

Aus der Klinik für Allgemein-, Visceral- und Transplantationschirurgie
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Genetisch modifizierte Upcyte® Hepatocyten als leistungsfähige Alternative zu primär humanen Hepatocyten und der hepatocellulären Karzinomzelllinie HepG2 im *in vitro* Steatosemodell

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Sebastian Sperling
aus Bamberg

Datum der Promotion: 07.12.2018

Für Emilie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis	1
Tabellenverzeichnis.....	2
Abkürzungsverzeichnis	3
Zusammenfassung.....	5
Abstract	7
1 Einleitung.....	8
1.1 NAFLD	8
1.1.1 Epidemiologie	8
1.1.2 Pathogenese.....	9
1.1.3 Diagnostik	12
1.1.4 Therapie	12
1.2 Etablierte NAFLD Modelle.....	12
1.2.1 <i>In vivo</i> Modelle	13
1.2.1.1 Genetisch modifizierte Nagetiermodelle	13
1.2.1.2 Diätarische Nagetiermodelle	13
1.2.2 <i>Ex vivo</i> Modelle	14
1.2.3 <i>In vitro</i> Modelle	14
1.2.3.1 Humane Hepatozyten	15
1.2.3.2 Immortalisierte Hepatozyten	16
1.2.3.3 Säugetier Hepatozyten.....	16
1.2.3.4 <i>In vitro</i> Annäherung an die NAFLD	17
1.2.3.5 Genetisch manipulierte Hepatozyten als mögliches NAFLD-Modell	17
2 Zielsetzung.....	19

3	Material und Methoden.....	20
3.1	Materialien	20
3.1.1	Geräte	20
3.1.2	Verbrauchsmaterial	21
3.1.3	Chemikalien	21
3.1.4	Lösungen und Puffer	22
3.1.4.1	Kulturbedien	22
3.1.4.2	Zellysepuffer	23
3.1.4.3	Western Blot	23
3.1.4.4	MTT-Test Lösungen.....	25
3.1.4.5	Ureatest Lösungen	25
3.1.4.6	ELISA-Lösungen.....	25
3.1.5	Antikörper	26
3.1.6	Kits und Assays.....	26
3.1.7	Humane Hepatozyten	27
3.1.8	Zelllinie HepG2.....	28
3.1.9	Upcyte [®] -Hepatozyten.....	28
3.2	Methoden.....	28
3.2.1	Zellbiologische Methoden.....	28
3.2.1.1	Zellkultur	28
3.2.1.2	Bestimmung der Zellzahl	29
3.2.1.3	Erzeugung der Upcyte [®] -Hepatozyten.....	29
3.2.1.4	Steatoseinduktion	30
3.2.1.5	Insulininkubation	30
3.2.2	Fluorometrische Analyse	31
3.2.2.1	Oil Red O Färbung	31
3.2.2.2	Sulforhodamine B Färbung	31

3.2.2.3	MTT-Test	32
3.2.2.4	Glucosebestimmung	32
3.2.2.5	Glycogenbestimmung	33
3.2.2.6	Ureabestimmung	34
3.2.2.7	Aminotransferasen- und Lactatdehydrogenasebestimmung	34
3.2.3	Proteinbiochemische und immunologische Methoden	36
3.2.3.1	Proteinisolierung	36
3.2.3.2	Messung der Proteinkonzentration	36
3.2.3.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	37
3.2.3.4	Western Blot und Proteindetektion	37
3.2.3.5	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	38
3.3	Datenbanken und Software	39
3.4	Statistische Auswertung	39
3.4.1	Deskriptive Statistik	39
3.4.2	Two-Way analysis of variance (ANOVA) und Bonferroni -Post-Test	39
4	Ergebnisse	41
4.1	Vorexperimente	41
4.2	Lipidakkumulation	42
4.3	Lipotoxizität	44
4.3.1	Verletzung der Membranintegrität durch Lipotoxizität	44
4.3.2	Lipotoxizität anhand der Gesamtproteinexpression	46
4.4	Metabolische Aktivität	48
4.5	Glucosemetabolismus	49
4.5.1	Glucoseverbrauch	50
4.5.2	Glycogenspeicherung	51
4.6	Basale hepatische Synthesefähigkeiten	52
4.6.1	Albuminsynthese	53

4.6.2	Ureasyntese	55
4.6.3	Zytosolischer Transaminasegehalt	56
4.7	Intrazelluläre Insulinsignaltransduktion	58
4.7.1	p44/42 MAPK (ERK 1/2) (Thr202/Tyr204)	59
4.7.2	pAkt (Ser473)	61
4.7.3	pGSK-3 α/β (Ser21/9)	62
4.7.4	pFoxO1 (Ser256)	64
5	Diskussion	66
5.1	Lipidakkumulation und Lipotoxizität im verwendeten NAFLD-Modell	66
5.2	Kohlenhydratstoffwechsel der HepaFH3	70
5.3	Basale hepatische Syntheseleistung der HepaFH3	75
5.4	Signaltransduktion und induzierter Proliferationsstopp der HepaFH3	79
5.5	Schlussfolgerung	82
5.6	Ausblick	85
	Literaturverzeichnis	86
	Eidesstattliche Versicherung	93
	Lebenslauf	94
	Publikationsliste	95
	Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen	96
	Danksagung	97

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Pathogenese und natürlicher Verlauf der nichtalkoholischen Fettlebererkrankung.	11
Abb. 2: Evaluation der intrazellulären Lipidakkumulation der Hepatocyten.....	42
Abb. 3: Repräsentative mikroskopische Bildausschnitte der Kontroll- und Steatosegruppe der HepaFH3 (ca. 10x vergrößert)	43
Abb. 4: Darstellung der zytosolischen Enzymaktivität im Zellmedium zur Evaluierung lipotoxischer Effekte.	45
Abb. 5: Semiquantitative und quantitative Bestimmung des zellulären Proteingehaltes der Hepatocyten zur Evaluierung lipotoxischer Effekte und zur Verdeutlichung der Biomasseproduktion und Normierungsgrundlage.....	47
Abb. 6: Semiquantitative Bestimmung der zellulären NADH- und NADPH-Synthese der Hepatocyten mittels MTT-Test zur Evaluierung der grundlegenden Stoffwechselaktivität und lipotoxischer Effekte.	49
Abb. 7: Quantitative Bestimmung von $\Delta c_{\text{Glucose}}$ im Kontroll-/Steatosemedium	50
Abb. 8: Quantitativer Nachweis der gespeicherten Glycogenmenge	52
Abb. 9: Quantitativer Nachweis der Albuminsynthese mittels Humanalbumin-ELISA.....	54
Abb. 10: Quantitativer Nachweis der Ureasyntese.....	55
Abb. 11: Quantitativer Nachweis der intrazellulären Transaminasen-Aktivität	57
Abb. 12: Repräsentative Ausschnitte des Western Blot	59
Abb. 13: Vergleich der 44/42 MAPK (ERK 1)-Phosphorylierung	60
Abb. 14: Vergleich der Akt-Phosphorylierung.....	61
Abb. 15: Vergleich der GSK-3 α/β -Phosphorylierung	63
Abb. 16: Vergleich der FoxO1-Phosphorylierungen	64
Abb. 17: Schematische Darstellung des Enzymefflux	68
Abb. 18: Schematische Darstellung des MTT-Testprinzipes.....	70
Abb. 19: Schematische Darstellung der metabolischen Unterschiede steatotischer PHH und steatotischer hepatischer Zelllinien	73
Abb. 20: Vereinfachte schematische Darstellung der Regulation des Harnstoffzyklus.....	76
Abb. 21: Vereinfachte Mechanismen der hepatischen Insulinsensitivität.....	80
Abb. 22: Ergebnisübersicht zur Verdeutlichung der Stellung von HepaFH-Zellen zwischen PHH und HepG2.	84

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ursachen für die sekundäre Steatosis hepatis nach Chalasani et al., 2012	8
Tabelle 2: PHH und HepaFH3 Medien	22
Tabelle 3: HepG2 Medien	22
Tabelle 4: Modifizierter RIPA-Puffer	23
Tabelle 5: 10x TBST - Stammlösung.....	23
Tabelle 6: 10x Elektrophoresepuffer - Stammlösung.....	23
Tabelle 7: 10x Blottingpuffer nach Towbin, ohne SDS	23
Tabelle 8: 5x SDS-Ladepuffer (100 ml).....	24
Tabelle 9: Elektrophoresegele für 2 0,75 mm Gele.....	24
Tabelle 10: Elektrophoresegelpuffer	24
Tabelle 11: Verwendete MTT-Lösungen	25
Tabelle 12: Herstellung der Ureatestlösungen	25
Tabelle 13: Konzentrationen der verwendeten ELISA-Fertiglösungen	25
Tabelle 14: Verwendete Antikörper	26
Tabelle 15: Verwendete Software und Datenbanken	39

Abkürzungsverzeichnis

ALT	Alanin-Aminotransferase
AST	Aspartat-Aminotransferase
BCA	4,4'-Dicarboxy-2,2'-bichinolin
CYP450	Cytochrom P450
DAG	Diacylglycerol
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FFS/FFA	freie Fettsäure/ free fatty acids
FKS/FCS	fetales Kälberserum/ fetal calf serum
GSK	Glycogensynthase-Kinase
HCC	hepatozelluläres Karzinom
HELLP	engl. Akronym: H aemolysis, E levated L iver enzyme levels, L ow P latelet count
HPV	humanen Papillomavirus
HRP	Meerrettichperoxidase
IRS	Insulinrezeptorsubstrat
LCAT	Lecitin-Cholesterin-Acyltransferase
LDH	Lactat-Dehydrogenase
MCD	methionin- und cholindefiziente Diät
MDH	Malat-Dehydrogenase
NAFL	Fettleber ohne Entzündung
NAFLD	nichtalkoholische Fettlebererkrankung
Nampt	Nicotinamidphosphoribosyltransferase
NASH	nichtalkoholischen Steatohepatits

NHANES	National Health and Nutrition Examination Survey
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PD	Zellpopulationsverdopplung
PDH	Pyruvatdehydrogenase
PHH	primär humane Hepatozyten
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PVDF	Polyvinylidenfluorid
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SRB	Sulforhodamine B
TAG	Triacylglycerol
TBST	TRIS gepufferte Salzlösung
UPR	Unfolded Protein Response
VLDL	Very Low Density Lipoproteine

Zusammenfassung

Mit zunehmendem kalorienreichen und inaktiven Lebensstils, war in den letzten Jahrzehnten ein Anstieg der Adipositas-Prävalenz und zugehöriger Insulinresistenz in der Bevölkerung zu beobachten. Hiermit verbunden wurde die NAFLD zu einer der am weitesten verbreiteten Lebererkrankungen der westlichen Welt. Die NAFLD umfasst das Erkrankungsspektrum von der einfachen Fettleber ohne Entzündung (NAFL für „nonalcoholic fatty liver“), hin zur nichtalkoholischen Steatohepatitis (NASH für „nonalcoholic steatohepatitis“) mit Entzündungszeichen und klarer Tendenz zur Progression des Krankheitsbildes. Aufgrund des noch unvollständig verstandenen Krankheitsbildes ist der Bedarf an Modellen hoch, die zu Verständnis der Ursachen und der Progression der NAFLD beitragen. Vor allem die molekularen Mechanismen und die Signaltransduktion, die der Fettleber und ihrer Entstehung zugrunde liegen lassen sich am ehesten durch hepatozytäre *in-vitro* NAFLD Modelle klären. Da primäre humane Hepatozyten (PHH) in ihrer Verfügbarkeit aber stark limitiert sind und bisherigen Alternativen eine geringere Aussagekraft aufweisen, ist der Bedarf an einer potenten PHH-Alternative groß. Ein vielversprechender Ansatz ist die Erzeugung genetisch veränderter PHH durch die Upcyte[®]-Technologie.

Die Upcyte[®]-Hepatozyten wurden dafür auf ihre Einsatzfähigkeit in einem gängigen *in-vitro* NAFLD-Modell getestet. Der vielversprechende Upcyte[®]-Klon HepaFH3 wurde bei allen Versuchen stets mit primären humanen Hepatozyten und HepG2 Zellen verglichen. Der Schwerpunkt wurde auf die Untersuchung der Lipidakkumulation und der damit verbundenen Lipotoxizität gelegt, sowie auf den Überblick über den Energie- und Glucosestoffwechsel, grundlegender hepatischer Funktionen.

Hochkonfluente HepaFH3 Kulturen zeigten sich durch Kontaktinhibition den PHH ähnlicher, als ihre proliferierenden Pendanten. Es zeigte sich hierbei eine gute Lipidspeicherfähigkeit der HepaFH3. In den Untersuchungen des NADH-Grundumsatzes, der Glucoseaufnahme und der Glycogenspeicherung lagen die HepaFH3 stets im Kontinuum zwischen den HepG2 und den PHH und waren der eingesetzten Zelllinie überlegen. Hinsichtlich der Ausprägung der basalen hepatischen Fähigkeiten wie der Urea-, Albumin-, und Aminotransferasesynthese konnte die Leistung der HepaFH3 nur knapp an die der HepG2 heranreichen. Die Albuminsyntheserate der HepG2 war hier 11x höher als die der HepaFH3-Klone. Außerdem zeigte sich in den Upcyte[®]-Hepatozyten eine Abnahme dieser Syntheserate mit zunehmender Anzahl der durchgeführten Passagen.

Der Vorteil der Upcyte[®]-Hepatozyten besteht in der Fähigkeit der erhaltenen Kontaktinhibition. Diese Fähigkeit ist vor allem in einem energiestoffwechsellastigen Modell von Vorteil, da sich hierdurch, der Grundumsatz reduzieren lässt, wodurch der Klon den PHH nahe kommt.

Aufgrund des eingeschränkten Einsatzgebietes durch die aufgezeigten Defizite, der Upcyte[®]-Hepatozyten, können diese nicht als vollständiger Ersatz für PHH im NAFLD-Modell angesehen werden. Ob die HepaFH3 mit ihrem niedrigeren Grundumsatz den etablierten Zelllinien im NAFLD-Modell überlegen sind, bleibt Gegenstand zukünftiger Arbeiten.

Abstract

The prevalence of adipositas and the related insulin resistance among western societies increased in the last few decades. Closely related to these findings, the NAFLD (non alcoholic fatty liver disease) became one of the most common liver diseases in westernized countries. The NAFLD comprises several stages of this liver disease, ranging from simple fatty liver all the way to cirrhosis. Owing to a lacking grasp of NAFLD, there is a high demand for experimental models. Especially the molecular mechanisms should be elucidated by using hepatocellular *in-vitro* NAFLD models. But due to the restricted availability of primary human hepatocytes (PHH) a promising approach might be genetically engineered human hepatocytes: the Upcyte[®]-hepatocytes.

Upcyte[®]-hepatocytes were tested in a common *in-vitro* NAFLD model. Therefore, we used the promising Upcyte[®]-clone HepaFH3. The mentioned clone, has been compared with PHH and the cell line HepG2 in all tests. The main focus was the examination of the lipid accumulation and the related lipotoxicity, as well as an oversight of the energy- and glucose metabolism and basic hepatic capabilities.

Because of their ability to show contact inhibition the highly confluent HepaFH3 seemed to be more similar to PHH compared with their proliferating pendants. HepaFH3 showed a considerable capability to store lipids. Lipotoxicity was not detected. Concerning the NADH basal metabolic rate, glucose uptake and glycogen storage, HepaFH3 ranged always in the continuum between PHH and HepG2. Regarding the basic hepatic capabilities (e.g. urea-, albumin- and amino transferase synthesis), HepaFH3 underperformed compared to HepG2. The albumin synthesis rate for example was 11x lower than the one of HepG2. Furthermore, HepaFH3 showed a decreasing rate of synthesis with an increasing amount of passages.

A major advantage of Upcyte[®]-hepatocytes, as it became evident, was the ability to show contact inhibition. This capability is of particular advantage in an energy metabolism model, like the used NAFLD model, due to a reduced basal metabolic rate. However, the minor specific hepatic capabilities of HepaFH3 will restrict their usage apart from energy metabolism models. A further disadvantage might be the not fully elucidated mechanism of the used Upcyte[®]-factors.

The question, whether HepaFH3 might be a more suitable replacement for carcinomatous cell lines, because of their lower oxidative capacities remains object of further investigations.

1 Einleitung

1.1 NAFLD

Die „nichtalkoholischen Fettlebererkrankung“ (NAFLD für „nonalcoholic fatty liver disease“) bezeichnet eine Verfettung der Leber (Steatose hepatis), welche einem Lipidanteil über 5% des Lebergewichts entspricht. Hierbei darf die Steatose der Leber laut Definition nicht maßgeblich durch Alkoholkonsum zustande gekommen sein (Maximale Trinkmenge für Frauen: ≤ 20 g/d; für Männer: ≤ 30 g/d). Die NAFLD umfasst das Erkrankungsspektrum von der einfachen Fettleber ohne Entzündung (NAFL für „nonalcoholic fatty liver“), hin zur nichtalkoholischen Steatohepatitis (NASH für „nonalcoholic steatohepatitis“) mit deutlichen Entzündungszeichen wie z.B. Hepatozytenschädigung mit Ballonierung, Apoptose sowie Nekrose und Leberfibrose. Es dürfen überdies keine weiteren Gründe für eine sekundäre Fettlebererkrankung vorliegen (siehe Tabelle 1) ⁽¹⁾.

Tabelle 1: Ursachen für die sekundäre Steatosis hepatis nach Chalasani et al., 2012

Ursachen für sekundäre Lebersteatose	
<i>Makrovesikuläre Steatose</i>	<i>Mikrovesikuläre Steatose</i>
Alkoholkonsum	Reye-Syndrom
Hepatitis C	Akute Schwangerschaftsfettleber
Lipodystrophie	HELLP-Syndrom
Hungerzustände	Stoffwechselstörungen (z.B.: Lecitin-Cholesterin-Acyltransferase [LCAT]-Mangel)
Parenterale Ernährung	Medikamente (z.B.: Valproinsäure, antiretrovirale Substanzen)
Abetalipoproteinämie	
Medikamente (z.B.: Amiodaron, Methotrexat, Steroide)	

1.1.1 Epidemiologie

Aufgrund des zunehmenden Anteils an Fettleibigkeit, kalorienreicher Essgewohnheiten, der Insulinresistenz und einem körperlich inaktiven Lebensstils wurde die NAFLD in den letzten Jahrzehnten eine der am weitesten verbreiteten Lebererkrankungen der westlichen Welt ⁽²⁾. In Europa und in den Vereinigten Staaten ist die NAFL inzwischen die am häufigsten diagnostizierte Ursache einer chronischen Lebererkrankung. Die Zunahme der Prävalenz ist jedoch auch durch das steigende Problembewusstsein der medizinischen Fachgesellschaft für diese Erkrankung be-

dingt^(3, 4). In Europa schätzt man die Häufigkeit der NAFLD inzwischen auf 20-30%⁽⁴⁾. Eine aktuelle Studie der die Daten der National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) zugrunde liegen, weist auf eine NAFLD-Prävalenz von 30% in den USA zwischen 2011 und 2012 hin⁽⁵⁾. Laut NHANES nahm die Diagnose der NAFLD im Bereich der chronischen Lebererkrankungen zwischen 1988 und 2008 um 28% zu (von 47% auf 75%). Als Grund hierfür wurde neben den bereits erwähnten Gründen auch die zunehmende Alterung der Gesellschaft genannt⁽³⁾. Zusammen mit der NAFLD wird im selben Zeitraum auch ein starker Anstieg der anderen Komponente des metabolischen Syndroms registriert: Adipositas um 12%, viszerale Adipositas um 16%, Diabetes mellitus Typ-2 um 3,5%, Insulinresistenz um 12% und die arterielle Hypertonie ebenfalls um 12%⁽³⁾.

Man geht weltweit von einer Prävalenz von 6-33% (Median von 20%) aus. Die Extremform der NAFLD, die NASH, tritt mit einer geschätzten Prävalenz von 3-5% weltweit auf^(6, 7).

1.1.2 Pathogenese

Eine essentielle Rolle in der Pathogenese der NAFLD und der Progression zur NASH spielen laut der "Multiple-Hit"-Theorie, die Insulinresistenz, oxidativer Stress und die daraufhin folgende Entzündungskaskade. Der erste "Hit" beschreibt die Entstehung der hepatischen Steatose durch die Aufnahme großer Mengen an freien Fettsäuren. Diese akkumulieren in den Zellen in Form von Triacylglycerol (TAG) und führen zur Steatose. Hierbei gibt es bislang keinen Anhalt, dass TAG per se toxisch sind⁽⁸⁾. Die freien Fettsäuren (FFA für "free fatty acids") der hepatozellulären TAG, sowie konsekutiv auch die Very Low Density Lipoproteine (VLDL), stammen vorwiegend aus drei verschiedenen Quellen⁽⁹⁾:

- 1.) Aus der Lipolyse, mit Freisetzung der FFA aus den hydrolysierten TAG des weißen Fettgewebes (ca. 60% der hepatischen TAG);
- 2.) FFA, die durch die Leber selbst hergestellt werden, mittels *de novo* Lipogenese (ca. 25% der hepatischen TAG);
- 3.) Den mit der Nahrung zugeführten FFA, welche nach Passage der Darmwand über die Lymphe, in Form der Chylomikrone, unmittelbar im Blut zur Verfügung stehen (ca. 15% der hepatischen TAG)⁽¹⁰⁾.

Diesem ersten Schritt, der blanden Steatose, folgt, bei weiterhin übermäßigem Anfluten von FFA, die Entstehung der Steatohepatits⁽⁸⁾. Diese entsteht durch komplexe Interaktionen zwi-

schen Hepatozyten, Kupfferschen Sternzellen, Fettgewebszellen, Entzündungsmediatoren und radikalen Sauerstoffspezies. Dieser zweite "Hit" entspricht mehrerer parallel stattfindender, schädigender Einflüsse auf die Leber. Der genaue Mechanismus der lipidvermittelten toxischen Effekte von FFA auf Leberzellen ist im Detail noch nicht bekannt. Die geläufigste Annahme ist die Schädigung verschiedener hepatozellulärer Strukturen durch eine vermehrte Oxidation der FFA, sowohl mitochondrial, als auch nicht-mitochondrial (z.B. über CYP2E1), mit nachfolgend übermäßiger Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS für "reactive oxygen species")⁽⁸⁾. Die entstandenen intrazellulären ROS schädigen die Zelle auf verschiedene Wege⁽⁸⁾:

- 1.) Durch Lipidperoxidation der membranständigen Fettsäuren, der Phospholipidzusammensetzung, des Cholesterolgehaltes und Störungen des ceramidabhängigen Signaltransduktion;
- 2.) Durch Beeinträchtigung der Aktivität der mitochondrialen Atmungskette durch Hemmung von Cytochrom C und Schädigung der mitochondrialen DNS, sowie weiterer mitochondrialer Enzyme der Atmungskette;
- 3.) Durch Induktion von sog. ER-Stress, mit Beeinflussung der Proteinsynthese, durch Protein-oxidation und Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen im ER. Dies führt zur Unfolded Protein Response (UPR), einer physiologischen Antwort des ERs. Die UPR besteht aus der Aktivierung einer Signalkaskade mit dem Ziel der Steigerung der Transkription von ER-residenten Chaperonen, einer generell verminderten Proteinbiosynthese und der Degradation fehlgefalteter Proteine. Reduziert die UPR nicht innerhalb eines gewissen Zeitraumes den ER-Stress, so führt dies zum Zelltod, mittels Apoptose^(8, 11).

Das Voranschreiten der Steatose zur NASH und die konsekutiven Mechanismen, verantwortlich für die Aktivierung der Entzündungssignalwege in der NAFLD und deren Erhalt, werden zunehmend besser verstanden. Der Überfluss an FFA bietet verschiedene mögliche Effekte, welche zur NASH führen können. Beispielsweise konnte nachgewiesen werden, dass die UPR zur Aktivierung von JNK-Signalwegen mit zugehöriger inflammatorischer Antwort führt.

Weiteren Progress erfährt die NASH, wie in der "Multiple Hit" Theorie propagiert, durch Freisetzung von Mediatoren wie z.B. Leptin, IL-6, TNF α und Adiponectin durch das endokrinologisch aktive Fettgewebe. Diese haben einerseits eine unmittelbar inflammatorische Wirkung, andererseits bewirkt Leptin beispielsweise eine gesteigerte Hydrolyse von TAG in der Leber mit erhöht intrazellulär verfügbaren FFA⁽¹²⁾. Auch ein lipidinduzierter Defekt des Insulinsignalweges mit darauffolgender Insulinresistenz führt intrazellulär zu einem vermehrten

Anfluten von ROS durch die gesteigerte β -Oxidation von FFA und unterhält hierdurch die inflammatorischen Prozesse ⁽⁸⁾.

Unterhalten werden die Entzündungsprozesse (im Sinne eines „second hit“) außerdem durch eine fett- und kohlenhydratreiche Diät. Diese führt bereits nach drei Tagen zu deutlich messbar erhöhten Serumspiegeln von zirkulierenden Lipopolysacchariden (LPS) durch Stimulation des Mikrobioms. Die Endotoxinämie führt nicht nur zu einer generalisierten Entzündung, sondern erhöht zusätzlich den hepatischen TAG-Anteil ⁽⁸⁾. Ein weiterer Grund für den Erhalt der Steatose unter inflammatorischen Bedingungen liegt möglicherweise auch in der verminderten Fähigkeit der Hepatozyten TAGs Apolipoprotein B-100 (ApoB-100) vermittelt zu sezernieren, da aufgrund der UPR die ApoB-100 Translation supprimiert ist ⁽⁸⁾.

Die genannten Entzündungsreaktionen führen zu zellulären Funktionseinschränkungen, wie zum Beispiel der Fähigkeit zur Autophagie ⁽¹³⁾. So führt die wiederholte Schädigung der Hepatozyten schließlich durch chronische insuffiziente Regeneration zur hepatischen Fibrose. Hierbei wird die extrazelluläre Matrix (Kollagen, Proteoglycane, Glycoproteine und Glycosaminoglycane) hauptsächlich durch Ito-Zellen synthetisiert, nach fibrogenen Stimuli anderer nicht-parenchymatöser Zellen. Im Verlauf der hepatischen Fibrogenese kann es auch zur Transition von Hepatozyten und Cholangiozyten hin zu Mesenchymzellen kommen ⁽⁸⁾.

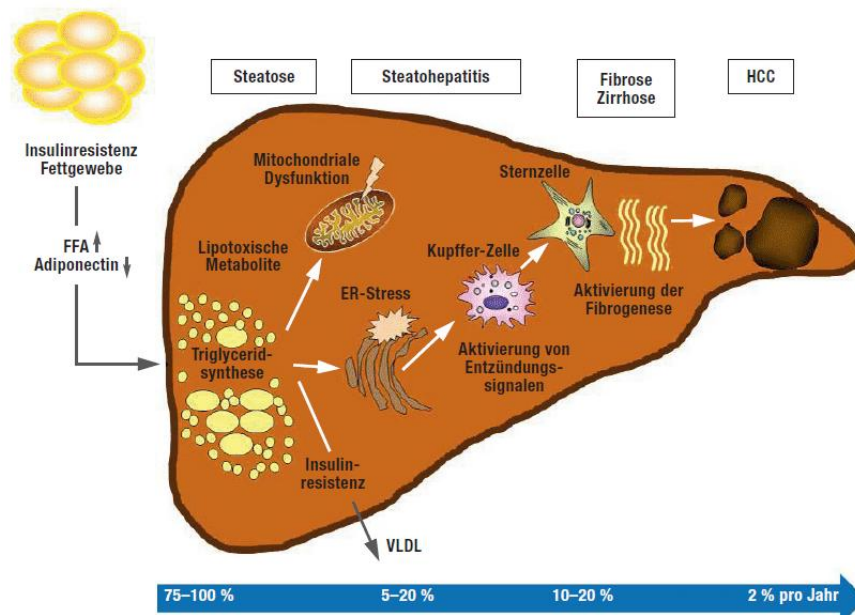


Abb. 1 ⁽¹⁴⁾: Pathogenese und natürlicher Verlauf der nichtalkoholischen Fettlebererkrankung. Angegeben sind die Häufigkeiten der einzelnen Krankheitsstadien (modifiziert nach Cusi et al., 2012) ⁽¹⁵⁾.

Unter bestehender Inflammation kann die Leberfibrose zur Zirrhose voranschreiten. Die jährliche Auftretenswahrscheinlichkeit eines hepatozellulären Karzinoms (HCC) bei Vorliegen einer Zirrhose liegt bei ca. 2% ⁽¹³⁻¹⁶⁾.

1.1.3 Diagnostik

Bei Diagnosestellung klagen die meisten Patienten über keine Beschwerden oder sonstige Krankheitsanzeichen, da die Befunde einer NAFLD eher unspezifisch sind. Vermehrte Müdigkeit oder ein Druckgefühl im rechten Oberbauch sind hier die häufigsten Schilderungen. Auch die üblichen Leberlaborwerte sind häufig normal. Einzig die Alaninaminotransferase (ALT) ist oft isoliert oder im Rahmen der Leberlaborparameter erhöht ⁽¹⁷⁾. Der Goldstandard in der NAFLD-Diagnostik ist noch immer die Leberbiopsie, da sich die NASH formal nur histologisch bestätigen lässt. Eine sensitive jedoch weniger invasive Methode stellt die Ultraschalluntersuchung da. Die Genauigkeit in der Erkennung der NAFLD sinkt jedoch mit abnehmendem Steatosegrad (Sensitivität: 60-94%, Spezifität: 66-97%) ⁽¹⁸⁾. Ein generelles NAFLD-Screening wird aufgrund der Beschwerdefreiheit, des geringen positiv prädikativen Wertes und der relativ hohen Kosten laut US-Leitlinie nicht empfohlen ⁽¹⁾. Die deutsche S3-Leitlinie empfiehlt ein Sonographie-Follow-Up für Zirrhose und NASH-Patienten ⁽¹³⁾.

1.1.4 Therapie

Die pharmazeutischen Therapien der NAFLD sind aktuell sehr limitiert ⁽¹⁹⁾. Medikamente, die den Fibroseverlauf der NASH günstig beeinflussen, gibt es bislang nicht. Die übrigen Therapiemöglichkeiten bei NAFLD und NASH sind hauptsächlich auf Ernährung- und Lebensstiländerungen beschränkt. Daher besteht die wirksamste Therapie in der generellen Gewichtsreduktion zusammen mit einer Bewegungssteigerung. Dies verbessert die histologischen Befunde nachweislich ⁽¹⁾.

1.2 Etablierte NAFLD Modelle

Trotz der steigenden Bedeutung der NAFLD als Krankheit in der westlichen Welt ist noch wenig über die Pathophysiologie der NAFLD bekannt. Aktuell kann man nicht mit Gewissheit sagen wie die Progression zur NASH vonstattengeht ⁽²⁰⁾. Daher ist der Bedarf an geeigneten NAFLD-Modellen groß. Denn die NAFLD ist, mitsamt ihrer komplexen Pathomechanismen, der langwie-

rigen Entwicklung zur NASH, Leberfibrose und letztlich zur Zirrhose, am lebenden Modell hinlänglich untersucht ⁽²¹⁾. In den nachfolgenden Kapiteln werden die gängigen NAFLD-Modelle vorgestellt werden.

1.2.1 *In vivo* Modelle

Die ersten molekularen Mechanismen und Signalkaskaden die an der Entwicklung der NAFLD beteiligt sind, wurden zunächst aus Tiermodellen gewonnen und durch klinische Studien bestätigt ⁽²²⁾. Deswegen werden nachfolgend zur Übersicht, die meist eingesetzten *in vivo*-NAFLD-Tiermodelle vorgestellt.

1.2.1.1 Genetisch modifizierte Nagetiermodelle

Die obese-Maus auch ob-Maus genannt besitzt eine spontane Mutation ihres, Leptin codierenden obese-Gens mit einem daraus resultierendem Leptindefizit. Leptin zirkuliert im Körper, überwindet die Blut-Hirn-Schranke und sorgt im Hypothalamus für das Sättigungsgefühl. Das Defizit führt zu einem hyperphagen, inaktiven, diabetischen Phänotyp, der mit einer ausgeprägten NAFLD vergesellschaftet ist ^(23, 24). Der Nachteil dieses Mausmodells ist, dass die NAFLD nicht spontan zur NASH voranschreitet. So ist es notwendig kleine Dosen an Endotoxin, eine sehr fettreiche oder eine "methionin- und cholindefiziente Ernährung zu verwenden" ⁽²⁵⁾.

Die heterozygote Mutation des Agouti-Gens (KK-Ay/a) resultiert in einem Verlust an Melanocortin mit einer beeinträchtigten hypothalamischen Appetitsuppression ⁽²⁶⁾. In einem ähnlichen Mausmodell wurde der Melanocortin-4-Rezeptor gezielt beeinflusst ⁽²⁷⁾. Sowohl den Phänotyp, als auch das Problem mit dem benötigten "second hit" für die Krankheitsprogression, haben diese Mausmodelle mit der ob-Maus gemein.

1.2.1.2 Diätarische Nagetiermodelle

Das meistverwendete Ernährungsmodell zur Darstellung der NAFLD ist das der methionin- und cholindefizienten Diät (MCD). Durch das Weglassen der essenziellen Ernährungsbestandteile entwickeln die Nagetiere sehr schnell eine Fettleber, da verstärkt FFA aufgenommen und deutlich weniger VLDL sezerniert werden. Nach zwei Wochen folgt auf die Steatose bereits Entzündungen und Leberzellnekrosen mit perizentraler Fibrose ⁽²⁸⁾. Der deutlichste Nachteil dieses Modells ist, dass die üblichen Risikofaktoren (z.B.: Insulinresistenz, Übergewicht) für die Entwicklung

der NAFLD vollständig fehlen und überdies hinaus zu einem ausgeprägten Gewichtsverlust kommt ⁽²⁹⁾.

Evidente Modelle zur Entwicklung der NAFLD in Nagern sind die fettreichen Diäten (High Fat Diets). Abhängig von der Dauer der Diät zeigen die Nager neben der Adipositas, Eigenschaften die der NAFLD sehr nahe kommen, wie verminderte Glucosetoleranz und Dyslipidämie ⁽³⁰⁾. Jedoch benötigen diese Modelle mehr Zeit für eine entsprechenden NAFLD-Progression, als das gängige MCD-Modell und die erreichten Krankheitsbilder reichen nicht an die Schwere der durch MCD verursachten heran ⁽³¹⁾.

Die neuesten Modelle verwenden eine Kombination aus fett - und fructosereicher Ernährung (Fast Food Diet / Western Style). Die Ergebnisse erscheinen vielversprechender als die der reinen High Fat Diet, aber für eine ausreichende Beurteilung liegen zum aktuellen Zeitpunkt nicht genügend Studien vor ⁽³²⁾.

