Aus der Abteilung Gastroenterologie und Endokrinologie

(Prof. Dr. med. Dr. h. c. G. Ramadori)

im Zentrum Innere Medizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Einfluss von freien Fettsäuren und Triglyceriden auf die Expression
von proinflammatorischen Mediatoren und Adhäsionsmolekülen in
Hepatozyten und Kupffer-Zellen (der Ratte)**

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät

der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Julia Elisabeth Demuth

aus

Rotenburg an der Fulda

Göttingen 2009

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. h. c. G. Ramadori

II. Berichterstatter/in:

III. Berichterstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung:

Inhalt

1	EINLEITUNG	1
1.1	Die Leber	1
1.1.1	Aufbau der Leber	1
1.1.2	Aufgaben der Leber	4
1.1.3	Zellen der Leber	5
1.1.3.1	Hepatozyten	5
1.1.3.2	Kupffer-Zellen	6
1.1.3.3	Sinusendothelzellen	7
1.1.3.4	Ito-Zellen	7
1.1.3.5	Pit-Zellen	8
1.2	Leberentzündung	8
1.2.1	Ursachen der Leberentzündung	8
1.2.2	Pathophysiologie	9
1.2.3	Mechanismus der Abwehr und Entzündung	10
1.2.4	Proinflammatorische Mediatoren	11
1.2.4.1	Zytokine	12
1.2.4.2	Chemokine	12
1.2.4.3	Adhäsionsmoleküle	13
1.3	Steatose und Steatohepatitis	14
1.3.1	Nichtalkoholische Fettleber	14
1.3.1.1	Epidemiologie	15
1.3.1.2	Ätiologie	15
1.3.1.3	Pathogenese	16
1.4	Ziel der Arbeit	17

2	MATERIAL UND METHODEN	21
2.1	Material	21
2.1.1	Tiere und Tierhaltung	21
2.1.2	Geräte	21
2.1.3	Verbrauchsmaterialien	23
2.1.4	Chemikalien und Reagenzien	24
2.1.5	Enzyme	25
2.1.6	Triglyceride und Fettsäuren	26
2.1.6.1	Lipofundin MCT 20 %	26
2.1.6.2	Linolsäure (Syn.: <i>Linoleic Acid</i> , (cis,cis)-Octadeca-9,12- diensäure)	27
2.1.6.3	Palmitinsäure (Syn.: <i>Palmitic Acid</i> , Hexadecansäure)	28
2.1.7	DNA-Oligonukleotide (Primer)	28
2.1.8	Antikörper	30
2.2	Methoden	31
2.2.1	Zellisolation	31
2.2.1.1	Isolation der Hepatozyten (modifiziert nach Seglen)	31
2.2.1.2	Isolation der Kupffer-Zellen (modifiziert nach Knook)	33
2.2.2	Zellkulturen	36
2.2.2.1	Zellkultivierung - Hepatozyten	36
2.2.2.2	Zellkultivierung - Kupffer-Zellen	37
2.2.2.3	Zellkultivierung - Hep G2 (humane Hepatomzellen)	37
2.2.3	Zellkulturexperimente	38
2.2.3.1	Anfertigung des konditionierten Kupffer-Zell-Mediums	38
2.2.3.2	Vorbereitung der Fettsäuren (modifiziert nach Joshi-Barve)	38
2.2.3.3	Stimulation der Zellkulturen	39
2.2.3.3.1	Zeitkinetikversuch	39
2.2.3.3.2	Präinkubationsversuch	39
2.2.3.3.3	Entzündungs-Initiierungsversuch	39
2.2.3.3.4	Dosisversuch	40

2.2.4	RNA-Gewinnung und PCR	40
2.2.4.1	Isolierung von Gesamt-RNA (modifiziert nach Chomczynski)	40
2.2.4.2	Synthese von cDNA	41
2.2.4.3	Quantitative Real-Time PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	41
2.2.5	Proteingewinnung und Western Blot	42
2.2.5.1	Proteingewinnung	42
2.2.5.2	Bestimmung des Gesamtproteingehalts	43
2.2.5.3	Polyacrylamidelektrophorese	43
2.2.5.4	Transfer	44
2.2.5.5	Proteindetektion	44
2.2.6	Enzymbestimmung im Mediumüberstand	45
2.2.7	Detektion von intrazellulären Fetttropfen	46
2.2.7.1	Fluoreszenzmikroskopie	46
2.2.7.2	FACS-Analyse (<i>Fluorescent Activated Cell Sorting-Analysis</i>)	46
2.2.8	Statistische Analyse	47
3.	ERGEBNISSE	48
3.1	Expression von proinflammatorischen Mediatoren in Hepatozyten unter Fettexposition	48
3.1.1	Einfluss einer längerfristigen Triglyceridexposition <i>in vitro</i> auf die basale Expression der proinflammatorischen Mediatoren	48
3.1.2	Einfluss einer Triglyceridexposition während einer induzierten Entzündungsreaktion <i>in vitro</i> auf die basale Expression der proinflammatorischen Mediatoren	50
3.1.3	Einfluss eines Entzündungsreizes bei <i>in vitro</i> fettakkumulierten Hepatozyten auf die basale Expression der proinflammatorischen Mediatoren	52
3.1.4	Einfluss einer längerfristigen freien Fettsäureexposition <i>in vitro</i> auf die basale Expression der proinflammatorischen Mediatoren	55
3.1.5	Einfluss einer konzentrationsabhängigen Stimulation mit Linolsäure <i>in vitro</i> auf die basale Expression der proinflammatorischen Mediatoren	59

3.2.	Expression von proinflammatorischen Mediatoren in Kupffer-Zellen unter Fettexposition	66
3.2.1	Einfluss einer Triglyceridexposition <i>in vitro</i> auf die basale Expression der proinflammatorischen Mediatoren	66
3.2.2	Einfluss einer Triglyceridexposition während einer induzierten Entzündungsreaktion <i>in vitro</i> auf die basale Expression der proinflammatorischen Mediatoren	67
3.2.3	Einfluss einer konzentrationsabhängigen Stimulation mit Palmitinsäure und Linolsäure <i>in vitro</i> auf die basale Expression der proinflammatorischen Mediatoren	70
3.2.4	Einfluss einer freien Fettsäureexposition während einer induzierten Entzündungsreaktion <i>in vitro</i> auf die basale Expression der proinflammatorischen Mediatoren	75
3.2.5	Einfluss niedriger Konzentrationen von Linolsäure <i>in vitro</i> auf die basale Expression der proinflammatorischen Mediatoren	78
3.3	Expression von proinflammatorischen Mediatoren in Hep G2 (humane Hepatomzellen) unter Fettexposition	81
3.3.1	Einfluss einer Triglyceridexposition <i>in vitro</i> auf die basale Expression der proinflammatorischen Mediatoren	81
3.3.2	Einfluss einer freien Fettsäureexposition <i>in vitro</i> auf die basale Expression der proinflammatorischen Mediatoren	82
4.	DISKUSSION	85
5.	ZUSAMMENFASSUNG	94
6.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	97
7.	TABELLENVERZEICHNIS	100
8.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	101
9.	LITERATURVERZEICHNIS	103

1. Einleitung

1.1 Die Leber

Die menschliche Leber ist mit einem Gewicht von etwa 1,5 kg nicht nur die größte Drüse des menschlichen Körpers, sondern auch als zentrales Organ des Intermediärstoffwechsels lebensnotwendig.

Die Leber ist im rechten Oberbauch lokalisiert, reicht bis zum rechten Rippenbogen hinunter und liegt zum größten Teil intraperitoneal. Mit ihrer konvex gewölbten Oberfläche, der Facies diaphragmatica, liegt sie dem Zwerchfell an und mit der Unterfläche bildenden Facies visceralis liegt sie den Eingeweiden auf. An der Unterseite befindet sich die so genannte Leberpforte, Porta hepatis, über die die Pfortader und Leberarterie in die Leber eintreten und die Lebergallengänge sie verlassen. Über die Pfortader, V. portae, erfolgt der venöse Abfluss aus den unpaaren Bauchorganen. Hierüber gelangen, neben Abbauprodukten der Milz, Hormone der Bauchspeicheldrüse, insbesondere resorbierte niedermolekulare Nahrungsbestandteile, von Magen und Darm zur Leber. Die arterielle Versorgung des Organs mit Sauerstoff erfolgt über die A. hepatica communis aus dem Truncus coeliacus (BENNINGHOFF und DRENCKHAN 2004).

1.1.1 Aufbau der Leber

Die Leber lässt sich makroskopisch in 4 Leberlappen unterteilen: Lobus dexter, Lobus sinister, Lobus quadratus und Lobus caudatus. Verfolgt man das Verzweigungsmuster von den Ästen der V. portae, A. hepatica und den Gallengängen, der so genannten Glisson'schen Trias, so wird eine segmentale Gliederung der Leber erkennbar, die insbesondere in der chirurgischen Lappenresektion relevant ist.

Als histologische Baueinheit gilt das Leberläppchen (Abb. 1a). Diese sind im Anschnitt sechseckige Gebilde, die jeweils aus Hepatozyten, Sinusoiden und einer Zentralvene bestehen. An den Eckpunkten benachbarter Leberläppchen liegen die Periportalfelder mit den darin enthaltenen Leitungsbahnen der Glisson-Trias. Zwischen Periportalfeld und Zentralvene fließt das Blut in speziellen erweiterten

Kapillaren der Leber, den so genannten Sinusoiden (Abb. 1b). In ihnen vereinigt sich das sauerstoffreiche Blut der Leberarterienäste mit dem nährstoffreichen Blut der Pfortader. Die Hepatozyten, die für die eigentlichen Stoffwechselleistungen der Leber verantwortlich sind, sind zwischen den Sinusoiden radiär in Balken ausgerichtet. Somit wird ein optimaler Stoffaustausch zwischen Blut und Hepatozyten gewährleistet. Das Blut gelangt von der Zentralvene in die so genannten Sammelvenen, die als abführende Blutgefäße das Blut über die Lebervenen in die Vena cava inferior drainieren.

Abb. 1a : Schematische Darstellung des Lebergewebes. Histologische Gliederung des Leberparenchyms in (A) Zentralvenenläppchen, (B) Portallläppchen und (C) Leberazinus. Die Leberläppchen sind von einer bindegewebigen Kapsel umgeben, in der die Strukturen der Glisson-Trias verlaufen: Äste von (1) A. hepatica, (2) V. portae und (3) Ductus hepaticus. Aus dem (4) Portalkanal entspringen die terminalen Verzweigungen, die das Lläppchen zirkulär umlaufen. Im Zentrum des Leberläppchens wird das Blut über die (5) V. centralis in die (6) V. cava inferior abgeleitet [Abbildung modifiziert nach BENNINGHOFF und DRENCKHAN 2004, S. 706].

Abb. 1b : Schematische Darstellung der Leberzellbälkchen und Zellen der Sinuswände. Der polare (1) Hepatozyt besitzt eine apikale Membran, die dem (2) Gallenkanälchen zugewandt ist und eine basolaterale Membran, die zur Blutseite hinweist. Zwischen den Leberzellplatten und das Sinusoid auskleidenden, fenestrierten (3) Sinusendothelzellen liegt der (A) Disse-Raum, in dem der unmittelbare Kontakt zwischen Blut und den mit Mikrovilli ausgestatteten Hepatozyten erfolgt. Im Disse-Raum sind die fettspeichernden (4) Ito-Zellen lokalisiert. Das venös-arterielle Mischblut gelangt über die zuführenden Gefäße, die in der (B) Glisson-Trias (Arterie, Vene, Gallengang) verlaufen, in die Leberkapillaren. Im (C) Lebersinusoid befinden sich die (5) leberspezifischen Makrophagen (Kupffer-Zellen) und in geringerer Zahl auch (6) leberassoziierte Lymphozyten (Pit-Zellen). Nach der Kapillarpassage wird das Blut über die Gefäße der (D) V. centralis abtransportiert [Abbildung modifiziert nach LÜLLMANN-RAUCH 2003, S. 339].

Die Sinusoide sind von einem gefensterten Endothel ausgekleidet und enthalten leberspezifische Makrophagen, die so genannten Kupffer-Zellen. Das Sinusendothel ist von den Hepatozyten durch einen schmalen kapillären Spaltraum, den Disse-Raum, getrennt. Hier findet der eigentliche Stoffaustausch zwischen Blut und Hepatozyt statt. Im Disse-Raum findet man weiterhin die Ito-Zellen, die in ihren Lipidtropfen das aus dem Darm resorbierte Vitamin A speichern.

An den Stellen, wo sich die Hepatozyten Rücken an Rücken gegenüber liegen, bilden sich zwischen ihnen Gallenkanälchen. Diese durchziehen die Leberläppchen netzartig und transportieren die von den Hepatozyten gebildete Galle, dem Blutstrom entgegengesetzt, zu den interlobulär gelegenen Gallengängen (LÜLLMANN-RAUCH 2003).

Weiterhin wird auch zur histologischen Gliederung des Leberparenchyms dem klassischen azinären Zonierungsmodell eine lobulär orientierte Zonierung

gegenübergestellt. Demnach bilden in der periportalen Zone die Sinusoide und die anliegenden Leberzellbalken ein irreguläres Netzwerk, während in der perivenösen Zone die Sinusoide und Leberzellbalken radiär auf die terminale hepatische Vene zulaufen (LAMERS et al. 1989). Diese Konzepte sind für das Verständnis von physiologischen und pathologischen Beobachtungen an der Leber interessant.

1.1.2 Aufgaben der Leber

Die Leber übernimmt als zentrales Organ des Intermediärstoffwechsels vielfältige Aufgaben. Ihre besondere Funktion im Intermediärstoffwechsel erklärt sich aus ihrer anatomischen Lage. So erhält sie während der Resorptionsphase die über den Intestinaltrakt aufgenommenen Nahrungsstoffe, Vitamine und Elektrolyte, die sie zum größten Teil speichert. In der postresorptiven Phase, der so genannten Hungerphase, kann die Leber dann diese Substrate in den Blutkreislauf abgeben, um somit diese den anderen Organen und Geweben des Körpers zur Deckung ihres Energiebedarfs zur Verfügung zu stellen (LÖFFLER et al. 2006). Im Einzelnen bedeutet dies die Sicherstellung der Energieversorgung des Organismus durch die Speicherung und Freisetzung von Glucose, durch Aminosäure-Katabolismus, Lipid-Prozessierung und Ketonkörper-Synthese. Weiterhin ist die Leber für die Synthese der meisten Plasmaproteine (Albumin, Gerinnungsfaktoren, Proteinaseinhibitoren, Transportproteine, etc.) verantwortlich und beeinflusst über Auf- und Abbau von Eiweißen unter Bildung von Harnstoff das Plasmavolumen. Die Verdauung wird maßgeblich durch die Produktion und Freisetzung von Gallensäuren unterstützt. Die Leber ist ebenso an der Steuerung des Hormonhaushalts beteiligt, indem sie (Pro)-Hormone und Mediatoren synthetisiert und freisetzt, aber auf der anderen Seite diese auch inaktiviert. Weiterhin ist die Leber das wichtigste Organ für die Biotransformation, die eine Entgiftung von Endo- und Xenobiotica ermöglicht (JUNGGERMANN und KATZ 1989).

Zu beachten gilt, dass nicht in jeder Leberzelle die aufgeführten Stoffwechselleistungen erbracht werden können. Vielmehr liegt eine zonale Verteilung im Leberläppchen vor, indem die Enzyme gemäß einer „metabolischen Heterogenität“ entweder in periportal oder in perivenös gelegenen Hepatozyten exprimiert werden (JUNGGERMANN und KIETZMANN 1996).

1.1.3 Zellen der Leber

Das Lebergewebe setzt sich aus verschiedenen Zelltypen zusammen. Etwa 65 % der Zellmasse besteht aus den eigentlichen Leberparenchymzellen, den Hepatozyten. Diese laufen zu Leberzellbalken geordnet, radiär auf die Vena centralis zu und sind für die eigentlichen Stoffwechselleistungen der Leber zuständig. Die restlichen 35 % der zellulären Bestandteile der Leber umfassen die nichtparenchymatösen Zellen, die insgesamt jedoch nur 6 Volumenprozent des Läppchenparenchyms ausmachen. Diese Zellen befinden sich vor allem entlang der blutgefüllten Sinusoide und stehen funktionell in enger Beziehung zu den Parenchymzellen. Die heterogene Gruppe der nichtparenchymatösen Zellen schließen die Sinusendothelzellen (44 % Volumendichte), Kupffer-Zellen (33 % Volumendichte), Ito-Zellen (20 % Volumendichte) und Pit-Zellen (3 % Volumendichte) mit ein. Weiterhin werden auch die intrahepatischen, biliären Epithelzellen zu der großen Gruppe der Leberzellen hinzugezählt (DANCYGIER 2003).

1.1.3.1 Hepatozyten

Hepatozyten sind polare, polygonale, epitheliale Zellen mit einem Durchmesser von 20 - 40 µm. Hepatozyten besitzen einen Kern, der diploid, tetraploid oder oktaploid sein kann. Weiterhin findet man im Zellinneren neben dem Zytoskelett und den Organellen Glykogeneinschlüsse, kristalline Strukturen aus Phospholipiden und Proteine sowie Lipidtröpfchen.

Hepatozyten sind für die eigentlichen Stoffwechselleistungen der Leber zuständig. Sie weisen eine spezielle polarisierte Bau- und Funktionsweise auf. Der basale Pol (Blutpol) ist zu den Sinusoiden hin ausgerichtet. Über zahlreiche Mikrovilli erfolgt der direkte Blutkontakt im Disse-Raum sowie in den Sinusoiden. Hier werden Stoffe aus dem Blut aufgenommen und Syntheseprodukte sowie Glucose an das Blut abgegeben. Der apikale Pol (Gallepol) ist den Gallenkanälchen zugewandt, die durch Einstülpungen der Zellmembran benachbarter Hepatozyten entstehen. Hier wird die Galle sezerniert. Die laterale Membran stellt die Kontaktfläche zwischen benachbarten Hepatozyten dar, welche über Desmosomen miteinander verknüpft werden. Über *Tight junctions* wird der Gallenkanal gegenüber dem interzellulären

Spalt abgegrenzt und *Gap junctions* ermöglichen eine Kommunikation zwischen den zytosolischen Räumen benachbarter Hepatozyten (DANCYGIER 2003).

1.1.3.2 Kupffer-Zellen

Kupffer-Zellen sind leberspezifische, sessile Gewebsmakrophagen, die sich aus Monozyten differenzieren. Sie gehören zu dem monozytären Phagozytensystem des Körpers und machen etwa 80 - 90 % aller Gewebemakrophagen des Organismus aus. Die Kupffer-Zellen sind intrasinusoidal lokalisiert. Sie weisen Fältelungen der Zellmembran, Mikrovilli und sternförmige Zytoplasmaausläufer auf. Mittels ihrer langen Fortsätze können sie Kontakt mit Sinusendothelzellen und Hepatozyten aufnehmen. Die topografische Lage ermöglicht es ihnen, potentielle Pathogene wie Mikroorganismen, Endotoxine und Immunkomplexe sowie andere körpereigene oder körperfremde Makromoleküle aus dem Pfortaderblut zu entfernen (DECKER 1990).

Die wichtigsten Aufgaben der Kupffer-Zellen sind die Aufnahme, Verarbeitung und Präsentation von antigenem Material sowie die Sekretion von Substanzen mit antimikrobieller und zytotoxischer Wirkung wie Defensine und Stickoxid (WINWOOD und ARTHUR 1993). Als Teil der unspezifischen Körperabwehr können Kupffer-Zellen Fremdmaterial durch Endozytose aufnehmen. Auf der anderen Seite werden mit Immunglobulinen oder Faktoren des Komplementsystems markierte Fremdzellen oder Fremdkörper von den Kupffer-Zellen phagozytiert. Die Identifikation und Bindung der aufzunehmenden Substanzen erfolgen über spezifische Rezeptoren (SHIRATORI et al. 1993).

Des Weiteren produzieren und sezernieren Kupffer-Zellen Zytokine wie: Interleukin-1, Interleukin-6, Tumornekrosefaktor- α (GREWE et al. 1994), Tumornekrosefaktor- β , Interferon- α und Interferon- β , die eine wichtige Rolle während der Akute-Phase-Reaktion einnehmen. Weiterhin wird eine parakrine Wirkung der Kupffer-Zellen durch Sekretion von Eikosanoiden, Wachstumsfaktoren und Zytokinen auf Hepatozyten, Sinusendothelzellen und Ito-Zellen vermutet (DANCYGIER 2003).

1.1.3.3 Sinusendothelzellen

Die Sinusendothelzellen der Leber formieren die Auskleidung der Sinusoide und sind im Unterschied zu den vaskulären Endothelzellen fenestriert. Ihre Fenestrae weisen einen Durchmesser von 100 - 150 µm auf und vermitteln die direkte Kommunikation zwischen Sinusoidallumen und Disse-Raum. Sie ermöglichen somit Makromolekülen aus den Sinusoiden freien Zugang zur Hepatozytenoberfläche, halten aber gleichzeitig zelluläre und hochmolekulare Substanzen zurück, so dass sie als Filter zwischen Hepatozyten und Blut fungieren (BURT et al. 1993).

Des Weiteren synthetisieren und sezernieren Sinusendothelzellen Wachstumsfaktoren, Chemokine und Adhäsionsmoleküle. Während eines Entzündungsvorganges kommt es zu spezifischen Änderungen in der Expression dieser Moleküle, so dass die Zellen aktiv an entzündlichen Prozessen und der Infiltration von inflammatorischen Zellen teilnehmen (RAMADORI et al. 2008). Weiterhin können Sinusendothelzellen Komponenten der extrazellulären Matrix wie Kollagen und Fibronectin synthetisieren (NEUBAUER et al. 1999).

1.1.3.4 Ito-Zellen

Ito-Zellen (Syn.: Perisinusoidalzellen, hepatische Sternzellen, Lipozyten) sind zwischen der basolateralen Membran der Hepatozyten und der lumenabgewandten Seite der Sinusendothelien, im so genannten Disse-Raum, lokalisiert. Sie bilden lange dendritisch verzweigte Zellfortsätze, die die Sinusoide umgreifen und mit den benachbarten Hepatozyten in Kontakt treten (BURT et al. 1993).

Die ruhende Ito-Zelle ist klein, dicht gepackt mit Fettvakuolen und speichert Vitamin A. Über Signalstoffe, wie z. B. Tumornekrosefaktor- α und Interleukine kann die Aktivierung der Ito-Zellen erfolgen. Die Zelle wird größer, ihre Ausläufer werden länger, der proteinsekretorische Apparat expandiert und die Zahl der Fettvakuolen nimmt ab (MINATO et al. 1983). Durch ihre Fähigkeit zur Biosynthese von Matrixkomponenten, wie Fibronectin und Proteoglykane (RAMADORI et al. 1987) oder Undulin (KNITTEL et al. 1992), können sie eine entscheidende Rolle in der zur Leberzirrhose führenden Leberfibrosierung spielen.

In der aktuellen Literatur unterscheidet man zwischen aktivierten Ito-Zellen und den aus dem Portalfeld stammenden Lebermyofibroblasten. Neben den Ito-Zellen haben

aktivierte Myofibroblasten bei der Entstehung der Leberzirrhose eine entscheidende Bedeutung (RAMADORI und SAILE 2004).

1.1.3.5 Pit-Zellen

Pit-Zellen sind leberassoziierte Lymphozyten die an der luminalen Oberfläche der Sinusoide angeheftet sind. Sie besitzen weitläufige, zytoplasmatische Ausläufer mit denen sie in Kontakt mit Kupffer-Zellen, Ito-Zellen und Hepatozyten treten. Des Weiteren können Pit-Zellen Pseudopodien ausbilden und sich vermutlich aktiv entlang der sinusoidalen Wand bewegen (WISSE et al. 1976). Ihre Struktur ist vergleichbar mit der von großen, granulären Lymphozyten, die jedoch natürliche Killerzell-Aktivität besitzen. Darunter versteht man die spontane Fähigkeit dieser Zellen, Fremdartigene, viral infizierte Zellen oder Tumorzellen abzubauen, ohne dass eine vorausgegangene Immunisierung notwendig ist (BURT et al. 1993).

1.2 Leberentzündung

Aufgrund ihrer vielfältigen Funktionen im Bereich des Stoffwechsels, sowie durch ihre besondere anatomische Positionierung im Organismus, steht die Leber auch im Mittelpunkt vieler den Organismus schädigender Ereignisse. Die Ursachen für eine entzündliche Erkrankung der Leber, einer so genannten Hepatitis, sind mannigfaltig. Führt eine andere zugrunde liegende Erkrankung zu einer Leberentzündung, wird von einer so genannten Begleithepatitis gesprochen.

1.2.1 Ursachen der Leberentzündung

Häufig erfolgt eine Infektion durch die klassischen Hepatitisviren A, B, C, D und E. Etwas seltener führen Infektionen durch Herpesviren (Epstein-Barr, Zytomegalie, Varicella zoster, Herpes simplex) sekundär zu einer Begleithepatitis. Des Weiteren können diverse bakterielle Erreger (z. B. Brucellen oder Leptospiren), parasitäre Erreger (z. B. Schistosoma, Plasmodien, Amöben oder Echinokokken) oder auch

Pilze Auslöser einer Leberentzündung sein. Darüber hinaus können neben infektiösen Ursachen auch immunologische Störungen, cholestatische Erkrankungen, physikalische Schäden sowie hereditäre Stoffwechselerkrankungen der Leber, wie z. B. Morbus Wilson, Hämochromatose oder Alpha1-Proteaseninhibitormangel, einer Entzündung zu Grunde liegen. In der heutigen Zeit spielen in der Pathogenese jedoch zunehmend medikamentös induzierte und alkoholtoxische Leberschäden eine entscheidende Rolle (HEROLD et al. 2008).

In der Klinik differenziert man zwischen einem akuten und einem chronischen Krankheitsverlauf. Eine chronische Leberentzündung kann im Verlauf zu einer Karzinomentstehung führen (PATEL et al. 1999).

