wt- (n=3) und drei HBV-transgenen Mäusen (n=3) zeigen keinen signifikanten Unterschied, inklusive Standardabweichung (SD, standard deviation),  $p \leq 0,05$ . **rechts** relative mRNA-PGK-Menge auf die Menge der GAPDH-Transkripte normalisiert von drei wt- (n=3) und drei HBV-transgenen Mäusen (n=3) ohne signifikanten Unterschied, inklusive Standardabweichung (SD, standard deviation),  $p \leq 0,05$ .

### 5.3.3 Keine histologischen Veränderungen in Lebern von HBV-transgenen Mäusen

Zur weiteren Charakterisierung HBV-transgener Mäuse wurden Lebern von sechs C57BL/6-Kontrolltieren sowie von sechs HBV-transgenen Mäusen histologisch untersucht. Die Lebern wurden post mortem in Formaldehyd fixiert, wie in Kapitel 4.6.7 beschrieben aufbereitet und die Leberschnitte analysiert. Wie aus Abbildung 5.21 ersichtlich, zeigen die Lebern der HBV-transgenen Tiere wie auch der Kontrolltiere eine erhaltene Leberarchitektur. Es sind weder entzündliche Infiltrate noch eine vermehrte Kollagenisierung diagnostizierbar. Vergleichend dazu zeigt Abbildung 5.22 die Leberbiopsien zweier chronisch HBV-infizierter Patienten, welche eine starke Fibrose mit massiven mononukleären Infiltraten und somit eine deutlich veränderte Leberarchitektur zeigen. Hieraus wird ersichtlich, dass die Lebern von HBV-transgenen Mäusen keine histologischen Veränderungen aufweisen, wie bereits bei Guidotti et al. [1995] beschrieben.



**Abbildung 5.22: HE-Färbungen der Leberbiopsien zweier chronisch HBV-infizierter Patienten sowie zwei nicht HBV-infizierter Patienten;** in der Leberbiopsie der chronisch HBV-infizierten Patienten kann eine vermehrte Fibrose mit starker mononukleärer Infiltration befundet werden, die Leberarchitektur stellt sich verglichen zu den nicht HBV-infizierten Patienten deutlich verändert dar.



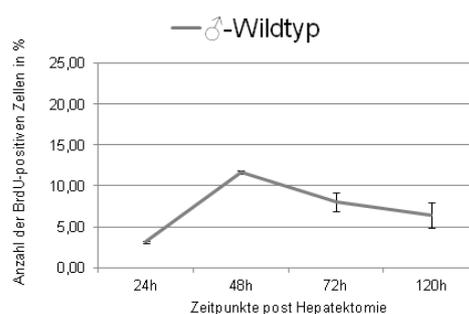
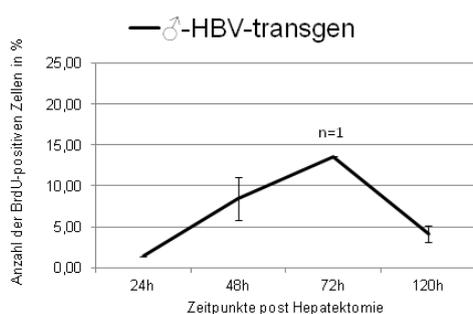
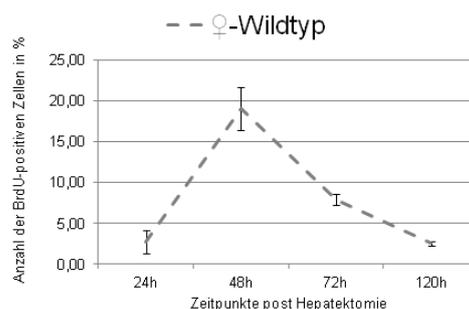
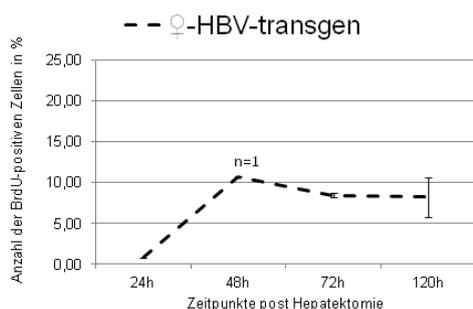
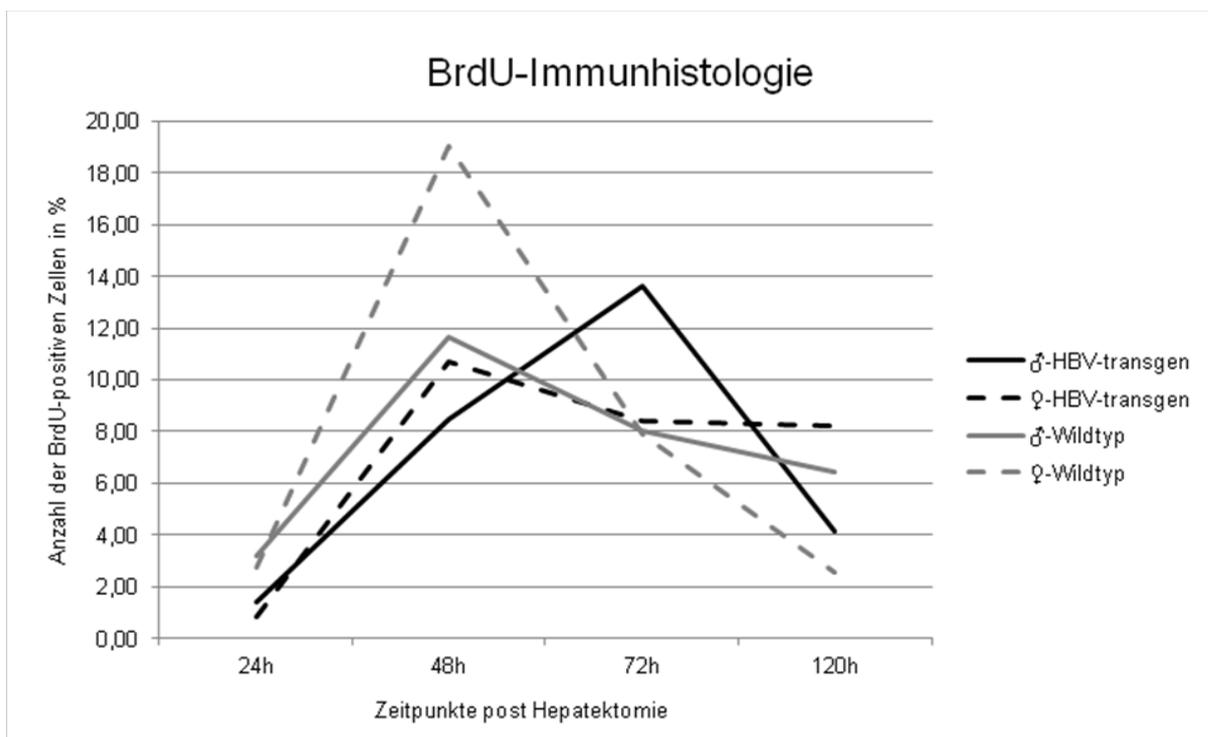
**Abbildung 5.21: HE-Färbung der Lebern von HBV-transgenen Mäusen sowie entsprechender Wildtypmäuse;** die Leberschnitte zeigen sowohl bei HBV-transgenen als auch bei den Kontrolltieren eine erhaltene Leberarchitektur, es sind weder Kollagenisierung noch entzündliche Infiltrate vorhanden.

### 5.3.4 Verminderte Leberregeneration in HBV-transgenen Mäusen nach partieller Hepatektomie

Die partielle Hepatektomie (PH) induziert eine starke Leberregeneration im verbleibenden Leberparenchym und wurde im Zuge dieser Arbeit genutzt, um die Leberregeneration von HBV-transgenen Mäusen mit der von Wildtyp-Mäusen zu vergleichen. Wie in Kapitel 4.6.3 beschrieben, wurden die HBV-transgenen und die C57BL/6-Mäuse als Kontrollgruppe hepatektomiert und 24, 48, 72 und 120 h post op getötet. Eine Stunde vor Tötung wurde das Thymidin-Analogon BrdU intraperitoneal appliziert. Die entnommenen Lebern wurden wie in Kapitel 4.6.7.3 beschrieben aufbereitet und anschließend mittels indirekter Immunhistochemie analysiert. Es wurden jeweils 120 Zellkerne ausgezählt und der Anteil BrdU-positiver Kerne bestimmt.

Wie aus Abbildung 5.23 ersichtlich, ist die höchste Proliferationsrate der Hepatozyten nach partieller Hepatektomie bei den weiblichen Tieren nach 48h erreicht. Bei den männlich HBV-transgenen Mäuse ist die stärkste Proliferationsrate hingegen erst nach 72 h erreicht. Bei allen Tieren sinkt die Anzahl proliferierender Hepatozyten innerhalb von 120 h wieder ab, wobei bei den C57BL/6-Kontrolltieren nach 120 h die geringste Proliferation beobachtet werden kann. Die Proliferation bei den HBV-transgenen Tieren nimmt nicht so schnell ab und liegt nach 120 h noch deutlich über der der Kontrolltiere. Bei Vergleichen zwischen den weiblichen HBV-transgenen Tieren und den wt-Mäusen untereinander fällt zudem auf, dass die Anzahl der BrdU-positiven Zellen bei weiblichen HBV-transgenen Mäusen nach 48 h deutlich reduziert ist.

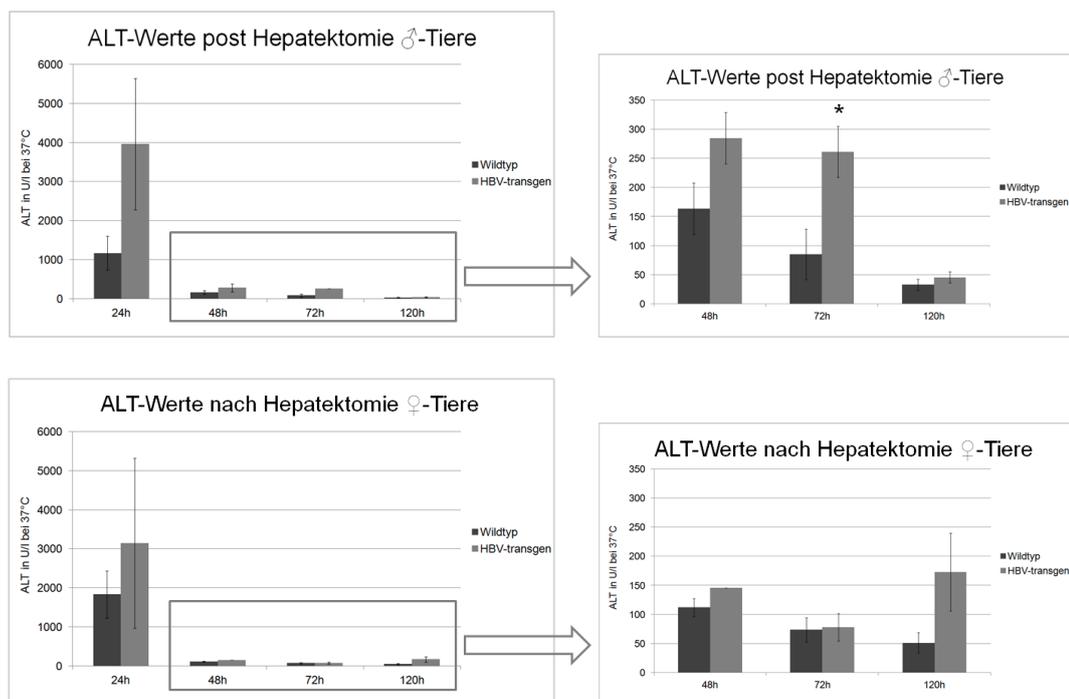
Zusammenfassend zeigen die Vergleiche der Proliferationsraten nach partieller Hepatektomie, dass bei HBV-transgenen Mäusen im Gegensatz zu den Wildtyp-Mäusen die Leberregeneration sowohl vermindert als auch verzögert abläuft.



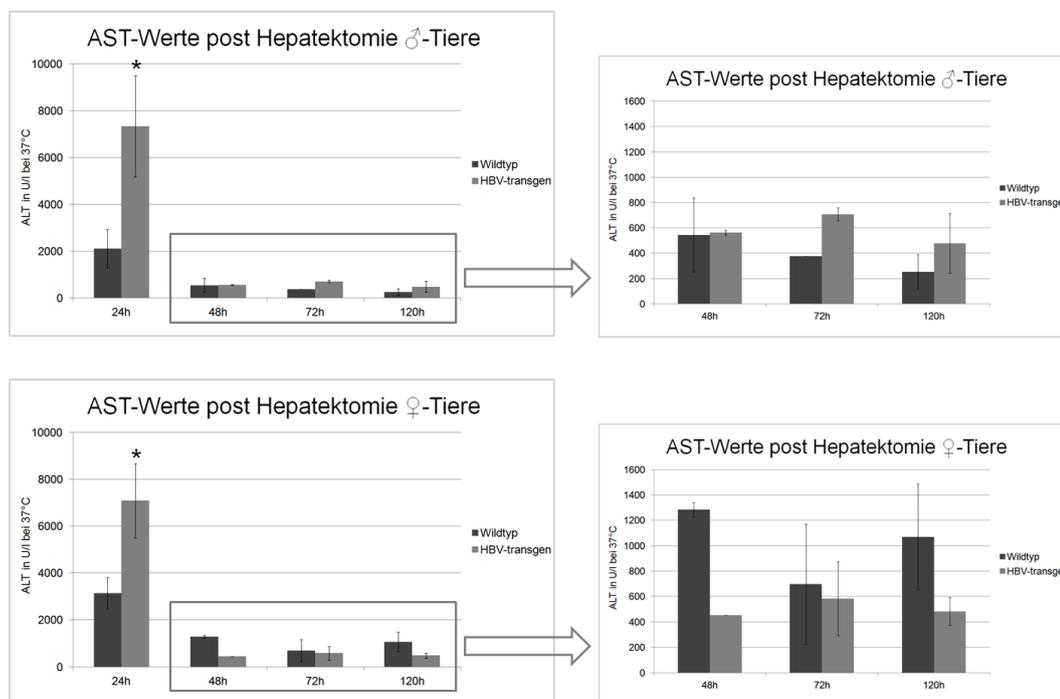
**Abbildung 5.23: Vergleichende Darstellung der Anzahl BrdU-positiver Hepatozyten männlicher und weiblicher HBV-transgener- und wt-Mäuse nach partieller 2/3 Hepatektomie;** bei männlichen und weiblichen HBV-transgenen- und wt-Mäusen wurde eine partielle 2/3 Hepatektomie durchgeführt und diese Mäuse 24 h, 48 h, 72 h und 120 h post Hepatektomie getötet; eine Stunde vor Tötung wurden 50 mg/kg BrdU intraperitoneal appliziert; die Lebern wurden mittels indirekter Immunhistologie ausgewertet; verwendet wurden hierzu Anti-BrdU-spezifische Antikörper sowie DAPI; **oben:** vergleichende Darstellung der BrdU-positiven Hepatozyten; **unten:** die Graphen zeigen die Anzahl BrdU-positiver Zellen von männlichen und weiblichen HBV-transgenen- und Wildtyp-Mäusen post Hepatektomie, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung; (n=2; 48 h weiblich HBV-transgene Mäuse sowie 72 h männliche HBV-transgene Mäuse n=1).

### 5.3.5 Keine Apoptoseinduktion durch partielle Hepatektomie in HBV-transgenen Mäusen

Neben der Untersuchung von Unterschieden in der Leberregeneration von HBV-transgenen und Wildtyp-Mäusen wurde auch die Induktion von Apoptose nach partieller Hepatektomie untersucht. Hierfür wurde den Mäusen 24, 48, 72 und 120 h nach Hepatektomie direkt post mortem durch Herzpunktion Blut entnommen und im Serum wie in Kapitel 4.6.2 beschrieben der Gehalt der Alanin- (ALT) sowie der Aspartat-Aminotransferase (AST) untersucht. Wie in den Abbildungen 5.24 und 5.25 zu sehen ist, zeigen die ALT- und AST-Gehalte im Serum der Kontrolltiere und der HBV-transgenen Mäuse an den meisten Zeitpunkten keinen signifikanten Unterschied. Der Serumgehalt beider Transaminasen ist 24 h nach partieller Hepatektomie noch deutlich erhöht und fällt sowohl bei den Wildtyp- als auch bei den transgenen Tieren bereits nach 48 h post Hepatektomie stark ab. Im Falle der ALT werden sogar 120 h nach Operation wieder physiologische Werte erreicht, siehe Tabelle 4.3. Der Serumspiegel der AST liegt hingegen noch deutlich über den Referenzbereichen. Die ALT-Werte der männlich transgenen Mäuse zeigen nach 72 h nach Hepatektomie einen signifikant höheren Wert, dieser ist jedoch bereits 120 h nach Hepatektomie nicht mehr nachweisbar. Auch bei den AST-Werten zeigt sich initial nach 24 h sowohl bei den männlich- als auch bei den weiblich-transgenen Tieren ein signifikant höherer AST-Wert, welcher bereits nach 48 h nach Hepatektomie nicht mehr nachweisbar ist.



**Abbildung 5.24: Serumanalyse der Alanin-Aminotransferase 24, 48, 72 und 120 h post Hepatektomie; oben:** Mittelwerte der ALT bei männlichen wt- und HBV-transgenen Mäusen ( $\sigma$ -tg: 24h n=4, 48h n=2, 72h n=2, 120h, n=2;  $\sigma$ -wt 24h, 48h, 72h, 120h, n=3) inklusive Standardabweichung (SD, standard deviation); die mit einem Stern (\*) markierten Säulen zeigen einen signifikanten Unterschied im Vergleich zu den wt-Mäusen,  $p \leq 0,05$ . **unten:** Mittelwerte der ALT bei weiblichen wt- und HBV-transgenen Mäusen ( $\varphi$ -tg: 24h n=2, 48h n=1, 72h n=5, 120h, n=2;  $\varphi$ -wt: 24h n=4, 48h n=2, 72h n=3, 120h, n=3), inklusive Standardabweichung (SD, standard deviation), ohne signifikante Unterschiede,  $p \leq 0,05$ .