1.2.2 *Ex vivo* Modelle

Ein komplexes biologisches Modell stellen auch die sogenannten Präzisionsgewebeschnitte der Rattenleber dar. Dieses Modell vereint eine komplexe Leberarchitektur mit den zugehörigen nicht-parenchymalen Zellen, mit einer Kultivierung unter standardisierten Bedingungen. Andererseits verhindert die Komplexität der Herstellung, mit Schwankung der Qualität der Gewebeschnitte weitgehend die großflächige Anwendung dieses Modells ^(33, 34).

1.2.3 *In vitro* Modelle

Nachdem die ersten Untersuchungen zur NAFLD zunächst in Tiermodellen stattfanden und klinisch bestätigt wurden, werden nun zunehmend *in-vitro* Ansätze benutzt, um die molekularen Mechanismen hinter der NAFLD zu untersuchen. Daher sind im Vergleich zu Tiermodellen aktuell verhältnismäßig wenige *in-vitro* Daten zur NAFLD verfügbar. Bei zum besseren Verständnis anderer Lebererkrankungen haben sich *in-vitro* Modelle als unverzichtbar erwiesen ⁽²¹⁾. Die Vorteile der *in-vitro* Modelle liegen in der einfachen Anwendbarkeit zur Untersuchung gezielter Fragestellungen. Durch den vereinfachten Aufbau, im Vergleich zur Komplexität des gesamten Organs, sind die *in-vitro* Modelle in ihrer Aussagekraft eingeschränkt ⁽³⁴⁾. Der Nutzen der *in-*

in vitro Modelle liegt somit in der isolierten Untersuchung der molekularen NAFLD-Mechanismen. So bietet die *in-vitro* Co-Kultur der Hepatozyten zusammen mit Adipozyten oder den nicht-parenchymalen Leberzellen (Endothelzellen, Kupffer-Zellen und Ito-Zellen) die Möglichkeit selektiv die Zell-Zell-Interaktion zu untersuchen. Als zwei Beispiele seien hier die Co-Kultur von Hepatozyten mit Ito-Zellen genannt, zur Etablierung eines *in-vitro* Fibrogenesemodells bei Überladung von Hepatozyten mit FFA⁽³⁵⁾, sowie die Co-Kultur von PHH mit Adipozyten, welche eine zelluläre Insulinresistenz in den Hepatozyten hervorrufen kann⁽³⁶⁾. Die Interaktion mehrerer Zellen darzustellen ist aktuell nur schwerlich möglich und stellt bislang eine Domäne der *in-vivo* Modelle dar⁽³⁴⁾. Um zukünftig mehr aussagekräftige Daten aus *in-vitro* Modellen zu gewinnen, muss zunächst ein funktionierendes *in-vitro* NAFLD Modell etabliert werden. Dies beinhaltet auch die Auswahl eines geeigneten leberzellbasierten Modells, da es große Unterschiede in der Verfügbarkeit und der Aussagekraft der gängigen Leberzellen gibt.

1.2.3.1 Humane Hepatozyten

Der Bedarf an humanen Hepatozyten ist groß, da die Verwendung dieser Zellen vielfältig ist, wie zum Beispiel in Bereichen der Pharmakokinetik und Pharmakotoxizität, in der Erforschung der Pathomechanismen anderer Lebererkrankungen, in der klinischen Translation zur Leberunterstützung und weiterer biomedizinischer Forschungsfelder^(21, 37). Der Gebrauch der primär humanen Hepatozyten (PHH) in der biomedizinischen Forschung stellt nach wie vor den Goldstandard der zellbasierten NAFLD-Modelle dar. Ihre Verwendung beantwortet die klinisch humanzentrierte Fragestellung am treffendsten⁽³⁸⁾. Die limitierte Verfügbarkeit humaner Leberzellen liegt überwiegend in der anspruchsvollen Kooperation, von leberchirurgischem Zentrum und entsprechender Arbeitsgruppe, begründet. Diese ist notwendig zur regelmäßigen erfolgreichen Isolation von PHH. Da erfolgreiche PHH-Isolationen überdies nicht vorhersagbar sind, ist auch die Planbarkeit der darauffolgenden Experimente eingeschränkt. Da auch die Möglichkeiten der Kryokonservation der PHH nur eingeschränkt zur Verfügung steht und die Zellen in der Kultur innerhalb von 72 h dedifferenzieren, müssen die Zellen vor jedem Experiment neu isoliert werden und unterliegen inhärenten breiten Schwankungen durch Verwendung unterschiedlicher Donoren mit Unterschieden in der Isolationsqualität, im Stoffwechsel, den Krankheitsbildern und der zugehörigen Vormedikation (neoadjuvante Chemotherapie, Statine, etc...) ⁽³⁹⁾. Dies ergibt eine nicht vermeidbare Interdonorvariabilität, welche die Reproduzierbarkeit und damit auch das Endergebnis beeinflusst⁽³⁴⁾.

1.2.3.2 Immortalisierte Hepatozyten

Eine verlässliche Alternative für den Gebrauch von PHH in den *in-vitro* NAFLD-Modelle ist die Verwendung hepatischer Zelllinien. Eine vielfach untersuchte und häufig verwendete Leberzelllinie stellt die gut differenzierte, in 1970er Jahren aus einem hepatozellulären Karzinom eines 15-jährigen Jungen gewonnene, Zelllinie HepG2 dar ⁽⁴⁰⁾. Sie bietet einige Vorteile im Vergleich zu primären Zellen: 1) die Zelllinie wächst kontinuierlich und besitzt eine quasi unbeschränkte Lebensspanne; 2) zuverlässiger, kaum eingeschränkter Zugang zu den Zellen und geringe Anforderung an die Kultivationsbedingungen; 3) standardisierte Kulturbedingungen und ein stabiler Phänotyp in allen Experimenten. Diese Qualitäten ermöglichen den Zugang zu einem zuverlässigen und beständigen Zellmodells während eines gesamten Projektzeitraumes. Aufgrund der Kryokonservierbarkeit ist es auch möglich zu jedem Zeitpunkt des Experimentes eine zelluläre Absicherung zu erstellen ^(34, 41). Doch im Vergleich zu PHH unterliegt auch diese Zelllinie einigen Nachteilen aufgrund ihres karzinomätosen Ursprunges: fehlende bzw. unvollständige Enzymexpression und veränderte nukleäre Faktoren ⁽³⁴⁾. Zudem hat sich inzwischen gezeigt, dass sich das Genexpressionsprofil der HepG2 von Passage zu Passage unterscheidet und damit einen Vergleich der Daten zwischen den einzelnen Laboratorien schwierig gestaltet ⁽⁴²⁾. Auch die übrigen hepatischen Zelllinien leiden unter den genannten Problemen ⁽³⁴⁾:

- HuH7: humane Hepatomzelllinie, die etwas seltener als HepG2 verwendet wird, dieser in ihren Lipidstoffwechselfähigkeiten jedoch nicht nachsteht ⁽⁴³⁾.
- H4IIE: Hepatomzelllinie der Ratte
- H4IIEC3: hepatische Zelllinie der Ratte

1.2.3.3 Säugetier Hepatozyten

Eine weitere Möglichkeit neben den primär humanen Hepatozyten ist die Verwendung primärer Maus-, Ratten- oder Schweinehepatozyten. Trotz anzeigepflichtiger Einschränkungen sind diese Zellen in größerer Menge als PHH verfügbar. Dennoch muss die Isolationsmethode gut etabliert sein, um zuverlässige und reproduzierbare Resultate zu erhalten. Darüber hinaus bestehen Unterschiede in den metabolischen Fähigkeiten der Nager- und Schweinehepatozyten im Vergleich zu den PHH. Hierdurch ergibt sich die Frage inwiefern die Ergebnisse auf den Mensch übertragbar sind ^(44, 45). Auch die Probleme mit denen primär humane Kulturen kämpfen (z.B. Isolationsqua-

lität, Interdonordifferenzen, Dedifferenzierung, etc.) sind in den ratten- und schweinbasierten Zellkulturen noch nicht gelöst ⁽⁴⁴⁾.

1.2.3.4 *In vitro* Annäherung an die NAFLD

Um NAFLD-ähnliche Zustände in der Zellkultur zu erzeugen gibt es mehrere Ansätze. Da die FFA die Grundlage der nichtalkoholischen Fettleber bilden (siehe Kapitel 1.1.2, Pathogenese), möchte man insbesondere die Auswirkungen von freien Fettsäuren auf den Hepatozyten untersuchen. Die Grundlage der *in vitro* Ansätze besteht daher in der Zugabe von FFA in hohen Konzentrationen zur Zellkultur. Hieraus resultiert eine intrazelluläre Steatose mit Formierung zytoplasmatischer Lipidropfen, mit Darstellbarkeit lipotoxischer Effekte und Apoptose durch die Triglycerid- und FFA-Überladung ⁽⁴⁰⁾. Die Effekte der FFA hängen stark von der Gesamtmenge und dem eingesetzten Verhältnis der verschiedenen FFA-Konzentrationen ab ⁽⁴⁶⁾. Dabei ist die Fähigkeit zur Lipoapoptoseinduktion gestaffelt, mit Stearinsäure als potentester Fettsäure (Stearinsäure > Palmitinsäure > Palmitoleinsäure > Ölsäure) ^(46, 47). Entsprechend dieser Beobachtung gibt es auch unterschiedliche Effekte der Palmitinsäure und der Ölsäure auf die Zellviabilität, Ligandenbindungsfähigkeit (z.B. Bindung gesättigter Fettsäuren an den hepatischen Toll-like Rezeptor 4), Caspaseaktivität und DNA-Fragmentation. Dies zeigt die Relevanz eines ausgewogenen Verhältnisses von ungesättigten- zu gesättigten Fettsäuren auf ^(8, 34, 48). Als Verhältnis der Wahl mit der höchsten Lipidakkumulation in hepatischen *in vitro* Kulturen, bei geringster Ausprägung der Lipoapoptose in der Kultur, hat sich der Mix von Oleat zu Palmitat im Verhältnis 2:1 mit der Gesamtkonzentration von 1 mM bewährt ^(40, 46).

Ein weniger verfolgter Ansatz der *in-vitro* Annäherung an die NAFLD, ist die gezielte Isolation von Hepatozyten aus Spendern (Mensch oder Tier), die bereits eine NAFLD aufweisen. Hierbei fehlen jedoch die Kontrollwerte nicht-steatotischer Zellen des selben Donors, sodass aufgrund der Donorspezifität steatosebedingte molekulare Auslenkungen schlecht oder gar nicht erkannt werden können ^(49, 50).

1.2.3.5 Genetisch manipulierte Hepatozyten als mögliches NAFLD-Modell

Da sowohl der Gebrauch primärer Hepatozyten als auch der von Zelllinien deutliche Schwächen aufweist, ist der Bedarf nach einer geeigneten Alternative groß, welche nicht die Defizite der

bislang genutzten *in-vitro* Modelle besitzen. Die genetisch veränderten Zellen sind hierbei ein vielversprechender Ansatz. Eine neue Entwicklung ist die einfach umzusetzende Erzeugung genetisch veränderter humaner Hepatozyten durch die upcyte[®]-Technologie. Hierzu werden in isolierte PHH mit Hilfe eines Lentivirus proliferationsanstoßende Gene (upcyte[®]-Faktoren) eingebracht⁽⁵¹⁻⁵³⁾. Dies ermöglicht PHH die Proliferation unter Beibehaltung eines Großteiles ihrer differenzierten Fähigkeiten, wie Albuminsynthese, kontaktinhibiertes Wachstum, leberzellspezifische Morphologie, sowie PHH-ähnlicher Expressionslevel hepatischer Phase I Enzyme⁽⁵³⁾. Somit eröffnet sich die Möglichkeit die physiologische Interdonorvariabilität durch Verwendung mehrerer Spender in einem experimentellen NAFLD-Setup reproduzierbar zu benutzen⁽⁵¹⁾. Überdies überstehen die transduzierten Hepatozyten eine Kryokonservierung nahezu schadlos. Wie in Burkard et al., 2012 beschrieben wurde ist die Cytochrom P450 (CYP) Aktivität generell vermindert im Vergleich zu PHH, nach 5-tägiger Kultur. Jedoch wird eine CYP3A4, CYP1A2 und CYP2B6 Induzierbarkeit berichtet⁽⁵¹⁾. Trotz dieser Einschränkung bieten die upcyte[®]-Hepatozyten laut Burkard et al., 2012, den Vorteil der unterschiedlichen Phenotypen, kombiniert mit der theoretisch unlimitierten Verfügbarkeit und dem komfortablen Handling von Zelllinien⁽⁵¹⁾.

2 Zielsetzung

Bedingt durch den Lebenswandel in der westlichen Welt ist die NAFLD eine weitverbreitete Krankheit mit einer hohen Tendenz zur Progredienz des Krankheitszustandes. Aufgrund des noch unvollständig verstandenen Krankheitsbildes ist der Bedarf an Modellen hoch, die das Verständnis der Ursache und der Progression der NAFLD erweitern. Gezielte Fragestellung bezüglich der Mechanismen der Leberschädigung lassen sich am ehesten durch *in-vitro* NAFLD Modelle klären. Da primäre humane Hepatozyten in ihrer Verfügbarkeit stark limitiert sind und bisherigen Alternativen eine geringere Aussagekraft aufweisen, ist der Bedarf an einem potenten zellulären Lebermodell groß. Ein neuer möglicher Ansatz, für die Verwendung im NAFLD-Modell, ist die Erzeugung und Verwendung genetisch veränderter humaner Hepatozyten durch die upcyte[®]-Technologie.

Im Rahmen dieser Dissertation wurden dazu folgende Fragestellungen analysiert:

- Ist es möglich PHH mittels upcyte[®]-Faktoren zu modifizieren und
- Behalten die erhaltenen Klone auch nach Kryokonservierung ihre hepatischen Eigenschaften?
- Besteht eine Anwendbarkeit von upcyte[®]-Hepatozyten im NAFLD-Modell zur Untersuchung von Pathomechanismen in der Steatoseforschung? Erreicht man mit dem gängigen NAFLD-Modell eine ausreichende Lipidakkumulation in den upcyte[®]-Hepatozyten und ist die hierdurch verursachte *in-vitro* Lipotoxizität vergleichbar mit PHH oder der Zelllinie HepG2?
- Entwickeln die upcyte[®]-Hepatozyten die Ausprägung ihrer differenzierten hepatischen Eigenschaften, wie zum Beispiel die Albumin- und Ureasynthese, nach Proliferationsstop durch beschriebene Kontaktinhibition?
- Unterscheiden sich die charakteristischen hepatischen Fähigkeiten der upcyte[®]-Hepatozyten von denen der HepG2?

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Geräte

Multimode-Mikroplatten-Lesegerät	FluoStar Optima (BMG LABTECH Inc., Ortenberg)
Autoklav	WEBECO, Selmsdorf
Blockthermostat	BT100 (Kleinfeld Labortechnik, Gehrden)
CO₂-Inkubator	BINDER, Tuttlingen
Ein-Stunden-Signaluhr	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Kühleinheiten	+ 4°C (Liebherr, Biberach a.d.R.) - 20°C (Liebherr, Biberach a.d.R.) - 80°C (Kirsch, Offenburg)
Magnetrührer	RCT (IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen)
Mikroskop	Axiovert 135 (Carl Zeiss AG, Oberkochen)
Pipettierhilfe	PIPETBOY acu transparent (IBS integra-biosciences, Fernwald)
Pipetten	Eppendorf Reference 0,5 - 10 µl; 10 - 100 µl; 50 - 200 µl; 100 - 1000 µl (Eppendorf AG, Hamburg)
Absaugsystem	Vacunsafe (INTEGRA Biosciences AG and Corporation)
pH-Meter	CG 840 (Schott, Hofheim)
Schüttler	MTS 2 (IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen)
Spektrophotometer	NanoDrop®-ND-1000-Spektrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, US)
Sterilbank	Hera Safe (Heraeus, Osterode)
Stickstofftank	Taylor-Wharton Germany GmbH, Mildstedt
Vortexer	MST Minishaker (IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen)
Waage	Feinwaage (Sartorius AG, Göttingen)
Wärmeschrank	BINDER, Tuttlingen
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Labor-Wasserdestillator	M4 von elektro-mag®

Western Blot - Zubehör	Gläser, Kammer, Kunststoffkamm, Kassettenhalter (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
Volt/Amperemeter	(Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
Chemilumineszenzdetektor	Chemi Doc MP System (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
Zählkammer	Neubauer-Zählkammer (Fein-Optik, Blankenburg)
Zentrifuge	Eppifuge (Eppendorf AG, Hamburg) Varifuge (Heraeus, Osterode)

3.1.2 Verbrauchsmaterial

Pipettenspitzen	10 µl, 100 µl, 1000 µl (SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht) 5 ml, 10 ml, 25 ml (BD Biosciences, San Jose, US)
Einmal-Handschuhe	unsteril (Kimberly-Clark, West Malling, UK)
Klebefolie	für PCR-Mikrotiterplatten, optisch klar (SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht)
Kryoröhrchen	2 ml (SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht)
Messzylinder	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Mikrotiterplatten	6-Well, 96-Well (BD Biosciences, San Jose, US)
Mörser & Pistill	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
PCR-Mikrotiterplatten	96-Well (SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht)
PCR-SoftTubes	Biozym Scientific GmbH, Wien, A
Reaktionsgefäße	1,5 ml, 2 ml (RNase-free) (Eppendorf AG, Hamburg)
Tubes	Falcon, 15 ml, 25 ml (BD Biosciences, San Jose, US)
Western Blot - Zubehör	Blotting-Filterpapier, Blotting-Membran (Sigma- Aldrich, Taufkirchen)
Zellschaber	25 cm (SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht)

3.1.3 Chemikalien

Soweit nicht anders vermerkt wurden alle Chemikalien von Sigma (Deisenhofen), Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Serva (Heidelberg), Merck (Darmstadt), Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe) oder Life Technologies GmbH (Karlsruhe) bezogen. Bei der Herstellung wässriger

Lösungen wurde deionisiertes, ultrafiltriertes Wasser (Millipore Q-50) verwendet, alle übrigen Lösungsmittel entsprachen dem Reinheitsgrad p.a..

Enzyme & Hormone

Complete Mini Protease Inhibitor Roche Applied Science, Mannheim

Fortecortin Merck, Darmstadt

Humanes Insulin Sanofi-aventis, Frankfurt am Main

3.1.4 Lösungen und Puffer

Für alle verwendeten Puffer und Lösungen wurde soweit nicht anders angegeben zweifach destilliertes Wasser verwendet. Ampuwa-Sterilwasser (Fresenius Kabi AG, Bad Homburg) wurde für die Adaptation der Proteinkonzentration im Western Blot verwendet.

3.1.4.1 Kulturmedien

Tabelle 2: PHH und HepaFH3 Medien

	Kulturmedium	Kontrollmedium
Williams^c Medium E + GlutamaxTM	450 ml	450 ml
Penicillin/Streptomycin (10000 U/l)	5 ml	5 ml
Fortecortin (4 mg/ml)	125 µl	-
HEPES (15 mmol/l)	7,5 ml	7,5 ml
Natriumpyruvat (1 mmol/l)	5 ml	5 ml
MEM NEAA (100x)	5 ml	5 ml
Humanes Insulin (1 mmol/l)	400 µl	-
Fetales Kälberserum	50 ml	25 ml

Tabelle 3: HepG2 Medien

	Kulturmedium	Kontrollmedium
DMEM - Low Glucose	450 ml	450 ml
Penicillin/Streptomycin (10000 U/l)	5 ml	5 ml
L-Glutamin (200 mM)	50 ml	50 ml
Bovines Serumalbumin (sterilfiltriert)	-	5 g
Fetales Kälberserum	50 ml	25 ml

3.1.4.2 Zellysepuffer

Tabelle 4: Modifizierter RIPA-Puffer

PBS (Grundlage)	
Tris-HCl	50 mM
Sodiumdodecylsulfat	0,1%
Triton X100	0,5%
Protease Inhibitor complete (Roche)	nach Herstellerangabe
NaF	0,5 M
Na₃VO₄	100 mM
β-Glycerolphosphat	1 M

3.1.4.3 Western Blot

Tabelle 5: 10x TBST - Stammlösung

	Konzentration	Menge
Trisbase	200 mM	24,2 g/l
NaCl	1,4 M	80 g/l

mit Aqua bidest. auf 1 l auffüllen und pH mittels HCl auf 7,6 einstellen, vor Gebrauch 100 ml Stammlösung mit ddH₂O auf 1000 ml auffüllen und 1 ml Tween/Liter hinzugeben

Tabelle 6: 10x Elektrophoresepuffer - Stammlösung

	Konzentration	Menge
Trisbase	250 mM	30,28 g/l
Glycin	190 mM	144,12 g/l
Sodiumdodecylsulfat	1%	10 g/l

mit Aqua bidest. auf 1 l auffüllen, pH auf einen Wert von 8,9 einstellen, vor Gebrauch 100 ml Stammlösung mit ddH₂O auf 1000 ml auffüllen

Tabelle 7: 10x Blottingpuffer nach Towbin, ohne SDS

	Konzentration	Menge
Trisbase	250 mM	30,28 g/l
Glycin	190 mM	144,12 g/l

mit Aqua bidest. auf 1 l auffüllen, pH-Bereich innerhalb 8,1 - 8,5; Einstellung des pH-Wertes abhängig von untersuchtem Protein, da Proteine am effektivsten aus dem Gel herauswandern, wenn der pH-Wert 10 bis 15 % über dem durchschnittlichen isoelektrischen Punkt der Proteine liegt; vor Gebrauch 100 ml Stammlösung mit ddH₂O auf 800 ml auffüllen und 200 ml Methanol hinzugeben

Tabelle 8: 5x SDS-Ladepuffer (100 ml)

	Konzentration	Menge
Trisbase	0,4 M	4,84 g
SDS	10%	10 g
2-Mercaptoethanol	25%	25 g
Glycerol	50%	50 g
Bromphenolblau	0,025%	25 mg

pH-Bereich sollte innerhalb 7,5 - 8,0 liegen

Tabelle 9: Elektrophoresegele für 2 0,75 mm Gele

	Sammelgel (5%)	Trenngel (10%)
ddH₂O	3,4 ml	4,1 ml
Acrylamid	0,83 ml	3,3 ml
Sammelgelpuffer	0,63 ml	-
Trenngelpuffer	-	2,5 ml
SDS	50 µl	0,1 ml
Ammoniumpersulfat (APS)	50 µl	50 µl
N,N,N',N' Tetramethyl-ethylendiamid (TEMED)	5 µl	5 µl

Tabelle 10: Elektrophoresegelpuffer

	Tris-HCl Konzentration	Tris-HCl Menge auf 500 ml ddH ₂ O	pH-Zielbereich
Sammelgelpuffer	0,5 M	30,28 g	6,8
Trenngelpuffer	1,5 M	90,86 g	8,8

pH-Zielbereich mit 1 M NaOH einstellen

3.1.4.4 MTT-Test Lösungen

Tabelle 11: Verwendete MTT-Lösungen

MTT-Stammlösung	MTT-Arbeitslösung	MTT-Solubilisierungslösung
50 mg Thiazolylblau	1 ml MTT-Stammlösung	5 g SDS
10 ml PBS	9 ml FCS freies Medium	49,7 ml DMSO
		0,3 ml Eisessig
<i>Sterilgefiltert;</i>	<i>Vor Gebrauch frisch angesetzt</i>	<i>Lagerung erfolgte lichtge-</i>
<i>4 Wochen haltbar bei 4°C</i>		<i>schützt</i>

3.1.4.5 Ureatest Lösungen

Tabelle 12: Herstellung der Ureatestlösungen

O-Phthalaldehydreagenz	Primaquinreagenz
80 ml ddH ₂ O	500 mg Borsäure
7,4 ml H ₂ SO ₄	60 ml ddH ₂ O
	22,2 ml H ₂ SO ₄
<i>Mischen und auf Raumtemperatur abkühlen lassen</i>	
60 mg O-Phthalaldehyd	102,6 mg Primaquin
100 µl 30% Brij-35	100 µl 30% Brij-35
<i>Auf 100 ml mit ddH₂O auffüllen</i>	

3.1.4.6 ELISA-Lösungen

Tabelle 13: Konzentrationen der verwendeten ELISA-Fertiglösungen

Coating Puffer	50 mM Karbonat-Bikarbonatpuffer, pH 9,6
Waschpuffer	50 mM TRIS, 140 mM NaCl, 0,05% Tween 20, pH 8,0
Blocklösung	50 mM TRIS, 140 mM NaCl, 1% BSA, pH 8,0
Probenverdünner	50 mM TRIS, 140 mM NaCl, 1% BSA, 0,05% Tween 20
Stopplösung	180 mM H ₂ SO ₄

3.1.5 Antikörper

Tabelle 14: Verwendete Antikörper

Primärantikörper	Verdünnung	Hersteller
Phospho-P44/42MAPK (ERK1/2)(Thr202/Tyr204)	1:2000	Cell Signaling
Phospho-Akt (Ser473)	1:2000	Cell Signaling
Phospho-GSK3α/β (Ser21/9)	1:2000	Cell Signaling
Phospho-FoxO1 (Ser256)	1:1000	Cell Signaling
β-Actin	1:5000	Jackson Immuno Research
Sekundärantikörper		
Anti-rabbit, HRP gekoppelt	1:10000	Cell Signaling
Anti-mouse, HRP gekoppelt	1:10000	Jackson Immuno Research

3.1.6 Kits und Assays

Zur Bestimmung des Transaminasegehaltes wurden die folgenden Kits eingesetzt:

Fluitest[®] GPT ALT (Analyticon 1186)

R1 ALT: (Lösung stabil für: 28 d)

TRIS- Puffer, pH 7.8	100 mmol/l
L-Alanin	500 mmol/l
LDH	1200 U/l

R2 ALT: (Lösung stabil für: 90 d)

NADH/H ⁺	0.18 mmol/l
---------------------	-------------

Fluitest[®] GOT AST (Analyticon 1176)

R1 AST: (Lösung stabil für: 28 d)

TRIS-Puffer, pH 7.8	100 mmol/l
L-Aspartat	200 mmol/l
LDH	800 U/l
MDH	600 U/l

R2 AST: (Lösung stabil für: 90 d)

NADH/H ⁺	0.18 mmol/l
2-Oxoglutarat	15 mmol/l

Fluitest® GLU GlucoseR1: (Analyticon 4341)

Phosphatpuffer, pH 7,5	0,5 mol/l
Phenol	7,5 mmol/l
GOD	12000 U/l
POD	660 U/l
4-Amino-antipyrin	0,40 mmol/l

R4: (Analyticon 4341)

Glucosestandardlösung	100 mg/dl (5,55 mmol/l)
-----------------------	-------------------------

Fluitest® LDH-L (Analyticon 2222)R1 LDH: (Lösung stabil für: 28 d)

2-Amino-methyl-propanol, pH 9,4	325 mmol/l
Lithiumlactat	50 mmol/l

R2 LDH: (Lösung stabil für: 28 d)

NAD ⁺	10 mmol/l
Imidazol	0.9 mmol/l

Zur Detektion der Proteinbanden im Western Blot durch Chemilumineszenz wurde das Pierce™ ECL Western Blotting Substrate (Katalognummer 32106, von Thermo Scientific) verwendet.

Zum Stripping der Western-Blot PVDF-Membran wurde der Restore™ Western Blot Stripping Buffer (Katalognummer: 21059, von Thermo Scientific) verwendet.

3.1.7 Humane Hepatozyten

Die primären humanen Hepatozyten wurden im Rahmen der Doktorarbeit isoliert und stammen aus der Klinik für Allgemein-, Visceral-, und Transplantationschirurgie der Medizinischen Fakultät der Charité-Universitätsmedizin Berlin. Die Leberresektate stammen von Tumorpatienten mit primären oder sekundären Lebertumoren oder lokalen benignen Lebererkrankungen. Das aufgeklärte und schriftliche Einverständnis der Patienten war Voraussetzung für die Verwendung

von Gewebeproben aus Leberteilresektaten, entsprechend den Richtlinien der Ethikkommission der Charité-Universitätsmedizin Berlin.

Die primären Leberzellen wurden in einer zweistufigen EDTA / Kollagenase Perfusionstechnik isoliert und durch ein Percollgradientenverfahren aufgereinigt., die verwendete Methodik orientiert sich hierbei streng an der Publikation von Pfeiffer et al., 2015 und Kegel et al., 2016^(37, 54, 55).

3.1.8 Zelllinie HepG2

HepG2 Zellen wurden vom Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH erworben. Mit dem Erhalt der Zellen von der DSMZ beginnt die labor-eigene Passagenzählung, da die vorherige Passagenanzahl nicht bekannt ist. Für die nachfolgenden Experimente wurden HepG2 der Passagen 22, 24 und 26 verwendet.

3.1.9 Upcyte[®]-Hepatozyten

Die zur Transfektion mit Upcyte[®]-Genen verwendeten PHH (siehe Kapitel 3.2.13) entstammten einer 59-jährigen Frau mit Lebermetastase ohne bekannten Primärtumor, einem sogenanntem CUP-Syndrom (cancer of unknown primary). Die Donorin hatte zum Zeitpunkt der Resektion keine neoadjuvante Chemotherapie erhalten. Nebenbefundlich zeigt sich eine Adipositas Grad I. Es zeigen sich keinerlei Auffälligkeiten im großen Blutbild, noch in der Serumanalyse; weder ist eine Dauermedikation bekannt.

Für die Etablierung der Arbeitszellbank wurde das speziell von Mediatech erworbene upcyte[®] Hepatocyte Culture Medium verwendet.

3.2 Methoden

3.2.1 Zellbiologische Methoden

3.2.1.1 Zellkultur

Die Zellkulturarbeiten wurden vollständig unter einer Sicherheitswerkbank der Klasse 2 (Hera Safe) durchgeführt. Alle hierzu genutzten Medien, Lösungen und Materialien wurden steril filtriert oder autoklaviert. Die Zellkultur erfolgte im CO₂-Inkubator bei 37°C und 5%iger-CO₂-

Atmosphäre. Morphologie, Konfluenz, Vitalität und Viabilität wurden regelmäßig mikroskopisch kontrolliert. Medienwechsel wurden bei PHH 12 h nach Adhäsion experimentspezifisch mit Kontrollmedium vorgenommen. Das Medium der Zelllinien in der Kultivierungsphase wurde alle 2-3 Tage, inklusive PBS Waschschrift, gewechselt. Mit dem Erreichen einer ca. 80%igen Konfluenz wurden sowohl HepG2, wie auch upcyte[®]-Hepatozyten passagiert. Hierfür wurde nach den PBS Waschschriften Trypsin/EDTA 0,05% / 0,02%, ohne Ca²⁺ / Mg²⁺ (Biochrome) für 5 min auf die Zellen gegeben und nach erfolgtem Detachment wurde die Reaktion mit 10 ml zellspezifischem Kultivationsmedium je Inkubationsflasche gestoppt. Nach dem Übertragen der Zellen in ein Falcon Tube (15 ml) wurde die Zellsuspension zweimalig bei 300 x g für 5 min bei 20°C zentrifugiert um eventuellen Zelldebris zu entfernen. Das Detachment wurde zwischenzeitlich mikroskopisch kontrolliert. Anschließend wurden alle verwendeten Zellen gezählt und mit einer Dichte von $1,2 \times 10^4$ Zellen/cm² erneut ausplattiert.

3.2.1.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahlbestimmung wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer durchgeführt, um die Gesamtzellzahl bei bekanntem Volumen zu ermitteln. Es wurden dazu 10 µl Zellsuspension mit 90 µl einer Trypanblau/PBS-Lösung (1:10) vermischt und hiervon 10 µl in die Zählkammer gefüllt. Die Auszählung erfolgte unter Berücksichtigung aller 4 Quadranten unter dem Lichtmikroskop. Hierbei wurden nur vitale, ungefärbte Zellen gezählt, da tote Zellen, durch den Verlust der Membranintegrität, den blauen Farbstoff aufnehmen. Die Gesamtzahl berechnet sich wie folgt:
Gesamtzellzahl = (Zellzahl / Zahl der Quadranten) x Verdünnungsfaktor (10x) x Neubauerfaktor (10000) x Resuspensionsvolumen

3.2.1.3 Erzeugung der Upcyte[®]-Hepatozyten

Die Viabilität der verwendeten PHH überstieg nach Isolation 85%, und wies überdies eine ausgesprochen hohe Qualität auf.

Die nachfolgenden Schritte wurden durch den Kooperationspartner Arbeitgruppe Prof. Küpper der Fachhochschule Lausitz durchgeführt:

Nach Ausplattierung adhärten die Zellen zu ca. 80% der ausgestreuten Zellen auf den kollagenbeschichteten Kulturplatten und präsentierten eine hepatozytentypische pflastersteinartige Morphologie. Die Hepatozyten wurden anschließend mit der von Medicyte patentierten Technik genetisch modifiziert⁽⁵²⁾. Nach 24 h Kulturzeit wurden die Zellen mit viralen Partikeln, die die proliferationsinduzierenden Gene enthielten, transfiziert. Der Versuchsaufbau verhielt

sich folgendermaßen: (a) unbehandelte Zellen, (b) Transfektion mit leerem Vektor (Mock) und (c) Transfektion mit proliferationsinduzierenden Genen. Die genannten Zellen wurden für 3-8 Wochen kultiviert. Während dieser Zeit wurde das von Mediatec erworbene Upcyte®-Hepatocyte Culture Medium verwendet und alle 2-3 Tage erneuert. Nach 10 d konnten die ersten proliferierenden Kulturen in den upcyte® behandelten Zellkulturen ausgemacht werden. Sowie die upcyte® Hepatozyten in der Kultur klar erkenntlich waren, wurden sie trypsiniert und mit einer Dichte von 2×10^4 Zellen/cm² wieder ausgestreut. Bei einer Konfluenz von 80% wurden auch diese Zellen trypsiniert und ab dann mit einer Dichte von 5×10^3 Zellen/cm² ausplattiert^(51, 53).

Mit Erreichen der Arbeitszellbankgröße des jeweiligen Klones wurde das PHH/HepaFH3 Medium verwendet. Die Zellklone wurden vor den Experimenten für mindestens 3 Monate in der Gasphase des flüssigen Stickstoffes gelagert. Für die nachfolgenden Experimente wurde einer der vielversprechendsten Klone, HepaFH3, zur Verfügung gestellt.