1.2.2 Pathophysiologie

Die Leberentzündung ist durch die Schädigung und Zerstörung von Leberzellen charakterisiert. Das Ausmaß des mehr oder weniger umfänglichen Leberzellunterganges ist vom einwirkenden Agens abhängig. Da die Leber über eine sehr hohe Regenerationsfähigkeit verfügt, ist eine *restitutio ad integrum* bei einem Sistieren der zugrunde liegenden Noxe möglich. Bei Persistenz des Entzündungsreizes führt jedoch der kontinuierliche Leberzelluntergang zu Bindegewebsablagerungen in der Leber, als Ausdruck der Wundheilung. Wird die exzessive Ablagerung von extrazellulärer Matrix nicht beendet, so entwickelt sich als Hauptkomplikation der chronischen Leberschädigung eine Leberfibrose (RAMADORI et al. 2008). Die Leberfibrose kann letztendlich in einer Leberzirrhose, das Endstadium chronischer Lebererkrankungen, münden. Dieses Stadium ist irreversibel und geht mit Störung der Leberarchitektur und Regeneratknotenbildung einher. Dies hat Funktionseinschränkungen der Leber sowie Störungen der Leberhämodynamik zur Folge, die wiederum sekundär die Funktion anderer Organe beeinträchtigen können (DANCYGIER 2003).

1.2.3 Mechanismus der Abwehr und Entzündung

Schädigungen des Lebergewebes führen auf der einen Seite zur Aktivierung von leberspezifischen Gewebsmakrophagen und auf der anderen Seite zur Freisetzung von spezifischen Mediatoren, den so genannten Chemokinen (Abb. 2). Die aktivierten Kupffer-Zellen nehmen eine Schlüsselposition in dem Pathomechanismus der Leberentzündung ein. Die von diesen sezernierten Chemokine und Zytokine induzieren zum einen direkt durch die Einwirkung der Mediatoren auf die Leberzellen und zum anderen indirekt via Chemotaxis von extrahepatischen Entzündungszellen eine Gewebsschädigung (RAMADORI et al. 2008).

Proinflammatorische Zytokine wie Interferon- γ und Tumornekrosefaktor- α induzieren eine gesteigerte Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 (*Intracellular Cell Adhesion Molecule-1*), VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule-1*) sowie eine verminderte Expression von PECAM-1 (*Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1*) in Sinusendothelzellen. Diese Moleküle sind essentiell für die Rekrutierung, die Adhäsion und die Transmigration von Entzündungszellen (NEUBAUER et al. 2000). Während des Entzündungsprozesses kann es zu Infiltration von folgenden Entzündungszellen in die Leber kommen: T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Plasmazellen, Histiozyten, eosinophile Granulozyten, neutrophile Granulozyten, Makrophagen, natürliche Killerzellen und Mastzellen.

Die ortsansässigen Pit-Zellen nehmen ebenfalls an der Entzündungsreaktion teil. Diese Zellpopulation ist in der Lage, ohne Voraktivierung, insbesondere virale Infektionen und maligne Zellen effektiv zu bekämpfen. Des Weiteren aktivieren gewebsständige sowie rekrutierte Makrophagen mesenchymale Zellen. Insbesondere Ito-Zellen wie auch Myofibroblasten synthetisieren extrazelluläre Matrix im Rahmen des Wundheilungsprozesses. Bei fortdauernder Leberschädigung kommt es zu einem Ungleichgewicht zwischen Fibrogenese und Fibrolyse, welche letztendlich in einer Vernarbung des Gewebes münden kann (SAILE und RAMADORI 2007).

Abb. 2 : Schema Leberentzündung

[Abbildung modifiziert nach SAILE und RAMADORI 2007, S. 78]

1.2.4 Proinflammatorische Mediatoren

Während eines inflammatorischen Prozesses im Organismus wird eine ganze Reihe an unterschiedlichen, löslichen Mediatoren von unterschiedlichen Zellpopulationen freigesetzt. Mittels dieser proinflammatorischen Mediatoren wird der Entzündungsprozess gesteuert sowie unterhalten.

In dieser Arbeit wurde das Verhalten folgender proinflammatorischer Mediatoren unter Fettexposition untersucht:

1.2.4.1 Zytokine

Zytokine sind Moleküle, die von Zellen des Immunsystems freigesetzt werden und wichtige Teile der Entzündung vermitteln. Während der akuten Inflammation spielen die Zytokine IL-1 β , TNF- α und IL-6 eine entscheidende Rolle. Diese Zytokine wirken über auto- und parakrine Wirkmechanismen aktivierend auf diverse Zellpopulationen. Weiterhin regulieren sie die Expression von Adhäsionsmolekülen, die für die Migration von Entzündungszellen zum Ort der Entzündung essentiell sind (FEGHALI und WRIGHT 1997).

Tab. 1 : Zytokine

Zytokine	
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α

1.2.4.2 Chemokine

Chemokine sind körpereigene Signalproteine, die während eines Entzündungsprozesses eine Chemotaxis von Immunzellen zum Ort der Entzündung auslösen. Die Zellen bewegen sich dabei entlang eines Konzentrationsgradienten zum Ort der höchsten Chemokinkonzentration. Folgende Chemokine wurden in dieser Arbeit genauer untersucht:

Das Chemokin MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein-1*), bzw. nach der neuen Nomenklatur CCL2, weist *in vitro* und *in vivo* eine starke chemotaktische Wirkung auf Monozyten auf (ROLLINS 1991).

Ebenfalls zur Rekrutierung sowie zur Aktivierung von im Blut zirkulierenden Monozyten, dienen die MIP-Chemokine (CAVAILLON 1994).

Da das Chemokin Interleukin-8 von Ratten nicht exprimiert wird, kann in Bezug auf die hier vorgelegten Untersuchungen das murine Analogon CINC (*Cytokine Induced Neutrophil Chemoattractant*) herangezogen werden. Wie sein humanes Gegenstück IL-8 ist CINC ein Mitglied der Chemokin-Familie CXC und wirkt in erster Linie auf neutrophile Granulozyten (MAHER 1995).

Tab. 2 : Chemokine

Chemokine	Alte Bezeichnung
CC-Familie	
CCL2	MCP-1 (<i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>)
CCL3	MIP-1 α (<i>Macrophage Inflammatory Protein-1α</i>)
CXC-Familie	
CXCL1	GRO α /CINC (<i>Cytokine Induced Neutrophil Chemoattractant</i>)
CXCL2	GRO β /MIP-2 α (<i>Macrophage Inflammatory Protein-2α</i>)
CXCL8	IL-8 (Interleukin-8)

1.2.4.3 Adhäsionsmoleküle

Im Rahmen von Entzündungsprozessen kommt es zur Freisetzung von Mediatoren wie z. B. TNF- α , die eine Adhäsion von Entzündungszellen an Endothelzellen, gefolgt von der Migration der Entzündungszellen durch die Endothelzellschicht, induzieren. ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule-1*) ist ein Adhäsionsmolekül, welches an der Adhäsionskaskade von Leukozyten an Endothelzellen im Rahmen der Inflammation beteiligt ist (DUSTIN et al. 1986).

PECAM-1 (*Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1*) gehört zu den Adhäsionsmolekülen, die für den Durchtritt von Leukozyten durch die Endothelspalten essentiell sind (MÜLLER et al. 1993).

Tab. 3 : Adhäsionsmoleküle

Adhäsionsmolekül	
ICAM-1	<i>Intercellular Adhesion Molecule-1</i>
PECAM-1	<i>Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1</i>

1.3 Steatose und Steatohepatitis

Die Steatose ist eine häufige Erkrankung der Leber, die in der Regel mit reversibler Einlagerung von Fett, in Form von Fettvakuolen in den Hepatozyten, einhergeht. Von einer Leberverfettung spricht man, wenn weniger als die Hälfte der Hepatozyten Fett speichern. Weisen mehr als die Hälfte der Leberparenchymzellen Fetteinlagerungen, meist Neutralfett, auf oder entfällt mehr als 5 % des Lebergewichts auf Fett, dann liegt eine Fettleber (Steatosis hepatis) vor. Findet man zusätzlich zu den Leberzellschäden in Form von Verfettung, Ballonierung und Zelltod der Zellen noch entzündliche Zellinfiltrate, so handelt es sich um eine Steatohepatitis. Ein zusätzliches, jedoch nicht notwendiges Kriterium stellt eine perisinusoidale Fibrose dar. In der Klinik wird anhand der Ätiologie zwischen der Alkoholischen Fettlebererkrankung (AFLD) und der Nichtalkoholischen Fettlebererkrankung (NAFLD) differenziert (DANCYGIER 2006).

1.3.1 Nichtalkoholische Fettleber

Das Spektrum der Nichtalkoholischen Fettlebererkrankungen, *Non Alcoholic Fatty Liver Disease* (NAFLD), reicht von der blanden Steatose über die Steatohepatitis (NASH), Steatofibrose bis hin zur Leberzirrhose. 1980 beschrieben LUDWIG et al. erstmals das Erscheinungsbild der NASH als einer Lebererkrankung bestehend aus Fetteinlagerungen und zusätzlicher entzündlicher Aktivität. Die Läsionen der NASH sind histologisch nicht von den Läsionen bei alkoholischer Hepatitis zu unterscheiden, und stellen die Progression einer NAFLD dar. Darüber hinaus wird zunehmend auch das Hepatozelluläre Karzinom im Zusammenhang mit einer NAFLD beobachtet.

Die Nichtalkoholische Fettlebererkrankung gewinnt zunehmend an Bedeutung in der klinischen Praxis, da diese die häufigste Ursache für die Erhöhung der Aminotransferasen unklarer Genese sowie der kryptogenen Leberzirrhose darstellt. Die Leberbiopsie ist der Goldstandard, um den klinischen Verdacht einer NAFLD zu bestätigen (NEUSCHWANDER-TETRI und CALDWELL 2003).

1.3.1.1 Epidemiologie

Die Nichtalkoholische Fettlebererkrankung ist die häufigste Lebererkrankung in den westlichen Industrienationen. Die Prävalenz in der erwachsenen Bevölkerung in den Industrienationen wird auf etwa 20 % geschätzt, die der NASH auf etwa 2 bis 3 %. Die Inzidenz der NAFLD liegt bei etwa 2 % Neuerkrankungen pro Jahr, wobei insbesondere übergewichtige Patienten und Typ-2-Diabetiker besonders häufig betroffen sind (BELLENTANI et al. 2004). Neuere Untersuchungen haben darüber hinaus belegt, dass auch übergewichtige Kinder NASH-Läsionen aufweisen können (RASHID und ROBERTS 2000).

1.3.1.2 Ätiologie

Da die Nichtalkoholische Fettlebererkrankung sowie die Steatohepatitis häufig mit Übergewicht, Dyslipoproteinämie, essentieller Hypertonie, Insulinresistenz und Diabetes mellitus vergesellschaftet sind, werden sie auch als hepatische Manifestation des metabolischen Syndroms angesehen. Das metabolische Syndrom ist mit Abstand die häufigste Ursache der NAFLD, wobei die Progredienz der Erkrankung mit der Anzahl der Komponenten des metabolischen Syndroms korreliert. Insbesondere die Kombination von Adipositas und Diabetes mellitus scheint mit einem besonders großen Risiko der NASH-Entwicklung behaftet zu sein (MARCHESINI et al. 2003).

Des Weiteren sind auch Medikamente als Auslöser steatohepatitischer Reaktionen zu berücksichtigen, wobei insbesondere für Amiodaron, Perhexilin und Glucocorticoide ein eindeutiger Nachweis geliefert wurde (STRAVITZ und SANYAL 2003).

Massive Gewichtsreduktion, im Rahmen von chirurgischen Eingriffen in der Adipositasbehandlung (PETERS et al. 1975), massive Dünndarmresektionen mit Kurzdarmsyndrom oder exzessivem Fasten (PALMER und SCHAFFNER 1990), werden ebenfalls mit der Entwicklung von NASH assoziiert.

Bei totaler parenteraler Ernährung führt insbesondere die Zufuhr großer Glucosemengen und Fettemulsionen zur Entwicklung einer Fettleber (QUIGLEY et al. 1993). Darüber hinaus wurde in einzelnen Fällen über das Vorkommen einer Fettleberhepatitis bei Morbus Weber-Christian, A- β -Lipoproteinämie, Lipodystrophie, Gliedmaßenendystrophie und Dünndarmdivertikulose berichtet (DANCYGIER 2006).

1.3.1.3 Pathogenese

Zur Ablagerung von Triglyceriden in der Leber kommt es durch eine Störung des hepatischen Fettstoffwechsels. So tritt eine Verfettung von Leberparenchymzellen auf, wenn Synthese und bzw. oder Zufuhr von Neutralfetten deren hepatischen Abbau oder Abtransport übersteigen. Die genaue Pathogenese der NASH ist jedoch ungeklärt. So kann man sich bis heute nicht erklären, warum es in einem Fall nur zur blanden, reversiblen Fettleber und im anderen Fall aber auch zu nekroinflammatorischen und fibrotischen Veränderungen kommt, die mit einer höheren Wahrscheinlichkeit eines progredienten Verlaufes zur Zirrhose einhergehen (DANCYGIER 2006).

Die beschriebene „*Two-Hit-Hypothese*“ von DAY und JAMES (1998) wird für Erklärungsversuche der multifaktoriellen Pathogenese herangezogen. Nach dieser Modellvorstellung ist ein wichtiger pathogenetischer Schritt auf dem Weg zur NASH die Steatose selbst. Die Steatose versetzt somit mit Anhäufung freier Fettsäuren und Triglyceriden in der Leber dem Organ einen „ersten Schlag“, der wiederum die Empfindlichkeit der Leber gegenüber Mechanismen, die den nekroinflammatorischen Vorgang auslösen und unterhalten, erhöhen. Letztgenanntes bezeichnet man als „zweiten Schlag“, der vor allem durch Endotoxine, oxidativen Stress und genetische Faktoren, die die Biotransformation beeinflussen, ausgeführt werden (Abb. 3).

Zusammengefasst kann man sagen, dass die Insulinresistenz der zentrale Faktor in der Entstehung der Steatose ist. Auf der Basis der chronischen Inflammation des metabolischen Syndroms mit Bildung reaktiver Sauerstoffradikale, Lipidperoxide und proinflammatorischer Zytokine sowie der Induktion von Apoptose kommt es zur Zellschädigung. Die einfache Steatose schreitet im Rahmen der oben bereits beschriebenen Entzündungsreaktionen der Leber zur Steatohepatitis und Steatofibrose voran (DANCYGIER 2006).

Abb. 3 : Schema Pathogenese der Steatohepatitis

1.4 Ziel der Arbeit

Das verstärkte Auftreten von so genannten „Wohlstandskrankheiten“ in den westlichen Industrienationen, entwickelt sich zu einem schwerwiegenden medizinischen, sozialen und ökonomischen Problem. Laut Weltgesundheitsorganisation (WHO) stellt die Adipositas eine der größten Herausforderungen für die Gesundheitspolitik des 21. Jahrhunderts dar. Die Prävalenz der Adipositas nimmt weltweit kontinuierlich zu. In Deutschland sind derzeit etwa 60 % der Erwachsenen übergewichtig bzw. adipös (HAMANN 2008). Eine abdominelle Adipositas gilt weiterhin als wichtiger Faktor des metabolischen Syndroms, deren klinische Bedeutung in einem erhöhten Risiko für Diabetes mellitus sowie kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität liegt. Ebenso wird eine steigende Prävalenz des metabolischen Syndroms verzeichnet, so dass entsprechend der Definition der *National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III* (NCEP/ATP III) die Prävalenz in Deutschland knapp über 20 % beträgt (MOEBUS et al. 2006).

Da die Nichtalkoholische Fettlebererkrankung häufig mit Übergewicht, Insulinresistenz und Diabetes mellitus vergesellschaftet ist, wird diese Erkrankung auch als hepatische Manifestation des metabolischen Syndroms angesehen. Studien haben gezeigt, dass Patienten mit metabolischem Syndrom ein 4- bis 11-fach erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer NAFLD haben (HAMAGUCHI et al. 2005). Ebenso demonstrieren Studien von BELLENTANI et al. (2000), dass die Prävalenz für

NAFLD für übergewichtige Personen um den Faktor 4,6 erhöht ist. Die Zahlen zeigen, dass auch in Zukunft die Behandlung von Nichtalkoholischen Fettlebererkrankungen einen besonders hohen Stellenwert einnehmen wird, da ein Rückgang für weitere Neuerkrankungen nicht abzusehen ist. Bisher nimmt man an, dass eine entzündliche Veränderung einer Fettleber zur Entwicklung einer Steatohepatitis führt. Um eine adäquate Behandlung der Lebererkrankung sowie eine effiziente Prävention dieser durchführen zu können, sind weitere Kenntnisse für den Pathomechanismus notwendig.

Im Rahmen von Vorarbeiten zu dieser Dissertation, habe ich an Untersuchungen der Arbeitsgruppe um BUDICK-HARMELIN et al. (2008) teilgenommen, die die Entzündungsreaktionen von Kupffer-Zellen unter Endotoxin- und Fettexposition untersucht haben. Die Studien haben zum einen gezeigt, dass die alleinige Exposition gegenüber Triglyceriden in Gegenwart der Kupffer-Zellen keinen nennenswerten Effekt zeigt. Zum anderen zeigen die Studien, dass eine simultane Exposition gegenüber Triglyceriden und Endotoxinen eine signifikant verstärkte Induktion von den proinflammatorischen Mediatoren IL-1 β , IL-6 und TNF- α , dem Peptidhormon G-CSF, welches unter anderem bei Entzündungen zur Anregung der Bildung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten ausgeschüttet wird, sowie dem Enzym iNOS, welches die Bildung von Stickstoffmonoxid katalysiert, in den Kupffer-Zellen im Vergleich zur alleinigen Endotoxinbehandlung aufweist. Des Weiteren wurde untersucht, welche Bestandteile des Fettes für den proinflammatorischen Effekt zuständig sind. Die Applikation von langkettigen Triglyceriden in Form von Clinoleic sowie von mittelkettigen Triglyceriden in Form von Lipofundin zeigen eine annähernd identische Expressionssteigerung. Eine simultane Stimulation der Kupffer-Zellen mit Triglyceriden und dem Lipase-Inhibitor Paroxon zeigt ebenfalls eine gesteigerte Genexpression der proinflammatorischen Mediatoren. Daraus kann man rückschließen, dass der induzierende Effekt nicht auf der lipaseabhängigen Triglycerid-Hydrolyse basiert. Um zu bestätigen, dass der proinflammatorische Effekt in den Kupffer-Zellen durch die Triglyceride und nicht durch freie Fettsäuren hervorgerufen wird, wurden zusätzlich die Zellen mit den freien Fettsäuren Palmitinsäure und Linolsäure stimuliert. Die Studienergebnisse demonstrieren, dass Triglyceride die Aktivierung von Kupffer-Zellen verstärken und somit die Entzündungsreaktion potenzieren. Dieser Mechanismus könnte unter

Umständen die Entwicklung einer Steatohepatitis unterstützen, was jedoch noch weiter abzuklären bleibt.

In Budick-Harmelin's Arbeit lag der Fokus ausschließlich auf den leberspezifischen Gewebsmakrophagen, die neben den eingewanderten Entzündungszellen, als Hauptakteure der Entzündungsreaktion agieren. Es stellt sich nun die Frage, welche Rolle unter anderen die eigentlichen Parenchymzellen der Leber, die Hepatozyten, die ca. 80 % des Lebervolumens ausmachen (DANCYGIER 2003), bei einer protrahierenden Lipidexposition spielen.

Die Leber ist essentiell für den Lipidstoffwechsel des Organismus. In den Hepatozyten finden Ab-, Um- und Aufbau verschiedenster Lipide statt (LÖFFLER et al. 2006). Im Krankheitsfall kann es jedoch wie bereits beschrieben zu einer Fettüberladung der Zellen kommen, die sich in Form einer Fettleber äußert. Entsprechend der „*Two-Hit-Hypothese*“ wird angenommen, dass die Leber nun empfänglicher für weitere Ereignisse ist, die den nekroinflammatorischen Vorgang auslösen und unterhalten. Inwieweit die Fettexposition per se als schädigendes Ereignis der Leber fungieren kann, ist noch nicht ausreichend geklärt. Die Ergebnisse der vorangehenden Arbeit weisen daraufhin, dass die Fettexposition in Kombination mit einem gesetzten Entzündungsreiz die Entzündungsreaktion der Kupffer-Zellen verstärken kann. Inwiefern die Hepatozyten bereits durch die Exposition gegenüber Lipiden geschädigt bzw. veranlasst werden, eine Entzündung zu induzieren, wurde noch nicht näher erörtert.

Ziel dieser Arbeit ist es zu klären, welche Rolle die Fettexposition in einer eventuellen Induktion einer Entzündungsreaktion einnimmt. Hierzu wird gesondert überprüft, wie sich die Genexpression von proinflammatorischen Mediatoren in Hepatozyten, den Parenchymzellen der Leber, durch die Exposition gegenüber Triglyceriden und freien Fettsäuren im Vergleich zu der Genexpression in den Kupffer-Zellen, den leberspezifischen Zellen des Phagozytensystems, verändert. Die Bestimmung einer Expressionssteigerung von spezifischen Zytokinen, Chemokinen sowie Adhäsionsmolekülen auf mRNA-Ebene im Vergleich zur Kontrolle, ermöglicht die Beurteilung, inwieweit die applizierten Fette einen entzündungsinduzierenden Effekt ausüben können. Neben der Quantifizierung der inflammatorischen Mediatoren soll weiterhin überprüft werden, inwieweit Hepatozyten sowie Kupffer-Zellen unter Fettexposition morphologische wie auch funktionelle Veränderungen unterlaufen. Die morphologische Kontrolle zur Vitalitätsprüfung sowie zur Bestimmung des

Aktivierungsgrades der Zellen erfolgt mikroskopisch. Immunzytologische Färbungen zur Apoptosedetektion sowie Messungen von ins Medium freigesetzten Leberenzymen dienen zur Verifizierung von Funktionsstörungen der Zellen.

In einem weiteren Schritt wird überprüft, inwiefern eine Fettexposition Einfluss auf eine separat induzierte Entzündungsreaktion nimmt. Hierzu wird untersucht, wie sich die Genexpression von proinflammatorischen Mediatoren in Hepatozyten, durch die Exposition gegenüber Triglyceriden und freien Fettsäuren unter simultaner Endotoxinexposition im Vergleich zu der Genexpression in den Kupffer-Zellen, verändert.

Somit soll in dieser Arbeit zum einen geklärt werden, inwieweit eine Fettexposition Einfluss auf die Induktion bzw. auf den Verlauf einer Entzündungsreaktion einnimmt, zum anderen, welche Rolle die Hepatozyten- bzw. Kupffer-Zell-Populationen bei der Initiierung und Unterhaltung einer fettinduzierten Entzündungsreaktion einnehmen und inwiefern sich diese voneinander unterscheiden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Tiere und Tierhaltung

Die für die Experimente benötigten Leberzellen wurden von weiblichen, durchschnittlich 6 Monate alten Wistar-Ratten der Firma **Harlan Winkelmann** (Borchen, Deutschland) isoliert. Das Körpergewicht der für die Präparation und anschließende Isolierung von Leberzellen verwendeten Ratten lag bei ca. 200 - 280 g. Die Tiere erhielten freien Zugang zu Labortierstandardnahrung und Wasser.

