

# **Die Rolle von Fettsäuretransportproteinen und Death Rezeptoren in der Leberregeneration im Steatose- Modell**

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Fakultät für Biologie  
an der  
Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Svenja Sydor  
aus Oberhausen

Februar 2012

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Gastroenterologie und Hepatologie des Universitätsklinikums Essen durchgeführt, eine Einrichtung der Universität Duisburg-Essen.

**1. Gutachter:** Prof. Dr. Bertram Opalka

**2. Gutachter:** Prof. Dr. Ali Canbay

**Vorsitzender des Prüfungsausschusses:** Prof. Dr. Peter Bayer

**Tag der mündlichen Prüfung:** 29.05.2012

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>ix</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>xiv</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Funktion und Aufbau der Leber</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Aufnahme und Stoffwechsel von Nahrungsfetten</b>	<b>4</b>
<i>1.2.1. Fettsäuretransportproteine (FATP)</i> .....	<i>5</i>
<i>1.2.2. NAFLD</i> .....	<i>8</i>
<b>1.3. Leberschädigung, Death Rezeptoren, Apoptose und Regeneration</b>	<b>9</b>
<i>1.3.1. Death Rezeptoren und Apoptose</i> .....	<i>10</i>
<i>1.3.2. Regeneration, Fettsäuren und NAFLD</i> .....	<i>13</i>
<b>1.4. Zielsetzung</b>	<b>14</b>
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>17</b>
<b>2.1. Material</b>	<b>17</b>
<i>2.1.1. Patientenmaterial</i> .....	<i>17</i>
<i>2.1.2. Chemikalien</i> .....	<i>17</i>
<i>2.1.3. Medien und Zusätze</i> .....	<i>22</i>
<i>2.1.4. Puffer und Lösungen</i> .....	<i>22</i>
<i>2.1.5. Proteingrößenstandards</i> .....	<i>23</i>
<i>2.1.6. Antikörper</i> .....	<i>23</i>

## Inhaltsverzeichnis

2.1.7. Oligonukleotide .....	25
2.1.8. Enzyme .....	30
2.1.9. Transfektionsreagenzien.....	30
2.1.10. Kits .....	30
2.1.11. Verwendete Experimentalfuttermittel.....	31
2.1.12. Verbrauchsmaterialien .....	31
2.1.13. Geräte .....	34
2.1.14. Computerprogramme.....	36
<b>2.2. Methoden</b>	<b>37</b>
2.2.1. Zellkultur-Modell.....	37
2.2.1.1. Isolation primärer humaner Hepatozyten aus Lebergewebe ....	37
2.2.1.2. Kultivierung und In-vitro Stimulation mit freien Fettsäuren .....	38
2.2.1.3. Transiente Transfektion mit siRNA .....	39
2.2.1.4. Stimulation der Zellen mit dem CD95/Fas-Agonisten CH11 .....	40
2.2.2. Tiermodell und operative Technik.....	40
2.2.2.0. Induktion der Steatose durch die Fütterung einer Western Diät (WD) .....	40
2.2.2.1. 70% Leberteileresektion (70% PHx) .....	40
2.2.2.2. Probengewinnung.....	41
2.2.2.3. Paraffineinbettung und Anfertigung von Gewebeschnitten.....	42
2.2.2.4. Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	42
2.2.2.5. Oil-Red-O-Färbung.....	42

## Inhaltsverzeichnis

2.2.2.6. Ki67-Immunhistochemie.....	43
2.2.2.7. Terminal-transferase-mediated-dUTP-nick-end-labeling (TUNEL)-Assay .....	44
2.2.2.8. Bestimmung von AST, ALT, LDH, Bilirubin, Gesamtprotein, Albumin.....	44
2.2.2.9. Bestimmung von Serum-FFA.....	45
2.2.2.10. Bestimmung von Interleukine und pro-inflammatorische Faktoren.....	45
2.2.2.11. Bestimmung Diabetes-assoziiertes Faktoren.....	45
2.2.2.12. Bestimmung von Adiponektin.....	45
<i>2.2.3. Nukleinsäuren .....</i>	<i>46</i>
2.2.3.0. Isolation von RNA aus Zellkultur .....	46
2.2.3.1. Isolation von RNA aus Gewebe .....	46
2.2.3.2. Quantifizierung von RNA.....	47
2.2.3.3. cDNA-Synthese.....	47
2.2.3.4. Quantitative RT-PCR ( <b>P</b> olymerase <b>C</b> hain <b>R</b> eaktion) .....	47
<i>2.2.4. Proteine.....</i>	<i>49</i>
2.2.4.0. Isolation von Proteinen aus Zellkultur .....	49
2.2.4.1. Isolation von Proteinen aus Lebergewebe .....	50
2.2.4.2. Bestimmung der Proteinkonzentration .....	50
2.2.4.3. Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen im SDS-Polyacrylamidgel (SDS-PAGE) .....	50

## Inhaltsverzeichnis

2.2.4.4. Proteintransfer auf PVDF-Membranen (Western-Blot) .....	51
2.2.4.5. Farbnachweis membrangebundener Proteine.....	51
2.2.4.6. Immunologischer Nachweis von Proteinen .....	51
2.2.4.7. Coomassie Färbung von PVDF-Membranen.....	52
2.2.4.8. Western-Blot-„Stripping“ .....	52
2.2.4.9. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) .....	52
2.2.4.10. Bestimmung von Triglyzeriden im Lebergewebe .....	53
2.2.4.11. Bestimmung von zellulärem ATP im Lebergewebe .....	53
2.2.5. Statistik.....	53
<b>3. Ergebnisse:</b>	<b>55</b>
<b>3.1. Behandlung von primären humanen Hepatozyten mit FFA für 24-96h</b>	<b>55</b>
3.1.1. <i>Fettaufnahme in primäre humane Hepatozyten nach Behandlung mit FFA für 24-96h</i> .....	55
3.1.2. <i>Expression von Fettsäuretransportproteinen (FATP) in primären humanen Hepatozyten nach Behandlung mit FFA für 24-96h</i> .....	57
3.1.3. <i>Expression von Death Rezeptoren (DR) in primären humanen Hepatozyten nach Behandlung mit FFA für 24-96h</i> .....	59
3.1.4. <i>Expression von Apoptose-assoziierten Molekülen und Bestimmung der Apoptose-Induktion in primären humanen Hepatozyten nach Behandlung mit FFA für 24-96h</i> .....	61
3.1.5. <i>Aktivierung von Erk in primären humanen Hepatozyten nach Behandlung mit FFA für 24-96h</i> .....	64
<b>3.2. Rolle von cFLAR bei der Apoptose-Induktion in FFA-behandelten primären humanen Hepatozyten</b>	<b>65</b>

3.2.1. Knockdown von cFLAR in primären humanen Hepatozyten mittels siRNA .....	65
3.2.2. Expression von DR und Apoptose-assoziierten Molekülen nach FFA-Behandlung in primären humanen Hepatozyten mit siRNA-vermitteltem Knockdown von cFLAR.....	66
<b>3.3. Auswirkungen der Fütterung einer 6-wöchigen Western Diät (WD) in C57Bl/6-Mäusen</b>	<b>68</b>
3.3.1. Histologie und Serologie von C57Bl/6-Mäusen nach 6-wöchiger Fütterung einer WD .....	69
3.3.2. Expression von FATP im Lebergewebe von C57Bl/6-Mäusen nach 6-wöchiger Fütterung einer SD oder WD.....	75
3.3.3. Expression von DR, Apoptose- und Autophagie-assoziiierter Gene sowie Bestimmung des Zelltods im Lebergewebe von C57Bl/6-Mäusen nach 6-wöchiger Fütterung einer SD oder WD.....	76
<b>3.4. Leberregeneration nach 70% Hepatektomie (PHx) von C57Bl/6-Mäusen nach 6-wöchiger Fütterung einer SD oder WD</b>	<b>80</b>
3.4.1. Histologie und Serologie nach 70% PHx von C57Bl/6-Mäusen nach 6-wöchiger Fütterung einer SD oder WD.....	80
3.4.2. Expression von FATP nach 70% PHx im Lebergewebe von C57Bl/6-Mäusen nach 6-wöchiger Fütterung einer SD oder WD.....	87
3.4.3. Expression von DR und Zelltod nach 70% PHx im Lebergewebe von C57Bl/6-Mäusen nach 6-wöchiger Fütterung einer SD oder WD.....	88
3.4.4. Expression Apoptose- und Autophagie-assoziiierter Moleküle nach 70% PHx im Lebergewebe von C57Bl/6-Mäusen nach 6-wöchiger Fütterung einer SD oder WD .....	90
3.4.5. Leberregeneration nach 70% PHx in C57Bl/6-Mäusen nach 6-wöchiger Fütterung einer SD oder WD .....	94

<i>3.4.6. Aktivierung von Erk an Tag 1, 2 und 7 nach 70% PHx im Lebergewebe von C57Bl/6-Mäusen nach 6-wöchiger Fütterung einer SD oder WD.....</i>	<i>97</i>
<i>3.4.7. Bestimmung von ATP an Tag 1, 2 und 7 nach 70% PHx im Lebergewebe von C57Bl/6-Mäusen nach 6-wöchiger Fütterung einer SD oder WD.....</i>	<i>98</i>
<b>4. Diskussion</b>	<b>100</b>
<b>4.1. Hintergründe und Zusammenhänge</b>	<b>100</b>
<b>4.2. Experimentelle Modelle und Methoden</b>	<b>102</b>
<b>4.3. Auswirkungen einer FFA-Behandlung auf die Expression von FATP, DR und der Zytotoxizität in primären humanen Hepatozyten</b>	<b>107</b>
<b>4.4. Leberregeneration im NAFLD-Mausmodell</b>	<b>110</b>
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>121</b>
<b>6. Literatur</b>	<b>123</b>
<b>7. Anhang</b>	<b>141</b>



## Abkürzungsverzeichnis

ACBP	acyl-CoA-binding protein
Acyl-CoA	acyl-Co-Enzym A
ALT	Alanin-Aminotransferase
AST	Aspartat-Aminotransferase
Atg	autophagy related homolog
ATP	Adenosintriphosphat
AZ	Aktenzeichen
Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-xs	B-cell lymphoma -2, -xl, -xs
BSA	Rinderserum Albumin
CCC	Cholangiozelluläres Karzinom
Cd36/Fat	Cd36 moleküle/fatty acid translocase
cDNA	complementary DNA
CFLAR	Caspase 8 and FADD-like apoptosis regulator
Ct	cycle threshold
Cyt C	Cytochrom C
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamin-2-Phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonucleinsäure

## Abkürzungsverzeichnis

DR, DR4, DR5	Death Receptor 4, 5
EDTA	Ethylendiaminotetraacetat
EGFR	epidermal growth factor receptor
EGTA	Ethylenglycol bis (2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
Erk	extracellular regulated MAP-kinase
FABP	fatty acid binding protein
FADD	Fas associated death domain
FasL	Fas-Ligand
FATP	Fettsäuretransportprotein, fatty acid transport protein
FCS	fötales Kälberserum
FFA	free fatty acids
G-CSF	granulocyte-colony stimulating factor
GIP	Glukose-abhängiges insulinotropes Peptid
GLP	glukagon like peptide
GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor
h	Stunde
HB-EGF	heparin-binding endothelial growth-factor-like factor
HBSS	Hank's buffered salt solution
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HE	Hämatoxylin-Eosin

## Abkürzungsverzeichnis

Hgf	hepatocyte growth factor
HPRT	Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase
HRP	horseradish peroxidase
IFN $\gamma$	Interferon gamma
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IL-6R	Interleukin 6 Rezeptor
IU/l	internationale Einheiten pro Liter
IVC	Inferior Vena Cava
JAK	Januskinase
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kDA	kiloDalton
LACS	long-chain acyl-CoA synthetase
LCFA	long chain fatty acid
LDH	Lactat Dehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharide
LSM	Laser Scan Mikroskop
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MCD	Methionin-Cholin-defiziente Diät
MCP-1 $\alpha$	monocyte chemoattractant protein 1 alpha
min	Minute(n)

## Abkürzungsverzeichnis

Mio	Million(en)
MIP-1 $\beta$	macrophage inflammatory protein 1-beta
mRNA	messenger RNA
n	Anzahl der Versuche oder Tiere
NAFLD	non-alcoholic fatty liver disease
NASH	non-alcoholic steatohepatitis
NF $\kappa$ B	nuclear faktor kappa B
OD	optische Dichte
OP	Operation
p.a.	pro analysi
PAI-1	plasminogen-aktivator-inhibitor type 1
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PEPCK	Phosphoenolpyruvat Carboxy Kinase
PHx+1,2,7	partielle Hepatektomie an Tag 1,2 und 7 post-operativ
Puma	p53 up-regulated modulator of apoptosis
PV	portal vein
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	quantitative Realtime PCR
RISC	RNA inducing silencing complex
RLU	relative light units

## Abkürzungsverzeichnis

ROS	reactive oxygen species
RT	Raumtemperatur
SD	Standard Diät
SDHA	succinate dehydrogenase complex, subunit A
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SEM	standard error of mean
shRNA	small hairpin RNA
siRNA	small interfering RNA
SLC27	solute carrier family 27
STAT	signal transducers and activators of transcription
TBS(T)	tris-buffered saline(Tween)
TGF- $\beta$	transforming growth factor beta
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor alpha
TNFR1	tumor necrosis factor receptor 1
TRAIL	TNF-related apoptosis inducing ligand
TUNEL	terminal-transferase-mediated-dUTP-nick end labeling
WD	Western Diät

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1: Lebersegmente. ....</b>	<b>2</b>
<b>Abb. 2: Schema der Leberzellen.....</b>	<b>3</b>
<b>Abb. 3:Transport und Aufnahme von FFA. ....</b>	<b>8</b>
<b>Abb. 4: Rolle von DR innerhalb der Induktion von Apoptose und Regeneation.</b>	
10	
<b>Abb. 5: Oil-Red-O-Färbung von primären humanen Hepatozyten nach FFA-</b> <b>Behandlung. ....</b>	<b>56</b>
<b>Abb. 6: Oil-Red-O-Quantifizierung nach FFA-Behandlung. ....</b>	<b>57</b>
<b>Abb. 7: Expression von FATP in primären humanen Hepatozyten nach</b> <b>Behandlung mit FFA für 24-96h. ....</b>	<b>58</b>
<b>Abb. 8: Expression von DR in primären humanen Hepatozyten nach Behandlung</b> <b>mit FFA für 24-96h.....</b>	<b>60</b>
<b>Abb. 9: Expression Apoptose-assoziiertes Moleküle in primären humanen</b> <b>Hepatozyten nach Behandlung FFA für 24-96h.....</b>	<b>61</b>
<b>Abb. 10: Quantifizierung von M30 in primären humanen Hepatozyten nach</b> <b>Inkubation mit 1mM FFA für 24-96h.....</b>	<b>62</b>
<b>Abb. 11: Quantifizierung von M30 nach Stimulation mit CH11 in primären</b> <b>humanen Hepatozyten nach Inkubation mit 1mM FFA für 24-96h. ....</b>	<b>63</b>
<b>Abb. 12: Detektion von phospho Erk in primären humanen Hepatozyten. ....</b>	<b>64</b>
<b>Abb. 13: Transfektion primärer humaner Hepatozyten mit siRNA. ....</b>	<b>66</b>
<b>Abb. 14: Expression von DR und pro-apoptischen Genen in primären humanen</b> <b>Hepatozyten mit cFLAR-Knockdown nach FFA-Behandlung für 24-96h.</b>	<b>67</b>

<b>Abb. 15: Verlauf des Körpergewichts und Zunahme des Lebergewichts nach Fütterung einer WD für 6 Wochen.....</b>	<b>69</b>
<b>Abb. 16: Serum Parameter im Serum von Mäusen, die für 6 Wochen mit einer SD oder einer WD gefüttert wurden. ....</b>	<b>70</b>
<b>Abb. 17: Interleukine im Serum nach 6-wöchiger SD oder WD. ....</b>	<b>71</b>
<b>Abb. 18: Inflammatorische Faktoren im Serum nach 6-wöchiger SD oder WD.</b>	<b>72</b>
<b>Abb. 19: Faktoren des metabolischen Syndroms im Serum nach 6-wöchiger SD oder WD.....</b>	<b>73</b>
<b>Abb. 20: Leberhistologie nach Fütterung einer SD oder WD über 6 Wochen.</b>	<b>74</b>
<b>Abb. 21: Expression von FATP im Lebergewebe nach 6-wöchiger Fütterung einer SD oder WD.....</b>	<b>75</b>
<b>Abb. 22: Expression von DR im Lebergewebe nach 6-wöchiger Fütterung einer SD oder WD. ....</b>	<b>76</b>
<b>Abb. 23: Expression pro-apoptotischer Moleküle im Lebergewebe nach 6-wöchiger Fütterung einer SD oder WD.....</b>	<b>77</b>
<b>Abb. 24: Expression anti-apoptotischer Moleküle im Lebergewebe nach 6-wöchiger Fütterung einer SD oder WD.....</b>	<b>78</b>
<b>Abb. 25: TUNEL-Assay. ....</b>	<b>78</b>
<b>Abb. 26: Expression Autophagie-assoziiertes Gene im Lebergewebe nach 6-wöchiger Fütterung einer SD oder WD.....</b>	<b>79</b>
<b>Abb. 27: Serum-Parameter nach 70% PHx nach 6-wöchiger Fütterung einer SD oder WD.....</b>	<b>80</b>
<b>Abb. 28: Interleukine im Serum nach 70% PHx. ....</b>	<b>81</b>
<b>Abb. 29: Inflammatorische Faktoren im Serum nach 70% PHx. ....</b>	<b>82</b>
<b>Abb. 30: Faktoren des metabolischen Syndroms nach 70% PHx. ....</b>	<b>84</b>

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 31: Fette im Lebergewebe und im Serum nach 70% PHx.....</b>	<b>85</b>
<b>Abb. 32: Fettakkumulation im Lebergewebe nach 70% PHx.....</b>	<b>86</b>
<b>Abb. 33: Expression von FATP nach 70% PHx.....</b>	<b>88</b>
<b>Abb. 34: Expression von DR nach 70% PHx.....</b>	<b>89</b>
<b>Abb. 35: TUNEL-Assay nach 70% PHx. ....</b>	<b>90</b>
<b>Abb. 36: Expression pro-apoptotischer Moleküle nach 70% PHx.....</b>	<b>91</b>
<b>Abb. 37: Expression anti-apoptotischer Moleküle nach 70% PHx. ....</b>	<b>92</b>
<b>Abb. 38: Expression Autophagie-assoziiierter Moleküle nach 70% PHx.....</b>	<b>93</b>
<b>Abb. 39: Verhältnis von Leber-zu Körpergewicht nach 70%.....</b>	<b>94</b>
<b>Abb. 40: Ki67 nach 70% PHx.....</b>	<b>95</b>
<b>Abb. 41: Expression Regeneration-assoziiierter Gene nach 70% PHx.....</b>	<b>96</b>
<b>Abb. 42: Detektion von phospho-Erk vor und an Tag 1, 2 und 7 nach PHx. ...</b>	<b>97</b>
<b>Abb. 43: ATP im Lebergewebe vor und nach 70% PHx. ....</b>	<b>99</b>



## 1. Einleitung

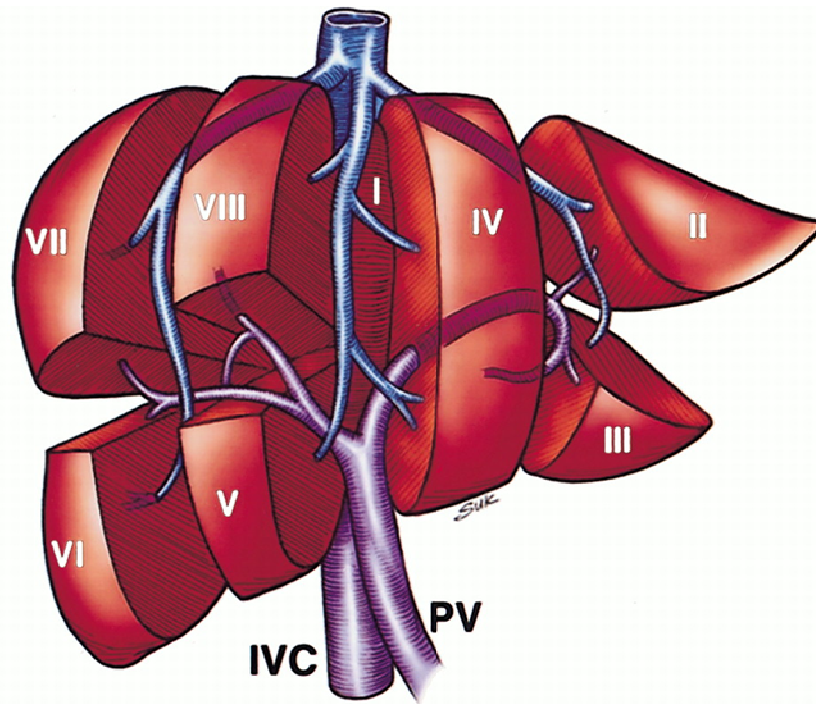
### 1. Einleitung

#### 1.1. Funktion und Aufbau der Leber

Die Leber stellt mit ca. 1200-1800 g die größte Drüse und das wichtigste Organ des Stoffwechsels körpereigener und körperfremder Substanzen dar. Durch die zentrale Lage sowie das große und variable Gefäßvolumen spielt die Leber bei der Speicherung von Blut und der Regulation verschiedener Stoffwechselprodukte und Nährstoffe eine bedeutende Rolle. Die Leber unterstützt z. B. die Verdauung von Fetten durch die Bildung von Galle und reguliert den Glukose- und Lipidhaushalt sowohl durch die Produktion von Glukose, als auch durch die Umwandlung und Speicherung von überschüssiger Glukose in Form von Glykogen. Neben den Nieren ist die Leber durch eine Vielzahl spezifischer Enzyme, die für diverse Abbau- und Umbaureaktionen notwendig sind, ein wichtiges Entgiftungs- und Exkretionsorgan. Hier werden endogene Stoffwechselprodukte und exogene Stoffe, die z. B. durch die Nahrung in Form von Genuss- und Arzneimitteln aufgenommen wurden, in ausscheidungsfähige Derivate umgewandelt, durch verschiedene Gallensäuren konjugiert und über die Nieren oder den Darm ausgeschieden. Bei der Umwandlung und dem Abbau verschiedener Hormone, Mediatoren und Vitamine sowie der Regulation des Wasser- und Säuren-Basen-Haushalts ist die Leber zuständig.

Die Versorgung der Leber mit sauerstoffreichem Blut geschieht über die Leberarterie (*Arteria hepatica propria*), über die Pfortader (*Vena portae*) gelangen Nährstoffe aus Magen und Darm, sowie Hormone aus der Bauchspeicheldrüse und Abbauprodukte der Milz zur Leber. Die Leber lässt sich in zwei große Leberlappen, den linken Leberlappen (*Lobus sinister*), bestehend aus den Segmenten I-IV und dem rechten Leberlappen (*Lobus dexter*), mit den Segmenten V-VIII unterteilen (Abb. 1).

## 1. Einleitung

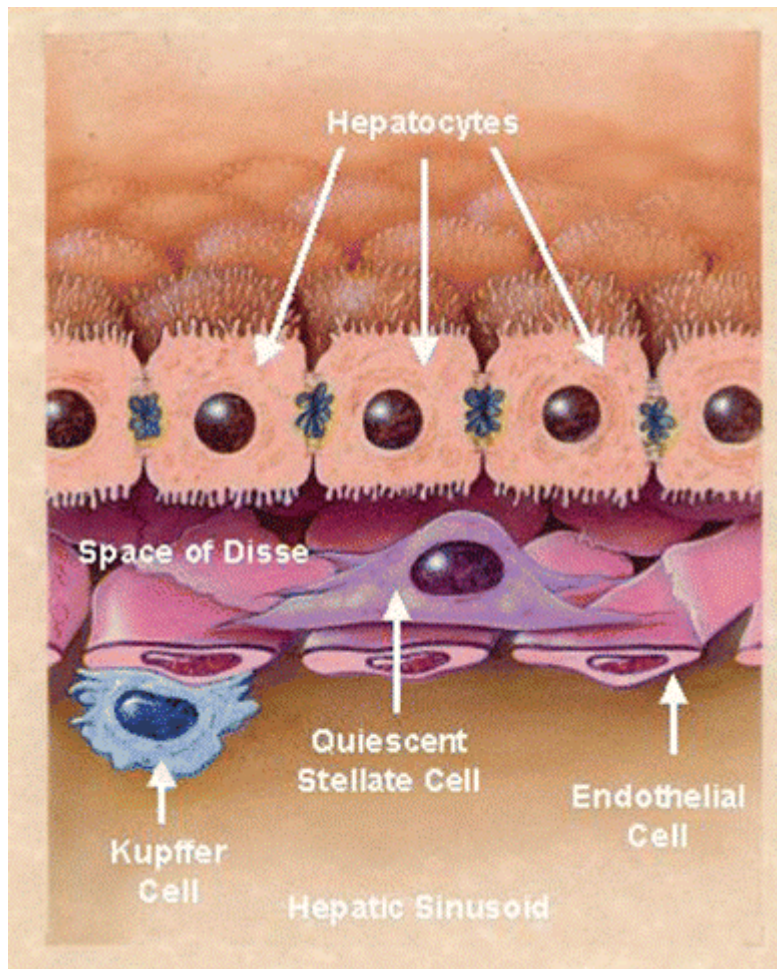


**Abb. 1: Anatomie der Leber.**

Schematische Darstellung der Lebersegmente und der allgemeinen Venenstruktur nach C. Couinaud. IVC = inferior Vena Cava, PV = Portal Vein/Vena portae (Madoff et al. 2002).

Das Leberparenchym setzt sich aus vielen kleineren (ca. 1-2 mm) sechseckigen Leberläppchen oder Zentralvenenläppchen zusammen. In den Ecken der Leberläppchen befindet sich ein Periportalfeld mit jeweils einem Glissonschen Dreieck (Glisson-Trias), bestehend aus der *Arteria interlobularis* (Ast der *Arteria hepatica propria*), der *Vena interlobularis* (Ast der *Vena portae*) und dem *Ductus bilifer interlobularis*. Im Zentrum jedes Leberläppchens verläuft die *Vena centralis*, in die das Blut von den radiär angeordneten Sinusoiden aus strömt. Die Wand der Sinusoide wird von Sinusendothelzellen gebildet und somit die Hepatozyten von den Sinusoiden durch den sogenannten Disse-Raum getrennt (Abb. 2). Im Disse-Raum sind die Kupffer-Zellen, eine Leber-spezifische Makrophagen-Population, eingelagert. Diese können Schadstoffe, Viren, Parasiten sowie Bakterien und deren Stoffwechselprodukte durch Phagozytose aus dem Blut der Pfortader aufnehmen und intrazellulär abbauen. Durch ihre Fortsätze stehen sie sowohl mit den Sinusendothelzellen, als auch mit den Hepatozyten in engem Kontakt. Im aktivierten Zustand können die Kupffer-Zellen Signalstoffe, wie z. B. Zytokine, freisetzen, somit auf die benachbarten Leberzellen einwirken und verschiedene Reaktionen auslösen oder beeinflussen.

## 1. Einleitung



**Abb. 2: Feinbau der Leber.**

Schematische Darstellung der Lokalisation der verschiedenen Zelltypen im Lebergewebe (Albanis & Friedman 2006).

Ein weiterer Zelltyp, der im Disse-Raum angesiedelt ist, bezeichnet die hepatischen Sternzellen oder Ito-Zellen. Hierbei handelt es sich um eine relativ kleine, aber funktionell bedeutsame Zellpopulation mit spezifischer Funktion. Die Zellen können sich in einem ruhenden und einem aktivierten Zustand befinden. Die ruhende Zelle dient vor Allem der Speicherung von Fetten, Vitamin A und verschiedenen Vitamin A-Metaboliten. Durch verschiedene Signalstoffe, wie z. B. TGF $\beta$  (***Transforming Growth Factor beta***) oder andere Zytokine werden die hepatischen Sternzellen aktiviert und können verschiedene Komponenten der extrazellulären Matrix sowie Enzyme zum Abbau von Kollagen sezernieren und nehmen damit eine wichtige Rolle innerhalb der Fibrosierung ein. Die metabolischen Funktionen, wie z. B. der Abbau von Hormonen und Signalstoffen, die Bildung von Akute-Phase-Proteinen, die Regulation des Säuren-

## 1. Einleitung

Basen-Haushalts sowie die Exkretion findet in den Hepatozyten statt (Arias *et al.* 1994; Gerok & Blum 1995; Deetjen *et al.* 2005; Paulsen & Waschke 2010).

### 1.2. Aufnahme und Stoffwechsel von Nahrungsfetten

Bei der Metabolisierung energiereicher Nahrungsbestandteile wie Zuckern und Fetten spielt die Leber eine entscheidende Rolle. Innerhalb des Glukosestoffwechsels reguliert die Leber, gesteuert durch die Hormone Insulin und Glukagon, den Blutzuckerspiegel unabhängig von der Nahrungsaufnahme. Überschüssige Glukose wird mithilfe von Insulin in den Speicherstoff Glykogen umgewandelt. Bei einem Absinken des Blutzuckerspiegels kann das gespeicherte Glykogen durch das Hormon Glukagon wiederum in Glukose umgewandelt und dem Stoffwechsel als Energieträger zugefügt werden (Glykogenolyse). Fette bestehen aus hochwertigen, energiereichen Molekülen, deren Speicherung, Sekretion, Aufspaltung und Neu-Synthese von der Leber unter Beteiligung verschiedener Hormone wie Insulin und Glukagon gesteuert wird (Nguyen *et al.* 2008). Nahrungsfette bestehen zum größten Teil aus Triglyzeriden, werden im Darm durch Gallensäuren emulgiert und in Mizellen verkapselt, in denen sich die Fette kugelförmig anordnen. Die Mizellen lagern sich an die Bürstensaummembran der Enterozyten an und somit gelangen die Triglyzeride in Form von Monoglyzeriden und freien Fettsäuren (FFA = **Free Fatty Acids**) in die Mukosazellen des Darms. Die einzelnen Fettbausteine werden in den Darmzellen wieder zu Triglyzeriden zusammengesetzt und aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften an Transportproteine oder Lipoproteine gebunden. In dieser Form werden die Lipide über das Blut zu den verschiedenen Organen und Zellen transportiert und zur Energiegewinnung durch die  $\beta$ -Oxidation gespalten. Fettsäuren, die nicht für die ATP-Umsetzung verwendet werden, können als Triglyzeride in Form von Lipidtropfen im Fettgewebe oder auch in der Leber gespeichert werden. Bei Bedarf werden die Triglyzeride durch eine Lipolyse wieder in FFA gespalten und können so durch den Blutkreislauf zu den entsprechenden Zellen transportiert werden. Nach der Aufnahme in die Zellen müssen die FFA vor dem Transport in die Mitochondrien durch die Bindung an Koenzym A aktiviert werden. Die aktivierten Fettsäuren werden in die Mitochondrien transportiert und hier durch  $\beta$ -Oxidation

## 1. Einleitung

abgebaut, wodurch Energie in Form von ATP freigesetzt wird (Arias *et al.* 1994; Gerok & Blum 1995; Deetjen *et al.* 2005).

### 1.2.1. Fettsäuretransportproteine (FATP)

Die Aufnahme von langkettigen Fettsäuren in das Zellinnere über die Plasmamembran wird durch verschiedene Mechanismen gesteuert und realisiert. Ein Teil der Fettsäuren passiert die Membran durch Diffusion, der Transport wird jedoch auch durch verschiedene Fettsäuretransportproteine (FATP = *Fatty Acid Transport Protein*) unterstützt (Memon *et al.* 1998; Eehalt *et al.* 2006). Es gibt verschiedene Familien von FATP, die unterschiedliche Transport-Mechanismen unterstützen und oft auch Organ-spezifisch exprimiert werden. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Überexpression verschiedener FATP die Aufnahme von langkettigen Fettsäuren steigern kann und umgekehrt bei Abwesenheit bestimmter FATP die Fettsäure-Aufnahme vermindert (Newberry *et al.* 2006; Doege *et al.* 2008; Newberry *et al.* 2009). Die wichtigsten Gruppen von Transportproteinen sind CD36/FAT (**CD36 Protein/ *Fatty Acid Translocase***), die FATP- oder SLC27-Familie (*Fatty Acid Transport Protein* oder *solute carrier family 27*), die FABP-Familie (*Fatty Acid Binding Protein*) und die Caveoline. CD36/FAT ist ein Transportprotein, das vor Allem native langkettige Fettsäuren wie Oleat, Palmitat, Stearat, Arachonidat und Linoleat bindet und in das Membran-Innere befördert (Abumrad *et al.* 1999). CD36 besitzt zwei Transmembran-Domänen bestehend aus sehr kurzen intrazellulären Segmenten und einer größeren glykolysierten extrazellulären Domäne (Abumrad *et al.* 1998). Es gibt verschiedene Hypothesen, die die Aufnahme von langkettigen Fettsäuren durch CD36/FAT beschreiben. Der Transport durch die Plasmamembran kann durch die Bildung einer Art Pore oder eines Kanals, sowie durch die Bindung an bestimmte Stellen der extrazellulären Domäne erleichtert werden (Abumrad *et al.* 1999; Abumrad *et al.* 2000).

Die Familie der FATP oder auch SLC27 umfasst 6 verschiedene Mitglieder (FATP1-6, bzw. SLC27A1-6), die partiell Organ-spezifisch exprimiert werden. Die 6 verschiedenen FATP sind im humanen und murinen Genom homolog zu einander vertreten. FATP-1 ist vor Allem in den Adipozyten des Fettgewebes, aber auch in der

## 1. Einleitung

Herz- und Skelettmuskulatur sowie in bestimmten Bereichen des Gehirns lokalisiert. FATP-1 ist ein Insulin-sensitiver Transporter, wobei die transmembrane Lokalisation von FATP-1 gesteuert und somit die Aufnahme von langkettigen Fettsäuren reguliert werden kann (Stahl 2004; Doege & Stahl 2006). FATP-2 ist in der Leber und im Nieren-Cortex lokalisiert, wodurch hauptsächlich Oleate transportiert werden (Stahl *et al.* 2001). Die Funktion von FATP-3 konnte bisher nicht genau aufgeklärt werden, die Expression dieses Transportproteins ist jedoch hauptsächlich in der Lunge, aber auch in den Ovarien und Testes lokalisiert (Pei *et al.* 2004; Doege & Stahl 2006). FATP-4 wird als einziges FATP der SLC27-Familie in den Epithelzellen des Dünndarms exprimiert und ist hier für die effiziente Aufnahme von Nahrungsfetten insbesondere von langkettigen und extra-langkettigen Fettsäuren ausschlaggebend (Stahl *et al.* 1999). Weitere Studien konnten FATP-4 eine wichtige Funktion bei der Homöostase der Haut zusprechen (Gimeno 2007). Die Expression von FATP-4 scheint für die embryonale Entwicklung der Haut wichtig zu sein, aber die genauen Zusammenhänge und Mechanismen sind noch unzureichend untersucht (Herrmann *et al.* 2005). Bei FATP-5 handelt es sich um ein Transportprotein, welches ausschließlich in der Leber lokalisiert ist und hier die Aufnahme von langkettigen Fettsäuren reguliert. Das letzte Mitglied der SCL27-Familie ist FATP-6 und nur im Sarkolemma der Kardiomyozyten zu finden (Stahl 2004). Die Expression der FATP kann durch verschiedene Hormone und Zytokine reguliert werden und damit die Aufnahme der Fettsäuren beeinflussen. Bei FATP-1 ist bekannt, dass die Expression in Abhängigkeit von dem Hormon Insulin steht, bei den anderen Mitgliedern der FATP-Familie wurden die Zusammenhänge noch nicht genauer untersucht (Stahl 2004; Doege & Stahl 2006). Alle FATP sind integrale Membran-Proteine mit mehreren Transmembran-Domänen.

Die FABP (*fatty acid binding proteins*) gehören zu einer Familie von unterschiedlichen im Zytosol lokalisierten Proteinen, die den intrazellulären Transport von Lipiden unterstützen. Die Expression dieser Proteine ist Organ-spezifisch und in allen Organen, die am FFA-Metabolismus und Transport beteiligt sind zu lokalisieren. Die Struktur der FABP ist bei allen Isoformen konserviert und besteht aus 10 anti-parallel angeordneten  $\beta$ -Faltblättern, die eine Lipid-Bindungstasche formen, gefolgt von einer Helix-Turn-Helix-Schleife, welche die Bindung von hydrophoben Bestandteilen, sowie die Protein-Protein Interaktion begünstigen kann (Newberry *et al.* 2009). FABP-1, oder auch L-FABP (*Liver FABP*) wird hauptsächlich in der Leber, aber auch im geringen

## 1. Einleitung

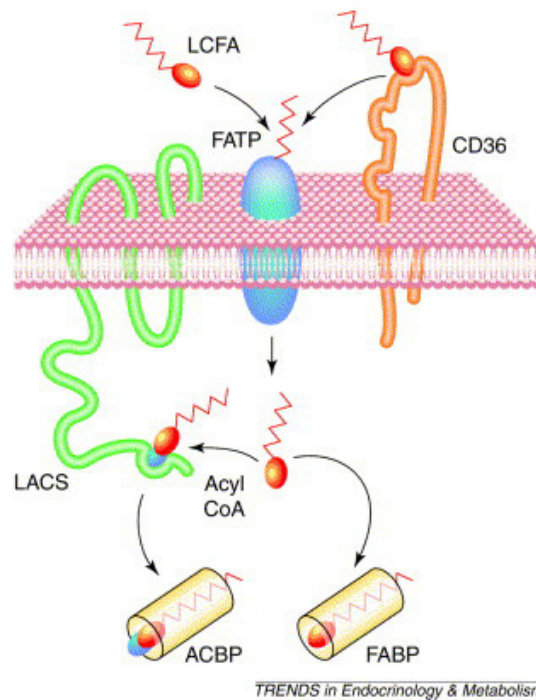
Maße im Dünndarmepithel, in den Nieren und im Dickdarm exprimiert (Gordon *et al.* 1985). Die Lipid-Bindungstasche von FABP-1 ist außerordentlich flexibel und hochspezifisch für die Bindung von langkettigen und mehrfach ungesättigten Fettsäuren, sowie von hydrophoben Liganden wie Cholesterin und Gallensäuren (Lowe *et al.* 1987; Thompson *et al.* 1997).

Eine weitere wichtige Proteingruppe im Zusammenhang mit dem Transport von langkettigen Fettsäuren sind die Caveoline. Es wurden bisher drei Caveoline identifiziert, wobei Caveolin-1 und Caveolin-2 ubiquitär in den unterschiedlichsten Zelltypen und Caveolin-3 ausschließlich in Muskelzellen exprimiert wird (Scherer *et al.* 1994; Parton *et al.* 1997). Caveolin-1 besitzt eine hoch-spezifische Bindungsstelle für verschiedene Fettsäuren und spielt außerdem eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung der Caveolae (Cameron *et al.* 1997; Razani *et al.* 2002). Hierbei handelt es sich um 50-100 nm große Einbuchtungen der Plasmamembran, in die reichhaltig Cholesterin, Glykolipide und Caveoline eingelagert sind. Diese Strukturen sind an verschiedenen zellulären Regulationsmechanismen beteiligt, wie z. B. innerhalb der Signaltransduktion, der Regulation der Glukose-Aufnahme, dem Cholesterol-Transport und verschiedener Rezeptor-vermittelter Mechanismen (z. B. Ausbildung von Rezeptor-Clustern) (Pohl *et al.* 2002). Durch die hohe Konzentration von Caveolin-1 innerhalb der Caveolae und dessen starker Bindungsaffinität zu FFA kann in diesen Bereichen der Plasmamembran der Transport von verschiedenen Fettsäuren erleichtert werden (Ehehalt *et al.* 2006).

Die genauen Transport-Mechanismen langkettiger Fettsäuren in das Zellinnere wurden bisher nicht vollständig aufgeklärt. Ein Modell für den möglichen FATP-abhängigen Ablauf der zellulären FFA-Aufnahme und für die Kooperation der verschiedenen FATP ist in Abb. 3 dargestellt. Die verschiedenen Fettsäuren binden direkt an den FATP-Komplex oder können über CD36/FAT zu den FATP geschleust werden und gelangen durch die Plasmamembran in das Zellinnere. Im Zytoplasma werden die Fettsäuren über die Fettsäure acyl-CoA Synthetase an Koenzym A oder direkt an FABP gebunden, um den Ausstrom der Fettsäuren zu verhindern.



## 1. Einleitung



### Abb. 3:Transport und Aufnahme von FFA.

Modell zum Aufnahme-Mechanismus von FFA in das Zytoplasma durch verschiedene Fettsäuretransportproteine (Stahl *et al.* 2001). LCFA (*long chain fatty acid*), LACS (*long-chain acyl-CoA synthetase*), Acyl CoA (**A**cyl-**C**o**A** *enzyme*), ACBP (**A**cyl-**C**o**A**-*binding protein*)

### 1.2.2. NAFLD

Die häufigste Hepatopathie ist die sogenannte Fettlebererkrankung oder *steatosis hepatis*. Hier kommt es zur reversiblen Einlagerung von Fetten, meist Triglyzeriden, in Form von Fettvakuolen in den Hepatozyten. Es werden hierbei verschiedene Formen aufgrund der Ursache oder Quelle der hepatozellulären Fetteinlagerung unterschieden. Kann man einen übermäßigen Konsum von Alkohol (Tuyns & Pequignot 1984; Diehl 1999; Byrne *et al.* 2009) ausschließen, so spricht man von einer nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung (NAFLE, oder im Englischen NAFLD = *non-**al**coholic **f**atty **l**iver **d**isease*). Die Entwicklung einer NAFLD beruht auf Störungen des Fettsäure- und Triglyzeridmetabolismus in den Hepatozyten und wird vor Allem durch eine kalorienreiche Ernährung, aber auch durch hormonelle Störungen wie *Diabetes mellitus* Typ 2, eine Schwangerschaft oder durch verschiedene Medikamente ausgelöst. Die NAFLD kann über Jahre unentdeckt und Symptom-frei verlaufen, sie kann sich jedoch durch Entzündungsreaktionen im Lebergewebe zu einer Fettleberhepatitis oder NASH (*non-**al**coholic **s**teato**h**epatitis*) entwickeln. Das Fortschreiten der NASH kann sich im weiteren Verlauf zur Ausbildung einer Zirrhose



## 1. Einleitung

bis hin zum Leberversagen entwickeln. Die Prävalenz der Steatose und daraus folgender NAFLD wird zu einem immer größeren Problem in der westlichen Bevölkerung (Clark *et al.* 2002) und steht in den meisten Fällen im Zusammenhang mit dem metabolischen Syndrom, gekennzeichnet durch das Auftreten von weiteren Erkrankungen wie *Diabetes mellitus* Typ 2, Insulinresistenz, Hypertension und koronaren Herzerkrankungen. Diese Umstände bedingen außerdem ein erhöhtes Risiko für die Ausbildung des Hepatozellulären Karzinoms (HCC = *hepatocellular carcinoma*) (Calle *et al.* 2003; Bugianesi 2007; Hashimoto *et al.* 2009; Ohki *et al.* 2009; Ertle *et al.* 2011). Neben der Akkumulation von Fettvakuolen im Lebergewebe sind erhöhte Mengen an FFA und Transaminasen im Serum weitere Charakteristika der NAFLD (de Almeida *et al.* 2002; Doege *et al.* 2008; Schreuder *et al.* 2008; Boden 2011). Verschiedene Untersuchungen in Zellkultur- und Maus-Modellen, sowie Patientenstudien haben gezeigt, dass eine vorhandene Steatose eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber der Apoptose-Induktion bedeuten kann (Feldstein *et al.* 2004; Siebler *et al.* 2007; Volkmann *et al.* 2007; Pusl *et al.* 2008; Bechmann *et al.* 2010; Jiang *et al.* 2011).

### 1.3. Leberschädigung, Death Rezeptoren, Apoptose und Regeneration

Die Leber ist ein metabolisch hoch aktives Organ. Neben der Regulation des Energiestoffwechsels und der Speicherung von Nährstoffen werden in den Hepatozyten außerdem körpereigene und körperfremde Stoffwechselprodukte ab- und umgebaut. Die Metabolisierung verschiedener Substanzen durch die unterschiedlichen Enzymsysteme lässt hoch reaktive und Zell-schädigende Moleküle entstehen. Durch verschiedene Entgiftungs- und Neutralisationsmechanismen können diese reaktiven Stoffe neutralisiert oder eliminiert werden. Während diesen Prozessen kommt es oft zur Schädigung und sogar zum Tod der Leberzellen. Diese Prozesse werden z. B. durch die Stimulation von verschiedenen Death Rezeptoren (**DR**) reguliert.

## 1. Einleitung

### 1.3.1. Death Rezeptoren und Apoptose

Zur TNF/TNF-Rezeptor Superfamilie gehört eine Vielzahl von Rezeptoren und Liganden, die von verschiedenen Zelltypen exprimiert und sezerniert werden und die Zell-Proliferation, die Zell-Differenzierung, das Überleben und die Apoptose regulieren. Zu dieser Familie werden auch viele Death Rezeptoren gezählt, die vor Allem auch auf der Oberfläche von Hepatozyten zu finden sind (Abb. 4). Hierzu gehören z. B. TNFR1 (*TNF-Rezeptor 1*), CD95/FAS sowie die TRAIL-Rezeptoren DR4 und DR5 (*Death Rezeptor 4 und 5*) (Faubion & Gores 1999; Locksley *et al.* 2001; Byrne *et al.* 2009; Malhi *et al.* 2010).

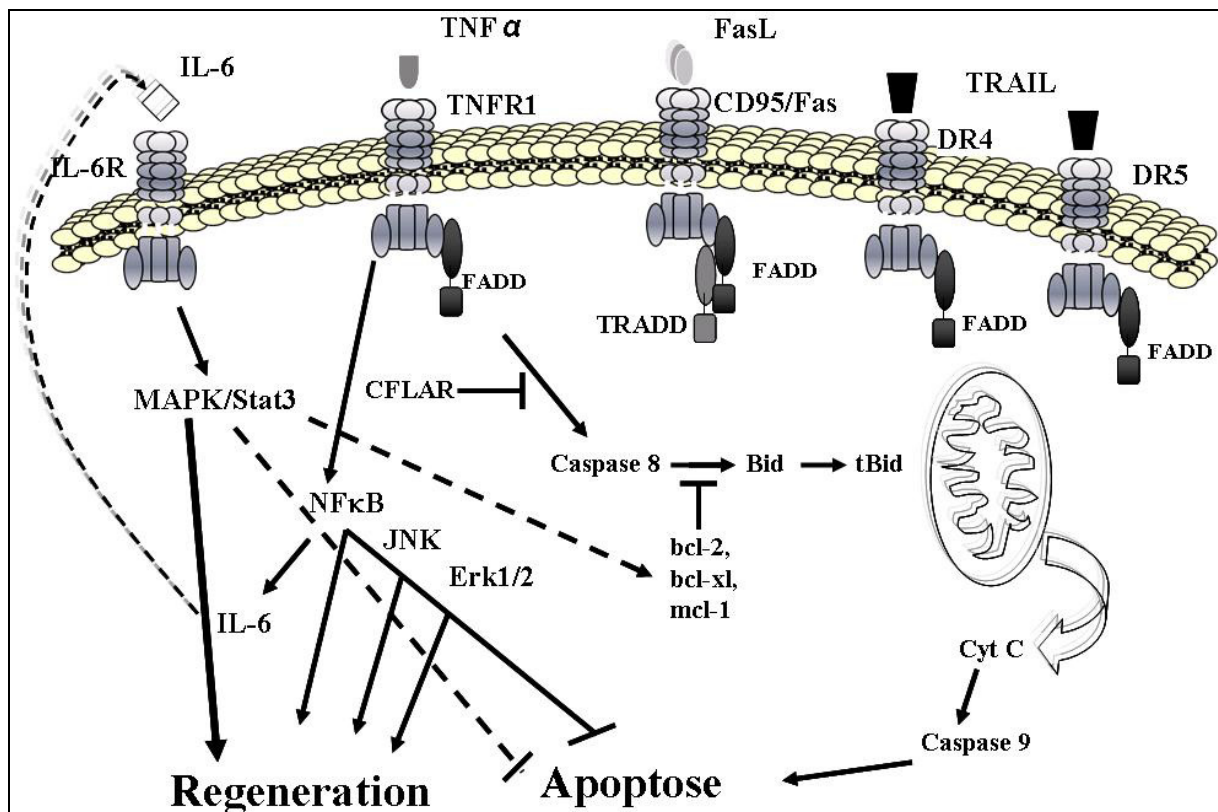


Abb. 4: Rolle von DR innerhalb der Induktion von Apoptose und Regeneration.