3.2.1.4 Steatoseinduktion

Das in dieser Arbeit verwendete *in vitro* Steatosemodell entspricht dem von Gómez-Lechón et al., 2006 propagiertem Modell. Es wird durch die Zugabe von freien Fettsäuren (Ölsäure und Palmitinsäure im Verhältnis 2:1 mit einer Gesamtkonzentration von 1 mM) für 24 h ins Kontrollmedium realisiert.

Hierzu wurden 28 mg Palmitat in 1,5 ml Methanol gelöst, um Sterilität zu gewährleisten, und 63 µl Ölsäure hinzugegeben. Um das Steatosemedium herzustellen wurden auf 250 ml Kontrollmedium 1,25 ml des Fettansatzes hinzugegeben um eine Gesamtkonzentration von 1 mM im Medium zu erreichen.

3.2.1.5 Insulininkubation

Zum Nachweis der Insulinresistenz wurden nach der 24 h andauernden Steatoseinduktion 2,8 µl Humaninsulin (100 I.E./ml) in 2 ml insulinfreies Medium einer 6-Well Platte gegeben, mit dem Ziel der Inkubation mit 100 nM Insulin. Die Insulininkubation wurde für 15 min durchgeführt und anschließend wurde die Proteinisolation (siehe Kapitel 3.2.3.1) und der Western Blot (siehe Kapitel 3.2.3.4) durchgeführt.

3.2.2 Fluorometrische Analyse

3.2.2.1 Oil Red O Färbung

Prinzip: Die Oil Red O Färbung dient zum semiquantitativen Nachweis von neutralen Lipiden in fixierten Zellen, indem der fettlösliche rötliche Azofarbstoff an Triglyceriden in der Zelle bindet.

Durchführung: Die Zellen werden in der Zellkultur mit PBS gewaschen um zellulären Debris und apoptotische Zellen zu beseitigen. Die Fixierung erfolgt durch das Bedecken der Zellen mit einer 4% Formaldehydlösung (Herbeta, Berlin, Germany) für mindestens 5 min. Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS werden die Zellen mit der nachfolgend beschriebenen Oil Red O Arbeitslösung für 10-15 min bei Raumtemperatur bedeckt. Durch reichlich Leitungswasser wird anschließend die ungebundene Färbung entfernt bis das Wasser klar erscheint. Um die Quantifizierung nicht zu verfälschen wurden die Wells luftgetrocknet und erst danach mit einer genau definierten Menge Isopropanol (in dieser Arbeit 1000 µl / Well in einer 12-Well Platte) bis zum Herauslösen des Oil Red O Farbstoffes bedeckt. Das Probenmaterial wurde als Dreifachbestimmung in eine 96-Well Platte transferiert. Als Leerwerte diente Isopropanol. Die Absorption wurde bei $\lambda = 500$ nm im Photometer (FluoStar Optima) gemessen.

Als Stammlösung wurden 0,7 g Oil Red O in 200 ml Isopropanol gelöst und bei Raumtemperatur gelagert. Die Arbeitslösung wurde kurz vor Anwendung angesetzt und besteht aus 6 Teilen Stammlösung und 4 Teilen ddH₂O und einer Endkonzentration von 0,2% Oil Red O.

3.2.2.2 Sulforhodamine B Färbung

Prinzip: Zur semiquantitativen Normalisierung der Oil Red O Färbung und zur zusätzlichen Evaluation der Lipotoxizität durch Bestimmung des Oberflächenproteingehaltes wurde eine Sulforhodamine B (SRB) Färbung durchgeführt ⁽⁵⁶⁾. Der fluoreszierende Farbstoff Sulforhodamine B bindet hierzu elektrostatisch und pH abhängig an basische Aminosäurenreste von fixierten Zellen. Unter mild sauren Bedingungen bindet der Farbstoff an die Proteine und lässt sich im leicht basischen Milieu zur Quantifikation herauslösen ⁽⁵⁷⁾.

Durchführung: Dazu wurden die zur Oil Red O Färbung genutzten Wells erneut zweimalig mit Leitungswasser gewaschen und nach der vorsichtigen Entfernung des Wasser für 30 min bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss mit SRB Lösung bedeckt (1% Essigsäure mit 0,4% SRB). Hiernach wurden die Zellen viermal mit 1% Essigsäure gewaschen. Zur Quantifikation wurde die übrige Essigsäure vorsichtig und vollständig entfernt und jedes Well mit exakt 1000 µl von einer 10 mM ungepufferten Tris-Lösung pro Well (bei Gebrauch einer 12-Well Platte) für

10 min bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss bedeckt. Die Bestimmung der optischen Dichte erfolgt äquivalent zur Oil Red O Färbung als Dreifachbestimmung in einer 96-Well Platte bei $\lambda = 565$ nm und noch einmal bei $\lambda = 690$ nm, um das Hintergrundrauschen durch Verunreinigungen und den Plattenboden von der Gesamtdichte substrahieren zu können. Als Leerwert diente die 10 mM Tris-Lösung.

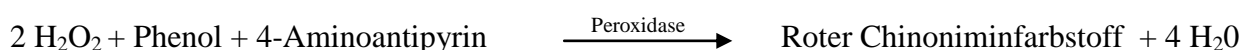
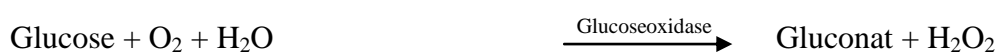
3.2.2.3 MTT-Test

Prinzip: Der Nachweis der Zellvitalität durch den MTT-Test beruht auf der Reduktion des gelben, wasserlöslichen Farbstoffs 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in ein blau-violettes, wasserunlösliches Formazan. Untersuchungen von Berridge et al. ^(58, 59) legen nahe, dass die Reduktion des MTT Farbstoffes vorwiegend durch die pyridinhaltigen Reduktionsäquivalente NADH und NADPH und nur teilweise von Succinat erfolgt. Der MTT-Test, der normalerweise zur Bestimmung der Zellviabilität genutzt wird, wird in dieser Arbeit hauptsächlich zur Bestimmung des NADH-Umsatzes genutzt und dient somit als Surrogatparameter zur Erfassung des Energieumsatzes durch die Glykolyse ^(58, 59).

Durchführung: Die Zellen wurden für diesen Test in einer 96-Well Platte (Falcon) kultiviert. Nach Ende der Kultivierungs- und Inkubationsphase wurden die Zellen zweifach mit PBS gewaschen und mit der Arbeitslösung (siehe Kapitel 3.1.4.4) für 2 h bei 37°C und 5% CO₂-Atmosphäre inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und 100 µl Solublisierungslösung (siehe Kapitel 3.1.4.4) pro Well hinzugegeben. Die Messung erfolgte als Dreifachbestimmung in einer 96-Well Platte bei $\lambda = 570$ nm und noch einmal bei $\lambda = 690$ nm um das Hintergrundrauschen durch Verunreinigungen und den Plattenboden von der Gesamtdichte substrahieren zu können. Als Leewert diente die Solublisierungslösung.

3.2.2.4 Glucosebestimmung

Prinzip: Zur Quantifizierung der Glucose wurde der Fluitest[®] Glucose von Analyticon gemäß der Anleitung des Herstellers genutzt. Der Test nach Trinder basiert auf der Kopplung der enzymatischen Oxidation von Glucose mit Glucose-Oxidase und einer Peroxidasereaktion, die zu einem farbigen Produkt führt:



Durchführung: Hierzu wurden 5 µl Medium in eine 96-Well Platte transferiert und mit 200 µl R1 Lösung (siehe Kap. 3.1.6) für 15 min bei 37°C inkubiert. Zur Kalibrierung wurde eine äquidistante Glucoseverdünnungsreihe in folgender Konzentration eingesetzt: 15 - 12 - 9 - 6 - 3 - 1 mM. Die Messung erfolgte als Endpunktbestimmung nach 15 min Inkubation bei 37°C bei $\lambda = 550$ nm im Photometer (FluoStar Optima). Die Proben wurden als Triplet aufgetragen.

3.2.2.5 Glycogenbestimmung

Prinzip: Für die Glycogenbestimmung wurde ein enzymatischer Assay entwickelt, orientierend an den Veröffentlichungen von Lust et al., 1975, Pilling et al., 2010 und Katz et al., 1976⁽⁶⁰⁻⁶²⁾. Um den Glycogengehalt genau zu bestimmen werden zunächst alle intrazellulären enzymatischen Prozesse gestoppt, die zelluläre Glucose extrahiert und im alkalischen Milieu eliminiert. Anschließend wird Glycogen durch die Amyloglucosidase zu β -D-Glucose hydrolysiert. Die nun vorhandene Glucose wird durch den Fluitest[®] Glucose (Analyticon) detektiert und nach Proteinkonzentrationsbestimmung der Suspension auf Masse Glycogen zu Masse Protein umgerechnet.

Durchführung: Die in 6-Well Platten kultivierten Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und mit 500 µl / Well einer Trypsin/EDTA Lösung (0,05% / 0,02%, ohne Ca^{2+} / Mg^{2+} von Biochrome) vom Well abgelöst. Das "Detachment" wurde durch 1000 µl / Well PBS mit einem 20% FCS Anteil gestoppt. Die Zellsuspension wurde in 1,5 ml Eppendorfgefäße übertragen und für 5 min bei 300 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig abgesaugt und 50 µl ddH₂O hinzugegeben. Die Suspension wurde für 10 min im Ultraschallbad behandelt und anschließend 10 µl für eine nachfolgende Proteinkonzentrationsbestimmung entnommen. In die Suspension wurden der Reihe nach erst 3.6 µl 7% Perchlorsäure, folgend von 20 µl 0,5 M Natriumhydroxid und anschließend für 10 min auf 100°C erwärmt. Um die Suspension abzukühlen und die Konzentration nicht durch Kondensationstropfen zu verfälschen wurden die Eppendorfgefäße für 1 min bei 500 g und 4°C zentrifugiert. Für die Hydrolyse des Glycogens wurden nun 20 µl eines 2 M Acetatpuffers mit pH 4,5 hinzugegeben, der 4 mg/ml Amyloglucosidase enthält (70 U / mg, Sigma Aldrich). Die Inkubation erfolgte bei 55°C für 2 h. Die anschließende Glucosekonzentrationsbestimmung erfolgt mittels Fluitest[®] Glucose von Analyticon (siehe Kapitel 3.1.6.).

3.2.2.6 Ureabestimmung

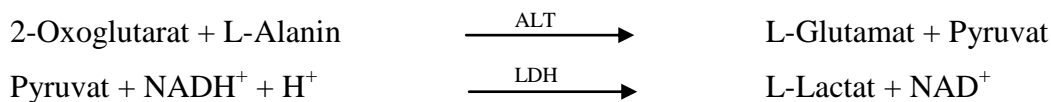
Prinzip: Die in dieser Arbeit verwendete Ureabestimmung entspricht der von Zawada et al. (2009)⁽⁶³⁾ verbesserten Methode von Jung et al. (1975)⁽⁶⁴⁾. Die Mechanismen dieser Farbreaktion sind noch nicht vollständig untersucht. Man geht von einem Zwei-Schritt Reaktionsablauf aus, in welchem der erste Schritt aus der spezifischen Kondensationsreaktion von Urea mit O-Phthalaldehyd besteht. Im zweiten Schritt reagiert das entstandene Carbeniumion mit Primaquine zu einem farbigen Produkt. Der Vorteil gegenüber der Jung-Methode besteht darin, dass das ursprünglich verwendete *N*-(1-naphthyl)ethylendiamin durch Primaquine ersetzt wurde. Hierdurch eignet sich die Methode auch für sehr niedrige Ureakonzentrationen und das durch Phenolrot verursachte Hintergrundrauschen konnte ausgeschaltet werden.

Durchführung: Es wurden 50 µl Probenmaterial/Well (phenolrothaltiges Medium) in einer 96-Well Platte verwendet. 100 µl des O-Phthalaldehydreagenz (siehe Kapitel 3.1.4.5) hinzugefügt und durch leichtes Schütteln der Platte vermischt. Nach Zugabe von 100 µl Primaquinreagenz (siehe Kapitel 3.1.4.5) wurde die gesamte Platte für 1 h bei 37°C inkubiert. Zur Kalibrierung wurde eine geometrische Ureaverdünnungsreihe in den folgenden Konzentrationen eingesetzt: 4,16 - 2,08 - 1,04 - 0,52 - 0,26 - 0,13 - 0,07 mM. Die Messung erfolgte als Endpunktbestimmung nach 1 h bei $\lambda = 430$ nm im Photometer (FluoStar Optima). Die Proben wurden als Triplets aufgetragen, als Leerwert diente das zellspezifische phenolrothaltige Medium.

3.2.2.7 Aminotransferasen- und Lactatdehydrogenasebestimmung

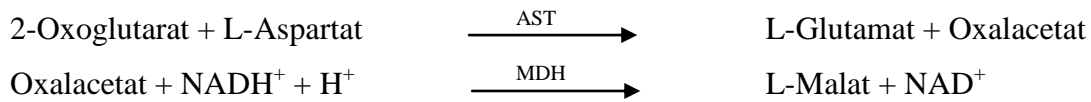
Prinzip: Die Bestimmung der Alanin-Aminotransferase (ALT), der Aspartat-Aminotransferase (AST) und der Lactat-Dehydrogenase (LDH) erfolgt durch optisch gekoppelte Tests, entsprechend den Empfehlungen der International Federation of Clinical Chemistry (IFCC):

Alanin-Aminotransferase:



Das Enzym ALT katalysiert die erste Gleichgewichtsreaktion, eine Reaktion erster Ordnung. Die Pyruvatzunahme wird in der zweiten gekoppelten Indikatorreaktion bestimmt, welche durch die Lactat-Dehydrogenase katalysiert wird. Hierbei wird NADH zu NAD^+ oxidiert. Die Geschwindigkeit der photometrisch gemessenen NADH-Abnahme ist direkt proportional der Bildungsgeschwindigkeit von Pyruvat und somit der ALT Aktivität.

Aspartat-Aminotransferase:



Das Enzym AST katalysiert die erste Gleichgewichtsreaktion, eine Reaktion erster Ordnung. Die Oxalacetatzunahme wird in der zweiten gekoppelten Indikatorreaktion bestimmt, welche durch die Malat-Dehydrogenase (MDH) katalysiert wird. Hierbei wird NADH zu NAD⁺ oxidiert. Die Geschwindigkeit der photometrisch gemessenen NADH-Abnahme ist direkt proportional der Bildungsgeschwindigkeit von Oxalacetat und somit der AST Aktivität.

L-Lactat-Dehydrogenase:



Das Enzym LDH katalysiert die Umwandlung von Pyruvat zu Lactat. Hierbei wird NAD⁺ zu NADH reduziert. Die Geschwindigkeit der photometrisch gemessenen NADH-Bildung ist direkt proportional zu LDH-Aktivität.

Durchführung: Die Anwendung weicht leicht von der Herstellervorgabe ab. Dies wurde vorgenommen um die Kits an die methodischen Besonderheiten des Mikrotiterplatten-Photometers anzupassen (FluoStar Optima). Hierzu wurden 20 µl Probenmaterial (für LDH 40 µl) in einer 96-Well Platte vorgelegt. Nach Zugabe von 200 µl einer R1 und R2 Mischung (Kit entsprechend dem gewünschten Enzym auswählen, siehe Kapitel 3.1.6) im Verhältnis von 1:1 wurde die Detektion unmittelbar durchgeführt. Zur Kalibrierung wurde eine geometrische Transaminaseverdünnungsreihe mit Bio Cal E[®] (Analyticon) etabliert. Bio Cal E[®] wurde vor Gebrauch aliquotiert, bei -20°C gelagert, kurz vor Gebrauch schonend aufgetaut und als geometrische Verdünnungsreihe aufgetragen.

Für ALT ergab dies folgende Konzentrationen: 197,8 - 98,9 - 49,5 - 24,7 - 12,4 - 6,2 - 3,1 (U/l).

Für AST ergab dies folgende Konzentrationen: 187,8 - 93,9 - 47,0 - 23,5 - 11,7 - 5,9 - 2,9 (U/l).

Für LDH ergab dies folgende Konzentrationen: 428 - 214 - 107 - 53,5 - 26,8 - 13,4 - 6,7 (U/l).

Die Messung erfolgte als kinetische Absorbionsmessung für mindestens 15 min bei 37°C und $\lambda = 340 \text{ nm}$ (FluoStar Optima) mit Beschränkung auf den linearen Absorptionsbereich. Die Proben wurden als Triplets aufgetragen. Der medienneigene Enzymgehalt aufgrund des FCS-Anteils wurde berücksichtigt und als Blindwert subtrahiert.

Für die intrazelluläre/gesamt Bestimmung der Transaminasen verwendete Probenmaterial wurde enzym schonend durch einen Zellschaber nach der Steatoseinduktionsphase unter Verwendung von PBS von der Kulturplatte gewonnen. Anschließend wurde durch ein Kavitationsverfahren (Dounce-Homogenisator) und anschließender mikroskopischer Kontrolle sichergestellt, dass die

Zellen vollständig lysiert wurden. Die Enzymaktivität wurde auf den Proteingehalt der Suspension normiert.

3.2.3 Proteinbiochemische und immunologische Methoden

3.2.3.1 Proteinisolierung

Zur Entfernung von Mediumresten und Zelldebris wurden die Wells zunächst mit PBS gewaschen. Daraufhin wurden 300 µl Lysepuffer (siehe Kapitel 3.1.4.2) / Well (6-Well Platte) hinzugegeben. Der Lysepuffer wurde vor Gebrauch auf 4°C heruntergekühlt. Anschließend wurden die Zellen sofort mit einem Zellschaber von der Platte gelöst und in ein Eppendorfggefäß überführt und bei -80°C für einige Tage gelagert. Kurz vor Messung der Proteinkonzentration (siehe nachfolgendes Kapitel) wurden die Proben sanft aufgetaut und im eisgekühlten Ultraschallbad für 5 min der Sonifikation unterzogen.

3.2.3.2 Messung der Proteinkonzentration

Prinzip: Die Bestimmung der Proteinkonzentration in dieser Arbeit dient der Normalisierung aller Assay bis auf die durchgeführten Färbungen. Zudem gewährleistet diese Methode, dass für den Western Blot identische Proteinkonzentrationen verwendet werden.

Die hier verwendete BCA-(4,4'-Dicarboxy-2,2'-bichinolin) Methode wird zur quantitativen, photometrischen bzw. kolorimetrischen Bestimmung von Proteinen (0,5 µg/mL – 1,5 mg/mL) verwendet ⁽⁶⁵⁾. Dabei reagieren zweiwertige Kupferionen (Cu^{2+}) in alkalischer Lösung quantitativ, mittels Komplexbildung mit den Peptidbindungen der Proteine zu einwertigen Kupferionen (Cu^+) (sog. Biuret-Reaktion). Die einwertigen Kupferionen geben mit der Bicinchoninsäure einen violetten Farbstoff, dessen Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm photometrisch ausgewertet werden kann.

Durchführung: Die Proben wurden 1:10 mit ddH₂O verdünnt und zu je 20 µl / Well bei einer 96-Well Platte vorgelegt. Die 300 µl BCA Lösung besteht aus BCA Reagenz (Thermo Scientific) und Kupfersulfat im Verhältnis 50:1. Nach der Zugabe der BCA Lösung wurde die Platte für 30 min bei 37°C inkubiert. Zur Kalibrierung wurde eine geometrische BSA-Verdünnungsreihe in den folgenden Konzentrationen eingesetzt: 1000 - 500 - 250 - 125 - 62,5 µg/ml. Die Messung erfolgte als Endpunktbestimmung bei $\lambda = 565$ nm im Photometer (FluoStar Optima). Die Proben wurden als Triplets aufgetragen, als Leerwert dienten 20 µl / Well ddH₂O mit 300 µl / Well BCA Lösung.

3.2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Prinzip: Die SDS-PAGE dient zur Auftrennung der Proteine durch ein diskontinuierliches Gel auf Polyacrylamidbasis. Das eingesetzte anionische Tensid SDS überdeckt die Eigenladung der Proteine. Die Spaltung der Disulfidbrücken durch Mercaptoethanol und die Denaturierung durch Aufkochen, führt zu einer Linearisierung der Proteine. Dies ermöglicht eine Auftrennung der Proteine im elektrischen Feld proportional zur Kettenlänge bzw. Molekülmasse.

Durchführung: Das isolierte Probenmaterial wurde mittels Ampuwa und dem 5x Probenpuffer (siehe Kapitel 3.1.4.3) auf eine Gesamtkonzentration von 1 µg Protein/ µl aufbereitetes Probenmaterial verdünnt und für 5 min auf 90°C erhitzt. In der vorbereiteten Gelgießvorrichtung wurde daraufhin das Trenngel (siehe Kapitel 3.1.4.3) gegossen. Dieses wurde mit ddH₂O oder Isopropanol überschichtet um eine horizontale Gelkante zu erzielen. Nach Polymerisation wurde das ddH₂O entfernt und das Sammelgel (siehe Kapitel 3.1.4.3) gegossen. Der Kunststoffkamm wurde unmittelbar anschließend eingesetzt unter Vermeidung von Luftblasen. Nach vollständiger Polymerisation wurden die Gele in die Elektrophoresekammer gesetzt, mit Elektrophoresepuffer gemäß den Herstellerangaben umgeben und mit dem Probenmaterial befüllt (20 µg / Tasche). Zur Kontrolle der Auftrennung und Transfereffizienz wurde eine "Prestained Protein Ladder" (PageRuler™ von Thermo Scientific) hinzugegeben. Das Sammeln der Proteine im Sammelgel erfolgte bei 60 V, die Auftrennung bei 100 V.

3.2.3.4 Western Blot und Proteindetektion

Prinzip: Die durch die SDS-PAGE aufgetrennten Proteine werden unter Verwendung eines elektrischen Feldes auf eine Polyvinylidenfluorid- (PVDF) Membran transferiert, um diese zu fixieren. Die Detektion erfolgt durch eine Antigen-Antikörper-Reaktion mit dem primären Antikörper. Der sekundäre Antikörper, Meerrettichperoxidase- (HRP) gekoppelt, dient zur Detektion via Chemilumineszenz. Die HRP katalysierte Oxidation von Luminol hat ein Emissionsmaximum bei 430 nm.

Durchführung: Der Proteintransfer erfolgte im sog. Wet/Tank-Blotting-Verfahren. Gel und Membran wurden in einem Kassettenhalter zwischen Filterpapier und Schwamm so orientiert, dass die Proteine aus dem Gel bei ihrer Wanderung im elektrischen Feld zur Anode hin die PVDF-Membran passieren. Der Aufbau erfolgte luftblasenfrei im Blottingpuffer. Die PVDF-Membran wurde vor dem Einsatz in Methanol aktiviert. Der Transfer erfolgte bei 4°C, 30 V für 16 h über Nacht. Für die Immundetektion wurde die PVDF-Membran nach dem Transfer für ca. eine Stunde in einer 10% Milchpulverlösung/BSA-Lösung (4 g Milchpulver/BSA, 40 ml TBST,

pH 7,4) blockiert, damit Casein/Albumin die vorhandenen Proteinbindungsstellen der Membran belegen kann. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte in der Blockinglösung bei 4°C über Nacht. Hierauf folgten 5 Waschvorgänge für 5 min mit TBST. Die Inkubation mit dem entsprechenden Sekundärantikörper erfolgt in TBST für 90 min bei 4°C, gefolgt von 5 Waschvorgängen für 5 min mit TBST. Die Detektion der Proteinbanden erfolgte anschließend mit dem Chemilumineszenzdetektor Chemi Doc MP System (Bio-Rad) mit Hilfe der ECL-Lösung Pierce™ ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific) nach Angabe der Hersteller.

Für die densitometrische Auswertung der Proteinbanden wurde die Software Image-Lab (Bio-Rad) verwendet. Die Quantifizierung der Signale erfolgte unter Subtraktion des Hintergrundes. Um eventuelle Unterschiede in der aufgetragenen Proteinmenge zu detektieren und auszugleichen, diente β -Aktin als Ladekontrolle.

Es werden in dieser Arbeit keine absoluten Werte angegeben, sondern die Signale stets zu einem densitometrischen semiquantitativen Wert in ein prozentuales Verhältnis gesetzt. Hierbei fungiert die Insulin-inkubierter PHH Kontrolle (K+) als Referenzwert (100%).

Da mehrere Proteine nachgewiesen werden mussten erfolgte die Lösung der Primär- und Sekundärantikörper durch sog. Stripping der PVDF-Membran durch den Restore™ Western Blot Stripping Buffer gemäß den Angaben des Herstellers. Anschließend musste die Membran erneut geblockt werden und das Detektionsverfahren konnte mit neuem Primärantikörper wiederholt werden.

3.2.3.5 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Prinzip: Der ELISA gehört zu den enzymatischen Immunadsorptionsverfahren. Hierzu wird das nachzuweisende Antigen über einen plattenadhäsiven Primärantikörper (coat-Antikörper) adsorptiv an die Mikrotiterplatte gebunden und angereichert. Der zweite Antikörper (detection-Antikörper) benutzt ein anderes Epitop um spezifisch an das Antigen zu binden (Sandwich-ELISA). Der HRP gekoppelte Sekundärantikörper dient zur Detektion via Chemilumineszenz äquivalent zur Detektion im Western Blot Verfahren.

Durchführung: Zum Coating wurden 100 μ l Coating-Puffer / Well einer Mikrotiterplatte mit je 1 μ l affinitätsgereinigter coat-Antikörper (anti-human albumin (goat), A80-129A, Bethyl Laboratories, Inc.) verwendet. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Puffer entfernt und die Wells 4x mit Waschpuffer behandelt. Zum Blocken wurden 200 μ l Blocklösung für 30 min bei Raumtemperatur aufgetragen. Anschließend wurden die Zellen 5x gewaschen. Pro Well wurden 100 μ l Probenmaterial verwendet und für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Inkubation wurden die Wells 5x gewaschen. Der detection-Antikörper wurde 1:50000 mit

dem "Probenverdünner" verdünnt und zu 100 µl in die Wells gegeben. Inkubation erfolgte bei 60 min bei Raumtemperatur, mit anschließenden 5 Waschschritten. Die Detektion erfolgte mit 100 µl TMB One Component Substrate (Bethyl Laboratories, Inc.) für 15 min unter Lichtabschluss. Hiernach wurde die Reaktion mit 100 µl Stopplösung unterbrochen. Ein Farbumschlag von blau nach gelb konnte dargestellt werden.

Zur Kalibrierung wurde eine geometrische Humanalbumin-Verdünnungsreihe in den folgenden Konzentrationen eingesetzt: 400 - 200 - 100 - 50 - 25 - 12,5 - 6,25 ng/ml (verdünnt mit Verdünnungspuffer). Die Messung erfolgte als Endpunktbestimmung bei $\lambda = 450$ nm im Photometer (FluoStar Optima). Die Proben wurden als Triplets aufgetragen.

3.3 Datenbanken und Software

Tabelle 15: Verwendete Software und Datenbanken

Excel 2007	Microsoft Corp.
Word 2010	Microsoft Corp.
Endnote™	Thomson Reuters™, www.myendnoteweb.com
GraphPad Prism 5	GraphPad Software
Image Lab™ Software	Bio-Rad Laboratories GmbH
NCBI (National Center for Biotechnology Information) Datenbank	NCBI, Bethesda, USA, www.ncbi.nlm.nih.gov/

3.4 Statistische Auswertung

3.4.1 Deskriptive Statistik

Zur deskriptiven Statistik wurden Mittelwerte, Standardabweichungen, Standardfehler, Mediane, Häufigkeiten und Vielfache der Kontrollgruppe berechnet. Die graphische Darstellung erfolgte als Säulendiagramm mit Mittelwert \pm Standardabweichung

3.4.2 Two-Way analysis of variance (ANOVA) und Bonferroni -Post-Test

Die in dieser Arbeit erhobenen Datensätze wurden als kategorisch unabhängige Variablen mit Einfluss auf kontinuierlich abhängige Variablen eingeordnet. Somit wurde die Two-Way ANOVA Analyse (GraphPad Prism 5) zur Auswertung der Datensätze verwendet. Damit konnte

nicht nur der Haupteffekt einzelner unabhängiger Variablen geprüft werden, sondern auch ob eine Interaktion zwischen den Variablen besteht. Als Post-hoc-Test wurde der Bonferroni-Post-Test ausgewählt, wodurch die Alphafehler-Kumulierung bei multiplen Paarvergleichen neutralisiert wird. Als Signifikanzniveau wurde ein p-Wert $< 0,05$ festgelegt.

4 Ergebnisse

4.1 Vorexperimente

Im Vorfeld wurden die für die experimentelle Umsetzung der Arbeit notwendigen Assays entwickelt bzw. etabliert, das experimentelle Setup erstellt und evaluiert. Das Hauptaugenmerk der Vorversuche lag im Wesentlichen auf:

- Etablierung und Anpassung des quantitativen Glycogennachweises für die Zellkultur
- Etablierung des quantitativen Ureanachweises für phenolrothaltiges Medium
- Etablierung des Western Blot
- Zellkultur der HepaFH3 unter biologischer Sicherheitsstufe 1
- Erprobung des experimentellen Setups mit HepG2 und PHH
- Isolation der PHH aus Leberresektaten, Auswahl der zur Transfektion geeigneten Zellen und Versandt der Zellen an die FH Lausitz
- Nachweis der Insulinresistenz als Definitionsmerkmal der NAFLD in der Zellkultur

4.2 Lipidakkumulation

Zunächst wurde die Fähigkeit der Hepatozyten zur TAG-Synthese evaluiert. Ziel war es herauszufinden, ob die Hepatozyten die im Übermaß angebotenen FFA aufnehmen und in ausreichender Menge als Triacylglyceride speichern können. Hierzu wurde der Neutralfettgehalt 12 h nach Aussaat bzw. vor und nach der 24 h FFA-Inkubationsperiode durch eine Oil Red O Färbung untersucht und mittels SRB-Färbung auf den Proteingehalt normiert.

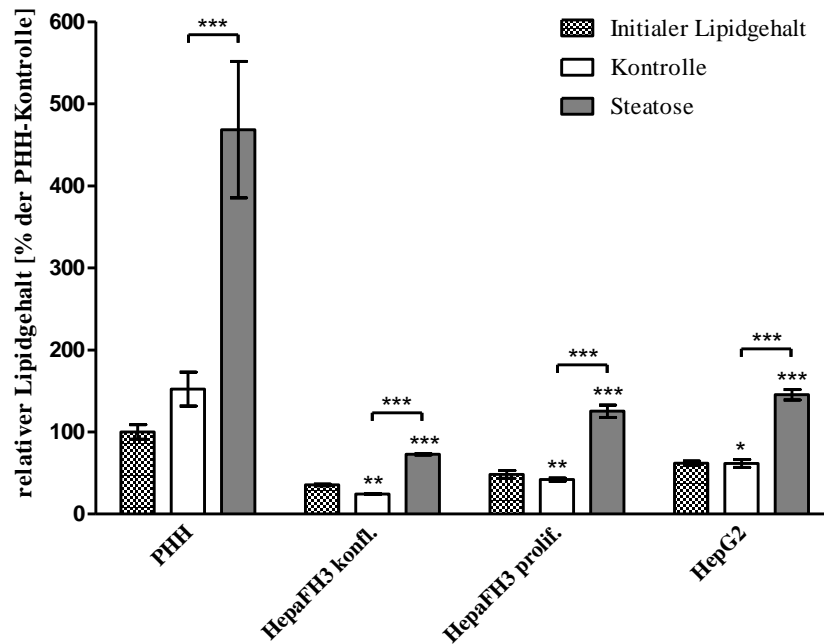


Abb. 2: Evaluation der intrazellulären Lipidakkumulation der Hepatocyten. Die Zellen wurden für 24 h in Kontrollmedium inkubiert, mit (Steatose) oder ohne (Kontrolle) Ölsäure und Palmitinsäure im Verhältnis 2:1 mit einer Gesamtkonzentration von 1 mM. Der initiale Lipidgehalt wurde 12 h nach Aussaat bzw. unmittelbar vor der Steatoinduktion gemessen. Die Daten wurden auf den Proteingehalt (SRB-Färbung) normalisiert und als Mittelwert \pm Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten für jeden Zelltyp und Kultivationsmodus ($N = 3$; $n = 9$) angegeben. Die Normierung erfolgte auf die PHH-Gruppe "Initialer Lipidgehalt". Signifikante Unterschiede wurden in Bezug zur entsprechenden PHH-Gruppe angegeben, bzw. relevante Unterschiede innerhalb der Gruppen durch Klammern kenntlich gemacht (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Die Oil Red O Färbung zeigt, dass Unterschiede bereits im initialen Lipidgehalt der unterschiedlichen Zelltypen vorliegen (Abb. 2). Deutlich wird dabei ein nahezu doppelt so hohes basales Lipidlevel in den PHH im Gegensatz zu den immortalisierten Zellen. Verglichen mit der Kontrollgruppe ist jedoch bei jedem Zelltyp eine signifikante Lipidspeicherung in der Steatosegruppe erkennbar: für PHH: 3,1x der Kontrolle; für beide Kultivationsmodi der HepaFH3: 3,0x der Kon-

trolle und für HepG2: 2,4x der Kontrolle. Trotz der inhomogen basalen Lipidakkumulationslevel, zeigen alle steatotischen Zelltypen ein signifikantes, bis zu 3-fach höheres Lipidakkumulationsniveau im Vergleich zur zugehörigen Kontrollgruppe.