2.1.2 Geräte

Tab. 4 : Geräte

Gerät	Hersteller	Niederlassung
Begasungsbrutschrank: BB6220	Heraeus	Hanau, Deutschland
Bio Photometer RS232C	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Elektrophorese-System: XCell SureLock (Mini-Cell)	Invitrogen	Carlsbad, CA, USA
Elutriations-System: - Centrifuge F2 - Elutriator B2	Beckman Coulter Beckman Coulter	Fullerton, CA, USA Fullerton, CA, USA
FACS-System: Epics XL	Beckman Coulter	Fullerton, CA, USA
Filmentwicklungsmaschine: SRX-101A	Konica	Tokyo, Japan
Kamera: - Canon D30 - 2800 Frigocut E	Canon Leica-Reichert-Jung	Krefeld, Deutschland Wetzlar, Deutschland

Magnetrührer Typ RCT	IKAMAG	Staufen i. Br., Deutschland
Mikroskop: <ul style="list-style-type: none"> - IDO3 - Standard 25 - Axiovert 200M 	Zeiss Zeiss Zeiss	Göttingen, Deutschland Göttingen, Deutschland Göttingen, Deutschland
Minishaker Typ MS1	Schütt	Göttingen, Deutschland
pH-Meter CG841	Schott	Mainz, Deutschland
Pipetten: <ul style="list-style-type: none"> - Reference - Research - Pipetus 	Eppendorf Eppendorf Hirschmann	Hamburg, Deutschland Hamburg, Deutschland Eberstadt, Deutschland
Pumpensystem: <ul style="list-style-type: none"> - ECOLINE ISM1077A - Masterflex, Easy-Load Model 7518-10 	ISMATEC Cole-Parmer	Wertheim-Mondfeld, Deutschland Vernon Hills, IL, USA
Real-Time PCR System: Step One Plus	Applied Biosystems	Foster City, CA, USA
Schüttelapparat: Duomax 1030	Heidolph	Schwabach, Deutschland
Sicherheitswerkbank: CleanAir	Thermo Life Sciences	Lund, Schweden
Trio-Thermoblock	Biometra	Göttingen, Deutschland
Waage: <ul style="list-style-type: none"> - PT210 - BP110 	Sartorius Sartorius	Göttingen, Deutschland Göttingen, Deutschland
Wasserbad Typ 1002	GFL	Burgwedel, Deutschland
Zentrifugen: <ul style="list-style-type: none"> - Universal 16 R - Mikro Rapid / K - 3K 30 - Rotixa / A 	Hettich Hettich Sigma Hettich	Tuttligen, Deutschland Tuttligen, Deutschland Osterode am Harz, Deutschland Tuttligen, Deutschland

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Applied Biosystems (Foster City, CA, USA): Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode (0,1 ml), Optical Adhesive Film

B. Braun (Melsungen, Deutschland): NaCl 0,9 %, Omnifix 10 ml, Sterican (26 G, 22 G)

Becton Dickinson Labware Europe (Le Pont de Claix, Frankreich): Falcon BLUE MAX (15 ml, 50 ml), Falcon EASY GRIP Tissue Culture Disk

Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, Deutschland): BD Plastipak, BD Venflon Pro

Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland): Safe-Lock Tubes (0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml), UVette

GeReSo GmbH (Einbeck, Deutschland): Ethanol (70 %, 99 %)

Konica (Tokio, Japan): Röntgenfilm SR-H5

Millipore GmbH (Schwalbach, Deutschland): Stericup

Nunc (Roskilde, Dänemark): Nunclon Surface

Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland): Cell Scraper, Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl), Serological Pipette (5 ml, 10 ml, 25 ml), Tissue Culture Flask

SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland): Nitrocellulose Membrane

Whatman Schleicher & Schuell GmbH (Dassel, Deutschland): Gebrauchsfertige Filtereinheit (PTFE 0,45 µm steril)

2.1.4 Chemikalien und Reagenzien

Amersham Buchler GmbH & Co. KG (Braunschweig, Deutschland): pd(N)₆ Primer, ECL Western Blotting Detection Reagents

AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland): Aceton, Essigsäure, Ethanol absolut, Formaldehyd, Kaliumchlorid, Magnesiumchlorid-Hexahydrat, Magnesiumsulfat-Heptahydrat, Methanol, RNAtidy G

Bender MedSystems GmbH (Wien, Österreich): Annexin, Annexin-Bindungspuffer, Propidium Iodide

Biochrom AG (Berlin, Deutschland): PBS (Phosphate Buffered Saline), Trypsin-EDTA

BioRad Laboratories GmbH (München, Deutschland): 30 % Acrylamide Mix, Ammoniumperoxodisulfat, Rainbow-Marker

Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland): Glycin, Milchpulver, Natriumchlorid

Fresenius Kabi Deutschland GmbH (Bad Homburg v. d. H., Deutschland): Ampuwa

Invitrogen GmbH (Karlsruhe, Deutschland): DAPI Nucleic Acid Stain, 100 mM dNTP Set (PCR Grade), DTT (Dithiothreitol), 5x First Strand Buffer, HEPES (2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure), L-Glutamin, Platinum-SYBR-Green qPCR SuperMix-UDG

Lonza Braine SA (Braine-l'Alleud, Belgien): PEN-STREP (Penicillin/Streptomycin)

Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland): Bromphenolblau, Calciumchlorid-Dihydrat, Chloroform, D(+)Glucose, Glycerol, Kaliumdihydrogenphosphat, 2-Mercaptoethanol, Natriumacid, Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat, Natriumhydrogencarbonat, Natronlauge, Phenolrot, Salzsäure

Merial GmbH (Hallbergmoos, Deutschland): Narcoren (Wirkstoff: Pentobarbital-Natrium)

Nycomed Pharma AS (Oslo, Norwegen): Nycodenz (5-[N-(2, 3-dihydroxypropyl)-acetamido]-2, 4, 6-trijod-N-, N'-bis-[2, 3-dihydroxypropyl] -isophthalamid)

PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich): DMEM Kulturmedium (Dulbecco's Modified Eagle Medium), FCS (Fetales Kälberserum), M199 Kulturmedium

Promega Corporation (Madison, Wisconsin, USA): Isopropanol

SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland): Albumin bovine Fraction V, Ponceau S

Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland): Dexamethasone, Glucagon, Hepes sodium salt, Insulin, Kollagen Typ 1 aus Rattenschwanz, Lipopolysaccharide aus Salmonella abortus equi, Nile Red, SDS (Sodium Dodecyl Sulfate), TBS-T (Twin 200), TEMED (Tetramethylethyldiamin), TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan), TRYPAN Blue Solution

Thermo Fisher Scientific (Dreieich, Deutschland): Coomassie Plus Protein Assay Reagent

2.1.5 Enzyme

DNase I

aus Rinderpankreas (**Roche Diagnostics GmbH**, Mannheim, Deutschland).

Während der enzymatischen Gewebedissoziation wird ein Teil der Zellen lysiert und dabei DNA freigesetzt. Makromolekulare DNA kann allerdings ein Verklumpen von Zellen verursachen, wodurch Zellverluste resultieren. DNase I ist eine neutrale DNase, die extrazelluläre DNA abbaut, indem sie eine enzymatische Spaltung zwischen der 5'-Phosphatgruppe und der 3'-Hydroxylgruppe zweier Nukleotide durchführt.

Kollagenase H

aus Clostridium Histolyticum (**Roche Diagnostics GmbH**, Mannheim, Deutschland). Kollagenase H ist ein Enzymgemisch, welches Bindegewebe auflöst durch Spaltung von Peptidbindungen und daher zur Isolierung der darin enthaltenen Zellen verwendet wird.

Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV RT)

aus E. coli (**Invitrogen GmbH**, Karlsruhe, Deutschland).

M-MLV RT ist eine rekombinante DNA-Polymerase, die einzelsträngige RNA, DNA oder ein RNA-DNA-Hybrid als Matrize zur Synthese eines komplementären DNA-Stranges benutzt.

Pronase E

aus Streptomyces griseus (**Merck KGaA**, Darmstadt, Deutschland).

Pronase E ist ein Komplex aus verschiedenen Exo- und Endopeptidasen, welche Peptidbindungen in Proteinen hydrolysiert. Neben der Kollagenase wird Pronase für die Gewebedissoziation bei der Isolierung von Zellen verwendet.

RNase A

aus Rinderpankreas (**Roche Diagnostics GmbH**, Mannheim, Deutschland).

Ribonukleasen sind Enzyme, die die Hydrolyse von Ribonukleinsäuren in kleinere Fragmente katalysieren. Bei der RNase A handelt es sich um eine Endonuklease. Sie trennt spezifische Verbindungen des Zuckergerüsts (Ribose) der RNA und bildet hierdurch Monomere.

2.1.6 Triglyceride und Fettsäuren**2.1.6.1 Lipofundin MCT 20 %**

Bei dem verschreibungspflichtigen Arzneimittel Lipofundin MCT 20 % von **B. Braun** (Melsungen, Deutschland) handelt es sich um Fettemulsionen, die zur Kaloriensubstitution und Zufuhr von essentiellen Fettsäuren im Rahmen einer parenteralen Ernährung eingesetzt werden.

Tab. 5 : Arzneilich wirksame Bestandteile von Lipofundin MCT 20 %

Bestandteile	Menge
Sojabohnenöl	100 g/l
Mittelkettige Triglyceride (MCT)	100 g/l
Eilecithin	12 g/l
Glycerol	25 g/l

2.1.6.2 Linolsäure (Syn.: *Linoleic Acid*, (cis,cis)-Octadeca-9,12-diensäure)

Linolsäure ist eine zweifach ungesättigte Fettsäure, die der Gruppe der Omega-6-Fettsäuren angehört. Hierbei handelt es sich um eine essentielle Fettsäure, die mit der Nahrung dem Organismus zugeführt werden muss. Linolsäure ist ein chemischer Bestandteil vieler Triglyceride, die Hauptanteil der natürlichen Fette und Öle sind. Sie kommt insbesondere in größeren Mengen in Pflanzenölen wie z. B. Distelöl, Sonnenblumenöl oder Hanföl vor.

Aus der Fettsäure Linolsäure wird Gamma-Linolensäure synthetisiert, eine wichtige Vorläufersubstanz für die Biosynthese von Eikosanoiden, die als Immunmodulatoren und Neurotransmitter wirken und vor allem an entzündlichen Prozessen im Körper beteiligt sind. Weiterhin findet man diese Fettsäure als Bestandteil von Zellmembranen.

Für die Versuchsreihen wurde die Fettsäure *Linoleic Acid* von der Firma **Sigma-Aldrich Chemie GmbH** (Taufkirchen, Deutschland) bezogen.

Abb. 4a : Strukturformel von Linolsäure

2.1.6.3 Palmitinsäure (Syn.: *Palmitic Acid*, Hexadecansäure)

Die Palmitinsäure ist eine der am häufigsten vorkommenden gesättigten Fettsäuren in pflanzlichen und tierischen Fetten und Ölen. So findet man große Mengen dieser Fettsäure in z. B. Stillingiaöl, Palmöl, Rindertalg, Schweineschmalz oder Kakaobutter.

Für die Versuchsreihen wurde die Fettsäure *Palmitic Acid* von der Firma **Sigma-Aldrich Chemie GmbH** (Taufkirchen, Deutschland) bezogen.

Abb. 4b : Strukturformel von Palmitinsäure

2.1.7 DNA-Oligonukleotide (Primer)

Für die Real Time PCR wurden spezifische Oligonukleotide, die eine Schmelztemperatur von 60 °C aufweisen sowie eine Größe von etwa 50 - 400 Basen innehaben, für eine optimale Genamplifikation eingesetzt. Die Primersequenzen wurden mit Hilfe des Sequenzanalyseprogramms Primer 3 des Whitehead Institute for Biomedical Research ermittelt. Als Grundlage diente dabei die ENSEMBL-Datenbank von WTSI / EBI (Wellcome Trust Sanger Institute / European Bioinformatics Institute).

Die Oligonukleotide wurden von der Firma **Invitrogen** (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

Tab. 6 : Oligonukleotide für PCR

Name		Sequenz
β-Aktin	5' - 3' sense	ACC ACC ATG TAC CCA GGC ATT
	5' - 3' antisense	CCA CAC AGA GTA CTT GCG CTC
CINC-1	5' - 3' sense	CCC CCA TGG TTC AGA AGA TTG
	5' - 3' antisense	TTG TCA GAA GCC AGC GTT CAC
CINC-2	5' - 3' sense	CTC AAT GCT GCA CTG CTT CT
	5' - 3' antisense	GTC ACC GTC AAG CTC TGG AT
ICAM-1	5' - 3' sense	TGC ACG TCC CTG GTG ATA CTC
	5' - 3' antisense	TGT CAA ACG GGA GAT GAA TGG
IL-1β	5' - 3' sense	AATTTGAGTCTGCCCCAGTTCCCC
	5' - 3' antisense	AGTCAGTTATATCCTGGCCGCC
IL-6	5' - 3' sense	GTC AAC TCC ATC TGC CCT TCA G
	5' - 3' antisense	GGC AGT GGC TGT CAA CAA CAT
iNOS	5' - 3' sense	CAG CGC AGA GGG CTC AAA GG
	5' - 3' antisense	TCG TCG GCC AGC TCT TTC T
MCP-1	5' - 3' sense	AGC CAG ATG CAG TTA ATG CCC
	5' - 3' antisense	ACA CCT GCT GCT GGT GAT TCT C
MIP-1α	5' - 3' sense	GAC GGC AAA TTC CAC GAA AA
	5' - 3' antisense	AGA TCT GCC GGT TTC TCT TGG
MIP-2α	5' - 3' sense	ACC TTC AGG GAC TGT TGT GG
	3' - 5' antisense	GGA GCT TGA GGG TTG AGA CA
PECAM-1	5' - 3' sense	TCA GCT GCC AGT CAG TAA ATG G
	3' - 5' antisense	TCT GGA AGT TGC TCT TTG CTC TT
TNF-α	5' - 3' sense	ACA AGG CTG CCC CGA CTA T
	5' - 3' antisense	CTC CTG GTA TGA AGT GGC AAA TC

2.1.8 Antikörper

Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland): *Monoclonal Anti- β -Actin Clone AC-15 Mouse Ascites Fluid* (1. AK / 1:5000)

CALBIOCHEM (San Diego, CA, USA): Polyklonale IgG Kaninchen Anti-I κ B α (1. AK / 1:250)

BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland): Polyklonale IgG Kaninchen Anti-iNOS (1. AK / 1:250)

DAKO-Immunglobulins a / v (Kopenhagen, Dänemark): Kaninchen-anti-Maus-Ig (2. AK / 1:2000), Schwein-anti-Kaninchen-Ig (2. AK / 1:1000)

2.2 Methoden

2.2.1 Zellisolation

Die Versuchstiere wurden zunächst mit 0,2 ml Pentobarbital-Natrium (Narcoren) pro 100 g Körpergewicht narkotisiert. Die Injektion des Narkotikums erfolgte intraperitoneal. Nach Desinfektion der Bauchregion mit 70%igem Ethanol wurde das Abdomen scharf eröffnet, so dass der Leberhilus freigelegt und die Pfortader frei präpariert werden konnte. Kranial der Vena lienalis wurde eine Ligatur zum späteren Fixieren der Braunüle locker um die Pfortader geschlungen. Mittels einer im Durchmesser 1,3 mm großen Braunüle wurde die Pfortader punktiert und über einen sterilen Schlauch mit dem Pumpensystem verbunden. Anschließend wurde die Braunüle in der Pfortader mit der Ligatur fixiert und die Leber blutleer gespült.

Die Perfusion wurde mit einer Durchflussgeschwindigkeit von 10 ml/min durchgeführt. Zum Erreichen von optimalen Isolationsbedingungen wurden die Perfusionslösungen mittels eines Zirkulations-Rezirkulationssystems aus Wärmepumpe, Wärmeaustauscher und Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Die Vena cava inferior wurde distal der Venae renales zur Druckentlastung eröffnet. Zur Tötung des Versuchstieres wurde darüber hinaus ein gezielter Schnitt ins Herz abgesetzt.

Zur Vorbereitung der Isolation von Hepatozyten und Kupffer-Zellen kamen gleiche Arbeitsschritte zur Anwendung. Nach der Punktion der Pfortader erfolgte die Perfusion der Leber mit den jeweils für die Zellart spezifischen Enzymlösungen.

2.2.1.1 Isolation der Hepatozyten (modifiziert nach Seglen)

Die Isolation der Hepatozyten aus der Rattenleber erfolgte anhand der Zwei-Schritt-Kollagenase-Perfusionstechnik (SEGLEN 1976).

Lösung I: (Ca²⁺-frei)

NaCl	8,3 g/l	4,15 g
KCl	0,5 g/l	0,25 g
HEPES	2,4 g/l	1,2 g
H ₂ O		ad 500 ml

Lösung II: (Kollagenase-Puffer)

NaCl	3,9 g/l	1,18 g
CaCl ₂ -2H ₂ O	0,7 g/l	0,21 g
KCl	0,5 g/l	0,15 g
HEPES	24 g/l	7,27 g
Kollagenase	500 mg/l	150 mg
H ₂ O		ad 300 ml

Lösung III: (Waschpuffer)

NaCl	8,3 g/l	4,25 g
KCl	0,5 g/l	0,25 g
CaCl ₂ -2H ₂ O	0,18 g/l	0,09 g
HEPES	2,4 g/l	1,2 g
H ₂ O		ad 500 ml

Die Leber wurde zuerst mit einem größeren Volumen calciumfreien Mediums (Lösung I) entblutet. Durch die Perfusion mit dem calciumfreien Medium werden Calcium-Ionen von den Desmosomen eluiert, was zu einer großen Zellausbeute mit geringer Zellschädigung führt. Im nächsten Schritt erfolgte der enzymatische Gewebeaufschluss mittels der kollagenasehaltigen Lösung II. Nachdem die Lösung vollständig durch die Leber gelaufen ist, sollte der Gewebeaufschluss der Leber in Form einer weichen Konsistenz sowie in einer irreversiblen Verformung der Leber sichtbar sein. Nun konnte die Exstirpation der Leber *in toto* mit anschließender Waschung und Zerzupfung der Leber mit 0 - 4 °C gekühltem Waschpuffer (Lösung III) durchgeführt werden. Das Waschen verringert den ungewollten Anteil an Kupfferschen-Sternzellen, Fibroblasten und Endothelzellen (LINDL und BAUER 1989). Die Zellsuspension wurde im nächsten Schritt durch einen Zellsieb filtriert und mit dem Waschpuffer gespült. Die Lösung wurde auf zwei 50 ml Falcons verteilt und bei 5 Minuten, 400 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde hinterher

abpipetiert, das Pellet vorsichtig aufgeschüttelt und mit dem Waschpuffer erneut resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde der Überstand verworfen und das Pellet gepoolt. Die isolierten Zellen wurden nach einer Vitalitätsprüfung in Trypanblau gezählt und abschließend in Kultur genommen.

2.2.1.2 Isolation der Kupffer-Zellen (modifiziert nach Knook)

Die Isolierung von Kupffer-Zellen erfolgte durch eine kombinierte Pronase-/Kollagenase-Verdauung der Leber modifiziert nach KNOOK et al. (1977 und 1982). Zur Trennung der Kupffer-Zellen von den anderen hepatischen Zellen erfolgte eine Dichtegradientenzentrifugation mit anschließender zentrifugalen Elutriation.

Am Tag der Präparation wurden die Enzyme Pronase und Kollagenase in verschiedenen Konzentrationen in GBSS für 30 Minuten gelöst. Der pH-Wert der Lösungen wurde auf 7,4 eingestellt. Anschließend wurden die Lösungen steril filtriert und auf 37 °C temperiert.

GBSS:

Glukose	1000 mg/l
NaCl	800 mg/l
KCl	370 mg/l
CaCl ₂ x 2H ₂ O	220 mg/l
MgCl ₂ x 6H ₂ O	210 mg/l
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	170 mg/l
MgSO ₄ x 7H ₂ O	70 mg/l
KH ₂ PO ₄	30 mg/l
HEPES	10 ml/l
NaHCO ₃	0,255 g/l
Phenolrot	Spatelspitze

BSA-GBSS-Lösung:

BSA	200 mg (= 0,2 %)
GBSS	ad 100 ml

Lösung I:

200 ml GBSS

Lösung II:

Pronase E	3 g/l	300 mg
GBSS		ad 100 ml

Lösung III:

Pronase E	1,4 g/l	210 mg
Kollagenase H	1,07 g/l	160 mg
GBSS		ad 150 ml

Lösung IV:

Pronase E	800 mg/l	160 mg
Kollagenase H	650 mg/l	130 mg
DNase I	50 mg/l	10 mg
GBSS		ad 200 ml

Nach Freilegung und Punktion der Pfortader wurde die Leber mittels GBSS (Lösung I) bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 10 ml/min entblutet. Im nächsten Schritt wurde die Leber zuerst mit 100 ml der Pronase-Lösung (Lösung II) und anschließend mit 150 ml der Pronase-/Kollagenase-Lösung (Lösung III) bei gleichbleibender Perfusionsgeschwindigkeit perfundiert, um das Bindegewebe der Leber enzymatisch anzugreifen. Nach Abschluss der Perfusion wurde die Leber vorsichtig aus dem Abdomen herauspräpariert und in eine sterile Petrischale, gefüllt mit Lösung IV, abgelegt.

Durch Ablösung der Organkapsel mittels einer Pinzette konnte die Leber eröffnet und anschließend vorsichtig zerrissen werden, wodurch sich der enzymatische Abbau des Bindegewebes fortsetzte und die Ausschwemmung der Zellen gefördert wurde. Das nun verflüssigte Gewebe wurde zusammen mit der restlichen Lösung IV in einen Erlenmeyerkolben überführt und für 30 Minuten in einem Wasserbad bei 37 °C auf einem Magnetrührer gerührt unter kontinuierlicher Überwachung des pH-Wertes. Bei Abweichungen wurde der pH mittels 1 M NaOH auf 7,4 eingestellt. Danach wurden vorhandene bindegewebige Strukturen mittels einer Filtration durch ein feinporiges

Sieb (Porengröße 12 mm) von der entstandenen Zellsuspension getrennt. Das Filtrat wurde auf vier sterile 50 ml Falconröhrchen verteilt und mit kalter GBSS-Lösung aufgefüllt.

Die Kupffer-Zellen wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation und anschließender zentrifugaler Elutriation von den übrigen Zelltypen separiert.

Einstufiger Dichtegradient

Um zunächst die Hepatozyten von den übrigen Zellen zu trennen, wurde die Zellsuspension 10 Minuten bei 450 g und 4 °C zentrifugiert. Im Überstand befanden sich nun die nicht-parenchymatösen Zellen und im Sediment die Hepatozyten. Die Zellen im Überstand wurden nach mehreren Waschschritten und wiederholter Zugabe von DNase I in GBSS resuspendiert und 14 ml Nycodenz-Stammlösung hinzugefügt. Die Zellsuspension wurde nach weiterem Auffüllen mit BSA-GBSS-Lösung auf 24 ml gleichmäßig auf sechs 15 ml Falconröhrchen verteilt und mit je 1,5 ml BSA-GBSS-Lösung überschichtet. Durch die folgende Zentrifugation bei 1500 g, 4 °C für 15 Minuten bildete sich ein Dichtegradient, indem sich die verschiedenen Zelltypen entsprechend ihres spezifischen Gewichtes auftrennten. Am Boden befanden sich Zelltrümmer und Erythrozyten. An der Grenzschicht zwischen Nycodenz und GBSS bildete sich die Interphase, wo sich die nicht-parenchymatösen Zellen, zum größten Teil Kupffer- und Endothelzellen sammelten. Diese Phase wurde vorsichtig mit einer Pipette in ein steriles Falconröhrchen überführt und in einer BSA-GBSS-Lösung resuspendiert. Nach einem letzten Zentrifugationsschritt für 10 Minuten bei 450 g und 4 °C, wurden die Zellsedimente für die nachfolgende zentrifugale Elutriation in eine sterile Spritze aufgenommen.

Zentrifugale Elutriation

Es erfolgte nun die Überführung der Zellsuspension in die Sedimentationskammer eines Gegenstrom-Elutriationsrotors zur zentrifugalen Elutriation. Dieses Verfahren dient der Trennung von unterschiedlichen Zellgrößen bzw. Zellarten. Das Prinzip dieses Trennungsverfahrens beruht auf der Wirkung von zwei gegeneinander gerichteten Kräften auf die Partikel in der Sedimentationskammer. Dies ist zum einen die Zentrifugalkraft, die durch die Rotationsgeschwindigkeit beeinflussbar ist und zum anderen die entgegengesetzt wirkende zentripetale Flussgeschwindigkeit, die durch eine vorgeschaltete Pumpe regulierbar ist. In Verbindung mit der Form der

Sedimentationskammer, die eine abnehmende Strömungsgeschwindigkeit in zentripetaler Richtung bewirkt, wurden die Zellen durch die resultierende Kraft entsprechend ihrer Sedimentationsrate geschichtet, indem sie in der Zone verblieben, in der ihre Sedimentationsgeschwindigkeit der Strömungsgeschwindigkeit der Flüssigkeit entsprach. Mittels einer Änderung der Flussgeschwindigkeit erfolgte die selektive Eluierung der entstandenen Zellschichten. Die gewünschte Kupffer-Zell-Fraktion konnte bei einer Elutriationsgeschwindigkeit von 55 ml/min gewonnen und in sterile Falconröhrchen aufgefangen werden. Nach einem abschließenden Zentrifugationsschritt über 5 Minuten bei 650 g und 4 °C wurde der Überstand verworfen und das Pellet gepoolt. Die isolierten Zellen wurden nach einer Vitalitätsprüfung in Trypanblau gezählt und abschließend in Kultur genommen (ARMBRUST und RAMADORI 1996).

2.2.2 Zellkulturen

Die Kultivierung aller verwendeten Zelltypen erfolgte in einem Begasungsbrutschrank bei 37 °C, 100 % relativer Luftfeuchtigkeit und einem CO₂-Gehalt von 5 %. Man muss jedoch zwischen unterschiedlichen Kulturbedingungen für die einzelnen Zellpopulationen unterscheiden.

2.2.2.1 Zellkultivierung - Hepatozyten

Die Kultivierung der Hepatozyten erfolgte als Monolayer in 6-Loch-Platten. Da sich Hepatozyten nur sehr schlecht an Polystyren-Kulturgefäße heften, ging der Kultivierung die Beschichtung der Kulturgefäße mit Kollagen Typ 1 voraus. Dazu wurde zuvor Kollagen in 10%iger Essigsäure (25 mg/100 ml) gelöst und davon eine 1:50 Verdünnung mit H₂O angefertigt. Damit wurde der Gefäßboden für 1 Stunde beschichtet und nach einem Waschschrift mit sterilem PBS bei Raumtemperatur getrocknet. Um eine hohe Zelldichte und optimale Wachstumsbedingungen zu erhalten, wurden jeweils 200.000 Zellen/ml Medium pro Loch ausplattiert (BERRY et al. 1991). Als Kulturmedium wurde DMEM (*Low Glucose* 1 g/l) unter Zusatz von fetalem Kälberserum (10 %), Penicillin/Streptomycin (1 %), L-Glutamin (1 %), Dexamethason (10 µl/ml), Insulin (10 µg/ml) und Glucagon (0,1 µg/ml) eingesetzt. Das Medium wurde 4 Stunden nach der Ausplattierung und am Folgetag

gewechselt. Am 2. Tag nach Isolation erfolgte, nach einer mikroskopischen Vitalitätsüberprüfung der Zellen, die Zellstimulation.

2.2.2.2 Zellkultivierung - Kupffer-Zellen

Die Kultivierung der Kupffer-Zellen erfolgte ebenfalls als Monolayer in 6-Loch-Platten. Um eine effektive Zelldichte zu erhalten, wurden jeweils 1.000.000 Zellen/ml Medium pro Loch ausplattiert. Für die Kupffer-Zellen wurden als Kulturmedium Medium 199 (*with Earle's salts, with L-Glutamine*) unter Zusatz von fetalem Kälberserum (15 %) und Penicillin/Streptomycin (1 %) eingesetzt. Das Medium wurde am Folgetag erneut gewechselt und etwa 6 Stunden danach erfolgte, nach einer erneuten mikroskopischen Vitalitätsüberprüfung der Zellen, die Zellstimulation.

2.2.2.3 Zellkultivierung - Hep G2 (humane Hepatomzellen)

Die humane Zelllinie Hep G2 wurde 1975 von ADEN et al. aus einer Leberbiopsie eines Kindes, das an einem primären Hepatoblastom erkrankt war, isoliert. Da diese Zelllinie noch viele Funktionen besitzen, die für normale humane Hepatozyten typisch sind, haben sie einen besonderen Stellenwert in der Forschung (ADEN et al. 1979).

Die Kultivierung der Hep G2-Zellen erfolgte als Monolayer in 75 cm² Polystyren-Kulturflaschen sowie in 3,5 cm² Schalen. Für das Wachstum der Hepatomzellen war eine Beschichtung der Kulturgefäße mit Kollagen nicht erforderlich. Bei einer Verdoppelungszeit von ungefähr 50 - 60 Stunden, wurden die Zellen so lange in Kultur gehalten, bis sich eine vergleichbare Population von 200.000 Zellen/ml Medium pro Loch entwickelt hatten. Als Kulturmedium wurde DMEM (*High Glucose*) unter Zusatz von fetalem Kälberserum (10 %), Penicillin/Streptomycin (1 %) und L-Glutamin (1 %) eingesetzt. Das Medium wurde täglich gewechselt.