Die DR-Stimulation durch die entsprechenden Liganden kann verschiedene Auswirkungen haben. Die Bindung von TNF $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor alpha*) an den TNFR1, vom Fas-Liganden an CD95/Fas oder von TRAIL an DR4 oder DR5 verursacht die Oligomerisierung des Rezeptors und rekrutiert das Adapter-Molekül FADD (*Fas associated death domain*) zur Death Domäne des Rezeptors. Durch die

## 1. Einleitung

Bildung dieses Komplexes wird die Caspase 8 (*FLICE*) aktiviert, wodurch weitere Effektor-Caspasen oder der intrinsische Apoptose-Weg über die Mitochondrien aktiviert und die Apoptose ausgelöst werden kann. Neben der Induktion der Apoptose können durch die DR-Aktivierung auch anti-apoptotische und Proliferation-fördernde Moleküle aktiviert werden. Ein wichtiger anti-apoptotischer Faktor ist CFLAR (*CASP8 and FADD-like apoptosis regulator*), der mit FADD und der Caspase 8 interagiert und die DR-induzierte Apoptose verhindern kann. Im weiteren Verlauf können proliferative und regenerative Faktoren, wie Erk (*extracellular regulated MAP kinase*), JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) und nFkB (*nuclear factor kappa B*) aktiviert werden, die die Sekretion pro-inflammatorischer Mediatoren sowie die Transduktion verschiedener Wachstumsfaktoren stimulieren kann (Desbarats & Newell 2000; Kanzler & Galle 2000; Kataoka *et al.* 2000; Reed 2000; Chen & Goeddel 2002). Wichtige Beteiligte im Ablauf der Apoptose sind die Mitglieder der Bcl-2-Familie, die pro- und anti-apoptotische Moleküle umfasst. Anti-apoptotische Mitglieder der Bcl-2 Familie sind vor Allem bcl-2, bcl-xl und mcl-1, wobei die pro-apoptotischen Moleküle bax, bid, bcl-xs und bad die Apoptose vorantreiben können (Kanzler & Galle 2000). Bcl-2, bcl-xl und mcl-1 können die Induktion der Apoptose verhindern, indem sie die Regulation des Cytochrom C-Ausstroms aus den Mitochondrien und die Aktivierung von pro-Caspasen kontrollieren (Chao & Korsmeyer 1998; Budd 2002). Besonders die Stimulation des TNFR1 kann durch die Aktivierung des anti-apoptotischen Moleküls nFkB die Apoptose verhindern und sogar die Zellteilung und Differenzierung stimulieren (Desbarats & Newell 2000; Fausto 2000). Der Zelltod, aber auch die Regeneration von Leberzellen kann durch die Schädigung der Zellen und des Gewebes, hervorgerufen durch die Akkumulation von Gift- und Fremdstoffen, sowie durch Verletzungen des Gewebes ausgelöst werden. Im gesunden Lebergewebe befinden sich nur wenige proliferierende Hepatozyten in der Leber, der größte Teil der Zellen arretiert in der G<sub>0</sub>-Phase des Zellzyklus. Durch Verletzungen, Leberteilresektionen oder Gewebeschädigungen durch Giftstoffe können die Hepatozyten zur Zellteilung angeregt werden und die fehlende Lebermasse kompensieren. Bei der Leberregeneration handelt es sich nicht um eine „echte“ Regeneration im biologischen Sinne, wie sie z. B. bei dem Ersatz von Gliedmaßen bei bestimmten Amphibien- oder Reptilien-Arten vorkommt, wobei zunächst undifferenzierte Zellen entstehen, die sich durch den Einfluss verschiedener Transkriptionsfaktoren zu verschiedenen Zelltypen differenzieren können. Die

## 1. Einleitung

Regeneration von irreversibel geschädigtem oder manuell entferntem Lebergewebe durch Teilresektionen beginnt mit der Vergrößerung der Leberzellmasse durch die sogenannte kompensatorische Hypertrophie. Hierbei kommt es zunächst zur Größenzunahme der Restleber durch die Teilung intakter Hepatozyten um die fehlende Lebermasse zu kompensieren (Fausto *et al.* 2006; Riehle *et al.* 2011). Damit beruht die Regeneration der Leber nicht auf der Differenzierung von Vorläufer- oder Stammzellen, sondern auf der Teilung von reifen Hepatozyten (Zaret 2001; Zaret & Grompe 2008).

Der Ablauf der Leberregeneration wird durch verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren reguliert. Die wichtigsten Initiatoren sind die pro-inflammatorischen Zytokine TNF $\alpha$  und IL-6 (Interleukin 6) (Streetz *et al.* 2000). Untersuchungen mit IL-6- und TNFR1-Knockout-Mäusen haben gezeigt, dass IL-6 und TNFR1 für die Initiation der Regeneration essentiell sind, da die Regeneration nach Leberteilresektionen in diesen Modellen blockiert war (Yamada *et al.* 1997; Yamada *et al.* 1998; Yamada & Fausto 1998). TNF $\alpha$  und IL-6 werden hauptsächlich von Kupffer-Zellen sezerniert, TNF $\alpha$  bindet an TNFR1 und initialisiert dadurch die Aktivierung von nFkB, der die Expression von IL-6 reguliert. IL-6 wiederum bindet an den IL-6-Rezeptor der Hepatozyten und kann dadurch den JAK-STAT-Signalweg aktivieren. Die Aktivierung von STAT3 kann weitere Gene aktivieren, die die Zellproliferation vorantreiben oder eine Akute-Phase-Antwort initiieren können (Fausto & Riehle 2005). Die Sekretion der Zytokine ist notwendig, um die in der G<sub>0</sub>-Phase ruhenden Hepatozyten in die G<sub>1</sub>-Phase zu führen. Zur Ausschüttung der Zytokine müssen die Kupffer-Zellen aktiviert werden; welche Mechanismen dazu führen ist bisher nicht vollständig aufgeklärt. Verschiedener Annahmen zufolge sind Endotoxin- bzw. LPS-abhängige (LPS = **L**ipop**o**ly**s**accharide) Signalwege, oder Elemente des Komplement-Systems für die Ausschüttung der Zytokine aus den Kupffer-Zellen verantwortlich (Fausto 2000; Imuro & Fujimoto 2010). Weitere Hypothesen beschreiben, dass die Freisetzung und Entstehung von ROS (*reactive Oxygen (Sauerstoff) Species*) zur Aktivierung der Zytokine führt (Diehl 2000; Fausto 2000). Die Exkretion der verschiedenen Zytokine führt zur Aktivierung von Wachstumsfaktoren, wodurch die Regeneration weiter vorangetrieben wird. Zu den wichtigen Wachstumsfaktoren innerhalb der Leberregeneration gehören HGF (*hepatocyte growth factor*), TGF $\alpha$  und HB-EGF (*heparin-binding endothelial growth factor-like growth factor*). Diese

## 1. Einleitung

Wachstumsfaktoren realisieren ihre Wirkung durch die Bindung an entsprechende Rezeptoren. HGF bindet an den HGF-Rezeptor c-met, TGFs und EGFs binden an die EGF-Rezeptoren EGFR1 und EGFR2. Die Bindung der Liganden an die entsprechenden Rezeptoren führt im weiteren Verlauf zur Initiation verschiedener intrazellulärer Signalwege, die Transkriptionsfaktoren regulieren und damit die Zellproliferation vorantreiben. Dazu zählt vor allem die Aktivierung verschiedener MAP-Kinasen, wie der AKT-Kinase, JNK und ERK 1/2 (Talarmin *et al.* 1999; Malhi *et al.* 2006; Iimuro & Fujimoto 2010). Der Ablauf oder die eventuell benötigten Signale für die Beendigung des Regenerationsprozesses sind bisher nicht bekannt. Es wird vermutet, dass durch die Wiederherstellung des Lebergewebes und damit der Wiedererlangung der gesteigerten Synthesefunktionen die Zellproliferation verlangsamt wird und die Zellen wieder in den Ruhezustand übergehen (Fausto 2000).

### 1.3.2. Regeneration, Fettsäuren und NAFLD

Während der frühen Phase der Regeneration bei Nagern kommt es nach einer Leberteilresektion zur Einlagerung von Fetten im verbleibenden Lebergewebe (Delahunty & Rubinstein 1970; Tjburg *et al.* 1991; Newberry *et al.* 2008). Die genauen Mechanismen wurden bisher nicht aufgeklärt. Es wird vermutet, dass die Lipide nach der Teilresektion als Energie- und Bausteinquelle für die proliferierenden Hepatozyten fungieren (Brasaemle 2006). Verschiedenen FATP werden während der Leberregeneration eine entscheidende Aufgabe zugesprochen, so kommt es z. B. nach 70% Hepatektomie zur Aktivierung der FABP-1-Expression oder bei Caveolin-1 Knockout-Mäusen zu einer verminderten Einlagerung von intrazellulären Fettvakuolen im Lebergewebe in Verbindung mit einer verminderten Regeneration des Lebergewebes nach partieller Hepatektomie (Wang *et al.* 2004; Fernández *et al.* 2006). Des Weiteren werden im Ablauf der Leberregeneration nach der Freisetzung verschiedener Zytokine unterschiedliche Signalwege aktiviert, die den Zell-Zyklus und den Aufbau der extrazellulären Matrix kontrollieren, sowie eine wichtige Rolle bei der Regulation des Insulin-, Glukose- und des allgemeinen Energie-Stoffwechsels spielen. Hierzu gehört vor allem die Aktivierung von nFkB, STAT3, Erk 1/2, JNK sowie die Regulation von PK-B/Akt und PEPCK (**Phosphoenolpyruvat Carboxy Kinase**) (Farrell 2004; Fausto & Riehle 2005; Malhi *et al.* 2006).

## 1. Einleitung

Die Regeneration von steatotischem Lebergewebe wird in verschiedenen Zusammenhängen zunehmend interessanter. Spenderlebern mit einem Steatose-Anteil von mehr als 30 % werden für gewöhnlich als Spenderorgane abgelehnt, da es in diesen Fällen ein erhöhtes Risiko für Reperfusionsschäden und Abstoßungsreaktionen gibt (Selzner & Clavien 2000; Imber *et al.* 2002; Clavien & Strasberg 2009). Die Leberlebendspende wird, aufgrund von Organknappheiten, immer weiter entwickelt und erfolgreich angewendet. Die Inzidenz der Steatose und der NAFLD ist in den letzten Jahren immer weiter angestiegen, wodurch die Verfügbarkeit von passenden Spender- oder Teilspendeorganen immer weiter reduziert wurde. Diverse Studien haben die Leberregeneration in verschiedenen Steatose-Tiermodellen untersucht. Bei diesen Modellen wurde die Steatose durch Spezial-Diäten oder genetische Modifikationen induziert. Bei den genetisch modifizierten Modellen handelte es sich zumeist um Leptin- oder Leptin-Rezeptor defiziente Mäuse, die unter diesen Umständen eine Steatose oder sogar ein metabolisches Syndrom ausbildeten und nach 70% Hepatektomie eine verlangsamte und verminderte Regeneration aufwiesen (Yang 2001; Leclercq *et al.* 2003; Uetsuka *et al.* 2005; Leclercq *et al.* 2006). Weitere Studien konnten jedoch zeigen, dass die Akkumulation von Fett und die *De novo* Lipogenese nach einer Leberteilresektion für den Regenerationsprozess essenziell sind (Tijburg *et al.* 1991; Shteyer *et al.* 2004). Welche Risiken und Möglichkeiten Fettsäuren und Steatose bei der Transplantation und der Leberregeneration nach Resektionen und Teiltransplantationen aufweisen, ist bis heute unzureichend erforscht. Bislang hierzu durchgeführte Studien scheinen jedoch zu zeigen, dass nicht die Steatose selbst die Leberregeneration nach einer Teilresektion vermindert, sondern wahrscheinlich hormonelle und metabolische Störungen im Zusammenhang mit dem metabolischen Syndrom an den Einschränkungen der Leberregeneration verantwortlich sind (Zhang *et al.* 1999; Leclercq *et al.* 2003; Veteläinen, Bennink, *et al.* 2007; Newberry *et al.* 2008).

### 1.4. Zielsetzung

Die nicht-alkoholische Fettlebererkrankung zeichnet sich durch die verstärkte Akkumulation von Lipid-Vakuolen in Hepatozyten aus und ist mit einer erhöhten Expression von DR, einer gesteigerten Apoptoserate, Leberzellschädigung und

## 1. Einleitung

Leberfibrose assoziiert. Bei der Leberregeneration nach 70% Hepatektomie spielen Fette und FATP allerdings eine essenzielle Rolle. Im Regenerationsprozess werden unterschiedliche Signalwege aktiviert, die die Proliferation der Hepatozyten anregen und damit die Leberregeneration vorantreiben. Diese Signalwege können auch durch die Stimulation von DR aktiviert werden, die somit nicht nur die Apoptose, sondern auch pro-proliferative und pro-regenerative Signalwege aktivieren können. Die Zusammenhänge von DR und FATP, sowie der Induktion von Apoptose und Leberzellschädigung in steatotischen Modellen nach 70% Hepatektomie wurden bisher nicht genauer untersucht.

In der vorliegenden Arbeit sollen daher folgende Fragestellungen beantwortet werden:

- Welche Auswirkung hat die Behandlung mit FFA auf die Expression von FATP und DR in primären humanen Hepatozyten, und weisen die Zellen nach FFA-Behandlung eine erhöhte DR-assoziierte Apoptose-Sensitivität auf?
- Spielt das anti-apoptotische Molekül CFLAR eine Rolle bei der FFA-vermittelten Hepatotoxizität in primären humanen Hepatozyten?
- Welche Veränderungen verursacht die 6 Wochen andauernde Fütterung einer fettreichen Western Diät (WD) bei C57Bl/6-Mäusen?
- Hat die Fütterung einer WD für 6 Wochen einen Einfluss auf den Regenerationsprozess nach 70% Hepatektomie?

Zunächst sollten die FATP-abhängigen Mechanismen der Fettaufnahme und der DR-abhängige Zelltod in primären humanen steatotischen Zellen näher definiert werden. Durch einen siRNA-vermittelten Knockdown von CFLAR sollte die Rolle dieses anti-apoptotischen Moleküls innerhalb der FFA-vermittelten Apoptose in primären humanen Hepatozyten näher untersucht werden. In dem Maus-Modell sollte zunächst der Phänotyp nach einer 6-wöchigen Gabe einer fettreichen WD auf physiologischer und molekularer Ebene in Bezug auf Veränderungen in der Expression von DR, FATP, der FFA-Akkumulation im Lebergewebe, der Leberzellschädigung und Apoptose, sowie

## 1. Einleitung

Modifikationen metabolischer Faktoren charakterisiert werden. Im weiteren Verlauf sollte daraufhin in dem zuvor charakterisierten Maus-Modell die Regeneration steatotischer Lebern detaillierter untersucht werden.



## 2. Material und Methoden

### 2. Material und Methoden

#### 2.1. Material

##### 2.1.1. Patientenmaterial

Für die Isolation von primären humanen Hepatozyten wurde uns Lebergewebe zur Verfügung gestellt, welches im Rahmen von Tumor- und Leberteilresektionen sowie von Lebertransplantationen entnommen wurde. Alle Patienten wurden darüber informiert, dass Teile des entnommenen Gewebes für Forschungszwecke verwendet werden und hatten ihr schriftliches Einverständnis hierzu erteilt (Ethikantrag mit AZ: 09-4252). Alle aus Patientenmaterial gewonnenen oder damit assoziierten Daten werden ausschließlich in anonymisierter Form veröffentlicht. Alle Vorgehensweisen befinden sich im Einklang mit der revidierten Deklaration von Helsinki von Oktober 2000 in Edinburgh.

##### 2.1.2. Chemikalien

Aqua B. Braun (steriles Pyrogen-freies Wasser)	B. Braun Melsungen AG; Melsungen, Deutschland
Albumin Fraktion V, fatty acid free	Roche Diagnostics; Indianapolis, USA
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA), pH 7	PAA; Pasching, Österreich
CaCl <sub>2</sub> Dihydrate (99% p.a.)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Deutschland
Chloroform (contains amylenes as stabilizer, min. 99%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Collagen G, 0,4%ige Lösung in HCl	Biochrom KG; Berlin, Deutschland

## 2. Material und Methoden

Complete mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche; Grenzach, Deutschland
Coomassie Brilliant blue R-250	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Deutschland
DAB-Substrat	Dako; Hamburg, Deutschland
Deoxycholic Acid (min. 99%)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
EDTA (99% +), Ethylendiamintetraacetat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
EGTA (97%, RNase-, DNase- und Proteinase-frei), Ethylenglycol bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Deutschland
Eosin-Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Deutschland
Essigsäure (99,8%, p.a.)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Deutschland
Ethanol absolut (99,9% p.a.)	Riedel-de-Haën; Seelze, Deutschland
External Well Factor Solution	Bio-Rad Laboratories GmbH; München, Deutschland
Fetal Calf Serum (FCS), PAA Clone, ultra-low Endotoxin-free	PAA; Pasching, Österreich
Gentamycin (10mg/ml)	PAA; Pasching, Österreich
Glycine, Elektrophoresis grade	MP Biomedicals, Eschwege, Deutschland
Glycerol, ultrapure	MP Biomedicals; Illkirch, Frankreich

## 2. Material und Methoden

Haematoxylin/Eosin-Färbelösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Deutschland
HBSS(Hank's BSS (1x) ohne Ca/Mg, ohne Phenol-Rot)	PAA; Pasching, Österreich
HCl, Maßlösung 0,2M	Carl Roth GmbH & CO.KG; Karlsruhe, Deutschland
HEPES-Buffer Solution (1M)	PAA; Pasching, Österreich
Histoacryl® Gewebekleber	B. Braun Melsungen AG; Melsungen, Deutschland
INTERFERin	Polyplus Transfection™; Illkirch, Frankreich
<i>In vivo</i> -jetPEI™-Gal+ 10% Glukose-Lösung	Polyplus Transfection™; Illkirch, Frankreich
2-Propanol (Isopropanol), molecular grade (min. 99%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Deutschland
Ketamin (10%)	Ceva Tiergesundheit GmbH; Düsseldorf, Deutschland
L-Glutamin (200mM)	PAA; Pasching, Österreich
Mayer's Hämalaun Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Deutschland
Methanol	Riedel-de-Haën; Seelze, Deutschland
NaCl	GERBU Biotechnik GmbH; Heidelberg, Deutschland

## 2. Material und Methoden

NaCl 0,9% Infusionslösung	B. Braun Melsungen AG; Melsungen, Deutschland
Non-fat dried milk powder (Magermilch-Pulver)	Applichem; Darmstadt, Deutschland
Igepal Ca-630 (Nonidet P-40)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Deutschland
Oil Red O	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Deutschland
Oleic Acid, cell culture tested	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Deutschland
Palmitoleic Acid, cell culture tested	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Deutschland
Paraformaldehyd-Lösung 4%, methanolfrei	Carl-Roth GmbH & CO.KG; Karlsruhe, Deutschland
PBS(Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (1x), ohne MgCl <sub>2</sub> , ohne CaCl <sub>2</sub> )	Invitrogen; Darmstadt, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA; Pasching, Österreich
PhosSTOP-Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets	Roche, Grenzach, Deutschland
ProLong®Gold antifade reagent;  ProLong®Gold antifade reagent with DAPI	Invitrogen; Darmstadt, Deutschland
Proteinase K, ready to use	Dako; Hamburg, Deutschland
Restore™ Western Bolt Stripping Buffer	Pierce/Thermo Scientific; Rockford, USA

## 2. Material und Methoden

Röntgen-Entwicklerkonzentrat	Adefo-Chemie GmbH; Dietzenbach, Deutschland
Röntgen-Fixierkonzentrat	Adefo-Chemie GmbH; Dietzenbach, Deutschland
Shandon Xylene Substitute	Thermo Scientific; Bonn, Deutschland
SDS (Sodiumdodecylsulfat), ultrapure	MP Biomedicals; Illkirch, Frankreich
TissueTek® O.C.T.™ Compound	Sakura; Alphen aan den Rijn, Niederlande
Trichloressigsäure (10%), p.a.	Carl Roth GmbH & CO.KG; Karlsruhe, Deutschland
Tri-Natriumcitrat Dihydrat (99%)	Carl Roth GmbH & CO.KG; Karlsruhe, Deutschland
Tris, Tris(hydroxymethyl)-aminomethan,	MP Biomedicals; Illkirch, Frankreich
Tris-HCl (99%, redox titrated)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Deutschland
TRizol® Reagent	Invitrogen; Darmstadt, Deutschland
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Deutschland
Wasserstoffperoxid (30%), ROTIPURAN® p.a. ISO, stabilisiert	Carl Roth GmbH & CO.KG; Karlsruhe, Deutschland
Xylazin (2%)	Ceva Tiergesundheit GmbH; Düsseldorf, Deutschland

## 2. Material und Methoden

### 2.1.3. Medien und Zusätze

#### Zellkultur primärer humaner Hepatozyten:

DMEM/Ham's F-12-Medium mit 10 % hitzeinaktiviertem FCS (30 min bei 56°C), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 2 mM L-Glutamin.

### 2.1.4. Puffer und Lösungen

Blockierlösung (Western-Blot)	5 % (w/v) Magermilchpulver in TBST
Collagen G-Lösung (Beschichtung von Zellkultur-Platten)	5,5 ml Collagen G-Lösung in 45 ml PBS (ohne Ca/Mg)
Coomassie Entfärbelösung	50 % (v/v) Methanol; 1 % (v/v) Essigsäure
Coomassie-Blau Färbelösung	40 ml Ethanol; 2 ml Essigsäure; 0,2 g Coomassie  brilliant blue ad 100 m
Entwickler (Röntgenfilme)	50 ml Entwicklerlösung in 200 ml H <sub>2</sub> O
Fixierer (Röntgenfilme)	50 ml Fixierlösung in 200 ml H <sub>2</sub> O
Natrium-Citrat-Puffer	1,47g tri-Natriumcitrat Dihydrat in 500ml H <sub>2</sub> O, pH 6 einstellen und mit 250µl Tween 20 versetzen
Oil Red O Stock-Lösung	0,35g Oil Red O in 100 ml Isopropanol, Rühren ü N und durch 0,2µm Filter sterilfiltrieren
Oil Red O Gebrauchslösung	60% (v/v) Oil Red O Stock-Lösung in H <sub>2</sub> O
Ponceau S Lösung	2 % (w/v) Ponceau S in 10 % (v/v) Trichloressigsäure

## 2. Material und Methoden

RIPA-Puffer	50mM Tris-HCl  150mM NaCl  0, 1% Igepal  1% Deoxycholic Acid  pH auf 7,5 einstellen, sterilfiltrieren
SDS Probenpuffer (4x)	40 % (w/v) Glycerol;  20 % (v/v) $\beta$ -Mercaptoethanol; 12 % (w/v) SDS; 0,4 %  Bromphenolblau
TBS (10x)	100 mM Tris; 1,5 M NaCl pH 7,4
TBST	1x TBS; 0,1 % (v/v) Tween 20
Tris Glycin SDS-Laufpuffer (Western-Blot)	25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1 % (w/v) SDS

### 2.1.5. Proteingrößenstandards

Protein-Marker:

Page Ruler Prestained Protein Marker [MBI Fermentas, Thermo Scientific; St. Leon-Rot, Deutschland]

### 2.1.6. Antikörper

Fas-Agonist CH-11 zur Stimulation des CD95/Fas-induzierten Zelltods:

Anti-Fas (human, activating), clone CH-11; monoclonal Antibody: #05-201[Millipore; Temecula, USA], 15 $\mu$ g/ml in PBS mit 1% BSA Fraktion V (fettfrei)

## 2. Material und Methoden

### **Primärantikörper:**

#### Western-Blot:

Anti-Erk1 (K-23): sc-94; polyclonal Rabbit [Santa Cruz Biotechnology; Heidelberg, Deutschland], Verdünnung 1: 1.000 in 5% Trockenmilch in TBST

Anti-pErk: phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2)(Thr202/Tyr204)(197G2): #4377, monoclonal Rabbit [Cell Signaling Technology, New England Biolabs; Frankfurt/Main, Deutschland], Verdünnung 1:1.000 in 5% BSA in TBST

Anti-β-Actin: (13E5) HRP Conjugate: #5125, monoclonal Rabbit [Cell Signaling Technology, New England Biolabs; Frankfurt/Main, Deutschland], Verdünnung 1:1.000 in 5% BSA in TBST

#### Immunhistochemie:

Anti-Ki67: KI681C01; monoclonal Rabbit [DCS Biogenex; Hamburg, Deutschland], Verdünnung 1:200 in PBS

### **Sekundärantikörper:**

#### Western-Blot:

Goat-anti-Mouse IgG HRP Konjugat: A4416 [Sigma; Saint Lois, USA], Verdünnung 1: 5.000 in Blockierlösung

Goat-anti-Rabbit IgG HRP Konjugat: A0545 [Sigma; Saint-Lois, USA], Verdünnung 1. 10.000 in Blockierlösung



## 2. Material und Methoden

### Immunhistochemie:

Donkey-anti-Rabbit POX: 711-036-152 [Dianova; Hamburg, Deutschland],  
Verdünnung 1:25 in PBS

### *2.1.7. Oligonukleotide*

#### Humane Primer:

Caveolin-1 (NM\_001172895)

Caveolin-1 forward ( $T_m=59,4^\circ\text{C}$ ) 5'-GAG CTG AGC GAG AAG CAA GT- 3'

Caveolin-1 reverse ( $T_m=57,3^\circ\text{C}$ ) 5'-CAA TCT TGA CCA CGT CAT CG- 3'

CD36/FAT (NM\_000072)

CD36 forward ( $T_m=58,4^\circ\text{C}$ ) 5'-AAC AGA GGC TGA CAA CTT CAC A- 3'

CD36 reverse ( $T_m=60,1^\circ\text{C}$ ) 5'-AAC AGT TCT CTC AAA GTT CTG ACT TG- 3'

CD95/Fas (NM\_000043)

CD95/Fas forward ( $T_m=53,2^\circ\text{C}$ ) 5'-CAA AGC CCA TTT TTC TTC CA- 3'

CD95/Fas reverse ( $T_m=56,5^\circ\text{C}$ ) 5'-TTT GGT TTA CAT CAG CAC TTG G- 3'

cFLAR (NM\_001127183)

cFLAR forward ( $T_m=60,5^\circ\text{C}$ ) 5'-CGT CTA GGG GAG CGA AGG-3'

cFLAR reverse ( $T_m=57,9^\circ\text{C}$ ) 5'-TCT GAG GGC TGA CTT CAT TTC-3'

## 2. Material und Methoden

### DR4 (NM\_003844)

DR4 forward ( $T_m=59,4^\circ\text{C}$ )      5'-GAG GGA TGG TCA AGG TCA AG- 3'

DR4 reverse ( $T_m=55,3^\circ\text{C}$ )      5'-AGC AAC GGA ACA ACC AAA GT- 3'

### DR5 (NM\_003842)

DR5 forward ( $T_m=57,9^\circ\text{C}$ )      5'-TCA GGA TGA TGG TGA TTT GC- 3'

DR5 reverse ( $T_m=58,2^\circ\text{C}$ )      5'-ATT CTC TCA TCC TTA GAG ATT GAG-3'

### FABP-1 (NM\_001443)

FABP-1 forward ( $T_m=57,3^\circ\text{C}$ )      5'-GCA GAG CCA GGA AAA CTT TG-3'

FABP-1 reverse ( $T_m=59,4^\circ\text{C}$ )      5'CAC CCC CTT GAT ATC CTT CC- 3'

### FATP-5 (NM\_012254)

FATP-5 forward ( $T_m=59,4^\circ\text{C}$ )      5'-GCC CTG CCC TCT TCA TCT AT- 3'

FATP-5 reverse ( $T_m=59,4^\circ\text{C}$ )      5'-CCC CAG ATA AGG ACA GCA TC- 3'

### HPRT (NM\_000194)

HPRT forward ( $T_m=57,3^\circ\text{C}$ )      5'-CTT GCG ACC TTG ACC ATC TT- 3'

HPRT reverse ( $T_m=59,4^\circ\text{C}$ )      5'-GAC CAG TCA ACA GGG GAC AT- 3'

### NOXA (NM\_021127)

NOXA forward ( $T_m=58,8^\circ\text{C}$ )      5'-GAG ATG CCT GGG AAG AAG G- 3'

NOXA reverse ( $T_m=55,3^\circ\text{C}$ )      5'-TTC TGC CGG AAG TTC AGT TT - 3'

## 2. Material und Methoden

PUMA (NM\_001127240)

PUMA forward ( $T_m=59,4^\circ\text{C}$ )      5'-GAC GAC CTC AAC GCA CAG TA- 3'

PUMA reverse ( $T_m=58,4^\circ\text{C}$ )      5'-AGG AGT CCC ATG ATG AGA TTG T - 3'

SDHA (NM\_004168)

SDHA forward ( $T_m=61,4^\circ\text{C}$ )      5'-ACA CAG ACC TGG TGG AGA CC-3'

SDHA reverse ( $T_m=57,3^\circ\text{C}$ )      5'-CAA AGG GCT TCT TCT GTT GC-3'

TNFR1 (NM\_001065)

TNFR1 forward ( $T_m=57,3^\circ\text{C}$ )      5'-CCT TCA CCG CTT CAG AAA AC-3'

TNFR1 reverse ( $T_m=58,8^\circ\text{C}$ )      5'-CGG TCC ACT GTG CAA GAA G-3'

### Maus-Primer:

Mm\_Bbc3\_2\_SG (Puma), Cat. No. QT01657432, QuantiTect® Primer Assay [Qiagen; Hilden, Deutschland]

Mm\_Cd36\_1\_SG, Cat. No. QT01058253, QuantiTect® Primer Assay [Qiagen]

Mm\_Cflar\_2\_SG, Cat. No. QT01776033, QuantiTect® Primer Assay [Qiagen]

Mm\_Fabp-1\_1\_SG, Cat. No. QT00114744, QuantiTect® Primer Assay [Qiagen]

Mm\_Fas\_1\_SG, Cat. No. QT00095333, QuantiTect® Primer Assay [Qiagen]

Mm\_Hprt\_1\_SG, Cat. No. QT00166768, QuantiTect® Primer Assay [Qiagen]

Mm\_Ii6\_1\_SG, Cat. No. QT00098875, QuantiTect® Primer Assay [Qiagen]

## 2. Material und Methoden

Mm\_Pmaip1\_2\_SG (Noxa), Cat. No. QT01759401, QuantiTect® Primer Assay [Qiagen]

Mm\_Sdha\_2\_SG, Cat. No.: QT01037666, QuantiTect® Primer Assay [Qiagen]

Mm\_Slc27a5\_1\_SG (FATP-5), Cat. No. QT00166124, QuantiTect® Primer Assay [Qiagen]

Atg5 (NM\_053069)

Atg5 forward ( $T_m=65,7^\circ\text{C}$ )      5`-CGA CGG AGC GGC CTT TCA TCC-3`

Atg5 reverse ( $T_m=64,0^\circ\text{C}$ )      5`-CTC TCC ATC TTC AGG GGC GAC T-3`

Atg7 (NM\_001253717)

Atg7 forward ( $T_m=63,7^\circ\text{C}$ )      5`-TGC CTC ACC AGA TCC GGG GTT-3`

Atg7 reverse ( $T_m=66,3^\circ\text{C}$ )      5`-CGC TAG GAA GGT GAA TCC TTC-3`

Bcl-2 (NM\_009741)

Bcl-2 forward ( $T_m=63,7^\circ\text{C}$ )      5`-CGG AGG CTG GGA TGC CTT TGT-3`

Bcl-2 reverse ( $T_m=63,5^\circ\text{C}$ )      5`-AGT GAT GCA GGC CCC GAC CA-3`

Bcl-xl (NM\_009743)

Bcl-xl forward ( $T_m=65,7^\circ\text{C}$ )      5`-GTC CTT TGG CGG GGC ACT GTG-3`

Bcl-xl reverse ( $T_m=64,6^\circ\text{C}$ )      5`-GAA TGT CCC AGC CGC GGT T-3`

Beclin1 (NM\_019584)

Beclin1 forward ( $T_m=63,7^\circ\text{C}$ )      5`-TGC CTC ACC AGA TCC GGG GTT-3`

## 2. Material und Methoden

Beclin1 reverse ( $T_m=66,3^\circ\text{C}$ )      5`-CGC TAG GAA GGT GAA TCC TTC TCG C-3`

Hgf (NM\_010427)

Hgf forward ( $T_m=62,7^\circ\text{C}$ )      5`-ACC ACA CGA ACA CAG CTT TTT GCC-3`

Hgf reverse ( $T_m=67,6^\circ\text{C}$ )      5`-GGG TCC CCC TTC TTC CCC TCG-3`

Hprt (NM\_013556)

Hprt forward ( $T_m=57,3^\circ\text{C}$ )      5`-CGT CGT GAT TAG CGA TGA CGA TGA TG-3`

Hprt reverse ( $T_m=59,8^\circ\text{C}$ )      5`-CGA AGT CTT TCA GTC CTG TCC-3`

Mcl-1 (NM\_008562)

Mcl-1 forward ( $T_m=65,5^\circ\text{C}$ )      5`-CCG GCT CCA AGG ACT CG-3`

Mcl-1 reverse ( $T_m=63,7^\circ\text{C}$ )      5`-AGT TTC CGG AGC ATG CCC TGG-3`

Met/Hgf-Rezeptor (NM\_008591)

Met forward ( $T_m=61,4^\circ\text{C}$ )      5`-TGT GAA GCG CGC AGT GACGA-3`

Met reverse ( $T_m=64,0^\circ\text{C}$ )      5`-AGC ACC ACC TGC ATG AAG CGA C-3`

### siRNA:

Hs\_cFLAR\_11 Sense      5`-GCA AGA UAA GCA AGG AGA ATT-3`

Hs\_cFLAR\_11 Antisense      5`-UUC UCC UUG CUU AUC UUG CCT-3`

Mm\_Cflar\_11 Sense      5`-GAA CGA UGU AUC CUC CUU ATT-3`

## 2. Material und Methoden

Mm-Cflar\_11 Antisense

5`-UAA GGA GGA UAC AUC GUU CTG-3`

### 2.1.8. Enzyme

Kollagenase Typ IV aus *Clostridium histolyticum* [Sigma-Aldrich; Steinbach, Deutschland]

### 2.1.9. Transfektionsreagenzien

Für die *in vitro*-Transfektion der primären humanen Hepatozyten wurde INTERFERin™ und für die *in vivo*-Transfektion der Mäuse das Transfektionsreagenz *in vivo*-jetPEI™-Gal von der Firma Polyplus Transfection™ [Illkirch, Frankreich] verwendet.

### 2.1.10. Kits

Adenosine 5'-triphosphate (ATP) bioluminescent somatic cell assay kit [Sigma-Aldrich; Saint-Louis, USA]

Amersham ECL Plus™ Western Blotting Detection Reagents [GE Healthcare; München, Deutschland]

BCA Protein Assay Kit [Pierce/Thermo Fisher Scientific; Bonn, Deutschland]

Bcl-2 ELISA Kit [Calbiochem/Merck; Heidelberg, Deutschland]

Bio-Plex Pro™ Mouse Cytokines, Chemokines and Growth Factors Assay [Bio-Rad Laboratories GmbH; München, Deutschland]

Bio-Plex Pro™ Mouse Diabetes Assay [Bio-Rad Laboratories GmbH; München, Deutschland]

Free Fatty Acid Quantification Kit [BioVision; Mountain View, USA]

## 2. Material und Methoden

*In Situ* Cell Death Detection Kit, Flourescein (TUNEL-Assay) [Roche Diagnostics; Mannheim, Deutschland]

Mouse Adiponectin/Acrp30 Quantikine ELISA Kit [R&D Systems; Minneapolis, USA]

M30 CytoDeath™ ELISA [Peviva; Bromma, Schweden]

QuantiTect® Reverse Transcription Kit [Qiagen; Hilden, Deutschland]

QuantiTect® SYBR® Green PCR Kit [Qiagen; Hilden, Deutschland]

RNeasy® Mini Kit [Qiagen; Hilden, Deutschland]

Triglyceride Quantification Kit [BioVision; Mountain View, USA]

### 2.1.11. Verwendete Experimentalfuttermittel

Standard-Diät (SD): ssniff® R/M-H Alleinfuttermittel für die Haltung von Ratten und Mäusen [Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland]

Western-Diät (WD): TD.88137 Adjusted Calories Diet [Harlan Teklad; Horst, Niederlande]

### 2.1.12. Verbrauchsmaterialien

15ml und 50ml Rührchen	Greiner Bio-one GmbH; Frickenhausen, Deutschland
12ml PP-Rührchen mit rundem Boden	Greiner Bio-one GmbH; Frickenhausen, Deutschland
1ml, 2ml, 5ml und 10 ml Einwegspritzen	Terumo Europe N.V.; Leuven, Belgien

## 2. Material und Methoden

1ml Einwegspritzen, Omnifix F	B.Braun Melsungen AG; Melsungen, Deutschland
Adhäsive Verschlussfolien (Klebefolien) für PCR-Platten	Nerbe plus GmbH; Winsen/Luhe, Deutschland
BD Microlance 3 (0,4 x 19mm; 0,9 x 40mM; 0,5 x 25mm) Einwegkanülen	Becton Dickinson/BD Biosciences; Fraga, Spanien
Biocoat-Platten, 6-Well	Becton Dickinson/BD Biosciences; Erembodegen, Belgien
Combitips plus 5ml, 10ml	Eppendorf; Hamburg, Deutschland
Deckgläschen (24x24mm; 24x60mm)	Engelbrecht medizin- und labortechnik GmbH; Edermünde, Deutschland
Einwegskalpelle	Servoprax® GmbH; Wesel, Deutschland
Hyperfilm™ ECL High Performance chemiluminescence film	Amersham Biosciences Europe GmbH; Freiburg, Deutschland
Metallsiebe, Maschenweite 60 mesh	Sigma-Aldrich-Inc.; Saint- Louis, USA
Mini-PROTEAN® TGX™Gels , 10% und anykD für Trans-Blot®Turbo™	Bio-Rad Laboratories GmbH; München, Deutschland
Multiparameter Messstreifen Leber-Panel für Spotchem EZ VET®	Akray; Kyoto, Japan
Nunc Cryotube™ Vials	Thermo Fisher Scientific;



## 2. Material und Methoden

	Bonn, Deutschland
Parafilm®	Pechiney Plastic Packaging; Menasha, USA
PCR-Platten, PP Natur, 96-Well	Nerbe plus GmbH; Winsen/Luhe, Deutschland
Petrischalen für die Zellkultur	Greiner Bio-one GmbH; Frickenhausen, Deutschland
25µm und 45µm PharmAssure Sterilfilter	Pall medical GmbH; Dreieich, Deutschland
Pipettenspitzen 0,1l-10µl, 1-20µl, 10-100µl und 101-1000µl	Starlab GmbH; Ahrensburg, Deutschland
Pipettenspitzen 2µl; 200µl	Biozym Scientific GmbH; Oldendorf, Deutschland
Safe-Lock Reaktionsgefäße 0,5ml, 1,5ml und 2ml	Eppendorf; Hamburg, Deutschland
Serologische Einwegpipetten, 2ml, 5ml, 10ml, 25ml und 50ml Cellstar®	Greiner Bio-one GmbH; Frickenhausen, Deutschland
Trans-Blot®Turbo™ PVDF-Membranen, mini und midi Format	Bio-Rad Laboratories GmbH; München, Deutschland
Tissue Ruptor® Disposable probes, nonsterile	Qiagen; Hilden, Deutschland
Vasofix ® Safety Venenverweilkatheter 20G	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Zählkammer, Neubauer	Brand GmbH& CO KG; Wertheim, Deutschland
Zellkulturplatten 96-Well Format	Greiner Bio-one GmbH;

## 2. Material und Methoden

	Frickenhausen, Deutschland
Zellschaber, gelb	Greiner Bio-one GmbH; Frickenheim, Deutschland

### 2.1.13. Geräte

Autoklav 2540 EL	Systemec GmbH; Wettengel, Deutschland
BioPhotometer	Eppendorf; Hamburg, Deutschland
Bio Plex	Bio-Rad Laboratories GmbH; München, Deutschland
CO <sub>2</sub> Inkubator Hera Cell	Heraeus; Hanau, Deutschland
Eagle Eye	Stratagene; Santa Clara, USA
ELISA Reader LAMBDA E	MWG-Biotech; Ebersberg, Deutschland
Feinwaage AT261 Delta Range	Mettler Toledo; Giessen, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop Axioplan mit der Kamera AxioCam HRc	Zeiss; Jena, Deutschland
HYBAID OmniGene Heizblock	Thermo HYBAID GmbH, Garching, Deutschland
iCycler iQ™	Bio-Rad Laboratories GmbH; München, Deutschland

## 2. Material und Methoden

Inverses Gewebekulturmikroskop TMSF	Nikon GmbH; Düsseldorf, Deutschland
Kamera (Eagle Eye) Pieper FK7512-IQ	Biostep GmbH; Jahsdorf, Deutschland
LaminAir® Sterilwerkbank	Heraeus; Hanau, Deutschland
Laser Scan Mikroskop LSM 510	Zeiss; Jena, Deutschland
Luminometer FB12	Berthold Technologies GmbH, Wildbad, Deutschland
Mikroskop Eclipse TS100	Nikon GmbH; Düsseldorf, Deutschland
Netzteile (Powersupplies): PowerPac 300 und PowerPac HD™	Bio-Rad Laboratories GmbH; München, Deutschland
Peristaltikpumpe Masterflex® easy-load II	Cole Parmer Instrument Company; Vernon Hills, USA
pH-Meter 765 Calimetric	Knick; Berlin, Deutschland
Schüttler Titramax 1000	Heidolph Instruments GmbH&CO KG; Schwabach, Deutschland
Spotchem EZ SP-4430	Arkray; Kyozo, Japan
Sterilwerkbank Biological Safety Cabinet Class II	NuAire; Plymouth, USA
TissueRuptor	Qiagen; Hilden, Deutschland
Trans-Blot®Turbo™ System Blotting System	Bio-Rad Laboratories GmbH; München, Deutschland

## 2. Material und Methoden

Ultra-Turrax, Dispergiergerät	IKA; Staufen, Deutschland
Waage MP-3000	Chyo Balance Corp.
Wasserbäder GLF und Julabo U3	Julabo Labortechnik GmbH; Seelbach, Deutschland
Zentrifugen 5424, 5810R und 5415R	Eppendorf; Hamburg, Deutschland

### *2.1.14. Computerprogramme*

Adobe Photoshop Extended CS5

Axiovision Zeiss 4.0

GraphPad PRISM 5.0

iCycler iQ 3.1

LSM Image Browser Zeiss 4.2

MS-Office Paket 2003

Phoretics 1D 4.01

Primer 3 Version 0.4.0

Zotero 9.0.1

## 2. Material und Methoden

### 2.2. Methoden

#### 2.2.1. Zellkultur-Modell

##### 2.2.1.1. Isolation primärer humaner Hepatozyten aus Lebergewebe

Das Lebergewebe für die Isolation primärer humaner Hepatozyten erhielten wir von allgemein chirurgischen Eingriffen, bei denen Leberteilresektionen zur Entfernung verschiedener Tumoren durchgeführt wurden, oder von Explantaten durchgeführter Lebertransplantationen. Die Ätiologien der Patienten sind in Tabelle 1 aufgeführt. Die für die Perfusion verwendeten Lebergewebestücke wurden möglichst weit entfernt von entstandenen Schnittkanten oder sichtbarem Tumor- oder Metastasengewebe entnommen.

**Tabelle 1:** Verteilung der Patienten-Ätiologien der Resektate, die für die Präparation von primären humanen Hepatozyten verwendet wurden.

Ätiologie	Anzahl
HCC (hepatozelluläres Karzinom)	2
CCC (cholangiozelluläres Karzinom)	3
Kolorektale Lebermetastasen	4
Lebermetastasen bei Mamma Karzinom	2

Nachdem ein geeignetes Gefäß an der Schnittkante des Gewebestücks gefunden wurde, wurde hier eine 20G Venenverweilkanüle eingeführt, fixiert und die Schnittfläche für eine bestmögliche und vollständige Perfusion mit Histoacryl® Gewebekleber versiegelt. Die Perfusionslösungen wurden mithilfe einer Peristaltikpumpe bei einer Pumpgeschwindigkeit von 30-50ml/min durch ein geschlossenes Schlauchsystem gepumpt, wobei die Flüssigkeiten durch einen Liebigkühler geleitet und dabei auf eine Temperatur von ca. 41 °C erwärmt wurden. Zunächst wurde das Gewebestück kurz mit HBSS versetzt mit 0,02M Gentamycin und

## 2. Material und Methoden

0,2M HEPES (im weiteren Text als HBSS/Genta/HEPES bezeichnet) durchgespült um verbliebene Blutreste zu entfernen. Danach folgte die Perfusion mit 120ml HBSS/Genta/HEPES mit 0,5mM EGTA, dabei wurde zunächst das Gewebe mit 40ml durchspült und die Lösung abgesaugt. Mit den restlichen 80ml wurde das Gewebe zirkulierend für ca. 20 min durchspült. Nach 20-minütiger Perfusionsdauer wurde die Leber nach dem gleichen Prinzip mit 120ml Kollagenase IV-Lösung (HBSS/Genta/HEPES mit 5mM CaCl<sub>2</sub> und 240-250U/ml Kollagenase IV) perfundiert. Die Kollagenase wurde zuvor in HBSS/Genta/HEPES mit 5mM CaCl<sub>2</sub> gelöst und durch einen 0,45µm PharmAssure Filter sterilfiltriert. Nach ca. 20-minütiger Perfusion mit der Kollagenase-Lösung zeigte das Gewebe eine deutlich aufgeschwemmte und weiche Konsistenz. Das Gewebe wurde mit einem Skalpell grob zerkleinert, mithilfe eines Stempels durch ein Sieb mit 4µm Maschenweite (60 mesh) gedrückt und mit HBSS/Genta/HEPES gespült. Die Zellsuspension wurde dreimal bei 18g (300rpm) für 10 min gewaschen, das Zellpellet wurde anschließend in Zellkulturmedium aufgenommen. Nach der Bestimmung der Zellzahl mit einer Neubauerzählkammer wurden die Zellen mit einer Dichte von 1 Mio Zellen pro Well in einer 6-Well-Platte ausgesät. Die Zellen wurden in den Brutschrank überführt und innerhalb der ersten Stunde alle 10 min geschwenkt, um eine gleichmäßige Verteilung der lebenden Zellen zu gewährleisten. Nach einer Stunde wurde das Kulturmedium gewechselt und damit nicht anhaftende, vor Allem tote Zellen, entfernt. Nach 24h wurde das Medium erneut durch frisches Medium ersetzt und nach weiteren 24h wurden die Zellen stimuliert.

### 2.2.1.2. Kultivierung und In-vitro Stimulation mit freien Fettsäuren

Von den beiden Fettsäuren Ölsäure und Palmitoleinsäure wurde jeweils eine Emulsion mit der Konzentration von 100mM in PBS mit 1% BSA Fraktion V (fettfrei) angesetzt. Dabei entsprechen 100mM Ölsäure 25,14µl/ml PBS+1%BSA und 100mM Palmitoleinsäure 22,8µl/ml PBS+1%BSA. Die beiden 100mM-Lösungen werden daraufhin im Verhältnis 2:1 (2 Teile Ölsäure und 1 Teil Palmitoleinsäure) gemischt. Das Gemisch wurde aliquotiert und konnte für längere Zeit bei -20°C gelagert werden.

Die primären humanen Hepatozyten wurden in DMEM/Ham's F-12-Medium mit 10% hitzeinaktiviertem FCS, 100U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin und 2mM L-

## 2. Material und Methoden

Glutamin kultiviert. Die Zellen wurden in einem wasserdampfgesättigten Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. 48h nach der Zellisolation wurde das Medium vor der Behandlung mit FFA durch frisches Medium ersetzt und die entsprechende Menge an FFA aus der 100mM FFA-Stammlösung zu dem Kulturmedium gegeben.

### 2.2.1.3. Transiente Transfektion mit siRNA

Bei der transienten Transfektion wird spezifische siRNA in die Zelle eingeschleust und über die RNA-Interferenz die Expression des entsprechenden Gens gehemmt. Die RNA-Interferenz beruht auf der spezifischen, post-transkriptionalen Inhibition der Genexpression durch doppelsträngige RNA und ist ursprünglich ein natürlicher Abwehr-Mechanismus eukaryotischer Zellen gegen fremde, z. B. virale RNA. Bei der verwendeten siRNA (*small interfering RNA*) handelt es sich um synthetisch hergestellte 19-25bp lange doppelsträngige künstlich hergestellte RNA-Fragmente. Wird die siRNA von der Zelle aufgenommen kann diese in einem Protein-Komplex (*RNA inducing silencing complex/RISC*) homolog an die mRNA binden, wodurch die mRNA in mehrere Bruchstücke gespalten wird und nicht mehr für die Translation verwendet werden kann. Durch diese Methode kann direkt im Organismus die Expression eines bestimmten Gens vorübergehend gehemmt werden.

Die Transfektion mit cFLAR-spezifischer siRNA erfolgte mithilfe des Transfektionsreagenz INTERFERin™, welches die siRNA während der Aufnahme in die Zelle schützen soll und gleichzeitig die Aufnahme über die Zellmembran erleichtern soll. Die entsprechende Menge an siRNA (Endkonzentration von 10nM) und JetPEI wurden jeweils in Serum-freiem DMEM/Ham`s F-12 -Medium verdünnt (Endvolumen jeweils 100µl), die beiden Ansätze wurden miteinander vereint und für 10 min bei RT inkubiert, um eine Komplexbildung von siRNA und Transfektionsreagenz zu ermöglichen. In der Zwischenzeit wurde das Kulturmedium der Zellen durch frisches Medium (+FCS) ersetzt. Nach der Komplexbildung wurde der Transfektionskomplex (200µl) auf die Zellen getropft und dabei leicht geschwenkt. Ca. 24h nach der Transfektion wurde das Medium durch frisches Medium ersetzt und die Zellen mit FFA behandelt.

## 2. Material und Methoden

### 2.2.1.4. Stimulation der Zellen mit dem CD95/Fas-Agonisten CH11

Der Anti-Fas Antikörper (clone CH11) wurde in PBS mit 1% BSA Fraktion V (fettfrei) auf eine Konzentration von 15µg/ml eingestellt, aliquotiert und konnte dann für längere Zeit bei -20°C gelagert werden.

Nach der Inkubation mit FFA wurde das Medium entfernt und durch Medium versetzt mit dem CD95/Fas-Agonisten CH11 ersetzt. Der Antikörper wurde in einer Endkonzentration von 100ng/ml eingesetzt und die 15µg/ml Stocklösung mit Zellkulturmedium verdünnt. Die Inkubation mit CH11 erfolgte für 4h im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>.

### *2.2.2. Tiermodell und operative Technik*

#### 2.2.2.0. Induktion der Steatose durch die Fütterung einer Western Diät (WD)

Männliche 6 Wochen alte C57Bl/6-Mäuse wurden für weitere 6 Wochen entweder mit einer Standard-Diät (SD), bestehend aus 58% Kohlenhydraten, 33% Proteinen und 9% Fetten, oder mit einer sogenannten Western-Diät (WD), mit einer Zusammensetzung aus 49% Kohlenhydraten, 17% Proteinen und 21% Fetten gefüttert. Während der Fütterungsphase konnten die Tiere frei über die Futter- und Wassermenge verfügen und wurden bei künstlichem Licht bei einem 12h Tag- und Nachtrhythmus im zentralen Tierlaboratorium des Universitätsklinikums Essen gehalten. Die Zunahme des Körpergewichts wurde wöchentlich dokumentiert.

#### 2.2.2.1. 70% Leberteilresektion (70% PHx)

Die Tiere wurden vor der Operation gewogen und erhielten eine intraperitoneale Injektions-Narkose mit Ketamin/Xylazin (100mg/kg Körpergewicht Ketamin und 10mg/kg Körpergewicht Xylazin, verdünnt in 0,9% NaCl-Lösung). Nach Prüfung der Reflexe und Erreichen des entsprechenden Narkosestadiums wurde die Bauchdecke an der abdominal verlaufenden Mittellinie geöffnet. Nach Exposition der intraabdominellen Organe folgt zur Mobilisierung der einzelnen Lappen die scharfe



## 2. Material und Methoden

Durchtrennung des *Ligamentum falciforme hepatis*, des *Ligamentum triangulare dextrum*, des *Ligamentum triangulare sinistrum* und der intrahepatischen Bänder. Nach Setzung von Ligaturen folgt jeweils die Entfernung des linken und des mittleren Leberlappens, die insgesamt 70% des gesamten Lebervolumens entsprechen (Mitchell & Willenbring 2008). Der Bauchraum wurde kurz mit steriler Kochsalzlösung gespült, darauf erfolgt zunächst der Verschluss der Muskelschichten und anschließend der Haut jeweils mit einer kontinuierlichen Naht.