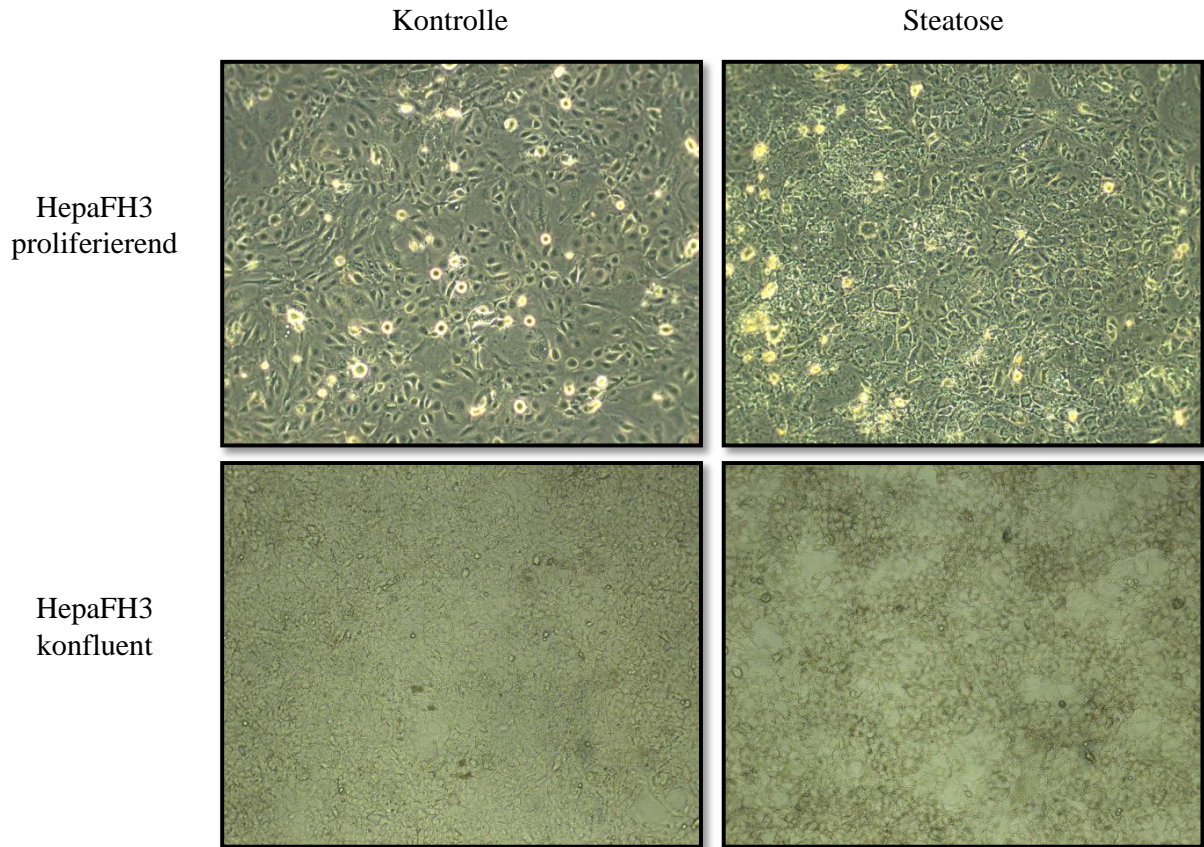


Abb. 3: Repräsentative mikroskopische Bildausschnitte der Kontroll- und Steatosegruppe der HepaFH3 (ca. 10x vergrößert). Die Zellen wurden für 24 h in Kontrollmedium inkubiert, mit (Steatose) oder ohne (Kontrolle) Ölsäure und Palmitinsäure im Verhältnis 2:1 mit einer Gesamtkonzentration von 1 mM. Anschließend erfolgte die mikroskopische Kontrolle.

Mittels Oil Red O Färbung konnte die erfolgreiche Steatoseinduktion nachgewiesen werden, welche einen wichtigen Bestandteil der nachfolgenden Experimente darstellt.

4.3 Lipotoxizität

Um einen potentiell toxischen Effekt der FFA Überladung bedingt durch die Anwendung des *in vitro* Steatosemodells zu erkennen, wurden mehrschichtige Zytotoxizitätsassays durchgeführt.

4.3.1 Verletzung der Membranintegrität durch Lipotoxizität

Durch eine potentiell lipotoxische Beschädigung der Zellmembran, erfolgt ein Efflux von Enzymen aus dem Zytosol ins Zellmedium. Der Anstieg der zytosolischen Enzyme ist normalerweise direkt proportional zum Grad der Schädigung der Zellen. Im Folgenden wurden dazu LDH, AST und ALT im Zellmedium 24 h nach Steatoseinduktion gemessen und mit der unbehandelten Kontrolle verglichen.

Die in fast allen Organismen ubiquitär vorhandene Lactatdehydrogenase eignet sich gut für *in vitro* Zytotoxizitätsuntersuchungen. Der im Serum unspezifische Marker ist in der Zellmonokultur ein sensitiver Marker für Schwächen in der zellulären Membranintegrität. Ein signifikanter LDH-Konzentrationsunterschied zwischen der Kontroll- und der Steatosegruppe im Zellmedium konnte nicht festgestellt werden (Abb. 2). Die Enzymaktivität im Medium der konfluenten HepaFH3 ist 1,7-fach höher als die identische Aktivität im Medium proliferierenden HepaFH3 und der PHH. Die niedrigste Enzymaktivität wurde im Medium der HepG2 nachgewiesen, welche 8-fach niedriger als die der konfluenten HepaFH3 ausfällt. Ein Hinweis auf Lipotoxizität war mit diesem Assay nicht feststellbar.

Die Aspartat-Aminotransferase ist im Menschen vor allem in Leber-, Muskel-, und Herzzellen anzutreffen. Somit stellt AST einen im Vergleich zu LDH spezifischeren Zytotoxizitätsmarker für Leberzellen dar. Wie die Messung der intrazellulären AST-Enzymaktivität (Abb. 4 B) zeigte, sollte durch die AST-Konzentration im Medium (Abb. 4 B) nur der Unterschied der Membranintegrität zwischen Kontroll- und Steatosegruppe innerhalb eines Zelltypus und dessen Kultivationsmodus (konfluent oder proliferierend) verglichen werden, da sich die intrazelluläre Enzymkonzentration zwischen den Zelltypen deutlich unterscheidet. Die AST-Aktivität war in den Zelllinien mehr als 4-fach niedriger als in den PHH. Nur in der Steatosegruppe der PHH zeigt sich eine signifikant hohe AST-Konzentration. Innerhalb der immortalisierten steatotischen Zellen konnte eine erhöhte AST-Konzentration im Medium nicht-signifikant in der Tendenz nachgewiesen werden.

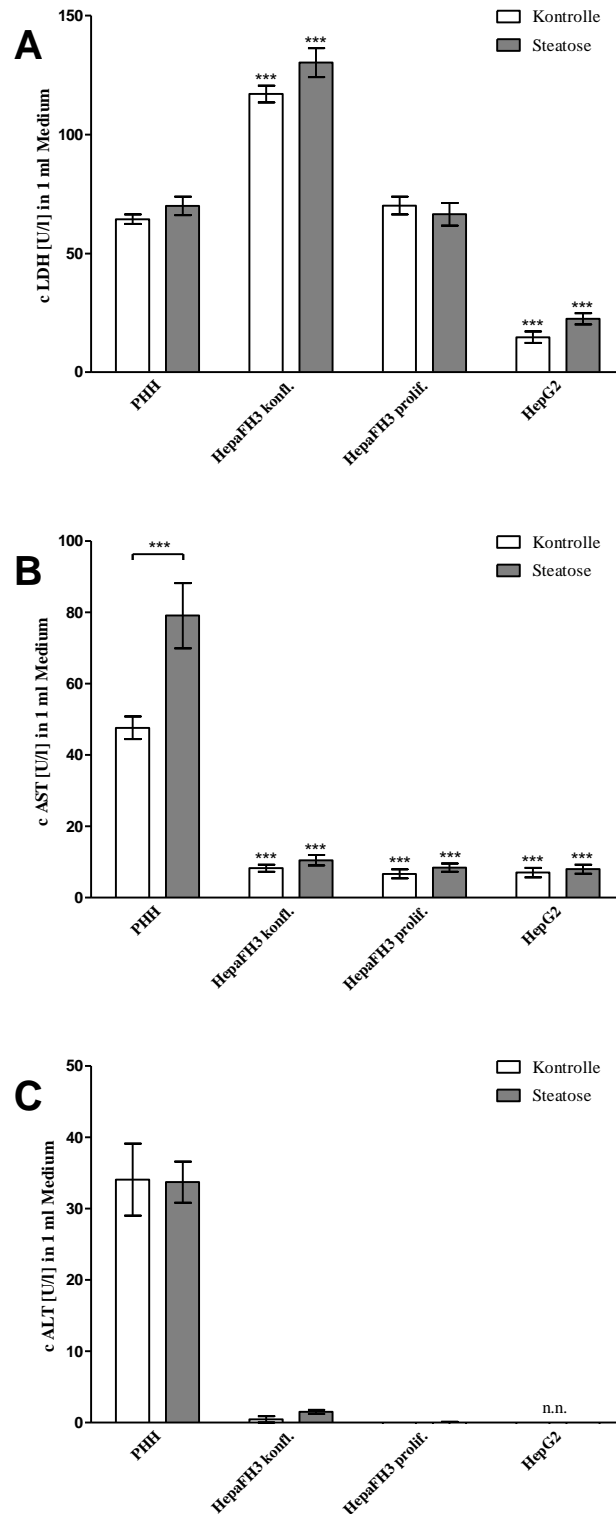


Abb. 4: Darstellung der zytosolischen Enzymaktivität im Zellmedium zur Evaluierung lipotoxischer Effekte. Die Zellen wurden für 24 h in Kontrollmedium inkubiert, mit (Steatose) oder ohne (Kontrolle) Ölsäure und Palmitinsäure im Verhältnis 2:1 mit einer Gesamtkonzentration von 1 mM. Die enzymatische Gesamtaktivität bezieht sich aus Gründen der Vergleichbarkeit, auf das Volumen des Zellmediums pro Well. Die Daten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten für jeden Zelltyp und Kultivationsmodus (N = 3; n = 9)

angegeben. Signifikante Unterschiede wurden in Bezug zur entsprechenden PHH-Gruppe angegeben, bzw. relevante Unterschiede innerhalb der Gruppen durch Klammern kenntlich gemacht (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). A: LDH-Aktivität im Medium. B: AST-Aktivität im Medium. C: ALT-Aktivität im Medium.

Die Alanin-Aminotransferase galt in dieser Arbeit als der leberspezifischste Zytotoxizitätsmarker. Doch lagen die ALT-Aktivitäten im Medium der HepG2 und der proliferierenden HepaFH3 unter der Nachweisgrenze und die ALT-Aktivität der konfluenten HepaFH3 lag nur knapp oberhalb der Grenze. Ausgeprägter als die die Messung der total intrazellulären AST-Enzymaktivität (Abb. 4 B), zeigt noch die Messung der total intrazellulären ALT-Enzymaktivität (Abb. 4), den deutlichen Unterschied in der ALT-Gesamtkonzentration der verschiedenen Zelltypen. Es wird daher nur der Unterschied in der Membranintegrität zwischen Kontroll- und Steatosegruppe innerhalb eines Zelltypus und dessen Kultivationsmodus (konfluent oder proliferierend) verglichen. Ein lipotoxischer Effekt war in diesem Datensatz nicht zu erkennen.

4.3.2 Lipotoxizität anhand der Gesamtproteinexpression

Zur zusätzlichen Überprüfung der enzymatischen Zytotoxizitätsassays und zur weiteren Aussage über das Proliferationsverhalten der Zellen in der Kultur, wurde zusätzlich die Gesamtproteinmenge als Parameter für die Lipotoxizität, bzw. für eine verminderte Proteinbiosynthese aufgrund der UPR, gemessen. Hierzu wurde zum einen die semiquantitative SRB-Färbung und zum anderen die BCA-Proteinbestimmung genutzt (Diese dient ebenso als Normierungsgrundlage für den Glucose-, Urea-, und Albuminnachweis).

Der Proteingehalt in der SRB-Färbung differierte zwischen den einzelnen Zelltypen und Kultivationsmodi teils erheblich, mit den konfluenten HepaFH3 als proteinreichste Kultur (Abb. 5 A). Innerhalb der Kontroll- und Steatosegruppe der jeweiligen Zelltypen erschien die Proteinmenge homogen, es zeigt sich jedoch ein signifikanter Unterschied in der Steatosegruppe der HepG2. In den HepG2 fiel zusätzlich eine Zunahme des Proteingehaltes der Kontrollgruppe gegenüber der initialen Messung auf. Dies veranschaulicht die Notwendigkeit der gründlichen Normalisierung aller erhobenen Parameter, da eine Vergleichbarkeit sonst nicht geschaffen werden konnte.

Innerhalb der Kontroll- und Steatosegruppe der jeweiligen Zelltypen war die Proteinmenge homogen (Abb. 5 B). Die PHH verzeichneten einen Verlust an Proteinkonzentration nach der 24 h dauernden Inkubationsphase. Die proliferierenden HepaFH3 und HepG2 hingegen zeigten in diesem Assay deutliche Anstiege der Proteinkonzentrationen in der Kontrollgruppe im Vergleich

zum initial Proteingehalt. Dies zeigt in Zusammenschau mit der mikroskopischen Beobachtung eine Proliferation im experimentellen Setting.

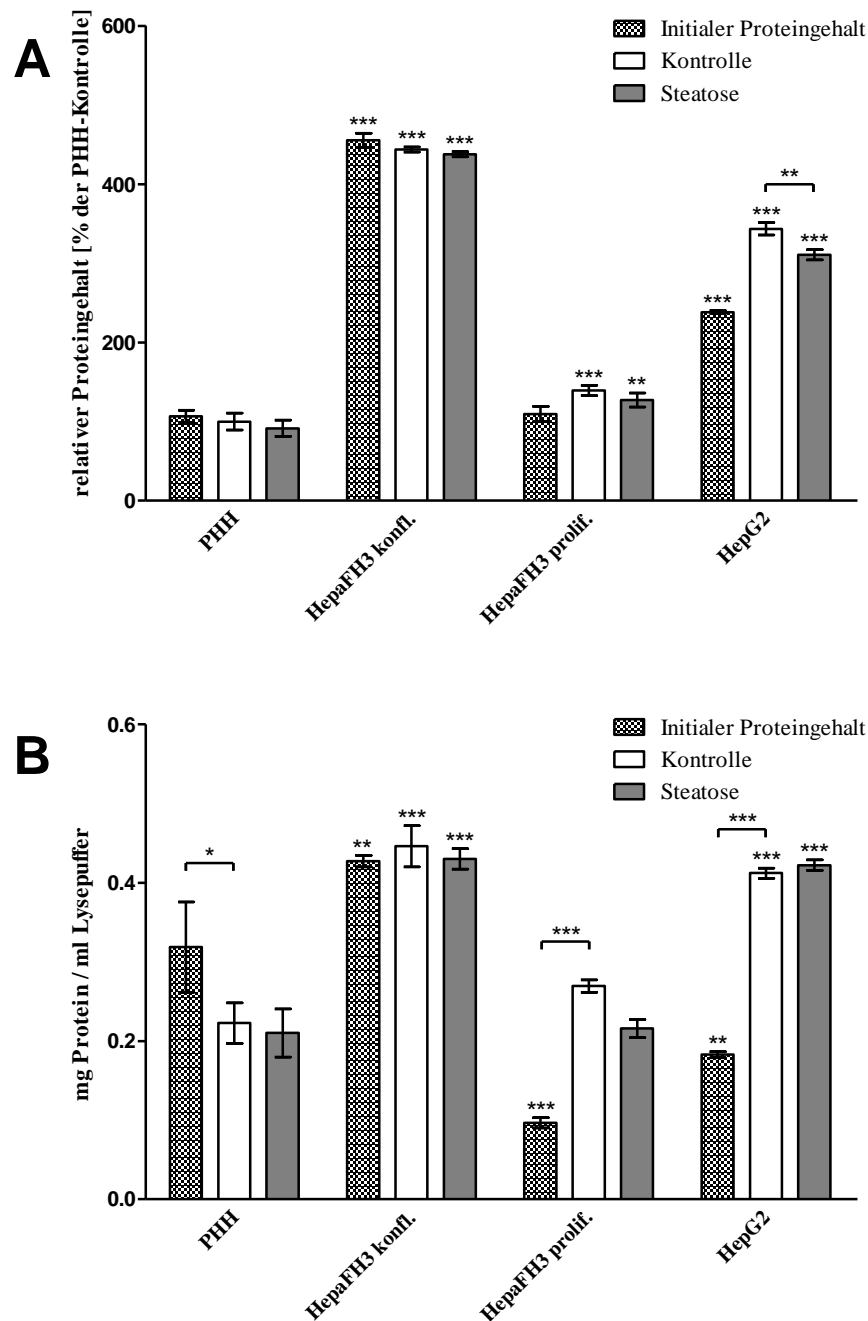


Abb. 5: Semiquantitative und quantitative Bestimmung des zellulären Proteingehaltes der Hepatocyten zur Evaluierung lipotoxischer Effekte und zur Verdeutlichung der Biomasseproduktion und Normierungsgrundlage. Die Zellen wurden für 24 h in Kontrollmedium inkubiert, mit (Steatose) oder ohne (Kontrolle) Ölsäure und Palmitinsäure im Verhältnis 2:1 mit einer Gesamtkonzentration von 1 mM. Der initiale Proteingehalt wurde 12 h nach Aussaat

bzw. unmittelbar vor der Steatoseinduktion gemessen. Die Daten wurden als relativer Mittelwert \pm Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten für jeden Zelltyp und Kultivationsmodus ($N = 3$; $n = 9$) angegeben. Signifikante Unterschiede wurden in Bezug zur entsprechenden PHH-Gruppe angegeben, bzw. relevante Unterschiede innerhalb der Gruppen durch Klammern kenntlich gemacht (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). A: Semiquantitative Bestimmung des zellulären Proteingehaltes der Hepatocyten mittels SRB-Färbung. B: Quantitative Bestimmung des zellulären Proteingehaltes der Hepatocyten mittels der BCA-Methode.

4.4 Metabolische Aktivität

Der MTT-Test beruht hauptsächlich auf der Reduktion des MTT Farbstoffes durch die pyridinhaltigen Reduktionsäquivalente NADH und NADPH und kann somit innerhalb eines Zelltypes, in dem im Schnitt jede Zelle die gleichen metabolischen Eigenschaften aufweist, als Viabilitätstest genutzt werden. In dieser Arbeit wurde der Test vornehmlich genutzt den Umsatz der Reduktionsäquivalente zu bestimmen. Da NADH überwiegend im Verlauf der Glycolyse und des Citrat-Zyklus entsteht, wird der MTT-Test in dieser Arbeit zur Messung dieser Vorgänge eingesetzt.

Um die Effekte der Steatose im MTT-Test abbilden zu können, wurde der Test unmittelbar nach der 24 h FFA-Inkubation durchgeführt. Da bereits initial unterschiedliche Zellzahlen eingesetzt wurden, wurde der Test auf die eingesetzte Zellzahl normiert und prozentual zur PHH-Kontrolle dargestellt.

Die durch den MTT-Test erhaltenen Metabolismusraten zeigen außer bei PHH keinen Rückgang der Raten in den Steatosegruppen (Abb. 6). Im Gegenteil, die Steatose erhöht die Umsatzrate der Reduktionsäquivalente der Zellen. Dies zeigt sich in signifikantem Ausmaß in den HepaFH3 Klonen. Aber wurde ebenso regelmäßig während der Vorexperimente in den HepG2 Zellen beobachtet (nicht abgebildet).

Der Unterschied zwischen den Zelltypen ließ klar erkennen, dass die frisch isolierten und differenzierten PHH nur sehr geringe NADH/NADPH-Umsatzraten aufwiesen. Die proliferierende Zelllinie HepG2 wies im Gegenzug knapp sechsfach höhere Raten auf. Die HepaFH3-Klone befanden sich hierbei in einem Kontinuum zwischen den beiden genannten Zelltypen. Der konfluente Klon zeigte eine kleine aber signifikant niedrigere Umsatzrate im Vergleich zu seinem proliferierenden Pendant.

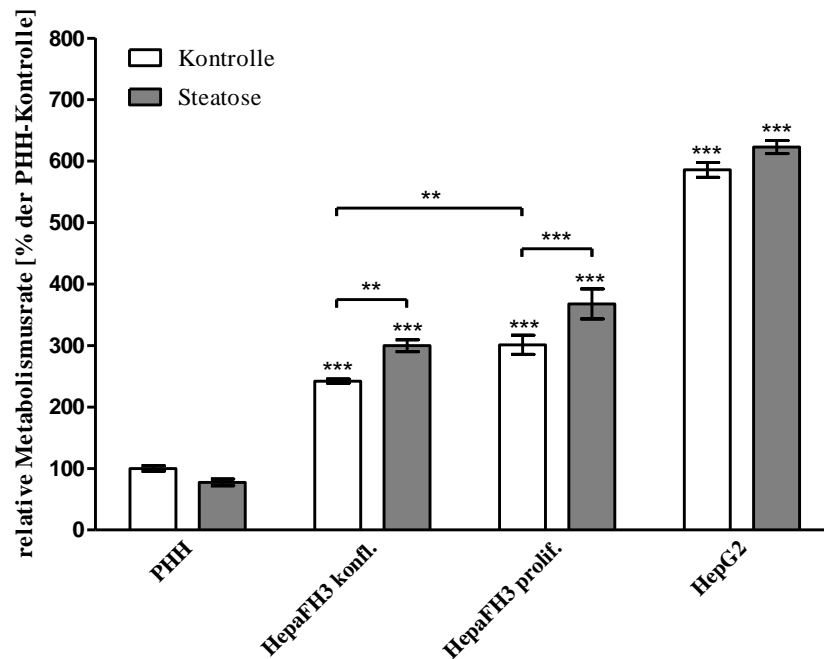


Abb. 6: Semiquantitative Bestimmung der zellulären NADH- und NADPH-Synthese der Hepatocyten mittels MTT-Test zur Evaluierung der grundlegenden Stoffwechselaktivität und lipotoxischer Effekte. Die Zellen wurden für 24 h in Kontrollmedium inkubiert, mit (Steatose) oder ohne (Kontrolle) Ölsäure und Palmitinsäure im Verhältnis 2:1 mit einer Gesamtkonzentration von 1 mM. Der MTT-Test wurde unmittelbar nach der genannten Inkubationsphase durchgeführt. Die Daten wurden auf die ausgestreute Zellzahl normiert und als relativer Mittelwert \pm Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten für jeden Zelltyp und Kultivationsmodus ($N = 3$; $n = 9$) angegeben. Signifikante Unterschiede wurden in Bezug zur entsprechenden PHH-Gruppe angegeben, bzw. relevante Unterschiede innerhalb der Gruppen durch Klammern kenntlich gemacht (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

4.5 Glucosemetabolismus

Differenzierte Hepatozyten sind in Lage neben der Glucoseaufnahme, diese Glucose in Form von Glycogen zu speichern und bei Bedarf diese auch wieder abzugeben um den Blutglucosespiegel im Serum aufrecht zu erhalten. Ebenso sind Hepatozyten in der Lage Glucose im Rahmen der Gluconeogenese aus Lactat, Glycerin, Pyruvat oder Oxalacetat sowie organischen Nicht-Kohlenhydratvorstufen aus dem Proteinabbau, zu synthetisieren. Im Folgenden wird sowohl die Glucoseaufnahme, respektive die Abgabe, und die Glycogenspeicherkapazität der verschiedenen Zelltypen untersucht.

4.5.1 Glucoseverbrauch

Um den Glucoseverbrauch der Zelltypen und deren Kultivationsmodi zu bestimmen, wurde die Glucosekonzentration im Kontroll-/Steatosemedium nach der 24 h Inkubationsphase gemessen und von der ursprünglichen Glucosekonzentration des entsprechenden Mediums subtrahiert. $\Delta c_{\text{Glucose}}$ entspricht dem während der 24 h verbrauchten Menge an Glucose in der Kultur. Dies wurde anschließend um eine Vergleichbarkeit zu erzielen auf die Proteinkonzentration, auf das verwendete Volumen des Zellmediums und auf die Zeitdauer normiert.

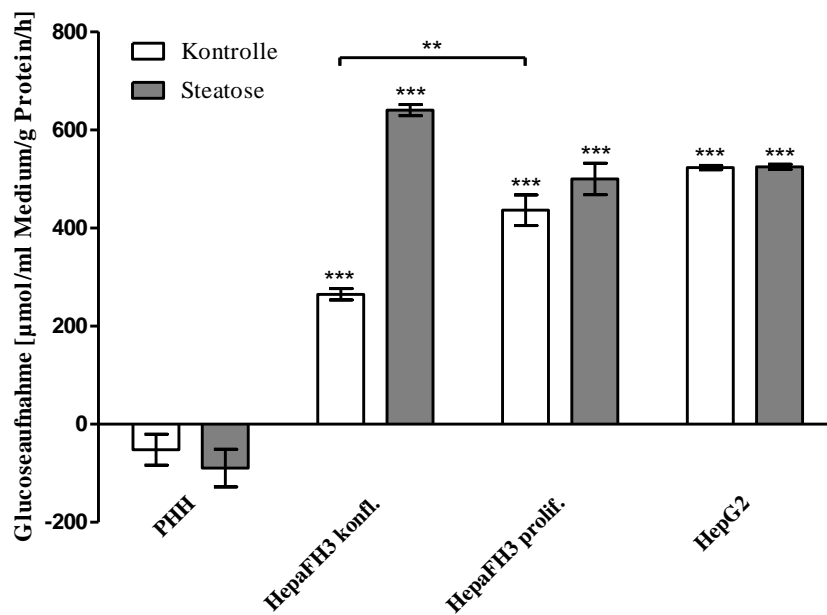


Abb. 7: Quantitative Bestimmung von $\Delta c_{\text{Glucose}}$ im Kontroll-/Steatosemedium. $\Delta c_{\text{Glucose}}$ ergibt sich durch die Messung der Glucosekonzentration im Medium nach 24 stündiger Inkubationsdauer und der anschließenden Subtraktion der gemessenen Konzentration vom initial gemessenen Glucosegehalt des entsprechenden Mediums.

Die Zellen wurden für 24 h in Kontrollmedium inkubiert, mit (Steatose) oder ohne (Kontrolle) Ölsäure und Palmitinsäure im Verhältnis 2:1 mit einer Gesamtkonzentration von 1 mM. Die Daten wurden zur Vergleichbarkeit auf den Gesamtproteingehalt der Kultur, auf das eingesetzte Mediumvolumen und auf Zeitdauer der Inkubation normalisiert und als Mittelwert \pm Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten für jeden Zelltyp und Kultivationsmodus (N = 3; n = 9) angegeben. Signifikante Unterschiede wurden in Bezug zur entsprechenden PHH-Gruppe angegeben, bzw. relevante Unterschiede innerhalb der Gruppen durch Klammern kenntlich gemacht (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Die durch die quantitative Bestimmung der Glucose darstellbare, negative Glucoseaufnahme der PHH, war als eine Glucosekonzentrationserhöhung im Zellmedium nach 24 h zu betrachten (Abb. 7). Somit haben die PHH mehr Glucose ins Medium abgegeben als sie verbraucht haben. Im Gegensatz hierzu wurde der gesamte Glucosegehalt des HepG2 DMEM-Medium mit

100 mg/dl Glucose von der Zelllinie HepG2 innerhalb von 24 h aufgebraucht. Somit konnte kein weiterer Glucoseverbrauch aufgezeichnet werden. Der mögliche reelle Verbrauch der HepG2 könnte, aufgrund des mangelhaften Substratangebotes, daher über dem gemessenen Wert liegen. Die proliferierenden HepaFH3 mit einem Glucosegehalt des Mediums von 200 mg/dl hatten eine 61% höhere Glucoseaufnahme verglichen zum konfluenten Gegenstück (264.7 ± 11.5 vs. 436.3 ± 31.3 $\mu\text{mol/ml Medium/g Protein/h}$). Der durchschnittliche Glucoseverbrauch in der Steatosegruppe der konfluenten HepaFH3 war bedeutend höher als derjenige der Kontrollgruppe. Ein derart großer Unterschied trat im proliferierenden Pendant nicht auf.

4.5.2 Glycogenspeicherung

Glycogen ist ein verzweigtes Polysaccharid, welches aus Glucoseeinheiten aufgebaut ist. Es dient der kurz- und mittelfristigen Speicherung des Energieträgers. Die Fähigkeit Glycogen im ausreichendem Maß zu synthetisieren und zu speichern gilt in vielen Arbeiten als Differenzierungsmerkmal des Hepatozyten. In dieser Arbeit sollte der quantitative Nachweis von Glycogen erfolgen, entgegen des üblichen qualitativen Nachweises. Hierfür wurde der Glycogengehalt unmittelbar nach Steatoseinduktion im eigens entwickelten und angepassten enzymatischen Glycogenassay bestimmt.

Die Quantifizierung des Glycogengehaltes demonstriert die Fähigkeit der konfluenten HepaFH3, Glycogen zu speichern (Abb. 8). Die Speicherkapazität der konfluenten HepaFH3 ist bis zu 13,6x höher als die des proliferierenden Pendants (55.0 ± 2.2 vs. 4.0 ± 0.4 g Glycogen $\times 10^{-3}/\text{g Protein}$). Jedoch übertrifft die Speicherfähigkeit der PHH die des konfluenten HepaFH3-Klons um das Dreifache. Es war nicht möglich gespeichertes Glycogen in den HepG2-Zellen nachzuweisen. Der Glycogengehalt der steatotischen Zellen war überdies in den PHH sowie in den konfluenten HepaFH3 signifikant niedriger als in den zugehörigen Kontrollgruppen.

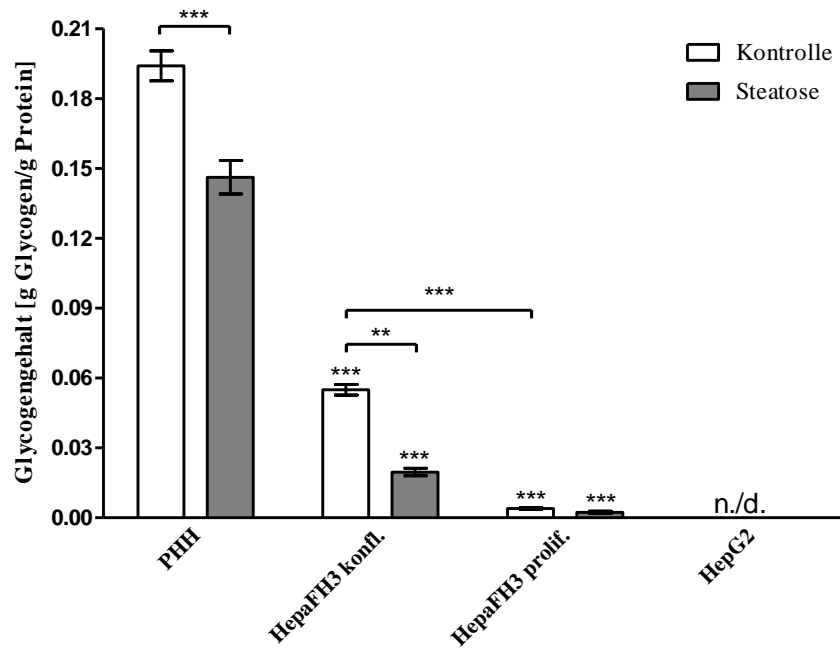


Abb. 8: Quantitativer Nachweis der gespeicherten Glycogenmenge. Die Zellen wurden für 24 h in Kontrollmedium inkubiert, mit (Steatose) oder ohne (Kontrolle) Ölsäure und Palmitinsäure im Verhältnis 2:1 mit einer Gesamtkonzentration von 1 mM. Unmittelbar anschließend fand die Glycogenbestimmung statt. Die Daten wurden zur Vergleichbarkeit auf den Gesamtproteingehalt der Kultur normiert und als Mittelwert \pm Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten für jeden Zelltyp und Kultivationsmodus ($N = 3$; $n = 9$) angegeben. Signifikante Unterschiede wurden in Bezug zur entsprechenden PHH-Gruppe angegeben, bzw. relevante Unterschiede innerhalb der Gruppen durch Klammern kenntlich gemacht (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

4.6 Basale hepatische Synthesefähigkeiten

Mit der Untersuchung der basalen hepatischen Synthesefähigkeiten sollten in dieser Arbeit die Syntheseleistungsfähigkeit der upcyte[®] modifizierte Hepatozyten mit derjenigen der PHH und der viel gebrauchten Zelllinie HepG2 verglichen werden. Damit sollte untersucht werden, ob hepatische Grundeigenschaften durch den Immortalisationsprozess beeinflusst wurden und ob es den HepaFH3 durch Unterbindung der Proliferation mittels Kontaktinhibition gelingt in eine G₀-Phase zu gelangen und damit wieder differenziertere hepatische Leistungen zu erbringen. Hierzu wurden ausschließlich sehr grundlegende hepatische Leistungen wie die Albumin- und Ureasyntese sowie die Transaminaseaktivität untersucht.

4.6.1 Albuminsynthese

Albumin macht etwa 60% der Gesamtproteinkonzentration des Serums aus und ist für ca. 80% des kolloidosmotischen Druckes verantwortlich. Damit besitzt Albumin eine wichtige physiologische Rolle unter den Differenzierungskriterien des Hepatozyten zu. Der quantitative Nachweis des synthetisierten Albumins erfolgte in dieser Arbeit mittels Humanalbumin-ELISA direkt aus dem Steatose-/Kontrollmedium nach der 24 h Steatoseinduktion. Der Albumingehalt der verwendeten Medien wurde ebenso berücksichtigt.

Die Untersuchung der Albuminsynthese zeigte, dass sowohl die konfluenten als auch die proliferierenden HepaFH3 nahezu kein Humanalbumin synthetisierten (Abb. 9 A). Die höchste Syntheserate der mit upcyte[®] Genen modifizierten Hepatocyten (Kontrollgruppe der konfluenten HepaFH3) ist noch immer 11x niedriger als die der HepG2 Zelllinie und ganze 163x niedriger als die Syntheserate der PHH (4.1 ± 1.7 vs. 45.0 ± 3.4 vs. 671.4 ± 48.1 μg Albumin/ml Medium/g Protein/h). Jedoch stellt sich die Albuminkonzentration im Medium der konfluenten HepaFH3 bis zu 9x höher dar, als die im Medium des proliferierenden Gegenstücks. Es war ein tendenziell negativer nichtsignifikanter Effekt der Steatose auf die Albuminsynthese fest zu stellen.

Die passageabhängige Untersuchung der Albuminsynthese der HepaFH3 zeigt, dass die Fähigkeit zur Albuminsynthese der HepaFH3-Klone mit steigender Zellpassageanzahl kontinuierlich abnimmt (Abb. 9 B). Mit zunehmender Anzahl der Zellteilungen büßen die HepaFH3-Klone somit an Albuminsynthesefähigkeit ein. Die Albuminsynthese, ist bereits in Passage 13 circa 11x niedriger als die der HepG2-Klone und sinkt mit zunehmender Passageanzahl unter die Nachweisgrenze. Deutlich wird in der Untersuchung zudem der große Unterschied in der Albuminsynthese zwischen den konfluenten HepaFH3 und dem proliferierendem Pendant ($> 6,5x$).