**Abbildung 5.25: Serumanalyse der Aspartat-Aminotransferase 24, 48, 72 und 120 h post Hepatektomie; oben:** Mittelwerte der AST bei männlichen wt- und HBV-transgenen Mäusen (♂-tg: 24h n=4, 48h n=2, 72h n=2, 120h, n=2; ♂-wt 24h, 48h, 72h, 120h, n=3), inklusive Standardabweichung (SD, standard deviation); die mit einem Stern (\*) markierten Säulen zeigen einen signifikanten Unterschied verglichen mit den ♂-wt-Tieren,  $p \leq 0,05$ . **unten:** Level der AST bei weiblichen wt- und HBV-transgenen Mäusen (♀-tg: 24h n=2, 48h n=1, 72h n=5, 120h, n=2; ♀-wt: 24h n=4, 48h n=2, 72h n=3, 120h, n=3) inklusive Standardabweichung (SD, standard deviation); die mit einem Stern (\*) markierten Säulen zeigen einen signifikanten Unterschied verglichen mit den ♀-wt-Tieren,  $p \leq 0,05$ .

Außer der Untersuchung der Transaminasen im Serum wurden zur Charakterisierung apoptotischer Prozesse die Leberlysate der hepatektomierten Mäuse mittels Western Blot analysiert. Verwendet wurde hierfür ein Anti-PARP-spezifischer Antikörper, Anti- $\beta$ -Actin diente als Ladekontrolle. In keinem Leberlysate konnte *cleaved* PARP als Marker für Apoptose nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Auch ein durchgeführter PARP *Cleavage*-ELISA aus den Leberlysaten war negativ (Daten nicht gezeigt). Darüber hinaus wurden die entnommenen Lebern immunhistochemisch mittels *TUNEL*-Assay analysiert. Bei der Auswertung durch Fluoreszenzmikroskopie konnten ebenfalls keine nukleären DNA-Fragmente, welche auf Apoptose hinweisen, histochemisch dargestellt werden (Daten nicht gezeigt).

## 6 Diskussion

Die Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus gilt als eine der häufigsten und schwerwiegendsten Infektionskrankheiten weltweit. Obwohl seit 1986 eine Vakzine zur Verfügung steht, wird geschätzt, dass derzeit mehr als 350 Millionen Menschen chronisch mit HBV infiziert sind [Neuveut et al., 2010, WHO, 2002]. Neben chronischen Hepatitiden und Leberzirrhose verursacht das Hepatitis-B-Virus primäre hepatozelluläre Karzinome (HCC), welche die häufigste Form der malignen Lebertumoren darstellen und in über 50 % der Fälle mit einer chronischen Infektion des Hepatitis-B-Virus assoziiert sind [Lok and McMahon, 2007, El-Serag, 2012, Lupberger and Hildt, 2007]. Zur Therapie von chronischen Hepatitis B-Infektionen werden derzeit zum einen immunmodulatorische Therapeutika wie Interferone und zum anderen Nukleosid- beziehungsweise Nukleotidanaloga, welche die HBV-Polymerase und somit direkt die Virusreplikation beeinflussen, eingesetzt. Das Ziel der chronischen HBV-Therapie ist die Eliminierung der cccDNA, um entzündliche Reaktionen und die Progression der Fibrose zu reduzieren, die Heilungsrate ist jedoch sehr gering [Buster and Janssen, 2006, Cornberg et al., 2011, Cornberg and Manns, 2011]. Ein elementarer Punkt in der HBV-assoziierten Hepatokarzinogenese ist der dynamische Verlauf der chronischen Hepatitis B. Wiederkehrende chronische Entzündungen mit einem durch das Immunsystem bedingten permanenten Zelltod, welche zu einer erhöhten Produktion von *Reactive Oxygen Species* (ROS) führen, gefolgt von Leberregeneration, können einen DNA-Schaden und Genmutationen nach sich ziehen und somit die Karzinogenese begünstigen [Chemin and Zoulim, 2009]. Im Gegensatz zu einigen Berichten, welche die Radikalformation als einen ursächlichen Grund für die HBV-assoziierte Karzinogenese sehen, konnten Schädler et al. zeigen, dass HBV-infizierte Zellen durch vermehrte Expression von Nrf2-/ARE-regulierten Genen einen Schutz gegen oxidativen Stress induzieren und so die virale Replikation sicherstellen [Schaedler et al., 2010]. In vielen Tumorzellen ist die Expression der Nrf2-/ARE-regulierten Gene ebenfalls erhöht, welche die Tumorzellen vor Elimination durch erhöhte Radikallevel oder vor Chemotherapeutika schützen können [Lau et al., 2008]. Der Transkriptionsfaktor Nrf2 spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Expression von Genen, die für zytoprotektive Proteine codieren, welche für die Detoxifikation und Elimination von Elektrophilen und ROS zuständig sind [Nguyen et al., 2009]. Die überaus wichtige Rolle von Nrf2 bei der Detoxifikation von zellulärem Stress konnte durch verschiedenen Studien mit Nrf2-knock-out-Mäusen bewiesen werden. Chan und Kan zeigten bereits 1999, dass diese Mäuse sehr empfindlich auf Butylhydroxytoluol reagieren und die pulmonale Toxizität ein akutes respiratorisches Distress-Syndrom (ARDS) auslöst [Chan and Kan, 1999]. Nrf2 wird vor allem in den detoxifizierenden Organen wie der Leber und den Nieren sowie in Organen mit Kontakt zur Umwelt wie der Haut, den Lungen oder dem Gastrointestinaltrakt gefunden [Motohashi et al., 2002]. Neben einer hohen Hepatotoxizität von Acetaminophen in Nrf2-knock-out-Mäusen [Chan et al., 2001] konnte

auch ein höheres toxisches Potential von Ethanol [Gong and Cederbaum, 2006] und Gallensäuren [Tan et al., 2007] bewiesen werden. Darüber hinaus konnten Beyer et al. beobachten, dass in Nrf2-knock-out-Mäusen nach partieller Hepatektomie eine signifikant verzögerte Leberregeneration auftritt, welche durch eine vorübergehenden Insulin- und IGF-1-Resistenz verursacht wird [Beyer et al., 2008].

Trotz intensiver Forschung sind die Interaktionen des Virus mit zellulären Signalwegen, dem Immunsystem und den auftretenden klinischen Symptomen noch nicht hinreichend bekannt. Dies unterstreicht einmal mehr die Notwendigkeit der Erforschung bislang nicht geklärter Virus-Wirt-Interaktionen und zusätzlicher Therapieansätze, um die Therapieerfolgsrate der chronischen HBV-Infektion zu erhöhen [Buster and Janssen, 2006].

## 6.1 Der Insulin-/IGF-1-Signalweg und seine Aktivierung in HBV-replizierenden Zellen

Viele Zytokine und Wachstumsfaktoren können inzwischen mit der Leberregeneration in Verbindung gebracht werden. Hierzu gehören die Zytokine TNF $\alpha$  und IL-6 sowie die Wachstumsfaktoren *Hepatocyte growth factor* (HGF), *Epidermal growth factor* (EGF), *Transforming growth factors* (TGFs) sowie Glukagon und Insulin [Taub, 2004]. Insulin nimmt hierbei eine Sonderstellung ein, indem es sowohl Metabolismus als auch Proliferation in der Leber steuert [Amaya et al., 2014]. Da in Experimenten mit Nrf2-knock-out-Mäusen eine signifikant verzögerte Leberregeneration auftritt, welche durch eine vorübergehenden Insulin- und IGF-1-Resistenz verursacht wird, sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob das Hepatitis-B-Virus mit den Proteinen oder der Aktivierung der Insulin-/IGF-1-Signalkaskade interferiert [Beyer et al., 2008].

Viele Mechanismen existieren, durch die das *Insulinsignaling* auf dem Level des Insulin-Rezeptors moduliert werden kann. Diese beinhalten zum einen die Modifikation des Rezeptorgehaltes in den Zellen durch Beeinflussung der Transkription oder des Proteinabbaus oder zum anderen eine Modifikation der enzymatischen Aktivität des Rezeptors [Youngren, 2007]. Im Zuge dieser Arbeit wurde zunächst der Proteingehalt des Insulin-Rezeptors *in vitro* analysiert, hierzu wurden die stabil HBV-replizierenden humanen Hepatoblastom-Zelllinien HepAD38 und HepG2.2.15 mit der Zelllinie HepG2 hinsichtlich der Menge an Insulinrezeptor im Western Blot verglichen. Wie aus der Abbildung 5.1 ersichtlich, enthalten die HBV-replizierenden Zellen eine signifikant höhere Menge des Insulinrezeptors. Auch in transient transfizierten Huh7.5-Zellen, die mittels indirekter Immunfluoreszenz untersucht wurden, konnte in den HBV-replizierenden Zellen eine deutlich erhöhte Menge des Insulin-Rezeptors detektiert werden. Obwohl in HBV-replizierenden Zellen die Menge des Insulin-Rezeptors signifikant erhöht ist, fällt auf, dass der Rezeptor jedoch nicht membranständig, sondern internalisiert vorliegt (siehe Abbildung 5.2). Die Menge des Insulin-Rezeptors wird durch den Grad der Synthetisierung, der Internalisierung und der Degradation reguliert, wobei das Herabsetzen des membranständigen Rezeptors die sogenannte *Downregulation* sowohl durch Degradation als auch durch Internalisierung oder Retention erfolgen kann [Hatada et al., 1989, Virkamäki et al., 1999]. Die Internalisierung des Rezeptors erfolgt durch

Rezeptor-mediierte Endozytose, jedoch können die meisten internalisierten Insulin-Rezeptoren der Degradation entkommen und werden recycelt, so dass ein Rezeptor mehrere Internalisierungszyklen durchlaufen kann, bevor er endgültig abgebaut wird [Kahn, 1985]. Dieser Prozess wird durch eine große Anzahl von Faktoren reguliert und während es beispielsweise in humanen Lymphozyten, Fibroblasten und Adipozyten durch eine Insulinstimulation sowohl zu einer Internalisierung als auch zu einer Degradation kommt, erfolgt in Hühnerleberzellen eine reine Internalisierung des Insulin-Rezeptors [Hatada et al., 1989, Kasuga et al., 1981, Krupp and Lane, 1982, Ronnett et al., 1982, Rouiller and Gordon, 1987]. Im Tiermodell erfolgt die *Downregulation* der Insulin-Rezeptorexpression ebenfalls sekundär bei Adipositas oder wahrscheinlicher durch die daraus resultierende Hyperinsulinämie [Virkamäki et al., 1999]. Auch *in vitro* kommt es unter dauerhafter oder hoher Exposition von Insulin bei HepG2-Zellen zu einer *Downregulation*, wohingegen ein Wachstumsstillstand zu einem Anstieg des Rezeptors auch unter Insulinexposition führt. Die mRNA-Level sind hierbei jedoch unverändert, so dass von einer verminderten Degradation ausgegangen wird [Hatada et al., 1989]. In den HBV-replizierenden Zellen konnten hingegen im Rahmen dieser Arbeit erhöhte IR-RNA-Mengen nachgewiesen werden, so dass es wahrscheinlich ist, dass die erhöhte Menge des Insulin-Rezeptors nicht etwa auf einen verminderten Proteinabbau, sondern auf eine verstärkte Expression des IR-Gens und zurückzuführen ist (siehe Abbildung 5.3). Da in HBV-replizierenden Zellen die Menge des Insulin-Rezeptors und die IR-RNA-Mengen signifikant erhöht sind, dieser jedoch nicht membranständig, sondern internalisiert vorliegt, ist eine weitere Möglichkeit, dass es sich um eine Retention des Rezeptors handelt. Kürzlich konnte beobachtet werden, dass HBV-exprimierende Zellen ebenfalls eine erhöhte Menge des Proteins  $\alpha$ -Taxilin aufweisen, welches vermutlich kompetitiv zum SNARE-Komplex Syntaxin bindet und somit den intrazellulären Vesikeltransport inhibieren könnte [Hoffmann et al., 2013]. In nachfolgenden Versuchen, welche auf die in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse Bezug nehmen, konnte vor kurzem gezeigt werden, dass in den HBV-exprimierenden Zellen HepAD38 im Gegensatz zu den HepG2-Zellen der Insulin-Rezeptor vermehrt im ER vorliegt und eine signifikant kleinere Menge des Rezeptors in den Golgi-Apparat gelangt. Hierdurch konnte demonstriert werden, dass es sich um eine intrazelluläre Retention des Rezeptors handelt [Barthel et al., 2016].

Für die *in vivo*-Untersuchungen der IR-Expression wurde ein transgenes Mausmodell für HBV der C57BL/6-Mäuse verwendet. Während im Western Blot keine vermehrte Expression des IR-Rezeptors nachgewiesen werden konnte (siehe Abbildung 5.15) und auch in der *Real-Time PCR* die Menge der IR-Transkripte keinen signifikanten Unterschied zwischen HBV-transgenen und wt-Mäusen zeigten (siehe Abbildung 5.16), konnte in der Immunhistochemie eine vermehrte IR-Proteinmenge nachgewiesen werden (siehe Abbildung 5.4). Der Grund für den fehlenden Nachweis einer vermehrten IR-Proteinmenge im Western Blot sowie von erhöhten IR-Transkripten in der *Real-Time PCR* ist wahrscheinlich die geringe Anzahl der HBV-positiven Zellen in den Lebern der transgenen Mäuse. Es sind nur wenige der in Abbildung 5.17 dargestellten Hepatozyten HBV-positiv, so dass dies nicht ausreicht, um im Leberlysate einen erhöhten Proteingehalt oder vermehrt IR-Transkripte zu detektieren. Abschließend wurden auch Lebern von chronisch HBV-infizierten Patienten auf ihren Gehalt an Insulin-Rezeptor untersucht und auch im humanen System konnte eine deutlich erhöhte Menge an Insulin-Rezeptor in HBV-positiven Leberzellen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 5.4).

In weiteren Versuchen könnte untersucht werden, ob ebenfalls eine veränderte Affinität zwischen Insulin und Insulinrezeptor in HBV-positiven Zellen vorliegt. Hierzu müsste entweder ein Rezeptorbindungsassay mit FITC-gelabeltem Insulin oder Jod-125-gelabeltem Insulin durchgeführt werden. Der *Insulin-like growth factor-1*-Rezeptor ist dem Insulin-Rezeptor sehr ähnlich, so sind beispielsweise 84 % der Aminosäuren in der Tyrosinkinasedomäne und 100 % an der ATP-Bindungsstelle identisch [Singh et al., 2014]. Physiologisch haben Insulin und IGF-1 jedoch sehr unterschiedliche Funktionen, während Insulin für die metabolische Aktivität, die Glukosehomöostase und die Zellproliferation verantwortlich ist, ist IGF als Wachstumshormon vor allem für die Regulation des Embryowachstums und die Differenzierung von Gewebe verantwortlich [Singh et al., 2014]. Jedoch bindet Insulin mit hoher Affinität an die beiden Isoformen IR-A und IR-B sowie auch an den IGF-1R, während IGF-1 mit hoher Affinität nur an den IGF-1R bindet [Singh et al., 2014, Ullrich et al., 1986]. Da der Insulin-Rezeptor in den HBV-positiven Zellen signifikant erhöht war, sollte nachfolgend auch die Menge des IGF-1-Rezeptors im Western Blot überprüft werden. Hier konnte jedoch keine Veränderung der Proteinmenge detektiert werden (siehe Abbildung 5.5).

Neben dem Insulin-Rezeptor und dem IGF-1R spielt auch das Insulin-Rezeptor-Substrat-1 eine überaus wichtige Rolle bei der Signaltransduktion [Kaburagi et al., 1999]. Veränderungen in der Expression von IRS sowie in seiner Funktion wurden in vielen verschiedenen Geweben bei Insulin-Resistenzen beobachtet. So konnte in der Skelettmuskulatur von Adipositaspatienten eine signifikant geringere Menge an IRS-1-, IRS-1-Phosphorylierung und PI-3-Kinase-Aktivierung festgestellt werden [Sesti et al., 2001]. Aus diesem Grunde wurde die Proteinmenge zwischen HBV-positiven und HBV-negativen Zellen verglichen, aber wie Abbildung 5.6 zeigt, konnte hier keine differierende Menge an IRS-1 nachgewiesen werden.

Nachdem die Basallevel der vorgeschalteten Proteine der Signalkaskade untersucht worden waren und nur für den Insulinrezeptor eine vermehrte Proteinmenge nachgewiesen werden konnte, wurde anschließend in einem exemplarischen Experiment die Aktivierung des Insulin-/IGF-Signalweges (Abbildung 6.1) in HBV-negativen und HBV-replizierenden-Zellen durch Insulinstimulation und Stimulation mit Glukoseoxidase als ständiger ROS-Generator durch Freisetzung von Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) analysiert. Die Abbildung 5.10 zeigt, dass sowohl der Insulin- als auch der IGF-Rezeptor nach Stimulation mit Insulin in HepG2 und HepAD38 aktiviert wird. Neben der Aktivierung durch Insulin werden jedoch auch bei reiner Stimulation mit Glukoseoxidase sowohl der Insulin- als auch der IGF-Rezeptor aktiviert. Im Skelettmuskel ist Wasserstoffperoxid ein wichtiger Regulator für zelluläre Vorgänge, der zur Aktivierung des Glukosetransportes führt. Bei mikromolarer  $H_2O_2$ -Stimulation in Abwesenheit von Insulin wird auch der Insulin-Signalweg aktiviert, um die basale Glukosetransportaktivität zu erhöhen. Im Gegensatz dazu wird im Muskel bei gleichzeitiger Stimulation von Insulin und  $H_2O_2$  die Wirkung von Wasserstoffperoxid antagonisiert und durch Verstärkung diverser Serin-/Threonin-Kinasen wie beispielsweise JNK, GSK-3 und p38-MAPK eine Insulinresistenz hervorgerufen [Diamond-Stanic et al., 2011, Henriksen et al., 2011, Henriksen, 2013].