Die operativen Eingriffe wurden durchgeführt von Frau Dr. med Yanli Gu, Abteilung für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie des Uniklinikums Essen, genehmigt durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV) mit der Genehmigungsnummer AZ 8.87-50.10.37.09.167.

### 2.2.2.2. Probengewinnung

Nach der Entnahme des Lebergewebes (während der Operation oder Entnahme des Restlebergewebes nach Tötung an den Tagen 1, 2 und 7 nach der Operation) wurde das Gewebe gewogen und für verschiedene Zwecke konserviert. Ein Teil wurde für die spätere Einbettung in Paraffin in 4% Paraformaldehyd gegeben, ein weiterer Teil wurde in Tissue Tek® O.C.T.™ Compound Einbettmedium gegeben und langsam in der Gasphase von flüssigem Stickstoff gefroren, ein Teil des Gewebes wurde in ein Cryo-Röhrchen überführt und ebenfalls in flüssigem Stickstoff gefroren. Die gefrorenen Gewebeproben wurden bei -80 °C gelagert.

Zur Entnahme von Blut erhielten die Tiere eine Ketamin/Xylazin-Narkose, die Bauchdecke wurde geöffnet und mithilfe einer Spritze wurde das gesamte Blut aus der *Vena cava* entnommen und in ein Probenröhrchen überführt. Die Proben wurden für 2-4h im Kühlschrank stehen gelassen, damit das Blut gerinnen konnte. Das Serum wurde durch Zentrifugation für 10 min bei 5.000 g bei RT von den festen Blutbestandteilen getrennt und bei -80 °C gelagert.

Ein Teil der Gewebeproben wurde während der Operation entnommen, um die Unterschiede zwischen den beiden Fütterungsgruppen im Lebergewebe vor der

## 2. Material und Methoden

Leberteilresektion bzw. vor der Regeneration durchzuführen (prä-OP-Proben), sowie an den Tagen 1, 2 und 7 nach 70% PHx.

### 2.2.2.3. Paraffineinbettung und Anfertigung von Gewebeschnitten

Die Gewebe-Einbettung in Paraffin, die Anfertigung der Paraffin- und Gefrier-Schnittpräparate sowie die Hämatoxylin-Eosin-Färbung, die Oil-Red-O-Färbung der Gewebeschnitte und die Ki67-Immunhistochemie wurden freundlicherweise von Frau Dorothe Möllmann, MTA am Institut für Pathologie und Neuropathologie der Universitätsklinik Essen angefertigt.

Das Gewebe wurde für mindestens 24h in 4% Paraformaldehyd aufbewahrt, das Paraformaldehyd wurde bei Bedarf gewechselt. Die Präparate wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert, in ein Xylolbad gegeben und in Paraffin eingebettet. Aus den Paraffinblöcken wurden mittels Schlittenmikrotom ca. 1-3µm starke Schnitte angefertigt und auf Objektträger aufgebracht.

### 2.2.2.4. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Mit der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) werden die unterschiedlichen Strukturen im Lebergewebe angefärbt. Für diese Färbung wurden sowohl Paraffin- als auch Gefrierschnitte verwendet. Die Paraffinschnitte wurden vor der Färbung mittels Xylolbad entparaffinisiert und durch eine absteigende Ethanolreihe hydriert. Die Gewebeschnitte wurden zunächst in Hämalaun-Lösung inkubiert, mit H<sub>2</sub>O gespült und unter fließendem Wasser gebläut. Die Präparate wurden kurz mit H<sub>2</sub>O gespült und in eine Eosin-Lösung gegeben, in H<sub>2</sub>O gespült und in einer aufsteigenden Ethanolreihe wieder entwässert und dann in Histomount eingedeckt.

### 2.2.2.5. Oil-Red-O-Färbung

Für die Oil-Red-O-Färbung von Lebergewebe wurden Gefriergewebeschnitte mithilfe eines Cryo-Mikrotoms mit einer Schnittstärke von ca. 5-15µm hergestellt. Die

## 2. Material und Methoden

Gefrierschnitte wurden mit H<sub>2</sub>O gewaschen und für 5 min in 60% Isopropanol gegeben. Für die Färbung wurden die Gewebeschnitte für 10 min in Oil-Red-O-Gebrauchslösung gegeben, danach kurz mit H<sub>2</sub>O gewaschen, nochmals für 5 min in 60% Isopropanol gegeben und mit H<sub>2</sub>O ausgewaschen. Die gefärbten Gewebeschnitte wurden kurz mit Hämatoxylin-Lösung gegengefärbt und eingedeckt. Die Quantifizierung der Oil-Red-O-gefärbten Fläche erfolgte mit dem Programm Axiovision 4.0.

Für die Oil-Red-O-Färbung von Zellen wurden diese nach entsprechender Inkubation mit PBS gewaschen und mit 4% Paraformaldehyd überschichtet. Nach 10 min wurde das Paraformaldehyd durch frisches ersetzt und die Zellen über Nacht bei 4°C gelagert.

Vor der Färbung wurden die Zellen mit H<sub>2</sub>O gewaschen und danach mit 60% Isopropanol für 5 min bei RT geschüttelt. Das Isopropanol wurde entfernt und die Zellen komplett getrocknet. Die getrockneten Zellen wurden für 10 min bei RT mit Oil-Red-O Gebrauchslösung überschichtet und geschüttelt. Nach der Färbung wurde die Oil-Red-O-Lösung entfernt und die Zellen mehrmals mit H<sub>2</sub>O gewaschen.

Für mikroskopische Aufnahmen wurden die Zellen mit ProLong®Gold Antifade mit DAPI eingedeckt.

Zur Quantifizierung der Oil-Red-O-Aufnahme wurden die getrockneten Zellen mit 1ml 100% Isopropanol bedeckt und für weitere 10 min geschüttelt, um das akkumulierte Oil-Red-O wieder aus den Zellen herauszuwaschen. Der Oil-Red-O-haltige Überstand wurde auf eine 96-Well Platte überführt und die Extinktion bei einer Wellenlänge von 500nm gemessen.

### 2.2.2.6. Ki67-Immunhistochemie

Die Paraffin-Gewebeschnitte wurden zunächst in Xylol entparaffinisiert und mittels absteigender Ethanolreihe rehydriert. Die endogene Peroxydase-Aktivität wurde durch Inkubation in Methanol mit 3% Wasserstoffperoxid blockiert. Die Schnitte wurden kurz in H<sub>2</sub>O gewaschen und dann für 20 min in Citratpuffer in der Mikrowelle erhitzt. Der Ki67-Antikörper wurde in PBS mit 5% BSA verdünnt und für 60 min in einer feuchten

## 2. Material und Methoden

Kammer bei RT inkubiert. Im Anschluss wurden die Gewebeschnitte in PBS gewaschen, für 30 min mit dem Sekundär-Antikörper inkubiert und erneut kurz in PBS gewaschen. Die Schnitte wurden mit frisch angesetztem DAB-Substrat entwickelt, kurz mit H<sub>2</sub>O gespült, mit Hämatoxylin-Lösung gegengefärbt und in Leitungswasser gebläut und mit Histomount eingedeckt. Die Quantifizierung der Ki67-Färbung erfolgte über die Berechnung des prozentualen Anteils an Ki67-positiven Zellen pro Gesamtzellzahl.

### 2.2.2.7. Terminal-transferase-mediated-dUTP-nick-end-labeling (TUNEL)-Assay

Durch den sogenannten TUNEL-Assay kann der Zelltod im Gewebe bestimmt werden. Dazu wurden Paraffin-Gewebeschnitte zunächst mit Xylol deparaffinisiert und über eine absteigende Ethanolreihe hydriert. Die Gewebeschnitte wurden mit Proteinase K permeabilisiert, mit PBS gewaschen und der TUNEL-Assay mithilfe des *In Situ* Cell Death Detection Kits, Fluorescein von der Firma Roche nach Herstellerangaben durchgeführt. Nach der Färbung wurden die Gewebeschnitte mit ProLong® Gold antifade reagent + DAPI eingedeckt. Die Quantifizierung des Zelltodes erfolgte über die Bildung des Quotienten von TUNEL-positiven Zellen pro Gesichtsfeld

### 2.2.2.8. Bestimmung von AST, ALT, LDH, Bilirubin, Gesamtprotein, Albumin

Die Bestimmung der Serum-Parameter AST, ALT, LDH, Bilirubin, Gesamtprotein und Albumin erfolgte mit dem Spotchem™-Systems, einem klinisch-chemischen Trockenchemie-Analyser. Hierbei werden die genannten Parameter mithilfe eines Reagenzstreifens gemessen. Der Reagenzstreifen besteht aus einem Mehrschicht-Testfeld, welches aus den nötigen Reagenzien besteht, um eine Farbreaktion hervorzurufen, die durch Reflexionsspektroskopie durch das SPOTCHEM-Analysengerät der Firma Akray quantifiziert werden kann.

## 2. Material und Methoden

### 2.2.2.9. Bestimmung von Serum-FFA

Die Bestimmung der freien Fettsäuren im Serum wurde mit dem Free Fatty Acid Quantification-Kit der Firma BioVision durchgeführt. Die Messung wurde nach Angaben des Herstellers mit 50µl Serum pro Messung durchgeführt.

### 2.2.2.10. Bestimmung von Interleukine und pro-inflammatorische Faktoren

Die Interleukine IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-13, IL-17 sowie die inflammatorischen Faktoren Eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , KC, MCP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES und TNF- $\alpha$  wurden durch einen Bio-Plex Pro Mouse Cytokine, Chemokine and Growth Factor Assay der Firma Bio-Rad Laboratories nach Angaben des Herstellers gemessen.

### 2.2.2.11. Bestimmung Diabetes-assoziiertes Faktoren

Die Diabetes-assoziierten Faktoren Ghrelin, GIP, GLP-1, Glucagon, Insulin, Leptin, PAI-1 und Resistin wurden durch den Bio-Plex Pro Mouse Diabetes Assay der Firma Bio-Rad Laboratories nach Angaben des Herstellers gemessen.

### 2.2.2.12. Bestimmung von Adiponektin

Das Adipokin Adiponektin wurde durch einen ELISA der Firma R&D Systems bestimmt. Dafür wurde das Serum wie im Protokoll angegeben verdünnt und der ELISA nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

## 2. Material und Methoden

### 2.2.3. Nukleinsäuren

#### 2.2.3.0. Isolation von RNA aus Zellkultur

Die Isolation von RNA aus primären humanen Hepatozyten wurde mit dem RNeasy Kit und den enthaltenen Puffern von Qiagen durchgeführt. Für die Isolation von RNA aus primären humanen Hepatozyten wurden 1 Mio Zellen/6-Well ausplattiert und entsprechend behandelt. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen und mit 600µl RLT-Puffer versetzt. Mithilfe eines Zellschabers wurden die Zellen von der Platte gelöst und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Die Zellsuspension wurde mithilfe einer 1ml Spritze und einer 27G-Kanüle mehrere Male resuspendiert, um einen besseren Aufschluss der Zellen sowie die Zerstörung der genomischen DNA zu fördern. Das Gemisch wurde mit 600µl 70% Ethanol versetzt und auf eine Qiagen-Säule gegeben. Durch Zentrifugation wurde die RNA vom Durchfluss getrennt und an die Säule gebunden. Die RNA mit RW1-Puffer und dem RPE-Puffer gewaschen, durch Zentrifugation kurz getrocknet und dann mit 50 µl RNase-freiem Wasser in ein frisches Reaktionsgefäß eluiert. Die RNA-Proben wurden bei -20°C für kürzere Zeit und dauerhaft bei -80°C gelagert.

#### 2.2.3.1. Isolation von RNA aus Gewebe

Zur Isolation von RNA aus Lebergewebe wurde ein ca. linsengroßes Stück Gewebe in 2ml TRIzol gegeben und mit dem Ultra-Turrax Dispergiergerät homogenisiert. Das Zellysate wurde mit 200µl Chloroform versetzt, gemischt, für ca. 2-3 min bei RT inkubiert und dann bei 4°C für 15 min bei 12.000 rpm zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde vorsichtig in ein neues Gefäß überführt und die darin enthaltene RNA mit 500µl Isopropanol gefällt und für 10 min bei RT inkubiert. Durch Zentrifugation wurde die RNA pelletiert, mit 1ml 75% Ethanol gewaschen und für 5 min bei 7.500 g abzentrifugiert. Die überschüssige Flüssigkeit wurde mithilfe einer Kapillare abgesaugt und das Pellet in 100µl RNase-freiem Wasser gelöst. Die RNA wurde daraufhin mithilfe des Qiagen-RNeasy-Kits aufgereinigt. Dazu wurde zu der resuspendierten RNA 250µl 100% Ethanol und 350µl RLT-Puffer gegeben. Dieses Gemisch wurde auf die Säule gegeben und wie in 2.2.3.1 beschrieben weiter verfahren.

## 2. Material und Methoden

### 2.2.3.2. Quantifizierung von RNA

Die Quantifizierung der RNA erfolgte im Photometer bei einer Wellenlänge von 260nm und 280nm. Eine  $OD_{260nm}$  entspricht einer RNA-Konzentration von 40 $\mu$ g/ml. Durch die Bildung des Quotienten  $OD_{260nm}/OD_{280nm}$  kann eine Aussage über die Reinheit der isolierten RNA getroffen werden. Für reine RNA liegt ein Quotient von 1,8-2,0 vor. Die RNA wurde nach der Konzentrationsbestimmung auf eine Konzentration von 125ng/ $\mu$ l mit RNase-freiem Wasser eingestellt.

### 2.2.3.3. cDNA-Synthese

Bei dieser Methode wird von der isolierten RNA als Matrize ausgehend eine cDNA durch die reverse Transkriptase synthetisiert. Für die reverse Transkription wurde das QuantiTect® Reverse Transcription Kit von Qiagen verwendet. Die cDNA-Synthese erfolgte nach Angaben des Herstellers mit 1 $\mu$ g Gesamt-RNA als Matrize.

### 2.2.3.4. Quantitative RT-PCR (Polymerase Chain Reaktion)

Bei dieser Methode kann durch die Verwendung spezifischer Oligonukleotid-Primer ein bestimmter DNA-Abschnitt amplifiziert werden. Die PCR besteht aus drei Abschnitten. Zunächst wird der PCR-Ansatz auf 95°C erhitzt, damit sich die beiden DNA-Stränge voneinander trennen (Denaturierung). Beim zweiten Schritt wird der Ansatz abgekühlt, damit die Primer komplementär binden können (Annealing). Die Annealing-Temperatur richtet sich nach der Schmelztemperatur der Primer und wurde immer 5 °C unterhalb der niedrigsten Schmelztemperatur der jeweilig verwendeten Primer gewählt. Im dritten Schritt wird der Ansatz auf eine Temperatur von 72°C (Temperaturoptimum der Taq-Polymerase) erhitzt, wodurch die Taq-Polymerase in 5'→3' Richtung den Einzelstrang zu einem komplementären Doppelstrang synthetisieren kann (Elongation). Die Amplifikation verlief nach folgendem Schema über 40 Zyklen:

## 2. Material und Methoden

15 min 95 °C (einmaliger Schritt zu Anfang der Amplifikation)

Jeder Zyklus: 30 sec 95 °C (Denaturierung)

30 sec 50-60 °C (Annealing)

30 sec 72 °C (Amplifikation)

Die Reaktionen wurden im 96-Well-Format angesetzt und in einem iCycler iQ-System durchgeführt und gemessen. Der Reaktionsansatz wurde in einem Gesamtvolumen von 30 µl angesetzt mit 2 µl cDNA, 15 µl QuantiTect Sybr Green Master Mix, 1 µl forward Primer, 1 µl reverse Primer (jeweils 10 pmol/µl) und 11 µl Nuklease-freiem Wasser. Die verwendeten Nukleotidsequenzen wurden über die Pubmed Nukleotid-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) ermittelt. Die verwendeten Primer wurden mithilfe der Software Primer 3 (<http://www.frodo.wi.mit.edu>) oder über die Funktion „pick primer“ bei Pubmed erstellt und von der Firma MWG Biotech (Eurofins MWG GmbH; Ebersberg, Deutschland) synthetisiert. Mit den QuantiTect Primer Assays von Qiagen wurden die PCR-Ansätze mit 2 µl cDNA, 15 µl QuantiTect Sybr Green Master Mix, 3 µl QuantiTect Primer Assay und 10 µl Nuklease-freiem Wasser angesetzt.

Vor der PCR wurde zur Normalisierung der Hintergrund-Fluoreszenz eine Platte mit External-Well-Factor-Solution (30 µl/Well in einer 96-Well-Platte) gemessen. Im Anschluss an die PCR-Reaktion wurde die Schmelzkurve jeder Probe zur Überprüfung der Spezifität der Reaktion ermittelt. Nukleotidsequenzen haben in Abhängigkeit von ihrer Länge und dem G-C-Gehalt eine spezifische Schmelztemperatur. Die PCR-Produkte der verschiedenen Proben, die mit den gleichen Primern amplifiziert wurden sollten eine identische Schmelztemperatur aufweisen. Somit konnten unspezifische PCR-Produkte detektiert und von der Auswertung ausgeschlossen werden. Wurde ein Gen sehr niedrig exprimiert, so konnte dies durch unspezifische Schmelzkurven gezeigt werden. Die jeweiligen Schmelzkurven der Proben wurden durch schrittweise Senkung der Messtemperatur von 95 °C auf 55 °C in 0,5 °C Schritten für jeweils 10 sec ermittelt.

Die Messung der Fluoreszenzintensität ist abhängig von der im Reaktionsgefäß enthaltenen doppelsträngigen DNA, da in jeden DNA-Strang der Fluoreszenz-Farbstoff Sybr Green interkaliert. Durch die Amplifikation der DNA wird damit auch die Intensität



## 2. Material und Methoden

der Fluoreszenz gesteigert. Die Fluoreszenz in jedem Well wird nach jedem PCR-Zyklus gemessen. Der sogenannte ct-Wert (*cycle threshold*) bezeichnet den Anfang der Phase des exponentiellen Wachstums der Messkurve und damit den Punkt an dem das Fluoreszenz-Signal das Signal der Hintergrund-Fluoreszenz überschreitet und sich die Kurve im exponentiellen Bereich der Messung befindet. Je mehr cDNA in dem Reaktionsansatz vorlag, desto mehr Kopien entstehen und desto intensiver ist das Fluoreszenz-Signal und desto eher überschreitet das Fluoreszenz-Signal die Hintergrund-Fluoreszenz. Für jede Probe wurde außerdem ein sogenanntes Housekeeping-Gen gemessen (HPRT oder SDHA), welches in allen Zellen annähernd gleichmäßig exprimiert wird. Bei der relativen Quantifizierung wird die Genexpression des Zielgens auf das Housekeeping-Gen bezogen oder normalisiert. Dabei wird jeweils der ct-Wert der Kontrolle des Housekeeping-Gens bzw. des Zielgens von den ct-Werten der behandelten Probe subtrahiert und ein Quotient gebildet (Differenz der Zielgen ct-Werte/ Differenz der Housekeeping-Gen ct-Werte). Die genaue Methode der Berechnung wird in einer Publikation von M. Pfaffl beschrieben (Pfaffl 2004). Der erhaltene Wert, der sogenannte „*foldchange*“ beschreibt den relativen Expressionsunterschied einer Probe zwischen Behandlung und der Kontrolle normalisiert zum Housekeeping-Gen.

### 2.2.4. Proteine

#### 2.2.4.0. Isolation von Proteinen aus Zellkultur

Zur Isolation von Proteinen aus primären humanen Hepatozyten wurden die Zellen zunächst zwei Mal mit PBS gewaschen, mit 200µl RIPA-Puffer pro 6-Well versetzt, mit einem Zellschaber von der Kulturschale entfernt und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Das Zelllysate wurde für 30 min auf Eis inkubiert, zwischendurch immer wieder kurz gevortext und danach für 30 min bei 13.000 rpm und bei 4°C zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde in ein sauberes Gefäß überführt und bei -80°C gelagert.

## 2. Material und Methoden

### 2.2.4.1. Isolation von Proteinen aus Lebergewebe

Ein ca. linsengroßes Gewebestück wurde in 500µl RIPA-Puffer mithilfe des TissueRuptor von Qiagen homogenisiert. Das Zelllysat wurde für 30 min auf Eis inkubiert und danach für 30 min bei 13.000 rpm und bei 4°C zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde in ein sauberes Gefäß überführt und bei -80°C gelagert.

### 2.2.4.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinbestimmung nach Bradford erfolgte mithilfe des Pierce BCA Protein Assay Kits von Pierce nach Angaben des Herstellers. Die Messung erfolgte in einer 96er-well Platte bei einer Wellenlänge von 560nm im ELISA-Plattenlesegerät. Als Standard wurde eine BSA-Eichkurve eingesetzt.

### 2.2.4.3. Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen im SDS-Polyacrylamidgel (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen erfolgte nach der Methode von Laemmli (Laemmli 1970) im diskontinuierlichen Polyacrylamidgel. Bei diesem Verfahren wurden die Proteine durch Zugabe von SDS und dem reduzierenden Thiol  $\beta$ -Mercaptoethanol bei 95°C erhitzt. Bei diesem Schritt wurden Sekundär- und Tertiärstrukturen durch die Unterbrechung von Wasserstoffbrücken und Disulfidbrücken aufgehoben und die Proteine linearisiert. Das SDS lagerte sich an die Proteine an und überdeckte dabei deren Eigenladung wodurch diese eine gleichmäßig negative Ladung erhielten. Für die Gelelektrophorese wurden kommerziell erhältliche fertige Polyacrylamidgele der Firma Bio-Rad verwendet. Das Gel wurde in die Elektrophorese-Kammer eingespannt und mit 1x Tris-Glycin-SDS Laufpuffer überschichtet. Die Kämme wurden gezogen und die Geltaschen mit Puffer durchgespült. Die Proteinproben (30µg Gesamtprotein) wurden mit ¼ Volumen SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Die Proben wurden abgekühlt, kurz abzentrifugiert und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese

## 2. Material und Methoden

erfolgte für ca. 30-40 min bei 150 V bis die Front des Probenpuffers den unteren Rand des Gels erreicht hatte.

### 2.2.4.4. Proteintransfer auf PVDF-Membranen (Western-Blot)

Der Proteintransfer erfolge als „*semi-dry*“ Blot mit dem TransBlot®Turbo™-System von Bio-Rad. In die Transferkammer wurden 4 in Puffer getränkte Filter und die PVDF-Membran luftblasenfrei gelegt. Das Trenngel wurde auf die Membran gelegt und dann mit 4 weiteren in Puffer getränkten Filtern bedeckt. Mit einer Rolle wurden evtl. noch vorhandene Luftblasen entfernt, der Deckel aufgebracht und mit leichtem Druck verschlossen. Der Transfer erfolgte bei Mini Gelen für 3 min, bei Midi Gelen für 7 min.

### 2.2.4.5. Farbnachweis membrangebundener Proteine

Nach dem Western-Blot wurde der Transfer der Proteine mittels Ponceau S-Färbung überprüft. Durch diese Färbung können Proteine reversibel auf der PVDF-Membran angefärbt werden. Dazu wurde die Membran kurz mit einer Ponceau S-Lösung überschichtet und dann wieder mit Wasser entfärbt. Bei erfolgreichem Transfer sind die Proteine als rotes Bandenmuster zu erkennen.

### 2.2.4.6. Immunologischer Nachweis von Proteinen

Nach dem Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran wurden unspezifische Bindungsstellen auf der Membran durch die Inkubation mit Blockierlösung für 1h bei RT abgesättigt. Die Membran wurde über Nacht bei 4°C leicht schwenkend mit dem Primärantikörper (verdünnt je nach Antikörper in Blockierlösung oder 5% BSA-Lösung) inkubiert. Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper wurde die Membran 3 x für jeweils 10 min mit TBST gewaschen. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte für 1h bei RT. Die Membran wurde mit TBST für 3 x 10 min gewaschen. Die Detektion erfolgte mithilfe des Amersham ECL™ Western Blotting Detection Reagent von GE Healthcare nach Angaben des Herstellers. Die Exposition erfolgte auf

## 2. Material und Methoden

Röntgenfilmen, die für unterschiedliche Zeiträume auf die Membran aufgelegt wurden. Die belichteten Filme wurden in Entwicklerlösung gegeben, kurz in Wasser gewaschen, in Fixierlösung gelegt und danach für ca. 30 min gewässert.

### 2.2.4.7. Coomassie Färbung von PVDF-Membranen

Die Proteine auf den PVDF-Membranen wurden durch eine Coomassie-Färbung angefärbt und auf der Membran fixiert. Die Membran wurde zunächst für ca. 1-2 min in Coomassie-Färbelösung geschwenkt. Die Färbelösung wurde entfernt und die Membran wurde mit Coomassie-Entfärbelösung so lange wieder entfärbt, bis die Proteinbanden gut sichtbar waren.

### 2.2.4.8. Western-Blot-„Stripping“

PVDF-Membranen können nach der Detektion mit einem spezifischen Antikörper und nach der Färbung mit Coomassie Blau mit einem anderen spezifischen Antikörper erneut entwickelt werden. Dazu ist es hilfreich die noch gebundenen Antikörper von der Membran wieder zu lösen (Stripping). Die Membran wurde dazu kurz in Methanol gegeben und danach für 2 x 5 min in TBST gewaschen. Der Puffer wurde auf die Membran gegeben und für 30 min bei 37°C leicht geschüttelt. Die Membran wurde erneut für 2 x 10 min in TBST gewaschen und konnte wie in 2.2.4.7 beschrieben mit einem anderen Primär-Antikörper inkubiert werden.

### 2.2.4.9. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Zum Nachweis von M30, Bcl-2 und Adiponektin wurden ELISA-Kits nach Angaben der Hersteller verwendet. Für den M30 Cytodeath-ELISA und für den Bcl-2 ELISA wurden 20µg des Gesamtproteinlysats verwendet. Für die Bestimmung von Adiponektin wurde Serum verwendet, das nach Angaben des Herstellers verdünnt wurde.

## 2. Material und Methoden

### 2.2.4.10. Bestimmung von Triglyzeriden im Lebergewebe

Zur Quantifizierung der Triglyzeride im Lebergewebe wurde ein ca. linsengroßes Gewebestück zunächst gewogen, in eine Lösung bestehend aus Wasser und 5% NP-40 gegeben und mithilfe des TissueRuptors von Qiagen homogenisiert. Die Probe wurde für ca. 5 min in ein 80-90°C warmes Wasserbad gegeben, bis die Trübung verschwunden war. Das Gemisch wurde abzentrifugiert, der Überstand 10-fach mit H<sub>2</sub>O verdünnt und nach Angaben des Herstellers für die Messung eingesetzt. Die Menge der Triglyzeride wurde auf das verwendete Gewicht normalisiert.

### 2.2.4.11. Bestimmung von zellulärem ATP im Lebergewebe

Ein ca. linsengroßes Stück gefrorenen Lebergewebes wurde in einem Mörser mithilfe eines Pistills und unter Zugabe von flüssigem Stickstoff zu einem Pulver zerstoßen. Das Pulver wurde gewogen und mit 500µl Dilution-Buffer (im Kit enthaltener Puffer zur Verdünnung der Proben oder wie in diesem Fall zur Zell-Lyse) versetzt. Das Gemisch wurde einige Male durch eine 27G Kanüle gezogen, um das Gewebe zu homogenisieren. Das Lysat wurde für 10 min auf Eis stehen gelassen und danach für 10 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde für die Messung eingesetzt. Dazu wurden in einem Reaktionsgefäß 100µl ATP-Assay Mix gegeben und für 3 min auf Eis inkubiert. In dieser Zeit wurden in einem weiteren Gefäß 100µl Releasing Agent, 50µl H<sub>2</sub>O und 50µl des Zelllysats vermischt. Die beiden Ansätze wurden vereint und die Lumineszenz direkt gemessen.

### 2.2.5. Statistik

Soweit nicht anders beschrieben werden die Daten als Mittelwert  $\pm$  SEM (*standard error of mean*) angegeben. Unterschiede zwischen jeweils zwei Gruppen wurden mittels ungepaartem Student's T-Test berechnet. Sofern Varianzen zwischen den Gruppen signifikant unterschiedlich waren, wurde eine Welch's-Korrektur durchgeführt. Sogenannte Ausreißer wurden durch einen Grubb-Test ermittelt und von der Auswertung ausgeschlossen. Die Gruppengrößen (n) bezeichnen im Zellkultur-Modell die Anzahl der unterschiedlichen Patienten-Proben aus denen die Hepatozyten isoliert

## 2. Material und Methoden

wurden oder im Maus-Modell die Anzahl der Tiere innerhalb einer Gruppe und sind nach Entfernung der Ausreißer angegeben.

Für alle angegebenen Berechnungen und die grafische Darstellung der Daten wurde das Programm Graph Pad Prism 5 verwendet.

### **3. Ergebnisse:**

Der Ergebnisteil besteht aus zwei Teilabschnitten, bestehend aus einem Zellkultur-Modell mit primären humanen Hepatozyten und einem Maus-Modell.

Im Zellkultur-Modell wurden die Hepatozyten mit freien Fettsäuren (FFA) behandelt und die FFA-Aufnahme sowie die Expression von FATP, DR und die Induktion der Apoptose näher untersucht.

In dem Maus-Modell erhielten die Tiere entweder eine Standard- oder eine sogenannte Western-Diät über einen Zeitraum von 6 Wochen, im Anschluss wurde eine 70% Leberteilresektion (70% PHx) durchgeführt. Dabei wurden im ersten Abschnitt die Auswirkungen der WD auf physiologischer und molekularer Ebene näher untersucht und in der zweiten Passage die Auswirkungen der WD auf den Regenerations-Prozess untersucht.

#### **3.1. Behandlung von primären humanen Hepatozyten mit FFA für 24-96h**

In den folgenden Experimenten wurde die Wirkung von FFA auf primäre humane Hepatozyten untersucht. Dabei wurde zunächst auf die FFA-Aufnahme und Akkumulation in den Zellen und im späteren Verlauf auf molekulare Veränderungen, wie die mRNA-Expression verschiedener FATP, DR und der Induktion der Apoptose nach der Behandlung, eingegangen.

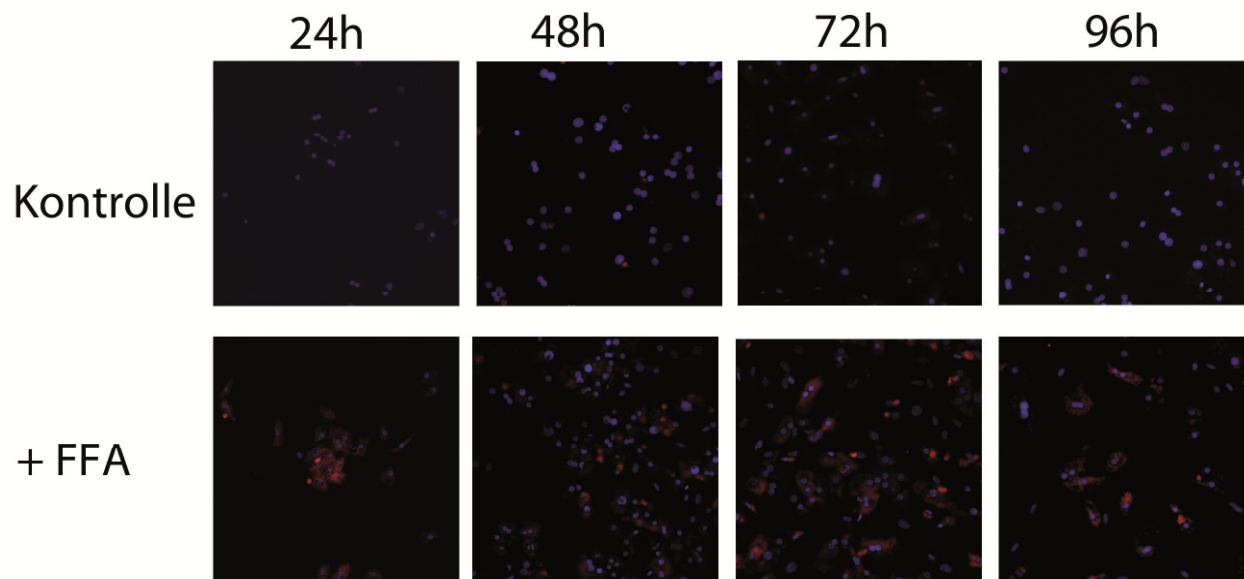
##### *3.1.1. Fettaufnahme in primäre humane Hepatozyten nach Behandlung mit FFA für 24-96h*

Durch eine Oil-Red-O-Färbung sollte die Aufnahme der FFA nach 24-96-stündiger Inkubation mikroskopisch dargestellt und quantifiziert werden.

Die primären humanen Hepatozyten wurden ca. 48h nach der Isolation aus humanem Lebergewebe mit 1mM FFA in frischem Medium für 24h-96h behandelt. In Abb. 5 konnte durch eine Oil-Red-O-Färbung die Aufnahme und Speicherung der FFA gezeigt werden. Bereits nach 24h waren vermehrt Fetttropfen in Form von Vakuolen in den

### 3 Ergebnisse

primären humanen Hepatozyten zu erkennen. Auch nach 96h FFA-Inkubation waren noch immer Fettvakuolen in den Zellen zu sehen.



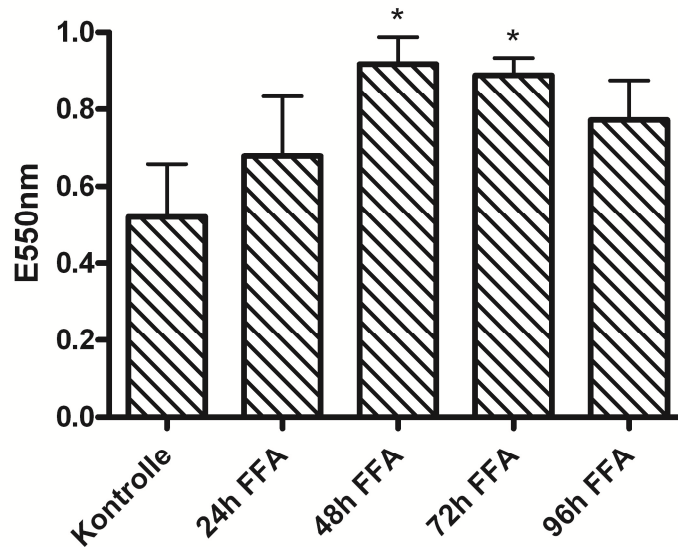
**Abb. 5: Oil-Red-O-Färbung von primären humanen Hepatozyten nach FFA-Behandlung.**

Die Zellen wurden mit 1mM FFA für 24-96h inkubiert. Die FFA-Aufnahme wurde durch eine Oil-Red-O-Färbung dargestellt. LSM-Aufnahme (Objektiv x20), als Kernfärbung wurde DAPI verwendet.

Für die Quantifizierung der Oil-Red-O-Akkumulation wurde das in den Fettvakuolen gespeicherte Oil-Red-O mit Isopropanol wieder herausgelöst und der Überstand für eine photometrische Messung bei einer Wellenlänge von 550nm verwendet. Wie in den mikroskopischen Aufnahmen zu sehen war, kam es schon nach 24h FFA-Behandlung zu einer erhöhten Fettaufnahme. Nach FFA-Inkubation erhöhten sich die gemessenen Extinktionswerte signifikant von 0,52 in den unbehandelten Kontroll-Zellen auf 0,92 nach 48h und auf 0,89 nach 72h. Auch nach 96h waren noch immer vermehrt FFA in den Zellen gespeichert.



### 3 Ergebnisse



**Abb. 6: Oil-Red-O-Quantifizierung nach FFA-Behandlung.**

Nach Behandlung mit 1mM FFA für 24-96h wurden die Zellen mit Oil-Red-O gefärbt und der akkumulierte Farbstoff anschließend aus den Zellen gelöst. Das gelöste Oil-Red-O wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 550nm gemessen (Mittelwert  $\pm$  SEM, n = 3; \* = p < 0,05 vs. Kontrolle).

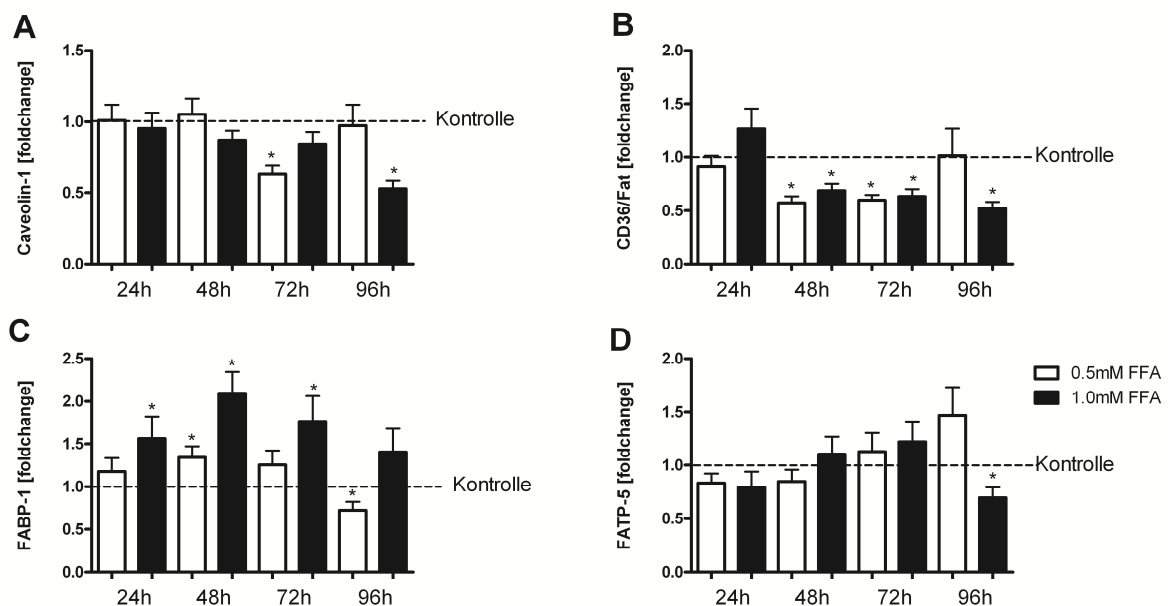
Die Oil-Red-O-Färbung konnte sowohl im Laser-Scan-Mikroskop als auch durch die Quantifizierung des aus den Zellen gelösten Farbstoffs zeigen, dass es nach der Behandlung der primären humanen Hepatozyten mit 1mM FFA für 24-96h zu einer verstärkten Anreicherung von Fetttropfen in Form von Vakuolen im Zytoplasma kam. Dabei zeigten die Zellen nach 48h und 72h den höchsten Gehalt an FFA im Zytoplasma auf, nach 96h Inkubation mit FFA war der Fettgehalt in den Zellen wieder reduziert.

#### *3.1.2. Expression von Fettsäuretransportproteinen (FATP) in primären humanen Hepatozyten nach Behandlung mit FFA für 24-96h*

In einer Arbeit wurde beschrieben, dass der erhöhte Gehalt an Serum-FFA bei adipösen Patienten mit einer erhöhten Expression von FATP einherging (Bechmann *et al.* 2010). Nachdem gezeigt werden konnte, dass die zelluläre Fettakkumulation durch die Behandlung mit FFA in primären humanen Hepatozyten gesteigert werden konnte, wurde im weiteren Verlauf die Expression verschiedener FATP gemessen.

### 3 Ergebnisse

Nach der Behandlung mit FFA für 24h-96h konnte eine Ansammlung von Fetttropfen im Zytoplasma der primären humanen Hepatozyten gezeigt werden. Es wird vermutet, dass der Transport von FFA in das Zellinnere durch verschiedene Fettsäuretransportproteine realisiert wird. Nach FFA-Inkubation für 24-96h wurde die relative Expression der FATP Caveolin-1, CD36/Fat, FABP-1 und FATP-5 in primären humanen Hepatozyten durch eine quantitative Realtime PCR bestimmt. Nach 24-48h hatte die Stimulation mit 0,5mM und 1mM FFA keinen Einfluss auf die Caveolin-1-Expression. 72h nach Inkubation mit 0,5mM FFA verringerte sich die Expression auf einen „foldchange“ von 0,64, stieg jedoch nach 96h wieder auf Kontroll-Niveau an (Abb. 7 A). Die Caveolin-1-Expression wurde nach 48-72h Behandlung mit 1mM FFA reduziert und wies nach 96h eine signifikante Verringerung auf (0,5-fach, Abb. 7 A). Die Expression von CD36 zeigte nach 48h FFA-Behandlung einen signifikanten Rückgang (0,5-fach; Abb. 7 B).



**Abb. 7: Expression von FATP in primären humanen Hepatozyten nach Behandlung mit FFA für 24-96h.** Relative Expression von Caveolin-1 (A), CD36/Fat (B), FABP-1 (C) und FATP-5 (D) in primären humanen Hepatozyten nach Behandlung mit 0,5mM und 1mM FFA. Gesamtauswertung der qRT-PCR, (Mittelwert  $\pm$  SEM, n = 7). \* = p < 0,05 vs. unbehandelte Kontrolle.

Abb. 7 C zeigt, dass die Inkubation mit FFA die Expression von FABP-1 in primären humanen Hepatozyten aktivieren konnte, wobei der Effekt deutlicher nach Behandlung

### 3 Ergebnisse

mit 1mM FFA war. Die Expression wurde nach 24h-Behandlung mit 1mM FFA 1,5-fach aktiviert, stieg nach 48h-Behandlung auf eine 2-fache Induktion an und wies nach 72h noch eine 1,8-fach erhöhte Genexpression auf. Nach 96h wurde die FABP-1-Expression reduziert, bei den mit 0,5mM-behandelten Zellen sank die Expression sogar auf einen Wert von 0,7-fach zurück. Die Expression von FATP-5 wies nach Behandlung mit FFA für 24-72h keine signifikanten Unterschiede auf, nach 96h Inkubation mit 1mM FFA wurde die FATP-5-Expression bis auf einen foldchange von 0,7 verringert (Abb. 7 D).

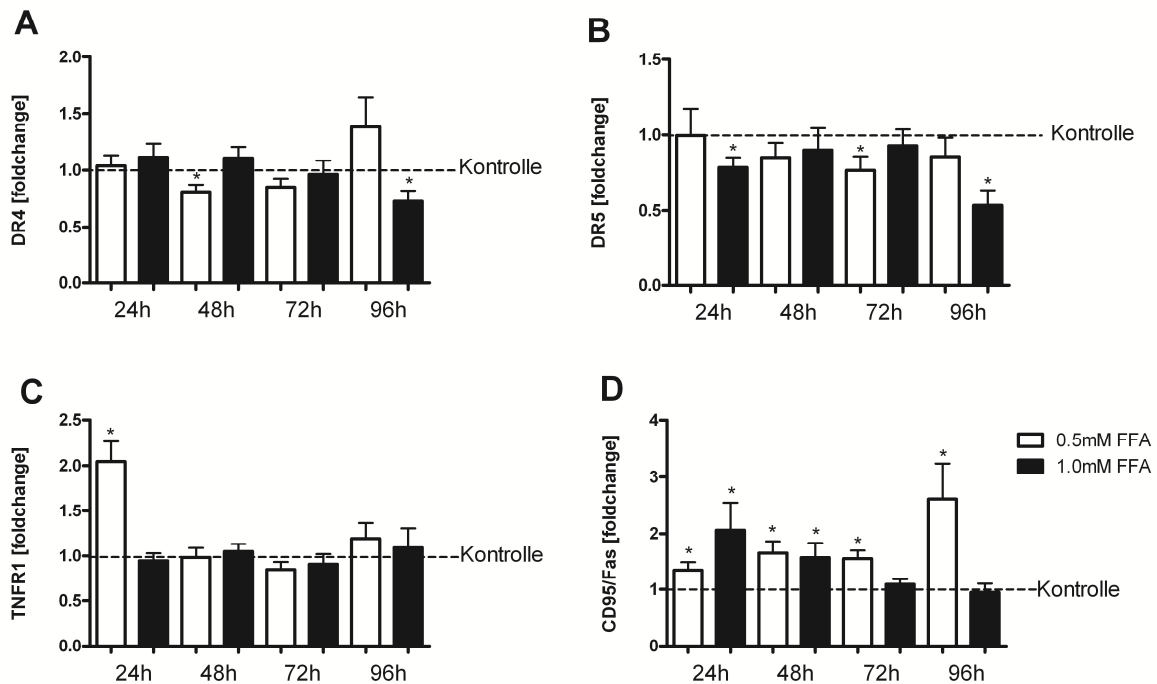
Durch die Behandlung mit FFA konnte also die Expression von FABP-1 in primären humanen Hepatozyten gesteigert werden, die Genexpression der FATP Caveolin-1, CD36/Fat und FATP-5 wurde nach FFA-Behandlung nicht gesteigert und in einigen Fällen sogar vermindert.

#### *3.1.3. Expression von Death Rezeptoren (DR) in primären humanen Hepatozyten nach Behandlung mit FFA für 24-96h*

Verschiedene Gruppen konnten zeigen, dass FFA die Hepatotoxizität und die Vulnerabilität von Hepatozyten gegenüber der DR-vermittelten Apoptose erhöhen können (Feldstein *et al.* 2003). Die Expression von DR4, DR5, TNFR1 und CD95/Fas wurde deshalb in primären humanen Hepatozyten nach Behandlung mit 0,5mM und 1mM FFA mittels qRT-PCR bestimmt (Abb. 8).

Die Expression von DR4 und DR5 wurde nach der Inkubation mit FFA nicht aktiviert und sogar signifikant verringert (Abb. 8 A+B). Die Behandlung mit 0,5mM FFA für 24h konnte die Expression von TNFR1 verdoppeln (Abb. 8 C). Die Expression von CD95/Fas wurde durch die Stimulation mit 1mM FFA nach 24h 2-fach und nach 48h 1,5-fach erhöht, durch die Inkubation mit 0,5mM FFA wurde die CD95/Fas-Expression nach 24h 1,3-fach, nach 48h 1,6-fach, nach 72h 1,5-fach und nach 96h 2,6-fach verstärkt (Abb. 8 D).

### 3 Ergebnisse



**Abb. 8: Expression von DR in primären humanen Hepatozyten nach Behandlung mit FFA für 24-96h.**

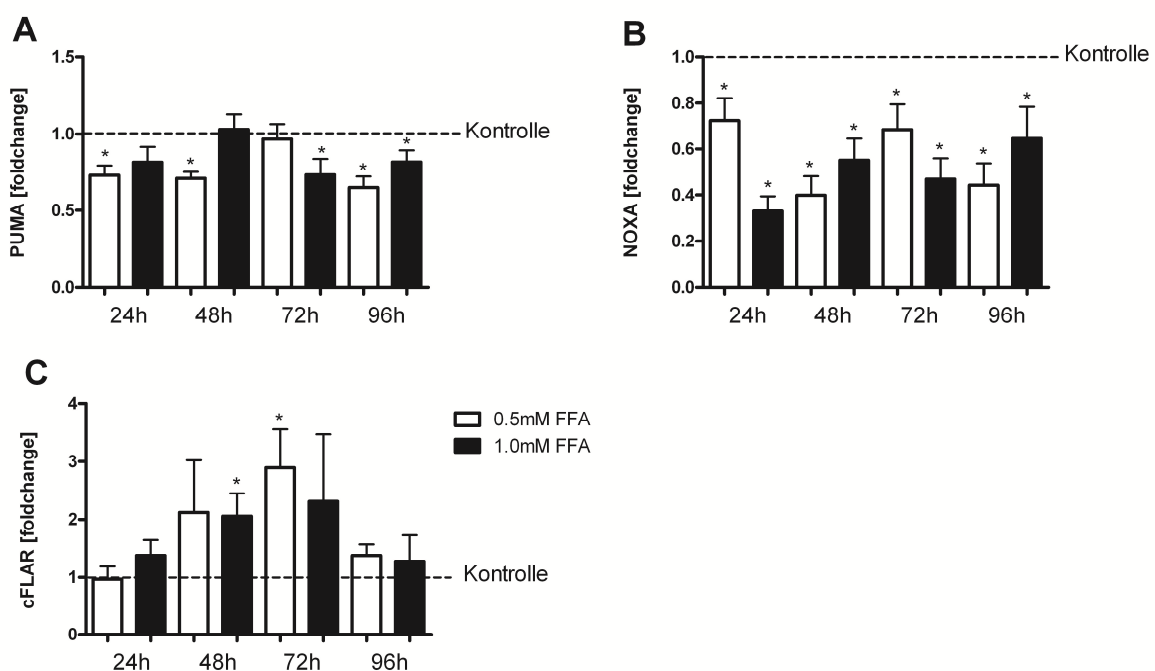
Relative Expression von DR4 (A), DR5 (B), TNFR1 (C) und CD95/Fas (D) in primären humanen Hepatozyten nach Behandlung mit 0,5mM und 1mM FFA. Gesamtauswertung der qRT-PCR, (Mittelwert  $\pm$  SEM, n = 7). \* = p < 0,05 vs. unbehandelte Kontrolle.

Nach Behandlung mit FFA wurde die Expression von DR4 und DR5 herunter reguliert. Die Expression von TNFR1 wurde nach 24h FFA-Inkubation aktiviert, wobei die Expression von CD95/Fas nach Behandlung mit 0,5mM FFA zwischen 24h und 96h durchgehend hoch reguliert war. Hier konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit FFA die Expression der unterschiedlichen DR verändern kann. Es kam hier jedoch nicht zu einer generellen Aktivierung der DR-Genexpression durch die Behandlung mit FFA, sondern zu einer selektiven Aktivierung der Genexpression von TNFR1 und von CD95/Fas. Die beiden TRAIL-Rezeptoren zeigten keine Aktivierung nach FFA-Inkubation.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1.4. Expression von Apoptose-assoziierten Molekülen und Bestimmung der Apoptose-Induktion in primären humanen Hepatozyten nach Behandlung mit FFA für 24-96h

Nachdem festgestellt werden konnte, dass durch die Behandlung der primären humanen Hepatozyten mit FFA eine erhöhte Expression von CD95/Fas zu beobachten war, wurde untersucht, welche Wirkung die zelluläre Fett-Akkumulation auf die Aktivierung Apoptose-assoziiierter Gene hatte.



