

AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR  
Kinder- und Jugendmedizin  
Prof. Dr. Michael Melter  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Bedeutung von Enzymen des Arachidonsäure-Metabolismus für die  
nichtalkoholische Fettlebererkrankung – Untersuchungen an humanem Lebergewebe  
sowie in einem *in vitro* Modell der hepatischen Steatose

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Jakob Riepl

2022



AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR  
Kinder- und Jugendmedizin  
Prof. Dr. Michael Melter  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Bedeutung von Enzymen des Arachidonsäure-Metabolismus für die  
nichtalkoholische Fettlebererkrankung – Untersuchungen an humanem Lebergewebe  
sowie in einem *in vitro* Modell der hepatischen Steatose

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Jakob Riepl

2022

Dekan:	Prof. Dr. Dirk Hellwig
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Thomas Weiß
2. Berichterstatterin:	Prof. Dr. Christa Büchler
Tag der mündlichen Prüfung:	16.08.2022

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	7
1.1	Die Leber – das zentrale Organ des menschlichen Metabolismus .....	7
1.2	NAFLD .....	7
1.2.1	Definition.....	7
1.2.2	Epidemiologie .....	8
1.2.3	Pathogenese .....	8
1.2.4	Klinische Diagnostik.....	11
1.2.5	Therapie .....	13
1.3	Arachidonsäure-Metabolismus .....	14
1.3.1	Arachidonsäure .....	14
1.3.2	Freisetzung durch Phospholipasen .....	14
1.3.3	Cyclooxygenase-Weg.....	15
1.3.4	Lipoxygenase-Weg.....	17
1.3.5	Eicosanoide und Inflammation.....	18
1.4	Fragestellung .....	20
2	Materialien und Methoden .....	23
2.1	Materialien .....	23
2.1.1	Geräte und Softwares.....	23
2.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	24
2.1.3	Reagenzien .....	25
2.1.4	Analyse-Kits.....	26
2.1.5	Zelllinien .....	27
2.1.6	Primer .....	27
2.1.7	Antikörper .....	28

2.1.8	Puffer und Lösungen .....	29
2.1.8.1	Proteingewinnung und -isolation.....	29
2.1.8.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	29
2.1.8.3	Western Blot .....	30
2.2	Methoden.....	31
2.2.1	Humane Kohorte .....	31
2.2.1.1	Gewinnung und Klassifizierung der Gewebeprouen .....	31
2.2.1.2	Homogenisierung von Lebergewebe und RNA-Isolation .....	32
2.2.1.3	TaqMan-basierte semiquantitative RT-PCR .....	33
2.2.2	Zellkultur .....	33
2.2.2.1	Zelllinien .....	33
2.2.2.2	Subkultivieren der Zelllinien.....	34
2.2.2.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	34
2.2.2.4	Bestimmung der Zellzahl .....	35
2.2.2.5	Aussäen der Zellen.....	35
2.2.2.6	Behandlung von Hepatoma-Zellen mit freien Fettsäuren.....	35
2.2.2.7	Inkubation von RAW-264.7-Zellen mit konditioniertem Kulturmedium..	36
2.2.2.8	RNA-Gewinnung und -Isolation aus kultivierten Zellen.....	37
2.2.2.9	Proteingewinnung und -Isolation.....	38
2.2.2.10	Oil-Red-O-Färbung .....	38
2.2.2.11	Vitalitätsprüfung (LDH-Release) .....	38
2.2.2.12	Bestimmung der mRNA-Expression .....	39
2.2.2.13	Bestimmung der Proteinexpression .....	40
2.2.3	Statistische Auswertung .....	42
2.2.3.1	Statistische Auswertung der semiquantitativen RT-PCR-Daten .....	42
2.2.3.2	Statistische Auswertung der Western Blots .....	42

3	Ergebnisse .....	43
3.1	Analyse der mRNA-Expressionen von PLA2G4A, PTGS2, HPGDS und ALOX5AP im Lebergewebe von NAFLD-Patienten .....	43
3.2	Analyse der mRNA-Expressionen von PLA2G4A, PTGS2, HPGDS und ALOX5AP in einem <i>in vitro</i> Steatose-Modell mit Hepatoma-Zellen .....	50
3.2.1	Etablierung des <i>in vitro</i> Modells der hepatischen Steatose .....	50
3.2.2	Analyse der mRNA-Expressionen von PLA2G4A, PTGS2, HPGDS und ALOX5AP in einem <i>in vitro</i> Steatose-Modell mit HepG2-Zellen .....	52
3.2.3	Analyse der Expressionen von PLA2G4A, PTGS2, HPGDS und ALOX5AP in einem <i>in vitro</i> Steatose-Modell mit Huh7-Zellen .....	53
3.3	Analyse der mRNA-Expressionen von mPLA2G4A, mPTGS2, mHPGDS und mALOX5AP in einem <i>in vitro</i> Steatose-Modell mit murinen Makrophagen .....	56
3.3.1	Erweiterung des <i>in vitro</i> Steatose-Modells.....	56
3.3.2	Analyse der mRNA-Expressionen von mPLA2G4A, mPTGS2, mHPGDS und mALOX5AP in einem <i>in vitro</i> Steatose-Modell mit RAW-264.7-Zellen .....	58
4	Diskussion .....	60
4.1	PLA2G4A, PTGS2, HPGDS und ALOX5AP im Kontext der NAFLD .....	60
4.2	Lipotoxizität von Palmitat als treibende Kraft der NAFLD im Vergleich zur simplen Steatose hepatischer Zellen .....	64
4.3	Ansatzpunkte für Therapie und Diagnostik der NAFLD .....	66
5	Zusammenfassung .....	69
6	Anhang .....	71
7	Literaturverzeichnis .....	73
8	Abbildungsverzeichnis.....	89
9	Tabellenverzeichnis.....	91
10	Abkürzungsverzeichnis.....	92
11	Danksagung .....	94
12	Lebenslauf .....	95

13	Erklärung .....	96
14	Posterbeiträge .....	97



# 1 Einleitung

## 1.1 Die Leber – das zentrale Organ des menschlichen Metabolismus

Die Leber eines Erwachsenen hat ein durchschnittliches Gewicht von 1,5 kg und befindet sich im rechten Oberbauch des menschlichen Körpers [1]. Sie produziert täglich bis zu einem Liter des für die Fettverdauung unerlässlichen Gallesekrets und ist als Entgiftungsorgan am Abbau xenobiotischer Verbindungen, einschließlich vieler Medikamente beteiligt [2, 3]. Ein Großteil der im Blut befindlichen Proteine wie die Gerinnungsfaktoren oder das Albumin wird in der Leber synthetisiert. Darüber hinaus ist sie für den Abbau von Proteinen durch den Harnstoffzyklus verantwortlich. Die Leber speichert Glucose in Form von Glykogen und gibt sie bei Bedarf in das Blut ab. Sie kann aber auch Glucose aus Aminosäuren über den Weg der Gluconeogenese *de novo* synthetisieren. Mit der Nahrung aufgenommene Fette und Fettsäuren werden in der Leber oxidiert. Überschüssige Lipide verteilt sie zur Speicherung an das Fettgewebe [4]. Die Leber ist das zentrale Organ des menschlichen Metabolismus [5]. Pathologien jeglicher Art, die zu einem Leberschaden bis hin zu einem Leberversagen führen, gehören zu den fundamentalen Gesundheitsproblemen [4].

## 1.2 NAFLD

### 1.2.1 Definition

Die nichtalkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD) ist die weltweit häufigste Form der chronischen Lebererkrankung [6]. Es handelt sich dabei um eine Fettansammlung in der Leber (Steatosis hepatis), die ohne sekundäre Ursachen wie übermäßigen Alkoholkonsum verursacht ist [7]. Die NAFLD umfasst ein Krankheitsspektrum, das von einer einfachen Steatosis hepatis (Nichtalkoholische Fettleber; NAFL) bis zur nichtalkoholischen Steatohepatitis (NASH) reicht [8]. NASH stellt die aggressivere Verlaufsform dar und ist gekennzeichnet durch die Schädigung von Leberepithelzellen und eine zunehmende Anzahl entzündlicher Zellinfiltrate [7, 9]. Sie geht einher mit einer schlechteren Prognose als die NAFL und kann zur Leberfibrose und -zirrhose sowie zur Entstehung eines hepatozellulären Karzinoms (HCC) führen [10].

### **1.2.2 Epidemiologie**

Die globale Prävalenz der NAFLD liegt bei etwa 25 %. Schätzungsweise 12 bis 20 % dieser Patienten leiden an einer NASH [11]. Alarmierend ist die steigende Prävalenz der NAFLD auch bei Kindern, die aktuell auf 3 bis 10 % geschätzt wird [12]. Vergleicht man die verschiedenen Regionen der Welt, zeigen sich deutliche Unterschiede in der Krankheitshäufigkeit. In Afrika liegt die Prävalenz bei etwa 13 %, während sie in Europa auf 24 % und Südamerika auf 30 % geschätzt wird [13]. Ähnliche Häufigkeitsverteilungen finden sich bei Betrachtung der Ethnizitäten. So ist in den USA die Bevölkerungsgruppe der Hispanics am schwersten von der NAFLD betroffen. Mit einer Prävalenz von 10 % leiden Afroamerikaner hingegen am seltensten an der Erkrankung [11, 14]. Womöglich ist dies zurückzuführen auf das unterschiedlich gehäufte Auftreten von mit der NAFLD assoziierten genetischen Risikovarianten wie dem Polymorphismus rs738409 G auf dem Gen PNPLA3 [15, 16]. Die NAFLD ist assoziiert mit Adipositas, Diabetes mellitus Typ 2, Dyslipidämie und Hypertonie. Diese finden sich jeweils mit einer Prävalenz von 51 %, 23 %, 69 % und 39 % bei Patienten mit einer NAFLD [13]. Die Prävalenz der NAFLD steigt parallel mit der voranschreitenden Ausbreitung der Adipositas [17]. Darüber hinaus nimmt die Krankheitshäufigkeit mit zunehmendem Patientenalter zu [13]. NAFLD und NASH gehören in den USA zu den häufigsten Indikationen für eine Lebertransplantation [18]. Einer Analyse des US Scientific Registry of Transplant Recipients aus den Jahren 2012 bis 2016 zufolge ist NASH die am schnellsten ansteigende Ursache eines hepatozellulären Karzinoms unter den gelisteten Patienten [19]. 7,5 % der Gesamtmortalität in den USA ist mit NAFLD assoziiert [20]. Kardiovaskuläre Erkrankungen sind die häufigsten Todesursachen unter Patienten mit NAFLD [11]. Nur ein geringer Anteil der NAFLD-Patienten entwickelt die typischen schweren Komplikationen einer chronischen Lebererkrankung, wobei vier bis acht Prozent an den Folgen einer Leberzirrhose und ein bis fünf Prozent an den Folgen eines hepatozellulären Karzinoms versterben [13]. Die gesellschaftliche Bedeutung der NAFLD spiegelt sich auch in den von ihr jährlich verursachten Kosten wider, welche in den USA auf 103 Milliarden Dollar geschätzt werden [21].

### **1.2.3 Pathogenese**

Histologisches Merkmal der NAFLD ist eine makrovesikuläre Steatose in mindestens fünf Prozent der Hepatozyten [22]. Ursächlich für die übermäßige Lipidakkumulation in den Leberzellen sind ein verstärkter Abbau des viszeralen Fettgewebes (Lipolyse),

die Aktivierung der hepatischen *De-Novo*-Lipogenese (DNL) sowie eine kohlenhydrat- und fettreiche Ernährung. Alle drei Mechanismen führen zu einer Anreicherung freier Fettsäuren (FFA) in der Leber, die in den Hepatozyten zu Triacylglyceriden (TAG) verestert als Lipidtröpfchen mikroskopisch sichtbar werden [23]. Freie Fettsäuren aus Lipolyse und hepatischer DNL haben den größten Anteil an der hepatischen Lipidakkumulation [24]. Die Fehlregulation dieser beider Mechanismen ist die Folge einer erworbenen Resistenz gegenüber dem anabolen Hormon Insulin, wie sie auch bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 zu finden ist [23]. Die TAG-Synthese dient unter physiologischen Bedingungen der Speicherung von freien Fettsäuren. Hier ist sie viel mehr als Schutzmechanismus der Hepatozyten zur Verringerung der toxischen Konzentrationen intrazellulärer freier Fettsäuren zu verstehen [25, 26]. Abbildung 1 fasst die Mechanismen, die zur hepatischen Anreicherung freier Fettsäuren und letztlich zur Entstehung der NAFL beitragen, zusammen.

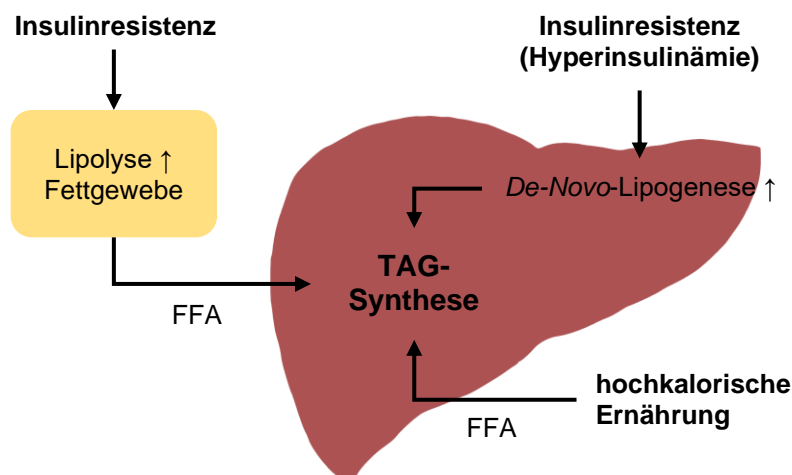


Abb. 1: Pathomechanismen der NAFL

Durch Insulinresistenz induzierte Lipolyse des viszeralen Fettgewebes und hepatische DNL sowie eine dauerhaft hochkalorische Ernährungsweise führen zur Anreicherung von FFA in der Leber und vermehrter TAG-Synthese; in Anlehnung an [23].

Während die einfache nichtalkoholische Fettleber als gutartiger Zustand gilt, ist die NASH mit einem aggressiveren Krankheitsverlauf assoziiert, der in Leberzirrhose und hepatozellulärem Karzinom enden kann [27]. Pathohistologisch unterscheidet sich die NASH von der NAFL durch das Auftreten ballonierter, degenerierter Hepatozyten und eine vermehrte Einwanderung inflammatorischer Zellen [28]. Abbildung 2 stellt die pathohistologischen Merkmale von NAFL und NASH gegenüber.

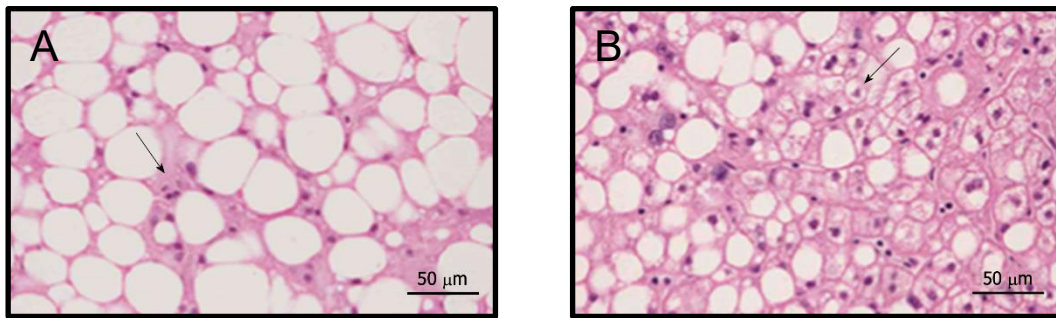


Abb. 2: Pathohistologische Unterschiede zwischen NAFL und NASH

Das typische Bild der (A) NAFL ist geprägt von intrazellulären hepatischen Lipidakkumulationen und nur minimalem entzündlichen Zellinfiltrat (Pfeil). (B) NASH ist verbunden mit der Degeneration und Ballonierung von Hepatozyten sowie einer verstärkten Einwanderung inflammatorischer Zellen (Pfeil) in das Lebergewebe; modifiziert nach [29].

Obwohl die Prozesse, die der Fettakkumulation zugrunde liegen, weitgehend klar sind, sind die Faktoren, die zur Entstehung der NASH führen, noch unzureichend verstanden. Diskutiert wird ein Zusammenspiel verschiedener Pathomechanismen, zu denen das Konzept der Lipotoxizität aber auch die Folgen eines veränderten intestinalen Mikrobioms gezählt werden [23].

Lipotoxizität ist die Folge einer gestörten intrazellulären Lipidzusammensetzung. Es kommt zu einer Anhäufung schädlicher Lipide, die zu Zellschädigung und Zelltod führen kann. Toxische Lipide können auf verschiedene Art und Weise schädigend auf eine Zelle wirken. Sie stören zum einen die Biologie und Funktion von Zellorganellen wie dem endoplasmatischen Retikulum und den Mitochondrien, was zu einer Anreicherung radikaler Sauerstoffspezies führt, zum anderen sind sie in der Lage, direkt mit intrazellulären Signalwegen und proinflammatorischen Rezeptoren an der Zelloberfläche oder im Zytoplasma zu interagieren [23, 30]. Lipotoxizität ist eng mit chronischer Inflammation, Adipositas, Diabetes mellitus Typ 2 und dem metabolischen Syndrom assoziiert [31].

Das intestinale Mikrobiom umfasst die Gesamtheit der im menschlichen Darm lebenden Mikroorganismen [32]. Hochkalorische Ernährungsweisen können die Zusammensetzung des Mikrobioms verändern und einen Zustand herbeiführen, den man als Dysbiose bezeichnet [33]. Dysbiosen können die Entstehung der NASH begünstigen,

indem sie zu Veränderungen in der Darmbarriere führen, die die Passage von Bakterien und bakteriellen Molekülen wie den Lipopolysacchariden aus dem Darm in den portalvenösen Kreislauf zulassen [34, 35].

Die Summe aller der NASH zugrunde liegenden Pathomechanismen führt letztlich zur Aktivierung von in der Leber ansässigen Makrophagen und zur Rekrutierung proinflammatorischer Zellen des angeborenen Immunsystems aus dem Blutkreislauf. Es kommt zur Entstehung und Aufrechterhaltung eines entzündlichen Milieus in der Leber [23]. Die komplexe Reihe an Ereignissen gipfelt schließlich in der Aktivierung von hepatischen Sternzellen und der Synthese und Ablagerung von extrazellulärer Matrix. Dies führt zur Fibrosierung und dem zirrhotischem Umbau des Lebergewebes [36]. Abbildung 3 rekapituliert die wichtigsten Faktoren in der Pathogenese von NAFLD und NASH.

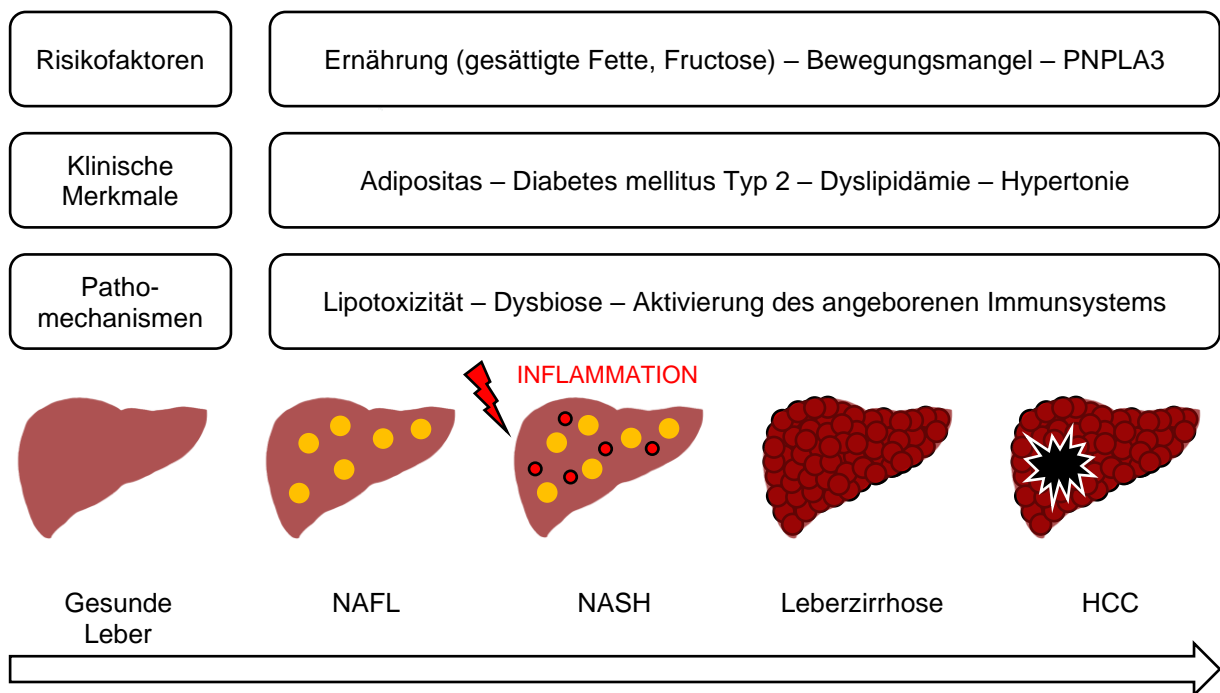


Abb. 3: Risikofaktoren, klinische Merkmale und Pathomechanismen der NAFLD  
In Anlehnung an [37].

### 1.2.4 Klinische Diagnostik

Die Diagnose NAFLD ist eine Ausschlussdiagnose. Sie ergibt sich aus dem Vorliegen einer hepatischen Steatose bei fehlenden sekundären Ursachen wie Alkohol oder steatogenen Medikamenten [7]. Meist wird die NAFLD-Diagnostik erst als Reaktion auf erhöhte Lebertransaminasen im Blut eingeleitet. Allerdings weisen einige Patienten mit

NAFLD auch normale Leberwerte auf [29, 38]. Aus diesem Grund sollte insbesondere bei Risikopatienten mit Adipositas oder Diabetes mellitus Typ 2 unabhängig von den Leberenzymen an eine NAFLD gedacht werden [37].

Die Sonografie ist das diagnostische Mittel der Wahl zur Identifizierung einer hepatischen Steatose (Abb. 4). Sie ist kostengünstig und weit verbreitet, hat aber eine geringe Sensitivität für die Diagnose milder Steatosen. Darüber hinaus lässt sich mit der Sonografie weder der Fibrosegrad noch das Vorliegen einer NASH beurteilen [12, 39]. Die Magnetresonanztomographie ist der radiologische Goldstandard für die Quantifizierung einer hepatischen Steatose. Aufgrund des erhöhten finanziellen und zeitlichen Aufwands ist sie allerdings kein Teil der klinischen Routinediagnostik [29, 40]. Alternativ zur Bildgebung kommen klinische Scores wie der Fatty Liver Index oder der NAFLD liver fat score zum Einsatz [41, 42]. Sie berechnen sich aus einfachen klinischen Parametern und sagen zuverlässig das Vorhandensein einer hepatischen Steatose, nicht aber deren Schweregrad, voraus [43].

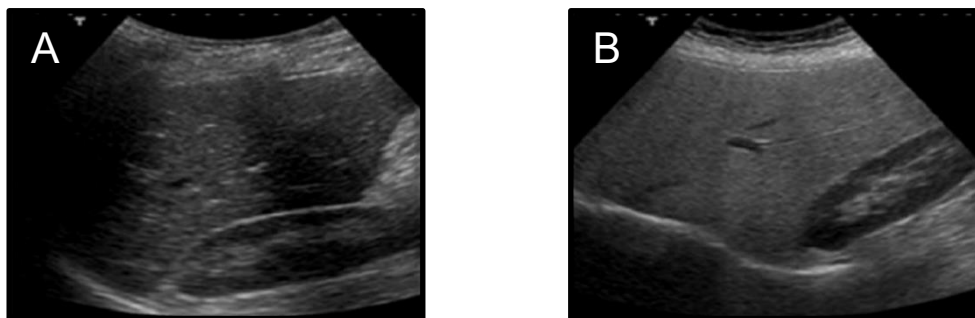


Abb. 4: Sonografische Darstellung von normalem und steatotischem Lebergewebe

Das (A) gesunde Leberparenchym besitzt dieselbe Echogenität wie das Nierenparenchym, während (B) eine Steatosis hepatis echoreicher erscheint; modifiziert nach [29].

Einer Diagnosestellung der NAFLD sollte eine Risikostratifizierung für das Vorliegen einer Leberfibrose folgen. Die Fibrosierung des Lebergewebes gilt als aussagekräftigstes prognostisches Merkmal der NAFLD [44, 45]. Mehrere klinische Scores wurden für das Staging der Fibrose entwickelt. Hierzu zählen der NAFLD fibrosis score oder der Fibrosis 4 calculator. Mit ihrer Hilfe kann auf der Basis von nicht-invasiven klinischen Parametern zwischen verschiedenen Fibrose-Stadien unterschieden werden [7]. Die meisten dieser Tests schneiden bei der Differenzierung früher Fibrose-Stadien schlecht ab, was zu einer Reihe an Werten führt, bei denen eine Fibrosierung nicht

definitiv ausgeschlossen werden kann [37]. Hilfreich könnte in Zukunft die Elastographie der Leber sein, die im Ultraschallgerät integriert ist und über die Steifigkeit der Leber zwischen Fibrosierung und Zirrhose differenziert [7, 29]. Für den Nachweis einer NASH gibt es bis *dato* keinen validen nicht-invasiven Test [12, 37]. Die Leberbiopsie bleibt daher nach wie vor der Goldstandard in der Diagnostik von Leberfibrose und NASH [9, 46].

### 1.2.5 Therapie

Der wichtigste Grundstein in der Behandlung der NAFLD ist aktuell die Therapie von prädisponierenden Faktoren wie Adipositas und Diabetes mellitus Typ 2 sowie die Verringerung des kardiovaskulären Folgerisikos [29, 37]. Eine Gewichtsabnahme reduziert dabei nicht nur den Fettgehalt in der Leber, sondern führt bereits bei einer Abnahme von 5 % des Körpergewichts zu einem histologisch sichtbaren Rückgang der NASH. Bei fast der Hälfte der Patienten mit einer Gewichtsabnahme von 10 % kommt es gar zur Regression einer bestehenden Fibrose [47]. Allerdings ist eine Änderung des Lebensstils für viele Patienten schwer umzusetzen. Selbst im Kontext einer Studie erreichen nur 10 % der Patienten eine Gewichtsabnahme von mehr als 10 % [47]. Ernährungsberater und der Zugang zu örtlichen Selbsthilfegruppen können bei der Gewichtsabnahme helfen. In besonderen Fällen stellen auch die Mittel der bariatrischen Chirurgie eine valide Alternative dar [48].

Für die pharmakologische Therapie der NASH sind derzeit weder von der US-amerikanischen Food and Drug Administration noch von der Europäischen Arzneimittelagentur Medikamente zugelassen [29]. Eine Behandlung mit Vitamin E für 96 Wochen zeigte in einer randomisiert-kontrollierten Studie einen positiven Effekt auf den Rückgang von NAFLD und NASH bei erwachsenen Patienten [49]. Bei Kindern mit NAFLD ist ein solcher Effekt durch Vitamin E allerdings nicht nachweisbar [50]. Das Antidiabetikum Pioglitazon führte in selbiger Studie zu einer Verbesserung der hepatischen Steatose und sinkenden Leberwerten unter den Probanden [49]. Aufgrund von Sicherheitsbedenken gegenüber Vitamin E und einer unerwünschten Gewichtszunahme durch Pioglitazon konnte sich jedoch keine der beiden Therapien in der klinischen Praxis durchsetzen [49, 51]. Kürzlich zeigten sich Erfolge mit der synthetischen Gallensäure Obeticholsäure, deren Einnahme in einer Phase-III-Studie zu einem Rückgang von Fibrose, Inflammation und hepatozellulärer Ballonierung bei NASH-Patienten führte [52].

Ein besonders wichtiger Bestandteil der Therapie von NAFLD- und NASH-Patienten liegt in der Prävention und Behandlung von Folgeerkrankungen. Patienten mit Leberzirrhose benötigen ein Screening auf das Vorliegen eines hepatozellulären Karzinoms [53]. Kommt es zur Dekompensation mit Aszites, Varizenblutung oder hepatischer Enzephalopathie, sollte eine frühzeitige Vorstellung in einem Lebertransplantationszentrum veranlasst werden [37].

## 1.3 Arachidonsäure-Metabolismus

### 1.3.1 Arachidonsäure

Die Arachidonsäure ist eine mehrfach ungesättigte Fettsäure mit 20 Kohlenstoffatomen und vier cis-Doppelbindungen [54]. Ihre chemische Struktur ist in Abbildung 5 dargestellt. Die Arachidonsäure ist ein integraler Bestandteil biologischer Zellmembranen und verleiht ihnen Fluidität und Flexibilität [55]. Die vier Doppelbindungen prädisponieren sie für Reduktions-Oxidations-Reaktionen mit Sauerstoff, was zu einer Fülle an Metaboliten führt. Diese sogenannten Eicosanoide sind von großer Bedeutung für die Funktion des Immunsystems, die Regulation inflammatorischer Prozesse, aber auch die Entstehung von Allergien [56].