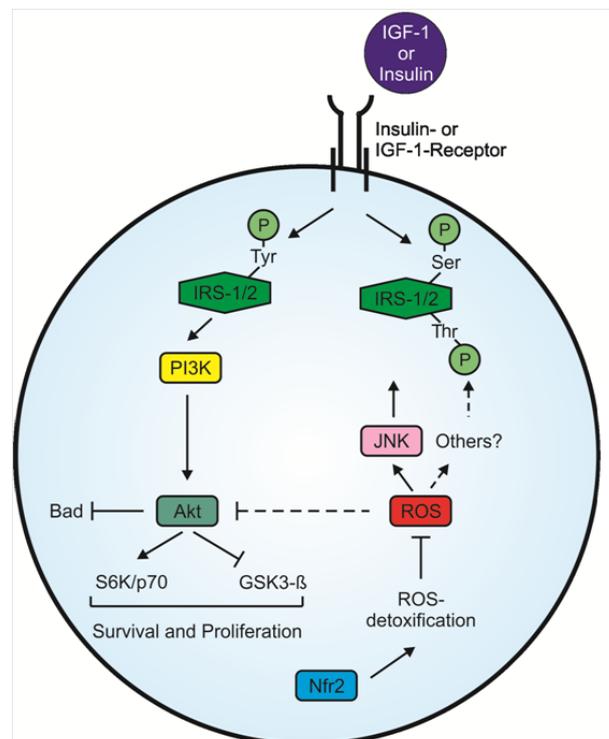
Da der Skelettmuskel neben der Leber eines der insulinsensitivsten Gewebe ist und auch eine wichtige Rolle bei der Glukoseaufnahme und Glykogenspeicherung einnimmt [Moore et al., 2012], wäre für die Leber ein ähnlicher Mechanismus denkbar. Eine weitere Möglichkeit wäre eine nicht-membranständige

Degradierung des Rezeptors, so dass es zu einer Veränderung des p-IR/IR-Quotienten kommt. Dass es bei Stimulation der HepAD38 mit Glukoseoxidase zu einer deutlich stärkeren Aktivierung des Insulin- und IGF-Rezeptors kommt, könnte für eine deutlich effizientere Phosphorylierung und die bessere Entgiftung bei vermehrt vorkommendem oxidativem Stress sprechen. Bei den HepG2.2.15 hingegen kommt es bei Stimulation mit Insulin sowie Insulin und Glukoseoxidase nur zu einer Aktivierung des IGF-Rezeptors und im Falle des Insulin-Rezeptors sogar zu einem Abfall verglichen mit den unstimulierten Zellen. Dies könnte mit einer eventuell deutlich höheren physiologischen Phosphorylierung des Insulin-Rezeptors zusammenhängen.

Darüber hinaus zeigt sich bei den HepG2.2.15 eine deutlich verminderte Phosphorylierung bei Stimulation mit Glukoseoxidase verglichen mit den HepG2 und HepGAD38. Auch wenn es sich sowohl bei den HepAD38 als auch bei den HepG2.2.15 um stabil HBV-replizierende Zelllinien handelt, so produzieren die HepAD38 höhere Level HBV-DNA, die kontrollierbar und induzierbar sind, und die HepG2.2.15 weniger HBV-DNA und dafür kontinuierlich intakte Viruspartikel [Ladner et al., 1997, Ma et al., 2009, Sells et al., 1987]. Die übermäßige Produktion von subviralen Partikeln der HepG2.2.15 könnte zu einer Überlastung des endoplasmatischen Retikulums mit Formation von vermehrt intrazellulären Radikalen führen [Schaedler et al., 2010]. Diese Überlastung könnte die HepG2.2.15 gegenüber oxidativem Stress eventuell sensitiver machen, als es die HepAD38 sind. Darüber hinaus ist das stabile System der HepAD38 näher an der physiologischen Replikation des Virus und die HepG2.2.15 sollten hier nur eingeschränkt bewertet werden.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass auf Ebene der Rezeptoren sowohl in HBV-positiven wie auch in HBV-negativen Zellen der Insulin-/IGF-1-Signalweg durch Insulin aktiviert wird. Nachfolgende Versuche jedoch mit kürzerer Stimulationszeit von HepAD38 und HepG2 mit Insulin zeigen eine verminderte Aktivierung

des Insulin-Rezeptors in der HBV-replizierenden Zelllinie [Barthel et al., 2016]. Inwieweit dies durch die unterschiedlichen Stimulationszeiten bedingt ist, müssen zukünftige Experimente zeigen. Darüber hinaus scheint in den HBV-positiven HepAD38 die Aktivierung der Rezeptoren durch gleichzeitige Stimulation mit Insulin und Glukoseoxidase noch stärker zu sein. Dies deutet erneut



**Abbildung 6.1: Schematische Darstellung des Insulin-/IGF-Rezeptor-Signalwegs in der regenerierenden Leber und dessen Beeinträchtigung in der Abwesenheit von Nrf2; modifiziert nach Beyer and Werner [2008].**

darauf hin, dass HBV durch die vermehrte Expression von Nrf2-/ARE-regulierten Genen, die die Inaktivierung von ROS vermitteln, das Überleben der Zelle und die genetische Integrität von Wirtszelle und viralem Genom sichern [Schaedler et al., 2010].

Eine reduzierte Phosphorylierung von IRS nach Insulin-Infusionen ist *in vivo* eine häufige Ursache für Insulinresistenzen. Auch wenn diese nicht durch eine primär veränderte IR-Funktion verursacht wird, sondern durch unterschiedliche Phosphorylierungen an IRS [Youngren, 2007]. Die Phosphorylierung von IRS an Tyrosin ist bei Nrf2<sup>-/-</sup> Mäusen in Folge einer Insulin-/IGF-Stimulation deutlich reduziert und oxidativer Stress resultiert in einer vermehrten Aktivität von JNK1/2, was zu einer Beeinträchtigung des Insulin-/IGF-1-Signalweges führt und damit auch für eine Hemmung der PI3-Kinase verantwortlich ist (siehe Abbildung 6.1) [Beyer et al., 2008]. In HBx-transgenen Mäusen scheint das HBx-Protein, welches ein multifunktionaler Regulator der Virus-Wirts-Interaktionen ist, in der Lage zu sein, die Expression von *Suppressor-of-cytokine-signaling*-Proteinen (SOCS) zu erhöhen und die Expression von IRS-1 zu erniedrigen, wodurch ebenfalls eine Beeinträchtigung im Insulin-Signalweg und im Insulinstoffwechsel entsteht [Kim et al., 2010]. In den *in vitro*-Experimenten konnte im Rahmen dieser Arbeit keine erhöhte Expression von IRS nachgewiesen werden (siehe Abbildung 5.6). Dies liegt jedoch wahrscheinlich an der deutlich geringeren HBx-Expression. Bei der Stimulation durch Glukoseoxidase ist bei der Phosphorylierung von IRS an Serin durch den oxidativen Stress in HepG2-Zellen ein deutlicher Anstieg zu verzeichnen, welcher circa dem zweifachen der Basalaktivität entspricht (siehe Abbildung 5.12). Aber auch bei alleiniger Stimulation mit Insulin ist vermehrt p-IRS-Ser zu detektieren. In den HBV-positiven Zellen HepAD38 kann durch Stimulation mit Insulin ebenfalls eine erhöhte Menge an p-IRS-Tyr nachgewiesen werden; diese ist aber im Gegensatz zu den HepG2 auch bei gleichzeitiger Stimulation mit Glukoseoxidase und Insulin erhöht. Die Phosphorylierung von IRS an Serin sowohl bei den HepAD38 als auch den HepG2.2.15 bei den Glukoseoxidase-behandelten Zellen ist hingegen im Vergleich mit den Basalwerten zu den HBV-negativen Zellen geringer, was somit erneut auf eine geringere Beeinträchtigung des Insulin-/IGF-1-Signalweges bei HBV-replizierenden Zellen durch oxidativen Stress hindeutet. In Versuchen mit JNK1<sup>-/-</sup> Mäusen konnte eine verminderte Phosphorylierung von IRS-1 an Serin verglichen mit dem Wildtyp gefunden werden, welche gleichzeitig zu einer erhöhten Phosphorylierung von IRS an Tyrosin führte [Hirosumi et al., 2002]. Entscheidend für eine Beeinträchtigung des Insulin-/IGF-1-Signalweges ist also wahrscheinlich das Verhältnis zwischen p-IRS-Tyr und p-IRS-Ser.

JNK-Signaling ist assoziiert mit vielen Zellvorgängen wie Zelltod, Zellproliferation und Tumorgenese in Hepatozyten und wirkt als regulatorischer Faktor über IRS im Insulin-/IGF-1-Signalweg (siehe Abbildung 6.1) [Hirosumi et al., 2002, Seki et al., 2012], deshalb sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob dieser Signalweg durch HBV reguliert wird. In Abbildung 5.14 nimmt das Verhältnis von aktivierter zur gesamten JNK in HepG2 bei Stimulation mit Insulin deutlich ab, während bei Erzeugung von oxidativem Stress mittels Glukoseoxidase die Aktivität der JNK zunimmt. In den HBV-replizierenden Zellen ist die Aktivität der JNK bei ROS jedoch reduziert und trotzdem liegt vermehrt p-IRS-Ser bei HepAD38 und HepG2.2.15 vor. Dies spricht für eine weitere Kinase neben der JNK, welche Einfluss auf IRS nimmt.

Während die Hepatitis-C-Infektion mit einer Insulin-Resistenz assoziiert ist und somit auch ein er-

höhtes Risiko für einen Typ-II-Diabetes besteht, fehlen bei HBV-Infektionen derzeit Studien, die eine HBV-Infektion mit einer Insulin-Resistenz oder einem Diabetes in Zusammenhang bringen [Hui et al., 2003, Kim et al., 2010].

Es ist bekannt, dass HBV Nrf2 aktiviert und dadurch auch vermehrt Nrf2-/ARE-regulierte Gene exprimiert werden [Schaedler et al., 2010]. Dies passt jedoch nicht zu der Annahme, dass es aufgrund der chronischen HBV-Infektion und dem damit verbundenen erhöhten ROS-Spiegeln zu einer Hemmung des Insulin-/IGF-1-Signalweges kommt und daraus resultierend zu einer verminderten Leberregeneration (siehe Abbildung 6.1). Auch im Zuge dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die HBV-positiven Zellen besser gegen oxidativen Stress geschützt sind und dies somit nicht der Grund einer verminderten Regenerationsfähigkeit zu sein scheint. Jedoch kann der immunbedingte Radikalstress, hervorgerufen vor allem durch zytotoxische T-Zellen, *in vivo* unter Umständen wesentlich stärker ausgeprägt sein und auch Langzeiteffekte des Radikalstresses könnten sich unterscheiden. Die Aktivierung des Insulin-/IGF-1-Signalweges durch Stimulation mit Insulin scheint ebenfalls hinsichtlich des Insulin-Rezeptors, des IGF-Rezeptors und IRS nicht beeinträchtigt zu sein. In weiteren Versuchen sollte jedoch untersucht werden, ob der quantitative Unterschied des Insulin-Rezeptors zwischen HBV-positiven und negativen Zellen sich auch in der intrazellulären Verteilung des Rezeptors widerspiegelt.

## 6.2 Verzögerte Leberregeneration in HBV-transgenen Mäusen

Die Leber ist einzigartig in ihrer Regenerationsfähigkeit und kann auf den Verlust von funktionellem Lebergewebe reagieren, welcher durch eine Vielzahl von beträchtlichen Schädigungen wie beispielsweise Operationen, Autoimmunerkrankungen, Toxin-induzierter Nekrosen oder Infektionen hervorgerufen werden kann. Eine Vielzahl von Absicherungen erlauben der Leber, ihre komplexen Funktionen der Detoxifikation, der metabolischen Homöostase, der Synthese, Speicherung und Sekretion von Nährstoffen auch nach erheblicher Beeinträchtigung auszuführen [Diehl, 2002, Mao et al., 2014]. Jedoch ist die Regenerationsfähigkeit durch chronische Prozesse wie chronische virale Hepatitiden oder langjährigen Alkoholmissbrauch deutlich insuffizient und verursacht häufig Leberzirrhosen, welche durch den Ersatz von funktionellem Lebergewebe durch Bindegewebe gekennzeichnet sind [Böhm et al., 2010]. Eine Vielzahl von Modellen wurden zur Untersuchung der Leberregeneration herangezogen, wobei die partielle Hepatektomie von Higgins und Anderson eines der am besten untersuchten Modelle ist [Higgins and Anderson, 1931, Mao et al., 2014]. Durch die partielle Hepatektomie besteht die Möglichkeit, sowohl die physiologische Regeneration in normalen Hepatozyten als auch die abnormale Regeneration in genetisch modifizierten Mäusen zu untersuchen [Fausto, 2000].

Die Leberregeneration nach einer partiellen Hepatektomie kann in drei verschiedene Phasen aufgeteilt werden, *Priming*, *Proliferation* und *Cessation*. Dieser komplexe Prozess wird durch eine Vielzahl von Zytokinen und Wachstumsfaktoren reguliert und verursacht bei einer physiologischen Leberregeneration weder eine massive Entzündung noch Leberzellnekrosen und induziert somit auch keine Fibrose [Beyer et al., 2008, Böhm et al., 2010]. Obwohl der Regenerationsprozess der Leber sehr effizient ist, kann er durch chronisch oxidativen Stress beeinträchtigt werden. Um Zellschäden durch ROS zu

vermeiden, ist eine enge Regulation des Redox-Gleichgewichts nötig, welche zumindest zum Teil durch Nrf2 erfolgt [Beyer and Werner, 2008]. Beyer et al. konnten in Studien mit Nrf2-knock-out-Mäusen nach partieller Hepatektomie eine signifikant verzögerte Leberregeneration nachweisen und somit neben dem *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF- $\kappa$ B) einen weiteren entscheidenden Regulator des intrazellulären Redoxpotentials in Hepatozyten identifizieren [Beyer et al., 2008, Schwabe and Brenner, 2006]. Da HBV eine starke Aktivierung von Nrf2-/ARE-regulierten Genen *in vitro* und *in vivo* induziert, sind diese Zellen verglichen mit den Kontrollzellen besser gegen oxidativen Stress geschützt. Diese Aktivierung wird durch die HBV-regulatorischen Proteine (HBx und LHBs) über c-Raf und MEK getriggert [Schaedler et al., 2010].

Vor der Untersuchung der Regenerationsfähigkeit mittels partieller Hepatektomie wurden zunächst Lebern von drei C57BL/6-Kontrolltieren und drei HBV-transgenen Mäuse makroskopisch und histologisch untersucht, um zu analysieren, ob es einen Einfluss von HBV auf die Lebermorphologie transgener Mäuse gibt. Hierbei konnten keine makroskopischen Veränderungen wie beispielsweise knotige Schrumpfungen, bindegewebige Verhärtungen oder Nekrosen der Leber, wie bei einer Zirrhose zu erwarten, noch Tumore gefunden werden. Auch die mikroskopischen Untersuchungen mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung nach Mayer und der van Gieson-Färbung (nicht gezeigt) zeigte keinerlei Veränderungen (siehe Abbildung 5.21). Im Gegensatz hierzu stehen die histologischen Veränderungen, welche sich im Verlauf einer chronischen HBV-Infektion beim Menschen zeigen. Hier ist eine deutlich veränderte Leberarchitektur mit starker Fibrose und massiven diffusen mononukleären Infiltraten vorherrschend (siehe Abbildung 5.22). Die unveränderte makroskopische und histologische Leberstruktur HBV-transgener Mäuse passt jedoch zu den Ergebnissen von Guidotti et al. [1995], dass Hepatozyten transgener Mäuse ohne zytopathologischen Effekt Virus produzieren. Die Menge des produzierten Virus ist dabei sogar vergleichbar mit den Virusmengen, die von Hepatozyten chronisch HBV-infizierter Patienten produziert werden [Guidotti et al., 1995].

Nachdem die Lebern der HBV-transgenen Mäuse keine Abweichungen in makroskopischer und histologischer Leberstruktur zeigten, sollte in einem nächsten Schritt im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob diese nach partieller Hepatektomie eine veränderte Leberregeneration zeigen. Wie aus Abbildung 4.2 hervorgeht, weisen die HBV-transgenen Mäuse im Falle der weiblichen Tiere eine verminderte und im Falle der männlichen Tiere eine verzögerte Regeneration auf, die ihr Maximum im Gegensatz zu den Wildtyptieren erst nach 72 h statt nach 48 h erreicht. Das vorliegende Maximum der Proliferationsrate nach 48 h steht im Einklang mit den Ergebnissen von Beyer et al. [2008], die während ihrer Experimente den Höhepunkt der Proliferation mittels BrdU-positiver Zellen ebenfalls nach 48 h dedektieren, welche dann auch kontinuierlich bis 120 h nach Hepatektomie abnimmt.

Eine weitere Fragestellung dieser Arbeit war, ob nach Hepatektomie eine vermehrte Apoptoseinduktion bei HBV-transgenen Mäusen stattfindet. Als ein Kennzeichen für Leberdysfunktion oder Leberschäden steht eine exzessive Freisetzung der beiden Transaminasen ALT und AST im Serum [Beyer et al., 2008]. Bei HBV-transgenen Mäusen und den Kontrolltieren besteht jedoch nach Hepatektomie kein signifikanter Unterschied (siehe Abbildung 5.24 und 5.25). Die deutlich erhöhten AST- und ALT-Werte 24 h postoperativ sprechen eher für einen operativ bedingten Anstieg, da der Serumgehalt beider Transaminasen bereits nach 48 h wieder stark abfällt und im Falle der ALT sogar 120 h nach

Operation wieder physiologische Werte erreicht. Dieser starke Anstieg 24 h postoperativ ist somit vermutlich durch die ligaturnahen Leberareale verursacht und spricht nicht für eine Apoptoseinduktion durch die Hepatektomie, zumal auch im Western Blot und im ELISA der Leberlysate kein *cleaved* PARP nachgewiesen werden konnte und ein durchgeführter *TUNEL*-Assay ebenfalls negativ war.

Auch wenn es sich hierbei um vorläufige Daten und eine verglichen relativ kleine Anzahl an Tieren handelt, geben sie eine deutliche Tendenz, dass die Leberregeneration bei HBV-transgenen Mäusen vermindert ist und durch die Hepatektomie keine Apoptose ausgelöst wird. Da HBV jedoch die Expression der Nrf2-/ARE-regulierten Proteine induziert [Schaedler et al., 2010] und die vorliegenden Daten eine beeinträchtigte Regeneration zeigen, scheint es sich hierbei um einen von Nrf2 unabhängigen Prozess zu handeln.

In den zukünftigen Experimenten sollten zum einen diese Ergebnisse mit einem größeren Probenumfang validiert werden und zum anderen wäre es interessant, ob es sich bei den BrdU-positiven Zellen um HBV-positive oder -negative Zellen handelt, um zu wissen, ob beide Zellen gleichermaßen auf den Regenerationsimpuls reagieren. Ein sich der vorliegenden Arbeit anschließender Versuch zur Untersuchung der Regenerationsfähigkeit von HBV-transgenen Mäusen im Vergleich zum Wildtyp nach CCl<sub>4</sub>-induzierter Leberschädigung zeigt, dass die Proliferation der Hepatozyten in HBV-transgenen Mäusen verglichen mit den C57BL/6-Kontrolltieren ebenfalls signifikant vermindert und verzögert ist [Barthel et al., 2016].