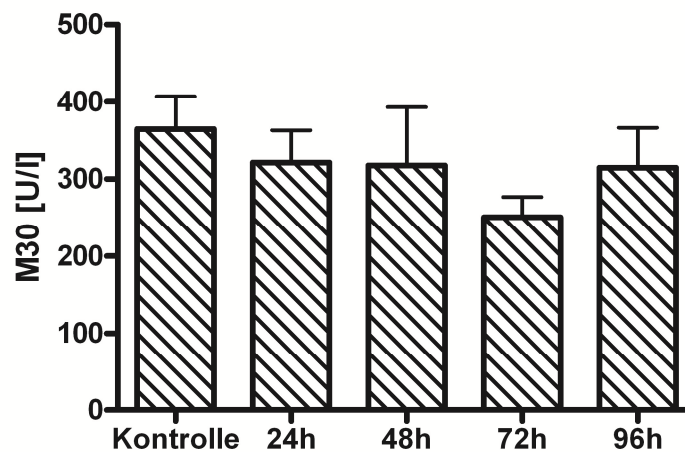
**Abb. 9: Expression Apoptose-assoziiierter Moleküle in primären humanen Hepatozyten nach Behandlung FFA für 24-96h.**

Relative Expression von PUMA (A), NOXA (B) und cFLAR (C) in primären humanen Hepatozyten nach Behandlung mit 0,5mM und 1mM FFA Gesamtauswertung der qRT-PCR, (Mittelwert  $\pm$  SEM, n = 7). \* = p < 0,05 vs. unbehandelte Kontrolle.

In Abb. 9 A und B ist zu sehen, dass die Expression der pro-apoptotischen Moleküle PUMA und NOXA in den mit FFA behandelten primären humanen Hepatozyten verringert wurde. Nach Inkubation mit 1mM FFA für 48h wurde die cFLAR-Expression 2-fach erhöht, nach 72-stündiger Behandlung mit 0,5mM FFA trat eine 2,9-fache Aktivierung der cFLAR-Expression auf. Des Weiteren wurde die Induktion der Apoptose durch einen M30-ELISA gemessen. Während der Apoptose kommt es zur

### 3 Ergebnisse

Spaltung von Cytokeratin-18 durch verschiedene Effektor-Caspasen, wodurch ein bestimmtes Neo-Epitop freigelegt wird. Bei M30 handelt es sich um einen Antikörper, der Caspase-gespaltene Cytokeratin 18 über die Bindung an dieses Neo-Epitop detektiert. Mit dem M30-ELISA kann die Menge an gespaltenem Cytokeratin-18 quantifiziert und somit Rückschlüsse auf die Induktion der Apoptose geschlossen werden. Die Bestimmung von M30 konnte deutlich machen, dass durch die Behandlung mit 1mM FFA keine verstärkte Apoptose-Induktion in primären humanen Hepatozyten stattfand.

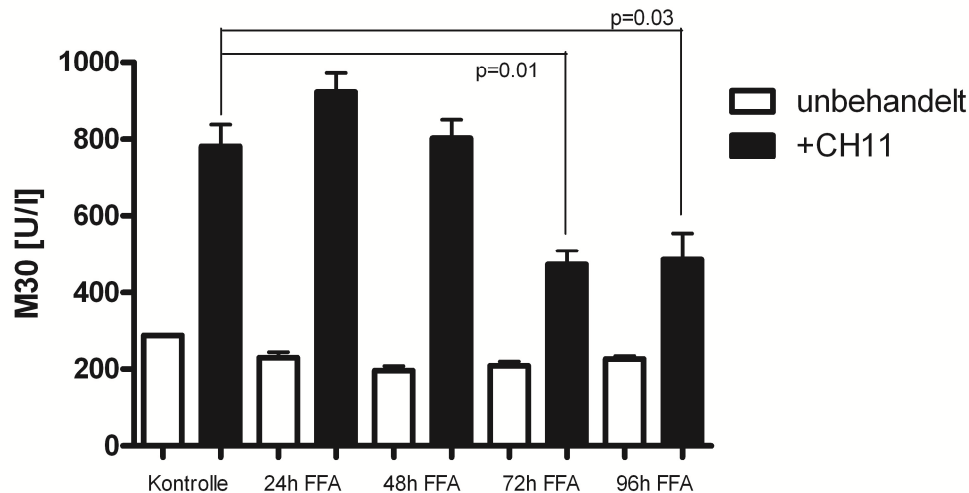


**Abb. 10: Quantifizierung von M30 in primären humanen Hepatozyten nach Inkubation mit 1mM FFA für 24-96h.**

Quantifizierung des Apoptose-Markers M30 [U/l] in Zelllysaten von primären humanen Hepatozyten mittels M30-ELISA, (Mittelwert  $\pm$  SEM, n = 3). Der Protein-Gehalt der Zelllysate wurde vor dem ELISA durch eine Konzentrations-Messung bestimmt und auf 20  $\mu$ g Gesamtprotein normalisiert.

Die Behandlung mit FFA erzeugte vor Allem eine Überexpression des DR CD95/Fas. Der Antikörper CH11 ist ein CD95/Fas-Agonist, der an diesen Rezeptor binden und damit die Apoptose auslösen kann. Nach entsprechender Behandlung der primären humanen Hepatozyten mit 1mM FFA für 24-96h, wurde dem Kultur-Medium für weitere 4h der CD95/Fas-Agonist CH11 zugesetzt. Bei diesem Versuch sollte geprüft werden, ob die mit FFA-behandelten Hepatozyten eine erhöhte Vulnerabilität gegenüber der CD95/Fas-induzierten Apoptose aufwiesen.

### 3 Ergebnisse



**Abb. 11: Quantifizierung von M30 nach Stimulation mit CH11 in primären humanen Hepatozyten nach Inkubation mit 1mM FFA für 24-96h.**

Quantifizierung des Apoptose-Markers M30 [U/l] in Zelllysaten von primären humanen Hepatozyten, mit oder ohne CH11-Behandlung, mittels M30-ELISA, (Mittelwert  $\pm$  SEM, n = 3). Der Protein-Gehalt der Zelllysate wurde vor dem ELISA durch eine Konzentrations-Messung bestimmt und auf 20  $\mu$ g Gesamtprotein normalisiert.

Durch die Behandlung mit dem CD95/Fas-Agonisten CH11 konnte die Apoptose in primären humanen Hepatozyten deutlich aktiviert werden. Die mit 1mM FFA behandelten Zellen wiesen jedoch nach CH11-Stimulation keine verstärkte Apoptose-Induktion auf (Abb. 11). Der M30-Gehalt war nach 24h FFA-Behandlung gegenüber der Kontroll-Zellen geringfügig erhöht, erreichte jedoch keine statistische Signifikanz (p = 0,13).

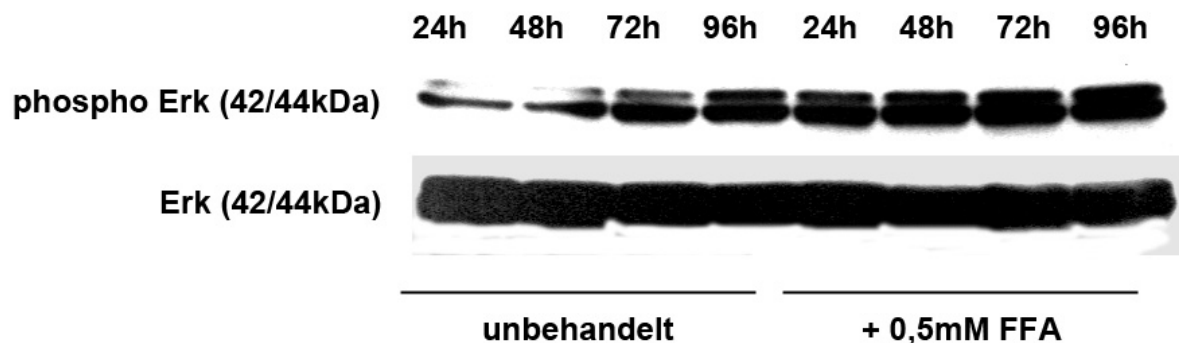
Hiermit konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit FFA keinen Einfluss auf die Expression pro-apoptotischer Moleküle hatte und die Expression des anti-apoptotischen Moleküls cFLAR wurde durch die Behandlung mit FFA aktiviert. Durch einen M30 ELISA konnte gezeigt werden, dass in primären humanen Hepatozyten nach FFA-Inkubation die Apoptose nicht verstärkt auftrat. Die Ko-Inkubation mit dem CD95/Fas-Agonisten CH11 hat gezeigt, dass FFA-behandelte primäre humane Hepatozyten keine erhöhte Vulnerabilität gegenüber der CD95/Fas-abhängigen Induktion der Apoptose aufwiesen.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1.5. Aktivierung von Erk in primären humanen Hepatozyten nach Behandlung mit FFA für 24-96h

Durch den Einfluss verschiedener Faktoren, wie z. B. die Aktivierung von Death Rezeptoren, die Ausschüttung von Zytokinen oder die Entstehung von oxidativem Stress können Stress-responsive Kinasen aktiviert werden. Eine wichtige anti-apoptotische Stress-Kinase ist Erk, die durch Phosphorylierung in den aktiven Zustand überführt wird und dadurch verschiedene Transkriptionsfaktoren, wie z. B. NFκB, aktivieren kann.

Die Behandlung von primären humanen Hepatozyten mit FFA hatte keinen Einfluss auf die Induktion der Apoptose. In diesem Zusammenhang wurde die Aktivierung der anti-apoptotischen Kinase Erk in primären humanen Hepatozyten nach FFA-Behandlung untersucht.



**Abb. 12: Detektion von phospho Erk in primären humanen Hepatozyten.**

Repräsentativer Western-Blot von phospho Erk und Erk in Zelllysaten (normalisiert auf 20µg Gesamtprotein) von primären humanen Hepatozyten nach Behandlung mit 0,5mM FFA für 24-96h.

Die Menge an phospho Erk in unbehandelten primären humanen Hepatozyten war geringer als in primären humanen Hepatozyten, die für 24h bis 72h mit 0,5mM FFA behandelt wurden. Durch die Behandlung mit FFA kam es bereits nach 24h zur Aktivierung bzw. Phosphorylierung von Erk. In unbehandelten primären humanen Hepatozyten wurde Erk nach 96h Inkubation in Kultur-Medium ebenfalls aktiviert.



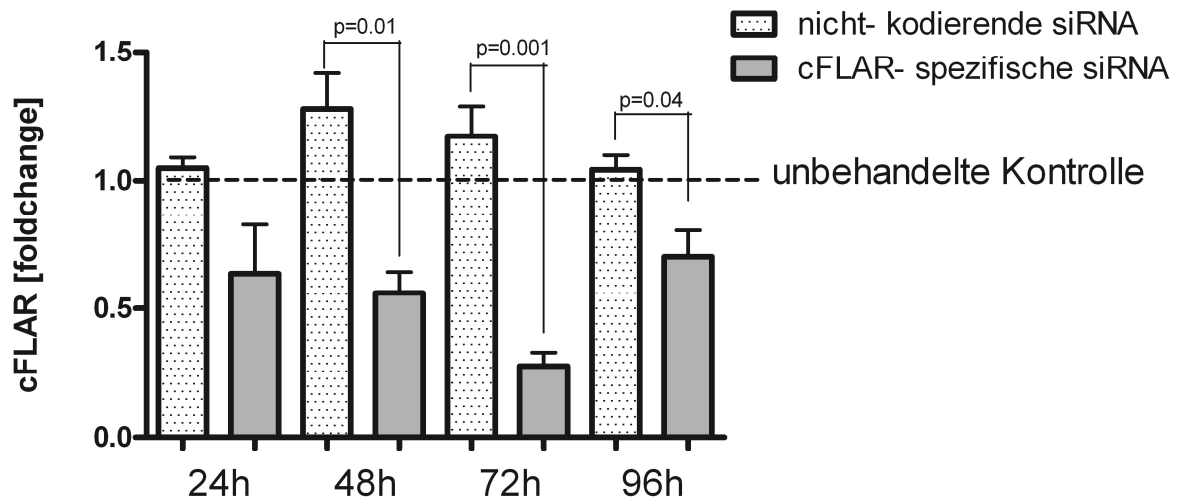
### **3.2. Rolle von cFLAR bei der Apoptose-Induktion in FFA-behandelten primären humanen Hepatozyten**

Nach dem durch eine FFA-Behandlung die cFLAR-mRNA-Expression aktiviert wurde, sollte nun untersucht werden, wie sich die Abwesenheit oder Reduktion der cFLAR-mRNA auf die Expression der DR auswirkt.

#### *3.2.1. Knockdown von cFLAR in primären humanen Hepatozyten mittels siRNA*

Durch die Behandlung mit FFA wurde die Expression vor Allem der DR TNFR1 und CD95/Fas in primären humanen Hepatozyten aktiviert, dies führte jedoch nicht zu einer verstärkten Induktion der Apoptose. Neben der Überexpression von TNFR1 und CD95/Fas konnte außerdem eine erhöhte Expression des anti-apoptotischen Moleküls cFLAR nach FFA-Behandlung festgestellt werden. Die Überexpression des anti-apoptotischen Moleküls könnte einen Grund für die verhinderte Apoptose-Induktion darstellen. Unter diesem Gesichtspunkt sollte die Expression von cFLAR mit Hilfe von spezifischer siRNA in primären humanen Hepatozyten vermindert werden. Hierzu wurden die Zellen 48h nach der Isolation aus humanem Lebergewebe mit cFLAR-spezifischer siRNA transfiziert. Zur Überprüfung des siRNA-Knockdowns wurde nach 24-96h die Expression von cFLAR in den transfizierten Zellen mittels quantitativer Realtime PCR bestimmt. Die Spezifität der siRNA-Transfektion wurde durch eine parallele Transfektion mit nicht-kodierender siRNA überprüft. Diese siRNA trägt die Eigenschaften einer typischen siRNA, besitzt jedoch keine Homologie zu einem bekannten Säugetier-Gen.

### 3 Ergebnisse



**Abb. 13: Transfektion primärer humaner Hepatozyten mit siRNA.**

Relative cFLAR-Expression 24-96h nach siRNA-Transfektion mit cFLAR-spezifischer oder nicht-kodierender siRNA. Gesamtauswertung der qRT-PCR nach siRNA-Transfektion, (Mittelwert  $\pm$  SEM, n = 3). Als Kontrolle dienten unbehandelte Hepatozyten.

Die Transfektion mit cFLAR-spezifischer siRNA wies, verglichen mit der nicht-kodierenden siRNA, eine verminderte Gen-Expression von cFLAR nach 24-96h in primären humanen Hepatozyten auf. Der deutlichste Knockdown-Effekt von cFLAR in den transfizierten Hepatozyten konnte nach 72h mit einer Reduktion auf eine 0,27-fache Expression gemessen werden (Abb. 13). Die Transfektion mit der nicht-kodierender siRNA hatte keinen Knockdown-Effekt auf die Expression von cFLAR in primären humanen Hepatozyten.

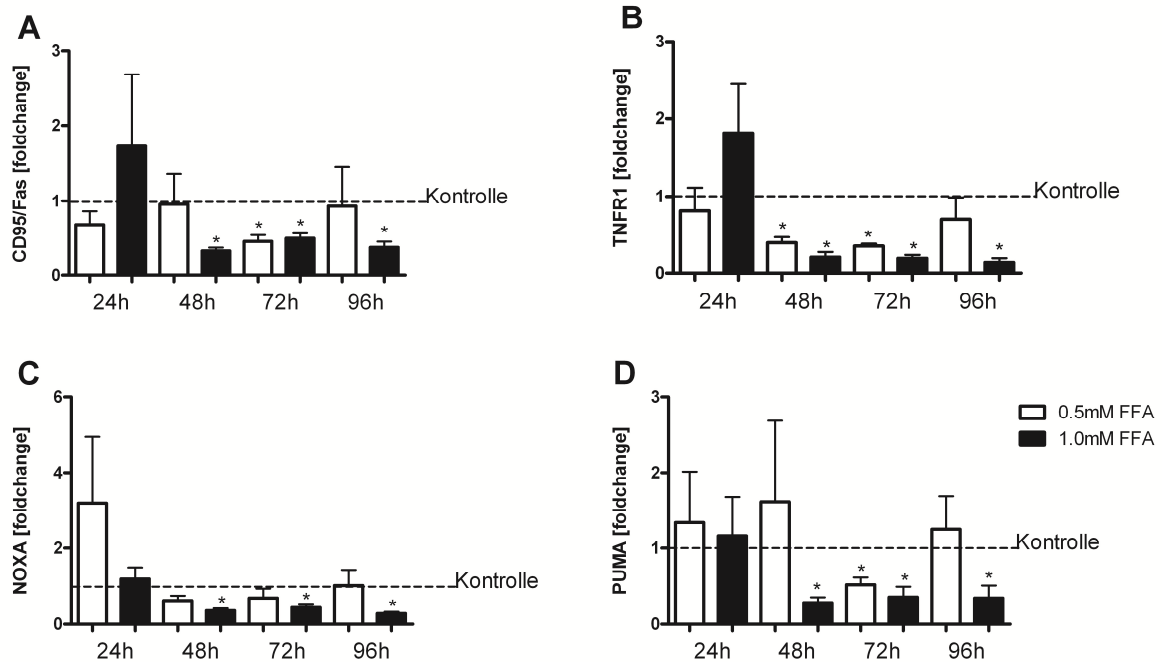
Durch die Transfektion mit cFLAR-spezifischer siRNA konnte die Genexpression von cFLAR in primären humanen Hepatozyten vermindert werden.

#### *3.2.2. Expression von DR und Apoptose-assoziierten Molekülen nach FFA-Behandlung in primären humanen Hepatozyten mit siRNA-vermitteltem Knockdown von cFLAR*

Zur näheren Beurteilung der Rolle von cFLAR in primären humanen Hepatozyten nach Behandlung mit FFA wurde die Expression von TNFR1, CD95/Fas, PUMA und NOXA in den transfizierten Hepatozyten gemessen. Die Zellen wurden mit cFLAR-spezifischer siRNA transfiziert und dann für 24-96h mit 0,5mM und 1mM FFA

### 3 Ergebnisse

behandelt. Der Knockdown von cFLAR wurde bei jedem Ansatz wie in 3.2.1 beschrieben in Hepatozyten ohne FFA-Behandlung durch eine quantitative realtime PCR überprüft.



**Abb. 14: Expression von DR und pro-apoptischen Genen in primären humanen Hepatozyten mit cFLAR-Knockdown nach FFA-Behandlung für 24-96h.**

Relative Expression von TNFR1(A), CD95/Fas (B), NOXA (C) und PUMA (D) nach Inkubation mit 0,5mM und 1mM FFA für 24-96h in primären humanen Hepatozyten nach siRNA-vermitteltem Knockdown von cFLAR. Gesamtauswertung der qRT-PCR nach siRNA-Transfektion, (Mittelwert  $\pm$  SEM, n = 3). Als Kontrolle dienen unbehandelte Hepatozyten, \* = p < 0,05 vs. unbehandelte Kontrolle.

Abb. 14 zeigt, dass die Behandlung der cFLAR Knockdown-Zellen mit 0,5mM FFA für 24h im geringen Maße zur Aktivierung der PUMA- und NOXA-Expression führte, die Behandlung mit 1mM FFA für 24h konnte die Expression von CD95/Fas und TNFR1 geringfügig aktivieren. Nach Behandlung der cFLAR Knockdown-Hepatozyten mit 0,5mM und 1mM FFA für 48-96h zeigte die Expression der gemessenen Gene keine signifikante Veränderung oder wurde vermindert. CD95/Fas wurde nach 48-stündiger Inkubation mit 1mM FFA auf eine 0,3-fache Expression vermindert. Die FFA-Behandlung mit 0,5mM und 1mM für 72h reduzierte die CD95/Fas-Expression um die Hälfte. Nach 96h Stimulation mit 1mM FFA wurde die Expression auf einen foldchange von 0,4 verringert. (Abb. 14 A). Die Stimulation mit 0,5mM FFA verminderte die

### 3 Ergebnisse

TNFR1-Expression nach 48h und 72h auf eine 0,6-fache Expression, nach Inkubation mit 1mM FFA wurde die TNFR1-Expression auf eine 0,2-fache Expression reduziert (Abb. 14 B). Eine signifikante Reduktion von NOXA auf eine 0,2- bis 0,4-fache Expression konnte durch die Behandlung mit 1mM FFA für 48-96h erzeugt werden (Abb. 14 C). Die relative mRNA-Expression von PUMA wurde durch die Inkubation mit 1mM FFA nach 48-96h vermindert, die Behandlung mit 0,5mM FFA hatte lediglich nach 72h eine Reduktion zur Folge (Abb. 14 D).

Der Knockdown des anti-apoptotischen Moleküls cFLAR in primären humanen Hepatozyten hatte zur Folge, dass die Expression der DR TNFR1 und CD95/Fas, sowie der pro-apoptotischen Moleküle PUMA und NOXA durch eine Behandlung mit FFA nicht aktiviert wurde.

Die Untersuchungen im Zellkultur-Modell konnten zeigen, dass die Behandlung mit FFA die Expression von FABP-1 und den DR TNFR1 und CD95/Fas aktivieren konnte. Die mRNAs für Caveolin-1, CD36/Fat und FATP-5, die TRAIL-Rezeptoren DR4 und DR5, sowie die pro-apoptotischen Faktoren PUMA und NOXA wurden durch die Behandlung mit FFA nicht aktiviert und teilweise sogar herunter reguliert. Das anti-apoptotische Molekül cFLAR, sowie die Stress-responsive Kinase Erk wurde durch die FFA-Inkubation aktiviert. Die Zellen wiesen durch die FFA-Behandlung keine erhöhte Apoptose-Vulnerabilität auf. Der siRNA-vermittelte Knockdown von cFLAR zeigte keine direkte Wirkung auf die Expression von Apoptose-assoziierten Molekülen und spielt vermutlich keine direkte Rolle bei der Induktion bzw. Hemmung der Apoptose in diesem Modell.

Die Ergebnisse konnten zeigen, dass die FFA-Behandlung auf primäre humane Hepatozyten keinen schädigenden Einfluss hatte.

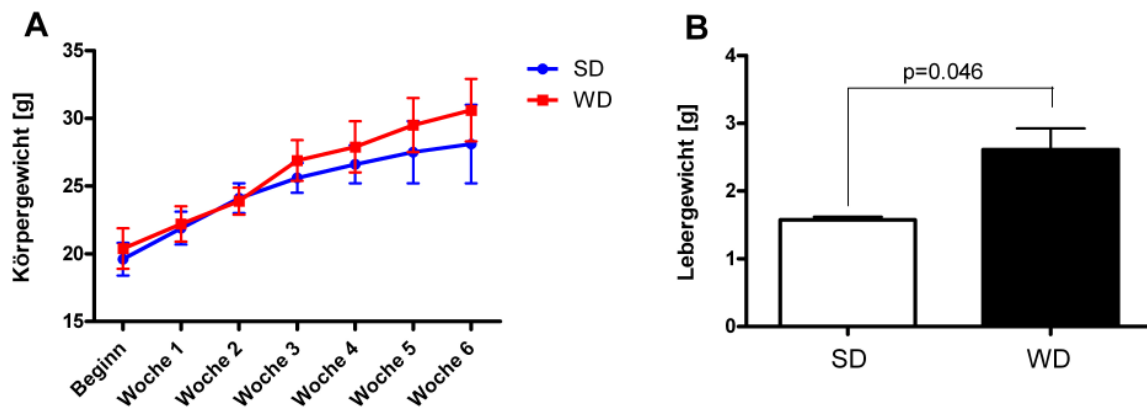
#### **3.3. Auswirkungen der Fütterung einer 6-wöchigen WD in C57Bl/6-Mäusen**

In diesem Teil wurden die Auswirkungen einer 6-wöchigen WD auf physiologischer und molekularer Ebene in C57Bl/6-Mäusen beschrieben.

### 3 Ergebnisse

#### 3.3.1. Histologie und Serologie von C57Bl/6-Mäusen nach 6-wöchiger Fütterung einer WD

Zur Induktion einer milden Steatose erhielten ca. 6 Wochen alte männliche C57Bl/6-Mäuse über einen Zeitraum von 6 Wochen eine Spezialdiät. Die sogenannte Western Diät (WD) zeichnet sich im Vergleich zur Standard-Diät (SD) durch eine veränderte Nährstoffzusammensetzung, im Speziellen einen erhöhten Fettanteil, aus. Während die SD sich aus 58% Kohlenhydraten, 33 % Proteinen und 9% Fetten zusammensetzt sind es bei der WD 49 % Kohlenhydrate, 17 % Proteine und 21 % Fett. Während des gesamten Fütterungszeitraums wurde die Zunahme des Körpergewichts dokumentiert.



**Abb. 15: Verlauf des Körpergewichts und Zunahme des Lebergewichts nach Fütterung einer WD für 6 Wochen.**

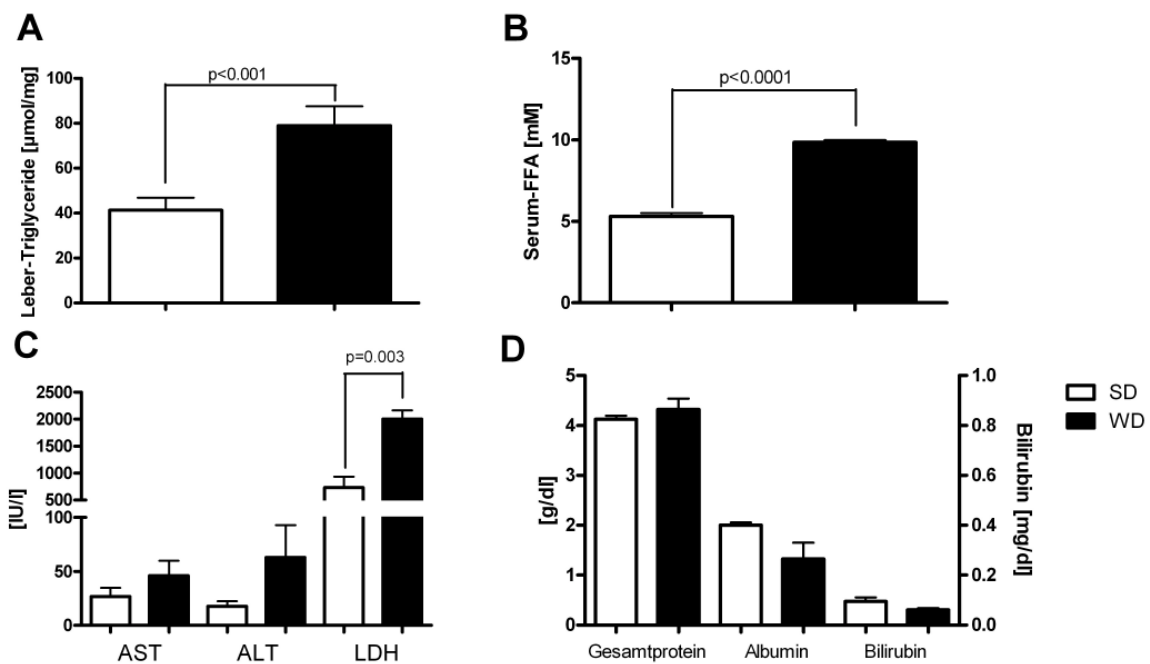
Dargestellt ist der Anstieg des Körpergewichts (A) von SD- und WD-gefütterten Tieren während der 6-wöchigen Fütterungsperiode (Mittelwert  $\pm$  SEM mit SD n = 12 und WD n = 18 Tiere pro Gruppe), sowie des Gesamt-Lebergewichts (B) nach 6-wöchiger SD oder WD (Mittelwert  $\pm$  SEM mit n = 4 Tieren pro Gruppe).

Bei den Tieren beider Fütterungsgruppen kam es zu einer gleichmäßigen Gewichtszunahme, wobei die WD-gefütterten Tiere einen höheren, jedoch nicht signifikanten Gewichtszuwachs aufwiesen (Abb. 15 A). Das durchschnittliche Lebergewicht nach WD-Fütterung ergab mit 2,6 g einen signifikanten Zuwachs des Lebergewichts, verglichen mit dem durchschnittlichen Lebergewicht der SD-Tiere von 1,6 g (Abb. 15 B).

Nach 6-wöchiger Diät konnte ein signifikanter Anstieg der Triglyzerid-Menge im Lebergewebe, von 79 mM in WD-Mäusen verglichen mit der Triglyzeridmenge von 40

### 3 Ergebnisse

mM in SD-Tieren, verzeichnet werden (Abb. 16 A): Die Messung der Serum-FFA ergab einen Gehalt von 5,3 mM in SD-Mäusen und von 9,9 mM FFA im Serum der WD-gefütterten Tiere, damit war der Gehalt an Serum FFA nach 6-wöchiger WD-Fütterung signifikant erhöht (Abb. 16 B). Die Leber-spezifischen Enzyme AST (Aspartat-Aminotransferase) und ALT (Alanin-Aminotransferase) waren im Serum durch die WD gering erhöht, die Bestimmung von LDH (Laktatdehydrogenase) ergab einen signifikanten Anstieg im Serum der WD-Gruppe von 2.002 IU/l verglichen mit der SD-Gruppe von 733 IU/l (Abb. 16 C). Weitere Serumparameter, wie Gesamtprotein, Albumin und Bilirubin wiesen keine Unterschiede zwischen SD- und WD-gefütterten Mäusen auf (Abb. 16 D).



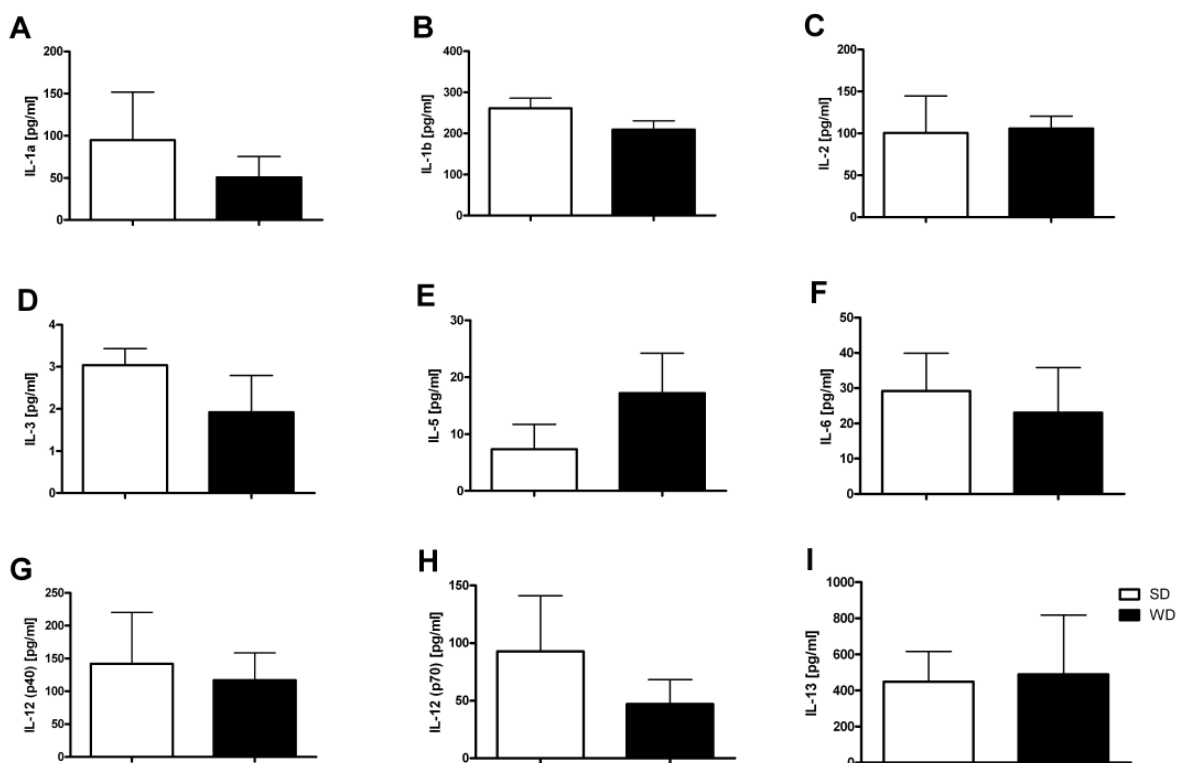
**Abb. 16: Serum Parameter im Serum von Mäusen, die für 6 Wochen mit einer SD oder einer WD gefüttert wurden.**

Messung von Triglyzeriden im Lebergewebe (A), FFA (B), AST, ALT und LDH (C), sowie von Gesamtprotein, Albumin und Bilirubin (D) im Serum (Mittelwert  $\pm$  SEM von SD n = 12 und WD n = 18 Tiere pro Gruppe).

Zur näheren Beschreibung des Maus-Modells wurden verschiedene Interleukine (IL) und inflammatorische Faktoren im Serum der Mäuse bestimmt. Studien konnten zeigen, dass im Serum übergewichtiger Patienten und in verschiedenen Tiermodellen erhöhte Mengen an inflammatorischen Molekülen und Interleukinen im Serum

### 3 Ergebnisse

vorhanden waren und diese Faktoren für z. B. Heilungsprozesse nach operativen Eingriffen als Risikofaktoren fungieren können (Boden 2011). Bei der Leberregeneration ist die Sekretion verschiedener Interleukine und pro-inflammatorischer Faktoren für den Ablauf des Regenerationsprozesses erforderlich (Diehl 2000; Fausto 2000). Die Serum-Konzentrationen verschiedener Interleukine und inflammatorischer Faktoren sollte in diesem Modell nach 6-wöchiger WD-Fütterung bestimmt werden, um die Zusammenhänge zwischen der Diät und einer Gewebeeinflammation näher zu untersuchen. In Abb. 17 werden die Konzentrationen der Interleukine IL-1a, IL-1b, IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, IL-12 (p40), IL-12 (p70) und IL-13 im Serum von SD- und WD-gefütterten Tieren dargestellt. Hier konnte gezeigt werden, dass zwischen den beiden Fütterungsgruppen keine signifikanten Unterschiede der gemessenen Parameter auftraten.

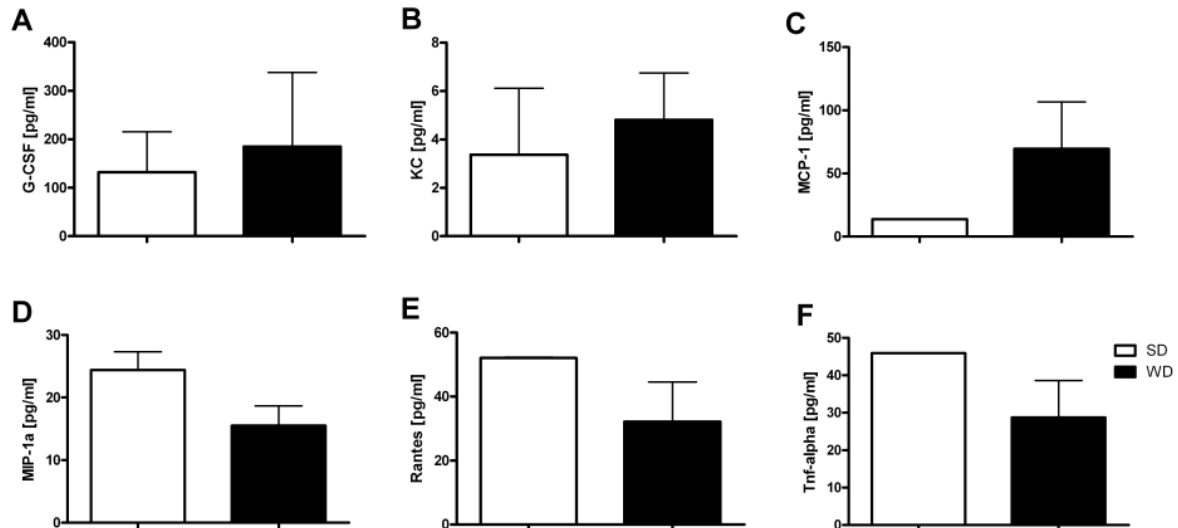


**Abb. 17: Interleukine im Serum nach 6-wöchiger SD oder WD.**

Bestimmung von IL-1a (A), IL-1b (B), IL-2 (C), IL-3 (D), IL-5 (E), IL-6 (F), IL-12 (p40) (G), IL-12 (p70) (H) und IL-13 (I) im Serum nach 6 Wochen SD oder WD (Mittelwert  $\pm$  SEM, n = 4 Tiere pro Gruppe).

### 3 Ergebnisse

Auch die Messung der inflammatorischen Faktoren G-CSF, KC, MCP-1, MIP-1a, Rantes und TNF $\alpha$  erzeugte durch die Fütterung der WD für 6 Wochen keine deutlichen Unterschiede im Vergleich mit den SD-gefütterten Tieren (Abb. 18).



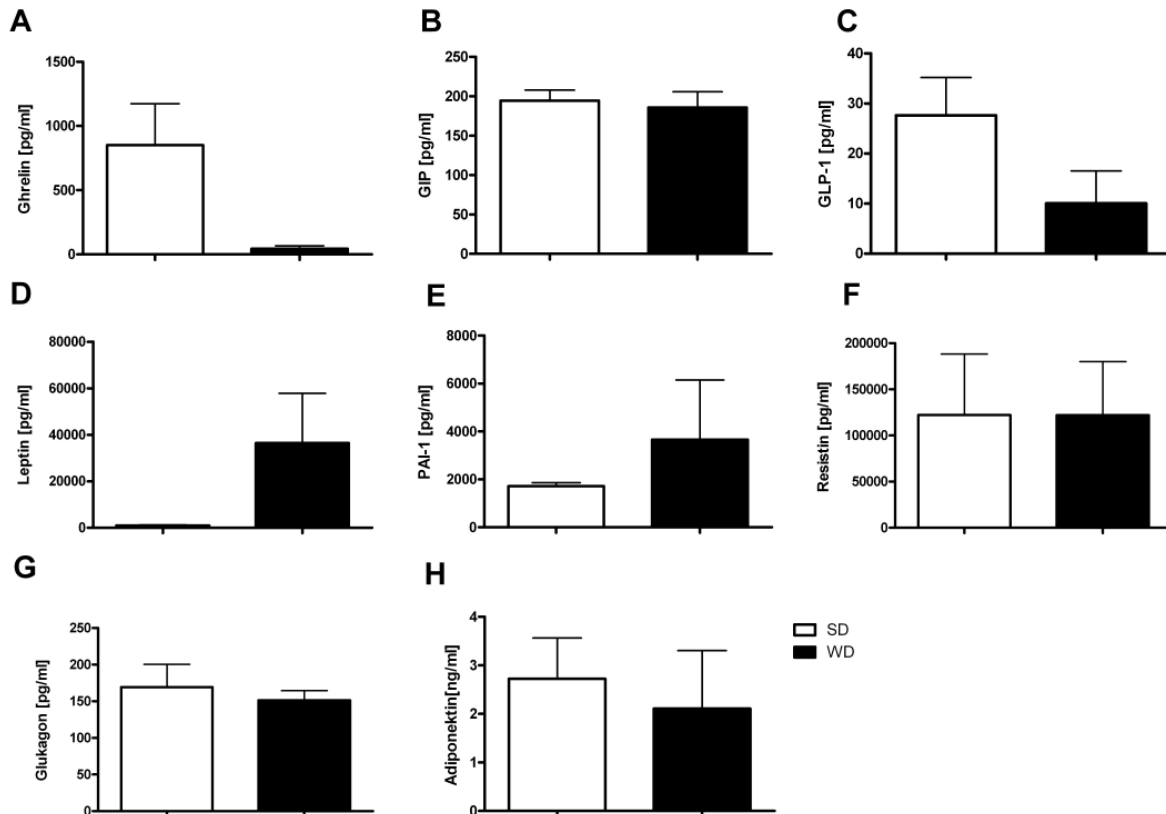
**Abb. 18: Inflammatorische Faktoren im Serum nach 6-wöchiger SD oder WD.**

Bestimmung von G-CSF (A), KC (B), MCP-1 (C), MIP-1a (D), Rantes (E) und TNF-alpha (F) im Serum nach 6 Wochen SD oder WD (Mittelwert  $\pm$  SEM, n = 4 Tiere pro Gruppe).

Eine kalorienreiche Ernährung kann zur Ausbildung eines metabolischen Syndroms führen, verbunden mit Übergewicht, erhöhten Blutfettwerten und der Entwicklung einer Insulinresistenz (Abdelmalek & Diehl 2007; Bugianesi *et al.* 2010; Yki-Järvinen 2010). Nach 6-wöchiger WD-Fütterung wurden einige Faktoren, die bei Patienten mit metabolischem Syndrom, im Speziellen mit einer Insulinresistenz, in Verbindung stehen, gemessen.



### 3 Ergebnisse



**Abb. 19: Faktoren des metabolischen Syndroms im Serum nach 6-wöchiger SD oder WD.**

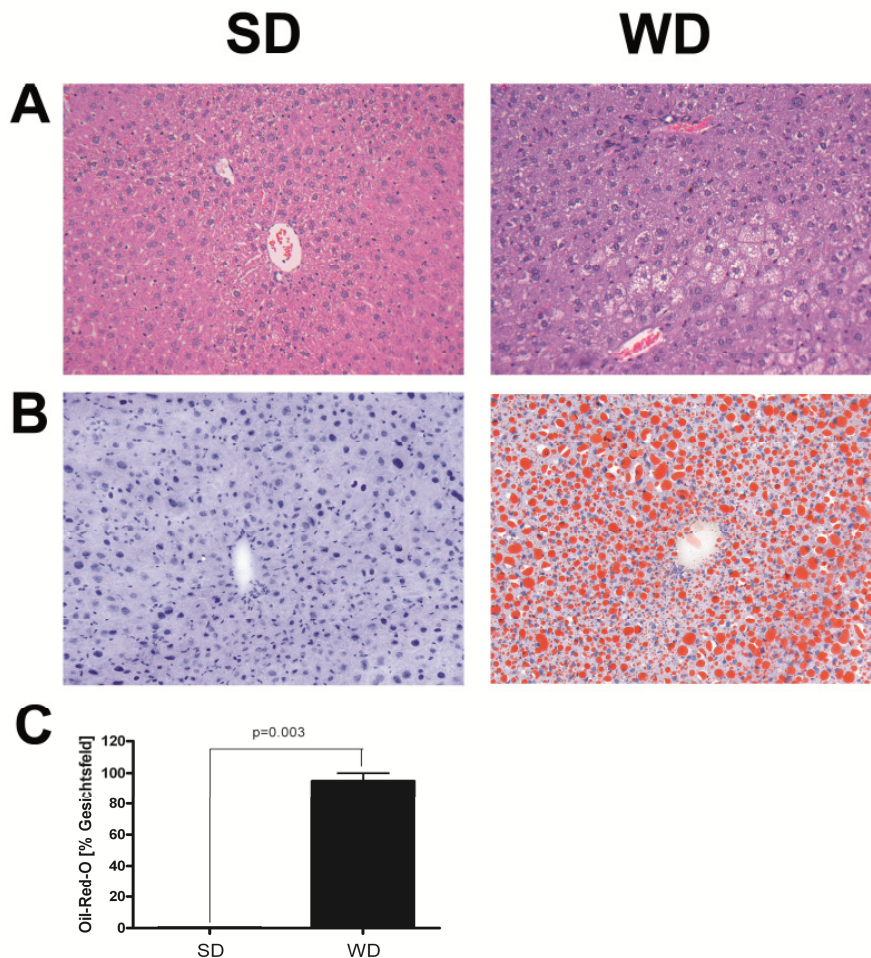
Messung von Ghrelin (A), GIP (B), GLP-1 (C), Leptin (D), PAI-1 (E), Resistin (F), Glukagon (G) und Adiponektin (H) im Serum nach 6 Wochen SD oder WD (Mittelwert  $\pm$  SEM, n = 4 pro Gruppe).

Beim Vergleich der gemessenen Serum-Parameter zeigte sich eine starke Verringerung von Ghrelin nach 6-wöchiger WD, von 850pg/ml in SD-Tieren auf 43pg/ml in WD-Tieren (Abb. 19 A). Der Unterschied war hier nicht signifikant, ist jedoch mit den Bedingungen bei adipösen Patienten mit metabolischem Syndrom vergleichbar (Considine *et al.* 1996; Yannakoulia *et al.* 2003). Eine geringe Verringerung von GLP-1 (Abb. 19 C), sowie ein geringfügiger Anstieg von PAI-1 (Abb. 19 E) trat in WD-gefütterten Mäusen auf. Die Messung der Faktoren GIP, Resistin, Glukagon und Adiponektin zeigte keine Unterschiede zwischen der WD- und der SD-Gruppe. Ein weiterer wichtiger Parameter ist das Adipokin Leptin, das in diesem Modell, wie auch bei adipösen Patienten, nach 6 Wochen WD deutlich erhöht war (Abb. 19 D).

Beim Vergleich der Leber-Histologie ergab sich bei den WD-gefütterten Tieren eine Ansammlung von hauptsächlich mikrovesikulären, teilweise aber auch

### 3 Ergebnisse

makrovesikulären Fettvakuolen im Lebergewebe. Die Akkumulation von Fetttropfen im Lebergewebe konnte durch eine Oil-Red-O-Färbung eindeutig gezeigt und quantifiziert werden. Im Lebergewebe der SD-Tiere fanden sich keine sichtbaren Fettvakuolen, was auch durch die Oil-Red-O-Färbung und die Quantifizierung der gefärbten Gewebefläche deutlich gezeigt werden konnte (Abb. 20 B und C).



**Abb. 20: Leberhistologie nach Fütterung einer SD oder WD über 6 Wochen.**

HE (A)- und Oil-Red-O-Färbung (B), sowie Quantifizierung der Oil-Red-O-gefärbten Fläche (C) im Lebergewebe nach Fütterung einer SD oder WD über 6 Wochen. Lichtmikroskopische Aufnahme in 20-facher Vergrößerung, sowie Quantifizierung der Oil-Red-O-gefärbten Fläche von  $n = 5$  Gesichtsfeldern von 5 verschiedenen Tieren pro Gruppe.

Die Zellen der WD-gefütterten Mäuse wiesen zwar eine verstärkte Fettakkumulation und teilweise auch Vergrößerung der Hepatozyten auf, es gab jedoch keine Anzeichen von vorhandenen Entzündungsherden oder krankhaften Veränderungen der Zellkerne

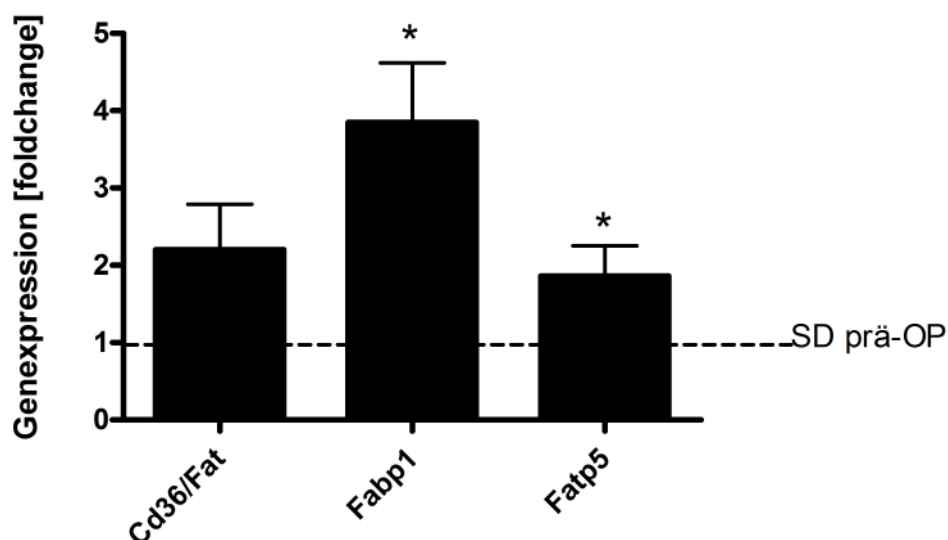
### 3 Ergebnisse

im Lebergewebe. Die Fütterung einer WD über 6 Wochen löste damit eine milde Steatose ohne Inflammation des Lebergewebes aus.

Die Fütterung der WD über 6 Wochen führte in dieser Gruppe zu erhöhten Serumkonzentrationen an FFA, AST, ALT und LDH sowie zur Akkumulation von Leber-Triglyzeriden. Die Messung verschiedener Interleukine im Serum zeigten zwischen den beiden Diät-Gruppen keine Unterschiede und es gab keine Anzeichen für einen bestehenden Diabetes oder Entzündungen im Lebergewebe.

#### 3.3.2. Expression von FATP im Lebergewebe von C57Bl/6-Mäusen nach 6-wöchiger Fütterung einer SD oder WD

Nachdem gezeigt werden konnte, dass es durch die Fütterung der WD für 6 Wochen zur Ausbildung einer Steatose mit verstärkter Einlagerung von Fetten im Lebergewebe kam, wurde die Expression der FATP FABP-1, FATP-5 und Cd36/Fat im Lebergewebe gemessen. In Abb. 21 ist zu sehen, dass die Fütterung der WD, verglichen mit der Fütterung der SD, zu einer 2,2-fachen Expression von Cd36, einer 3,8-fachen Aktivierung von FABP-1 und einer 1,9-fachen Steigerung der FATP-5-Expression im Lebergewebe führte.



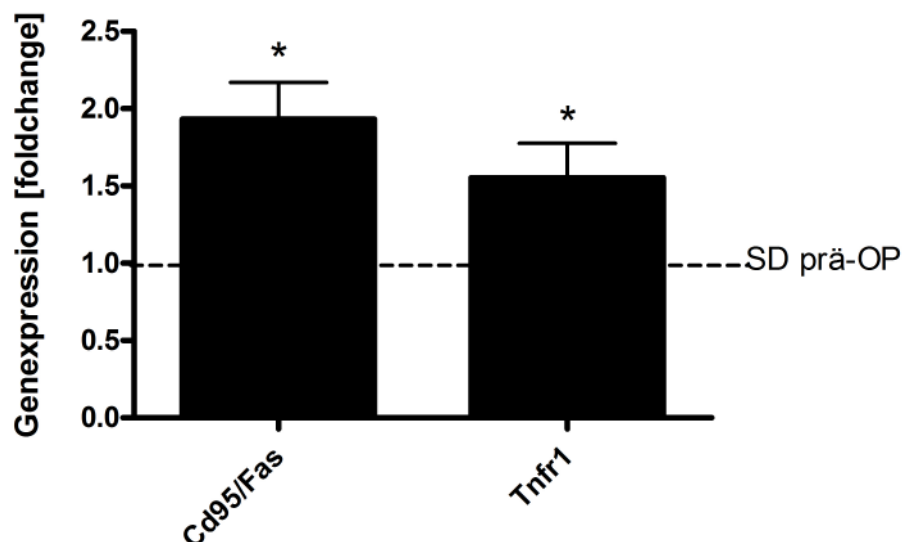
**Abb. 21: Expression von FATP im Lebergewebe nach 6-wöchiger Fütterung einer SD oder WD.** Relative Expression von Cd36/Fat, Fabp-1 und Fatp-5 im Lebergewebe. Gesamtauswertung der qRT-PCR, (Mittelwert  $\pm$  SEM, SD n = 12, WD n = 18). Die Basalexpression in SD-gefütterten Tieren vor der OP wird als gestrichelte Linie SD prä-OP dargestellt.\* = p < 0,05 vs. SD prä-OP.