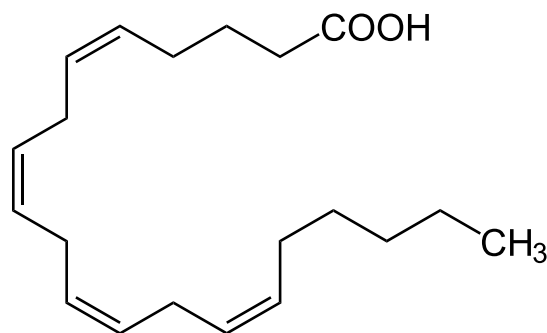


Abb. 5: Chemische Strukturformel der Arachidonsäure

In Anlehnung an [56].

### 1.3.2 Freisetzung durch Phospholipasen

Nach ihrer Aufnahme in die Zelle wird die Arachidonsäure verestert und in den Phospholipiden der Zellmembran gespeichert [56]. Die intrazelluläre Konzentration freier Arachidonsäure ist gering. Bevor sie also verstoffwechselt werden kann, muss sie aus den Phospholipiden der Zellmembran wieder freigesetzt werden [57]. Dies geschieht



durch sogenannte Phospholipasen, insbesondere den Mitgliedern der Phospholipase-A<sub>2</sub>-Familie. Sie spalten die Phospholipide der Zellmembran am C2-Atom des Phosphoglycerids, wodurch Arachidonsäure freigesetzt wird [58]. Die Ca<sup>2+</sup>-abhängige zytosolische Phospholipase A<sub>2</sub> scheint dabei aufgrund ihrer Substratspezifität besonders wichtig für die Biosynthese der Eicosanoide zu sein. Sie hydrolisiert veresterte Arachidonsäure aus der C2-Position von Phosphatidylcholin, dem Hauptphospholipid der Zellmembran, und Phosphatidylinositol [59]. Weitere Mitglieder der Phospholipase-A<sub>2</sub>-Familie sind etwa die Ca<sup>2+</sup>-unabhängige zytosolische Phospholipase A<sub>2</sub> und die sekretorische Phospholipase A<sub>2</sub> [58].

Einmal freigesetzt, kann die Arachidonsäure in verschiedene Stoffwechselwege eintreten. Es besteht die Möglichkeit der Verstoffwechslung durch Cyclooxygenasen, Lipoxygenasen oder Cytochrom P450 aber auch die der nicht-enzymatischen Peroxidation. Letztere mündet in der Bildung von Isoprostanen [57, 60]. Abbildung 6 gibt einen vereinfachten Überblick über die Stoffwechselwege des Arachidonsäure-Metabolismus.

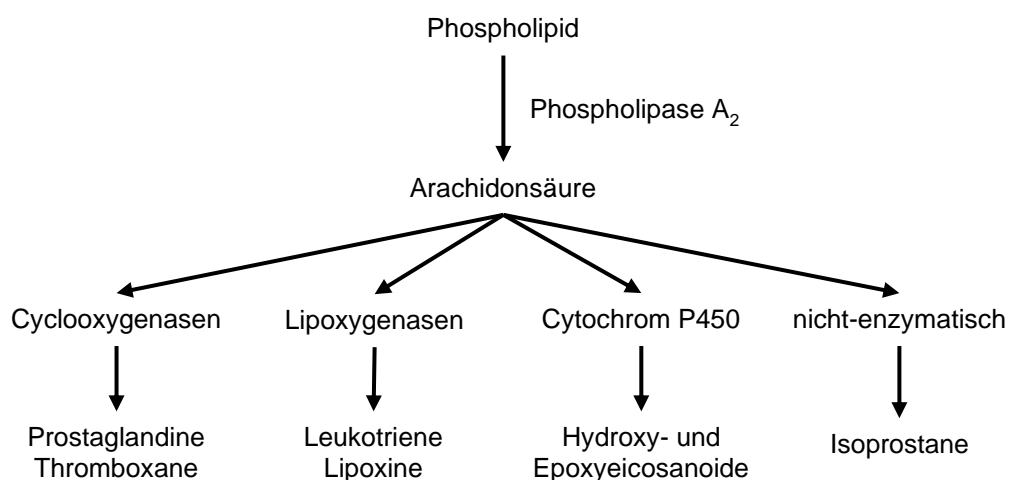


Abb. 6: Stoffwechselwege des Arachidonsäure-Metabolismus

In Anlehnung an [60].

### 1.3.3 Cyclooxygenase-Weg

Im Cyclooxygenase-Weg werden Prostaglandine (PG) und Thromboxane (TX) gebildet, die zusammengenommen als Prostanoiden bezeichnet werden [61]. Die ersten zwei Schritte des Cyclooxygenase-Wegs sind zwei aneinandergeschaltete Reaktionen,

die beide von der Prostaglandin-H<sub>2</sub>-Synthase (PGHS) katalysiert werden: eine Cyclooxygenase-Reaktion, wodurch die namensgebende Ringstruktur und Prostaglandin G<sub>2</sub> aus der Arachidonsäure entsteht, sowie eine Peroxidase-Reaktion, aus der das Prostaglandin H<sub>2</sub> hervorgeht. PGHS wird alternativ auch als Cyclooxygenase (COX) bezeichnet [57]. Es gibt zwei Isoformen der Cyclooxygenase: COX-1 und COX-2 [62, 63]. Zudem gibt es eine Variante der COX-1, die als COX-3 bezeichnet wird. Sie scheint beim Menschen allerdings nicht funktionell zu sein [64]. COX-1 wird konstitutiv exprimiert. Es wird angenommen, dass diese Isoform vornehmlich an der Synthese derjenigen Prostaglandine beteiligt ist, die für die basalen physiologischen Funktionen benötigt werden [62, 63]. COX-2 hingegen ist induzierbar. Dies geschieht zum Beispiel als Reaktion auf bakterielle Produkte wie Lipopolysaccharide oder durch inflammatorische Signalmoleküle [62, 63]. Die biochemischen Strukturen von COX-1 und COX-2 sind grundsätzlich ähnlich. Das aktive Zentrum von COX-2 ist allerdings etwas größer, was bei der Entwicklung von Medikamenten, die in den Arachidonsäure-Metabolismus eingreifen, genutzt wird. [65]. Sowohl für COX-1 als auch für COX-2 ist die Arachidonsäure das bevorzugte Substrat. Das Produkt der Cyclooxygenasen, Prostaglandin H<sub>2</sub>, ist ein instabiles Zwischenprodukt. Es wird durch die spezifischen Prostanoidsynthasen weiterverarbeitet, woraus sich eine Vielzahl an Prostanoiden wie Prostaglandin D<sub>2</sub>, Prostaglandin E<sub>2</sub>, Prostaglandin F<sub>2α</sub>, Prostaglandin I<sub>2</sub> und Thromboxan A<sub>2</sub> ergeben [57]. Die meisten Synthasen haben mehrere Subtypen und werden zell- und gewebe-spezifisch unterschiedlich stark exprimiert [66]. Thromboxan A<sub>2</sub> beispielsweise entsteht vornehmlich in Thrombozyten, während Prostaglandin I<sub>2</sub> hauptsächlich von vas-kulären Endothelzellen produziert wird [67, 68]. Abbildung 7 fasst die wichtigsten Enzyme und Metaboliten des Cyclooxygenase-Wegs zusammen.

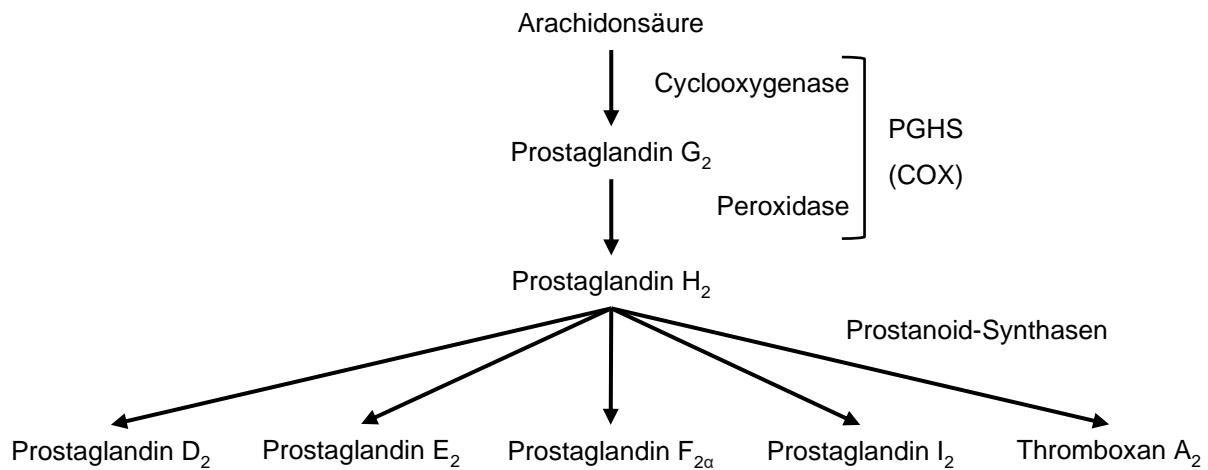


Abb. 7: Enzyme und Metaboliten des Cyclooxygenase-Wegs

In Anlehnung an [57].

### 1.3.4 Lipoxygenase-Weg

Der Lipoxygenase-Weg dient unter anderem der Bildung von Leukotrienen (LT) und Lipoxinen (LX). Die 5-Lipoxygenase (5-LOX) ist das Schlüsselenzym der Leukotrien-Biosynthese und wird vornehmlich in Zellen myeloischen Ursprungs wie Granulozyten, Makrophagen oder dendritischen Zellen exprimiert [69–71]. Im ersten Schritt der Leukotrien-Biosynthese synthetisiert sie 5-Hydroperoxyeicosatetraensäure (5-HpETE) aus freier Arachidonsäure. 5-HpETE kann zu 5-Hydroxyeicosatetraensäure (5-HETE) reduziert werden oder durch die 5-Lipoxygenase zu Leukotrien A<sub>4</sub> metabolisiert werden [57]. Letztgenannter Schritt wird reguliert durch FLAP, das 5-Lipoxygenase-aktivierende Protein [72]. Leukotrien A<sub>4</sub> ist instabil und wird auf zwei Wegen weiterverarbeitet. Der eine Weg nutzt das zytosolische Enzym Leukotrien-A<sub>4</sub>-Hydrolase zur Bildung von Leukotrien B<sub>4</sub> [73]. Der andere mündet in der Bildung von Leukotrien C<sub>4</sub> durch eine an die Kernmembran gebundene Glutathion-S-Transferase. Auch diesem Schritt wohnt FLAP bei. Aus Leukotrien C<sub>4</sub> gehen Leukotrien D<sub>4</sub> und Leukotrien E<sub>4</sub> hervor [57]. Abbildung 8 gibt eine Zusammenfassung der wichtigsten Akteure der Leukotrien-Biosynthese.

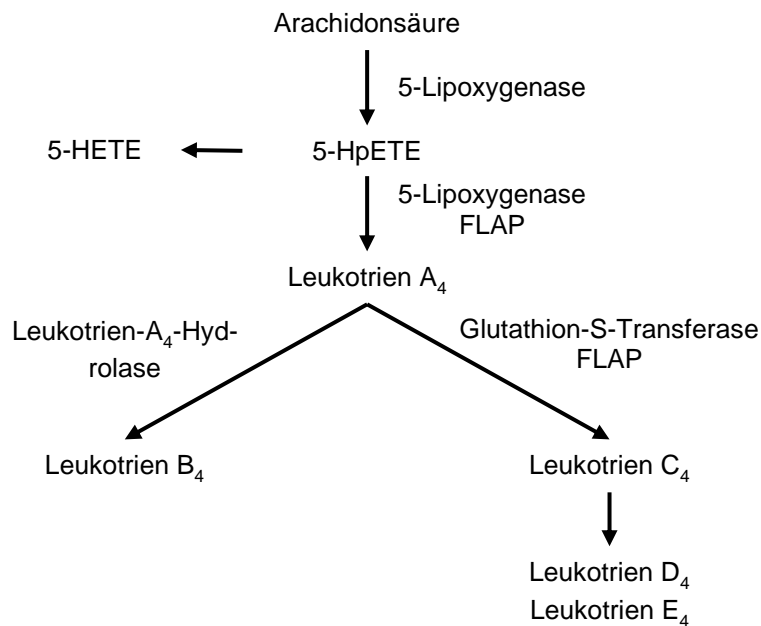


Abb. 8: Enzyme und Metaboliten der Leukotrien-Biosynthese

In Anlehnung an [57].

Die 15-Lipoxygenase ist das Eingangsenzym der Lipoxin-Biosynthese. Sie synthetisiert die 15-Hydroperoxyeicosatetraensäure (15-HpETE) aus freier Arachidonsäure. 15-HpETE kann zu 15-Hydroxyeicosatetraensäure reduziert und weiter in 5,6-Epoxyeicosatetraensäure umgewandelt werden. Dieser Metabolit ist die Vorstufe der Lipoxine A<sub>4</sub> und B<sub>4</sub>. Lipoxine werden als antientzündliche Gegenspieler der Leukotriene behandelt. Epimere von Lipoxin A<sub>4</sub> und B<sub>4</sub> können in Gegenwart von Acetylsalicylsäure (Aspirin®) durch COX-2 aus Arachidonsäure gebildet werden. Daher werden diese Epimere auch als Aspirin®-getriggerte Lipoxine bezeichnet [74]. Ein weiterer Mechanismus, der die Komplexität der Eicosanoid-Biosynthese veranschaulicht, zeigt sich außerdem in der Möglichkeit der transzellulären Synthese von Lipoxin A<sub>4</sub>: In Leukozyten durch die 5-Lipoxygenase synthetisiertes Leukotrien A<sub>4</sub> kann von Thrombozyten aufgenommen und mithilfe der 12-Lipoxygenase in Lipoxin A<sub>4</sub> umgewandelt werden [75].

### 1.3.5 Eicosanoide und Inflammation

Entzündungen sind ein Teil der humanen Wirtsabwehr und spielen eine wichtige Rolle für Wundheilungsprozesse und Immunität gegenüber Infektionen. Infektionen und entzündliche Stimuli induzieren die Aktivität der Schlüsselenzyme des Arachidonsäure-Metabolismus wie der Phospholipase A<sub>2</sub>, COX-2 und der 5-Lipoxygenase,

wodurch sich die Kapazität zur Eicosanoidbildung erhöht [57]. Eicosanoide vermitteln die Kardinalzeichen der Inflammation *Calor, Rubor, Tumor* und *Dolor* [5]. Es ist jedoch wichtig anzumerken, dass zwar viele Aktivitäten der Eicosanoide als proinflammatorisch beschrieben werden können, sie aber auch entzündungshemmende Funktionen haben und an der Inflammationsrückbildung beteiligt sind. Die Art des Entzündungsreizes und die vorherrschenden Zelltypen bestimmen die Zusammensetzung der Eicosanoide, die zu einem bestimmten Zeitpunkt während einer Entzündungsreaktion produziert werden [56, 57].

Prostaglandin E<sub>2</sub> gilt allgemein als proinflammatorisch und besitzt viele dementsprechende Funktionen wie die Induktion von Fieber und Schmerzen sowie die Erhöhung der vaskulären Permeabilität, welche es Abwehrzellen ermöglicht in Infektions- oder Entzündungsherde einzudringen [76, 77]. Prostaglandin E<sub>2</sub> potenziert die durch Mediatoren wie Bradykinin und Histamin induzierten Schmerzreaktionen. Viele entzündungshemmende Medikamente zielen aufgrund dieser Wirkungen auf den Cyclooxygenase-Weg, um die Prostaglandin-E<sub>2</sub>-Produktion zu verringern [57]. Prostaglandin E<sub>2</sub> ist jedoch auch in der Lage, die 5-Lipoxygenase zu unterdrücken, wodurch die Synthese von Leukotrienen, die im Allgemeinen proinflammatorisch sind, gehemmt wird. Außerdem kann Prostaglandin E<sub>2</sub> die 15-Lipoxygenase induzieren und so die Synthese von entzündungsrückbildenden Lipoxinen fördern [78, 79].

Prostaglandin D<sub>2</sub> hat eine signifikante proinflammatorische Wirkung bei allergischen Atemwegserkrankungen wie Asthma bronchiale, wo es einige der charakteristischen Merkmale wie Eosinophilie, Hyperreaktivität der Atemwege und erhöhte Schleimproduktion vermittelt [80]. Prostaglandin D<sub>2</sub> hat auch proinflammatorische Effekte in der Haut, wo es Erytheme, Ödeme und Leukozyteninfiltration fördert [81]. Allerdings wurden für Prostaglandin D<sub>2</sub> ebenso eine Reihe antiinflammatorischer und entzündungshemmender Effekte zum Beispiel im Rahmen von Typ IV Hypersensitivitätsreaktionen beschrieben, sodass sich seine Wirkung nicht verallgemeinern lässt [82, 83]. Die Effekte von Prostaglandin D<sub>2</sub> im Kontext der Inflammation sind komplex. Je nach Entzündungsmilieu kann es entzündungsfördernd oder -unterdrückend agieren [84].

Leukotriene, die Produkte der 5-Lipoxygenase, sind ebenfalls entscheidend an den inflammatorischen Prozessen im menschlichen Körper beteiligt. Leukotrien B<sub>4</sub> wird von vielen verschiedenen Arten von Leukozyten, Makrophagen, aber auch Epithelzellen produziert [57]. Es fungiert als potenter chemotaktischer Lockstoff, der Leukozyten

(insbesondere neutrophile Granulozyten und Makrophagen) an Orte mit inflammatorischer Aktivität rekrutieren kann [69, 70]. Leukotrien C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub> und E<sub>4</sub>, die zusammen auch als Cysteinyl-Leukotriene bezeichnet werden, gelten als langsam reagierende Substanzen der Anaphylaxie und wirken ebenfalls proinflammatorisch etwa im Rahmen des Asthma bronchiale [57, 85].

Für den Organismus ist es entscheidend, dass sich eine Inflammationsreaktion auf geordnete und integrierte Weise zurückbildet. Man geht davon aus, dass ein Mangel an rückbildenden Prozessen zu chronischer Inflammation führt, die schädigende, pathologische Veränderungen hervorrufen kann [86]. Einer der zentralen Mechanismen ist hierbei die Bildung von Lipoxinen. Sie wirken antiinflammatorisch auf Leukozyten sowie vaskuläre und epitheliale Zellen und tragen so zur Beendigung und Auflösung von Entzündungsreaktionen bei [87, 88].

## 1.4 Fragestellung

Microarray-Analysen sind moderne molekularbiologische Untersuchungsmethoden, die dabei helfen können, multifaktoriell bedingte Erkrankungen wie die NAFLD besser zu verstehen. Durch die Erstellung von Geneexpressionsprofilen von gesundem und krankem Gewebe ist es möglich, Gruppen von dysregulierten Genen zu identifizieren und ihre Assoziationen mit zellulären Signalwegen zu untersuchen. Hieraus lassen sich neue Einsichten in die Pathogenese einer Erkrankung gewinnen, aber auch therapeutische Ziele ableiten [89–91]. Die Arbeitsgruppe für experimentelle Pädiatrie an der Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universität Regensburg (KUNO) unter der Leitung von Professor Dr. rer. nat. Thomas Weiß führte Microarray-Analysen (Affymetrix GeneChip®) an menschlichen Leberproben durch, um Prozesse aufzudecken, die zwischen gesundem Lebergewebe, NAFL und NASH unterscheiden. Differentiell exprimierte Gene (DEG) wurden anhand ihrer Gene-Ontology-Termini zugeordnet, wobei sich der Arachidonsäure-Metabolismus mit den Genen PLA2G4A, PTGS2, HPGDS, und ALOX5AP als einer der am stärksten veränderten Stoffwechselwege im Lebergewebe von NAFLD-Patienten zeigte.

PLA2G4A kodiert die zytosolische Phospholipase A<sub>2</sub> Gruppe IVA. Das Enzym katalysiert die Hydrolyse von Phospholipiden zur Freisetzung von Arachidonsäure aus der Zellmembran [92]. Das Gen PTGS2 kodiert die Prostaglandinsynthase-2 (PGHS-2,

COX-2), eines der Schlüsselenzyme der Prostaglandin-Biosynthese [93]. HPGDS kodiert die hämatopoetische Prostaglandin-D<sub>2</sub>-Synthase, die die Umwandlung von Prostaglandin H<sub>2</sub> zu Prostaglandin D<sub>2</sub> katalysiert [94]. ALOX5AP ist das zugehörige Gen des 5-Lipoxygenase-aktivierenden Proteins (FLAP). Dieses Protein reguliert gemeinsam mit der 5-Lipoxygenase den zentralen Schritt der Leukotrien-Biosynthese [72]. Abbildung 9 gibt einen Überblick über die Rolle der DEGs und den von ihnen kodierten Enzymen im Arachidonsäure-Metabolismus menschlicher Zellen.

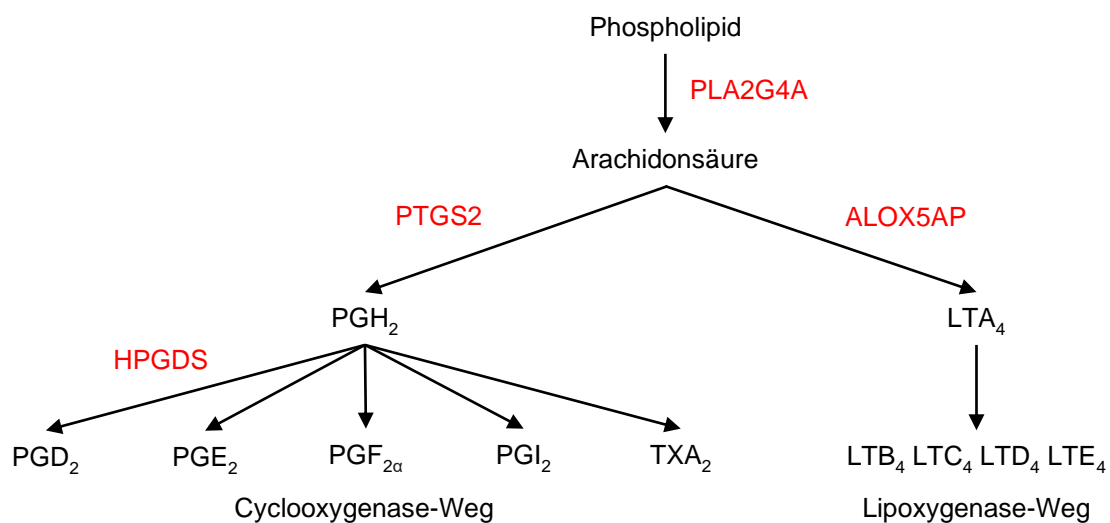


Abb. 9: PLA2G4A, PTGS2, HPGDS und ALOX5AP im Kontext des Arachidonsäure-Metabolismus  
Einordnung der DEGs PLA2G4A, PTGS2, HPGDS und ALOX5AP (rot) entsprechend der Funktion der von ihnen kodierten Enzyme in den Arachidonsäure-Metabolismus menschlicher Zellen.

Die genannten Microarray-Analysen wurden an einer Pilot-Kohorte (n = 22) durchgeführt und dienten der Detektion dysregulierter Stoffwechselwege und differentiell exprimierter Gene im Lebergewebe von NAFLD-Patienten. Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun die Validierung der DEGs anhand einer zweiten unabhängigen Patientenkohorte (n = 122) sowie die Evaluierung an einem *in vitro* Modell der hepatischen Steatose erfolgen. Nachstehend genannte Fragen galt es zu klären:

1. Lässt sich die in der Pilot-Studie im Lebergewebe von NAFLD-Patienten detektierte differentielle Expression von PLA2G4A, PTGS2, HPGDS und ALOX5AP an einer großen, unabhängigen Kohorte mittels semiquantitativer RT-PCR bestätigen?

2. Ist die im Lebergewebe von NAFLD-Patienten gemessene differentielle Expression von PLA2G4A, PTGS2, HPGDS und ALOX5AP in einem *in vitro* Modell der hepatischen Steatose reproduzierbar?
3. Welchem Zelltyp sind die im Gesamtlebergewebe von NAFLD-Patienten gemessenen differentiellen Expressionen zuzuschreiben?
4. Kann die freie, toxische Fettsäure Palmitat (PA) als Trigger der differentiellen Expression von PLA2G4A, PTGS2, HPGDS und ALOX5AP angesehen werden?

Die Etablierung des *in vitro* Modells ist darüber hinaus ein erster wichtiger Schritt, um in Folgestudien molekulare Mechanismen der differentiellen Genexpressionen untersuchen zu können. Im weiteren Sinne dient diese Arbeit somit der Evaluierung von PLA2G4A, PTGS2, HPGDS und ALOX5AP als potentielle therapeutische und diagnostische Targets der NAFLD. Zudem soll die Arbeit dazu beitragen, die Rolle dieser Gene in der Pathogenese der NAFLD genauer zu beleuchten.



## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Geräte und Softwares

Biomark™	Fluidigm, San Francisco, USA
Centrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Centrifuge 5424 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
EW Präzisionswaage	Kern & Sohn, Balingen-Frommern, Deutschland
GENios™ Plus Microplate Reader	Tecan, Männedorf, Schweiz
gentleMACS™ Tissue Dissociator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
GVLab Reagenzglasschüttler	Gilson, Middelton, USA
Eclipse TS 100	Nikon, Tokio, Japan
Heracell™ 150	Heraeus, Hanau, Deutschland
Herasafe™ Bench	Heraeus, Hanau, Deutschland
ImageQuant™ LAS 4000 mini	GE Healthcare, München, Deutschland
ImageQuant™ LAS 4000 Software	GE Healthcare, München, Deutschland
ImageJ	Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA
LightCycler® 480	Roche, Basel, Schweiz
LightCycler® 480 Software	Roche, Basel, Schweiz
Magellan™ Data Analysis Software	Tecan, Männedorf, Schweiz
Microsoft Excel®	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Mini-Protean® Tetra System	Bio-Rad, Feldkirchen, Deutschland
MiniSpin®	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Multipette® stream	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
NanoDrop™ 2000/2000c Software	Thermo Fisher, Waltham, USA
NanoDrop™ 2000 Spectrophometer	Thermo Fisher, Waltham, USA
NIS Elements	Nikon, Tokio, Japan
Pipetman®	Gilson, Middelton, USA
PowerPac™ 200	Bio-Rad, Feldkirchen, Deutschland
RCT basic	IKA, Staufen i. Breisgau, Deutschland

Research® Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Sprout® Mikro-Zentrifuge	Kisker-Biotech, Steinfurt, Deutschland
SPSS®	IBM, Armonk, USA
Trans-Blot® Turbo™ Transfer System	Bio-Rad, Feldkirchen, Deutschland
Thermocycler TProfessional Basic Gradient	Biometra, Göttingen, Deutschland
Thermomixer® comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Universal 320 Tischzentrifuge	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Vortex-Genie® 2 G560-E	Scientific Industries, Bohemia, USA
Wasserbad	GFL, Burgwendel, Deutschland
WT17 Mini-Taumel-Wipptisch	Biometra, Göttingen, Deutschland

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

6 Well Plate	Corning, Inc., Corning, USA
96 Well Plate	Corning, Inc., Corning, USA
Biosphere® Filter Tips	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Bottle Top Filter 500 ml	Corning, Inc., Corning, USA
C-Chip® disposable Haemocytometer	NanoEnTek, Seoul, Korea
Cell Scraper 16 cm	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Chromatographiepapier 3 mm	Whatman, Dassel, Deutschland
Combitips advanced® 1.0 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Cyro.s™	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Disposable Pasteur Pipetts 230 mm	VWR International, Radnor, USA
Duran® Laborglasflaschen 100, 250, 500 ml	Schott, Mainz, Deutschland
gentleMACS™ M Tubes	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
LightCycler® 480 Multowellplatte 96 white	Roche, Basel, Schweiz
LightCycler® 480 Sealing Foil	Roche, Basel, Schweiz
Mini-Protean® TGX™ Stainfree Gel 12%	Bio-Rad, Feldkirchen, Deutschland
Mr. Frosty™ Nalgene®	Thermo Fisher, Waltham, USA
Multiply® -µStrip Pro 8er Kette	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
NeoTouch® Handschuhe	Ansell, Brüssel, Belgien
SafeSeal® Reagiergefäße 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

SafeSeal® SurPhob Spitzen 10 µl	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Schraubröhre 15, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Sealing Foil	Sigma, Steinheim, Deutschland
Serological Pipette 2, 5, 10, 25, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
TC-Flasche T75, Standard	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
TC-Flasche T75, Cell+	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

### 2.1.3 Reagenzien

2-Mercaptoethanol	Merck, Hohenbrunn, Deutschland
2-Propanol 99.8%	Honeywell, Morristown, USA
Amersham™ Hybond® P 0.2 PVDF Western blotting membranes	GE Healthcare, München, Deutschland
Albuminfraktion V (BSA)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
BioWhittaker® Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Lonza, Verviers, Belgien
BSA Standard for Protein Assay	Interchim, Montluçon, Frankreich
cOmplete™, Mini Protease Inhibitor Cocktail	Roche, Basel, Schweiz
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Steinheim, Deutschland
DL-Norleucin	Sigma, Steinheim, Deutschland
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Ethanol 99.8%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Fetal Bovine Serum (FBS)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Formaldehydlösung 37%	Merck, Hohenbrunn, Deutschland
Gibco® DMEM	Thermo Fisher, Waltham, USA
Gibco® Roswell Park Memorial Institute (RPMI) Medium 1640	Thermo Fisher, Waltham, USA
Glycin	Sigma, Steinheim, Deutschland
Isopropanol 70%	Braun, Melsungen, Deutschland
Laemmli Sample Buffer (2x)	Bio-Rad, Feldkirchen, Deutschland
L-Glutamin	Sigma, Steinheim, Deutschland
LightCycler® 480 SYBR Green I Master	Roche, Basel, Schweiz

Magermilchpulver	TSI, Zeven, Deutschland
MEM Non-essential Amino Acid Solution	Sigma, Steinheim, Deutschland
Methanol	Merck, Hohenbrunn, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Hohenbrunn, Deutschland
Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Natrium-Dodecyl-Sulfat-Pellets	Serva, Heidelberg, Deutschland
Natronlauge (NaOH)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Oil Red O	Sigma, Steinheim, Deutschland
Ölsäure ≥99%	Sigma, Steinheim, Deutschland
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher, Waltham, USA
Palmitinsäure ≥99%	Sigma, Steinheim, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Sigma, Steinheim, Deutschland
PhosSTOP™ EASYpack	Roche, Basel, Schweiz
Ponceau S	Sigma, Steinheim, Deutschland
Re-Blot™ Plus Mild Solution (10x)	Merck, Hohenbrunn, Deutschland
Salzsäure (HCl)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Super Signal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Fisher, Waltham, USA
TaqMan-Genexpressionsassays	Thermo Fisher, Waltham, USA
Triton™ X-100	Sigma, Steinheim, Deutschland
Trizma® base (Tris)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Trypsin-EDTA solution	Sigma, Steinheim, Deutschland
Trypan Blue Solution 0.4%	Sigma, Steinheim, Deutschland
Tween® 20	Sigma, Steinheim, Deutschland

#### 2.1.4 Analyse-Kits

<i>In vitro</i> Toxicology Assay Kit, Lactic Dehydrogenase based, TOX7	Sigma, Steinheim, Deutschland
QuantiTect® Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNAlater®	Sigma, Steinheim, Deutschland
RNase-Free DNase Set	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy® Maxi Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Uptima BC Assay	Interchim, Montluçon, Frankreich

### 2.1.5 Zelllinien

HepG2 (human)

HB-8065, ATCC, Manassas, USA

Huh7 (human)

01042712, ECACC, Porton Down, UK

RAW 264.7 (murin)

TIB-71, ATCC, Manassas, USA

### 2.1.6 Primer

Mit Ausnahme der Primer für das murine Housekeeper-Gen  $\beta$ -Actin (Sigma, Steinheim, Deutschland) wurden alle Primer von Metabion (Planegg, Deutschland) hergestellt.

