

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

DISSERTATION

Einfluss von Genistein auf Insulin-responsive Signalwege im humanen Fettlebermodell

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Sebastian Lünse

aus Pasewalk

Datum der Promotion: 23.06.2019

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	7
Zusammenfassung	8
Summary	9
1 Einleitung	11
1.1 Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD)	11
1.1.1 Die hepatische Insulin-Signaltransduktion	14
1.1.2 NAFLD und Insulinresistenz	16
1.1.3 Bedeutung für die Chirurgie	17
1.2 Genistein (GEN) - ein biologisch aktives Isoflavonoid	18
1.3 <i>In-vitro</i> -Modelle der Fettleber	19
2 Fragestellung und Zielsetzung	21
3 Experimenteller Ablauf und Methodik	22
4 Material und Methoden	23
4.1 Geräte	23
4.2 Chemikalien	24
4.3 Verbrauchsmaterialien	26
4.4 Ansätze, Lösungen und Puffer	27
4.5 Isolierung primärer humaner Hepatozyten	32
4.5.1 Humanes Lebergewebe	32
4.5.2 Zwei-Phasen-Perfusion	33
4.6 2D-Zellkultur	36
4.6.1 Beschichtung der Zellkulturplatten und Zellaussaat	36
4.6.2 Induktion einer <i>Steatosis hepatis</i>	36
4.6.3 Substanzinkubation mit Genistein und Insulin	36
4.7 <i>In-vitro</i> -Analytik	37
4.7.1 Ölrot O-Färbung	37
4.7.2 Sulforhodamin B (SRB)-Assay	37
4.7.3 AST- und LDH-Assay	37
4.7.4 Harnstoff-Assay	38
4.7.5 XTT-Assay	39
4.8 Protein-Analytik	39
4.8.1 Proteinisolierung	39

4.8.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	39
4.8.3	SDS-Page und Western Blot	40
4.8.4	Wiederverwendung der Nitrozellulose-Membran (Stripping)	41
4.9	RNA-Analytik	42
4.9.1	RNA-Isolierung	42
4.9.2	Reverse Transkription der RNA	42
4.9.3	Quantitative realtime-PCR	43
4.10	Statistische Auswertung	43
5	Ergebnisse	44
5.1	Spendercharakteristika	44
5.2	Charakterisierung des <i>in-vitro</i> -Fettlebermodells	45
5.2.1	Evaluation des Lipidgehaltes	45
5.2.2	Zytotoxizität von freien Fettsäuren	47
5.2.3	Einfluss von freien Fettsäuren auf die hepatische Syntheseleistung	49
5.3	Insulin-Signaltransduktion im <i>in-vitro</i> -Fettlebermodell	50
5.3.1	Phosphorylierung von Akt	50
5.3.2	Phosphorylierung von ERK1/2	51
5.3.3	Phosphorylierung von GSK3 α/β	52
5.3.4	Phosphorylierung von FoxO1	53
5.3.5	Gen-Expression vom Glukosetransporter Typ II	54
5.3.6	Gen-Expression vom Insulinrezeptor	55
5.4	Evaluation der Effekte von Genistein (GEN)	56
5.4.1	Zytotoxizität von GEN	56
5.4.2	Einfluss von GEN auf die hepatische Syntheseleistung	59
5.5	Einfluss von GEN auf die hepatische Insulin-Signaltransduktion	60
5.5.1	Phosphorylierung von Akt	60
5.5.2	Phosphorylierung von ERK1/2	61
5.5.3	Phosphorylierung von GSK3 α/β	62
5.5.4	Phosphorylierung von FoxO1	63
5.5.5	Gen-Expression vom Glukosetransporter Typ II	63
5.5.6	Gen-Expression vom Insulinrezeptor	64
6	Diskussion	65
6.1	<i>In-vivo</i> -Bedingungen der Fettleber im <i>in-vitro</i> -Modell	65
6.2	Nachweis einer <i>in-vitro</i> -Insulinresistenz	67
6.3	Zytotoxische Effekte von GEN	71
6.4	Wirkung von GEN auf die Insulin-Signaltransduktion	73
6.5	Limitationen des Fettlebermodells	77
6.6	Schlussfolgerung und Ausblick	78

7	Literaturverzeichnis	80
8	Anhang	95
8.1	Eidesstattliche Erklärung	95
8.2	Lebenslauf	96
8.3	Publikationsliste	97
8.4	Danksagung	99

Abkürzungsverzeichnis

Akt	Proteinkinase B
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
AST	Aspartat-Aminotransferase
Aqua dest.	Aqua destillata
BCA	Bicinchoninsäure
BMI	(engl.) body-mass-index, Körpermasseindex
BSA	(engl.) bovine serum albumin, Rinder-Serumalbumin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	(engl.) deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure
ERK1/2	(engl.) extracellular signal-regulated kinases 1/2
FCS	(engl.) fetal calf serum, Fetales Kälberserum
FFS	Freie Fettsäuren
FoxO1	Forkhead-Box-Protein 1
GEN	Genistein
GLUT2	Glukosetransporter Typ II
GSK3	Glykogensynthase-Kinase 3
HCC	(engl.) hepatocellular carcinoma, Leberzellkarzinom
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
INSR	Insulinrezeptor-Gen
IR	Insulinrezeptor
IRS	Insulinrezeptor-Substrat
LDH	Lactatdehydrogenase

MAP	(engl.) mitogen-activated protein, Mitogen-aktiviertes Protein
MEM-NEAA	(engl.) Minimum Essential Medium-Eagle with non-essential amino acids, nicht-essentielle Aminosäuren
mRNA	(engl.) messenger ribonucleic acid, Boten-Ribonukleinsäure
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NADP	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NAFLD	(engl.) non-alcoholic fatty liver disease, nicht-alkoholische Fettlebererkrankung
NASH	(engl.) non-alcoholic steatohepatitis, nicht-alkoholische Steatohepatitis
OD	Optische Dichte
PBS	(engl.) phosphate-buffered saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	(engl.) polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PDK1	(engl.) 3-phospho-inositide-dependent protein kinase-1
PEPCK	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
PHH	Primäre humane Hepatozyten
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
rpm	(engl.) revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SRB	Sulforhodamin B
TBST	Tris-Borat-Puffer mit Tween 20
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
v/v	Volumen pro Volumen
WME	Williams' Medium E
w/v	Gewicht pro Volumen
XTT	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

1	Multiple-Hit-Hypothese zur Pathogenese der NAFLD.	13
2	Hepatische Insulin-Signaltransduktion.	14
3	Chemische Struktur von Genistein.	18
4	Experimenteller Ablauf und Methodik.	22
5	Schematischer Ablauf der Perfusions-Phasen.	33
6	Zwei-Phasen-Perfusion von humanem Lebergewebe.	34
7	Lichtmikroskopische Aufnahmen nach Ölrot O-Färbung.	45
8	Lipid-Gehalt der Kontroll- und Steatosisgruppe.	46
9	Aktivität der AST und LDH.	47
10	Viabilität der Kontroll- und Steatosisgruppe.	48
11	Stoffmengenkonzentration von Harnstoff.	49
12	Phosphorylierung von Akt.	50
13	Phosphorylierung von ERK1/2.	51
14	Phosphorylierung von GSK3 α/β	52
15	Phosphorylierung von FoxO1.	53
16	Genexpression von GLUT2.	54
17	Genexpression des hepatischen Insulinrezeptors.	55
18	AST-Aktivität nach Inkubation mit GEN.	56
19	LDH-Aktivität nach Inkubation mit GEN.	57
20	Zellaktivität nach Inkubation mit GEN.	58
21	Stoffmengenkonzentration von Harnstoff nach Inkubation mit GEN.	59
22	Phosphorylierung von Akt nach Inkubation mit GEN.	60
23	Phosphorylierung von ERK1/2 nach Inkubation mit GEN.	61
24	Phosphorylierung von GSK3 α/β nach Inkubation mit GEN.	62
25	Genexpression von GLUT2 nach Inkubation mit GEN.	63
26	Genexpression des hepatischen Insulinrezeptors nach Inkubation mit GEN.	64
27	Insulinresistenz in steatotischen Hepatozyten.	67

Tabellenverzeichnis

1	Spendercharakteristika.	44
---	---------------------------------	----

Zusammenfassung

Einleitung:

Die nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD) ist bereits die häufigste chronische Lebererkrankung in der westlichen Welt. Die komplexe Erkrankung wird als hepatische Manifestation des metabolischen Syndroms verstanden und ist eng mit der Insulinresistenz assoziiert. Genistein (GEN), ein natürlich vorkommendes Isoflavonoid, zeigte in zahlreichen Studien einen positiven Einfluss auf die NAFLD und der damit verbundenen Insulinresistenz. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung und Charakterisierung eines humanen *in-vitro*-Modells der Fettleber und die Evaluation der Effekte von GEN auf die hepatische Insulin-Signaltransduktion.

Material und Methoden:

Primäre humane Hepatozyten (PHH) wurden aus chirurgisch reseziertem Lebergewebe isoliert. Anschließend erfolgte die Induktion einer *Steatosis* durch Inkubation mit 1 mM Öl- und Palmitinsäure (2:1) für 24 Stunden. Der Lipidgehalt wurde mittels Ölrot O-Färbung gemessen, die Zytotoxizität und die metabolische Aktivität mittels AST-, LDH- und Harnstoff-Assay sowie dem XTT-Assay bestimmt. Die Expression vom Insulinrezeptor (INSR) und Glukosetransporter Typ II (GLUT2) wurde durch realtime-PCR evaluiert. Veränderungen der Proteinphosphorylierungen von AKT, ERK1/2, FoxO1 und GSK3 α/β , in Abhängigkeit einer Inkubation mit und ohne 100 nM Insulin für 15 Minuten, wurden mittels Western Blot analysiert. In einer Konzentrationsreihe von 1 bis 100 μ M wurden steatotische und nicht-steatotische PHH mit GEN für 24 Stunden behandelt.

Ergebnisse:

Die mit freien Fettsäuren behandelten PHH zeigten einen signifikant erhöhten Lipidgehalt und eine moderate Lipotoxizität, wohingegen keine Einschränkung der metabolischen Kompetenz beobachtet werden konnte. In steatotischen PHH konnte eine reduzierte Insulin-induzierte Phosphorylierung von Akt, ERK1/2, GSK3 α/β und FoxO1 und ein moderater Anstieg der Expression von GLUT2 und INSR beobachtet werden. Die Behandlung mit GEN war in den Konzentrationen von 50 und 100 μ M zytotoxisch. Steatotische PHH zeigten einen Anstieg der Phosphorylierung von ERK1/2 und GSK3 α/β sowie der GLUT2- und INSR-Expression mit ansteigender Konzentration von GEN. In nicht-steatotischen PHH konnte eine gesteigerte Akt-, ERK1/2- und GSK3 α/β -Phosphorylierung sowie eine erhöhte INSR-Expression mit ansteigender GEN-Konzentration nachgewiesen werden.

Diskussion:

Das vorliegende humane *in-vitro*-Fettlebermodell ist eine verlässliche Reproduktion der *in-vivo*-Verhältnisse einer NAFLD bezüglich Lipidakkumulation, Lipotoxizität und Insulin-

resistenz. Eine Behandlung mit GEN zeigte insulinotrope Effekte sowohl in steatotischen als auch in nicht-steatotischen PHH durch einen Dosis-abhängigen Anstieg der Phosphorylierung von Schlüsselproteinen der hepatischen Insulin-Signaltransduktion. Zudem zeigte sich eine erhöhte Expression von transmembranären Transportproteinen, was möglicherweise zu einer Verbesserung des hepatischen Energiestoffwechsels beitragen könnte.

Summary

Introduction:

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is already the most common chronic liver disease in western countries. The complex disorder is regarded as the hepatic manifestation of metabolic syndrome and has been strongly associated with insulin resistance. Genistein (GEN), a natural soy isoflavone, has shown some potential benefits on NAFLD as well as insulin resistance in numerous epidemiological and experimental studies. Aim of the present study was the establishment and characterization of a human *in-vitro* fatty liver model and the evaluation of GEN effects on hepatic insulin signalling.

Materials and Methods:

Primary human hepatocytes (PHH) were isolated from resected liver tissues. Steatosis was induced by adding 1 mM oleic and palmitic acid (2:1) for 24h. Lipid content was quantified by Oilred O staining and cytotoxicity and metabolic activity was evaluated by enzymatic assays of AST, LDH and urea as well as XTT cell viability assay. Alterations in mRNA expression of insulin receptor (INSR) and glucose transporter type 2 (GLUT2) were measured by realtime-PCR. Furthermore, changes in protein phosphorylation of AKT, ERK1/2, FoxO1 and GSK3 α/β besides stimulation with and without 100 nM insulin for 15 minutes were analysed by Western Blot. Steatotic and non-steatotic PHH were stimulated with GEN at different concentrations ranging from 1 to 100 μ M for 24h.

Results:

PHH treated with free fatty acids showed a significant increase in cytoplasmic lipid vesicles. A moderate lipotoxicity was observed whereas metabolic activity was not changed. We observed decreased insulin-induced phosphorylation levels of AKT, ERK1/2, GSK3 α/β and FoxO1 in steatotic PHH. Furthermore, lipid-overloaded hepatocytes showed a slight elevation of GLUT2 and INSR expression levels. Additional treatment with GEN showed cytotoxicity at 50 and 100 μ M. In steatotic PHH, we observed increased phosphorylation of ERK1/2 and GSK3 α/β as well as increased expression of GLUT2 and INSR in a dose-dependent manner of GEN. In non-steatotic PHH, we observed an increased phosphorylation of Akt, ERK1/2 and GSK3 α/β as well as an increased expression of INSR in a concentration-dependent manner of GEN, respectively.

Conclusion:

Our data show that the human *in-vitro* model of NAFLD is a reliable reproduction of *in-vivo* conditions regarding fat accumulation, lipotoxicity and insulin resistance. Additional treatment with GEN showed insulinotropic effects in steatotic as well as non-steatotic PHH by an increased phosphorylation of insulin signalling related key proteins in a dose-dependent manner. Moreover, an increased expression of transmembrane transport proteins has been observed, suggesting an improvement of hepatic energy metabolism.

1 Einleitung

1.1 Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD)

Die Leber ist das zentrale Stoffwechselorgan des menschlichen Organismus und stellt durch eine Vielzahl von komplexen Funktionen eine physiologische Homöostase sicher. Neben der lebensnotwendigen Entgiftungsfunktion endogener (z.B. Zellprodukte) und exogener Verbindungen (z.B. Medikamente) im Rahmen der sogenannten Biotransformation, laufen in der größten Drüse des Körpers wichtige Reaktionen des Intermediärstoffwechsels ab. So reguliert die Leber maßgeblich den Aminosäure-, Kohlenhydrat- und Lipidstoffwechsel. Über die Synthese von Serumproteinen, wie beispielsweise Albumin und Transferrin, ist die Leber an systemischen Prozessen wie der Hämostase und Immunabwehr beteiligt. Durch die Sekretion von Gallensäuren wird die Resorption von Nahrungsfetten, die Ausscheidung von Stoffwechselendprodukten und Toxinen ermöglicht, sowie der Cholesterinstoffwechsel reguliert.

Die Zusammensetzung des Lebergewebes kann in zwei Klassen von Zellen unterteilt werden: den eigentlichen Parenchymzellen und den nicht-parenchymatösen Zellen. Die Parenchymzellen, namentlich Hepatozyten und Cholangiozyten, repräsentieren die Hauptmasse der Leber mit 70% bzw. 5% der hepatischen Zellpopulation. Die verbleibenden 25% bilden die nicht-parenchymatösen Zellen, zu denen hauptsächlich Kupffer-Zellen, Endothelzellen und hepatische Sternzellen gehören [1].

Die Ursachen für eine Schädigung der Leber können vielfältig sein. Neben einer viralen (Hepatitisviren A-D), autoimmunen (z.B. primär biliäre Cholangitis, Autoimmunhepatitis), toxischen (z.B. Medikamente, Chemikalien, Drogen) und hereditären (z.B. Morbus Wilson, Hämochromatose) Genese kommen auch nutritiv-toxische Ursachen, hier vor allem Alkohol und Adipositas, in Betracht.

Mit einer stetig steigenden Prävalenz spricht man bei der Adipositas bereits von einer weltweiten Epidemie von beachtlicher sozioökonomischer Bedeutung. Mehr als 500 Millionen Menschen sind weltweit betroffen und nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (engl., World Health Organization, WHO) sterben jedes Jahr etwa 3,4 Millionen an den Folgen von Übergewicht und Adipositas [2]. Schätzungen gehen davon aus, dass im Jahr 2030 etwa 10% der Weltbevölkerung von Adipositas betroffen sein werden [3].

Die als Übergewicht mit einem Körpermasseindex (BMI) von über 30 kg/m² definierte Ernährungs- und Stoffwechselstörung wird durch ein komplexes Zusammenspiel von Umweltfaktoren, genetischer Prädisposition und Verhaltensweisen wie Überernährung und Bewegungsmangel verursacht. Verbunden mit der Adipositas ist auch ein Anstieg der unter dem sogenannten metabolischen Syndrom zusammengefassten Erkrankungen wie Bluthochdruck, Fettstoffwechselstörung und Insulinresistenz.

Die als hepatische Manifestation des metabolischen Syndroms verstandene nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD) ist mit einer Prävalenz von 20% in der Allgemeinbevölkerung die häufigste chronische Lebererkrankung der westlichen Welt [4]. Schätzungen ergaben für

Deutschland bereits eine Prävalenz von 30% [5]. Im Allgemeinen sind Männer mit einer Prävalenz von 19-31% häufiger betroffen als Frauen, die eine Prävalenz von 15-16% aufzeigten [6]. Die Prävalenz steigt mit zunehmendem Alter und auch Kinder und Jugendliche sind betroffen [7]. Schätzungen gehen davon aus, dass die direkten Kosten im Zusammenhang mit Adipositas in Deutschland 29,39 Billionen Euro und die zusätzlichen, indirekten Kosten etwa 33,65 Billionen Euro betragen [8].

Die Erstbeschreibung der NAFLD erfolgte im Jahr 1980 durch Ludwig *et al.* als histopathologische Veränderung des Leberparenchyms bei Patienten ohne signifikanten Alkoholkonsum [9]. Heute ist die NAFLD definiert als eine Leberzellverfettung (*Steatosis hepatis*) mit einem Fettanteil von mehr als 5% der Parenchymfläche, die nicht maßgeblich durch einen erhöhten Alkoholkonsum (Frauen ≤ 10 g/d und Männer ≤ 20 g/d) bedingt ist. Weiter unterscheidet man histologisch zwischen einer kleintropfigen (mikrovesikulären) und einer großtropfigen (makrovesikulären) Form der *Steatosis hepatis*, wobei auch Mischformen möglich sind. Bei der NAFLD kommt es vorwiegend zu einer makrovesikulären Akkumulation von Lipiden im Zytoplasma der Hepatozyten [10]. Anhand der Menge von Fettvakuolen im Zytoplasma der Hepatozyten wird zwischen milder ($<33\%$), mäßiger (33 bis 66%) und schwerer ($>66\%$) *Steatosis hepatis* unterschieden [11].

Das Spektrum der NAFLD reicht von einer einfachen *Steatosis hepatis* über die Steatohepatitis (NASH) mit begleitender Entzündung hin zur irreversiblen Leberfibrose und -zirrhose. Zwischen 5-20% der NAFLD-Patienten entwickeln im Verlauf eine NASH. Bei etwa 10-20% geht diese in eine höhergradige Fibrose über, welche bei unter 5% der Patienten bis zur Leberzirrhose voranschreiten kann [12]. Bei Vorliegen einer Leberzirrhose besteht das Risiko zur Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms (HCC) von etwa 2% pro Jahr [13]. Davon abgesehen ist die NAFLD auch ein beachtlicher kardiovaskulärer Risikofaktor [14]. NASH-Patienten weisen im Vergleich zu Patienten mit einer einfachen NAFLD eine erhöhte Gesamt- [15] und leberspezifische Mortalität auf [16].

Die Pathogenese der nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung konnte bisher nur in Grundzügen aufgeklärt werden. Neben genetischen und epigenetischen Ursachen spielen auch ethnische, hormonelle und umweltbedingte Faktoren eine Rolle bei der Entstehung einer NAFLD. Nach der „Two-Hit“-Hypothese von Day *et al.* aus dem Jahr 1998 [17], geht man gegenwärtig von einer „Multiple-Hit“-Theorie (Abb. 1) zur Entstehung der NAFLD aus [18]. Die Lipidakkumulation in der Leber schädigt einerseits durch Lipotoxizität mit Aktivierung des $\text{I}\kappa\text{B}/\text{NF}\kappa\text{B}$ -Signalweges [19] und sensibilisiert andererseits die Hepatozyten für Schädigungen durch inflammatorische Zytokine, oxidativen Stress, mitochondriale Dysfunktion sowie Stress des Endoplasmatischen Retikulums (ER).

Die gegenwärtige Therapie der NAFLD respektive NASH beschränkt sich auf eine Änderung von Ernährung und Lebensstil sowie auf die Behandlung der Risikofaktoren des metabolischen Syndroms wie arterieller Hypertonie, Fettstoffwechselstörung und Insulinresistenz. Durch die Erstellung evidenzbasierter Leitlinien, wie durch italienische (AISF), amerika-

nische (AGA/AASLD/ACG) und chinesische Fachgesellschaften (CASLD), wurde der zunehmenden klinischen Relevanz der NAFLD bereits Rechnung getragen. Im Januar 2015 veröffentlichte die deutsche Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) eine S2k-Leitlinie mit Empfehlungen zur NAFLD.

In der klinischen Praxis sind leberspezifische Therapien bisher jedoch nicht verfügbar. Ein besseres Verständnis der zugrundeliegenden molekularen Mechanismen, welche die Entstehung und Aufrechterhaltung einer NAFLD beeinflussen, könnten zur Entwicklung neuer Therapiestrategien für diese weltweit zunehmende, ökonomisch relevante Erkrankung beitragen.

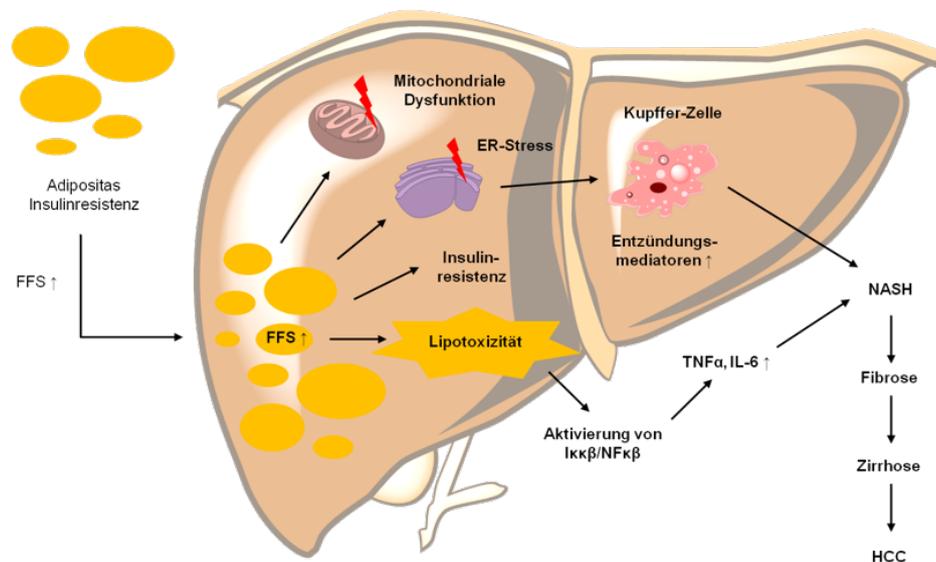


Abb. 1 Multiple-Hit-Hypothese zur Pathogenese der NAFLD. Durch Adipositas und Insulinresistenz kommt es zu einer vermehrten Freisetzung von freien Fettsäuren aus Adipozyten und Muskelzellen. Diese akkumulieren in der Leber und bedingen eine NAFLD. Zum einen schädigt bereits die Lipidakkumulation die Leber in Form von Lipotoxizität, zum anderen ist eine steatotische Leber sensibilisiert für Schädigungen durch inflammatorische Zytokine, Adipokine, oxidativem Stress und mitochondriale Dysfunktion. Zudem reduziert der oxidative Stress die Fähigkeit der Hepatozyten zu Regeneration und Proliferation. Die chronischen Entzündungsreaktionen führen zur Steatohepatitis (NASH) und langfristig zur Fibrose und Zirrhose bis hin zum hepatozellulären Karzinom (Abbildung modifiziert nach Dowman *et al.* [20]).

1.1.1 Die hepatische Insulin-Signaltransduktion

Nahezu alle Zellen des menschlichen Organismus nutzen die Phosphorylierung von Proteinen zur Weiterleitung von Informationen und Signalen. Das Peptidhormon Insulin aktiviert durch die Bindung an seinen Rezeptor mehrere intrazelluläre Phosphorylierungskaskaden, die durch Signalwege beschrieben werden können (Abb. 2). Diese Signalwege stoßen vielfältige Prozesse in der Zelle an, wie beispielsweise die Regulation des Energie- und Proteinstoffwechsels und von Differenzierungsprozessen, sowie die dazu notwendige Genexpression. Durch die Aktivierung von zwei Signalwegen, dem Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)/Akt- sowie dem MAP-Kinase-Weg (engl., mitogen-activated protein, MAP), reguliert Insulin die Glukosehomöostase sowie Zellwachstum und -differenzierung in der Leber.

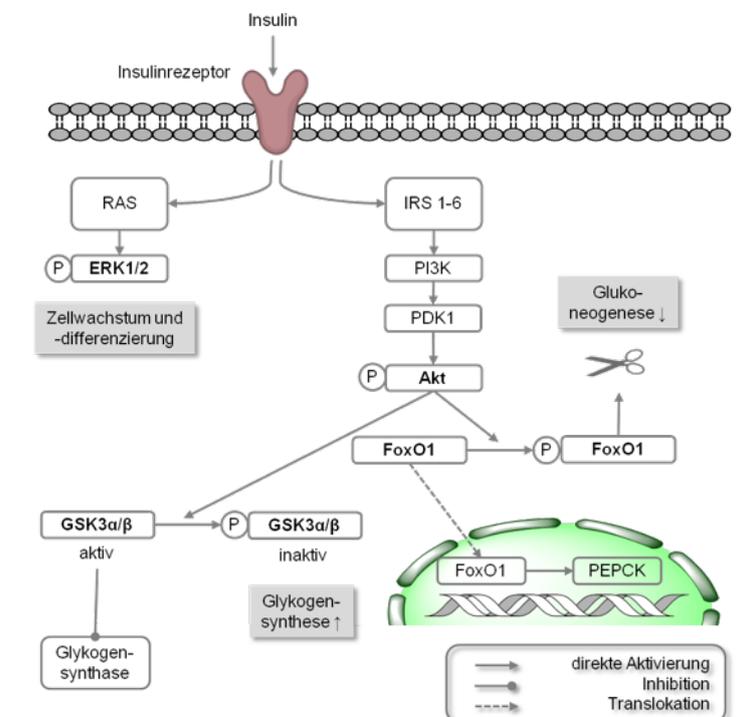


Abb. 2 Hepatische Insulin-Signaltransduktion. Mit der Bindung von Insulin an den Insulinrezeptor (IR) wird nach Aktivierung der Insulinrezeptorsubstrate (IRS) 1-6 ein Großteil der intrazellulären Effekte von Insulin über den PI3K/Akt- sowie den MAP-Kinase-Weg vermittelt. Die Proteinkinase Akt stimuliert über die Phosphorylierung von GSK3α/β die Glykogensynthese und hemmt über die Phosphorylierung von FoxO1 die Glukoneogenese. Über die MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 reguliert Insulin das Zellwachstum und -differenzierung. Dargestellt ist eine vereinfachte Auswahl an wichtigen und in dieser Arbeit untersuchten Signalwegen der hepatischen Insulin-Signaltransduktion. P-Phosphorylierung.

Nach Bindung von Insulin an die beiden extrazellulären α -Untereinheiten des membranständigen Insulinrezeptors wird eine Transphosphorylierung der beiden intrazellulär gelegenen β -Untereinheiten induziert. Hierdurch werden die Kinase-Domänen der β -Untereinheiten aktiviert und stellen dadurch Bindungsstellen für intrazelluläre Substrate bereit, wie beispiels-

weise die Insulinrezeptorsubstrate (IRS) oder Ras-Proteine. Die IRS sind hierbei sogenannte Adapterproteine zwischen dem Insulinrezeptor und dem weiterleitenden Zielprotein [21]. Als eines dieser Insulin-Zielproteine aktiviert die PI3K über die PDK1 (engl., 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1) die Proteinkinase Akt durch spezifische Phosphorylierungen an den Aminosäureresten Threonin³⁰⁸ und Serin⁴⁷³ [22, 23]. Die phosphorylierte Proteinkinase Akt wiederum reguliert die hepatische Glykogensynthese und die Glukoneogenese über die Glykogensynthase Kinase 3 (GSK3) mit ihren beiden Isoformen GSK3 α und GSK3 β sowie über den Transkriptionsfaktor FoxO1 (engl., forkhead box protein O1). Die Akt-vermittelte Phosphorylierung der GSK3 α/β an den Aminosäureresten Serin²¹ und Serin⁹ inaktiviert diese und stimuliert somit die Glykogensynthese in Form einer Derepression [24]. Die spezifische Phosphorylierung von FoxO1 durch Akt an Serin²⁵⁶ transloziert den Transkriptionsfaktor aus dem Nukleus. Getrennt vom Nukleus kann FoxO1 seine Funktion, nämlich die Aktivierung der Transkription von wichtigen Enzym-Genen der Glukoneogenese, nicht mehr fortführen und die Glukoneogenese wird konsekutiv gehemmt [25].

Der MAP-Kinase-Weg ist ein weiterer Signalweg der Insulin-Signaltransduktion. Zwei bedeutende Mitglieder aus der Familie der MAP-Kinasen sind die Isoformen ERK1 und ERK2 (engl., extracellular signal-regulated kinases, ERK). Die Bindung von Insulin an den Insulinrezeptor führt über eine Phosphorylierungskaskade zur Aktivierung des Ras-Proteins. Das aktivierte Ras-Protein induziert dann eine sequentielle Phosphorylierung von ERK1 an Threonin²⁰² und von ERK2 an Tyrosin²⁰⁴. Im phosphorylierten und damit aktivierten Zustand steuern ERK1 und ERK2 in der Zelle Insulin-induziertes Wachstum und Differenzierung [26].

Der Transport von Glukose durch die Zellmembran wird durch bestimmte transmembranäre Transportproteine, den sogenannten Glukosetransportern (GLUT), katalysiert. Die hierfür benötigte Energie wird durch den Konzentrationsgradient der Glukose bereitgestellt. Bisher sind 14 verschiedene Transporter vom GLUT-Typ bekannt, wobei diese in drei Klassen unterteilt werden. In der Leber kommt vor allem der insulinunabhängige Glukosetransporter Typ 2 (GLUT2) vor. Durch die geringe Glukoseaffinität ist die Aufnahme von Glukose abhängig vom Blutzuckerspiegel.

1.1.2 NAFLD und Insulinresistenz

Bereits im Jahr 1988 postulierte der amerikanische Endokrinologe Gerald Reaven für die Insulinresistenz eine zentrale Rolle bei der Pathophysiologie des metabolischen Syndroms, einer der führenden Ursachen für Mortalität und Morbidität in Industrieländern der westlichen Welt [27].

Die Insulinresistenz ist ein zentrales Charakteristikum der metabolischen Dysfunktion im Rahmen einer NAFLD und ist definiert als eine Störung im Insulin-Signalweg mit der fehlenden Fähigkeit von Insulin den gezielten Transport von Glukose in die Zellen zu stimulieren [28]. Neben einer signifikanten Hyperglykämie, als Maßstab für eine im gesamten Körper gestörte Glukosehomöostase, zeigt vor allem die verminderte Fähigkeit zur Suppression der endogenen Glukosesynthese, das Vorliegen einer hepatischen Insulinresistenz [29]. Der Lipidgehalt der Leber ist hierbei der einzige unabhängige Vorhersagewert für eine verschlechterte hepatische wie auch periphere Insulin-Signaltransduktion [30]. Zwischen dem Fettgehalt der Leber und der Insulin-Sensitivität wurde ein inverser Zusammenhang beschrieben [31]. Eine reduzierte Sensitivität von Zellen auf Insulin lässt sich bei NAFLD-Patienten nicht nur im Leberparenchym, sondern auch in Muskel- und Fettgewebe nachweisen [32]. Die Insulinresistenz verursacht eine Abschwächung der anti-lipolytischen Effekte von Insulin und begünstigt durch periphere Lipolyse und *De-novo*-Lipogenese wiederum die Einlagerung von freien Fettsäuren in die Leber im Sinne eines *Circulus vitiosus* [33]. Bei Patienten mit nachgewiesener NAFLD konnte, durch die eingeschränkte Möglichkeit zur Nutzung von Glukose als Energiequelle, eine gesteigerte β -Oxidation von Fettsäuren zur alternativen Bereitstellung von Energie nachgewiesen werden [34]. Ferner scheint die Insulinresistenz eng mit der Entstehung eines Leberzellkarzinoms verknüpft zu sein [35].