2.2.3 Zellkulturexperimente

2.2.3.1 Anfertigung des konditionierten Kupffer-Zell-Mediums

Im ersten Schritt wurden Kupffer-Zellen wie bereits beschrieben isoliert und kultiviert. Im Anschluss daran erfolgte eine 6-stündige Stimulierung der Zellen mit LPS in einer Konzentration von 2 ng/ml. Abschließend wurde der Mediumüberstand sowohl von den stimulierten Zellen wie auch von einer unbehandelten Kontrollgruppe gesammelt.

2.2.3.2 Vorbereitung der Fettsäuren (modifiziert nach Joshi-Barve)

Fettsäuren bestehen aus einer lipophilen Kohlenwasserstoffkette und einer hydrophilen Carboxylgruppe. Aufgrund der überwiegenden hydrophoben Eigenschaften der Lipide können diese nicht ohne weiteres frei im wässrigen Medium Blutplasma transportiert werden. Aus diesem Grund werden langkettige Fettsäuren an das Plasmaprotein Albumin gebunden transportiert. Um eine physiologische Ausgangslage zu schaffen, mussten die zur Stimulation verwendeten Fettsäuren vorab in eine albumingebundene Form gebracht werden. Hierzu wurde eine hoch dosierte Albumin-Stammlösung angefertigt (3,864 g Albumin/100 ml Medium) zu der jeweils 3 mM der jeweiligen Fettsäure hinzu gegeben wurde (Endverhältnis Fettsäure zu Albumin 5,2:1). Dieses Fettsäuren-Albumin-Gemisch wurde anschließend über 12 Stunden bei 37 °C behutsam geschüttelt, um eine Albumin-Fettsäuren-Komplexbildung herbeizuführen (JOSHI-BARVE et al. 2007). Für die Versuchsdurchführung wurde nun eine Verdünnungsreihe der Fettsäuren in folgenden Konzentrationen angefertigt: 3 mmol/L, 1,5 mmol/L, 0,75 mmol/L, 0,375 mmol/L und 0,1875 mmol/L. Abschließend wurden die Lösungen steril filtriert und auf einen physiologischen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

Zu beachten ist, dass die Fettsäuren von der Firma Sigma-Aldrich in Pulverform geliefert werden, so dass diese mittels Isopropanol vorab in Lösung gebracht werden müssen. Da der Einfluss von Isopropanol auf die Zellkultur ausgeschlossen werden sollte, wurde analog für die Kontrollgruppe eine Isopropanol-Albumin-Lösung angefertigt, mit welcher die Zellen stimuliert worden sind.

2.2.3.3 Stimulation der Zellkulturen

Die einzelnen Zellpopulationen (Hepatozyten, Kupffer-Zellen, Hep G2) wurden kultiviert und jeweils unterschiedlichen Einzelexperimenten unterzogen. In jedem Einzelexperiment wurde analog zu jeder Stimulationsgruppe eine entsprechende Kontrolle ohne das jeweilige Stimulationssubstrat angefertigt. Die verwendeten Fettstimulationsdosen orientieren sich an den bisher veröffentlichten Studien (ILAN et al. 2005, JOSHI-BARVE et al. 2007, BUDICK-HARMELIN et al. 2008), unter Berücksichtigung von physiologischen Konzentrationsbereichen. So findet man im Serum von Gesunden Triglyceride in einem Konzentrationsbereich von 50 - 200 mg/100 ml, dass entspricht 0,62 - 2,5 mmol/L sowie nichtveresterte Fettsäuren in einem Konzentrationsbereich von 14 - 22 mg/100 ml, das entspricht 0,5 - 0,8 mmol/L (LÖFFLER et al. 2006).

Folgende Stimulationsansätze werden unterschieden:

2.2.3.3.1 Zeitkinetikversuch

Kultivierte Zellen wurden mit 100 mg/100 ml Lipofundin (entspricht 0,1 % Triglyceride), 3 mmol/L Linolsäure und 3 mmol/L Palmitinsäure für 1, 3, 6, 12 und 24 Stunden stimuliert.

2.2.3.3.2 Präinkubationsversuch

Hepatozyten wurden über Nacht mit 100 mg/100 ml Lipofundin (0,1 % Triglyceride) inkubiert, um eine Fetteinlagerung in den Zellen zu erwirken. Im zweiten Schritt wurde das Medium von LPS-aktivierten-Kupffer-Zellen zu den Hepatozyten für 2 und 6 Stunden hinzu gegeben, um einen Entzündungsreiz zu setzen.

2.2.3.3.3 Entzündungs-Initiierungsversuch

Zum einen erfolgte eine kombinierte Stimulation von Hepatozyten mit konditioniertem Kupffer-Zell-Medium + 100 mg/100 ml Lipofundin (0,1 % Triglyceride) über 2 und 6 Stunden. Zum anderen erfolgte eine kombinierte Stimulation der Kupffer-Zellen mit Lipofundin + LPS, Linolsäure + LPS bzw. Palmitinsäure + LPS über 12 Stunden.

2.2.3.3.4 Dosisversuch

Kultivierte Zellen wurden mit einer absteigenden Konzentration von Linolsäure bzw. Palmitinsäure (3 mmol/L, 1,5 mmol/L, 0,75 mmol/L, 0,375 mmol/L und 0,1875 mmol/L) für 12 Stunden stimuliert.

2.2.4 RNA-Gewinnung und PCR

2.2.4.1 Isolierung von Gesamt-RNA (modifiziert nach Chomczynski)

Der Umgang mit Nukleinsäuren, in diesem Fall mit Ribonukleinsäuren, erfordert besondere Sorgfalt, da RNA abbauende Ribonukleasen in der Umwelt regelmäßig auftreten. Daher ist es wichtig, die sehr stabilen RNasen möglichst schnell von der RNA zu trennen. Das Prinzip der RNA-Isolation beruht darauf, die Zellen in einer chemischen Umgebung zu lysieren, in der die RNasen möglichst zügig denaturiert werden. Anschließend wird die RNA von den übrigen zellulären Bestandteilen getrennt.

Die Zellen wurden zu den jeweils angegebenen Zeitpunkten in 1 ml RNAtidy G von den Zellkulturschalen abgekratzt. Die Chemikalie RNAtidy G enthält Guanidinthiocyanat, welches durch seinen chaotropen Charakter die Zellen lysiert und gleichzeitig RNasen und sonstige Enzyme inaktiviert. Zusätzlich enthält RNAtidy G Phenol, in dem sich DNA und Protein lösen. Nach Zugabe von Chloroform (200 µl/1 ml RNAtidy G) und anschließender 15-minütiger Zentrifugation bei 14.000 g und 4 °C, trennte sich das Gemisch in drei Phasen auf. Die RNA ist in der oberen klaren Phase, die Proteine in der mittleren weißen Interphase und RNAtidy G in der unteren hell-trüben Phase enthalten. Die RNA wurde in ein neues Gefäß überführt und durch Zugabe von Isopropanol (500 µl/1 ml RNAtidy G), bei einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 14.000 g, 4 °C für 30 Minuten gefällt. Durch anschließendes wiederholtes Waschen mit 75%igem Ethanol (1 ml/1 ml RNAtidy G) wurden Salz- und Isopropanolreste entfernt. Nach einem abschließendem Zentrifugationsschritt wurde das vorliegende Pellet mit 50 µl RNase-freiem H₂O gelöst, um direkt im Anschluss für die cDNA-Synthese weiter verwendet zu werden (CHOMCZYNSKI und SACCHI 1987).

2.2.4.2 Synthese von cDNA

Die Reverse Transkriptase (RT) *Moloney Murine Leukemia Virus* ist eine rekombinante DNA-Polymerase, die im Rahmen der cDNA-Synthese cDNA-mRNA-Hybride herstellt. Als Primer lagern sich pd(N)₆-Oligonukleotide an die Poly(A)-Sequenzen der 3'-Enden der mRNA-Moleküle an. Die mRNA-Einzelstränge dienen der retroviralen Polymerase dabei als Matrize zur Synthese der komplementären cDNA.

Zur cDNA-Synthese wurde 2 µg RNA eingesetzt, die in einem Volumen von 10 µl RNase-freiem H₂O gelöst wurde. Diese RNA-Lösung wurde für 10 Minuten bei 64 °C im Thermoblock inkubiert, um Sekundärstrukturen innerhalb der RNA zu denaturieren. Anschließend wurde der Ansatz für 2 Minuten auf Eis abgekühlt. Im Folgendem wurde der Master-Mix bestehend aus: 6,4 µl RNase-freiem H₂O, 1,6 µl pd(N)₆, 8µl dNTP-Mix, 4 µl DTT, 8 µl 5x *First Strand Buffer* und 2 µl M-MLV hinzu gegeben und die Transkriptionsreaktion wurde im Thermoblock mit den folgenden Inkubationszeiten durchgeführt:

- 60 Minuten bei 37 °C
- 5 Minuten bei 90 °C.

Bei einer anschließenden Schockgefrierung auf Eis wurde der Vorgang terminiert. Abschließend wurden die synthetisierten cDNA-mRNA-Hybride durch die Zugabe von 272,5 µl RNase-freiem H₂O auf eine äquivalente RNA-Konzentration von 6,4 ng/ml verdünnt und bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.4.3 Quantitative Real-Time PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Die quantitative Real-Time-PCR ist eine etablierte Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion beruht. Zusätzlich bietet diese Methode die Möglichkeit der Quantifizierung der gewonnenen DNA in Echtzeit mit der Hilfe von Fluoreszenz-Messungen am Ende oder während eines PCR-Zyklus. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu, was eine Quantifizierung ermöglicht.

Es gibt verschiedene Formate der Fluoreszenzdetektion. In diesem Fall wurde mit der SYBR-Green-Methode gearbeitet. SYBR Green I ist ein fluoreszierender Farbstoff, der sich an die kleine Furche der DNA-Doppelhelix anlagert. Die Fluoreszenz wird durch diese Bindung verstärkt. Daraus folgt, dass die

Fluoreszenzsignale initial nach der Denaturierung der DNA sehr klein ausfallen, da die DNA als Einzelstrang vorliegt. Mit der Ausbildung von doppelsträngigen DNA-Molekülen im Rahmen des weiteren PCR-Zyklus steigt die Fluoreszenzintensität proportional zur Menge des gebildeten doppelsträngigen PCR-Produktes an. Diese Methode zeichnet sich durch eine hohe Sensitivität, aber da der Farbstoff nicht nur mit der Zielsequenz, sondern unter ungünstigen Bedingungen auch mit Primer-Dimeren oder PCR-Beiprodukten reagieren kann, durch eine geringere Spezifität aus. Die Spezifität des PCR-Produktes kann jedoch am Ende der PCR durch eine Schmelzkurvenanalyse überprüft werden.

Für die relative Quantifizierung ist von Bedeutung, dass die Expression eines Zielgens mit einem Referenzgen, dem so genannten *Housekeeping-Gen*, normalisiert wird, indem die Signale des Referenzgens verwendet werden, um Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten DNA-Proben auszugleichen (HOLZAPFEL und WICKERT 2007).

Der Reaktions-Mix (20 µl) wurde mit 0,2 µM sense bzw. antisense Oligonukleotid-Primer der jeweiligen Zielgene, 2 x Platinum-SYBR-Green qPCR SuperMix-UDG und H₂O angesetzt. Als *Housekeeping-Gen* wurde β-Aktin verwendet, da dieses Gen eine konstante Expression aufwies. In einem Thermocycler wurde der PCR-Prozess durchgeführt. So folgte auf eine initiale Denaturierung für 120 Sekunden bei 95 °C eine 45-malige Wiederholung des PCR-Zyklus bestehend aus Denaturierung, Primer-Annealing, Elongation und Fluoreszenzmessung.

Die jeweilige Genexpression wurde abschließend mit der Berechnung nach der delta-delta-CT-Methode ermittelt. Hierbei wurden die CT-Werte des Zielgens von dem *Housekeeping-Gen* abgezogen ($-\Delta CT$) und die 2. Potenz davon ermittelt ($2^{-\Delta CT}$).

2.2.5 Proteingewinnung und Western Blot

2.2.5.1 Proteingewinnung

Wie bereits beschrieben, wurden die Zellen kultiviert und stimuliert. Nach der Stimulation wurden die Zellen zu den jeweils angegebenen Zeitpunkten dreimal mit kaltem GBSS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 100 µl PBS/1 % Triton-

Puffer aufgenommen und von dem Kulturgefäß abgekratzt. Die Proben wurden nun bei -20 °C aufbewahrt.

Für den Einsatz der Proben in der Polyacrylamidelektrophorese mussten diese in einem weiteren Arbeitsschritt zuerst lyophilisiert und anschließend in Sample-Buffer aufgenommen werden, so dass eine Proteinkonzentration von 400 µg/ml entstand.

2.2.5.2 Bestimmung des Gesamtproteingehalts

Die Messung des Gesamtproteingehalts der Proben erfolgte in Doppelbestimmung über die Bindung von Coomassie-Brilliant-Blau an Protein und die damit verbundene Farbänderung von rot-braun nach blau, die mit einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nach 595 nm einhergeht (BRADFORD 1976).

Hierzu wurden in 96-Loch-Platten je 5 µl der Proteinlösung sowie 250 µl Coomassie-Lösung gegeben und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 595 nm gemessen. Über die mitgemessene Standardproteinkonzentration wurden die Proteinkonzentrationen der jeweiligen Proben ermittelt. Auf der Basis der ermittelten Daten wurde ein β -Aktin-Western-Blot durchgeführt, um die Proteinkonzentration erneut zu kontrollieren. Bei Diskrepanzen musste die Proteinbestimmung wiederholt werden.

2.2.5.3 Polyacrylamidelektrophorese

Mittels der Polyacrylamidelektrophorese können Proteinmoleküle nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Hierzu wurden die Proben in einem ersten Schritt in ein SDS-haltiges Milieu (*Sodium Dodecyl Sulfate*) überführt. SDS lagert sich an die Proteine an, wodurch die Ladungsunterschiede der Proteine, welche die Proteinwanderung im elektrischen Feld negativ beeinflussen, beseitigt werden.

Zur Durchführung der von LAEMMLI (1970) beschriebenen Methode wurde zunächst ein so genanntes vertikales Separationsgel gegossen. Hierbei handelte es sich um ein Polyacrylamidgel, dessen Konzentration an Acrylamid je nach Massendichte des zu detektierenden Proteins variiert wurde. Um die Austrocknung der Gele zu vermeiden, wurden diese mit Aqua dest. überschichtet. Nach Abschluss der Polymerisation (nach ca. 1 bis 2 Stunden) wurde ein so genanntes 4%iges Sammelgel (Stacker) gegossen. Mit der Hilfe eines Kammes wurden Taschen für das Laden der Proben gebildet. Nachdem das Gel nach etwa 30 Minuten fest geworden

war, wurde der Stacker zweimal mit Laufpuffer gewaschen und abschließend wieder aufgefüllt. Im nächsten Schritt wurden dann die Proben auf 95 °C erhitzt und anschließend in die Taschen gefüllt.

Für dieses Verfahren wurden 50 µl der jeweiligen Probe mit einem Proteingehalt von je 20 µg eingesetzt. Für die spätere Proteingrößenbestimmung wurde ein *Rainbow-Weight-Marker* eingesetzt. Die Elektrophorese erfolgte mit einer konstanten Stromstärke von 20 mA pro Gel bei 4 °C Wasserkühlung.

2.2.5.4 Transfer

Im Anschluss an die Elektrophorese erfolgte der Transfer der Proteine vom Gel auf Nitrozellulose. Hierzu wurde eine spezielle Transferkammer verwendet, welche durch elektrischen Strom die Wanderung der Proteine in horizontaler Richtung unterstützt. Zur Durchführung wurden Gel und Nitrozellulose übereinander gelegt und von Whatman-Papier und Schaumstoff ummantelt, um anschließend in ein Elektrodengitter in den Transferpuffer getaucht zu werden. Der Transfer wurde bei einer Stromstärke von 1000 mA durchgeführt (TOWBIN et al. 1979). Der Transfer wurde anschließend mit Hilfe von Ponceau S überprüft.

2.2.5.5 Proteindetektion

Der Nachweis spezifischer Proteinbanden erfolgte in Anlehnung an das Protokoll des ECL-Detektionssystems von Amersham.

Nach dem Übertragen der Proteine mussten zu Beginn unspezifische Bindungsstellen abgeblockt werden. Hierzu wurde die Membran für 1 Stunde in Blockierungspuffer gewaschen. Im Anschluss wurde die Membran für jeweils 15, 10 und 5 Minuten in Waschpuffer gewaschen, um den überschüssigen Blockierungspuffer zu entfernen.

Im nächsten Schritt wurde, entsprechend dem zu untersuchenden Protein, der spezifische 1. Antikörper gemeinsam mit einem Inkubationspuffer (TBS-T + 2,5 % Milch) hinzu gegeben und über Nacht inkubiert. Anschließend erfolgte ein erneuter Waschgang wie oben bereits beschrieben. Danach wurde die Membran mit dem POD-konjugiertem 2. Antikörper Kaninchen-anti-Maus- bzw. Schwein-anti-Kaninchen-Immunglobulin-G inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift überschichtete man die Nitrozellulose für 1 Minute mit je gleichen Volumina der ECL-

Detektionslösung 1 und 2. Abschließend erfolgte die Exposition zu X-Omat-Röntgenfilmen, die je nach Signalintensität zwischen 10 Sekunden und 30 Minuten dauerte. Mit Hilfe des farbigen Proteinstandards konnte man die erhaltenen Banden anhand ihrer Größe identifizieren.

2.2.6 Enzymbestimmung im Mediumüberstand

Die Transaminasen GOT (Glutamatoxalacetattransaminase) und GPT (Glutamatpyruvattransaminase) sowie die Oxidoreduktase GLDH (Glutamatdehydrogenase) kommen zwar in allen Organen und Zellen vor, haben jedoch aufgrund des erhöhten Auftretens in der Leber einen besonderen Stellenwert in der Leberdiagnostik. Diese Leberenzyme dienen der Beurteilung von Art und Ausmaß einer Leberschädigung, da bei einer Schädigung der Leberzellen diese Enzyme im Blutserum erhöht auftreten. Die Höhe des Enzymanstiegs im Serum entspricht dabei dem Ausmaß der Leberzellschädigung.

Die Enzyme GPT und GOT kommen überwiegend im Zytoplasma der Leberzellen vor, wobei GOT auch in geringeren Mengen in den Mitochondrien aufzufinden ist. Hieraus resultiert, dass bereits bei oberflächlicher Schädigung der Zellen ein Enzymanstieg von GPT und GOT im Blutserum zu registrieren ist. Das Enzym GLDH hingegen kommt überwiegend in den Mitochondrien der Zellen vor. Je tief greifender eine Leberzellschädigung ist, desto höher ist somit auch die GLDH-Aktivität im Blut. Die Enzymbestimmung im Serum ist folglich eine nichtinvasive Methode, um den Grad der Zellschädigung zu beurteilen. Dieses Prinzip wurde für die Beurteilung der *in vitro* kultivierten Hepatozyten herangezogen.

Zu diesem Zweck wurde der Mediumüberstand der stimulierten Hepatozytenkulturen gesammelt und an das Routinelabor der Klinischen Chemie der Universitätsmedizin Göttingen weitergeleitet. Die Enzymaktivität in den Überständen wurde dort in freundlicher Zusammenarbeit bestimmt.

2.2.7 Detektion von intrazellulären Fetttropfen

Zur Darstellung von intrazellulären Fetttropfen kam die von GREENSPAN et al. (1985) beschriebene Methode der Lipidanfärbung mittels Nile Red zum Einsatz. Der Fluoreszenzfarbstoff Nile Red besitzt die Eigenschaften eines Lysochroms, welches in wässriger und polarer Lösung nicht fluoresziert. In hydrophoben Phasen hingegen ist der Fluoreszenzfarbstoff sehr löslich und ist dann mit Wellenlängen zwischen 450 und 560 nm anregbar. Die Emission wird um 590 nm detektiert.

Für die Nile-Red-Färbung wurden die mit Triglyceriden stimulierten Zellen mehrmals mit PBS gewaschen. Die Nile-Red-Stocklösung (100 µg/ml Aceton) wurde in PBS auf eine Endkonzentration von 1 µg/ml verdünnt. Anschließend wurden die Zellen für 5 Minuten mit dieser Verdünnung inkubiert. Nach einem abschließenden Waschschrift mit PBS erfolgte die Detektion von intrazellulären Fetttropfen mittels Fluoreszenzmikroskopie und FACS-Analyse.

2.2.7.1 Fluoreszenzmikroskopie

Die heutigen Fluoreszenzmikroskope arbeiten nach dem Auflichtprinzip. Das bedeutet, dass das mit einem fluoreszierenden Stoff (Fluorochrome) behandelte Präparat von oben durch das Objektiv, das gleichzeitig als Kondensator fungiert, beleuchtet wird. Licht einer bestimmten Wellenlänge (Anregungsstrahlung) gelangt durch das Objektiv auf das Präparat und regt das Fluorochrom an, welches daraufhin langwelliges Licht emittiert. Die gewünschte Emissionswellenlänge des Fluorochroms wird gefiltert und das daraus entstandene Fluoreszenzbild kann nun entweder durch das Okular betrachtet oder mit einer Kamera aufgezeichnet werden. Nach Abschluss der Stimulation wurden die kultivierten Hepatozyten entsprechend der beschriebenen Methode von GREENSPAN et al. (1985) mikroskopiert.

2.2.7.2 FACS-Analyse (*Fluorescent Activated Cell Sorting-Analysis*)

Das Prinzip der FACS-Analyse, der so genannten Durchflusszytometrie, beruht auf der Emission von optischen Signalen seitens der Zelle, wenn diese einen Laserstrahl passiert. Das Vorwärtsstreulicht (FSC = *Forward Scatter*), welches die Zelle bei der Laserpassage abgibt, ist ein Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel und

hängt vom Volumen der Zelle ab. Das Seitwärtsstreulicht (SSC = *Sidewards Scatter*) ist hingegen ein Maß für die Brechung des Lichts im rechten Winkel, die von der Granularität der Zelle, der Größe und Struktur ihres Zellkerns und der Menge der Vesikel in einer Zelle beeinflusst wird. Anhand dieser Informationen kann man eine phänotypische Charakterisierung bzw. Einteilung der Zellen vornehmen. Weitere spezifische Informationen kann man durch die Messung von Fluoreszenzfarben erhalten. Hierzu verwendet man verschiedene Farbstoffe, die an spezifische Zellstrukturen binden.

Nach Abschluss der Stimulation wurden die kultivierten Hepatozyten in den 6-Loch-Platten vorsichtig nach Entfernung der Mediumüberstände mit sterilem PBS gewaschen. Um eine Ablösung der lebenden Zellen von der Plattenoberfläche zu erwirken, wurden im Anschluss die Zellen mit 1,5 ml Trypsin-EDTA pro Loch behandelt. Die Ablösung wurde zusätzlich durch leichte Erschütterung der Platten unterstützt. Die Wirkung des Trypsin-EDTA's wurde mit 1,5 ml sterilem 100%igem FCS pro Loch geblockt. Anschließend wurden die Zellen gesammelt und in einer 10%igen BSA-Lösung gewaschen. Die Zellen wurden wie bereits beschrieben mit Nile Red inkubiert und anschließend durch eine Kapillare in den Durchflusszytometer gedrückt. Hierdurch wurden feine Tropfen erzeugt, von denen jeder nur eine einzige Zelle enthielt. Alle Tropfen passierten einen Laserstrahl, so dass das Gerät sowohl die Lichtstreuung an den Zellen wie auch die Fluoreszenzemission erfassen konnte.

2.2.8 Statistische Analyse

Alle quantitativ erhobenen Daten wurden als absolute oder relative Werte $\pm$ SEM (*Standard Error Of The Mean*) aller durchgeführten Versuche dargestellt. Für die statistische Analyse wurden die jeweiligen Gruppen mittels Student's t-Test für gepaarte bzw. ungepaarte Proben verglichen und von einem p-Wert $\leq 0,05$ an als signifikant unterschiedlich betrachtet.

3. Ergebnisse

3.1 Expression von proinflammatorischen Mediatoren in Hepatozyten unter Fettexposition

Zunächst sollte untersucht werden, ob sich die basale Expression von proinflammatorischen Mediatoren in den Leberparenchymzellen, den Hepatozyten, unter der Exposition gegenüber Fetten verändert. In diesem Rahmen wurde weiterhin überprüft, ob sich die Genexpression der proinflammatorischen Mediatoren unter der Applikation von Triglyceriden und freien Fettsäuren unterscheidet. In einem weiteren Schritt sollte untersucht werden, ob ein Unterschied in der Genexpression unter Normalbedingungen und bei experimenteller Entzündung in Anwesenheit von Fetten vorliegt. Die experimentelle Entzündung wurde durch die Gabe von konditioniertem Kupffer-Zell-Medium in kultivierten Hepatozyten *in vitro* simuliert.

Im Versuchsaufbau wurden dann jeweils die mit Substanzen behandelten Hepatozyten (Stimulationsgruppe) mit unbehandelten Hepatozyten (Kontrollgruppe) verglichen. Zur Verifizierung der Ergebnisse wurden die einzelnen Versuche unter den gleichen Konditionen wiederholt.

3.1.1 Einfluss einer längerfristigen Triglyceridexposition *in vitro* auf die basale Expression der proinflammatorischen Mediatoren

Um zu untersuchen, ob sich die basale Expression der proinflammatorischen Mediatoren unter Normalbedingungen und unter Triglyceridexposition *in vitro* unterscheidet, wurden die kultivierten Hepatozyten über 24 Stunden mit Lipofundin, entspricht 0,1 % Triglyceride, stimuliert. Zu den Zeitpunkten 0, 1, 3, 6, 12 und 24 Stunden wurden jeweils Auswertungen durchgeführt.

Die Daten zeigen, dass durch die Applikation von Triglyceriden keine signifikante Regulation von proinflammatorischen Mediatoren erfolgt. Sowohl auf mRNA- wie auf Proteinebene konnte kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe detektiert werden.