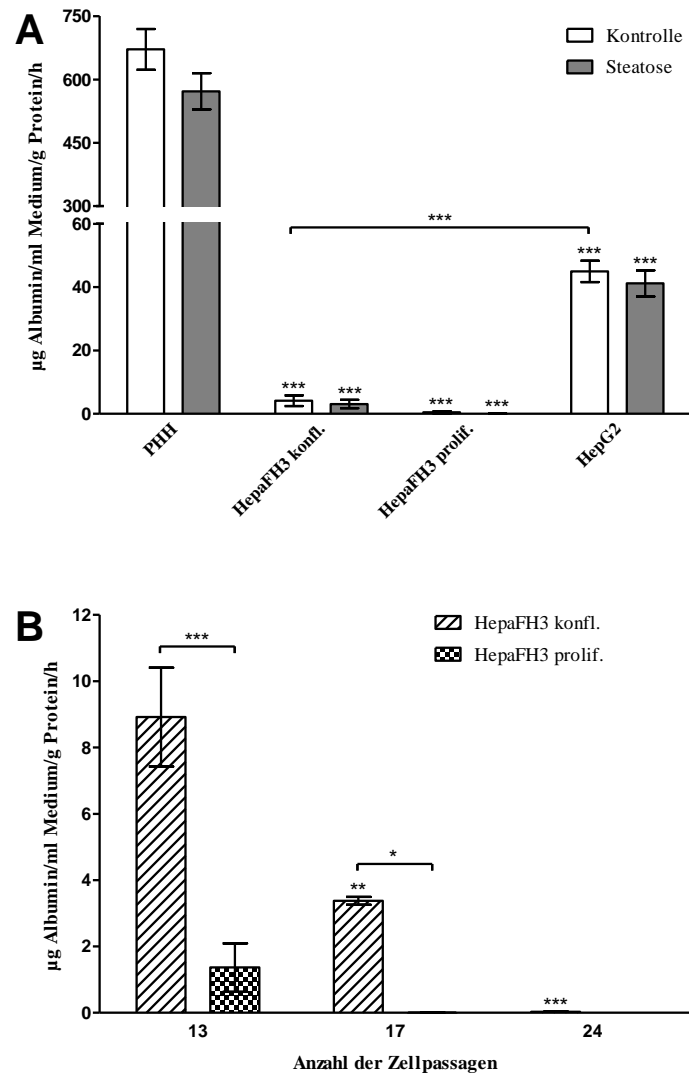


Abb. 9: Quantitativer Nachweis der Albuminsynthese mittels Humanalbumin-ELISA. Die Zellen wurden für 24 h in Kontrollmedium inkubiert, mit (Steatose) oder ohne (Kontrolle) Ölsäure und Palmitinsäure im Verhältnis 2:1 mit einer Gesamtkonzentration von 1 mM. Unmittelbar anschließend (nach 24 h Inkubation) fand die Albuminbestimmung aus dem verwendeten Kontroll-/Steatosemedium statt. Die Daten wurden zur Vergleichbarkeit auf den Gesamtproteingehalt der Kultur, auf das eingesetzte Mediumvolumen und auf die Zeitdauer der Inkubation normiert und als Mittelwert \pm Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten für jeden Zelltyp und Kultivationsmodus ($N = 3$; $n = 9$) angegeben. Signifikante Unterschiede wurden in Bezug zur entsprechenden PHH-Gruppe angegeben, bzw. relevante Unterschiede innerhalb der Gruppen durch Klammern kenntlich gemacht (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). A: Albuminsynthese aller Zelltypen und Kultivationsmodi der HepaFH3. B: Passageabhängige Albuminsynthese beider Kultivationsmodi der HepaFH3-Zellklone.

4.6.2 Ureasyntese

Urea wird hauptsächlich als Endprodukt des Protein- und Aminosäurestoffwechsel gebildet. Beim Säugetier stellt er die wichtigste Ausscheidungsform des in Proteinen enthaltenen Stickstoffs dar. In dieser Arbeit dient die Harnstoffsynthese als weiteres Merkmal des differenzierten Hepatozyten. Da die Detektion direkt aus dem phenolrothaltigen Medium stattfinden konnte und mit dem erhöhten Aminosäuregehalt (vorwiegend Glutamin) der verwendeten Medien der Harnstoffzyklus ausreichend angeregt wurde, erfolgte die Quantifizierung des Harnstoffgehalt unmittelbar aus dem Kontroll-/Steatosmedium nach der 24 h Steatoseinduktion. Der medienneigene Harnstoffanteil, vornehmlich dem eingesetzten FCS geschuldet, wurde berücksichtigt und als Blindwert abgezogen.

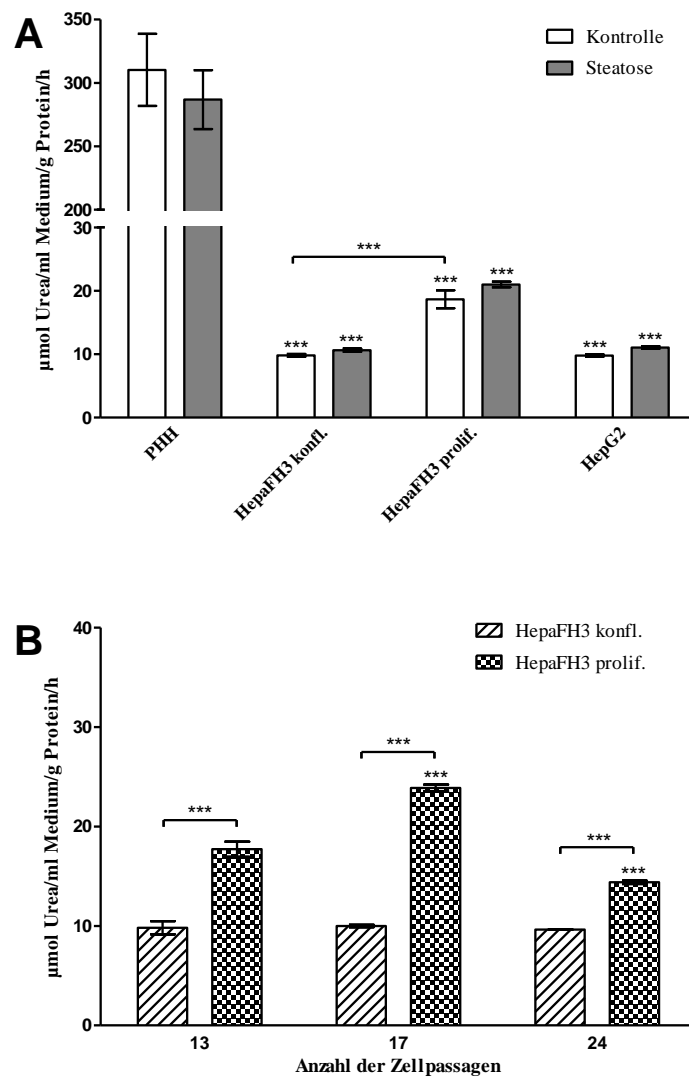


Abb. 10: Quantitativer Nachweis der Ureasyntese. Die Zellen wurden für 24 h in Kontrollmedium inkubiert, mit (Steatose) oder ohne (Kontrolle) Ölsäure und Palmitinsäure im Verhältnis 2:1 mit einer Gesamtkonzentration von

1 mM. Unmittelbar anschließend fand die Ureabestimmung aus dem verwendeten Kontroll-/Steatosemedium statt. Der mediumeigene Harnstoffgehalt wurde berücksichtigt und von den erhobenen Datensätzen subtrahiert. Die Daten wurden zur Vergleichbarkeit auf den Gesamtproteingehalt der Kultur, auf das eingesetzte Mediumvolumen und auf die Zeitdauer der Inkubation normiert und als Mittelwert \pm Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten für jeden Zelltyp und Kultivationsmodus ($N = 3$; $n = 9$) angegeben. Signifikante Unterschiede wurden in Bezug zur entsprechenden PHH-Gruppe angegeben, bzw. relevante Unterschiede innerhalb der Gruppen durch Klammern kenntlich gemacht (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). A: Ureasyntese aller Zelltypen und Kultivationsmodi der HepaFH3. B: Passageabhängige Ureasyntese beider Kultivationsmodi der HepaFH3-Zellklone.

Die Quantifizierung des synthetisierten Harnstoffs zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen den konfluenten HepaFH3 und den HepG2 (Abb. 10 A). Dennoch produzierte der Klon ca. 32x weniger Urea als die PHH (310.3 ± 28.4 vs 9.8 ± 0.2 $\mu\text{mol Urea/ml Medium/g Protein/h}$). Der proliferierende Klon zeigte eine fast doppelt so hohe Syntheserate verglichen zu seinem konfluenten Pendant. Die Steatose schien nur geringen bis keinen Einfluss auf die Menge des produzierten Harnstoffs zu nehmen.

Infolge des beobachtbaren passageabhängigen Rückganges der Albuminsynthese in den HepaFH3-Klonen stellte sich die Frage, ob dieser Effekt der suspizierten Seneszenz auch Einfluss auf die Ureasynteserate nehmen würde (Abb. 10 B). Doch wie die genauere passageabhängige Darstellung der Ureasynteserate der HepaFH3-Zellen zeigt, ist die Ureasyntese innerhalb der getesteten Passagen der HepaFH3-Klone konstant (Abb. 10 B). Auffällig sind hierbei die bis zu doppelt so hohen Harnstoffsynthesewerte der proliferierenden Klone im Vergleich zu ihren konfluenten Klonen. Dies steht im Gegensatz zur Albuminsynthese, in welcher die proliferierenden HepaFH3 deutlich geringere Syntheseraten zeigen.

4.6.3 Zytosolischer Transaminasegehalt

In dieser Arbeit wurde der Transaminasegehalt für zwei verschiedene Zwecke bestimmt. Zu Beginn der Arbeit wurden nur die im Medium enthaltenen Enzyme bestimmt um eine potentielle Lipotoxizität auszuschließen. Hierbei hat sich die Frage aufgeworfen, ob der zytosolische Gesamtgehalt der Transaminasen in den HepaFH3 vermindert sein könnte und ob die Enzymbestimmung in diesen Zellen als Parameter für vergleichende Toxizitätsuntersuchungen geeignet ist (siehe Abb. 4). Zur Beantwortung dieser Frage wurde noch einmal der zytosolische Transaminasegehalt bestimmt. Hierzu wurden die Zellen nach Steatoseinduktion aus der Kultur gelöst und mittels Kavitation (Dounce-Homogenisator) enzym schonend lysiert. Die anschließend bestimmte Transaminaseaktivität wurde auf die Gesamtproteinmenge der Suspension normiert.

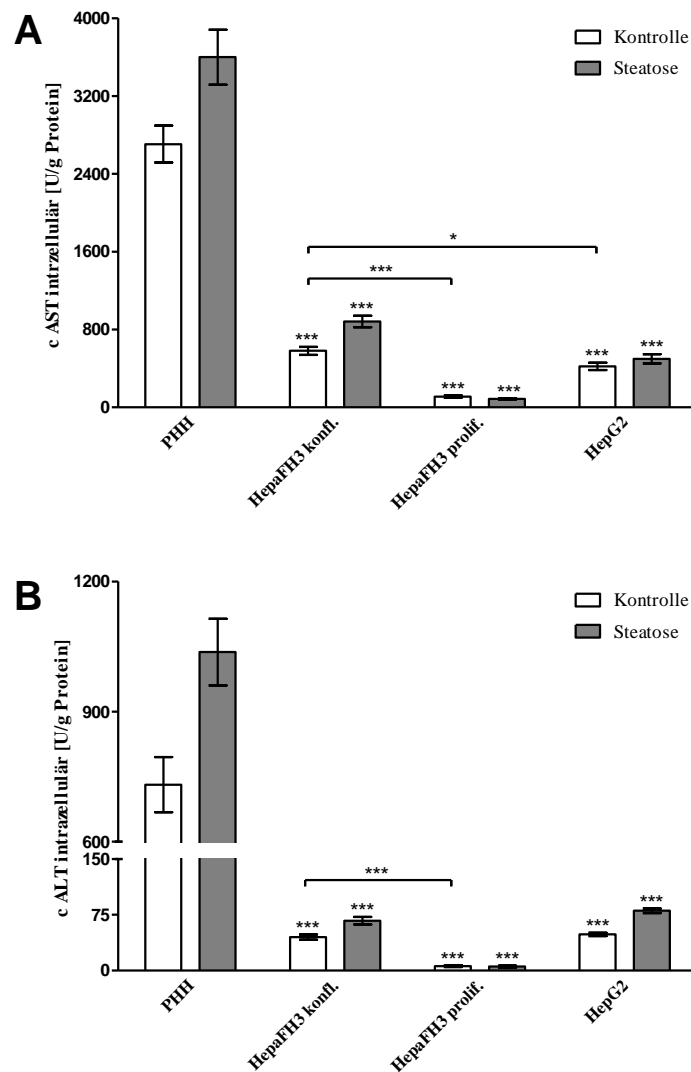


Abb. 11: Quantitativer Nachweis der intrazellulären Transaminasen-Aktivität, der beiden biochemisch bedeutendsten Transaminasen. Die Zellen wurden für 24 h in Kontrollmedium inkubiert, mit (Steatose) oder ohne (Kontrolle) Ölsäure und Palmitinsäure im Verhältnis 2:1 mit einer Gesamtkonzentration von 1 mM. Unmittelbar anschließend wurden die Zellen von der Kulturplatte gelöst und mittels Kavitationsverfahren (Dounce-Homogenisator) vollständig lysiert. Die Enzymaktivität wurde zur Vergleichbarkeit auf den Gesamtproteingehalt der Suspension normalisiert und als Mittelwert \pm Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten für jeden Zelltyp und Kultivationsmodus ($N = 3$; $n = 9$) angegeben. Signifikante Unterschiede wurden in Bezug zur entsprechenden PHH-Gruppe angegeben, bzw. relevante Unterschiede innerhalb der Gruppen durch Klammern kenntlich gemacht (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). A: Intrazelluläres AST-Aktivitätslevel. B: Intrazelluläres ALT-Aktivitätslevel, die leberspezifische Transaminase.

Die zytosolische AST-Aktivität der PHH ist ca. 6x höher als die der konfluenten HepaFH3 (Abb. 11 A). Dies korreliert in etwa mit dem zu erwartenden Ergebnis, wenn man den entsprechenden Zytotoxizitätstest (Abb. 4) zugrunde legt. Die AST-Konzentration der HepG2-Zelllinie liegt noch knapp unter der Enzymaktivität des konfluenten Klons. Die proliferierenden HepaFH3 liegen noch einmal 8-10x unter der AST-Aktivität der HepG2 und des proliferierenden Pendants.

Die Bestimmung der sehr leberspezifischen ALT-Aktivität (Abb. 11 B) in den verschiedenen Zelltypen zeigt ein ähnliches Verteilungsmuster wie die der AST-Aktivität (Abb. 11 A). Doch zeigen die PHH einen deutlich ausgeprägteren Abstand zu den immortalisierten Zelllinien. So ist zum Beispiel das ALT Aktivitätslevel der konfluenten HepaFH3 16x niedriger als das der PHH.

Es ist in beiden Transaminasetests (Abb. 11) zu sehen, dass die Level der Aminotransferaseaktivität in allen steatotischen Zellen im Schnitt um ca. 28% erhöht sind. Nur in den proliferierenden HepaFH3 kann dieser Zusammenhang, aufgrund der insgesamt niedrigen Enzymaktivität, nicht beobachtet werden.

4.7 Intrazelluläre Insulinsignaltransduktion

Das Vorliegen einer Insulinresistenz gilt als Definitionsmerkmal im "Multiple-Hit" Modell der NAFLD ⁽¹⁰⁾. Der Nachweis der Insulinresistenz im verwendeten *in-vitro* NAFLD-Modell erfolgt durch Untersuchung der Phosphorylierungslevel der dem Insulinrezeptor nachgeschalteten Signalproteine. Das hierfür verwendete Erklärungsmodell stützt sich auf die Diacylglycerolhypothese. Hierbei liegt der Insulinresistenz ein lipidinduzierter Defekt des Insulinsignalweges zugrunde. Erhöhter intrazellulärer Diacylglycerol (DAG) - Gehalt und ein nachfolgend gesteigertes PKC- ϵ (Proteinkinase C) Aktivierungslevel führen zu einer verminderten Tyrosinphosphorylierung des Insulinrezeptorsubstrates (IRS) 1 und 2 ^(66, 67). Der bei der Insulinresistenz der Leberzelle verminderte Aktivierungsgrad des IRS setzt sich im PI3K-Akt-Signalweg fort. Davon beeinflusst werden die Phosphorylierungslevel der in der Arbeit untersuchten Signalproteine Akt, GSK3 und FoxO1. Ausgespart bzw. nur gering beeinträchtigt durch die Insulinresistenz zeigt sich der MAP-Kinase-Weg, mit der in dieser Arbeit untersuchten MAP-Kinase ERK ⁽⁶⁸⁾.

Hierzu wurde die Hälfte der Zellen nach der 24 h Steatoseinduktion für 15 min mit 100 nm Insulin inkubiert um, die Sensitivität der HepaFH3 auf Insulingabe und eine potentiell induzierbare

Insulinresistenz festzustellen. Der Inkubationsvorgang wurde mittels Zellyse durch Zugabe des Lysepuffers mit Phosphorylaseinhibitorzusatz unterbrochen. Zusätzlich zum Konzentrationsangleichs des Proteingehaltes der Proben nach BCA wurde im Immunoblot die phosphorylierte Proteinmenge auf das Housekeeping Protein β -Actin normiert. Die anschließende semiquantitative densitometrische Auswertung der Immunoblotdaten erfolgte mittels Image-Lab Software (Bio-Rad), die eine Auswertung überbelichteter Proteinbanden verhinderte. In Abb. 12 werden repräsentative Ausschnitte der Immunoblotabbildungen, der nachfolgend beschriebenen Experimente gezeigt.

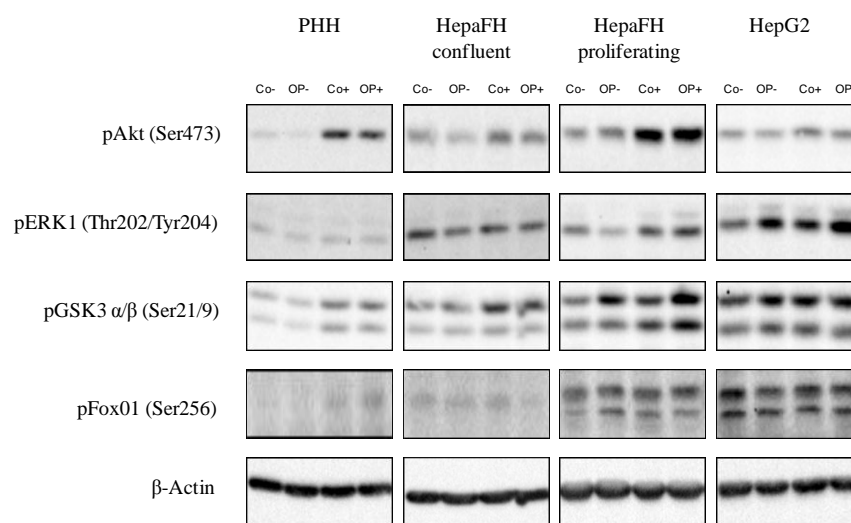


Abb. 12: Repräsentative Ausschnitte des Western Blot. Die Zellen wurden für 24 h in Kontrollmedium inkubiert, mit (Steatose hier "OP" für Oleat/Palmitat) oder ohne (Kontrolle hier "Co") Ölsäure und Palmitinsäure im Verhältnis 2:1 mit einer Gesamtkonzentration von 1 mM. Unmittelbar anschließend wurde die Hälfte der Zellen für 15 min mit 100 nM Insulin inkubiert (mit Insulin: +; ohne Insulin: -). Der Inkubationsvorgang wurde mittels Zellyse durch Zugabe des Lysepuffers mit Phosphorylaseinhibitorzusatz unterbrochen. Die Messung der Chemolumineszenz und die nachfolgende densitometrische Auswertung erfolgte mittels Chemi Doc MP und der Image-Lab Software. Im Immunoblot wurde die phosphorylierte Proteinmenge auf das Housekeeping Protein β -Actin normiert.

4.7.1 p44/42 MAPK (ERK 1/2) (Thr202/Tyr204)

Der 44/42 MAPK (ERK1/2) Signalweg kann als Antwort auf viele extrazelluläre Reize hin aktiviert werden, wie zum Beispiel durch Mitogene, Wachstumsfaktoren und Zytokine. Die MAP-Kinasegruppe stellt den zytosolischen Endpunkt des RAF-RAS-MEK-ERK Signalweges dar, welches phosphoryliert und damit aktiviert in den Nukleus transloziert und dort durch Phosphorylierung verschiedene Transkriptionsfaktoren aktiviert. Der ERK1/2 Signalweg wird als Schlüsselfad der normalen Zellproliferation betrachtet, welcher in karzinomatösen Zellen übermäßig

aktiviert ist ⁽⁶⁹⁾. In dieser Arbeit dient ERK 1/2, als zytosolischer Endpunkt des RAF-RAS-MEK-ERK Signalweges, zur Bestimmung der Aktivität dieses MAPK-Signalweges und damit als Parameter des Proliferationsverhaltens der Zelle.

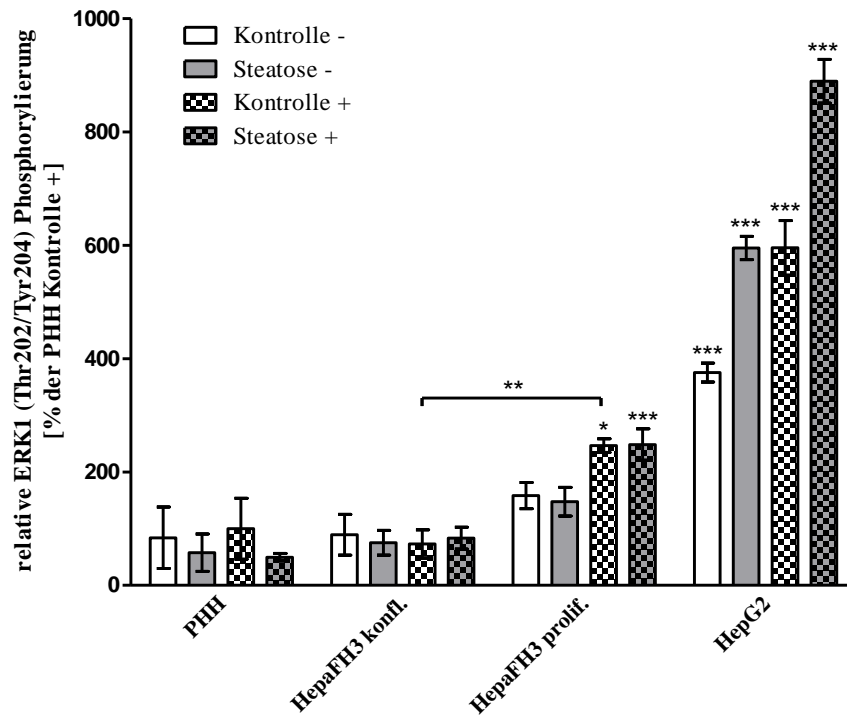


Abb. 13: Vergleich der 44/42 MAPK (ERK 1)-Phosphorylierung. Die Zellen wurden für 24 h in Kontrollmedium inkubiert, mit (Steatose) oder ohne (Kontrolle) Ölsäure und Palmitinsäure im Verhältnis 2:1 mit einer Gesamtkonzentration von 1 mM. Unmittelbar anschließend wurde die Hälfte der Zellen für 15 min mit 100 nM Insulin inkubiert (mit Insulin: +; ohne Insulin: -). Der Inkubationsvorgang wurde mittels Zelllyse durch Zugabe des Lysepuffers mit Phosphorylaseinhibitorzusatz unterbrochen. Die Messung der Chemolumineszenz und die nachfolgende densitometrische Auswertung erfolgte mittels Chemi Doc MP und der Image-Lab Software. Für die densitometrische Auswertung wurde die phosphorylierte Proteinmenge auf das Housekeeping Protein β -Actin normiert und als Mittelwert \pm Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten für jeden Zelltyp und Kultivationsmodus (N = 3; n = 9) angegeben. Signifikante Unterschiede wurden in Bezug zur entsprechenden PHH-Gruppe angegeben, bzw. relevante Unterschiede innerhalb der Gruppen durch Klammern kenntlich gemacht (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001).

Die Phosphorylierungslevel von ERK 1/2 in den PHH und den konfluenten HepaFH3 sind ähnlich niedrig und aufgrund der großen Abweichung ist kein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungen der Zellen festzustellen (Abb. 13). Nur tendenziell ist in den PHH eine verminderte Phosphorylierung der Steatosgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe im Sinne einer lipidinduziert verminderten Signaltransduktion zu erkennen. In den proliferierenden HepaFH3

jedoch ist ein leicht erhöhtes basales Phosphorylierungslevel nachweisbar, sowie ein Ansprechen auf die Insulininkubation zu beobachten. Der Vergleich der konfluenten HepaFH3 mit dem proliferierenden Pendant, zeigt eine signifikante erhöhte Signalstärke in den proliferierenden HepaFH3. HepG2 zeigt das höchste Phosphorylierungslevel in den durchgeführten Versuchen. Die insulinstimulierte Tyrosinphosphorylierung der MAP-Kinase ERK1/2 in den HepG2 war höher in den steatotischen Zellgruppen, ebenso war das basale Erk Phosphorylierungslevel in den steatotischen Zellen erhöht.

4.7.2 pAkt (Ser473)

Akt ist eine zentrale Kinase des PI3K-Akt-Signalweges. Sie spielt eine essentielle Rolle in der Kontrolle des Zellüberlebens, der Apoptose und der Regulation des Glycogenmetabolismus durch die Phosphorylierung und Inaktivierung von GSK-3 α/β und FoxO1⁽⁷⁰⁾. Die verminderte Phosphorylierung des IRS der insulinresistenten Zelle setzt sich im PI3K-Akt-Signalweg fort und wirkt sich auf das Phosphorylierungslevel von Akt aus.

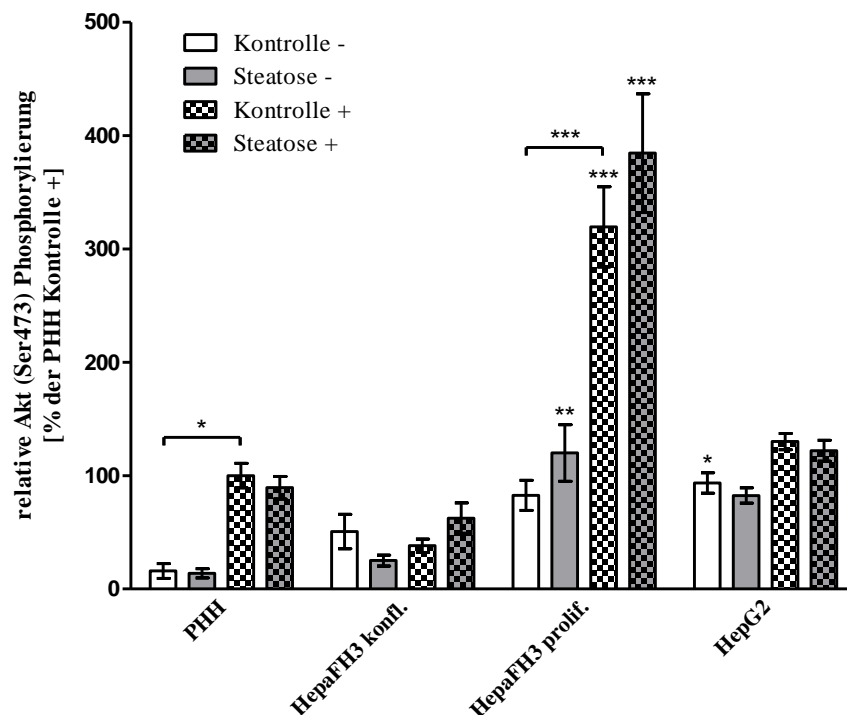


Abb. 14: Vergleich der Akt-Phosphorylierung. Die Zellen wurden für 24 h in Kontrollmedium inkubiert, mit (Steatose) oder ohne (Kontrolle) Ölsäure und Palmitinsäure im Verhältnis 2:1 mit einer Gesamtkonzentration von 1 mM. Unmittelbar anschließend wurde die Hälfte der Zellen für 15 min mit 100 nM Insulin inkubiert (mit Insulin: +; ohne Insulin: -). Der Inkubationsvorgang wurde mittels Zelllyse durch Zugabe des Lysepuffers mit Phosphorylaseinhibitorzusatz unterbrochen. Die Messung der Chemolumineszenz und die nachfolgende

densitometrische Auswertung erfolgte mittels Chemi Doc MP und der Image-Lab Software. Für die densitometrische Auswertung wurde die phosphorylierte Proteinmenge auf das Housekeeping Protein β -Actin normiert und als Mittelwert \pm Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten für jeden Zelltyp und Kultivationsmodus ($N = 3$; $n = 9$) angegeben. Signifikante Unterschiede wurden in Bezug zur entsprechenden PHH-Gruppe angegeben, bzw. relevante Unterschiede innerhalb der Gruppen durch Klammern kenntlich gemacht (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Die Phosphorylierungslevel der PHH und der proliferierenden HepaFH3 zeigen eine starke Reaktion auf die Insulingabe, auch in den HepG2 ist ein leichter Anstieg der Phosphorylierungslevel festzustellen (Abb. 14). Im Gegensatz dazu kann keine Reaktion auf die Insulinstimulation in den konfluenten HepaFH3 und HepG2 gemessen werden. Es zeigt sich eine leicht verminderte Phosphorylierung der PHH-Steatosegruppe im Vergleich zur Kontrolle im Sinne einer lipidinduziert verminderten Signaltransduktion.

4.7.3 pGSK-3 α/β (Ser21/9)

GSK-3 α/β stellt ein nachgeschaltetes Element des PI3K-Akt Signalwegs dar, welcher unter anderem das Überleben der Zelle reguliert. Die Aktivität dieser Protein-Kinase kann durch die Akt vermittelte Phosphorylierung an Serin 21 und Serin 9 des GSK-3 α/β gehemmt werden ⁽⁷¹⁾. Die Glycogensynthase-Kinase (GSK) phosphoryliert und inaktiviert unter anderem die Glycogensynthase, welche das Schlüsselenzym in der Konversion von Glucose zu Glycogen darstellt. Somit spielt die GSK eine wichtige regulative Rolle in der Glycogensynthese. Die Glycogensynthase ist. Je höher das Phosphorylierungslevel von GSK-3 ausfällt, desto geringer die Inhibierung der Glycogensynthase.

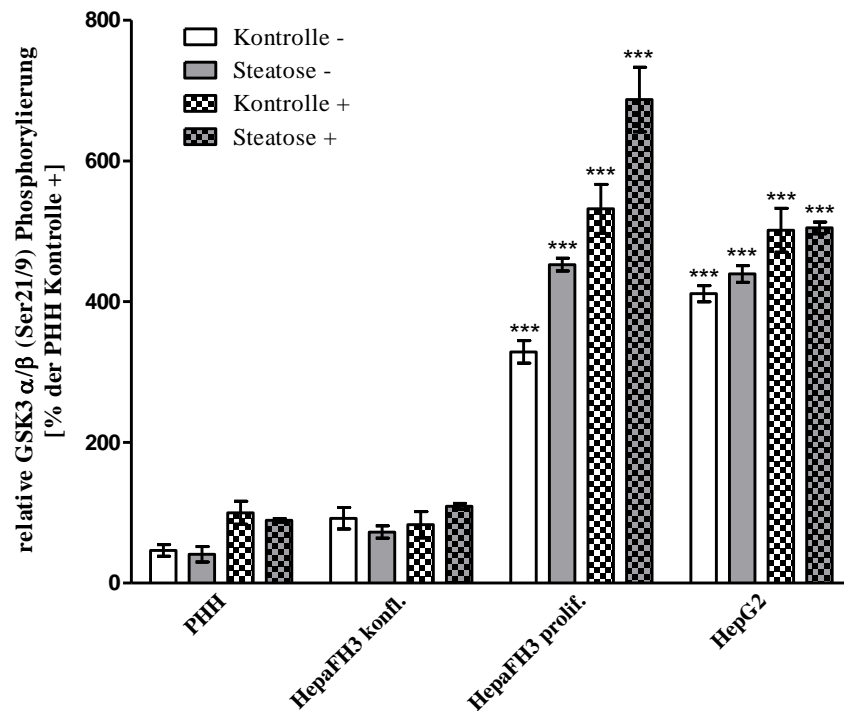


Abb. 15: Vergleich der GSK-3 α/β -Phosphorylierung. Die Zellen wurden für 24 h in Kontrollmedium inkubiert, mit (Steatose) oder ohne (Kontrolle) Ölsäure und Palmitinsäure im Verhältnis 2:1 mit einer Gesamtkonzentration von 1 mM. Unmittelbar anschließend wurde die Hälfte der Zellen für 15 min mit 100 nM Insulin inkubiert (mit Insulin: +; ohne Insulin: -). Der Inkubationsvorgang wurde mittels Zelllyse durch Zugabe des Lysepuffers mit Phosphorylaseinhibitorzusatz unterbrochen. Die Messung der Chemolumineszenz und die nachfolgende densitometrische Auswertung erfolgte mittels Chemi Doc MP und der Image-Lab Software. Für die densitometrische Auswertung wurde die phosphorylierte Proteinmenge auf das Housekeeping Protein β -Actin normiert und als Mittelwert \pm Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten für jeden Zelltyp und Kultivationsmodus (N = 3; n = 9) angegeben. Signifikante Unterschiede wurden in Bezug zur entsprechenden PHH-Gruppe angegeben (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Die densitometrische Auswertung der pGSK-3 Daten zeigte erhöhte Phosphorylierungslevel in den proliferierenden Zellkulturen (Abb. 15). Äquivalent hierzu zeigten sich sehr niedrige Phosphorylierungslevel in den PHH und den konfluenten und damit nur noch sehr eingeschränkt proliferierenden HepaFH3. Eine lipidinduzierte verminderte Signaltransduktion konnte hier nur bei einzelnen PHH-Donoren nachgewiesen werden. Aufgrund der insgesamt großen interindividuellen Donorunterschiede stellte sich dieses Phänomen in der graphischen Abbildung nicht dar.

4.7.4 pFoxO1 (Ser256)

Die aktiven Mitglieder der Forkhead-Boxproteinfamilie sind als Tumorsuppressoren bekannt und fördern den Zellzyklusarrest und die Apoptose. Vermehrte Proliferation resultiert aus einer Inaktivierung der Forkhead-Transkriptionsfaktoren durch die Phosphorylierung durch Akt an der Proteinstelle Thr24, Ser256 und Ser319. Hierbei wandern die inaktivierten Moleküle aus dem Nucleus, in welchem sie zuvor Transkriptionsfaktoraktivität inhibierten, ins Zytosol, und werden dort anschließend ubiquitiniert und abgebaut^(72, 73). Darüber hinaus induziert aktives FoxO1 die Transkription der Glucose-6-Phosphatase und erhöht damit indirekt die hepatische Glucoseproduktion⁽⁷⁴⁾.