Die molekularen Mechanismen der hepatischen Insulinresistenz sind komplex und noch weitestgehend unklar. Die ausgeprägte inverse Korrelation zwischen peripherer Insulinresistenz und intrahepatischer Lipidakkumulation suggeriert, dass die hepatische Insulinresistenz zur peripheren Insulinresistenz führen könnte, was in einigen Tierstudien gezeigt wurde [36]. Ebenso bleiben zentrale Fragen bisher unbeantwortet. Ist die Insulinresistenz ursächlich für eine NAFLD? Oder begünstigt die Akkumulation von Fett in der Leber eine Insulinresistenz? Neben der viszeralen Fettakkumulation im Organismus spielen inflammatorische Prozesse unter Einbeziehung des endoplasmatischen Retikulums (ER) eine entscheidende Rolle. Der Grad der Insulinresistenz ist dabei eng mit dem Schweregrad der Fettleberentzündung verbunden [37].

Ein besseres Verständnis der molekularen Grundlagen der Insulinresistenz im Rahmen der NAFLD könnte zu neuen therapeutischen Interventionen führen und neben der Minderung von Endorganschäden zu einem längeren Überleben beitragen.

1.1.3 Bedeutung für die Chirurgie

Aufgrund der gegenwärtigen und in der Zukunft noch weiter ansteigenden Prävalenz der NAFLD in der Allgemeinbevölkerung ergibt sich in Abhängigkeit vom Krankheitsstadium ein tiefgreifender Einfluss auf die hepatobiliäre Chirurgie und Lebertransplantation (LTx). Lebererkrankungen sind weltweit nach der Global Burden of Disease Studie für etwa 2% aller Todesfälle verantwortlich [38]. Die chirurgische Resektion ist oft die einzige kurative Option für viele Patienten mit primären und sekundären Lebertumoren. Bei schätzungsweise 20% der Patienten, die für eine Leberteilresektion vorgesehen sind, konnte eine *Steatosis hepatis* nachgewiesen werden [39]. Zwei Studien zeigten bei 20% und 51% der Patienten eine histologisch gesicherte NAFLD, die für eine elektive Leberlebenspende vorgesehen waren [40, 41]. Zahlreiche Studien belegen signifikant erhöhte Morbidität nach Leberresektionen bei Patienten mit einer mäßigen und schweren Fettleber, inklusive dem gehäuften Auftreten von postoperativen Komplikationen, wie beispielsweise Infektionen, abdominellen Abszessen, Gallenleckagen oder Leberversagen [42, 43, 44]. Zudem ist eine bestehende Fettleber assoziiert mit längeren Operationszeiten sowie einer postoperativen Hyperbilirubinämie [45].

Die *Steatosis hepatis* ist ein nachgewiesener Risikofaktor für eine primäre Nichtfunktion der Spenderleber nach Lebertransplantation [39, 46, 47]. Zudem stellt die NAFLD/NASH-induzierte Leberzirrhose bereits die dritthäufigste Indikation für eine LTx in den USA dar [48]. Während im Jahr 2003 bei nur etwa 1% der Transplantatempfänger in den USA eine NASH diagnostiziert wurde, waren es 2010 bereits 7,7-9,7% [49]. In einer Analyse des amerikanischen Transplantationsregisters (UNOS) stieg der Anteil von Lebertransplantationen aufgrund eines NASH-induzierten hepatozellulären Karzinoms von 8,3% aller HCC-Patienten im Jahr 2002 auf 13,5% im Jahr 2012 [50]. Zu einem ähnlichen Ergebnis kam eine monozentrische Studie aus Deutschland. Hier war die NASH die dritthäufigste Ursache für eine Leberzirrhose bei Patienten, die sich in einem Zeitraum von 1994 bis 2011 aufgrund eines HCC einer Lebertransplantation unterzogen haben [51]. Als eine weitere Konsequenz der weltweit steigenden Prävalenz der NAFLD müssen zahlreiche Spenderlebern abgelehnt werden. Die deutsche Bundesärztekammer (BÄK) hat bereits reagiert und in den Richtlinien für eine Organvermittlung zur Lebertransplantation die Vermittelbarkeit von Organen mit einer histologisch gesicherten Fettleber von über 40% eingeschränkt. Die mit einer *Steatosis hepatis* assoziierte Insulinresistenz erhöht das Risiko für postoperative Komplikationen nach abdominalchirurgischen Eingriffen [52]. Zudem zeigten Patienten mit einem Diabetes mellitus eine signifikant schlechtere 5-Jahres-Überlebensrate nach einer Lebertransplantation im Vergleich zu Patienten ohne diabetische Stoffwechsellaage [53].

Zur Verbesserung von Outcome und Mortalität nach leberchirurgischen Eingriffen und Lebertransplantationen sowie zur Erweiterung des Spenderpools sollten neue Optionen zur Therapie der NAFLD und der damit assoziierten Insulinresistenz erschlossen werden.

1.2 Genistein (GEN) - ein biologisch aktives Isoflavonoid

Genistein (4',5,7-Trihydroxyisoflavon) ist ein natürlicher, in vielen Pflanzen, vor allem der Sojabohne, vorkommender Farbstoff und wurde erstmalig durch Perkin und Newbury im Jahr 1899 aus dem Hülsenfrüchtler Färber-Ginster (*Genista tinctoria*) isoliert [54]. Die chemische Synthese gelang im Jahr 1928.

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zum Hormon Östrogen gehört GEN zu den Phytoöstrogenen, und hier in die Subgruppe der Isoflavonoide (Abb. 3). Isoflavonoide sind meist sekundäre Pflanzenfarbstoffe mit gelblicher Färbung, die neben zahlreichen anderen Funktionen vor allem für die Abwehr von Pathogenen wichtig sind.

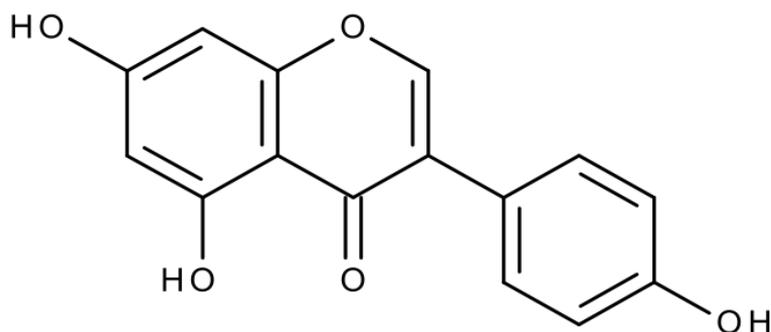


Abb. 3 Chemische Struktur von Genistein. Das Isoflavonoid-Grundgerüst mit drei Hydroxylgruppen wird von zwei Benzolringen gebildet, welche durch einen heterozyklischen Pyran-Ring miteinander verbunden sind. Die gelbe, kristalline Substanz Genistein mit der Summenformel $C_{15}H_{10}O_5$ hat ein Molekulargewicht von 270,24 g/mol und ist in Ethanol und Dimethylsulfoxid (DMSO) gut löslich.

Hauptsächlich in Form von glykosidischen Konjugaten vorliegend, varriert die Konzentration von GEN in Soja-reicher Nahrung zwischen 0,2 und 1 mg/g [55]. Nach Ingestion wird Genistein durch Hydrolyse im Magen sowie mit Hilfe der Darmflora zu Dihydrogenistein und dem biologisch aktiven 5-Hydroxy-equol metabolisiert [56].

Aufgrund zahlreicher pleiotroper Effekte wie die Verbesserung von postmenopausalen Beschwerden und Osteoporose [57], einer anti-kanzerogenen Wirkung beim Mamma- und Prostatakarzinom in asiatischen Populationen [58, 59] sowie einer protektiven Rolle bei kardiovaskulären Erkrankungen [40], rückte das Isoflavonoid Genistein in den letzten beiden Dekaden zunehmend in den Fokus der Forschung.

Epidemiologische Studien zeigten eine niedrigere Inzidenz von Krebs- und Herz-Kreislaufkrankungen in asiatischen Ländern mit hohem Soja-Anteil in der Nahrung im Vergleich zu Ländern mit westlichem Lebensstil [60]. Bei postmenopausalen Frauen mit Osteoporose reduzierte Genistein signifikant den Glukose- und Insulinspiegel unter Nahrungskarenz [61]. Eine randomisierte Studie mit 50 Frauen, ebenfalls in der Postmenopause, zeigte eine Verbesserung der Insulinsensitivität bei vorbestehender Hyperinsulinämie nach einer Behandlung mit 54 mg Genistein pro Tag für 24 Wochen [62]. Eine prospektive Studie an übergewichti-

gen Frauen in Japan zeigte unter erhöhter Aufnahme von Isoflavonen ein geringeres Risiko für die Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ II [63]. Zu einem ähnlichen Ergebnis kam Squadrito *et al.* bei einer Untersuchung an postmenopausalen Frauen mit metabolischem Syndrom. Nach einjähriger Diät mit Genistein bestand ein verringertes Risiko für die Entwicklung eines Diabetes mellitus [64].

Auch verschiedene Tiermodell-Studien ergaben eine anti-diabetische Wirkung von GEN nach Applikation in pharmakologischen Dosierungen. In einem Modell mit diabetischen Wistar-Ratten verbesserte GEN die Glukosetoleranz und senkte signifikant den Glukosespiegel im Blut [65]. Zudem konnte in adipösen Mäusen mit induziertem Diabetes mellitus Typ II eine Verbesserung der Hyperglykämie nach Gabe von GEN nachgewiesen werden [66]. Eine Reduktion der Insulinresistenz zeigte sich in einem Tiermodell mit Ovar-ektomierten Sprague-Dawley-Ratten nach 4-wöchiger Diät mit einem Genistein-Anteil von 0,1% als Supplement [67]. Ein Modell der Insulinresistenz mit männlichen Wistar-Ratten ergab nach einer Genistein-Diät für 43 Tage eine Verbesserung der Sensitivität auf Insulin [68]. In einem weiteren Tiermodell mit männlichen Wistar-Ratten zeigte sich eine Normalisierung der Insulinkonzentration im Blut bei der für 10 Tage mit Sojaprotein gefütterten Gruppe [69]. Über die genauen Angriffspunkte von Genistein auf molekularer Ebene bei der Insulinresistenz liegen bisher nur wenige Daten vor. Haneishi *et al.* konnte beispielsweise eine günstige Beeinflussung der Glukosehomöostase durch eine Genistein-vermittelte Stimulation der Phosphorylierung der Proteinkinase C (PKC) in einem *in-vitro*-Modell mit Ratten-Hepatozyten nachweisen [70].

Die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen der Effekte von Genistein auf die zelluläre Insulin-Signaltransduktion sind nur unvollständig bekannt. Ein besseres Verständnis könnte einen potentiellen Ansatz zur Prävention und Therapie der Insulinresistenz im Rahmen einer NAFLD identifizieren.

1.3 *In-vitro*-Modelle der Fettleber

Trotz intensiver Forschung auf dem Gebiet der NAFLD und Insulinresistenz besteht bisher nur ein lückenhaftes Wissen über die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen. Zur Erweiterung des Verständnisses der pathophysiologischen Zusammenhänge kommen nicht nur Diät-induzierte und genetisch-modifizierte Tiermodelle, sondern auch *in-vitro*-Zellkulturen zur Anwendung.

Eine breite Verwendung finden immortalisierte Leberkarzinomzellen, wie HepG2, HuH-7 oder HepaRG. Sie sind leicht verfügbar, problemlos unter standardisierten Bedingungen zu kultivieren und zeigen eine kontinuierliche Proliferation sowie einen stabilen Phänotyp. Ein großer Nachteil ist jedoch die durch die Immortalisierungsmethode bedingte Veränderung der Expression von Enzymen und Transkriptionsfaktoren mit einhergehendem Funktionsverlust [71]. Zudem zeigen sich veränderte metabolische Eigenschaften und die Analyse von

inter-individuellen Schwankungen ist durch die Abstammung von nur einem einzigen Donor nicht möglich [72]. Leberkarzinomzellen eignen sich vor allem für *in-vitro*-Studien zur Tumorbio­logie sowie zur gezielten Testung von Arzneimitteln gegen Krebserkrankungen.

In der Wissenschaft besteht ein breiter Konsens darüber, dass im Bereich der *in-vitro*-Zellkulturen ein Modell mit PHH die *in-vivo*-Bedingungen am genauesten abbildet [73]. Limitationen stellen hierbei die begrenzte Verfügbarkeit von humanem Lebergewebe, das aufwändige und kostspielige Isolierungsverfahren zur Zellgewinnung, die eingeschränkte Kultivierungszeit wie auch hohe ethische Anforderungen dar. Ferner erschweren die schnelle Entdifferenzierung der Hepatozyten und die fehlende Proliferation die Kultivierung.

Die erstmalige Etablierung eines *in-vitro*-Fettlebermodells gelang im Jahr 1989 nach der Induktion einer *Steatosis hepatis* in isolierten Rattenhepatozyten durch die Behandlung mit Tetrazyklinen [74]. Die Akkumulation von Lipiden in den Hepatozyten, vor allem bestehend aus Öl- und Palmitinsäure gebunden in Form von Triglyzeriden, ist ein zentrales Charakteristikum der NAFLD und eng assoziiert mit der Insulinresistenz. Durch die gezielte Behandlung mit freien Fettsäuren etablierten sich in den letzten Jahren zahlreiche *in-vitro*-Modelle der NAFLD. Gómez-Lechón *et al.* konnte ein Fettlebermodell an HepG2-Zellen wie auch PHH durch die 24-stündige Inkubation mit Öl- und Palmitinsäure in einem festen Verhältnis von 2:1 etablieren [75]. Darüber hinaus zeigte Ricchi *et al.* an den drei hepatischen Zell-Linien HepG2, HuH-7 und WRL68 eine Korrelation zwischen Lipidakkumulation, Lipotoxizität und Insulinresistenz, wobei die gesättigte Palmitinsäure interessanterweise die größere Toxizität aufwies [76].

Mit wachsendem Wissen über die komplexen Zell-Zell- sowie Zell-Matrix-Interaktionen gewinnen zunehmend dynamische Modelle mit Ko-Kulturen sowie 3D-Technologien, wie beispielsweise Bioreaktoren, an Bedeutung. Diesbezüglich konnte im Jahr 2017 ein dreidimensionales Modell der NAFLD mit PHH, ebenfalls durch Inkubation mit Öl- und Palmitinsäure, etabliert werden [77].

Primäre humane Hepatozyten reproduzieren die funktionellen Leistungen der *in-vivo* Leber am genauesten und sind der Goldstandard, um der Notwendigkeit einer prädiktiven Aussage von *in-vitro*-Modellen der NAFLD Rechnung zu tragen. Gegenwärtig stehen zahlreiche 2D-, Ko-Kultur- und 3D-Modelle zur Verfügung und sollten, nach Abwägung der Vor- und Nachteile, angepasst an die jeweilige wissenschaftliche Fragestellung ausgewählt werden. Obwohl konventionelle 2D-Fettlebermodelle mit PHH immer nur Teilaspekte der komplexen Abläufe im menschlichen Organismus widerspiegeln können, eignen sie sich hervorragend zur Evaluation der Pathophysiologie, und können zur Entwicklung neuer Präventions- und Therapiestrategien für die NAFLD beitragen.

2 Fragestellung und Zielsetzung

Die NAFLD ist eng mit einer hepatischen Insulinresistenz assoziiert und heute bereits die häufigste chronische Lebererkrankung in der westlichen Welt. Neben dem Potential zur Progression über Steatohepatitis (NASH) und Fibrose hin zur Leberzirrhose, besteht am Endpunkt dieser Entwicklung auch die Gefahr der Entstehung eines HCC.

Das in der Sojabohne natürlich vorkommende Isoflavonoid Genistein zeigte in zahlreichen klinischen Studien wie auch *in-vitro*-Analysen nicht nur einen günstigen Einfluss auf die Leberzellverfettung, sondern auch auf die damit verbundene Insulinresistenz.

Hieraus ergibt sich folgende Zielsetzung dieser Arbeit:

- (a) Etablierung eines *in-vitro*-Modells der Fettleber an primären humanen Hepatozyten
- (b) Charakterisierung des Fettlebermodells hinsichtlich metabolischer und toxischer Einflüsse der freien Fettsäuren Öl- und Palmitinsäure
- (c) Nachweis einer *in-vitro*-Insulinresistenz im Fettlebermodell
- (d) Evaluation der Wirkung von Genistein in ausgewählten Konzentrationen auf Metabolismus und Toxizität sowie auf wichtige Zielmoleküle der hepatischen Insulin-Signaltransduktion

Zur Beantwortung der folgenden Fragen:

- (1) Stellt das vorliegende Modell der humanen Fettleber eine verlässliche Reproduktion von *in-vivo*-Verhältnissen einer NAFLD, vor allem bezüglich der Insulinresistenz, dar?
- (2) Hat das Isoflavonoid Genistein einen adversen Effekt auf die hepatische Insulinresistenz im Rahmen einer NAFLD?

3 Experimenteller Ablauf und Methodik

Im Rahmen chirurgischer Leberteilresektionen wurde humanes Lebergewebe für Forschungszwecke zur Verfügung gestellt. Hieraus konnten nach einem standardisierten Verfahren PHH isoliert und kultiviert werden. Zur Induktion einer *Steatosis hepatis* erfolgte eine Inkubation mit der für das Fettlebermodell bereits etablierten Öl- und Palmitinsäure für 24 Stunden im Verhältnis 2:1 und einer Gesamtkonzentration von 1 mM (Abb. 4). Zudem erfolgte eine Inkubation mit oder ohne 100 nM Insulin für 15 Minuten zur Stimulation der Insulin-Signalkaskade. Anschließend wurden die steatotischen und nicht-steatotischen PHH hinsichtlich Lipidgehalt, Zytotoxizität, Membranintegrität und metabolischer Aktivität analysiert. Das Vorliegen einer Insulinresistenz wurde anhand der Insulin-induzierten Phosphorylierung der Proteinkinasen Akt, ERK1/2, FoxO1 und GSK3 α/β sowie der Expression des INSR und des GLUT2 ausgewertet. Zur Bestimmung des Einflusses von GEN erfolgte eine Inkubation in der Konzentrationsreihe von 1, 5, 10, 50 und 100 μM für weitere 24 Stunden sowie die Behandlung mit oder ohne 100 nM Insulin für 15 Minuten.

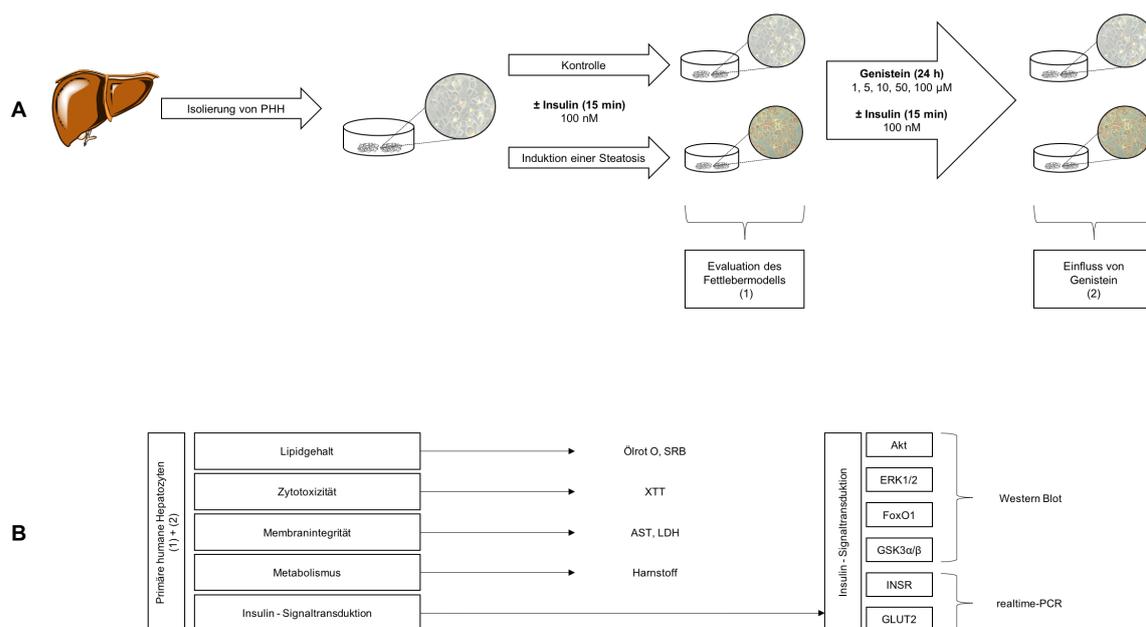


Abb. 4 Experimenteller Ablauf und Methodik. (A) Aus humanem Lebergewebe wurden mittels 2-Phasen-Perfusion PHH isoliert. Nach einer 24-stündigen Inkubation mit FFS konnte das *in-vitro*-Fettlebermodell evaluiert werden. Auf eine weitere 24-stündige Inkubation mit GEN folgte die Messung des Einflusses von GEN. (B) Neben Zellfärbungen (Ölrot O, SRB) kamen enzymatische Assays (AST, LDH, Harnstoff) sowie der XTT-Assay zur Anwendung. Die Analyse des Einflusses auf die Insulin-Signaltransduktion erfolgte mittels Western Blot und realtime-PCR.

4 Material und Methoden

4.1 Geräte

Die Nutzung der Geräte erfolgte entsprechend den Herstellerangaben und wurde bei gegebener Notwendigkeit unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Gerät	Hersteller
Blotting-Kassette	Biorad Mini Trans-Blot [®] , München (D)
Büchner-Trichter	Roth 127 C, Karlsruhe (D)
Dispenser	Eppendorf Multipette [®] , Hamburg (D)
CO ₂ -Inkubator	Binder CB 150, Tuttlingen (D)
Elektronische Pipettierhilfe	Integra Biosciences Pipetboy [®] acu, Fernwald (D)
Elektrophorese-Kammer	Biorad, München (D)
Elektrophorese-Spannungsquelle	Biorad Power [®] Pac 300, München (D)
Glasplatten	Biorad Mini-Protean [®] System, München (D)
Inverses Lichtmikroskop	Zeiss Axiovert 135, Jena (D)
Knopfkanülen	Amefa Sonderanfertigung, Limburg (D)
Lichtmikroskop	Olympus BH-2, Hamburg (D)
Lumineszenz-Detektor	Biorad VersaDoc [®] Modell 4000, München (D)
Mehrkanal-Pipette	Eppendorf Research [®] , Hamburg (D)
Mikroplattenleser	BMG Fluostar Optima, Offenburg (D)
PCR-Cycler StepOne [™] Plus	Applied Biosystems, Foster City (USA)
Peristaltikpumpe	Roth Cyclo I, Karlsruhe (D)
Petrischale	BD Falcon, Franklin Lakes (USA)
pH-Meter	Schott CG840, Mainz (D)
Plattformschüttler	Heidolph Promax 2020, Schwabach (D)
Präzisionswaage	Sartorius AC121S, Göttingen (D)
Silikonschläuche	Roth, Karlsruhe (D)
Spektralphotometer	Peqlab NanoDrop [™] ND-1000, Erlangen (D)
Sterile Arbeitsbank (Bench)	Heraeus Instruments HS 18/2, Hanau (D)
Thermocycler Veriti [™] 96-Well	Applied Biosystems, Foster City (USA)
Tischzentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5417 R, Hamburg (D)
Ultraschallbad	Bandelin Sonorex, Berlin (D)
Umwälzthermostat	Lauda Typ B, Lauda-Königshofen (D)
Vakuum-Absaugsystem	Integra Biosciences Vacusafe comfort, Fernwald (D)
Vortexer	Neolab 7-2020, Heidelberg (D)
Wasserbad	GFL 1013, Burgwedel (D)
Zählkammer (nach Neubauer)	Optik Labor, Friedrichsdorf (D)
Zentrifuge	Heraeus Sepatech Varifuge 3.0R, München (D)

4.2 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden analysenrein und bei gegebener Notwendigkeit unter sterilen Bedingungen verwendet.

Chemikalie	Hersteller
Acrylamid	Roth, Karlsruhe (D)
Aqua destillata	Eigene Reinstwasseranlage
APS	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
BCA	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
BSA	Gibco, Karlsruhe (D)
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck, Darmstadt (D)
cDNA-Synthese-Kit	Fermentas, St. Leon-Rot (D)
Chloroform	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
Collagenase P	Roche, Mannheim (D)
Coumarinsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
DEPC	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
DMSO	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
DNase I-Kit	Fermentas, St. Leon-Rot (D)
EGTA	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
Essigsäure	Merck, Darmstadt(D)
Ethanol	Merck, Darmstadt (D)
FCS	Gibco, Karlsruhe (D)
Fluitest [®] -AST Kit	Analyticon, Lichtenfels (D)
Fluitest [®] -LDH-L Kit	Analyticon, Lichtenfels (D)
Fluitest [®] -UREA Kit	Analyticon, Lichtenfels (D)
Formaldehyd	Herbeta Arzneimittel, Berlin (D)
Fortecortin	Merck, Darmstadt (D)
Genistein	Roth, Karlsruhe (D)
Glutamax	Gibco, Karlsruhe (D)
Glycerol	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
Glycerophosphat	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
Glycin	Serva, Heidelberg (D)
HEPES	Roth, Karlsruhe (D)
Insulin (human)	Sanofi-Aventis, Berlin (D)
Isopropanol	Roth, Karlsruhe (D)
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt (D)
Kollagenase P	Roche, Mannheim (D)
Kupfersulfat	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)

Chemikalie	Hersteller
Luminol	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
Magermilchpulver	Applichem, Darmstadt (D)
MEM-NEAA	Gibco, Karlsruhe (D)
Methanol	JT Baker, Deventer (NL)
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt (D)
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
Natrium-Orthovanadat	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
Ölrot O	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
Ölsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
PageRuler [®]	Thermo Scientific, Rockford (USA)
Palmitinsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
PBS	PAA Laboratories, Pasching (A)
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Karlsruhe (D)
Percoll (Easycoll [®])	Biochrom AG, Berlin (D)
Ponceau S	Merck, Darmstadt (D)
ReBlot [®] Plus Mild	Millipore Corporation, Bedford (USA)
SDS	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
Sodiumpyruvat	Gibco, Karlsruhe (D)
Sulforhodamin B	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
Trypan-Blau	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
TEMED	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
Tris	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
Trizol [™]	Invitrogen, Karlsruhe (D)
Tween 20	Merck, Darmstadt (D)
Wasserstoffperoxid	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
William's Medium E	Gibco, Karlsruhe (D)
XTT-Assay	Roche, Mannheim (D)

4.3 Verbrauchsmaterialien

Die Verbrauchsmaterialien wurden analysenrein und bei gegebener Notwendigkeit unter sterilen Bedingungen verwendet.

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Dispenserspitze (5, 10 ml)	Eppendorf Combitips [®] plus, Hamburg (D)
Einmalskalpell	Feather, Tokyo (J)
Eppendorfgefäß (2 ml)	Eppendorf, Hamburg (D)
Filterpapier	Amersham Biosciences, Buckinghamshire (GB)
Glaspipette (5, 10, 25 ml)	BD Falcon, Franklin Lakes (USA)
Histoacryl-Kleber	B.Braun, Melsungen (D)
Mikrotiterplatte (96-Well)	Applied Biosystems MicroAmp, Foster City (USA)
Nitrozellulose-Membran	Biorad, München (D)
PCR-Platte (96-Well)	Applied Biosystems MicroAmp, Foster City (USA)
PCR-Reaktionsgefäß (0,2 ml)	Applied Biosystems MicroAmp, Foster City (USA)
Petrischale	BD Falcon, Franklin Lakes (USA)
Pipettenspitze	Sarstedt, Nümbrecht (D)
Spitzbodenröhrchen (15, 50 ml)	BD Falcon Tubes, Franklin Lakes (USA)
Zellkulturplatte (6-,12-,96-Well)	BD Falcon, Franklin Lakes (USA)
Zellschaber	TPP, Trasadingen (CH)

4.4 Ansätze, Lösungen und Puffer

Reagenzien für die Hepatozytenisolierung

Die Reagenzien für die Hepatozytenisolierung wurden nach dem Ansatz steril filtriert und für maximal 4 Wochen bei einer Temperatur von 4°C gelagert. CaCl₂·2H₂O, Calciumchlorid-Dihydrat; KCl, Kaliumchlorid; NaCl, Natriumchlorid; * = Adjustierung auf einen pH-Wert von 7,4; ** = Adjustierung auf einen pH-Wert von 7,6.

Reagenz	Additive	Konzentration	Hersteller	
Perf.-lösg. I*	NaCl	142 mM	Merck, Darmstadt (D)	
	KCl	6,7 mM	Merck, Darmstadt (D)	
	HEPES	10 mM	Roth, Karlsruhe (D)	
	Aqua dest.	-	-	
+ EGTA	EGTA	2,5 mM	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)	
Perf.-lösg. II**	NaCl	67 mM	Merck, Darmstadt (D)	
	KCl	6,7 mM	Merck, Darmstadt (D)	
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	6,7 mM	Merck, Darmstadt (D)	
	HEPES	100 mM	Roth, Karlsruhe (D)	
	BSA	0,5% (w/v)	Gibco, Karlsruhe (D)	
	Aqua dest.	-	-	
	+ FCS	FCS	10% (v/v)	Gibco, Karlsruhe (D)
	+ Kollagenase	Kollagenase P	100 mg/100 ml	Roche, Mannheim (D)
	Kulturmedium	WME	-	Gibco, Karlsruhe (D)
		Pen./Strept.	100 IE/100 µg/ml	Merck, Darmstadt (D)
		Fortecortin	1,6 µM	Merck, Darmstadt (D)
		HEPES	15 mM	Roth, Karlsruhe (D)
		Sodium Pyruvat	1 mM	Gibco, Karlsruhe (D)
Human-Insulin		1 mM	Sanofi-Aventis, Berlin (D)	
FCS		10% (v/v)	Gibco, Karlsruhe (D)	
	MEM-NEAA, 100x	1% (v/v)	Gibco, Karlsruhe (D)	

Reagenzien für das FFS-Inkubationsmedium

Additive	Konzentration	Hersteller
WME + Glutamax	-	Gibco, Karlsruhe (D)
Ölsäure	0,66 mM	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
Palmitinsäure	0,33 mM	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
BSA	1% (w/v)	Gibco, Karlsruhe (D)
FCS	5% (v/v)	Gibco, Karlsruhe (D)
Penicillin/Streptomycin	100 IE /100 µg/ml	Gibco, Karlsruhe (D)
HEPES	15 mM	Roth, Karlsruhe (D)
MEM-NEAA, 100x	1% (v/v)	Gibco, Karlsruhe (D)
Sodium Pyruvat	1 mM	Gibco, Karlsruhe (D)

Ansatz für die Ölrot O-Lösung

Additive	Konzentration	Hersteller
Ölrot O	0,4 g	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
Isopropanol	200 ml	Roth, Karlsruhe (D)

Ansatz für die Formaldehyd-Lösung

Additive	Konzentration	Hersteller
Formaldehyd 37%	100 ml	Herbeta Arzneimittel, Berlin (D)
PBS	825 ml	PAA Laboratories, Pasching (A)

Reagenzien für den SRB-Assay

Reagenz	Additive	Konzentration	Hersteller
Fixierungspuffer	Ethanol	95% (v/v)	Merck, Darmstadt (D)
	Essigsäure	5% (v/v)	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
SRB-Lösung	Sulforhodamin B	0,4% (w/v)	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
	Essigsäure	1% (v/v)	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
TRIS-Lösung	TRIS	10 mM	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
	Aqua dest.	-	-

Lysis-Puffer für die Isolierung phosphorylierter Proteine

HCl, Wasserstoffchlorid; NaF, Natriumfluorid; Na₃VO₄, Natrium-Orthovanadat; * = Protease Inhibitor Cocktail complete mini.

Additive	Konzentration	Hersteller
Tris-HCl	50 mM	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
SDS	0,1% (w/v)	Merck, Darmstadt (D)
Triton X-100	0,5% (v/v)	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
NaF	0,5 M	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
Na ₃ VO ₄	100 mM	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
β-Glycerophosphat	1 M	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
PI-Cocktail *	1 Tablette	Roche, Mannheim (D)

BCA-Lösung zur Messung der Proteinkonzentration

CuSO₄, Kupfersulfat; * = BCA, Bicinchoninsäure.

Additive	Volumen	Hersteller
BCA*-Reagenz	1 ml	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
CuSO ₄	20 µl	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)

Probenpuffer

Additive	Konzentration	Hersteller
Aqua dest.	-	-
Tris base	0,4M	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
SDS	10% (w/v)	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
Glycerol	50% (v/v)	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
Bromphenolblau	0,025% (w/v)	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
2-Mercaptoethanol	25% (v/v)	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)

Ansätze für Trenn- und Sammelgel

APS, Ammoniumperoxodisulfat; TEMED, Tetramethylethyldiamin; * = 1, 5 M und Adjustierung auf einen pH-Wert von 8,8; ** = 1 M und Adjustierung auf einen pH-Wert von 6,8.

Additive	Trenngel	Sammelgel	Hersteller
Aqua dest.	4,7 ml	3,4 ml	-
Acrylamid Rotipherese Gel	2,7 ml	0,83 ml	Roth, Karlsruhe (D)
Tris base 1*	2,5 ml	-	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
Tris base 2**	-	0,63 ml	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
SDS 10%	0,1 ml	50 μ l	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
APS	50 μ l	50 μ l	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
TEMED	5 μ l	5 μ l	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)

Ansatz für den 5-fach Running-Buffer

Zum Erhalt eines 1-fachen Ansatzes wurde das gewünschte Volumen in einem Verhältnis von 1:5 mit Aqua dest. verdünnt; Adjustierung auf einen pH-Wert von 8,9.