Tab. 1: Humane Gene, zugehörige Primerpaare und Annealing-Temperaturen

HPRT1	5'-tgacactggcaaaacaatgca-3' 5'-ggtcctttcaccagcaagct-3'	Fwd 60 °C Rev 60 °C
YWAHZ	5'-gcaattactgagagacaactgaca-3' 5'-tggaaggccggtaatttt-3'	Fwd 63 °C Rev 53 °C
PTGS2 (COX-2)	5'-cttcacgcatcagttttcaag-3' 5'-tcaccgtaaataatgatttaagtccac-3'	Fwd 58 °C Rev 62 °C
HPGDS	5'-gggggagagaatggcttatt-3' 5'-ggtcaggcttaagaccaaag-3'	Fwd 58 °C Rev 60 °C
PLA2G4A	5'-cttctggctccacctgga-3' 5'-aggggattgtggctaacattt-3'	Fwd 60 °C Rev 57 °C
ALOX5AP	5'-catcagcgtgtccagaat-3' 5'-caagtgtccggctcctctg-3'	Fwd 57 °C Rev 59 °C

Tab. 2: Murine Gene, zugehörige Primerpaare und Annealing-Temperaturen

mβ-Actin	5'- agccatgtacgtagccatcc -3' 5'- ctctcagctgtggtgggtaa -3'	Fwd 63,8 °C Rev 64,2 °C
mPTGS2 (mCOX-2)	5'- aagcgaggacctgggttca -3' 5'- aaggcgcagtttatgtgtctgt -3'	Fwd 59 °C Rev 61 °C
mHPGDS	5'-atgcctaactacaaactgctt -3' 5'-ctagagttttgtctgtggcct -3'	Fwd 55 °C Rev 59 °C
mPLA2G4A	5'-cctttgagttcattttggatcctaa -3' 5'-tgtagctgtgcctagggtttcat -3'	Fwd 61 °C Rev 63 °C
mALOX5AP	5'-agcgtgggtccagaatgcg -3' 5'-gatccgcttgccgaagatgta -3'	Fwd 58 °C Rev 61 °C

### 2.1.7 Antikörper

#### Primäre Antikörper:

β-Actin (13E5) Rabbit mAb #4970	Cell Signaling, Danvers, USA
Anti-COX2 / Cyclooxygenase 2 antibody (ab15191), Rabbit pAb	Abcam, Cambridge, UK
Anti-FLAP antibody (ab85227), Rabbit pAb	Abcam, Cambridge, UK

#### Sekundärer Antikörper:

Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP	Dako, Hamburg, Deutschland
--------------------------------------	----------------------------

Tab. 3: Antikörper und zugehörige verwendete Konzentrationen

Anti-β-Actin	1 : 2000 in 5 % BSA/TBST
Anti-COX2	1 : 1000 in 5 % Milchpulver/TBST
Anti-FLAP	1 µg/ml in 5 % Milchpulver/TBST
Goat Anti-Rabbit	1 : 10000 in 5 % Milchpulver/TBST

## 2.1.8 Puffer und Lösungen

### 2.1.8.1 Proteingewinnung und -isolation

#### RIPA-Puffer:

1M Tris pH 8,8	5 ml
5M NaCl	3 ml
Triton™ X100	1 ml
10 % SDS/H <sub>2</sub> O	1 ml
H <sub>2</sub> O	90 ml

*Mittels HCl (1 N) wurde der Puffer auf einen pH von 7,2 eingestellt. Lagerung bei 4 °C. Vor dem Gebrauch wurden in 10 ml des RIPA-Puffers je eine Protease Inhibitor und eine PhosSTOP™ Tablette gelöst.*

### 2.1.8.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

#### 10 % SDS-Ladepuffer (Elektrodenpuffer):

SDS Pellets	10 g
Glycin	143 g
Tris	30,4 g
H <sub>2</sub> O	1000 ml

#### TBST 10x (Tris-buffered saline with Tween® 20):

NaCl	90 g
Tris	61 g (0,5 M)
Tween® 20	10 ml
H <sub>2</sub> O	1000 ml

#### 5 % Milchpulver/TBST:

Milchpulver	5 g
TBST 1x	100 ml

#### 5 % BSA/TBST:

BSA	5 g
TBST 1x	100 ml

### 2.1.8.3 Western Blot

#### Anodenpuffer A:

Methanol	100 ml
Tris Cl (1 M, pH 10,4)	12,5 ml (25 mM)
H <sub>2</sub> O	500 ml

#### Anodenpuffer B:

Methanol	100 ml
Tris Cl (1 M, pH 10,4)	150 ml (0,3 mM)
H <sub>2</sub> O	500 ml

#### Kathodenpuffer:

DL-Norleucin	2,63 g (40 mM)
Tris Cl (1 M, pH 9,4)	12,5 ml (25 mM)
H <sub>2</sub> O	500 ml

*Alle Puffer wurden im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt.*



## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Humane Kohorte**

#### **2.2.1.1 Gewinnung und Klassifizierung der Gewebeprobe**

Humanes Lebergewebe wurde von Patienten ohne NAFLD, mit einfacher Lebersteatose (NAFL) und nichtalkoholischer Steatohepatitis (NASH) gewonnen. Bei der Anamnese wurden Alkoholkonsum, Medikamente und Virusinfektionen als Ursache für eine Steatose ausgeschlossen. Chirurgische Eingriffe wurden aufgrund von Lebermetastasen extrahepatischer Tumoren (73 Patienten), fokaler nodulärer Hyperplasien (9 Patienten), Leberadenome (8 Patienten), cholangiozellulären Karzinomen (14 Patienten), HCC (12 Patienten) und anderen Erkrankungen (6 Patienten) durchgeführt, wobei nur nicht betroffenes Gewebe verwendet wurde. Das informierte Einverständnis der Patienten zur Verwendung der Lebergewebeprobe für Forschungszwecke wurde präoperativ schriftlich eingeholt. Die Verfahren wurden gemäß den Richtlinien der gemeinnützigen, staatlich kontrollierten Stiftung Human Tissue & Cell Research (HTCR) durchgeführt und von der Ethikkommission des Universitätsklinikums Regensburg genehmigt [95].

Die Lebergewebeprobe wurden histologisch durch das Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Regensburg auf Steatose, Inflammation und Fibrose untersucht. Der Steatosegrad wurde anhand der Menge an steatotischen Hepatozyten eingeteilt, wobei < 5 % dem Grad 0, 5 bis 33 % dem Grad 1, > 33 bis 66 % dem Grad 2 und > 66 % dem Grad 3 entsprachen. Inflammation wurde wie folgt bewertet: kein Herd pro 200x Sichtfeld (0), < 2 Herde pro 200x Sichtfeld (1), 2 bis 4 Herde pro 200x Sichtfeld (2) und > 4 Herde pro 200x Sichtfeld (3). Fibrose wurde definiert als keine Fibrose (0), Zone 3 perisinusoidale/perizelluläre Fibrose; fokal oder extensiv vorhanden (1), Zone 3 perisinusoidale/perizelluläre Fibrose mit fokaler oder extensiver periportaler Fibrose (2), Zone 3 perisinusoidale/perizelluläre Fibrose und portale Fibrose mit fokaler oder extensiver Brückenfibrose (3) und Zirrhose (4). Bei der Ballonierung von Hepatozyten wurde zwischen keine Ballonierung (0), wenige Ballonzellen (1) und viele Ballonzellen/prominente Ballonierung (2) unterschieden. Die Punktzahl für jedes Merkmal wurde gemäß dem NAFLD Activity Score (NAS) addiert. Patienten mit einer Punktzahl von 5 oder mehr wurden als an NASH leidend eingestuft [28]. Tabelle 4 schlüsselt die Kohorte anhand der genannten Klassifizierungen auf.

Tab. 4: Aufschlüsselung der Kohorte nach Alter, Grad der hepatischen Steatose, Inflammation, Fibrose, Ballonierung sowie dem NAS

Angegeben sind der Median sowie der minimale und maximale Wert innerhalb einer Gruppe.

	Normale Leber	Steatose	NASH
Patienten (♀/ ♂)	32 (15/17)	47 (21/26)	43 (25/18)
Alter in Jahren	58 (20 - 82)	60 (24 - 84)	65 (33 - 82)
Steatose	0 (0)	2 (1 - 3)	2 (1 - 3)
Inflammation	0 (0)	0 (0 - 2)	2 (1 - 3)
Fibrose	0 (0)	0 (0 - 4)	2 (0 - 3)
Ballonierung	0 (0)	1 (0 - 1)	2 (1 - 2)
NAS	0 (0)	2 (1 - 4)	6 (5 - 8)

### 2.2.1.2 Homogenisierung von Lebergewebe und RNA-Isolation

Die Lagerung der Lebergewebeproben erfolgte bei -80 °C. Vor dem Einfrieren wurden sie zur Stabilisation der enthaltenen RNA mit 1 ml RNAlater® behandelt. Die nachfolgende Homogenisierung und Isolation der RNA erfolgte mithilfe des RNeasy® Maxi Kits. Zunächst wurde das aufgetaute Gewebe gewogen, um die erforderlichen Mengen an RLT-Lysepuffer zu bestimmen. Anschließend wurden die Proben mit einem Skalpell zerkleinert, mit RLT-Puffer und 2-Mercaptoethanol (1 µl pro 1 ml RLT-Puffer) vermengt und in gentleMACS™ M Tubes überführt. Es folgte die Homogenisierung mithilfe des gentleMACS™ Tissue Dissociator. Die homogenisierten Lysate wurden nun bei 4500 x g für 20 min zentrifugiert. Der klare Überstand wurde abgenommen, in 50 ml Tubes überführt und zur Verbesserung der Bindungskapazität der in den Lysaten enthaltenen RNA mit 70%igem RNase-freiem Ethanol versetzt. Im Anschluss wurden die Ethanol-Lysat-Gemische auf die RNeasy® Columns pipettiert und für 5 min bei 3500 x g zentrifugiert. Falls sich noch Lysat-Rückstände auf der Säulenmembran befanden, wurde die Zentrifugation wiederholt. Das Flowthrough wurde in gesonderte Tubes überführt und bei -80 °C gelagert, sodass vorhandene Rest-RNA zu einem späteren Zeitpunkt erneut isolieren werden konnte. Die RNeasy® Columns wurden nun mit 7,5 ml RW1-Puffer gewaschen und für 5 min bei 3500 x g zentrifugiert. Das Flowthrough wurde abpipettiert. Um die bei der RNA-Isolation ebenfalls anfallende DNA aus dem Lysat zu entfernen, wurden je 210 µl RDD-Puffer mit 30 µl DNase vermischt und auf eine RNeasy® Column gegeben. Die Säulen wurden für 15 min inkubiert und im Anschluss mit 7,5 ml RW1-Puffer gewaschen. Die Proben wurden mit 3500 x g für 5 min zentrifugiert und das Flowthrough abgenommen. Nun wurden je

10 ml RPE-Puffer auf eine RNeasy® Column pipettiert, die Säulen bei 3500 x g für 2 min zentrifugiert und das Flowthrough entfernt. Es wurden erneut 10 ml RPE-Puffer hinzugegeben und die Säulen zum Trocknen der Membranen für 10 min bei 3500 x g zentrifugiert. Das Flowthrough wurde abermals verworfen. Die RNeasy® Columns wurden nun in neue Tubes überführt und zur Verflüchtigung etwaiger Ethanol-Reste für 3 min offengelassen. Zur Eluierung der RNA wurde je nach Gewebemenge 0,8 ml (< 300 mg Gewebe) beziehungsweise 1,2 ml (≥ 300 mg Gewebe) RNase-freies Wasser direkt auf die Membran pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 1 min wurden die RNeasy® Columns bei 3500 x g für 3 min zentrifugiert, wodurch die eluierte RNA aus den Membranen der Säulen gelöst und in Tubes überführt wurde. Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurde die RNA 1 : 100 mit RNase-freiem Wasser verdünnt und mit dem NanoDrop™ 2000 Spectrophometer vermessen. Der Rest des Isolats wurde bei -80 °C gelagert.

### **2.2.1.3 TaqMan-basierte semiquantitative RT-PCR**

Die Bestimmung der Expression von aus humanem Lebergewebe isolierter mRNA erfolgte mittels Biomark™ High-Throughput semiquantitativer RT-PCR und vorgefertigten TaqMan-Genexpressionsassays von Thermo Fisher gemäß den Anweisungen des Herstellers [96]. Tabelle 1 zeigt die Annealing-Temperaturen der verwendeten Primer. Die Daten wurden mit der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode analysiert und die Expressionswerte auf die Expressionsniveaus des Housekeeping-Gens (HPRT1) normalisiert [97, 98].

## **2.2.2 Zellkultur**

### **2.2.2.1 Zelllinien**

Im Rahmen der Arbeit kamen drei Zelllinien zum Einsatz: die Hepatoma-Zelllinien HepG2 und Huh7, sowie die von murinen Makrophagen abstammende RAW-264.7-Zelllinie. HepG2-Zellen wurden in einem Nährmedium aus DMEM mit 10 % FBS, 1 % MEM, 1 % L-Glutamin und 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert. Für die Huh7-Zellen wurde ebenfalls auf der Basis von DMEM ein Nährmedium mit 10 % FBS und 1 % Penicillin/Streptomycin hergestellt. Die Kultivierung der RAW-264.7-Zellen erfolgte in mit 5 % FBS und 1 % Penicillin/Streptomycin versetztem RPMI Medium. Alle Zelllinien mit Ausnahme von Huh7 wurden in Standard T75 TC Zellkulturflaschen mit den entsprechenden Kulturmedien bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Für die Huh7-

Zellen wurden Cell+ T75 TC Zellkulturflaschen mit einer speziellen Wachstumsfläche verwendet.

#### **2.2.2.2 Subkultivieren der Zelllinien**

Die Zellen wurden im Abstand von drei bis vier Tagen subkultiviert (i. e. Splitting). Hierfür wurde das gebrauchte Nährmedium aus den Zellkulturflaschen abgesaugt und die Zellen mit 5 ml vorgewärmtem PBS gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation der Zellen bei 37 °C mit 5 ml Trypsin-EDTA pro Flasche. Nach 5 min konnten die trypsinisierten Zellen dem Brutschrank entnommen und durch seitliches Klopfen vom Flaschenboden gelöst werden. Noch anhaftende Zellen wurden mit FBS-haltigem Kulturmedium vom Flaschenboden gespült, wodurch zudem die proteinspaltende Wirkung des Trypsins gestoppt wurde. Die Zellsuspension wurde sodann in eine 15 ml Schraubröhre überführt und für 5 min bei 300 x g zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das am Boden haftende Zellpellet in 1 ml Kulturmedium resuspendiert. Im Anschluss wurde ein der Splitting-Ratio entsprechendes Volumen der Zellsuspension entnommen und in eine mit 10 ml vorgewärmten Nährmedium gefüllte Zellkulturflasche gegeben. Die Hepatoma-Zelllinien HepG2 und Huh7 wurden im Verhältnis 1 : 3, RAW-264.7-Zellen im Verhältnis 1 : 8 subkultiviert.

#### **2.2.2.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Analog zu 2.2.2.2 wurde das verbrauchte Medium abgesaugt, die Zellen mithilfe von Trypsin vom Flaschenboden gelöst und bei 300 x g für 5 min zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 4 °C kaltem Einfriermedium resuspendiert und in Cyro.s™ Einfrierröhrchen aliquotiert. Das Einfriermedium setzte sich aus 70 % DMEM, 20 % FBS und 10 % DMSO zusammen. Anschließend wurden die Einfrierröhrchen in den mit Isopropanol befüllten Mr. Frosty™ Gefrierbehälter für 2 h bei -20 °C und über Nacht bei -80 °C gelagert. Zur Langzeitlagerung erfolgte am Folgetag die Überführung der Zellen in einen N<sub>2</sub>-Kyrocontainer.

Um gefrorene Zellen wieder aufzutauen, wurden sie in vorgewärmtes Zellkulturmedium gegeben. Anschließend konnte die Zellsuspension zentrifugiert, das Zellpellet in frischem Kulturmedium resuspendiert und die Zellen entsprechend den unter 2.2.2.1 gemachten Angaben kultiviert werden.

#### 2.2.2.4 Bestimmung der Zellzahl

Zellen wurden wie unter 2.2.2.2 beschrieben mit Trypsin vom Flaschenboden gelöst, abzentrifugiert und in 1 ml Kulturmedium resuspendiert. 10 µl der Zellsuspension wurden zu 90 µl des Farbstoffes Trypan Blue 0,2 % gegeben und durch Auf- und Abpipetieren vermischt. Anschließend wurden 10 µl der gefärbten Zellsuspension in eine C-Chip® Zählkammer pipettiert. Die Zählung erfolgte mäanderförmig in den äußeren vier Großquadranten analog dem Prinzip der Neubauer-Zählkammer. Durch die Färbung mit Trypan Blue 0,2 % ließen sich vitale, ungefärbte von abgestorbenen, gefärbten Zellen unterscheiden. Zur Berechnung der Anzahl vitaler Zellen pro ml wurde folgende Formel herangezogen.

$$\frac{\text{vitale Zellen} \times 10}{4 \times 10^{-4} \text{ ml}}$$

10 = Verdünnungsfaktor (90 µl Trypan Blue 0,2 %, 10 µl Zellsuspension)

4 = Anzahl der ausgezählten Großquadranten

10<sup>-4</sup> ml = Volumen der Neubauer Zählkammer pro Quadrant

#### 2.2.2.5 Aussäen der Zellen

Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen auf 6-Well-Platten mit jeweils 2 ml Nährmedium pro Well ausgesät. Die Anzahl der pro Well benötigten Zellen ergab sich aus den spezifischen Wachstumseigenschaften der Zelllinien und der Dauer der Versuche (Tab. 5). Zum Zeitpunkt der Behandlung wurde stets eine Konfluenz von 80 % angestrebt.

Tab. 5: Anzahl der Zellen pro Well in Abhängigkeit von Zelllinie und Inkubationszeit

HepG2, Huh7	500 000 Zellen pro Well	24 h
HepG2, Huh7	400 000 Zellen pro Well	48 h
RAW 264.7	75 000 Zellen pro Well	6 h

#### 2.2.2.6 Behandlung von Hepatoma-Zellen mit freien Fettsäuren

Hepatoma-Zellen wurden an Tag 1 auf 6-Well-Platten zu je 500 000 (Behandlungsdauer 24 h) beziehungsweise 400 000 (Behandlungsdauer 48 h) Zellen pro Well mit 2 ml des entsprechenden Kulturmediums ausgesät. Am Folgetag wurde ein Medien-

wechsel auf FBS-freies Nährmedium durchgeführt. Die eigentliche Stimulation der Zellen mit freien Fettsäuren erfolgte an Tag 3. In Isopropanol gelöste freie Fettsäuren wurden mit 1 % BSA-haltigem und FBS-freiem Kulturmedium gemischt und nach Absaugen des alten Mediums in unterschiedlichen Konzentrationen zu den Zellen gegeben. Die Versuche wurden einerseits mit Palmitat (PA) allein andererseits mit Oleat (OA) und Palmitat im physiologischen Verhältnis von 2 : 1 durchgeführt [99]. Zudem variierte die Dauer der Behandlung, sodass sich folgende Ansätze ergaben:

A) Behandlung mit Oleat und Palmitat für 24 h beziehungsweise 48 h:

Je zwei Wells einer 6-Well-Platte wurden mit 0,4 mM beziehungsweise 0,8 mM Oleat und Palmitat im Verhältnis 2 : 1 versetzt. Als Kontrolle wurden die übrigen zwei Wells mit Kulturmedium ohne freie Fettsäuren behandelt, das die im Mittel zur Lösung der freien Fettsäuren benötigte Menge an Isopropanol enthielt (Abb. 10).

B) Behandlung mit Palmitat für 24 h beziehungsweise 48 h:

Je zwei Wells einer 6-Well-Platte wurden mit 0,2 mM beziehungsweise 0,4 mM Palmitat behandelt. Als Kontrolle wurden die übrigen zwei Wells mit einem Kulturmedium ohne Palmitat inkubiert, das die im Mittel zur Lösung des Palmitats benötigte Menge an Isopropanol enthielt (Abb. 10).

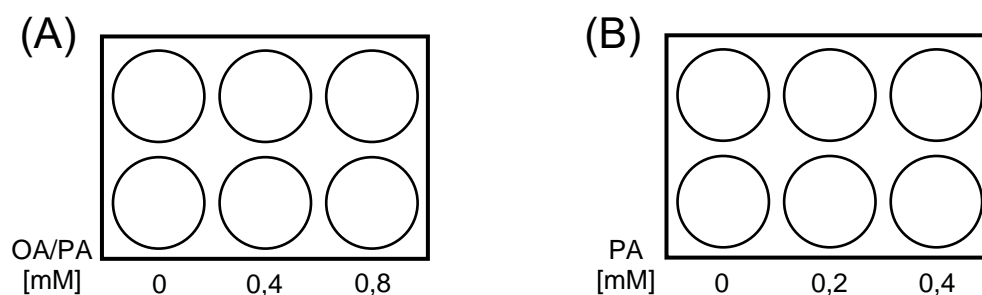


Abb. 10: Schematische Darstellung des *in vitro* Steatose-Modells

Behandlung von Zellen (A) mit OA und PA im Verhältnis 2 : 1 in den Konzentrationsstufen 0,4 mM und 0,8 mM beziehungsweise (B) mit PA allein in den Konzentrationsstufen 0,2 mM und 0,4 mM.

**2.2.2.7 Inkubation von RAW-264.7-Zellen mit konditioniertem Kulturmedium**

Huh7-Zellen wurden in dem unter 2.2.2.6 beschriebenen Modell mit Palmitat in den Konzentrationen 0,2 und 0,4 mM behandelt. Nach 24 h wurde das Huh7-Kulturmedium abgenommen. RAW-267.4-Zellen wurden anschließend in im Mischverhältnis 1 : 1 mit

RAW-264.7- Kulturmedium verdünntem konditionierten Huh7-Kulturmedium für 6 h inkubiert.

#### **2.2.2.8 RNA-Gewinnung und -Isolation aus kultivierten Zellen**

Die Kulturmedien wurden nach den Versuchen abgesaugt und die Zellen mit 1 ml PBS pro Well gewaschen. Das PBS wurde abgenommen und erneut 500 µl PBS zugegeben. Mithilfe von Zellschabern wurden die adhärennten Zellen vom Boden der Wells gelöst und in 1,5 ml SafeSeal® Reagiergefäße überführt. Nachdem die Cups für 4 min mit 1200 x g zentrifugiert wurden, wurde der Überstand abgesaugt und das am Boden der Gefäße haftende Zellpellet in 350 µl RLT-Puffer mit zwei Prozentigem 2-Mercaptoethanol gelöst. RLT-Puffer sowie sämtliche weitere für die RNA-Isolation benötigten Puffer entstammten dem Qiagen RNeasy® Mini Kit. Die in 350 µl RLT-Puffer gelösten Zellen wurden mit 350 µl 70%igem Ethanol verdünnt und in eine RNeasy® Spin-Column mit Collection Tube pipettiert. Nach Zentrifugation bei 8000 x g für 30 s wurde der in den Collection Tube aufgefangene Flowthrough verworfen und 350 µl RW1 Puffer auf die RNeasy® Spin-Column gegeben. Diese wurden abermals 30 s bei 8000 x g zentrifugiert. 10 µl DNase Stock wurden mit 70 µl RDD Puffer gemischt. Jeweils 80 µl dieser DNase-Lösung wurden nun auf die Membran einer RNeasy® Spin-Column gegeben. Nach 15-minütiger Inkubation erfolgte die erneute Zugabe von 350 µl RW1-Puffer und die Zentrifugation der Säulen für 30 s bei 8000 x g. Das Flowthrough wurde verworfen. Nun wurden 500 µl RPE-Puffer zupipettiert, die RNeasy® Spin-Columns 30 s bei 8000 x g zentrifugiert und das Flowthrough in den Collection Tubes verworfen. Nach Zugabe von 500 µl RPE-Puffer wurden die Säulen 2 min bei 8000 x g zentrifugiert. Das Flowthrough wurde abermals verworfen. Die RNeasy® Spin-Columns wurden nun mit neuem Sammelgefäß für 1 min bei 8000 x g zentrifugiert. Nachdem das Flowthrough mitsamt Sammelgefäß verworfen wurde, wurden die RNeasy® Spin-Columns in ein frisches 1,5 ml Eppendorf-Cup überführt und 30 µl RNase-freies Wasser direkt auf die Membran der Säulen pipettiert. Nach 2 min Inkubation wurden die RNeasy® Spin-Columns mitsamt Eppendorf-Cup für 1 min bei 8000 x g zentrifugiert, um die RNA zu eluieren. Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurden 1 µl des Isolats mit dem NanoDrop™ 2000 Spectrophometer vermessen. Der Rest der isolierten RNA wurde bei -80 °C gelagert.

### **2.2.2.9 Proteingewinnung und -Isolation**

Nach Beendigung der Zellkulturversuche wurde das Nährmedium aus den Wells abgenommen und die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen. Im Anschluss wurden 500 µl PBS in jedes Well gegeben und die adhärennten Zellen mithilfe eines Zellschabers vom Boden gelöst. Der Inhalt zweier Wells wurde nun in einem 1,5 ml Reagiergefäß für 4 min bei 1200 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 150 µl RIPA-Puffer gelöst. Zur Isolation der Proteine wurden die Lysate bei 4 °C und 14000 x g für 20 min zentrifugiert. Der das Proteinisolat enthaltende klare Überstand wurde abgenommen und bei -20 °C verwahrt.

### **2.2.2.10 Oil-Red-O-Färbung**

Mit freien Fettsäuren behandelte Hepatoma-Zellen wurden nach Aspirieren des Kulturmediums mit vorgewärmtem PBS gewaschen und mit einer 10%igen Formaldehydlösung für 5 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen mit 60%igem Isopropanol gewaschen. Es folgte die einstündige Inkubation mit dem in destilliertem H<sub>2</sub>O und Isopropanol gelöstem Farbstoff Oil Red O. Nach der Färbung wurden die Zellen unter dem Mikroskop begutachtet und fotografiert.

### **2.2.2.11 Vitalitätsprüfung (LDH-Release)**

Die Konzentration an freier extrazellulärer zytoplasmatischer Laktatdehydrogenase (LDH) in Kulturmedien gibt Aufschluss über die Integrität der Zellmembranen. Dazu wurden die Kulturmedien der einzelnen Wells aus den im Kapitel 2.2.2.6 beschriebenen Versuchen abgenommen und für 4 min bei 250 x g zentrifugiert. Jeweils 50 µl der Kulturmedien wurden in Triplikaten auf eine transparenten 96-Well-Platte pipettiert. Die enzymatische Analyse der LDH-Konzentration erfolgte mithilfe des *In Vitro* Toxicology Assay Kits. Dafür wurde zunächst ein Lactate Dehydrogenase Assay Mix aus LDH Assay Substrate Solution, LDH Assay Dye Solution und LDH Assay Coactor Preparation zu gleichen Teilen hergestellt. Jeweils 100 µl davon wurden pro Well zu den Kulturmedien gegeben. Nach Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur für 30 min, wurde die Reaktion durch die Zugabe von 15 µl HCl (1 N) beendet. Es folgte die Bestimmung der Lichtabsorption in den Wells bei 490 nm mithilfe des Tecan



GENios™ Plus Microplate Reader und der Magellan™ Data Analysis Software, woraus indirekt auf die LDH-Konzentrationen in den Kulturmedien geschlossen werden konnte.