Mittels der Nile-Red-Färbung erfolgte zusätzlich eine intrazelluläre Lipidanfärbung. Eine rote Fluoreszenz wird detektiert bei einer Anregung mit 515 - 560 nm in der Anwesenheit von Triglyceriden. Die Färbung zeigt in der Fluoreszenzmikroskopie eine deutliche Fettakkumulation in den mit Triglyceriden behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 5). Des Weiteren konnte in der FACS-Analyse der signifikante Unterschied in der intrazellulären Fettakkumulation der behandelten Zellen bestätigt werden.

Abb. 5 : Detektion von intrazellulären Fetttropfen in Hepatozyten mittels Nile-Red-Färbung.

Nile Red absorbiert Licht einer Wellenlänge von 515 - 560 nm und weist eine rote Fluoreszenz-Emission um 590 - 615 nm auf.

- (A) Übersicht Kontrollgruppe
 - (B) Übersicht Hepatozyten behandelt mit 0,1 % Triglyceriden nach 24 Stunden
 - (C) Vergrößerung Kontrollgruppe
 - (D) Vergrößerung Hepatozyten behandelt mit 0,1 % Triglyceriden nach 24 Stunden
- Pfeile kennzeichnen Lipidtropfen.

3.1.2 Einfluss einer Triglyceridexposition während einer induzierten Entzündungsreaktion *in vitro* auf die basale Expression der proinflammatorischen Mediatoren

Die Expression von proinflammatorischen Mediatoren, wie z. B. die Chemokine IL-8, IP-10, MIG, MIP-1 oder MIP2, in Hepatozyten unter Entzündungsbedingungen ist weitläufig bekannt (RAMADORI et al. 2008). Im Folgenden wurde die basale Expression der proinflammatorischen Mediatoren während einer induzierten Entzündungsreaktion unter zusätzlicher Triglyceridexposition *in vitro* genauer untersucht.

Kupffer-Zellen wurden für 24 Stunden mit 2 ng/ml LPS stimuliert, um einen Entzündungsreiz zu setzen. Dies entspricht einem *in-vitro*-Modell zur Aktivierung von Kupffer-Zellen. Die aktivierten (LPS-stimulierten) Kupffer-Zellen sezernieren daraufhin unter anderen Zytokine wie IL-1, IL-6 und TNF- α , welche die Hepatozyten zur Synthese von Akute-Phase-Proteine anregen, in das umliegende Medium. Insbesondere das Zytokin IL-6 spielt als Hepatozyten-Stimulationsfaktor in der Entzündungsreaktion eine entscheidende Rolle (DECKER 1990). Anschließend wurde das konditionierte Kupffer-Zell-Medium zur weiteren Verwendung gesammelt. In einem weiteren Schritt wurden Hepatozyten als Monolayer kultiviert und anschließend mit dem gesammelten konditioniertem Medium der LPS-vorbehandelten Kupffer-Zellen jeweils allein oder in Kombination mit 0,1 % Triglyceriden für 2 und 6 Stunden stimuliert. Die Kontrollgruppe wurde mit dem Mediumüberstand von unbehandelten Kupffer-Zellen für diesen Zeitraum inkubiert. Um einen möglichen Einfluss des Kupffer-Zell-Mediums auf die Zellkultur auszuschließen, wurde im Vorfeld ein Mediumversuch durchgeführt, der zeigte, dass die Applikation eines Mischmediums, bestehend aus 50 % DMEM und 50 % Medium 199, keinen signifikanten Unterschied zur 100%igen DMEM Gabe zeigt.

Um zu untersuchen, ob sich die basale Expression der proinflammatorischen Mediatoren unter Normalbedingungen und induzierten Entzündungsbedingungen *in vitro* unterscheidet, wurde die Genexpression auf mRNA-Ebene in den Hepatozyten aus Kontroll- und Stimulationsgruppe bestimmt. Die Ergebnisse zeigen zum einen, dass durch die Applikation des konditionierten Mediums von LPS-vorbehandelten Kupffer-Zellen ein Entzündungsreiz induziert werden kann. Dies spiegelt sich in der gesteigerten Expression von proinflammatorischen Mediatoren wie z. B.: CINC-1,

CINC-2 oder IL-6 in den mit konditionierten Kupffer-Zell-Medium behandelten Hepatozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe wider. Zum anderen zeigen die Ergebnisse aber auch, dass die simultane Gabe von konditioniertem Kupffer-Zell-Medium und Triglyceriden keine gesteigerte Genexpression bewirkt (Abb. 6). Vielmehr weisen die Daten daraufhin, dass die gleichzeitige Gabe von konditioniertem Kupffer-Zell-Medium und Triglyceriden die Induktion der Entzündungsreaktion tendenziell abschwächt.

Abb. 6 : Genexpression von proinflammatorischen Mediatoren auf mRNA-Ebene.

Hepatozyten (HC) wurden für jeweils 2 und 6 Stunden mit dem konditionierten Medium von LPS-vorbehandelten Kupffer-Zellen sowie in Kombination mit 0,1 % Triglyceriden (TAG's) stimuliert. Anschließend wurde die Gesamt-RNA isoliert, cDNA synthetisiert und die Mediatoren-mRNA-Expression mittels LightCycler-PCR im Verhältnis zur β -Aktin-Expression quantifiziert. Die Werte sind Mittelwerte $\pm$ SEM aus 2 Versuchen mit Doppelbestimmung. Dargestellt sind jeweils die Werte der basalen Mediatoren-Expression in unbehandelten HC, in mit konditioniertem Kupffer-Zell-Medium behandelten sowie in kombiniert mit Triglyceriden behandelten HC.

3.1.3 Einfluss eines Entzündungsreizes bei *in vitro* fettakkumulierten Hepatozyten auf die basale Expression der proinflammatorischen Mediatoren

Die NASH ist eine Lebererkrankung, die sich aus den Entitäten einer Fetteinlagerung und einer zusätzlichen entzündlichen Aktivität zusammensetzt. Die genaue Pathogenese dieser Erkrankung ist jedoch bis auf weiteres noch ungeklärt. Entsprechend der „*Two-Hit-Hypothese*“ (DAY und JAMES 1998), wird versucht ein experimentelles Modell zu entwickeln, das den Pathomechanismus der NASH simulieren soll.

Hierzu wurden in Monolayer kultivierte Hepatozyten über 12 Stunden mit einer physiologisch hohen Konzentration an Triglyceriden (100 mg/100 ml Lipofundin) inkubiert. Hierdurch wurde wie bereits beschrieben eine verstärkte Einlagerung von Fettvakuolen in den Zellen herbeigeführt. Im folgenden Schritt erfolgte die Induktion eines Entzündungsreizes mittels der Gabe eines konditionierten Mediums von LPS-vorbehandelten Kupffer-Zellen. Die Kontrollgruppen erhielten keine Vorbehandlung

mit Lipiden. Vielmehr wurde die eine Gruppe mit dem Mediumüberstand von unbehandelten Kupffer-Zellen und die andere Gruppe mit dem Mediumüberstand von LPS-behandelten Kupffer-Zellen stimuliert.

Um zu untersuchen, ob sich die basale Expression der proinflammatorischen Mediatoren unter Normalbedingungen und unter *in vitro* fettakkumulierten Hepatozyten bei einem gesetzten Entzündungsreiz unterscheidet, wurde nach einer Präinkubation mit Triglyceriden zu den Hepatozyten das Medium von LPS-aktivierten-Kupffer-Zellen gegeben. Zu den Zeitpunkten 2 und 6 Stunden wurden jeweils Auswertungen auf mRNA-Ebene durchgeführt.

Infolge der Applikation des konditionierten Mediums ist eine Erhöhung der Expression von proinflammatorischen Mediatoren zu verzeichnen. Insbesondere bei den folgenden Genen ist durch die Induktion eines künstlichen Entzündungsreizes mittels des konditionierten Mediums eine signifikante Steigerung der Genexpression zu beobachten (Abb. 7).

Mit Triglyceriden präinkubierte Hepatozyten weisen nach der Initiierung eines Entzündungsreizes nach 6 Stunden eine signifikante Steigerung der Expression von CINC-1 im Vergleich zur Kontrolle und unter ausschließlichen Entzündungsbedingungen auf. Das Chemokin MCP-1 weist ebenfalls, unter gesetztem Entzündungsreiz bei vorausgehender Fettexposition, nach 6 Stunden eine signifikante Steigerung der Expression auf. Ein signifikanter Anstieg der IL-6-Expression ist bei fettbeladenen Hepatozyten nach etwa 2 Stunden zu beobachten. Im Gegensatz dazu zeigt die Expression von TNF- α nur unter ausschließlichen Entzündungsbedingungen ohne Fettbehandlung einen signifikanten Anstieg nach 2 Stunden. Die Hepatozyten mit eingelagerten Fettvakuolen zeigen hingegen einen Trend zur Abschwächung der Entzündungsreaktion. Ebenso erfolgt eine signifikant gesteigerte Expression von ICAM-1 unter Entzündungsbedingungen, wobei jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den mit Fett vorbehandelten Zellen und den direkt stimulierten Zellen besteht. Dieser positive Effekt auf die Genexpression findet sich ebenso bei PECAM-1.

Die Vorbehandlung der Hepatozyten mit Triglyceriden zeigt teilweise einen positiven Effekt auf die Expression von proinflammatorischen Mediatoren. Die Chemokine zeigen tendenziell eher eine Expressionssteigerung nach einem länger bestehenden Entzündungsreiz von mindestens 6 Stunden. Eine Regulierung der Adhäsionsmoleküle ist hingegen schon nach einer sehr kurzen Expositionszeit von

2 Stunden zu beobachten. Insgesamt ist ein Trend zu einer gesteigerten Expression zu erahnen, allerdings war der Effekt nicht ganz so eindeutig signifikant, möglicherweise aufgrund der relativ stark streuenden Kontrollwerte.

Abb. 7 : Genexpression von proinflammatorischen Mediatoren auf mRNA-Ebene.

Hepatozyten (HC) sowie präinkubierte Hepatozyten mit Triglyceriden (TAG's) wurden jeweils für 2 und 6 Stunden mit dem konditionierten Medium von LPS-vorbehandelten Kupffer-Zellen stimuliert. Anschließend wurde die Gesamt-RNA isoliert, cDNA synthetisiert und die Mediatoren-mRNA-Expression mittels LightCycler-PCR im Verhältnis zur β -Aktin-Expression quantifiziert. Die Werte sind Mittelwerte $\pm$ SEM aus 3 Versuchen mit Doppelbestimmung. Dargestellt sind jeweils die Werte der basalen Mediatoren-Expression in unbehandelten HC (Kontrolle), in mit konditioniertem Kupffer-Zell-Medium behandelten sowie in kombiniert mit Triglyceriden vorbehandelten HC. (*) Signifikanz zur Kontrolle entsprechend, $p < 0,05$.

3.1.4 Einfluss einer längerfristigen freien Fettsäureexposition *in vitro* auf die basale Expression der proinflammatorischen Mediatoren

Mit der Nahrung nimmt der Mensch eine komplex zusammengesetzte Fettfraktion auf. Die Triglyceride (50 - 200 mg/100 ml Serum) nehmen hierbei den größten Anteil der Nahrungslipide ein. Zu einem geringeren Anteil kommen jedoch auch nichtveresterte freie Fettsäuren (14 - 22 mg/100 ml Serum) im Serum von gesunden Menschen vor (LÖFFLER et al. 2006).

In den vorangehenden Versuchen sollte bereits geklärt werden, ob die Exposition von Triglyceriden einen Effekt auf die Expression der proinflammatorischen Mediatoren hat. Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob die Applikation von freien Fettsäuren einen Einfluss auf die Genexpression nimmt. Hierzu wurden die in Monolayer kultivierten Hepatozyten über 24 Stunden mit den Fettsäuren Palmitinsäure und Linolsäure in einer unphysiologisch hohen Konzentration von

3 mmol/L stimuliert. Die Kontrollgruppe wurde mit einer äquivalenten Menge an Isopropanol-Albumin-Lösung behandelt. Zu den Zeitpunkten 0, 1, 3, 6, 12 und 24 Stunden wurden jeweils Auswertungen auf mRNA- und Proteinebene durchgeführt. Auf mRNA-Ebene sowie auf Proteinebene ließ sich feststellen, dass Linolsäure in einer Konzentration von 3 mmol/L einen zytotoxischen Effekt aufweist. Hepatozyten die mit Palmitinsäure behandelt worden sind, zeigen hingegen keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse können durch eine spezifische Färbung mit Fluoreszenz-markiertem Annexin V untermauert werden (Abb. 8a). Während der frühen Phase der Apoptose wird durch Verlust symmetrischer Eigenschaften der Phospholipidzellmembran Phosphatidylserin auf der extrazellulären Seite der Zellmembran präsentiert. Dieses befindet sich bei vitalen Zellen nur auf der intrazellulären Seite der Zellmembran. Diese Expression von Phosphatidylserin auf der Zellmembran kann durch Annexin V, ein Phosphatidylserin bindendes Protein, detektiert werden (O'BRIEN et al. 1997). Die Kontrollgruppe und die mit 3 mmol/L Palmitinsäure behandelten Zellen zeigen einen geringen Unterschied im Anfärbeverhalten. Vereinzelt sind in der Behandlungsgruppe spezifisch gefärbte Zellen auf Apoptose zu erkennen. Bei der Kontrollgruppe sowie bei den mit Palmitinsäure behandelten Zellen sieht man jedoch eine sehr gleichmäßige Verteilung der adhären und vitalen Zellen auf der Kulturschale. Im Gegensatz dazu zeigen die mit 3 mmol/L Linolsäure behandelten Zellen deutliche spezifische Färbungen für Apoptose. Adhären und vitale Zellen sind so gut wie nicht auffindbar.

Abb. 8a : Spezifische immunzytologische Färbung zum Nachweis apoptotischer Zellen.

Hepatozyten wurden mit 3 mmol/L Palmitinsäure und 3 mmol/L Linolsäure für 24 Stunden stimuliert. Die Abbildungen zeigen eine spezifische Färbung mit Fluoreszenz-markiertem Annexin V zum Nachweis apoptotischer Zellen. Es erfolgt die Anfärbung von:

- (A) Kontrollgruppe
- (B) Hepatozyten behandelt mit 3 mmol/L Palmitinsäure nach 24 Stunden
- (C) Hepatozyten behandelt mit 3 mmol/L Linolsäure nach 24 Stunden

Ein weiterer zuverlässiger Marker für eine Schädigung der Hepatozyten ist die Messung der ins Medium freigesetzten Leberenzyme. Anhand der Höhe des Enzymanstiegs lässt sich ungefähr das Ausmaß der Leberzellschädigung abschätzen. Unter der Applikation von Linolsäure kommt es zu einem deutlichen Anstieg von GOT, GPT sowie GLDH (Abb. 8b). Im Gegensatz dazu zeigen sowohl die Kontrollgruppe wie auch die Hepatozyten, die mit Palmitinsäure behandelt worden sind, ausschließlich einen geringen Enzymanstieg im Medium im Verlauf von 24 Stunden. Dies ist mit dem regulären Zelluntergang unter *in-vitro*-Bedingungen vereinbar.

Abb. 8b: Leberenzyme im zellfreien Mediumüberstand.

Im zellfreien Mediumüberstand der mit freien Fettsäuren behandelten Hepatozyten (HC) sowie von unbehandelten HC, wurde die Aktivität von den Leberenzymen GOT, GPT und GLDH zu den Zeitpunkten 0, 1, 3, 6, 12 und 24 Stunden bestimmt. Die Werte sind Mittelwerte $\pm$ SEM aus 3 Versuchen. Dargestellt sind jeweils die relative Enzymaktivität von GOT, GPT und GLDH aus dem Mediumüberstand von mit Isopropanol-Albumin-Lösung behandelten HC (Kontrolle), mit 3 mmol/L Palmitinsäure und 3 mmol/L Linolsäure behandelten HC.

3.1.5 Einfluss einer konzentrationsabhängigen Stimulation mit Linolsäure *in vitro* auf die basale Expression der proinflammatorischen Mediatoren

Der vorangehende Versuch zeigte einen zytotoxischen Effekt der Fettsäure Linolsäure in einer Konzentration von 3 mmol/L. Um einen Effekt auf die basale Genexpression näher eruieren zu können, wurde ein Dosisversuch durchgeführt. Zum einen sollte ermittelt werden, unter welcher Dosis der zytotoxische Effekt ausbleibt, und zum anderen, ob sich eine Veränderung in der basalen Expression der proinflammatorischen Mediatoren unter der Applikation der Fettsäure Linolsäure beobachten lässt.

Hepatozyten wurden erneut kultiviert und anschließend mit einer absteigenden Konzentration von Linolsäure stimuliert. Hierzu wurde wie bereits beschrieben eine Fettsäurestammlösung in einer Konzentration von 3 mmol/L angefertigt, die in einer Verdünnungsreihe zu folgenden Konzentrationen verdünnt worden ist: 1,5 mmol/L,

0,75 mmol/L und 0,375 mmol/L. Die Kontrollgruppe wurde wiederum mit einer Isopropanol-Albumin-Lösung behandelt. Nach einer Stimulationszeit von 12 Stunden wurden Auswertungen angefertigt.

Wie bereits beschrieben, ist Linolsäure in der Konzentration von 3 mmol/L und scheinbar auch in einer Konzentration von 1,5 mmol/L zytotoxisch. In geringerer Dosis weist Linolsäure jedoch keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe in der Genexpression von inflammatorischen Mediatoren auf. Vielmehr findet sich hier eine Tendenz zur Verringerung der Expression von inflammatorischen Mediatoren und Adhäsionsmolekülen (Abb. 9a).

Abb. 9a : Genexpression von proinflammatorischen Mediatoren auf mRNA-Ebene.

Hepatozyten (HC) wurden mit 0,75 mmol/L und 0,375 mmol/L Linolsäure für 12 Stunden stimuliert. Anschließend wurde die Gesamt-RNA isoliert, cDNA synthetisiert und die Mediatoren-mRNA-Expression mittels LightCycler-PCR im Verhältnis zur β -Aktin-Expression quantifiziert. Die Werte sind Mittelwerte $\pm$ SEM aus 2 Versuchen mit Doppelbestimmung. Dargestellt sind jeweils die Werte der basalen Mediatoren-Expression in mit Isopropanol-Albumin-Lösung behandelten HC (Kontrolle), in mit 0,75 mmol/L sowie mit 0,375 mmol/L Linolsäure behandelten HC.

Des Weiteren wurde unter anderem auf Proteinebene die Expression der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) untersucht. Das Enzym iNOS ist ein wesentlicher Faktor zur Ausprägung von oxidativem Stress während der Leberschädigung. Die Expression vor allem in Kupffer-Zellen wird durch endogene Faktoren wie bakterielles LPS oder aber auch durch freigesetzte Zytokine (Interferon- γ , Tumornekrosefaktor- α , Interleukine) reguliert (MURIEL 2000).

Die Western-Blot-Analyse bestätigt die Daten der mRNA-Analyse. So findet man im Vergleich zur Kontrolle eine deutlich verminderte Proteinexpression unter der Applikation von 0,75 mmol/L und 0,375 mmol/L Linolsäure (Abb. 9b).

NF- κ B (Nuklearfaktor κ B) ist ein wichtiger spezifischer Transkriptionsfaktor, der für die Regulation der Immunantwort, der Zellproliferation, von entzündlichen Prozessen und des Zelltodes von großer Bedeutung ist. Dieser Transkriptionsfaktor kommt in nahezu allen Zelltypen und Geweben vor und ist für die Regulation von zahlreichen Zytokinen und Adhäsionsmolekülen zuständig. Eine Aktivierung erfolgt über Wachstumsfaktoren, Zytokine, bakterielle und virale Antigene und chemisch-physikalische Noxen. In den meisten Zellen liegt NF- κ B inaktiv an seinen Inhibitor I κ B

(Inhibitor- κ B) gebunden im Zytoplasma vor. Für die Aktivierung von NF- κ B ist die Degradierung von I κ B notwendig (BAEUERLE und HENKEL 1994).

Mittels Western-Blot-Analyse wurde das Protein I κ B detektiert. Im Vergleich zur Kontrolle zeigen die mit Linolsäure behandelten Hepatozyten (0,75 mmol/L und 0,375 mmol/L) eine deutliche Erhöhung des Proteingehaltes (Abb. 9b). Es findet sich hier kein Hinweis auf eine vorliegende Degradation von I κ B.

Abb. 9b : Western-Blot-Analyse.

Hepatozyten (HC) wurden mit 0,75 mmol/L und 0,375 mmol/L Linolsäure für 12 Stunden stimuliert. Anschließend wurde zelluläres Protein für die Western-Blot-Analyse aus den jeweiligen Zelllysaten gewonnen. Darstellung einer von 2 Western-Blot-Analysen von 2 unterschiedlichen Zellisolationen. Dargestellt sind die iNOS-, β-Aktin- und I κ B-Banden von (1) HC, die mit einer Isopropanol-Albumin-Lösung behandelt wurden (Kontrolle), (2) HC, die mit 0,75 mmol/L sowie (3) HC, die mit 0,375 mmol/L Linolsäure behandelt wurden.

Des Weiteren wurden Übersichtsaufnahmen von den stimulierten Zellen sowie von der Kontrollgruppe angefertigt, um die Morphologie der Hepatozyten zu beurteilen (Abb. 9c). In der Kontrollgruppe wurden die adhärennten Zellen teilweise von abschwimmenden Zellen überdeckt. Dennoch sind die typischen Merkmale von vitalen Hepatozyten erkennbar. Die polygonalen Zellen weisen einen runden Zellkern

auf. Sie haben einen Helligkeitskontrast zwischen Zellkern und Zytoplasma und einen refraktionsbedingten Ring um die Zellmembran.

Im Vergleich dazu weisen die Hepatozyten, die mit einer hohen Konzentration von Linolsäure stimuliert worden sind (3 mmol/L und 1,5 mmol/L), Merkmale der Zellschädigung auf. Insbesondere bei den mit 3 mmol/L stimulierten Zellen ist nur noch eine sehr dünne Zellbesiedlung zu finden. Vitale Zellen sind nicht mehr auszumachen und die verbliebenen Zellreste sind in sich zusammengefallen und zu kleinen Haufen akkumuliert.

Je geringer die stimulierende Fettsäurekonzentration ist, desto weniger sehen wir den beschriebenen negativen Effekt. So sehen wir bei den Hepatozyten, die mit 0,375 mmol/L Linolsäure behandelt worden sind, außer einigen Fetttröpfchenablagerungen keine Änderungen in der Morphologie der Zellen.

Abb. 9c : Übersichtsaufnahme von Hepatozyten in Kultur.

Hepatozyten (HC) wurden mit der Fettsäure Linolsäure in einer absteigenden Konzentration für 12 Stunden stimuliert. Die Abbildungen zeigen die Zellmorphologie der mit (A) Isopropanol-Albumin-Lösung behandelten HC (Kontrolle) im Vergleich zu den stimulierten HC mit (B) 3 mmol/L Linolsäure, (C) 1,5 mmol/L Linolsäure, (D) 0,75 mmol/L Linolsäure sowie mit (E) 0,375 mmol/L Linolsäure.

Durch Messungen der Leberenzymkonzentrationen von GOT, GPT und GLDH im zellfreien Mediumüberstand aller Behandlungsgruppen wurde versucht, indirekt Rückschlüsse über eine mögliche Zellschädigung nach Behandlung mit Linolsäure in einer absteigenden Konzentration zu ziehen.

Die Behandlung von Hepatozyten mit 3 mmol/L Linolsäure zeigt einen eindeutigen zytotoxischen Effekt, in Form einer signifikanten Steigerung der Leberenzyme um ein vielfaches (Abb. 9d). Bei der nächst niedrigeren Konzentration von 1,5 mmol/L Linolsäure findet man ebenfalls noch eine geringgradige Erhöhung der Enzyme. Unter Berücksichtigung der relativ hohen Standardabweichung würde man dennoch einen schädigenden Effekt der genannten Dosis annehmen. Die morphologischen Veränderungen der Zellen würden diese These ebenfalls unterstützen. In den Fettsäurekonzentrationen 0,75 mmol/L und 0,375 mmol/L findet man keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe.

Abb. 9d : Leberenzyme im zellfreien Mediumüberstand.

Im zellfreien Mediumüberstand der mit freien Fettsäuren behandelten Hepatozyten (HC) sowie von unbehandelten HC wurde die Enzymaktivität von den Leberenzymen GOT, GPT und GLDH nach einer Stimulationszeit von 12 Stunden bestimmt. Die Werte sind Mittelwerte $\pm$ SEM aus 2 Versuchen. Dargestellt sind jeweils die relative Enzymaktivität von GOT, GPT und GLDH aus dem Mediumüberstand von mit Isopropanol-Albumin-Lösung behandelten HC (Kontrolle), mit 3 mmol/L, 1,5 mmol/L, 0,75 mmol/L und 0,375 mmol/L Linolsäure behandelten HC.

3.2 Expression von proinflammatorischen Mediatoren in Kupffer-Zellen unter Fettexposition

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob sich die basale Expression von proinflammatorischen Mediatoren in den leberspezifischen, sessilen Gewebsmakrophagen, den Kupffer-Zellen, unter der Exposition gegenüber Lipiden verändert.

Entsprechend zu den vorausgegangenen Hepatozytenversuchen sollte überprüft werden, ob ein Unterschied in der Genexpression unter Normalbedingungen und bei experimenteller Entzündung in Anwesenheit von Triglyceriden bzw. von freien Fettsäuren vorliegt. Die experimentelle Entzündung wurde durch eine LPS-Behandlung der kultivierten Kupffer-Zellen *in vitro* simuliert.

Im Versuchsaufbau wurden dann jeweils die mit Substanzen behandelten Kupffer-Zellen (Stimulationsgruppe) mit unbehandelten Kupffer-Zellen (Kontrollgruppe) verglichen. Zur Verifizierung der Ergebnisse wurden die einzelnen Versuche unter den gleichen Konditionen wiederholt.

3.2.1 Einfluss einer Triglyceridexposition *in vitro* auf die basale Expression der proinflammatorischen Mediatoren

Um zu untersuchen, ob sich die basale Expression der proinflammatorischen Mediatoren unter Normalbedingungen und unter Triglyceridexposition *in vitro* unterscheidet, wurden die in Monolayer kultivierten Kupffer-Zellen für 6 Stunden mit Lipofundin, entspricht 0,1 % Triglyceride, stimuliert. Zu den Zeitpunkten 2 und 6 Stunden wurden jeweils Auswertungen durchgeführt.