Additive	Konzentration	Hersteller
Aqua dest.	-	-
Tris base	125 mM	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
Glycin	1,25 M	Serva, Heidelberg (D)
SDS	0,5% (w/v)	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)

Ansatz für Blotting-Buffer

Additive	Konzentration	Hersteller
Aqua dest.	-	-
Tris base	50 mM	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
Glycin	380 mM	Serva, Heidelberg (D)
SDS	0,1% (w/v)	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
Methanol	20% (v/v)	JT Baker, Deventer (NL)

Ansatz von Ponceau S

Additive	Konzentration	Hersteller
Aqua dest.	250 ml	-
Ponceau S	5 g	Merck, Darmstadt (D)
Trichloressigsäure	75 g	Merck, Darmstadt (D)
Sulfosalicylsäure	75 g	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)

Ansatz für Magermilchlösung

Additive	Konzentration	Hersteller
Magermilchpulver	1 g	Applichem, Darmstadt (D)
TBST	20 ml	-

Ansatz von 5-fach TBST

Zur Fertigstellung von 1-fach TBST wurden 200 ml vom 5-fach TBS mit 800 ml Aqua dest. verdünnt und 1 ml Tween 20 hinzugefügt; Adjustierung auf einen pH-Wert von 7,5.

Additive	Konzentration	Hersteller
Aqua dest.	-	-
Tris base	50 mM	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
Natriumchlorid	150 mM	Merck, Darmstadt (D)
Tween 20	0,1% (v/v)	Merck, Darmstadt (D)

Ansatz für die Chemilumineszenz-Lösung

Reagenz	Additive	Konzentration	Hersteller
Lösung I	Tris base 0,1 M	2,5 ml	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
	Wasserstoffperoxid	1,5 μ l	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
Lösung II	Tris base 0,1 M	2,5 ml	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
	Luminol 250 mM	25 μ l	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
	p-Coumarinsäure 90 mM	11 μ l	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)

Antikörper für den Western Blot

Sämtliche Antikörper wurden mit TBST mit 1% (w/v) BSA in einer Konzentration von 1:2000 verdünnt.

Antikörper	Spezies	Hersteller
Phospho-Akt (Ser ⁴⁷³)	Rabbit mAB	Cell Signaling, Danvers (USA)
Phospho-ERK1/2 (Thr ²⁰² /Tyr ²⁰⁴)	Rabbit mAB	Cell Signaling, Danvers (USA)
Phospho-FoxO1 (Ser ²⁵⁶)	Rabbit mAb	Cell Signaling, Danvers (USA)
Phospho-GSK3 α/β (Ser ^{21/9})	Rabbit mAb	Cell Signaling, Danvers (USA)
Phospho-GSK3 α/β (Ser ^{21/9})	Rabbit mAb	Cell Signaling, Danvers (USA)
Anti- α -Tubulin	Mouse IgG mAb	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
Anti-Rabbit POD	IgG Ab	Dianova, Hamburg (D)
Anti-Mouse POD	IgG Ab	Amersham Biosciences, Freiburg (D)

TaqMan™ Gene Expression Assays

Alle Assays wurden von der Firma Applied Biosystems (Foster City, USA) bezogen.

Gen	Bestellnummer
Insulinrezeptor (INSR)	Hs00961554_m1
Glukosetransporter Typ II (GLUT2)	Hs01096908_m1
β -Actin	Hs99999903_m1

Ansatz für quantitative realtime-PCR

Additive	Menge	Hersteller
TaqMan™ Gene Expression Master Mix	5 μ l	Applied Biosystems, Foster City (USA)
TaqMan™ Gene Expression Assay	0,5 μ l	Applied Biosystems, Foster City (USA)
DEPC-Wasser	3,5 μ l	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
cDNA 50 ng	1 μ l	-

4.5 Isolierung primärer humaner Hepatozyten**4.5.1 Humanes Lebergewebe**

Das für die Isolierung von primären Hepatozyten benötigte humane Lebergewebe wurde im Rahmen medizinisch notwendiger Operationen durch die Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie am Campus Virchow Klinikum der Charité-Universitätsmedizin Berlin bei vorliegender Patienten-Einwilligung sowie Genehmigung durch die Ethikkommission (Antrag EA2/076/09 mit Votum vom 23.07.2009) bereitgestellt. Von der Isolierung ausgeschlossen waren Patienten mit Infektionen mit dem Humanen Immundefizienz Virus (HIV), Hepatitis B und C Virus (HBV/HCV) sowie mit Methicillin-resistentem *Staphylococcus aureus* (MRSA). Eine Leberfibrose und -zirrhose sowie eine ausgeprägte Cholestase bildeten weitere Ausschlusskriterien.

Bei chirurgischen Leberteilresektionen aufgrund benigner oder maligner Primär- und Sekundärtumoren der Leber ist zum Erreichen einer R0-Resektion bzw. aufgrund anatomischer Begebenheit ebenso gesundes Lebergewebe entfernt worden. Für die Leberzellisolierung wurde von diesem makroskopisch tumorfreien Lebergewebe ein zwischen 20 und 50 g schwerer Parenchymkeil mit intakter Kapselung entfernt. Der sofortige Transport zum Isolierungslabor erfolgte in 4°C kaltem Inkubationsmedium und sicherte eine Kalt-Ischämiezeit unter 15 Minuten.

4.5.2 Zwei-Phasen-Perfusion

Das Prinzip zur Isolation primärer humaner Hepatozyten basiert auf einer erstmalig im Jahr 1976 von Seglen *et al.* beschriebenen Methode zur Isolierung von Zellen einer Rattenleber mittels zwei-phasiger Kollagenase-Perfusion [78]. In der vorliegenden Arbeit wurde ein modifiziertes Protokoll nach Knobloch *et al.* verwendet [79]. Der schematische Ablauf der beiden Perfusionsphasen ist in Abbildung 5 und der Aufbau der Perfusionsanlage in Abbildung 6A dargestellt.

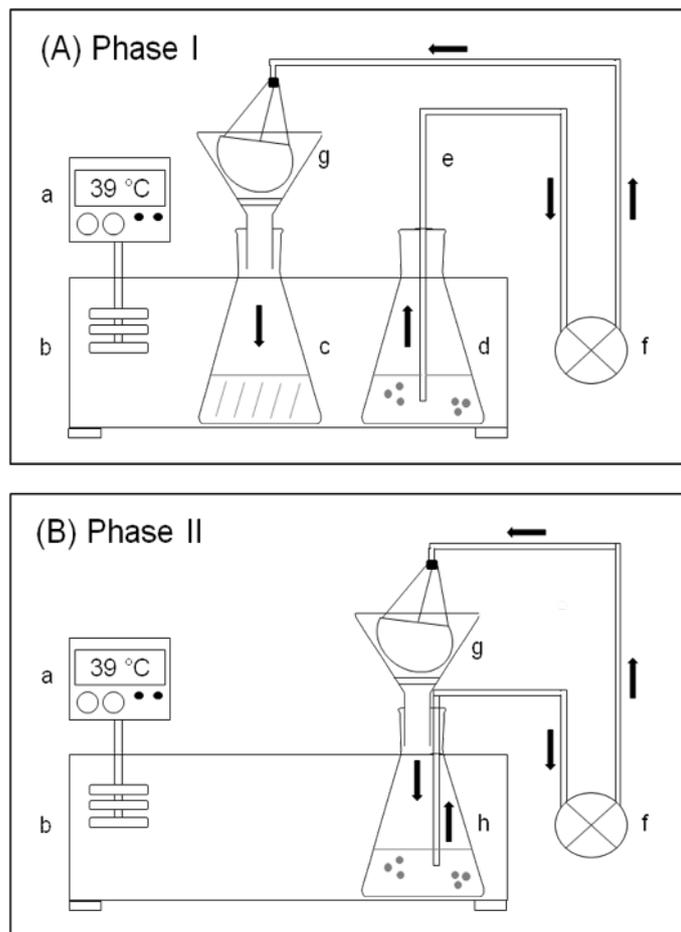


Abb. 5 Schematischer Ablauf der Perfusions-Phasen. (A) Phase I mit zirkulierender und (B) Phase II mit rezirkulierender Gewebepерfusion. (a) Umwälzthermostat, (b) Wasserbad mit einer Temperatur von 39°C, (c) sterile Flasche für Abfall, (d) sterile Flasche mit Perfusionslösung I mit EGTA, (e) sterile Silikonschläuche, (f) Peristaltikpumpe, (g) Büchner-Trichter mit kanüliertem Lebergewebe und (h) sterile Flasche mit Perfusionslösung II und Kollagenase P.

In große Gefäßöffnungen des Lebergewebes wurden 5 bis 7 Knopfkanülen befestigt und die Resektionsfläche mit Histoacryl-Gewebekleber versiegelt (Abb. 6B). Anschließend wurde das Lebergewebe in der ersten Perfusionsphase für 20 Minuten mit 500 ml Perfusionslösung I mit EGTA mit Hilfe der Perfusionsanlage gespült, um eine intravasale Koagulation rückständiger Blutbestandteile zu verhindern und Zell-Zell-Kontakte zu lösen. Die zweite Perfusionsphase

wurde durch eine rezirkulierende Perfusion mit 100 ml Perfusionslösung II mit dem Enzym Kollagenase P (aus *Clostridium histolyticum*) eingeleitet. Die proteolytische Aktivität der Calcium-abhängigen Kollagenase P führte zu einer Desintegration der kollagenen Bindematrix des Lebergewebes und konsekutiver Freisetzung von Leberzellen (Abb. 6C). Durch Zugabe von 4°C kalter Perfusionslösung I mit 10% (v/v) FCS wurde die Proteolyse gestoppt und vitale Hepatozyten mittels Zellschaber herausgelöst. Die erhaltene Zellsuspension konnte über eine sterile Kompressen filtriert und in Spitzbodenröhrchen überführt werden. Eine Zentrifugation bei 50 x g für 5 Minuten und 4°C trennte die Zellen von der Kollagenase-Lösung und separierte die Parenchymzellen (vor allem PHH) von den nicht-parenchymatösen Zellen. Das Zellpellet wurde dann in Inkubationsmedium resuspendiert und bei 4°C auf Eis gelagert.

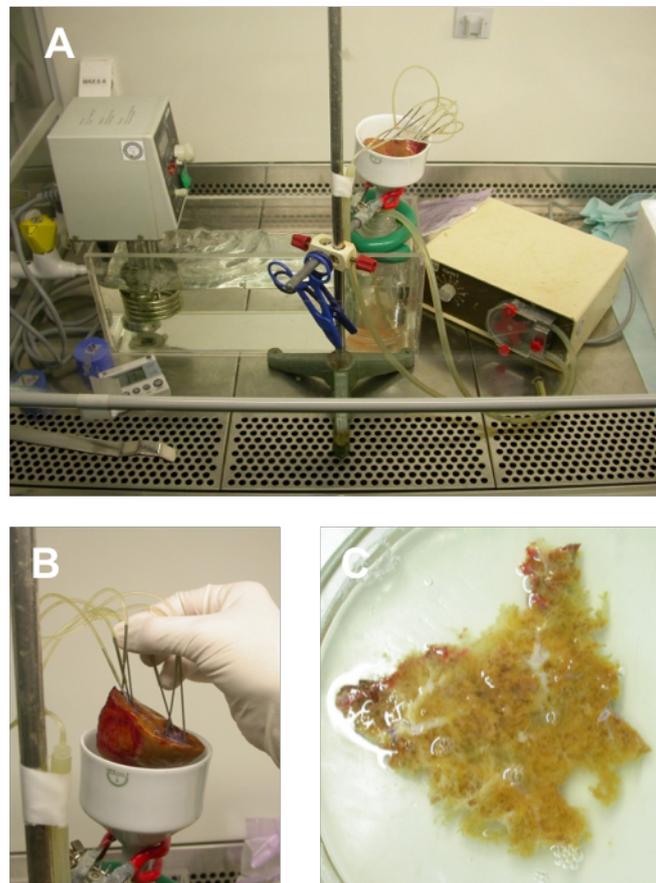


Abb. 6 Zwei-Phasen-Perfusion von humanem Lebergewebe. (A) Aufbau der Perfusionsanlage. (B) Kanüliertes Lebergewebe mit versiegelter Resektionsfläche. (C) Lebergewebe nach Kollagenase-Verdau und Freisetzung vitaler Hepatozyten.

Anschließend erfolgte die Bestimmung von Zellzahl und Viabilität. Dazu wurden 100 μ l der Zellsuspension im Verhältnis 1:10 mit Trypanblau gefärbt. Der saure Farbstoff durchdringt dabei die defekte Zellmembran toter Zellen und färbt diese durch Bindung an zytosolische Proteine.

Die Zählung der Zellen erfolgte lichtmikroskopisch mittels Neubauer-Zählkammer und anschließender Berechnung der Parameter wie folgt:

Zellzahl = gezählte Zellen x 10^4 x 10 x ml Zellsuspension

Viabilität [%] = (Zahl vitaler Zellen x 100) / Gesamtzellzahl

Eine Viabilität unter 75% wurde durch eine zusätzliche Dichtegradientenzentrifugation mit Percoll verbessert. Die Trennlösung Percoll ist ein Silikat-Kolloid mit Polyvinylpyrrolidon-Beschichtung. Dazu wurden jeweils 5 ml der Zellsuspension auf 20 ml einer 25%igen Percoll-Lösung (5 ml Percoll auf 15 ml PBS) pipettiert und bei 1278 x g für 20 Minuten ohne Bremse bei 4°C zentrifugiert. Aufgrund unterschiedlicher Dichten erfolgt eine Trennung der Zellen, wobei tote Zellen und Detritus in der oberen und vitale Zellen als Pellet in der unteren Schicht zu finden sind. Nach Absaugen der toten Zellen wurde das Zellpellet in PBS resuspendiert und bei 50 x g für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. In Inkubationsmedium resuspendiert konnte eine erneute Bestimmung der Zellzahl und Viabilität erfolgen.

4.6 2D-Zellkultur

4.6.1 Beschichtung der Zellkulturplatten und Zellaussaat

Für eine ausreichende Adhärenz der PHH auf den Zellkulturplatten wurden diese vor der Zellaussaat mit 1%iger Kollagen-Lösung (1 ml Rattenschwanz-Kollagen auf 100 ml PBS) für 30 Minuten bei Raumtemperatur beschichtet. Um eine Zelldichte von etwa 100.000 Zellen pro cm^2 zu erreichen, wurden die PHH nach folgendem Schema ausgesät:

12-Well-Zellkulturplatte jeweils 400.000 PHH pro Well

96-Well-Zellkulturplatte jeweils 33.300 PHH pro Well

Die Inkubation der PHH erfolgte in einer H_2O -gesättigten Atmosphäre mit 5% CO_2 und einer Temperatur von 37°C .

4.6.2 Induktion einer *Steatosis hepatis*

Nach der Isolation und Aussaat auf Zellkulturplatten wurden die PHH zunächst für 24 Stunden mit Kulturmedium inkubiert. Die *in-vitro*-Induktion der *Steatosis hepatis* erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Gómez-Lechón *et al.* durch eine Exposition mit den freien Fettsäuren Öl- und Palmitinsäure in einem Verhältnis von 2:1 und einer Gesamtkonzentration von 1 mM im FFS-Inkubationsmedium für weitere 24 Stunden [75]. Die Hepatozyten der Kontrollgruppe wurden mit Inkubationsmedium ohne Zusatz von FFS für den gleichen Zeitraum behandelt.

4.6.3 Substanzinkubation mit Genistein und Insulin

Die PHH wurden in der Kontroll- und Steatosis-Gruppe für 24 Stunden mit einer aufsteigenden Konzentrationsreihe von 0, 1, 5, 10, 50, 100 μM Genistein behandelt. Dazu wurde eine Stammlösung von 120 mM Genistein in DMSO hergestellt und lichtgeschützt bei -20°C aufbewahrt. Nach Vorbereitung einer DMSO-Konzentrationsreihe und einer Verdünnung von 1:200 im Kulturmedium, ergab sich eine finale DMSO-Konzentration von 0,05% (v/v). Zudem erfolgte eine Behandlung mit oder ohne Insulin in einer Konzentration von 100 nM für 15 Minuten.

4.7 *In-vitro*-Analytik

4.7.1 Ölrot O-Färbung

Ölrot O ist ein lipophiler Farbstoff zur Färbung intrazellulärer Neutralfette. Der Färbemechanismus beruht auf der besseren Löslichkeit von Ölrot O in Lipiden gegenüber dem Lösungsmittel. Zunächst wurden die PHH mit 4°C kaltem PBS zweimalig gewaschen und in 4%iger (v/v) Formaldehydlösung für 30 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen mit 0,2%iger (w/v) Ölrot O-Lösung für 15 Minuten auf dem Schüttler. Nicht gebundener Farbstoff konnte durch zweimaliges Waschen mit Aqua dest. entfernt und die Zellen für 20 Minuten luftgetrocknet werden. Abschließend wurde der Farbstoff durch Inkubation mit Isopropanol für 20 Minuten auf dem Schüttler wieder aus den Zellen herausgelöst und die Optische Dichte (OD) konnte bei einer Wellenlänge von $\lambda = 500$ nm spektralphotometrisch bestimmt werden. Die OD ist proportional zum Lipidgehalt der Hepatozyten.

4.7.2 Sulforhodamin B (SRB)-Assay

Der SRB-Assay wird zur Bestimmung der Proteinmenge und für Analysen zur Toxizität und Zellproliferation eingesetzt. Der Farbstoff Sulforhodamin B (SRB) bindet elektrostatisch unter sauren Bedingungen an Aminosäurereste von Oberflächenproteinen. Unter basischen Bedingungen kann die Bindung wieder gelöst werden und die Absorption des herausgelösten Farbstoffs mit dem Spektralphotometer gemessen werden. Hierfür wurden die in 12-Well-Zellkulturplatten kultivierten PHH mit 4°C kaltem Fixierungspuffer für 30 Minuten bei -20°C fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit Aqua dest. erfolgte die lichtgeschützte Inkubation mit 0,4%iger (w/v) SRB-Lösung für 30 Minuten auf dem Schüttler bei Raumtemperatur. Nicht gebundenes SRB wurde durch viermaliges Waschen mit 1%iger (v/v) Essigsäure-Lösung entfernt. Abschließend wurde das gebundene SRB durch eine lichtgeschützte Inkubation mit 10 mM TRIS-Lösung für 10 Minuten auf dem Schüttler wieder herausgelöst und die OD konnte bei einer Wellenlänge von $\lambda = 565$ nm photometrisch gemessen werden. Die OD ist proportional zur Proteinmenge.

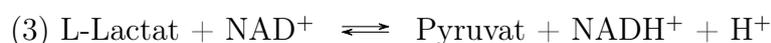
4.7.3 AST- und LDH-Assay

Das in allen Geweben vorkommende Enzym Aspartat-Aminotransferase (AST) ist zellulär sowohl im Zytoplasma als auch in den Mitochondrien lokalisiert, wobei die ebenfalls ubiquitäre Lactatdehydrogenase (LDH) im Zytoplasma vorkommt. Eine Erhöhung der AST- und LDH-Aktivität im Überstand des Kulturmediums zeigt eine Desintegration von Zellmembranen mit konsekutivem Austritt von intrazellulären Bestandteilen an und kann somit als ein Surrogatparameter für eine Zellschädigung genutzt werden. Die AST gehört zur Gruppe der Transaminasen und katalysiert durch den Transfer von Aminogruppen die Umwandlung

von Aminosäuren zu den entsprechenden α -Ketosäuren und umgekehrt. Die Bestimmung von AST im Kulturmedium-Überstand erfolgte indirekt mittels photometrischer Messung der Absorptionsänderung bei der Oxidation von NADH/H^+ zu NAD^+ während einer gekoppelten Indikatorreaktion mit dem Fluitest[®]-AST Kit. In einer ersten von der AST katalysierten Gleichgewichtsreaktion (1) wird Oxalacetat gebildet, welches als Substrat für die mit der Malatdehydrogenase gekoppelten Indikatorreaktion (2) dient. Die hierbei entstehende Absorptionsänderung, bedingt durch die Oxidation von NADH/H^+ zu NAD^+ , wird spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda = 340$ nm gemessen und ist direkt proportional zur enzymatischen Aktivität der AST.

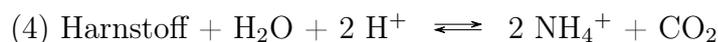


Die LDH katalysiert die Oxidation von Lactat zu Pyruvat mit der gleichzeitigen Reduktion von NAD^+ zu NADH/H^+ sowie die entsprechende Rückreaktion (3). Die Bestimmung der LDH-Aktivität im Überstand des Kulturmediums wurde mit dem Fluitest[®]-LDH-L Kit durchgeführt. Die Geschwindigkeit der NADH/H^+ -Bildung ist dabei direkt proportional zur LDH-Aktivität und kann mittels spektralphotometrischer Messung der Absorptionsänderung ebenfalls bei einer Wellenlänge von $\lambda = 340$ nm gemessen werden.



4.7.4 Harnstoff-Assay

Das Kohlendäureamid Harnstoff (*Urea*) ist ein Endprodukt des Aminosäurestoffwechsels und wird in der Leber im Rahmen des Harnstoffzyklus gebildet. Harnstoff kann als Surrogatparameter für die metabolische Aktivität von *in-vitro* kultivierten Hepatozyten genutzt werden. Die Messung erfolgte durch eine Indikatorreaktion mit dem Fluitest[®]-UREA Kit. In einer ersten Reaktion hydrolysiert das Enzym Urease den Harnstoff zu Ammoniak und Kohlenstoffdioxid (4). Der dabei entstandene Ammoniak reagiert in einer zweiten Indikatorreaktion mit 2-Ketoglutarat und NADH in Gegenwart der Glutamatdehydrogenase (GLDH) zu Glutamat und NAD^+ (5).



Die Absorptionsänderung durch Verringerung der NADH -Konzentration kann bei einer Wellenlänge von $\lambda = 340$ nm gemessen werden und ist proportional zur Harnstoffkonzentration.

4.7.5 XTT-Assay

Der XTT-Assay findet zur Messung von Zellviabilität und -proliferation eine breite Anwendung. Das Testprinzip des Assays beruht auf der Metabolisierung des gelben Tetrazoliumsalzes XTT (Natrium-3'-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium-bis-(4-methoxy-6-nitro)-benzen-Schwefelsäurehydrat) zum orangen Farbstoff Formazan durch mitochondriale Dehydrogenasen stoffwechselaktiver Zellen. Die Absorption des wasserlöslichen Formazan-Produktes kann mittels Spektralphotometer gemessen werden und ist direkt proportional zur Anzahl viabler Zellen.

Für den XTT-Assay wurden PHH in 96-Well-Zellkulturplatten ausgesät und analog zum experimentellen Ablauf (siehe Abb. 4) mit FFS und GEN behandelt. Die XTT-Mischlösung wurde durch die Zugabe von 1 μl Elektronen-Koppelungsreagenz zu 50 μl Markierungsreagenz zunächst frisch vorbereitet. Zur Durchführung des XTT-Assays wurden die PHH dann für 24 Stunden mit 50 μl XTT-Mischlösung inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der Formazan-Absorption mit dem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von $\lambda = 492$ nm und einer Referenzwellenlänge von $\lambda = 690$ nm.

4.8 Protein-Analytik

4.8.1 Proteinisolierung

Zur Extraktion phosphorylierter Proteine aus dem Zytoplasma primärer humaner Hepatozyten wurden die Zellen zweimalig mit 4°C kaltem PBS gewaschen. Der Aufschluss der Zellmembranen erfolgte durch Inkubation mit 100 μl Lysis-Puffer für mindestens 2 h bei -80°C. Anschließend wurden die Lysate bei 12.000 rpm für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde verworfen und der Überstand bei -80°C gelagert.

4.8.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die quantitative Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Bicinchoninsäure (BCA)-Methode [80]. In alkalischer Lösung kommt es zur Komplexbildung von Protein mit Cu^{2+} -Ionen (Biuret-Reaktion), welche dadurch zu Cu^+ -Ionen reduziert werden. In einer zweiten Reaktion bilden zwei BCA-Moleküle mit einem Cu^+ -Ion einen violetten Chelatkomplex. Dieser kann bei einem Absorptionsmaximum von $\lambda = 562$ nm spektralphotometrisch gemessen werden und ist proportional zur Proteinkonzentration.

Zur Durchführung wurden 4 μl des isolierten Proteins im Verhältnis 1:10 mit Aqua dest. verdünnt und jeweils 20 μl als Doppelbestimmung in eine 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Nach Zugabe von 300 μl BCA-Lösung erfolgte eine Inkubation von 30 Minuten bei 37°C. Anschließend konnte die Absorption des entstandenen Farbstoffes mit dem Spektralphotometer detektiert werden. Eine mitgeführte Albumin-Standardkonzentrationsreihe ermöglichte die Umrechnung der Proteinkonzentration in $\mu\text{g}/\text{ml}$.

4.8.3 SDS-Page und Western Blot

Es wurden jeweils 30 μg Gesamtprotein einer Probe in ein Eppendorf-Gefäß überführt und mit Aqua dest. auf ein Volumen von 20 μl aufgefüllt. Nach Zugabe von 5 μl Probenpuffer wurden die Aliquots für 5 Minuten bei 100°C denaturiert und konnten nach kurzer Zentrifugation mit 10.000 rpm bei -20°C aufbewahrt werden.

Die Auftrennung des zellulären Gesamtproteins der primären humanen Hepatozyten erfolgte mittels Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli *et al.* [81]. Dazu wurde zunächst ein aus Trenn- und Sammelgel bestehendes Gel mit einer Konzentration von 8% Acrylamid hergestellt. Die Ansätze für beide Gelschichten wurden getrennt voneinander vorbereitet. Die Konzentration von Acrylamid und der pH-Wert des Puffers Tris base bestimmt die Trenneigenschaften des jeweiligen Gels. Der Trenngel-Ansatz wurde zügig zwischen zwei abgedichtete Glasplatten mit dazwischenliegendem Abstandhalter (Abstand: 1,5 mm) luftblasenfrei eingegossen und sofort mit Aqua dest. überschichtet. Nach einem Zeitraum von 45 Minuten war das Trenngel auspolymerisiert und das Aqua dest. konnte abgesaugt werden. Danach wurde das Sammelgel etwa 1 cm hoch über das Trenngel pipettiert und 30 Minuten polymerisiert. Die fertige SDS-Page wurde in die mit Running-Buffer gefüllte Elektrophoresekammer eingespannt und mit den vorbereiteten Proben und dem Proteinstandard PageRuler[®] beladen. An die Elektrophoresekammer wurde anschließend für 30 Minuten eine Spannung von 60 Volt und für weitere 90 Minuten die doppelte Spannung von 120 Volt angelegt, bis die Bande des Proteinstandards den Unterrand des Gels erreicht hatte.

Beim Western Blot wird das zelluläre Gesamtprotein entsprechend der Molekulargröße gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen [82]. Anschließend können spezifische Proteine durch Antikörperreaktionen detektiert und mittels Densitometrie quantitativ erfasst werden. Hierzu wurde in folgender Reihenfolge die Blotting-Kassette bestückt: Das Gel wurde auf eine Nitrozellulose-Membran gelegt und von beiden Seiten mit jeweils einem Filterpapier und einem Schwamm begrenzt. Dann wurde die Blotting-Kassette mit Blotting-Buffer befüllt. Nach Zugabe eines Kühlblocks und eines Magnetrührstäbchens wurde für 60 Minuten eine Stromstärke von 340 mA angelegt. Zur Überprüfung eines adäquaten Proteintransfers auf die Nitrozellulose-Membran erfolgte eine Färbung der Membran für 5 Minuten mit Ponceau S. Dabei bindet der rote Azofarbstoff reversibel an die positiv geladenen Aminogruppen der Proteine. Nach Markierung der Banden des Proteinstandards wurde die Membran zweimalig mit Aqua dest. zum vollständigen Entfärben gewaschen. Alle folgenden Inkubationsschritte wurden auf einem Plattformschüttler durchgeführt. Es erfolgte das sogenannte „Blocking“. Hierbei werden freie Proteinbindungsstellen auf der Membran blockiert, um eine unspezifische Bindung des Antikörpers zu verhindern. Das Blockieren der Bindungsstellen erfolgte mit einem für den Antikörper nicht erkennbaren Protein. Hierfür wurde die Nitrozellulose-Membran für 60 Minuten bei Raumtemperatur mit

einer 5%igen Magermilchlösung inkubiert und danach einmalig mit TBST gewaschen. Bei der folgenden Immundetektion wurden Proteinbanden auf der Membran mittels spezifischer Primärantikörper identifiziert und mit Hilfe eines Enzym-gekoppelten Sekundärantikörpers in einer Chemilumineszenzreaktion sichtbar gemacht. Die Nitrozellulose-Membran wurde über Nacht bei einer Temperatur von 4°C mit dem Primärantikörper inkubiert. Anschließend wurden fünf Waschschrte mit TBST für jeweils 5 Minuten durchgeführt. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper für 60 Minuten bei Raumtemperatur. Nach drei weiteren Waschschrten mit TBST erfolgte die Detektion der mit den Antikörpern markierten Proteine durch Hinzugabe der beiden Chemilumineszenz-Lösungen. Die abschließende Detektion erfolgte mittels Lumineszenz-Detektor.

4.8.4 Wiederverwendung der Nitrozellulose-Membran (Stripping)

Zur erneuten Immundetektion eines weiteren Proteins wurden die auf der Nitrozellulose-Membran bereits gebundenen Antikörper durch das sogenannte „Stripping“-Verfahren wieder entfernt. Hierfür wurde die Membran zunächst viermalig für 5 Minuten in TBST gewaschen und anschließend für 15 Minuten auf dem Plattformschüttler bei Raumtemperatur mit dem Stripping-Puffer ReBlot® Plus Mild inkubiert. Nach zweimaligem Waschen für 5 Minuten mit Blocking-Buffer konnte eine erneute Immundetektion durchgeführt werden.

4.9 RNA-Analytik

4.9.1 RNA-Isolierung

Die Isolierung der RNA aus den humanen Hepatozyten erfolgte mittels Phenol/Chloroform-Extraktion nach Chomczynski und Sacchi unter Anwendung von Trizol™ [83].

Die Reagenz Trizol™ enthält Guanidiniumthiocyanat, welches Zellmembranen lysiert und RNAsen inaktiviert. Das zudem enthaltene Phenol ermöglicht die Solubilisierung von RNA und Proteinen. Zur Isolierung der RNA aus den in 12-Well-Zellkulturplatten kultivierten PHH wurde zunächst das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurde jeweils 200 μl Trizol™ für 10 Minuten bei Raumtemperatur in jede Vertiefung gegeben, die Zellen dann mit einem Zellschaber herausgelöst und die Suspension in ein Eppendorf-Gefäß überführt.

Die RNA-Isolation erfolgte entsprechend dem Hersteller-Protokoll der Firma Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland). Nach einer abschließenden Resuspension des RNA-Pellets in 50 μl DEPC-Wasser wurden nicht unmittelbar weiter verarbeitete Aliquots im Kühlschrank bei -80°C für maximal 2 Wochen gelagert. Die Konzentration und der Reinheitsgrad der isolierten Gesamt-RNA konnte spektralphotometrisch mittels NanoDrop™ ND-1000 ermittelt werden. Hierfür wurden jeweils 1,5 μl der isolierten RNA-Proben aufgetragen. Bei einer Wellenlänge von 260 nm erfolgte die Bestimmung der Konzentration in $\text{ng}/\mu\text{l}$ mit Hilfe des Beer'schen Gesetz. Der Quotient der Absorptionen bei 260 und 280 nm ($A_{260/280}$ -Ratio) gibt Aufschluss auf die Reinheit der RNA. Proben mit einem ermittelten Quotienten zwischen 1,8 und 2,0 wurden direkt weiterverwendet. Bei einem niedrigeren Quotienten erfolgte eine Aufreinigung der RNA mittels DNase. Hierfür wurde das DNase I-Kit mit dem entsprechenden Hersteller-Protokoll verwendet.

4.9.2 Reverse Transkription der RNA

Die Reverse Transkription ist eine Methode zur Umschreibung von mRNA in cDNA. Hierfür wurde das cDNA-Synthese-Kit mit dem entsprechenden Hersteller-Protokoll verwendet. Umgeschrieben wurden jeweils 1 μg mRNA des jeweiligen Aliquots. Dazu wurde die jeweilige Probe mit 1 μl Oligo(dT)₁₈-Primer und dem entsprechenden Volumen an DEPC-Wasser in einem PCR-Reaktionsgefäß gemischt und im Thermo-Cycler für 5 min auf 65°C erhitzt. Anschließend wurden die übrigen Additive (4 μl 5X Reaction Buffer; 1 μl RiboLock RNase-Inhibitor (20 U/ μl); 2 μl dNTP-Mix (10 mM); 1 μl RevertAid RT (200 U/ μl)) gemäß dem Hersteller-Protokoll hinzugefügt und für 60 min bei 37°C sowie für 5 min bei 70°C inkubiert. Die Lagerung der Proben erfolgte für maximal 2 Wochen bei -80°C .

4.9.3 Quantitative realtime-PCR

Die quantitative realtime-PCR ist ein auf dem Prinzip der konventionellen Polymerase-Kettenreaktion (engl., polymerase chain reaction) beruhendes Verfahren zur Amplifikation von Nukleinsäuren mit der zusätzlichen Möglichkeit einer direkten Quantifizierung [84]. Bei der PCR wird ein durch zwei Oligonukleotid-Primer flankierter, spezifischer DNA-Bereich mit Hilfe einer hitzestabilen DNA-Polymerase enzymatisch vervielfältigt. Die Methodik beruht auf einer automatisierten Wiederholung des Zyklus von thermischer DNA-Denaturierung (engl., melting), Primerhybridisierung (engl., primer annealing) und Elongation (engl., primer-extending) zur DNA-Synthese.