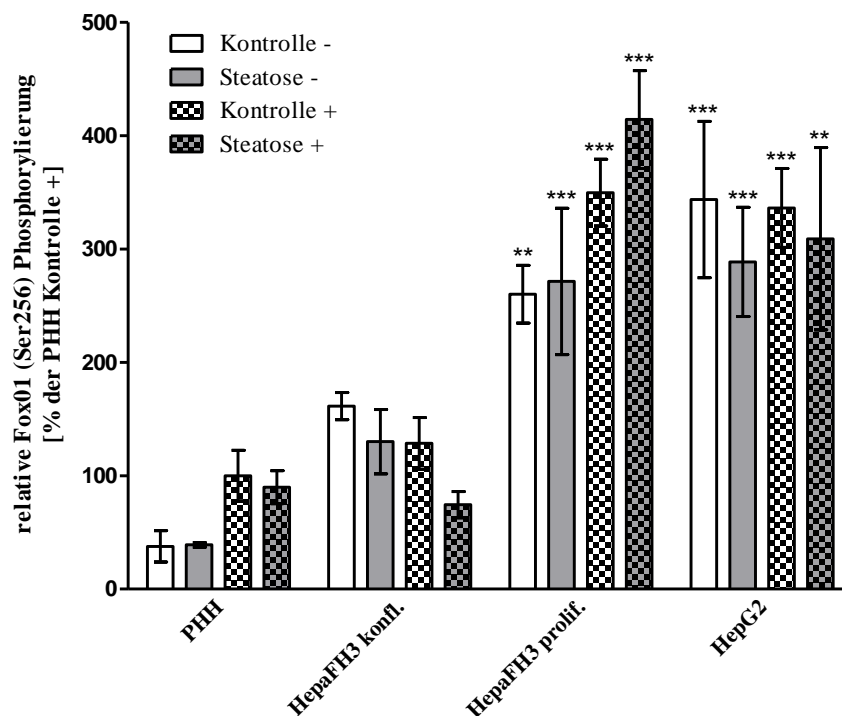


Abb. 16: Vergleich der FoxO1-Phosphorylierung. Die Zellen wurden für 24 h in Kontrollmedium inkubiert, mit (Steatose) oder ohne (Kontrolle) Ölsäure und Palmitinsäure im Verhältnis 2:1 mit einer Gesamtkonzentration von 1 mM. Unmittelbar anschließend wurde die Hälfte der Zellen für 15 min mit 100 nM Insulin inkubiert (mit Insulin: +; ohne Insulin: -). Der Inkubationsvorgang wurde mittels Zelllyse durch Zugabe des Lysepuffers mit Phosphorylaseinhibitorzusatz unterbrochen. Die Messung der Chemolumineszenz und die nachfolgende densitometrische Auswertung erfolgte mittels Chemi Doc MP und der Image-Lab Software. Für die densitometrische Auswertung wurde die phosphorylierte Proteinmenge auf das Housekeeping Protein β -Actin normiert und als Mittelwert \pm Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten für jeden Zelltyp und Kultivationsmodus (N = 3; n = 9) angegeben. Signifikante Unterschiede wurden in Bezug zur entsprechenden PHH-Gruppe angegeben (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Die proliferierenden Zellen zeigen deutlich höhere FoxO1 Phosphorylierungslevel als die konfluenten HepaFH3 und die differenzierten PHH (Abb. 16). Eine Insulinresponsibilität der konfluenten HepaFH3 kann mittels der graphischen Auswertung nicht gezeigt werden. Es zeigt sich eine nicht signifikante verminderte Phosphorylierung der PHH-Steatosgruppe im Vergleich zur Kontrolle im Sinne einer lipidinduziert verminderten Signaltransduktion.

5 Diskussion

In dieser Arbeit wurde der mögliche Einsatz von upcyte[®]-Hepatozyten im *in-vitro* NAFLD Modell geprüft. Hierzu wurden metabolische Eigenschaften mit Schwerpunkt im Bereich des Glucose- und Fettstoffwechsel der mit upcyte[®]-Faktoren transduzierten Hepatozyten (HepaFH3) im *in-vitro* Steatosemodell dargestellt. Als Referenz wurden hierbei primäre humane Hepatozyten und die hepatisch Krebszelllinie HepG2 verwenden. Ziel der Untersuchung war die Beantwortung der Frage der Eignung der HepaFH3 als geeignete Alternative zu PHH und HepG2 im *in-vitro* NAFLD-Modell. Da aufgrund der stark eingeschränkten Verfügbarkeit von PHH, als Goldstandard in *in-vitro* Lebermodellen, die Nachfrage nach einem geeigneten Ersatz gegeben ist ⁽⁷⁵⁾. Die alternativ verfügbaren Hepatozyten für *in-vitro* Modelle, weisen Mängel in ihrer Aussagekraft auf. So ist die Verwendung tierischer Zellen anzeigepflichtig eingeschränkt und die damit gewonnenen Erkenntnisse können nicht unmittelbar auf den Menschen übertragen werden ^(44, 45). Auch die häufig verwendeten hepatischen Zelllinien (HepG2, HuH7), welche theoretisch in unbeschränkter Menge zur Verfügung stehen, sind durch das Fehlen einiger differenzierter hepatischer Eigenschaften in ihrer Aussagekraft stark eingeschränkt ⁽³⁴⁾. Auf den folgenden Seiten werden daher die experimentell ermittelten leberspezifischen metabolischen Funktionen der HepaFH3 mit denen der PHH und HepG2 verglichen und diskutiert.

5.1 Lipidakkumulation und Lipotoxizität im verwendeten NAFLD-Modell

Für ein funktionierendes *in-vitro* NAFLD-Modell ist die Fähigkeit die angebotenen FFA aus dem Medium aufzunehmen, daraus TAGs zu synthetisieren und diese speichern zu können, essenziell. Zudem sollten die ausgewählten Konzentrationen, die in dieser Arbeit verwendet wurden (0,33 mM Ölsäure und 0,66 mM Palmitinsäure), und durch die Arbeit von Gómez-Lechón et al., 2007 in ihrer Wirksamkeit bereits bestätigt worden sind, auf die HepaFH3 nicht in zu großem Umfang toxisch wirken ⁽⁴⁰⁾. Resultierend aus zu großen Zellverlusten zwischen und innerhalb der verschiedenen Zelltypen könnte folglich die Vergleichbarkeit der Versuche nicht mehr garantiert werden ⁽⁴⁶⁾.

In diesem experimentellen Setup war zu beobachten, dass die verwendeten Hepatozyten insgesamt eine gleichartige Reaktion auf das Überangebot an FFA zeigten (Abb. 2). Der initiale Lipidgehalt und damit die Ausgangslage war in den zur Proliferation befähigten Hepatozyten deutlich niedriger als in den PHH, aber der Faktor der Akkumulation war in allen verwendeten

Zellen sehr ähnlich (PHH: 3,1x der Kontrolle, für beide HepaFH3: 3,0x der Kontrolle und für HepG2: 2,4x der Kontrolle). Diese Faktoren liegen unterhalb derer die in Gómez-Lechón et al., 2007 ermittelt wurden ⁽⁴⁰⁾. Ein Grund hierfür könnte die fehlende Normierung der, in der Arbeit Gómez-Lechón et al., 2007, angegebenen Daten auf den Proteingehalt sein.

Zudem wurde in dieser Arbeit, im Gegensatz zu Gómez-Lechón et al., 2007, 1% bovines Serumalbumin in Kontroll- und Steatosemedium der HepG2 hinzugegeben, um die Löslichkeit und Stabilität der Fettsäuren im Zellmedium zu gewährleisten und damit, die in den Voruntersuchungen aufgetretene Lipotoxizität, abzufangen. Diese trat wiederholt bei Verwendung der 1 mM FFA-Emulsion während der Vorexperimente mit HepG2 auf, sodass sich zur Zugabe von bovinem Albumin entschieden wurde.

Die in dieser Arbeit verwendeten FFA-Konzentrationen liegen mit 1 mM im Spitzenwertbereich der physiologischen Serumkonzentration. Diese liegen unter ausgeglichenen Ernährungsbedingungen bei 0,3 - 0,4 mM, in der postabsorptiven Phase steigen diese bis auf 0,5 mM, im Hungerzustand auf bis zu 0,8 mM und im diabetischen Koma sind Werte bis zu 2 mM möglich ⁽⁷⁶⁾. Bei derart hohen Fettsäurekonzentrationen spielt der Diffusionstransport durch die Zellmembran via Flip-Flop Mechanismus eine deutlich größere Rolle als der proteinvermittelte Fettsäuretransport bei niedrigen Konzentrationen ⁽⁷⁷⁾. Hiermit erlangt die Verfügbarkeit der äquivalenten FFA-Konzentration im Medium eine besondere Bedeutung. Wird Albumin zum Medium hinzugegeben, so binden die FFA aufgrund ihrer lipophilen Struktur ans Albumin, jedoch kann nur der freie Anteil an FFA die Zellmembran passieren. Da zudem auch zwischen Maus-, Rinder und Menschenalbuminen Unterschiede in der Bindungskapazität bestehen ^(34, 78), ist besondere Vorsicht beim Einsatz von Albumin angebracht, möchte man die Ergebnisse anschließend mit anderen Kulturen vergleichen. Daher ist davon auszugehen, dass die HepG2 Zellen, dem experimentellem Aufbau geschuldet, nicht die maximale Lipidakkumulation erreicht haben. Es ist aber auch klar ersichtlich, dass die Lipidspeicherkapazitäten der zur Proliferation fähigen Hepatozyten in dieser Arbeit nicht an die der PHH heranreichen. Dieser Effekt wurde bereits von Gómez-Lechón et al., 2007⁽⁴⁰⁾ beschrieben.

Hinsichtlich der Lipidakkumulation, ist HepaFH3 der Zelllinie HepG2 nicht überlegen. Jedoch kann eine leicht erhöhte Toleranz gegenüber der hohen FFA-Konzentration angenommen werden, da sich bei den HepaFH3 in den Voruntersuchungen auch ohne BSA-Zusatz keine nennenswerte Lipotoxizität gezeigt hat.

Zur Evaluation der Lipotoxizität in der Hepatozytenkulturen wurden mehrere gängige Methoden verwendet ⁽⁷⁹⁾. Denn ein ausgeprägter toxischer Effekt würde die Aussagekraft des Steatosemodells auf mehrere Weisen verringern:

- 1) Es würde nicht der Stoffwechsel unter steatotischen Bedingungen untersucht werden, sondern die akute Lipotoxizität.
- 2) Die Normierung der Stoffwechseldaten auf den Proteingehalt wäre größeren Schwankungen unterworfen und die Ergebnisse aufgrund des heterogenen Ablebens der Hepatozyten verzerrt. Eine Vergleichbarkeit der Daten wäre nicht gewährleistet.

Die verwendeten enzymatischen Assays beruhen alle auf dem Verlust der Plasmamembranintegrität und der damit verbundenen Leckage der zytosolischen bzw. mitochondrialen Enzyme (Abb. 17). Die Aussagekraft der Assays ist jedoch sehr unterschiedlich.

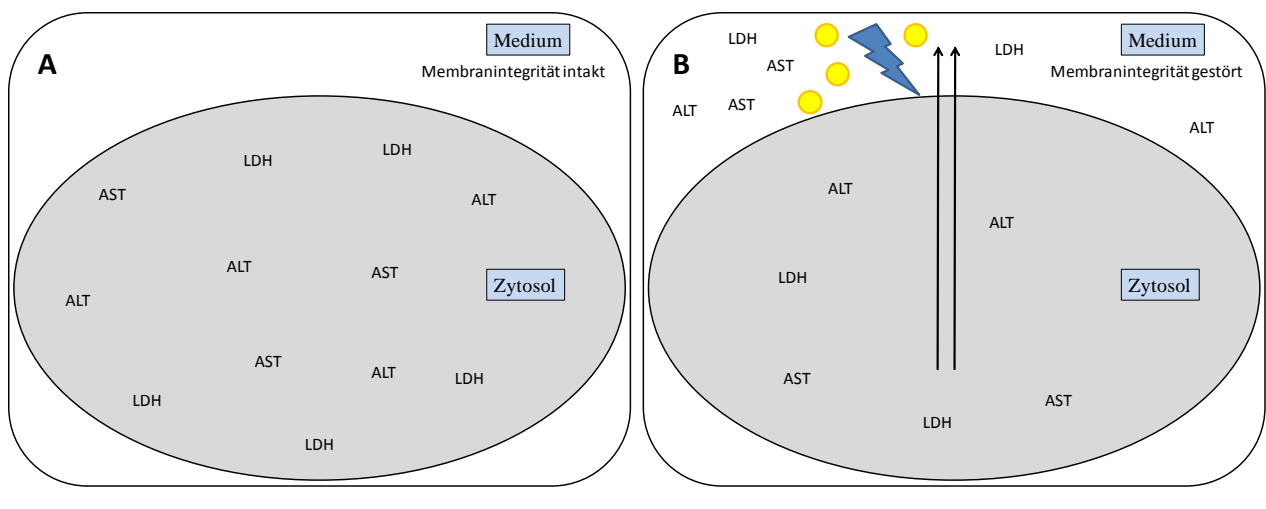


Abb. 17: Schematische Darstellung des Enzymefflux nach Störung der Membranintegrität durch potenziell lipotoxische Effekte. A: Intakte Membranintegrität mit zytosolischen Enzymen (LDH, AST und ALT). B: Durch freie Fettsäuren (gelbe Kreise) beschädigte Membranintegrität mit Efflux zytosolischer Enzyme und möglichem Nachweis im Kulturmedium.

Da in dieser enzymatischen Testreihe eine möglich Lipotoxizität nachgewiesen werden sollte, wurde auf eine Normierung auf den Proteingehalt verzichtet, da das Augenmerk auf Konzentrationsunterschieden zwischen Kontrolle und Steatose liegt und nicht auf den interzellulären Unterschieden der Proteinbiosynthese. Dies hätte das Ergebnis nur im Falle einer auftretenden Lipotoxizität rechnerisch verfälscht und damit die Aussagekraft der Daten geschmälert. Zudem ist eine vergleichbare zytosolische Gesamtkonzentration/Aktivität der Enzyme in den einzelnen Zelltypen aufgrund unterschiedlicher Genexpressionsprofilen nicht gewährleistet⁽⁸⁰⁾. Somit bleibt der intraspezifische Vergleich zwischen Kontroll- und Steatosegruppe.

Hierbei zeigte die Bestimmung der Lactatdehydrogenase messtechnisch die reliabelsten Ergebnisse, da von allen Zelltypen, für das Messverfahren, ausreichende Mengen an LDH ins Zellmedium freigesetzt wurde (Abb. 4 A). Wie beschrieben, eignet sich die Bestimmung der LDH-

Aktivitäten im Serum nicht zum Toxizitätsvergleich zwischen den Zelltypen. Denn der signifikante interspezifische Unterschied zwischen PHH, den Kultivationsmodi der HepaFH3 und HepG2 ließ keine Aussage über Unterschiede in der interspezifischen Membranpermeabilität zu, da der zelltypspezifische LDH-Gehalt und die spezifische Enzymaktivität (U / mol) nicht untersucht wurde.

Die Bestimmung der Transaminasen als Zytotoxizitätsnachweis zeigte sich in dieser Arbeit als ein nicht valider Parameter für diese Fragestellung, aufgrund der sehr geringen Freisetzung aktiver Transaminasen ins Medium. Die daraufhin erfolgte Bestimmung des zellulären Gesamttransaminasegehaltes macht deutlich, dass der Transaminasegehalt der HepaFH3 und HepG2 signifikant unter dem der PHH liegen (Abb. 11) und somit beim Zelluntergang geringere Transaminaseaktivitäten im Medium gemessen werden können. Zudem liegt AST intrazellulär kompartimentiert vor, so befinden sich beispielsweise ungefähr 80-85% der AST-Enzyme in den Mitochondrien und werden erst nach entsprechend schwerer Schädigung dieser Kompartimente ins Medium abgegeben⁽⁷⁹⁾. Daher lag in dieser Arbeit die messbare AST-Aktivität der Zelllinien im Zellmedium knapp über - und bei ALT teils unter der Nachweisgrenze (Abb. 11). Somit könnten bei alleiniger Verwendung der Transaminasen als Zytotoxizitätsparameter folglich auch vermehrte Nekrosen der Zelllinienkultur verborgen bleiben.

Aufgrund dieser Erkenntnis wurde sich für die zusätzliche Verwendung der Proteinbestimmung als Lipotoxizitätsmarker der Wahl für diese Arbeit entschieden. Diese zeigten keinen Anhalt für eine Lipotoxizität während des Versuches. In der Kultur der konfluenten HepaFH3 sowie der HepG2 war ein Anstieg des Proteingehaltes zu beobachten, der auf eine Proliferation in der Kulturphase schließen lässt. Dies wäre nicht unüblich, da diese Zellen nicht zu 100% konfluent ausgestreut wurden und HepG2 auch keine Kontaktinhibition zeigte. Für eine Überlagerung der lipotoxischen Effekte mit der Proliferation gab es keinen Anhalt, da weder ein signifikanter Anstieg der LDH-Aktivität im Serum noch signifikante Unterschiede im Proteingehalt im Vergleich zu erkennen waren. Auch konnte kein inhibierender Einfluss auf die Proteinbiosynthese der steatotischen Zellen nachgewiesen werden.

Der unterschiedliche Proteingehalt in der BCA-Messung im Vergleich zur SRB-Färbung (Abb. 5) ergibt sich durch die Verwendung dreier zusätzlicher PHH-Donoren für den Glucose-, Urea-, und Albuminnachweis, da der Zellbedarf an PHH für ein komplettes Setup zu umfangreich gewesen wäre. Die hier gezeigte und für die Proben verwendete BCA-Normierung entstammt dem erwähnten zweiten Teilsetup. Dies veranschaulichte die Notwendigkeit der gründlichen Norma-

lisierung aller erhobenen Parameter, da eine Vergleichbarkeit der Syntheseleistungen sonst nicht gewährleistet werden konnte.

5.2 Kohlenhydratstoffwechsel der HepaFH3

Die Daten, die durch die Untersuchung der relativen Metabolismusrate durch den MTT-Test (Abb. 6) gewonnen wurden, legen nahe, dass HepaFH3 und besonders HepG2 eine erhöhte basale Umsatzrate aufgrund ihrer hohen Zellteilungsaktivität aufweisen. Der MTT-Test, der normalerweise zur Bestimmung der Zellviabilität genutzt wird, wird in dieser Arbeit hauptsächlich zur Bestimmung des NADH/NADPH-Umsatzes genutzt. Denn die Untersuchungen von Berridge et al. ^(58, 59) legen nahe, dass die Reduktion des MTT Farbstoffes vorwiegend durch die pyridinhaltigen Reduktionsäquivalente NADH und NADPH erfolgt und nur zu einem geringen Anteil durch Succinat (Abb. 18).

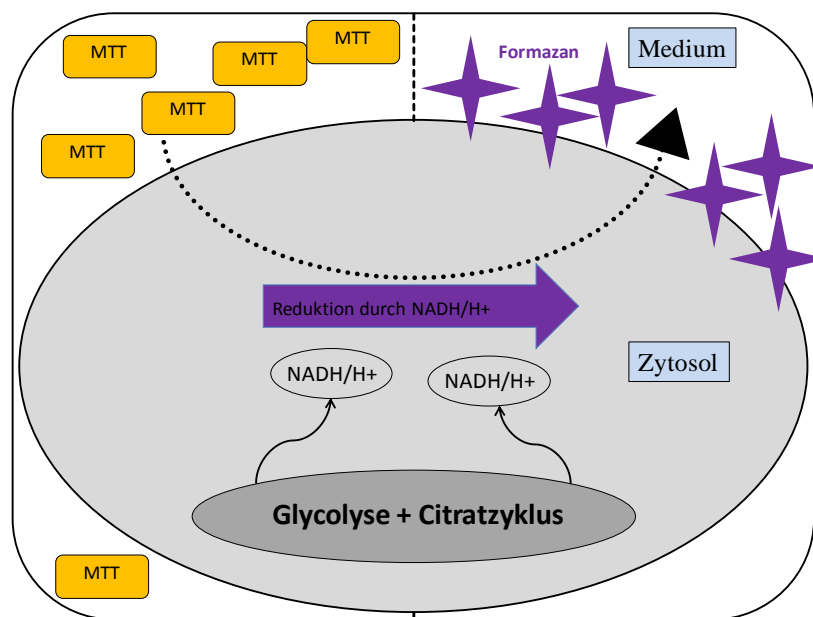


Abb. 18: Schematische Darstellung des MTT-Testprinzips. Der Nachweis der Zellvitalität durch den MTT-Test beruht auf der Reduktion des gelben, wasserlöslichen Farbstoffs 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in ein blau-violettes, wasserunlösliches Formazan. Untersuchungen von Berridge et al. ^(58, 59) legen nahe, dass die Reduktion des MTT Farbstoffes vorwiegend durch die pyridinhaltigen Reduktionsäquivalente NADH und NADPH und nur teilweise von Succinat erfolgt.

Diese These der erhöhten basalen Umsatzrate wird unterstützt durch die Untersuchung des Glucoseverbrauchs und schließlich auch vom mangelnden bzw. verminderten Vermögen der HepG2-/HepaFH3-Zellen Glycogen im nachweisbaren Umfang zu speichern (Abb. 7 und Abb. 8). Die zur Proliferation befähigten Zellen waren nicht in der Lage den verhältnismäßig geringeren NADH/NADPH-Umsatz der PHH im MTT-Test zu erreichen. Jedoch zeigten die konfluenten HepaFH3 niedrigere Turnoverraten als es das proliferierende Pendant und HepG2 taten. Die wahrscheinlichste Interpretation dieser Beobachtung ist, dass die niedrigere NADH/NADPH-Syntheserate in den konfluenten HepaFH3 mit der sowohl in den Vorexperimenten, als auch während der Kultur beobachtbaren und von Burkard et al., 2012 ⁽⁵¹⁾ propagierten Kontaktinhibition zusammenhängt. Diese Kontaktinhibition verhindert eine weitere Zellteilung der HepaFH3 sobald diese einen ausreichenden Zell-Zellkontakt erreicht haben.

In den steatotischen Kulturen der proliferationsbefähigten Zellen konnte eine leichte aber signifikant erhöhte NADH/NADPH-Synthese festgestellt werden. Verglichen mit den Daten der Lipotoxizität (SRB, BCA, LDH, AST, ALT) kann hierbei jedoch nicht von einem lipoprotektiven Effekt ausgegangen werden. Auch vom vollständigen Ausbleiben der Lipotoxizität kann aufgrund der Datenlage nicht angenommen werden. Zwei mögliche Erklärungsmodelle für den erhöhten Energieumsatz sind:

1.) Mit dem Überangebot an FFA und TAG übernimmt die β -Oxidation einen größeren Anteil an der Regeneration des reduzierten Pyridins NADH ⁽⁸¹⁾. Dieses wiederum reduziert mehr von dem im MTT-Test benutzten Tetrazoliumsalmes ⁽⁵⁹⁾. Die Glucoseoxidation, welche für den Großteil der NADH-Synthese in den unbehandelten Zellen zuständig ist, wird durch die Stoffwechselprodukte der β -Oxidation in den steatotischen Zellen gehemmt. Überwiegend geschieht dies durch die allosterische Hemmung des Schrittmacherenzym Pyruvatdehydrogenase (PDH) durch das akkumulierende Acetyl-CoA, NADH und ATP aus der β -Oxidation ^(81, 82). In Verbindung mit dem übermäßigen FFA-Angebot in den lipidreichen Zellmedien ergibt sich somit ein nachweisbar gesteigertes NADH/NAD⁺-Verhältnis in den steatotischen Zellen.

2.) Dieser Effekt wurde bereits 2015 durch Penke et al. im "high-fat diet" Mausmodell nachgewiesen ⁽⁸³⁾. Hier sah man auch eine vermehrte Nicotinamidphosphoribosyltransferase (Nampt)-mRNA Expression im Vergleich zu den Kontrollmäusen. Nampt stellt das Schrittmacherenzym des NAD Salvage-Pathway dar. Eine genaue Regulation von Nampt ist nicht bekannt. So wurde die Vermutung geäußert, dass ein gesteigertes NAD-Vorkommen, als potentielle Energieträger aus der Lipidoxidation, als Kompensationsmechanismus gegen die negativen Einflüsse der hepatischen Lipidakkumulation zu werten sein könnte ⁽⁸³⁾.

So haben die angebotenen Substrate einen großen, und auch schon im Vorexperiment sichtbaren Effekt, auf die basale NADH-Synthese. Dies ließ einen Viabilitätsvergleich mittels MTT-Test zum Ausschluss einer Zytotoxizität nicht zu, da die steatotischen Zellen im Vergleich einer etwaigen Kontrollgruppe nutritionsbedingt einen höheren NADH/NAD⁺-Umsatz zeigen.

Ein weiteres Argument gegen den vermeintlich lipoprotektiven Effekt stellt die vermehrte Bildung der ROS durch die Zellatmung dar. Die vermehrte β -Oxidation führt zu einem erhöhten mitochondrialem NADH/NAD⁺-Verhältnis und einem größeren mitochondrialem Membranpotenzial ($\Delta\psi$). Dies legt nahe, dass das Energieangebot, den zellulären Energieverbrauch übersteigt ⁽⁸¹⁾. Eine vermehrte FFA-Oxidation führt hierbei zu einem vermehrten Anteil von Elektronen, die an Komplex II der Atmungskette transferiert werden. Dies führt, im Vergleich zu Komplex I der Atmungskette, zu einer ineffizienten oxidativen Phosphorylation im Sinne einer intrinsischen Entkopplung, mit erhöhter Bildung von ROS ⁽⁸¹⁾.

Zusammenfassend sollte der Einsatz der tetrazoliumsalzbasierten Assays (MTT, XTT und WST-1), die häufig als Viabilitätstest in Versuchsaufbauten mit toxischen Substanzen (auch Fettsäuren) benutzt werden, überdacht werden, da sich diese für die Evaluation der Lipotoxizität in NAFLD-Modellen als nicht geeignet erwiesen. Denn das vermehrte Substratangebot in den steatotischen Zellen spiegelt sich in einer erhöhten Reduktionsrate des Tetrazoliumsalzes durch NADH wieder, wodurch eventuell entstehende lipotoxische Effekte maskiert werden können.

Bezüglich des Glucoseaufnahmeverhaltens (Abb. 7) wurde wie erwartet in den differenzierten Zellen die Eigenschaft der Gluconeogenese beobachtet. Außerdem wurde erwartet eine vermehrte Glucoseexkretion in den steatotischen Zellen vorzufinden. Dieser Effekt wäre unmittelbar durch die vermehrte Verfügbarkeit von ATP als Folge der erhöhten β -Oxidation und die allosterische Aktivierung der Pyruvatcarboxylase durch Acetyl-CoA zu erklären ⁽⁸²⁾. Mit zeitlichem Abstand wäre dieser Effekt durch die gesteigerte Aktivität von FoxO1 und FoxA2, bedingt durch die Insulinresistenz, zu erklären. Da die Forkhead Boxproteine zu einer gesteigerten Expression von Schlüsselenzymen der Gluconeogenese (PEPCK, Glucose-6-Phosphatase) führen ⁽⁸⁴⁾. Parallel dazu wurde ein verminderter Glucoseverbrauch in den steatotischen proliferationsbefähigten Zellen erwartet, da die erhöhte β -Oxidationsrate zu einer Beeinträchtigung der Glucoseoxidation führt. Hierbei wird die PDH durch die Akkumulation von Acetyl-CoA, NADH und ATP allosterisch gehemmt. Dieser Effekt konnte jedoch in dieser Arbeit durch eine verminderte Glucoseaufnahmerate nicht nachgewiesen werden, weder in den HepaFH3 noch in den HepG2. Einzig die PHH zeigten die Gluconeogenese wie erwartet, in Verbindung mit der vermehrten Glucoseexkretion in der Steatose. Die exzessive Glucoseaufnahme der konfluenten HepaFH3

zeigte keine gemessene Entsprechung im MTT-Test, im Sinne einer erhöhten NADH-Syntheserate, noch im Glycogentest, da hier dennoch große Mengen an Glycogen gespeichert wurden (Abb. 8).

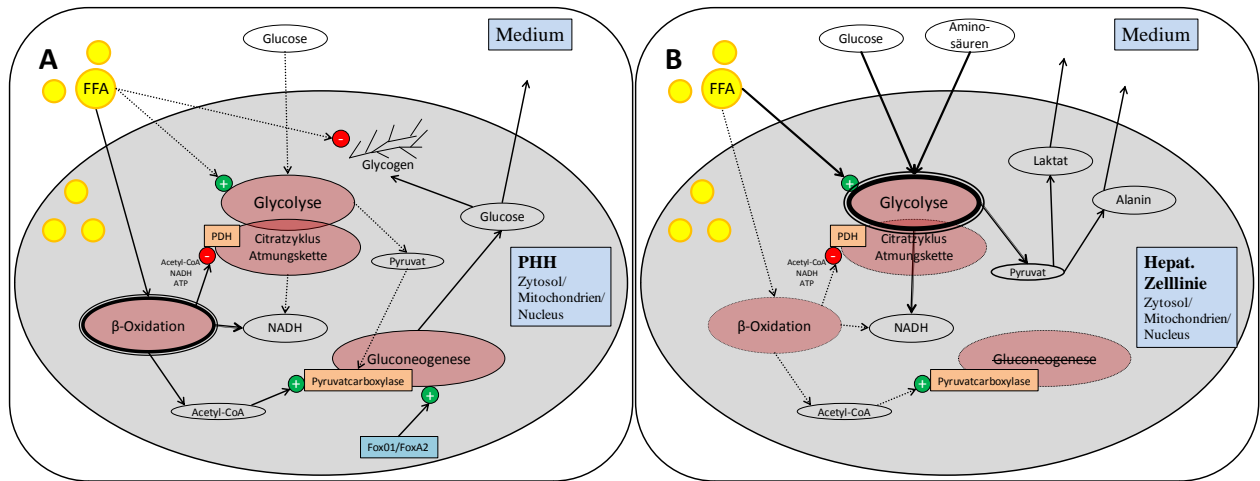


Abb. 19: Schematische Darstellung der metabolischen Unterschiede steatotischer PHH und steatotischer hepatischer Zelllinien. Grüne Kreise: Aktivierung; rote Kreise: Inhibierung; transparente rötliche Ovale: Stoffwechselwege; dicke Linien: aktive Stoffwechsel-/Signalwege; gestrichelte Linien: abgeschwächte Stoffwechsel-/Signalwege. A: Stoffwechsellage steatotischer PHH mit erhaltener Fähigkeit der Gluconeogenese, Glykogensynthese. B: Stark katabole Stoffwechsellage steatotischer hepatischer Zelllinien, wie HepG2. Verminderte oxidative Kapazität und β -Oxidationsfähigkeit, mit nachfolgender Anhäufung von Laktat und Alanin.

Entsprechend der Arbeit von Blackard et al., 1990 könnten die freien Fettsäuren einen stimulatorischen Effekt auf die Glycolyserate in Zelllinien, wie HepG2 (eventuell auch HepaFH3) haben, da diese eine sehr geringe oxidative Kapazität besitzen⁽⁸⁵⁾. Dies bedeutet, dass die von Zelllinien aufgenommene Glucose vornehmlich in die anaerobe Glycolyse eingeht und zu 75% der benutzten Glucose wieder als Lactat ins Medium abgegeben wird. Auch der Aminosäurestoffwechsel ist stark katabol, so werden zum Beispiel 60% des aufgenommenen Glutamins wieder als Lactat oder Alanin ausgeschieden⁽⁸⁶⁾ (Abb. 19). Daher könnte auch die NADH-Umsatzrate der Zelllinien im MTT-Test nur moderat hoch ausfallen, obwohl die Glucoseaufnahme deutlich höher ist, als die der PHH. Wie durch Blackard weiter beschrieben, könnte der stimulatorische Effekt auf die Glycolyse auf einer vermehrten Aktivierung der Glucosetransportenzyme beruhen, wie auch auf den aktivierten Schlüsselenzymen der Glycolyse durch unoxidierte freie Fettsäuren. Da Zelllinien eine verminderte β -Oxidationsfähigkeit besitzen ist nach Blackard der inhibitorische Effekt auf die Glycolyse geringer als in PHH. Mithilfe des Erklärungsansatzes von Blackard et al., 1990 könnte die vermehrte Glucoseaufnahme der HepaFH3 erklärt werden und der unerwartet hohe Glucoseverbrauch der konfluenten HepaFH3

(siehe Abb. 7) wäre keine messtechnische Anomalität, sondern würde, deckungsgleich mit dem Erklärungsmodell, dem Warburg-Effekt entsprechen^(85, 86). Dies würde aber auch bedeuten, dass die HepaFH3 trotz Kontaktinhibition und deutlich verminderter Proliferation eine sehr geringe oxidative Kapazität besitzen und in ihrem Energiemetabolismus der hepatokarzinomatösen Zelllinie HepG2 ähnlich sind.

Ein weiterer Aspekt des Kohlenhydratstoffwechsels der hepatischen Zellen ist die Fähigkeit Glycogen zu speichern. Der konfluente Kultivationsmodus der HepaFH3 zeigte eine erstaunlich hohe Glycogenspeicherfähigkeit, die nur 3,5x unter der Kapazität der PHH lag (Abb. 8). Mit einer Speicherkapazität die 48,1x unter der der PHH lag, waren die proliferierenden HepaFH3 mit den intrazellulär gespeicherten verzweigten Polysacchariden nur knapp über dem Detektionslimit. Weiterhin wurde ein physiologisch verminderter Glycogengehalt in den steatotischen PHH wie auch in den HepaFH, im Vergleich zu deren Kontrollgruppe, gefunden. Dies ist laut Ruddock et al., 2008⁽⁶⁸⁾ und Muoio et al., 2006⁽⁸²⁾ wahrscheinlich dem direkt inhibitorischen Effekt der FFA auf den Insulinsignalweg, den Glucosetransport, die Glycogensynthese und auf die damit zusammenhängende Genexpression, geschuldet. Der verminderte Glycogengehalt in den HepaFH3 ist wahrscheinlich auf deren reduzierter oxidativer Kapazität und dem damit verbundenen erhöhtem Glucosebedarf zurückzuführen. Durch den induzierten Proliferationsstopp wurde der ständige Bedarf an Reduktionsäquivalenten vermindert und somit konnte die Fähigkeit zur Glycogenspeicherung noch einmal erhöht werden.