### 3 Ergebnisse

Die Fettakkumulation im Lebergewebe der WD-Tiere erzeugte eine verstärkte Expression der FATP Cd36/Fat, Fabp-1 und Fatp-5.

#### 3.3.3. Expression von DR, Apoptose- und Autophagie-assoziiierter Gene sowie Bestimmung des Zelltods im Lebergewebe von C57Bl/6-Mäusen nach 6-wöchiger Fütterung einer SD oder WD

Vorhergehende Studien haben gezeigt, dass NAFLD-Patienten eine erhöhte DR-Expression im Lebergewebe sowie ein erhöhtes Maß an Leber-Zelltod aufweisen (Feldstein *et al.* 2003). Die Expression von DR sowie Apoptose-assoziierten Genen sollte nun auch im Lebergewebe von SD- und WD-gefütterten Mäusen bestimmt werden.



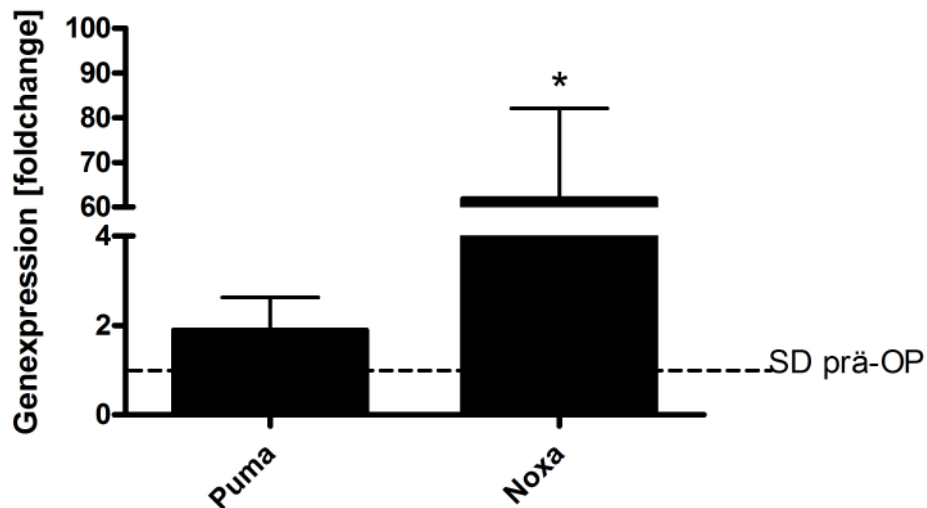
**Abb. 22: Expression von DR im Lebergewebe nach 6-wöchiger Fütterung einer SD oder WD.**

Relative Expression von Cd95/Fas und Tnfr1 im Lebergewebe. Gesamtauswertung der qRT-PCR, (Mittelwert  $\pm$  SEM, SD n = 12, WD n = 18). Die Basalexpression in SD-gefütterten Tieren vor der OP wird als gestrichelte Linie SD prä-OP dargestellt. \* =  $p < 0,05$  vs. SD prä-OP.

Die Fütterung der WD steigerte die Expression von Cd95/Fas auf das 1,9-fache, verglichen mit der Expression im Lebergewebe nach SD-Fütterung. Die Genexpression von Tnfr1 wurde durch die Gabe der WD 1,5-fach verstärkt (Abb. 22).

### 3 Ergebnisse

Des Weiteren wurde die Expression der pro-apoptotischen Gene Puma und Noxa bestimmt.

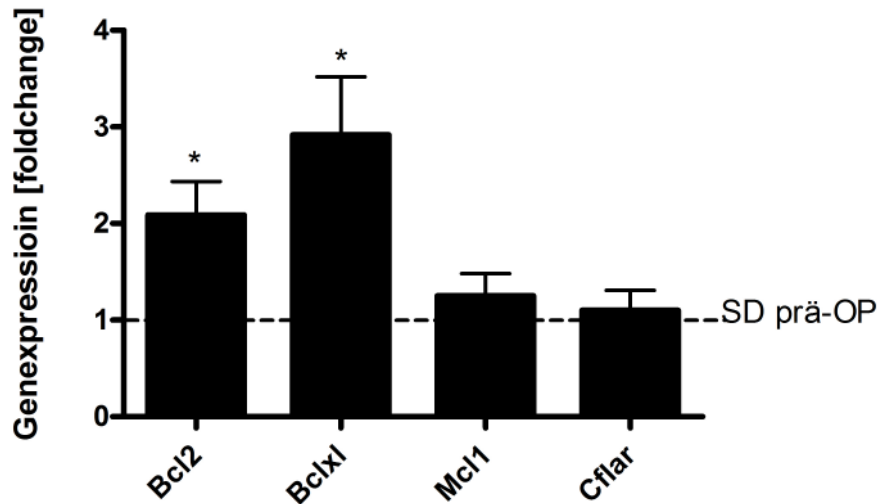


**Abb. 23: Expression pro-apoptotischer Moleküle im Lebergewebe nach 6-wöchiger Fütterung einer SD oder WD.**

Relative Expression von Puma und Noxa im Lebergewebe. Gesamtauswertung der qRT-PCR (Mittelwert  $\pm$  SEM, SD n = 12, WD n = 18). Die Basalexpression in SD-gefütterten Tieren vor der OP wird als gestrichelte Linie SD prä-OP dargestellt. \* = p < 0,05 vs. SD prä-OP.

Durch die Fütterung der WD kam es zu einer 2-fachen Induktion des pro-apoptotischen Gens Puma und zu einer 61-fach erhöhten Expression von Noxa (Abb. 23). Neben der Expression der pro-apoptotischen Moleküle wurde außerdem die mRNA der anti-apoptotischen Moleküle Bcl-2, Bcl-xl, Mcl-1 und Cflar in Lebergewebe von WD-gefütterten Tieren ermittelt.

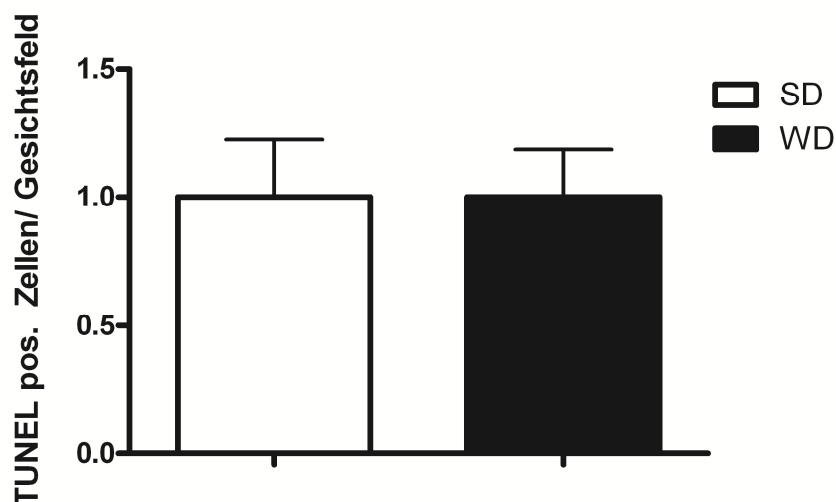
### 3 Ergebnisse



**Abb. 24: Expression anti-apoptotischer Moleküle im Lebergewebe nach 6-wöchiger Fütterung einer SD oder WD.**

Relative Expression von Bcl-2, Bcl-xl, Mcl-1 und cflar im Lebergewebe. Gesamtauswertung der qRT-PCR (Mittelwert  $\pm$  SEM, SD n = 12, WD n = 18). Die Basalexpression in SD-gefütterten Tieren vor der OP wird als gestrichelte Linie SD prä-OP dargestellt. \* =  $p < 0,05$  vs. SD prä-OP.

Die Fütterung der WD über 6 Wochen erzeugte einen signifikanten Anstieg der Expression der anti-apoptotischen Moleküle Bcl-2 (2-fach) und Bcl-xl (2,9-fach) im Lebergewebe (Abb. 24). Die Expression von Mcl-1 und Cflar wurde durch die Gabe der WD nicht verändert. Zur weiteren Untersuchung des Zelltods im Lebergewebe von SD- und WD-gefütterten Tieren wurde ein TUNEL-Assay durchgeführt.

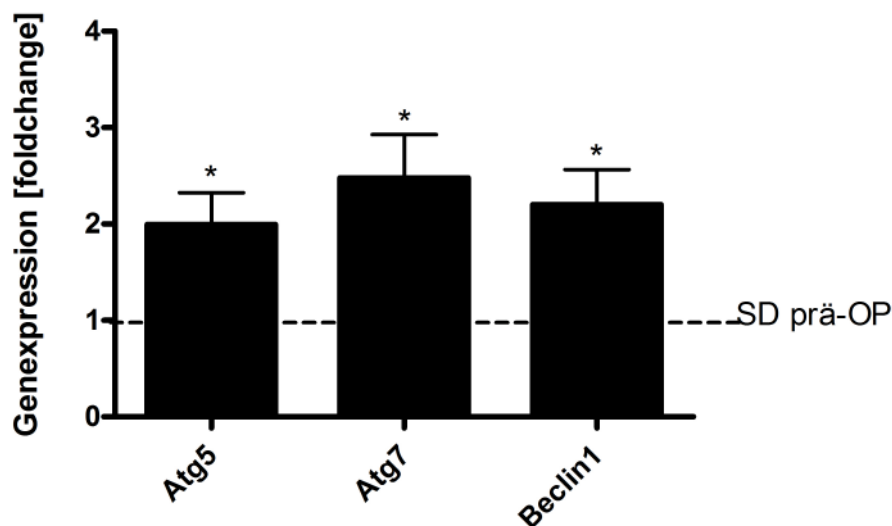


**Abb. 25: TUNEL-Assay.**

Quantifizierung TUNEL-positiver Zellen im Lebergewebe nach 6-wöchiger Fütterung einer SD oder WD. Dargestellt ist die Quantifizierung von TUNEL-positiven Zellen pro Gesichtsfeld von n = 5 Gesichtsfeldern von 5 verschiedenen Tieren pro Gruppe.

### 3 Ergebnisse

Die Auswertung des TUNEL-Assays ergab, dass die Anzahl an TUNEL-positiven Zellen im Lebergewebe von SD- und WD-gefütterten Mäusen keine Unterschiede aufwies (Abb. 25). In neuen Studien (Czaja 2010; Yang *et al.* 2010) wird vermutet, dass bei der Progression der NAFLD die Autophagie eine wichtige Rolle bei der Schädigung des Lebergewebes spielt. In Abb. 26 wird die Expression der Autophagie-assoziierten Gene Atg5, Atg7 und Beclin1 im Lebergewebe WD-gefütterter Mäuse dargestellt. Nach 6-wöchiger Gabe einer WD wurde ein 2-facher Anstieg der Atg5-Expression, eine 2,5-fache Atg7- und eine 2,2-fache Beclin1-Expression im Lebergewebe ermittelt (Abb. 26).



**Abb. 26: Expression Autophagie-assoziiierter Gene im Lebergewebe nach 6-wöchiger Fütterung einer SD oder WD.**

Relative Expression von Atg5, Atg7 und Beclin1 im Lebergewebe. Gesamtauswertung der quantitativen realtime PCR (Mittelwert  $\pm$  SEM, SD n = 12, WD n = 18). Die Basalexpression in SD-gefütterten Tieren vor der OP wird als gestrichelte Linie SD prä-OP dargestellt. \* =  $p < 0,05$  vs. SD prä-OP.

Die Fütterung der WD über 6 Wochen aktivierte die Expression der DR Cd95/Fas und Tnfr1, der pro-apoptischen Moleküle Noxa und Puma, der anti-apoptischen Moleküle Bcl-2 und Bcl-xl, sowie der Autophagie-assoziierten Gene Atg5, Atg7 und Beclin1. Bei der Quantifizierung des Zelltods mittels TUNEL-Assay konnten keine Unterschiede zwischen den beiden Fütterungsgruppen festgestellt werden.

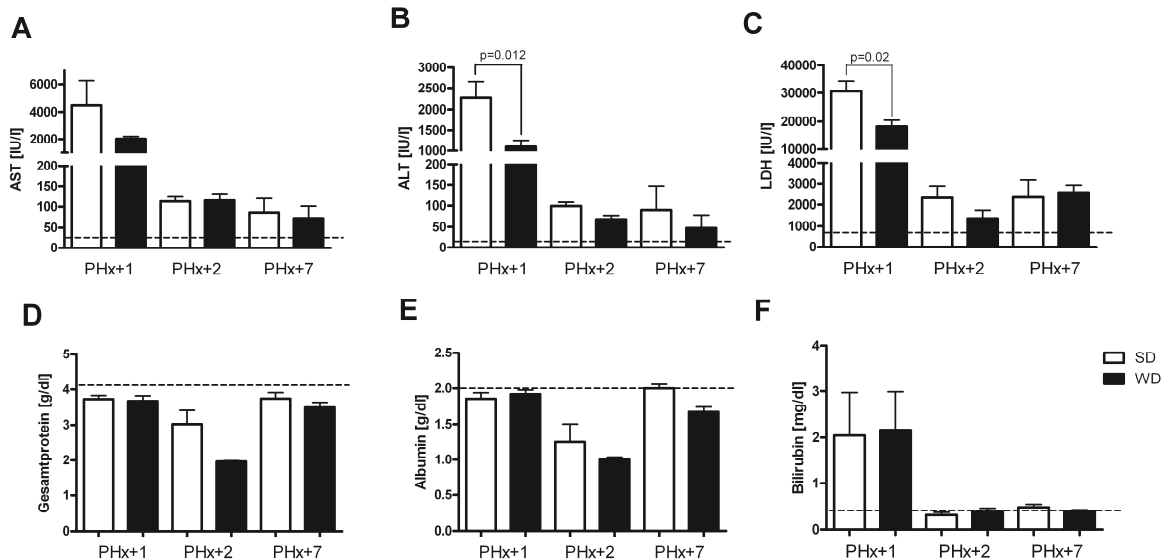
### 3 Ergebnisse

#### 3.4. Leberregeneration nach 70% Hepatektomie (PHx) von C57Bl/6-Mäusen nach 6-wöchiger Fütterung einer SD oder WD

In diesem Teil der Arbeit soll die Regeneration des Lebergewebes von SD- und WD-gefütterten Mäusen nach 70% Hepatektomie (PHx) näher erforscht werden. Besonders soll hier die Rolle von FATP, DR und Apoptose-assoziierten Molekülen und Mechanismen untersucht werden.

##### 3.4.1. Histologie und Serologie nach 70% PHx von C57Bl/6-Mäusen nach 6-wöchiger Fütterung einer SD oder WD

Nach 70% PHx wurden die Tiere an Tag 1, 2 und 7 (PHx+1, PHx+2, PHx+7) getötet, die Rest-Leber sowie venöses Blut wurden entnommen.



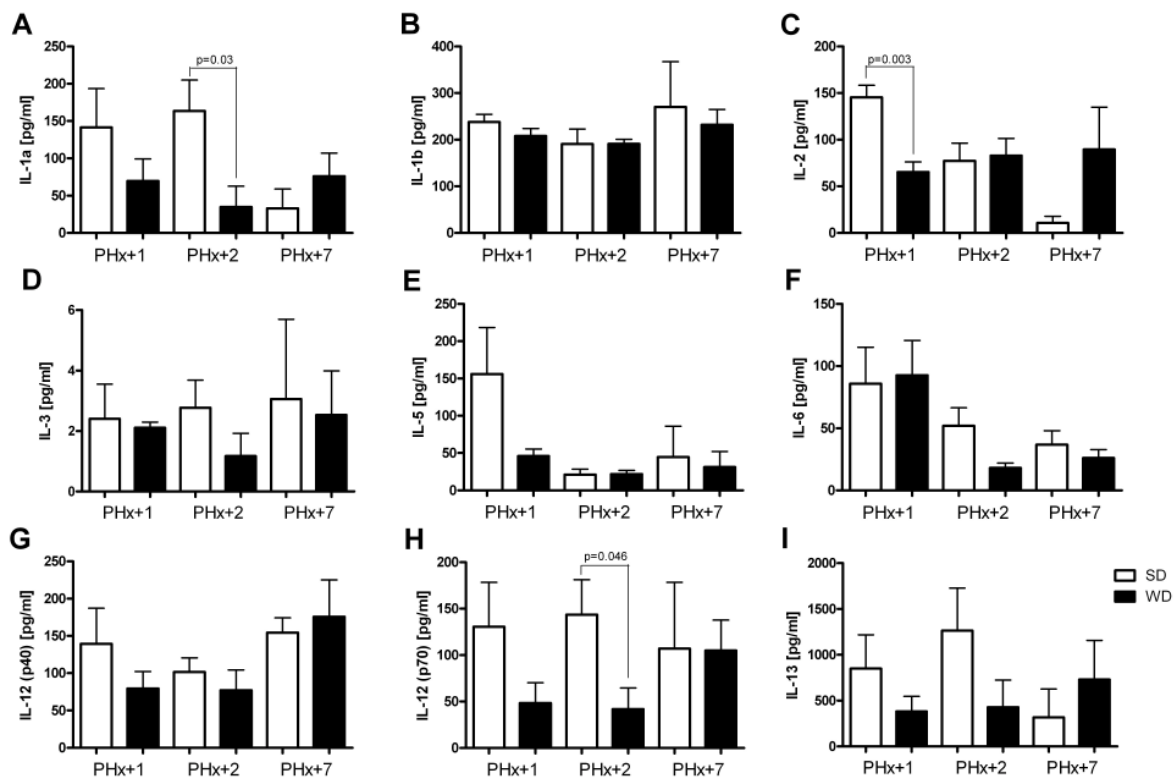
**Abb. 27: Serum-Parameter nach 70% PHx nach 6-wöchiger Fütterung einer SD oder WD.**

Messung von AST (A), ALT (B), LDH (C), Gesamtprotein (D), Albumin (E) und Bilirubin (F) an Tag 1, 2 und 7 (Mittelwert  $\pm$  SEM von SD n = 4 und WD n = 6 Tiere pro Gruppe). Die Gestrichelte Linie stellt den Wert in SD-Tieren prä-OP dar.



### 3 Ergebnisse

Nach der 70% PHx kam es zu einem erheblichen Anstieg der Leberenzyme, was nach dem operativen Eingriff am Lebergewebe zu erwarten war. Der Anstieg von ALT war in den SD-gefütterten Tieren mit 2.269 IU/l ALT signifikant höher als bei den WD-Tieren mit 1.099 IU/l (Abb. 27 B). Die Messung von LDH ergab mit 30.610 IU/l in der SD-Gruppe ebenfalls eine höhere Menge als in der WD-Gruppe mit 18.200 IU/l LDH in der WD-Gruppe (Abb. 27 C). Der gleiche Effekt, allerdings nicht statistisch signifikant, wurde auch bei dem Enzym AST gemessen (Abb. 27 A). An PHx+2 kam es zur Verringerung des Gesamtproteins und des Albumins, diese Werte erhöhten sich an PHx+7 wieder und erreichten das Niveau vor dem operativen Eingriff (Abb. 27 D+E). Wie zu erwarten war, kam es nach dem operativen Eingriff zu einem deutlichen Anstieg des Serum-Bilirubins, allerdings zeigten sich keine Unterschiede zwischen den beiden Fütterungsgruppen (Abb. 27 F).



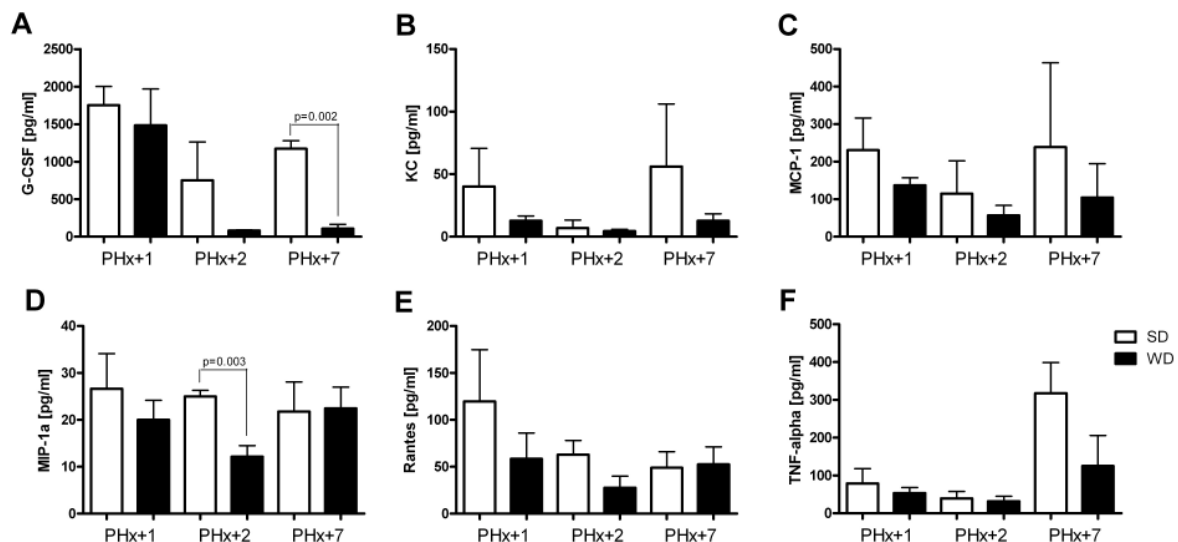
**Abb. 28: Interleukine im Serum nach 70% PHx.**

Messung der Interleukine IL-1a (A), IL-1b (B), IL-2 (C), IL-3 (D), IL-5 (E), IL-6 (F), IL-12 (p40) (G), IL-12 (p70) (H) und IL-13 (I) an Tag 1, 2 und 7 nach 70% PHx im Serum nach 6-wöchiger Fütterung einer SD oder WD (Mittelwert  $\pm$  SEM, n = 4 Tiere pro Gruppe).

### 3 Ergebnisse

Die Messung der verschiedenen Interleukine im Serum an Tag 1, 2 und 7 nach 70% PHx ergab keine signifikante Erhöhung der Interleukine in WD-gefütterten Mäusen. Zum Zeitpunkt PHx+2 wurde die Ausschüttung von IL-1a mit 164 pg/ml in der SD-Gruppe gegenüber der WD-Gruppe mit 35 pg/ml signifikant erhöht (Abb. 28 A). Die Sekretion von IL-2 an PHx+1 war in SD-Tieren mit 145 pg/ml signifikant höher als im Serum der WD-Tiere mit 65 pg/ml (Abb. 28 C). Vergleichbare Ergebnisse waren auch bei IL-5 (Abb. 28 E, an PHx+1), IL-12 (p70) (Abb. 28 H, an PHx+1 und PHx+2), sowie bei IL-13 (Abb. 28 I an PHx+1 und PHx+2) in der SD-Gruppe nach 70% PHx messbar.

Neben der Bestimmung diverser Interleukine wurden außerdem weitere inflammatorische Faktoren an Tag 1, 2 und 7 nach 70% PHx im Serum in SD- und WD-gefütterten Tieren gemessen (Abb. 29). Bei dieser Messung waren kaum deutliche Unterschiede zwischen SD- und WD-gefütterten Tieren zu erkennen. Die Serum-Menge von G-CSF an PHx+7 war mit 107 pg/ml in der WD-Gruppe verglichen mit den Tieren der SD-Gruppe mit 1.172 pg/ml signifikant verringert (Abb. 29 A). Ein vergleichbarer Effekt trat bei der Messung von MIP-1a an PHx+2 auf (25 pg/ml in SD-Mäusen und 12 pg/ml im Serum von WD-Tieren, Abb. 29 D).



**Abb. 29: Inflammatorische Faktoren im Serum nach 70% PHx.**

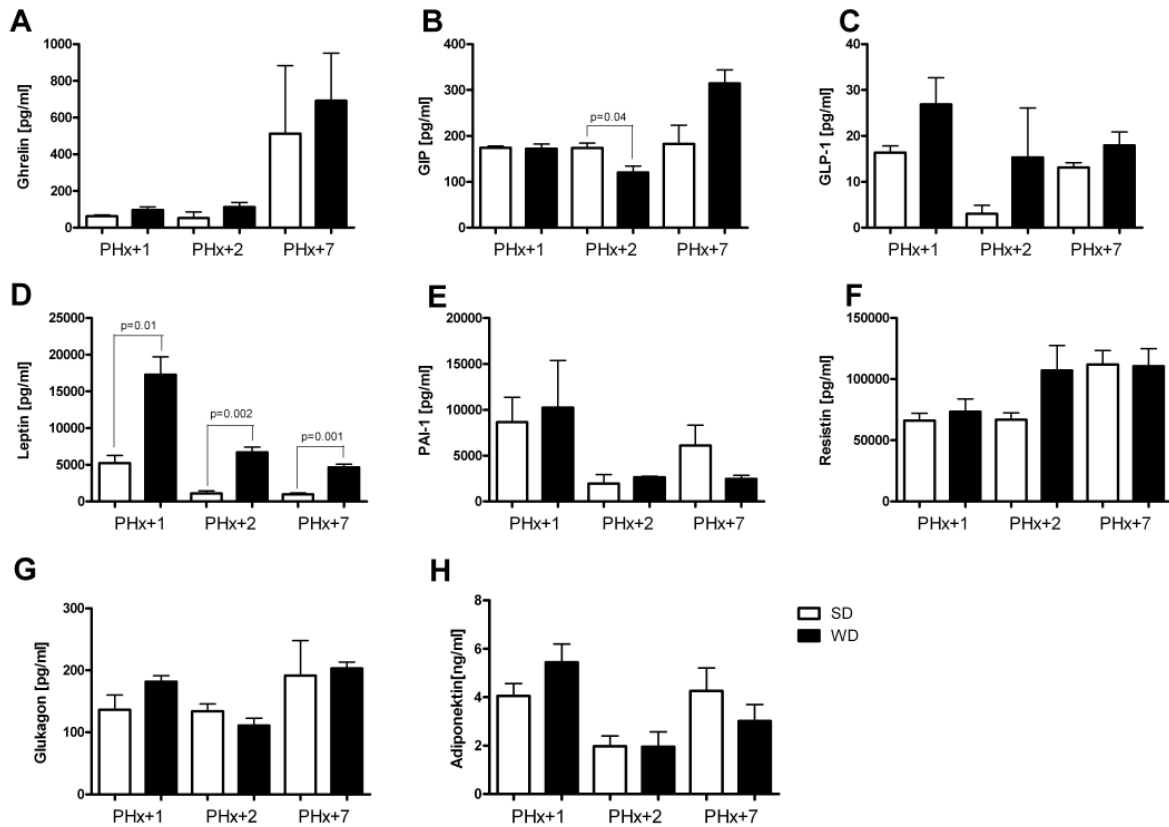
Messung von G-CSF (A), KC (B), MCP-1 (C), MIP-1a (D), Rantes (E) und TNF-alpha (F) an Tag 1, 2 und 7 nach 70% PHx im Serum nach 6-wöchiger SD oder WD (Mittelwert  $\pm$  SEM, n = 4 Tiere pro Gruppe).

### 3 Ergebnisse

Die Serum-Mengen von MCP-1, Rantes und TNF- $\alpha$  ergaben keine Veränderungen (Abb. 29 C, E + F). Bei TNF- $\alpha$  kam es an PHx+7 in beiden Fütterungsgruppen zu einem Anstieg der Serum-Menge, der Effekt war in der SD-Gruppe deutlicher zu erkennen.

Zur näheren Beschreibung der Regeneration steatotischer Lebern wurden nach der Leberteileresektion die charakteristischen Serum-Parameter des metabolischen Syndroms bestimmt. Der deutlichste Effekt fiel bei der Bestimmung des Adipokins Leptin auf (Abb. 30 D). Hier war zu beobachten, dass es an Tag 1, 2 und 7 nach 70% PHx in der WD-Gruppe stets zu einer deutlichen Erhöhung verglichen mit der SD-Gruppe kam. An PHx+1 betrug der Leptin-Gehalt im Serum der SD-Tiere 5.242 pg/ml und der WD-Tiere 17.260 pg/ml. An PHx+2 verringerte sich die Leptin-Konzentration in beiden Fütterungsgruppen, zeigte jedoch mit 6.717 pg/ml im Serum der WD-Mäuse gegenüber 1.087 pg/ml im Serum der SD-Mäuse weiterhin eine signifikante Erhöhung. Der gleiche Effekt trat auch an PHx+7 auf (975 pg/ml in SD-Tieren verglichen mit 4.650 pg/ml in WD-Tieren). Der Serum-Spiegel von Leptin war bereits vor der OP in der WD-Gruppe höher, so wie es auch nach der OP noch immer der Fall war.

### 3 Ergebnisse

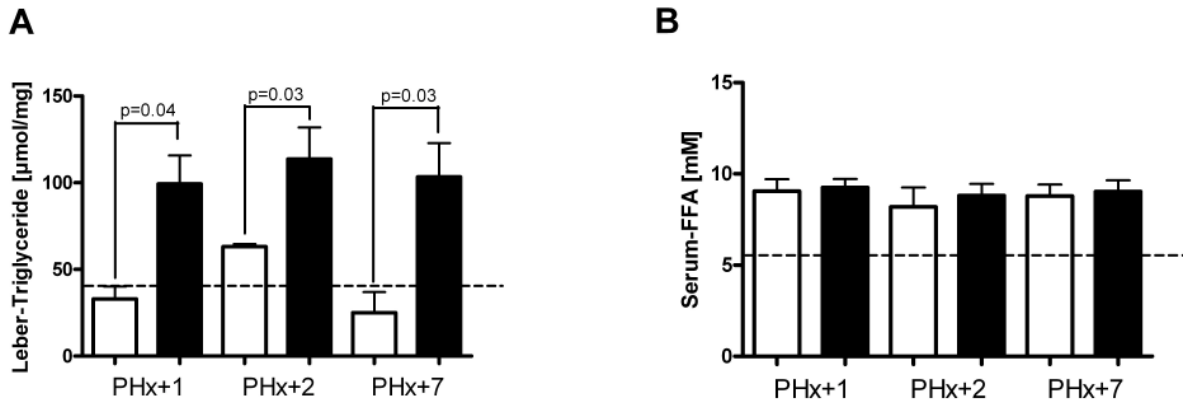


**Abb. 30: Faktoren des metabolischen Syndroms nach 70% PHx.**

Messung von Ghrelin (A), GIP (B), GLP-1 (C), Leptin (D), PAI-1 (E), Resistin (F), Glukagon (G) und Adiponektin (H) an Tag 1, 2 und 7 nach 70% PHx im Serum nach 6-wöchiger SD oder WD (Mittelwert  $\pm$  SEM, n = 4 Tiere pro Gruppe).

Neben der Bestimmung verschiedener Serum-Parameter, die auf die Manifestation eines metabolischen Syndroms hindeuten, wurden auch nach 70% PHx entsprechende Blut- und Leberfettwerte bestimmt.

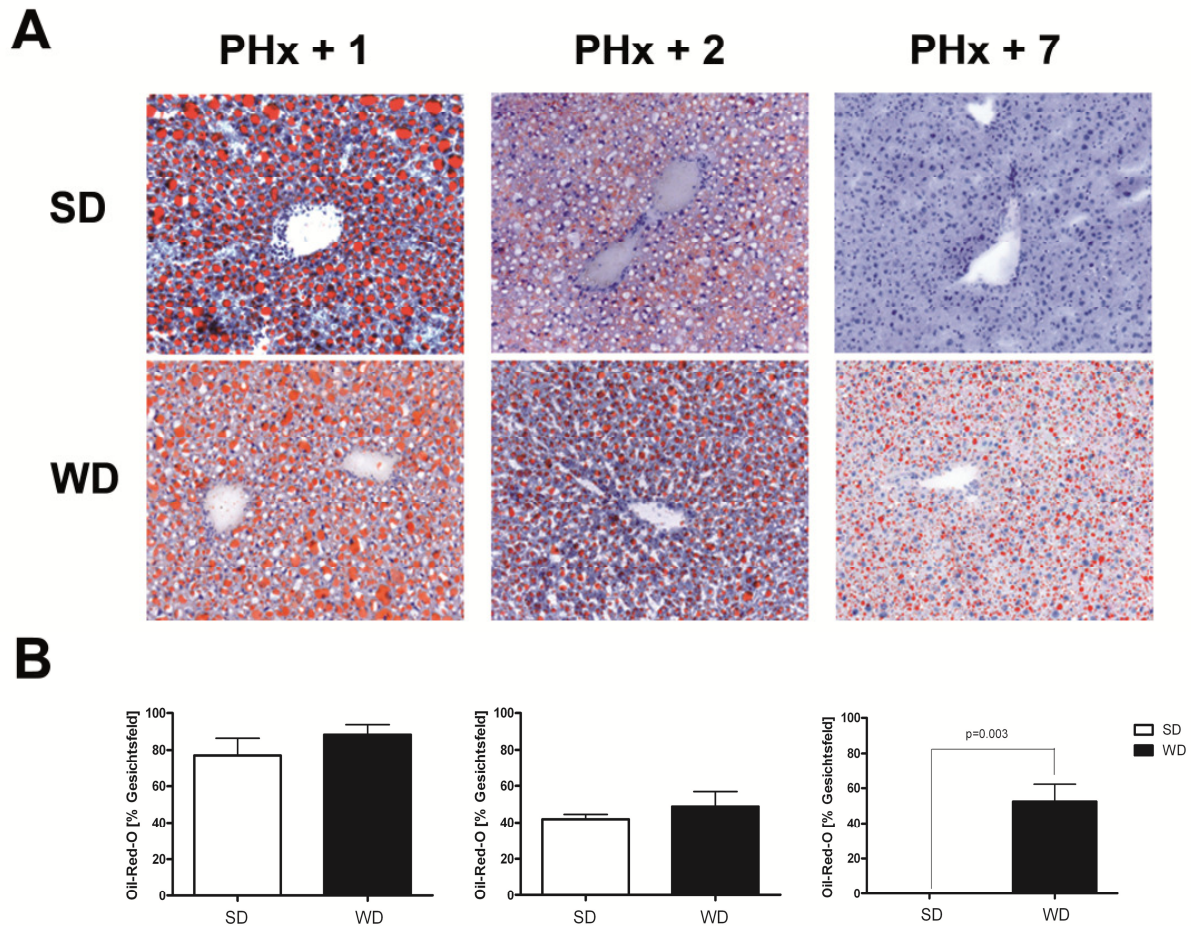
### 3 Ergebnisse



**Abb. 31: Fette im Lebergewebe und im Serum nach 70% PHx.**

Bestimmung von Leber-Triglyceriden (A) und Serum-FFA (B) an Tag 1,2 und 7 nach 70% PHx nach 6-wöchiger Fütterung einer SD oder WD (Mittelwert  $\pm$  SEM von SD n = 4 und WD n = 6 Tiere pro Gruppe). \* = p < 0,05 vs. SD prä-OP. Die Gestrichelte Linie stellt den Wert in SD-Tieren prä-OP dar.

Nach 70% PHx kam es zu allen Zeitpunkten zu einem signifikanten Anstieg der FFA im Serum beider Diät-Gruppen (Abb. 31 B). Der Gehalt an Serum-FFA wies keine Unterschiede zwischen den beiden Fütterungsgruppen auf (8-9 mM nach PHx gegenüber 6 mM vor dem operativen Eingriff). Die Menge an Triglyceriden im Lebergewebe ergab keine signifikanten Unterschiede in der SD-Gruppe nach 70% PHx, jedoch war auch hier zu den gemessenen Zeitpunkten die Menge im Lebergewebe der WD-gefütterten Tiere signifikant höher als im Lebergewebe der SD-Tiere (Abb. 31 A). Eine auffällige Beobachtung nach 70% PHx war der Anstieg von freien Fettsäuren im Serum von SD- und WD-Tieren. Bei Betrachtung der Leber-Histologie wurde deutlich, dass es nicht nur zur verstärkten Akkumulation von FFA in Serum, sondern auch von Fettvakuolen im Lebergewebe der SD-gefütterten Mäuse kam. In Abb. 32 ist zu sehen, dass es nach der 70% PHx zu einer starken Akkumulation von Fetten im Lebergewebe kam und es an PHx+1 und PHx+2 keine sichtbaren Unterschiede zwischen SD- und WD-gefütterten Mäusen gab.



**Abb. 32: Fettakkumulation im Lebergewebe nach 70% PHx.**

Oil-Red-O-Färbung (A), sowie Quantifizierung der Oil-Red-O-gefärbten Fläche (B) im Lebergewebe an Tag 1, 2 und 7 nach 70% PHx von SD- und WD-gefütterten Mäusen. Lichtmikroskopische Aufnahme (Objektiv x20), sowie Quantifizierung der Oil-Red-O-gefärbten Fläche von n = 5 Gesichtsfeldern von SD n = 4 und WD n = 6 verschiedenen Tieren, dargestellt als Mittelwert ± SEM.

An Tag 7 nach dem operativen Eingriff waren im Lebergewebe der SD-Mäuse keine Fettvakuolen mehr zu erkennen. Im Gewebe der WD-Gruppe fanden sich auch am PHx+7 deutliche Fettvakuolen, da die Gabe der WD auch nach der Leberteilesektion fortgeführt wurde.

Nach der Leberteilesektion waren die Serum-Konzentrationen der Leber-spezifischen Enzyme AST, ALT und LDH besonders an PHx+1 stark erhöht, dieser Effekt war in der SD-Gruppe höher als in der WD-Gruppe. Die verschiedenen Interleukine waren in einigen Fällen nach der Operation erhöht und zumeist in der SD-Gruppe höher als bei den WD-Tieren. Bei den Diabetes-assoziierten Faktoren zeigten sich bei dem Adipokin Leptin Unterschiede zwischen den beiden Fütterungsgruppen, die Mengen im Serum

### 3 Ergebnisse

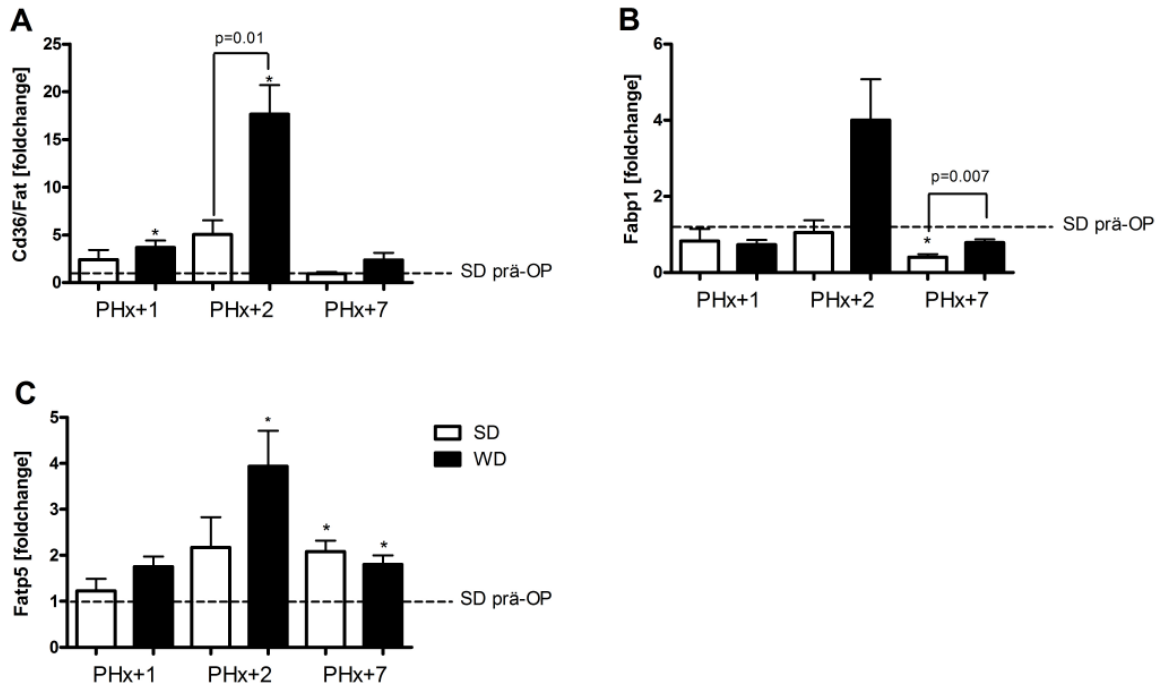
der WD-Tiere waren, gegenüber den Serum-Mengen der SD-Tiere, deutlich erhöht. Die Menge an Triglyzeriden im Lebergewebe war nach 70% PHx zu allen Zeitpunkten in der WD-Gruppe höher als in der SD-Gruppe.

Im Lebergewebe kam es nach der OP zur massiven Akkumulation von Fett in beiden Fütterungsgruppen, der Gehalt an FFA war in beiden Gruppen erhöht und zeigte keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen auf.

#### *3.4.2. Expression von FATP nach 70% PHx im Lebergewebe von C57Bl/6-Mäusen nach 6-wöchiger Fütterung einer SD oder WD*

Die Fütterung der WD ging bereits vor 70% PHx mit einer Überexpression von Fettsäuretransportproteinen einher, die Expression dieser Gene wurde auch nach der Teilresektion näher untersucht. In Abb. 33 ist die Expression der Fettsäuretransportproteine Cd36/Fat, Fabp-1 und Fatp-5 nach der Leberteilresektion im Rest-Lebergewebe der Mäuse, die mit einer SD bzw. WD gefüttert wurden, dargestellt. Es war zu beobachten, dass es nach dem operativen Eingriff zu einer 3,8-fachen Aktivierung von Cd36/Fat bereits an PHx+1 in WD-Tieren kam und diese an PHx+2 noch weiter auf eine 18-fache Expression anstieg. Dieser Effekt war an PHx+2 im Lebergewebe der WD-Tiere signifikant höher als im Gewebe der SD-Mäuse (5-fach aktiviert). Die Gen-Expression von Fabp-1 ergab an PHx+1 eine verringerte Expression im Lebergewebe beider Fütterungsgruppen und wurde an PHx+2 in der WD-Gruppe 4-fach aktiviert. Die Fabp-1-Expression wurde an PHx+7 vermindert und wies eine geringere mRNA-Expression als vor 70% PHx auf. Dieser Effekt war hier deutlicher in der SD-Gruppe mit 0,4-facher gegenüber einer 0,8-fachen Expression in der WD-Fütterungsgruppe. Abb. 33 C zeigt die Expression von Fatp-5 nach 70% PHx. Hier ist zu erkennen, dass es an PHx+2 in SD-Tieren zu einer 2-fachen und in WD-Tieren zu einer 4-fachen Steigerung der Fatp-5-Expression nach dem operativen Eingriff kam. Der Effekt der Fatp-5-Aktivierung war im Lebergewebe der WD-gefütterten Tiere eindeutiger als bei den SD-Tieren. An PHx+7 wurde die Fatp-5-Expression wieder verringert, zeigte jedoch in den SD-Tieren noch eine 2-fache und in den WD-Tieren eine 1,8-fach erhöhte Expression im Vergleich zum Zeitpunkt vor der Leberteilresektion.

### 3 Ergebnisse



#### Abb. 33: Expression von FATP nach 70% PHx.

Relative Expression von Cd36/Fat (A), FABP-1 (B) und FATP-5 (C) an Tag 1, 2 und 7 nach 70% PHx im Lebergewebe nach 6-wöchiger Fütterung einer SD oder WD. Gesamtauswertung der qRT-PCR (Mittelwert  $\pm$  SEM, SD n = 4, WD n = 6 Tiere pro Gruppe). Die Basalexpression in SD-gefütterten Tieren vor der OP wird als gestrichelte Linie SD prä-OP dargestellt. \* = p < 0,05 vs. SD prä-OP.

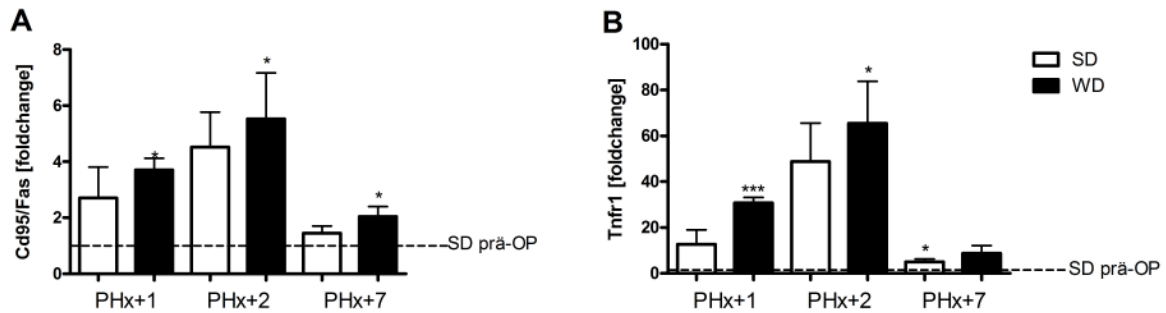
Hier konnte beobachtet werden, dass es zur verstärkten Expression der Fettsäuretransportproteine Cd36/Fat und Fatp-5 nach dem operativen Eingriff kam.

#### 3.4.3. Expression von DR und Zelltod nach 70% PHx im Lebergewebe von C57Bl/6-Mäusen nach 6-wöchiger Fütterung einer SD oder WD

Die Expression der DR Cd95/Fas und Tnfr1 an Tag 1, 2 und 7 nach einer 70% PHx im Lebergewebe SD- und WD-gefütterter Mäuse ist in Abb. 34 dargestellt.



### 3 Ergebnisse

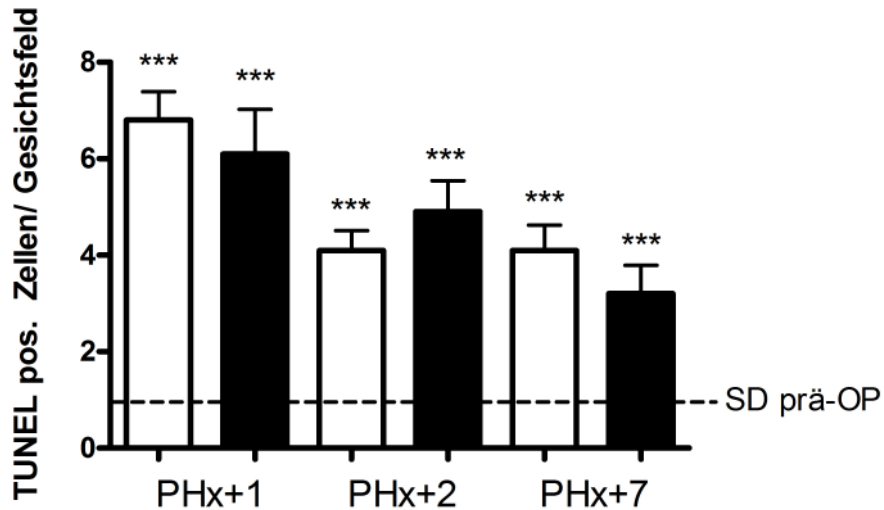


**Abb. 34: Expression von DR nach 70% PHx.**

Relative Expression von Cd95/Fas (A) und Tnfr1 (B) an Tag 1, 2 und 7 nach 70% PHx im Lebergewebe nach 6-wöchiger Fütterung einer SD oder WD. Gesamtauswertung der qRT-PCR (Mittelwert  $\pm$  SEM, SD n = 4, WD n = 6 Tiere pro Gruppe). Die Basalexpression in SD-gefütterten Tieren vor der OP wird als gestrichelte Linie SD prä-OP dargestellt. \* =  $p < 0,05$  vs. SD prä-OP.

Die Leberteilresektion verursachte im Lebergewebe beider Versuchsgruppen einen sichtbaren Anstieg der Cd95/Fas-Expression (Abb. 34 A) an PHx+1, PHx+2 und PHx+7 mit einem Höhepunkt an PHx+2 (4,5-fache Expression nach SD-Fütterung und 5,5-facher Anstieg in WD-Tieren). Die Aktivierung der Expression erhöhte sich zu allen Zeitpunkten in der WD-Gruppe eindeutiger als in der SD-Gruppe. Der gleiche Effekt war bei der Expression von Tnfr1 zu beobachten, hierbei kam es jedoch zu einer extremen Überexpression in beiden Fütterungsgruppen (Abb. 34 B). An PHx+1 wurde die Tnfr1-Expression in SD-Tieren 13-fach und in den WD-Tieren 31-fach verstärkt, an PHx+2 kam es zu einer 49-fachen in der SD-Gruppe und zu einer 65-fachen Steigerung der Expression in der WD-Gruppe. Zum Zeitpunkt PHx+7 sank die Tnfr1-Expression wieder ab, ergab jedoch bei den SD-Tieren noch immer eine 5-fache und in den WD-Tieren eine 8,8-fache Induktion. Da es nach der Leberteilresektion zu einer sehr starken Überexpression der DR kam, wurde der Zelltod im Lebergewebe durch einen TUNEL-Assay bestimmt.

### 3 Ergebnisse



**Abb. 35: TUNEL-Assay nach 70% PHx.**

Quantifizierung TUNEL-positiver Zellen an Tag 1, 2 und 7 nach 70% PHx im Lebergewebe von nach 6-wöchiger Fütterung einer SD oder WD. Dargestellt ist die Quantifizierung von TUNEL-positiven Zellen pro Gesichtsfeld von n = 5 Gesichtsfeldern von 4-6 verschiedenen Tieren (Mittelwert ± SEM). Die Anzahl TUNEL-positiver Zellen in SD-gefütterten Tieren prä-OP ist als gestrichelte Linie dargestellt. \*\*\* =  $p < 0,0001$  vs. SD prä-OP.

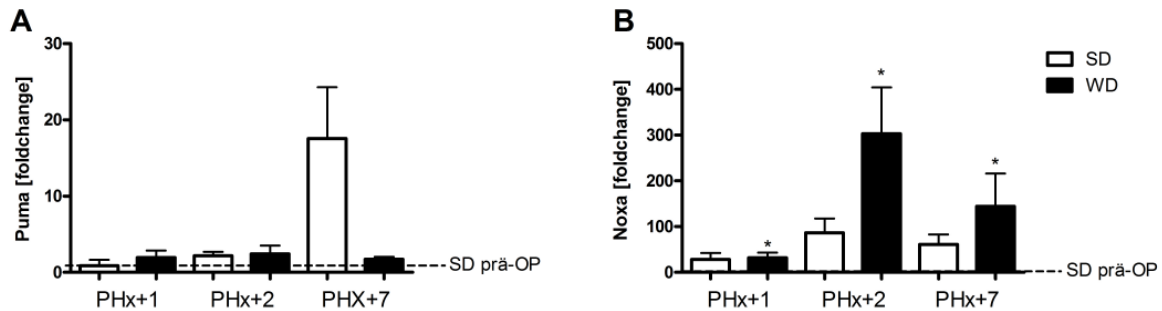
Abb. 35 zeigt, dass nach der Leberteilresektion im Lebergewebe deutlich mehr TUNEL-positive Zellen vorhanden waren als vor dem Eingriff. Im regenerierenden Lebergewebe wurde damit mehr Zelltod als vor dem operativen Eingriff detektiert, zwischen den beiden Fütterungsgruppen waren jedoch keine Unterschiede festzustellen.