In dieser Arbeit kamen TaqMan™ Gene Expression Assays zur Anwendung. Die Primersonde ist hierbei mit dem Fluoreszenzmarker FAM und einem das Signal supprimierenden Quencher versehen. Der Quencher wird während der Synthese durch die Polymerase entfernt, wodurch ein Fluoreszenzsignal generiert wird. Dieses Signal wird am Ende jeden Durchgangs gemessen und nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Anhand des Fluoreszenzsignals erfolgte dann die Quantifizierung der synthetisierten DNA-Komplementärstränge in der exponentiellen Phase der Amplifikation.

Für jedes Ziel-Gen wurde ein entsprechender Ansatz mit 50 ng Proben-cDNA als Duplikat in eine 96-Well PCR-Platte pipettiert. Als Negativkontrolle diente eine äquivalente Menge DEPC-Wasser anstelle der Proben-cDNA. Die PCR erfolgte im StepOne™ Plus Real-Time PCR-System nach folgendem Protokoll: Aktivierung bei 50°C für eine Minute, Heizstart bei 95°C für 10 Minuten und anschließend 40 Zyklen Denaturierung bei 95°C für 15 Sekunden und Annealing bei 60°C für 60 Sekunden. Die relative Quantifizierung der mRNA erfolgte nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode [85], wobei die Differenz der C_T -Werte von Duplikaten nicht größer als 0,5 sein durfte. Als endogenes Referenzgen diente β -Actin.

4.10 Statistische Auswertung

Die statistische wie auch die graphische Auswertung der Daten erfolgte mit GraphPad Prism® 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Für die densitometrische Analyse der Western Blot-Daten wurde die Software Quantity One® 4.2.1 (Bio-Rad, München, Deutschland) genutzt. Die grafische Darstellung von Signalwegen erfolgte mittels ChemBioDraw 13.0 (CambridgeSoftware, Waltham, USA). Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung von mindestens drei voneinander unabhängigen Proben dargestellt. Zur Überprüfung auf Signifikanz kamen der Mann-Whitney-U-Test (AST, LDH, Harnstoff) und der Wilcoxon-Test (Lipidgehalt, XTT, Proteinphosphorylierung, GLUT2, INSR) zur Anwendung. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

5 Ergebnisse

5.1 Spendercharakteristika

Das für die Isolierung von primären humanen Hepatozyten notwendige Lebergewebe wurde im Rahmen von Leberteileresektionen von insgesamt 12 verschiedenen Spendern gewonnen. Die Indikation für die chirurgische Resektion war in 5 Fällen eine kolorektale Lebermetastase, in 2 Fällen ein cholangiozelluläres Karzinom (CCC) sowie in jeweils einem Fall ein Hepatoblastom, ein hepatozelluläres Karzinom (HCC), ein Hämangiom, eine Leberzyste sowie ein Rhabdomyosarkom.

Der Median der Spender lag bei 53 ± 24 Jahren. Das Alter lag in einem Bereich zwischen 2 und 77 Jahren. Die Geschlechterverteilung der Spender war 58% männlich und 42% weiblich. Die zur Abschätzung der Qualität der Hepatozytenisolierungen wichtigen Spendercharakteristika Adipositas ($\text{BMI} > 30 \text{ kg/m}^2$), Diabetes mellitus, neoadjuvante Chemotherapie sowie der histopathologische Nachweis einer *Steatosis hepatis* sind in Tabelle 1 dargestellt. Zudem wurde die intraoperative Durchführung des sogenannten Pringle-Manövers, einer temporären Unterbindung (< 60 Minuten) der arteriellen und portalvenösen Blutzufuhr zur Leber, mit aufgeführt.

Tabelle 1 Spendercharakteristika. Adipos., Adipositas; CCC, cholangiozelluläres Karzinom; CRC-LM, kolorektale Lebermetastase; Cx, Chemotherapie; D.m., Diabetes mellitus; Geschl., Geschlecht; HCC, hepatozelluläres Karzinom; PM, Pringle-Manöver; Steat., *Steatosis hepatis*.

Iso	Diagnose	Alter	Geschl.	Adipos.	D.m.	Cx	Steat.	PM
1	Hämangiom	43	m	nein	nein	nein	nein	nein
2	CRC-LM	50	m	nein	nein	ja	nein	ja
3	Rhabdomyosarkom	13	m	nein	nein	ja	ja	ja
4	CRC-LM	67	w	nein	nein	ja	nein	nein
5	CCC	77	m	ja	ja	nein	ja	ja
6	HCC	76	w	nein	nein	nein	nein	nein
7	CCC	69	w	ja	ja	ja	ja	ja
8	CRC-LM	43	w	ja	ja	ja	nein	nein
9	Leberzyste	66	w	nein	nein	nein	nein	ja
10	CRC-LM	67	m	ja	nein	nein	nein	nein
11	CRC-LM	62	m	ja	ja	ja	ja	nein
12	Hepatoblastom	2	m	nein	nein	ja	nein	ja

5.2 Charakterisierung des *in-vitro*-Fettlebermodells

5.2.1 Evaluation des Lipidgehaltes

Die *Steatosis hepatis* ist histologisch gekennzeichnet durch eine gesteigerte intrazelluläre Einlagerung von Fettvakuolen in den Hepatozyten. Zur Etablierung eines *in-vitro*-Modells der Fettleber wurden primäre humane Hepatozyten für 24 Stunden mit den freien Fettsäuren Öl- und Palmitinsäure im Verhältnis 2:1 und einer Gesamtkonzentration von 1 mM inkubiert. Die Evaluation der Lipid-Akkumulation erfolgte zunächst lichtmikroskopisch durch Färbung mit Ölrot O (Abb. 7). Hierbei zeigten die mit FFS behandelten PHH eine deutliche Zunahme zytoplasmatischer Fettvakuolen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

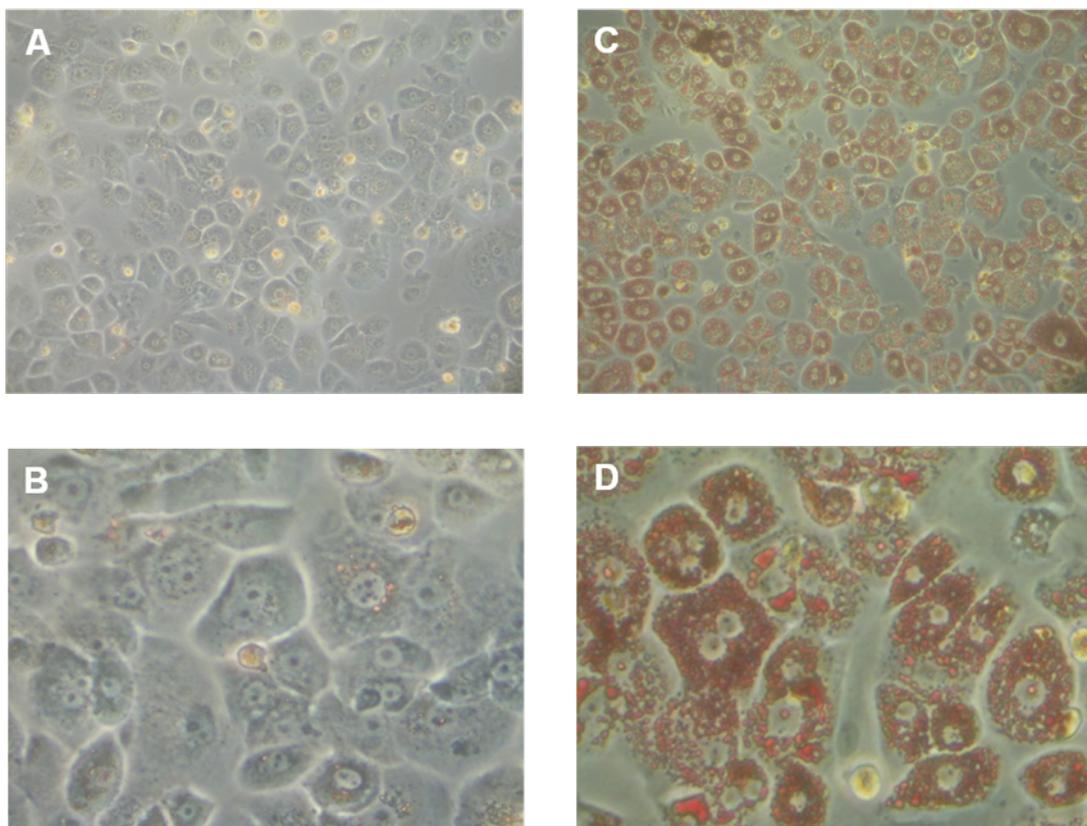


Abb. 7 Lichtmikroskopische Aufnahmen nach Ölrot O-Färbung. Unbehandelte (A, B) und für 24 Stunden mit freien Fettsäuren behandelte primäre humane Hepatozyten (C, D). Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen von 5 voneinander unabhängigen Hepatozytenisolierungen mit jeweiliger Färbung von Triplikaten. A, C - 200× Vergrößerung; B, D - 400× Vergrößerung.

Zur quantitativen Auswertung der Lipid-Akkumulation wurde das gebundene Ölrot O wieder aus den Hepatozyten herausgelöst und die Absorption kolorimetrisch bestimmt. Eine Normierung der gemessenen Werte erfolgte auf den Proteingehalt. Dieser wurde durch Färbung mit Sulforhodamin B (SRB) und Messung der Absorption nach Lösung des Farbstoffes ermittelt (hier nicht dargestellt). Die Auswertung des jeweiligen Absorptionsquotienten Ölrot O/SRB bei 12 voneinander unabhängigen Hepatozytenisolierungen ergab einen um das

2,86-fache, signifikant gesteigerten Lipid-Gehalt in der Steatosisgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe: Kontrolle $1,0 \pm 0,13$ relative Absorption versus Steatosis $2,93 \pm 0,99$ relative Absorption (Abb. 8).

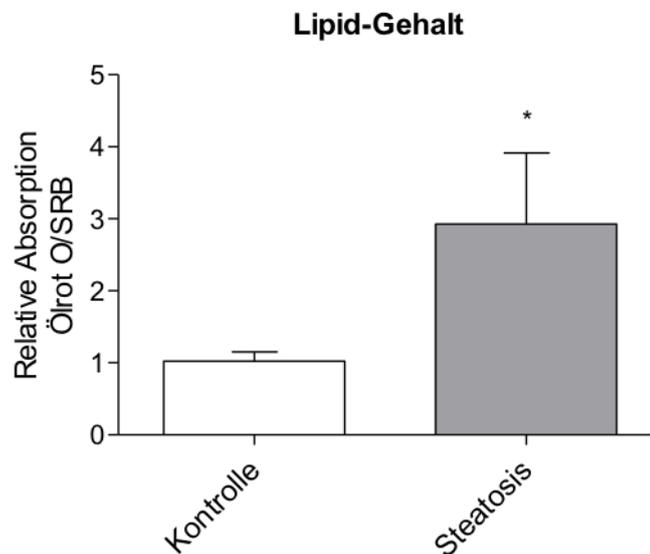


Abb. 8 Lipid-Gehalt der Kontroll- und Steatosisgruppe. PHH wurden für 24 h mit Öl- und Palmitinsäure inkubiert. Anschließend erfolgten Zellfärbungen mit Ölrot O und SRB. Die jeweilige Absorption des herausgelösten Farbstoffes wurde kolorimetrisch bestimmt. Eine Normierung erfolgte auf den Proteingehalt, gemessen durch den SRB-Assay. Daten sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung (N = 12; n = 6). * $p < 0,05$ in Relation zur Kontrolle.

5.2.2 Zytotoxizität von freien Fettsäuren

Die Messung der Freisetzung der intrazellulären Enzyme AST und LDH ist ein Surrogatparameter für die Integrität der Zellmembran.

Die Aktivität der AST im Überstand des Kulturmediums war in der für 24 Stunden mit FFS behandelten Steatosisgruppe um 1,59-fach signifikant erhöht: Kontrolle $47,28 \pm 11,40$ U/l versus Steatosis $75,34 \pm 24,02$ U/l (Abb. 9). Auch die Enzymaktivität der LDH zeigte sich in der Steatosisgruppe um 1,47-fach signifikant erhöht: Kontrolle $43,21 \pm 17,44$ U/l versus Steatosis $63,47 \pm 33,23$ U/l.

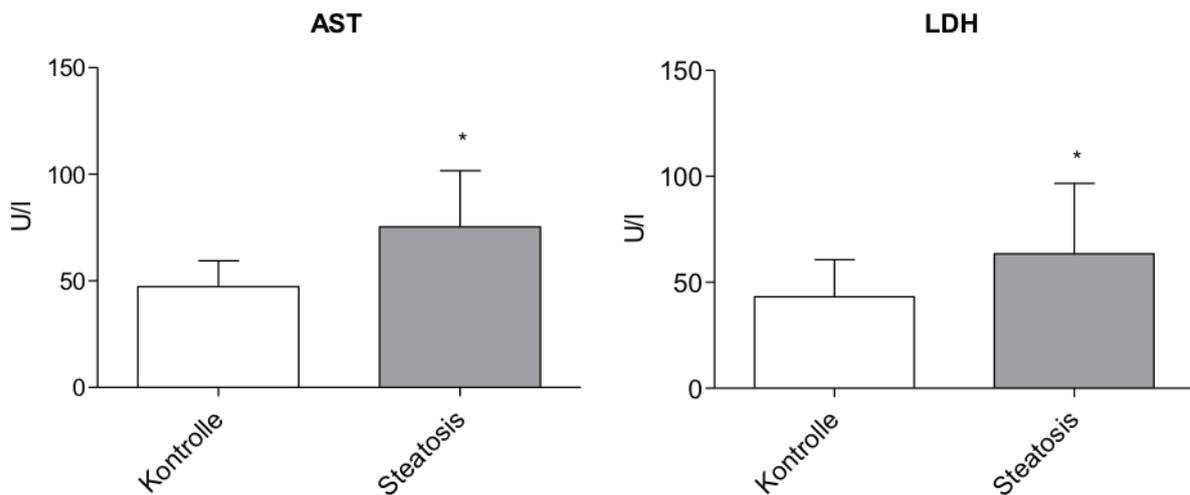


Abb. 9 Aktivität der AST und LDH. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden mit FFS zeigte sich eine signifikant erhöhte Aktivität der AST wie auch der LDH im Überstand des Kulturmediums. Daten sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung ($N = 6$; $n = 6$). * $p < 0,05$ in Relation zur Kontrolle.

Zur weiteren Evaluation der zytotoxischen Effekte der freien Fettsäuren auf primäre humane Hepatozyten wurde der zur Viabilitätsbestimmung weit verbreitete XTT-Assay angewendet. In der Steatosisgruppe zeigte sich eine signifikant verringerte relative Absorption: Kontrolle $1,0 \pm 0,05$ relative Absorption versus $0,84 \pm 0,11$ relative Absorption (Abb. 10).

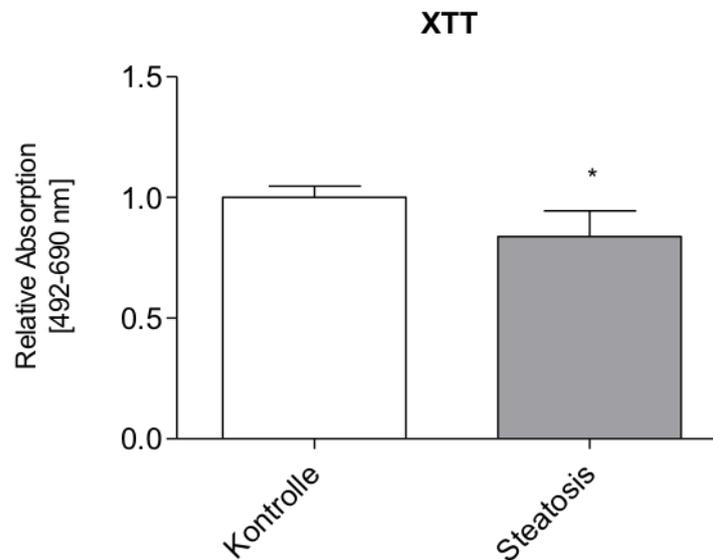


Abb. 10 Viabilität der Kontroll- und Steatosisgruppe. Es zeigt sich eine statistisch signifikant verringerte Viabilität der steatotischen Hepatozyten nach Inkubation mit FFS für 24 h. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung ($N = 3$; $n = 5$). * $p < 0,05$ in Relation zur Kontrolle.

5.2.3 Einfluss von freien Fettsäuren auf die hepatische Syntheseleistung

Das Kohlendioxidamid Harnstoff (*Urea*) ist ein Endprodukt des Stickstoff-Stoffwechsels und wird im Rahmen des Harnstoffzyklus zum größten Teil in der Leber gebildet. Somit kann *Urea* als Surrogatparameter zur Einschätzung der Syntheseleistung von Hepatozyten herangezogen werden.

Die Stoffmengenkonzentration von Harnstoff im Überstand des Kulturmediums zeigte sich in der Steatosisgruppe minimal erniedrigt ohne statistische Signifikanz: Kontrolle $0,90 \pm 0,43$ mmol/l versus Steatosis $0,85 \pm 0,41$ mmol/l (Abb. 11).

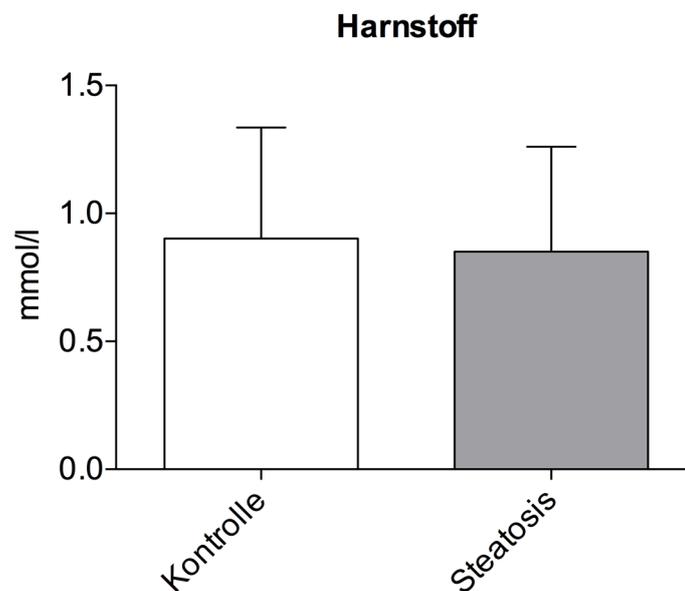


Abb. 11 Stoffmengenkonzentration von Harnstoff. Im Überstand des Kulturmediums zeigte sich in der Steatosisgruppe eine leicht erniedrigte Konzentration von Harnstoff. Daten sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung ($N = 6$; $n = 6$).

5.3 Insulin-Signaltransduktion im *in-vitro*-Fettlebermodell

5.3.1 Phosphorylierung von Akt

Die Proteinkinase Akt spielt eine zentrale Rolle bei der Regulation des hepatischen Glukosemetabolismus durch Insulin.

Eine Western Blot-Analyse nach 15 minütiger Inkubation ohne und mit 100 nM Insulin ergab in der mit FFS behandelten Steatosisgruppe ein geringeres Niveau der Phosphorylierung von Akt: Kontrolle $10,69 \pm 8,25$ relative Bandenintensität versus Steatosis $2,16 \pm 0,71$ relative Bandenintensität (Abb. 12).

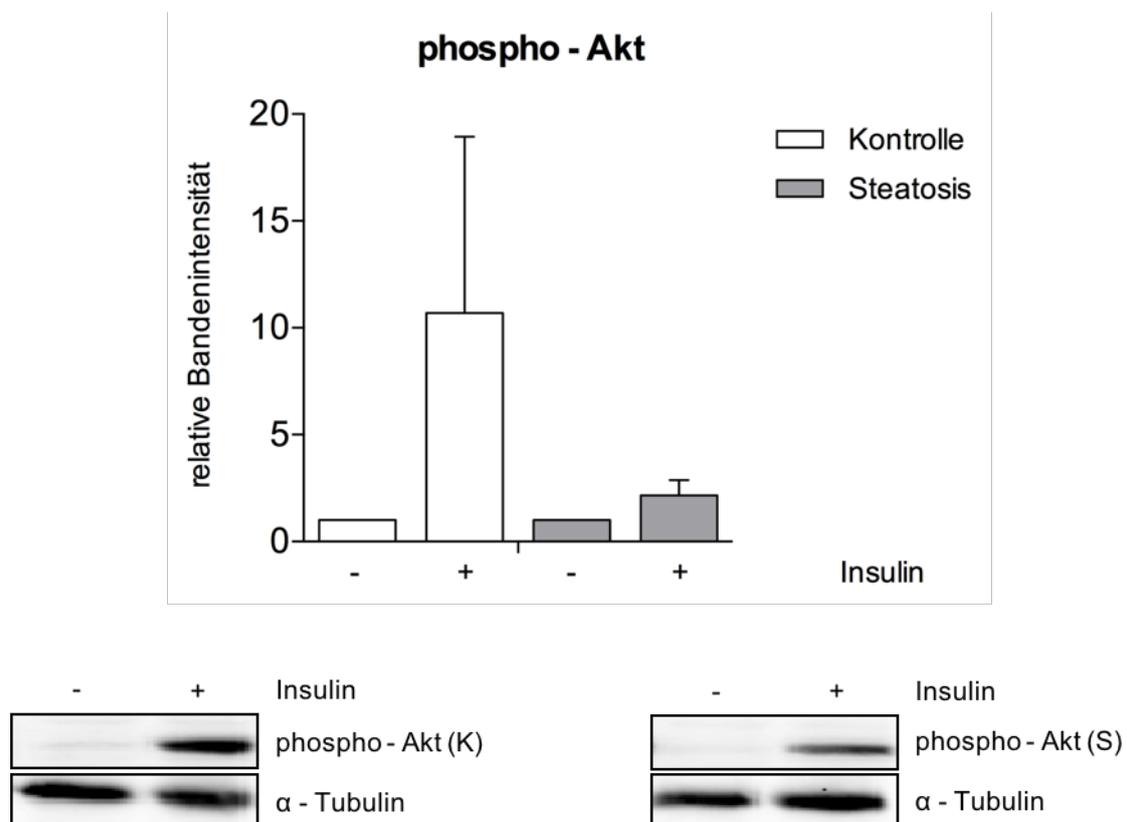


Abb. 12 Phosphorylierung von Akt. PHH wurden in 12-Well-Platten für 24 h mit Öl- und Palmitinsäure behandelt. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 15 Minuten \pm 100 nM Insulin. Die Phosphorylierung von Akt (Ser⁴⁷³) wurde mittels Western Blot-Analyse bestimmt. Dargestellt ist die densitometrische Auswertung in Relation zu Insulin-unbehandelten PHH in der Kontroll- und Steatosisgruppe (Mittelwert \pm Standardabweichung). Darunter ein repräsentativer Western Blot. Daten stammen von drei voneinander unabhängigen Hepatozytenisolierungen und wurden auf α -Tubulin normiert. (K) - Kontrolle, (S) - Steatosis.

5.3.2 Phosphorylierung von ERK1/2

Die Proteinkinase ERK1/2 ist als zytoplasmatisches Signalprotein maßgeblich an der Insulin-vermittelten Regulation von Zellwachstum und -differenzierung beteiligt.

Die durch Insulin vermittelte Phosphorylierung von ERK1/2 ist in der Steatosisgruppe geringer: Kontrolle $3,62 \pm 0,82$ relative Bandenintensität versus Steatosis $1,65 \pm 1,08$ relative Bandenintensität (Abb. 13).

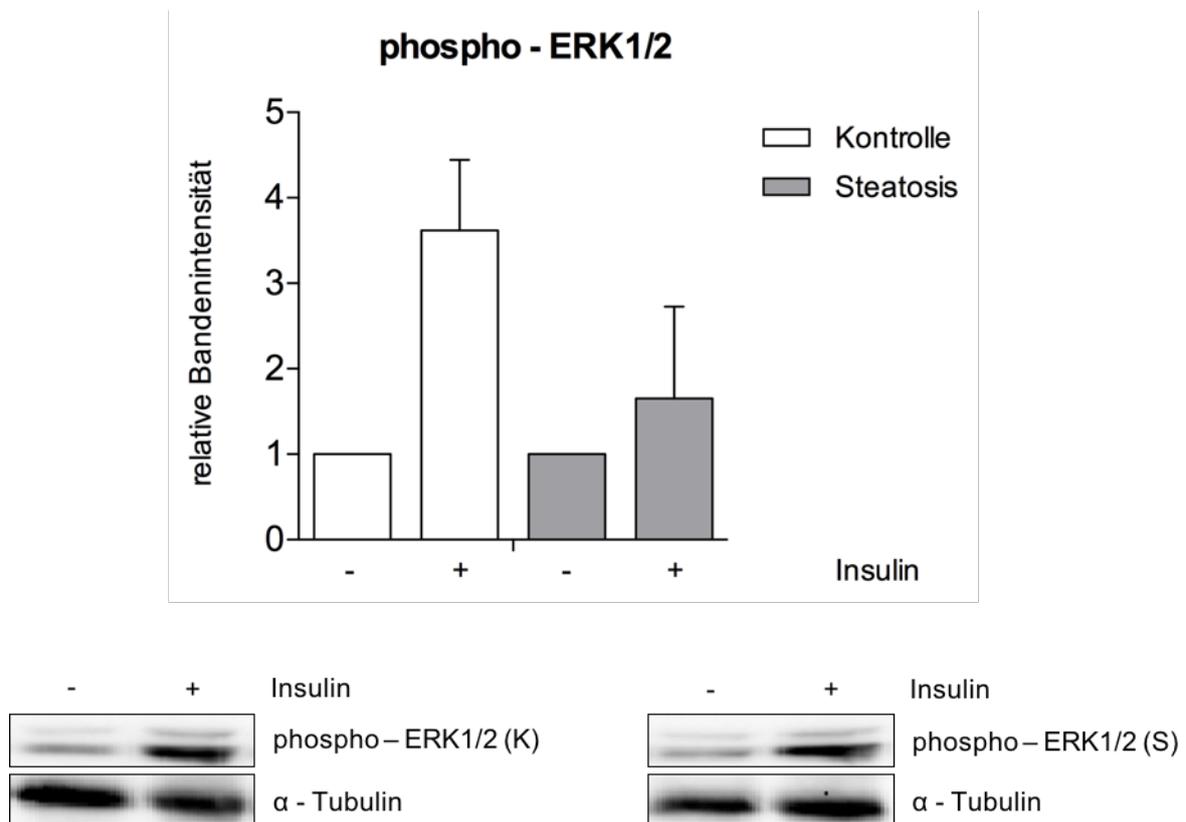


Abb. 13 Insulin-induzierte Phosphorylierung von ERK1/2. PHH wurden in 12-Well-Platten für 24 h mit Öl- und Palmitinsäure behandelt. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 15 Minuten \pm 100 nM Insulin. Die Phosphorylierung von ERK1/2 (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴) wurde mittels Western Blot-Analyse bestimmt. Dargestellt ist die densitometrische Auswertung in Relation zu Insulin-unbehandelten PHH in der Kontroll- und Steatosisgruppe (Mittelwert \pm Standardabweichung). Darunter ein repräsentativer Western Blot. Daten stammen von drei voneinander unabhängigen Hepatozytenisolierungen und wurden auf α -Tubulin normiert. (K) - Kontrolle, (S) - Steatosis.

5.3.3 Phosphorylierung von GSK3 α/β

Die Proteinkinase GSK3 α/β vermittelt die Regulation der hepatischen Glykogensynthese durch Insulin.

Die densitometrische Auswertung der Western Blot-Analyse zeigte in der Steatosisgruppe eine geringere Insulin-induzierte Phosphorylierung von GSK3 α/β : Kontrolle $1,94 \pm 0,53$ relative Bandenintensität versus Steatosis $0,96 \pm 0,35$ relative Bandenintensität (Abb. 14).

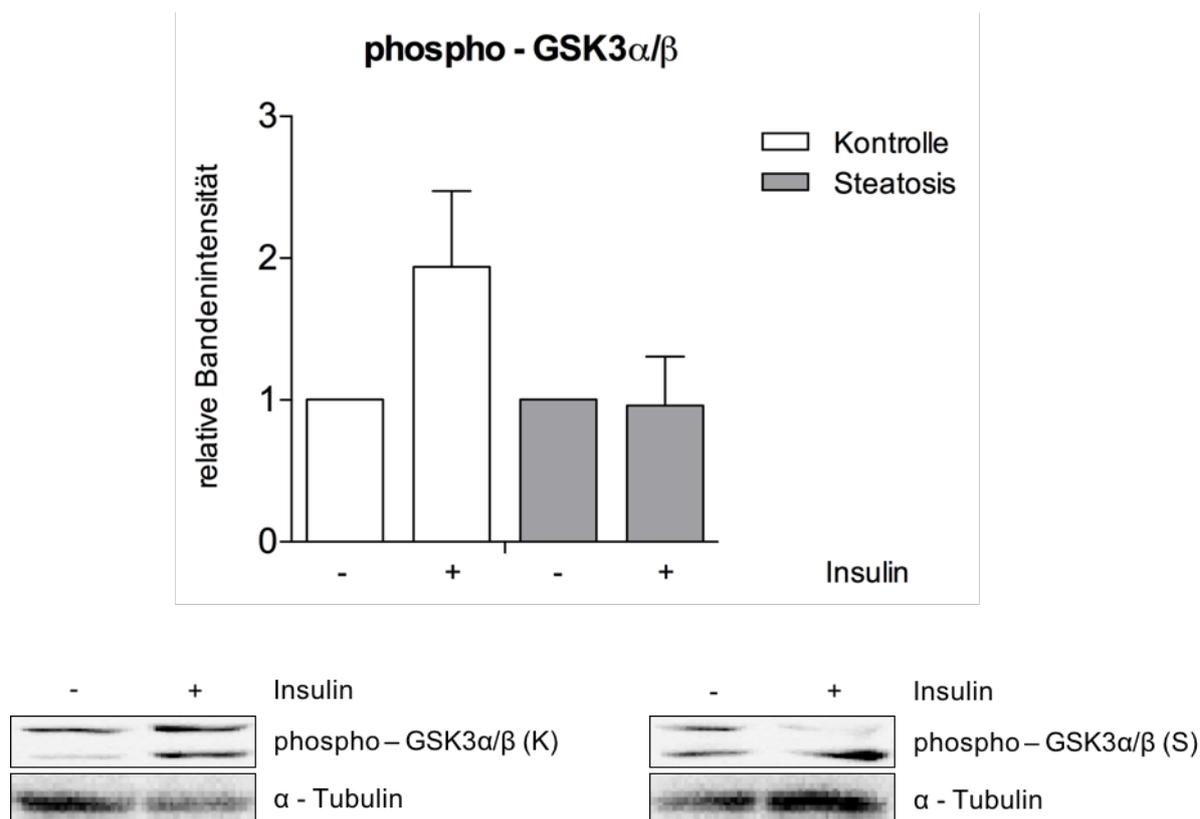


Abb. 14 Insulin-induzierte Phosphorylierung von GSK3 α/β . PHH wurden in 12-Well-Platten für 24 h mit Öl- und Palmitinsäure behandelt. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 15 Minuten \pm 100 nM Insulin. Die Phosphorylierung von GSK3 α/β (Ser^{21/9}) wurde mittels Western Blot-Analyse bestimmt. Dargestellt ist die densitometrische Auswertung in Relation zu Insulin-unbehandelten PHH in der Kontroll- und Steatosisgruppe (Mittelwert \pm Standardabweichung). Darunter ein repräsentativer Western Blot. Daten stammen von drei voneinander unabhängigen Hepatozytenisolierungen und wurden auf α -Tubulin normiert. (K) - Kontrolle, (S) - Steatosis.

5.3.4 Phosphorylierung von FoxO1

Der Transkriptionsfaktor FoxO1 ist maßgeblich an der Regulation der Glukoneogenese durch Insulin in der Leber beteiligt.

Die Steatosisgruppe zeigte im Vergleich zur Kontrolle ein geringeres Phosphorylierungsniveau nach Stimulation mit Insulin: Kontrolle $1,31 \pm 0,42$ relative Bandenintensität versus $0,90 \pm 0,34$ relative Bandenintensität (Abb. 15).