Als Referenzwert für den LDH-Release wurde auch die Menge des gesamten (intra- und extrazellulären) LDH's bestimmt. Dafür wurden die Zellen eines Wells vor der Abnahme des Kulturmediums mithilfe der LDH Assay Lysis Solution (45 min, 37 °C) lysiert und im Anschluss die LDH-Konzentration photometrisch erfasst.

### **2.2.2.12 Bestimmung der mRNA-Expression**

#### **2.2.2.12.1 Reverse Transkription von RNA in cDNA**

Das Umschreiben der isolierten RNA in cDNA erfolgte unter Verwendung des QuantiTect® Reverse Transcription Kit. 1 µg RNA wurden zusammen mit 2 µl cDNA Wipeout Buffer in 0,2 ml Cups gegeben und mit RNase-freiem Wasser auf ein Endvolumen von 14 µl aufgefüllt. Nach einer zweiminütigen Inkubation bei 42 °C im Thermocycler TProfessional, wurden je Probe 6 µl einer auf Eis hergestellten Lösung aus 1 µl Reverse Transcriptase, 4 µl RT Buffer und 1µl RT Primer Mix zur verdünnten RNA gegeben. Für den anschließenden Umschreibeprozess wurden die Proben für 15 min bei 42 °C und sodann für weitere 3 min bei 95 °C inkubiert. Die gewonnene cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

#### **2.2.2.12.2 SYBR-Green-basierte semiquantitative RT-PCR**

Jedes Well einer LightCycler® 480 96-Well-Platte enthielt 10 µl LightCycler® 480 SYBR Green I Master, 7 µl H<sub>2</sub>O, 1 µl Primer Reverse und 1 µl Primer Forward sowie 1 µl cDNA. Die cDNA wurde in der Konzentration 25 ng/µl eingesetzt, hierfür musste sie nach dem Umschreiben 1 : 2 verdünnt werden. Alle Primer wurden in einer Endkonzentration von 10 µM verwendet. Als Negativkontrolle diente eine Probe aus destilliertem H<sub>2</sub>O und den entsprechenden Primern. Eine Verdünnungsreihe wurde zur Ermittlung einer Standardkurve und späteren Quantifizierung der Proben mitgeführt. Nach dem Einsetzen der Proben horizontal in Triplikaten wurde die 96-Well-Platte mit der LightCycler® 480 Sealing Foil versiegelt und für 2 min mit 3000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die 96-Well-Platte im LightCycler® 480 positioniert und der PCR-Lauf gestartet. Die Annealing-Temperaturen der verwendeten Primer finden sich in Tabelle 1 und 2. Mithilfe der LightCycler® 480 Software wurden die Werte der Läufe

analysiert und exportiert sowie Schmelzkurven zur Validierung der Amplifikationsprodukte erstellt. Die Daten wurden im Anschluss mit der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode ausgewertet und die Expressionswerte auf die Expressionsniveaus der Housekeeping-Gene (YWAZ,  $\beta$ -Actin) normalisiert.

### **2.2.2.13 Bestimmung der Proteinexpression**

#### **2.2.2.13.1 Bicinchoninic-Acid-Test**

Zur Konzentrationsbestimmung der Proteinisolate wurde das Uptima BC Assay Kit verwendet. Dafür wurden Proben des Isolats zunächst mit 50 mM Tris 1 : 20 verdünnt. Je 10  $\mu\text{l}$  eines BSA-Standards beziehungsweise der Proteinproben wurden vertikal in Triplikaten auf eine transparente 96-Well-Platte pipettiert. In jedes Well wurden 200  $\mu\text{l}$  BCA-Lösung bestehend aus Reagenz A und B im Verhältnis 1 : 50 gegeben und die Platte mit einer Schutzfolie abgedeckt. Nach Inkubation für 30 min bei 37 °C im Dunkeln wurde die Folie abgenommen und die Lichtabsorption der Proben zwischen 540 und 590 nm am Tecan GENios™ Plus Microplate Reader bestimmt. Mithilfe der Magellan™ Data Analysis Software konnte nun anhand der mitgeführten BSA-Standardverdünnungsreihe die Proteinkonzentration der Proben berechnet werden.

#### **2.2.2.13.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Je 30  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein wurden mit 5  $\mu\text{l}$  Laemmli Sample Buffer (2x) in ein 1,5 ml Reagiergefäß gegeben, mit Tris 50 mM auf ein Endvolumen von 20  $\mu\text{l}$  aufgefüllt und für 5 min bei 95 °C inkubiert. Danach wurden die Proben jeweils in eine Tasche eines Mini-Protean® TGX™ 12% Gels pipettiert, wobei sich das Gel in einer mit einprozentigem Elektrodenpuffer gefüllten Mini-Protean® Tetra Elektrophoresekammer befand. In nicht mit Protein befüllten Taschen wurden 10  $\mu\text{l}$  Laemmli zum Gewichtsausgleich gegeben. Außerdem wurde eine Tasche mit 10  $\mu\text{l}$  des Standards PageRuler™ Prestained Protein Ladder befüllt, um die Proteine nach der Elektrophorese ihren Molekülgrößen zuordnen zu können. Die Auftrennung erfolgte mit einer Stromspannung von 90 V.

### 2.2.2.13.3 Western Blot

Nach Laufende der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mussten die aufgetrennten Proteine zur weiteren Analyse aus dem Gel auf eine PVDF-Membran übertragen werden. Chromatographiepapier (Filterpapier) und PVDF-Membran wurden auf 6,5 cm x 9 cm zugeschnitten. Im Anschluss wurden die Filterpapiere nach dem Drei-Puffer-System in verschiedene Puffer getränkt. Je vier Filterpapiere wurden in Anodenpuffer B, zwei Stück in Anodenpuffer A und weitere vier Stück in Kathodenpuffer gegeben. Die PVDF-Membran wurde 5 min in Methanol equilibriert und dann in Anodenpuffer A getränkt. Filterpapiere, PVDF-Membran und das Gel wurden wie in Abbildung 11 dargestellt geschichtet und glattgestrichen.

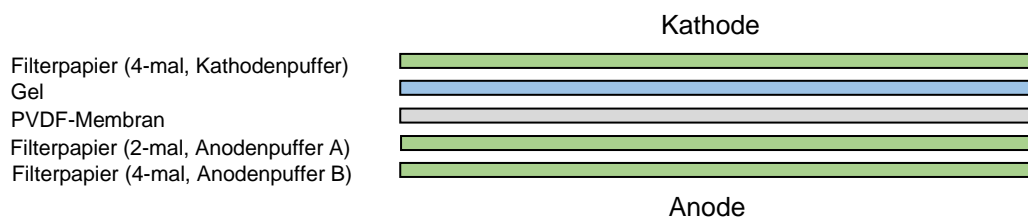


Abb. 11: Anordnung von Filterpapieren, Gel und PVDF-Membran im Blotting-Gerät

Die im Gel befindlichen aufgetrennten Proteine wurden nun durch den Trans-Blot<sup>®</sup> Turbo<sup>™</sup> auf die PVDF-Membran übertragen (i. e. Blotting). Dafür wurde für 40 min eine Stromspannung von 23 V und eine Stromstärke von 250 mA angelegt. PVDF-Membran und Gel wurden aus dem Blotting-Gerät entnommen, das Gel verworfen. Unspezifische Antikörperbindungsstellen auf der PVDF-Membran wurden für 1 h mit funfprozentigem Milchpulver/TBST geblockt. Es folgte die Inkubation der Membran mit den primären Antikörpern bei 4 C über Nacht. Tabelle 3 gibt einen Überblick über die verwendeten Konzentrationen. Am Folgetag wurde die PVDF-Membran dreimal für 5 min mit 1x TBST gewaschen. Der sekundäre Antikörper wurde zugegeben und die Membran bei Raumtemperatur für 50 min auf dem Schüttler inkubiert. Erneut wurde die Membran dreimal für 5 min mit 1x TBST gewaschen. Im Anschluss lie man die Membran abtropfen und behandelte sie für 5 min im Dunkeln mit dem Chemilumineszenz-Substrat Super Signal<sup>®</sup> West Femto. Die PVDF-Membran wurde nun in eine Klar-sichtfolie gelegt und die Protein-Standard-Molekülgrößen markiert. Die Detektion der Lumineszenz erfolgte durch den ImageQuant<sup>™</sup> LAS 4000 mini. Die ImageQuant<sup>™</sup> LAS 4000 Software diente der Auswertung der Blots.

Sollte die PVDF-Membran für weitere Analysen verwendet werden, wurden die ihr anhaftenden Antikörper durch 20-minütige Inkubation mit 10%iger Re-Blot™ Plus Mild Lösung entfernt (i. e. Stripping). Nach zweimaligem Waschen mit 1x TBST für 5 min und anschließendem zweimaligem Blocken der Membran mit fünfprozentigem Milchpulver/TBST für 5 min konnte sie mit einem neuen primären Antikörper inkubiert werden.

## **2.2.3 Statistische Auswertung**

### **2.2.3.1 Statistische Auswertung der semiquantitativen RT-PCR-Daten**

Die statistische Auswertung und grafische Darstellung der semiquantitativen RT-PCR-Daten erfolgten mit SPSS® und Microsoft Excel®. Für die Normierung wurden HPRT1 (humanes Lebergewebe), YWAHZ (HepG2, Huh7) beziehungsweise mβ-Actin (RAW 264.7) als Housekeeper-Gene verwendet. Die Box-Plot-Diagramme der humanen Kohorte zeigen den Median, das erste und dritte Quartil, das obere und untere Whisker sowie die Extremwerte der Datenreihen. Die mRNA-Expressionswerte einer ausgewählten Normallebergewebeprobe dienten als Referenzgröße. Bei den dargestellten Werten der Zellkulturversuche handelt es sich um Mittelwerte ± Standardabweichung. Die mRNA- und Proteinexpressionswerte der mit freien Fettsäuren behandelten Zellen wurden auf die Expressionswerte der Kontrollen (unbehandelte Zellen; in den Diagrammen als rote, gestrichelte Linie dargestellt) normalisiert. Die Daten wurden mittels einfaktorieller ANOVA nach Kruskal-Wallis und paarweiser Vergleiche mit post-hoc-Bonferroni-Korrektur (humane Kohorte) beziehungsweise Student's t-Test (HepG2, Huh7, RAW-264.7) auf statistische Signifikanz überprüft. Ein p-Wert < 0,05 galt als signifikant.

### **2.2.3.2 Statistische Auswertung der Western Blots**

Die densitometrische Auswertung der Western Blots erfolgte mithilfe der Software ImageJ [100]. Die statistische Analyse wurde mit Microsoft Excel® durchgeführt. B-Actin-Proteinexpression wurde zur Normalisierung verwendet. Die in den Diagrammen dargestellten Werte sind normalisierte Mittelwerte ± Standardabweichung. Signifikante Unterschiede wurden mittels Student's t-Test ermittelt, wobei ein p-Wert < 0,05 als signifikant galt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Analyse der mRNA-Expressionen von PLA2G4A, PTGS2, HPGDS und ALOX5AP im Lebergewebe von NAFLD-Patienten

In den dieser Arbeit vorangegangenen Microarray-Analysen fanden sich veränderte Genexpressionen von PLA2G4A, PTGS2, HPGDS und ALOX5AP im Lebergewebe von NAFLD-Patienten (n = 22). Zur Validierung der Ergebnisse sollten nun die mRNA-Expressionen dieser Gene anhand einer zahlenmäßig größeren, unabhängigen Kohorte (n = 122) mittels semiquantitativer RT-PCR untersucht werden. Humanes Lebergewebe wurde wie in 2.2.1.1 beschrieben von Patienten ohne NAFLD (n = 32), mit einfacher nichtalkoholischer Lebersteatose (n = 47) und nichtalkoholischer Steatohepatitis (n = 43) gewonnen. Die Einteilung in normales, NAFL- und NASH-Lebergewebe erfolgte anhand des NAFLD Activity Scores (NAS). Die Gesamt-RNA des Gewebes wurde isoliert und aufgereinigt. Im Anschluss folgte die Analyse der mRNA-Expressionen der Zielgene mittels semiquantitativer RT-PCR.

Die Expression von PLA2G4A-mRNA war sowohl im steatotischem als auch im Lebergewebe von NASH-Patienten unverändert (Abb. 12 A). Das Gen PTGS2 zeigte eine erhöhte relative mRNA-Expression in Lebergewebe von NASH-Patienten gegenüber normalem und steatotischem Lebergewebe (Abb. 12 B). In der statistischen Auswertung fand sich hier ein geschlechtsspezifischer Unterschied. Die mRNA-Expression von PTGS2 in NASH-Lebergewebe war nur bei weiblichen Patienten gegenüber steatotischem Gewebe erhöht (siehe Anhang; Abb. 26 B).

Die HPGDS-mRNA war bei Patienten mit NAFL geringer exprimiert als in gesundem Gewebe (Abb. 12 C). Bei geschlechtsspezifischer Auswertung fand sich dieser Effekt nur bei männlichen Patienten (siehe Anhang; Abb. 26 C). ALOX5AP wies in der Gesamtkohorte eine Erhöhung der relativen mRNA-Expression in NASH-Gewebe gegenüber normalem und steatotischem Lebergewebe auf (Abb. 12 D). Nach geschlechtsspezifischer Analyse der Daten fanden sich diese Unterschiede allerdings nur bei weiblichen Patienten wieder (siehe Anhang; Abb. 26 D).

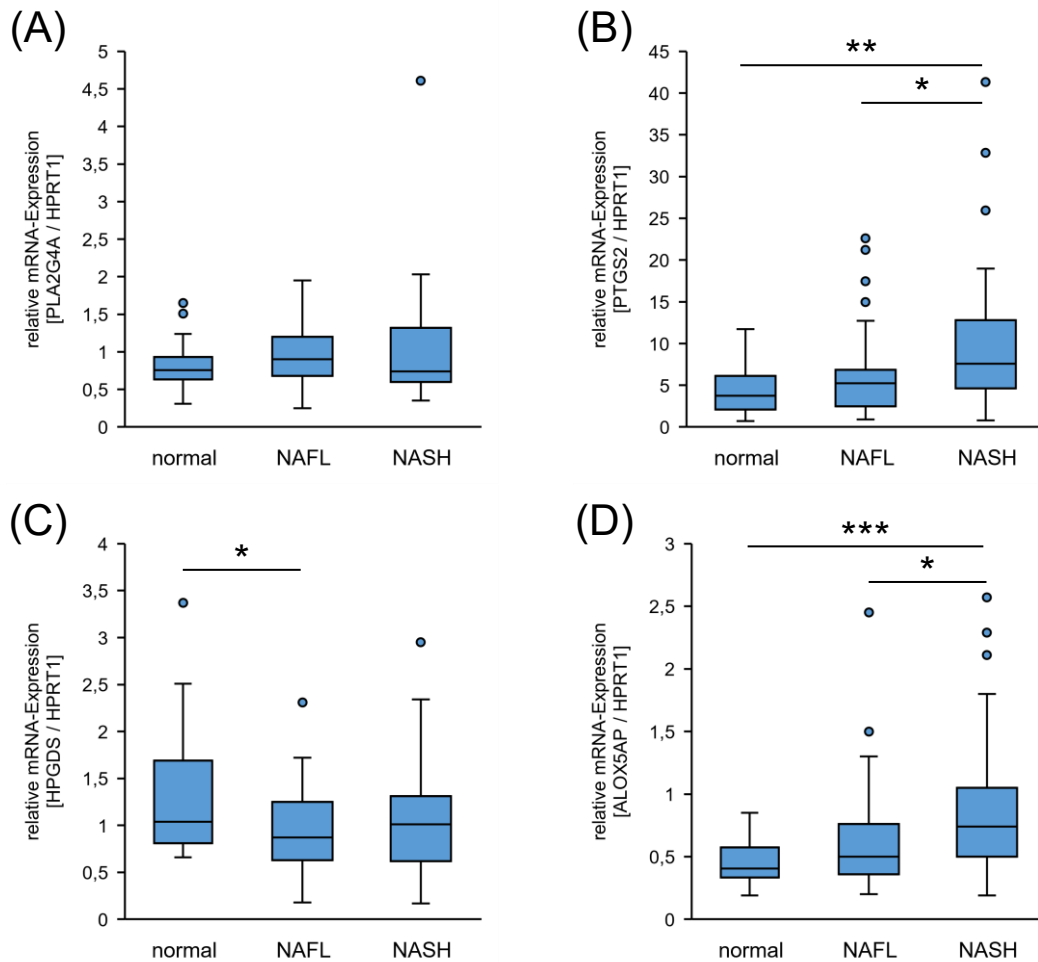
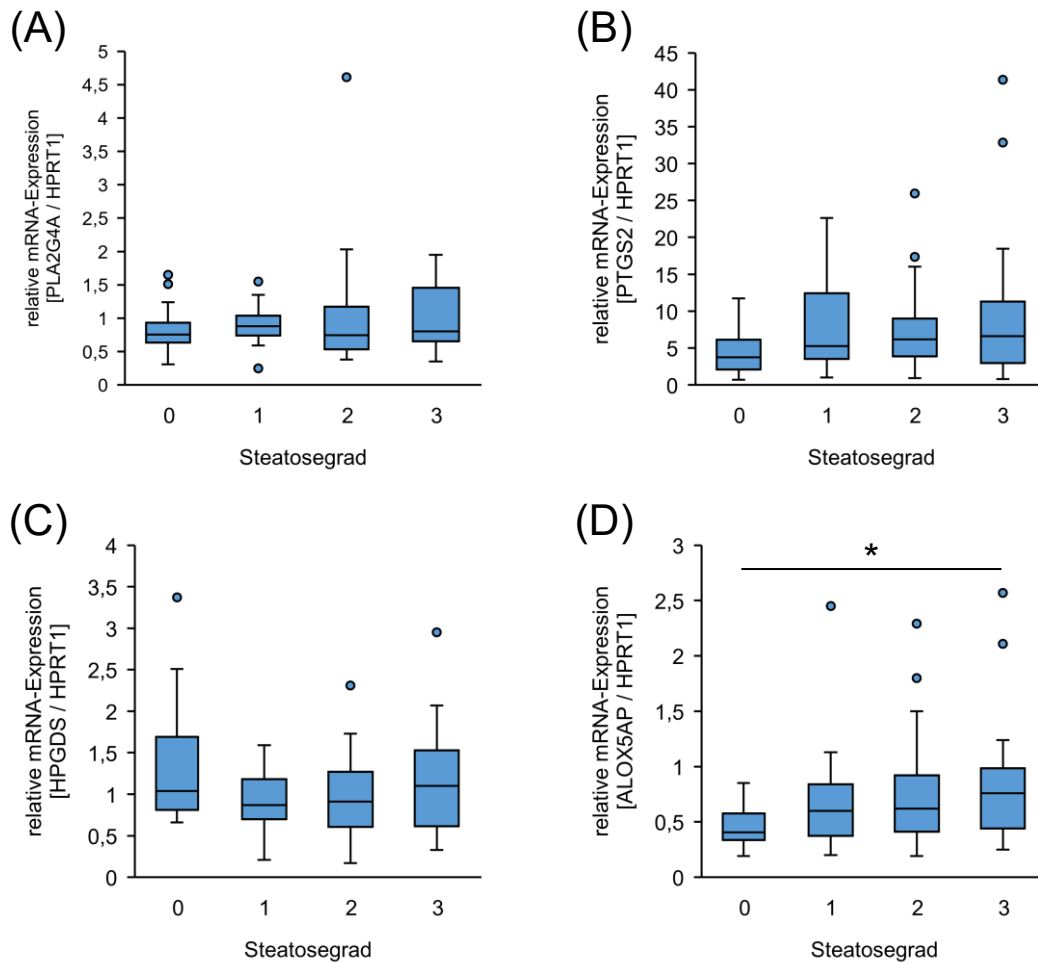


Abb. 12: Relative mRNA-Expressionen von PLA2G4A, PTGS2, HPGDS und ALOX5AP in normalem, NAFL- und NASH-Lebergewebe

Die mRNA-Expressionen von (A) PLA2G4A, (B) PTGS2, (C) HPGDS und (D) ALOX5AP wurden mittels semiquantitativer RT-PCR in Lebergewebe von Patienten mit NASH (n = 43), NAFL (n = 47) und normalem Lebergewebe (n = 32; HPGDS: n = 31) analysiert. Zur Normalisierung wurde die mRNA-Expression von HPRT1 verwendet. Statistische Unterschiede wurden mithilfe einfaktorier ANOVA nach Kruskal-Wallis und paarweiser Vergleiche mit post-hoc-Bonferroni-Korrektur bestimmt. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001.

Um weitere Einblicke zu bekommen, wurden die mRNA-Expressionen von PLA2G4A, PTGS2, HPGDS und ALOX5AP darüber hinaus mit den dem NAS zu Grunde liegenden histopathologischen Scores zur Beschreibung von hepatischer Steatose, Inflammation und Fibrose korreliert [28]. In Relation des Steatosegrads der Gewebeproben zeigten sich die Expressionen von PLA2G4A, PTGS2 und HPGDS unverändert (Abb. 13 A, B und C). Für ALOX5AP ergab sich ein signifikanter Anstieg der relativen mRNA-Expression bei Steatosegrad 3 gegenüber Steatosegrad 0 (Abb.13 D).



**Abb. 13: Korrelation der mRNA-Expressionen in Lebergewebe mit dem Steatosegrad**

Die mRNA-Expressionen von (A) PLA2G4A, (B) PTGS2, (C) HPGDS und (D) ALOX5AP wurden mittels semiquantitativer RT-PCR in Lebergewebe von Patienten mit NASH, NAFL und normalem Lebergewebe analysiert und mit dem Steatosegrad korreliert. Der Steatosegrad wurde anhand der Menge an steatotischen Hepatozyten in den Proben eingeteilt, wobei < 5 % dem Grad 0 (n = 32; HPGDS: n = 31), 5 bis 33 % dem Grad 1 (n = 25), > 33 bis 66 % dem Grad 2 (n = 44) und > 66 % dem Grad 3 (n = 21) entsprachen. HPRT1 wurde als Housekeeping-Gen zur Normalisierung der Daten verwendet. Statistische Unterschiede wurden mithilfe einfaktorier ANOVA nach Kruskal-Wallis und paarweiser Vergleiche mit post-hoc-Bonferroni-Korrektur berechnet. \* p < 0,05.

Bei einem Inflammationsgrad von 1 fand sich die relative mRNA-Expression des Gens PLA2G4A erhöht gegenüber Grad 0 (Abb. 14 A). PTGS2 und HPGDS waren dagegen bezogen auf die verschiedenen Inflammationsgrade der Gewebeproben nicht differentiell exprimiert (Abb. 14 B und C). Die relative mRNA-Expression von ALOX5AP zeigte sich bei Inflammationsgrad 1 und 3 im Vergleich zu inflammationsfreiem Gewebe erhöht, wobei die relative mRNA-Expression bei Inflammationsgrad 2 gegenüber Grad 1 signifikant vermindert war (Abb. 14 D).

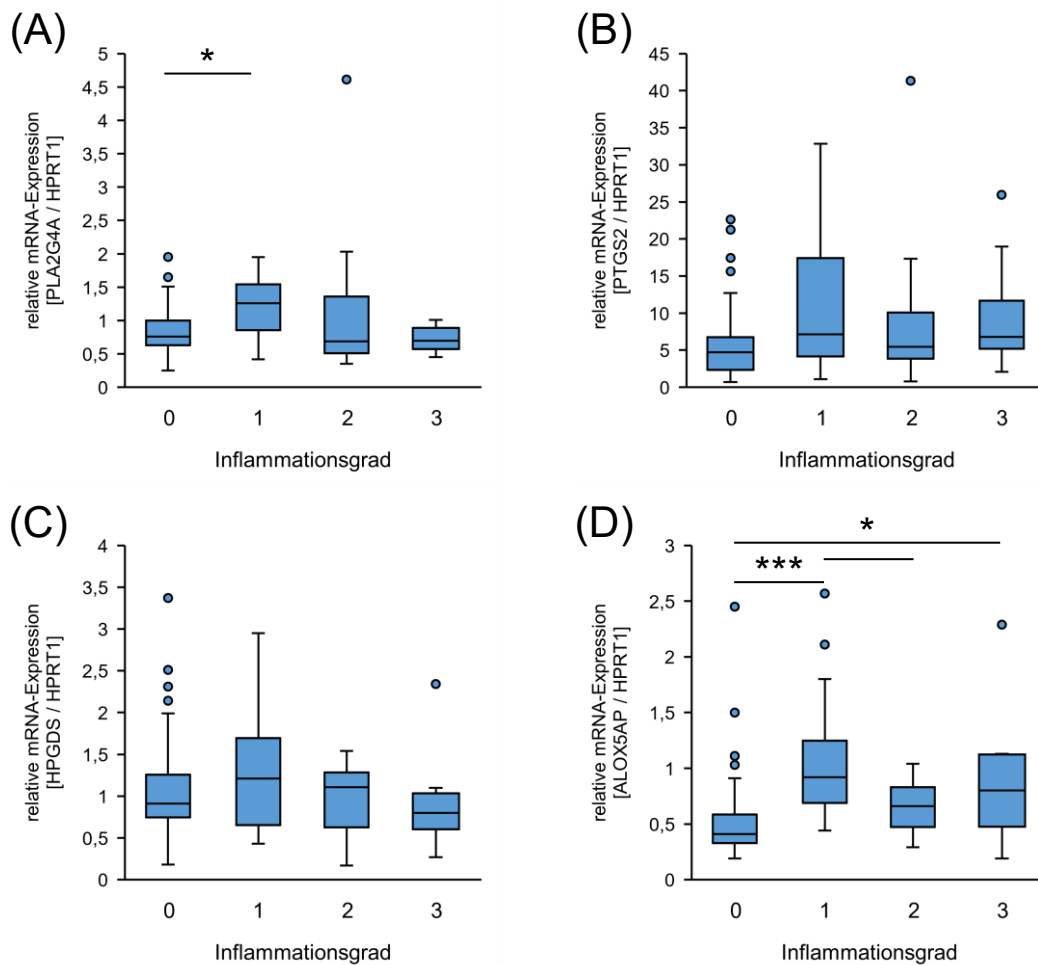


Abb. 14: Korrelation der mRNA-Expressionen in Lebergewebe mit dem Inflammationsgrad

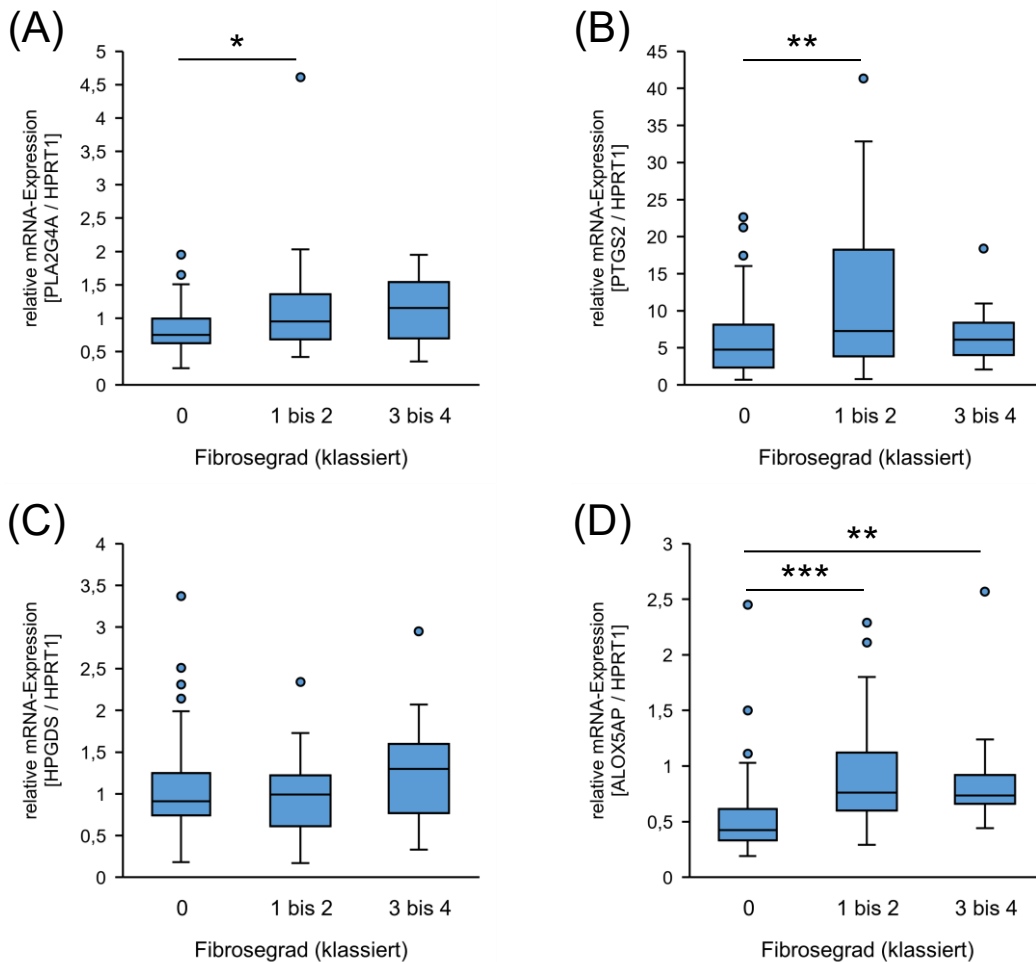
Die mRNA-Expressionen von (A) PLA2G4A, (B) PTGS2, (C) HPGDS und (D) ALOX5AP wurden mittels semiquantitativer RT-PCR in Lebergewebe von Patienten mit NASH, NAFL und normalem Lebergewebe bestimmt und mit dem Inflammationsgrad korreliert. Der Grad an Inflammation wurde wie folgt eingeteilt: kein Herd pro 200x Sichtfeld (0; n = 69; HPGDS: n = 68), < 2 Herde pro 200x Sichtfeld (1; n = 20), 2 bis 4 Herde pro 200x Sichtfeld (2; n = 22) und > 4 Herde pro 200x Sichtfeld (3; n = 10). HPRT1-mRNA wurde zur Normalisierung verwendet. Statistische Unterschiede wurden mittels einfaktorier ANOVA nach Kruskal-Wallis und paarweiser Vergleiche mit post-hoc-Bonferroni-Korrektur berechnet. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001.