Der verminderte Glycogengehalt in den proliferierenden HepaFH3 im Vergleich zu deren konfluenten Pendant ist jedoch nicht nur auf die noch stattfindende Proliferation zurückzuführen. So zeigt die Arbeit von Tolosa et al. von 2016, dass in hochkonfluenten Upcyte[®]-Hepatozytenkulturen die Expression von Kohlenhydratstoffwechsel assoziierten Genen (FGF21, G6PC, PEPCCK und GYS2) erhöht ist. Weitere Auswirkungen auf die Genexpression konnten in der genannten Arbeit durch Variation der Konfluenz nicht festgestellt werden⁽⁸⁷⁾.

Auf Signalebene korreliert das im Immunoblot erhaltene GSK-3 α/β Signal (Abb. 15) nicht mit den gespeicherten Glycogenmengen der Zelltypen. Denn je höher das Phosphorylierungslevel von GSK-3 ausfällt, desto geringer die Inhibierung des für die Glycogensynthese zuständigen Enzyms Glycogensynthase. So können die deutlich erhöhten Phospho-GSK-3 Werte der proliferierenden HepaFH3 und HepG2 durch eine Überaktivierung des PI3K-Signalweges oder anderen Wegen wie des Wnt-Signalweges zu erklären sein, sowie durch eine erhöhte GSK-3 Expression in diesen Zellen⁽⁸⁸⁾. Die wirksamere Regulation der Glycogensynthese und damit der Glycogensynthese findet durch eine allosterische Aktivierung durch Glucose-6-Phosphat statt,

welches aufgrund der höheren oxidativen Kapazität in den differenzierten Zellen in größerem Umfang zur Verfügung steht ⁽⁸⁹⁾.

5.3 Basale hepatische Syntheseleistung der HepaFH3

Die Albuminsynthese ist ein häufig genutzter Differenzierungsmarker von Hepatozyten und ist eine der hepatozytendefinierenden Synthesefähigkeiten ^(90, 91). Eine entsprechend hohe Syntheserate wäre daher für die Upcyte[®]-modifizierte HepaFH3 relevant, da dieser Marker auch für andere hepatozyten-ähnliche Zellen (z.B. differenzierte Stammzellen) in der Hepatozytenklassifikation als Qualitätsparameter Verwendung findet ⁽⁹⁰⁾. Somit ist die schwache Albuminsyntheserate der HepaFH3 verglichen mit HepG2 und PHH ein großer Nachteil für das Upcyte[®]-Verfahren (Abb. 9). Auch die Tatsache, dass die HepaFH3-Klone mit zunehmender Zellzahlverdopplung ihre Albuminsynthesefähigkeit verlieren und auch unter Kontaktinhibition nicht wieder erlangen, schränkt den Gebrauch der Upcyte[®]-Technologie ein. Hinsichtlich der experimentellen Durchführung ist festzuhalten, dass jede Zellpassage im Verlauf dieser Arbeit mit mindestens 2-3 Populationsverdopplungen (PD für "population doubling") einherging. Der Zeitraum in dem die reifste Zellreihe mit Passage 24 verwendet wurde erstreckt sich also von 48 bis hin zu 72 PDs. Wie in der Arbeit von Burkard et al., 2012 ⁽⁵¹⁾ empfohlen, sollte die Zellpopulationsverdopplung, der experimentell verwendeten Zellen, die Anzahl von 40 nicht überschreiten, da sonst Seneszenzeffekte vermutet werden. Somit ist nachvollziehbar, dass in Passage 24 nahezu keinerlei messbare Albuminsynthese mehr stattfand. Dennoch ist auch die Syntheserate der jüngsten HepaFH3-Zellreihe 4x niedriger als die Syntheserate der HepG2.

Die *in vitro* Beobachtung in dieser Arbeit der leicht abgesenkten Albuminsyntheserate in allen steatotischen Zellgruppen wurde bislang noch nicht beschrieben. So sind über den Mechanismus der lipidabhängigen Regulation der Albuminsynthese bislang keine aussagekräftigen Arbeiten veröffentlicht worden, die in diesem Modell anwendbar wären.

Eine weitere, häufig abgefragte Stoffwechsellleistung der Hepatozyten ist die Harnstoffsynthese, da diese Leistung eine grundlegende Detoxifikationsfähigkeit darstellt. Häufig beinhaltet bereits der erste Schritt des Aminosäureabbaus die Abspaltung der α -Aminogruppe durch Transaminierung oder Desaminierung. Anschließend muss das toxische Ammoniak in eine neutrale, sichere und dabei wasserlösliche Form umgewandelt werden, da es sonst unter anderem zu einer zerebralen Schädigung des Organismus durch die Hyperammonämie kommt ⁽⁹²⁾. Für diese Form der Ammoniakdetoxifikation und der damit einhergehenden intrazellulären pH-Regulation

benötigen die Hepatozyten die Fähigkeit der Harnstoffsynthese. Daher wird der Ammoniakmetabolismus auch häufig als funktioneller Marker des hepatischen Phänotyps verwendet ⁽⁹⁰⁾.

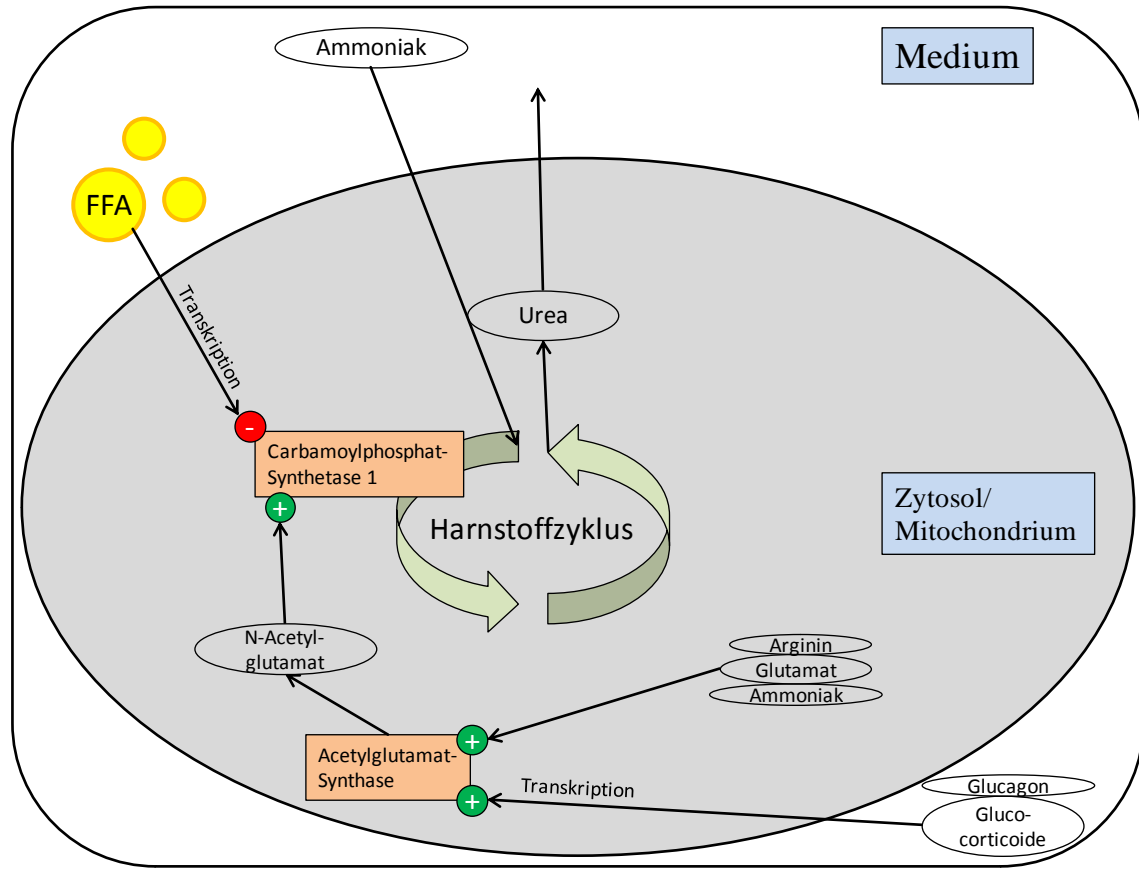


Abb. 20: Vereinfachte schematische Darstellung der Regulation des Harnstoffzyklus im steatotischen primären Hepatozyten. Die Besonderheiten der hepatischen Zelllinie sind nicht dargestellt. Grüne Kreise: Aktivierung; rote Kreise: Inhibierung; dicke Linien: aktive Stoffwechsel-/Signalwege.

Die Upcyte[®]-Klone sind in der Lage Harnstoff zu synthetisieren (Abb. 10). Aber hierbei sind sie kaum leistungsfähiger als HepG2 und haben damit immer noch eine Syntheseleistung die 31.6x unter der der primären humanen Hepatozyten liegt. Eine sinkende Ureasyntheserate mit steigender Passageanzahl analog zur Albuminsynthese der HepaFH3 konnte nicht festgestellt werden. Die proliferierenden HepaFH3 zeigen eine nahezu doppelt so hohe Syntheserate wie das konfluente Pendant (Abb. 10). Die Erklärung hierfür könnte in der Regulation des Harnstoffzyklus liegen. Dieser wird durch N-Acetylglutamat angekurbelt mittels allosterischer Aktivierung der Carbamoylphosphat-Synthetase 1, das die erste und gleichzeitig geschwindigkeitsbestimmende Reaktion des Harnstoffzyklus katalysiert. N-Acetylglutamat entsteht aus einer durch die Acetylglutamat-Synthase katalysierten Reaktion von Glutamat und Acetyl-CoA in den Mitochondrien. Das Enzym Acetylglutamat-Synthase wird überwiegend durch Arginin und Glutamat

aber ebenso durch Ammoniak aktiviert. So ist hauptsächlich die Aminosäurekonzentration ausschlaggebend für die Aktivität des Ureazyklus ⁽⁹³⁾. Zudem erhöhen Glucocorticoide und Glucagon die Transkriptionsrate der Acetylglutamat-Synthase ⁽⁹³⁾.

Bei identischem Aminosäureangebot für die HepaFH3 durch das Medium könnte einerseits eine höhere Ammoniakkonzentration bei den proliferierenden HepaFH3, aufgrund des steigenden Energiebedarfs, für den großen Unterschied in der Ureaexkretion verantwortlich sein. So würden im größerem Umfang Aminosäuren desaminiert und der Glycolyse zugeführt werden, was eine erhöhte Konzentration an Ammoniak nach sich zieht. Dieser vermehrt entstehende Ammoniak würde als Substrat im Harnstoffzyklus der proliferierenden HepaFH3 einfließen und zu Urea umgesetzt werden. Andererseits könnte auch die Transkription der Acetylglutamat-Synthase bedingt durch die unterschiedlichen Kultivationsmodi verändert sein (Abb. 20).

Burkard et al., 2012 beschreiben in ihrer Arbeit eine mit PHH vergleichbare Ureasyntase ihrer Upcyte[®]-Hepatozyten ⁽⁵¹⁾: "Upcyte[®] hepatocytes from all four donors tested produced urea in comparable amounts to reported values of primary hepatocytes." Dieses Ergebnis kann in dieser Arbeit nicht bestätigt werden, da die HepaFH3 signifikant hinter der Syntheseleistung der PHH zurückbleiben. Gleichwohl übertrifft die von HepaFH3 geleistete Harnstoffsynthese die unstimulierte Synthese der Upcyte[®]-Klone in Burkard et al., 2012 ⁽⁵¹⁾ rund 20x. Die deutlich höheren Sekretionswerte der HepaFH3 in dieser Arbeit könnten teilweise an einer Induktion der am Harnstoffzyklus beteiligten Enzymen durch Glutamin liegen ⁽⁹⁴⁾. Glutamin ist in allen Zellkultur-schritten dieser Arbeit reichlich vorhanden, da entsprechende Medien genutzt werden (z.B.: William's Medium E/GlutaMAX[™] mit dem Zusatz von Non Essential Amino Acids Solution).

Entgegen der initialen Erwartungen hatte das Überangebot an Fettsäuren die hepatische Ureasyntesefähigkeit kaum beeinflusst. Laut Tomomura et al., 1996 ⁽⁹⁵⁾ aber haben langkettige Fettsäuren, mit einer Kettenlänge von ≥ 16 C-Atome, einen dexamethasonvermittelten suppressiven Effekt auf die Carbamoylphosphatsynthetase mRNA Transkription. Dieser Effekt wird durch Doppelbindungen, wie sie in der Ölsäure vorkommen, noch verstärkt. Möglicherweise hat die nur 24 h andauernde Steatoseinduktion nicht ausgereicht, um einen vollständigen Umsatz der harnstoffzyklusbeteiligten Enzyme zu bewirken. So konnte der Effekt einer verminderten Carbamoylphosphatsynthetasekonzentration nicht zum Tragen kommen.

Der dexamethasonvermittelte suppressive Effekt der FFA könnte zudem mit dem vermehrten Vorhandensein und dem Abbau von energiereichen Substraten in Form der Fettsäuren konkurrieren, da durch das Übersteigen des zellulären Energiebedarfs ein erhöhtes Acetyl-CoA/CoA-Verhältnis vorliegt ⁽⁹⁶⁾. Das Acetyl-CoA dient anschließend auch der Acetylglutamat-Synthase

als Substrat, wodurch es N-Acetylglutamat vermittelt zu einer Aktivierung der Carbamoylphosphat-Synthetase 1 kommen kann ⁽⁹³⁾. So kann das den zellulären Energiebedarf übersteigende Angebot an Energieträgern, als Erklärungsmodell für die nicht sichtbaren Unterschiede in der Harnstoffsynthese zwischen den Kontroll- und Steatosegruppen dienen.

Die substanziellen Unterschiede in der Ureasyntese zwischen den PHH und HepG2 wurden durch Mavri-Damelin et al., 2007 ⁽⁹⁷⁾ bereits formuliert. Die verminderte Expression der Ornithintranscarbamylase und der Arginase verhindert die Synthese von Ornithin mit Carbamoylphosphat zu Citrullin. Hierdurch kann Ornithin, vermittelt durch Ornithindecaboxylase, für die benötigte Polyaminbiosynthese genutzt werden. Die Polyamine wiederum spielen eine wichtige Rolle in der Progression des Zellzyklus und der Proliferation ⁽⁹⁸⁾. Eventuell kann ein ähnlicher Mechanismus, wie die Verschiebung der Enzymexpressionsmusters mit nachfolgender Stoffwechselferschiebung durch den Immortalisationsprozess, für die HepaFH3 ebenso angenommen werden.

Regelmäßig werden Transaminasen in hepatischen *in-vitro* Modellen zur Messung toxischer Effekte verwendet. Da bereits in den Vorexperimenten der Verdacht aufkam, dass die Transaminaselevel, insbesondere ALT, in den proliferationsbefähigten Zellen vermindert sein könnten, wurde im Verlauf dieser Arbeit der gesamtzelluläre Transaminasegehalt bestimmt. Das Ziel dieser Untersuchung war zum einen der Nachweis, dass die Bestimmung der Transaminase im Zellmedium aufgrund zu geringer intrazellulärer Expression und damit zu niedriger Konzentrationen keinen reliablen Marker ergibt. Zum anderen, dass die Unterschiede in der interzellspezifischen Ausprägung der Enzyme einen Vergleich zwischen den Zellspezies nicht zulassen. Die experimentellen Daten (Abb. 10) zeigen eine den Verdacht bestätigende deutlich niedrigere Aminotransferaseaktivitäten in den proliferationsbefähigten Zellen. Dies lässt vermuten, dass die Expressionsfähigkeit dieser spezifisch hepatischen Enzyme der HepaFH3 eher denen der Zelllinie HepG2 entspricht, als den der PHH.

Trotz der im Allgemeinen erniedrigten gemessenen Syntheseleistung der HepaFH3 ist erkennbar, dass die Syntheseleistung der leberspezifischen Transaminasen, genauso wie die gezeigte Albuminsyntheserate, in den konfluenten HepaFH3, im Gegensatz zum proliferierenden Pendant, ansteigt. Der Verdacht liegt nahe, dass die konfluenten Upcyte[®]-Klone bedingt durch ihre Kontaktinhibition für einen längeren Zeitraum in der Interphase ihres Zellzyklus verharren können und so wieder ihre leberspezifischen Funktionen im höheren Umfang ausüben können ^(99, 100). Wie zum Beispiel eine gesteigerte Synthese der Transaminasen, solange sich die Zelle in einer verlängerten G₁- oder bereits G₀-Phase befindet.

Eine zweite Auffälligkeit betrifft die durchschnittlich erhöhte Aktivität der Transaminasen in der Steatose aller Zelltypen. So ist der Unterschied zwischen Kontroll- und Steatosegruppe hinsichtlich der Aktivität von AST ungefähr 24,8% und von ALT 33,8%. Ein entsprechender Regulationsmechanismus ist nicht bekannt. Für die erhöhten Transaminasewerte im Serum der NAFLD-Patienten bedeutet dies, dass die erhöhten Konzentrationen nicht allein von einer bereits erfolgten Leberzellschädigung stammen ^(101, 102), sondern eben auch von einer basal erhöhten Expression dieser Transaminasen in der Steatose.

5.4 Signaltransduktion und induzierter Proliferationsstopp der HepaFH3

Erhöhte Plasmakonzentrationen der freien Fettsäuren sind assoziiert mit insulinresistenten Zuständen wie der Adipositas und Typ-2 Diabetes und spielen eine wichtige Rolle in der peripheren und der hepatischen Insulinresistenz ⁽⁶⁸⁾. Die lipidinduzierte hepatische Insulinresistenz ist damit ein Definitionsmerkmal im "Multiple-Hit" Modell der NAFLD ^(10, 103). Es bleibt jedoch unklar, ob die Insulinresistenz letztlich Ursache oder Folge der Steatosis hepatis ist. Der dahinter stehende Mechanismus ist ebenso noch nicht vollständig verstanden ⁽⁶⁷⁾. Die von Samuel et al., 2010 postulierte Diacylglycerolhypothese beschreibt, dass die intrazelluläre Akkumulation von DAG als Zwischenprodukt der TAG-Synthese indirekt die Interaktion des IRS mit dem Insulinrezeptor vermindert ⁽⁶⁷⁾. Hohe intrazelluläre DAG-Konzentrationen seien laut diesem Modell mit einer Aktivierung von PKC ϵ assoziiert. PKC ϵ beeinträchtigt durch Serinphosphorylierung des IRS die Interaktionsfähigkeit mit dem Insulinrezeptor und vermindert die stimulatorische IRS Tyrosinphosphorylierung ^(66, 67). Dieser verminderte Aktivierungsgrad von IRS-1 und 2 setzt sich in einer Signalkaskade im PI3K-Akt-Signalweg fort. Davon beeinflusst werden die Phosphorylierungslevel der in der Arbeit untersuchten Kinasen Akt, GSK3 und FoxO1 (Abb. 21). Ausgespart bzw. nur gering beeinträchtigt durch die Insulinresistenz zeigt sich der MAP-Kinase-Weg, mit der in dieser Arbeit untersuchten MAP-Kinase ERK ⁽⁶⁸⁾.

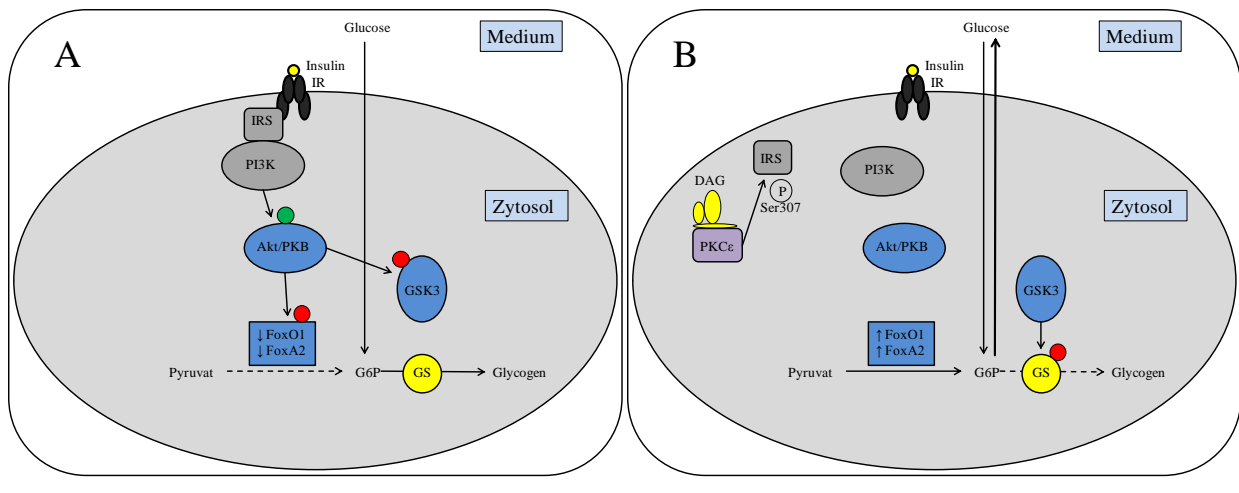


Abb. 21: Vereinfachte Mechanismen der hepatischen Insulinsensitivität nach Samuel et al. 2010. A: Unbeeinträchtigter Insulinsignalweg. B: Durch DAG beeinträchtigter Insulinsignalweg.

IR = Insulinrezeptor, IRS = Insulinrezeptorsubstrat, PI3K = Phosphoinositid-3-Kinase, PKB = Proteinkinase B, G6P = Glucose-6-Phosphat, GS = Glycogensynthase, GSK = Glycogensynthasekinase, FoxO1/ FoxA2 = Forkhead-Boxprotein, DAG = Diacylglycerol, PKCε = Proteinkinase Cε, Ser = Serin, P mit Kreis repräsentiert eine Phosphorylierung, grüner Kreis repräsentiert eine Aktivierung, roter Kreis repräsentiert eine Inaktivierung, Solide Linien repräsentieren eine Erhöhung oder Akkumulation von Substrat, gestrichelte Linien repräsentieren eine Verminderung dieses Pfades.

In dieser Arbeit dient ERK 1/2, als zytosolischer Endpunkt des RAF-RAS-MEK-ERK Signalweges, zur Bestimmung der Aktivität dieses MAPK-Signalweges und damit als Anhaltspunkt auf Signalebene für ein karzinomatöses Verhalten der Zellen. Es wurde erwartet, dass HepaFH3 in einem Kontinuum zwischen den hohen Signalwerten von HepG2 und den niedrigen Werten der PHH liegt. So zeigten die HepG2 ein deutlich höheres Phosphorylierungslevel als die differenzierten PHH (Abb. 13). Die konfluenten HepaFH3 wiesen ein ähnlich niedriges Phosphorylierungslevel wie die PHH auf, nur das proliferierende Pendant ließ geringgradig höhere Level erkennen. Eine Insulinresistenz konnte in den IRS-nachgeschalteten Signalproteinen nicht nachgewiesen werden, da in den PHH und in den konfluenten HepaFH3 keine Insulinresponsibilität zu erkennen war. Nur in den HepG2 und den proliferierenden HepaFH3 war eine Reaktion auf die Insulingabe zu beobachten. Besonders das Verhalten der HepG2, mit den erhöhten basale Erk Phosphorylierungslevel in den steatotischen Zellen, sowie dem vermehrten Ansprechen auf Insulin in den steatotischen Zellen, wurde so bereits in vaskulären Zellen nachgewiesen⁽¹⁰⁴⁾.

Primär sollte in dieser Arbeit mithilfe einer Auswahl an Signalproteine des PI3K-Akt-Signalweges eine hepatische Insulinresistenz nachgewiesen werden. Dies würde bedeuten, dass

die insulinbehandelte Steatosegruppe einen geringeren Phosphorylierungsgrad aufwies, als die entsprechende insulinbehandelte Kontrollgruppe. Dies war jedoch nur tendenziell und nicht signifikant in den PHH nachweisbar. In den proliferationsbefähigten Zellen ließ sich dieses Phänomen nur bedingt nachweisen.

Ein Grund für den fehlenden Nachweis der Insulinresistenz könnte in der unbeabsichtigten Verwendung von zu geringen Insulinkonzentrationen liegen. So kam es im Verlauf der Experimente zu einem systematischen Verdünnungsfehler und es wurde anstatt der angepeilten 100 nM Insulin nur 44,24 nM zur Inkubation verwendet. Das Phosphorylierungslevel von Akt und des PI3K-Signalweges wird wie durch Hermann et al. 2000 in Endothelzellen gezeigt, durch die Dosisreduktion jedoch nur geringgradig vermindert ⁽¹⁰⁵⁾.

Ein weiterer methodischer Fehler, der als Ursache für den fehlenden Nachweis der Insulinresistenz in Frage kommt ist, dass die gemessenen Phosphorylierungslevel nicht auf die entsprechend unphosphorylierten Proteingegenstücke normalisiert wurden, sondern nur auf β -Aktin. Somit können keine Informationen über eine veränderte Expression der untersuchten Phosphokinasen gegeben werden. Auch die Bildung eines Signalquotienten (z.B. phospho-Akt/Akt) ist nicht möglich. Damit kann nicht unterschieden werden, ob in den undifferenzierteren Zelllinien die bereits die basale Signalamplitude im PI3K-Akt-Signalweg erhöht ist oder die zum Signalweg gehörigen Proteine vermehrt vorhanden sind ⁽¹⁰⁶⁾.

Was man aber unabhängig von der Insulininkubation in den FoxO1 Immunoblotdaten erkennen kann, ist dass die Kontaktinhibition in den konfluenten HepaFH3 auch eine Entsprechung im Signalweg besitzt und PHH als auch die konfluenten HepaFH3 deutlich niedrigere Aktivierungslevel von FoxO besitzen als die proliferierenden Gegenstücke (Abb. 16). Damit könnten den konfluenten HepaFH3 im Gegensatz zu den proliferierenden Klonen vermehrt aktives FoxO1 zur Verfügung stehen. Die aktiven Mitglieder der Forkhead-Boxproteinfamilie dienen hierbei als Tumorsuppressoren und fördern den Zellzyklusarrest und die Apoptose, damit spielt der genannten Signalweg eine wichtige Rolle in der Proliferation und im Überleben von Krebszellen ^(72, 73, 107). So wurde die konstitutive Aktivität des PI3K/Akt Signalweges in den proliferierenden Zellen, wie es bereits in verschiedenen Karzinomarten beobachtbar war, auch in den hohen Phosphorylierungslevel der proliferierenden HepaFH3 und HepG2 nachgewiesen ^(72, 73, 107). Auch im Schlüsselpfad der normalen Zellproliferation, dem RAF-RAS-MEK-ERK Signalweges ist, wie bereits erwähnt, der Phosphorylierungsgrad der konfluenten HepaFH3 niedriger als der in den proliferierenden Klonen. Dieser ist üblicherweise in karzinomatösen Zellen übermäßig

aktiviert⁽⁶⁹⁾. Das könnte insgesamt auf eine präzisere Regulation des Zellzyklus der HepaFH3 schließen lassen, bedingt durch die Kontaktinhibition in der hochkonfluenten Kultur.

5.5 Schlussfolgerung

Der Vorteil der Upcyte[®]-Hepatozyten, wie er in dieser Arbeit evident geworden ist, besteht in der Fähigkeit der erhaltenen Kontaktinhibition. Diese Fähigkeit ist vor allem in einem energiestoffwechsellastigen Modell wie dem hier benutzten NAFLD-Modell sehr von Vorteil. Da sich hierdurch, wie in dieser Arbeit nachgewiesen, der Grundumsatz reduzieren lässt, wodurch der Upcyte[®]-Klon den PHH wieder ähnlicher wird (Bsp: Glycogenspeicherung).

Angesichts der Ergebnisse muss man aber aktuell schon sehr genau abwägen, ob der Vorteil des PHH näheren Energiemetabolismus den nötigen Aufwand überwiegt. Ein großer Nachteil der Upcyte[®]-Zellen liegt schon in ihrer Erzeugung. Die verwendeten Upcyte[®]-Faktoren müssen zunächst einmal käuflich zusammen mit einer Lizenz vom Unternehmen Medicyte (im Insolvenzverfahren, mit Einstellung der Geschäftstätigkeit seit dem 08.07.2015⁽¹⁰⁸⁾) bzw. upcyte technologies⁽¹⁰⁹⁾ erworben werden. Diese besitzen hierfür auch die Patentrechte⁽⁵²⁾.

Sollte angestrebt werden die Upcyte[®]-Hepatozyten für umfangreichere Experimente selbst heranzuziehen, so benötigt die Kultur der erzeugten modifizierten Hepatozyten ungefähr 2-3 Monate, bis eine ausreichende Größe der Arbeitszellbank erschaffen wurde und eine genügend große Menge als Backup kryokonserviert wurde. Mindestens für diesen Zeitraum wird die von upcyte technologies hergestellte Medienauswahl ideale Ergebnisse empfohlen, deren Zusammensetzung nicht bekannt ist.

Alternativ können jedoch auch einzelne Zellchargen unterschiedlicher Donoren direkt vom Unternehmen erworben werden.

Es ist zudem nicht vollständig bekannt welche Technik und welcher Mechanismus sich hinter den proliferationsinduzierenden Genen steckt, da hierüber unzureichend publiziert wurde. Die im Gentechnikregister des Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit⁽¹¹⁰⁾ hinterlegten Daten über die Upcyte[®]-Hepatozyten sagen aus, dass ein Derivat des lentiviralen Vektor pLenti6.2/V5-Dest zur Transduktion benutzt wurde und als Transgen die viralen Gene E5-E7 des humanen Papillomavirus (HPV) verwendet wurden. Die erhältlichen Daten über die HPV 16 Transgene E5-E7 berichten von einer erhöhten Onkogenität der transduzierten und immortalisierten Zellen⁽¹¹¹⁾. Zum Beispiel wird eine verminderte E-Cadherinexpression beschrieben. Dies gilt als Ursache einer vermehrten Motilität in der Zellkultur, was in-vivo als

Kennzeichen einer erhöhten Malignität gewertet wird ⁽¹¹²⁾. So stützen diese veröffentlichten Daten die bereits aufgestellte Theorie, dass die Upcyte[®]-modifizierten Zellen eher einer Zelllinie ähneln als differenzierten primären humanen Hepatozyten.

Die Arbeit zeigt jedoch, dass die HepaFH3 sich bezüglich des NADH-Umsatzes, des Glucoseverbrauchs und der Glycogenspeicherfähigkeit in einem Kontinuum zwischen nicht proliferierenden, differenzierten PHH und proliferierenden, nicht differenzierten HepG2 liegen. Auch im Bereich der Signaltransduktion im PI3K-Akt- und MAPK-Signalweges zeigten sich die HepaFH3 meist im Kontinuum zwischen den streng regulierten PHH und den übermäßig aktivierten Phosphorylierungslevel der HepG2. Nur die zum Teil hepatozytendefinierenden hepatischen Syntheseleistungen ^(90, 91) des Upcyte[®]-Klones wie Harnstoff-, Albumin- und die Transaminasesynthese konnten die Leistungen der HepG2 in diesen Bereichen kaum übertreffen (Abb. 22).

Bemerkenswert ist, dass der Upcyte[®]-Klon HepaFH3 proliferieren kann wie eine Zelllinie, jedoch diese Proliferation durch Kontaktinhibition gestoppt wird, was hinsichtlich der abgefragten Fähigkeiten zu einer Annäherung an die PHH führte. Hierdurch sank im konfluenten Klon im Vergleich zum Proliferierenden der NADH-Umsatz und die Glucoseaufnahme, bei gleichzeitigem Anstieg der Glycogenspeicherfähigkeit, der Albumin- und Transaminasesynthese. Dieses Phänomen im hochkonfluenten Zustand war auch auf Signalebene zu beobachten mit einer erhöhten Aktivität von FoxO1 und einem erniedrigtem Phosphorylierungslevel der ERK 1/2-Gruppe im Gegensatz zu den proliferierenden Klonen. Damit liegt der Verdacht nahe, dass die konfluenten Upcyte[®]-Klone für einen längeren Zeitraum in der G₁-Phase ihres Zellzyklus verharren können und so wieder ihre leberspezifischen Funktionen im höheren Umfang ausüben können ^(99, 100). Das könnte zusammenfassend auf eine Redifferenzierung der konfluenten HepaFH3 hindeuten.

Zu klären wäre jedoch ob die beobachteten Redifferenzierungsphänomene der HepaFH3 wirklich mit der Kontaktinhibition in Zusammenhang stehen und ob die in dieser Dissertation aufgestellte These der prolongierten G₁-Phase bzw. Eintritt in die G₀-Phase ein geeignetes Erklärungsmodell hierfür liefert.