Letztendlich stehen die Ergebnisse der verzögerten beziehungsweise verminderten Leberregeneration der HBV-transgenen Tiere aber im Konsens mit dem klinischen Erscheinungsbild der chronischen Form einer HBV-Infektion, welche in 20-30 % der Fälle durch eine Leberzirrhose mit hoher Morbidität, Mortalität und einem hohen HCC-Risiko gekennzeichnet ist [Gerok et al., 2007, Diehl, 2002]

## 7 Zusammenfassung

### Interferenz des Hepatitis-B-Virus mit insulinabhängig regulierten Signalwegen

Das humane Hepatitis-B-Virus (HBV) ist ein 42 nm großes partiell doppelsträngiges DNA-Virus, das der Familie der Hepadnaviridae zugeordnet wird [Modrow et al., 2010]. Infektionen mit HBV können akute und chronische Leberentzündungen hervorrufen und gelten als einer Hauptrisikofaktoren für hepatozelluläre Karzinome (HCC), welche die häufigste Form der malignen Lebertumoren darstellen [Schaedler et al., 2010]. Eine verminderte Leberregeneration begünstigt hierbei die Entstehung einer Leberfibrose beziehungsweise -zirrhose und führt zu einem Verlust von funktionellem Leberparenchym [Lok and McMahon, 2007]. Ein wichtiger regulatorischer Faktor für die Leberregeneration ist der Transkriptionsfaktor *nuclear factor E2-related factor 2* (Nrf2). Dieser bindet an die *antioxidant response elements* (ARE)-Region verschiedener Gene und kontrolliert so die Expression von Proteinen, die für Detoxifikation und Elimination von Elektrophilen und ROS zuständig sind und liegt vermehrt in HBV-positiven Zellen vor [Nguyen et al., 2009, Schaedler et al., 2010]. Darüber hinaus konnte in Nrf2-knock-out-Mäusen nach partieller Hepatektomie eine verminderte Leberregeneration beobachtet werden. Dies ist durch einen erhöhten ROS-Spiegel bedingt, der zu einer Hemmung der insulinabhängigen Signaltransduktion führt [Beyer et al., 2008]. Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Einfluss des HBV auf die Insulin-/IGF-1-Signalkaskade und der Einfluss von Nrf2 auf die Leberregeneration in HBV-positiven Zellen untersucht werden.

Zunächst wurde die Mengen wichtiger Proteine der Insulin-Signalkaskade im Western Blot analysiert. Diese zeigten, dass in HBV-replizierenden Zellen eine signifikant höhere Menge an Insulin-Rezeptor enthalten ist, wohingegen weder die Menge des *Insulin-like-growth-factor*-Rezeptor (IGF-Rezeptors) noch des Insulinrezeptor-Substrats-1 (IRS-1) verändert ist (siehe Kapitel 5.1, Abbildung 5.1, Abbildung 5.5 und Abbildung 5.6). Die höhere Expression des Insulin-Rezeptors wurde anschließend in transient transfizierten HBV-replizierenden Zelllinien durch Immunfluoreszenzuntersuchungen bestätigt. Der Rezeptor scheint jedoch internalisiert und nicht plasmamembranassoziiert vorzuliegen (siehe Kapitel 5.1, Abbildung 5.2). Da auch die IR-mRNA-Mengen in HBV-replizierenden Zellen erhöht sind, kann von einer heraufgesetzten Expression und nicht von einer verminderten Rezeptordegradation ausgegangen werden (siehe Kapitel 5.1, Abbildung 5.3). Eine der möglichen Erklärungen hierfür wäre eine Insulin-Rezeptor-Retention durch  $\alpha$ -Taxilin, welches den intrazellulären Vesikeltransport inhibiert und in HBV-replizierenden Zellen in erhöhter Menge vorliegt [Hoffmann et al., 2013].

Aufgrund der erhöhten IR-Menge in HBV-replizierenden Zellen *in vitro* wurden diese Ergebnisse auch in *in vivo* verifiziert, sowohl durch Verwendung von HBV-transgenen Mäusen als auch durch Leberschnitte von HBV-infizierten Patienten (siehe Kapitel 5.1, Abbildung 5.4 und Kapitel 5.3.1, Abbildung 5.17).

Um mehr Informationen über die Aktivierung des Insulin-/IGF-1-Signalweges zu bekommen, wurden anschließend stabil HBV-replizierende Hepatoblastomzellen und Kontrollzellen mit Insulin und Glukoseoxidase stimuliert, um kontinuierlichen ROS durch Wasserstoffperoxid zu erzeugen (siehe Kapitel 6, Abbildung 6.1). Die Daten bestätigen, dass der Insulin-/IGF-1-Signalweg auf der Rezeptorebene sowohl in HBV-positiven als auch in HBV-negativen Zellen normal aktiviert wird. Die Aktivierung in HBV-replizierenden Zellen ist sogar höher als die in negativen Zellen, wenn gleichzeitig mit Insulin und Glukoseoxidase stimuliert wird (siehe Kapitel 5.2.1, Abbildung 5.10). Da HBV eine Aktivierung der Nrf2-/ARE-abhängig regulierter Gene bewirkt, könnte dies ein Mechanismus sein, um das Überleben der infizierten Zellen zu sichern, die Immunantwort zu modifizieren und somit die Infektion zu manifestieren [Schaedler et al., 2010].

Eine Studie mit Nrf2-*knockout*-Mäusen konnte zeigen, dass die Phosphorylierung von IRS-1 an Tyrosin als Folge einer Insulinstimulation deutlich vermindert war nach partieller Hepatektomie. Dies scheint der Grund für eine Insulinresistenz in Nrf2-*knockout*-Hepatozyten zu sein, da die IR-Phosphorylierung normal war [Beyer and Werner, 2008, Beyer et al., 2008]. Die Phosphorylierung von IRS-1 an Serin in HepAD38 und HepG2.2.15, welche mit Glukoseoxidase stimuliert wurden, ist deutlich vermindert verglichen mit HBV-negativen Zellen (siehe Kapitel 5.2.2, Abbildung 5.12). Dies zeigt einmal mehr, dass HBV-positive Zellen verglichen mit HBV-negativen Zellen weniger durch ROS beeinträchtigt werden. Die Aktivität von JNK als ein Mediator der Insulinresistenz durch Phosphorylierung von IRS-1 an Serin ist reduziert in HBV-replizierenden Zellen, obwohl mehr p-IRS-Ser vorliegt (siehe Kapitel 5.2.2, Abbildung 5.12 und Kapitel 5.2.3, Abbildung 5.14) [Beyer et al., 2008]. Dies bestärkt die Vermutung, dass mindestens eine weitere Kinase neben JNK die Phosphorylierung an IRS reguliert. Zusammenfassend konnte in HBV-replizierenden Zellen gezeigt werden, dass erhöhte ROS-Level nicht die Aktivierung des Insulin-/IGF-1-Signalweges beeinträchtigen. Jedoch könnte ROS durch das Immunsystem vor allem durch zytotoxische T-Zellen deutlich ausgeprägter *in vivo* sein. Unerwarteterweise weisen HBV-positive Zellen deutlich höhere Mengen des Insulin-Rezeptors auf, die jedoch internalisiert vorliegen. In zukünftigen Experimenten sollte untersucht werden, ob der Rezeptor wirklich normal zur Zellmembran transportiert wird oder dieser internalisiert akkumuliert und eventuell doch zu reduzierter Insulinbindung führt.

In Nrf2-*knockout* Mäusen kommt es nach partieller Hepatektomie zu einer verzögerten Leberregeneration [Beyer et al., 2008]. Deshalb war es überaus interessant zu untersuchen, ob die Leberregeneration in HBV-transgenen Mäusen ebenfalls reduziert ist im Vergleich zu C57BL/6-Kontrolltieren. Es konnte gezeigt werden, dass weibliche HBV-transgene Mäuse eine reduzierte und männliche HBV-transgene Mäuse eine verzögerte Leberregeneration verglichen zu C57BL/6-Kontrolltieren aufweisen (siehe Kapitel 5.3.4, Abbildung 5.23). Zusätzlich wurden die beiden Transaminasen ALT und AST im Serum nach Hepatektomie bestimmt, um den aufgetretenen Leberschaden zu ermitteln (siehe Kapitel 5.3.5, Abbildung 5.24 und 5.25). Die zunächst erhöhten AST- und ALT-Werte nach Hepatektomie lassen

sich vor allem auf die chirurgische Intervention zurückführen und nicht auf eine erhöhte Apoptose. Um dies zu bestätigen, wurden zusätzlich ein TUNEL-Assay und ein *cleaved*-PARP-ELISA durchgeführt. Zusammenfassend zeigen diese *in vivo*-Daten, dass eine beeinträchtigte Regeneration vorliegt, hierbei scheint sich jedoch um einen von Nrf2 unabhängigen Prozess zu handeln, da HBV die Expression der Nrf2-/ARE-regulierten Proteine induziert [Schaedler et al., 2010]. In weiteren Experimenten sollte der Probenumfang erhöht werden und es wäre interessant zu wissen, ob die BrdU-positiven Zellen HBV-positive oder negative Zellen sind. So könnte festgestellt werden, ob beide Zellen gleichermaßen auf den Regenerationsreiz der Hepatektomie reagieren. Darüber hinaus wäre es interessant zu wissen, ob eine unterschiedliche Regeneration nach CCl<sub>4</sub>-induzierter Leberschädigung erfolgt.

## 8 Abstract

### Interference of Hepatitis B Virus with insulin-dependent signaling pathways

The human hepatitis B virus (HBV) is a 42nm partially double-stranded DNA-virus belonging to the family of hepadnaviridae [Modrow et al., 2010]. Infection with HBV can cause acute or chronic inflammation of the liver and is considered to be a major etiological factor in the development of human hepatocellular carcinoma (HCC) [Schaedler et al., 2010]. A decreased level of liver regeneration promotes the development of fibrosis and liver cirrhosis leading to a loss of liver function [Lok and McMahon, 2007]. An important regulatory factor for the control of liver regeneration is the transcription factor nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2). Nrf2 binds to antioxidant response elements (ARE) and thereby triggers the expression of cytoprotective proteins [Nguyen et al., 2009, Schaedler et al., 2010]. This factor regulates the expression of antioxidant proteins important for reactive oxygen stress (ROS) detoxification and is upregulated in HBV-positive cells [Schaedler et al., 2010]. Recently, it was shown that Nrf2-deficient mice show an impaired liver regeneration due to an elevated ROS level that results in insulin and IGF resistance [Beyer et al., 2008].

In this study, the interference between HBV and insulin-dependent signaling pathways should be investigated in more detail to characterize the influence of Nrf2 on liver regeneration in HBV-positive cells.

First of all, Western-Blot-analyses, investigating the amount of key proteins of the insulin signaling pathway, showed that the level of insulin receptor in HBV-positive cells is significantly increased, whereas the insulin like growth factor receptor (IGF-1R) and the insulin receptor substrates (IRS) are not affected (see chapter 5.1, fig. 5.1, fig. 5.5 and fig. 5.6). This was confirmed by analyzing transiently transfected cells by confocal immunofluorescence microscopy. The transiently transfected cells revealed higher IR amounts compared to HBV-negative controls, but the receptor seemed to be internalized instead of plasmamembrane-associated (see chapter 5.1, fig. 5.2). Since IR-mRNA levels are increased in HBV-replicating cells, it is to be assumed that elevated IR levels are due to increased expression and not to decreased receptor degradation (see chapter 5.1, fig. 5.3). A possible explanation could be an insulin receptor retention by  $\alpha$ -taxilin, which is increased in HBV replicating cells, inhibiting the intracellular vesicular trafficking [Hoffmann et al., 2013].

Based on the higher IR amounts in HBV-positive cells *in vitro*, this data were also verified in *in vivo* models including both, HBV-transgenic mice and livers of HBV-infected patients (see chapter 5.1, fig. 5.4 and chapter 5.3.1, fig. 5.17).

In order to get more information about the activation of the insulin signaling pathway, stable HBV-expressing and HBV-negative control cells were stimulated with insulin and glucose oxidase to initiate continuous ROS via hydrogen peroxide (see chapter 6, fig. 6.1). The data confirm that the insulin signaling pathway is activated at the level of the insulin receptor in HBV-positive as well as in HBV-negative cells. Activation in HBV-positive cells is even higher if stimulated simultaneously with insulin and glucose oxidase (see chapter 5.2.1, fig. 5.10). As HBV induces a strong activation of Nrf2-/ARE-regulated genes, this might ensure survival of the infected cell, shape the immune response to HBV and thereby promotes the establishment of the infection [Schaedler et al., 2010]. A recent study in Nrf2-deficient mice showed that tyrosine phosphorylation of the IRS-1 and PI3K activation in response to insulin was inhibited in the regenerating liver after partial hepatectomy. This is most likely responsible for the insulin/IGF-1 resistance in Nrf2-deficient hepatocytes, since IR phosphorylation occurred normally [Beyer and Werner, 2008, Beyer et al., 2008]. Serine phosphorylation of IRS in glucose oxidase-treated HepAD38 and HepG2.2.15 is decreased compared to HBV-negative cells (see chapter 5.2.2, fig. 5.12). Once more this claims a minor impairment of the insulin signaling pathway in HBV-positive cells by ROS compared to HBV-negative cells. JNK is a mediator of insulin resistance by phosphorylating IRS-1 at serin and thereby inhibiting its phosphorylation at tyrosine [Beyer et al., 2008]. However, in HBV-replicating cells the activity of JNK is reduced and there is an increased amount of p-IRS-Ser (see chapter 5.2.2, fig. 5.12 and chapter 5.2.3, fig. 5.14). This indicates that another kinase besides JNK regulates IRS phosphorylation as well.

In summary, HBV induces the expression of ARE-regulated genes by activation of Nrf2 [Schaedler et al., 2010]. However, increased ROS-level in chronic HBV-infections do not impair the insulin/IGF-pathway. Nevertheless, ROS induced by an immune response especially by cytotoxic T-cells might be more pronounced *in vivo*. Unexpectedly, it could be shown that HBV expressing cells possess increased amounts of insulin-receptors. In future experiments, it should be investigated whether the receptor is properly translocated to the cell membrane or accumulates intracellularly leading to reduced insulin binding.

Nrf2-deficient mice showed a delayed liver regeneration after partial hepatectomy [Beyer et al., 2008]. Therefore, it was tempting to analyze whether liver regeneration is impaired in HBV transgenic mice as well. It was found that female HBV transgenic mice have a reduced and male HBV transgenic mice have a delayed liver regeneration compared to wild type mice (see chapter 5.3.4, fig. 5.23). In addition, serum alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase were analyzed to determine liver damage after hepatectomy (see chapter 5.3.5, fig. 5.24 and 5.25). Nevertheless, increased level of serum transferases after hepatectomy due to the surgical intervention and not to apoptosis. This was confirmed by a TUNEL Assay and a cleaved PARP ELISA. Taken together, these results indicate that impaired liver regeneration seems to be independent of Nrf2, since HBV induces expression of Nrf2-/ARE-regulated Proteins [Schaedler et al., 2010]. In future experiments, it could be investigated whether the BrdU-positive cells are HBV-positive or -negative cells and whether they respond equally to hepatectomy. Moreover, it would be interesting to see if a different regeneration of liver damage occurs after carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) treatment.

## 9 Abkürzungsverzeichnis

<b>ALT</b>	Alaninamino-Transferase	<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco 's modified eagle medium</i>
<b>APS</b>	Ammoniumperoxidsulfat	<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>ARE</b>	<i>Antioxidant response elements</i>	<b>DNase</b>	Desoxyribonuklease
<b>ASHBV</b>	<i>Arctic squirrel Hepatitis-B-Virus</i>	<b>DPBS</b>	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
<b>ASK1</b>	<i>Apoptosis signal-regulating Kinase</i>	<b>ECL</b>	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
<b>AST</b>	Aspartatamino-Transferase	<b>E. coli</b>	Escherichia coli
<b>bp</b>	Basenpaare	<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>BrdU</b>	5-Bromo-2'deoxyuridin	<b>EHR</b>	<i>Extended homology region</i>
<b>BSA</b>	Bovines Serumalbumin	<b>ELISA</b>	<i>Enzyme Linked-Immunesorbent Assay</i>
<b>BTB</b>	<i>bric-a-brac, tramtrack, broad complex</i>	<b>ER</b>	endoplasmatisches Retikulum
<b>bZIP</b>	<i>Basic Leucine Zipper Proteine</i>	<b>ERK</b>	<i>extracellular signal-regulated protein kinase</i>
<b>cccDNA</b>	<i>covalently closed circular DNA</i>	<b>FCS</b>	fetales Kälberserum
<b>cDNA</b>	komplementäre DNA	<b>GAPDH</b>	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
<b>CHBV</b>	<i>crane hepatitis-B-virus</i>	<b>GCS</b>	Glutamat-Cystein-Synthetase
<b>ChHBV</b>	<i>chimpanzee hepatitis-B-virus</i>	<b>GiHBV</b>	<i>gibbon hepatitis-B-virus</i>
<b>cLSM</b>	konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	<b>GLUT</b>	Glucosetransporter
<b>CNC</b>	'cap'n'collar'-Familie	<b>GO</b>	Glukoseoxidase
<b>CO<sub>2</sub></b>	Kohlenstoffdioxid	<b>GoHBV</b>	<i>gorilla hepatitis-B-virus</i>
<b>CTL</b>	zytotoxische T-Lymphozyten	<b>GOT</b>	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
<b>CTR</b>	C-terminale Region	<b>GPT</b>	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
<b>Cul3</b>	<i>Cullin 3-based E3 Ligase Komplex</i>	<b>GPx</b>	Gluthation Peroxidase
<b>Cy3</b>	Cyanin 3	<b>GSHBV</b>	<i>ground squirrel hepatitis-B-virus</i>
<b>Cy5</b>	Cyanin 5	<b>GSK</b>	Glykogen Synthase Kinase
<b>DAPI</b>	Diamidino-2-Phenylindol	<b>GST</b>	Glutathion-S-Transferase
<b>DEPC</b>	Diethylpyrocarbonat	<b>GTHBV</b>	<i>grey teal hepatitis-B-virus</i>
<b>DGR</b>	<i>double glycine repeat</i>	<b>HBcAg</b>	<i>hepatitis B core antigen</i>
<b>DHBV</b>	<i>duck hepatitis-B-virus</i>	<b>HBeAg</b>	<i>hepatitis B early antigen</i>