Das Vorliegen von Fibrosegrad 1 bis 2 resultierte in einem Anstieg der relativen mRNA-Expression von PLA2G4A gegenüber Gewebeproben ohne Fibrose (Abb. 15 A). Zudem zeigte sich hier ein geschlechtsspezifischer Unterschied in der mRNA-Expression dieses Gens. Bei weiblichen Patienten war die mRNA-Expression von PLA2G4A in Gewebeproben mit Fibrosegrad 3 bis 4 gegenüber Fibrose-freiem Gewebe erhöht. In den Gewebeproben männlicher Patienten zeigte sich ein Anstieg der relativen mRNA-



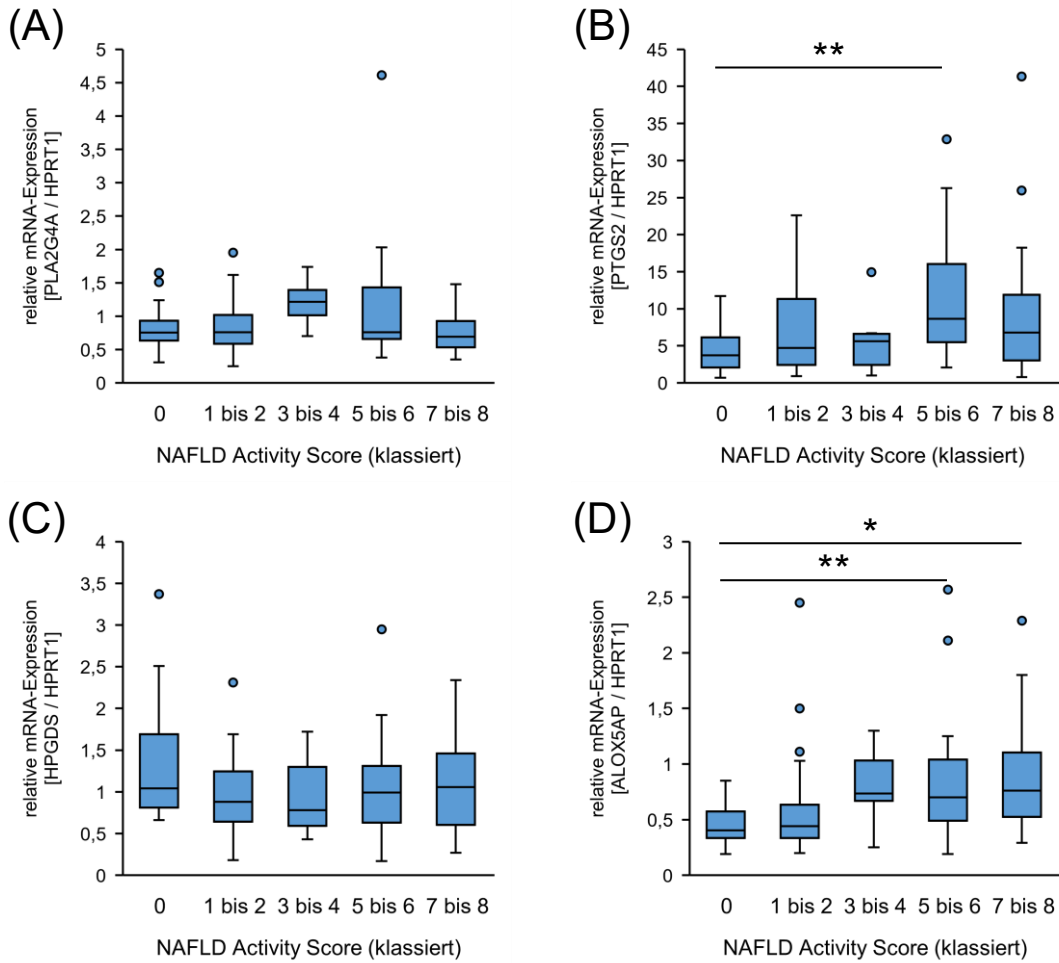
Expression von PLA2G4A bei Fibrosegrad 1 bis 2 gegenüber Fibrosegrad 0 (siehe Anhang; Abb. 27 A). PTGS2-mRNA war in Gewebeproben mit Fibrosegrad 1 bis 2 stärker exprimiert als in Proben ohne Fibrose (Abb. 15 B). Darüber hinaus fand sich bei weiblichen Patienten neben dem Anstieg der PTGS2-Expression bei Fibrosegrad 1 bis 2 gegenüber Fibrosegrad 0 eine verminderte Expression bei Fibrosegrad 3 bis 4 im Vergleich zu Fibrosegrad 1 bis 2. Bei männlichen Personen war die PTGS2-mRNA in Relation des Fibrosegrades der Lebergewebeproben hingegen unverändert (siehe Anhang; Abb. 27 B). HPGDS zeigte keine differentielle mRNA-Expression in Abhängigkeit der Fibrosierung des Lebergewebes (Abb. 15 C). Die mRNA-Expression von ALOX5AP war sowohl in Gewebe mit Fibrosegrad 1 bis 2 als auch Fibrosegrad 3 bis 4 gegenüber nicht fibrosiertem Lebergewebe erhöht (Abb. 15 D). Hier zeigte sich ebenfalls ein geschlechtsspezifischer Unterschied. Der Expressionsanstieg der ALOX5AP-mRNA in Gewebeproben mit Fibrosegrad 1 bis 2 und 3 bis 4 gegenüber nicht fibrosiertem Gewebe fand sich nur bei weiblichen Patienten. Bei männlichen Patienten war ALOX5AP in Relation des Fibrosegrads nicht differentiell exprimiert (siehe Anhang, Abb. 27 D).

Des Weiteren wurden die mRNA-Expressionen der Zielgene mit dem NAFLD Activity Score der Lebergewebeproben korreliert (Abb. 16). PLA2G4A und HPGDS zeigten keine veränderten mRNA-Expressionen in Abhängigkeit des NAS der Lebergewebeproben (Abb. 16 A und C). PTGS2-mRNA-Expression war in den Gewebeproben mit einem NAS von 5 bis 6 gegenüber Normalgewebe erhöht (Abb. 16 B). Ebenso fand sich ein Anstieg der mRNA-Expression von ALOX5AP in Gewebeproben mit einem NAS von 5 bis 6 und 7 bis 8 im Vergleich zu gesundem Lebergewebe (Abb. 16 D).



**Abb. 15: Korrelation der mRNA-Expressionen in Lebergewebe mit dem Fibrosegrad**

Die mRNA-Expressionen von (A) PLA2G4A, (B) PTGS2, (C) HPGDS und (D) ALOX5AP wurden mittels semiquantitativer RT-PCR in Lebergewebeproben von Patienten mit NASH, NAFL und normalem Lebergewebe analysiert und mit dem Fibrosegrad der Proben korreliert. Hepatische Fibrose wurde eingeteilt in „keine Fibrose“ (0), „Zone 3 perisinusoidale/perizelluläre Fibrose; fokal oder extensiv vorhanden“ (1), „Zone 3 perisinusoidale/perizelluläre Fibrose mit fokaler oder extensiver periportaler Fibrose“ (2), „Zone 3 perisinusoidale/perizelluläre Fibrose und portale Fibrose mit fokaler oder extensiver Brückenfibrose“ (3) und „Zirrhose“ (4). Es erfolgte eine Klassierung in Grad 0 (n = 76; HPGDS: n = 75), Grad 1 bis 2 (n = 27) und Grad 3 bis 4 (n = 16). Zur Normalisierung wurde das Housekeeping-Gen HPRT1 verwendet. Statistische Unterschiede wurden mittels einfaktorier ANOVA nach Kruskal-Wallis und paarweiser Vergleiche mit post-hoc-Bonferroni-Korrektur bestimmt. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001.



**Abb. 16: Korrelation der mRNA-Expressionen in Lebergewebe mit dem NAS**

Die mRNA-Expressionen von (A) PLA2G4A, (B) PTGS2, (C) HPGDS und (D) ALOX5AP wurden mittels semiquantitativer RT-PCR in Lebergewebe von Patienten mit NASH, NAFL und normalem Lebergewebe bestimmt und mit dem NAFLD Activity Score (NAS) korreliert. Der NAS ergibt sich aus der Summe der histopathologischen Scores für hepatische Steatose, Inflammation, Fibrose und Ballonierung. Gewebe mit einem Score von 5 oder mehr wird als NASH eingestuft [28]. Es erfolgte eine Klassierung in NAS 0 (n = 32; HPGDS: n = 31), 1 bis 2 (n = 37), 3 bis 4 (n = 10), 5 bis 6 (n = 27) und 7 bis 8 (n = 16). HPRT1-mRNA wurde zur Normalisierung verwendet. Statistische Unterschiede wurden mittels einfaktorier ANOVA nach Kruskal-Wallis und paarweiser Vergleiche mit post-hoc-Bonferroni-Korrektur berechnet. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01.

## **3.2 Analyse der mRNA-Expressionen von PLA2G4A, PTGS2, HPGDS und ALOX5AP in einem *in vitro* Steatose-Modell mit Hepatoma-Zellen**

### **3.2.1 Etablierung des *in vitro* Modells der hepatischen Steatose**

Die Validierung der mRNA-Expressionsprofile an der ausgewählten Patientenkohorte bestätigte für PTGS2, HPGDS und ALOX5AP, jedoch nicht für PLA2G4A, eine differentielle Regulation bei NAFLD. Zur weiteren Evaluierung sollten die Genexpressionen in einem *in vitro* Modell der hepatischen Steatose untersucht werden. Ein histologisches Hauptmerkmal der NAFLD ist die makrovesikuläre Steatose in mehr als 5 % der Hepatozyten [22]. Dies ist die Folge einer systemisch erhöhten Konzentration freier Fettsäuren, welche zur kompensatorischen Bildung von TAGs führt, die als Lipidtröpfchen akkumuliert in den Hepatozyten mikroskopisch sichtbar sind (siehe Kap. 1.2.3; Abb. 2). Um diesen Zustand in einem Zellkulturmodell zu simulieren, wurden dem Nährmedium von Hepatoma-Zellen freie Fettsäuren hinzugefügt. Die Zellen wurden mit einem Gemisch aus Oleat und Palmitat im Verhältnis 2 : 1 in den Konzentrationen 0,4 mM und 0,8 mM oder mit Palmitat allein in den Konzentrationen 0,2 mM und 0,4 mM für jeweils 24 h beziehungsweise 48 h inkubiert (siehe Kap. 2.2.2.6). Anschließend wurden die Zellen wie unter 2.2.2.10 beschrieben mit dem lipophilen Farbstoff Oil Red O gefärbt, um etwaige Lipidakkumulationen und Fettvakuolen darzustellen. Abbildung 17 zeigt die Mikroskop-Aufnahmen der gefärbten Zellen. Im Vergleich zu den als Kontrolle mitgeführten unbehandelten Hepatoma-Zellen sind die mit Fettsäuren behandelten Zellen intensiver rot gefärbt. Zudem finden sich intrazelluläre Fettvakuolen wie sie auch das histologische Bild der NAFLD prägen [9].

Eine einfache hepatische Steatose (NAFL) gilt noch als gutartiger Zustand [23, 27, 36]. Anhaltende pathologische Reize führen allerdings zur Entwicklung einer Steatohepatitis (NASH), aus der Leberzirrhose und HCC hervorgehen können. Der Übergang von NAFL zu NASH ist ein „Kipppunkt“ der NAFLD [101]. Interessanterweise zeigten sich in Kapitel 3.1 die differentiellen mRNA-Expressionen von PTGS2 und ALOX5AP ausschließlich in Lebergewebeproben von NASH-Patienten. Um also den prognosebestimmenden Schritt von NAFL zu NASH im Zellkulturmodell zu simulieren und aussagekräftige mRNA-Expressionen der Zielgene *in vitro* messen zu können, war es deshalb notwendig die Hepatoma-Zellen einem ausreichenden Zellstress auszusetzen.

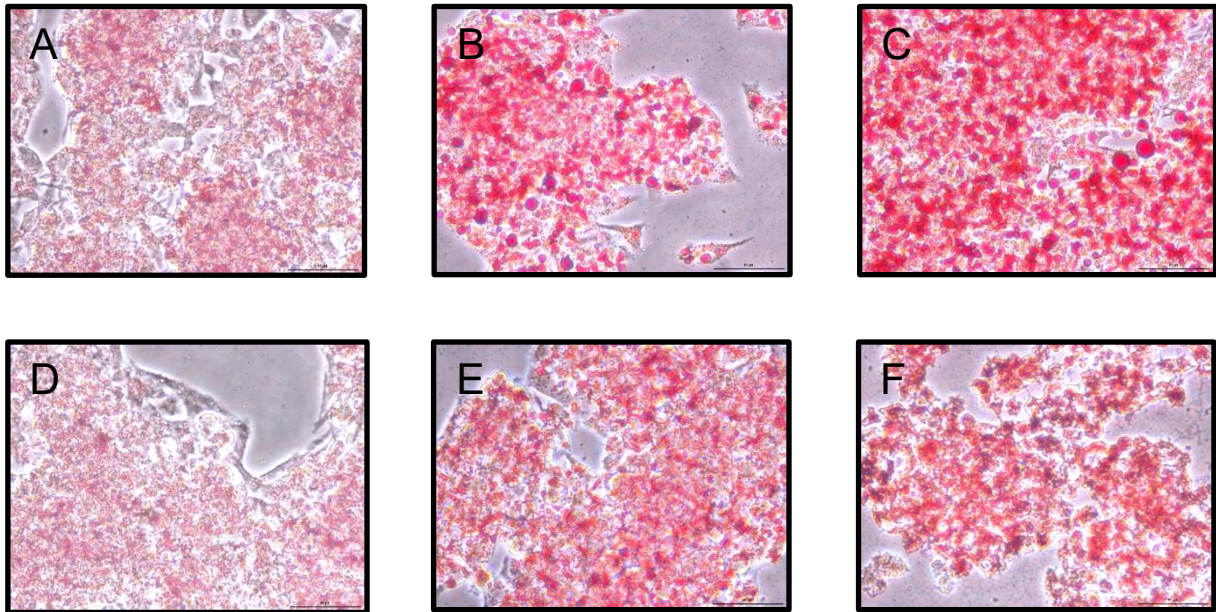
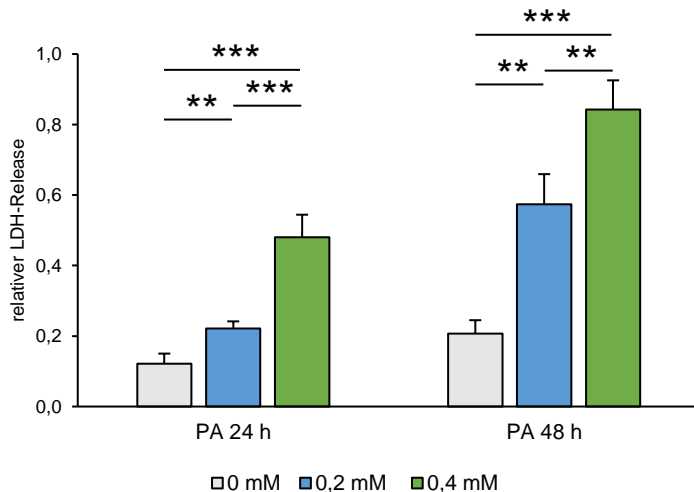


Abb. 17: Oil-Red-O-gefärbte HepG2-Zellen 24 h nach Inkubation mit OA/PA beziehungsweise PA  
 HepG2-Zellen wurden für 24 h (A) mit 0 mM, (B) 0,4 mM und (C) 0,8 mM OA/PA (2/1) beziehungsweise (D) mit 0 mM, (E) 0,2 mM und (F) 0,4 mM PA inkubiert. Sodann wurden sie mit dem lipophilen Farbstoff Oil Red O gefärbt und bei 400-facher Vergrößerung fotografiert.

Die Konzentration von Palmitat spielte hierbei eine entscheidende Rolle. Gesättigte Fettsäuren wie Palmitat sind zelltoxisch und werden mit der NASH-Pathogenese in Verbindung gebracht [23, 102, 103]. Ziel war es einerseits einen möglichst starken Effekt auf die Hepatoma-Zellen auszuüben, andererseits sollte die Toxizität von Palmitat nicht verstärkt zum Zelltod führen. Um dieses Problem zu lösen, wurden Hepatoma-Zellen für 24 h beziehungsweise 48 h mit Palmitat inkubiert. Es folgte die photometrische Bestimmung der Konzentration freier zytoplasmatischer Laktatdehydrogenase in den Kulturmedien. Die Konzentration an extrazellulärer, zytoplasmatischer LDH (LDH-Release) erlaubte indirekt eine Aussage über die Integrität der Zellmembranen der kultivierten Zellen und diente somit als Maß für die Zytotoxizität von Palmitat. Abbildung 18 stellt den relativen LDH-Release von mit Palmitat behandelten HepG2-Zellen dar. Es zeigte sich ein dosis- und zeitabhängiger Anstieg der relativen LDH-Konzentration in den Kulturmedien durch Palmitat. Ein Wert von 1,0 auf der Ordinateachse entspricht der Menge an zytoplasmatischer LDH, die bei einer vollständigen Lyse der Zellkultur frei wird. Trotz der Zytotoxizität von Palmitat befindet sich das Modell noch in einem für Hepatoma-Zellen sublethalen Bereich, ähnlich den Bedingungen, denen Hepatozyten am Übergang von NAFL zu NASH ausgesetzt sind [104].



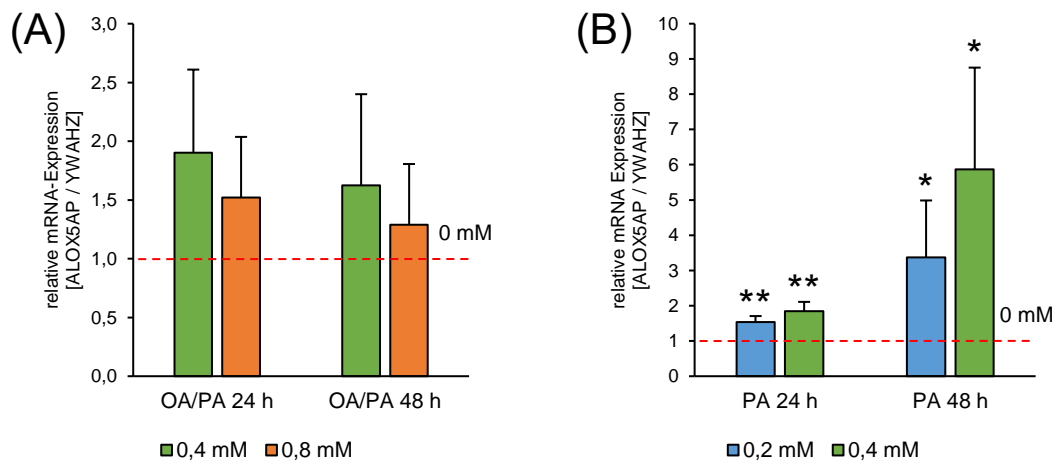
**Abb. 18: Relativer LDH-Release von HepG2-Zellen nach Inkubation mit PA**

HepG2-Zellen wurden mit 0 mM, 0,2 mM und 0,4 mM PA für 24 h beziehungsweise 48 h inkubiert (n = 4). Als Maß für die Integrität der Zellmembranen wurde die Konzentration an freier, extrazellulärer, zytoplasmatischer LDH in den Kulturmedien (LDH-Release) photometrisch bestimmt. Ein relativer LDH-Release von 1,0 entspricht einer vollständigen Lyse aller Zellen. Statistische Unterschiede wurden mithilfe des Student's t-Test bestimmt. \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001.

### **3.2.2 Analyse der mRNA-Expressionen von PLA2G4A, PTGS2, HPGDS und ALOX5AP in einem *in vitro* Steatose-Modell mit HepG2-Zellen**

HepG2-Zellen wurden für 24 h beziehungsweise 48 h mit freien Fettsäuren in unterschiedlichen Konzentrationen behandelt. Die Zellen wurden geerntet, ihre mRNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde die Genexpression von PLA2G4A, PTGS2, HPGDS und ALOX5AP mittels semiquantitativer RT-PCR bestimmt und statistisch ausgewertet.

Die mRNA-Expressionen von PLA2G4A, PTGS2 und HPGDS waren weder in den mit freien Fettsäuren behandelten noch in den zur Kontrolle mitgeführten unbehandelten HepG2-Zellen messbar. Eine statistische Auswertung war daher nicht möglich. Für das Gen ALOX5AP konnten ausreichende mRNA-Expressionslevel gemessen werden. In den mit Oleat und Palmitat im Verhältnis 2 : 1 behandelten HepG2-Zellen, fand sich keine veränderte Expression der ALOX5AP-mRNA gegenüber unbehandelten Zellen (Abb. 19 A). In mit Palmitat allein behandelten HepG2-Zellen war jedoch ein im Vergleich zur Kontrolle (0 mM Palmitat) signifikanter Anstieg der relativen mRNA-Expression von ALOX5AP zu erkennen. Dies galt sowohl für die 24-stündige als auch für die 48-stündige Inkubation (Abb. 19 B).



**Abb. 19: Relative mRNA-Expression von ALOX5AP in HepG2 nach Inkubation mit FFA**

HepG2-Zellen wurden (A) mit 0,4 mM und 0,8 mM OA/PA (2/1; n = 3) und (B) mit 0,2 mM und 0,4 mM PA (n = 4) für 24 h beziehungsweise 48 h inkubiert. Die mRNA-Expression von ALOX5AP wurde mittels semiquantitativer RT-PCR analysiert. YWAHZ-mRNA-Expression wurde zur Normalisierung verwendet. Zudem erfolgte eine Normierung der Daten auf die mitgeführten Kontrollen (0 mM FFA). Statistische Unterschiede wurden mithilfe des Student's t-Test bestimmt. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01: signifikanter Unterschied zur Kontrolle (0 mM PA).

### 3.2.3 Analyse der Expressionen von PLA2G4A, PTGS2, HPGDS und ALOX5AP in einem *in vitro* Steatose-Modell mit Huh7-Zellen

Huh7-Zellen wurden mit 0,2 mM und 0,4 mM Palmitat für 24 h beziehungsweise 48 h behandelt. Nach der Inkubation wurde die mRNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und die Expressionen von PLA2G4A, PTGS2, HPGDS und ALOX5AP mittels semiquantitativer RT-PCR analysiert und statistisch ausgewertet.

Im Gegensatz zu den im vorangehenden Kapitel beschriebenen Versuchen mit HepG2-Zellen war hier für alle vier Zielgene eine suffiziente mRNA-Expression messbar. PLA2G4A-mRNA zeigte nach 24-stündiger Palmitat-Exposition keine differentielle Expression in Huh7-Zellen gegenüber der Kontrolle (0 mM Palmitat). Dies galt sowohl für 0,2 mM als auch 0,4 mM Palmitat. Eine Inkubationszeit von 48 h resultierte in einer Reduktion der relativen mRNA-Expression, die bei gleichbleibender Inkubationszeit und 0,4 mM signifikant stärker ausfiel (Abb. 20 A). Die Analyse der mRNA-Expression von PTGS2 ergab sowohl bei 24- als auch 48-stündiger Inkubation einen relativen Anstieg durch 0,2 mM Palmitat. Dieser war bei gleicher Expositionszeit und 0,4 mM aus-

geprägter als bei 0,2 mM Palmitat (Abb. 20 B). HPGDS zeigte in beide Konzentrationen eine Verminderung seiner relativen mRNA-Expression. Dies galt sowohl für die 24- als auch für die 48-stündigen Versuche (Abb. 20 C). Eine Inkubation mit Palmitat führte zu einer erhöhten mRNA-Expression von ALOX5AP. Diese fand sich sowohl bei 24- als auch 48-stündige Inkubation, sowie verstärkt bei 0,4 mM Palmitat (Abb. 20 D).

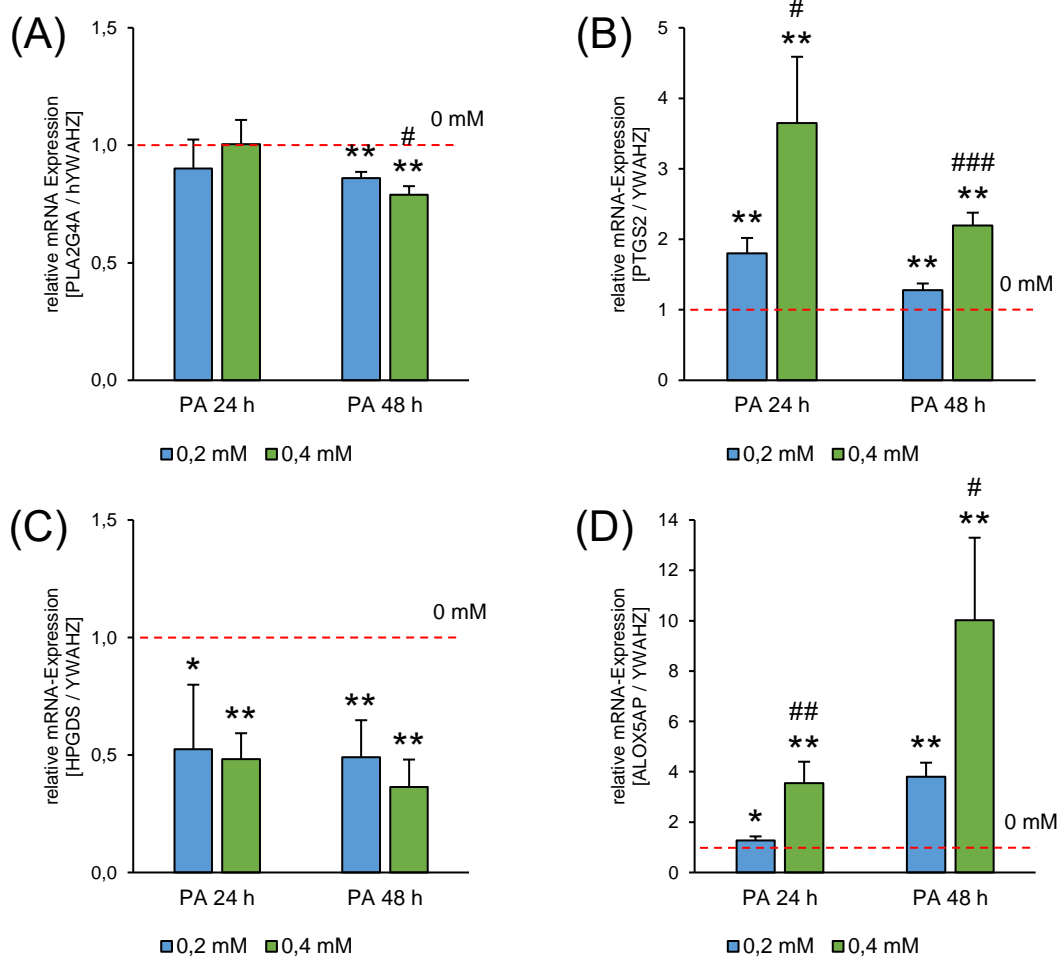
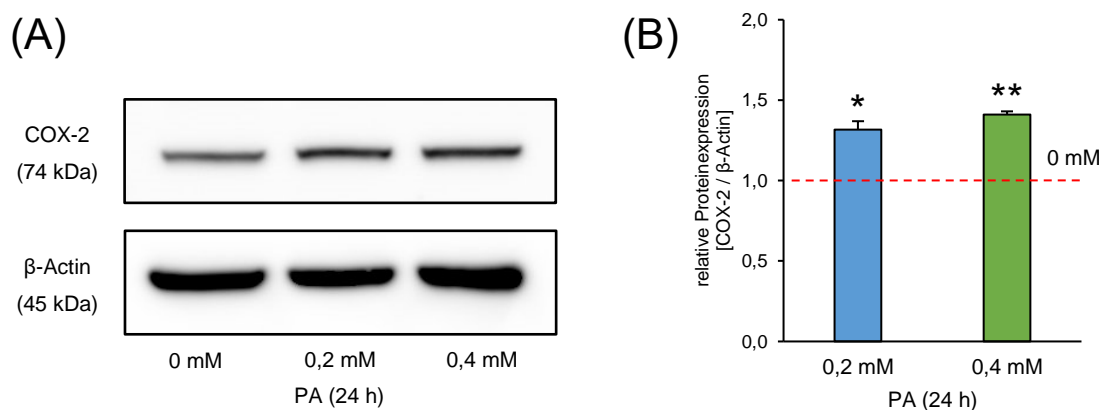


Abb. 20: Relative mRNA-Expressionen von PLA2G4A, PTGS2, HPGDS und ALOX5AP in Huh7 nach Inkubation mit PA

Huh7-Zellen wurden mit 0,2 mM und 0,4 mM PA für 24 h beziehungsweise 48 h inkubiert (n = 4). Die mRNA-Expressionen von (A) PLA2G4A, (B) PTGS2, (C) HPGDS und (D) ALOX5AP wurden mittels semiquantitativer RT-PCR bestimmt. YWAHZ wurde als Housekeeping-Gen verwendet. Zudem erfolgte eine Normierung auf die Kontrollen (0 mM PA). Statistische Unterschiede wurden mit dem Student's t-Test berechnet. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01: signifikanter Unterschied zur Kontrolle (0 mM PA); # p < 0,05; ## p < 0,01; ### p < 0,001: signifikanter Unterschied zu 0,2 mM PA.