Durch die vorhergehenden Messungen konnte festgestellt werden, dass es nach der Leberteilresektion zwar zur Überexpression von DR, aber nicht zu einem erhöhten Maß an Leberzelltod kam.

#### *3.4.4. Expression Apoptose- und Autophagie-assoziiierter Moleküle nach 70% PHx im Lebergewebe von C57Bl/6-Mäusen nach 6-wöchiger Fütterung einer SD oder WD*

Im folgenden Teil wird die Expression verschiedener pro- und anti-apoptotischer sowie Autophagie-assoziiierter Moleküle nach 70% PHx dargestellt.

### 3 Ergebnisse

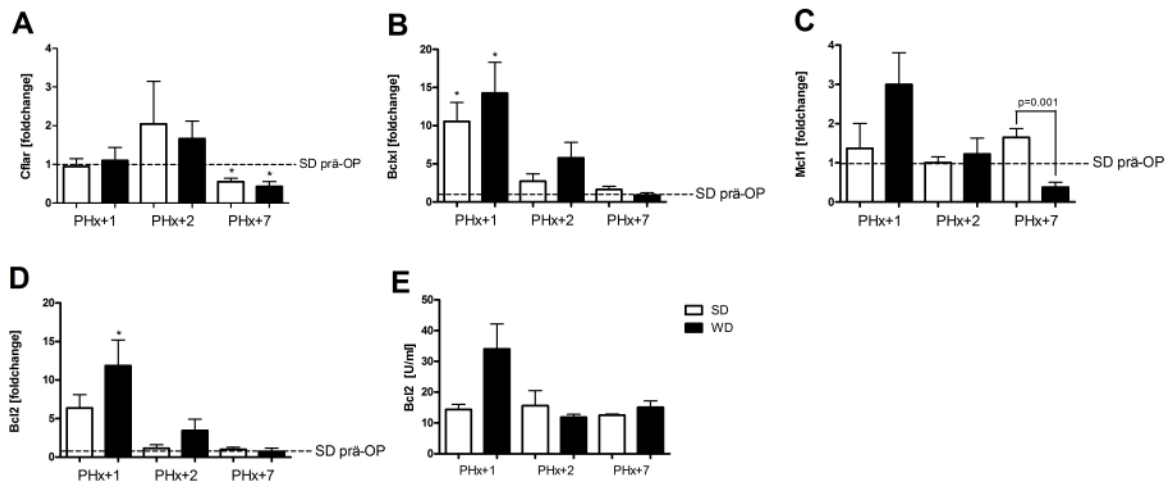


**Abb. 36: Expression pro-apoptotischer Moleküle nach 70% PHx.**

Relative Expression von Puma (A) und Noxa mRNA (B) an Tag 1, 2 und 7 nach 70% PHx im Lebergewebe nach 6-wöchiger Fütterung einer SD oder WD. Gesamtauswertung der qRT-PCR (Mittelwert  $\pm$  SEM, SD n = 4, WD n = 6 Tiere pro Gruppe). Die Basalexpression in SD-gefütterten Tieren vor der OP wird als gestrichelte Linie SD prä-OP dargestellt. \* =  $p < 0,05$  vs. SD prä-OP.

Abb. 36 A zeigt, dass die Expression von Puma nach 70% PHx an Tag 1, 2 und 7 in beiden Fütterungsgruppen in geringem Maße aktiviert wurde. In Abb. 36 B ist zu sehen, dass es in SD-Mäusen an PHx+1 zu einer 28-fachen und in WD-Tieren zu einer 32-fachen Überexpression von Noxa kam. An Tag 2 nach der OP stieg die Expression weiterhin an (in der SD-Gruppe 87-fach und in der WD-Gruppe 300-fach). Die Messung der Noxa-Expression ergab an Tag 7 nach der Teilresektion in der SD-Gruppe eine 61-fache und in der WD-Gruppe eine 144-fache Aktivierung. An Tag 2 und 7 war die Induktion der Noxa-Expression in der WD-Gruppe deutlich erhöht, als in der SD-Gruppe. Neben der Expression der pro-apoptotischen Moleküle Puma und Noxa wurde außerdem die Expression der anti-apoptotischen Moleküle Cflar, Bcl-2, Bcl-xl und Mcl-1 weiter untersucht.

### 3 Ergebnisse



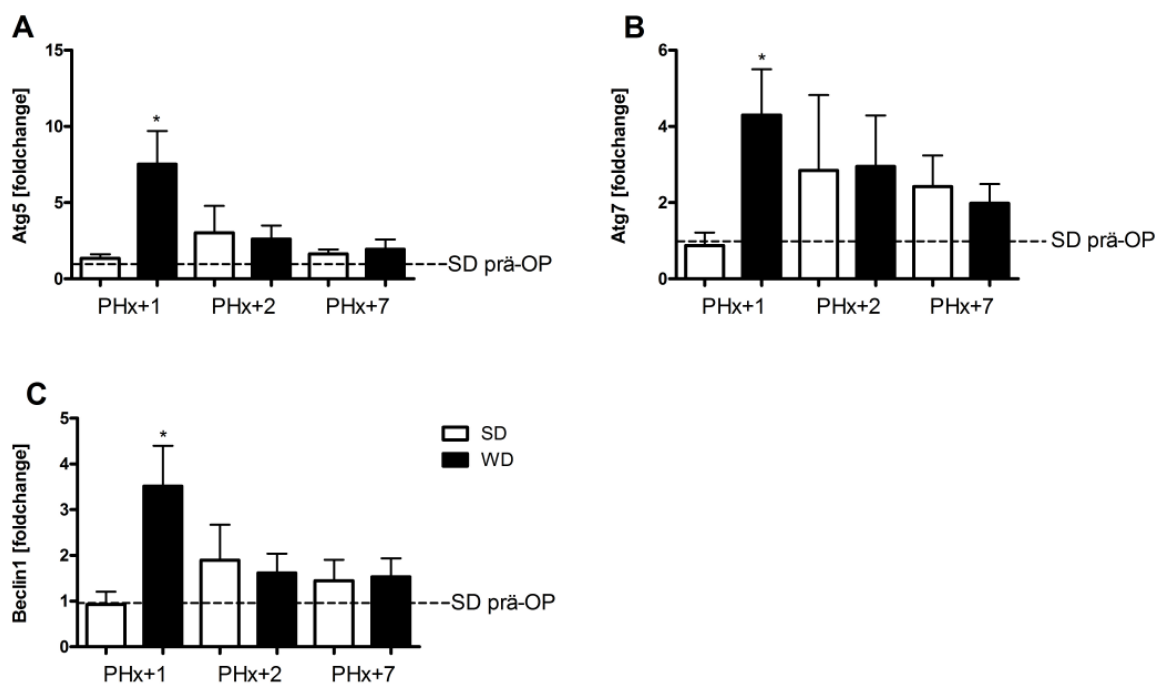
**Abb. 37: Expression anti-apoptotischer Moleküle nach 70% PHx.**

Relative Expression von Cflar (A), Bcl-xl (B) und Mcl-1 (C) und Bcl-2 (D+E) an Tag 1, 2 und 7 nach 70% PHx im Lebergewebe nach 6-wöchiger Fütterung einer SD oder WD. Gesamtauswertung der qRT-PCR in A-D (Mittelwert  $\pm$  SEM, SD n = 4, WD n = 6 Tiere pro Gruppe). Die Basalexpression in SD-gefütterten Tieren vor der OP wird als gestrichelte Linie SD prä-OP dargestellt. \* =  $p < 0,05$  vs. SD prä-OP. Abb.33 E zeigt die Bestimmung von Bcl-2 mittels ELISA, dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM von SD n = 4 und WD n = 6 Tieren pro Gruppe.

Die Expression von Cflar zeigte nach 70% PHx keinen Unterschied und wurde an Tag 7 nach OP sogar ca. um die Hälfte in beiden Gruppen vermindert (Abb. 37 A). An PHx+1 war die Bcl-xl-Expression 11-fach in der SD- und 14-fach in der WD-Gruppe erhöht. Nach weiteren 24h sank die Genexpression von Bcl-xl an PHx+2 bei den SD-Tieren auf das 2,7-fache und bei den WD-Tieren auf das 5,8-fache ab (Abb. 37 B). Die Expression von Mcl-1 wurde nach der Leberteilresektion in der SD-Gruppe 1,3-fach und in der WD-Gruppe 3-fach verstärkt. Mcl-1 sank an PHx+2 wieder auf das Niveau vor der OP ab (Abb. 37 C) und war an PHx+7 in der WD-Gruppe verglichen mit der SD-Gruppe signifikant verringert (in der SD-Gruppe 1,6-fache und in der WD-Gruppe 0,38-fache Expression). Die mRNA-Expression von Bcl-2 wurde an PHx+1 in SD-Mäusen um das 6,4-fache und in den WD-Mäusen um das 11,9-fache aktiviert. An PHx+2 war die Bcl-2-mRNA-Expression lediglich in den WD-Tieren 3,4-fach erhöht (Abb. 37 D). Die Proteinmenge von Bcl-2 wurde hier außerdem durch einen Bcl-2-spezifischen ELISA bestimmt und wies an PHx+1 bei den WD-gefütterten Tieren einen höheren, aber nicht signifikanten ( $p = 0,18$ ), Bcl2-Gehalt als in den SD-gefütterten Tieren auf (Abb. 37 E). Bei den anti-apoptotischen Molekülen Bcl-xl, Mcl-1 und Bcl-2 wurde die Expression nach der Operation vor Allem an PHx+1 aktiviert, wobei die Überexpression in der WD-Gruppe höher war als in der SD-Gruppe.

### 3 Ergebnisse

Wie bereits vor der Leberteilresektion zeigte sich auch nach dem operativen Eingriff eine starke Überexpression der Autophagie-assoziierten Gene Atg5, Atg7 und Beclin1 in WD-Mäusen im besonderen Maße an PHx+1. In der WD-Gruppe ergaben sich eine 7,5-fache Genexpression von Atg5, eine 3,4-fache Induktion von Atg7 und ein 3,5-facher Expressionszuwachs von Beclin1. Die Expression dieser Gene war in der SD-Gruppe an PHx+1 nicht verändert. An Tag 2 nach dem operativen Eingriff ergab sich auch in den SD-Mäusen ein leichter Expressionsanstieg der gemessenen Gene, der Effekt reduzierte sich allerdings in beiden Gruppen an PHx+2 und PHx+7 stetig (Abb. 38).



**Abb. 38: Expression Autophagie-assoziiierter Moleküle nach 70% PHx.**

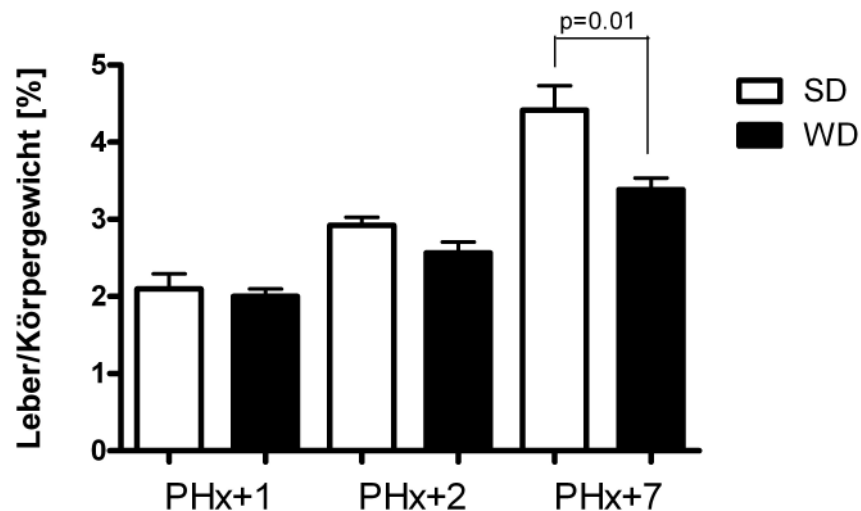
Relative Expression von Atg5 (A), Atg7 (B) und Beclin1 (C) an Tag 1, 2 und 7 nach 70% PHx im Lebergewebe nach 6-wöchiger Fütterung einer SD oder WD. Gesamtauswertung der qRT-PCR, (Mittelwert  $\pm$  SEM, SD n = 4, WD n = 6 Tiere pro Gruppe). Die Basalexpression in SD-gefütterten Tieren vor der OP wird als gestrichelte Linie SD prä-OP dargestellt. \* = p < 0,05 vs. SD prä-OP.

Nach der OP kam es zu einer verstärkten Expression der pro- und anti-apoptotischen Moleküle sowie der Autophagie-assoziierten Gene, wobei der Effekt deutlicher in der WD-Gruppe ausgeprägt war. Die Expression von Cflar war nach der OP nicht verändert.

### 3 Ergebnisse

#### 3.4.5. Leberregeneration nach 70% PHx in C57Bl/6-Mäusen nach 6-wöchiger Fütterung einer SD oder WD

Die Regeneration des Lebergewebes nach der Teilresektion wurde durch die Bestimmung des Verhältnisses von Leber-zu Körpergewicht und durch die Anfärbung von proliferierenden Zellen im Lebergewebe dargestellt.



**Abb. 39: Verhältnis von Leber-zu Körpergewicht nach 70%.**

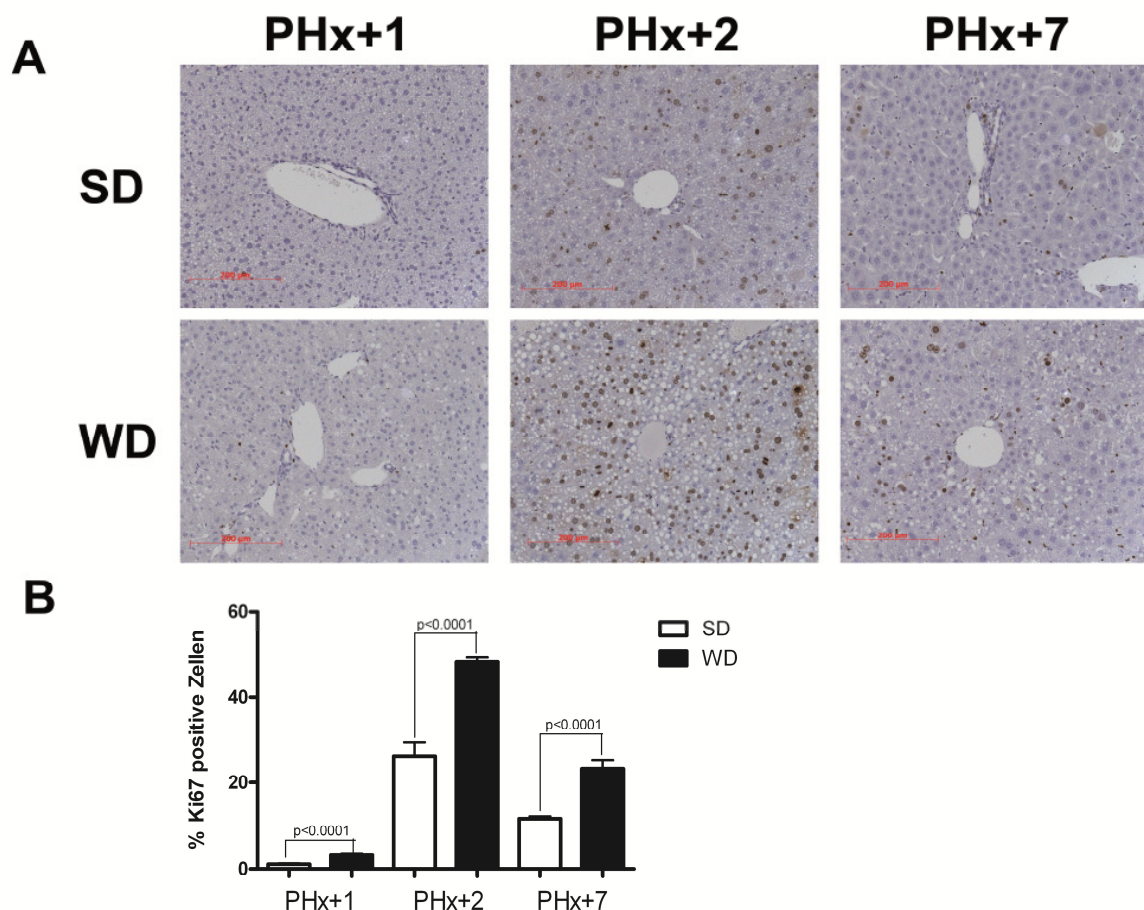
Bestimmung des Verhältnisses von Leber-zu Körpergewicht nach 70% PHx nach 6-wöchiger Fütterung einer SD oder WD. Mittelwert  $\pm$  SEM; SD n = 4, WD n = 6 Tiere pro Gruppe.

Die Ermittlung des Verhältnisses von Leber- zu Körpergewicht zeigte nach der Operation an PHx+1 und PHx+2 keine deutlichen Unterschiede zwischen den beiden Fütterungsgruppen auf. An Tag 7 nach dem operativen Eingriff betrug der Anteil des Lebergewichts 4,4% bei den SD-Tieren und 3,4% bei den WD-Tieren, der gemessene Unterschied ergab damit einen signifikant größeren Zuwachs des Lebergewichts in der SD-Gruppe (Abb. 39).

Als Proliferationsmarker wurde das Lebergewebe mit dem Ki67-Antikörper gefärbt. Bei Ki67 handelt es sich um ein Protein, welches während der Zellproliferation in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus, jedoch nicht in der G<sub>0</sub>-Phase in ruhenden Zellen, detektierbar ist.

### 3 Ergebnisse

Durch die Ki67-Immunhistochemie war zu beobachten, dass im Lebergewebe der steatotischen Tiere ein signifikant höherer Anteil an Ki67-positiven Zellen pro Gesamtzellzahl zu verzeichnen war. An PHx+1 war zunächst nur ein geringer Anteil an proliferierenden Zellen zu detektieren (1,1% bei den SD-Tieren und 3,2% bei den WD-Tieren), nach weiteren 24h nahm die Zellteilung ersichtlich zu und betrug in der SD-Gruppe 26% und in der WD-Gruppe 48%. An PHx+7 wurden weniger proliferierende Zellen im Lebergewebe beider Gruppen ermittelt, wobei bei den SD-Mäusen noch ein Anteil von 12% und in den WD-Mäusen von 23% teilender Zellen detektiert werden konnten (Abb. 40). Die Zellproliferation wurde zwischen 24 und 48h aktiviert und an Tag 7 wieder reduziert. Beim Vergleich der beiden Fütterungsgruppen wurde in der WD-Gruppe ein höherer Anteil an proliferierenden Zellen ermittelt als in der SD-Gruppe.

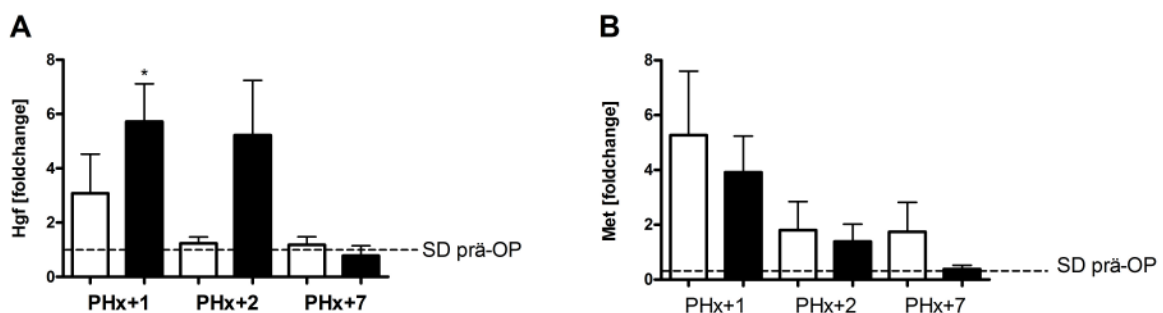


**Abb. 40: Ki67 nach 70% PHx.**

Ki67-Immunhistochemie (A) und Quantifizierung Ki67-positiver Zellen (B) an Tag 1, 2 und 7 nach 70% PHx im Lebergewebe nach 6-wöchiger Fütterung einer SD oder WD. Lichtmikroskopische Aufnahme (Objektiv x20). Quantifizierung der Ki67-positiven Zellen pro Gesamtzellzahl von n = 5 Gesichtsfeldern von SD n = 4 und WD n = 6 Tieren pro Gruppe (Mittelwert ± SEM).

### 3 Ergebnisse

Der Regeneration-assoziierte Faktor Hgf wurde im Lebergewebe der SD-Gruppe an PHx+1 3-fach verstärkt exprimiert. In der WD-Gruppe erhöhte sich die Genexpression an PHx+1 5,7-fach und an PHx+2 5,2-fach, an PHx+7 wurden keine Unterschiede in beiden Gruppen ermittelt. Die Hgf-Expression wurde eindeutiger durch die Fütterung der WD nach der Teilresektion aktiviert als durch die Fütterung der SD (Abb. 41 B). Beim Hgf-Rezeptor Met kam es an PHx+1 zur 5,2-fach verstärkten Expression innerhalb der SD-Gruppe und zu einer 3,9-fachen Induktion in der WD-Gruppe, die jedoch an den Tagen 2 und 7 wieder vermindert wurde (Abb. 41 C). An PHx+7 zeigte sich lediglich bei den SD-Tieren noch eine minimal erhöhte Expression von Met.



**Abb. 41: Expression Regeneration-assoziiierter Gene nach 70% PHx.**

Relative Expression von Hgf (A) und Met (B) an Tag 1, 2 und 7 nach 70% PHx im Lebergewebe nach 6-wöchiger Fütterung einer SD oder WD. Gesamtauswertung der qRT-PCR, (Mittelwert  $\pm$  SEM, SD n = 4, WD n = 6 Tiere pro Gruppe). Die Basalexpression in SD-gefütterten Tieren vor der OP wird als gestrichelte Linie SD prä-OP dargestellt. \* =  $p < 0,05$  vs. SD prä-OP.

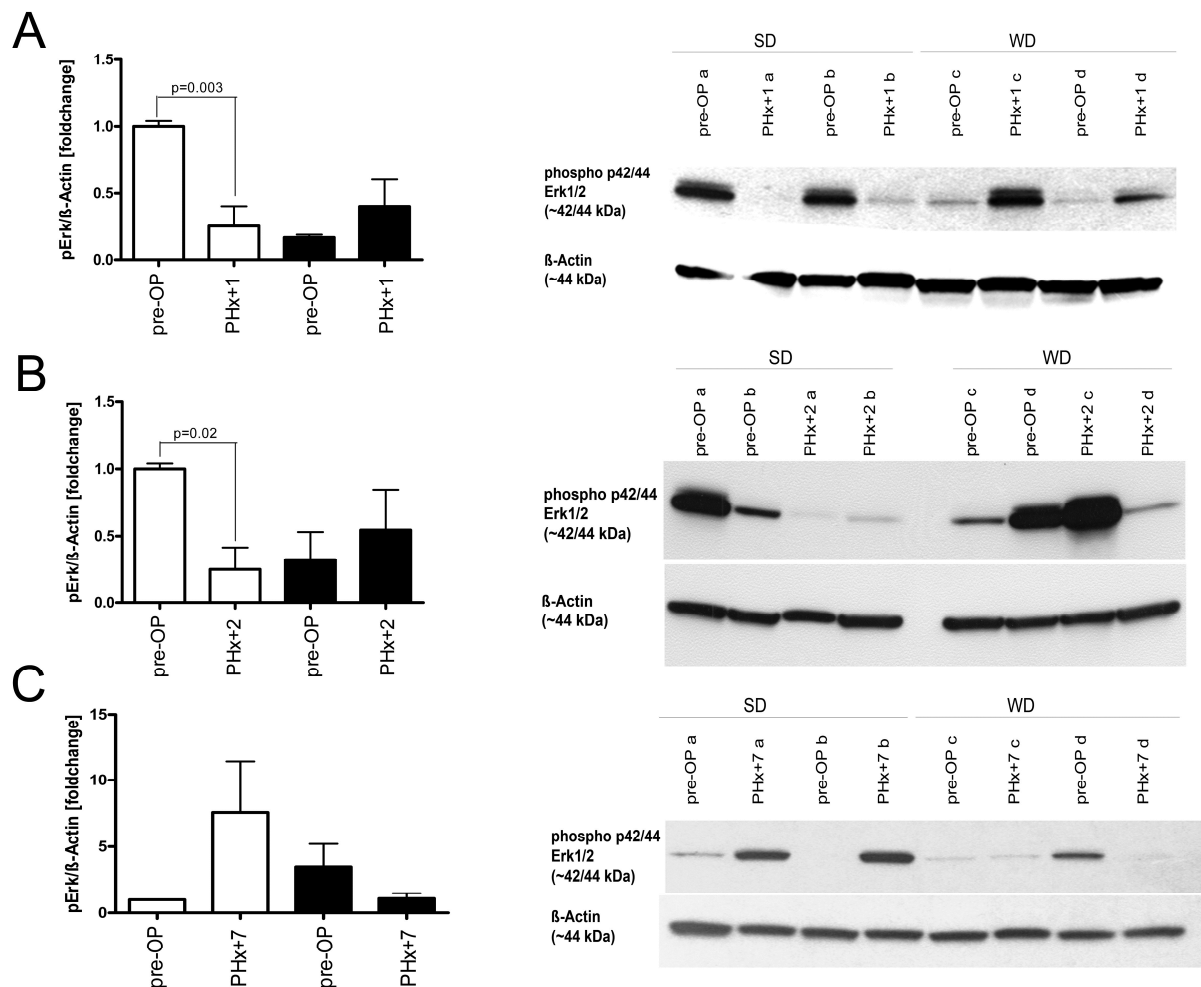
Nach der Leberteilresektion kam es zu einer erhöhten Proliferation der Leberzellen in beiden Gruppen, wobei der Anteil an proliferierenden Zellen im Gewebe der WD-Tiere zu allen Zeitpunkten eindeutig höher war. Dies ging mit einer erhöhten Expression von Regeneration-assoziierten Genen im Lebergewebe einher. Auch hier wurde deutlich, dass der Effekt der Überexpression von Hgf offensichtlicher bei den WD-Tieren zu beobachten war. Die Expression des Hgf-Rezeptors Met wurde zwar nach dem operativen Eingriffe erhöht, zwischen den beiden Gruppen konnten jedoch keine deutlichen Unterschiede ermittelt werden.



### 3 Ergebnisse

#### 3.4.6. Aktivierung von Erk an Tag 1, 2 und 7 nach 70% PHx im Lebergewebe von C57Bl/6-Mäusen nach 6-wöchiger Fütterung einer SD oder WD.

Die anti-apoptotische, Stress-responsive Kinase Erk kann durch verschiedene Faktoren und Moleküle phosphoryliert und damit in den aktivierten Zustand überführt werden. Die Phosphorylierung kann durch den Einfluss von Zytokinen und Chemokinen oder auch durch oxidativen Stress, UV-Strahlung oder andere Stressfaktoren aktiviert werden und die Regulation von Prozessen wie Proliferation, Zelltod, Überleben und Differenzierung beeinflussen (Kirillova *et al.* 1999; Tergaonkar 2006). Aufgrund der pro-proliferativen Wirkung wurde die Erk-Phosphorylierung im Lebergewebe vor und nach 70% PHx in beiden Fütterungsgruppen untersucht.



**Abb. 42: Detektion von phospho-Erk vor und an Tag 1, 2 und 7 nach PHx.**

Immunologischer Nachweis von phospho-Erk an PHx+1 (A), PHx+2 (B) und PHx+7 (C) im Lebergewebe nach 6-wöchiger Fütterung einer SD oder WD. Gezeigt wird zu jedem Zeitpunkt ein repräsentativer Western-Blot von jeweils n = 2 Tieren pro Gruppe und die densitometrische Auswertung von phospho-Erk normalisiert auf β-Actin von n = 4 Tieren pro Gruppe (Mittelwert ± SEM).

### 3 Ergebnisse

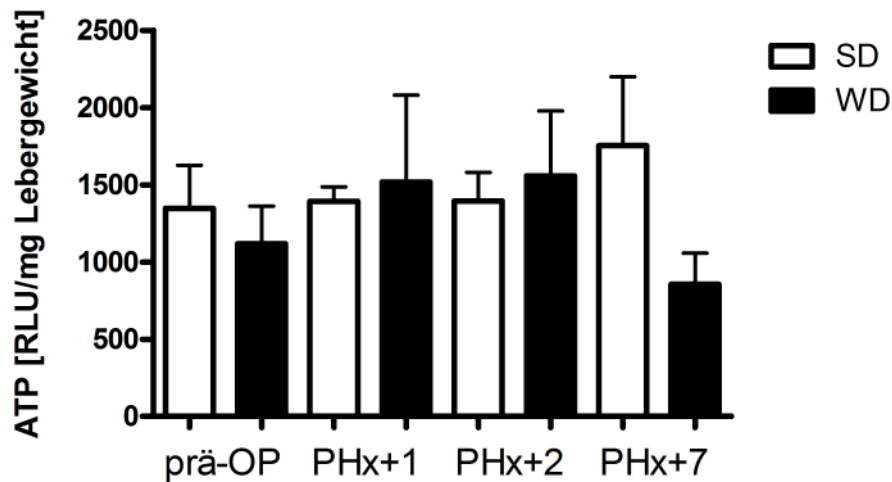
Vor dem operativen Eingriff ergab sich, dass Erk im Lebergewebe der SD-Tiere im phosphorylierten Zustand detektierbar war. Die Mengen an phospho-Erk zeigten jedoch in den einzelnen Tieren teilweise Unterschiede. Zu den Zeitpunkten PHx+1 und PHx+2 nach Leberteilresektion kam es bei den SD-Mäusen zu einem Verlust von 75% der Erk-Phosphorylierung im Lebergewebe. Im Lebergewebe der WD-Tiere war der Effekt nicht so eindeutig, wie bei den SD-Tieren. Hier ergab sich jedoch, dass beim Großteil der Tiere vor der OP Erk im nicht-phosphorylierten Zustand im Lebergewebe detektierbar war und die Erk-Phosphorylierung nach der Leberteilresektion an PHx+1 und PHx+2 anstieg. An PHx+7 kam es bei den SD-Tieren wieder zum Anstieg und in WD-Tieren zu einer Reduktion von phospho-Erk (Abb. 42).

Durch die Leberteilresektion kam es zu Unterschieden der Erk-Phosphorylierung, wobei es in der SD-Gruppe nach 70% PHx zum Verlust der Phosphorylierung von Erk an PHx+1 und PHx+2 kam. In der WD-Gruppe ergaben sich verschiedene Ergebnisse hinsichtlich der Phosphorylierung von Erk, allerdings kam es in dem meisten Fällen nach der Operation zu einer Verstärkung der Erk-Phosphorylierung.

#### *3.4.7. Bestimmung von ATP an Tag 1, 2 und 7 nach 70% PHx im Lebergewebe von C57Bl/6-Mäusen nach 6-wöchiger Fütterung einer SD oder WD.*

Die DNA-Replikation wird in Abhängigkeit von ATP durch verschiedene Zell-Zyklus-Kinasen gesteuert. Studien konnten zeigen, dass der ATP-Gehalt im Gewebe eine wichtige Rolle im Regenerationsprozess spielt (Yang 2001). In unserem Modell konnte gezeigt werden, dass es zu einer verstärkten Zellproliferation im Lebergewebe der WD-gefütterten Mäuse nach 70% PHx kam. Aufgrund dessen wurde eine Bestimmung des ATP-Gehalts im Lebergewebe von SD- und WD-Tieren bevor, sowie an den Tagen 1, 2 und 7 nach der Leberteilresektion durchgeführt.

### 3 Ergebnisse



**Abb. 43: ATP im Lebergewebe vor und nach 70% PHx.**

Bestimmung des ATP-Gehalts im Lebergewebe nach 6-wöchiger Fütterung einer SD oder WD. Dargestellt ist der ATP-Gehalt im Lebergewebe als RLU (*relative light units*) pro mg Lebergewebe (Mittelwert  $\pm$  SEM; SD prä-OP n = 12, WD prä-OP n = 16; SD PHx+ n = 4 und WD PHx+ n = 6 Tiere pro Gruppe).

Die Bestimmung des ATP-Gehalts im Lebergewebe von SD- und WD-gefütterten Tieren konnte vor dem operativen Eingriff und an den Tagen PHx+1 und PHx+2 keine Unterschiede zwischen den beiden Fütterungsgruppen aufzeigen. An PHx+7 war der ATP-Gehalt im Lebergewebe der WD-Gruppe geringer als in der SD-Gruppe (Abb. 43).

### 4. Diskussion

#### 4.1. Hintergründe und Zusammenhänge

Die erhöhte Prävalenz der NAFLD und des metabolischen Syndroms, charakterisiert durch das Vorhandensein von Übergewicht, Insulinresistenz, *Diabetes mellitus* Typ 2, erhöhten Blutfettwerten und Hypertonie, ist in vielen medizinischen Bereichen relevant und stellt heutzutage ein stetig wachsendes Problem dar (Clark *et al.* 2002; Li, Clark, *et al.* 2002; Boden 2011). Diese Erkrankungen entwickeln sich aus einem Lebensstil, der durch eine Fehl- oder Überernährung und Bewegungsmangel gekennzeichnet ist und betreffen einen großen Anteil der in Industriestaaten lebenden Bevölkerung (Kopelman 2000). Vor Allem eine kohlenhydrat- und fettreiche Ernährung hat die Zunahme des Körperfettanteils zur Folge. Erhöhte Glukose-, Insulin- und FFA-Serum-Spiegel können die Ausbildung von Insulinresistenz und *Diabetes mellitus* Typ 2 sowie die weitere Freisetzung von FFA, Triglyzeriden und Zytokinen aus dem viszeralem Fettgewebe begünstigen, dadurch die Einlagerung von Fettvakuolen im Lebergewebe und die Progression der NAFLD und daraus entstehende Zell- und Gewebeschädigungen fördern (Canbay *et al.* 2007; Artwohl *et al.* 2009; Marra & Bertolani 2009; Haus *et al.* 2010; de Meijer *et al.* 2010; Bechmann *et al.* 2011; Rhee *et al.* 2011). Bei NAFLD- und NASH-Patienten kommt es aus bisher nicht aufgeklärten Gründen sehr häufig zur verstärkten Sekretion von Adipokinen und Zytokinen wie TNF- $\alpha$  und IL-6 aus dem viszeralem Fettgewebe (Aleffi *et al.* 2005; Marra & Bertolani 2009). In Maus- und Zellkultur-Modellen wurde beobachtet, dass bedingt durch erhöhte FFA die Expression von DR im Lebergewebe und die Ausschüttung von Death-Liganden erhöht war und es dadurch zu einem verstärkten Zelltod kommen kann (Feldstein *et al.* 2003; Feldstein *et al.* 2004; Bechmann *et al.* 2010). Die Sekretion verschiedener Zytokine, Chemokine, FFA und Death-Liganden können zellulären Stress auslösen und die Progression der vorhandenen Morbiditäten weiter fördern (Hotamisligil 2006; Park *et al.* 2010).

FFA können einen Effekt auf den gesamten Stoffwechsel und speziell auf die Leber haben. Es gibt verschiedene Formen von FFA, die durch die Nahrung aufgenommen und metabolisiert werden oder während der *de-novo*-Lipogenese als Haupt- oder Zwischenprodukte entstehen (Nguyen *et al.* 2008). Die Kombination und chemische Beschaffenheit der verschiedenen Fettsäuren und deren Qualität in der Ernährung

## 4 Diskussion

können sich auf unterschiedliche Weise auf den gesamten Organismus auswirken. Besonders bei der Unterscheidung von gesättigten und ungesättigten Fettsäuren werden die unterschiedlichen Wirkmechanismen deutlich. In Zellkultur-Modellen haben gesättigte Fettsäuren hauptsächlich eine toxische Wirkung, einfach ungesättigte Fettsäuren sind dagegen nicht-toxisch und können sogar protektiv wirken (Nolan & Larter 2009; Rhee *et al.* 2011). In Untersuchungen mit verschiedenen Hepatom-Zelllinien konnte gezeigt werden, dass z. B. die Ölsäure die Entstehung einer Steatose vermehrt fördern kann und die Palmitoleinsäure vermehrt Zellschäden herbeifügen kann (Ricchi *et al.* 2009).

Die verstärkte Akkumulation von FFA und Triglyzeriden hat zur Folge, dass verschiedene Moleküle, die den Transport und Abbau von FFA regulieren, wie z. B. FATP, in diesen Vorgang involviert und deren Expression und Aktivierung verstärkt werden. So zeigten sich z. B. in NAFLD- und NASH-Patienten erhöhte Expressions-Level von FATP (Greco *et al.* 2008; Bechmann *et al.* 2010).

Die steigende Prävalenz der NAFLD hat des Weiteren zur Folge, dass die Verfügbarkeit von Spenderorganen reduziert wird. Organe, die eine Steatose von mehr als 30% aufweisen stellen bereits ein erhöhtes Risiko für die Transplantation oder für eine Leber-Lebendspende dar und werden unter bestimmten Umständen für eine Transplantation abgelehnt (Selzner & Clavien 2001; Angulo 2006). Hier kommt es vermehrt zu post-operativen Komplikationen, wie z. B. einer erhöhten Morbidität oder dem erhöhten Risiko eines Organversagens durch Ischämie- oder Reperfusionsschäden sowohl auf Seiten des Empfängers als auch, im Fall einer Lebendspende, auf Seiten des Spenders (de Rougemont *et al.* 2009; de Rougemont *et al.* 2010). In verschiedenen Tier-Modellen konnte des Weiteren gezeigt werden, dass die Leberregeneration nach einer Teilresektion in verschiedenen Diät-induzierten oder genetisch-modifizierten Steatose-Modellen eingeschränkt war (Zhang *et al.* 1999; Newberry *et al.* 2008; Nguyen *et al.* 2011).

Die Rolle von steatotischen Organen in der Lebertransplantation und der Leberregeneration innerhalb der Leber-Lebendspende wird weiterhin untersucht, um den verfügbaren Organ-Pool erweitern zu können. Einige Autoren vertreten die Meinung, dass die Verfettung eines Organs nicht der Hauptgrund für Komplikationen innerhalb der Transplantation oder Regeneration nach einer Teilspende steatotischer

## 4 Diskussion

Organe ist (Fishbein *et al.* 1997; Busuttil & Tanaka 2003; Cho *et al.* 2005; Cho *et al.* 2006; Clavien *et al.* 2010; McCormack *et al.* 2010). Die genauen Mechanismen, die die Risiken begünstigen sowie die Rolle von FATP, DR und der Zusammenhang von Zellschädigung und Zelltod bei der Regeneration steatotischer Lebern müssen allerdings weiter untersucht werden.

Ziel dieser Arbeit war es daher, die Zusammenhänge der Expression von DR und FATP sowie die Mechanismen der Apoptose und Leberzellschädigung in steatotischen Modellen näher zu untersuchen. Um die Mechanismen der Leberregeneration bei einer bestehenden NAFLD näher zu untersuchen, wurde in dem hier beschriebenen Maus-Modell eine 70% PHx durchgeführt.

### **4.2. Experimentelle Modelle und Methoden**

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene experimentelle Modelle ausgewählt. Zunächst wurde die Wirkung von FFA auf die Expression von FATP und DR in primären humanen Hepatozyten näher untersucht. Hierbei handelt es sich um ein Modell, welches die zellulären Funktionen im humanen System möglichst unverändert abbilden sollte. Aus der Literatur ist bekannt, dass verschiedene Hepatom-Zelllinien eine erhöhte Lipotoxizität verbunden mit einer erhöhten DR-Expression und Sensitivität gegenüber der DR-vermittelten Apoptose aufwiesen (Feldstein *et al.* 2004; Malhi *et al.* 2006; Malhi *et al.* 2007). Bei der Verwendung von Hepatom-Zelllinien ist zu berücksichtigen, dass es sich um immortalisierte Tumorzellen handelt, die in unterschiedlichem Umfang genetische Mutationen aufweisen. Das Material, aus dem die Zellen präpariert wurden stammte in den meisten Fällen von Teilresektionen zur Entfernung von Leberzelltumoren oder Lebermetastasen anderer Primärtumoren und obwohl augenscheinlich gesundes Gewebe verwendet wurde, konnten eventuelle Einflüsse der Grunderkrankungen des Patienten und der eventuell voran gegangenen medikamentösen Therapie bei den Primärzellen nicht ganz ausgeschlossen werden. Allerdings wurden in diesem Modell mit humanen Primärzellen trotz variabler Patienten-Äthiologien bei den Messungen geringe Standardabweichungen erzielt, was auf eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse hindeutet.

## 4 Diskussion

Die verwendete Fettsäure-Mischung und die entsprechenden Konzentrationen wurden aus vergleichbaren Arbeiten weitestgehend übernommen und an die primären humanen Hepatozyten angepasst (Feldstein *et al.* 2004; Malhi *et al.* 2007; Akazawa *et al.* 2010; Bechmann *et al.* 2010). Diese FFA-Kombination aus zwei Teilen Ölsäure, einer einfach ungesättigten Fettsäure, und einem Teil Palmitoleinsäure, einer gesättigten Fettsäure, beinhaltet die prominentesten Fettsäuren in der Nahrung und in zirkulierender Form im Serum und sollte eine Zusammensetzung der Ernährung mit z. B. einer WD reflektieren (Baylin *et al.* 2002; Nguyen *et al.* 2008; Charlton *et al.* 2011). Unter diesen Konditionen sollten die Zusammenhänge zwischen FATP- und DR-Expression, sowie die Lipotoxizität von FFA in humanen primären Hepatozyten untersucht werden, wie es auch bei NAFLD- und NASH-Patienten beobachtet wurde (Greco *et al.* 2008; Bechmann *et al.* 2010). Die Untersuchungen haben gezeigt, dass primäre humane Hepatozyten gegenüber einer FFA-Inkubation *in-vitro* nur im geringen Maße aktivierbar waren, grundlegende Zusammenhänge zwischen der Expression von FATP und DR nach FFA-Behandlung jedoch aufgezeigt werden konnten. Unter dieser Annahme wurde ein möglicher Apoptose-hemmender Mechanismus über das Molekül cFLAR mithilfe einer siRNA-Transfektion näher untersucht. Die Etablierung der siRNA-Transfektion war in diesem sensiblen und differenziellen System schwierig zu realisieren, da die Transfektion nicht immer effektiv und das Ergebnis der siRNA-vermittelten Genregulation nicht immer konstant gewährleistet werden konnte. Die Transfektion sollte in diesem Modell noch weiter optimiert werden um eine bezeichnende Aussage über den gewählten Mechanismus tätigen zu können. Dabei könnte der Einsatz anderer Transfektions-Reagenzien den Knockdown-Effekt positiv beeinflussen oder stabilisieren. Der Einsatz von Plasmid-Konstrukten, die in die Zellen transferiert werden und dann entweder kontinuierlich über einen konstitutiven Promotor oder nach entsprechender Induktion (z. B. pharmakologisch) siRNA oder shRNA direkt in den Zellen exprimieren, erscheint in diesem Modell als keine sinnvolle Methodik. Die Lebensdauer der primären Hepatozyten ist für diesen experimentellen Ansatz zu gering. Nach mehreren Tagen in Kultur können primäre Hepatozyten entweder de-differenzieren und in eine Art Ruhe-Zustand eintreten, wodurch Leber-spezifische Funktionen verloren gehen, oder die Zellen sterben können (Elaut *et al.* 2006; Chen, Kon, *et al.* 2007).

## 4 Diskussion

Die aus der Literatur und Erfahrungen aus dem gewählten Zellkultur-Modell sollten weitere Erkenntnisse über den Zusammenhang von FFA, FATP und DR in einem *in-vitro*-Modell liefern. Hier sollte außerdem die Rolle von FATP und DR bei der Leberregeneration in einem *in-vivo*-NAFLD-Modell untersucht werden. Es wurde bereits gezeigt, dass die Fütterung einer kohlenhydrat- und fettreichen Diät eine NAFLD induzieren kann (Carmiel-Haggai *et al.* 2005; Anstee & Goldin 2006; Ahmed *et al.* 2009; de Meijer *et al.* 2010). Aus der Literatur ist weiterhin bekannt, dass die Regenerationsfähigkeit der Leber in verschiedenen NAFLD-Modellen verringert war und die NAFLD ein Problem bei der Lebertransplantation darstellen kann (Selzner & Clavien 2001; Farrell *et al.* 2002; Newberry *et al.* 2008). Bei diesen Modellen handelt es sich hauptsächlich um genetisch modifizierte Modelle mit Störungen der Leptin-Regulation, zum Teil in Verbindung mit einer bestehenden Insulinresistenz oder Diabetes. Die Diät-induzierten NAFLD-Modelle wurden meist über mehrere Wochen oder sogar Monate mit diversen Diäten gefüttert und differenzierten sich in Ihrem Phänotyp deutlich von dem in dieser Arbeit beschriebenen Modell (Yang 2001; Leclercq *et al.* 2003; Yamauchi *et al.* 2003; Liao *et al.* 2004; Anstee & Goldin 2006; Ezaki *et al.* 2009; Tanoue *et al.* 2011). Das hier gewählte Modell unterschied sich durch den Schweregrad der NAFLD und den damit verbundenen Ko-Morbiditäten wie *Diabetes mellitus* Typ 2 und der Progression zur NASH durch verstärkte Entzündungen im Lebergewebe. Dieses Modell sollte Einblicke in den Regenerationsvorgang bei einer einfachen NAFLD ohne die Anwesenheit verschiedener schwerwiegender Ko-Morbiditäten liefern. Eine mögliche Entwicklung des *Diabetes mellitus* Typ 2 und der Insulinresistenz konnte in diesem Modell nicht vollkommen ausgeschlossen werden, es wurden lediglich durch einen ELISA die Serum-Faktoren gemessen, die typischerweise bei einer bestehenden Diabetes-Erkrankung verändert werden. Diese Messung hat jedoch gezeigt, dass durch die Ernährung die Ausschüttung dieser Moleküle bereits nach wenigen Wochen WD-Fütterung verändert wurde. Die Serum-Mengen von Glukose und Insulin, die bei der Diagnose von Diabetes und Insulinresistenz essenziell sind, konnten hier aufgrund zu geringer Mengen in den Serum-Proben nicht bestimmt werden. Bei den durchgeführten Analysen stand die Diagnose des Diabetes nicht unbedingt im Vordergrund, hier sollte vielmehr die Wirkung der veränderten Diät auf den gesamten Energie-Stoffwechsel und besonders auf den Leptin-Stoffwechsel gezeigt werden. Die



## 4 Diskussion

Messung dieser Parameter sollte den Vergleich des in dieser Arbeit beschriebenen Modells mit den bestehenden Nager-Modellen unterstützen.

Um die Mechanismen der Leberregeneration bei einer bestehenden NAFLD näher zu untersuchen wurde in dem hier beschriebenen Maus-Modell eine 70% PHx durchgeführt. Der Regenerationsprozess wurde in diesem Modell über einen relativ kurzen Zeitraum von maximal einer Woche beobachtet. Die Regenerationsdauer im murinen Modell ist im Vergleich mit der Regeneration der humanen Leber deutlich kürzer und ist nach ca. 7-10 Tagen abgeschlossen (Diehl 1991; Fausto *et al.* 1995). Der größte Teil der molekularen Mechanismen, wie z. B. die Aktivierung von Zytokinen geschieht bereits wenige Stunden nach der Resektion. In diesem Modell stand die Regeneration-abhängige Zellteilung unter Berücksichtigung der zuvor induzierten NAFLD im Vordergrund, die Zellproliferation beginnt jedoch erst ca. 24h nach der Teilresektion und erreicht einen Höhepunkt zwischen 48 und 72h (Fausto *et al.* 1995; Fausto 2000). Daher wurden diese Zeitpunkte sowie der Zeitpunkt 7 Tage nach der Resektion betrachtet und frühere bzw. spätere Zeitpunkte nicht berücksichtigt. Die Induktion und Intensität des Regenerationsprozesses ist abhängig vom Resektionsumfang, wobei nach einer 2/3 oder 70% Hepatektomie verglichen mit einer 30% PHx oder einer 90% PHx die Regeneration am stärksten induziert wird (Sowa *et al.* 2008; Li *et al.* 2009).

Die Ergebnisse in dieser Arbeit beziehen sich zum größten Teil auf die mRNA-Expression der untersuchten Faktoren, die durch eine quantitative Realtime PCR gemessen wurde. Western-Blots wurden hier lediglich für die Untersuchung der Erk-Aktivierung durchgeführt, die Expression von FATP, DR und Apoptose-assoziierten Molekülen sowie regenerativer Faktoren wurde über die quantitative Realtime PCR bestimmt. Eine zusätzliche Quantifizierung der untersuchten Moleküle auf Protein-Ebene über Western-Blots oder ELISAs wurde hier nicht durchgeführt, da die posttranslationale Modifizierung für die meisten der gemessenen Faktoren nicht relevant war. Im Falle von IL-6 waren die mRNA-Mengen zu gering, besonders im Lebergewebe vor dem operativen Eingriff. Daher wurde dieses Zytokin und bestimmte weitere Faktoren (Zytokine und Chemokine) nicht mittels quantitativer Realtime PCR quantifiziert. Die Expression und Sekretion dieser Moleküle findet nicht ausschließlich im Lebergewebe, sondern z. B. auch im Fettgewebe statt und eine erhöhte IL-6-

## 4 Diskussion

mRNA-Expression im Lebergewebe bewirkt nicht unbedingt die Aktivierung von Downstream-Targets in diesen Zellen.

Die Auswahl der Gruppengröße, von 4 Tieren in der SD- und von 6 Tieren in der WD-Gruppe für die jeweiligen Zeitpunkte nach der OP, erschienen hier für die meisten Messungen ausreichend. Problematisch waren verschiedene Messungen im Serum, da die Tiere in unterschiedlichem Maße auf die Operation reagierten und sich hier teilweise erhebliche Varianzen ergaben.

Die Proliferation nach der Teilresektion sollte in diesem Modell noch detaillierter untersucht werden. Weitere Proliferationsmarker, spezifisch für unterschiedliche Stadien des Zellzyklus, sollten in kommenden Arbeiten in den beiden Gruppen nachgewiesen werden. Die immunhistochemische Färbung mit dem Proliferationsmarker PCNA wurde bei diesem Modell unter verschiedenen Bedingungen getestet, führte allerdings aufgrund von methodischen Problemen zu keinen zufrieden stellenden Ergebnissen. Hier könnte in zukünftigen Arbeiten neben der Quantifizierung der Zellproliferation die Mechanismen der Zellteilung, wie z. B. die Aktivierung von Cyclinen und Cyclin-abhängigen Kinasen näher untersucht werden. Es war nicht auszuschließen, dass zunächst die Proliferation der Zellen in der WD-Gruppe aktiviert wurde und es in Folge aus ungeklärten Gründen zu Störungen oder sogar zum Stillstand der Zellteilung kam.