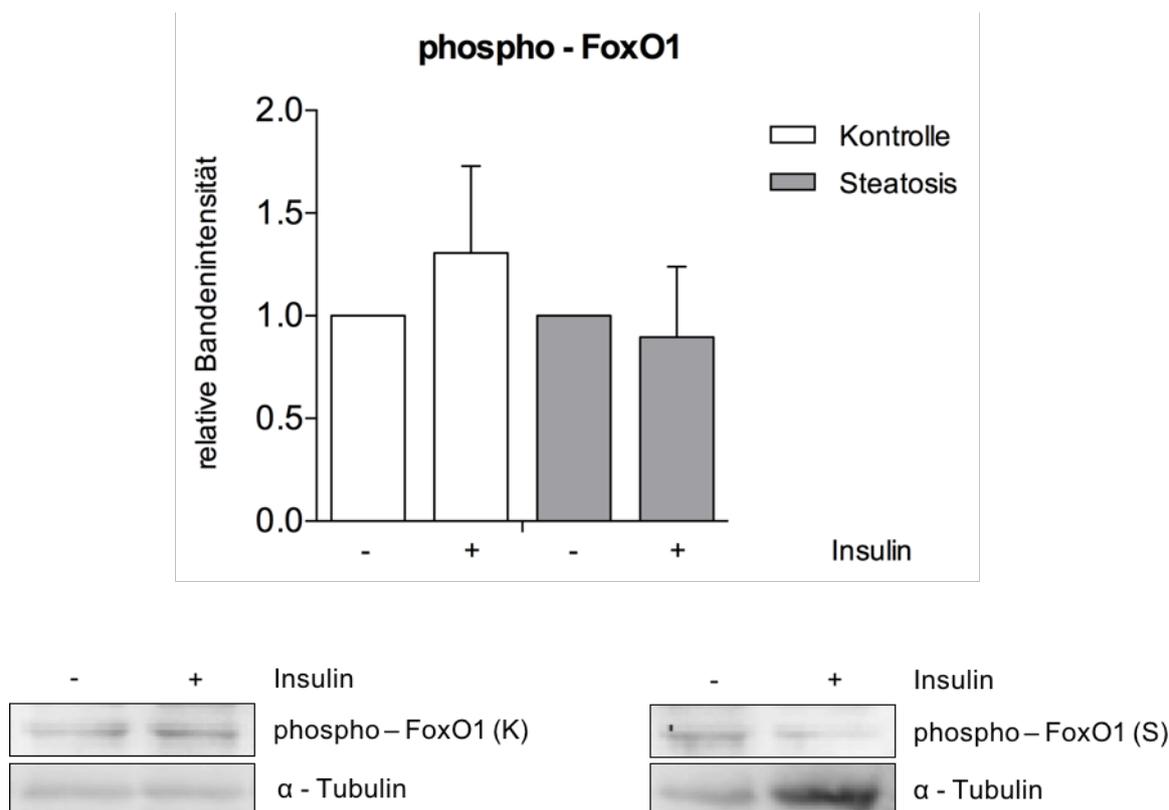


Abb. 15 Phosphorylierung von FoxO1. PHH wurden in 12-Well-Platten für 24 h mit Öl- und Palmitinsäure behandelt. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 15 Minuten \pm 100 nM Insulin. Die Phosphorylierung von FoxO1 (Ser²⁵⁶) wurde mittels Western Blot-Analyse bestimmt. Dargestellt ist die densitometrische Auswertung in Relation zu Insulin-unbehandelten PHH in der Kontroll- und Steatosisgruppe (Mittelwert \pm Standardabweichung). Darunter ein repräsentativer Western Blot. Daten stammen von drei voneinander unabhängigen Hepatozytenisolierungen und wurden auf α -Tubulin normiert. (K) - Kontrolle, (S) - Steatosis.

5.3.5 Gen-Expression vom Glukosetransporter Typ II

Der Glukosetransporter Typ II (GLUT2) ermöglicht einen Insulin-unabhängigen, bidirektionalen Glukosetransport über die sinusoidale Zellmembran der Hepatozyten. Als Transmembranprotein spielt er eine zentrale Rolle der Regulation der Blutglukosekonzentration.

Die Messung der relativen mRNA-Expression von GLUT2, als ein Vielfaches der Kontrolle, ergab in der Steatosisgruppe eine 1,21-fache \pm 0,30 mRNA-Expression (Abb. 16).

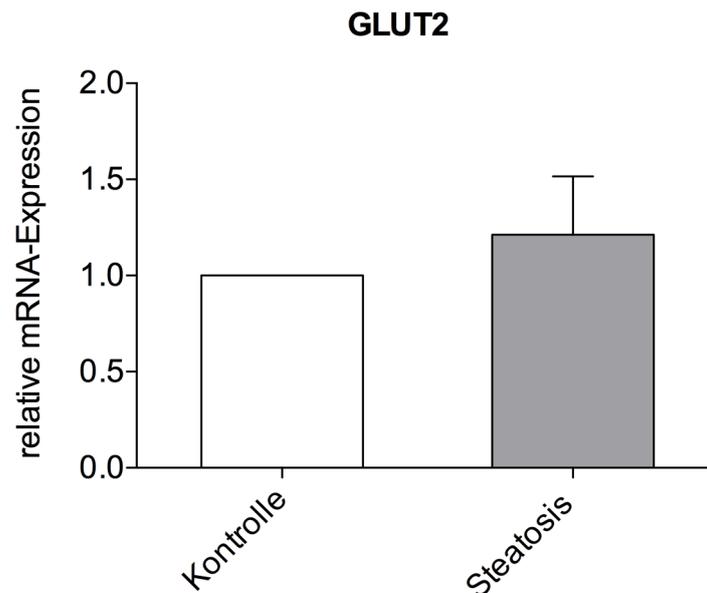


Abb. 16 Genexpression von GLUT2. Dargestellt ist die relative mRNA-Expression der Steatosisgruppe als ein Vielfaches der Kontrolle. Daten sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung von drei voneinander unabhängigen Hepatozytenisolierungen mit jeweiliger Messung von Duplikaten und wurden auf β -Actin als endogene Kontrolle normiert.

5.3.6 Gen-Expression vom Insulinrezeptor

Der Insulinrezeptor ermöglicht als integrales Membranprotein die zelluläre Wirkungsentfaltung von Insulin. Die Bindung des Peptidhormones an den extrazellulären Anteil führt über eine Konformationsänderung zu einer Autophosphorylierung von spezifischen intrazellulären Tyrosinresten. In diesem aktivierten Zustand löst der Insulinrezeptor verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden aus, welche die Insulinwirkung vermitteln.

In der mit freien Fettsäuren behandelten Steatosisgruppe ergab die Messung der relativen mRNA-Expression des Insulinrezeptor-Gens (INSR) eine 2,13-fache \pm 1,45 mRNA-Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 17).



Abb. 17 Genexpression des hepatischen Insulinrezeptors. Dargestellt ist die relative mRNA-Expression der Steatosisgruppe als ein Vielfaches der Kontrolle. Daten sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung von drei voneinander unabhängigen Hepatozytenisolierungen mit jeweiliger Messung von Duplikaten und wurden auf β -Actin als endogene Kontrolle normiert.

5.4 Evaluation der Effekte von Genistein (GEN)

5.4.1 Zytotoxizität von GEN

Die Messung der zytotoxischen Effekte von Genistein in einer ausgewählten Konzentrationsreihe erfolgte analog zur Evaluation der Zytotoxizität der freien Fettsäuren. Neben der Messung der Membranintegrität über die Aktivität von AST und LDH im Überstand des Kulturmediums wurde zudem ein XTT-Assay zur Bestimmung der Viabilität durchgeführt. Die Aktivität der AST im Überstand des Kulturmediums nach Inkubation mit Genistein war in der Steatosisgruppe über alle GEN-Konzentrationen im Vergleich zur Kontrollgruppe im Mittel um 65% erhöht (Abb. 18). Auffallend zeigte sich die Konzentration von 100 μM Genistein in steatotischen PHH mit einer 2,4-fachen Erhöhung gegenüber der Kontrollgruppe: Kontrolle $53,55 \pm 34,25$ U/l versus Steatosis $128,53 \pm 77,85$ U/l.

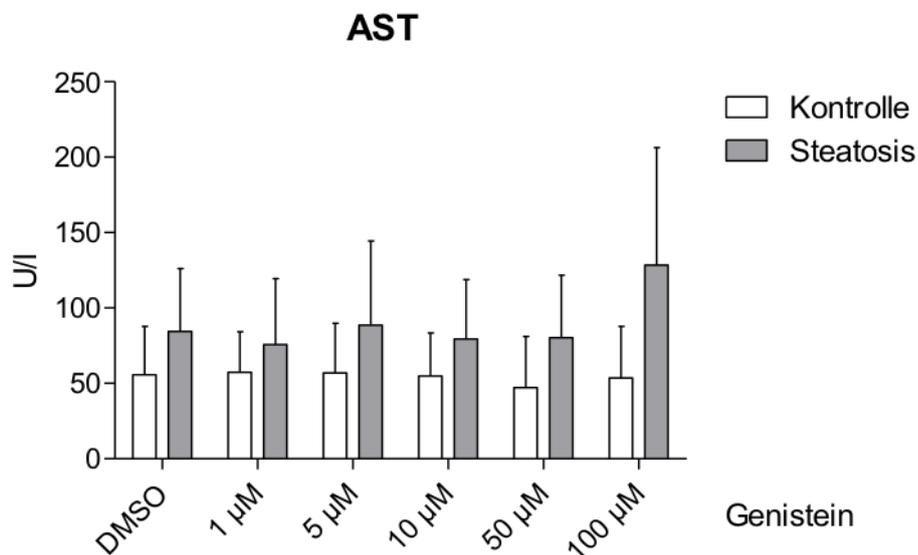


Abb. 18 AST-Aktivität nach Inkubation mit GEN. PHH wurden nach der eintägigen Behandlung mit FFS für weitere 24 Stunden mit Genistein in einer Konzentration von 0, 5, 10, 50 und 100 μM inkubiert. Daten sind dargestellt als Mittelwert mit Standardabweichung von 5 voneinander unabhängigen Hepatozytenisolierungen mit jeweiliger Messung von Duplikaten.

Ein ähnliches Resultat ergab sich bei der Messung der LDH im Überstand des Kulturmediums. Auch hier zeigte die Steatosisgruppe über alle Konzentrationen von Genistein eine im Mittel um 23% erhöhte LDH-Aktivität (Abb. 19). Im Gegensatz zur AST-Messung ergab die Bestimmung der LDH für 100 μM Genistein keinen Unterschied zwischen der Kontroll- und Steatosisgruppe: Kontrolle $23,34 \pm 17,95$ U/l versus Steatosis $24,21 \pm 13,68$ U/l.

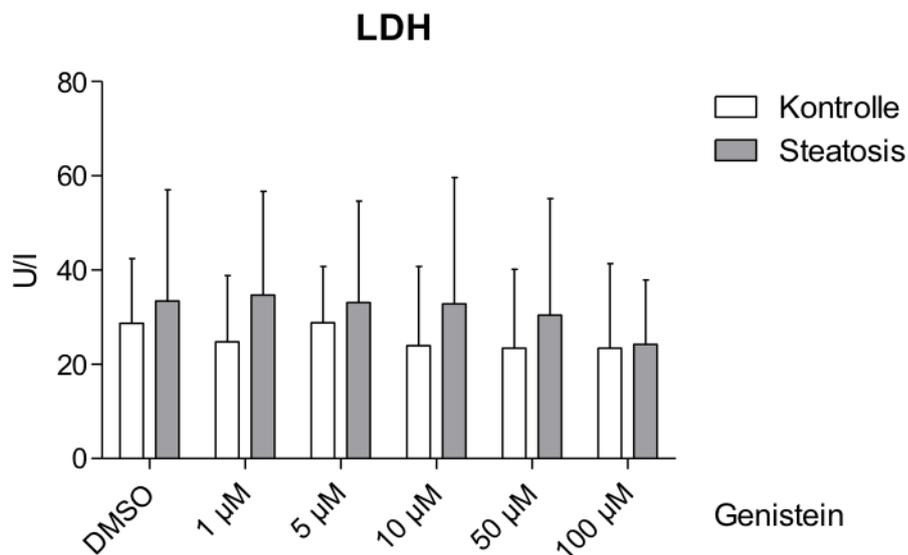


Abb. 19 LDH-Aktivität nach Inkubation mit GEN. PHH wurden nach der eintägigen Behandlung mit FFS für weitere 24 Stunden mit Genistein in einer Konzentration von 0, 5, 10, 50 und 100 μM inkubiert. Daten sind dargestellt als Mittelwert mit Standardabweichung von 5 voneinander unabhängigen Hepatozytenisolierungen mit jeweiliger Messung von Duplikaten.

Der XTT-Assay ergab eine im Mittel um 15% reduzierte Zellaktivität (relative Absorption) in der Steatosisgruppe bei den GEN-Konzentrationen von 1 bis 10 μM im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 20). In diesem Bereich zeigte sich eine Plateau-artig erniedrigte Zellaktivität. Demgegenüber zeigten die Konzentrationen von 50 sowie 100 μM GEN eine Dosis-abhängige Reduktion der Aktivität in beiden Gruppen: Kontrolle 50 μM GEN $0,92 \pm 0,16$ versus Steatosis 50 μM GEN $0,78 \pm 0,13$ bzw. Kontrolle 100 μM GEN $0,72 \pm 0,17$ versus Steatosis 100 μM GEN $0,56 \pm 0,19$. Insgesamt zeigte sich in beiden Gruppen eine Abnahme der Aktivität mit ansteigender Konzentration von GEN und damit korrelierend eine reduzierte Viabilität der PHH. Eine signifikant reduzierte, relative Zellaktivität konnte in der Kontrolle bei 100 μM GEN um 28% und in der Steatosisgruppe bei den Konzentrationen von 50 und 100 μM GEN um 23% bzw. um 45% nachgewiesen werden.

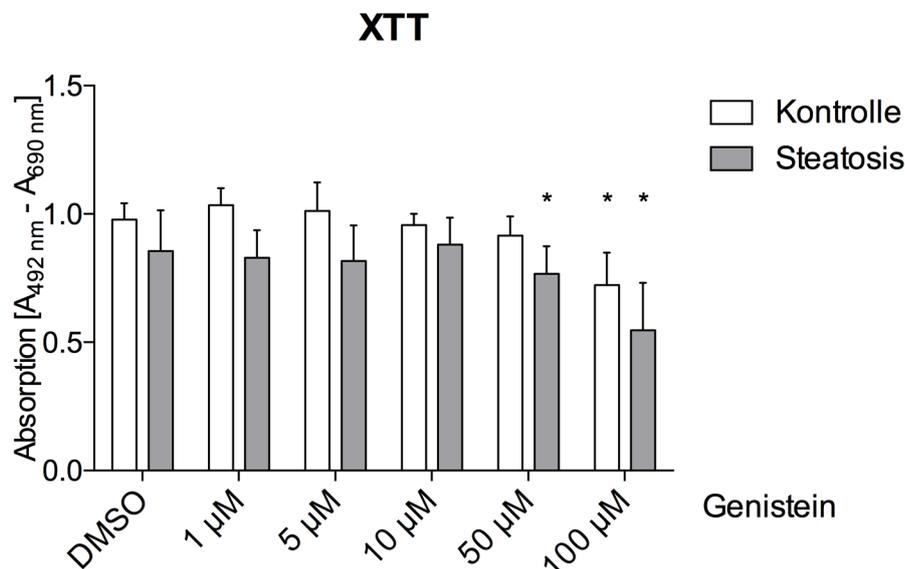


Abb. 20 Zellaktivität nach Inkubation mit GEN. PHH wurden nach einer eintägigen Behandlung mit FFS für weitere 24 Stunden mit Genistein in einer Konzentration von 0, 5, 10, 50 und 100 μM inkubiert. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung der relativen Absorption [492-690 nm] von 5 voneinander unabhängigen Hepatozytenisolierungen mit jeweiliger 6-fach Bestimmung. * $p < 0,05$ in Relation zu DMSO.

5.4.2 Einfluss von GEN auf die hepatische Syntheseleistung

Zur Evaluation der Wirkung von Genistein auf die hepatische Syntheseleistung wurde der Surrogatparameter Harnstoff (*Urea*) herangezogen.

In der Steatosisgruppe zeigte sich über alle GEN-Konzentrationen kein wesentlicher Unterschied der Stoffmengenkonzentrationen von Harnstoff im Überstand des Kulturmediums (Abb. 21).

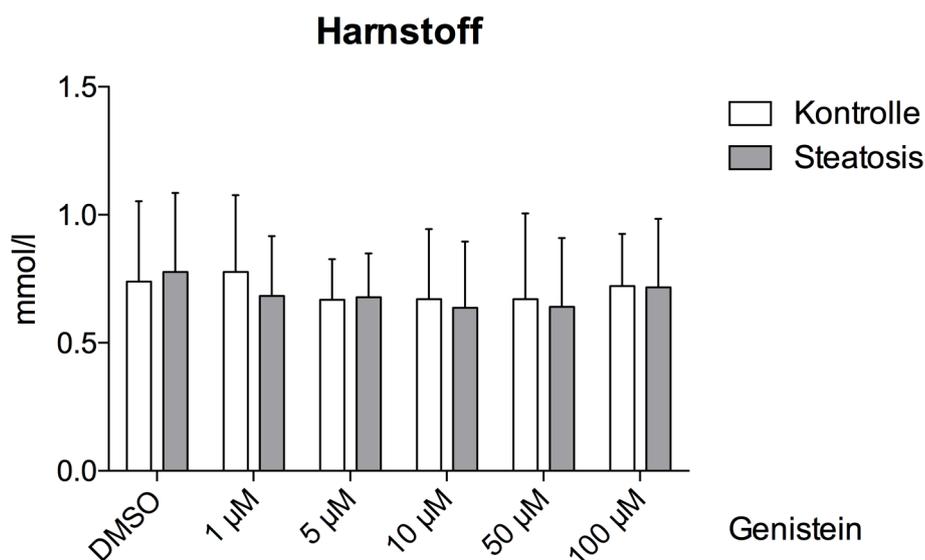


Abb. 21 Stoffmengenkonzentration von Harnstoff nach Inkubation mit GEN. PHH wurden nach der eintägigen Behandlung mit FFS für weitere 24 Stunden mit Genistein in einer Konzentration von 0, 5, 10, 50 und 100 μM inkubiert. Daten sind dargestellt als Mittelwert mit Standardabweichung von 5 voneinander unabhängigen Hepatozytenisolierungen mit jeweiliger Messung von Duplikaten.

5.5 Einfluss von GEN auf die hepatische Insulin-Signaltransduktion

5.5.1 Phosphorylierung von Akt

Nach der standardisierten Inkubation mit Genistein für 24 Stunden und der Applikation von Insulin für 15 Minuten konnte zwischen der Kontroll- und Steatosisgruppe eine diametrale Phosphorylierung von Akt beobachtet werden (Abb. 22).

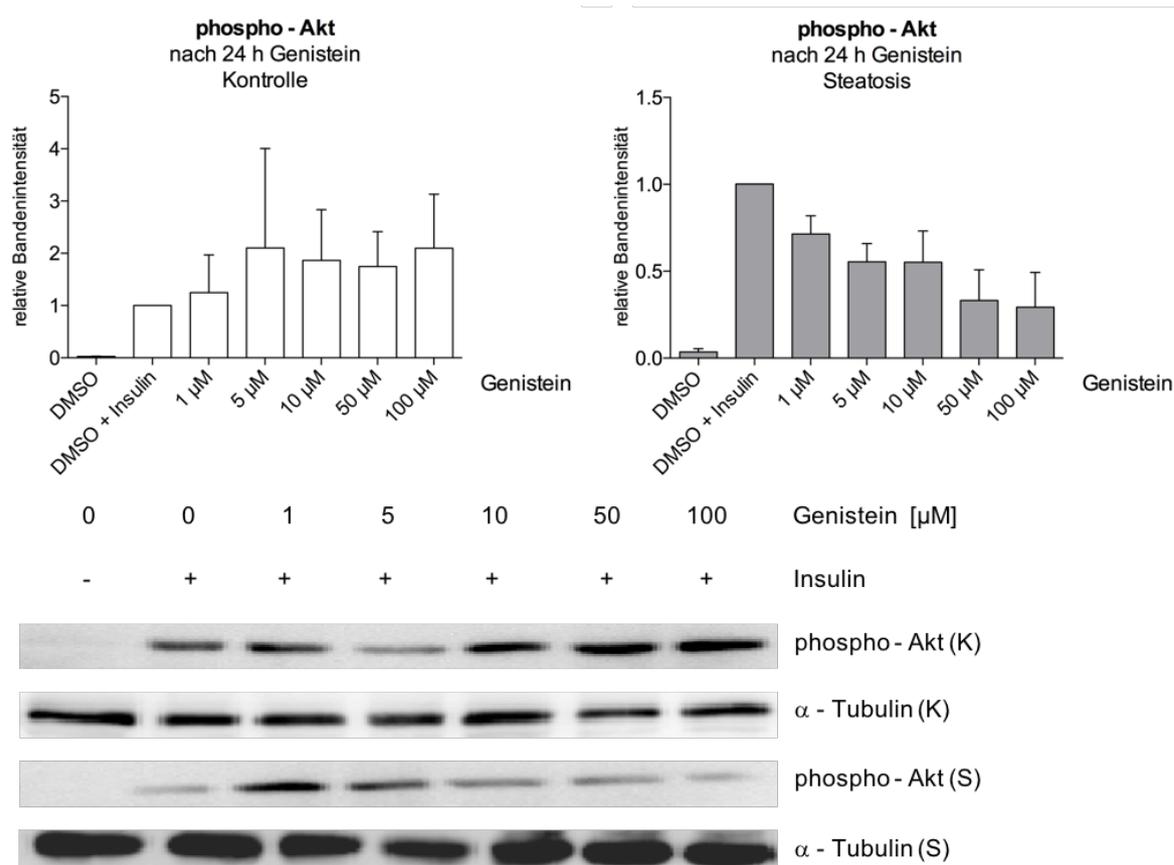


Abb. 22 Phosphorylierung von Akt nach Inkubation mit GEN. PHH wurden für 24 h mit Öl- und Palmitinsäure inkubiert und für weitere 24 h mit GEN. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit 100 nM Insulin für 15 Minuten über alle GEN-Konzentrationen. Dargestellt ist die densitometrische Auswertung als ein Vielfaches der mit Insulin-behandelten PHH in der Kontroll- und Steatosisgruppe (Mittelwert \pm Standardabweichung). Darunter ein repräsentativer Western Blot. Daten stammen von drei voneinander unabhängigen Hepatozytenisolierungen und wurden jeweils auf α -Tubulin normiert. (K) - Kontrolle, (S) - Steatosis.

Die Kontrolle zeigte einen konzentrationsabhängigen Anstieg der Akt-Phosphorylierung mit einem Plateau ab einer GEN-Konzentration von 5 μ M, bei allerdings großer Schwankungsbreite. Insgesamt zeigte sich in der Kontrolle über alle GEN-Konzentrationen ein deutlich höheres Phosphorylierungsniveau von Akt im Vergleich zu steatotischen PHH. Diametral zum Anstieg in der Kontrolle zeigten steatotische PHH eine konzentrationsabhängige Abnahme der Akt-Phosphorylierung nach GEN-Behandlung. Die größte Änderung konnte bei 100 μ M GEN mit einem Abfall um 71% bzw. um das 0,71-fache \pm 0,20 beobachtet werden.

5.5.2 Phosphorylierung von ERK1/2

Die MAP-Kinase ERK1/2 zeigte in der Kontrolle nach 24-stündiger Inkubation mit GEN und Stimulation mit Insulin keine wesentliche Änderung der Phosphorylierung, wobei große Schwankungen bei den GEN-Konzentrationen von 5 und 10 μM beobachtet werden konnten (Abb. 23).

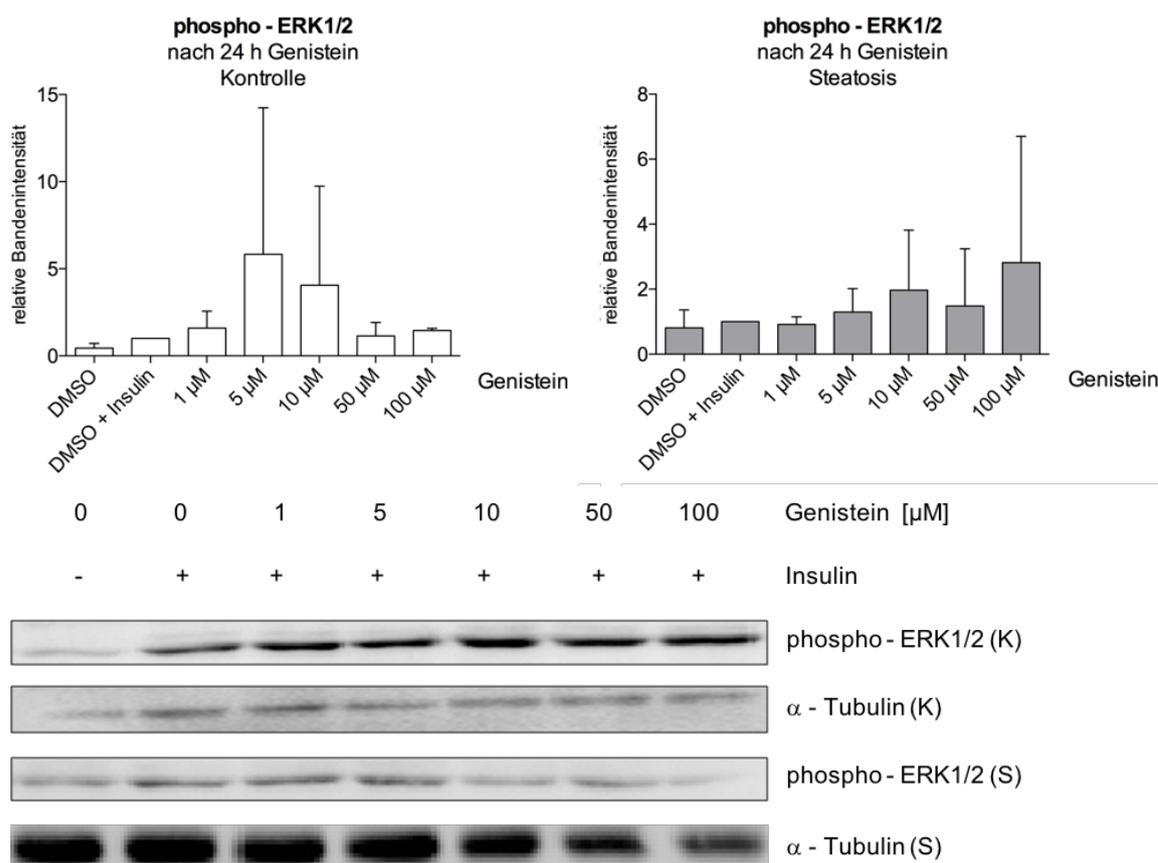


Abb. 23 Phosphorylierung von ERK1/2 nach Inkubation mit GEN. PHH wurden für 24 h mit Öl- und Palmitinsäure inkubiert und für weitere 24 h mit GEN. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit 100 nM Insulin für 15 Minuten über alle GEN-Konzentrationen. Dargestellt ist die densitometrische Auswertung als ein Vielfaches der mit Insulin-behandelten PHH in der Kontroll- und Steatosisgruppe (Mittelwert \pm Standardabweichung). Darunter ein repräsentativer Western Blot. Daten stammen von drei voneinander unabhängigen Hepatozytenisolierungen und wurden jeweils auf α -Tubulin normiert. (K) - Kontrolle, (S) - Steatosis.

In steatotischen PHH konnte im Trend ein moderater, konzentrationsabhängiger Anstieg der Phosphorylierung von ERK1/2 ab einer Konzentration von 5 μM GEN beobachtet werden. Insgesamt zeigte sich vor allem bei den Konzentrationen ab 10 μM GEN eine große Schwankungsbreite.

5.5.3 Phosphorylierung von GSK3 α/β

In der Kontrolle zeigte sich nach standardisierter Inkubation mit GEN für 24 Stunden und Insulin-Stimulation im Trend ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Phosphorylierung von GSK3 α/β (Abb. 24). Über alle Konzentrationen von GEN konnten breite Schwankungen der Phosphorylierung festgestellt werden.

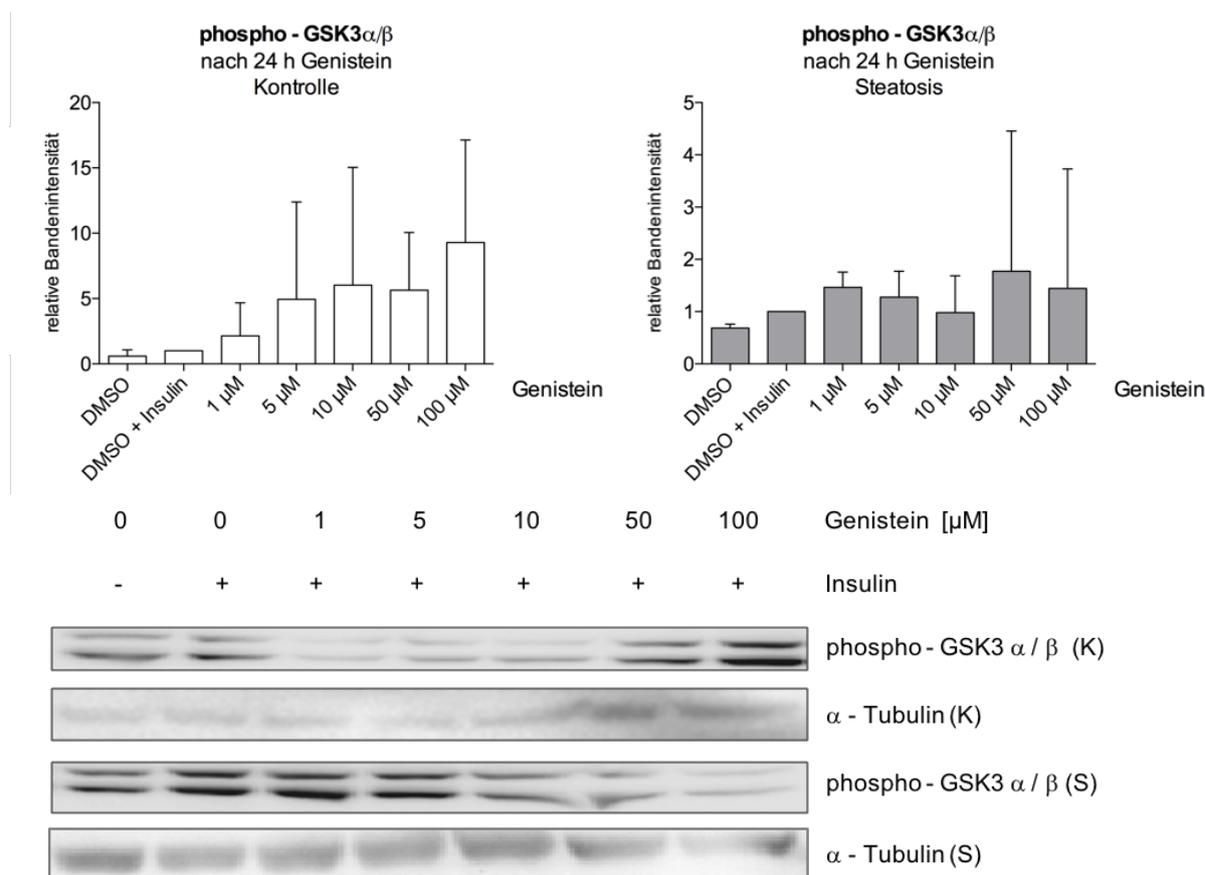


Abb. 24 Phosphorylierung von GSK3 α/β nach Inkubation mit GEN. PHH wurden für 24 h mit Öl- und Palmitinsäure inkubiert und für weitere 24 h mit GEN. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit 100 nM Insulin für 15 Minuten über alle GEN-Konzentrationen. Dargestellt ist die densitometrische Auswertung als ein Vielfaches der mit Insulin-behandelten PHH in der Kontroll- und Steatosisgruppe (Mittelwert \pm Standardabweichung). Darunter ein repräsentativer Western Blot. Daten stammen von drei voneinander unabhängigen Hepatozytenisolierungen und wurden jeweils auf α -Tubulin normiert. (K) - Kontrolle, (S) - Steatosis.

Steatotische PHH zeigten über alle GEN-Konzentrationen ein geringeres Phosphorylierungsniveau im Vergleich zur Kontrolle. Im Trend konnte auch in steatotischen PHH ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Phosphorylierung von GSK3 α/β mit einem Plateau ab 1 μ M GEN beobachtet werden. In Analogie zur Kontrolle zeigten auch die steatotischen PHH eine große Schwankungsbreite der Phosphorylierung nach der Behandlung mit Genistein.

5.5.4 Phosphorylierung von FoxO1

Trotz mehrfacher Durchführung des Western Blot-Verfahrens nach standardisiertem Protokoll war bei 3 voneinander unabhängigen Hepatozytenisolierungen mit jeweiliger Dreifachmessung, aufgrund eines Signales unterhalb der Nachweisgrenze, keine densitometrische Auswertung der Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors FoxO1 möglich.

5.5.5 Gen-Expression vom Glukosetransporter Typ II

Die Expression des Glukosetransporters Typ II (GLUT2) ist nach der Behandlung mit Genistein für 24 Stunden in der Kontrolle über die gesamte Konzentrationsreihe im Trend geringgradig erniedrigt (Abb. 25).

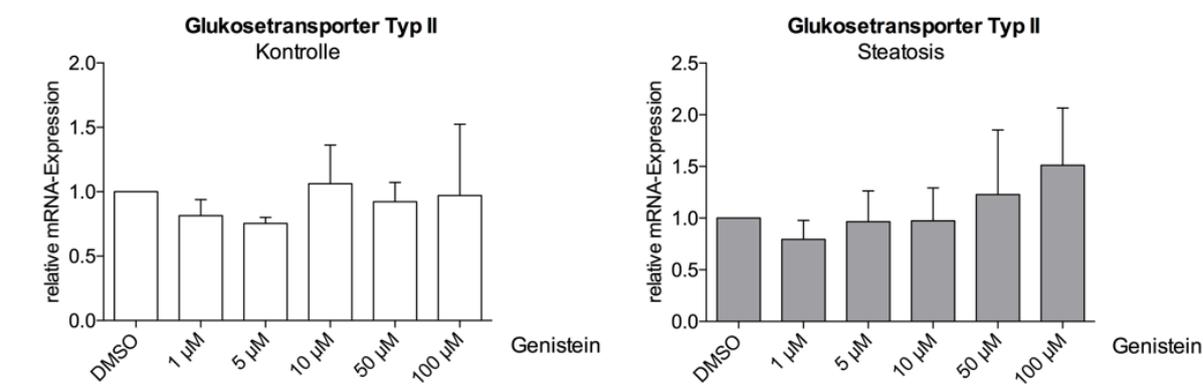


Abb. 25 Genexpression von GLUT2 nach Inkubation mit GEN. Dargestellt ist die relative mRNA-Expression von GLUT2 in der Kontroll- und Steatosisgruppe als ein Vielfaches der DMSO-Kontrolle. Daten sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung von drei voneinander unabhängigen Hepatozytenisolierungen mit jeweiliger Messung von Duplikaten. Alle Messwerte wurden auf β -Actin als endogene Kontrolle normiert.