Experiment	Modus	PHH	HepaFH3 konfluent	HepaFH3 proliferierend	HepG2
Initiales Assesment: kein Anhalt für Lipotoxizität					
Relative Lipidakkumulation [% des initialen PHH Lipidgehaltes]	<i>Kontrolle</i> <i>Steatose</i>	152 ± 21 469 ± 83	24 ± 1 72 ± 1	42 ± 2 125 ± 7	62 ± 5 145 ± 6
Proteingehalt [mg Protein / ml Lysepuffer]	<i>Initial</i> <i>Kontrolle</i> <i>Steatose</i>	0,32 ± 0,06 0,22 ± 0,03 0,21 ± 0,03	0,43 ± 0,01 0,45 ± 0,03 0,43 ± 0,01	0,10 ± 0,01 0,27 ± 0,01 0,22 ± 0,01	0,18 ± 0,00 0,41 ± 0,01 0,42 ± 0,01
Kohlenhydratstoffwechsel:					
Relative Metabolismusrate [% der PHH-Kontrolle]	<i>Kontrolle</i> <i>Steatose</i>	100 ± 5 77 ± 5	242 ± 3 299 ± 10	301 ± 15 368 ± 24	586 ± 12 623 ± 11
Glucoseaufnahme [µmol/ml Medium / g Protein / h]	<i>Kontrolle</i> <i>Steatose</i>	- 52 ± 31 - 89 ± 38	265 ± 11 640 ± 11	436 ± 31 500 ± 32	523 ± 5 524 ± 5
Glycogensynthese [g Glycogen / g Protein]	<i>Kontrolle</i> <i>Steatose</i>	0,19 ± 0,01 0,15 ± 0,01	0,06 ± 0,00 0,02 ± 0,00	0,004 ± 0,002 0,002 ± 0,001	n.d. n.d.
Hepatische Synthesefähigkeiten:					
Albuminsynthese [µg Albumin / ml Medium / g Protein / h]	<i>Kontrolle</i> <i>Steatose</i>	671 ± 48 572 ± 42	4,1 ± 1,7 3,1 ± 1,3	0,5 ± 0,3 0,04 ± 0,04	45 ± 4 41 ± 4
Ureasyntese [µmol Urea / ml Medium / g Protein / h]	<i>Kontrolle</i> <i>Steatose</i>	310 ± 28 287 ± 23	10 ± 0,2 11 ± 0,2	19 ± 1,4 21 ± 0,4	10 ± 0,2 11 ± 0,2
AST-Aktivität, intrazellulär [U / g Protein]	<i>Kontrolle</i> <i>Steatose</i>	2706 ± 190 3598 ± 283	581 ± 41 884 ± 59	111 ± 13 87 ± 8	423 ± 37 498 ± 47
ALT-Aktivität, intrazellulär [U / g Protein]	<i>Kontrolle</i> <i>Steatose</i>	732 ± 63 1037 ± 77	45 ± 3 67 ± 5	6 ± 1 6 ± 1	49 ± 2 80 ± 3
Signaltransduktion:					
Relative FoxO1 Phosphorylierung [% der PHH Kontrolle +]	<i>Kontrolle -</i> <i>Steatose -</i>	38 ± 14 39 ± 2	161 ± 12 130 ± 28	260 ± 25 271 ± 65	344 ± 69 288 ± 48
Relative ERK1 Phosphorylierung [% der PHH Kontrolle +]	<i>Kontrolle -</i> <i>Steatose -</i>	84 ± 54 57 ± 33	89 ± 36 75 ± 22	158 ± 23 148 ± 25	375 ± 17 595 ± 20

Abb. 22: Ergebnisübersicht zur Verdeutlichung der Stellung von HepaFH-Zellen zwischen PHH und HepG2. Ausgewählte und gekürzte Darstellung, mit kolorierten Zahlenwerten entsprechend der zellulären Ähnlichkeit zu PHH (grün) oder HepG2 (rot). Intermediäre Ergebnisse wurden gelb oder orange gefärbt. Fähigkeiten von HepaFH3, welche nach Ansicht des Autors, hinter denjenigen von HepG2 liegen, wurden dunkelrot hinterlegt. Die Zellen wurden für 24 h in Kontrollmedium inkubiert, mit (Steatose) oder ohne (Kontrolle) Ölsäure und Palmitinsäure im Verhältnis 2:1 mit einer Gesamtkonzentration von 1 mM. Unmittelbar anschließend (nach 24 h Inkubation) fand die jeweilige Testung statt, wie im Ergebnisteil (siehe Abschnitt 4) dargestellt. Die Daten wurden als Mittelwert ± Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten für jeden Zelltyp und Kultivationsmodus (N = 3; n = 9) angegeben.

Retrospektiv betrachtet fehlen im metabolischen Vergleich der verschiedenen Zelltypen entscheidende Parameter. Der Tatsache geschuldet, dass die Arbeit innerhalb einer Kooperation mit

der Hochschule Lausitz angefertigt wurde, fehlen Daten zu verschiedenen Cytochrom P450 Expressionen als Marker für die hepatische Differenzierung.

Unabhängig hiervon, wäre die Frage der vergleichenden Differenzierung zwischen den Kultivationsmodi im Kontinuum zwischen primären Hepatozyten und der Zelllinie, die Bestimmung von Zytokeratinen, wie Zytokeratin 8, Alpha-1-Fetoprotein interessant gewesen. Die Bestimmung dieser Eigenschaften für Upcyte®-Klone erfolgte bereits in der Arbeit von Burkard et al. 2012, jedoch ohne direkten Vergleich zu PHH und HepG2⁽⁵¹⁾. Bezüglich der aufgestellten Hypothese der geringen oxidativen Kapazität der Upcyte®-Zellen wäre die photometrische Lactatbestimmung sinnvoll gewesen.

Zur Beantwortung der Fragen nach dem Verbleib in der G₁- oder G₀-Phase der kontaktinhibierten HepaFH3 wäre die Bestimmung von Zellzyklusmarkern im Rahmen der Arbeit interessant gewesen. Hierzu gibt es bislang keine bekannte Publikation.

5.6 Ausblick

Es wird zukünftig sicher noch viel Arbeit in die Weiterentwicklung der Upcyte®-Hepatozyten gesteckt werden. Der Hauptfokus wird hierbei auf der verbesserten Differenzierung der modifizierten Hepatozyten liegen. Dieser Aspekt wurde auch bei upcyte technologies bereits berücksichtigt. Auf der Unternehmenswebsite⁽¹¹³⁾ wird seit dem 01.03.2015 empfohlen die Zellen mit einer Konzentration von 0,1% - 0,5% DMSO zu inkubieren. Dies ist eine gängige Methode, um in hepatischen Zelllinien den Differenzierungsgrad zu erhöhen^(114, 115).

Letztendlich kann die Frage, ob die genetisch modifizierten Upcyte®-Hepatozyten einen geeigneten Ersatz für PHH im NAFLD-Modell darstellen wohl mit einem Nein beantwortet werden. Aber die spannende Frage, ob die HepaFH3 mit ihrem niedrigeren Grundumsatz den etablierten Zelllinien mit ihrer geringen oxidativen Kapazität im NAFLD-Modell nicht mindestens ebenbürtig sind, bleibt Gegenstand zukünftiger Arbeiten.

Literaturverzeichnis

1. N. Chalasani, Z. Younossi, J. E. Lavine, A. M. Diehl, E. M. Brunt, K. Cusi, M. Charlton, A. J. Sanyal, A. A. f. t. S. o. L. Diseases, A. C. o. Gastroenterology, A. G. Association, The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: Practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Am J Gastroenterol* 107, 811-826 (2012).
2. G. Marchesini, M. Babini, Nonalcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome. *Minerva Cardioangiol* 54, 229-239 (2006).
3. Z. M. Younossi, M. Stepanova, M. Afendy, Y. Fang, Y. Younossi, H. Mir, M. Srishord, Changes in the prevalence of the most common causes of chronic liver diseases in the United States from 1988 to 2008. *Clin Gastroenterol Hepatol* 9, 524-530.e521; quiz e560 (2011).
4. M. Blachier, H. Leleu, M. Peck-Radosavljevic, D. C. Valla, F. Roudot-Thoraval, The burden of liver disease in Europe: a review of available epidemiological data. *J Hepatol* 58, 593-608 (2013).
5. C. E. Ruhl, J. E. Everhart, Fatty liver indices in the multiethnic United States National Health and Nutrition Examination Survey. *Aliment Pharmacol Ther* 41, 65-76 (2015).
6. G. Vernon, A. Baranova, Z. M. Younossi, Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther* 34, 274-285 (2011).
7. K. Bettermann, T. Hohensee, J. Haybaeck, Steatosis and steatohepatitis: complex disorders. *Int J Mol Sci* 15, 9924-9944 (2014).
8. M. Trauner, M. Arrese, M. Wagner, Fatty liver and lipotoxicity. *Biochim Biophys Acta* 1801, 299-310 (2010).
9. K. L. Donnelly, C. I. Smith, S. J. Schwarzenberg, J. Jessurun, M. D. Boldt, E. J. Parks, Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* 115, 1343-1351 (2005).
10. J. Girard, M. Lafontan, Impact of visceral adipose tissue on liver metabolism and insulin resistance. Part II: Visceral adipose tissue production and liver metabolism. *Diabetes Metab* 34, 439-445 (2008).
11. S. H. Koo, Nonalcoholic fatty liver disease: molecular mechanisms for the hepatic steatosis. *Clin Mol Hepatol* 19, 210-215 (2013).
12. H. Tilg, A. R. Moschen, Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology* 52, 1836-1846 (2010).
13. T. Yamauchi, J. Kamon, Y. Minokoshi, Y. Ito, H. Waki, S. Uchida, S. Yamashita, M. Noda, S. Kita, K. Ueki, K. Eto, Y. Akanuma, P. Froguel, F. Foufelle, P. Ferre, D. Carling, S. Kimura, R. Nagai, B. B. Kahn, T. Kadowaki, Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 8, 1288-1295 (2002).
14. W. J. R. M., Ed. (Dtsch Arztebl Int, Dtsch Arztebl Int, 2014), vol. 111(26), pp. 447-452.
15. K. Cusi, Role of obesity and lipotoxicity in the development of nonalcoholic steatohepatitis: pathophysiology and clinical implications. *Gastroenterology* 142, 711-725.e716 (2012).
16. J. R. Lewis, S. R. Mohanty, Nonalcoholic fatty liver disease: a review and update. *Dig Dis Sci* 55, 560-578 (2010).
17. P. Angulo, Nonalcoholic fatty liver disease. *Rev Gastroenterol Mex* 70 Suppl 3, 52-56 (2005).

18. M. V. Machado, H. Cortez-Pinto, Non-invasive diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease. A critical appraisal. *J Hepatol* 58, 1007-1019 (2013).
19. B. Baran, F. Akyüz, Non-alcoholic fatty liver disease: What has changed in the treatment since the beginning? *World J Gastroenterol* 20, 14219-14229 (2014).
20. B. A. Neuschwander-Tetri, Nonalcoholic steatohepatitis and the metabolic syndrome. *Am J Med Sci* 330, 326-335 (2005).
21. G. Kanuri, I. Bergheim, In Vitro and in Vivo Models of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *Int J Mol Sci* 14, 11963-11980 (2013).
22. J. M. Schattenberg, P. R. Galle, Animal models of non-alcoholic steatohepatitis: of mice and man. *Dig Dis* 28, 247-254 (2010).
23. J. MAYER, M. W. BATES, M. M. DICKIE, Hereditary diabetes in genetically obese mice. *Science* 113, 746-747 (1951).
24. N. Chalasani, D. W. Crabb, O. W. Cummings, P. Y. Kwo, A. Asghar, P. K. Pandya, R. V. Considine, Does leptin play a role in the pathogenesis of human nonalcoholic steatohepatitis? *Am J Gastroenterol* 98, 2771-2776 (2003).
25. R. Faggioni, G. Fantuzzi, C. Gabay, A. Moser, C. A. Dinarello, K. R. Feingold, C. Grunfeld, Leptin deficiency enhances sensitivity to endotoxin-induced lethality. *Am J Physiol* 276, R136-142 (1999).
26. T. Masaki, S. Chiba, H. Tatsukawa, T. Yasuda, H. Noguchi, M. Seike, H. Yoshimatsu, Adiponectin protects LPS-induced liver injury through modulation of TNF-alpha in KK-Ay obese mice. *Hepatology* 40, 177-184 (2004).
27. D. Huszar, C. A. Lynch, V. Fairchild-Huntress, J. H. Dunmore, Q. Fang, L. R. Berkemeier, W. Gu, R. A. Kesterson, B. A. Boston, R. D. Cone, F. J. Smith, L. A. Campfield, P. Burn, F. Lee, Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* 88, 131-141 (1997).
28. Q. M. Anstee, R. D. Goldin, Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research. *Int J Exp Pathol* 87, 1-16 (2006).
29. M. E. Rinella, M. S. Elias, R. R. Smolak, T. Fu, J. Borensztajn, R. M. Green, Mechanisms of hepatic steatosis in mice fed a lipogenic methionine choline-deficient diet. *J Lipid Res* 49, 1068-1076 (2008).
30. R. Buettner, J. Schölmerich, L. C. Bollheimer, High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity (Silver Spring)* 15, 798-808 (2007).
31. K. Omagari, S. Kato, K. Tsuneyama, C. Inohara, Y. Kuroda, H. Tsukuda, E. Fukazawa, K. Shiraishi, M. Mune, Effects of a long-term high-fat diet and switching from a high-fat to low-fat, standard diet on hepatic fat accumulation in Sprague-Dawley rats. *Dig Dis Sci* 53, 3206-3212 (2008).
32. M. Charlton, A. Krishnan, K. Viker, S. Sanderson, S. Cazanave, A. McConico, H. Masuoko, G. Gores, Fast food diet mouse: novel small animal model of NASH with ballooning, progressive fibrosis, and high physiological fidelity to the human condition. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 301, G825-834 (2011).
33. M. J. Duryee, M. S. Willis, C. S. Schaffert, R. D. Reidelberger, A. Dusad, D. R. Anderson, L. W. Klassen, G. M. Thiele, Precision-cut liver slices from diet-induced obese rats exposed to ethanol are susceptible to oxidative stress and increased fatty acid synthesis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 306, G208-217 (2014).
34. N. C. Chavez-Tapia, N. Rosso, C. Tiribelli, In vitro models for the study of non-alcoholic fatty liver disease. *Curr Med Chem* 18, 1079-1084 (2011).
35. V. J. Barbero-Becerra, P. J. Giraudi, N. C. Chávez-Tapia, M. Uribe, C. Tiribelli, N. Rosso, The interplay between hepatic stellate cells and hepatocytes in an in vitro model of NASH. *Toxicol In Vitro* 29, 1753-1758 (2015).

36. Z. Wang, J. Lv, R. Zhang, Y. Zhu, D. Zhu, Y. Sun, J. Zhu, X. Han, Co-culture with fat cells induces cellular insulin resistance in primary hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 345, 976-983 (2006).
37. E. Pfeiffer, V. Kegel, K. Zeilinger, J. G. Hengstler, A. K. Nüssler, D. Seehofer, G. Damm, Featured Article: Isolation, characterization, and cultivation of human hepatocytes and non-parenchymal liver cells. *Exp Biol Med (Maywood)* 240, 645-656 (2015).
38. M. J. Gómez-Lechón, J. V. Castell, M. T. Donato, An update on metabolism studies using human hepatocytes in primary culture. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 4, 837-854 (2008).
39. A. P. Li, Human hepatocytes: isolation, cryopreservation and applications in drug development. *Chem Biol Interact* 168, 16-29 (2007).
40. M. J. Gómez-Lechón, M. T. Donato, A. Martínez-Romero, N. Jiménez, J. V. Castell, J. E. O'Connor, A human hepatocellular in vitro model to investigate steatosis. *Chem Biol Interact* 165, 106-116 (2007).
41. M. T. Donato, A. Lahoz, J. V. Castell, M. J. Gómez-Lechón, Cell lines: a tool for in vitro drug metabolism studies. *Curr Drug Metab* 9, 1-11 (2008).
42. C. Guguen-Guillouzo, A. Guillouzo, General review on in vitro hepatocyte models and their applications. *Methods Mol Biol* 640, 1-40 (2010).
43. S. J. Meex, U. Andreo, J. D. Sparks, E. A. Fisher, Huh-7 or HepG2 cells: which is the better model for studying human apolipoprotein-B100 assembly and secretion? *J Lipid Res* 52, 152-158 (2011).
44. A. Langsch, S. Giri, A. Acikgöz, I. Jasmund, B. Frericks, A. Bader, Interspecies difference in liver-specific functions and biotransformation of testosterone of primary rat, porcine and human hepatocyte in an organotypical sandwich culture. *Toxicol Lett* 188, 173-179 (2009).
45. D. J. Boocock, J. L. Maggs, K. Brown, I. N. White, B. K. Park, Major inter-species differences in the rates of O-sulphonation and O-glucuronylation of alpha-hydroxytamoxifen in vitro: a metabolic disparity protecting human liver from the formation of tamoxifen-DNA adducts. *Carcinogenesis* 21, 1851-1858 (2000).
46. M. Ricchi, M. R. Odoardi, L. Carulli, C. Anzivino, S. Ballestri, A. Pinetti, L. I. Fantoni, F. Marra, M. Bertolotti, S. Banni, A. Lonardo, N. Carulli, P. Loria, Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes. *J Gastroenterol Hepatol* 24, 830-840 (2009).
47. T. Pusl, N. Wild, T. Vennegeerts, R. Wimmer, B. Göke, S. Brand, C. Rust, Free fatty acids sensitize hepatocytes to bile acid-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 371, 441-445 (2008).
48. C. L. Gentile, M. J. Pagliassotti, The role of fatty acids in the development and progression of nonalcoholic fatty liver disease. *J Nutr Biochem* 19, 567-576 (2008).
49. I. Leclercq, Y. Horsmans, J. P. Desager, N. Delzenne, A. P. Geubel, Reduction in hepatic cytochrome P-450 is correlated to the degree of liver fat content in animal models of steatosis in the absence of inflammation. *J Hepatol* 28, 410-416 (1998).
50. M. D. Weltman, G. C. Farrell, P. Hall, M. Ingelman-Sundberg, C. Liddle, Hepatic cytochrome P450 2E1 is increased in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 27, 128-133 (1998).
51. A. Burkard, C. Dähn, S. Heinz, A. Zutavern, V. Sonntag-Buck, D. Maltman, S. Przyborski, N. J. Hewitt, J. Braspenning, Generation of proliferating human hepatocytes using Upcyte® technology: characterisation and applications in induction and cytotoxicity assays. *Xenobiotica* 42, 939-956 (2012).
52. B. J. H. S. K. H. (Patent EP2185690:05-19, 2010).

53. N. Herzog, M. Hansen, S. Miethbauer, K. U. Schmidtke, U. Anderer, A. Lupp, S. Sperling, D. Seehofer, G. Damm, K. Scheibner, J. H. Küpper, Primary-like human hepatocytes genetically engineered to obtain proliferation competence display hepatic differentiation characteristics in monolayer and organotypical spheroid cultures. *Cell Biol Int* 40, 341-353 (2016).
54. D. Knobloch, S. Ehnert, L. Schyschka, P. Büchler, M. Schoenberg, J. Kleeff, W. E. Thasler, N. C. Nussler, P. Godoy, J. Hengstler, A. K. Nussler, Human hepatocytes: isolation, culture, and quality procedures. *Methods Mol Biol* 806, 99-120 (2012).
55. V. Kegel, D. Deharde, E. Pfeiffer, K. Zeilinger, D. Seehofer, G. Damm, Protocol for Isolation of Primary Human Hepatocytes and Corresponding Major Populations of Non-parenchymal Liver Cells. *J Vis Exp*, e53069 (2016).
56. V. Vichai, K. Kirtikara, Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat Protoc* 1, 1112-1116 (2006).
57. W. Voigt, Sulforhodamine B assay and chemosensitivity. *Methods Mol Med* 110, 39-48 (2005).
58. M. V. Berridge, A. S. Tan, Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys* 303, 474-482 (1993).
59. M. V. Berridge, P. M. Herst, A. S. Tan, Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev* 11, 127-152 (2005).
60. W. D. Lust, J. V. Passonneau, S. K. Crites, The measurement of glycogen in tissues by amylo-alpha-1,4-alpha-1,6-glucosidase after the destruction of preexisting glucose. *Anal Biochem* 68, 328-331 (1975).
61. J. Pilling, H. Garside, E. Ainscow, Development of a quantitative 96-well method to image glycogen storage in primary rat hepatocytes. *Mol Cell Biochem* 341, 73-78 (2010).
62. J. Katz, S. Golden, P. A. Wals, Stimulation of hepatic glycogen synthesis by amino acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73, 3433-3437 (1976).
63. R. J. Zawada, P. Kwan, K. L. Olszewski, M. Llinas, S. G. Huang, Quantitative determination of urea concentrations in cell culture medium. *Biochem Cell Biol* 87, 541-544 (2009).
64. D. Jung, H. Biggs, J. Erikson, P. U. Ledyard, New Colorimetric reaction for end-point, continuous-flow, and kinetic measurement of urea. *Clin Chem* 21, 1136-1140 (1975).
65. P. K. Smith, R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson, D. C. Klenk, Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150, 76-85 (1985).
66. D. M. Erion, G. I. Shulman, Diacylglycerol-mediated insulin resistance. *Nat Med* 16, 400-402 (2010).
67. V. T. Samuel, K. F. Petersen, G. I. Shulman, Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism. *Lancet* 375, 2267-2277 (2010).
68. M. W. Ruddock, A. Stein, E. Landaker, J. Park, R. C. Cooksey, D. McClain, M. E. Patti, Saturated fatty acids inhibit hepatic insulin action by modulating insulin receptor expression and post-receptor signalling. *J Biochem* 144, 599-607 (2008).
69. P. J. Roberts, C. J. Der, Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* 26, 3291-3310 (2007).
70. E. Hajduch, G. J. Litherland, H. S. Hundal, Protein kinase B (PKB/Akt)--a key regulator of glucose transport? *FEBS Lett* 492, 199-203 (2001).
71. G. I. Welsh, C. Wilson, C. G. Proud, GSK3: a SHAGGY frog story. *Trends Cell Biol* 6, 274-279 (1996).
72. K. C. Arden, FoxO: linking new signaling pathways. *Mol Cell* 14, 416-418 (2004).

73. J. Seoane, H. V. Le, L. Shen, S. A. Anderson, J. Massagué, Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation. *Cell* 117, 211-223 (2004).
74. J. Nakae, T. Kitamura, D. L. Silver, D. Accili, The forkhead transcription factor Foxo1 (Fkhr) confers insulin sensitivity onto glucose-6-phosphatase expression. *J Clin Invest* 108, 1359-1367 (2001).
75. G. Elaut, T. Henkens, P. Papeleu, S. Snykers, M. Vinken, T. Vanhaecke, V. Rogiers, Molecular mechanisms underlying the dedifferentiation process of isolated hepatocytes and their cultures. *Curr Drug Metab* 7, 629-660 (2006).
76. H. A. Harper, G. Loeffler, P. E. Petrides, L. Weiss, in *Physiologische Chemie: Eine Einführung in die medizinische Biochemie für Studierende der Medizin und Ärzte*. (Springer Verlag, 1975), vol. 1. Auflage, pp. 364.
77. P. Tso, A. Nauli, C. M. Lo, Enterocyte fatty acid uptake and intestinal fatty acid-binding protein. *Biochem Soc Trans* 32, 75-78 (2004).
78. G. V. Richieri, A. Anel, A. M. Kleinfeld, Interactions of long-chain fatty acids and albumin: determination of free fatty acid levels using the fluorescent probe ADIFAB. *Biochemistry* 32, 7574-7580 (1993).
79. A. Guillouzo, Liver cell models in in vitro toxicology. *Environ Health Perspect* 106 Suppl 2, 511-532 (1998).
80. H. H. Gerets, K. Tilmant, B. Gerin, H. Chanteux, B. O. Depelchin, S. Dhalluin, F. A. Atienzar, Characterization of primary human hepatocytes, HepG2 cells, and HepaRG cells at the mRNA level and CYP activity in response to inducers and their predictivity for the detection of human hepatotoxins. *Cell Biol Toxicol* 28, 69-87 (2012).
81. L. Hue, H. Taegtmeier, The Randle cycle revisited: a new head for an old hat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297, E578-591 (2009).
82. D. M. Muoio, C. B. Newgard, Obesity-related derangements in metabolic regulation. *Annu Rev Biochem* 75, 367-401 (2006).
83. M. Penke, P. S. Larsen, S. Schuster, M. Dall, B. A. Jensen, T. Gorski, A. Meusel, S. Richter, S. G. Vienberg, J. T. Treebak, W. Kiess, A. Garten, Hepatic NAD salvage pathway is enhanced in mice on a high-fat diet. *Mol Cell Endocrinol* 412, 65-72 (2015).
84. K. J. Oh, H. S. Han, M. J. Kim, S. H. Koo, CREB and FoxO1: two transcription factors for the regulation of hepatic gluconeogenesis. *BMB Rep* 46, 567-574 (2013).
85. W. G. Blackard, J. N. Clore, L. P. Powers, A stimulatory effect of FFA on glycolysis unmasked in cells with impaired oxidative capacity. *Am J Physiol* 259, E451-456 (1990).
86. M. G. Vander Heiden, L. C. Cantley, C. B. Thompson, Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324, 1029-1033 (2009).
87. L. Tolosa, M. J. Gomez-Lechon, S. Lopez, C. Guzman, J. V. Castell, M. T. Donato, R. Jover, Human Upcyte Hepatocytes: Characterization of the Hepatic Phenotype and Evaluation for Acute and Long-Term Hepatotoxicity Routine Testing. *Toxicol Sci* 152, 214-229 (2016).
88. A. R. Cole, C. Sutherland, Measuring GSK3 expression and activity in cells. *Methods Mol Biol* 468, 45-65 (2008).
89. M. Bouskila, R. W. Hunter, A. F. Ibrahim, L. Delattre, M. Peggie, J. A. van Diepen, P. J. Voshol, J. Jensen, K. Sakamoto, Allosteric regulation of glycogen synthase controls glycogen synthesis in muscle. *Cell Metab* 12, 456-466 (2010).
90. P. Godoy, N. J. Hewitt, U. Albrecht, M. E. Andersen, N. Ansari, S. Bhattacharya, J. G. Bode, J. Bolleyn, C. Borner, J. Böttger, A. Braeuning, R. A. Budinsky, B. Burkhardt, N. R. Cameron, G. Camussi, C. S. Cho, Y. J. Choi, J. Craig Rowlands, U. Dahmen, G. Damm, O. Dirsch, M. T. Donato, J. Dong, S. Dooley, D. Drasdo, R. Eakins, K. S. Ferreira, V. Fonsato, J. Fraczek, R. Gebhardt, A. Gibson, M. Glanemann, C. E. Goldring,

- M. J. Gómez-Lechón, G. M. Groothuis, L. Gustavsson, C. Guyot, D. Hallifax, S. Hammad, A. Hayward, D. Häussinger, C. Hellerbrand, P. Hewitt, S. Hoehme, H. G. Holzhütter, J. B. Houston, J. Hrach, K. Ito, H. Jaeschke, V. Keitel, J. M. Kelm, B. Kevin Park, C. Kordes, G. A. Kullak-Ublick, E. L. LeCluyse, P. Lu, J. Luebke-Wheeler, A. Lutz, D. J. Maltman, M. Matz-Soja, P. McMullen, I. Merfort, S. Messner, C. Meyer, J. Mwinyi, D. J. Naisbitt, A. K. Nussler, P. Olinga, F. Pampaloni, J. Pi, L. Pluta, S. A. Przyborski, A. Ramachandran, V. Rogiers, C. Rowe, C. Schelcher, K. Schmich, M. Schwarz, B. Singh, E. H. Stelzer, B. Stieger, R. Stöber, Y. Sugiyama, C. Tetta, W. E. Thasler, T. Vanhaecke, M. Vinken, T. S. Weiss, A. Widera, C. G. Woods, J. J. Xu, K. M. Yarborough, J. G. Hengstler, Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME. *Arch Toxicol* 87, 1315-1530 (2013).
91. J. G. Hengstler, M. Brulport, W. Schormann, A. Bauer, M. Hermes, A. K. Nussler, F. Fandrich, M. Ruhnke, H. Ungefroren, L. Griffin, E. Bockamp, F. Oesch, M. A. von Mach, Generation of human hepatocytes by stem cell technology: definition of the hepatocyte. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 1, 61-74 (2005).
92. P. Ott, H. Vilstrup, Cerebral effects of ammonia in liver disease: current hypotheses. *Metab Brain Dis* 29, 901-911 (2014).
93. S. K. Heibel, G. Y. Lopez, M. Panglao, S. Sodha, L. Mariño-Ramírez, M. Tuchman, L. Caldovic, Transcriptional regulation of N-acetylglutamate synthase. *PLoS One* 7, e29527 (2012).
94. P. J. Snodgrass, R. C. Lin, Induction of urea cycle enzymes of rat liver by amino acids. *J Nutr* 111, 586-601 (1981).
95. M. Tomomura, A. Tomomura, M. A. Dewan, T. Saheki, Long-chain fatty acids suppress the induction of urea cycle enzyme genes by glucocorticoid action. *FEBS Lett* 399, 310-312 (1996).
96. G. Yarmush, L. Santos, J. Yarmush, S. Koundinyan, M. Saleem, N. I. Nativ, R. S. Schloss, M. L. Yarmush, T. J. Maguire, F. Berthiaume, Metabolic Flux Distribution during Defatting of Steatotic Human Hepatoma (HepG2) Cells. *Metabolites* 6, (2016).
97. D. Mavri-Damelin, S. Eaton, L. H. Damelin, M. Rees, H. J. Hodgson, C. Selden, Ornithine transcarbamylase and arginase I deficiency are responsible for diminished urea cycle function in the human hepatoblastoma cell line HepG2. *Int J Biochem Cell Biol* 39, 555-564 (2007).
98. H. M. Wallace, A. V. Fraser, A. Hughes, A perspective of polyamine metabolism. *Biochem J* 376, 1-14 (2003).
99. L. J. Pilaz, D. Patti, G. Marcy, E. Ollier, S. Pfister, R. J. Douglas, M. Betizeau, E. Gautier, V. Cortay, N. Doerflinger, H. Kennedy, C. Dehay, Forced G1-phase reduction alters mode of division, neuron number, and laminar phenotype in the cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 21924-21929 (2009).
100. W. D. Kuhlmann, P. Peschke, Hepatic progenitor cells, stem cells, and AFP expression in models of liver injury. *Int J Exp Pathol* 87, 343-359 (2006).
101. M. M. Van Ness, A. M. Diehl, Is liver biopsy useful in the evaluation of patients with chronically elevated liver enzymes? *Ann Intern Med* 111, 473-478 (1989).
102. M. Ekstedt, L. E. Franzén, U. L. Mathiesen, L. Thorelius, M. Holmqvist, G. Bodemar, S. Kechagias, Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. *Hepatology* 44, 865-873 (2006).
103. E. Bugianesi, S. Moscatiello, M. F. Ciaravella, G. Marchesini, Insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Pharm Des* 16, 1941-1951 (2010).

104. Z. Y. Jiang, Y. W. Lin, A. Clemont, E. P. Feener, K. D. Hein, M. Igarashi, T. Yamauchi, M. F. White, G. L. King, Characterization of selective resistance to insulin signaling in the vasculature of obese Zucker (fa/fa) rats. *J Clin Invest* 104, 447-457 (1999).
105. C. Hermann, B. Assmus, C. Urbich, A. M. Zeiher, S. Dimmeler, Insulin-mediated stimulation of protein kinase Akt: A potent survival signaling cascade for endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20, 402-409 (2000).
106. T. A. Gorr, J. Vogel, Western blotting revisited: critical perusal of underappreciated technical issues. *Proteomics Clin Appl* 9, 396-405 (2015).
107. M. Osaki, M. Oshimura, H. Ito, PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis* 9, 667-676 (2004).
108. M. Insolvenz. (<http://www.technologiapark-heidelberg.de/current/news/news-details/article/medicyte-insolvency/>, 25.02.2016).
109. u. technologies. (<http://www.upcyte.com/>, 25.02.2016), vol. 25.02.2016.
110. B.f.V.u.L.S.Gentechnik, <http://apps2.bvl.bund.de/cellswww/protected/main/cell.do?method=detail&theId=2033&d=49653-p=null>. (27.07.2015).
111. M. C. Stoppler, S. W. Straight, G. Tsao, R. Schlegel, D. J. McCance, The E5 gene of HPV-16 enhances keratinocyte immortalization by full-length DNA. *Virology* 223, 251-254 (1996).
112. S. Boulenouar, C. Weyn, M. Van Noppen, M. Moussa Ali, M. Favre, P. O. Delvenne, F. Bex, A. Noel, Y. Englert, V. Fontaine, Effects of HPV-16 E5, E6 and E7 proteins on survival, adhesion, migration and invasion of trophoblastic cells. *Carcinogenesis* 31, 473-480 (2010).
113. Medicyte. (<http://www.upcyte.com/images/stories/shop/pdf/PFU2015/pfu-no9-upcyte-hepatocyte-metabolism.pdf>, 27.07.2015).
114. S. Snykers, J. De Kock, V. Rogiers, T. Vanhaecke, In Vitro Differentiation of Embryonic and Adult Stem Cells into Hepatocytes: State of the Art. *Stem Cells* 27, 577-605 (2009).
115. S. Choi, B. Sainz, P. Corcoran, S. Uprichard, H. Jeong, Characterization of increased drug metabolism activity in dimethyl sulfoxide (DMSO)-treated Huh7 hepatoma cells. *Xenobiotica* 39, 205-217 (2009).

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Sebastian Sperling, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: "Genetisch modifizierte Upcyte® Hepatocyten als leistungsfähige Alternative zu primär humanen Hepatocyten und der hepatocellulären Karzinomzelllinie HepG2 im *in vitro* Steatosemodell" selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

1.)

Autoren: Herzog N, Hansen M, Miethbauer S, Schmidtke KU, Anderer U, Lupp A, Sperling S, Seehofer D, Damm G, Scheibner K, Küpper JH

Titel: Primary-like human hepatocytes genetically engineered to obtain proliferation competence display hepatic differentiation characteristics in monolayer and organotypical spheroid cultures.

Zeitschrift und Erscheinungsjahr: Cell Biol Int. 2016 Mar; 40(3):341-53. doi: 10.1002/cbin.10574. Epub 2016 Jan 18. PubMed PMID: 26715207.

2.)

Autoren: Vogt D*, Sperling S*, Tkhilaishvili T, Trampuz A, Pirnay JP, Willy C

*Die Autoren Vogt und Sperling teilen sich die Erstautorenschaft

Titel: Beyond antibiotic therapy - Future antiinfective strategies - Update 2017

Zeitschrift und Erscheinungsjahr: Unfallchirurg, Journal 120, Pages 573-584, doi 10.1007/s00113-017-0374-6. Epub Date 2017/06/24.

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Sebastian Sperling hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Autoren: Herzog N, Hansen M, Miethbauer S, Schmidtke KU, Anderer U, Lupp A, Sperling S, Seehofer D, Damm G, Scheibner K, Küpper JH

Titel: Primary-like human hepatocytes genetically engineered to obtain proliferation competence display hepatic differentiation characteristics in monolayer and organotypical spheroid cultures.

Zeitschrift und Erscheinungsjahr: Cell Biol Int. 2016 Mar; 40(3):341-53. doi: 10.1002/cbin.10574. Epub 2016 Jan 18. PubMed PMID: 26715207.

Beitrag im Einzelnen (bitte kurz ausführen):

Auswahl und Isolation der PHH, Versand und Untersuchung der PHH hinsichtlich ihres Lipid-, Kohlenhydrat- und Ureastoffwechsels.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschul-
lehrerin

Unterschrift des Doktoranden

Danksagung

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. med. Daniel Seehofer für die Überlassung des Themas und die uneingeschränkte Unterstützung des Projektes.

Besonderer Dank gebührt Herrn Dr. rer. nat. Georg Damm der mich unermüdlich über mein gesamtes Projekt hinweg begleitet und angeleitet hat. Mit zahlreichen Denkanstößen und Hinweisen hatte er bedeutenden Anteil an der Fertigstellung der Arbeit. Er wird mir immer ein Vorbild bleiben.

Darüber hinaus danke ich Frau Anja Schirmeier die mir bei der praktischen Arbeit stets beratend zur Seite stand. Sowie meinen Mitdoktoranden Elisa Pfeiffer, Victoria Kegel, Theresa Schulz und Melanie Kießig für den freundschaftlichen und herzlichen Umgang, sodass mir die gemeinsame Zeit im Labor für immer in guter Erinnerung bleiben wird.

Schließlich danke ich auch meinen Eltern die während des Studiums und der Arbeit immer mit Rat und Tat zur Seite standen. Vielen Dank hierfür!