<b>HBsAG</b>	<i>hepatitis B surface antigen</i>	<b>PARP</b>	<i>Poly (ADP-ribose) polymerase</i>
<b>HBV</b>	Hepatitis-B-Virus	<b>PBS</b>	<i>Phosphate buffered Saline</i>
<b>HBx</b>	regulatorisches X-Protein	<b>PCR</b>	Polymerase Kettenreaktion
<b>HCC</b>	hepatozelluläres Karzinom	<b>PDTC</b>	Pyrrolidindithiokarbamat
<b>HE</b>	Hämatoxylin-Eosin	<b>PEG-IFN</b>	pegyliertes Interferon
<b>HHBV</b>	<i>Heron Hepatitis-B-Virus</i>	<b>PEI</b>	Polyethylenimin
<b>HO-1</b>	Hämoxygenase-1	<b>PGK</b>	Phosphoglyceratkinase
<b>HRP</b>	<i>Horseradish Peroxidase</i>	<b>pgRNA</b>	praegenomische RNA
<b>Hsp</b>	Hitzeschockproteine	<b>PH</b>	partielle Hepatektomie
<b>IF</b>	Immunfluoreszenz	<b>PI3K</b>	Phosphatidylinositol 3-Kinase
<b>IFN</b>	Interferon	<b>PKC</b>	Proteinkinase C
<b>IGF-1R</b>	<i>Insulin-like-growth-factor-1-receptor</i>	<b>PMA</b>	<i>Phorbol-12-myristat-13-acetat</i>
<b>IL</b>	Interleukin	<b>qPCR</b>	quantitative PCR
<b>IR</b>	Insulin-Rezeptor	<b>rcDNA</b>	<i>relaxed circular DNA</i>
<b>IRS</b>	Insulin-Rezeptor-Substrat	<b>RGHBV</b>	<i>Ross Goose Hepatitis-B-Virus</i>
<b>IVR</b>	<i>Intervening Region</i>	<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>JNK</b>	<i>c-jun N-terminal Kinase</i>	<b>ROS</b>	<i>reactive oxygen stress</i>
<b>kDa</b>	Kilodalton	<b>RT</b>	reverse Transkriptase
<b>Keap1</b>	<i>Kelch ECH associating protein 1</i>	<b>RT-PCR</b>	Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion
<b>LCR</b>	<i>locus control region</i>	<b>SDS-PAGE</b>	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<b>LHBs</b>	<i>Large hepatitis B surface antigen</i>	<b>SHBs</b>	<i>small hepatitis B surface antigen</i>
<b>MAPK</b>	mitogen-aktivierte Proteinkinase	<b>SHGBV</b>	<i>snow goose hepatitis-B-virus</i>
<b>MARE</b>	<i>Maf recognition element</i>	<b>SSp</b>	Spatelspitze
<b>MDHBV</b>	<i>Maned Duck Hepatitis-B-Virus</i>	<b>STHBV</b>	<i>stork hepatitis-B-virus</i>
<b>MHBs</b>	<i>middle hepatitis B surface antigen</i>	<b>TAK1</b>	<i>transforming growth factor-<math>\beta</math>-activated Kinase</i>
<b>mRNA</b>	<i>messenger RNA</i>	<b>tBHQ</b>	tert-Butylhydrochinon
<b>MRPs</b>	<i>multidrug resistance-associated proteins</i>	<b>TBST</b>	<i>Tris Buffered Saline with Tween</i>
<b>Neh2</b>	<i>Nrf2-ECHhomology 2</i>	<b>TEMED</b>	Tetramethylethylenediamin
<b>NK-Zellen</b>	natürliche Killerzellen	<b>TLM</b>	<i>translocation Motif</i>
<b>NLS</b>	<i>nuclear localisation signal</i>	<b>TNF</b>	Tumornekrosefaktor
<b>NQO1</b>	<i>NAD(P)H:Quinone Oxidoreduktase 1</i>	<b>TUNEL-Assay</b>	<i>terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end-labeling-Assay</i>
<b>Nrf2</b>	<i>nuclear factor E2-related factor 2</i>	<b>WHBV</b>	<i>woodchuck hepatitis-B-virus</i>
<b>OD</b>	optische Dichte	<b>WHO</b>	<i>World Health Organization</i>
<b>OHBV</b>	<i>orangutan hepatitis-B-virus</i>	<b>WMHBV</b>	<i>wooly monkey hepatitis-B-virus</i>
<b>ORF</b>	<i>open reading frame</i>	<b>XRE</b>	<i>xenobiotic responsive element</i>

**ZNS**                    zentrales Nervensystem

## 10 Literaturverzeichnis

- K. Ahmad. Insulin sources and types: a review of insulin in terms of its mode on diabetes mellitus. *J Tradit Chin Med*, 34(2):234–237, Apr 2014.
- L. M. Aleksunes and J. E. Manautou. Emerging role of nrf2 in protecting against hepatic and gastrointestinal disease. *Toxicol Pathol*, 35(4):459–473, Jun 2007.
- M. J. Amaya, A. G. Oliveira, E. S. Guimarães, M. C F. Casteluber, S. M. Carvalho, L. M. Andrade, M. C X. Pinto, A. Mennone, C. A. Oliveira, R. R. Resende, G. B. Menezes, M. H. Nathanson, and M F. Leite. The insulin receptor translocates to the nucleus to regulate cell proliferation in liver. *Hepatology*, 59(1):274–283, Jan 2014.
- E. Araki, M. A. Lipes, M. E. Patti, J. C. Brüning, B Haag, 3rd, R. S. Johnson, and C. R. Kahn. Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the irs-1 gene. *Nature*, 372(6502):186–190, Nov 1994.
- P. Arauz-Ruiz, H. Norder, B. H. Robertson, and L. O. Magnius. Genotype h: a new amerindian genotype of hepatitis b virus revealed in central america. *J Gen Virol*, 83(Pt 8):2059–2073, Aug 2002.
- U. auf dem Keller, M. Huber, T. A. Beyer, A. Kümin, C. Siemes, S. Braun, P. Bugnon, V. Mitropoulos, D. A. Johnson, J. A. Johnson, D. Hohl, and S. Werner. Nrf transcription factors in keratinocytes are essential for skin tumor prevention but not for wound healing. *Mol Cell Biol*, 26(10):3773–3784, May 2006.
- F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J.G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl. *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley, 2012.
- S. Banerjee, K. Saito, M. Ait-Goughoulte, K. Meyer, R. B. Ray, and R. Ray. Hepatitis c virus core protein upregulates serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 and impairs the downstream akt/protein kinase b signaling pathway for insulin resistance. *J Virol*, 82(6):2606–2612, Mar 2008.
- R. Bartenschlager, M. Junker-Niepmann, and H. Schaller. The p gene product of hepatitis b virus is required as a structural component for genomic rna encapsidation. *J Virol*, 64(11):5324–5332, Nov 1990.
- Sebastian Robert Barthel, Regina Medvedev, Thekla Heinrich, Sarah Manon Büchner, Nadja Ketterer, and Eberhard Hildt. Hepatitis b virus inhibits insulin receptor signaling and impairs liver regeneration

- via intracellular retention of the insulin receptor. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 73: 4121–4140, November 2016. ISSN 1420-9071. doi: 10.1007/s00018-016-2259-1.
- T. F. Baumert, R. Thimme, and F. von Weizsäcker. Pathogenesis of hepatitis b virus infection. *World J Gastroenterol*, 13(1):82–90, Jan 2007.
- R. P. Beasley and L. Y. Hwang. Hepatocellular carcinoma and hepatitis b virus. *Semin Liver Dis*, 4 (2):113–121, May 1984.
- R. P. Beasley, L. Y. Hwang, C. C. Lin, and C. S. Chien. Hepatocellular carcinoma and hepatitis b virus. a prospective study of 22 707 men in taiwan. *Lancet*, 2(8256):1129–1133, Nov 1981.
- J. Beck and M. Nassal. Hepatitis b virus replication. *World J Gastroenterol*, 13(1):48–64, Jan 2007.
- A. Bertoletti, A. T. Tan, and A. J. Gehring. Hbv-specific adaptive immunity. *Viruses*, 1(2):91–103, Sep 2009.
- T. A. Beyer and S. Werner. The cytoprotective nrf2 transcription factor controls insulin receptor signaling in the regenerating liver. *Cell Cycle*, 7(7):874–878, Apr 2008.
- T. A. Beyer, W. Xu, D. Teupser, U. auf dem Keller, P. Bugnon, E. Hildt, J. Thiery, Y.W. Kan, and S. Werner. Impaired liver regeneration in nrf2 knockout mice: role of ros-mediated insulin/igf-1 resistance. *EMBO J*, 27(1):212–223, Jan 2008.
- F. Böhm, U. A. Köhler, T. Speicher, and S. Werner. Regulation of liver regeneration by growth factors and cytokines. *EMBO Mol Med*, 2(8):294–305, Aug 2010.
- H. C. Birnboim and J. Doly. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid dna. *Nucleic Acids Res*, 7(6):1513–1523, Nov 1979.
- V. Blank. Small maf proteins in mammalian gene control: mere dimerization partners or dynamic transcriptional regulators? *J Mol Biol*, 376(4):913–925, Feb 2008.
- V. Blank and N. C. Andrews. The maf transcription factors: regulators of differentiation. *Trends Biochem Sci*, 22(11):437–441, Nov 1997.
- K. J. Blight, J. A. McKeating, and C. M. Rice. Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis c virus rna replication. *J Virol*, 76(24):13001–13014, Dec 2002.
- D. A. Bloom and A. K. Jaiswal. Phosphorylation of nrf2 at ser40 by protein kinase c in response to antioxidants leads to the release of nrf2 from inrf2, but is not required for nrf2 stabilization/accumulation in the nucleus and transcriptional activation of antioxidant response element-mediated nad(p)h:quinone oxidoreductase-1 gene expression. *J Biol Chem*, 278(45):44675–44682, Nov 2003.
- B. S. Blumberg. Polymorphisms of the serum proteins and the development of iso-precipitins in transfused patients. *Bull N Y Acad Med*, 40:377–386, May 1964.
- B. S. Blumberg, L. Melartin, R. A. Guint, and B. Werner. Family studies of a human serum isoantigen system (australia antigen). *Am J Hum Genet*, 18(6):594–608, Nov 1966.

- B. S. Blumberg, B. J. Gerstley, D. A. Hungerford, W. T. London, and A. I. Sutnick. A serum antigen (australia antigen) in down's syndrome, leukemia, and hepatitis. *Ann Intern Med*, 66(5):924–931, May 1967.
- B. S. Blumberg, A. I. Sutnick, and W. T. London. Australia antigen and hepatitis. *JAMA*, 207(10):1895–1896, Mar 1969.
- C. A. Bondy, H. Werner, CT Roberts, Jr, and D. LeRoith. Cellular pattern of insulin-like growth factor-i (igf-i) and type i igf receptor gene expression in early organogenesis: comparison with igf-ii gene expression. *Mol Endocrinol*, 4(9):1386–1398, Sep 1990.
- M. M. Bradford. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72:248–254, May 1976.
- B. Brandenburg, L. Stockl, C. Gutzeit, M. Roos, J. Lupberger, R. Schwartlander, H. Gelderblom, I. M. Sauer, P.H. Hofschneider, and E. Hildt. A novel system for efficient gene transfer into primary human hepatocytes via cell-permeable hepatitis b virus-like particle. *Hepatology*, 42(6):1300–1309, Dec 2005.
- S. Braun, C. Hanselmann, M. G. Gassmann, U. auf dem Keller, C. Born-Berclaz, K. Chan, Y. W. Kan, and S. Werner. Nrf2 transcription factor, a novel target of keratinocyte growth factor action which regulates gene expression and inflammation in the healing skin wound. *Mol Cell Biol*, 22(15):5492–5505, Aug 2002.
- V. Bruss. Envelopment of the hepatitis b virus nucleocapsid. *Virus Res*, 106(2):199–209, Dec 2004.
- V. Bruss. Hepatitis b virus morphogenesis. *World J Gastroenterol*, 13(1):65–73, Jan 2007.
- E H C J. Buster and H L A. Janssen. Antiviral treatment for chronic hepatitis b virus infection—immune modulation or viral suppression? *Neth J Med*, 64(6):175–185, Jun 2006.
- A. A. Butler and D. LeRoith. Minireview: tissue-specific versus generalized gene targeting of the igf1 and igf1r genes and their roles in insulin-like growth factor physiology. *Endocrinology*, 142(5):1685–1688, May 2001.
- J. Y. Chan, M. Kwong, R. Lu, J. Chang, B. Wang, T. S. Yen, and Y. W. Kan. Targeted disruption of the ubiquitous cnc-bzip transcription factor, nrf-1, results in anemia and embryonic lethality in mice. *EMBO J*, 17(6):1779–1787, Mar 1998.
- K. Chan and Y. W. Kan. Nrf2 is essential for protection against acute pulmonary injury in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(22):12731–12736, Oct 1999.
- K. Chan, R. Lu, J. C. Chang, and Y. W. Kan. Nrf2, a member of the nfe2 family of transcription factors, is not essential for murine erythropoiesis, growth, and development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(24):13943–13948, Nov 1996.
- K. Chan, X. D. Han, and Y. W. Kan. An important function of nrf2 in combating oxidative stress: detoxification of acetaminophen. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(8):4611–4616, Apr 2001.

- M. Chang. Cancer prevention by vaccination against hepatitis b. *Recent Results Cancer Res*, 181: 85–94, 2009.
- S. F. Chang, H. J. Netter, M. Bruns, R. Schneider, K. Frölich, and H. Will. A new avian hepadnavirus infecting snow geese (*anser caerulescens*) produces a significant fraction of virions containing single-stranded dna. *Virology*, 262(1):39–54, Sep 1999.
- S. F. Chang, H. J. Netter, E. Hildt, R. Schuster, S. Schaefer, Y. C. Hsu, A. Rang, and H. Will. Duck hepatitis b virus expresses a regulatory hbx-like protein from a hidden open reading frame. *J Virol*, 75(1):161–170, Jan 2001.
- I. Chemin and F. Zoulim. Hepatitis b virus induced hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett*, 286(1): 52–59, Dec 2009.
- M. T. Chen, J.-N. Billaud, M. Sällberg, L. G. Guidotti, F. V. Chisari, J. Jones, J. Hughes, and D. R. Milich. A function of the hepatitis b virus precore protein is to regulate the immune response to the core antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(41):14913–14918, Oct 2004.
- F. V. Chisari. Cytotoxic t cells and viral hepatitis. *J Clin Invest*, 99(7):1472–1477, Apr 1997.
- F. V. Chisari. Rous-whipple award lecture. viruses, immunity, and cancer: lessons from hepatitis b. *Am J Pathol*, 156(4):1117–1132, Apr 2000.
- F. V. Chisari and C. Ferrari. Hepatitis b virus immunopathology. *Springer Semin Immunopathol*, 17 (2-3):261–281, 1995.
- C.-J. Chu and A. S. F. Lok. Clinical significance of hepatitis b virus genotypes. *Hepatology*, 35(5): 1274–1276, May 2002.
- M. H. Cobb and E. J. Goldsmith. How map kinases are regulated. *J Biol Chem*, 270(25):14843–14846, Jun 1995.
- M. Cornberg and M. Manns. Leitliniengerechte therapie der hepatitis b. korrekte indikationsstellung ist die voraussetzung. *Pharmazie in unserer Zeit*, 40:45–51, 2011.
- M. Cornberg, U. Protzer, J. Petersen, H. Wedemeyer, T. Berg, W. Jilg, A. Erhardt, S. Wirth, C. Sarrazin, M. M. Dollinger, P. Schirmacher, K. Dathe, I. B. Kopp, S. Zeuzem, W. H. Gerlich, M. P. Manns, and A. W. M. F. . [prophylaxis, diagnosis and therapy of hepatitis b virus infection - the german guideline]. *Z Gastroenterol*, 49(7):871–930, Jul 2011.
- S. B. Cullinan, J. D. Gordan, J. Jin, J. W. Harper, and J. A. Diehl. The keap1-btb protein is an adaptor that bridges nrf2 to a cul3-based e3 ligase: oxidative stress sensing by a cul3-keap1 ligase. *Mol Cell Biol*, 24(19):8477–8486, Oct 2004.
- M. Dandri and S. Locarnini. New insight in the pathobiology of hepatitis b virus infection. *Gut*, 61 Suppl 1:i6–17, May 2012.
- D. S. Dane, C. H. Cameron, and M. Briggs. Virus-like particles in serum of patients with australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet*, 1(7649):695–698, Apr 1970.