Ein konzentrationsabhängiger Effekt von GEN auf die GLUT2-Expression konnte in der Kontrolle nicht beobachtet werden. Demgegenüber zeigten steatotische PHH im Trend eine konzentrationsabhängige Steigerung der Expression von GLUT2 ab einer Konzentration von 50 μ M GEN.

5.5.6 Gen-Expression vom Insulinrezeptor

Das Insulinrezeptor-Gen (INSR) zeigte nach der Inkubation mit GEN für 24 Stunden in der Kontrolle im Trend einen moderaten, konzentrationsabhängigen Anstieg der mRNA-Expression (Abb. 26).

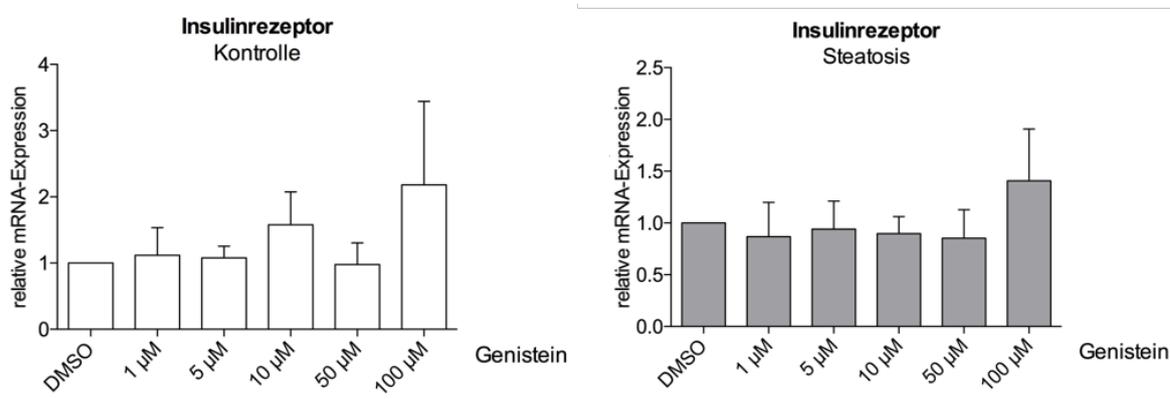


Abb. 26 Genexpression des hepatischen Insulinrezeptors nach Inkubation mit GEN. Dargestellt ist die relative mRNA-Expression des INSR in der Kontroll- und Steatosisgruppe als ein Vielfaches der DMSO-Kontrolle. Daten sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung von drei voneinander unabhängigen Hepatozytenisolierungen mit jeweiliger Messung von Duplikaten. Alle Messwerte wurden auf β -Actin als endogene Kontrolle normiert.

Demgegenüber zeigten steatotische PHH nur bei der höchsten Konzentration von GEN einen Anstieg der INSR-Expression, wobei insgesamt ein erniedrigtes Expressionsniveau des INSR im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden konnte. In beiden Gruppen, sowohl in der Kontrolle als auch in den steatotischen PHH, war bei großer Schwankungsbreite der deutlichste Effekt mit einer erhöhten INSR-Expression bei einer Konzentration von 100 μM GEN zu beobachten.

6 Diskussion

6.1 *In-vivo*-Bedingungen der Fettleber im *in-vitro*-Modell

Die *in-vitro*-Zellkultur mit primären humanen Hepatozyten ermöglicht die derzeit genaueste Abbildung von *in-vivo*-Bedingungen der humanen Leber [86]. Nach einer standardisierten Isolation aus humanem Lebergewebe und anschließender Überführung in ein Kulturmedium übernehmen die PHH ihre typischen biochemischen Funktionen [73].

Das erste Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung und Charakterisierung eines humanen *in-vitro*-Fettlebermodells.

In steatotischen Hepatozyten sind am häufigsten die Öl- und Palmitinsäure zu finden, welche als langkettige, freie Fettsäuren in Triglyceriden gebunden vorliegen [87]. Zur *in-vitro*-Induktion einer *Steatosis hepatis* kam ein modifiziertes Protokoll nach Gómez-Lechón *et al.* mit einer Inkubation der PHH mit Öl- und Palmitinsäure in einer Gesamtkonzentration von 1 mM und einem 2:1 Verhältnis für 24 Stunden zur Anwendung [75].

Die mit den freien Fettsäuren behandelten, steatotischen Hepatozyten zeigten einen signifikanten, 2,86-fach höheren intrazellulären Lipidgehalt im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Eine Studie von Gómez-Lechón *et al.* kam zu einem ähnlichen Ergebnis. Dort zeigten aus steatotischen Lebern isolierte PHH einen 3,8-fach höheren Gehalt an Lipiden im Vergleich zu nicht-steatotischen Lebern [75]. Die Quantität der hierbei im Fettlebermodell erreichbaren Lipidakkumulation ist etwa 32% niedriger als in Leberbiopsien bei Patienten mit histopathologisch nachgewiesener *Steatosis hepatis*, jedoch insgesamt vergleichbar [75, 87]. Bei Patienten mit NAFLD und NASH konnten signifikant erhöhte Blutplasmaspiegel von freien Fettsäuren nachgewiesen werden [88]. Interessanterweise scheinen die FFS hierbei mit einem geschätzten Anteil von 59% als primäre Quelle der Triglycerid-Synthese eine bedeutende Rolle bei der Lipidakkumulation in der Leber zu haben [88, 89]. Eine mögliche Erklärung des geringeren Lipidgehaltes im *in-vitro*-Modell ist der *in-vivo* deutlich längere Zeitraum der Lipidexposition von Jahren bis zu mehreren Jahrzehnten im Vergleich zur 24 Stunden-Inkubation im vorliegenden Fettlebermodell. Zudem fehlen die komplexen Wechselwirkungen zu den nicht-parenchymtösen Kupffer-, Stern- und Endothelzellen in der Leber sowie zu den peripheren Adipozyten, welche eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese, Aufrechterhaltung und Progression der NAFLD zu haben scheinen [90, 91, 92]. Ferner stehen *in-vivo* neben den FFS weitere Energiequellen zur Lipogenese zur Verfügung, wie beispielsweise Kohlenhydrate oder Proteine. Durch die mit dem metabolischen Syndrom einhergehende Insulinresistenz wird beispielsweise die Funktion der peripheren Adipozyten gestört, wodurch mehr FFS ins Blut abgegeben werden und weniger Glukose aus dem Blut abgebaut werden kann. Der erhöhte Gehalt an Lipiden in der Leber verursacht durch oxidative und nicht-oxidative Stoffwechselwege die sogenannte Lipotoxizität, welche zur Apoptose von Hepatozyten führen kann. Hierbei korreliert das Ausmaß der Lipoapoptose mit dem Schweregrad der NAFLD [93]. Die Evaluation der Lipotoxizität im vorliegenden Fettlebermodell erfolgte durch die

Bestimmung der Membranintegrität mittels Messung der Freisetzung der zytoplasmatischen Enzyme AST und LDH. Ein zentrales Charakteristikum der Nekrose wie auch der späten Apoptose ist die Permeabilisierung der Zellmembran mit Austritt von intrazellulären Enzymen in das extrazelluläre Milieu. Hier zeigte sich eine signifikant erhöhte Freisetzung der AST um 59% beziehungsweise der LDH um 47% bei den mit freien Fettsäuren behandelten PHH als ein Beleg für Lipotoxizität. Dieses konnte durch den XTT-Assay mit einer um 16% signifikant reduzierten Viabilität bestätigt werden. Eine gezielte Unterscheidung zwischen dem Vorliegen einer Nekrose oder einer späten Apoptose war anhand der in dieser Arbeit gewählten Toxizitäts-Assays jedoch nicht möglich. Insgesamt sind die vorliegenden Ergebnisse zur Zytotoxizität vergleichbar mit denen anderer Arbeitsgruppen. Eine durch freie Fettsäuren bedingte Lipotoxizität konnte in *in-vitro*-Studien an Hepatozyten der Ratte sowie der humanen Zell-Linie HepG2 nachgewiesen werden [94, 95, 96]. Eine mögliche Ursache der Lipotoxizität ist die Stimulation der Apoptose durch die Öl- und Palmitinsäure mittels Aktivierung von MAP-Kinasen, Protein p53 sowie des NF κ B-Signalweges [97]. Interessanterweise scheint die gesättigte Palmitinsäure im Vergleich zur ungesättigten Ölsäure den stärkeren zytotoxischen Effekt zu haben. Während die Ölsäure nur eine geringgradige pro-apoptotische Wirkung zeigt [76], induziert die Palmitinsäure dosisabhängig in Hepatozyten sogenannten Endoplasmatischen Retikulum-Stress (ER-Stress) mit nachfolgendem Ausstrom von Calcium [98]. Durch eine Komplexbildung von Palmitinsäure und Calcium kommt es zu einem Abfall des mitochondrialen Membranpotenzials mit Freisetzung von Cytochrom C, was zur Einleitung der Apoptose führt [99]. Ein weiterer Auslöser der Apoptose ist oxidativer Stress. Nach der Behandlung mit Palmitinsäure konnte eine gesteigerte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (engl., reactive oxygen species, ROS) mit erhöhter Aktivität der pro-apoptotischen Caspase 3 in Rattenhepatozyten nachgewiesen werden [99, 94].

Die metabolische Kompetenz der *in-vitro*-kultivierten PHH kann als ein Indikator für die Funktionalität der Zellen herangezogen werden. Eine wichtige Funktion von Hepatozyten ist die Umwandlung von Ammoniak in Harnstoff (*Urea*) zum Schutz des Organismus vor einer Intoxikation. Im vorliegenden Fettlebermodell diente die Messung der Harnstoff-Synthese als Surrogatparameter für die metabolische Kompetenz der PHH. Hier zeigte die Kontrolle und die mit FFS-behandelten PHH eine suffiziente Synthese von Harnstoff, wobei diese in steatotischen Hepatozyten um 5,55% geringgradig erniedrigt war. Eine leicht reduzierte Harnstoffsynthese in steatotischen Hepatozyten wurde in einem mittels Ölsäure etablierten Fettlebermodell mit HepG2-Zellen bestätigt [100]. Die Harnstoffsynthese scheint somit keinen tiefgreifenden Änderungen bei der Pathogenese der NAFLD zu unterliegen. Diesbezüglich sollte in zukünftigen Untersuchungen der Einfluss von FFS auf weitere Stoffwechselprodukte, wie beispielsweise Albumin, analysiert werden.

Zusammenfassend gibt das vorliegende humane *in-vitro*-Modell der Fettleber eine verlässliche Abbildung der *in-vivo*-Gegebenheiten einer *Steatosis hepatis* hinsichtlich Lipidgehalt, Lipotoxizität und metabolischer Kompetenz, wie sie im Rahmen einer NAFLD vorliegt.

Die Proteinkinase Akt ist ein zentraler Regulator des Glukosemetabolismus in der Leber und zeigte in der Kontrolle nach standardisierter Gabe von Insulin eine auf das 10,69-fache erhöhte Phosphorylierung am spezifischen Aminosäurerest Ser⁴⁷³ im Vergleich zur Insulin-unbehandelten Kontrolle. Demgegenüber zeigten die mit freien Fettsäuren behandelten PHH eine um 80% reduzierte Phosphorylierung nach Insulingabe. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen verschiedene Studien an den humanen Zell-Linien HepG2 und HuH-7 [76, 104, 105]. Ein Mausmodell der *Steatosis hepatis* bestätigte eine verminderte Akt-Phosphorylierung um 64% [106]. Interessanterweise hatte hierbei die Palmitinsäure den stärkeren Einfluss auf die Reduktion der Akt-Phosphorylierung [107]. Eine verminderte Akt-Phosphorylierung zeigte sich auch in einem Tiermodell der NAFLD mit männlichen Sprague-Dawley Ratten sowie in einem Diabetes-Tiermodell mit Streptozotocin-behandelten Ratten [108, 109]. Die zelluläre Aktivität der Proteinkinase Akt korreliert mit dem Ausmaß der Insulin-induzierten Phosphorylierung, sodass im vorliegenden Fettlebermodell durch die reduzierte Akt-Aktivität auf eine konsekutive Störung des Glukosestoffwechsels in steatotischen PHH geschlossen werden kann. Eine Quantifizierung der Glykogensynthese bzw. der Glukoneogenese könnte hier weitere Evidenz erbringen und sollte bei zukünftigen Untersuchungen bedacht werden.

Die Proteinkinase ERK mit den beiden Untereinheiten ERK1 und ERK2 steuert Insulin-vermittelt Differenzierung, Proliferation und Zellüberleben von Hepatozyten [26]. Zudem spielt der MAP-Kinase-Signalweg eine Rolle in der Signalkaskade von Zytokinen, bei der Zellzyklus-Regulation, der Expression von Genen sowie der Antagonisierung der Apoptose [110]. In Analogie zu den Ergebnissen beim PI3K-/Akt-Signalweg zeigte auch der MAP-Kinase-Signalweg im vorliegenden Modell in steatotischen PHH eine um 55% verminderte Phosphorylierung von ERK1/2 an den Insulin-spezifischen Aminosäureresten Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴ nach der Stimulation mit Insulin. Eine ebenso reduzierte ERK1/2-Phosphorylierung konnte in einem *in-vitro*-Modell der Insulinresistenz mit HepG2-Zellen bestätigt werden [105]. Insgesamt gibt es in der Literatur nur wenig publizierte Daten zur Phosphorylierung von ERK1/2 im Rahmen einer Insulinresistenz. Eine signifikant reduzierte Insulin-induzierte Phosphorylierung von ERK1/2 konnte eine Studie von Ruiz-Alcaraz *et al.* in Skelettmuskelbiopsien von jungen Männern mit Adipositas und nachgewiesener Insulinresistenz beobachten [111]. Ferner zeigten Muskelbiopsien von Insulin-resistenten Frauen im Rahmen eines polyzystischen Ovar-Syndroms eine verminderte Phosphorylierung von ERK1/2 nach Stimulation mit Insulin [112]. Eine mögliche Ursache der reduzierten ERK1/2-Phosphorylierung im Fall einer Insulinresistenz kann eine Störung der Signalweiterleitung durch ein Defekt der Insulin-Rezeptor-Substrate (IRS) sein [113]. Diesbezüglich sind weiterführende Untersuchungen notwendig und es sollte unbedingt auch die Phosphorylierung der Insulin-Rezeptor-Substrate analysiert werden. Zudem ist eine Analyse von Endpunkten des MAP-Kinase-Signalweges sinnvoll, um die direkten Auswirkungen der Insulinresistenz besser abschätzen zu können. Die Glykogensynthese spielt eine Schlüsselrolle bei der Insulin-vermittelten Reduktion der postprandialen Hyperglykämie. Eine wichtige Funktion hat dabei die Glykogensynthase-

Kinase 3 mit ihren beiden Isoformen GSK3 α und GSK3 β , welche nach Phosphorylierung durch Insulin in Form einer Derepression die Glykogensynthese stimuliert [24]. Mit freien Fettsäuren behandelte PHH zeigten eine um etwa 50% reduzierte Phosphorylierung der GSK3 α/β an den spezifischen Aminosäureresten Ser^{21/9} im Vergleich zur FFS-unbehandelten Kontrolle. Eine ebenso verminderte Phosphorylierung von GSK3 α/β konnte in verschiedenen Insulinresistenz-Modellen mit der humanen Zell-Linie HepG2 nachgewiesen werden [114, 104]. Beispielsweise zeigte So *et al.* in einem Insulinresistenzmodell mit HepG2-Zellen eine signifikant verminderte Phosphorylierung von GSK3 α/β nach einer 10-minütigen Stimulation mit 100 nM Insulin [105].

Der Transkriptionsfaktor FoxO1 vermittelt die Effekte von Insulin auf die Glukoneogenese in der Leber durch die gezielte Steuerung der Expression der Enzyme Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK) und Glukose-6-Phosphatase (G6PC). Die Phosphorylierung von FoxO1 durch Insulin bewirkt die Entfernung des Transkriptionsfaktors aus dem Zellkern, was durch die damit verbundene Reduktion der Enzym-Expression zu einer Hemmung der Glukoneogenese führt. Im vorliegenden Fettlebermodell zeigten die steatotischen PHH eine um 31% reduzierte Phosphorylierung von FoxO1 am spezifischen Aminosäurerest Ser²⁵⁶ im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Ein ähnliches Ergebnis offenbarte sich in einem Insulinresistenzmodell mit HepG2-Zellen. Hier war die FoxO1-Phosphorylierung nach Stimulation mit 100 nM Insulin für 10 Minuten signifikant reduziert [105]. Die verringerte Phosphorylierung von FoxO1 lässt eine gestörte Hemmung der Glukoneogenese in steatotischen Hepatozyten vermuten. Die verminderte Fähigkeit von Insulin zur Suppression der endogenen Glukoseproduktion ist ein wesentliches Merkmal der Insulinresistenz [115]. Zu einem ähnlichen Ergebnis kam eine Studie von Valenti *et al.* an insgesamt 84 Patienten, bei denen eine Leberbiopsie durchgeführt wurde [116]. Bei Patienten mit histopathologisch nachgewiesener *Steatosis hepatis* ergaben die Leberbiopsien hier eine verringerte Insulin-spezifische Phosphorylierung von FoxO1, wobei die deutlichste Reduktion der Phosphorylierung bei der Steatohepatitis nachgewiesen werden konnte. Auf molekularer Ebene zeigte die Studie von Valenti *et al.* einen Anstieg der transkriptionellen Aktivität von FoxO1 mit konsekutiver Steigerung der Produktion von Glukose. In Übereinstimmung zeigte sich in einem Mausmodell der Diät-induzierten Insulinresistenz eine Erhöhung der Genexpression von FoxO1 [117]. Eine mögliche Ursache ist der vor allem bei der NASH auftretende oxidative Stress in den Hepatozyten. Eine Studie von Frescas *et al.* konnte nachweisen, dass bei zusätzlich vorhandenem oxidativen Stress, der Transkriptionsfaktor FoxO1 weniger sensitiv auf Insulin reagiert [118]. Ein Insulinresistenzmodell der humanen Zell-Linie HepG2 stellte eine verminderte Phosphorylierung von FoxO1 bei erhöhter Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen fest [119]. In einem Modell mit adipösen ob/ob-Mäusen konnte ebenso eine reduzierte FoxO1-Phosphorylierung nachgewiesen werden, wobei eine Aktivierung der atypischen Proteinkinase C (aPKC) durch hepatische Ceramide eine Rolle zu spielen scheint [120].

Der Glukosetransporter Typ 2 (GLUT2) ist einer von bisher insgesamt 13 beim Menschen

identifizierten Glukosetransporterproteinen und wird neben Dünndarm und Niere vor allem in der Leber exprimiert [121]. GLUT2 ermöglicht den Hepatozyten die effektive Steuerung der Glukose-Aufnahme. Die mit freien Fettsäuren behandelten PHH hatten eine 20% höhere Expression von GLUT2 im Vergleich zur Kontrolle. Zu einem ähnlichen Ergebnis kam Okamoto *et al.* bei *in-vitro*-Untersuchungen an mit Ölsäure behandelten HepG2-Zellen [122]. Dies konnte bereits im Jahr 1991 an einem Mausmodell der Insulinresistenz mit einer signifikant erhöhten mRNA-Expression von GLUT2 in der Leber nachgewiesen [123] und in mehreren nachfolgenden *in-vivo*-Studien mit Streptozocin-induzierten diabetischen Mäusen bestätigt werden [124, 125]. Ebenso in einem Tiermodell der Insulinresistenz mit adipösen ob/ob-Mäusen wurde eine signifikante Steigerung der GLUT2-Expression nachgewiesen [126]. Die gesteigerte Expression von GLUT2 in der Leber erhöht die Glukosetransport-Aktivität sowohl für die zelluläre Aufnahme als auch Abgabe. Die gesteigerte hepatische Abgabe von Glukose in das Blut kann die Insulinresistenz im Sinne eines *Circulus vitiosus* verschlechtern [127].

Der Insulinrezeptor ist ein integrales Zellmembranprotein mit intrinsischer Aktivität von Tyrosinkinase und vermittelt die intrazelluläre Wirkung von Insulin. Die Bindung von Insulin an den Insulinrezeptor induziert eine Tyrosinphosphorylierung der Insulin-Rezeptor-Substrate (IRS), welche das Insulin-Signal auf nachgeordnete Stoffwechselwege, wie dem PI3K-/Akt- und MAP-Kinase-Signalweg, weiterleiten. Im vorliegenden Fettlebermodell zeigte das Insulinrezeptor-Gen (INSR) eine um 113% gesteigerte Expression bei steatotischen Hepatozyten im Vergleich zur Fettsäure-unbehandelten Kontrolle. Eine Studie von Yang *et al.* beobachtete ebenso eine erhöhte INSR-Expression bei mit Palmitinsäure behandelten HepG2-Zellen [128]. Die wenigen verfügbaren Daten in der Literatur liefern jedoch auch gegenteilige Ergebnisse. Eine Studie mit HepG2-Zellen bestätigte beispielsweise eine signifikante Reduktion der Insulinrezeptor-Expression im Rahmen einer Insulinresistenz [129].

Zusammenfassend stimmen die in dieser Arbeit erhobenen Daten mit zahlreichen Studien an Mausmodellen wie auch Fettlebermodellen an HepG2- oder Huh-7-Zellen überein. Die hohen Standardabweichungen bei den Analysen zur Phosphorylierung von Akt, ERK1/2, GSK3 α/β und FoxO1 sowie bei der Expression von GLUT2 und INSR im vorliegenden Modell sind vor dem Hintergrund ausgeprägter inter-individueller Spender-Charakteristika mit zum Teil vorbestehendem Diabetes mellitus zu werten und geben somit nur eine eingeschränkte Möglichkeit zur Extrapolation. Eine verschlechterte Insulin-Signaltransduktion wird konsekutiv weiterreichende Störungen des Zellstoffwechsels, vor allem aber auf die Glukosehomöostase sowie auf das Zellwachstum und -differenzierung, zur Folge haben. Als mögliche Ursache der verminderten Insulinsensitivität der Hepatozyten werden mit einer *Steatosis hepatis* einhergehende inflammatorische Prozesse vermutet, welche mit dem PI3K-/Akt- wie auch dem MAP-Kinase-Signalweg interagieren [130, 119]. Interessanterweise scheint Palmitinsäure im Vergleich zur Ölsäure die stärkeren Effekte in Hinblick auf Lipotoxizität und Interaktion mit dem Zellstoffwechsel zu haben [131]. Weiterführende Untersuchungen sind

auf diesem Gebiet notwendig, um die genauen pathobiochemischen Zusammenhänge der Insulinresistenz in der komplexen hepatischen Insulin-Signaltransduktion aufzuklären.

6.3 Zytotoxische Effekte von GEN

Nachdem Akiyama *et al.* im Jahr 1987 eine Hemmung der Tyrosin-spezifischen Protein-kinasen des EGF-Rezeptors (engl., epidermal growth factor, epidermaler Wachstumsfaktor) durch GEN nachweisen konnte, fokussierte sich die Forschung in der Folge auf die vielfältigen pharmakologischen Effekte des natürlichen Isoflavonoids [132]. Zahlreiche Publikationen zeigen eine zytoprotektive Rolle von Genistein als Fänger freier Radikale oder durch die gezielte Regulation von Genen zur Steuerung von Entzündungsreaktionen und Immunantworten [133, 134]. Zudem konnte ein signifikanter Schutz von Lipoproteinen vor Oxidation nachgewiesen werden [135]. Verschiedene Studien belegen auch eine anti-kanzerogene Wirkung von GEN durch die Induktion von Apoptose [136].

In diesem Spannungsfeld zwischen einerseits zytoprotektiven und andererseits apoptotischen Effekten war die Evaluation der Zytotoxizität von Genistein auf primäre humane Hepatozyten im Fettlebermodell ein Ziel der vorliegenden Arbeit. Hierfür wurden PHH in der Kontroll- und Steatosisgruppe in einer aufsteigenden Konzentrationsreihe mit 1, 5, 10, 50 und 100 μM Genistein für 24 Stunden behandelt.

Die Messung der Freisetzung der Lactatdehydrogenase (LDH) ist der am weitesten verbreiteste Indikator für eine Membranschädigung [137]. Neben der LDH wurde die Aspartat-Aminotransferase (AST), welche in hoher Konzentration in der Leber vorkommt, als zusätzlicher Surrogatparameter für die Zytotoxizität, wie bereits bei der Evaluation des Fettlebermodells, in dieser Arbeit verwendet. Die mit freien Fettsäuren behandelten, steatotischen PHH zeigten, wie bereits bei der Evaluation des Fettlebermodells, eine erhöhte Toxizität im Sinne einer Lipotoxizität. Über alle Genistein-Konzentrationen war im Mittel ein Anstieg der AST- und LDH-Werte um 65% bzw. 23% in steatotischen Hepatozyten, bei allerdings hohen Standardabweichungen, zu beobachten. Als eine Ursache der Lipotoxizität wird eine durch die Palmitin- und Ölsäure bedingte Stimulation der Apoptose durch Aktivierung von MAP-Kinasen, p53-Protein und des NF κ B-Signalweges angenommen [95, 96, 97]. Eine Unterscheidung zwischen dem Vorliegen einer Apoptose oder Nekrose ist anhand der erhobenen AST- und LDH-Werte nicht möglich, da bei beiden Vorgängen eine Freisetzung der zytoplasmatischen Enzyme beobachtet werden kann [138]. Hier sind gezielte Untersuchungen, beispielsweise mittels Apoptose-Assays, zur weiterführenden Toxizitätsanalyse notwendig. Zur Evaluation der metabolischen Kompetenz der Hepatozyten kam die Messung von Harnstoff zur Anwendung. Hierbei hatte die Behandlung mit Genistein keinen Einfluss auf die metabolische Kompetenz der PHH.

Bei den physiologisch im Blut erreichbaren Genistein-Konzentrationen von bis zu 10 μM [139] stellte sich in der Kontroll- und Steatosisgruppe keine gesteigerte Zytotoxizität durch

die Inkubation mit Genistein dar. Insbesondere in der Fettsäure-unbehandelten Kontrolle zeigte sich bei 1 bis 10 μM GEN eine unveränderte, Plateau-artige Viabilität im XTT-Test. Dieses korreliert mit den erhobenen Messwerten zu AST und LDH. Ähnliche Daten lieferten auch verschiedene *in-vitro*-Studien. Eine GEN-Konzentration $< 3,7 \mu\text{M}$ stimulierte das Zellwachstum von intestinalen IEC-18 Epithelzellen [140]. Proliferative Effekte konnten ebenso bei 1-2 μM GEN in HT-29 Kolonkarzinomzellen und bis zu 10 μM in MCF-7 Mammakarzinomzellen nachgewiesen werden [141, 142].

Eine Dosis-abhängige Zytotoxizität zeigte sich bei den höheren GEN-Konzentrationen von 50 und 100 μM . Der XTT-Assay ergab eine um 28% signifikant reduzierte Viabilität in der FFS-unbehandelten Kontrolle bei einer Konzentration von 100 μM GEN. In den steatotischen PHH konnte bei 50 μM GEN eine Reduktion um 23% und bei der höchsten GEN-Konzentration von 100 μM eine signifikante Reduktion der Viabilität um 45% beobachtet werden. Der AST-Assay bestätigte die Zytotoxizität in steatotischen PHH bei 100 μM GEN mit einem Anstieg um 140%, wobei die LDH bei höheren GEN-Konzentrationen keine erhöhte Toxizität anzeigte. Die hohen Standardabweichungen bei den Toxizitäts-Assays sind wiederum auf die Vielzahl an humanen Spendern mit einer jeweils unterschiedlichen Vorschädigung der Leber (z.B. Adipositas, NASH, neoadjuvante Chemotherapie oder intraoperatives Pringle-Manöver) zurückzuführen. In Übereinstimmung mit den Daten in dieser Arbeit konnten verschiedene *in-vitro*-Studien pro-apoptotische bzw. anti-kanzerogene Effekte bei höheren Genistein-Konzentrationen in Abhängigkeit von Inkubationszeit und Dosierung nachweisen. Die Behandlung von Caco-2 und HT-29 Kolonkarzinomzellen mit 100 μM GEN für 48 Stunden reduzierte beispielsweise die Viabilität um 25-40% und verursachte einen Zellzyklus-Arrest in der G2/M-Phase [143]. Dieses bestätigten weitere Studien an humanen PC-3 Prostatakarzinomzellen und SK-OV-3 Ovarialkarzinomzellen [144, 145]. Ferner induzierte eine Inkubation mit 100 μM GEN für 48 Stunden eine Apoptose durch Interaktion mit dem Endoplasmatischen Retikulum sowie Aktivierung der Caspasen 3, 7 und 12 in hepatozellulären Hep3B-Karzinomzellen [146]. Bei GEN-Konzentrationen über 20 μM und einer Inkubationszeit von 24 Stunden konnte Rucinska *et al.* eine signifikante Reduktion der Viabilität bei NIH-3T3-Mausfibroblasten zeigen, wobei bei den Konzentrationen von 5 und 10 μM keine toxischen Effekte nachgewiesen werden konnten [147]. Die Konzentration von 15 bis 60 μM GEN mit einer Inkubationszeit von 24 Stunden induzierten Apoptose in T-Lymphomzellen der Maus durch eine Depolarisation der Mitochondrien und Aktivierung der Caspasen 3 und 9 [148]. Ebenso eine mitochondriale Schädigung mit Freisetzung von Cytochrom c sowie eine Caspasen-Aktivierung konnte in humanen SH-SY5Y Neuroblastomzellen durch die Behandlung mit 100 μM GEN nachgewiesen werden [149].

Zusammenfassend bestätigt sich der aus zahlreichen *in-vitro*- und *in-vivo*-Studien beobachtete „biphasische Effekt“ von Genistein auch an PHH im vorliegenden Fettlebermodell. Während die physiologischen Konzentrationen bis 10 μM keine toxischen Effekte aufwiesen, zeigte sich vor allem in steatotischen PHH eine signifikante Dosis-abhängige Zytotoxizität

von Genistein bei den höheren Konzentrationen von 50 und 100 μM . Keinen Einfluss hatte die Behandlung mit Genistein auf die metabolische Kompetenz der Hepatozyten. Mögliche Ursachen der pro-apoptotischen Wirkung in hohen Dosierungen sind Zellzyklus-Arrest, Tyrosinkinase-Hemmung, DNA- und Mitochondrien-Schädigungen, pro-oxidative Prozesse sowie die Aktivierung von Apoptose-Signalwegen. Die genauen Mechanismen der multiplen und komplexen Wirkungen von GEN sind noch weitestgehend unklar und bedürfen weiterer Untersuchungen.

6.4 Wirkung von GEN auf die Insulin-Signaltransduktion

Die hepatische Insulinresistenz spielt eine Schlüsselrolle bei der metabolischen Dysfunktion im Rahmen der nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung und kann als wichtiger Ansatzpunkt sowohl für die Prävention als auch für die Therapie der NAFLD angesehen werden. Neben einer kalorienreduzierten und gesunden Ernährungsweise umfassen die gegenwärtigen Therapiestrategien auch pharmakologische Interventionen, beispielsweise mittels anti-oxidativer, Lipid-senkender oder Insulin-sensitiverender Medikation.

Das Isoflavonoid Genistein hat in zahlreichen *in-vivo*- und *in-vitro*-Studien positive Effekte auf die Regulation des Glukosestoffwechsels im Falle einer Insulinresistenz gezeigt [62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69]. Ein besseres Verständnis der molekularen Angriffspunkte von GEN auf die hepatische Insulin-Signaltransduktion könnte für zukünftige Therapiestrategien der NAFLD von Bedeutung sein.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von GEN in einer aufsteigenden Konzentrationsreihe von 1 bis 100 μM und einer Inkubationszeit von 24 Stunden auf zwei der zentralen Signalwege der Insulin-Signalkaskade, dem Phosphatidylinositol-3-Kinase(PI3K)/Akt- sowie dem MAP-Kinase-Weg, im *in-vitro*-Fettlebermodell mit nachgewiesener Insulinresistenz untersucht.