Wie bereits die Vorarbeiten unter BUDICK-HARMELIN et al. (2008) gezeigt haben, bestätigen diese Versuche, dass durch die Applikation von Triglyceriden keine signifikante Regulation von proinflammatorischen Mediatoren erfolgt. Sowohl auf mRNA- wie auf Proteinebene konnte kein signifikanter Unterschied detektiert werden.

3.2.2 Einfluss einer Triglyceridexposition während einer induzierten Entzündungsreaktion *in vitro* auf die basale Expression der proinflammatorischen Mediatoren

Im Rahmen von entzündlichen Prozessen in der Leber werden von den dort ansässigen Zellpopulationen eine Reihe von chemischen Mediatoren gebildet, die den weiteren Entzündungsprozess steuern. Insbesondere Kupffer-Zellen nehmen über die Produktion von folgenden inflammatorischen Mediatoren wie: IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-18, TNF- α , IP-10 oder MIP's Einfluss auf den Entzündungsprozess (RAMADORI et al. 2008).

Im Folgenden sollte die basale Expression der proinflammatorischen Mediatoren während einer induzierten Entzündungsreaktion unter zusätzlicher Triglyceridexposition *in vitro* genauer untersucht werden. Hierzu wurden Kupffer-Zellen zur Aktivierung für 6 Stunden mit LPS, in einer Konzentration von 2 ng/ml, stimuliert. Parallel dazu wurden weiterhin Kupffer-Zellen simultan mit LPS und 0,1 % Triglyceriden behandelt. Zu den jeweiligen Stimulationszeitpunkten wurden zusätzlich unbehandelte Kupffer-Zell-Kontrollen angefertigt. Nach 2 und 6 Stunden erfolgte die Auswertung auf mRNA-Ebene.

Die Daten zeigen, dass eine generelle Induktion der proinflammatorischen Mediatoren unter der Applikation von LPS oder in der Kombination LPS mit Triglyceriden zu verzeichnen ist (Abb. 10). Vereinzelt konnte kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden, wobei dies am ehesten auf die dort vorliegenden hohen Streuwerte zurückzuführen ist.

Das proinflammatorische Zytokin IL-1 β zeigt bereits nach einer kurzen Stimulationsdauer von 2 Stunden mit LPS bzw. LPS kombiniert mit Triglyceriden eine signifikante Expressionssteigerung im Vergleich zur Kontrolle. Nach einem Behandlungsintervall von 6 Stunden findet man weiterhin einen signifikanten Unterschied zwischen der reinen LPS-Behandlung und der mit Fett kombinierten Behandlung. So zeigen die Daten eine signifikante Erhöhung der Genexpression der kombinierten Kupffer-Zell-Behandlung im Vergleich zur ausschließlichen LPS-Behandlung. Denselben Trend findet man auch bei dem Zytokin IL-6. So ist ebenfalls nach einer Stimulationszeit von 6 Stunden eine signifikante Erhöhung der Genexpression der mit Fett- und LPS-behandelten Kupffer-Zellen gegenüber den Zellen, die ausschließlich mit LPS inkubiert worden sind, zu beobachten.

Für die Mediatoren TNF- α , MIP-1 α und dem Enzym iNOS ist kein signifikanter Unterschied in der Genexpression zwischen einfacher LPS-Behandlung und kombinierter LPS-Behandlung mit Triglyceriden zu finden.

Für das Chemokin MIP-2 sind sowohl nach 2 wie auch nach 6 Stunden eine signifikante Erhöhung der Expression für die fettexponierten Zellen im Vergleich zu den allein mit LPS-stimulierten Zellen zu verzeichnen.

Die Adhäsionsmoleküle weisen auch in diesem Versuch ihr charakteristisches Verhalten unter Entzündungsbedingungen auf. So wird ICAM-1 hochreguliert und PECAM-1 tendenziell herunterreguliert. Die Daten zeigen jedoch keinen signifikanten Effekt der Triglyceride gegenüber der alleinigen Behandlung mit LPS.

Abb. 10 : Genexpression von proinflammatorischen Mediatoren auf mRNA-Ebene.

Kupffer-Zellen (KC) wurden mit LPS sowie mit LPS in Kombination mit 0,1 % Triglyceriden für 6 Stunden stimuliert. Anschließend wurde die Gesamt-RNA isoliert, cDNA synthetisiert und die Mediatoren-mRNA-Expression mittels LightCycler-PCR im Verhältnis zur β -Aktin-Expression quantifiziert. Die Werte sind Mittelwerte $\pm$ SEM aus 3 Versuchen mit Doppelbestimmung. Dargestellt sind jeweils die Werte der basalen Mediatoren-Expression in unbehandelten KC (Kontrolle), in mit 2 ng/ml LPS sowie mit 2 ng/ml LPS in Kombination mit 0,1 % Triglyceriden behandelten KC. (*) Signifikanz zur Kontrolle entsprechend, $p < 0,05$.

3.2.3 Einfluss einer konzentrationsabhängigen Stimulation mit Palmitinsäure und Linolsäure *in vitro* auf die basale Expression der proinflammatorischen Mediatoren

Analog zu den vorausgegangenen Hepatozytenversuchen sollte nun untersucht werden, ob die Applikation von freien Fettsäuren einen Einfluss auf die basale Expression der proinflammatorischen Mediatoren von Kupffer-Zellen nimmt. Da auch bei dieser Zellpopulation mit einem zytotoxischen Effekt von hochkonzentrierten Fettsäuren zu rechnen war, wurde sogleich mit einem Dosisversuch begonnen.

Hierzu wurden Kupffer-Zellen erneut in Monolayer kultiviert und anschließend in einer absteigenden Konzentration von Palmitinsäure und Linolsäure stimuliert. Wie bereits beschrieben wurde eine Fettsäurestammlösung in einer Konzentration von 3 mmol/L hergestellt, die in einer Verdünnungsreihe zu folgenden Konzentrationen verdünnt worden ist: 1,5 mmol/L, 0,75 mmol/L und 0,375 mmol/L. Die Kontrollgruppe wurde wie zuvor beschrieben mit einer äquivalenten Menge an Isopropanol-Albumin-Lösung behandelt. Nach einer Stimulationszeit von 12 Stunden wurden Auswertungen angefertigt.

Anhand der Auswertung des *Housekeeping-Gens* β -Aktin konnten Rückschlüsse auf die Syntheseleistung der behandelten Zellen gezogen werden. Die Ergebnisse auf mRNA-Ebene wie auch auf Proteinebene bestätigen, dass Linolsäure und Palmitinsäure in einer Konzentration von 3 mmol/L und 1,5 mmol/L einen schädigenden Effekt ausüben und somit gewonnene Daten kritisch zu betrachten sind (Abb. 11a). Aus diesem Grund wurden die folgenden Auswertungen erst ab einer Stimulationskonzentration von 0,75 mmol/L durchgeführt.

Abb. 11a : Western-Blot-Analyse von β -Aktin.

Kupffer-Zellen (KC) wurden mit 3 mmol/L, 1,5 mmol/L, 0,75 mmol/L und 0,375 mmol/L Linolsäure für 12 Stunden stimuliert. Anschließend wurde zelluläres Protein für die Western-Blot-Analyse aus den

jeweiligen Zelllysaten gewonnen. Darstellung einer von 2 Western-Blot-Analysen von 3 unterschiedlichen Zellisolationen. Dargestellt sind die β -Aktin-Banden von (1) KC, die mit einer Isopropanol-Albumin-Lösung behandelt wurden (Kontrolle), (2) KC, die mit 3 mmol/L, (3) 1,5 mmol/L, (4) 0,75 mmol/L sowie (5) 0,375 mmol/L Linolsäure behandelt wurden.

Die Daten zeigen tendenziell, dass insbesondere für die Fettsäure Linolsäure in einer niedrigeren Konzentration bereits signifikante Steigerungen in der Genexpression von proinflammatorischen Mediatoren vorliegen (Abb. 11b).

Abb. 11b: Genexpression von proinflammatorischen Mediatoren auf mRNA-Ebene.

Kupffer-Zellen (KC) wurden jeweils mit 0,75 mmol/L sowie mit 0,375 mmol/L Linolsäure und Palmitinsäure für 12 Stunden stimuliert. Anschließend wurde die Gesamt-RNA isoliert, cDNA synthetisiert und die Mediatoren-mRNA-Expression mittels LightCycler-PCR im Verhältnis zur β -Aktin-Expression quantifiziert. Die Werte sind Mittelwerte $\pm$ SEM aus 3 Versuchen mit Doppelbestimmung. Dargestellt sind jeweils die Werte der basalen Mediatoren-Expression in mit Isopropanol-Albumin-Lösung behandelten KC (Kontrolle), in mit 0,75 mmol/L sowie mit 0,375 mmol/L Linolsäure bzw. Palmitinsäure behandelten KC. (*) Signifikanz zur Kontrolle entsprechend, $p < 0,05$.

Die Western-Blot-Analyse von iNOS bestätigt die Daten der mRNA-Analyse. So findet man im Vergleich zur Kontrolle eine verminderte Proteinexpression unter der Applikation von 0,75 mmol/L Linolsäure, sowie eine tendenziell gesteigerte Expression bei allen weiteren mit Fettsäure behandelten Zellen. Insbesondere die Kupffer-Zellen, die mit einer Konzentration von 0,375 mmol/L Linolsäure behandelt worden sind, weisen eine deutliche Erhöhung des Proteingehaltes auf (Abb. 11c). Des Weiteren findet man parallel zu dem Anstieg von iNOS, insbesondere bei den Kupffer-Zellen die mit 0,375 mmol/L Linolsäure und mit 0,75 mmol/L Palmitinsäure behandelt wurden, eine Degradierung von I κ B (Abb. 11c).

Abb. 11c : Western-Blot-Analyse.

Kupffer-Zellen (KC) wurden mit 0,75 mmol/L und 0,375 mmol/L Linolsäure bzw. Palmitinsäure für 12 Stunden stimuliert. Anschließend wurde zelluläres Protein für die Western-Blot-Analyse aus den

jeweiligen Zelllysaten gewonnen. Darstellung einer von 2 Western-Blot-Analysen von 3 unterschiedlichen Zellisolationen. Dargestellt sind die iNOS-, β -Aktin- und I κ B-Banden von (1) KC, die mit einer Isopropanol-Albumin-Lösung behandelt wurden (Kontrolle), (2) KC, die mit 0,75 mmol/L Linolsäure, (3) mit 0,375 mmol/L Linolsäure, (4) mit 0,75 mmol/L Palmitinsäure sowie (5) mit 0,375 mmol/L Palmitinsäure behandelt wurden.

Weiterhin wurden Übersichtsaufnahmen von den stimulierten Zellen sowie von der Kontrollgruppe angefertigt, um die Morphologie der Kupffer-Zellen zu beurteilen (Abb. 11d).

In der Kontrollgruppe sieht man ruhende Kupffer-Zellen, die sich durch Fältelungen der Zellmembran, plumpe Mikrovilli und durch einzelne sternförmige Zytoplasmaausläufern kennzeichnen.

Im Vergleich dazu weisen die Kupffer-Zellen, die mit einer hohen Konzentration von Linolsäure stimuliert worden sind (3 mmol/L), eindeutige Merkmale der Zellaktivierung auf. Diese Zellen zeigen eine deutliche Größenzunahme sowie eine verstärkte Spreitung und Fältelung der Zellmembran. Auch in den niedrigeren Stimulationsdosen der Fettsäuren Linolsäure und Palmitinsäure findet man Anzeichen einer Zellaktivierung. Diese ist jedoch nicht so prägnant ausgeprägt wie bei der Behandlung mit 3 mmol/L Linolsäure.

Abb. 11d : Übersichtsaufnahme von Kupfer-Zellen in Kultur.

Kupfer-Zellen (KC) wurden mit den Fettsäuren Palmitinsäure und Linolsäure in einer absteigenden Konzentration für 12 Stunden stimuliert. Die Abbildungen zeigen die Zellmorphologie der mit (A) Isopropanol-Albumin-Lösung behandelten KC (Kontrolle) im Vergleich zu den stimulierten KC mit (B) 3 mmol/L Palmitinsäure, (C) 3 mmol/L Linolsäure, (D) 1,5 mmol/L Palmitinsäure, (E) 1,5 mmol/L Linolsäure, (F) 0,75 mmol/L Palmitinsäure, (G) 0,75 mmol/L Linolsäure, (H) 0,375 mmol/L Palmitinsäure sowie mit (I) 0,375 mmol/L Linolsäure.

3.2.4 Einfluss einer freien Fettsäureexposition während einer induzierten Entzündungsreaktion *in vitro* auf die basale Expression der proinflammatorischen Mediatoren

In einem weiteren Schritt sollte untersucht werden, ob sich die basale Expression der proinflammatorischen Mediatoren unter Entzündungsbedingungen und unter der Anwesenheit von freien Fettsäuren *in vitro* bei einem gesetzten Entzündungsreiz unterscheidet. Hierzu wurden Kupfer-Zellen in Monolayer kultiviert und anschließend mit 2 ng/ml LPS aktiviert. Einige dieser Zellen wurden simultan mit unterschiedlichen Konzentrationen der Fettsäuren Linolsäure und Palmitinsäure behandelt (3 mmol/L, 1,5 mmol/L, 0,75 mmol/L und 0,375 mmol/L). Die Kontrollgruppe wurde, wie in den vorangehenden Versuchen, mit einer äquivalenten Menge an Isopropanol-Albumin-Lösung behandelt. Nach einem Expositionszeitraum von 12 Stunden erfolgten die jeweiligen Auswertungen.

Die Daten zeigen, dass eine generelle Induktion der proinflammatorischen Mediatoren unter der Applikation von LPS oder in der Kombination LPS mit freien Fettsäuren zu verzeichnen ist (Abb. 12). Die Applikation von Linolsäure weist grundsätzlich einen größeren Effekt im Vergleich zu der Applikation von Palmitinsäure auf. Die Daten zeigen tendenziell, dass insbesondere in der niedrigen

Konzentration von 0,375 mmol/L Linolsäure der größte induzierende Effekt für Chemokine und Zytokine zu finden ist. Im Verhältnis zu den anderen inflammatorischen Mediatoren reagieren die Adhäsionsmoleküle nur im geringen Ausmaß auf den Entzündungsreiz.

Abb. 12 : Genexpression von proinflammatorischen Mediatoren auf mRNA-Ebene.

Kupfer-Zellen (KC) wurden mit LPS sowie mit LPS in Kombination mit den Fettsäuren Linolsäure und Palmitinsäure jeweils in den Konzentrationen 0,75 mmol/L und 0,375 mmol/L für 12 Stunden stimuliert.

Anschließend wurde die Gesamt-RNA isoliert, cDNA synthetisiert und die Mediatoren-mRNA-Expression mittels LightCycler-PCR im Verhältnis zur β -Aktin-Expression quantifiziert. Die Werte sind Mittelwerte $\pm$ SEM aus 2 Versuchen mit Doppelbestimmung. Dargestellt sind jeweils die Werte der basalen Mediatoren-Expression in mit Isopropanol-Albumin-Lösung behandelten KC (Kontrolle), in mit LPS behandelten KC sowie in mit LPS in Kombination mit jeweils 0,75 mmol/L und mit 0,375 mmol/L Linolsäure bzw. Palmitinsäure behandelten KC.

3.2.5 Einfluss niedriger Konzentrationen von Linolsäure *in vitro* auf die basale Expression der proinflammatorischen Mediatoren

Der vorangehende Versuch zeigte, dass die Behandlung mit 0,375 mmol/L Linolsäure den größten Effekt auf die Expressionssteigerung von proinflammatorischen Mediatoren aufweist. Im Folgenden wurde derselbe Versuch mit zwei weiter reduzierten Stimulationskonzentrationen an Linolsäure durchgeführt. Hierdurch sollte ermittelt werden, ob bei einer Behandlung mit 200 μ M bzw. 100 μ M Linolsäure noch ein induzierender Effekt auf die basale Expression der proinflammatorischen Mediatoren vorliegt.

Die Daten weisen daraufhin, dass Linolsäure in einer Konzentration von 200 μ M noch einen proinflammatorischen Effekt hat. Die Chemokine CINC-2, MCP-1 und MIP-1 α sowie das proinflammatorische Zytokin IL-6 zeigen tendenziell noch eine Expressionssteigerung. Die Adhäsionsmoleküle reagieren weniger ausgeprägt unter der Applikation von 200 μ M Linolsäure. PECAM-1 ist tendenziell noch herunterreguliert, was für einen noch bestehenden Entzündungsreiz sprechen würde. Ebenso findet man bei der induzierbaren NO-Synthase als Korrelat der Entzündungsreaktion eine gesteigerte Expression.

Im Vergleich zur Kontrolle weisen jedoch die mit 100 μ M Linolsäure behandelten Zellen nahezu keine Genregulation mehr auf (Abb. 13).

Abb. 13 : Genexpression von proinflammatorischen Mediatoren auf mRNA-Ebene.

Kupffer-Zellen (KC) wurden mit 100 μ M und 200 μ M Linolsäure für 12 Stunden stimuliert. Anschließend wurde die Gesamt-RNA isoliert, cDNA synthetisiert und die Mediatoren-mRNA-Expression mittels LightCycler-PCR im Verhältnis zur β -Aktin-Expression quantifiziert. Die Werte sind Mittelwerte $\pm$ SEM aus 2 Versuchen mit Doppelbestimmung. Dargestellt sind jeweils die Werte der basalen Mediatoren-Expression in mit Isopropanol-Albumin-Lösung behandelten KC (Kontrolle), KC stimuliert mit 200 μ M Linolsäure und 100 μ M Linolsäure.

3.3 Expression von proinflammatorischen Mediatoren in Hep G2 (humane Hepatomzellen) unter Fettexposition

In den vorangehenden Versuchen wurden die Untersuchungen ausschließlich an Leberzellen der Ratte durchgeführt. Um einen Eindruck zu bekommen, inwieweit die ermittelten Daten auch auf das menschliche System übertragbar sind, wurden zum Abschluss noch die basale Expression von proinflammatorischen Mediatoren in humanen Hepatomzellen unter Fettexposition untersucht. Zu diesem Zweck wurde die humane Hepatom-Zelllinie Hep G2 verwendet, da diese noch viele Funktionen besitzt, die für normale humane Hepatozyten typisch sind.

Entsprechend den vorausgehenden Untersuchungen wurde anhand von einigen exemplarisch ausgewählten Chemokinen (CXCL1, CXCL2 und CXCL8) und Adhäsionsmolekülen (ICAM-1 und PECAM-1) die basale Expression von proinflammatorischen Mediatoren unter der Exposition gegenüber Triglyceriden und freien Fettsäuren überprüft.

Im Versuchsaufbau wurden dann jeweils die mit Substanzen behandelten Hepatomzellen (Stimulationsgruppe) mit unbehandelten Hepatomzellen (Kontrollgruppe) verglichen. Da ausschließlich ein Eindruck vermittelt werden sollte, wie humane Hepatomzellen tendenziell sich unter Fettexposition verhalten, wurde auf weitere Wiederholungen dieser Versuche verzichtet.

3.3.1 Einfluss einer Triglyceridexposition *in vitro* auf die basale Expression der proinflammatorischen Mediatoren

Um zu untersuchen, ob sich die basale Expression der proinflammatorischen Mediatoren unter Normalbedingungen und unter Triglyceridexposition *in vitro* unterscheidet, wurden die in Monokultur kultivierten Hep G2 Zellen über 12 Stunden mit Lipofundin, entspricht 0,1 % Triglyceride, stimuliert. Nach 12 Stunden wurden die Auswertungen auf mRNA-Ebene durchgeführt.

Die Daten zeigen, dass durch die Applikation von Triglyceriden die Chemokine CXCL1 und CXCL8 deutlich in ihrer Expression im Vergleich zur Kontrolle gesteigert sind (Abb. 14).

Die anderen untersuchten Chemokine und Adhäsionsmoleküle hatten keinen deutlichen Unterschied zur Kontrolle aufgewiesen.

Abb. 14 : Genexpression von Chemokinen auf mRNA-Ebene.

Humane Hepatomzellen (Hep G2) wurden für 12 Stunden mit 0,1 % Triglyceriden behandelt. Anschließend wurde die Gesamt-RNA isoliert, cDNA synthetisiert und die Mediatoren-mRNA-Expression mittels LightCycler-PCR im Verhältnis zur β -Aktin-Expression quantifiziert. Die Werte sind Mittelwerte $\pm$ SEM aus einem Versuch mit Doppelbestimmung. Dargestellt sind jeweils die Werte der basalen Mediatoren-Expression in unbehandelte Hep G2-Zellen (Kontrolle) und in mit 0,1 % Triglyceriden behandelten Hep G2-Zellen.

3.3.2 Einfluss einer freien Fettsäureexposition *in vitro* auf die basale Expression der proinflammatorischen Mediatoren

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob die Applikation von freien Fettsäuren einen Einfluss auf die Genexpression von proinflammatorischen Mediatoren in humanen Hepatomzellen nimmt. Hierzu wurden die in Monokultur kultivierten Hep G2-Zellen für 12 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen der Fettsäuren Linolsäure und Palmitinsäure inkubiert. Die humanen Hepatomzellen wurden jeweils mit 0,75 mmol/L, 0,375 mmol/L und 0,1875 mmol/L Linolsäure bzw. Palmitinsäure stimuliert. Die Kontrollgruppe wurde analog zu den vorangehenden Versuchen mit einer Isopropanol-Albumin-Lösung behandelt. Nach 12 Stunden erfolgten dann die Auswertungen auf mRNA-Ebene.

Auf mRNA-Ebene ließ sich feststellen, dass insbesondere Linolsäure in einer Konzentration von 0,75 mmol/L eine deutliche Hochregulierung der Genexpression der proinflammatorischen Mediatoren CXCL1, CXCL2, CXCL8 und des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 im Vergleich zur Kontrolle aufweist.

Palmitinsäure weist in einer Konzentration von 0,75 mmol/L eine ähnliche, aber nicht ganz so ausgeprägte Tendenz auf. Sowohl bei der Behandlung mit der Fettsäure Linolsäure wie auch bei der Behandlung mit der Fettsäure Palmitinsäure kann man in den niedrigeren Konzentrationen kaum noch diesen positiven Effekt nachweisen (Abb. 15).

Abb. 15 : Genexpression von proinflammatorischen Mediatoren auf mRNA-Ebene.

Humane Hepatomzellen (Hep G2) wurden jeweils für 12 Stunden mit 0,75 mmol/L, 0,375 mmol/L sowie 0,1875 mmol/L Linolsäure bzw. Palmitinsäure stimuliert. Anschließend wurde die Gesamt-RNA isoliert, cDNA synthetisiert und die Mediatoren-mRNA-Expression mittels LightCycler-PCR im Verhältnis zur β -Aktin-Expression quantifiziert. Die Werte sind Mittelwerte $\pm$ SEM aus einem Versuch mit Doppelbestimmung. Dargestellt sind jeweils die Werte der basalen Mediatoren-Expression in mit Isopropanol-Albumin-Lösung behandelten Hep G2-Zellen (Kontrolle), in mit 0,75 mmol/L, mit 0,375 mmol/L sowie mit 0,1875 mmol/L Linolsäure bzw. Palmitinsäure behandelten Hep G2-Zellen.

4. Diskussion

In dieser Arbeit sollte geklärt werden, welche Rolle die Fettexposition in einer möglichen Induktion einer Entzündungsreaktion einnimmt. Hierzu wurde gesondert überprüft, welchen Effekt die Applikation von Triglyceriden und freien Fettsäuren auf die Genexpression von proinflammatorischen Mediatoren in Hepatozyten im Vergleich zu der Genexpression in Kupffer-Zellen ausübt.

Sowohl Hepatozyten, die Parenchymzellen der Leber, sowie Kupffer-Zellen, die leberspezifischen Zellen des Phagozytensystems, wurden jeweils mit Lipofundin MCT 20 %, entspricht 0,1 % Triglyceride, für 24 Stunden behandelt. In der Lichtmikroskopie stellten sich die Hepatozyten als vitale, adhärente, polygonale Zellen mit intrazellulären Fettvakuolen dar. Mittels der Nile-Red-Färbung sowie in der FACS-Analyse konnte ebenfalls eine vorliegende intrazelluläre Fettakkumulation bestätigt werden. Dies entspricht den Ausführungen von BRADBURY und BERK (2004), die die Aufnahme von Fetten in Hepatozyten mittels spezifischer Transporter und passiver Diffusion postulieren. Im Vergleich hierzu waren in der Lichtmikroskopie ebenso vitale und adhärente Kupffer-Zellen zu sehen, die jedoch keine deutlich sichtbaren Fetteinlagerungen aufwiesen. Wie auch schon die Arbeiten unter BUDICK-HARMELIN et al. (2008) gezeigt haben, waren in den Kupffer-Zellen keine prominenten Fettakkumulationen mittels Nile-Red-Färbung und FACS-Analyse nachzuweisen. Andere Studien zeigten im Gegensatz zu diesen Daten, dass Kupffer-Zellen unter Triglyceridexposition im Rahmen ihrer Phagozytenfunktion signifikant intrazellulär fettakkumulierten (ROTH et al. 1996). Diese Diskrepanz ist am ehesten damit zu erklären, dass in den erwähnten Studien mit vorwiegend langkettigen Triglyceriden (LCT) gearbeitet wurden, für die im Gegensatz zu den mittelkettigen Triglyceriden (MCT) eine Fettakkumulation in Kupffer-Zellen nachgewiesen werden konnte (ROTH et al. 1998).

Um zu verifizieren, ob die Applikation von Triglyceriden einen zellschädigenden Effekt ausübt, wurden die von Hepatozyten ins Medium freigesetzten Leberenzyme (GOT, GPT und GLDH) gemessen. Hier wurde ausschließlich ein geringer Enzymanstieg im zeitlichen Verlauf detektiert, welcher mit einem regulären Zelluntergang unter *in-vitro*-Bedingungen vereinbar ist. Ebenso konnte keine Induktion von Apoptose durch Fettexposition mittels der immunzytologischen

Annexin-Färbung in Hepatozyten wie auch in Kupffer-Zellen nachgewiesen werden. Hiermit war in beiden Zellpopulationen kein Anhalt für Lipotoxizität zu finden.