Nach der OP erhielten die Tiere weiterhin die WD. Interessante Untersuchungsbedingungen für weiterführende Experimente beinhaltet die Fütterung der WD nach der OP einzustellen und diese Diät durch eine SD auszutauschen. Eventuell käme es hier zu einer „Entfettung“ des Lebergewebes nach der Teilresektion, so wie es an PHx+7 in der SD-Gruppe zu sehen war. Unter diesem Aspekt sollte die WD-Fütterung vor einem operativen Eingriff als Option zur Verstärkung der Leberregeneration nach Teilresektionen näher untersucht werden.

### **4.3. Auswirkungen einer FFA-Behandlung auf die Expression von FATP, DR und der Zytotoxizität in primären humanen Hepatozyten**

Zur Bestätigung eigener Vorarbeiten und Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen sollte im beschriebenen Primärzell-Modell untersucht werden, welchen Einfluss Fett auf Leberparenchymzellen hat. Die Expression verschiedener FATP wurde in der vorliegenden Arbeit in FFA-behandelten primären humanen Hepatozyten genauer untersucht. Durch die Behandlung mit FFA kam es zur verstärkten Akkumulation von Fettvakuolen innerhalb der Zellen und in Folge dessen zur Induktion der FABP-1-mRNA-Expression. Die Expression weiterer FATP wurde durch die Behandlung mit FFA nicht verändert, die CD36/FAT-Expression wurde sogar vermindert. Eine andere Arbeit konnte zeigen, dass die Aktivierung von CD36/FAT und FATP-5 durch erhöhte FFA und Triglyzeride parallel mit einer verstärkten DR-Aktivierung und zellulärer Apoptose verläuft (Bechmann *et al.* 2010). In dem untersuchten Modell kam es nicht zur erhöhten CD36/FAT-Expression, allerdings wurde nach FFA-Behandlung die Expression der DR CD95/Fas und TNFR1 verstärkt. Die FFA-Aufnahme wird durch verschiedene FATP realisiert, und in diesem Modell scheint CD36/FAT keine zentrale Rolle beim FFA-Transport zu spielen, da es in diesen Zellen nach FFA-Behandlung trotzdem zur erhöhten Aufnahme von FFA kam. In diesem Modell wurde die Expression von FABP-1 nach FFA-Behandlung erhöht, durch welche Mechanismen FFA die Expression von DR induzieren können, konnte bisher nicht aufgeklärt werden. Es wird allerdings vermutet, dass die chemische Zusammensetzung der FFA und zellulärer Stress, z. B. in Form von ROS oder durch verschiedene hormonell-regulierte Faktoren, für die Aktivierung von DR und die Zellschädigung verantwortlich sind (Sidoti-de Fraisse *et al.* 1998; Jaeschke *et al.* 2002; Milagro *et al.* 2006; Fruhwirth & Hermetter 2008; Cazanave & Gores 2010; Bechmann *et al.* 2011).

Verschiedene Arbeiten konnten zeigen, dass in FFA-behandelten Hepatom-Zelllinien eine verstärkte Apoptose-Induktion vor Allem durch eine erhöhte Expression und Stimulationsfähigkeit von CD95/Fas bestand (Feldstein *et al.* 2004; Malhi *et al.* 2007). Durch einen M30-ELISA konnte in Abschnitt 3.1.4 gezeigt werden, dass die Behandlung mit FFA die Apoptose in den primären humanen Hepatozyten trotz erhöhter CD95/Fas-Expression nicht verstärkt auslösen konnte. Nach der Stimulation mit dem CD95/Fas-Agonisten CH11 zeigte sich, dass die FFA-Behandlung die

## 4 Diskussion

CD95/Fas-induzierte Apoptose nicht verstärken konnte. Neben der Induktion von CD95/Fas kam es nach FFA-Inkubation des Weiteren zur Induktion der cFLAR-mRNA-Expression. Die pro-apoptotischen Faktoren PUMA und NOXA wurde nach der Behandlung mit FFA nicht induziert, wobei die NOXA-Expression nach FFA-Inkubation sogar vermindert wurde. Das anti-apoptotische Molekül cFLAR kann die CD95/Fas-induzierte Apoptose verhindern, indem es die Aktivierung von Caspase-8 blockiert (Kreuz *et al.* 2001; Chang *et al.* 2002). Dieser Mechanismus könnte im hier verwendeten Modell für die Unterdrückung der CD95/Fas-induzierten Apoptose verantwortlich gewesen sein. Nach der FFA-Behandlung wurde die Phosphorylierung der Stress-responsiven Kinase Erk erhöht. Dieser Effekt stand in Verbindung mit einer aktivierten cFLAR- und CD95/Fas-Expression. Die Stimulation von CD95/Fas kann heterogene Auswirkungen haben; neben der Induktion der Apoptose kann außerdem über cFLAR die Apoptose verhindert und die Zellproliferation angeregt werden. In diesem Fall verhindert cFLAR die Spaltung der Pro-Caspase 8 zur Caspase 8 und kann die Aktivierung pro-proliferativer Faktoren wie NFκB und Erk stimulieren. Dadurch wird die Induktion der Apoptose verhindert und die Zelle unter Umständen zur Proliferation angeregt (Kataoka *et al.* 2000; Hyer *et al.* 2006; Malhi *et al.* 2006). Die Hemmung der CD95/Fas-induzierten Apoptose könnte in diesem Modell eine Folge der erhöhten cFLAR-Expression sein. Durch die Verminderung der cFLAR-Expression mittels siRNA-Transfektion sollte diese Hypothese untersucht werden. Die mRNA-Expression von cFLAR konnte durch die Transfektion mit cFLAR-spezifischer siRNA in den primären humanen Hepatozyten verringert werden, wobei die mRNA-Expression nicht vollständig unterdrückt werden konnte und der Effekt zeitlich begrenzt war. Nach Behandlung der cFLAR-Knockdown-Zellen mit FFA wurde die Expression der pro-apoptotischen Moleküle PUMA und NOXA, wie auch zuvor ohne cFLAR-Knockdown, nicht aktiviert sondern verringert. Die Expression dieser beiden Moleküle steht mit dem anti-apoptotischen Molekül cFLAR in keiner direkten Verbindung. cFLAR kann die Induktion der Apoptose über den extrinsischen oder DR-induzierten Apoptose-Signalweg unterdrücken. Bei den meisten Zellarten, wie auch bei Hepatozyten, wird die Apoptose nicht allein durch die Stimulation von DR induziert. Bei diesen Zellen muss auch der intrinsische Apoptose-Signalweg durch die Ausschüttung von Cytochrom C aus den Mitochondrien und die Aktivierung weiterer Effektor-Caspasen stimuliert werden (Schuler & Green 2001; Shiraishi *et al.* 2006; Eberle *et al.* 2007). Die Induktion der Moleküle PUMA und NOXA ist nicht in den extrinsischen Apoptose-

## 4 Diskussion

Signalweg involviert, sondern spielt beim mitochondrialen bzw. intrinsischen Apoptose-Weg über die Moleküle der Bcl-2-Familie eine Rolle (Chao & Korsmeyer 1998; Li *et al.* 2006). Bei der FFA-induzierten Apoptose scheinen die Moleküle PUMA und NOXA nicht direkt beteiligt zu sein. Die Expression der DR TNFR1 und CD95/Fas wurde in den cFLAR-Knockdown-Zellen nach 48h FFA-Behandlung herunter reguliert. Es war zu erwarten, dass durch die Verminderung des anti-apoptotischen Moleküls cFLAR die Expression der DR und der pro-apoptotischen Moleküle PUMA und NOXA vermehrt wird; ein gegenteiliger Effekt trat jedoch ein. Über die Zusammenhänge der erhöhten DR- und cFLAR-Expression nach FFA-Behandlung kann nach den durchgeführten Experimenten noch keine genaue Aussage getroffen werden. Die Gen-Regulation durch eine siRNA-Transfektion in einem Primärzell-Modell ist aufgrund verschiedener Faktoren relativ kompliziert. Obwohl die Gen-Regulation über die Messung unterschiedlicher Housekeeping-Gene überprüft wurde, waren die Ergebnisse des siRNA-vermittelten mRNA-Knockdowns nicht beständig und die Transfektion nicht immer im gleichen Maße effektiv. Um eine genaue Aussage über die Zusammenhänge von cFLAR, Apoptose-Induktion und DR-Stimulation treffen zu können, müsste der siRNA-vermittelte Knockdown der cFLAR-Expression noch weiter optimiert und stabilisiert werden.

Wie zu erwarten war, kam es in den FFA-behandelten primären humanen Hepatozyten zur Induktion der DR-Expression, diese war allerdings nicht mit einer erhöhten Apoptose-Sensitivität der Zellen verbunden. Des Weiteren kam es nach FFA-Inkubation zur Akkumulation von Fettvakuolen in den Zellen und zu einer aktivierten Expression des Fettsäuretransportproteins FABP-1. Die beschriebenen Experimente mit primären humanen Hepatozyten haben gezeigt, dass die Behandlung mit FFA für 24-96h die Expression von FABP-1, TNFR1 und CD95/Fas erhöhen konnte, die Behandlung allerdings keinen zytotoxischen Effekt hatte. Welche genauen Mechanismen die Schädigung der Zellen verhinderten, konnte durch die durchgeführten Experimente nicht aufgeklärt werden. In diesem Zusammenhang wird allerdings dem anti-apoptotischen Molekül cFLAR eine mögliche Rolle zugewiesen.

### 4.4. Leberregeneration im NAFLD-Mausmodell

Die oben beschriebenen Merkmale des metabolischen Syndroms sollten in einem Maus-Modell simuliert werden und im Anschluss die Mechanismen der Regeneration bei einer bestehenden NAFLD näher beschrieben werden. In dem untersuchten Maus-Modell wurde durch die 6-wöchige Verabreichung einer kohlenhydrat- und fettreichen Ernährung (WD) eine NAFLD induziert, was durch erhöhte FFA im Serum, erhöhte Triglyzerid-Mengen und Fetteinlagerungen im Lebergewebe gekennzeichnet war. Aus der erhöhten Fett-Akkumulation resultierte die Induktion von Fabp-1 und Fatp-5. Die Fütterung der WD für 6 Wochen ging mit einer Aktivierung von Cd95/Fas und Tnfr1, der pro-apoptotischen Moleküle Puma und Noxa, der anti-apoptotischen Faktoren Bcl-2, Bcl-xl und Mcl-1 sowie der Autophagie-assoziierten Gene Atg-5, Atg-7 und Beclin-1 einher, was allerdings den hepatischen Zelltod nicht erhöhte. Bei der Begutachtung der Histologien konnten keine Inflammationsherde beobachtet werden und im Serum wurden keine erhöhten Inflammationsmarker gemessen. Die Messung von Diabetes-assoziierten Faktoren deutete nicht auf die Entwicklung eines Diabetes oder metabolischen Syndroms hin.

Nachdem die oben beschriebenen Effekte im WD-Modell auftraten, sollte der Einfluss der WD auf die Leberregeneration nach einer 70% Leberteilesektion untersucht werden. Die Akkumulation von Fetten spielt im Regenerationsprozess eine wichtige Rolle, diese können jedoch in ihrem Wirkungs-Spektrum sehr weitreichend agieren. Viele Arbeiten haben gezeigt, dass Fettsäuren sowohl eine schädigende Wirkung in verschiedenen Zellkultur- und Maus-Modellen haben können, aber bestimmte Fettsäuren allein auch einen Zell-protectiven Effekt haben können. Ein schädigendes Potenzial zeigte sich in den meisten Modellen durch eine erhöhte Vulnerabilität gegenüber der Cd95/Fas-induzierten Apoptose. Es konnte gezeigt werden, dass Steatose in Zellkultur-Modellen aber auch im Maus-Modell die Cd95/Fas-induzierte Apoptose verstärkte (Feldstein *et al.* 2003; Siebler *et al.* 2007). In dem in dieser Arbeit beschriebenen Maus-Modell kam es nach 6-wöchiger WD-Fütterung zu einer erhöhten Expression von Cd95/Fas und Tnfr1, was auf eine verstärkte Apoptose-Vulnerabilität durch die Behandlung mit Fetten hindeutet. Die Stimulation von DR ist allerdings auch für den Regenerationsprozess essenziell. Studien mit TNF-Rezeptor-Knockout-Mäusen haben gezeigt, dass die Expression und Aktivierung von Tnfr1 für die

## 4 Diskussion

Leberregeneration nach massiven Zellverlusten gewährleistet sein muss. In diesen Modellen wurde durch die Stimulation des Tnfr1 die Aktivierung von NFκB und STAT3 unterdrückt und somit die Leberregeneration verhindert (Yamada *et al.* 1998; Yamada & Fausto 1998).

Die Fütterung der fettreichen WD führte im Lebergewebe außerdem zur Induktion von Puma und Noxa, die durch die Bindung an anti-apoptotische Moleküle der Bcl-2-Familie die Induktion der Apoptose über die Permeabilisierung der Mitochondrien-Membran fördern (Chao & Korsmeyer 1998). Im Gegenzug kam es durch die WD-Fütterung zu einer erhöhten mRNA-Expression anti-apoptotischer Faktoren der Bcl-2-Familie wie Bcl-2 und Bcl-xl. Die Autophagie-assoziierten Moleküle Atg5, Atg7 und Beclin1 zeigten ebenfalls eine Induktion im Lebergewebe der WD-gefütterten Tiere. Die erhöhte Expression dieser Moleküle weist nicht zwingend auf eine verstärkte Induktion der Autophagie hin. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Spaltung des Autophagie-Markers LC3 in einem Western-Blot mit dem Antikörper LC3B (D11)XP™ Rabbit mAB von Cell Signaling (#3868) sowie die Struktur verschiedener Zellorganellen im Raster-Elektornenmikroskop untersucht (Daten nicht gezeigt). Beide Methoden wiesen nicht auf die Induktion der Autophagie im Lebergewebe von SD- und WD-gefütterten Mäusen vor und nach der Operation hin. Autophagie ist nicht nur für die Degradation zellulärer Kompartimente nach Zellschädigungen oder in Hungerphasen zuständig sondern spielt außerdem eine entscheidende regulative Rolle innerhalb des Lipid-Metabolismus (Singh *et al.* 2009; Czaja 2010).

Obwohl verschiedene pro- und anti-apoptotische Faktoren und Autophagie relevante Moleküle durch die WD stimuliert wurden, kam es nicht zu einer erhöhten Zelltod-Rate im Lebergewebe vor und nach der OP. Die Anzahl an TUNEL-positiven Zellen im Lebergewebe war in beiden Fütterungsgruppen vor und nach dem operativen Eingriff unverändert. Zwar kam es nach 70% PHx zu einer erhöhten Zelltod-Rate, diese unterschied sich allerdings beim Vergleich der SD- und WD-Gruppe nicht voneinander. In dem beschriebenen Modell könnte dies durch die Gegenregulation der beschriebenen pro- und anti-apoptotischen Moleküle erklärt werden. In dem zuvor beschriebenen Zellkultur-Modell wurde dem anti-apoptotischen Molekül cFLAR eine potenzielle Hauptrolle der Apoptose-Hemmung zugesprochen. Die mRNA-Expression dieses Moleküls zeigte in dem WD-Maus-Modell jedoch keine Veränderungen.

## 4 Diskussion

Während der Regeneration findet eine Interaktion zwischen Cd95/Fas und der Aktivierung anti-apoptotischer Moleküle der Bcl-2-Familie statt, die für das Voranschreiten des Regenerationsprozesses von großer Bedeutung ist (Taira *et al.* 2001). Die Stimulation von DR kann neben der Apoptose auch Mechanismen der Zelldifferenzierung und der Regeneration auslösen (Budd 2002; Chen & Goeddel 2002). Die Bindung des Fas-Liganden an CD95/Fas, von TNF- $\alpha$  an den TNFR1 oder von TRAIL an die entsprechenden TRAIL-Rezeptoren führt zur Oligomerisierung des Rezeptors und rekrutiert das Adaptermolekül FADD zur Todesdomäne des Rezeptors. Die Bildung dieses Komplexes kann die Caspase-Kaskade aktivieren und über die Stimulation der Ausschüttung von Cytochrom C aus den Mitochondrien die Apoptose auslösen. In diesem Mechanismus können verschiedene Moleküle die Apoptose verhindern und das Überleben der Zelle bewirken oder die Zellproliferation anregen. In diesen Signalweg kann cFLAR sehr früh eingreifen und die Aktivierung der Caspase 8 verhindern oder weitere anti-apoptotische Faktoren aktivieren. Hierzu zählen z. B. Bcl-2, Bcl-xl und Mcl-1, die den mitochondrialen Cytochrom C-Ausstrom verhindern und die Aktivierung von Caspasen unterbinden können (Kroemer 1997; Chao & Korsmeyer 1998; Werneburg *et al.* 2007). Besonders nach Leberteilresektionen scheinen Mitglieder der Bcl-2-Familie eine essentielle Rolle bei der Minderung der Apoptose zu spielen (Tzung *et al.* 1997; Kamimukai *et al.* 2001). In dem hier verwendeten Modell zeigte sich sowohl vor 70% PHx als auch 24h danach eine verstärkte Expression von Bcl-2, Bcl-xl und Mcl-1 in den WD-gefütterten Tieren. In der SD-Gruppe wurde nach der Leberteilresektion die Expression dieser Moleküle induziert, allerdings war der Effekt in den WD-Tieren stets höher als in der SD-Gruppe. Hier scheinen erhöhte Serum-FFA sowie erhöhte Leber-Triglyzeride keinen verstärkten Zellschaden oder Zelltod trotz erhöhter Expression von Cd95/Fas, Tnfr1, Puma und Noxa zur Folge zu haben, was auf die parallel erhöhte Expression anti-apoptotischer Moleküle zurückzuführen sein kann.

Die Rolle von FATP bei Zellschädigung und Apoptose in der Regeneration steatotischer Lebern wurde bisher nicht untersucht. Es ist allerdings bekannt, dass FFA und Triglyzeride im Prozess der Leberregeneration essentiell sind und die Fettakkumulation obligatorisch nach einer Leberteilresektion auftritt (Tijburg *et al.* 1991; Rao *et al.* 2001; Farrell 2004). In verschiedenen FATP-Knockout-Modellen konnte gezeigt werden, dass es zu einer gestörten Leberregeneration in diesen



## 4 Diskussion

Modellen kam. So zeigten z. B. Caveolin-1-Knockout-Mäuse eine verminderte Regeneration und erhöhte Mortalität nach einer Leberteilresektion in Verbindung mit einer defektiven Akkumulation von Lipiden im Lebergewebe (Fernández *et al.* 2006). Verschiedene Autoren postulieren, dass die hepatozelluläre Fettakkumulation bei der Leberregeneration von großer Bedeutung ist und die Blockade der hepatischen Fetteinlagerung die Leberregeneration unterbindet (Farrell 2004; Shteyer *et al.* 2004; Brasaemle 2006; Gazit *et al.* 2010). Diese Tatsache ist jedoch im Zusammenhang mit metabolischen Störungen wie der NAFLD, NASH und dem metabolischen Syndrom umstritten und in verschiedenen Diät-induzierten oder genetisch-manipulierten Nagetier-Modellen mit einer gestörten Leberregeneration assoziiert (Zhang *et al.* 1999; Yamauchi *et al.* 2003; Veteläinen, van Vliet, *et al.* 2007; Newberry *et al.* 2008; Tanoue *et al.* 2011).

Die Verabreichung Methionin-Cholin-defizienter Diäten (MCD) führte bereits nach wenigen Wochen zur Ausbildung einer makrovesikulären NAFLD, fördert Entzündungsprozesse im Gewebe und führt rasch zur Ausbildung einer NASH oder Fibrose und beeinträchtigte die Leberregeneration nach partiellen Hepatektomien in Ratten (Anstee & Goldin 2006; Veteläinen, Bennink, *et al.* 2007; Veteläinen, van Vliet, *et al.* 2007). Der Mechanismus der MCD-induzierten Steatose beruht allerdings auf Störungen im Abbau und Export von Fetten aus den Zellen und geschieht nicht aufgrund eines Überangebots an Kalorien aus Fett und Kohlenhydraten, sondern durch einen Eiweiß-Mangel (Basaranoglu *et al.* 2010). Die verminderte Leberregeneration nach Teilresektionen in diesen Modellen wurde mit dem Aufkommen der Steatose in Verbindung mit erhöhten Entzündungsreaktionen und einer fortschreitenden Fibrosierung argumentiert. Der Grad einer bestehenden Steatose beeinflusst die Regenerationsfähigkeit des Gewebes deutlich. Eine milde mikrovesikuläre Steatose verfügt über ein höheres Regenerations-Potenzial als eine makrovesikuläre Steatose (Cho *et al.* 2006; Oleszczuk *et al.* 2007). MCD-Modelle weisen zumeist eine makrovesikuläre Leberverfettung mit ausgebildeten Fibrose-Herden auf, wobei die Verfettung in dem hier beschriebenen WD-Maus-Modell vorwiegend mikrovesikulär war. Eine Fibrosierung oder Entzündung war histologisch nicht zu beobachten. In diesem Modell zeigten sich nach 6-wöchiger WD geringfügig erhöhte AST- und ALT- Serum-Mengen und signifikant erhöhte LDH-Serum-Konzentrationen. Eine Erhöhung der Serum-Konzentration dieser Leber-spezifischen

## 4 Diskussion

Enzyme kann auf eine Schädigung der Leber hindeuten (Fernandez-Cruz *et al.* 1978; Panteghini 1990; Oh *et al.* 2006). Die Konzentration verschiedener Interleukine und pro-inflammatorischer Faktoren waren nach der Verabreichung der WD nicht verändert. Trotz leicht erhöhter Konzentrationen der Leberenzyme, waren somit auch systemisch keine Anzeichen für erhöhte Entzündungsherde im Lebergewebe zu finden.

Die Fütterung einer WD über 6 Wochen führte zwar zur Ausbildung einer deutlichen Fettlebererkrankung, hatte jedoch nach dieser kurzen Fütterungsperiode keinen bedeutenden Einfluss auf die Parameter, die für das metabolische Syndrom und im Besonderen für das Vorhandensein von *Diabetes mellitus* Typ 2 charakteristisch sind. Einige der Faktoren zeigten keine Veränderungen innerhalb der beiden Fütterungsgruppen, die Konzentrationen von Glukose und Insulin konnten aufgrund von zu geringen Serum-Ausbeuten nicht bestimmt werden. Die Serum-Konzentration des Peptidhormons Glukagon, das antagonistisch zu Insulin wirkt, war unverändert. Das gleiche Resultat ergab sich für die Bestimmung von GIP (**G**lukoseabhängiges insulinotropes **P**eptid) und Resistin. GIP stimuliert im Organismus die Ausschüttung von Insulin und kann somit die Progression von Adipositas und Insulinresistenz fördern (Zhou *et al.* 2005; Naitoh *et al.* 2008). Erhöhte Resistin-Spiegel im Blut können ebenfalls die Entstehung einer Insulinresistenz und Inflammationen begünstigen (Qatanani *et al.* 2009). Obwohl die Gabe der Diät nicht zu signifikanten Veränderungen führte, waren verschiedene Diabetes-assoziierte Faktoren bereits tendenziell verändert. Die WD-Gruppe zeigte nach 6 Wochen Fütterung einen Anstieg von PAI-1 (**P**lasminogen-**A**ktivator-**I**nhibitor **T**yp **1**). Dieser Gerinnungsfaktor wird vor allem bei Adipositas-Patienten und beim Vorliegen eines *Diabetes mellitus* Typ 2 verstärkt vom viszeralen Fettgewebe sezerniert und kann dabei die Bildung von Blutgerinnseln fördern (Jankun *et al.* 2012). Das Peptidhormon GLP-1 (**G**lucagon-**l**ike-**p**eptide **1**) fördert den Abbau von Glukose sowie die Freisetzung von Insulin und zeigte im WD-Mausmodell verminderte Serum-Mengen, was charakteristisch für Patienten mit *Diabetes mellitus* Typ 2 sein kann. Das appetitanregende Hormon Ghrelin weist bei Adipositas-Patienten aufgrund des Überangebots an Kalorien verringerte Serum-Konzentrationen auf (Florant & Healy 2011; Ladenheim 2012). Nach 6-wöchiger WD konnten verminderte Serum-Mengen dieses Hormons gemessen werden. Sehr deutlich war außerdem die Erhöhung der Leptin-Konzentration in der WD-Gruppe.

## 4 Diskussion

Leptin-Serum-Spiegel sind bei Adipositas-Patienten charakteristisch erhöht, welche Rolle Leptin im Regenerationsprozess hat, konnte bisher noch nicht aufgeklärt werden (Considine *et al.* 1996; Yannakoulia *et al.* 2003; Mantzoros *et al.* 2011).

Bei Arbeiten in genetisch veränderten Modellen mit verminderter Leberregeneration handelte es sich zumeist um Leptin-defiziente (*ob/ob*, *obese*) oder Leptin-Rezeptor-defiziente (*db/db*, *diabetes*) Maus- oder Ratten-Modelle (*Zucker Ratte*). Die *ob/ob*-Maus oder auch *obese*-Maus ist ein genetisches Modell, bei dem das Leptin-Gen oder auch Obese-Gen deletiert ist. Leptin ist ein Hormon, das vom Fettgewebe sezerniert wird und durch die Bindung an den Leptin-Rezeptor das Hungergefühl und damit die Nahrungsaufnahme steuern kann (Zhang *et al.* 1994). Die Mäuse entwickeln durch eine verstärkte Lipid-Synthese und Nahrungsaufnahme Übergewicht, *Diabetes mellitus* Typ 2, Insulinresistenz, erhöhte Blutfettwerte und Hypertonie und stellen damit ein Modell-System für das metabolische Syndrom dar. Als Folge dessen akkumulieren diese Tiere vermehrt Fettvakuolen im Lebergewebe (Anstee & Goldin 2006). Untersuchungen bezüglich der Leberregeneration nach Leberteilresektion oder toxischen Schädigungen haben gezeigt, dass der Regenerationsprozess nach Verlust der Leberzellmasse verringert war und die Tiere eine erhöhte Mortalität nach der OP aufwiesen (Leclercq *et al.* 2003; Leclercq *et al.* 2006). Leptin-Rezeptor-defiziente Nagemodelle, wie die *diabetes*- bzw. *db/db*-Maus oder die *Zucker-Ratte* weisen einen ähnlichen Phänotyp wie *ob/ob*-Mäuse auf. Diese Tiere können zwar das Adipokin Leptin bilden, aber die entsprechenden Rezeptoren sind hier nicht vorhanden und damit kommt es auch in diesem Modell zu einer verstärkten Nahrungsaufnahme mit den oben beschriebenen Folgeerkrankungen und der Ausbildung des metabolischen Syndroms. Auch in diesen Modellen zeigte sich eine verminderte Regeneration nach partieller Hepatektomie (Picard *et al.* 2002; Yamauchi *et al.* 2003; Uetsuka *et al.* 2005; Leclercq *et al.* 2006). Die Untersuchungen an Leptin- und Leptin-Rezeptor-defizienten Tieren konnten zeigen, dass der Leptin-abhängige Signalweg eine wichtige Rolle innerhalb der Leberregeneration spielt. Für die verminderte Regeneration in diesen Modell-Systemen ist nicht unbedingt die Akkumulation von Fettsäuren und Triglyzeriden, sondern Hormon-bedingte Faktoren wie die Insulin- oder auch die Leptin-Resistenz verantwortlich (Newberry *et al.* 2008; Gazit *et al.* 2010). Die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit konnten zeigen, dass die Fütterung der WD mit einer Erhöhung der Serum-Leptin-Konzentrationen und einer verstärkten

## 4 Diskussion

Zellproliferation nach 70% PHx einherging. Das Hormon Leptin kann neben der Steuerung der Nahrungsaufnahme außerdem die Zellproliferation anregen. In diesem Zusammenhang wird z. B. vermutet, dass Leptin eine pro-proliferative Rolle beim Fortschreiten verschiedener Karzinom-Arten spielt (Chen, Chang, *et al.* 2007). Hier können durch Leptin verschiedene pro-proliferative Mechanismen, wie z. B. die Aktivierung von Cyclinen oder die Aktivierung von STAT3 und Erk, stimuliert werden (Chen, Chang, *et al.* 2007; Catalano *et al.* 2004). In den beschriebenen Leptin- und Leptin-Rezeptor-defizienten Modellen zeigte sich eine gestörte Leberregeneration nach 70% PHx, allerdings wiesen diese Tier-Modelle schwerwiegende metabolische und endokrinologische Störungen und verstärkte Leberschäden wie Entzündungen im Gewebe oder Fibrose auf, was in dem hier untersuchten Maus-Modell nicht der Fall war. Die beschriebenen Modelle unterschieden sich von dem WD-Maus-Modell hauptsächlich dadurch, dass in den einen Modellen eine Leptin- oder Leptin-Rezeptor-Defizienz vorlag und in dem hier beschriebenen Modell das Serum-Leptin durch die Gabe der WD erhöht wurde. Ob allerdings erhöhte Leptin-Serum-Spiegel ein Grund für die verstärkte Proliferation der Leberzellen nach 70% PHx war muss durch weitere Untersuchungen verifiziert werden.

Wie zuvor beschrieben konnte mit verschiedenen FATP-Knockout-Modellen gezeigt werden, dass die Akkumulation von Fetten und Triglyzeriden für die Leberregeneration nach partieller Hepatektomie ein essentieller Schritt ist. Durch die Freisetzung von Fettsäuren und Triglyzeriden aus dem Fettgewebe werden dem Organismus nach einer Leberteileresektion Energie und Bausteine für neue Zellmembranen zur Verfügung gestellt (Farrell 2004; Thevananther 2010). Die Notwendigkeit der Fett-Akkumulation nach der Leberteileresektion zeigte sich dadurch, dass auch in der SD-Gruppe nach 70% PHx eine erhöhte Akkumulation von FFA im Serum sowie von Fett-Vakuolen im Lebergewebe auftrat. Die erhöhte Fett-Akkumulation nach der Teilresektion ging mit einer Erhöhung der FATP-Expression in beiden Fütterungs-Gruppen einher, wobei die Expression in den WD-Tieren deutlich stärker als in der SD-Gruppe war. Die erhöhte FATP-Expression ist anscheinend eine Folge der erhöhten FFA-Serum-Mengen und geschieht, um den Zellen die Aufnahme der Fette zu erleichtern, damit diese als Energie- und Bausteinquelle während der Regeneration genutzt werden können.

## 4 Diskussion

Neben einer erhöhten Expression von DR, pro- und anti-apoptotischer sowie Autophagie-assoziiierter Moleküle wurde die Expression der Regeneration-assoziierten Moleküle Hgf und dem Hgf-Rezeptor Met durch die WD-Fütterung aktiviert. Die Leberregeneration steht neben einer erhöhten Fettakkumulation in Verbindung mit einer verstärkten Ausschüttung von Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren. Hier spielen vor Allem die Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-6 sowie die Wachstumsfaktoren HGF, TGF $\alpha$  und HB-EGF eine entscheidende Rolle (Debonera *et al.* 2001; Taub 2003; Huh *et al.* 2004; Mitchell *et al.* 2005; Fausto *et al.* 2006). Es war zu vermuten, dass das Bestehen einer NAFLD mit erhöhten Serum-Mengen an IL-6 und TNF- $\alpha$  in den WD-gefütterten Mäusen einhergeht (Tilg 2010). Die Konzentrationen verschiedener Interleukine zeigten allerdings nach Fütterung der WD keine deutlichen Unterschiede zwischen den beiden Fütterungsgruppen und im steatotischen Lebergewebe waren trotz starker Fetteinlagerungen und erhöhter DR-Expression keine Entzündungsherde zu erkennen. Nach der OP stieg der IL-6-Serum-Spiegel zwar an, es zeigten sich aber zwischen den beiden Gruppen keine Unterschiede.

Die verstärkte Zellproliferation in der WD-Gruppe wurde nach 70% PHx von einer erhöhten Hgf- und Met-Expression begleitet, wobei Hgf in der WD-Gruppe stärker exprimiert wurde. Aus der Literatur ist bekannt, dass der Hgf/Met-Signalweg für die Leberregeneration nach Teilresektionen oder massivem Zellverlust durch toxische Einflüsse essentiell ist (Matsumoto & Nakamura 1992; Borowiak *et al.* 2004; Huh *et al.* 2004; Jin *et al.* 2010). Die erhöhte Zellproliferation im Lebergewebe der WD-gefütterten Mäuse ist möglicherweise eine Folge der Überexpression des Proliferationsfördernden Moleküles Hgf sowie der anti-apoptotischen Moleküle Bcl-2, Bcl-xl und Mcl-1 und der DR Cd95/Fas und Tnfr1 sein. Bei Stimulation von Cd95/Fas und Tnfr1 können neben der Apoptose außerdem die Aktivierung von STAT3, NF $\kappa$ B und Erk anregen und damit die Zellproliferation stimulieren (Kirillova *et al.* 1999; Debonera *et al.* 2001; Li, Liang, *et al.* 2002).

Die Aktivierung der Stress-responsiven Kinase Erk wurde in diesem Modell untersucht, und es konnte gezeigt werden, dass es nach dem operativen Eingriff zu Veränderungen innerhalb der Erk-Aktivierung in den beiden Fütterungsgruppen kam. Vor dem operativen Eingriff zeigte sich, dass Erk im Lebergewebe der SD-Tiere im phosphorylierten und damit aktivierten Zustand detektierbar war. Nach der

## 4 Diskussion

Leberteilresektion kam es in den SD-Mäusen an PHx+1 und PHx+2 zu einem Verlust der Erk-Phosphorylierung. Bei den WD-Tieren zeigte sich, dass bei einem Großteil der Tiere vor der OP Erk im un-phosphorylierten Zustand detektierbar war und die Phosphorylierung von Erk nach der Leberteilresektion an PHx+1 und PHx+2 anstieg. Die Kinase Erk kann durch verschiedene Stress-Faktoren wie Zytokine und Hormone oder auch über die Stimulation von DR aktiviert werden, wodurch Erk an verschiedenen Threonin- und Tyrosin-Resten phosphoryliert und dadurch in einen aktivierten Zustand überführt wird. Durch die Stimulation von TNFR1 oder CD95/Fas kann Erk z. B. über cFLAR aktiviert werden und statt der Apoptose auch das Überleben der Zelle oder die Zell-Proliferation anregen (Kataoka *et al.* 2000; Chen & Goeddel 2002; Thoresen *et al.* 2003). Die Progression des Zell-Zyklus und regenerativer Mechanismen können über Erk reguliert werden, indem die Apoptose verhindert und die DNA-Replikation stimuliert wird (Talarmin *et al.* 1999). Die pro-regenerative Erk-Phosphorylierung wird vor Allem downstream des Hgf/Met-Signalweges oder durch das Adipokin Leptin reguliert (Nakamura 1994; Ogura *et al.* 2001; Borowiak *et al.* 2004; Catalano *et al.* 2004; Huh *et al.* 2004; Saxena *et al.* 2007; Liu *et al.* 2011). In dem hier untersuchten Modell konnte beobachtet werden, dass durch die WD der Wachstumsfaktor Hgf und das Hormon Leptin vor und nach der Operation aktiviert wurden und parallel hierzu die Stress-responsive Kinase Erk in der WD-Gruppe nach der OP verstärkt phosphoryliert wurde. Die Aktivierung dieser Faktoren durch die Fütterung der WD stellt einen potenziellen Mechanismus für die erhöhte Zellproliferation in diesem Modell dar. Die Phosphorylierung von Stress-Kinasen wie p38 und Erk ist ein Energie-abhängiger Prozess, der in der frühen Phase der Leberregeneration nach einer Teilresektion zunächst in der G<sub>1</sub>-Phase gehemmt wird (Talarmin *et al.* 1999; Campbell *et al.* 2011). Die benötigte Energie zur Phosphorylierung verschiedener Moleküle und zur Regulation zellulärer Mechanismen wie der Zellproliferation oder der Apoptose wird durch ATP bereitgestellt (Nakatani *et al.* 1981; Ferrari *et al.* 1997; Ferrari *et al.* 1998). Eine Arbeit konnte zeigen, dass bei der Leberregeneration in *ob/ob*-Mäusen die Regulation von JNK, Akt und Erk in Folge reduzierter ATP-Mengen gestört war (Yang 2001). In dem hier beschriebenen WD-induzierten NAFLD-Modell kam es allerdings nach 6-wöchiger Fütterung der WD vor und nach 70% PHx nicht zu depletierten ATP-Mengen im steatotischen Lebergewebe. Aufgrund der hohen Fett-Akkumulation im Lebergewebe der WD-Tiere wurden hier veränderte ATP-Konzentrationen erwartet. Die Fütterung der beiden Diäten hatte

keinen Einfluss auf die ATP-Mengen in der Leber. Die Mechanismen der Energie-Gewinnung nach einer PHx und ob die Akkumulation von Triglyzeriden und Fettsäuren im Lebergewebe überhaupt eine Rolle spielt, konnte bisher nicht aufgeklärt werden und bedarf weiterer Untersuchungen. In dem hier gezeigten Modell hatte die Verfettung des Lebergewebes keinen negativen Einfluss auf die hepatozellulären ATP-Konzentrationen und spielt somit keine bedeutende Rolle in der Regulierung ATP-abhängiger Mechanismen.

### **4.4 Ausblick**

Die Lebertransplantation stellt für viele verschiedene Leber-Erkrankungen die einzige therapeutische Option dar. Die Verfügbarkeit von passenden Spenderorganen und die Bereitschaft zur Organspende schwinden heutzutage allerdings immer weiter. Die fortschreitende Entwicklung der Leber-Lebendspende wird in diesem Zusammenhang auch in Zukunft für die Erweiterung der Organverfügbarkeit eine wichtige Rolle spielen. Die Transplantation und Teiltransplantation erkrankter Organe ist für den Empfänger und im Fall einer Lebendspende auch für den Spender mit hohen Risiken verbunden. Bei der immer weiter ansteigenden Inzidenz der NAFLD wird der Organ-Pool weiterhin verringert, da Organe mit einer Verfettung von mehr als 30% von der Transplantation weitestgehend ausgeschlossen werden. Die Mechanismen, die zu einem erhöhten Risiko des Organversagens oder postoperativer Komplikationen führen konnten bis heute nur unzureichend aufgeklärt werden. Das Problem wird auf die zytotoxische Wirkung von freien Fettsäuren, einer verstärkten Zirkulation von Zytokinen und einer erhöhten Expression und Sensitivität von Death Rezeptoren zurückgeführt. Allerdings ist die Ausschüttung von freien Fettsäuren und Triglyzeriden aus dem viszeralen Fettgewebe für die Leberregeneration essenziell. In welchem Maße freie Fettsäuren bei Lebertransplantationen Schäden verursachen können und ob eine leichte Verfettung sogar förderlich sein könnte, muss durch weitere Studien genauer untersucht werden.

Das hier beschriebene Modell einer milden Steatose konnte die Leberregeneration nach Leberteilresektionen verbessern, jedoch scheint hier der Grat zwischen einem förderndem und einem schädigendem Effekt der freien Fettsäuren sehr schmal zu

## 4 Diskussion

sein. Die bisher untersuchten NAFLD-Modelle zeigten im Zusammenhang mit der Leberregeneration eine gestörte Zellproliferation durch die Verfettung der Leber und parallel auftretender Ko-Morbiditäten des metabolischen Syndroms.

In welchem Ausmaß und über welche Mechanismen die Inzidenz der NAFLD die Leberregeneration fördern oder verringern kann bedarf weiterer Untersuchungen. In diesem Zusammenhang sollten die entscheidenden Mechanismen auch unter Berücksichtigung der verschiedenen Ko-Morbiditäten in Kombination mit der NAFLD detaillierter untersucht werden.



## 5. Zusammenfassung

Nicht-alkoholische Fettlebererkrankungen (NAFLD und NASH) treten in industrialisierten Ländern immer häufiger auf. Sie sind durch eine verstärkte Akkumulation von Lipid-Vakuolen in den Hepatozyten gekennzeichnet und oft mit einer erhöhten Expression von Death-Rezeptoren (DR) und Fettsäuretransportproteinen (FATP), einer gesteigerten Zelltod-Rate und Leberschädigung assoziiert. Der aktive Transport von freien Fettsäuren (FFA) durch verschiedene FATP steht im Verdacht, die Akkumulation von Fettsäuren und Triglyzeriden zu fördern und dadurch die Leberzellschädigung und eine erhöhte DR-induzierte Apoptose-Sensitivität zu begünstigen. Bei der Regeneration nach Leberschäden sind diese Mechanismen jedoch essentiell für die Proliferation der Hepatozyten. In der Leber akkumulierte Fette dienen als Energieträger und Membranbestandteile, und DR können Signalwege der Regeneration und Zell-Proliferation induzieren.

Nach Lebertransplantationen und der Regeneration nach Leberteilresektionen bzw. Leber-Lebendspenden stellt die NAFLD ein erhöhtes Risiko für post-operative Störungen dar, was eine Beteiligung von FATP und DR nahe legt. In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Expression von FATP, DR und Apoptose-steuernden Proteinen in steatotischen Hepatozyten sowie im Regenerationsprozess steatotischer Lebern untersucht.

Zunächst wurden in einem Zellkultur-Modell primäre humane Hepatozyten mit freien Fettsäuren (FFA) behandelt und in diesen die FATP-abhängigen Mechanismen der Fett-Aufnahme und der DR-abhängige Zelltod analysiert. Es wurde eine erhöhte Expression von FABP-1, CD95/Fas und TNFR1 beobachtet. Weitere FATP wie CD36/FAT, FATP-5 und Caveolin-1 zeigten keine erhöhte Expression. Auch nach Stimulation mit dem CD95/Fas-Agonisten CH11 trat jedoch keine vermehrte Apoptose auf, was vermutlich auf die Induktion des anti-apoptotischen Moleküls cFLAR nach FFA-Behandlung zurückzuführen war. Eine Apoptose-hemmende Wirkung durch cFLAR konnte nach einem siRNA-vermittelten cFLAR-Knockdown jedoch nicht bewiesen werden. Insgesamt verändert die Verfettung von Leberzellen

## 5 Zusammenfassung

die Expression von FATP und DR, hat jedoch keinen direkten Einfluss auf die Apoptose.

Als *in-vivo* NAFLD-Modell wurden C57Bl/6-Mäuse für 6 Wochen mit einer Western-Diät (WD) gefüttert und im Anschluss daran einer 70% Leberteilresektion (70% PHx) unterzogen. Die Auswirkungen einer kohlenhydrat- und fettreichen Diät sollten auf physiologischer und molekularer Ebene, sowie auf den Regenerations-Prozess nach 1, 2 und 7 Tagen in steatotischen Lebern untersucht werden. Die 6-wöchige Fütterung der WD führte zu erhöhten FFA-Mengen im Serum und zur Einlagerung von Fett-Vakuolen im Lebergewebe sowie zu gering erhöhten AST-, ALT- und LDH-Werten. Hinweise auf Entzündungen in der Leber, oder Diabetes wurden nicht beobachtet. Außerdem wies das Lebergewebe keine veränderte Zelltod-Rate auf. Durch die WD wurde die Expression der FATP Fabp-1, Fatp-5 und Cd36/Fat, der DR Cd95/Fas und Tnfr1, der pro-apoptotischen Moleküle Puma und Noxa, die anti-apoptotischen Faktoren Bcl-2, Bcl-xl und Mcl-1, der Autophagie-assoziierten Moleküle Atg5, Atg7 und Beclin-1 sowie des Wachstumsfaktors Hgf induziert.

Nach 70% PHx kam es zum Anstieg der FFA-Serum-Mengen sowie zur Akkumulation von Lipiden im Lebergewebe beider Fütterungsgruppen. Dies war mit einer erhöhten Aktivierung der FATP- und DR-Expression sowie mit einer erhöhten Expression von pro- und anti-apoptotischen Molekülen, Autophagie-assoziierten Molekülen sowie des Wachstumsfaktors Hgf verbunden, wobei der Effekt deutlicher in der WD-Gruppe war. Im Lebergewebe der WD-Tiere war nach 70% PHx eine höhere Anzahl an proliferierenden Zellen zu finden als in der SD-Gruppe. An den Tagen 1 und 2 nach 70% PHx war die Phosphorylierung von Erk gehemmt, in der WD-Gruppe wurde sie zu diesen Zeitpunkten aktiviert.

Die beschriebenen Daten erweitern die Einsichten über bekannte molekulare Mechanismen der Leberregeneration. Sie zeigen mögliche Ansatzpunkte für weiterführende Untersuchungen auf und eröffnen einen Beitrag zur Entwicklung neuer therapeutischer Vorgehensweisen zur verbesserten Regeneration steatotischer Organe nach Resektionen und Leber-Lebend-Spenden.

## 6. Literatur

- Abdelmalek, M.F. & Diehl, A.M., 2007. Nonalcoholic fatty liver disease as a complication of insulin resistance. *The Medical Clinics of North America*, 91(6), S.1125-1149, ix.
- Abumrad, N., Coburn, C. & Ibrahimi, A., 1999. Membrane proteins implicated in long-chain fatty acid uptake by mammalian cells: CD36, FATP and FABPm. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1441(1), S.4-13.
- Abumrad, N., Harmon, C. & Ibrahimi, A., 1998. Membrane transport of long-chain fatty acids: evidence for a facilitated process. *Journal of Lipid Research*, 39(12), S.2309-2318.
- Abumrad, N.A., Sfeir, Z., Connelly, M.A. & Coburn, C., 2000. Lipid transporters: membrane transport systems for cholesterol and fatty acids. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 3(4), S.255-262.
- Ahmed, U., Redgrave, T.G. & Oates, P.S., 2009. Effect of dietary fat to produce non-alcoholic fatty liver in the rat. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 24(8), S.1463-1471.
- Akazawa, Y., Cazanave, S., Mott, J.L., Elmi, N., Bronk, S.F., Kohno, S., Charlton, M.R. & Gores, G.J., 2010. Palmitoleate attenuates palmitate-induced Bim and PUMA up-regulation and hepatocyte lipoapoptosis. *Journal of Hepatology*, 52(4), S.586-593.
- Albanis, E. & Friedman, S.L., 2006. Antifibrotic agents for liver disease. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 6(1), S.12-19.
- Aleffi, S., Petrai, I., Bertolani, C., Parola, M., Colombatto, S., Novo, E., Vizzutti, F., Anania, F.A., Milani, S., Rombouts, K., Laffi, G., Pinzani, M. & Marra, F., 2005. Upregulation of proinflammatory and proangiogenic cytokines by leptin in human hepatic stellate cells. *Hepatology*, 42(6), S.1339-1348.
- de Almeida, I.T., Cortez-Pinto, H., Fidalgo, G., Rodrigues, D. & Camilo, M.E., 2002. Plasma total and free fatty acids composition in human non-alcoholic steatohepatitis. *Clinical Nutrition (Edinburgh, Scotland)*, 21(3), S.219-223.
- Angulo, P., 2006. Nonalcoholic fatty liver disease and liver transplantation. *Liver Transplantation: Official Publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*, 12(4), S.523-534.
- Anstee, Q.M. & Goldin, R.D., 2006. Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research. *International Journal of Experimental Pathology*, 87(1), S.1-16.

## 6 Literatur

- Arias, Boyer, Fausto, Jakoby, Schachter & Schafritz, 1994. *The Liver Biology and Pathobiology* 3. Aufl., Raven Press.
- Artwohl, M., Lindenmair, A., Roden, M., Waldhäusl, W.-K., Freudenthaler, A., Klosner, G., Ilhan, A., Luger, A. & Baumgartner-Parzer, S.M., 2009. Fatty acids induce apoptosis in human smooth muscle cells depending on chain length, saturation, and duration of exposure. *Atherosclerosis*, 202(2), S.351-362.
- Basaranoglu, M., Kayacetin, S., Yilmaz, N., Kayacetin, E., Tarcin, O. & Sonsuz, A., 2010. Understanding mechanisms of the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 16(18), S.2223-2226.
- Baylin, A., Kabagambe, E.K., Siles, X. & Campos, H., 2002. Adipose tissue biomarkers of fatty acid intake. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 76(4), S.750-757.
- Bechmann, L.P., Gieseler, R.K., Sowa, J.-P., Kahraman, A., Erhard, J., Wedemeyer, I., Emons, B., Jochum, C., Feldkamp, T., Gerken, G. & Canbay, A., 2010. Apoptosis is associated with CD36/fatty acid translocase upregulation in non-alcoholic steatohepatitis. *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver*, 30(6), S.850-859.
- Bechmann, L.P., Hannivoort, R.A., Gerken, G., Hotamisligil, G.S., Trauner, M. & Canbay, A., 2011. The Interaction of Hepatic Lipid and Glucose Metabolism in Liver Diseases. *Journal of Hepatology*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22173168> [Zugegriffen Dezember 21, 2011].
- Boden, G., 2011. Obesity, insulin resistance and free fatty acids. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes, and Obesity*, 18(2), S.139-143.
- Borowiak, M., Garratt, A.N., Wüstefeld, T., Strehle, M., Trautwein, C. & Birchmeier, C., 2004. Met provides essential signals for liver regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(29), S.10608-10613.
- Brasaemle, D.L., 2006. A Metabolic Push to Proliferate. *Science*, 313(5793), S.1581 -1582.
- Budd, R.C., 2002. Death receptors couple to both cell proliferation and apoptosis. *The Journal of Clinical Investigation*, 109(4), S.437-441.
- Bugianesi, E., 2007. Non-alcoholic steatohepatitis and cancer. *Clinics in Liver Disease*, 11(1), S.191-207, x-xi.
- Bugianesi, E., Moscatiello, S., Ciaravella, M.F. & Marchesini, G., 2010. Insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *Current Pharmaceutical Design*, 16(17), S.1941-1951.