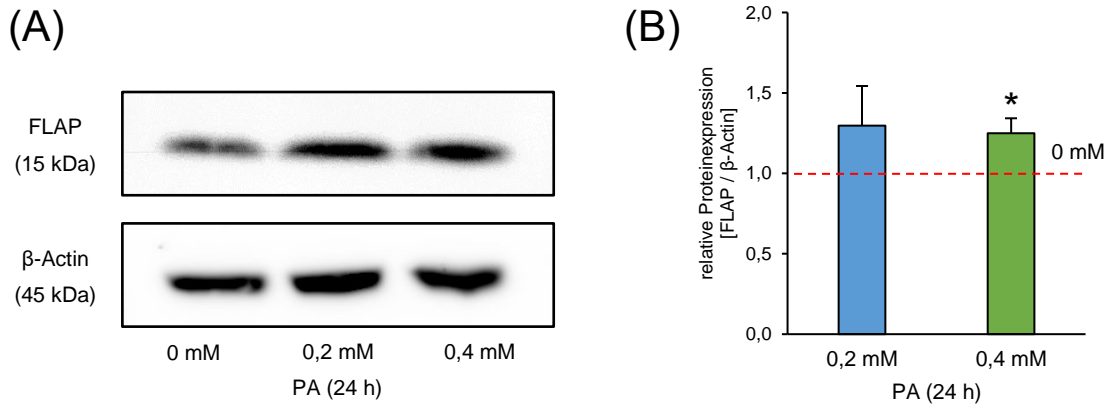


PTGS2 und ALOX5AP zeigten in Lebergewebe von NASH-Patienten einen deutlichen Anstieg der mRNA-Expressionen gegenüber normalem und NAFL-Lebergewebe (siehe Kap. 3.1; Abb. 12). Dieses Bild bestätigte sich *in vitro*: Nach 24-stündiger Inkubation mit Palmitat fand sich bei beiden Genen eine etwa vierfache Steigerung der relativen mRNA-Expressionen in Huh7-Zellen (Abb. 20). Folglich sollten in einem weiterführenden Schritt auch die Proteinexpressionen dieser Gene im Zellkulturmodell der hepatischen Steatose analysiert werden. Hierfür wurden die Proteinlysate von mit Palmitat behandelten Huh7-Zellen mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Expressionen der spezifischen Proteine COX-2 (PTGS2) und FLAP (ALOX5AP) mithilfe des Western-Blot-Verfahrens (Immunoblot) nachgewiesen. Für beide Proteine ergab sich kongruent zu den Ergebnissen der semiquantitativen RT-PCR-Analysen ein relativer Expressionsanstieg in Huh7-Zellen durch die Behandlung mit Palmitat. Abbildungen 21 und 22 zeigen jeweils einen repräsentativen Blot, sowie die densitometrische Auswertung der Analysen.



**Abb. 21: Proteinexpression von COX-2 in Huh7 nach Inkubation mit PA für 24 h**

Huh7-Zellen wurden mit 0,2 mM und 0,4 mM PA für 24 h behandelt (n = 3). Die Proteinexpression von COX-2 (PTGS2) wurde (A) mittels Western-Blot-Verfahren analysiert (ein repräsentativer Blot ist gezeigt) und (B) densitometrisch ausgewertet. Die Proteinexpression von β-Actin wurde als Ladekontrolle und zur Normalisierung verwendet. Zudem wurden die Daten auf die Kontrolle (0 mM PA) normiert. Statistische Unterschiede wurden mithilfe des Student's t-Test berechnet. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01: signifikanter Unterschied zur Kontrolle (0 mM PA).



**Abb. 22: Proteinexpression von FLAP in Huh7 nach Inkubation mit PA für 24 h**

Huh7-Zellen wurden mit 0,2 mM und 0,4 mM PA für 24 h behandelt (n = 3). Die Proteinexpression von FLAP (ALOX5AP) wurde (A) mittels Western-Blot-Verfahren analysiert (ein repräsentativer Blot ist gezeigt) und (B) densitometrisch ausgewertet. β-Actin-Proteinexpression wurde als Ladekontrolle und zur Normalisierung verwendet. Zudem wurden die Daten auf die Kontrolle (0 mM PA) normiert. Statistische Unterschiede wurden mit dem Student's t-Test berechnet. \* p < 0,05: signifikanter Unterschied zur Kontrolle (0 mM PA).

### 3.3 Analyse der mRNA-Expressionen von mPLA2G4A, mPTGS2, mHPGDS und mALOX5AP in einem *in vitro* Steatose-Modell mit murinen Makrophagen

#### 3.3.1 Erweiterung des *in vitro* Steatose-Modells

Sowohl die Microarray-Analysen der initialen Kohorte als auch die semiquantitativen RT-PCR-Untersuchungen der humanen Kohorte dieser Arbeit (siehe Kap. 3.1) wurden an Gesamtlebergewebe durchgeführt. Hepatozyten (parenchymale Leberzellen) sind die primäre Zellpopulation der Leber. Sie machen den Großteil des Lebervolumens aus und erfüllen eine Vielzahl der Funktionen, die der Leber zugeschrieben werden [4]. Das humane Lebergewebe beinhaltet allerdings auch eine Reihe weiterer, nicht-parenchymaler Zelltypen. Auch diese sind einer intrahepatischen Anreicherung freier Fettsäuren ausgesetzt und könnten daher für die im NAFLD-Gesamtlebergewebe gemessenen differentiellen Genexpression verantwortlich sein. Insbesondere in die Leber infiltrierende oder sesshafte Makrophagen (in der Leber auch Kupffer-Zellen genannt) sind in diesem Kontext von Bedeutung. Makrophagen sind Teil des angeborenen zellulären Immunsystems [2]. Ihr gehäuftes Auftreten in steatotischem Lebergewebe gilt als eines der histopathologischen Merkmale der NASH [23]. Zudem spielen

sie eine bedeutende Rolle in der Biosynthese von Eicosanoiden [57, 105]. Vor dem Hintergrund aktueller Überlegungen zur NASH-Pathogenese sind verschiedene Wege denkbar, die zu einer Induktion des Arachidonsäure-Metabolismus in Makrophagen führen könnten: zum einen direkt durch den Einfluss von freien Fettsäuren wie Palmitat, zum anderen indirekt über eine Aktivierung durch von Hepatozyten sezernierte extrazelluläre Vesikel oder andere Faktoren [104, 106].

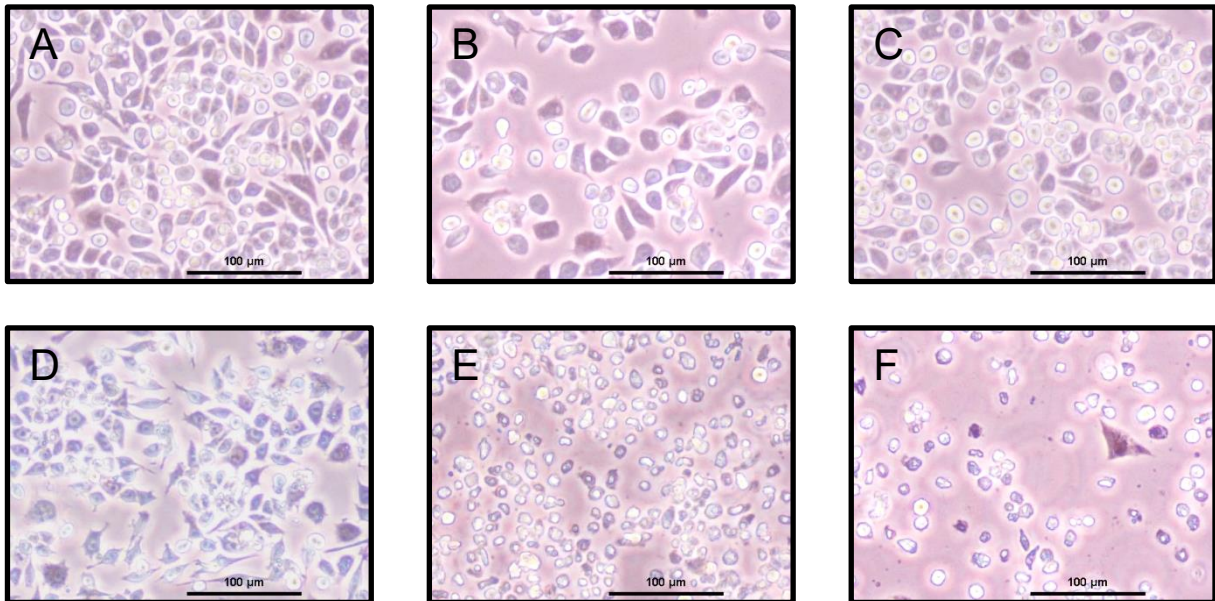


Abb. 23: RAW-264.7-Zellen 6 h und 24 h nach Inkubation mit PA

RAW-264.7-Zellen wurden (A) mit 0 mM, (B) 0,1 mM und (C) 0,2 mM PA für 6 h beziehungsweise (D) mit 0 mM, (E) 0,2 mM und (F) 0,4 mM PA für 24 h inkubiert und bei 100-facher Vergrößerung fotografiert.

Zur Untersuchung des direkten Einflusses freier Fettsäuren auf den Arachidonsäure-Metabolismus von Makrophagen wurden murine RAW-264.7-Zellen für 6 h mit 0,1 mM und 0,2 mM Palmitat inkubiert. Um eine Induktion durch von Hepatozyten sezernierte Moleküle zu untersuchen, wurde folgendes Prinzip verfolgt: Huh7-Zellen wurden für 24 h mit 0,2 mM beziehungsweise 0,4 mM Palmitat inkubiert. Im Anschluss wurde das konditionierte Huh7-Kulturmedium abgenommen. RAW-264.7-Zellen wurden nun für 6 h mit für diese Zelllinie nicht-toxischen Verdünnungen des konditionierten Kulturmediums behandelt. Die Verdünnung der konditionierten Medien im Mischverhältnis 1 : 1 mit RAW-264.7-Nährmedium und die Inkubationszeit von 6 h ergaben sich aus Verdünnungsreihen, in denen der zelltoxische Effekt von Palmitat auf RAW-264.7-Zellen untersucht wurde. Hierfür wurden RAW-264.7-Zellen mit 0,4 mM, 0,2 mM, 0,1 mM und

0,05 mM Palmitat für 24 h, mit 0,2 mM, 0,1 mM und 0,05 mM Palmitat für 12 h sowie mit 0,2 mM, 0,1 mM und 0,05 mM Palmitat für 6 h inkubiert und mikroskopisch begutachtet. Abbildung 23 zeigt ausgewählte Mikroskop-Aufnahmen der sechsständigen und 24-stündigen Inkubationen. Der toxische Effekt von Palmitat auf RAW-264.7-Zellen lässt sich an den vom Flaschenboden abgelösten, abgerundeten und abgestorbenen Zellen (Abb. 23 E und F) erkennen.

### **3.3.2 Analyse der mRNA-Expressionen von mPLA2G4A, mPTGS2, mHPGDS und mALOX5AP in einem *in vitro* Steatose-Modell mit RAW-264.7-Zellen**

RAW-264.7-Zellen wurden für 6 h mit 0,1 mM und 0,2 mM Palmitat beziehungsweise mit konditioniertem Kulturmedium von mit Palmitat behandelten Huh7-Zellen inkubiert. Die mRNA wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und die Expression der Zielgene mittels semiquantitativer RT-PCR analysiert und statistisch ausgewertet. Da es sich bei RAW 264.7 um eine murine Zelllinie handelt, wurden hierfür eigens Primer etabliert (siehe Kap. 2.1.6; Tab. 2).

Alle zu untersuchenden Gene konnten in RAW 264.7 als exprimiert nachgewiesen werden. Die Expression von mPLA2G4A-mRNA war in den mit Palmitat allein behandelten RAW-264.7-Zellen nicht verändert. Durch konditioniertes Huh7-Kulturmedium kam es zu einer Abnahme der mPLA2G4A-mRNA (Abb. 24 A). Die relative mRNA-Expression von mPTGS2 war in den mit 0,1 mM und 0,2 mM Palmitat behandelten RAW-264.7-Zellen erhöht. Eine Behandlung mit konditioniertem Huh7-Medium hatte hingegen keinen Effekt auf die mRNA-Expression von mPTGS2 (Abb. 24 B). Das Gen mHPGDS zeigte keine differentielle mRNA-Expression in mit Palmitat behandelten RAW-264.7-Zellen. Konditioniertes Huh7-Medium führte zu einer Verminderung der relativen mHPGDS-mRNA-Expression. Allerdings fand sich dies nur in der 0,1 mM Palmitat entsprechenden Konzentrierung des konditionierten Mediums (Abb. 24 C). Das Gen mALOX5AP zeigte weder in den mit Palmitat noch in den mit konditioniertem Huh7-Kulturmedium behandelten RAW-264.7-Zellen eine im Vergleich zu den mitgeführten Kontrollen differentielle mRNA-Expression (Abb. 24 D).

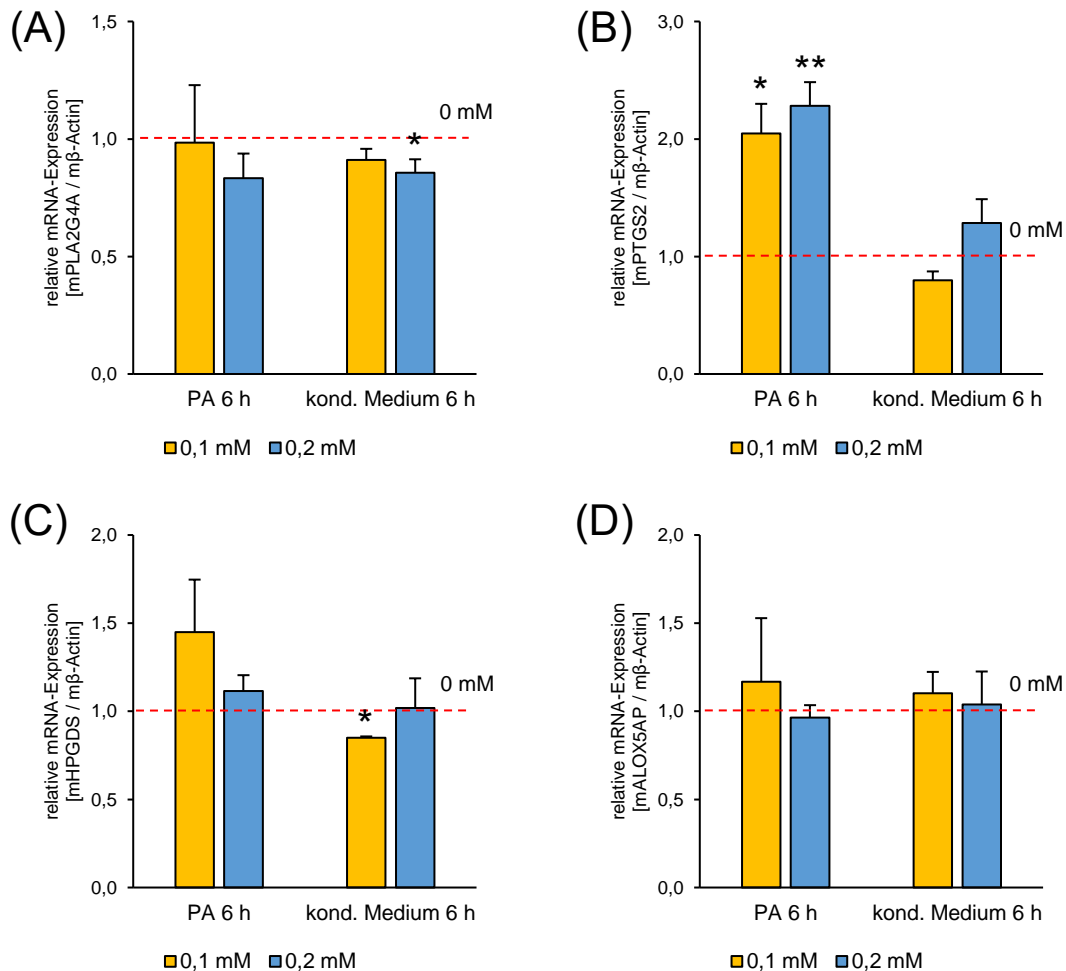


Abb. 24: Relative mRNA-Expression von PLA2G4A, PTGS2, HPGDS und ALOX5AP in RAW-264.7-Zellen nach Inkubation mit PA beziehungsweise konditioniertem Huh7-Kulturmedium

RAW-264.7-Zellen wurden mit 0,1 mM und 0,2 mM PA allein beziehungsweise mit konditioniertem Kulturmedium von mit PA behandelten Huh7-Zellen für 6 h inkubiert (n = 3). Die mRNA-Expressionen von (A) mPLA2G4A, (B) mPTGS2, (C) mHPGDS und (D) mALOX5AP wurden mittels semiquantitativer RT-PCR bestimmt. mβ-Actin-mRNA wurde zur Normalisierung bestimmt. Zudem erfolgte eine Normierung der Daten auf die mitgeführten Kontrollen. Statistische Unterschiede wurden mittels Student's t-Test berechnet. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01: signifikanter Unterschied zur Kontrolle (0 mM PA beziehungsweise konditioniertes Medium).

## 4 Diskussion

### 4.1 PLA2G4A, PTGS2, HPGDS und ALOX5AP im Kontext der NAFLD

In den der Arbeit vorangehenden Microarray-Analysen fanden sich die Gene PLA2G4A, PTGS2, HPGDS und ALOX5AP des Arachidonsäure-Metabolismus in NAFLD-Lebergewebe differentiell exprimiert. Zur weiteren Evaluierung wurden die Expressionen dieser Gene *in vivo* an einer zahlenmäßig größeren, unabhängigen Kohorte sowie *in vitro* an einem Zellkulturmodell der hepatischen Steatose untersucht. Im Folgenden sollen die Ergebnisse der *in vivo* und *in vitro* Studien einander gegenübergestellt und in den Kontext der NAFLD und ihrer Pathogenese eingeordnet werden.

PLA2G4A zeigte keine differentielle mRNA-Expression in NAFL- und NASH-Lebergewebe. Im Zellkulturversuch spiegelte sich dies in den für 24 h mit Palmitat behandelten Huh7-Zellen wider. Nach einer Inkubationszeit von 48 h kam es jedoch zu einer Verminderung der PLA2G4A-mRNA-Expression. In RAW-264.7-Zellen zeigte PLA2G4A keine veränderte Expression nach Inkubation mit Palmitat. Allerdings verminderte sich die Expression durch eine Behandlung mit konditioniertem Huh7-Kulturmedium. PLA2G4A kodiert eines der Mitglieder der Phospholipase-A<sub>2</sub>-Familie, die als Eingangsenzyme des Arachidonsäure-Metabolismus einer Reihe regulatorischer Prozesse unterworfen sind [56, 92, 107]. Eine Inhibition von PLA2G4A führt zu einer Reduktion der Prostaglandin- und Leukotrien-Biosynthese, was sich unter anderem in einer Hemmung inflammatorischer Abläufe äußert und als protektiver Schritt der Hepatoma-Zellen gewertet werden könnte [108]. Dies scheint allerdings im Rahmen der NAFLD - wenn überhaupt - eine untergeordnete Rolle zu spielen, zumal sich in den *in vivo* Daten dieser Arbeit keine differentielle mRNA-Expression von PLA2G4A messen ließ. Nichtsdestotrotz weisen eine Reihe von Studien auf die Bedeutung von PLA2G4A für die Pathogenese der NAFLD hin. So scheint das von PLA2G4A kodierte Enzym, die zytosolische Phospholipase A<sub>2</sub>, positiv an der TAG-Bildung in Hepatozyten und somit der Entstehung einer hepatischen Steatose beteiligt zu sein [59, 109–111]. In PLA2G4A-Knockout-Mäusen verringerte sich durch den Mangel an PLA2G4A darüber hinaus nicht nur die Lipidablagerung in der Leber, sondern auch die Bildung von Leberfibrose [112].

PTGS2 (COX-2) ist das Schlüsselenzym der Prostaglandinsynthese [93]. Seine Induktion wird mit inflammatorischen Prozessen in Verbindung gebracht [60, 113, 114]. Die

semiquantitativen RT-PCR-Analysen in humanem Lebergewebe ergaben einen Anstieg der mRNA-Expression von PTGS2 in Gewebe von NASH-Patienten. Dieser war bei weiblichen Patienten ausgeprägter als bei männlichen. In den Zellkulturversuchen mit Huh7 zeigte sich eine Erhöhung der mRNA-Expression durch Palmitat. Auch in den Western-Blot-Analysen war eine Expressionssteigerung von PTGS2 (COX-2) in Huh7 durch Palmitat zu sehen. In den Versuchen mit RAW-264.7-Zellen zeigte sich ein Anstieg der mRNA-Expression von mPTGS2 durch Palmitat allein, der sich bei einer Behandlung mit konditionierte Huh7-Kulturmedium nicht wiederfand. Einige Arbeitsgruppen konnten PTGS2 mit NAFLD in Verbindung bringen. So wurden veränderte Expressionen von COX-2 in Tiermodellen der NAFLD aber auch in humanem NAFLD-Gewebeproben detektiert [115]. In einer Studie mit COX-2-Knockout-Mäusen führte die Inhibierung von COX-2 zu einer milder verlaufenden NASH und der Reduktion apoptotischer Hepatozyten [116]. Darüber hinaus scheint das von COX-2 synthetisierte Prostaglandin E<sub>2</sub> die TAG-Anreicherung in Hepatozyten zu verstärken und somit an der Entstehung der NAFL mitzuwirken [117, 118]. Die genaue pathogenetische Rolle von PTGS2 wird allerdings nach wie vor kontrovers diskutiert [119, 120].

Die Prostaglandin-Synthase HPGDS synthetisiert Prostaglandin D<sub>2</sub> aus Prostaglandin H<sub>2</sub> [94]. Prostaglandin D<sub>2</sub> kann sowohl pro- als auch antiinflammatorisch wirken [84]. Folglich wird ihm wie den meisten Prostaglandinen eine regulierende Rolle in Entzündungsprozessen zugeschrieben. Ob Prostaglandin D<sub>2</sub> letztlich pro- oder antiinflammatorisch wirkt, ist dabei prozess- und gewebeabhängig [57]. Darüber hinaus scheint Prostaglandin D<sub>2</sub> an hepatischer Lipidakkumulation und der Entstehung von Insulin-Resistenz beteiligt zu sein [121–123]. Allerdings finden sich bisher nur wenige Hinweise auf die mögliche Bedeutung von HPGDS im Rahmen der nichtalkoholischen Fettlebererkrankung. Die mRNA-Expressionsanalyse von HPGDS im Lebergewebe von NAFL-Patienten ergab eine verminderte Expression gegenüber gesundem Gewebe. Bei einem Vergleich der HPGDS-mRNA-Expressionen im Gewebe weiblicher und männlicher Patienten bestätigte sich dies nur für Männer. In dem *in vitro* Modell der NAFLD zeigte sich eine Reduktion der relativen mRNA-Expression in Huh7-Zellen durch Palmitat. Möglicherweise deutet dies auf eine antiinflammatorische Rolle von Prostaglandin D<sub>2</sub> in der NASH Pathogenese hin, die als Ausdruck einer krankhaft überschießenden Inflammation unterdrückt wird. In RAW-264.7-Zellen führte weder die Inkubation mit Palmitat noch die Behandlung mit konditioniertem Huh7-Medium zu einer differentiellen mRNA-Expression von HPGDS.

FLAP (ALOX5AP) vermittelt gemeinsam mit der 5-Lipoxygenase den zentralen Schritt der Synthese der als proinflammatorisch geltenden Leukotriene [72]. Die Enzyme des 5-Lipoxygenasewegs sind assoziiert mit hepatischer Inflammation und NAFLD [124–126]. In Tiermodellen konnten durch die Inhibierung von FLAP entzündliche Prozesse in der Leber gehemmt werden [127]. Dies korrespondiert mit den Ergebnissen dieser Arbeit, in denen im entzündeten Lebergewebe von NASH-Patienten eine signifikante Erhöhung der relativen mRNA-Expression von ALOX5AP gegenüber NAFL- und Normalgewebe gemessen wurde. In der geschlechtsspezifischen Analyse fand sich dieser Effekt allerdings nur bei weiblichen Patienten. *In vitro* ließ sich sowohl in HepG2- als auch in Huh7-Zellen ein Anstieg der relativen mRNA-Expression durch Palmitat feststellen. Bei Huh7-Zellen und in dem 24-stündigen Modell mit HepG2 fiel dieser bei gleicher Inkubationszeit und 0,4 mM Palmitat signifikant stärker aus als nach einer Behandlung mit 0,2 mM Palmitat. Auf Proteinebene fand sich ebenfalls ein Anstieg der relativen Expression von FLAP in Huh7 durch Palmitat. In den mit Palmitat und Oleat im Verhältnis 1 : 2 behandelten HepG2-Zellen ließ sich keine differentielle mRNA-Expression von ALOX5AP messen, was auf einen antagonistischen Effekt der beiden Fettsäuren hinweist, wie er auch in anderen Arbeiten beschrieben wurde [23, 128–133]. In den Zellkulturversuchen mit RAW-264.7-Zellen zeigte sich ebenfalls keine differentielle mRNA-Expression von mALOX5AP.

In Zusammenschau der gemessenen mRNA-Expressionen lassen sich folgende Punkte festhalten. Die differentiellen Expressionen der Microarray-Analyse konnten in einer zweiten Kohorte mittels semiquantitativer RT-PCR in Lebergewebe von NAFLD-Patienten größtenteils reproduziert werden. Lediglich die mRNA-Expression von PLA2G4A fand sich in der humanen Kohorte dieser Arbeit nicht verändert. Darüber hinaus zeigten sich geschlechtsspezifische Unterschiede, die auf eine vermehrte Aktivierung des Arachidonsäure-Metabolismus bei Frauen mit NASH hindeuten. Der Altersmedian weiblicher Patienten lag bei 60,5 Jahren. Somit fügen sich die Daten dieser Arbeit in das Bild laufender epidemiologischer, klinischer und experimenteller Studien, die eine höhere Rate an schweren Leberfibrosen und eine erhöhte Sterblichkeit bei postmenopausalen Patientinnen mit NAFLD beschreiben [134, 135]. Die mRNA-Expressionen des *in vitro* Steatose-Modells mit Hepatoma-Zellen korrespondieren mit den *in vivo* Daten. Die mRNA-Expressionen der Zielgene in den Zellkulturversuchen mit RAW-264.7-Zellen unterschieden sich hingegen deutlich von den Ergebnissen der



klinischen Studie. Dies galt sowohl für die mit Palmitat als auch für die mit konditioniertem Huh7-Kulturmedium behandelten RAW-264.7-Zellen. Es lässt sich also vermuten, dass die im Gesamtlebergewebe von NAFLD-Patienten gemessenen Expressionsveränderungen der Zielgene Hepatozyten zuzuschreiben sind.

Zwar sind Hepatozyten die primäre epitheliale Zelllinie des Leberparenchyms, nichtsdestotrotz ist dieser Zusammenhang bemerkenswert [4]. Der Arachidonsäure-Metabolismus findet sich in einer Vielzahl der Zellen des menschlichen Körpers. Insbesondere die Synthese von proinflammatorischen Prostaglandinen und Leukotrienen wird den Zellen des Immunsystems wie etwa den Makrophagen zugeschrieben [57, 105]. Aber auch epitheliale Zellen wie Hepatozyten produzieren Eicosanoide [136]. Dieser Metabolismus scheint in ruhenden Hepatozyten allerdings eine untergeordnete Rolle zu spielen. PTGS2 (COX-2) etwa wird in normalen Hepatozyten kaum exprimiert [113]. In bestimmten Situationen, die mit chronischer Leberentzündung und -zirrhose assoziiert sind, kann die Expression von PTGS2 in Hepatozyten jedoch induziert werden [137, 138]. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen den Schluss zu, dass dies auch im Rahmen der NAFLD, insbesondere aber der NASH, der Fall ist. Die nicht messbaren mRNA-Expressionen von PLA2G4A, PTGS2 und HPGDS in HepG2-Zellen bestätigen zudem die geringe Expression des Arachidonsäure-Metabolismus in ruhenden hepatischen Zellen.