Die Daten dieser Untersuchungen zeigen, dass unter der Applikation von 0,1 % Triglyceriden sowohl in den Hepatozyten wie auch in den Kupffer-Zellen keine Induktion von proinflammatorischen Mediatoren zu verzeichnen war.

Neben proinflammatorischen Mediatoren, reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), spielt insbesondere aber auch die Freisetzung von Stickstoffmonoxiden (NO) eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Leberschädigung. Unter Entzündungsbedingungen setzen verschiedene Zelltypen NO frei, wobei in erster Linie das erhöhte Aufkommen dieser Stickoxide auf eine Induktion der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) zurückzuführen ist (LASKIN et al. 2001). Untersuchungen haben gezeigt, dass im Rahmen von oxidativem Stress die Expression der NO-Synthase über den Transkriptionsfaktor NF- κ B sowie AP-1 (*Activator Protein-1*) reguliert wird. Die Aktivität dieser Transkriptionsfaktoren wird wiederum in der Anwesenheit von ROS modifiziert (KUN 2003). Wie eingangs bereits erwähnt, wird NF- κ B durch das Protein I κ B inhibiert. Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass unter der Applikation von 0,1 % Triglyceriden keine signifikante Induktion von iNOS sowohl in den Hepatozyten wie auch in den Kupffer-Zellen zu finden sind. Vielmehr besteht eher die Tendenz zu einer verminderten Expression unter Fettexposition. Analog hierzu findet man keine Degradation von I κ B, was dafür sprechen könnte, dass die iNOS-Expression über die Hemmung von NF- κ B blockiert ist. Diese Daten bestätigen die Arbeitshypothese von ILAN et al. (2005), dass der durch Triglyceride vermittelte oxidative Stress zu einer Hemmung der Stickoxidproduktion führt. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass Hepatozyten unter der Applikation von 0,1 % Triglyceriden eine signifikant verminderte Expression von iNOS bei gleichzeitig reduziertem NF- κ B-Vorkommen aufweisen.

Unter Entzündungsbedingungen verhalten sich die beiden betrachteten Zellpopulationen jedoch grundsätzlich unterschiedlich. Hepatozyten wurden zur Induktion eines Entzündungsreizes mit dem konditionierten Medium von LPS-vorbehandelten Kupffer-Zellen in Kombination mit 0,1 % Triglyceriden für 2 und 6 Stunden behandelt. Die Daten zeigen keinen Anhalt für eine gesteigerte Expression von proinflammatorischen Mediatoren. Vielmehr schwächt die gleichzeitige Fettexposition während einer induzierten Entzündung die eigentliche Entzündungsreaktion tendenziell ab. So findet man insbesondere nach einer

Behandlungszeit von 6 Stunden eine deutliche Expressionsabnahme von proinflammatorischen Mediatoren. Dies entspricht den Ausführungen von READ et al. (1993), der bereits einen protektiven Effekt von Serum Lipoproteinen und triglyceridhaltigen Lipidemulsionen gegenüber bakteriellen Lipopolysacchariden beobachtete. Die Daten zeigen insbesondere auch eine deutliche Verringerung von $\text{TNF-}\alpha$ nach 6 Stunden, die laut READ et al. den protektiven Effekt der Lipidemulsionen im Rahmen von LPS-induzierten Entzündungsreaktionen ausmacht.

Orientiert man sich jedoch an der „*Two-Hit-Hypothese*“ von Day und James, so wurde in einem weiteren Schritt untersucht, welchen Effekt eine induzierte Entzündung auf Hepatozyten, die bereits im Vorfeld Fett in Form von Triglyceriden intrazellulär akkumulierten, ausüben. Den vorbeschriebenen protektiven Effekt bei der simultanen Gabe von Triglyceriden und Substanzen, die eine Entzündung induzieren, war unter diesen Konditionen nicht mehr zu finden. Vielmehr scheinen die Hepatozyten empfindlicher auf Entzündungsreize zu reagieren, indem sie zum Teil mit einer gesteigerten Expression von proinflammatorischen Mediatoren antworten. So zeigen die Daten eine signifikante Steigerung der Expression von: CINC-1, MCP-1 oder IL-6. Dies lässt vermuten, dass entsprechend der „*Two-Hit-Hypothese*“ eine Fettleber empfänglicher für Entzündungsreize und die daraus resultierenden Entzündungsreaktionen ist.

Diese Hypothese wird durch die klinischen Studie von JONSSON et al. (2008) unterstützt. Die Daten dieser Studie postulieren, dass Fettleibigkeit und Steatosis mit einer erhöhten Expression von Mediatoren wie dem Akute-Phase-Protein CRP sowie den Zytokinen IL-6 und $\text{TNF-}\alpha$ einhergehen. Dies lässt mutmaßen, dass die vermehrte Freisetzung von insbesondere proinflammatorischen Zytokinen bei Adipösen eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung einer Steatohepatitis einnimmt (DAY 2006).

Im Gegensatz hierzu zeigen Kupffer-Zellen, die für 2 und 6 Stunden mit LPS in Kombination mit 0,1 % Triglyceriden behandelt worden sind, von vornherein eine gesteigerte Expression von diversen proinflammatorischen Mediatoren. Insbesondere nach 6 Stunden findet man einen verstärkenden Effekt der reinen Entzündungsreaktion unter LPS durch die Kombination mit Triglyceriden vor allem für proinflammatorische Mediatoren wie: IL-1 β , MIP-2, IL-6 und dem Enzym iNOS. Auch die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und PECAM-1 werden nicht ganz so sensibel, aber entsprechend den Entzündungsbedingungen hoch- bzw. runterreguliert.

Diese Daten gehen grundsätzlich mit den Beobachtungen von BUDICK-HARMELIN et al. (2008) einher, dass Triglyceride die Entzündungsreaktion in Kupffer-Zellen potenzieren. Diese Beobachtung lässt ebenfalls die Vermutung zu, dass in der Fettleber unter der Mitwirkung von Lipiden es zu einer Verstärkung der Entzündungsreaktion kommt, die mit einer gesteigerten Aktivierung der Kupffer-Zellen einhergeht.

Im nächsten Schritt wurde überprüft, welchen Effekt die Applikation von freien Fettsäuren auf die Genexpression von proinflammatorischen Mediatoren in Hepatozyten im Vergleich zu der Genexpression in Kupffer-Zellen aufweist. Hierzu wurde in einem Vorversuch Hepatozyten mit den Fettsäuren: Linolsäure, Palmitinsäure, Ölsäure und Stearinsäure behandelt. Aufgrund der gewonnenen Daten, wurden die folgenden Versuche auf die Verwendung der Omega-6-Fettsäure Linolsäure und der gesättigten Fettsäure Palmitinsäure begrenzt, da hier die interessanteren Ergebnisse zu erwarten waren. So wurden Hepatozyten für 24 Stunden sowie Kupffer-Zellen für 12 Stunden jeweils mit einer absteigenden Konzentration an freien Fettsäuren behandelt.

In der Lichtmikroskopie stellten sich die Hepatozyten, die mit einer Konzentration von 0,375 mmol/L und 0,75 mmol/L Linolsäure behandelt wurden als vitale, adhärente, polygonale Zellen mit kleinen intrazellulären Lipidtröpfchen dar. Dem gegenüber findet man bei den Hepatozyten, die mit einer Konzentration von 1,5 mmol/L und 3 mmol/L Linolsäure inkubiert wurden, wenig adhärente Zellen, wobei der Anteil an zusammengefallenen, akkumulierten Zellhaufen, bei denen keine eindeutige Zellstruktur mehr detektierbar war, deutlich überwiegt. Die Beobachtungen der intrazellulären Fettakkumulation werden durch BRADBURY (2006) bestätigt, der davon ausgeht, dass ein Teil der aufgenommenen freien Fettsäuren in den Hepatozyten zu Triglyceriden umgebaut werden.

Im Vergleich hierzu fand man in der Lichtmikroskopie der Kupffer-Zellen, die mit einer Konzentration von 0,375 mmol/L und 0,75 mmol/L Linolsäure behandelt wurden, große Zellen mit Spreitung und Fältelung der Zellmembran, als Ausdruck der Zellaktivierung, vor. ROTH et al. (1996) berichteten bereits von morphologischen Zeichen der Kupffer-Zell-Aktivierung nach intravenöser Lipidgabe. Vereinzelt wurden jedoch auch zerstörte Zellen gefunden. Bei den Kupffer-Zellen, die mit einer höheren Konzentration von 1,5 mmol/L und 3 mmol/L Linolsäure inkubiert wurden, sind ebenfalls die Merkmale der Zellaktivierung zu erkennen. Eine deutliche Aufnahme

der freien Fettsäuren konnte mittels der Nile-Red-Färbung nicht nachgewiesen werden, da bekannterweise die Umbauprozesse zu Triglyceriden nicht in dieser Zellpopulation stattfindet.

Um zu verifizieren, ob die Applikation von Linolsäure einen zellschädigenden Effekt ausübt, wurden auch hier die von Hepatozyten ins Medium freigesetzten Leberenzyme gemessen. Bei Hepatozyten die mit einer Konzentration von 0,375 mmol/L bzw. 0,75 mmol/L Linolsäure behandelt wurden, wurde ausschließlich ein geringer Enzymanstieg im zeitlichen Verlauf detektiert, welcher mit einem regulären Zelluntergang unter *in-vitro*-Bedingungen vereinbar ist. Ebenso konnte keine Induktion von Apoptose durch eine geringe Konzentration an Linolsäure mittels der immunzytologischen Annexin-Färbung nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu findet man bei Hepatozyten, die mit einer höheren Konzentration von 1,5 mmol/L und 3 mmol/L Linolsäure stimuliert wurden, einen signifikanten Anstieg der Leberenzyme, was für eine vorliegende Zellschädigung spricht. Ebenso findet sich hier ein Nachweis für Zellapoptose in der Annexin-Färbung im Vergleich zur Kontrolle. Diese Ergebnisse bekräftigen die Vermutung, dass Linolsäure in einer hohen Konzentration einen zelltoxischen Effekt ausübt. Ähnlich verhält es sich mit den behandelten Kupffer-Zellen. So zeigen Auswertungen des *Housekeeping-Gens* β -Aktin sowohl auf mRNA- wie auch auf Proteinebene, dass Kupffer-Zellen die mit einer niedrigen Konzentration an Linolsäure behandelt worden sind, so gut wie keine Beeinträchtigung der Syntheseleistung aufweisen. Betrachtet man hingegen Kupffer-Zellen, die mit 1,5 mmol/L bzw. 3 mmol/L behandelt worden sind, so findet man gar keine bzw. eine stark verminderte Syntheseleistung dieser Zellen. Der Verlust der Syntheseleistung der Zellen in Kombination mit dem morphologischen Erscheinungsbild spricht für einen zytotoxischen Effekt der Fettsäure. Diverse Studien berichten von einem toxischen Effekt der Fettsäuren in verschiedenen Zelltypen, als einen konzentrations- und zeitabhängigen Effekt ihrer Metabolite (OTTON und CURI 2005, CURY-BOAVENTURA et al. 2006).

Aufgrund des beschriebenen toxischen Effektes von Linolsäure in hohen Konzentrationen, lag der Fokus für die folgenden Auswertungen auf den Stimulationsreihen mit einer niedrigeren Linolsäurekonzentration. Die Daten dieser Untersuchungen zeigen, dass unter der Applikation von 0,375 mmol/L und 0,75 mmol/L Linolsäure in den Hepatozyten keine Induktion von proinflammatorischen Mediatoren zu finden ist. Vielmehr zeigen die Daten die

Tendenz zu einer verminderten Expression von proinflammatorischen Mediatoren unter der Applikation von Linolsäure. Entsprechend zu diesen Daten wurde auch eine verstärkte Expression von I κ B auf Proteinebene nachgewiesen. Die fehlende Degradation von I κ B spricht dafür, dass wie bereits im Vorfeld beschrieben, die Induktion der Genexpression über den Transkriptionsfaktor NF- κ B blockiert ist. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass Hepatozyten unter der Applikation von 0,375 mmol/L bzw. 0,75 mmol/L Linolsäure eine signifikant verminderte Expression von iNOS bei gleichzeitig reduziertem NF- κ B-Vorkommen aufweisen. An dieser Stelle ist nicht ersichtlich, ob durch die freien Fettsäuren *per se* oder durch die in Hepatozyten generierten Triglyceride der oxidative Stress vermittelt wird, der zu einer Hemmung der Stickoxidproduktion führt.

Im Vergleich zu den Hepatozyten zeigen Kupffer-Zellen, die mit einer niedrigen Konzentration an Linolsäure behandelt wurden, nach 12 Stunden eine zum Teil signifikant gesteigerte Expression von proinflammatorischen Mediatoren. So findet man insbesondere bei der Stimulation mit 0,375 mmol/L Linolsäure eine signifikante Hochregulierung der Gene: CINC-2, MIP-1 α , MCP-1 und IL-6. Bei einer Stimulationsdosis von 0,75 mmol/L Linolsäure reagieren bereits MCP-1, IL-6 und ICAM-1 noch sensibler mit einer gesteigerten Expression. Mehrere Studien haben bereits die Modulation der Kupffer-Zell-Funktionen durch freie Fettsäuren beschrieben (YAQOOB 1998, HAYASHI et al. 1998). Man hat die Erkenntnis gewonnen, dass die Omega-6-Fettsäuren für gewöhnlich eine Entzündungsreaktion stimulieren, wohingegen Omega-3-Fettsäuren eher einen antiinflammatorischen Effekt aufweisen.

Des Weiteren zeigen die Daten, dass Kupffer-Zellen, die mit einer Konzentration von 0,75 mmol/L Linolsäure behandelt wurden, eine signifikant verringerte iNOS-Expression und Kupffer-Zellen, die mit einer Konzentration von 0,375 mmol/L behandelt wurden, eine signifikante Steigerung der iNOS-Expression, sowohl auf mRNA- wie auch auf Proteinebene aufwiesen. Wie bereits beschrieben, erfolgt die Regulierung der iNOS-Expression über den Transkriptionsfaktor NF- κ B, so dass wir entsprechend zu den gezeigten Daten auch bei einer Stimulationsdosis von 0,375 mmol/L eine deutliche Degradation von I κ B auf Proteinebene nachweisen konnten. Diese Daten bestätigen zum einen die Ergebnisse von DE LIMA et al. (2006), die besagen, dass freie Fettsäuren in einer niedrigen Konzentration die Stickoxidproduktion stimulieren und in einer hohen Konzentration, aufgrund von

Verlust der Zellintegrität, einen inhibitorischen Effekt ausüben. Zum anderen können die Daten darauf hinweisen, dass die Regulierung weiterer proinflammatorischer Mediatoren, zumindest zum Teil, über den NF- κ B-Weg erfolgt (BLACKWELL und CHRISTMAN 1997).

Untersucht man Kupffer-Zellen, die für 12 Stunden mit LPS in Kombination mit freien Fettsäuren behandelt worden sind, so findet man grundsätzlich eine gesteigerte Expression von diversen proinflammatorischen Mediatoren. Insbesondere unter der Applikation von 0,375 mmol/L Linolsäure findet man einen verstärkten Effekt der reinen LPS-induzierten Entzündungsreaktion. So zeigen die Daten vor allem für die proinflammatorischen Mediatoren: CINC-1, CINC-2, MCP-1, MIP-1 α , MIP-2, IL-6, TNF- α und iNOS eine gesteigerte Expression auf mRNA-Ebene. Analog zu den Daten der Triglyceridexposition in Kombination mit LPS zeigt sich auch unter Fettsäureapplikation eine weniger ausgeprägte Regulation der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und PECAM-1. Entsprechend den Entzündungsbedingungen werden diese zwar tendenziell hoch- bzw. runterreguliert, jedoch kann man zusammenfassend feststellen, dass die Adhäsionsmoleküle nicht so sensitiv auf einen Entzündungsreiz reagieren wie im Vergleich zu anderen Mediatoren (Abb. 16).

Wie eingangs bereits erwähnt, wurden neben der Omega-6-Fettsäure Linolsäure die Versuche auch mit der gesättigten Fettsäure Palmitinsäure durchgeführt. Die Auswertungen zeigen jedoch, dass bei mit Palmitinsäure behandelten Hepatozyten kein signifikanter Unterschied in der Genexpression von proinflammatorischen Mediatoren im Vergleich zur Kontrollgruppe zu finden ist. Bei der Stimulation von Kupffer-Zellen hingegen ist zum Teil eine geringe Steigerung der Genexpression nachzuweisen, dieser Effekt ist jedoch viel geringer ausgeprägt als bei dem Einsatz von Linolsäure. Somit scheint die Fettsäure Linolsäure eine Entzündungsreaktion viel potenter zu stimulieren bzw. zu unterhalten, als die Fettsäure Palmitinsäure.

Abschließend erfolgten noch ergänzende Untersuchungen an humanen Hepatomzellen der Zelllinie Hep G2. Diese wurden analog zu den vorausgegangenen Versuchen mit Triglyceriden und freien Fettsäuren behandelt. Zum einen sollte hiermit überprüft werden, ob die von JOSHI-BARVE et al. (2007) beschriebene Methode der Zellstimulierung mit freien Fettsäuren korrekt durchgeführt worden ist, und zum anderen, ob die von Rattenzellen gewonnenen Daten auch auf den Menschen übertragbar sind. Die Daten bestätigen im Ansatz, die von JOSHI-BARVE et al. (2007) beschriebene Induktion von IL-8 durch freie Fettsäuren. Die

Auswertungen zeigen weiterhin, dass die freien Fettsäuren in einer niedrigen Konzentration kaum Einfluss auf die Genexpression von proinflammatorischen Mediatoren nehmen. Somit kann man grundsätzlich sagen, dass die erhobenen Daten mit den Daten von Rattenzellen in Einklang zu bringen sind, dass jedoch scheinbar die Rattenleberzellen bereits auf niedrigere Fettkonzentrationen reagieren. Weiterhin ist zu beachten, dass es sich bei Hep G2 Zellen um maligne transformierte Zellen handelt, welche dementsprechend nur begrenzt mit differenzierten Hepatozyten vergleichbar sind.

Abb. 16 : Pathomechanismus der fettinduzierenden Leberentzündung.

Ein übermäßiges Angebot an Lipiden im Organismus führt zu einer Fettakkumulation in der Leber. Freie Fettsäuren (FFA's) können in hohen Konzentrationen die Hepatozyten schädigen und eine gesteigerte Synthese von Chemokinen induzieren und somit eine Aktivierung der leberansässigen Kupfer-Zellen sowie eine Chemotaxis von extrahepatischen Entzündungszellen bewirken. Weiterhin kommt es insbesondere zur verstärkten Expression des Zytokins TNF-α. Diese Expressionssteigerung wird unter anderem über eine direkte Aktivierung des NF-κB-Wegs über lysosomale Cathepsin B-abhängige Mechanismen reguliert (FELDSTEIN et al. 2004). Ein erhöhtes Aufkommen von TNF-α

kann zum einen direkt Apoptose in den Hepatozyten unter Einbeziehung verschiedener spezifischer „Todesrezeptoren“ induzieren, falls die Hepatozyten durch andere Trigger dafür sensibilisiert worden sind (GÜRLEYEN et al. 2009). Zum anderen erfolgt über diesen Mediator eine Aktivierung der leberresidenten Makrophagen sowie eine Rekrutierung von extrahepatischen Entzündungszellen, die den Entzündungsprozess vorantreiben. Insbesondere nach gesteigerter zellulärer Fettaufnahme läuft in den Hepatozyten weiterhin verstärkt die Fettsäuren-Oxidation ab, welche zur Bildung und Anreicherung von reaktiven Metaboliten führt. Im Rahmen der Ausbildung von oxidativem Stress kommt es wiederum zur Aktivierung des NF- κ B-Wegs, welcher in einer vermehrten Expression von Zytokinen und Chemokinen mündet, sowie eine direkten Schädigung der zellulären Mitochondrien bewirkt (LALOR et al. 2007, CHOI und DIEHL 2008).

Eine direkte Aktivierung der Kupffer-Zellen über Endotoxine oder aber auch über Lipide und deren Metabolite führt ebenfalls zu einer verstärkten Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen, die eine direkte Schädigung des Lebergewebes bzw. eine Rekrutierung von extrahepatischen Entzündungszellen bewirken. Als Ausdruck der Leberentzündung und der damit einhergehenden Leberschädigung lassen sich freigesetzte spezifische Leberenzyme sowie apoptotische Zellen nachweisen.

Im Rahmen dieser Studie soll verdeutlicht werden, welche entscheidende Rolle eine übermäßige Fettexposition auf dem Weg zur Entwicklung einer NASH einnimmt. Wie bereits frühere Studien gezeigt haben, kommt es durch ein Überangebot an Lipiden im ersten Schritt zu einer Fettakkumulation in den Hepatozyten, was sich letztendlich in einer Leberzellverfettung bzw. später in einer Fettleber niederschlägt. Die Daten dieser Studie zeigen jedoch auch, dass Lipide in Form von Triglyceriden und freien Fettsäuren ein eigenständiger Faktor für die Induktion bzw. Unterhaltung einer Entzündungsreaktion sind. Hierbei nehmen die beiden untersuchten Zellpopulationen zum Teil unterschiedliche Funktionen wahr. Die gewonnenen Daten bestätigen, dass die aktivierten Kupffer-Zellen die Hauptakteure des Entzündungsprozesses darstellen. Die Hepatozytenpopulation versuchen hingegen bis zu einem gewissen Grad die Entzündungsinduktion abzumildern. Sind die Hepatozyten jedoch scheinbar ihren Kompensationsmechanismen im Rahmen von übermäßiger Fetteinlagerung beraubt, so sind auch diese Zellen für einen Entzündungsreiz empfänglicher.

Anhand dieser Ergebnisse kann man postulieren, dass Lipidstoffwechselstörungen, die mit einem überhöhten Angebot an Lipiden im Blut einhergehen, ein entscheidender Risikofaktor für die Pathogenese einer NASH darstellen. Auf der einen Seite erfolgt durch die übermäßige Fettexposition eine Vorschädigung der Leber in Form einer Fettüberladung. Auf der anderen Seite modifizieren Lipide nicht nur scheinbar die Immunzellfunktionen und -antworten, sondern sie weisen auch einen entzündungsinduzierenden Effekt auf.

5. Zusammenfassung

Die Nichtalkoholische Fettlebererkrankung ist eine der häufigsten Lebererkrankungen weltweit. Bisher veröffentlichte Daten aus klinischen sowie tierexperimentellen Studien implizieren, dass die Frühformen dieser Erkrankung, Steatosis sowie Steatohepatitis, auf eine exzessive Exposition von freien Fettsäuren und inflammatorischen Zytokinen zurückzuführen sind (CHOI und DIEHL 2008). Der exakte Pathomechanismus, der die Progression einer NAFLD zu dem schweren Krankheitsbild einer NASH beschreibt, ist bis auf weiteres noch nicht ausreichend verstanden. Man geht jedoch davon aus, dass unterschiedliche Zellpopulationen in unterschiedlicher Weise in diesen Krankheitsprozess involviert sind.

In dieser Arbeit sollte geklärt werden, inwieweit eine Fettexposition eine Rolle in einer möglichen Induktion bzw. Unterhaltung einer Entzündungsreaktion einnimmt. Hierzu wurde gesondert untersucht, wie sich die Genexpression von proinflammatorischen Mediatoren in Hepatozyten- und Kupffer-Zell-Populationen unter der Applikation von Triglyceriden und freien Fettsäuren verändert.

In Vorarbeiten zu dieser Dissertation wurde unter BUDICK-HARMELIN et al. (2008) die Entzündungsreaktionen von Kupffer-Zellen unter Endotoxin- und Fettexposition untersucht. Die Daten dieser Arbeit haben gezeigt, dass eine simultane Exposition von Triglyceriden und Endotoxinen eine signifikant verstärkte Induktion von den Zytokinen IL-1 β , IL-6 und TNF- α , dem Peptidhormon G-CSF sowie dem Enzym iNOS in den Kupffer-Zellen im Vergleich zur alleinigen Endotoxinbehandlung aufweist. Diese Daten lassen darauf schließen, dass Triglyceride die Entzündungsreaktion in Kupffer-Zellen potenzieren.

Die Ergebnisse dieser Dissertation haben gezeigt, dass die alleinige Applikation von Triglyceriden keine Änderung in der Genexpression von proinflammatorischen Mediatoren sowohl in Hepatozyten wie auch in Kupffer-Zellen der Ratte bewirkt. Auf der anderen Seite können die gewonnenen Daten daraufhin weisen, dass die Fettexposition auch einen leberzellprotektiven Effekt in Hepatozyten aufweisen kann, indem diese über eine verminderte Expression von iNOS eine Hemmung der Stickoxidproduktion vermittelt.

Im Gegensatz dazu verhalten sich die beiden Zellpopulationen unter *in vitro* simulierten Entzündungsbedingungen jedoch unterschiedlich. Hepatozyten schwächen scheinbar bei der simultanen Gabe von Triglyceriden und LPS, im

Gegensatz zu den Kupffer-Zellen, die die Entzündungsreaktion potenzieren, die eigentliche Entzündungsreaktion tendenziell ab. Dies äußert sich in einer Verminderung der Genexpression von proinflammatorischen Mediatoren. Akkumulieren jedoch Hepatozyten im Vorfeld bereits intrazellulär Triglyceride, so reagieren diese auf einen gesetzten Entzündungsreiz empfindlicher. Daten dieser Studie konnten eine signifikant gesteigerte Expression von CINC-1, MCP-1 und IL-6 unter diesen Konditionen nachweisen.

Im Gegensatz zur Applikation von Triglyceriden konnte beim Einsatz der freien Fettsäure Linolsäure ein zytotoxischer Effekt nachgewiesen werden. Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass Linolsäure in einer hohen Konzentration insbesondere Hepatozyten wie auch in einem etwas geringeren Umfang Kupffer-Zellen abtöten. Dieser zelltoxische Effekt wurde durch den Nachweis einer gesteigerten Freisetzung von Leberenzymen ins Medium, typische morphologische Veränderungen der Zellen, Nachweis von Apoptose sowie durch die Bestätigung des Verlustes der Syntheseleistung der Zellen verifiziert. In einer niedrigen Stimulationskonzentration hingegen findet man eine Fetteinlagerung in den Hepatozyten sowie eine Zellaktivierung der Kupffer-Zellen. Wie bereits unter Triglyceridexposition detektiert, weisen Hepatozyten auch unter der Applikation von Linolsäure in einer niedrigen Konzentration eher die Tendenz zu einer verminderten Expression von proinflammatorischen Mediatoren auf, so dass man vielmehr von einem protektiven Effekt ausgehen kann. Über die Blockierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B wird ebenfalls eine Verminderung des Enzyms iNOS verursacht, was wiederum mit einer Reduzierung der Stickoxidproduktion einhergeht.