## 6 Literatur

- Busuttil, R.W. & Tanaka, Koichi, 2003. The utility of marginal donors in liver transplantation. *Liver Transplantation: Official Publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*, 9(7), S.651-663.
- Byrne, C.D., Olufadi, R., Bruce, K.D., Cagampang, F.R. & Ahmed, M.H., 2009. Metabolic disturbances in non-alcoholic fatty liver disease. *Clinical Science (London, England: 1979)*, 116(7), S.539-564.
- Calle, E.E., Rodriguez, C., Walker-Thurmond, K. & Thun, M.J., 2003. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *The New England Journal of Medicine*, 348(17), S.1625-1638.
- Cameron, P.L., Ruffin, J.W., Bollag, R., Rasmussen, H. & Cameron, R.S., 1997. Identification of caveolin and caveolin-related proteins in the brain. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 17(24), S.9520-9535.
- Campbell, J.S., Argast, G.M., Yuen, S.Y., Hayes, B. & Fausto, N., 2011. Inactivation of p38 MAPK during liver regeneration. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 43(2), S.180-188.
- Canbay, A., Bechmann, L. & Gerken, G., 2007. Lipid Metabolism in the Liver. *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 45(1), S.35-41.
- Carmiel-Haggai, M., Cederbaum, A.I. & Nieto, N., 2005. A high-fat diet leads to the progression of non-alcoholic fatty liver disease in obese rats. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 19(1), S.136-138.
- Catalano, S., Mauro, L., Marsico, S., Giordano, C., Rizza, P., Rago, V., Montanaro, D., Maggiolini, M., Panno, M.L. & Andó, S., 2004. Leptin induces, via ERK1/ERK2 signal, functional activation of estrogen receptor alpha in MCF-7 cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(19), S.19908-19915.
- Cazanave, S.C. & Gores, G.J., 2010. Mechanisms and clinical implications of hepatocyte lipoapoptosis. *Clinical Lipidology*, 5(1), S.71-85.
- Chang, D.W., Xing, Z., Pan, Y., Algeciras-Schimmich, A., Barnhart, B.C., Yaish-Ohad, S., Peter, M.E. & Yang, X., 2002. c-FLIP(L) is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis. *The EMBO Journal*, 21(14), S.3704-3714.
- Chao, D.T. & Korsmeyer, S.J., 1998. BCL-2 family: regulators of cell death. *Annual Review of Immunology*, 16, S.395-419.
- Charlton, M., Krishnan, A., Viker, K., Sanderson, S., Cazanave, S.C., McConico, A., Masuoko, H. & Gores, G.J., 2011. The Fast Food Diet Mouse - A Novel Small Animal Model of NASH with

## 6 Literatur

- High Histologic and Physiologic Fidelity to the Human Condition. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21836057> [Zugegriffen September 13, 2011].
- Chen, C., Chang, Y.-C., Liu, C.-L., Liu, T.-P., Chang, K.-J. & Guo, I.-C., 2007. Leptin induces proliferation and anti-apoptosis in human hepatocarcinoma cells by up-regulating cyclin D1 and down-regulating Bax via a Janus kinase 2-linked pathway. *Endocrine-Related Cancer*, 14(2), S.513-529.
- Chen, G. & Goeddel, D.V., 2002. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science (New York, N.Y.)*, 296(5573), S.1634-1635.
- Chen, Q., Kon, J., Ooe, H., Sasaki, K. & Mitaka, T., 2007. Selective proliferation of rat hepatocyte progenitor cells in serum-free culture. *Nat. Protocols*, 2(5), S.1197-1205.
- Cho, J.Y., Suh, K.-S., Kwon, C.H., Yi, N.-J. & Lee, K.U., 2006. Mild hepatic steatosis is not a major risk factor for hepatectomy and regenerative power is not impaired. *Surgery*, 139(4), S.508-515.
- Cho, J.Y., Suh, K.-S., Kwon, C.H., Yi, N.-J., Cho, S.Y., Jang, J.-J., Kim, S.H. & Lee, K.U., 2005. The hepatic regeneration power of mild steatotic grafts is not impaired in living-donor liver transplantation. *Liver Transplantation*, 11(2), S.210-217.
- Clark, J.M., Brancati, F.L. & Diehl, A.M., 2002. Nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*, 122(6), S.1649-1657.
- Clavien, P.A. & Strasberg, S.M., 2009. Severity Grading of Surgical Complications. *Annals of Surgery*, 250(2), S.197-198.
- Clavien, P.-A., Oberkofler, C.E., Raptis, D.A., Lehmann, K., Rickenbacher, A. & El-Badry, A.M., 2010. What is critical for liver surgery and partial liver transplantation: Size or quality? *Hepatology*, 52(2), S.715-729.
- Considine, R.V., Sinha, M.K., Heiman, M.L., Kriauciunas, A., Stephens, T.W., Nyce, M.R., Ohannesian, J.P., Marco, C.C., McKee, L.J. & Bauer, T.L., 1996. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *The New England Journal of Medicine*, 334(5), S.292-295.
- Czaja, M.J., 2010. Autophagy in health and disease. 2. Regulation of lipid metabolism and storage by autophagy: pathophysiological implications. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 298(5), S.C973-978.

## 6 Literatur

- Debonera, F., Aldeguer, X., Shen, X., Gelman, A.E., Gao, F., Que, X., Greenbaum, L.E., Furth, E.E., Taub, R & Olthoff, K.M., 2001. Activation of interleukin-6/STAT3 and liver regeneration following transplantation. *The Journal of Surgical Research*, 96(2), S.289-295.
- Deetjen, Speckmann & Hescheler, 2005. *Physiologie* 4. Aufl., Urban und Fischer.
- Delahunty, T.J. & Rubinstein, D., 1970. Accumulation and release of triglycerides by rat liver following partial hepatectomy. *Journal of Lipid Research*, 11(6), S.536-543.
- Desbarats, J. & Newell, M.K., 2000. Fas engagement accelerates liver regeneration after partial hepatectomy. *Nat Med*, 6(8), S.920-923.
- Diehl, A.M., 2000. Cytokine regulation of liver injury and repair. *Immunological Reviews*, 174, S.160-171.
- Diehl, A.M., 1991. Nutrition, hormones, metabolism, and liver regeneration. *Seminars in Liver Disease*, 11(4), S.315-320.
- Diehl, A.M., 1999. Nonalcoholic steatohepatitis. *Seminars in Liver Disease*, 19(2), S.221-229.
- Doege, H. & Stahl, A., 2006. Protein-mediated fatty acid uptake: novel insights from in vivo models. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 21, S.259-268.
- Doege, H., Grimm, D., Falcon, A., Tsang, B., Storm, T.A., Xu, H., Ortegon, A.M., Kazantzis, M., Kay, M.A. & Stahl, A., 2008. Silencing of hepatic fatty acid transporter protein 5 in vivo reverses diet-induced non-alcoholic fatty liver disease and improves hyperglycemia. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(32), S.22186-22192.
- Eberle, J., Fecker, L.F., Forschner, T., Ulrich, C., Röwert-Huber, J. & Stockfleth, E., 2007. Apoptosis pathways as promising targets for skin cancer therapy. *The British Journal of Dermatology*, 156 Suppl 3, S.18-24.
- Ehehalt, R., Füllekrug, J., Pohl, J., Ring, A., Herrmann, T. & Stremmel, W., 2006. Translocation of long chain fatty acids across the plasma membrane – lipid rafts and fatty acid transport proteins. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 284(1-2), S.135-140.
- Elaut, G., Henkens, T., Papeleu, P., Snykers, S., Vinken, M., Vanhaecke, T. & Rogiers, V., 2006. Molecular mechanisms underlying the dedifferentiation process of isolated hepatocytes and their cultures. *Current Drug Metabolism*, 7(6), S.629-660.
- Ertle, J., Dechêne, A., Sowa, J.-P., Penndorf, V., Herzer, K., Kaiser, G., Schlaak, J.F., Gerken, G., Syn, W.-K. & Canbay, A., 2011. Non-alcoholic fatty liver disease progresses to hepatocellular carcinoma in the absence of apparent cirrhosis. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 128(10), S.2436-2443.

## 6 Literatur

- Ezaki, H., Yoshida, Y., Saji, Y., Takemura, T., Fukushima, J., Matsumoto, H., Kamada, Y., Wada, A., Igura, T., Kihara, S., Funahashi, T., Shimomura, I., Tamura, S., Kiso, S. & Hayashi, N., 2009. Delayed liver regeneration after partial hepatectomy in adiponectin knockout mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 378(1), S.68-72.
- Farrell, G.C., 2004. Probing Prometheus: fat fueling the fire? *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 40(6), S.1252-1255.
- Farrell, G.C., Robertson, G.R., Leclercq, I. & Horsmans, Y., 2002. Liver regeneration in obese mice with fatty livers: Does the impairment have relevance for other types of fatty liver disease? *Hepatology*, 35(3), S.731-731.
- Faubion, W.A. & Gores, G.J., 1999. Death receptors in liver biology and pathobiology. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 29(1), S.1-4.
- Fausto, N, Laird, A.D. & Webber, E.M., 1995. Liver regeneration. 2. Role of growth factors and cytokines in hepatic regeneration. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 9(15), S.1527-1536.
- Fausto, N, 2000. Liver regeneration. *Journal of Hepatology*, 32(1 Suppl), S.19-31.
- Fausto, N. & Riehle, K.J., 2005. Mechanisms of liver regeneration and their clinical implications. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery*, 12(3), S.181-189.
- Fausto, N., Campbell, J.S. & Riehle, K.J., 2006. Liver regeneration. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 43(2 Suppl 1), S.S45-53.
- Feldstein, A.E., Canbay, A., Guicciardi, M.E, Higuchi, H., Bronk, S.F. & Gores, G.J., 2003. Diet associated hepatic steatosis sensitizes to Fas mediated liver injury in mice. *Journal of Hepatology*, 39(6), S.978-983.
- Feldstein, A.E., Werneburg, N.W., Canbay, A., Guicciardi, M.E., Bronk, S.F., Rydzewski, R., Burgart, L.J. & Gores, G.J., 2004. Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF-alpha expression via a lysosomal pathway. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 40(1), S.185-194.
- Fernández, M.A., Albor, C., Ingelmo-Torres, M., Nixon, S.J., Ferguson, C., Kurzchalia, T., Tebar, F., Enrich, C., Parton, R.G & Pol, A., 2006. Caveolin-1 is essential for liver regeneration. *Science (New York, N.Y.)*, 313(5793), S.1628-1632.
- Fernandez-Cruz, E., Escartin, P., Bootello, A., Kreisler, M. & Segovia de Arana, J.M., 1978. Hepatocyte damage induced by lymphocytes from patients with chronic liver diseases, as detected by LDH release. *Clinical and Experimental Immunology*, 31(3), S.436-442.



## 6 Literatur

- Ferrari, D., Stepczynska, A., Los, M., Wesselborg, S. & Schulze-Osthoff, K., 1998. Differential regulation and ATP requirement for caspase-8 and caspase-3 activation during CD95- and anticancer drug-induced apoptosis. *The Journal of Experimental Medicine*, 188(5), S.979-984.
- Ferrari, D., Wesselborg, S., Bauer, M.K. & Schulze-Osthoff, K., 1997. Extracellular ATP activates transcription factor NF-kappaB through the P2Z purinoreceptor by selectively targeting NF-kappaB p65. *The Journal of Cell Biology*, 139(7), S.1635-1643.
- Fishbein, T.M., Fiel, M.I., Emre, S., Cubukcu, O., Guy, S.R., Schwartz, M.E., Miller, C.M. & Sheiner, P.A., 1997. Use of livers with microvesicular fat safely expands the donor pool. *Transplantation*, 64(2), S.248-251.
- Florant, G.L. & Healy, J.E., 2011. The regulation of food intake in mammalian hibernators: a review. *Journal of Comparative Physiology. B, Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22080368> [Zugegriffen Januar 14, 2012].
- Fruhwrth, G.O. & Hermetter, A., 2008. Mediation of apoptosis by oxidized phospholipids. *Sub-Cellular Biochemistry*, 49, S.351-367.
- Gazit, V., Weymann, A., Hartman, E., Finck, B.N., Hruz, P.W., Tzekov, A. & Rudnick, D.A., 2010. Liver regeneration is impaired in lipodystrophic fatty liver dystrophy mice. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 52(6), S.2109-2117.
- Gerok & Blum, 1995. *Hepatology* 2. Aufl., Urban und Schwarzenberg.
- Gimeno, R.E., 2007. Fatty acid transport proteins. *Current Opinion in Lipidology*, 18(3), S.271-276.
- Gordon, J.I., Elshourbagy, N, Lowe, J.B., Liao, W.S., Alpers, D.H. & Taylor, J.M., 1985. Tissue specific expression and developmental regulation of two genes coding for rat fatty acid binding proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 260(4), S.1995-1998.
- Greco, D., Kotronen, A., Westerbacka, J., Puig, O., Arkkila, P., Kiviluoto, T., Laitinen, S., Kolak, M., Fisher, R.M., Hamsten, A., Auvinen, P. & Yki-Järvinen, H., 2008. Gene expression in human NAFLD. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 294(5), S.G1281-1287.
- Hashimoto, E., Yatsuji, S., Tobar, M., Taniai, M., Torii, N., Tokushige, K. & Shiratori, K., 2009. Hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Journal of Gastroenterology*, 44(0), S.89-95.
- Haus, J.M., Solomon, T.P.J., Marchetti, C.M., Edmison, J.M., González, F. & Kirwan, J.P., 2010. Free fatty acid-induced hepatic insulin resistance is attenuated following lifestyle intervention in

## 6 Literatur

- obese individuals with impaired glucose tolerance. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 95(1), S.323-327.
- Herrmann, T., Gröne, H.-J., Langbein, L., Kaiser, I., Gosch, I., Bennemann, U., Metzger, D., Chambon, P., Stewart, A.F. & Stremmel, W., 2005. Disturbed epidermal structure in mice with temporally controlled fatp4 deficiency. *The Journal of Investigative Dermatology*, 125(6), S.1228-1235.
- Hotamisligil, G.S., 2006. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, 444(7121), S.860-867.
- Huh, C.-G., Factor, V.M., Sánchez, A., Uchida, K., Conner, E.A. & Thorgeirsson, S.S., 2004. Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(13), S.4477-4482.
- Hyer, M.L., Samuel, T. & Reed, John C, 2006. The FLIP-side of Fas signaling. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 12(20 Pt 1), S.5929-5931.
- limuro, Y. & Fujimoto, J., 2010. TLRs, NF- $\kappa$ B, JNK, and Liver Regeneration. *Gastroenterology Research and Practice*, 2010. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20936148> [Zugegriffen April 28, 2011].
- Imber, C.J., St Peter, S.D., Handa, A. & Friend, P.J., 2002. Hepatic steatosis and its relationship to transplantation. *Liver Transplantation: Official Publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*, 8(5), S.415-423.
- Jaeschke, H., Gores, G.J., Cederbaum, A.I., Hinson, J.A., Pessayre, D. & Lemasters, J.J., 2002. Mechanisms of Hepatotoxicity. *Toxicol. Sci.*, 65(2), S.166-176.
- Jankun, J., Al-Senaïdy, A. & Skrzypczak-Jankun, E., 2012. Can inactivators of plasminogen activator inhibitor alleviate the burden of obesity and diabetes? (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 29(1), S.3-11.
- Jiang, Y., Zhao, M. & An, W., 2011. Increased hepatic apoptosis in high-fat diet-induced NASH in rats may be associated with downregulation of hepatic stimulator substance. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21814826> [Zugegriffen August 11, 2011].
- Jin, S.-Z., Meng, X.-W., Sun, X., Han, M.-Z., Liu, B.-R., Wang, X.-H. & Pei, F.-H., 2010. Hepatocyte growth factor promotes liver regeneration induced by transfusion of bone marrow mononuclear cells in a murine acute liver failure model. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic*

## 6 Literatur

- Sciences*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21076985> [Zugegriffen Mai 2, 2011].
- Kamimukai, N., Togo, S., Hasegawa, S., Kubota, T., Kurosawa, H., Li, X.K., Suzuki, S. & Shimada, H., 2001. Expression of Bcl-2 family reduces apoptotic hepatocytes after excessive hepatectomy. *European Surgical Research. Europäische Chirurgische Forschung. Recherches Chirurgicales Européennes*, 33(1), S.8-15.
- Kanzler, S. & Galle, P R, 2000. Apoptosis and the liver. *Seminars in Cancer Biology*, 10(3), S.173-184.
- Kataoka, T., Budd, R C, Holler, N., Thome, M., Martinon, F., Irmeler, M., Burns, K., Hahne, M., Kennedy, N., Kovacsovics, M. & Tschopp, J., 2000. The caspase-8 inhibitor FLIP promotes activation of NF-kappaB and Erk signaling pathways. *Current Biology: CB*, 10(11), S.640-648.
- Kirilova, I., Chaisson, M. & Fausto, N, 1999. Tumor necrosis factor induces DNA replication in hepatic cells through nuclear factor kappaB activation. *Cell Growth & Differentiation: The Molecular Biology Journal of the American Association for Cancer Research*, 10(12), S.819-828.
- Kopelman, P.G., 2000. Obesity as a medical problem. *Nature*, 404(6778), S.635-643.
- Kreuz, S., Siegmund, D., Scheurich, P. & Wajant, H., 2001. NF-kappaB inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling. *Molecular and Cellular Biology*, 21(12), S.3964-3973.
- Kroemer, G., 1997. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nature Medicine*, 3(6), S.614-620.
- Ladenheim, E.E., 2012. Gastrointestinal regulatory peptides and central nervous system mechanisms of weight control. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes, and Obesity*, 19(1), S.13-18.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), S.680-685.
- Leclercq, I.A., Field, J. & Farrell, G.C., 2003. Leptin-specific mechanisms for impaired liver regeneration in ob/ob mice after toxic injury. *Gastroenterology*, 124(5), S.1451-1464.
- Leclercq, I.A., Vansteenbergh, M., Lebrun, V.B., VanHul, N.K., Abarca-Quinones, J., Sempoux, C.L., Picard, C., Starkel, P. & Horsmans, Y.L., 2006. Defective hepatic regeneration after partial hepatectomy in leptin-deficient mice is not rescued by exogenous leptin. *Lab Invest*, 86(11), S.1161-1171.

## 6 Literatur

- Li, Jiangning, Campbell, J.S., Mitchell, C., McMahan, R.S., Yu, X., Riehle, K.J., Bumgarner, R.E. & Fausto, N., 2009. Relationships between deficits in tissue mass and transcriptional programs after partial hepatectomy in mice. *The American Journal of Pathology*, 175(3), S.947-957.
- Li, Jianze, Lee, B. & Lee, A.S., 2006. Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: multiple pathways and activation of p53-up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) and NOXA by p53. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(11), S.7260-7270.
- Li, W., Liang, X., Kellendonk, C., Poli, V. & Taub, R., 2002. STAT3 contributes to the mitogenic response of hepatocytes during liver regeneration. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(32), S.28411-28417.
- Li, Z., Clark, J. & Diehl, A.M., 2002. The liver in obesity and type 2 diabetes mellitus. *Clinics in Liver Disease*, 6(4), S.867-877.
- Liao, Y., Shikapwashya, O.N., Shteyer, E., Dieckgraefe, B.K., Hruz, P.W. & Rudnick, D.A., 2004. Delayed hepatocellular mitotic progression and impaired liver regeneration in early growth response-1-deficient mice. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(41), S.43107-43116.
- Liu, Y., Lv, L., Xiao, W., Gong, C., Yin, J., Wang, D. & Sheng, H., 2011. Leptin activates STAT3 and ERK1/2 pathways and induces endometrial cancer cell proliferation. *Journal of Huazhong University of Science and Technology. Medical Sciences* 31(3), S.365-370.
- Locksley, R.M., Killeen, N. & Lenardo, M.J., 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*, 104(4), S.487-501.
- Lowe, J.B., Sacchettini, J.C., Laposata, M., McQuillan, J.J. & Gordon, J.I., 1987. Expression of rat intestinal fatty acid-binding protein in Escherichia coli. Purification and comparison of ligand binding characteristics with that of Escherichia coli-derived rat liver fatty acid-binding protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 262(12), S.5931-5937.
- Madoff, D.C., Hicks, M.E., Vauthey, J.-N., Charnsangavej, C., Morello, F.A., Jr, Ahrar, K., Wallace, M.J. & Gupta, S., 2002. Transhepatic portal vein embolization: anatomy, indications, and technical considerations. *Radiographics: A Review Publication of the Radiological Society of North America, Inc*, 22(5), S.1063-1076.
- Malhi, H., Barreyro, F.J., Isomoto, H., Bronk, S.F. & Gores, G.J., 2007. Free fatty acids sensitise hepatocytes to TRAIL mediated cytotoxicity. *Gut*, 56(8), S.1124-1131.
- Malhi, H., Bronk, S.F., Werneburg, N.W. & Gores, G.J., 2006. Free fatty acids induce JNK-dependent hepatocyte lipoapoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(17), S.12093-12101.
- Malhi, H., Guicciardi, M.E. & Gores, G.J., 2010. Hepatocyte Death: A Clear and Present Danger. *Physiol. Rev.*, 90(3), S.1165-1194.

## 6 Literatur

- Mantzoros, C.S., Magkos, F., Brinkoetter, M., Sienkiewicz, E., Dardeno, T.A., Kim, S.-Y. & Hamnvik, O.-P.R., 2011. Leptin in human physiology and pathophysiology. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21791620>.
- Marra, F. & Bertolani, C., 2009. Adipokines in liver diseases. *Hepatology*, 50(3): 957-69.
- Matsumoto, K. & Nakamura, T., 1992. Hepatocyte growth factor: molecular structure, roles in liver regeneration, and other biological functions. *Critical Reviews in Oncogenesis*, 3(1-2), S.27-54.
- McCormack, L., Dutkowski, P., El-Badry, A.M. & Clavien, P.-A., 2010. Liver transplantation using fatty livers: Always feasible? *Journal of Hepatology*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21145846>.
- de Meijer, V.E., Le, H.D., Meisel, J.A., Sharif, M.R.A., Pan, A., Nosé, V. & Puder, M., 2010. Dietary fat intake promotes the development of hepatic steatosis independently from excess caloric consumption in a murine model. *Metabolism*, In Press, Corrected Proof. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WN4-4Y41V59-1/2/e110fb65ac3aff5f13620a8bcf8c7b48>.
- Memon, R.A., Feingold, K.R., Moser, A.H., Fuller, J. & Grunfeld, C., 1998. Regulation of fatty acid transport protein and fatty acid translocase mRNA levels by endotoxin and cytokines. *The American Journal of Physiology*, 274(2 Pt 1), S.E210-217.
- Milagro, F.I., Campión, J. & Martínez, J.A., 2006. Weight gain induced by high-fat feeding involves increased liver oxidative stress. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 14(7), S.1118-1123.
- Mitchell, C. & Willenbring, H., 2008. A reproducible and well-tolerated method for 2/3 partial hepatectomy in mice. *Nature Protocols*, 3(7), S.1167-1170.
- Mitchell, C., Nivison, M., Jackson, L.F., Fox, R., Lee, D.C., Campbell, J.S. & Fausto, N., 2005. Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor links hepatocyte priming with cell cycle progression during liver regeneration. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(4), S.2562-2568.
- Naitoh, R., Miyawaki, K., Harada, N., Mizunoya, W., Toyoda, K., Fushiki, T., Yamada, Yuichiro, Seino, Y. & Inagaki, N., 2008. Inhibition of GIP signaling modulates adiponectin levels under high-fat diet in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 376(1), S.21-25.
- Nakamura, T., 1994. Hepatocyte growth factor as mitogen, motogen and morphogen, and its roles in organ regeneration. *Princess Takamatsu Symposia*, 24, S.195-213.

## 6 Literatur

- Nakatani, T., Ozawa, K., Asano, M., Ukikusa, M., Kamiyama, Y. & Tobe, T., 1981. Differences in predominant energy substrate in relation to the resected hepatic mass in the phase immediately after hepatectomy. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 97(6), S.887-898.
- Newberry, E.P., Kennedy, S.M., Xie, Y., Luo, J. & Davidson, N.O., 2009. Diet-induced alterations in intestinal and extrahepatic lipid metabolism in liver fatty acid binding protein knockout mice. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 326(1-2), S.79-86.
- Newberry, E.P., Kennedy, S.M., Xie, Y., Luo, J., Stanley, S.E., Semenkovich, C.F., Crooke, R.M., Graham, M.J. & Davidson, N.O., 2008. Altered hepatic triglyceride content after partial hepatectomy without impaired liver regeneration in multiple murine genetic models. *Hepatology*, 48(4), S.1097-1105.
- Newberry, E.P., Xie, Y., Kennedy, S.M., Luo, J. & Davidson, N.O., 2006. Protection against Western diet-induced obesity and hepatic steatosis in liver fatty acid-binding protein knockout mice. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 44(5), S.1191-1205.
- Nguyen, M.-H., Cheng, M. & Koh, T.J., 2011. Impaired Muscle Regeneration in Ob/ob and Db/db Mice. *TheScientificWorldJournal*, 11, S.1525-1535.
- Nguyen, P., Leray, V., Diez, M., Serisier, S., Le Bloc'h, J., Siliart, B. & Dumon, H., 2008. Liver lipid metabolism. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 92(3), S.272-283.
- Nolan, C.J. & Larter, C.Z., 2009. Lipotoxicity: why do saturated fatty acids cause and monounsaturates protect against it? *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 24(5), S.703-706.
- Ogura, Y., Hamanoue, M., Tanabe, G., Mitsue, S., Yoshidome, S., Nuruki, K. & Aikou, T., 2001. Hepatocyte growth factor promotes liver regeneration and protein synthesis after hepatectomy in cirrhotic rats. *Hepato-Gastroenterology*, 48(38), S.545-549.
- Oh, S.-Y., Cho, Y.-K., Kang, M.-S., Yoo, T.-W., Park, J.-H., Kim, H.-J., Park, D.-I., Sohn, C.-I., Jeon, W.-K., Kim, B.-I., Son, B.-H. & Shin, J.-H., 2006. The association between increased alanine aminotransferase activity and metabolic factors in nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 55(12), S.1604-1609.
- Ohki, T., Tateishi, R., Shiina, S., Goto, E., Sato, T., Nakagawa, H., Masuzaki, R., Goto, T., Hamamura, K., Kanai, F., Yoshida, H., Kawabe, T. & Omata, M., 2009. Visceral fat accumulation is an independent risk factor for hepatocellular carcinoma recurrence after curative treatment in patients with suspected NASH. *Gut*, 58(6), S.839-844.

## 6 Literatur

- Oleszczuk, A., Spannauer, M., Tannapfel, A., Blüher, M., Hengstler, J., Pietsch, U.-C., Schuhmacher, A., Wittekind, C., Hauss, J.P. & Schön, M.R., 2007. Regenerative capacity differs between micro- and macrovesicular hepatic steatosis. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 59(3-4), S.205-213.
- Panteghini, M., 1990. Aspartate aminotransferase isoenzymes. *Clinical Biochemistry*, 23(4), S.311-319.
- Park, E.J., Lee, J.H., Yu, G.-Y., He, G., Ali, S.R., Holzer, R.G., Osterreicher, C.H., Takahashi, H. & Karin, M., 2010. Dietary and genetic obesity promote liver inflammation and tumorigenesis by enhancing IL-6 and TNF expression. *Cell*, 140(2), S.197-208.
- Parton, R.G., Way, M., Zorzi, N. & Stang, E., 1997. Caveolin-3 associates with developing T-tubules during muscle differentiation. *The Journal of Cell Biology*, 136(1), S.137-154.
- Paulsen, F. & Waschke, J. hrsg., 2010. *Sobotta Atlas der Anatomie des Menschen-Innere Organe* 23. Aufl., Urban und Fischer.
- Pei, Z., Fraisl, P., Berger, J., Jia, Z., Forss-Petter, S. & Watkins, P.A., 2004. Mouse very long-chain Acyl-CoA synthetase 3/fatty acid transport protein 3 catalyzes fatty acid activation but not fatty acid transport in MA-10 cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(52), S.54454-54462.
- Pfaffl, M.W., 2004. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. , (1/04 10.Jahrgang).
- Picard, C., Lambotte, L., Starkel, P., Sempoux, C., Saliez, A., Van Den Berge, V. & Horsmans, Y., 2002. Steatosis is not sufficient to cause an impaired regenerative response after partial hepatectomy in rats. *Journal of Hepatology*, 36(5), S.645-652.
- Pohl, J., Ring, A. & Stremmel, W., 2002. Uptake of long-chain fatty acids in HepG2 cells involves caveolae: analysis of a novel pathway. *Journal of Lipid Research*, 43(9), S.1390-1399.
- Pusl, T., Wild, N., Vennegeerts, T., Wimmer, R., Göke, B., Brand, S. & Rust, C., 2008. Free fatty acids sensitize hepatocytes to bile acid-induced apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 371(3), S.441-445.
- Qatanani, M., Szwegold, N.R., Greaves, D.R., Ahima, R.S. & Lazar, M.A., 2009. Macrophage-derived human resistin exacerbates adipose tissue inflammation and insulin resistance in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(3), S.531-539.
- Rao, M.S., Papreddy, K., Abecassis, M. & Hashimoto, T., 2001. Regeneration of liver with marked fatty change following partial hepatectomy in rats. *Digestive Diseases and Sciences*, 46(9), S.1821-1826.

## 6 Literatur

- Razani, B., Woodman, S.E. & Lisanti, Michael P, 2002. Caveolae: from cell biology to animal physiology. *Pharmacological Reviews*, 54(3), S.431-467.
- Reed, J C, 2000. Mechanisms of apoptosis. *The American Journal of Pathology*, 157(5), S.1415-1430.
- Rhee, E.P., Cheng, S., Larson, M.G., Walford, G.A., Lewis, G.D., McCabe, E., Yang, E., Farrell, L., Fox, C.S., O'Donnell, C.J., Carr, S.A., Vasan, R.S., Florez, J.C., Clish, C.B., Wang, T.J. & Gerszten, R.E., 2011. Lipid profiling identifies a triacylglycerol signature of insulin resistance and improves diabetes prediction in humans. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(4), S.1402-1411.
- Ricchi, M., Odoardi, M.R., Carulli, L., Anzivino, C., Ballestri, S., Pinetti, A., Fantoni, L.I., Marra, F., Bertolotti, M., Banni, S., Lonardo, A., Carulli, N. & Loria, P., 2009. Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 24(5), S.830-840.
- Riehle, K.J., Dan, Y.Y., Campbell, J.S. & Fausto, N., 2011. New concepts in liver regeneration. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 26 Suppl 1, S.203-212.
- de Rougemont, O., Dutkowski, P. & Clavien, P.-A., 2010. Biological modulation of liver ischemia-reperfusion injury. *Current Opinion in Organ Transplantation*, 15(2), S.183-189.
- de Rougemont, O., Lehmann, K. & Clavien, P.-A., 2009. Preconditioning, organ preservation, and postconditioning to prevent ischemia-reperfusion injury to the liver. *Liver Transplantation*, 15(10), S.1172-1182.
- Saxena, N.K., Sharma, D., Ding, X., Lin, S., Marra, F., Merlin, D. & Anania, F.A., 2007. Concomitant activation of the JAK/STAT, PI3K/AKT, and ERK signaling is involved in leptin-mediated promotion of invasion and migration of hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Research*, 67(6), S.2497-2507.
- Scherer, P.E., Lisanti, M P, Baldini, G., Sargiacomo, M., Mastick, C.C. & Lodish, H.F., 1994. Induction of caveolin during adipogenesis and association of GLUT4 with caveolin-rich vesicles. *The Journal of Cell Biology*, 127(5), S.1233-1243.
- Schreuder, T.C.M.A., Verwer, B.J., van Nieuwkerk, C.M.J. & Mulder, C.J.J., 2008. Nonalcoholic fatty liver disease: an overview of current insights in pathogenesis, diagnosis and treatment. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 14(16), S.2474-2486.
- Schuler, M. & Green, D.R., 2001. Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochemical Society Transactions*, 29(Pt 6), S.684-688.



## 6 Literatur

- Selzner, M. & Clavien, P.-A., 2001. Fatty Liver in Liver Transplantation and Surgery. *Seminars in Liver Disease*, 21(01), S.105-114.
- Selzner, M. & P.-A. Clavien, 2000. Failure of regeneration of the steatotic rat liver: disruption at two different levels in the regeneration pathway. *Hepatology*, 31(1), S.35-42.
- Shiraishi, H., Okamoto, H., Yoshimura, A. & Yoshida, Hiroki, 2006. ER stress-induced apoptosis and caspase-12 activation occurs downstream of mitochondrial apoptosis involving Apaf-1. *Journal of Cell Science*, 119(Pt 19), S.3958-3966.
- Shteyer, E., Liao, Y., Muglia, L.J., Hruz, P.W. & Rudnick, D.A., 2004. Disruption of hepatic adipogenesis is associated with impaired liver regeneration in mice. *Hepatology*, 40(6), S.1322-1332.
- Sidoti-de Fraisse, C., Rincheval, V., Risler, Y., Mignotte, B. & Vayssière, J.L., 1998. TNF-alpha activates at least two apoptotic signaling cascades. *Oncogene*, 17(13), S.1639-1651.
- Siebler, J., Schuchmann, M., Strand, S., Lehr, H.A., Neurath, M.F. & Galle, P.R., 2007. Enhanced sensitivity to CD95-induced apoptosis in ob/ob mice. *Digestive Diseases and Sciences*, 52(9), S.2396-2402.
- Singh, R., Kaushik, S., Wang, Y., Xiang, Y., Novak, I., Komatsu, M., Tanaka, Keiji, Cuervo, A.M. & Czaja, M.J., 2009. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature*, 458(7242), S.1131-1135.
- Sowa, J.-P., Best, J., Benko, T., Bockhorn, M., Gu, Y., Niehues, E.-M., Bucchi, A., Benedetto-Castro, E.-M., Gerken, G., Rauen, U. & Schlaak, J.-F., 2008. Extent of liver resection modulates the activation of transcription factors and the production of cytokines involved in liver regeneration. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 14(46), S.7093-7100.
- Stahl, A, Gimeno, R E, Tartaglia, L.A. & Lodish, H.F., 2001. Fatty acid transport proteins: a current view of a growing family. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 12(6), S.266-273.
- Stahl, A, Hirsch, D.J., Gimeno, R E, Punreddy, S., Ge, P., Watson, N., Patel, S., Kotler, M., Raimondi, A., Tartaglia, L.A. & Lodish, H.F., 1999. Identification of the major intestinal fatty acid transport protein. *Molecular Cell*, 4(3), S.299-308.
- Stahl, A., 2004. A current review of fatty acid transport proteins (SLC27). *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*, 447(5), S.722-727.
- Streetz, K.L., Luedde, T., Manns, M P & Trautwein, C, 2000. Interleukin 6 and liver regeneration. *Gut*, 47(2), S.309-312.

## 6 Literatur

- Taira, K., Hiroyasu, S., Shiraishi, M., Muto, Y. & Koji, T., 2001. Role of the Fas system in liver regeneration after a partial hepatectomy in rats. *European Surgical Research. Europäische Chirurgische Forschung. Recherches Chirurgicales Européennes*, 33(5-6), S.334-341.
- Talarmin, H., Rescan, C., Cariou, S., Glaise, D., Zanninelli, G., Bilodeau, M., Loyer, P., Guguen-Guillouzo, C. & Baffet, G., 1999. The mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase cascade activation is a key signalling pathway involved in the regulation of G(1) phase progression in proliferating hepatocytes. *Molecular and Cellular Biology*, 19(9), S.6003-6011.
- Tanoue, S., Uto, H., Kumamoto, R., Arima, S., Hashimoto, S., Nasu, Y., Takami, Y., Moriuchi, A., Sakiyama, T., Oketani, M., Ido, A. & Tsubouchi, H., 2011. Liver regeneration after partial hepatectomy in rat is more impaired in a steatotic liver induced by dietary fructose compared to dietary fat. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, In Press, Corrected Proof. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WBK-528YX4T-B/2/2d5ed32f0eebd94fb86a3b841aa86f15> [Zugegriffen März 31, 2011].
- Taub, R., 2003. Hepatoprotection via the IL-6/Stat3 pathway. *The Journal of Clinical Investigation*, 112(7), S.978-980.
- Tergaonkar, V., 2006. NFkappaB pathway: a good signaling paradigm and therapeutic target. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 38(10), S.1647-1653.
- Thevananther, S., 2010. Adipose to the rescue: peripheral fat fuels liver regeneration. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 52(6), S.1875-1876.
- Thompson, J., Winter, N., Terwey, D., Bratt, J. & Banaszak, L., 1997. The crystal structure of the liver fatty acid-binding protein. A complex with two bound oleates. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(11), S.7140-7150.
- Thoresen, G.H., Guren, T.K. & Christoffersen, T., 2003. Role of ERK, p38 and PI3-kinase in EGF receptor-mediated mitogenic signalling in cultured rat hepatocytes: requirement for sustained ERK activation. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 13(4), S.229-238.
- Tijburg, L.B., Nyathi, C.B., Meijer, G.W. & Geelen, M.J., 1991. Biosynthesis and secretion of triacylglycerol in rat liver after partial hepatectomy. *Biochemical Journal*, 277(Pt 3), S.723-728.
- Tilg, H., 2010. The role of cytokines in non-alcoholic fatty liver disease. *Digestive Diseases (Basel, Switzerland)*, 28(1), S.179-185.

## 6 Literatur

- Tuyns, A.J. & Pequignot, G., 1984. Greater risk of ascitic cirrhosis in females in relation to alcohol consumption. *International Journal of Epidemiology*, 13(1), S.53-57.
- Tzung, S.P., Fausto, N & Hockenbery, D.M., 1997. Expression of Bcl-2 family during liver regeneration and identification of Bcl-x as a delayed early response gene. *The American Journal of Pathology*, 150(6), S.1985-1995.
- Uetsuka, K., Shirai, M., Yamauchi, H., Nakayama, H. & Doi, K., 2005. Impaired proliferation of non-parenchymal cells participates in an impairment of liver regeneration in db/db mice. *Experimental and Molecular Pathology*, 79(1), S.51-58.
- Veteläinen, R., Bennink, R.J., van Vliet, A. K. & van Gulik, T. M., 2007. Mild steatosis impairs functional recovery after liver resection in an experimental model. *British Journal of Surgery*, 94(8), S.1002-1008.
- Veteläinen, R., Vliet, Arlène K. van & van Gulik, T.M., 2007. Severe Steatosis Increases Hepatocellular Injury and Impairs Liver Regeneration in a Rat Model of Partial Hepatectomy. *Annals of Surgery*, 245(1), S.44–50.
- Volkman, X., Fischer, U., Bahr, M.J., Ott, M., Lehner, F., Macfarlane, M., Cohen, G.M., Manns, M. P., Schulze-Osthoff, K. & Bantel, H., 2007. Increased hepatotoxicity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in diseased human liver. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 46(5), S.1498-1508.
- Wang, G., Chen, Q.M., Minuk, G.Y., Gong, Y. & Burczynski, F.J., 2004. Enhanced expression of cytosolic fatty acid binding protein and fatty acid uptake during liver regeneration in rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 262(1-2), S.41-49.
- Werneburg, N.W., Guicciardi, M. E., Bronk, S.F., Kaufmann, S.H. & Gores, G.J., 2007. Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand Activates a Lysosomal Pathway of Apoptosis That Is Regulated by Bcl-2 Proteins. *J. Biol. Chem.*, 282(39), S.28960-28970.
- Yamada, Y & Fausto, N, 1998. Deficient liver regeneration after carbon tetrachloride injury in mice lacking type 1 but not type 2 tumor necrosis factor receptor. *The American Journal of Pathology*, 152(6), S.1577-1589.
- Yamada, Y, Kirillova, I., Peschon, J.J. & Fausto, N, 1997. Initiation of liver growth by tumor necrosis factor: deficient liver regeneration in mice lacking type I tumor necrosis factor receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(4), S.1441-1446.

## 6 Literatur

- Yamada, Y, Webber, E.M., Kirillova, I., Peschon, J.J. & Fausto, N, 1998. Analysis of liver regeneration in mice lacking type 1 or type 2 tumor necrosis factor receptor: requirement for type 1 but not type 2 receptor. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 28(4), S.959-970.
- Yamauchi, H., Uetsuka, K., Okada, T., Nakayama, H. & Doi, K., 2003. Impaired liver regeneration after partial hepatectomy in db/db mice. *Experimental and Toxicologic Pathology: Official Journal of the Gesellschaft Für Toxikologische Pathologie*, 54(4), S.281-286.
- Yang, L., Li, P., Fu, S., Calay, E.S. & Hotamisligil, G.S., 2010. Defective hepatic autophagy in obesity promotes ER stress and causes insulin resistance. *Cell Metabolism*, 11(6), S.467-478.
- Yang, S., 2001. Disrupted signaling and inhibited regeneration in obese mice with fatty livers: Implications for nonalcoholic fatty liver disease pathophysiology. *Hepatology*, 34(4), S.694-706.
- Yannakoulia, M., Yiannakouris, N., Blüher, S., Matalas, A.-L., Klimis-Zacas, D. & Mantzoros, C.S., 2003. Body fat mass and macronutrient intake in relation to circulating soluble leptin receptor, free leptin index, adiponectin, and resistin concentrations in healthy humans. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 88(4), S.1730-1736.
- Yki-Järvinen, H., 2010. Liver fat in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Digestive Diseases (Basel, Switzerland)*, 28(1), S.203-209.
- Zaret, K S, 2001. Hepatocyte differentiation: from the endoderm and beyond. *Current Opinion in Genetics & Development*, 11(5), S.568-574.
- Zaret, K.S. & Grompe, M., 2008. Generation and regeneration of cells of the liver and pancreas. *Science (New York, N.Y.)*, 322(5907), S.1490-1494.
- Zhang, B.H., Weltman, M. & Farrell, G C, 1999. Does steatohepatitis impair liver regeneration? A study in a dietary model of non-alcoholic steatohepatitis in rats. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 14(2), S.133-137.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L. & Friedman, J.M., 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372(6505), S.425-432.
- Zhou, H., Yamada, Yuichiro, Tsukiyama, K., Miyawaki, K., Hosokawa, M., Nagashima, K., Toyoda, K., Naitoh, R., Mizunoya, W., Fushiki, T., Kadowaki, T. & Seino, Y., 2005. Gastric inhibitory polypeptide modulates adiposity and fat oxidation under diminished insulin action. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 335(3), S.937-942.

## 7. Anhang

### Danksagung

Die vorliegende Arbeit und die zu Grunde liegenden Ergebnisse wurden am Institut für Gastroenterologie und Hepatologie am Universitätsklinikum in Essen angefertigt, daher möchte ich mich bei Prof. Dr. Gerken, dem Direktor der Abteilung, für seinen finanziellen Beitrag, sowie die Bereitstellung seiner Laboratorien bedanken. Insbesondere möchte ich Prof. Dr. Canbay danken, der mir die Möglichkeit bot in seiner Arbeitsgruppe die behandelten Fragestellungen zu bearbeiten. Durch seine Ideen und Anregungen hat er wesentlich zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen und meinen wissenschaftlichen Werdegang mit großer Kompetenz betreut. Vielen Dank für Ihre Diskussionsbereitschaft, für die Zeit und Ihr Vertrauen, welches Sie mir stets entgegen gebracht haben. Ganz besonderen Dank möchte ich an meinen Betreuer Herrn Prof. Dr. Opalka richten, der viele Stunden in die Diskussion und Korrektur der vorliegenden Arbeit investiert hat und diese mit seiner enormen fachlichen Expertise und organisatorischen Kompetenz geprägt hat.

Ferner möchte ich den Kooperationspartnern Frau Prof. Dr. Rauen vom Institut für physiologische Chemie und Herrn Prof. Dr. Baba vom Institut für Pathologie und Neuropathologie danken. Sie haben diese Arbeit sowohl durch interessante Diskussionen als auch technische Expertise unterstützt. Hier ist vor Allem die Unterstützung von Frau Möllmann (MTA, Insitut für Pathologie und Neuropathologie) hervorzuheben, die mich bei der Anfertigung von Gewebe-Schnitten und -Färbungen unterstützte.

Ganz besonders möchte Frau Dr. Yanli Gu von der Abteilung für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie des Universitätsklinikums Essen, für die exzellente Durchführung der beschriebenen Operationen und die freundliche Zusammenarbeit danken. Weiterhin gilt mein großer Dank Herrn Prof. Dr. Paul, Direktor der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie des Universitätsklinikums Essen, dessen Kooperation unerlässlich für die Verwendung humanen Materials zur Zellisolation war. Insbesondere Herrn Dr. Treckmann möchte

## 6 Literatur

ich hier erwähnen, der die damit verbundene Kommunikation und Logistik mit intensivem Aufwand aufrechterhalten hat.

Ferner bedanke ich mich bei Herrn Prof. Hilken, Leiter des zentralen Tierlaboratoriums des Universitätsklinikums Essen und seinen Mitarbeitern Herrn Dr. Dammann und Frau Dr. Krüger für Ihre engagierte Hilfsbereitschaft beim Erstellen der Tierversuchsanträge, der Bereitstellung der Operationsräumlichkeiten und der Messung der Serum-Parameter.

Insbesondere danke ich Herrn Dr. Lars Peter Bechmann und Dr. Jan-Peter Sowa (den Peters) für die vielen technischen und theoretischen Hinweise und Diskussionen, die in diesem Zusammenhang das Projekt äußerst effektiv vorangetrieben und geprägt haben. Außerdem möchte ich Herrn Dr. Marquitan und Herrn Schlattjan für technische Ratschläge und Unterstützung danken. Ebenso dankbar bin ich Herrn Dr. Schreiter, der die Methode der Zellisolation aus Humangewebe in unserem Labor etabliert hat.

Den Mitarbeitern der Abteilung für Gastroenterologie und Hepatologie, Frau Lena Wingerter, Frau Anja Beilfuß, Herr Malte Jansen, Herr Dr. Jan Best, Herr Dr. Martin Trippler, Frau Dr. Ruth Bröring, Frau Catherine Real, Frau Kathrin Kleinehr, Frau Lena Poggenpohl, Frau Melanie Lutterbeck, Frau Olessja Pankraz, Frau Dr. Carolina Hoyo-Becerra, Frau Anastasia Hübener, Frau Anne Achterfeld, Frau M. Beste, Frau Prof. Dr. Elke Cario, Frau Dr. Annette Eyking, Frau Dr. Birgit Ey, Frau Frederike Bartsch und Frau Magdalena Klepak, danke ich ganz herzlich für das angenehme Arbeitsklima und die vielen Tips und Tricks, die so manche kleinen und großen Probleme lösen konnten.

Mein besonderer Dank gilt jedoch meiner Familie und meinen Freunden, die mich in jeder Situation mit vollem Vertrauen unterstützt haben und immer für mich da waren.  
LOVE.

## **Lebenslauf**

### **Angaben zur Person**

Name

Geburtsdatum und –Ort

Familienstand

Staatsangehörigkeit

### **beruflicher Werdegang**

### Wissenschaftliche Veröffentlichungen:

#### Poster und Abstracts:

- **DGPT 2007:** Poster. “Die Überexpression von Tumornekrosefaktor-alpha potenziert die Toxizität von Paracetamol in humanen Zellen“ S. Sydor, Y. Chovolou, W. Wätjen, A. Kampkötter, R. Kahl
- **Forschertag der medizinischen Fakultät UK Essen 2008:** Poster. “Expression of fatty- acid- transport- proteins and death- receptors in human primary hepatocytes after treatment with free fatty acids (FFA)” S. Sydor, A. Canbay
- **DGVS 2009:** Poster. “Expression von Fettsäuretransport- Proteinen und Death- Rezeptoren in humanen primären Hepatozyten nach der Behandlung mit freien Fettsäuren (FFA)“ S. Sydor, G. Gerken, A. Canbay
- **EASL 2009-Special Conference on NAFLD and NASH:** Poster, ausgezeichnet mit einem Reisestipendium. ”Expression of fatty acid transport proteins and death receptors in human primary hepatocytes after treatment with free fatty acids (FFA)“ S. Sydor, P. Kocabayoglu, J. Treckmann, G. Kaiser, G. Gerken, A. Canbay
- **Forschertag der medizinischen Fakultät UK Essen 2009:** Poster. “Increased expression of FABP-1 and cFLIPL by free fatty acid (FFA) treatment is associated with reduced death- receptor mediated apoptosis in human primary hepatocytes “ S. Sydor, A. Canbay
- **GASL 2010:** Poster. “Increased expression of FABP-1 and cFLIPL by free fatty acid treatment is associated with reduced death- receptor mediated apoptosis in human primary hepatocytes” S. Sydor, P. Kocabayoglu, J. Treckmann, G. Kaiser, G. Gerken, A. Canbay



- **Jahrestagung der Gesellschaft für Gastroenterologie und Hepatologie in Nordrhein- Westfalen 2010:** Poster, ausgezeichnet mit einem Reisestipendium. „Erhöhte Expression von FABP-1 und cFLIPL durch Fettsäurebehandlung ist mit verminderter Apoptose durch Death- Rezeptoren in primären humanen Hepatozyten,“ S. Sydor, P. Kocabayoglu, J. Treckmann, G. Kaiser, G. Gerken, A. Canbay
- **AASLD 2010:** 2 Poster. "Increased expression of FABP-1 and cFLIPL by free fatty acid treatment is associated with reduced death- receptor mediated apoptosis and Erk- activation in human primary hepatocytes" S. Sydor, J.-P. Sowa, J. Treckmann, A. Wree, K. Herzer, G. Gerken, A. Canbay  
  
"Western- diet enhances expression of death receptors and fatty acid transporters in a mouse model of 70% hepatectomy and leads to increased cell proliferation in the liver" S. Sydor, Y. Gu, J.-P. Sowa, H. A. Baba, J. Treckmann, K. Herzer, A. Wree, U. Rauen, G. Gerken, A. Canbay
- **Forschertag der medizinischen Fakultät UK Essen 2010:** Poster. „Western- diet enhances expression of death- receptors and fatty acid transporters in a mouse model of 70% hepatectomy and leads to increased cell proliferation in the liver“ S. Sydor, A. Canbay
- **GASL 2011:** Poster. "Western- diet enhances expression of death receptors and fatty acid transporters in a mouse model of 70% hepatectomy and leads to increased cell proliferation in the liver" S. Sydor, Y. Gu, J.-P. Sowa, J. Treckmann, S. Mathé, A. Wree, U. Rauen, G. Gerken, A. Canbay
- **Jahrestagung der Gesellschaft für Gastroenterologie und Hepatologie in Nordrhein- Westfalen 2011:** Poster "In einem Maus- Modell der 70% Hepatectomie erhöht eine Western- Diät- Fütterung die Expression von Death- Rezeptoren und Fettsäuretransport- Proteinen und verstärkt die Zellproliferation im Lebergewebe“ S. Sydor, Y. Gu, J.-P. Sowa, L. P. Bechmann, J. Treckmann, G. Gerken, A. Canbay

**Erklärung:**

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs.2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-  
Fakultät zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema  
„Die Rolle von Fettsäuretransportproteinen und Death Rezeptoren in der  
Leberregeneration im Statose-Modell“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete  
und den Antrag von Svenja Sydor befürworte.

Essen, den \_\_\_\_\_

Unterschrift d. wissenschaftl. Betreuers / Mitglieds der Universität Duisburg-Essen

**Erklärung:**

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs.2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-  
Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation  
selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel  
bedient habe.

Essen, den \_\_\_\_\_

**Erklärung:**

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs.2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-  
Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen  
bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese  
Arbeit von keiner andern Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den \_\_\_\_\_