Ein weiterer Punkt, der aus den *in vitro* Versuchen dieser Arbeit hervorgeht, ist die Tatsache, dass die gesättigte FFA Palmitat in der Lage ist, die Expression von Genen des Arachidonsäure-Metabolismus in hepatischen Zellen zu regulieren. Die Rolle gesättigter Fettsäuren in der NASH-Pathogenese ist Gegenstand einer Vielzahl an Studien. Ihre lipotoxische Wirkung auf Hepatozyten ist vermutlich zurückzuführen auf die Anreicherung radikaler Sauerstoffspezies im endoplasmatischen Retikulum und in den Mitochondrien, die wiederum Inflammation und Zelltod fördern [23]. Möglicherweise kommt es zu einer sekundären Induktion des Arachidonsäure-Metabolismus als Reaktion auf die Zytotoxizität von Palmitat. Darüber hinaus ist ein direkter Einfluss dieser Fettsäuren auf die Genexpression des Arachidonsäure-Metabolismus denkbar. Gesättigte Fettsäuren sind in der Lage, an den mit Inflammation und NASH assoziierten Toll-Like-Rezeptor 4 (TLR4) auf der Zelloberfläche von Hepatozyten zu binden [23, 104]. Dies kann zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B führen [30]. NF- $\kappa$ B ist ein spezifischer Transkriptionsfaktor, der an einer Reihe inflammatorischer Prozesse beteiligt ist und unter anderem mit der Regulation der in dieser Arbeit untersuchten Gene PLA2G4A, PTGS2,

HPGDS und ALOX5AP assoziiert wird [113, 139–144]. Abbildung 25 veranschaulicht den Signalweg, über den Palmitat die Expression der Zielgene beeinflussen könnte. Es gilt diesen Ansatz in weiterführenden Studien zu evaluieren.

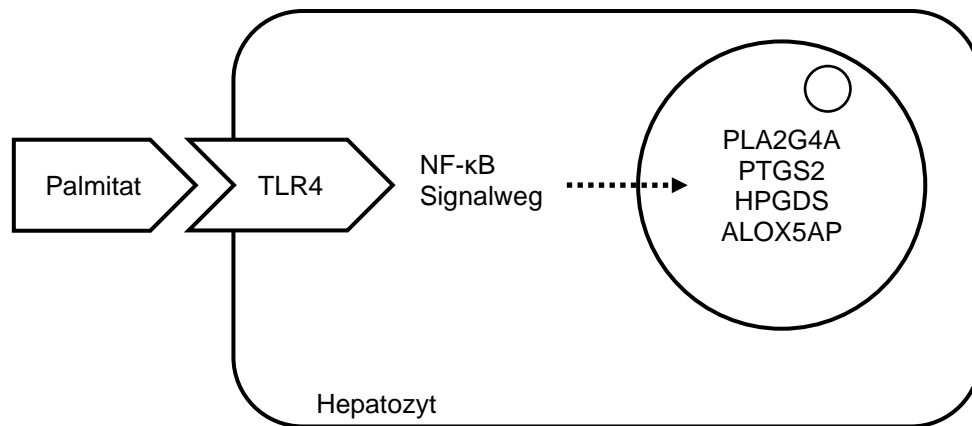


Abb. 25: Potentieller molekularer Mechanismus der Regulation von PLA2G4A, PTGS2, HPGDS und ALOX5AP durch Palmitat in Hepatozyten

Abgeleitet von [30, 104, 113, 139–144].

## 4.2 Lipotoxizität von Palmitat als treibende Kraft der NAFLD im Vergleich zur simplen Steatose hepatischer Zellen

Zur besseren Charakterisierung der im Lebergewebe von NAFLD-Patienten gemessenen Expressionen von PLA2G4A, PTGS2, HPGDS und ALOX5AP wurden die mRNA-Expressionen der Gene mit histopathologischen Scores korreliert (siehe Kap. 3.1). PLA2G4A und ALOX5AP zeigten differentielle mRNA-Expressionen in Lebergewebe mit erhöhten Inflammationsgraden. Die mRNA-Expressionen von PTGS2 und ALOX5AP korrelierten positiv mit dem NAFLD Activity Score (NAS) der Proben. Ein bemerkenswerter Unterschied fand sich im Vergleich der Analysen in Abhängigkeit von Steatose- beziehungsweise Fibrosegrad der Gewebeproben. Während ein Anstieg des Steatosegrads lediglich bei ALOX5AP mit einer differentiellen mRNA-Expression einherging, korrelierte ein zunehmender Fibrosegrad der Lebergewebeproben mit erhöhten mRNA-Expressionen von PLA2G4A, PTGS2 und ALOX5AP. Auch hier fand sich ein geschlechtsspezifischer Unterschied. So waren in Abhängigkeit des Fibrosegrads insbesondere differentielle mRNA-Expressionen von PTGS2 und ALOX5AP nur bei weiblichen Patienten zu sehen. Der Steatosegrad der Gewebeproben scheint sich weniger stark auf die Expressionen der Zielgene auszuwirken als der Fibrosegrad.

Dies unterstreicht die Vorstellung der einfachen hepatischen Steatose (NAFL) als benignen Zustand, der durch eine kombinierte Wirkung zytotoxischer und proinflammatorischer Faktoren in die aggressivere NASH übergehen kann. Die Ergebnisse der *in vitro* Versuche dieser Arbeit legen nahe, dass die ungesättigte Fettsäure Palmitat und ihr lipotoxischer Effekt auf Hepatozyten hierbei eine Rolle spielen.

Fettsäuren werden nach der Anzahl ihrer Kohlenstoffatome sowie dem Vorhandensein und der Position von Mehrfachbindungen klassifiziert. Gesättigte Fettsäuren wie Palmitat besitzen im Vergleich zu ungesättigten Fettsäuren wie Oleat (einfach ungesättigt) keine Mehrfachbindungen [5, 145]. Verschiedenste *in vitro* Studien konnten die unterschiedliche lipotoxische Wirkung von gesättigten und ungesättigten Fettsäuren nachweisen [128–130]. Palmitat führte in hepatischen Zelllinien zu Zellstress und -tod [146–149]. Ähnliche Effekte zeigten sich *in vivo* [103, 150, 151]. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte photometrische Bestimmung des LDH-Release im Kulturmedium von mit 0,2 mM beziehungsweise 0,4 mM Palmitat behandelten HepG2-Zellen bestätigte ebenfalls die zytotoxische Wirkung der gesättigten Fettsäure. Ungesättigte freie Fettsäuren wie Oleat sind weniger toxisch als Palmitat, auch wenn sie maßgeblich zur Lipidakkumulation in den Hepatozyten beitragen [23, 152]. Darüber hinaus scheinen ungesättigte Fettsäuren einen protektiven Effekt zu besitzen [23, 131]. Es wird angenommen, dass er mit der Fähigkeit ungesättigter Fettsäuren zusammenhängt, Palmitat zur Veresterung in neutrale Triacylglyceride zu bewegen [23]. Die dadurch sinkende intrazelluläre Konzentration an zytotoxischem Palmitoyl-CoA, würde den protektiven Effekt ungesättigter freier Fettsäuren erklären. In den in dieser Arbeit durchgeführten Oil-Red-O-Färbungen lässt sich in mit Oleat und Palmitat behandelten Zellen eine intensivere Fettvakulolenbildung als in den nur mit Palmitat behandelten Zellen erkennen (siehe Kap. 3.2.1; Abb. 17 und 18). Dies steht in Einklang mit der Annahme eines bevorzugten Einbaus von Palmitat in Triacylglyceride bei Anwesenheit von Oleat. Der antagonistische Effekt von Oleat wird zudem aus der Analyse der relativen mRNA-Expression von ALOX5AP in mit freien Fettsäuren behandelten HepG2-Zellen ersichtlich. Mit Palmitat allein behandelte HepG2-Zellen zeigten einen Anstieg der relativen mRNA-Expression von ALOX5AP. Eine Behandlung mit Oleat und Palmitat hob diesen Effekt auf.

Ernährungsbedingte Faktoren sind entscheidend für die Entwicklung der NAFLD. Ein hoher Fettkonsum, typisch für die westliche Ernährungsweise, wird mit Insulinresistenz, Dyslipidämie, kardiovaskulären und metabolischen Erkrankungen in Verbindung

gebracht [153]. Unter normalen Bedingungen unterliegt die Gewebekonzentration von Palmitat einer homeostatischen Regulation, die Schwankungen in der Palmitat-Aufnahme durch ein Zusammenspiel aus *De-Novo*-Lipogenese von Palmitat und Desaturierung zu Oleat ausgleicht [154–158]. Eine anhaltend hochkalorische Ernährung mit übermäßigen Anteilen an Kohlenhydraten, insbesondere Fructose, und fettreichen Bestandteilen, insbesondere gesättigter Fettsäuren sowie eine dysregulierte *De-Novo*-Lipogenese von Palmitat können dieses Gleichgewicht empfindlich stören [99]. Für Patienten mit NAFLD beziehungsweise prädisponierenden Konditionen wie Adipositas oder Insulinresistenz, könnte daher ein niedrigschwelliger Verzehr von Palmitat-haltigen Lebensmitteln wie Fleisch-, Milch-, und Fertigprodukten sinnvoll sein [99, 159, 160]. Dies gilt umso mehr, da Palmitat auch im Verdacht steht, das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen zu erhöhen [161]. Den aktuellen Empfehlungen der Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) zufolge sollte der Anteil gesättigter Fettsäuren in der Ernährung 10 % nicht übersteigen [162].

### **4.3 Ansatzpunkte für Therapie und Diagnostik der NAFLD**

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass ein veränderter Arachidonsäure-Metabolismus in Hepatozyten an der Pathogenese von NAFLD und NASH beteiligt ist. Medikamente, die in den Arachidonsäure-Metabolismus eingreifen, sind aufgrund ihrer entzündungshemmenden Wirkung im klinischen Alltag weit verbreitet [57, 163]. Im Kontext von NAFLD und NASH sind sie allerdings nur unzureichend untersucht. Phospholipasen wie PLA2G4A sind die Eingangsenzyme des Arachidonsäure-Metabolismus [92]. Ihre Inhibition kann die Biosynthese von Eicosanoiden in einer Zelle vermindern, da nachgeschalteten Enzymen wie COX-2 hierdurch eine geringere Menge an freier Arachidonsäure als Substrat zur Verfügung steht. Tatsächlich gab es bereits vielversprechende Studien mit dem oralen PLA2G4A-Inhibitor ASB 14780, in denen sich ein Rückgang von NAFLD und NASH zeigte [164]. Die antiinflammatorische Wirkung von Kortikosteroiden beruht ebenfalls auf der Hemmung von Phospholipasen wie PLA2G4A aber auch von Cyclooxygenasen wie COX-2 [165, 166]. Zur Fibroseprävention und -reduktion finden sie bereits Anwendung bei autoimmunen Leberentzündungen [167]. Eine Langzeittherapie mit Kortikosteroiden ist aufgrund der zahlreichen Nebenwirkungen jedoch sehr kritisch zu sehen [168]. Darüber hinaus können Kortikosteroide bei NAFLD-Patienten zur Exazerbation metabolischer Risikofaktoren

führen, da sie die Dysregulation des Lipidmetabolismus, Bluthochdruck und Insulinresistenz fördern [169, 170].

Cyclooxygenase-Hemmer finden einen breiten klinischen Einsatz [171]. Einige Studien haben bereits ihren Nutzen für die Behandlung der NAFLD untersucht. So zeigte der selektive COX-2-Hemmer Celecoxib eine Regression von Steatose und Inflammation bei Ratten mit NASH [113]. Interessanterweise hemmt Celecoxib aber nicht nur COX-2, sondern auch die 5-Lipoxygenase, die gemeinsam mit FLAP für den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Leukotrien-Biosynthese verantwortlich ist [72, 172]. So können mit einem Wirkstoff sowohl die Prostaglandin- als auch die Leukotrien-Biosynthese inhibiert werden. Prothrombotische Eigenschaften von COX-2-Hemmern erhöhen jedoch das kardiovaskuläre Risiko, was sich gerade für NAFLD-Patienten als problematisch darstellt [11, 173]. Acetylsalicylsäure (ASS, Aspirin<sup>®</sup>) entfaltet ihre antiinflammatorische Wirkung durch eine Acetylierung der aktiven Zentren von COX-1 und COX-2 [57]. Die regelmäßige Einnahme von ASS führte in Studien zu einer histologisch sichtbaren Verbesserung von NAFLD und NASH und einem niedrigerem Risiko für ein Fortschreiten der Leberfibrose bei Patienten mit NAFLD [174, 175]. Zudem wird ASS mit einem geringeren Risiko für die Entstehung eines hepatozellulären Karzinoms assoziiert [176, 177]. ClinicalTrials.gov zufolge läuft derzeit eine weitere Medikamentenstudie, die den Einsatz von ASS in der Therapie von NAFLD-Patienten untersucht. Erste Ergebnisse werden voraussichtlich 2024 veröffentlicht [178].

Die von FLAP und der 5-Lipoxygenase katalysierte Reaktion stellt die Schlüsselstelle der Leukotrien-Biosynthese dar [57, 72]. Die relative mRNA-Expression von ALOX5AP war sowohl im Lebergewebe von Patienten mit NASH als auch im *in vitro* Modell der NAFLD signifikant erhöht. Eine Inhibition von ALOX5AP könnte den inflammatorischen Prozessen der NASH entgegenwirken. 5-Lipoxygenase-Inhibitoren stehen im Verdacht, lebertoxisch zu sein, zudem gelten FLAP-Inhibitoren als potenter [179]. In der Tat konnte in Tiermodellen gezeigt werden, dass sich die Inhibierung des 5-Lipoxygenase-Wegs positiv auf Steatose, Inflammation und Fibrose der Leber auswirken kann [180, 181]. Allerdings hat es noch kein FLAP-Inhibitor in die klinische Anwendung geschafft [179].

Trotz vielversprechender Ansätze spielen Medikamente, die in den Arachidonsäure-Metabolismus eingreifen, bis *dato* keine Rolle in der Therapie von NAFLD und NASH. Eine weitere Evaluierung von PLA2G4A-, COX- und FLAP-Hemmern scheint vor dem Hintergrund der Ergebnisse dieser Arbeit allerdings durchaus sinnvoll.

Die Leberbiopsie ist der Goldstandard in der NASH-Diagnostik [9, 46]. Es handelt sich dabei um ein invasives Verfahren, das mit Komplikationen wie Blutungen und Infektionen vergesellschaftet ist [182]. Klinische Scores basierend auf Biomarkern könnten dazu führen, eine Diagnosestellung auch ohne Leberbiopsie möglich zu machen. Spezifische Plasmakonzentrationen von Eicosanoiden des Cyclooxygenase- und Lipoxygenase-Wegs konnten bereits mit NAFL und NASH assoziiert werden [183]. Allerdings sind weitere Studien nötig, bevor der klinische Einsatz von Eicosanoiden als Biomarker der NASH etabliert werden kann.

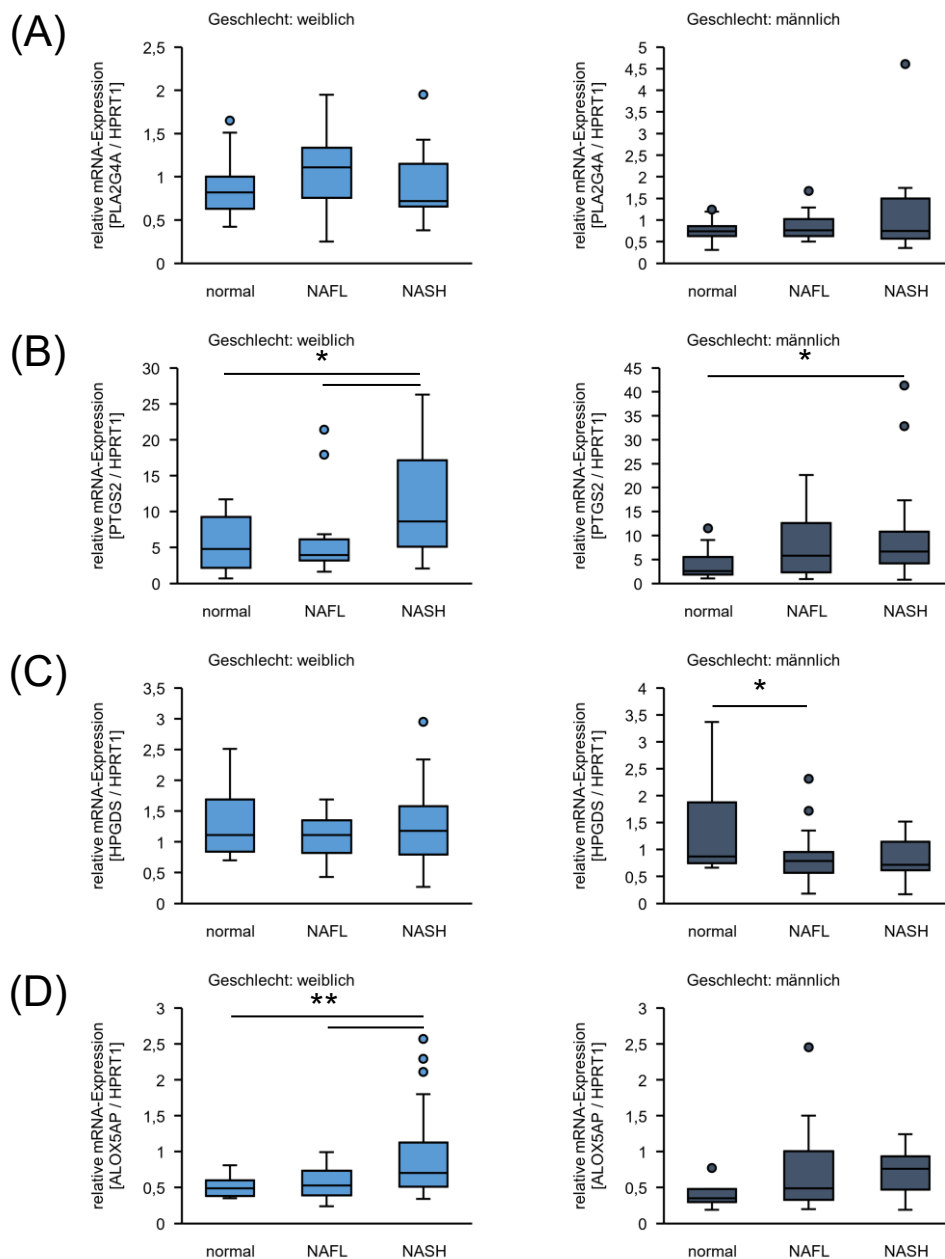
## 5 Zusammenfassung

Die NAFLD ist ein wachsendes globales Gesundheitsproblem von großer Tragweite. Ihre weltweite Prävalenz beträgt rund 25 %. Sie ist die an Häufigkeit am schnellsten zunehmende Ursache für Lebertransplantationen in der westlichen Welt. Trotz allem sind ihre Pathomechanismen nur unvollständig verstanden und die Therapiemöglichkeiten sehr begrenzt. Die Arbeitsgruppe für experimentelle Pädiatrie an der Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin (KUNO) der Universität Regensburg identifizierte mittels Microarray-Analysen differentielle Expressionen von den mit dem Arachidonsäure-Metabolismus assoziierten Genen PLA2G4A, PTGS2, HPGDS und ALOX5AP im Lebergewebe von NAFLD-Patienten (n = 22). Zur Evaluierung der Ergebnisse folgte im Rahmen dieser Arbeit die Analyse der Genexpressionen an einer zweiten unabhängigen Patientenkohorte (n = 122) sowie die Analyse anhand eines *in vitro* Zellkulturmodells der NAFLD mittels semiquantitativer RT-PCR und Western Blot. Mit Ausnahme von PLA2G4A bestätigten sich die differentiellen Genexpressionen der Microarray-Analysen in der humanen Kohorte dieser Arbeit, wobei sich geschlechtsspezifische Unterschiede zeigten. Zudem korrespondierten die *in vivo* Daten größtenteils mit den Ergebnissen der *in vitro* Zellkulturversuche mit Hepatoma-Zellen. Die Ergebnisse legen nahe, dass Hepatozyten für die im Gesamtlebergewebe von NAFLD-Patienten gemessenen differentiellen Genexpressionen verantwortlich sind. Dies ist insofern beachtlich, da die Rolle des Arachidonsäure-Metabolismus in Hepatozyten weitgehend unerforscht ist und seine Expression in ruhenden, gesunden Hepatozyten nur gering ausgeprägt ist. Darüber hinaus scheint der direkte Einfluss der gesättigten Fettsäure Palmitat diese Veränderungen im Arachidonsäure-Metabolismus von Hepatozyten hervorzurufen, was möglicherweise zur Initiierung oder Verstärkung des Entzündungsprozesses am Übergang von NAFL zu NASH beiträgt. Eine einfache hepatische Steatose scheint hierbei von geringerer Bedeutung zu sein. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die Bildung von Triacylglyceriden und die Anwesenheit einfach ungesättigter Fettsäuren wie Oleat einen protektiven Effekt besitzen. Weitere Studien sind nötig, um die intrazellulären Signalwege zu entschlüsseln, über die Palmitat den Arachidonsäure-Metabolismus beeinflusst. Zudem ist die Bedeutung der in sublethalen Hepatozyten synthetisierten Eicosanoide für die Pathogenese der

NASH weiterhin unklar. Diese Arbeit unterstützt die gegenwärtigen Bemühungen, Medikamente, die in den Arachidonsäure-Metabolismus eingreifen, in der Therapie der NAFLD einzusetzen. Einzelne Studien konnten hierzu in der Vergangenheit bereits positive Effekte nachweisen – unter anderem durch die Inhibition von PLA2G4A, PTGS2 und ALOX5AP beziehungsweise den von diesen Genen kodierten Enzymen.

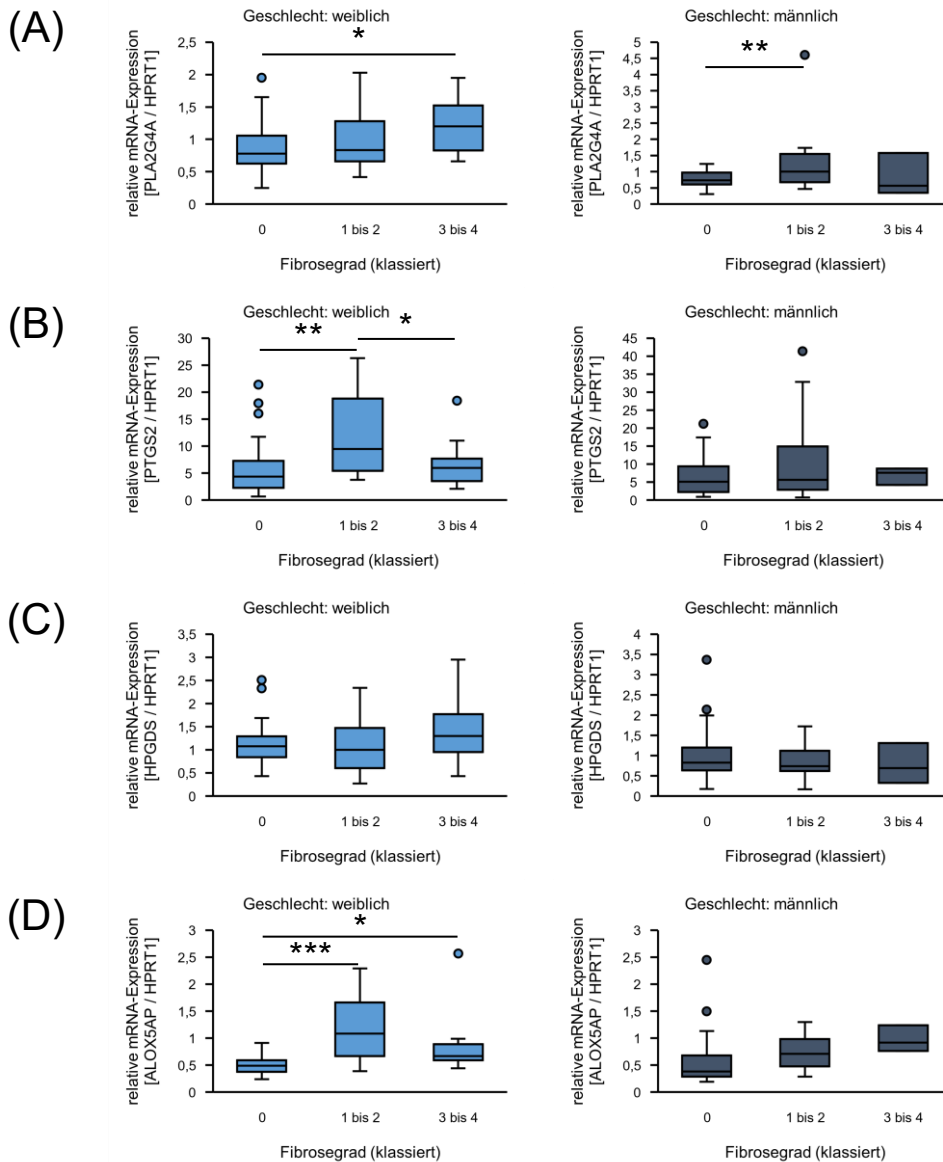


## 6 Anhang



**Abb. 26: Relative mRNA-Expressionen von PLA2G4A, PTGS2, HPGDS und ALOX5AP in normalem, NAFL- und NASH-Lebergewebe weiblicher und männlicher Patienten**

Die mRNA-Expressionen von (A) PLA2G4A, (B) PTGS2, (C) HPGDS und (D) ALOX5AP wurden in Lebergewebe von weiblichen Patienten (hellblau) mit NASH (n = 25), NAFL (n = 21) und normalem Lebergewebe (n = 15) und männlichen Patienten (blaugrau) mit NASH (n = 18), NAFL (n = 26) und normalem Lebergewebe (n = 17; HPGDS: n = 16) mittels semiquantitativer RT-PCR analysiert. Zur Normalisierung wurde die mRNA-Expression von HPRT1 verwendet. Statistische Unterschiede wurden mittels einfaktorieller ANOVA nach Kruskal-Wallis und paarweiser Vergleiche mit post-hoc-Bonferroni-Korrektur bestimmt. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01.