Die Proteinkinase Akt ist der zentrale Regulator des hepatischen Glukosestoffwechsels. Nach der Behandlung mit GEN zeigte sich bei insgesamt hoher Schwankungsbreite ein diametraler Effekt auf die Akt-Phosphorylierung in Abhängigkeit von der Genistein-Konzentration zwischen der Kontrolle und der mit freien Fettsäuren behandelten, steatotischen PHH. In der Kontrolle war mit ansteigender GEN-Konzentration eine Zunahme der Insulin-abhängigen Akt-Phosphorylierung zu beobachten. Während bei 1 μM GEN die Akt-Phosphorylierung um 25% erhöht war, konnte bei der Konzentration von 100 μM GEN ein Anstieg um 110% beobachtet werden. Demgegenüber zeigten die steatotischen PHH nach Behandlung mit Genistein einen Abfall der Akt-Phosphorylierung, ebenfalls in Abhängigkeit von der Genistein-Dosierung. Bei 1 μM GEN war die Phosphorylierung um 29% reduziert und bei 100 μM GEN bereits um 71%. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich somit nur in der Kontrolle ein positiver, insulinotroper Effekt auf die Phosphorylierung von Akt. In der Literatur liegen nur sehr wenige Daten zum Einfluss von GEN auf die Akt-Phosphorylierung in der Leber vor und die-

se zeigen ein breites Spektrum an Effekten. Eine insulinotrope Genistein-Wirkung durch eine gesteigerte Akt-Phosphorylierung bestätigte ein Tiermodell, allerdings mit adipösen Mäusen. Hier zeigte sich eine Steigerung der Insulin-vermittelten Akt-Phosphorylierung in der Leber, allerdings nach einer Genistein-Diät für 45 Tage [150]. Die damit einhergehende Verbesserung der Insulinsensitivität führen die Autoren auf eine Aktivierung der AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK) durch Genistein zurück. Demgegenüber erbrachte eine Studie von Kim *et al.* eine signifikante Reduktion der Phosphorylierung von Akt mit zunehmender GEN-Konzentration bis zu 100 μM an humanen HT-29-Kolonkarzinomzellen, möglicherweise durch eine Interaktion mit dem insulinähnlichen Wachstumsfaktor 1 (engl., insulin-like growth factor 1, IGF-1) [151]. Auch an humanen HEK293-Nierenzellen wurde eine signifikant reduzierte Akt-Phosphorylierung bei 1 und 5 μM GEN, vermutlich durch Interaktion mit dem Wnt-Signalweg, nachgewiesen [152]. Zukünftige Studien sollten deshalb auch in der Signalkaskade vorgeschaltete Moleküle wie IGF-1 oder Insulin-Rezeptor-Substrate näher analysieren, um potentielle Angriffspunkte von GEN zu detektieren.

Der MAP-Kinase-Signalweg mit der Serin/Threonin-Kinase ERK1/2, bestehend aus den beiden Isoformen ERK1 und ERK2, steuert mittels Insulin-vermittelter Phosphorylierungskaskade Zellwachstum und -differenzierung [26]. In der vorliegenden Arbeit zeigten die FFS-unbehandelten PHH nach der Inkubation mit Genistein keine wesentliche Änderung der ERK1/2-Phosphorylierung. In steatotischen PHH deutete sich im Trend ein dosisabhängiger, insulinotroper Effekt durch einen moderaten Anstieg der Phosphorylierung von ERK1/2 mit zunehmender Konzentration ab 5 μM GEN an. In der Literatur gibt es diesbezüglich bisher keine organspezifischen Daten zur Leber. Insulinotrope Effekte von GEN durch Aktivierung von ERK1/2 mittels gesteigerter Phosphorylierung konnten beispielsweise an pankreatischen INS1-Beta-Zellen der Ratte sowie an humanen Inselzellen bei einer Konzentration von 5 μM GEN und einem Behandlungszeitraum von 48 Stunden beobachtet werden [153]. Ähnliche Daten lieferte eine Studie von Elmarakby *et al.* mit einem diabetischen Mausmodell an Nierenzellen nach wiederholten Injektionen von GEN über einen Zeitraum von 10 Wochen [154]. Eine durch GEN gesteigerte ERK1/2-Phosphorylierung zeigte hier einen zytoprotektiven Effekt durch Hemmung von Entzündungsprozessen und oxidativem Stress. Interessanterweise konnten jedoch auch gegenteilige, pro-apoptotische Wirkungen von GEN auf den MAP-Kinase-Signalweg aufgezeigt werden. Eine Verringerung der ERK1/2-Phosphorylierung mit einhergehender Stimulation der Apoptose ergab sich nach der Behandlung von Hep3B-Zellen mit 100 μM GEN für die Zeiträume von 6 bis 48 Stunden [146]. Als Ursache der Apoptose-Induktion wird eine mitochondriale Schädigung durch die Genistein-Exposition genannt. Auch eine Studie an humanen HeLa-Zervixkarzinomzellen konnte eine Hemmung der ERK1/2-Phosphorylierung durch eine kurzzeitige Behandlung mit 10 μM GEN für 2 Stunden nachweisen, wodurch eine gesteigerte Apoptose hervorgerufen wurde [155]. In Zusammenschau der mit einer NAFLD einhergehenden oxidativen Prozesse in der Leber und der in dieser Arbeit nachgewiesenen, dosis-abhängigen Steigerung der

ERK1/2-Phosphorylierung in steatotischen PHH, könnte GEN potentiell eine insulinotrope wie auch hepato-protective Funktion in Abhängigkeit von der Dosierung ausüben. Der Einfluss von Genistein auf inflammatorische und oxidative Zellvorgänge sollte in weiteren Studien deshalb gezielt untersucht werden.

Die Glykogensynthase-Kinase 3 (GSK3) mit der α - und β -Untereinheit reguliert in Abhängigkeit von Insulin die hepatische Glykogensynthese. In der Kontroll- und Steatosisgruppe zeigte sich eine gesteigerte Phosphorylierung von GSK3 α/β mit zunehmender GEN-Konzentration. Dieser Effekt war in der Kontrolle bei der GEN-Konzentration von 100 μM mit einem 9,3-fachen Anstieg und in steatotischen PHH bei 50 μM GEN mit einem 1,77-fachen Anstieg am ausgeprägtesten. Insgesamt zeigte sich in beiden Gruppen mit einem Dosis-abhängigen Anstieg der GSK3 α/β -Phosphorylierung ein insulinotroper Effekt von Genistein und lässt eine damit verbundene Steigerung der Glykogensynthese vermuten. Dieses hätte einen positiven Effekt auf die Glukosehomöostase im Rahmen einer Insulinresistenz. Weiterführend sollten diesbezüglich Stoffwechselendprodukte, wie der zelluläre Glykogengehalt, analysiert werden. In der Literatur liegen nahezu keine Daten zum Einfluss von GEN auf die Glykogensynthase-Kinase 3 vor. Eine Studie mit humanen HEK293-Nierenzellen dokumentierte eine verminderte Phosphorylierung von GSK3 β bei GEN-Konzentration von 1 und 5 μM , am ehesten durch eine Interaktion mit dem onkogenen Wnt-Signalweg [152].

Im vorliegenden Fettlebermodell war nach der Behandlung mit GEN eine Phosphorylierungsanalyse des Transkriptionsfaktors FoxO1 aufgrund eines Signals unterhalb der Nachweisgrenze nicht möglich. Neben der Möglichkeit eines Messfehlers ist eine ausgeprägte Reduzierung der FoxO1-Phosphorylierung, sowohl in der Kontrolle als auch in steatotischen PHH, durch mit der *in-vitro*-Kultivierung einhergehende inflammatorische Prozesse denkbar [119]. Zur Evaluation des Einflusses von GEN auf FoxO1 sind zukünftig weitere Untersuchungen, beispielsweise auch mittels gezielter Analyse der FoxO1-Expression und des nicht-phosphorylierten FoxO1-Proteins, notwendig.

Der Glukosetransporter Typ 2 (GLUT2) ist der hauptsächliche Transporter für Glukose in der Leber und ermöglicht den Hepatozyten die effektive Aufnahme von Glukose. Während sich in FFS-unbehandelten PHH kein Effekt von GEN zeigte, konnte in der vorliegenden Arbeit in steatotischen PHH im Trend ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Expression von GLUT2 bei 50 und 100 μM GEN beobachtet werden. Dieses kann eine erhöhte Glukose-Sensitivität zur Folge haben und zeigt damit möglicherweise eine insulinotrope Wirkung von GEN. Zum organspezifischen Einfluss von GEN auf die GLUT2-Expression in der Leber liegen in der Literatur keine publizierten Daten vor. Einen Genistein-induzierten Anstieg der GLUT2-Expression zeigte eine Tierstudie von Nordentoft *et al.* an diabetischen KKA γ -Mäusen. Nordentoft konnte aufzeigen, dass eine Diät mit Sojabohnen-Protein für 9 Wochen einen signifikanten Anstieg der GLUT2-Expression in Pankreaszellen zur Folge hatte [156]. Demgegenüber erbrachte eine *in-vitro*-Studie an INS-1 Pankreaszellen der Ratte nach einer Inkubation mit 1 bis 5 μM Genistein für 48 Stunden keine nachweisbare Änderung der

GLUT2-Expression [153]. In der Literatur gibt es widersprüchliche Aussagen bezüglich des Nutzen einer erhöhten GLUT2-Expression in der Leber. Neben einer verbesserten Glukose-Sensitivität und -aufnahme kann eine gesteigerte Glukose-Ausfuhr aus den Hepatozyten auch einen Anstieg der Glukosekonzentration im Blut und eine damit einhergehende Verschlechterung der Insulinresistenz zur Folge haben. Die Extrapolation der erhobenen Daten zum Glukosetransporter Typ 2 ist in Hinblick auf die hohen Standardabweichungen in den PHH nur eingeschränkt möglich und sollte in weiterführenden Untersuchungen neben der Quantifizierung des membranständigen GLUT2-Proteins enger mit den Spender-Charakteristika (v.a. vorbestehenden Diabetes mellitus) korreliert werden. Zudem ist eine Variation des Behandlungszeitraumes mit GEN sinnvoll, um kurzfristige von längerfristigen Effekten diskriminieren zu können.

Der Insulinrezeptor (INSR) vermittelt als integrales Membranprotein die intrazelluläre Wirkung von Insulin durch Tyrosinkinase-Aktivität und nachfolgender Weiterleitung von Phosphorylierungsprozessen. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich in der FFS-unbehandelten Kontrolle im Trend ein moderater, konzentrationsabhängiger Anstieg der Expression des Insulinrezeptors. In steatotischen PHH konnte bei der höchsten GEN-Konzentration von 100 μM ein Anstieg der Expression des INSR beobachtet werden, was eine verbesserte Insulin-Signaltransduktion durch Genistein suggeriert. Bei sehr wenigen diesbezüglich publizierten Daten, konnte in einem Modell mit diabetischen Mäusen eine 9-wöchige Diät mit Sojabohnen-Protein keinen Effekt auf die Expression des Insulinrezeptors in Pankreaszellen auslösen [156].

Zusammenfassend zeigte Genistein, in Übereinstimmung mit publizierten Studien unterschiedlicher Arbeitsgruppen, auch in der vorliegenden Arbeit in Abhängigkeit von der Dosierung unterschiedliche Effekte auf die Phosphorylierung und Expression von wichtigen Molekülen der Insulin-Signalkaskade in der Kontrolle und in steatotischen PHH. Im Allgemeinen zeigten sich bei allen untersuchten Zielmolekülen der Insulin-Signalkaskade hohe Standardabweichungen bei den Messwerten, welches zu einem großen Anteil auf die inter-individuellen Unterschiede zwischen den einzelnen humanen Hepatozyten-Spendern zurückzuführen ist. Zusammen mit der geringen Fallzahl erschwerte diese Tatsache die Extrapolation der erhobenen Daten deutlich.

Eine insulinotrope Wirkung durch eine gesteigerte Phosphorylierung zeigte sich in der mit FFS-unbehandelten Kontrolle bei den Proteinen Akt, ERK1/2 und GSK3 α/β sowie einer erhöhten Expression des Insulinrezeptors. In steatotischen PHH konnte ein insulinotroper Effekt durch eine gesteigerte Phosphorylierung bei ERK1/2, GSK3 α/β bzw. eine erhöhte Expression des Glukosetransporters Typ II sowie des Insulinrezeptors nachgewiesen werden. Wie bereits die Ergebnisse zur Toxizität zeigten, waren auch bei der Modulation der hepatischen Insulin-Signaltransduktion biphasische Effekte zwischen niedriger und hoher GEN-Konzentration zu beobachten. Unterschiede zu den in verschiedenen Zell- und Tiermodellen erhobenen Daten ergeben sich neben einem Zell-spezifischen Metabolismus vor allem durch

das breite Spektrum an unterschiedlichen Zeiträumen und Dosierungen der Behandlung mit Genistein. Nichtsdestotrotz zeigt Genistein die Tendenz zu einer insulinotropen Wirkung und kann somit einen potentiellen Ansatzpunkt zur Therapie der Insulinresistenz im Rahmen einer NAFLD darstellen.

6.5 Limitationen des Fettlebermodells

Trotz der guten Abbildung von *in-vivo*-Bedingungen der NAFLD im vorliegenden *in-vitro*-Modell der Fettleber gibt es eine Vielzahl an Limitationen, die bei der Extrapolation der experimentell erhobenen Daten beachtet werden müssen.

Die Zellisolierung und Kultivierung von primären humanen Hepatozyten ist ein schwieriges und aufwendiges Verfahren und die Zellviabilität beträgt im besten Fall etwa 75%. Trotz unterschiedlicher Isolierungsprotokolle wird eine durchschnittliche Viabilität um 40% beschrieben [157]. Zudem proliferieren *in-vitro* kultivierte PHH nicht, neigen zu einer schnellen Dedifferenzierung und überleben durchschnittlich nicht länger als 10 Tage. Nichtsdestotrotz sind primäre humane Hepatozyten weiterhin der Goldstandard in der *in-vitro*-Forschung. PHH reflektieren die gesamte Funktionalität der Leber und liefern prädiktive Daten für die pharmakologische und toxikologische Forschung. Zudem offeriert die Isolierung von Hepatozyten verschiedener Spender die Möglichkeit zur Analyse eines breiten Spektrums an genetischen Polymorphismen [72]. Demgegenüber weisen die weitverbreiteten, immortalisierten Karzinomzell-Linien, wie beispielsweise HepG2 und HuH-7, unter anderem intrinsische p53-Mutationen auf und sind deshalb in der Extrapolation erhobener Daten eingeschränkt und nicht für alle wissenschaftlichen Fragestellungen geeignet. Ferner weisen die schnellproliferierenden Zell-Linien durch die Transformation nicht alle Hepatozyten-spezifischen Funktionen auf und sind gegenüber toxischen Effekten weniger sensitiv [72].

Ein wichtiger Kritikpunkt des vorliegenden Fettlebermodells sind die inter-individuellen Charakteristika der Spender. Eine Studie von Lee *et al.* untersuchte das Ergebnis von insgesamt 1034 Hepatozytenisolierungen und konnte einen signifikanten Einfluss von Alter, BMI, Leberfettgehalt, Leberschädigung und klinischen Parametern (Leberenzyme, Bilirubin, Gerinnung) auf die Viabilität der PPH nachweisen [158]. Die Durchführung einer Chemotherapie, Alkohol- oder Nikotinabusus, der pathohistologische Leberbefund (z.B. Infektionen, *Steatosis*, Fibrose, Zirrhose, Karzinom) oder eine vorbestehende Insulinresistenz bzw. Diabetes mellitus, bedingen die hohen Standardabweichungen in den Messwerten und haben nachweislich einen erheblichen Einfluss auf Zellviabilität und -funktionalität [73, 72]. Vor allem auch die Warmischämiezeit, beispielsweise durch die intraoperative Unterbindung der Blutzufuhr zur Leber mittels sogenanntem Pringle-Manöver, sowie die Kaltischämiezeit durch den Gewebetransport vom Op-Saal zum Forschungslabor beeinflussen die Quantität und Qualität der Leberzellisolierung nachweislich [159]. Zudem können mit unbekanntem Fettstoffwechselstörungen, chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen, eine veränderte Ernährung

(parenteral, Mangelernährung, Kurzdarmsyndrom) oder auch die Einnahme hepatotoxischer Medikamente bereits sekundäre Ursachen einer vorbestehenden Fettleber vorliegen. Diesbezüglich erbrachte eine Metabolisierungsstudie an PHH mit dem nicht-opioiden Analgetikum Aceclofenac von Ponsoda *et al.* den Nachweis, daß die Variabilität der Messwerte die unterschiedlichen Phänotypen der Leberzellspender widerspiegelt [160]. Zu einem ähnlichen Ergebnis kam eine Studie von Gómez-Lechón *et al.* nach Messung der Heterogenität der P450-Expression [161].

Eine bedeutende Limitation für eine Ausweitung der Nutzung des humanen Fettlebermodells stellt neben ethischen Aspekten die eingeschränkte Verfügbarkeit von humanem Lebergewebe dar. Gesundes Leberparenchym steht nur selten für die Forschung zur Verfügung und ist in ständiger Konkurrenz zu klinischen Anwendungen, wie Hepatozytentransplantation oder artifiziellen Leberunterstützungssystemen. In diesem Zusammenhang zeigen sich humane Kadaverspenden, welche für eine Lebertransplantation ungeeignet sind, als eine potentielle Quelle für die Isolierung hochwertiger Hepatozyten [162, 161]. Als weiterer Nachteil ist der sehr kosten- und zeitintensive Prozess der Hepatozytenisolierung anzusehen, der ein gut organisiertes Netzwerk zwischen Klinik und Forschung voraussetzt.

6.6 Schlussfolgerung und Ausblick

Das in dieser Arbeit an primären humanen Hepatozyten etablierte Modell der *Steatosis hepatis* ist eine valide *in-vitro*-Abbildung der *in-vivo*-Gegebenheiten einer nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung hinsichtlich Lipidgehalt, Lipotoxizität und metabolischer Kompetenz. Die hepatische Insulinresistenz, als zentrale metabolische Dysfunktion im Rahmen einer NAFLD, konnte im Modell durch eine verminderte Insulin-induzierte Phosphorylierung der zentralen Zielmoleküle der Insulin-Signalkaskade Akt, ERK1/2, GSK3 α/β und FoxO1 sowie einer gesteigerten Expression des Glukosetransporters Typ II und des Insulinrezeptors auf molekularer Ebene nachgewiesen werden. Das vorliegende humane Fettlebermodell stellt somit eine geeignete, standardisierte Basis zur reproduzierbaren und reliablen *in-vitro*-Erforschung von Pathomechanismen der NAFLD und Insulinresistenz sowie zur Entwicklung von neuen Therapiestrategien dar. Ferner könnte ein validiertes Fettlebermodell die Lücke zwischen präklinischen Tierversuchen und klinischen Studien gezielt schließen.

Das natürlich vorkommende Isoflavonoid Genistein zeigt, wie bereits verschiedene Studien belegen, auch in der vorliegenden Arbeit einen biphasischen Effekt bezüglich der Zytotoxizität. Während die im Blut physiologisch erreichbaren Konzentrationen bis 10 μM Genistein keine wesentliche Toxizität aufwiesen, zeigten vor allem steatotische Hepatozyten bei einer Behandlung mit 50 und 100 μM eine signifikant reduzierte Viabilität. Mögliche Ursachen hierfür sind die Aktivierung pro-apoptotischer Signalwege, eine mitochondriale Schädigung, oxidative Prozesse und eine Interaktion mit dem Zellzyklus oder Wnt-Signalweg in höheren Konzentrationen, welche unter anderem auch für die bekannte anti-kanzerogene Wirkung

von Genistein diskutiert werden. Diesbezüglich sind weitere Datenerhebungen in höheren Fallzahlen notwendig, beispielsweise mittels Messung freier Sauerstoffradikale oder der Bestimmung von Zytokinen.

Eine Dosis-abhängige, insulinotrope Wirkung von Genistein zeigte sich in der Fettsäure-unbehandelten Kontrolle und in steatotischen PHH durch eine gesteigerte Phosphorylierung von ERK1/2 und GSK3 α/β bzw. einer gesteigerten Expression des Glukosetransporters Typ II sowie des Insulinrezeptors. Diese Effekte könnten eine verbesserte zelluläre Glukosehomöostase zur Folge haben und einen positiven Einfluss auf Regeneration sowie Aufrechterhaltung und Stabilität der Hepatozyten-Differenzierung ausüben. Erklärungsansätze sind eine durch Genistein induzierte Aktivierung der AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK) und eine Interaktion mit dem Wnt-Signalweg. Weiterführende Untersuchungen zum Einfluss von Genistein auf die hepatische Signaltransduktion sollten neben der Analyse genannter Signalwege und der Variation von Konzentration und Behandlungszeitraum auch Messungen von Stoffwechselendprodukten, wie beispielsweise Glukose- und Glykogengehalt, beinhalten. In diesem Zusammenhang sollten auch in der Insulin-Signalkaskade weiter vorgelagerte Zielmoleküle wie die Insulin-Rezeptor-Substrate (IRS) Beachtung finden, da es Evidenz für eine frühe Interaktion von Genistein mit dem Insulin-Signalweg gibt. Zudem ist ein *in-vitro*-Vergleich mit bereits etablierten Insulin-Sensitizern, wie beispielsweise Rosiglitazon, sinnvoll. Zur besseren Abbildung der *in-vivo*-Situation unter Beachtung von Zell-Zell- sowie Zell-Extrazellulärmatrix-Wechselwirkungen und parakrinen Effekten kommt die Etablierung des Fettlebermodells in dynamischen 3D-Zellkulturen, zum Beispiel mittels Bioreaktor-Technologie, in Betracht.

Zusammenfassend sind die genauen molekularen Mechanismen der komplexen intrazellulären Effekte des biologisch aktiven Isoflavonoids Genistein auf Insulin-responsive Signalwege in humanen Hepatozyten noch weitestgehend unklar und bedürfen weiterer intensiver Forschung.

7 Literaturverzeichnis

- [1] E. Pfeiffer, V. Kegel, K. Zeilinger, J. G. Hengstler, A. K. Nussler, D. Seehofer, and G. Damm. Featured article: Isolation, characterization, and cultivation of human hepatocytes and non-parenchymal liver cells. Exp Biol Med (Maywood), 240(5):645–56, 2015.
- [2] WHO. Obesity and overweight fact sheet no. 311. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>, 2014.
- [3] L. Webber, D. Divajeva, T. Marsh, K. McPherson, M. Brown, G. Galea, and J. Breda. The future burden of obesity-related diseases in the 53 who european-region countries and the impact of effective interventions: a modelling study. BMJ Open, 4(7):e004787, 2014.
- [4] G. Vernon, A. Baranova, and 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(3):274–85, 2011.
- [5] M. Blachier, H. Leleu, M. Peck-Radosavljevic, D. C. Valla, and F. Roudot-Thoraval. The burden of liver disease in europe: a review of available epidemiological data. J Hepatol, 58(3):593–608, 2013.
- [6] M. Lazo, R. Hernaez, M. S. Eberhardt, S. Bonekamp, I. Kamel, E. Guallar, A. Koteish, F. L. Brancati, and J. M. Clark. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in the united states: the third national health and nutrition examination survey, 1988-1994. Am J Epidemiol, 178(1):38–45, 2013.
- [7] J. B. Schwimmer, R. Deutsch, T. Kahen, J. E. Lavine, C. Stanley, and C. Behling. Prevalence of fatty liver in children and adolescents. Pediatrics, 118(4):1388–93, 2006.
- [8] T. Effertz, S. Engel, F. Verheyen, and R. Linder. The costs and consequences of obesity in germany: a new approach from a prevalence and life-cycle perspective. Eur J Health Econ, 17(9):1141–1158, 2016.
- [9] J. Ludwig, T. R. Viggiano, D. B. McGill, and B. J. Oh. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo clinic experiences with a hitherto unnamed disease. Mayo Clin Proc, 55(7):434–8, 1980.
- [10] M. M. Yeh and E. M. Brunt. Pathological features of fatty liver disease. Gastroenterology, 147(4):754–64, 2014.
- [11] R. Adam, M. Reynes, M. Johann, M. Morino, I. Astarcioglu, I. Kafetzis, D. Castaing, and H. Bismuth. The outcome of steatotic grafts in liver transplantation. Transplant Proc, 23(1 Pt 2):1538–40, 1991.

- [12] R. Bataller, K. Rombouts, J. Altamirano, and F. Marra. Fibrosis in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 25(2):231–44, 2011.
- [13] S. H. Caldwell and D. M. Crespo. The spectrum expanded: cryptogenic cirrhosis and the natural history of non-alcoholic fatty liver disease. J Hepatol, 40(4):578–84, 2004.
- [14] M. Stepanova and Z. M. Younossi. Independent association between nonalcoholic fatty liver disease and cardiovascular disease in the us population. Clin Gastroenterol Hepatol, 10(6):646–50, 2012.
- [15] M. Ekstedt, L. E. Franzen, U. L. Mathiesen, L. Thorelius, M. Holmqvist, G. Bode-mar, and S. Kechagias. Long-term follow-up of patients with nafld and elevated liver enzymes. Hepatology, 44(4):865–73, 2006.
- [16] N. Chalasani, Z. Younossi, J. E. Lavine, A. M. Diehl, E. M. Brunt, K. Cusi, M. Charl-ton, and A. J. Sanyal. 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. Hepatology, 55(6):2005–23, 2012.
- [17] C. P. Day and O. F. James. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? Gastroenterology, 114(4):842–5, 1998.
- [18] E. Buzzetti, M. Pinzani, and E. A. Tsochatzis. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (nafld). Metabolism, 65(8):1038–48, 2016.
- [19] A. E. Feldstein, N. W. Werneburg, A. Canbay, M. E. Guicciardi, S. F. Bronk, R. Ryd-zewski, L. J. Burgart, and G. J. Gores. Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating tnf-alpha expression via a lysosomal pathway. Hepatology, 40(1):185–94, 2004.
- [20] J. K. Dowman, J. W. Tomlinson, and P. N. Newsome. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. QJM, 103(2):71–83, 2010.
- [21] C. M. Taniguchi, B. Emanuelli, and C. R. Kahn. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. Nat Rev Mol Cell Biol, 7(2):85–96, 2006.
- [22] P. R. Shepherd, D. J. Withers, and K. Siddle. Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. Biochem J, 333 (Pt 3):471–90, 1998.
- [23] D. R. Alessi, M. Andjelkovic, B. Caudwell, P. Cron, N. Morrice, P. Cohen, and B. A. Hemmings. Mechanism of activation of protein kinase b by insulin and igf-1. EMBO J, 15(23):6541–51, 1996.

- [24] D. A. Cross, D. R. Alessi, P. Cohen, M. Andjelkovich, and B. A. Hemmings. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase b. Nature, 378(6559):785–9, 1995.
- [25] J. Nakae, T. Kitamura, D. L. Silver, and D. Accili. The forkhead transcription factor foxo1 (fkhr) confers insulin sensitivity onto glucose-6-phosphatase expression. J Clin Invest, 108(9):1359–67, 2001.
- [26] S. B. Biddinger and C. R. Kahn. From mice to men: insights into the insulin resistance syndromes. Annu Rev Physiol, 68:123–58, 2006.
- [27] G. M. Reaven. Banting lecture 1988. role of insulin resistance in human disease. Diabetes, 37(12):1595–607, 1988.
- [28] N. Chalasani, M. A. Deeg, S. Persohn, and D. W. Crabb. Metabolic and anthropometric evaluation of insulin resistance in nondiabetic patients with nonalcoholic steatohepatitis. Am J Gastroenterol, 98(8):1849–55, 2003.
- [29] M. Gaggini, M. Morelli, E. Buzzigoli, R. A. DeFronzo, E. Bugianesi, and A. Gastaldelli. Non-alcoholic fatty liver disease (nafl) and its connection with insulin resistance, dyslipidemia, atherosclerosis and coronary heart disease. Nutrients, 5(5):1544–60, 2013.
- [30] J. Koska, N. Stefan, P. A. Permana, C. Weyer, M. Sonoda, C. Bogardus, S. R. Smith, D. R. Joannise, T. Funahashi, J. Krakoff, and J. C. Bunt. Increased fat accumulation in liver may link insulin resistance with subcutaneous abdominal adipocyte enlargement, visceral adiposity, and hypoadiponectinemia in obese individuals. Am J Clin Nutr, 87(2):295–302, 2008.
- [31] R. Hage Hassan, O. Bourron, and E. Hajduch. Defect of insulin signal in peripheral tissues: Important role of ceramide. World J Diabetes, 5(3):244–57, 2014.
- [32] G. Marchesini, M. Brizi, A. M. Morselli-Labate, G. Bianchi, E. Bugianesi, A. J. McCullough, G. Forlani, and N. Melchionda. Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. Am J Med, 107(5):450–5, 1999.
- [33] A. Brea and J. Puzo. Non-alcoholic fatty liver disease and cardiovascular risk. Int J Cardiol, 167(4):1109–17, 2013.
- [34] E. Bugianesi, A. Gastaldelli, E. Vanni, R. Gambino, M. Cassader, S. Baldi, V. Ponti, G. Pagano, E. Ferrannini, and M. Rizzetto. Insulin resistance in non-diabetic patients with non-alcoholic fatty liver disease: sites and mechanisms. Diabetologia, 48(4):634–42, 2005.
- [35] B. Q. Starley, C. J. Calcagno, and S. A. Harrison. Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma: a weighty connection. Hepatology, 51(5):1820–32, 2010.

- [36] G. Perseghin. Viewpoints on the way to a consensus session: where does insulin resistance start? the liver. Diabetes Care, 32 Suppl 2:S164–7, 2009.
- [37] D. M. Ferreira, R. E. Castro, M. V. Machado, T. Evangelista, A. Silvestre, A. Costa, J. Coutinho, F. Carepa, H. Cortez-Pinto, and C. M. Rodrigues. Apoptosis and insulin resistance in liver and peripheral tissues of morbidly obese patients is associated with different stages of non-alcoholic fatty liver disease. Diabetologia, 54(7):1788–98, 2011.
- [38] R. Lozano, M. Naghavi, K. Foreman, S. Lim, K. Shibuya, and Z. A. Memish. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the global burden of disease study 2010. Lancet, 380(9859):2095–128, 2012.
- [39] M. Selzner and P. A. Clavien. Fatty liver in liver transplantation and surgery. Semin Liver Dis, 21(1):105–13, 2001.
- [40] J. Y. Lee, K. M. Kim, S. G. Lee, E. Yu, Y. S. Lim, H. C. Lee, Y. H. Chung, Y. S. Lee, and D. J. Suh. Prevalence and risk factors of non-alcoholic fatty liver disease in potential living liver donors in korea: a review of 589 consecutive liver biopsies in a single center. J Hepatol, 47(2):239–44, 2007.
- [41] A. Marcos, R. A. Fisher, J. M. Ham, M. L. Shiffman, A. J. Sanyal, V. A. Luketic, R. K. Sterling, A. S. Fulcher, and M. P. Posner. Liver regeneration and function in donor and recipient after right lobe adult to adult living donor liver transplantation. Transplantation, 69(7):1375–9, 2000.
- [42] J. Belghiti, K. Hiramatsu, S. Benoist, P. Massault, A. Sauvanet, and O. Farges. Seven hundred forty-seven hepatectomies in the 1990s: an update to evaluate the actual risk of liver resection. J Am Coll Surg, 191(1):38–46, 2000.
- [43] D. Gomez, H. Z. Malik, G. K. Bonney, V. Wong, G. J. Toogood, J. P. Lodge, and K. R. Prasad. Steatosis predicts postoperative morbidity following hepatic resection for colorectal metastasis. Br J Surg, 94(11):1395–402, 2007.
- [44] L. McCormack, H. Petrowsky, W. Jochum, K. Furrer, and P. A. Clavien. Hepatic steatosis is a risk factor for postoperative complications after major hepatectomy: a matched case-control study. Ann Surg, 245(6):923–30, 2007.
- [45] K. E. Behrns, G. G. Tsiotos, N. F. DeSouza, M. K. Krishna, J. Ludwig, and D. M. Nagorney. Hepatic steatosis as a potential risk factor for major hepatic resection. J Gastrointest Surg, 2(3):292–8, 1998.
- [46] P. Angulo. Nonalcoholic fatty liver disease and liver transplantation. Liver Transpl, 12(4):523–34, 2006.

- [47] R. Adam and E. Hoti. Liver transplantation: the current situation. Semin Liver Dis, 29(1):3–18, 2009.
- [48] M. R. Charlton, J. M. Burns, R. A. Pedersen, K. D. Watt, J. K. Heimbach, and R. A. Dierkhising. Frequency and outcomes of liver transplantation for nonalcoholic steatohepatitis in the united states. Gastroenterology, 141(4):1249–53, 2011.
- [49] A. K. Singal, P. Guturu, B. Hmoud, Y. F. Kuo, H. Salameh, and R. H. Wiesner. Evolving frequency and outcomes of liver transplantation based on etiology of liver disease. Transplantation, 95(5):755–60, 2013.
- [50] R. J. Wong, R. Cheung, and A. Ahmed. Nonalcoholic steatohepatitis is the most rapidly growing indication for liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma in the u.s. Hepatology, 59(6):2188–95, 2014.
- [51] K. Schutte, M. Kipper, S. Kahl, J. Bornschein, T. Gotze, D. Adolf, J. Arend, R. Seidensticker, H. Lippert, J. Ricke, and P. Malfertheiner. Clinical characteristics and time trends in etiology of hepatocellular cancer in germany. Digestion, 87(3):147–59, 2013.
- [52] R. S. Jackson, R. L. Amdur, J. C. White, and R. A. Macsata. Hyperglycemia is associated with increased risk of morbidity and mortality after colectomy for cancer. J Am Coll Surg, 214(1):68–80, 2012.
- [53] H. Y. Yoo and P. J. Thuluvath. The effect of insulin-dependent diabetes mellitus on outcome of liver transplantation. Transplantation, 74(7):1007–12, 2002.
- [54] Newbury F.G. Perkin A.G. The colouring matters contained in dyers broom (*genista tinctoria*) and heather (*calluna vulgaris*). J Chem Soc., 75:830–839, 1899.
- [55] M. Fukutake, M. Takahashi, K. Ishida, H. Kawamura, T. Sugimura, and K. Wakabayashi. Quantification of genistein and genistin in soybeans and soybean products. Food Chem Toxicol, 34(5):457–61, 1996.
- [56] A. Matthies, G. Loh, M. Blaut, and A. Braune. Daidzein and genistein are converted to equol and 5-hydroxy-equol by human intestinal *slackia isoflavoniconvertens* in gnotobiotic rats. J Nutr, 142(1):40–6, 2012.
- [57] H. Marini, L. Minutoli, F. Polito, A. Bitto, D. Altavilla, M. Atteritano, A. Gaudio, S. Mazzaferro, A. Frisina, N. Frisina, C. Lubrano, M. Bonaiuto, R. D’Anna, M. L. Cannata, F. Corrado, E. B. Adamo, S. Wilson, and F. Squadrito. Effects of the phytoestrogen genistein on bone metabolism in osteopenic postmenopausal women: a randomized trial. Ann Intern Med, 146(12):839–47, 2007.