- L. Daulhac, A. Kowalski-Chauvel, L. Pradayrol, N. Vaysse, and C. Seva. Src-family tyrosine kinases in activation of erk-1 and p85/p110-phosphatidylinositol 3-kinase by g/cckb receptors. *J Biol Chem*, 274(29):20657–20663, Jul 1999.
- R. de Franchis, G. Meucci, M. Vecchi, M. Tatarella, M. Colombo, E. Del Ninno, M. G. Rumi, M. F. Donato, and G. Ronchi. The natural history of asymptomatic hepatitis b surface antigen carriers. *Ann Intern Med*, 118(3):191–194, Feb 1993.
- H. E. de Vries, M. Witte, D. Hondius, A. J M. Rozemuller, B. Drukarch, J. Hoozemans, and J. van Horsen. Nrf2-induced antioxidant protection: a promising target to counteract ros-mediated damage in neurodegenerative disease? *Free Radic Biol Med*, 45(10):1375–1383, Nov 2008.
- S. Desagher, J. Glowinski, and J. Premont. Astrocytes protect neurons from hydrogen peroxide toxicity. *J Neurosci*, 16(8):2553–2562, Apr 1996.
- S. Dhakshinamoorthy and A. K. Jaiswal. Small maf (mafg and mafk) proteins negatively regulate antioxidant response element-mediated expression and antioxidant induction of the nad(p)h:quinone oxidoreductase1 gene. *J Biol Chem*, 275(51):40134–40141, Dec 2000.
- M. K. Diamond-Stanic, E. M. Marchionne, M. K. Teachey, D. E. Durazo, J. S. Kim, and E. J. Henriksen. Critical role of the transient activation of p38 mapk in the etiology of skeletal muscle insulin resistance induced by low-level in vitro oxidant stress. *Biochem Biophys Res Commun*, 405(3):439–444, Feb 2011.
- A. M. Diehl. Liver regeneration. *Front Biosci*, 7:e301–e314, Jul 2002.
- W.-X. Ding, H.-M. Ni, W. Gao, T. Yoshimori, D. B. Stolz, D. Ron, and X.-M. Yin. Linking of autophagy to ubiquitin-proteasome system is important for the regulation of endoplasmic reticulum stress and cell viability. *Am J Pathol*, 171(2):513–524, Aug 2007.
- A. T. Dinkova-Kostova, W. D. Holtzclaw, R. N. Cole, K. Itoh, N. Wakabayashi, Y. Katoh, M. Yamamoto, and P. Talalay. Direct evidence that sulfhydryl groups of keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(18):11908–11913, Sep 2002.
- A. T. Dinkova-Kostova, W. D. Holtzclaw, and N. Wakabayashi. Keap1, the sensor for electrophiles and oxidants that regulates the phase 2 response, is a zinc metalloprotein. *Biochemistry*, 44(18):6889–6899, May 2005.
- H. W. Doerr and W. H. Gerlich. *Medizinische Virologie: Grundlagen, Prävention und Therapie viraler Erkrankungen*. Thieme, 2010.
- A. L. Eggler, G. Liu, J. M. Pezzuto, R. B. van Breemen, and A. D. Mesecar. Modifying specific cysteines of the electrophile-sensing human keap1 protein is insufficient to disrupt binding to the nrf2 domain neh2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(29):10070–10075, Jul 2005.
- H. B. El-Serag. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 142(6):1264–1273.e1, May 2012.

- Henke J. Haberstroh J. Baumgartner C. Tacke S. Erhardt, W. *Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier mit Exoten, Labortieren, Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen*. Schattauer, 2011.
- European Association For The Study Of The Liver. Easl clinical practice guidelines: Management of chronic hepatitis b virus infection. *J Hepatol*, 57(1):167–185, Jul 2012.
- B. Ewringmann, A. und Glöckner. *Leitsymptome bei Hamster, Ratte, Maus und Rennmaus*. Enke, 2007.
- V. R. Fantin, Q. Wang, G. E. Lienhard, and S. R. Keller. Mice lacking insulin receptor substrate 4 exhibit mild defects in growth, reproduction, and glucose homeostasis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 278(1):E127–E133, Jan 2000.
- N. Fausto. Liver regeneration. *J Hepatol*, 32(1 Suppl):19–31, 2000.
- N. Fausto, J. S. Campbell, and K. J. Riehle. Liver regeneration. *J Hepatol*, 57(3):692–694, Sep 2012.
- L. V. Favreau and C. B. Pickett. Transcriptional regulation of the rat nad(p)h:quinone reductase gene. identification of regulatory elements controlling basal level expression and inducible expression by planar aromatic compounds and phenolic antioxidants. *J Biol Chem*, 266(7):4556–4561, Mar 1991.
- G.M. Findlay and F.O. MacCallum. Note on acute hepatitis and yellow fever immunisation. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 31:297–308, 1937.
- G.M. Findlay and F.O. MacCallum. Observation bearing on the aetiology of infectious hepatitis (so-called epidemic catarrhal jaundice). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 32:575–586, 1939.
- W. C. Forrester, C. Thompson, J. T. Elder, and M. Groudine. A developmentally stable chromatin structure in the human beta-globin gene cluster. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(5):1359–1363, Mar 1986.
- D. Ganem and A. M. Prince. Hepatitis b virus infection—natural history and clinical consequences. *N Engl J Med*, 350(11):1118–1129, Mar 2004.
- T. Geetha, C. Zheng, N. Vishwaprakash, T. L. Broderick, and J. R. Babu. Sequestosome 1/p62, a scaffolding protein, is a newly identified partner of irs-1 protein. *J Biol Chem*, 287(35):29672–29678, Aug 2012.
- J. L. Gerin, R. H. Purcell, M. D. Hoggan, P. V. Holland, and R. M. Chanock. Biophysical properties of australia antigen. *J Virol*, 4(5):763–768, Nov 1969.
- W. Gerok. [pathophysiology of chronic diarrhea]. *Praxis (Bern 1994)*, 89(41):1635–1641, Oct 2000.
- W. Gerok, C. Huber, T. Meinertz, and H. Zeidler. *Die Innere Medizin: Referenzwerk für den Facharzt*. Schattauer, 2007.
- D. Glebe and W. H. Gerlich. Neue wege der impfung gegen hepatitis b, trilaterale dfg-studie in zusammenarbeit mit medizineren in israel und palästina. *Spiegel der Forschung*, 26. Jg./Nr. 2:50–55, 2009.

- D. Glebe and S. Urban. Viral and cellular determinants involved in hepadnaviral entry. *World J Gastroenterol*, 13(1):22–38, Jan 2007.
- P. Gong and A. I. Cederbaum. Nrf2 is increased by cyp2e1 in rodent liver and hepg2 cells and protects against oxidative stress caused by cyp2e1. *Hepatology*, 43(1):144–153, Jan 2006.
- S. Grethe, J. O. Heckel, W. Rietschel, and F. T. Hufert. Molecular epidemiology of hepatitis b virus variants in nonhuman primates. *J Virol*, 74(11):5377–5381, Jun 2000.
- L. G. Guidotti and F. V. Chisari. Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. *Annu Rev Pathol*, 1:23–61, 2006.
- L. G. Guidotti, B. Matzke, H. Schaller, and F. V. Chisari. High-level hepatitis b virus replication in transgenic mice. *J Virol*, 69(10):6158–6169, Oct 1995.
- H. Guo, Y. Xiong, P. Witkowski, J. Cui, L.-J. Wang, J. Sun, R. Lara-Lemus, L. Haataja, K. Hutchison, S.-O. Shan, P. Arvan, and M. Liu. Inefficient translocation of preproinsulin contributes to pancreatic  $\beta$  cell failure and late-onset diabetes. *J Biol Chem*, 289(23):16290–16302, Jun 2014.
- H. Hahn, S. Kaufmann, T. Schulz, and S. Suerbaum. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Springer, 2009.
- E. N. Hatada, D. A. McClain, E. Potter, A. Ullrich, and J. M. Olefsky. Effects of growth and insulin treatment on the levels of insulin receptors and their mrna in hep g2 cells. *J Biol Chem*, 264(12):6741–6747, Apr 1989.
- K. H. Heermann, U. Goldmann, W. Schwartz, T. Seyffarth, H. Baumgarten, and W. H. Gerlich. Large surface proteins of hepatitis b virus containing the pre-s sequence. *J Virol*, 52(2):396–402, Nov 1984.
- E. J. Henriksen. Effects of h2o2 on insulin signaling the glucose transport system in mammalian skeletal muscle. *Methods Enzymol*, 528:269–278, 2013.
- E. J. Henriksen, M. K. Diamond-Stanic, and E. M. Marchionne. Oxidative stress and the etiology of insulin resistance and type 2 diabetes. *Free Radic Biol Med*, 51(5):993–999, Sep 2011.
- Hepatitis and More. Hepatitis b diagnostik. [www.hepatitisandmore.de](http://www.hepatitisandmore.de).
- G.M. Higgins and R.M. Anderson. Experimental pathology of the liver i. restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch. Pathol.*, 12:186–202, 1931.
- J. Hirosumi, G. Tuncman, L. Chang, C. Z. Görgün, K. T. Uysal, K. Maeda, M. Karin, and G. S. Hotamisligil. A central role for jnk in obesity and insulin resistance. *Nature*, 420(6913):333–336, Nov 2002.
- J. Hoffmann, C. Boehm, K. Himmelsbach, C. Donnerhak, H. Roettger, T. S. Weiss, D. Ploen, and E. Hildt. Identification of  $\beta$ -taxilin as an essential factor for the life cycle of hepatitis b virus. *J Hepatol*, 59(5):934–941, Nov 2013.
- J. Hu, D. Toft, D. Anselmo, and X. Wang. In vitro reconstitution of functional hepadnavirus reverse transcriptase with cellular chaperone proteins. *J Virol*, 76(1):269–279, Jan 2002.

- H. C. Huang, T. Nguyen, and C. B. Pickett. Regulation of the antioxidant response element by protein kinase c-mediated phosphorylation of nf-e2-related factor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97 (23):12475–12480, Nov 2000.
- H-C. Huang, Truyen Nguyen, and Cecil B. Pickett. Phosphorylation of nrf2 at ser-40 by protein kinase c regulates antioxidant response element-mediated transcription. *J Biol Chem*, 277(45): 42769–42774, Nov 2002.
- J. M. Hui, A. Sud, G. C. Farrell, P. Bandara, K. Byth, J. G. Kench, G. W. McCaughan, and J. George. Insulin resistance is associated with chronic hepatitis c virus infection and fibrosis progression [corrected]. *Gastroenterology*, 125(6):1695–1704, Dec 2003.
- K. Igarashi, K. Kataoka, K. Itoh, N. Hayashi, M. Nishizawa, and M. Yamamoto. Regulation of transcription by dimerization of erythroid factor nf-e2 p45 with small maf proteins. *Nature*, 367 (6463):568–572, Feb 1994.
- K. Itoh, K. Igarashi, N. Hayashi, M. Nishizawa, and M. Yamamoto. Cloning and characterization of a novel erythroid cell-derived cnc family transcription factor heterodimerizing with the small maf family proteins. *Mol Cell Biol*, 15(8):4184–4193, Aug 1995.
- K. Itoh, T. Chiba, S. Takahashi, T. Ishii, K. Igarashi, Y. Katoh, T. Oyake, N. Hayashi, K. Satoh, I. Hatayama, M. Yamamoto, and Y. Nabeshima. An nrf2/small maf heterodimer mediates the induction of phase ii detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun*, 236(2):313–322, Jul 1997.
- K. Itoh, N. Wakabayashi, Y. Katoh, T. Ishii, K. Igarashi, J. D. Engel, and M. Yamamoto. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by nrf2 through binding to the amino-terminal neh2 domain. *Genes Dev*, 13(1):76–86, Jan 1999.
- K. Itoh, N. Wakabayashi, Y. Katoh, T. Ishii, T. O'Connor, and M. Yamamoto. Keap1 regulates both cytoplasmic-nuclear shuttling and degradation of nrf2 in response to electrophiles. *Genes Cells*, 8 (4):379–391, Apr 2003.
- K. Itoh, K. I. Tong, and M. Yamamoto. Molecular mechanism activating nrf2-keap1 pathway in regulation of adaptive response to electrophiles. *Free Radic Biol Med*, 36(10):1208–1213, May 2004.
- K. Itoh, J. Mimura, and M. Yamamoto. Discovery of the negative regulator of nrf2, keap1: a historical overview. *Antioxid Redox Signal*, 13(11):1665–1678, Dec 2010.
- A. K. Jaiswal. Human nad(p)h:quinone oxidoreductase (nqo1) gene structure and induction by dioxin. *Biochemistry*, 30(44):10647–10653, Nov 1991.
- A. K. Jaiswal. Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Radic Biol Med*, 36(10):1199–1207, May 2004.
- C. Jochum and G. Gerken. [clinical features and diagnosis of hepatitis b, c and d. acute or chronic process?]. *Pharm Unserer Zeit*, 40(1):30–35, Jan 2011.

- O. Johnsen, N. Skammelsrud, L. Luna, M. Nishizawa, H. Prydz, and A. B. Kolstø. Small maf proteins interact with the human transcription factor tcf11/nrf1/lcr-f1. *Nucleic Acids Res*, 24(21): 4289–4297, Nov 1996.
- H. G. Joost and B. Thorens. The extended glut-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members (review). *Mol Membr Biol*, 18(4):247–256, 2001.
- M. R. Junttila, S.-P. Li, and J. Westermarck. Phosphatase-mediated crosstalk between mapk signaling pathways in the regulation of cell survival. *FASEB J*, 22(4):954–965, Apr 2008.
- Y. Kaburagi, T. Yamauchi, R. Yamamoto-Honda, K. Ueki, K. Tobe, Y. Akanuma, Y. Yazaki, and T. Kadowaki. The mechanism of insulin-induced signal transduction mediated by the insulin receptor substrate family. *Endocr J*, 46 Suppl:S25–S34, Mar 1999.
- C. R. Kahn. The molecular mechanism of insulin action. *Annu Rev Med*, 36:429–451, 1985.
- C. R. Kahn and M. F. White. The insulin receptor and the molecular mechanism of insulin action. *J Clin Invest*, 82(4):1151–1156, Oct 1988.
- K. W. Kang, J. H. Ryu, and S. G. Kim. The essential role of phosphatidylinositol 3-kinase and of p38 mitogen-activated protein kinase activation in the antioxidant response element-mediated rgsta2 induction by decreased glutathione in h4iie hepatoma cells. *Mol Pharmacol*, 58(5):1017–1025, Nov 2000.
- M.-I. Kang, A. Kobayashi, N. Wakabayashi, S.-G. Kim, and M. Yamamoto. Scaffolding of keap1 to the actin cytoskeleton controls the function of nrf2 as key regulator of cytoprotective phase 2 genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(7):2046–2051, Feb 2004.
- M. Kann, X. Lu, and W. H. Gerlich. Recent studies on replication of hepatitis b virus. *J Hepatol*, 22 (1 Suppl):9–13, 1995.
- S. Karim, D. H. Adams, and P. F. Lalor. Hepatic expression and cellular distribution of the glucose transporter family. *World J Gastroenterol*, 18(46):6771–6781, Dec 2012.
- D. Kasai, T. Adachi, L. Deng, M. Nagano-Fujii, K. Sada, M. Ikeda, N. Kato, Y.-H. Ide, I. Shoji, and H. Hotta. Hcv replication suppresses cellular glucose uptake through down-regulation of cell surface expression of glucose transporters. *J Hepatol*, 50(5):883–894, May 2009.
- M. Kasuga, C. R. Kahn, J. A. Hedo, E. Van Obberghen, and K. M. Yamada. Insulin-induced receptor loss in cultured human lymphocytes is due to accelerated receptor degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78(11):6917–6921, Nov 1981.
- M. Kasuga, J. A. Hedo, K. M. Yamada, and C. R. Kahn. The structure of insulin receptor and its subunits. evidence for multiple nonreduced forms and a 210,000 possible proreceptor. *J Biol Chem*, 257(17):10392–10399, Sep 1982.
- K. Kataoka, M. Noda, and M. Nishizawa. Maf nuclear oncoprotein recognizes sequences related to an ap-1 site and forms heterodimers with both fos and jun. *Mol Cell Biol*, 14(1):700–712, Jan 1994.

- K. Kataoka, K. Igarashi, K. Itoh, K. T. Fujiwara, M. Noda, M. Yamamoto, and M. Nishizawa. Small maf proteins heterodimerize with fos and may act as competitive repressors of the nf-e2 transcription factor. *Mol Cell Biol*, 15(4):2180–2190, Apr 1995.
- M. N. Khan, G. Baquiran, C. Brule, J. Burgess, B. Foster, J. J. Bergeron, and B. I. Posner. Internalization and activation of the rat liver insulin receptor kinase in vivo. *J Biol Chem*, 264(22):12931–12940, Aug 1989.
- Y. Kido, D. J. Burks, D. Withers, J. C. Bruning, C. R. Kahn, M. F. White, and D. Accili. Tissue-specific insulin resistance in mice with mutations in the insulin receptor, irs-1, and irs-2. *J Clin Invest*, 105(2):199–205, Jan 2000.
- K. J. Kim, K. H. Kim, and J.H. Cheong. Hepatitis b virus x protein impairs hepatic insulin signaling through degradation of irs1 and induction of socs3. *PLoS One*, 5(3):e8649, 2010.
- B. B. Knowles, C. C. Howe, and D. P. Aden. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis b surface antigen. *Science*, 209(4455):497–499, Jul 1980.
- A. Kobayashi, M.-I. Kang, H. Okawa, M. Ohtsuji, Y. Zenke, T. Chiba, K. Igarashi, and M. Yamamoto. Oxidative stress sensor keap1 functions as an adaptor for cul3-based e3 ligase to regulate proteasomal degradation of nrf2. *Mol Cell Biol*, 24(16):7130–7139, Aug 2004.
- A. Kobayashi, M.-I. Kang, Y. Watai, K. I. Tong, T. Shibata, K. Uchida, and M. Yamamoto. Oxidative and electrophilic stresses activate nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of keap1. *Mol Cell Biol*, 26(1):221–229, Jan 2006.
- M. Komatsu, S. Kageyama, and Y. Ichimura. p62/sqstm1/a170: physiology and pathology. *Pharmacol Res*, 66(6):457–462, Dec 2012.
- A. D. Kraft, D. A. Johnson, and J. A. Johnson. Nuclear factor e2-related factor 2-dependent antioxidant response element activation by tert-butylhydroquinone and sulforaphane occurring preferentially in astrocytes conditions neurons against oxidative insult. *J Neurosci*, 24(5):1101–1112, Feb 2004.
- Emmerich I. Hein J. Kraft, W. *Dosierungsvorschläge für Arzneimittel bei Kleinnagern, Kaninchen und Frettchen*. Schattauer, 2011.
- W. Kraft and U. Dürr. *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin*. Schattauer, 2005.
- M. N. Krupp and M. D. Lane. Evidence for different pathways for the degradation of insulin and insulin receptor in the chick liver cell. *J Biol Chem*, 257(3):1372–1377, Feb 1982.
- V. Kumar, A.K. Abbas, N. Fausto, and J. Aster. *Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease 8th edition*. Saunders, 2009.
- S. K. Ladner, M. J. Otto, C. S. Barker, K. Zaifert, G. H. Wang, J. T. Guo, C. Seeger, and R. W. King. Inducible expression of human hepatitis b virus (hbv) in stably transfected hepatoblastoma cells: a novel system for screening potential inhibitors of hbv replication. *Antimicrob Agents Chemother*, 41(8):1715–1720, Aug 1997.