Im Gegensatz zu den Hepatozyten zeigen Kupffer-Zellen neben einer Zellaktivierung eine gesteigerte Expression von proinflammatorischen Mediatoren unter Linolsäureapplikation. Insbesondere die Gene: CINC-2, MIP-1 α , MCP-1, IL-6, ICAM-1 und iNOS reagieren sensibel mit einer Expressionssteigerung. Analog hierzu findet man eine Degradierung von I κ B, welche einer Aktivierung von NF- κ B vorausgeht. Die Omega-6-Fettsäure Linolsäure stimuliert somit vermutlich über die Aktivierung von Kupffer-Zellen die Entzündungsreaktion.

Wie auch unter der Applikation von Triglyceriden zeigen die Daten, dass Kupffer-Zellen unter einer simultanen Gabe von Linolsäure in einer geringen Konzentration und von Endotoxinen eine signifikant verstärkte Induktion der proinflammatorischen Mediatoren (CINC-1, CINC-2, MCP-1, MIP-1 α , MIP-2, IL-6, TNF- α und iNOS) im

Vergleich zur alleinigen Endotoxinbehandlung aufweisen. Die Daten sprechen dafür, dass Linolsäure die Entzündungsreaktion in Kupffer-Zellen steigert.

Die Daten dieser Arbeit lassen vermuten, dass die beiden untersuchten Zellpopulationen unterschiedliche Rollen im Rahmen des Pathomechanismus der NAFLD einnehmen. So zeigen die Parenchymzellen der Leber, die Hepatozyten, unter der Applikation von Triglyceriden und freien Fettsäuren kein Entzündungspotenzial. Vitale Hepatozyten scheinen unter induzierten Entzündungsbedingungen die Entzündungsreaktion abzuschwächen. Liegt jedoch bereits eine Vorschädigung der Zellen, in Form einer vorausgehenden intrazellulären Fettakkumulation vor, so scheinen die Zellen ihre Kompensationsmechanismen verloren zu haben und entsprechend sensibler auf einen Entzündungsreiz zu reagieren. Im Gegensatz zu den Hepatozyten weisen die leberspezifischen Makrophagen, die Kupffer-Zellen, als Hauptakteure eines Entzündungsprozesses unter der Fettexposition eine gesteigerte Zellaktivierung auf. Daher lässt sich aufgrund der Daten dieser Arbeit feststellen, dass unter induzierten Entzündungsbedingungen die Entzündungsreaktion durch die simultane Gabe von Triglyceriden oder auch freien Fettsäuren verstärkt wird.

6. Abkürzungsverzeichnis:

AFLD	Alkoholische Fettlebererkrankung, engl.: <i>Alcoholic Fatty Liver Disease</i>
AK	Antikörper
AP-1	engl.: <i>Activator Protein-1</i>
Aqua dest.	lat.: <i>aqua destillata</i>
BSA	engl.: <i>Bovine Serum Albumin</i>
CINC-1	engl.: <i>Cytokine Induced Neutrophil Chemoattractant-1</i>
CINC-2	engl.: <i>Cytokine Induced Neutrophil Chemoattractant-2</i>
CCL2	engl.: <i>Chemokine (C-C motif) Ligand 2</i> , bzw. alte Nomenklatur engl.: <i>monocyte chemotactic protein-1</i> (MCP-1)
CCL3	engl.: <i>Chemokine (C-C motif) Ligand 3.</i> , bzw. alte Nomenklatur engl.: <i>Macrophage Inflammatory Protein-1α</i> (MIP-1 α)
CXCL1	engl.: <i>Chemokine (C-X-C motif) Ligand 1</i>
CXCL2	engl.: <i>Chemokine (C-X-C motif) Ligand 2</i> , bzw. alte Nomenklatur engl.: <i>Macrophage Inflammatory Protein 2-alpha</i> (MIP2-alpha), bzw. engl.: <i>Growth-Regulated Protein Beta</i> (Gro-beta) bzw. engl.: <i>Growth Oncogene-2</i> (Gro-2)
CXCL8	engl.: <i>Chemokine (C-X-C motif) Ligand 8</i> , oder Interleukin-8 (IL-8)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (DNS), engl.: <i>Deoxyribonucleic Acid</i> , DNA
EDTA	Ethylendiamintetraacetat bzw. Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	und andere lat.: <i>et alii</i>
FACS	engl.: <i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FCS	Fetales Kälberserum, engl.: <i>Fetal Calf Serum</i>
FSC	engl.: <i>Forward Scatter</i>
g	Erdbeschleunigung bzw. Gravitation
GBSS	engl.: <i>Gey's Balanced Salt Solution</i>

G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor, engl.: <i>Granulocyte Colony Stimulating Factor</i> , G-CSF
GLDH	Glutamatdehydrogenase
GOT	Glutamatoxalacetattransaminase oder kurz: AST
GPT	Glutamatpyruvattransaminase oder kurz: ALT
HC	Hepatozyten
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperaziny] - ethansulfonsäure
ICAM-1	engl.: <i>Intercellular Adhesion Molecule-1</i>
IFN- γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin
I κ B	Inhibitor- κ B
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6 oder alte Bezeichnung: Interferon- β 2 (IFNB2), B-Zell-stimulierender Faktor, B-Zell-Differenzierungs-Faktor, Leberzell-stimulierender-Faktor
IL-8	Interleukin-8 oder CXCL8 (s. o.)
iNOS	engl.: <i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i>
IP-10	engl.: <i>Interferon Inducible Protein-10</i>
KC	Kupffer-Zellen
kDa	kiloDalton
LCT	langkettige Triglyceride engl.: <i>Long chain triglycerides</i>
LPS	Lipopolysaccharid
MCP-1	engl.: <i>Monocyte Chemoattractant protein-1</i>
MCT	mittelkettige Triglyceride engl.: <i>Medium chain triglycerides</i>
MIG	engl.: <i>Murine Monokine Induced By Gamma Interferon</i>
MIP-1	engl.: <i>Macrophage Inflammatory Protein-1</i>
MIP-2	engl.: <i>Macrophage Inflammatory Protein-2</i>

MyD88	engl.: <i>Myeloid Differentiation Primary Response Gene 88</i>
NAFLD	Nichtalkoholische Fettlebererkrankung, engl.: <i>Non-Alcoholic Fatty Liver Disease</i>
NASH	<i>Non-Alcoholic Steatohepatitis</i>
NCEP/ATP III	engl.: <i>National Cholesterol Education Program, Adult Treatment Panel III</i>
NF-κB	Nuklearfaktor κB
NO	Stickstoffmonoxid, engl.: <i>Nitric oxide or nitrogen monoxide</i>
PBS	engl.: <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, engl.: <i>Polymerase Chain Reaction, PCR</i>
PECAM-1	engl.: <i>Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1</i>
pH	pH-Wert, Maß für die Aktivität von Protonen einer wässrigen Lösung (Säuregrad)
RNA	Ribonukleinsäure (RNS) engl.: <i>Ribonucleic Acid, RNA</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies, engl.: <i>Reactive Oxidative Species</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute, engl.: <i>Rounds Per Minute</i>
RT	Reverse Transkriptase
SDS	engl.: <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SEM	engl.: <i>Standard Error Of The Mean</i>
SSC	engl.: <i>Sidewards Scatter</i>
Syn.	Synonym
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VCAM-1	engl.: <i>Vascular Cell Adhesion Molecule-1</i>

7. Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Zytokine	12
Tab. 2	Chemokine	13
Tab. 3	Adhäsionsmoleküle	13
Tab. 4	Geräte	21
Tab. 5	Arzneilich wirksame Bestandteile von Lipofundin MCT 20 %	27
Tab. 6	Oligonukleotide für PCR	29

8. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1a	Schematische Darstellung des Lebergewebes	2
Abb. 1b	Schematische Darstellung der Leberzellbälkchen und Zellen der Sinuswände	3
Abb. 2	Schema Leberentzündung	11
Abb. 3	Schema Pathogenese der Steatohepatitis	17
Abb. 4a	Strukturformel von Linolsäure	27
Abb. 4b	Strukturformel von Palmitinsäure	28
Abb. 5	Detektion von intrazellulären Fetttropfen in Hepatozyten mittels Nile-Red-Färbung	49
Abb. 6	Genexpression von proinflammatorischen Mediatoren auf mRNA-Ebene	52
Abb. 7	Genexpression von proinflammatorischen Mediatoren auf mRNA-Ebene	55
Abb. 8a	Spezifische immunzytologische Färbung zum Nachweis apoptotischer Zellen	57
Abb. 8b	Leberenzyme im zellfreien Mediumüberstand	59
Abb. 9a	Genexpression von proinflammatorischen Mediatoren auf mRNA-Ebene	61
Abb. 9b	Western-Blot-Analyse	62

Abb. 9c	Übersichtsaufnahme von Hepatozyten in Kultur	64
Abb. 9d	Leberenzyme im zellfreien Mediumüberstand	65
Abb. 10	Genexpression von proinflammatorischen Mediatoren auf mRNA-Ebene	69
Abb. 11a	Western-Blot-Analyse von β-Aktin	70
Abb. 11b	Genexpression von proinflammatorischen Mediatoren auf mRNA-Ebene	72
Abb. 11c	Western-Blot-Analyse	73
Abb. 11d	Übersichtsaufnahme von Kupffer-Zellen in Kultur	75
Abb. 12	Genexpression von proinflammatorischen Mediatoren auf mRNA-Ebene	77
Abb. 13	Genexpression von proinflammatorischen Mediatoren auf mRNA-Ebene	80
Abb. 14	Genexpression von Chemokinen auf mRNA-Ebene	82
Abb. 15	Genexpression von proinflammatorischen Mediatoren auf mRNA-Ebene	84
Abb. 16	Pathomechanismus der fettinduzierenden Leberentzündung	92

9. Literaturverzeichnis:

Aden DP, Fogel A, Plotkin S, Damjanov I, Knowles BB (1979): Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* 282: 615 - 616

Armbrust T, Ramadori G (1996): Functional characterization of two different Kupffer cell populations of normal rat liver. *J Hepatol* 25: 518 - 528

Baeuerle PA, Henkel T (1994): Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 12: 141 - 179

Bellentani S, Saccoccio G, Masutti F, Crocè LS, Brandi G, Sasso F, Cristanini G, Tiribelli C (2000): Prevalence of and risk factors for hepatic steatosis in Northern Italy. *Ann Intern Med* 132: 112 - 117

Bellentani S, Bedogni G, Miglioli L, Tiribelli C (2004): The epidemiology of fatty liver. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 16: 1087 - 1093

Benninghoff A, Drenckhan D: Anatomie, Makroskopische Anatomie, Embryologie und Zellbiologie. (Band 2), 16. Auflage; Urban & Fischer Verlag, München 2004

Berry MN, Edwards AM, Barritt GJ: Isolated hepatocytes, preparation, properties and applications. *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*. 1. Auflage; Elsevier Science Publisher B.V, Amsterdam 1991

Blackwell TS, Christman JW (1997): The role of nuclear factor-kappa B in cytokine gene regulation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 17: 3 - 9

Bradbury MW (2006): Lipid metabolism and liver inflammation. I. Hepatic fatty acid uptake: possible role in steatosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290: 194 - 198

Bradbury MW, Berk PD (2004): Lipid metabolism in hepatic steatosis. *Clin Liver Dis* 8: 639 - 671

Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248 - 254

Budick-Harmelin N, Dudas J, Demuth J, Madar Z, Ramadori G, Tirosh O (2008): Triglycerides potentiate the inflammatory response in rat Kupffer cells. *Antioxid Redox Signal* 10: 2009 - 2022

Burt AD, Le Bail B, Balabaud C, Bioulac-Sage P (1993): Morphologic investigation of sinusoidal cells. *Semin Liver Dis* 13: 21 - 38

Cavaillon JM (1994): Cytokines and macrophages. *Biomed Pharmacother* 48: 445 - 453

Choi SS, Diehl AM (2008): Hepatic triglyceride synthesis and nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Opin Lipidol* 19: 295 - 300

Chomczynski P, Sacchi N (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156 - 159

Cury-Boaventura MF, Gorjão R, de Lima TM, Newsholme P, Curi R (2006): Comparative toxicity of oleic and linoleic acid on human lymphocytes. *Life Sci* 78: 1448 - 1456

Dancygier H: *Klinische Hepatologie. Grundlagen, Diagnostik und Therapie hepatobiliärer Erkrankungen*. 1. Auflage; Springer Verlag, Berlin 2003

Dancygier H (2006): Pathogenese und Therapie der nichtalkoholischen Fettlebererkrankungen. Von der Fettleber zur Zirrhose. *Dtsch Ärztebl* 19: 1301 - 1307

Day CP (2006): From fat to inflammation. *Gastroenterology* 130: 207 - 210

Day CP, James OF (1998): Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 114: 842 - 845

Decker K (1990): Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells). *Eur J Biochem* 192: 245 - 261

de Lima TM, de Sa Lima L, Scavone C, Curi R (2006): Fatty acid control of nitric oxide production by macrophages. *FEBS Lett* 580: 3287 - 3295

Dustin ML, Rothlein R, Bhan AK, Dinarello CA, Springer TA (1986): Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J Immunol* 137: 245 - 254

Feghali CA, Wright TM (1997): Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front Biosci* 2: 12 - 26

Feldstein AE, Werneburg NW, Canbay A, Guicciardi ME, Bronk SF, Rydzewski R, Burgart LJ, Gores GJ (2004): Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF-alpha expression via a lysosomal pathway. *Hepatology* 40: 185 - 194

Greenspan P, Mayer EP, Fowler SD (1985): Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *J Cell Biol* 100: 965 - 973

Grewe M, Gausling R, Gyufko K, Hoffmann R, Decker K (1994): Regulation of the mRNA expression for tumor necrosis factor-alpha in rat liver macrophages. *J Hepatol* 20: 811 - 818

Gürleyen H, Christiansen H, Tello K, Dudas J, Hermann RM, Rave-Fränk M, Hess CF, Ramadori G, Saile B (2009): Irradiation leads to sensitization of hepatocytes to TNF-alpha-mediated apoptosis by upregulation of IkappaB expression. *Radiat Environ Biophys* 48: 85 - 94

Hamaguchi M, Kojima T, Takeda N, Nakagawa T, Taniguchi H, Fujii K, Omatsu T, Nakajima T, Sarui H, Shimazaki M (2005): The metabolic syndrome as a predictor of nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Intern Med* 143: 722 - 728

Hamann A (2008): Adipositas: Eine Volkskrankheit?. *Gynäkol Endokrinol* 1: 14 - 19

Hayashi N, Tashiro T, Yamamori H, Takagi K, Morishima Y, Otsubo Y, Sugiura T, Furukawa K, Nitta H, Nakajima N (1998): Effects of intravenous omega-3 and omega-6 fat emulsion on cytokine production and delayed type hypersensitivity in burned rats receiving total parenteral nutrition. JPEN J Parenter Enteral Nutr 22: 363 - 367

Herold G: Innere Medizin. 1. Auflage; Herold Verlag, Köln 2008

Holzapfel B, Wickert L (2007): Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete. Biol Unserer Zeit 37: 120 - 126

Ilan E, Tirosh O, Madar Z (2005): Triacylglycerol-mediated oxidative stress inhibits nitric oxide production in rat isolated hepatocytes. J Nutr 135: 2090 - 2095

Jonsson JR, Barrie HD, O'Rourke P, Clouston AD, Powell EE (2008): Obesity and steatosis influence serum and hepatic inflammatory markers in chronic hepatitis C. Hepatology 48: 80 - 87

Joshi-Barve S, Barve SS, Amancherla K, Gobejishvili L, Hill D, Cave M, Hote P, McClain CJ (2007): Palmitic acid induces production of proinflammatory cytokine interleukin-8 from hepatocytes. Hepatology 46: 823 - 830

Jungermann K, Katz N (1989): Functional specialization of different hepatocyte populations. Physiol Rev 69: 708 - 764

Jungermann K, Kietzmann T (1996): Zonation of parenchymal and nonparenchymal metabolism in liver. Annu Rev Nutr 16: 179 - 203

Knittel T, Odenthal M, Schuppan D, Schwögler S, Just M, Meyer zum Büschenfelde KH, Ramadori G (1992): Synthesis of undulin by rat liver fat-storing cells: comparison with fibronectin and tenascin. Exp Cell Res 203: 312 - 320

Knook DL, Blansjaar N, Sleyster EC (1977): Isolation and characterization of Kupffer and endothelial cells from the rat liver. Exp Cell Res 109: 317 - 329

Knook DL, Seffelaar AM, De Leeuw AM (1982): Fat-storing cells of the rat liver. Their isolation and purification. *Exp Cell Res* 139: 468 - 471

Kun JF (2003): Regulation of nitrogen monoxide production in human malaria. *Redox Rep* 8: 289 - 291

Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680 - 685

Lalor PF, Faint J, Aarbodem Y, Hubscher SG, Adams DH (2007): The role of cytokines and chemokines in the development of steatohepatitis. *Semin Liver Dis* 27: 173 - 93

Lamers WH, Hilberts A, Furt E, Smith J, Jonges GN, van Noorden CJ, Janzen JW, Charles R, Moorman AF (1989): Hepatic enzymic zonation: a reevaluation of the concept of the liver acinus. *Hepatology* 10: 72 - 76

Laskin JD, Heck DE, Gardner CR, Laskin DL (2001): Prooxidant and antioxidant functions of nitric oxide in liver toxicity. *Antioxid Redox Signal* 3: 261 - 271

Lindl T, Bauer J: Zell- und Gewebekultur. 2. Auflage; Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1989

Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC: Biochemie und Pathobiochemie. 8. Auflage; Springer Verlag, Berlin 2006

Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ (1980): Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc* 55: 434 - 438

Lüllmann-Rauch R: Histologie. Verstehen - Lernen - Nachschlagen. 1. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2003

Maher JJ (1995): Rat hepatocytes and Kupffer cells interact to produce interleukin-8 (CINC) in the setting of ethanol. *Am J Physiol* 269: 518 - 523

Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, Cerrelli F, Lenzi M, Manini R, Natale S, Vanni E, Villanova N, Melchionda N (2003): Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology* 37: 917 - 923

Minato Y, Hasumura Y, Takeuchi J (1983): The role of fat-storing cells in Disse space fibrogenesis in alcoholic liver disease. *Hepatology* 3: 559 - 566

Moebus S, Hanisch JU, Neuhäuser M, Aidselburger P, Wasem J, Jöckel KH (2006): Assessing the prevalence of the Metabolic Syndrome according to NCEP ATP III in Germany: feasibility and quality aspects of a two step approach in 1550 randomly selected primary health care practices. *GMS Ger Med Sci* 2006; 4:Doc07, <http://www.egms.de/en/gms/2006-4/000036.shtml>

Müller WA, Weigl SA, Deng X, Phillips DM (1993): PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J Exp Med* 178: 449 - 460

Muriel P (2000): Regulation of nitric oxide synthesis in the liver. *J Appl Toxicol* 20: 189 - 195

Neubauer K, Krüger M, Quondamatteo F, Knittel T, Saile B, Ramadori G (1999): Transforming growth factor- β 1 stimulates the synthesis of basement membrane proteins laminin, collagen type IV and entactin in rat liver sinusoidal endothelial cells. *J Hepatol* 31: 692 - 702

Neubauer K, Ritzel A, Saile B, Ramadori G (2000): Decrease of platelet-endothelial cell adhesion molecule 1-gene-expression in inflammatory cells and in endothelial cells in the rat liver following CCl₄-administration and in vitro after treatment with TNF α . *Immunol Lett* 74: 153 - 164

Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH (2003): Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology* 37: 1202 - 1219

O'Brien IE, Reutelingsperger CP, Holdaway KM (1997): Annexin-V and TUNEL use in monitoring the progression of apoptosis in plants. *Cytometry* 29: 28 - 33

Otton R, Curi R (2005): Toxicity of a mixture of fatty acids on human blood lymphocytes and leukaemia cell lines. *Toxicol In Vitro* 19: 749 - 755

Palmer M, Schaffner F (1990): Effect of weight reduction on hepatic abnormalities in overweight patients. *Gastroenterology* 99: 1408 - 1413

Patel T, Steer CJ, Gores GJ (1999): Apoptosis and the liver: A mechanism of disease, growth regulation, and carcinogenesis. *Hepatology* 30: 811 - 815

Peters RL, Gay T, Reynolds TB (1975): Post-jejunoileal-bypass hepatic disease. Its similarity to alcoholic hepatic disease. *Am J Clin Pathol* 63: 318 - 331

Quigley EM, Marsh MN, Shaffer JL, Markin RS (1993): Hepatobiliary complications of total parenteral nutrition. *Gastroenterology* 104: 286 - 301

Ramadori G, Saile B (2004): Inflammation, damage repair, immune cells, and liver fibrosis: specific or nonspecific, this is the question. *Gastroenterology* 127: 997 - 1000

Ramadori G, Rieder H, Knittel T, Dienes HP, Meyer zum Büschenfelde KH (1987): Fat storing cells (FSC) of rat liver synthesize and secrete fibronectin: Comparison with hepatocytes. *J Hepatol* 4: 190 - 197

Ramadori G, Moriconi F, Malik I, Dudas J (2008): Physiology and pathophysiology of liver inflammation, damage and repair. *J Physiol Pharmacol* 59: 107 - 117

Rashid M, Roberts E (2000): Nonalcoholic steatohepatitis in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 30: 48 - 53

Read TE, Harris HW, Grunfeld C, Feingold KR, Kane JP, Rapp JH (1993): The protective effect of serum lipoproteins against bacterial lipopolysaccharide. *Eur Heart J* 14: 125 - 129

Rollins BJ (1991): JE/MCP-1: an early-response gene encodes a monocyte-specific cytokine. *Cancer Cells* 3: 517 - 524

Roth B, Ekelund M, Fan BG, Hägerstrand I, Nilsson-Ehle P (1996): Lipid deposition in Kupffer cells after parenteral fat nutrition in rats: a biochemical and ultrastructural study. *Intensive Care Med* 22: 1224 - 1231

Roth B, Ekelund M, Fan BG, Hägerstrand I, Salehi A, Lundquist I, Nilsson-Ehle P (1998): Biochemical and ultra-structural reactions to parenteral nutrition with two different fat emulsions in rats. *Intensive Care Med* 24: 716 - 724

Saile B, Ramadori G (2007): Inflammation, damage repair and liver fibrosis - role of cytokines and different cell types. *Z Gastroenterol* 45: 77 - 86

Seglen PO (1976): Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol* 13: 29 - 83

Shiratori Y, Tananka M, Kawase T, Shiina S, Komatsu Y, Omata M (1993): Quantification of sinusoidal cell function in vivo. *Semin Liver Dis* 13: 39 - 49

Stravitz RT, Sanyal AJ (2003): Drug-induced steatohepatitis. *Clin Liver Dis* 7: 435 - 451

Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Biochemistry* 76: 4350 - 4354

Winwood PJ, Arthur MJ (1993): Kupffer cells: their activation and role in animal models of liver injury and human liver disease. *Semin Liver Dis* 13: 50 - 59

Wisse E, van't Noordende JM, van der Meulen J, Daems WT (1976): The pit cell: description of a new type of cell occurring in rat liver sinusoids and peripheral blood. *Cell Tissue Res* 173: 423 - 435

Yaqoob P (1998): Lipids and the immune response. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 1: 153 - 161

Danksagung

Hiermit möchte ich mich herzlich bei Herrn Professor Dr. med. Dr. h. c. Giuliano Ramadori für die freundliche Überlassung des Themas dieser Dissertation, sowie für seine hervorragende Unterstützung in allen Fragen bedanken.

Mein herzlichster Dank gilt meinem Betreuer Herrn PhD Jozsef Dudas für seine ausgezeichnete Betreuung. Er stand mir jederzeit mit seiner fachlichen Erfahrung zur Seite und förderte mit seinem Einsatz den Fortgang dieser Arbeit von Anfang an. Besonders dankbar bin ich, dass Herr Dudas auch nach seinem beruflichen Wechsel nach Innsbruck mich bis zum Abschluss meiner Arbeit begleitete.

Des Weiteren möchte ich mich bei Frau Sandra Georgi für ihre Hilfeleistung und ihre tatkräftige Mitarbeit bedanken, ohne die diese Arbeit in dieser Form nicht zustande gekommen wäre.

Lebenslauf

Am 31. Dezember 1980 wurde ich, Julia Elisabeth Demuth, als viertes von vier Kindern meiner Eltern Renate Demuth (geb. Manns) und Alois Demuth in Rotenburg an der Fulda geboren. Nach der Einschulung in die Albert-Schweitzer-Grundschule Rotenburg 1987 und anschließendem Besuch der Förderstufe der Jakob-Grimm-Schule in Rotenburg wechselte ich 1993 auf die Gesamtschule mit gymnasialer Oberstufe der Jakob-Grimm-Schule in Rotenburg. Im Sommer 2000 erwarb ich dort die Allgemeine Hochschulreife.

Am 1. August 2000 begann ich meine Ausbildung zur Fachinformatikerin in der Fachrichtung Systemintegration im Zentralamt der Bundesanstalt für Arbeit in Nürnberg. Nach dem erfolgreichen Abschluss meiner Ausbildung arbeitete ich, von Juli 2003 bis April 2004, als Sachbearbeiterin im Bereich Windows-Datenbanken im BA-IT-Systemhaus der Bundesagentur für Arbeit in Nürnberg.

Im Sommersemester 2004 nahm ich das Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität auf. Im März 2006 legte ich den Ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung ab. Im Winter 2006 begann ich die vorliegende Dissertation in der Abteilung Gastroenterologie und Endokrinologie unter der Leitung von Prof. Dr. med. Dr. h. c. G. Ramadori.

Ab Februar 2009 absolvierte ich mein Praktisches Jahr im Universitätsklinikum Göttingen (Anästhesie), im Evangelischen Krankenhaus Göttingen-Weende (Innere), sowie im Städtischen Klinikum Lüneburg (Chirurgie).

Den Zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung werde ich voraussichtlich im Sommer 2010 ablegen.