- [58] J. W. Lampe, Y. Nishino, R. M. Ray, C. Wu, W. Li, M. G. Lin, D. L. Gao, Y. Hu, J. Shannon, H. Stalsberg, P. L. Porter, C. L. Frankenfeld, K. Wahala, and D. B. Thomas. Plasma isoflavones and fibrocystic breast conditions and breast cancer among women in shanghai, china. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 16(12):2579–86, 2007.
- [59] N. Kurahashi, M. Iwasaki, S. Sasazuki, T. Otani, M. Inoue, and S. Tsugane. Soy product and isoflavone consumption in relation to prostate cancer in japanese men. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 16(3):538–45, 2007.
- [60] A. H. Wu, R. G. Ziegler, P. L. Horn-Ross, A. M. Nomura, D. W. West, L. N. Kolonel, J. F. Rosenthal, R. N. Hoover, and M. C. Pike. Tofu and risk of breast cancer in asian-americans. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 5(11):901–6, 1996.
- [61] M. Atteritano, H. Marini, L. Minutoli, F. Polito, A. Bitto, D. Altavilla, S. Mazzaferro, R. D’Anna, M. L. Cannata, A. Gaudio, A. Frisina, N. Frisina, F. Corrado, F. Cancellieri, C. Lubrano, M. Bonaiuto, E. B. Adamo, and F. Squadrito. Effects of the phytoestrogen genistein on some predictors of cardiovascular risk in osteopenic, postmenopausal women: a two-year randomized, double-blind, placebo-controlled study. J Clin Endocrinol Metab, 92(8):3068–75, 2007.
- [62] P. Villa, B. Costantini, R. Suriano, C. Perri, F. Macri, L. Ricciardi, S. Panunzi, and A. Lanzone. The differential effect of the phytoestrogen genistein on cardiovascular risk factors in postmenopausal women: relationship with the metabolic status. J Clin Endocrinol Metab, 94(2):552–8, 2009.
- [63] A. Nanri, T. Mizoue, Y. Takahashi, K. Kirii, M. Inoue, M. Noda, and S. Tsugane. Soy product and isoflavone intakes are associated with a lower risk of type 2 diabetes in overweight japanese women. J Nutr, 140(3):580–6, 2010.
- [64] F. Squadrito, H. Marini, A. Bitto, D. Altavilla, F. Polito, E. B. Adamo, R. D’Anna, V. Arcoraci, B. P. Burnett, L. Minutoli, A. Di Benedetto, G. Di Vieste, D. Cucinotta, C. de Gregorio, S. Russo, F. Corrado, A. Saitta, C. Irace, S. Corrao, and G. Licata. Genistein in the metabolic syndrome: results of a randomized clinical trial. J Clin Endocrinol Metab, 98(8):3366–74, 2013.
- [65] A. P. Rauter, A. Martins, C. Borges, H. Mota-Filipe, R. Pinto, B. Sepodes, and J. Justino. Antihyperglycaemic and protective effects of flavonoids on streptozotocin-induced diabetic rats. Phytother Res, 24 Suppl 2:S133–8, 2010.
- [66] Z. Fu, E. R. Gilbert, L. Pfeiffer, Y. Zhang, Y. Fu, and D. Liu. Genistein ameliorates hyperglycemia in a mouse model of nongenetic type 2 diabetes. Appl Physiol Nutr Metab, 37(3):480–8, 2012.

- [67] J. S. Choi, I. U. Koh, and J. Song. Genistein reduced insulin resistance index through modulating lipid metabolism in ovariectomized rats. Nutr Res, 32(11):844–55, 2012.
- [68] N. Palanisamy, P. Viswanathan, and C. V. Anuradha. Effect of genistein, a soy isoflavone, on whole body insulin sensitivity and renal damage induced by a high-fructose diet. Ren Fail, 30(6):645–54, 2008.
- [69] C. Ascencio, N. Torres, F. Isoard-Acosta, F. J. Gomez-Perez, R. Hernandez-Pando, and A. R. Tovar. Soy protein affects serum insulin and hepatic srebp-1 mrna and reduces fatty liver in rats. J Nutr, 134(3):522–9, 2004.
- [70] A. Haneishi, K. Takagi, K. Asano, S. Nakamura, N. Kagawa, and K. Yamada. Genistein stimulates the insulin-dependent signaling pathway. Front Biosci (Elite Ed), 3:1534–40, 2011.
- [71] M. T. Donato, A. Lahoz, J. V. Castell, and M. J. Gomez-Lechon. Cell lines: a tool for in vitro drug metabolism studies. Curr Drug Metab, 9(1):1–11, 2008.
- [72] K. Zeilinger, N. Freyer, G. Damm, D. Seehofer, and F. Knospel. Cell sources for in vitro human liver cell culture models. Exp Biol Med (Maywood), 241(15):1684–98, 2016.
- [73] M. J. Gomez-Lechon, M. T. Donato, J. V. Castell, and R. Jover. Human hepatocytes in primary culture: The choice to investigate drug metabolism in man. Current Drug Metabolism, 5(5):443–462, 2004.
- [74] D. Deboyser, F. Goethals, G. Krack, and M. Roberfroid. Investigation into the mechanism of tetracycline-induced steatosis: study in isolated hepatocytes. Toxicol Appl Pharmacol, 97(3):473–9, 1989.
- [75] M. J. Gomez-Lechon, M. T. Donato, A. Martinez-Romero, N. Jimenez, J. V. Castell, and J. E. O’Connor. A human hepatocellular in vitro model to investigate steatosis. Chem Biol Interact, 165(2):106–16, 2007.
- [76] 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, and P. Loria. Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes. J Gastroenterol Hepatol, 24(5):830–40, 2009.
- [77] T. Kostrzewski, T. Cornforth, S. A. Snow, L. Ouro-Gnao, C. Rowe, E. M. Large, and D. J. Hughes. Three-dimensional perfused human in vitro model of non-alcoholic fatty liver disease. World J Gastroenterol, 23(2):204–215, 2017.
- [78] P. O. Seglen. Preparation of isolated rat liver cells. Methods Cell Biol, 13:29–83, 1976.

- [79] D. Knobloch, S. Ehnert, L. Schyschka, P. Buchler, M. Schoenberg, J. Kleeff, W. E. Thasler, N. C. Nussler, P. Godoy, J. Hengstler, and A. K. Nussler. Human hepatocytes: isolation, culture, and quality procedures. Methods Mol Biol, 806:99–120, 2012.
- [80] 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, and D. C. Klenk. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal Biochem, 150(1):76–85, 1985.
- [81] U. K. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. Nature, 227(5259):680–5, 1970.
- [82] H. Towbin, T. Staehelin, and J. Gordon. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci U S A, 76(9):4350–4, 1979.
- [83] P. Chomczynski and N. Sacchi. Single-step method of rna isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem, 162(1):156–9, 1987.
- [84] C. A. Heid, J. Stevens, K. J. Livak, and P. M. Williams. Real time quantitative pcr. Genome Res, 6(10):986–94, 1996.
- [85] M. W. Pfaffl. A new mathematical model for relative quantification in real-time rt-pcr. Nucleic Acids Res, 29(9):e45, 2001.
- [86] M. J. Gomez-Lechon, M. T. Donato, J. V. Castell, and R. Jover. Human hepatocytes as a tool for studying toxicity and drug metabolism. Curr Drug Metab, 4(4):292–312, 2003.
- [87] J. Araya, R. Rodrigo, L. A. Videla, L. Thielemann, M. Orellana, P. Pettinelli, and J. Poniachik. Increase in long-chain polyunsaturated fatty acid n - 6/n - 3 ratio in relation to hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. Clin Sci (Lond), 106(6):635–43, 2004.
- [88] K. L. Donnelly, C. I. Smith, S. J. Schwarzenberg, J. Jessurun, M. D. Boldt, and 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(5):1343–51, 2005.
- [89] I. T. de Almeida, H. Cortez-Pinto, G. Fidalgo, D. Rodrigues, and M. E. Camilo. Plasma total and free fatty acids composition in human non-alcoholic steatohepatitis. Clin Nutr, 21(3):219–23, 2002.
- [90] K. Smith. Liver disease: Kupffer cells regulate the progression of ald and nafld. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 10(9):503, 2013.

- [91] H. Wobser, C. Dorn, T. S. Weiss, T. Amann, C. Bollheimer, R. Buttner, J. Scholmerich, and C. Hellerbrand. Lipid accumulation in hepatocytes induces fibrogenic activation of hepatic stellate cells. *Cell Res*, 19(8):996–1005, 2009.
- [92] A. Gastaldelli. Insulin resistance and reduced metabolic flexibility: cause or consequence of nafld? *Clin Sci (Lond)*, 131(22):2701–2704, 2017.
- [93] A. E. Feldstein, A. Canbay, P. Angulo, M. Taniai, L. J. Burgart, K. D. Lindor, and G. J. Gores. Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology*, 125(2):437–43, 2003.
- [94] A. Moravcova, Z. Cervinkova, O. Kucera, V. Mezera, D. Rychtrmoc, and H. Lotkova. The effect of oleic and palmitic acid on induction of steatosis and cytotoxicity on rat hepatocytes in primary culture. *Physiol Res*, 64 Suppl 5:S627–36, 2015.
- [95] D. Wang, Y. Wei, and M. J. Pagliassotti. Saturated fatty acids promote endoplasmic reticulum stress and liver injury in rats with hepatic steatosis. *Endocrinology*, 147(2):943–51, 2006.
- [96] H. Malhi, S. F. Bronk, N. W. Werneburg, and G. J. Gores. Free fatty acids induce jnk-dependent hepatocyte lipoapoptosis. *J Biol Chem*, 281(17):12093–101, 2006.
- [97] H. Yuan, X. Zhang, X. Huang, Y. Lu, W. Tang, Y. Man, S. Wang, J. Xi, and J. Li. NADPH oxidase 2-derived reactive oxygen species mediate fatty acid-induced dysfunction and apoptosis of beta-cells via jnk, p38 mapk and p53 pathways. *PLoS One*, 5(12):e15726, 2010.
- [98] A. K. Leamy, R. A. Egnatchik, M. Shiota, P. T. Ivanova, D. S. Myers, H. A. Brown, and J. D. Young. Enhanced synthesis of saturated phospholipids is associated with ER stress and lipotoxicity in palmitate treated hepatic cells. *J Lipid Res*, 55(7):1478–88, 2014.
- [99] K. N. Belosludtsev, N. V. Belosludtseva, A. V. Agafonov, M. E. Astashev, A. S. Kazakov, N. E. Saris, and G. D. Mironova. Ca²⁺-dependent permeabilization of mitochondria and liposomes by palmitic and oleic acids: a comparative study. *Biochim Biophys Acta*, 1838(10):2600–6, 2014.
- [100] S. Vidyashankar, L. M. Sharath Kumar, V. Barooah, R. Sandeep Varma, K. S. Nandakumar, and P. S. Patki. Liv.52 up-regulates cellular antioxidants and increase glucose uptake to circumvent oleic acid induced hepatic steatosis in hepg2 cells. *Phytomedicine*, 19(13):1156–65, 2012.
- [101] H. Yki-Jarvinen. Liver fat in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Dig Dis*, 28(1):203–9, 2010.

- [102] M. Roden, T. B. Price, G. Perseghin, K. F. Petersen, D. L. Rothman, G. W. Cline, and G. I. Shulman. Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. J Clin Invest, 97(12):2859–65, 1996.
- [103] B. Mlinar, J. Marc, A. Janez, and M. Pfeifer. Molecular mechanisms of insulin resistance and associated diseases. Clin Chim Acta, 375(1-2):20–35, 2007.
- [104] Z. Tang, N. Xia, X. Yuan, X. Zhu, G. Xu, S. Cui, T. Zhang, W. Zhang, Y. Zhao, S. Wang, and B. Shi. Prdx1 is involved in palmitate induced insulin resistance via regulating the activity of p38mapk in hepg2 cells. Biochem Biophys Res Commun, 465(4):670–7, 2015.
- [105] W. Y. So and P. S. Leung. Irisin ameliorates hepatic glucose/lipid metabolism and enhances cell survival in insulin-resistant human hepg2 cells through adenosine monophosphate-activated protein kinase signaling. Int J Biochem Cell Biol, 78:237–247, 2016.
- [106] F. R. Jornayvaz, A. L. Birkenfeld, M. J. Jurczak, S. Kanda, B. A. Guigni, D. C. Jiang, D. Zhang, H. Y. Lee, V. T. Samuel, and G. I. Shulman. Hepatic insulin resistance in mice with hepatic overexpression of diacylglycerol acyltransferase 2. Proc Natl Acad Sci U S A, 108(14):5748–52, 2011.
- [107] J. A. Chavez and S. A. Summers. Characterizing the effects of saturated fatty acids on insulin signaling and ceramide and diacylglycerol accumulation in 3t3-l1 adipocytes and c2c12 myotubes. Arch Biochem Biophys, 419(2):101–9, 2003.
- [108] Y. G. Wang, M. Shi, T. Wang, T. Shi, J. Wei, N. Wang, and X. M. Chen. Signal transduction mechanism of trb3 in rats with non-alcoholic fatty liver disease. World J Gastroenterol, 15(19):2329–35, 2009.
- [109] T. Y. Liu, C. X. Shi, R. Gao, H. J. Sun, X. Q. Xiong, L. Ding, Q. Chen, Y. H. Li, J. J. Wang, Y. M. Kang, and G. Q. Zhu. Irisin inhibits hepatic gluconeogenesis and increases glycogen synthesis via the pi3k/akt pathway in type 2 diabetic mice and hepatocytes. Clin Sci (Lond), 129(10):839–50, 2015.
- [110] J. P. Guegan, C. Fremin, and G. Baffet. The mapk mek1/2-erk1/2 pathway and its implication in hepatocyte cell cycle control. Int J Hepatol, 2012:328372, 2012.
- [111] A. J. Ruiz-Alcaraz, C. Lipina, J. R. Petrie, M. J. Murphy, A. D. Morris, C. Sutherland, and D. J. Cuthbertson. Obesity-induced insulin resistance in human skeletal muscle is characterised by defective activation of p42/p44 map kinase. PLoS One, 8(2):e56928, 2013.

- [112] M. Rajkhowa, S. Brett, D. J. Cuthbertson, C. Lipina, A. J. Ruiz-Alcaraz, G. E. Thomas, L. Logie, J. R. Petrie, and C. Sutherland. Insulin resistance in polycystic ovary syndrome is associated with defective regulation of erk1/2 by insulin in skeletal muscle in vivo. Biochem J, 418(3):665–71, 2009.
- [113] S. Wang, E. J. Dougherty, and R. L. Danner. Ppargamma signaling and emerging opportunities for improved therapeutics. Pharmacol Res, 111:76–85, 2016.
- [114] X. Zheng, Y. Ke, A. Feng, P. Yuan, J. Zhou, Y. Yu, X. Wang, and W. Feng. The mechanism by which amentoflavone improves insulin resistance in hepg2 cells. Molecules, 21(5), 2016.
- [115] G. Marchesini, M. Brizi, G. Bianchi, S. Tomassetti, E. Bugianesi, M. Lenzi, A. J. McCullough, S. Natale, G. Forlani, and N. Melchionda. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. Diabetes, 50(8):1844–50, 2001.
- [116] L. Valenti, R. Rametta, P. Dongiovanni, M. Maggioni, A. L. Fracanzani, M. Zappa, E. Lattuada, G. Roviario, and S. Fargion. Increased expression and activity of the transcription factor foxo1 in nonalcoholic steatohepatitis. Diabetes, 57(5):1355–62, 2008.
- [117] V. T. Samuel, C. S. Choi, T. G. Phillips, A. J. Romanelli, J. G. Geisler, S. Bhanot, R. McKay, B. Monia, J. R. Shutter, R. A. Lindberg, G. I. Shulman, and M. M. Veniant. Targeting foxo1 in mice using antisense oligonucleotide improves hepatic and peripheral insulin action. Diabetes, 55(7):2042–50, 2006.
- [118] D. Frescas, L. Valenti, and D. Accili. Nuclear trapping of the forkhead transcription factor foxo1 via sirt-dependent deacetylation promotes expression of glucogenetic genes. J Biol Chem, 280(21):20589–95, 2005.
- [119] H. Miao, Y. Zhang, Z. Lu, Q. Liu, and L. Gan. Foxo1 involvement in insulin resistance-related pro-inflammatory cytokine production in hepatocytes. Inflamm Res, 61(4):349–58, 2012.
- [120] M. P. Sajjan, R. A. Ivey, M. C. Lee, and R. V. Farese. Hepatic insulin resistance in ob/ob mice involves increases in ceramide, apk activity, and selective impairment of akt-dependent foxo1 phosphorylation. J Lipid Res, 56(1):70–80, 2015.
- [121] M. Uldry and B. Thorens. The slc2 family of facilitated hexose and polyol transporters. Pflugers Arch, 447(5):480–9, 2004.
- [122] Y. Okamoto, S. Tanaka, and Y. Haga. Enhanced glut2 gene expression in an oleic acid-induced in vitro fatty liver model. Hepatol Res, 23(2):138–144, 2002.

- [123] T. Yamamoto, H. Fukumoto, G. Koh, H. Yano, K. Yasuda, K. Masuda, H. Ikeda, H. Imura, and Y. Seino. Liver and muscle-fat type glucose transporter gene expression in obese and diabetic rats. Biochem Biophys Res Commun, 175(3):995–1002, 1991.
- [124] T. Matsuzaka, H. Shimano, N. Yahagi, M. Amemiya-Kudo, H. Okazaki, Y. Tamura, Y. Iizuka, K. Ohashi, S. Tomita, M. Sekiya, A. Hasty, Y. Nakagawa, H. Sone, H. Toyoshima, S. Ishibashi, J. Osuga, and N. Yamada. Insulin-independent induction of sterol regulatory element-binding protein-1c expression in the livers of streptozotocin-treated mice. Diabetes, 53(3):560–9, 2004.
- [125] U. J. Jung, M. K. Lee, Y. B. Park, M. A. Kang, and M. S. Choi. Effect of citrus flavonoids on lipid metabolism and glucose-regulating enzyme mrna levels in type-2 diabetic mice. Int J Biochem Cell Biol, 38(7):1134–45, 2006.
- [126] A. Gonzalez-Periz, R. Horrillo, N. Ferre, K. Gronert, B. Dong, E. Moran-Salvador, E. Titos, M. Martinez-Clemente, M. Lopez-Parra, V. Arroyo, and J. Claria. Obesity-induced insulin resistance and hepatic steatosis are alleviated by omega-3 fatty acids: a role for resolvins and protectins. FASEB J, 23(6):1946–57, 2009.
- [127] S. P. Weinstein, E. O’Boyle, M. Fisher, and R. S. Haber. Regulation of glut2 glucose transporter expression in liver by thyroid hormone: evidence for hormonal regulation of the hepatic glucose transport system. Endocrinology, 135(2):649–54, 1994.
- [128] W. M. Yang, K. H. Min, and W. Lee. Induction of mir-96 by dietary saturated fatty acids exacerbates hepatic insulin resistance through the suppression of insr and irs-1. PLoS One, 11(12):e0169039, 2016.
- [129] Z. Shengsheng, Z. Hai, W. Li, L. Xiaofei, and W. Yuntang. Microwave-assisted synthesis of chitosan biguanidine hydrochloride and its regulation on insr and glut2 in insulin resistant hepg2 cells. RSC Adv., 7:10108–10117, 2017.
- [130] E. Wallerstedt, M. Sandqvist, U. Smith, and C. X. Andersson. Anti-inflammatory effect of insulin in the human hepatoma cell line hepg2 involves decreased transcription of il-6 target genes and nuclear exclusion of foxo1. Mol Cell Biochem, 352(1-2):47–55, 2011.
- [131] S. Yamagishi, T. Okamoto, S. Amano, Y. Inagaki, K. Koga, M. Koga, H. Choei, N. Sasaki, S. Kikuchi, M. Takeuchi, and Z. Makita. Palmitate-induced apoptosis of microvascular endothelial cells and pericytes. Mol Med, 8(4):179–84, 2002.
- [132] T. Akiyama, J. Ishida, S. Nakagawa, H. Ogawara, S. Watanabe, N. Itoh, M. Shibuya, and Y. Fukami. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. J Biol Chem, 262(12):5592–5, 1987.

- [133] C. Choi, H. Cho, J. Park, C. Cho, and Y. Song. Suppressive effects of genistein on oxidative stress and nf-kappab activation in raw 264.7 macrophages. Biosci Biotechnol Biochem, 67(9):1916–22, 2003.
- [134] C. Borrás, J. Gambini, M. C. Gomez-Cabrera, J. Sastre, F. V. Pallardo, G. E. Mann, and J. Vina. Genistein, a soy isoflavone, up-regulates expression of antioxidant genes: involvement of estrogen receptors, erk1/2, and nf-kappab. FASEB J, 20(12):2136–8, 2006.
- [135] C. E. Rufer and S. E. Kulling. Antioxidant activity of isoflavones and their major metabolites using different in vitro assays. J Agric Food Chem, 54(8):2926–31, 2006.
- [136] F. H. Sarkar and Y. Li. Soy isoflavones and cancer prevention. Cancer Invest, 21(5):744–57, 2003.
- [137] S. M. Hussain, K. L. Hess, J. M. Gearhart, K. T. Geiss, and J. J. Schlager. In vitro toxicity of nanoparticles in brl 3a rat liver cells. Toxicol In Vitro, 19(7):975–83, 2005.
- [138] M. E. Guicciardi, H. Malhi, J. L. Mott, and G. J. Gores. Apoptosis and necrosis in the liver. Compr Physiol, 3(2):977–1010, 2013.
- [139] N. Salleh, M. M. Helmy, K. N. Fadila, and S. O. Yeong. Isoflavone genistein induces fluid secretion and morphological changes in the uteri of post-pubertal rats. Int J Med Sci, 10(6):665–75, 2013.
- [140] C. Booth, D. F. Hargreaves, J. A. Hadfield, A. T. McGown, and C. S. Potten. Isoflavones inhibit intestinal epithelial cell proliferation and induce apoptosis in vitro. Br J Cancer, 80(10):1550–7, 1999.
- [141] G. I. Salti, S. Grewal, R. R. Mehta, T. K. Das Gupta, Jr. Boddie, A. W., and A. I. Constantinou. Genistein induces apoptosis and topoisomerase ii-mediated dna breakage in colon cancer cells. Eur J Cancer, 36(6):796–802, 2000.
- [142] D. T. Zava and G. Duwe. Estrogenic and antiproliferative properties of genistein and other flavonoids in human breast cancer cells in vitro. Nutr Cancer, 27(1):31–40, 1997.
- [143] A. C. Chen and S. M. Donovan. Genistein at a concentration present in soy infant formula inhibits caco-2bbe cell proliferation by causing g2/m cell cycle arrest. J Nutr, 134(6):1303–8, 2004.
- [144] J. J. Raffoul, Y. Wang, O. Kucuk, J. D. Forman, F. H. Sarkar, and G. G. Hillman. Genistein inhibits radiation-induced activation of nf-kappab in prostate cancer cells promoting apoptosis and g2/m cell cycle arrest. BMC Cancer, 6:107, 2006.

- [145] E. J. Choi, T. Kim, and M. S. Lee. Pro-apoptotic effect and cytotoxicity of genistein and genistin in human ovarian cancer sk-ov-3 cells. *Life Sci*, 80(15):1403–8, 2007.
- [146] T. C. Yeh, P. C. Chiang, T. K. Li, J. L. Hsu, C. J. Lin, S. W. Wang, C. Y. Peng, and J. H. Guh. Genistein induces apoptosis in human hepatocellular carcinomas via interaction of endoplasmic reticulum stress and mitochondrial insult. *Biochem Pharmacol*, 73(6):782–92, 2007.
- [147] A. Rucinska, M. Roszczyk, and T. Gabryelak. Cytotoxicity of the isoflavone genistein in nih 3t3 cells. *Cell Biol Int*, 32(8):1019–23, 2008.
- [148] D. M. Baxa, X. Luo, and F. K. Yoshimura. Genistein induces apoptosis in t lymphoma cells via mitochondrial damage. *Nutr Cancer*, 51(1):93–101, 2005.
- [149] A. Das, N. L. Banik, and S. K. Ray. Mechanism of apoptosis with the involvement of calpain and caspase cascades in human malignant neuroblastoma sh-sy5y cells exposed to flavonoids. *Int J Cancer*, 119(11):2575–85, 2006.
- [150] E. Arunkumar, D. Karthik, and C. V. Anuradha. Genistein sensitizes hepatic insulin signaling and modulates lipid regulatory genes through p70 ribosomal s6 kinase-1 inhibition in high-fat-high-fructose diet-fed mice. *Pharm Biol*, 51(7):815–24, 2013.
- [151] E. J. Kim, H. K. Shin, and J. H. Park. Genistein inhibits insulin-like growth factor-i receptor signaling in ht-29 human colon cancer cells: a possible mechanism of the growth inhibitory effect of genistein. *J Med Food*, 8(4):431–8, 2005.
- [152] S. Park and J. Choi. Inhibition of beta-catenin/tcf signaling by flavonoids. *J Cell Biochem*, 110(6):1376–85, 2010.
- [153] Z. Fu and D. Liu. Long-term exposure to genistein improves insulin secretory function of pancreatic beta-cells. *Eur J Pharmacol*, 616(1-3):321–7, 2009.
- [154] A. A. Elmarakby, A. S. Ibrahim, J. Faulkner, M. S. Mozaffari, G. I. Liou, and R. Abdelsayed. Tyrosine kinase inhibitor, genistein, reduces renal inflammation and injury in streptozotocin-induced diabetic mice. *Vascul Pharmacol*, 55(5-6):149–56, 2011.
- [155] M. W. Lee, J. H. Bach, H. J. Lee, D. Y. Lee, W. S. Joo, Y. S. Kim, S. C. Park, K. Y. Kim, W. B. Lee, and S. S. Kim. The activation of erk1/2 via a tyrosine kinase pathway attenuates trail-induced apoptosis in hela cells. *Cancer Invest*, 23(7):586–92, 2005.
- [156] I. Nordentoft, P. B. Jeppesen, J. Hong, R. Abudula, and K. Hermansen. Increased insulin sensitivity and changes in the expression profile of key insulin regulatory genes and beta cell transcription factors in diabetic kky-mice after feeding with a soy bean protein rich diet high in isoflavone content. *J Agric Food Chem*, 56(12):4377–85, 2008.

- [157] R. H. Bhogal, J. Hodson, D. C. Bartlett, C. J. Weston, S. M. Curbishley, E. Haughton, K. T. Williams, G. M. Reynolds, P. N. Newsome, D. H. Adams, and S. C. Afford. Isolation of primary human hepatocytes from normal and diseased liver tissue: a one hundred liver experience. *PLoS One*, 6(3):e18222, 2011.
- [158] S. M. Lee, C. Schelcher, R. P. Laubender, N. Frose, R. M. Thasler, T. S. Schiergens, U. Mansmann, and W. E. Thasler. An algorithm that predicts the viability and the yield of human hepatocytes isolated from remnant liver pieces obtained from liver resections. *PLoS One*, 9(10):e107567, 2014.
- [159] L. Richert, E. Alexandre, T. Lloyd, S. Orr, C. Viollon-Abadie, R. Patel, S. Kingston, D. Berry, A. Dennison, B. Heyd, G. Manton, and D. Jaeck. Tissue collection, transport and isolation procedures required to optimize human hepatocyte isolation from waste liver surgical resections. a multilaboratory study. *Liver Int*, 24(4):371–8, 2004.
- [160] A. R. Saltiel and C. R. Kahn. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, 414(6865):799–806, 2001.
- [161] M. J. Gomez-Lechon, J. V. Castell, and M. T. Donato. Hepatocytes—the choice to investigate drug metabolism and toxicity in man: in vitro variability as a reflection of in vivo. *Chem Biol Interact*, 168(1):30–50, 2007.
- [162] X. Ponsoda, M. T. Donato, G. Perez-Cataldo, M. J. Gomez-Lechon, and J. V. Castell. Drug metabolism by cultured human hepatocytes: how far are we from the in vivo reality? *Altern Lab Anim*, 32(2):101–10, 2004.

8 Anhang

8.1 Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Sebastian Lünse, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Einfluss von Genistein auf Insulin-responsive Signalwege im humanen Fettlebermodell“ 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](http://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 Betreuer, 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.“

Berlin, den 23.06.2019

Sebastian Lünse

8.2 Lebenslauf

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

8.3 Publikationsliste

Kongressbeiträge

29. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber (GASL), Hannover

Damm G, Krüger A, Lünse S, Kegel V, Schulz T, Sperling S, Burkhardt B, Seehofer D, Glanemann M, Nüssler A. Human in vitro model of steatosis hepatis and the influence of anti-lipidemic drugs on energy metabolism in steatotic hepatocytes. Z Gastroenterol 2013; 51: P2/06.

24th International Congress of The Transplantation Society (TTS), Berlin

Damm G, Krüger A, Lünse S, Nüssler AK, Glanemann M. In vitro steatosis model and the influence of anti-lipidemic drugs on defatting steatotic hepatocytes. Abstract-Book.

129. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie (DGCH), Berlin

Damm G, Krüger A, Lünse S, Nüssler AK, Glanemann M. Genistein shows beneficial influence on metabolic and signal pathways in an in vitro hepatic steatosis model. Abstract-Book.

118. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin (DGIM), Wiesbaden

Lünse S, Krüger A, Glanemann M, Damm G. Human in vitro model of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: a useful tool to investigate hepatic insulin resistance. Der Internist 2012; 13(Supplement 1): 15.

28. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber (GASL), Hamburg

Lünse S, Krüger A, Glanemann M, Damm G. Soy isoflavone Genistein affects energy metabolism in a steatotic liver model. Z Gastroenterol 2012; 50: 96.

22nd European Students Conference (ESC), Berlin

Lünse S, Krüger A, Glanemann M, Damm G. Genistein modulates insulin signaling in a human fatty liver model. Eur J Med Res 2011; 16(Supplement 1): 162.

27. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber (GASL), Regensburg

Lünse S, Krüger A, Brümmer C, Glanemann M, Knobloch D. Effects of Genistein on hepatic insulin signaling. Z Gastroenterol 2011; 49: 100.

Auszeichnungen

Reisestipendium zum Falk Pharma Workshop „Inflammation & Cancer“ 2012, Hamburg

2. Preis ESC Research Award „Poster Presentation Category“, 22nd European Students Conference (ESC) 2011, Berlin

Reisestipendium zum Falk Pharma Workshop „Liver & Immunology“ 2011, Regensburg

Sonstige Veröffentlichungen

S. Lünse, C.D. Heidecke. 2017. **Operative Therapie von Lebererkrankungen und Schwangerschaft.** In: M.Wolff, W. Kuhn, Hrsg. Viszeralchirurgie und Schwangerschaft. Erste Aufl. Berlin: De Gruyter-Verlag, 229-243.

S. Lünse, P. Döring, C.D. Heidecke, L.I. Partecke. **Giant hepatocellular carcinoma with bone metastasis in a young adult, emerged from pigmented adenoma with beta-Catenin activation: A case report.** Int J Surg Case Rep, 36:18-21, 2017.

S. Lünse, P. Simon, C.D. Heidecke, A. Glitsch. **Over-the-Scope Clip Closure of a Colon Perforation Caused by an Ingested Wooden Toothpick.** ACG Case Rep J, 3(4), 2016.

8.4 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Johann Pratschke für die Möglichkeit zur Promotion an seiner Klinik sowie meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Daniel Seehofer für die Überlassung des interessanten Themas und die beständige Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit. In diesem Zusammenhang möchte ich auch Herrn Prof. Dr. med. Matthias Glanemann für die Hilfestellungen zu Beginn meines Promotionsprojektes danken.

Auch danke ich Herrn Dr. rer. medic. Daniel Knobloch sehr für die umfassende Einarbeitung in das Projekt sowie der stets geduldigen Unterstützung bei der Aneignung der laborchemischen Methodik.

Mein besonderer Dank geht an Herrn Dr. rer. nat. Georg Damm für die Weiterbetreuung und die konstruktive und umfangreiche Hilfe bei der Fertigstellung des Projektes sowie der Dissertationsschrift.

Frau Dr. med. Anne Krüger danke ich für die vielen anstrengenden, aber stets freudvollen Stunden im Labor bei den Isolierungen sowie der gemeinsamen Datenerfassung zur Etablierung und Evaluation des humanen *in-vitro*-Modells der Fettleber. Im Rahmen eines Gemeinschaftsprojektes wurden zu gleichen Anteilen die Daten zum Lipidgehalt, Zytotoxizität und Metabolismus des Fettlebermodells sowie zur Evaluation der Zytotoxizität von Genistein erfasst.

Auch danke ich Frau Dr. med. Christine Tarnogrocki für die gute Zusammenarbeit im Team der AG Glanemann/Seehofer.

Den Laborassistentinnen, Frau Anja Schirmeier und Frau Jennifer Golembus, danke ich für die freundliche und kompetente Hilfe bei der Durchführung der Experimente.

Zuletzt danke ich vor allem meinen Eltern, Silvia und Dirk Lünse, ohne deren immer fortwährende, selbstlose Unterstützung meines Werdeganges weder Medizinstudium noch Promotion möglich gewesen wären.