- U. K. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature*, 227(5259):680–685, Aug 1970.
- R. E. Lanford, D. Chavez, K. M. Brasky, RB Burns, 3rd, and R. Rico-Hesse. Isolation of a hepadnavirus from the woolly monkey, a new world primate. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(10):5757–5761, May 1998.
- A. Lau, N. F. Villeneuve, Z. Sun, P. K. Wong, and D. D. Zhang. Dual roles of nrf2 in cancer. *Pharmacol Res*, 58(5-6):262–270, 2008.
- D. Lavanchy. Worldwide epidemiology of hbv infection, disease burden, and vaccine prevention. *J Clin Virol*, 34 Suppl 1:S1–S3, Dec 2005.
- J. M. Lee, J. M. Hanson, W. A. Chu, and J. A. Johnson. Phosphatidylinositol 3-kinase, not extracellular signal-regulated kinase, regulates activation of the antioxidant-responsive element in imr-32 human neuroblastoma cells. *J Biol Chem*, 276(23):20011–20016, Jun 2001.
- J.-M. Lee, M. J. Calkins, K. Chan, Y. W. Kan, and J. A. Johnson. Identification of the nf-e2-related factor-2-dependent genes conferring protection against oxidative stress in primary cortical astrocytes using oligonucleotide microarray analysis. *J Biol Chem*, 278(14):12029–12038, Apr 2003.
- S. E. Leney and J. M. Tavaré. The molecular basis of insulin-stimulated glucose uptake: signalling, trafficking and potential drug targets. *J Endocrinol*, 203(1):1–18, Oct 2009.
- D. LeRoith and C. T. Roberts, Jr. The insulin-like growth factor system and cancer. *Cancer Lett*, 195(2):127–137, Jun 2003.
- D. LeRoith, H. Werner, D. Beitner-Johnson, and CT Roberts, Jr. Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor i receptor. *Endocr Rev*, 16(2):143–163, Apr 1995.
- B. S. Levene, C. und Blumberg. Additional specificities of australia antigen and the possible identification of hepatitis carriers. *Nature*, 221(5176):195–196, Jan 1969.
- L. Li, R.J. Dixon, X. Gu, and J.E. Newbold. Comparison of the sequences of the grey teal, maned duck and duck hepatitis b viruses. in the molecular biology of hepatitis b virus. *University of California San Diego*, 1998.
- W. Li, S. Yu, T. Liu, J.-H. Kim, V. Blank, H. Li, and A.-N. T. Kong. Heterodimerization with small maf proteins enhances nuclear retention of nrf2 via masking the neszip motif. *Biochim Biophys Acta*, 1783(10):1847–1856, Oct 2008.
- J. Lin, R. M. Adam, E. Santiestevan, and M. R. Freeman. The phosphatidylinositol 3'-kinase pathway is a dominant growth factor-activated cell survival pathway in Incap human prostate carcinoma cells. *Cancer Res*, 59(12):2891–2897, Jun 1999.
- S. Locarnini and F. Zoulim. Molecular genetics of hbv infection. *Antivir Ther*, 15 Suppl 3:3–14, 2010.
- A. S F. Lok and B. J. McMahon. Chronic hepatitis b. *Hepatology*, 45(2):507–539, Feb 2007.

- W. T. London, M. Di Figlia, A. Sutnick, and B. S. Blumberg. An epidemic of hepatitis in a chronic-hemodialysis unit. Australia antigen and differences in host response. *N Engl J Med*, 281(11): 571–578, Sep 1969a.
- W. T. London, A. I. Sutnick, and B. S. Blumberg. Australia antigen and acute viral hepatitis. *Ann Intern Med*, 70(1):55–59, Jan 1969b.
- J. Lucifora, S. Arzberger, D. Durantel, L. Belloni, M. Strubin, M. Levrero, F. Zoulim, O. Hantz, and U. Protzer. Hepatitis b virus x protein is essential to initiate and maintain virus replication after infection. *J Hepatol*, 55(5):996–1003, Nov 2011.
- J. Lucifora, Y. Xia, F. Reisinger, K. Zhang, D. Stadler, X. Cheng, M. F. Sprinzl, H. Koppensteiner, Z. Makowska, T. Volz, C. Remouchamps, W.-M. Chou, W. E. Thasler, N. Hüser, D. Durantel, T. J. Liang, C. Münk, M. H. Heim, J. L. Browning, E. Dejardin, M. Dandri, M. Schindler, M. Heikenwalder, and U. Protzer. Specific and nonhepatotoxic degradation of nuclear hepatitis b virus cccDNA. *Science*, 343(6176):1221–1228, Mar 2014.
- R. Lucius and J. Sievers. Postnatal retinal ganglion cells in vitro: protection against reactive oxygen species (ros)-induced axonal degeneration by cocultured astrocytes. *Brain Res*, 743(1-2):56–62, Dec 1996.
- J. Lupberger and E. Hildt. Hepatitis b virus-induced oncogenesis. *World J Gastroenterol*, 13(1):74–81, Jan 2007.
- J. Lupberger, S. Schaedler, A. Peiran, and E. Hildt. Identification and characterization of a novel bipartite nuclear localization signal in the hepatitis b virus polymerase. *World J Gastroenterol*, 19(44):8000–8010, Nov 2013.
- Y. Ma, J. Yu, H. L. Y. Chan, Y.-C. Chen, H. Wang, Y. Chen, C.-Y. Chan, M. Y. Y. Go, S. Tsai, S.-M. Ngai, K.-F. To, J. H. M. Tong, Q.-Y. He, J. J. Y. Sung, H.-F. Kung, C. H. K. Cheng, and M.-I. He. Glucose-regulated protein 78 is an intracellular antiviral factor against hepatitis b virus. *Mol Cell Proteomics*, 8(11):2582–2594, Nov 2009.
- S. Manley, J. A. Williams, and W.-X. Ding. Role of p62/sqstm1 in liver physiology and pathogenesis. *Exp Biol Med (Maywood)*, 238(5):525–538, May 2013.
- S. A. Mao, J. M. Glorioso, and S. L. Nyberg. Liver regeneration. *Transl Res*, 163(4):352–362, Apr 2014.
- M. G. Marini, K. Chan, L. Casula, Y. W. Kan, A. Cao, and P. Moi. hmaf, a small human transcription factor that heterodimerizes specifically with nrf1 and nrf2. *J Biol Chem*, 272(26):16490–16497, Jun 1997.
- P. L. Marion, L. S. Oshiro, D. C. Regnery, G. H. Scullard, and W. S. Robinson. A virus in beechey ground squirrels that is related to hepatitis b virus of humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77(5): 2941–2945, May 1980.
- W. S. Mason, G. Seal, and J. Summers. Virus of pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis b virus. *J Virol*, 36(3):829–836, Dec 1980.

- S. Mauss, T. Berg, J. Rockstroh, C. Sarrazin, and H. Wedemeyer. *Hepatology - A clinical Textbook*. Druckhaus Süd, 2012.
- B. J. McMahon, W. L. Alward, D. B. Hall, W. L. Heyward, T. R. Bender, D. P. Francis, and J. E. Maynard. Acute hepatitis b virus infection: relation of age to the clinical expression of disease and subsequent development of the carrier state. *J Infect Dis*, 151(4):599–603, Apr 1985.
- M. McMahon, K. Itoh, M. Yamamoto, S. A. Chanas, C. J. Henderson, L. I. McLellan, C. R. Wolf, C. Cavin, and J. D. Hayes. The cap'n'collar basic leucine zipper transcription factor nrf2 (nf-e2 p45-related factor 2) controls both constitutive and inducible expression of intestinal detoxification and glutathione biosynthetic enzymes. *Cancer Res*, 61(8):3299–3307, Apr 2001.
- M. Melegari, S. K. Wolf, and R. J. Schneider. Hepatitis b virus dna replication is coordinated by core protein serine phosphorylation and hbx expression. *J Virol*, 79(15):9810–9820, Aug 2005.
- K. Miksits and H. Hahn. *Basiswissen medizinische Mikrobiologie und Infektionologie*. Springer, 2008.
- I. Millman, V. Zavatone, B. J. Gerstley, and B. S. Blumberg. Australia antigen detected in the nuclei of liver cells of patients with viral hepatitis by the fluorescent antibody technic. *Nature*, 222(5189):181–184, Apr 1969.
- I. Millman, W. T. London, A. I. Sutnick, and B. S. Blumberg. Australia antigen-antibody complexes. *Nature*, 226(5240):83–84, Apr 1970a.
- I. Millman, JF Ziegenfuss, Jr, V. Raunio, W. T. London, A. I. Sutnick, and B. S. Blumberg. The production of antibodies to australia antigen in mouse ascites fluid. *Proc Soc Exp Biol Med*, 133(4):1426–1431, Apr 1970b.
- C. Mitchell and H. Willenbring. A reproducible and well-tolerated method for 2/3 partial hepatectomy in mice. *Nat Protoc*, 3(7):1167–1170, 2008.
- S. Modrow, D. Falke, U. Truyen, and H. Schätzl. *Molekulare Virologie*. Spektrum, 2010.
- M. C. Moore, K. C. Coate, J. J. Winnick, Z. An, and A. D. Cherrington. Regulation of hepatic glucose uptake and storage in vivo. *Adv Nutr*, 3(3):286–294, May 2012.
- H. Motohashi and M. Yamamoto. Nrf2-keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends Mol Med*, 10(11):549–557, Nov 2004.
- H. Motohashi, F. Katsuoka, J. A. Shavit, J. D. Engel, and M. Yamamoto. Positive or negative mare-dependent transcriptional regulation is determined by the abundance of small maf proteins. *Cell*, 103(6):865–875, Dec 2000.
- H. Motohashi, T. O'Connor, F. Katsuoka, J. D. Engel, and M. Yamamoto. Integration and diversity of the regulatory network composed of maf and cnc families of transcription factors. *Gene*, 294(1-2):1–12, Jul 2002.
- D. Muir, S. Varon, and M. Manthorpe. An enzyme-linked immunosorbent assay for bromodeoxyuridine incorporation using fixed microcultures. *Anal Biochem*, 185(2):377–382, Mar 1990.

- M. Mulisch and U. Welsch. *Romeis Mikroskopische Technik*. Spektrum Akademischer Verlag, 2010.
- M. Nassal. Hepatitis b viruses: reverse transcription a different way. *Virus Res*, 134(1-2):235–249, Jun 2008.
- H. Naumann, S. Schaefer, C. F. Yoshida, A. M. Gaspar, R. Repp, and W. H. Gerlich. Identification of a new hepatitis b virus (hbv) genotype from brazil that expresses hbv surface antigen subtype adw4. *J Gen Virol*, 74 ( Pt 8):1627–1632, Aug 1993.
- C. Neuveut, Y. Wei, and M. A. Buendia. Mechanisms of hbv-related hepatocarcinogenesis. *J Hepatol*, 52(4):594–604, Apr 2010.
- J. E. Newbold, H. Xin, M. Tencza, G. Sherman, J. Dean, S. Bowden, and S. Locarnini. The covalently closed duplex form of the hepadnavirus genome exists in situ as a heterogeneous population of viral minichromosomes. *J Virol*, 69(6):3350–3357, Jun 1995.
- T. Nguyen, H. C. Huang, and C. B. Pickett. Transcriptional regulation of the antioxidant response element. activation by nrf2 and repression by mafk. *J Biol Chem*, 275(20):15466–15473, May 2000.
- T. Nguyen, P. J. Sherratt, H.-C. Huang, C. S. Yang, and C. B. Pickett. Increased protein stability as a mechanism that enhances nrf2-mediated transcriptional activation of the antioxidant response element. degradation of nrf2 by the 26 s proteasome. *J Biol Chem*, 278(7):4536–4541, Feb 2003a.
- T. Nguyen, P. J. Sherratt, and C. B. Pickett. Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 43:233–260, 2003b.
- T. Nguyen, C. S. Yang, and C. B. Pickett. The pathways and molecular mechanisms regulating nrf2 activation in response to chemical stress. *Free Radic Biol Med*, 37(4):433–441, Aug 2004.
- T. Nguyen, P. Nioi, and C. B. Pickett. The nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J Biol Chem*, 284(20):13291–13295, May 2009.
- M. Nishizawa, K. Kataoka, N. Goto, K. T. Fujiwara, and S. Kawai. v-maf, a viral oncogene that encodes a "leucine zipper" motif. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(20):7711–7715, Oct 1989.
- S. K. Niture, J. W. Kaspar, J. Shen, and A. K. Jaiswal. Nrf2 signaling and cell survival. *Toxicol Appl Pharmacol*, 244(1):37–42, Apr 2010.
- H. Norder, B. Hammas, S. Löfdahl, A. M. Couroucé, and L. O. Magnius. Comparison of the amino acid sequences of nine different serotypes of hepatitis b surface antigen and genomic classification of the corresponding hepatitis b virus strains. *J Gen Virol*, 73 ( Pt 5):1201–1208, May 1992.
- H. Norder, A. M. Couroucé, and L. O. Magnius. Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis b virus, four of which represent two new genotypes. *Virology*, 198(2):489–503, Feb 1994.
- H. Norder, J. W. Ebert, H. A. Fields, I. K. Mushahwar, and L. O. Magnius. Complete sequencing of a gibbon hepatitis b virus genome reveals a unique genotype distantly related to the chimpanzee hepatitis b virus. *Virology*, 218(1):214–223, Apr 1996.

- H. Norder, A.-M. Couroucé, P. Coursaget, J. M. Echevarria, S.-D. Lee, I. K. Mushahwar, B. H. Robertson, S. Locarnini, and L. O. Magnius. Genetic diversity of hepatitis b virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and hbsag subtypes. *Intervirology*, 47(6):289–309, 2004.
- H. Okamoto, F. Tsuda, H. Sakugawa, R. I. Sastrosoewignjo, M. Imai, Y. Miyakawa, and M. Mayumi. Typing hepatitis b virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol*, 69 ( Pt 10):2575–2583, Oct 1988.
- T. Oyake, K. Itoh, H. Motohashi, N. Hayashi, H. Hoshino, M. Nishizawa, M. Yamamoto, and K. Igarashi. Bach proteins belong to a novel family of btb-basic leucine zipper transcription factors that interact with mafk and regulate transcription through the nf-e2 site. *Mol Cell Biol*, 16(11): 6083–6095, Nov 1996.
- N. Papavramidou, E. Fee, and H. Christopoulou-Aletra. Jaundice in the hippocratic corpus. *J Gastrointest Surg*, 11(12):1728–1731, Dec 2007.
- D. M. Parkin. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer*, 118(12):3030–3044, Jun 2006.
- M. Parola and G. Robino. Oxidative stress-related molecules and liver fibrosis. *J Hepatol*, 35(2): 297–306, Aug 2001.
- V. Paziienza, S. Clément, P. Pugnale, S. Conzelman, M. Foti, A. Mangia, and F. Negro. The hepatitis c virus core protein of genotypes 3a and 1b downregulates insulin receptor substrate 1 through genotype-specific mechanisms. *Hepatology*, 45(5):1164–1171, May 2007.
- James A. Perkins. Medical and scientific illustrations. <https://people.rit.edu/japfaa/>, 2002.
- D. H. Perlman, E. A. Berg, P. B. O’connor, C. E. Costello, and J. Hu. Reverse transcription-associated dephosphorylation of hepadnavirus nucleocapsids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(25):9020–9025, Jun 2005.
- J. E. Pessin and A. R. Saltiel. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J Clin Invest*, 106(2):165–169, Jul 2000.
- W. Pieper. *Innere Medizin*. Springer, 2006.
- A. Prassolov, H. Hohenberg, T. Kalinina, C. Schneider, L. Cova, O. Krone, K. Frölich, H. Will, and H. Sirma. New hepatitis b virus of cranes that has an unexpected broad host range. *J Virol*, 77(3): 1964–1976, Feb 2003.
- T. Primiano, T. R. Sutter, and T. W. Kensler. Antioxidant-inducible genes. *Adv Pharmacol*, 38: 293–328, 1997.
- A. M. Prince. Relation of australia and sh antigens. *Lancet*, 2(7565):462–463, Aug 1968.
- U. Protzer, M. K. Maini, and P. A. Knolle. Living in the liver: hepatic infections. *Nat Rev Immunol*, 12(3):201–213, Mar 2012.
- O. Puig and R. Tjian. Transcriptional feedback control of insulin receptor by dfoxo/foxo1. *Genes Dev*, 19(20):2435–2446, Oct 2005.

- I. Pult, H. J. Netter, M. Bruns, A. Prassolov, H. Sirma, H. Hohenberg, S. F. Chang, K. Frölich, O. Krone, E. F. Kaleta, and H. Will. Identification and analysis of a new hepadnavirus in white storks. *Virology*, 289(1):114–128, Oct 2001.
- B. Rabe, A. Vlachou, N. Panté, A. Helenius, and M. Kann. Nuclear import of hepatitis b virus capsids and release of the viral genome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(17):9849–9854, Aug 2003.
- M. Raman, W. Chen, and M. H. Cobb. Differential regulation and properties of mapks. *Oncogene*, 26(22):3100–3112, May 2007.
- M. Ramos-Gomez, M. K. Kwak, P. M. Dolan, K. Itoh, M. Yamamoto, P. Talalay, and T. W. Kensler. Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in nrf2 transcription factor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(6):3410–3415, Mar 2001.
- Iowa State University Laboratory Animal Resources. Normal values in the mouse. 2008.
- C. River. C57bl/6 mouse biochemistry. [www.criver.com](http://www.criver.com), 2012.
- RKI. Epidemiologisches bulletin nr. 1. 2012.
- W. S. Robinson. The genome of hepatitis b virus. *Annu Rev Microbiol*, 31:357–377, 1977.
- G. V. Ronnett, V. P. Knutson, and M. D. Lane. Insulin-induced down-regulation of insulin receptors in 3t3-l1 adipocytes. altered rate of receptor inactivation. *J Biol Chem*, 257(8):4285–4291, Apr 1982.
- P. Rorsman and M. Braun. Regulation of insulin secretion in human pancreatic islets. *Annu Rev Physiol*, 75:155–179, 2013.
- D. G. Rouiller and P. Gorden. Homologous down-regulation of the insulin receptor is associated with increased receptor biosynthesis in cultured human lymphocytes (im-9 line). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(1):126–130, Jan 1987.
- T. H. Rushmore and C. B. Pickett. Transcriptional regulation of the rat glutathione s-transferase ya subunit gene. characterization of a xenobiotic-responsive element controlling inducible expression by phenolic antioxidants. *J Biol Chem*, 265(24):14648–14653, Aug 1990.
- T. H. Rushmore, R. G. King, K. E. Paulson, and C. B. Pickett. Regulation of glutathione s-transferase ya subunit gene expression: identification of a unique xenobiotic-responsive element controlling inducible expression by planar aromatic compounds. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(10):3826–3830, May 1990.
- T. H. Rushmore, M. R. Morton, and C. B. Pickett. The antioxidant responsive element. activation by oxidative stress and identification of the dna consensus sequence required for functional activity. *J Biol Chem*, 266(18):11632–11639, Jun 1991.
- A. R. Saltiel and C. R. Kahn. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, 414(6865):799–806, Dec 2001.
- S. Schaedler, J. Krause, K. Himmelsbach, M. Carvajal-Yepes, F. Lieder, K. Klingel, M. Nassal, T. S. Weiss, S. Werner, and E. Hildt. Hepatitis b virus induces expression of antioxidant response element-regulated genes by activation of nrf2. *J Biol Chem*, 285(52):41074–41086, Dec 2010.

- S. Schaefer. Hepatitis b virus taxonomy and hepatitis b virus genotypes. *World J Gastroenterol*, 13 (1):14–21, Jan 2007.
- S. Schädler and E. Hildt. Hbv life cycle: entry and morphogenesis. *Viruses*, 1(2):185–209, Sep 2009.
- P. Schirmacher, W. E. Fleig, H. P. Dienes, and Deutsche Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) Kompetenznetz Hepatitis (HepNet) , Deutsche Gesellschaft für Pathologie (D. G. P). [biopsy diagnosis of chronic hepatitis]. *Z Gastroenterol*, 42(2):175–185, Feb 2004.
- R. Schuster, E. Hildt, S.-F. Chang, O. Terradillos, T. Pollicino, R. Lanford, W. H. Gerlich, H. Will, and S. Schaefer. Conserved transactivating and pro-apoptotic functions of hepadnaviral x protein in ortho- and avihepadnaviruses. *Oncogene*, 21(43):6606–6613, Sep 2002.
- Robert F. Schwabe and David A. Brenner. Mechanisms of liver injury. i. tnf-alpha-induced liver injury: role of ikk, jnk, and ros pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 290(4):G583–G589, Apr 2006.
- C. Seeger and W. S. Mason. Hepatitis b virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev*, 64(1):51–68, Mar 2000.
- C. Seeger, W.S. Mason, and F. Zoulim. *Fields Virology, 5th Edition*. Lippincott Williams & Wilkins, 2006.
- E. Seki, D. A. Brenner, and M. Karin. A liver full of jnk: signaling in regulation of cell function and disease pathogenesis, and clinical approaches. *Gastroenterology*, 143(2):307–320, Aug 2012.
- M. A. Sells, M. L. Chen, and G. Acs. Production of hepatitis b virus particles in hep g2 cells transfected with cloned hepatitis b virus dna. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(4):1005–1009, Feb 1987.
- G. Sesti, M. Federici, M. L. Hribal, D. Lauro, P. Sbraccia, and R. Lauro. Defects of the insulin receptor substrate (irs) system in human metabolic disorders. *FASEB J*, 15(12):2099–2111, Oct 2001.
- G. Shen, V. Hebbar, S. Nair, C. Xu, W. Li, W. Lin, Y.-S. Keum, J. Han, M. A. Gallo, and A.-N. T. Kong. Regulation of nrf2 transactivation domain activity. the differential effects of mitogen-activated protein kinase cascades and synergistic stimulatory effect of raf and creb-binding protein. *J Biol Chem*, 279(22):23052–23060, May 2004.
- D. Shouval, H. Roggendorf, and M. Roggendorf. Enhanced immune response to hepatitis b vaccination through immunization with a pre-s1/pre-s2/s vaccine. *Med Microbiol Immunol*, 204(1):57–68, Feb 2015.
- K. Siddle. Molecular basis of signaling specificity of insulin and igf receptors: neglected corners and recent advances. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 3:34, 2012.
- P. Singh, J. M. Alex, and F. Bast. Insulin receptor (ir) and insulin-like growth factor receptor 1 (igf-1r) signaling systems: novel treatment strategies for cancer. *Med Oncol*, 31(1):805, Jan 2014.
- R. Sprengel, E. F. Kaleta, and H. Will. Isolation and characterization of a hepatitis b virus endemic in herons. *J Virol*, 62(10):3832–3839, Oct 1988.

- C. E. Stevens, R. P. Beasley, J. Tsui, and W. C. Lee. Vertical transmission of hepatitis b antigen in taiwan. *N Engl J Med*, 292(15):771–774, Apr 1975.
- L. Stoeckl, A. Funk, A. Kopitzki, B. Brandenburg, S. Oess, H. Will, H. Sirma, and E. Hildt. Identification of a structural motif crucial for infectivity of hepatitis b viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(17):6730–6734, Apr 2006.
- L. Stuyver, S. De Gendt, C. Van Geyt, F. Zoulim, M. Fried, R. F. Schinazi, and R. Rossau. A new genotype of hepatitis b virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol*, 81(Pt 1):67–74, Jan 2000.
- J. Summers, J. M. Smolec, and R. Snyder. A virus similar to human hepatitis b virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 75(9):4533–4537, Sep 1978.
- Z. Sun, S. Zhang, J. Y. Chan, and D. D. Zhang. Keap1 controls postinduction repression of the nrf2-mediated antioxidant response by escorting nuclear export of nrf2. *Mol Cell Biol*, 27(18):6334–6349, Sep 2007.
- P. Talalay, A. T. Dinkova-Kostova, and W. D. Holtzclaw. Importance of phase 2 gene regulation in protection against electrophile and reactive oxygen toxicity and carcinogenesis. *Adv Enzyme Regul*, 43:121–134, 2003.
- H. Tamemoto, T. Kadowaki, K. Tobe, T. Yagi, H. Sakura, T. Hayakawa, Y. Terauchi, K. Ueki, Y. Kaburagi, and S. Satoh. Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature*, 372(6502):182–186, Nov 1994.
- K. P. Tan, M. Yang, and S. Ito. Activation of nuclear factor (erythroid-2 like) factor 2 by toxic bile acids provokes adaptive defense responses to enhance cell survival at the emergence of oxidative stress. *Mol Pharmacol*, 72(5):1380–1390, Nov 2007.
- K. Tatematsu, Y. Tanaka, F. Kurbanov, F. Sugauchi, S. Mano, T. Maeshiro, T. Nakayoshi, M. Wakuta, Y. Miyakawa, and M. Mizokami. A genetic variant of hepatitis b virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a japanese patient and provisionally assigned to new genotype j. *J Virol*, 83(20):10538–10547, Oct 2009.
- R. Taub. Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5(10):836–847, Oct 2004.
- C. A. Telakowski-Hopkins, R. G. King, and C. B. Pickett. Glutathione s-transferase ya subunit gene: identification of regulatory elements required for basal level and inducible expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(4):1000–1004, Feb 1988.
- P. Testut, C. A. Renard, O. Terradillos, L. Vitvitski-Trepo, F. Tekaia, C. Degott, J. Blake, B. Boyer, and M. A. Buendia. A new hepadnavirus endemic in arctic ground squirrels in alaska. *J Virol*, 70(7):4210–4219, Jul 1996.
- R. Thimme and H. E. Blum. [therapy of hepatitis b]. *Praxis (Bern 1994)*, 95(36):1383–1388, Sep 2006.

- R. Thimme, S. Wieland, C. Steiger, J. Ghrayeb, K. A. Reimann, R. H. Purcell, and F. V. Chisari. Cd8(+) t cells mediate viral clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis b virus infection. *J Virol*, 77(1):68–76, Jan 2003.
- H. L. Tillmann, J. Hadem, L. Leifeld, K. Zachou, A. Canbay, C. Eisenbach, I. Graziadei, J. Encke, H. Schmidt, W. Vogel, A. Schneider, U. Spengler, G. Gerken, G. N. Dalekos, H. Wedemeyer, and M. P. Manns. Safety and efficacy of lamivudine in patients with severe acute or fulminant hepatitis b, a multicenter experience. *J Viral Hepat*, 13(4):256–263, Apr 2006.
- K. I. Tong, Y. Katoh, H. Kusunoki, K. Itoh, T. Tanaka, and M. Yamamoto. Keap1 recruits neh2 through binding to etge and dlq motifs: characterization of the two-site molecular recognition model. *Mol Cell Biol*, 26(8):2887–2900, Apr 2006a.
- K. I. Tong, A. Kobayashi, F. Katsuoka, and M. Yamamoto. Two-site substrate recognition model for the keap1-nrf2 system: a hinge and latch mechanism. *Biol Chem*, 387(10-11):1311–1320, 2006b.
- H. Towbin, T. Staehelin, and J. Gordon. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology*, 24:145–149, 1992.
- T. T. Huy Tran, T. N. Trinh, and K. Abe. New complex recombinant genotype of hepatitis b virus identified in vietnam. *J Virol*, 82(11):5657–5663, Jun 2008.
- D. Tuan, W. Solomon, Q. Li, and I. M. London. The "beta-like-globin" gene domain in human erythroid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82(19):6384–6388, Oct 1985.
- A. Ullrich, A. Gray, A. W. Tam, T. Yang-Feng, M. Tsubokawa, C. Collins, W. Henzel, T. Le Bon, S. Kathuria, and E. Chen. Insulin-like growth factor i receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *EMBO J*, 5(10):2503–2512, Oct 1986.
- M. Vaudin, A. J. Wolstenholme, K. N. Tsiquaye, A. J. Zuckerman, and T. J. Harrison. The complete nucleotide sequence of the genome of a hepatitis b virus isolated from a naturally infected chimpanzee. *J Gen Virol*, 69 ( Pt 6):1383–1389, Jun 1988.
- E. Vega-Avila and M. K. Pugsley. An overview of colorimetric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells. *Proc West Pharmacol Soc*, 54:10–14, 2011.
- R. Venugopal and A. K. Jaiswal. Nrf1 and nrf2 positively and c-fos and fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of nad(p)h:quinone oxidoreductase1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(25):14960–14965, Dec 1996.
- A. Virkamäki, K. Ueki, and C. R. Kahn. Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest*, 103(7):931–943, Apr 1999.
- G. H. Wang and C. Seeger. Novel mechanism for reverse transcription in hepatitis b viruses. *J Virol*, 67(11):6507–6512, Nov 1993.
- K. S. Warren, J. L. Heeney, R. A. Swan, Heriyanto, and E. J. Verschoor. A new group of hepadnaviruses naturally infecting orangutans (*Pongo pygmaeus*). *J Virol*, 73(9):7860–7865, Sep 1999.

- K. Watashi, S. Urban, W. Li, and T. Wakita. Ntcp and beyond: opening the door to unveil hepatitis b virus entry. *Int J Mol Sci*, 15(2):2892–2905, 2014.
- L. W. D. Weber, M. Boll, and A. Stampfl. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Crit Rev Toxicol*, 33(2):105–136, 2003.
- C. M. Weinbaum, I. Williams, E. E. Mast, S. A. Wang, L. Finelli, A. Wasley, S. M. Neitzel, J. W. Ward, Centers for Disease Control, and Prevention (CDC). Recommendations for identification and public health management of persons with chronic hepatitis b virus infection. *MMWR Recomm Rep*, 57(RR-8):1–20, Sep 2008.
- H. Werner, D. Weinstein, and I. Bentov. Similarities and differences between insulin and igf-i: structures, receptors, and signalling pathways. *Arch Physiol Biochem*, 114(1):17–22, Feb 2008.
- E. J. Wherry, J. N. Blattman, K. Murali-Krishna, R. van der Most, and R. Ahmed. Viral persistence alters cd8 t-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment. *J Virol*, 77(8):4911–4927, Apr 2003.
- E. J. Wherry, S.-J. Ha, S. M. Kaech, W. N. Haining, S. Sarkar, V. Kalia, S. Subramaniam, J. N. Blattman, D. L. Barber, and R. Ahmed. Molecular signature of cd8+ t cell exhaustion during chronic viral infection. *Immunity*, 27(4):670–684, Oct 2007.
- WHO. General information on hepatitis. <http://www.who.int/topics/hepatitis/en/>.
- WHO. Hepatitis b. [www.who.int](http://www.who.int), 2002.
- WHO. Immunisation, vaccines and biologicals - hepatitis b. [www.who.int/immunisation](http://www.who.int/immunisation), 2012.
- S. Wieland, R. Thimme, R. H. Purcell, and F. V. Chisari. Genomic analysis of the host response to hepatitis b virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(17):6669–6674, Apr 2004.
- A. C. Wild, H. R. Moinova, and R. T. Mulcahy. Regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase subunit gene expression by the transcription factor nrf2. *J Biol Chem*, 274(47):33627–33636, Nov 1999.
- D. Michael Willard and Harold Tvedten. *Labordiagnostik in der Kleintierpraxis*. Elsevier, 2006.
- D. J. Withers, J. S. Gutierrez, H. Towery, D. J. Burks, J. M. Ren, S. Previs, Y. Zhang, D. Bernal, S. Pons, G. I. Shulman, S. Bonner-Weir, and M. F. White. Disruption of irs-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature*, 391(6670):900–904, Feb 1998.
- C. Xu, X. Yuan, Z. Pan, G. Shen, J.-H. Kim, S. Yu, T. O. Khor, W. Li, J. Ma, and A.-N. T. Kong. Mechanism of action of isothiocyanates: the induction of are-regulated genes is associated with activation of erk and jnk and the phosphorylation and nuclear translocation of nrf2. *Mol Cancer Ther*, 5(8):1918–1926, Aug 2006.
- H. Yan, G. Zhong, G. Xu, W. He, Z. Jing, Z. Gao, Y. Huang, Y. Qi, B. Peng, H. Wang, L. Fu, M. Song, P. Chen, W. Gao, B. Ren, Y. Sun, T. Cai, X. Feng, J. Sui, and W. Li. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis b and d virus. *Elife*, 1: e00049, 2012.

- J. F. Youngren. Regulation of insulin receptor function. *Cell Mol Life Sci*, 64(7-8):873–891, Apr 2007.
- R. Yu, C. Chen, Y. Y. Mo, V. Hebbar, E. D. Owuor, T. H. Tan, and A. N. Kong. Activation of mitogen-activated protein kinase pathways induces antioxidant response element-mediated gene expression via a nrf2-dependent mechanism. *J Biol Chem*, 275(51):39907–39913, Dec 2000a.
- R. Yu, S. Mandlekar, W. Lei, W. E. Fahl, T. H. Tan, and A. N. Kong. p38 mitogen-activated protein kinase negatively regulates the induction of phase ii drug-metabolizing enzymes that detoxify carcinogens. *J Biol Chem*, 275(4):2322–2327, Jan 2000b.
- S. Zeuzem. *Akute und chronische Virushepatitiden, in Therapie von Leber- und Gallekrankheiten von Caspary W. F., Leuschner U., Zeuzem S. (Hrsg.)*. Springer, 2000.
- D. D. Zhang, S.-C. Lo, J. V. Cross, D. J. Templeton, and M. Hannink. Keap1 is a redox-regulated substrate adaptor protein for a cul3-dependent ubiquitin ligase complex. *Mol Cell Biol*, 24(24):10941–10953, Dec 2004.
- Y. Zick. Ser/thr phosphorylation of irs proteins: a molecular basis for insulin resistance. *Sci STKE*, 2005(268):pe4, Jan 2005.
- L. M. Zipper and R. T. Mulcahy. Inhibition of erk and p38 map kinases inhibits binding of nrf2 and induction of gcs genes. *Biochem Biophys Res Commun*, 278(2):484–492, Nov 2000.
- L. M. Zipper and R. T. Mulcahy. The keap1 btb/poz dimerization function is required to sequester nrf2 in cytoplasm. *J Biol Chem*, 277(39):36544–36552, Sep 2002.
- L. M. Zipper and R. T. Mulcahy. Erk activation is required for nrf2 nuclear localization during pyrrolidine dithiocarbamate induction of glutamate cysteine ligase modulatory gene expression in hepg2 cells. *Toxicol Sci*, 73(1):124–134, May 2003.
- J. N. Zuckerman. Nonresponse to hepatitis b vaccines and the kinetics of anti-hbs production. *J Med Virol*, 50(4):283–288, Dec 1996.

# 11 Publikationsverzeichnis

Sebastian Robert Barthel, Regina Medvedev, Thekla Heinrich, Sarah Manon Büchner, Nadja Kettern, and Eberhard Hildt. Hepatitis b virus inhibits insulin receptor signaling and impairs liver regeneration via intracellular retention of the insulin receptor. Cellular and molecular life sciences : CMLS, 73: 4121–4140, November 2016

## 12 Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei all jenen bedanken, die mich während der Anfertigung meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Eberhard Hildt bedanken für die hervorragende Betreuung und einzigartige Unterstützung während dieser Arbeit. Seine Geduld, seine hervorragende fachliche Kompetenz und seine grenzenloser Optimismus haben mich auch in schwierigen Momenten immer wieder motiviert und mir ermöglicht diese Arbeit zu vollenden.

Mein Dank gilt insbesondere auch Herrn Prof. Dr. Dr. Ralf Einspanier vom Institut für Veterinär-Biochemie der FU Berlin für die Betreuung meiner Arbeit und die Übernahme des Erstgutachtens.

Herrn Dr. Roland Plesker danke ich für seine große Hilfsbereitschaft bei der Betreuung der tierexperimentellen Arbeiten und Frau Wingerter für die Anfertigung der Paraffinpräparate.

Zudem möchte ich mich bei Dr. Klaus Boller die fachliche Unterstützung am LSM bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt Nadja Kettern, Meike Gratz, Jessica Fechner und Dagmar Fecht-Schwarz für das zeitaufwendige und kritische Korrekturlesen.

Ganz herzlich möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe Andrea, Caro, Christian, Daniela, Gert, Jasmin, Kiyoshi, Lilli, Meike, Nina, Sami, Sanita und Stef bedanken. Vielen Dank für die immer bereitwillige Hilfestellung, die fröhliche Arbeitsatmosphäre, die ein oder andere Kaffchenpause und die vielen lustigen Abende mit euch.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, ohne die die Anfertigung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Sie haben mich bereits während meines Studiums, aber auch während meiner Doktorarbeit tatkräftig unterstützt, mir in jeglicher Hinsicht zur Seite gestanden und mir den nötigen Rückhalt gegeben.

Abschließend möchte ich mich ganz besonders bei René dafür bedanken, dass er immer für mich da war und mich mit seiner unerschöpflichen Geduld und Motivation einzigartig unterstützt hat.

**Danke.**

## 13 Selbständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Ratzeburg, den 20.02.2017

Thekla Bogenhagen