**Abb. 27: Korrelation der mRNA-Expressionen im Lebergewebe weiblicher und männlicher Patienten mit dem Fibrosegrad**

Die mRNA-Expressionen von (A) PLA2G4A, (B) PTGS2, (C) HPGDS und (D) ALOX5AP wurden in Lebergewebe von weiblichen (hellblau) und männlichen (blaugrau) Patienten mit NASH, NAFL und normalem Lebergewebe mittels semiquantitativer RT-PCR bestimmt und mit dem Fibrosegrad der Proben korreliert. Hepatische Fibrose wurde eingeteilt in „keine Fibrose“ (0), „Zone 3 perisinusoidale/perizelluläre Fibrose; fokal oder extensiv vorhanden“ (1), „Zone 3 perisinusoidale/perizelluläre Fibrose mit fokaler oder extensiver periportaler Fibrose“ (2), „Zone 3 perisinusoidale/perizelluläre Fibrose und portale Fibrose mit fokaler oder extensiver Brückenfibrose“ (3) und „Zirrhose“ (4). Es erfolgte eine Klassierung in Grad 0 (n (weiblich) = 34; n (männlich) = 42 außer HPGDS: n = 41), 1 bis 2 (n (weiblich) = 12; n (männlich) = 25) und 3 bis 4 (n (weiblich) = 13; n (männlich) = 3). Zur Normalisierung wurde das Housekeeping-Gen HPRT1 verwendet. Statistische Unterschiede wurden mittels einfaktorier ANOVA nach Kruskal-Wallis und paarweiser Vergleiche mit post-hoc-Bonferroni-Korrektur bestimmt. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

## 7 Literaturverzeichnis

- [1] Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M, Wesker K. Prometheus. Thieme eRef. 4. Aufl. Stuttgart, New York: Thieme; 2015
- [2] Lüllmann-Rauch R. Taschenlehrbuch Histologie. 10 Tabellen. Thieme E-Book Library Studium & Lehre. 4. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2012
- [3] Behrends JC. Physiologie. 93 Tabellen. Duale Reihe. 2. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2012
- [4] Trefts E, Gannon M, Wasserman DH. The liver. *Curr Biol* 2017; 27: R1147-R1151
- [5] Horn F. Biochemie des Menschen. Das Lehrbuch für das Medizinstudium. 5. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2012
- [6] Sayiner M, Koenig A, Henry L, et al. Epidemiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis in the United States and the Rest of the World. *Clinics in Liver Disease* 2016; 20: 205–214
- [7] EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology* 2016; 64: 1388–1402
- [8] Herold G, Hrsg. Innere Medizin 2021. Berlin/Boston: De Gruyter; 2021
- [9] Theurer S, Kälsch J, Schwertheim S, et al. Histopathologische Diagnostik und Differenzialdiagnostik der nichtalkoholischen Fettlebererkrankung. *Pathologe* 2020; 41: 434–443
- [10] Stepanova M, Rafiq N, Makhlof H, et al. Predictors of all-cause mortality and liver-related mortality in patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Dig Dis Sci* 2013; 58: 3017–3023
- [11] Younossi ZM. Non-alcoholic fatty liver disease - A global public health perspective. *Journal of Hepatology* 2019; 70: 531–544
- [12] Nobili V, Alisi A, Valenti L, et al. NAFLD in children: new genes, new diagnostic modalities and new drugs. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2019; 16: 517–530
- [13] Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, et al. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology* 2016; 64: 73–84

- [14] Kalia HS, Gaglio PJ. The Prevalence and Pathobiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Patients of Different Races or Ethnicities. *Clinics in Liver Disease* 2016; 20: 215–224
- [15] Kotronen A, Johansson LE, Johansson LM, et al. A common variant in PNPLA3, which encodes adiponutrin, is associated with liver fat content in humans. *Diabetologia* 2009; 52: 1056–1060
- [16] Dongiovanni P, Anstee QM, Valenti L. Genetic predisposition in NAFLD and NASH: impact on severity of liver disease and response to treatment. *Current Pharmaceutical Design* 2013; 19: 5219–5238
- [17] Fan J-G, Kim S-U, Wong VW-S. New trends on obesity and NAFLD in Asia. *Journal of Hepatology* 2017; 67: 862–873
- [18] Younossi ZM. Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis: Implications for liver transplantation. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society* 2018; 24: 166–170
- [19] Younossi Z, Stepanova M, Ong JP, et al. Nonalcoholic Steatohepatitis Is the Fastest Growing Cause of Hepatocellular Carcinoma in Liver Transplant Candidates. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2019; 17: 748-755.e3
- [20] Alvarez CS, Graubard BI, Thistle JE, et al. Attributable Fractions of Nonalcoholic Fatty Liver Disease for Mortality in the United States: Results From the Third National Health and Nutrition Examination Survey With 27 Years of Follow-up. *Hepatology* 2020; 72: 430–440
- [21] Younossi ZM, Blissett D, Blissett R, et al. The economic and clinical burden of nonalcoholic fatty liver disease in the United States and Europe. *Hepatology* 2016; 64: 1577–1586
- [22] Bedossa P, Poitou C, Veyrie N, et al. Histopathological algorithm and scoring system for evaluation of liver lesions in morbidly obese patients. *Hepatology* 2012; 56: 1751–1759
- [23] Pierantonelli I, Svegliati-Baroni G. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Basic Pathogenetic Mechanisms in the Progression From NAFLD to NASH. *Transplantation* 2019; 103: e1-e13
- [24] Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, et al. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *The Journal of Clinical Investigation* 2005; 115: 1343–1351

- [25] Yamaguchi K, Yang L, McCall S, et al. Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2007; 45: 1366–1374
- [26] Papazyan R, Sun Z, Kim YH, et al. Physiological Suppression of Lipotoxic Liver Damage by Complementary Actions of HDAC3 and SCAP/SREBP. *Cell Metab* 2016; 24: 863–874
- [27] Dulai PS, Singh S, Patel J, et al. Increased risk of mortality by fibrosis stage in nonalcoholic fatty liver disease: Systematic review and meta-analysis. *Hepatology* 2017; 65: 1557–1565
- [28] Kleiner DE, Brunt EM, van Natta M, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005; 41: 1313–1321
- [29] Leoni S, Tovoli F, Napoli L, et al. Current guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review with comparative analysis. *World J Gastroenterol* 2018; 24: 3361–3373
- [30] Fuchs M, Sanyal AJ. Lipotoxicity in NASH. *Journal of Hepatology* 2012; 56: 291–293
- [31] Marra F, Svegliati-Baroni G. Lipotoxicity and the gut-liver axis in NASH pathogenesis. *Journal of Hepatology* 2018; 68: 280–295
- [32] Cani PD. Human gut microbiome: hopes, threats and promises. *Gut* 2018; 67: 1716–1725
- [33] Betrapally NS, Gillevet PM, Bajaj JS. Changes in the Intestinal Microbiome and Alcoholic and Nonalcoholic Liver Diseases: Causes or Effects? *Gastroenterology* 2016; 150: 1745-1755.e3
- [34] Munck TJI de, Xu P, Verwijs HJA, et al. Intestinal permeability in human nonalcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis. *Liver International* 2020; 40: 2906–2916
- [35] Miele L, Valenza V, La Torre G, et al. Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2009; 49: 1877–1887
- [36] Koyama Y, Brenner DA. Liver inflammation and fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation* 2017; 127: 55–64
- [37] Maurice J, Manousou P. Non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Med (Lond)* 2018; 18: 245–250

- [38] Portillo-Sanchez P, Bril F, Maximos M, et al. High Prevalence of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus and Normal Plasma Aminotransferase Levels. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2015; 100: 2231–2238
- [39] Hernaez R, Lazo M, Bonekamp S, et al. Diagnostic accuracy and reliability of ultrasonography for the detection of fatty liver: a meta-analysis. *Hepatology* 2011; 54: 1082–1090
- [40] Szczepaniak LS, Nurenberg P, Leonard D, et al. Magnetic resonance spectroscopy to measure hepatic triglyceride content: prevalence of hepatic steatosis in the general population. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 288: E462-8
- [41] Bedogni G, Bellentani S, Miglioli L, et al. The Fatty Liver Index: a simple and accurate predictor of hepatic steatosis in the general population. *BMC Gastroenterol* 2006; 6: 33
- [42] Kotronen A, Peltonen M, Hakkarainen A, et al. Prediction of non-alcoholic fatty liver disease and liver fat using metabolic and genetic factors. *Gastroenterology* 2009; 137: 865–872
- [43] Fedchuk L, Nascimbeni F, Pais R, et al. Performance and limitations of steatosis biomarkers in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 2014; 40: 1209–1222
- [44] Ekstedt M, Hagström H, Nasr P, et al. Fibrosis stage is the strongest predictor for disease-specific mortality in NAFLD after up to 33 years of follow-up. *Hepatology* 2015; 61: 1547–1554
- [45] Angulo P, Kleiner DE, Dam-Larsen S, et al. Liver Fibrosis, but No Other Histologic Features, Is Associated With Long-term Outcomes of Patients With Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* 2015; 149: 389-97.e10
- [46] Nouredin M, Loomba R. Nonalcoholic fatty liver disease: Indications for liver biopsy and noninvasive biomarkers. *Clinical Liver Disease* 2012; 1: 104–107
- [47] Vilar-Gomez E, Martinez-Perez Y, Calzadilla-Bertot L, et al. Weight Loss Through Lifestyle Modification Significantly Reduces Features of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology* 2015; 149: 367-78.e5; quiz e14-5

- [48] Talavera-Urquijo E, Beisani M, Balibrea JM, et al. Is bariatric surgery resolving NAFLD via microbiota-mediated bile acid ratio reversal? A comprehensive review. *Surgery for Obesity and Related Diseases : Official Journal of the American Society for Bariatric Surgery* 2020; 16: 1361–1369
- [49] Sanyal AJ, Chalasani N, Kowdley KV, et al. Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med* 2010; 362: 1675–1685
- [50] Amanullah I, Khan YH, Anwar I, et al. Effect of vitamin E in non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *Postgraduate Medical Journal* 2019; 95: 601–611
- [51] Miller ER, Pastor-Barriuso R, Dalal D, et al. Meta-analysis: high-dosage vitamin E supplementation may increase all-cause mortality. *Annals of Internal Medicine* 2005; 142: 37–46
- [52] Younossi ZM, Ratziu V, Loomba R, et al. Obeticholic acid for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: interim analysis from a multicentre, randomised, placebo-controlled phase 3 trial. *The Lancet* 2019; 394: 2184–2196
- [53] Tzartzeva K, Obi J, Rich NE, et al. Surveillance Imaging and Alpha Fetoprotein for Early Detection of Hepatocellular Carcinoma in Patients With Cirrhosis: A Meta-analysis. *Gastroenterology* 2018; 154: 1706-1718.e1
- [54] Rich MR. Conformational analysis of arachidonic and related fatty acids using molecular dynamics simulations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1993; 1178: 87–96
- [55] Brash AR. Arachidonic acid as a bioactive molecule. *The Journal of Clinical Investigation* 2001; 107: 1339–1345
- [56] Hanna VS, Hafez EAA. Synopsis of arachidonic acid metabolism: A review. *J Adv Res* 2018; 11: 23–32
- [57] Calder PC. Eicosanoids. *Essays Biochem* 2020; 64: 423–441
- [58] Dennis EA, Cao J, Hsu Y-H, et al. Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. *Chemical Reviews* 2011; 111: 6130–6185
- [59] Leslie CC. Cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>: physiological function and role in disease. *Journal of Lipid Research* 2015; 56: 1386–1402
- [60] Marks F. Der Stoffwechsel der Arachidonsäure. Ein riskantes Bravourstück der Evolution. *Biologie in unserer Zeit* 2000; 30: 342–353

- [61] Smith WL, Urade Y, Jakobsson P-J. Enzymes of the cyclooxygenase pathways of prostanoid biosynthesis. *Chemical Reviews* 2011; 111: 5821–5865
- [62] Smith WL, Langenbach R. Why there are two cyclooxygenase isozymes. *J Clin Invest* 2001; 107: 1491–1495
- [63] Rouzer CA, Marnett LJ. Cyclooxygenases: structural and functional insights. *J Lipid Res* 2009; 50 Suppl: S29-34
- [64] Davies NM, Good RL, Roupe KA, et al. Cyclooxygenase-3: axiom, dogma, anomaly, enigma or splice error?--Not as easy as 1, 2, 3. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences* 2004; 7: 217–226
- [65] Laneuville O, Breuer DK, Xu N, et al. Fatty acid substrate specificities of human prostaglandin-endoperoxide H synthase-1 and -2. Formation of 12-hydroxy-(9Z, 13E/Z, 15Z)- octadecatrienoic acids from alpha-linolenic acid. *Journal of Biological Chemistry* 1995; 270: 19330–19336
- [66] Seo M-J, Oh D-K. Prostaglandin synthases: Molecular characterization and involvement in prostaglandin biosynthesis. *Progress in Lipid Research* 2017; 66: 50–68
- [67] Crescente M, Menke L, Chan MV, et al. Eicosanoids in platelets and the effect of their modulation by aspirin in the cardiovascular system (and beyond). *British Journal of Pharmacology* 2019; 176: 988–999
- [68] Kawabe J, Ushikubi F, Hasebe N. Prostacyclin in vascular diseases. - Recent insights and future perspectives -. *Circulation Journal* 2010; 74: 836–843
- [69] Haeggström JZ, Funk CD. Lipoxygenase and leukotriene pathways: biochemistry, biology, and roles in disease. *Chemical Reviews* 2011; 111: 5866–5898
- [70] Rådmark O, Werz O, Steinhilber D, et al. 5-Lipoxygenase, a key enzyme for leukotriene biosynthesis in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1851: 331–339
- [71] Horn T, Adel S, Schumann R, et al. Evolutionary aspects of lipoxygenases and genetic diversity of human leukotriene signaling. *Progress in Lipid Research* 2015; 57: 13–39
- [72] ALOX5AP arachidonate 5-lipoxygenase activating protein [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI (10.05.2021). Im Internet: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/241>; Stand: 10.05.2021



- [73] Wan M, Tang X, Stsiapanava A, et al. Biosynthesis of leukotriene B4. *Seminars in Immunology* 2017; 33: 3–15
- [74] Serhan CN. Chapter 152 - Lipoxins and Aspirin-Triggered 15-epi-Lipoxins: Pro-Resolving Mediators in Anti-Inflammation and Resolution. In: Bradshaw RA, Dennis EA, Hrsg. *Handbook of cell signaling*. Previous ed.: San Diego, Calif. ; London: Academic, 2004. 2. Aufl. Amsterdam: Elsevier/Academic Press; 2010: 1235–1242
- [75] Capra V, Rovati GE, Mangano P, et al. Transcellular biosynthesis of eicosanoid lipid mediators. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1851: 377–382
- [76] Tilley SL, Coffman TM, Koller BH. Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. *J Clin Invest* 2001; 108: 15–23
- [77] Samuchiwal SK, Boyce JA. Role of lipid mediators and control of lymphocyte responses in type 2 immunopathology. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2018; 141: 1182–1190
- [78] Levy BD, Clish CB, Schmidt B, et al. Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. *Nat Immunol* 2001; 2: 612–619
- [79] Vachier I, Chanez P, Bonnans C, et al. Endogenous anti-inflammatory mediators from arachidonate in human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 290: 219–224
- [80] Domingo C, Palomares O, Sandham DA, et al. The prostaglandin D2 receptor 2 pathway in asthma: a key player in airway inflammation. *Respir Res* 2018; 19: 189
- [81] Honda T, Kabashima K. Prostanoids and leukotrienes in the pathophysiology of atopic dermatitis and psoriasis. *Int Immunol* 2019; 31: 589–595
- [82] Rajakariar R, Hilliard M, Lawrence T, et al. Hematopoietic prostaglandin D2 synthase controls the onset and resolution of acute inflammation through PGD2 and 15-deoxyDelta12 14 PGJ2. *PNAS* 2007; 104: 20979–20984
- [83] Trivedi SG, Newson J, Rajakariar R, et al. Essential role for hematopoietic prostaglandin D2 synthase in the control of delayed type hypersensitivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006; 103: 5179–5184
- [84] Joo M, Sadikot RT. PGD synthase and PGD2 in immune response. *Mediators of Inflammation* 2012; 503128

- [85] Theron AJ, Steel HC, Tintinger GR, et al. Cysteinyl leukotriene receptor-1 antagonists as modulators of innate immune cell function. *Journal of Immunology Research* 2014; 608930
- [86] Barnig C, Bezema T, Calder PC, et al. Activation of Resolution Pathways to Prevent and Fight Chronic Inflammation: Lessons From Asthma and Inflammatory Bowel Disease. *Front. Immunol.* 2019; 10: 1699
- [87] Romano M, Cianci E, Simiele F, et al. Lipoxins and aspirin-triggered lipoxins in resolution of inflammation. *European Journal of Pharmacology* 2015; 760: 49–63
- [88] Barnig C, Levy BD. Innate immunity is a key factor for the resolution of inflammation in asthma. *European Respiratory Review* 2015; 24: 141–153
- [89] Mülhardt C. *Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2013. doi:10.1007/978-3-642-34636-1
- [90] Brown PO, Botstein D. Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nat Genet* 1999; 21: 33–37
- [91] Piguet A-C, Guarino M, Potaczek DP, et al. Hepatic gene expression in mouse models of non-alcoholic fatty liver disease after acute exercise. *Hepatology Research : The Official Journal of the Japan Society of Hepatology* 2019; 49: 637–652
- [92] PLA2G4A phospholipase A2 group IVA [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI (30.04.2021). Im Internet: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5321>; Stand: 30.04.2021
- [93] PTGS2 prostaglandin-endoperoxide synthase 2 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI (30.04.2021). Im Internet: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5743>; Stand: 30.04.2021
- [94] HPGDS hematopoietic prostaglandin D synthase [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI (10.05.2021). Im Internet: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/27306>; Stand: 10.05.2021
- [95] Thasler WE, Weiss TS, Schillhorn K, et al. Charitable State-Controlled Foundation Human Tissue and Cell Research: Ethic and Legal Aspects in the Supply of Surgically Removed Human Tissue For Research in the Academic and Commercial Sector in Germany. *Cell Tissue Banking* 2003; 4: 49–56

- [96] Spurgeon SL, Jones RC, Ramakrishnan R. High throughput gene expression measurement with real time PCR in a microfluidic dynamic array. *PLOS ONE* 2008; 3: e1662
- [97] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods (San Diego, Calif.)* 2001; 25: 402–408
- [98] Kaur S, Rawal P, Siddiqui H, et al. Increased Expression of RUNX1 in Liver Correlates with NASH Activity Score in Patients with Non-Alcoholic Steatohepatitis (NASH). *Cells* 2019; 8
- [99] Carta G, Murru E, Banni S, et al. Palmitic Acid: Physiological Role, Metabolism and Nutritional Implications. *Front Physiol* 2017; 8: 902
- [100] Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* 2012; 9: 671–675
- [101] Singh S, Allen AM, Wang Z, et al. Fibrosis progression in nonalcoholic fatty liver vs nonalcoholic steatohepatitis: a systematic review and meta-analysis of paired-biopsy studies. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2015; 13: 643-54.e1-9; quiz e39-40
- [102] Hirsova P, Ibrahim SH, Gores GJ, et al. Lipotoxic lethal and sublethal stress signaling in hepatocytes: relevance to NASH pathogenesis. *J Lipid Res* 2016; 57: 1758–1770
- [103] Wang D, Wei Y, Pagliassotti MJ. Saturated fatty acids promote endoplasmic reticulum stress and liver injury in rats with hepatic steatosis. *Endocrinology* 2006; 147: 943–951
- [104] Ibrahim SH, Hirsova P, Gores GJ. Non-alcoholic steatohepatitis pathogenesis: sublethal hepatocyte injury as a driver of liver inflammation. *Gut* 2018; 67: 963–972
- [105] Norris PC, Dennis EA. A lipidomic perspective on inflammatory macrophage eicosanoid signaling. *Advances in Biological Regulation* 2014; 54: 99–110
- [106] Hirsova P, Ibrahim SH, Verma VK, et al. Extracellular vesicles in liver pathobiology: Small particles with big impact. *Hepatology* 2016; 64: 2219–2233
- [107] Dennis EA, Norris PC. Eicosanoid storm in infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* 2015; 15: 511–523

- [108] Ashcroft FJ, Mahammad N, Midtun Flatekvål H, et al. cPLA2 $\alpha$  Enzyme Inhibition Attenuates Inflammation and Keratinocyte Proliferation. *Biomolecules* 2020; 10
- [109] Hardwick JP, Eckman K, Lee YK, et al. Eicosanoids in metabolic syndrome. *Adv Pharmacol* 2013; 66: 157–266
- [110] Guijas C, Rodríguez JP, Rubio JM, et al. Phospholipase A2 regulation of lipid droplet formation. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1841: 1661–1671
- [111] li H, Yokoyama N, Yoshida S, et al. Alleviation of high-fat diet-induced fatty liver damage in group IVA phospholipase A2-knockout mice. *PLOS ONE* 2009; 4: e8089
- [112] Ishihara K, Miyazaki A, Nabe T, et al. Group IVA phospholipase A2 participates in the progression of hepatic fibrosis. *The FASEB Journal* 2012; 26: 4111–4121
- [113] Du Y. Celecoxib attenuates liver steatosis and inflammation in non-alcoholic steatohepatitis induced by high-fat diet in rats. *Mol Med Report* 2011
- [114] Süleyman H, Demircan B, Karagöz Y. Anti-inflammatory and side effects of cyclooxygenase inhibitors. *Pharmacological Reports : PR* 2007; 59: 247–258
- [115] Yang H, Xuefeng Y, Shandong W, et al. COX-2 in liver fibrosis. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* 2020; 506: 196–203
- [116] Wu J, Chen C, Hu X, et al. Suppressing cyclooxygenase-2 prevents nonalcoholic and inhibits apoptosis of hepatocytes that are involved in the Akt/p53 signal pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2016; 469: 1034–1040
- [117] Hsieh P-S, Jin J-S, Chiang C-F, et al. COX-2-mediated inflammation in fat is crucial for obesity-linked insulin resistance and fatty liver. *Obesity (Silver Spring)* 2009; 17: 1150–1157
- [118] Enomoto N, Ikejima K, Yamashina S, et al. Kupffer cell-derived prostaglandin E(2) is involved in alcohol-induced fat accumulation in rat liver. *AJP Gastrointestinal and Liver Physiology* 2000; 279: G100-6
- [119] Martín-Sanz P, Casado M, Boscá L. Cyclooxygenase 2 in liver dysfunction and carcinogenesis: Facts and perspectives. *World J Gastroenterol* 2017; 23: 3572–3580

- [120] Motiño O, Agra N, Brea Contreras R, et al. Cyclooxygenase-2 expression in hepatocytes attenuates non-alcoholic steatohepatitis and liver fibrosis in mice. *Biochim Biophys Acta* 2016; 1862: 1710–1723
- [121] Kaushal N, Gupta M, Kulshreshtha E. Hempseed (*Cannabis sativa*) lipid fractions alleviate high-fat diet-induced fatty liver disease through regulation of inflammation and oxidative stress. *Heliyon* 2020; 6: e04422
- [122] Kumar S, Srivastava A, Palaia T, et al. Lipocalin-type prostaglandin D2 synthase deletion induces dyslipidemia and non-alcoholic fatty liver disease. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 2020; 149: 106429
- [123] Wang W, Zhong X, Guo J. Role of 2-series prostaglandins in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus and non-alcoholic fatty liver disease (Review). *International Journal of Molecular Medicine* 2021; 47
- [124] Martínez-Clemente M, Clària J, Titos E. The 5-lipoxygenase/leukotriene pathway in obesity, insulin resistance, and fatty liver disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2011; 14: 347–353
- [125] Martínez-Clemente M, Ferré N, González-Pérez A, et al. 5-lipoxygenase deficiency reduces hepatic inflammation and tumor necrosis factor alpha-induced hepatocyte damage in hyperlipidemia-prone ApoE-null mice. *Hepatology* 2010; 51: 817–827
- [126] Titos E, Ferré N, Lozano JJ, et al. Protection from hepatic lipid accumulation and inflammation by genetic ablation of 5-lipoxygenase. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 2010; 92: 54–61
- [127] Titos E, Clària J, Planagumà A, et al. Inhibition of 5-lipoxygenase-activating protein abrogates experimental liver injury: role of Kupffer cells. *Journal of Leukocyte Biology* 2005; 78: 871–878
- [128] Maedler K, Spinas GA, Dyntar D, et al. Distinct effects of saturated and monounsaturated fatty acids on beta-cell turnover and function. *Diabetes* 2001; 50: 69–76
- [129] Listenberger LL, Ory DS, Schaffer JE. Palmitate-induced apoptosis can occur through a ceramide-independent pathway. *The Journal of Biological Chemistry* 2001; 276: 14890–14895
- [130] Vries JE de, Vork MM, Roemen TH, et al. Saturated but not mono-unsaturated fatty acids induce apoptotic cell death in neonatal rat ventricular myocytes. *J Lipid Res* 1997; 38: 1384–1394

- [131] Akazawa Y, Cazanave S, Mott JL, et al. Palmitoleate attenuates palmitate-induced Bim and PUMA up-regulation and hepatocyte lipoapoptosis. *Journal of Hepatology* 2010; 52: 586–593
- [132] Gao D, Griffiths HR, Bailey CJ. Oleate protects against palmitate-induced insulin resistance in L6 myotubes. *The British Journal of Nutrition* 2009; 102: 1557–1563
- [133] Kwon B, Lee H-K, Querfurth HW. Oleate prevents palmitate-induced mitochondrial dysfunction, insulin resistance and inflammatory signaling in neuronal cells. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1843: 1402–1413
- [134] DiStefano JK. NAFLD and NASH in Postmenopausal Women: Implications for Diagnosis and Treatment. *Endocrinology* 2020; 161
- [135] Paik JM, Henry L, Avila L de, et al. Mortality Related to Nonalcoholic Fatty Liver Disease Is Increasing in the United States. *Hepatol Commun* 2019; 3: 1459–1471
- [136] Brock TG, Peters-Golden M. Activation and regulation of cellular eicosanoid biosynthesis. *The Scientific World Journal* 2007; 7: 1273–1284
- [137] Cheng AS-L, Chan HL-Y, Leung WK, et al. Expression of HBx and COX-2 in chronic hepatitis B, cirrhosis and hepatocellular carcinoma: implication of HBx in upregulation of COX-2. *Modern Pathology* 2004; 17: 1169–1179
- [138] Mohammed NA, Abd El-Aleem SA, El-Hafiz HA, et al. Distribution of constitutive (COX-1) and inducible (COX-2) cyclooxygenase in postviral human liver cirrhosis: a possible role for COX-2 in the pathogenesis of liver cirrhosis. *Journal of Clinical Pathology* 2004; 57: 350–354
- [139] Lee C-W, Lee I-T, Lin C-C, et al. Activation and induction of cytosolic phospholipase A2 by IL-1beta in human tracheal smooth muscle cells: role of MAPKs/p300 and NF-kappaB. *Journal of Cellular Biochemistry* 2010; 109: 1045–1056
- [140] Yu J, Ip E, Dela Peña A, et al. COX-2 induction in mice with experimental nutritional steatohepatitis: Role as pro-inflammatory mediator. *Hepatology* 2006; 43: 826–836
- [141] Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 1999; 18: 6853–6866

- [142] Korbecki J, Baranowska-Bosiacka I, Gutowska I, et al. The effect of reactive oxygen species on the synthesis of prostanoids from arachidonic acid. *Journal of Physiology and Pharmacology : An Official Journal of the Polish Physiological Society* 2013; 64: 409–421
- [143] Allegra M, D'Acquisto F, Tesoriere L, et al. Pro-oxidant activity of indicaxanthin from *Opuntia ficus indica* modulates arachidonate metabolism and prostaglandin synthesis through lipid peroxide production in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Redox Biology* 2014; 2: 892–900
- [144] Serio KJ, Reddy KV, Bigby TD. Lipopolysaccharide induces 5-lipoxygenase-activating protein gene expression in THP-1 cells via a NF-kappaB and C/EBP-mediated mechanism. *American journal of physiology. Cell Physiology* 2005; 288: C1125-33
- [145] Juárez-Hernández E, Chávez-Tapia NC, Uribe M, et al. Role of bioactive fatty acids in nonalcoholic fatty liver disease. *Nutr J* 2016; 15: 72
- [146] Pfaffenbach KT, Gentile CL, Nivala AM, et al. Linking endoplasmic reticulum stress to cell death in hepatocytes: roles of C/EBP homologous protein and chemical chaperones in palmitate-mediated cell death. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010; 298: E1027-35
- [147] Cao J, Dai D-L, Yao L, et al. Saturated fatty acid induction of endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human liver cells via the PERK/ATF4/CHOP signaling pathway. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2012; 364: 115–129
- [148] Leamy AK, Egnatchik RA, Shiota M, et al. Enhanced synthesis of saturated phospholipids is associated with ER stress and lipotoxicity in palmitate treated hepatic cells. *J Lipid Res* 2014; 55: 1478–1488
- [149] Egnatchik RA, Leamy AK, Jacobson DA, et al. ER calcium release promotes mitochondrial dysfunction and hepatic cell lipotoxicity in response to palmitate overload. *Molecular Metabolism* 2014; 3: 544–553
- [150] Li J, Huang J, Li J-S, et al. Accumulation of endoplasmic reticulum stress and lipogenesis in the liver through generational effects of high fat diets. *Journal of Hepatology* 2012; 56: 900–907
- [151] Alkhoury N, Dixon LJ, Feldstein AE. Lipotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease: not all lipids are created equal. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology* 2009; 3: 445–451

- [152] Li ZZ, Berk M, McIntyre TM, et al. Hepatic lipid partitioning and liver damage in nonalcoholic fatty liver disease: role of stearyl-CoA desaturase. *The Journal of Biological Chemistry* 2009; 284: 5637–5644
- [153] Fan J-G, Cao H-X. Role of diet and nutritional management in non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2013; 28 Suppl 4: 81–87
- [154] Song X, Huang Y, Neuhaus ML, et al. Dietary long-chain fatty acids and carbohydrate biomarker evaluation in a controlled feeding study in participants from the Women's Health Initiative cohort. *Am J Clin Nutr* 2017; 105: 1272–1282
- [155] Innis SM, Dyer R. Dietary triacylglycerols with palmitic acid (16:0) in the 2-position increase 16:0 in the 2-position of plasma and chylomicron triacylglycerols, but reduce phospholipid arachidonic and docosahexaenoic acids, and alter cholesteryl ester metabolism in formula-Fed piglets. *J Nutr* 1997; 127: 1311–1319
- [156] Wilke MS, French MA, Goh YK, et al. Synthesis of specific fatty acids contributes to VLDL-triacylglycerol composition in humans with and without type 2 diabetes. *Diabetologia* 2009; 52: 1628–1637
- [157] Strable MS, Ntambi JM. Genetic control of de novo lipogenesis: role in diet-induced obesity. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 2010; 45: 199–214
- [158] Silbernagel G, Kovarova M, Cegan A, et al. High hepatic SCD1 activity is associated with low liver fat content in healthy subjects under a lipogenic diet. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2012; 97: E2288-92
- [159] Mancini A, Imperlini E, Nigro E, et al. Biological and Nutritional Properties of Palm Oil and Palmitic Acid: Effects on Health. *Molecules* 2015; 20: 17339–17361
- [160] Palomer X, Pizarro-Delgado J, Barroso E, et al. Palmitic and Oleic Acid: The Yin and Yang of Fatty Acids in Type 2 Diabetes Mellitus. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 2018; 29: 178–190
- [161] van Rooijen MA, Mensink RP. Palmitic Acid Versus Stearic Acid: Effects of Interesterification and Intakes on Cardiometabolic Risk Markers - A Systematic Review. *Nutrients* 2020; 12



- [162] Nando. Fats and fatty acids in human nutrition. Report of an expert consultation ; 10 to 14 November 2008, Geneva. Bd. 91. FAO food and nutrition paper. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2010
- [163] Rainsford KD. Anti-inflammatory drugs in the 21st century. *Subcellular Biochemistry* 2007; 42: 3–27
- [164] Kanai S, Ishihara K, Kawashita E, et al. ASB14780, an Orally Active Inhibitor of Group IVA Phospholipase A2, Is a Pharmacotherapeutic Candidate for Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J Pharmacol Exp Ther* 2016; 356: 604–614
- [165] Boumpas DT, Paliogianni F, Anastassiou ED, et al. Glucocorticosteroid action on the immune system: molecular and cellular aspects. *Clinical and Experimental Rheumatology* 1991; 9: 413–423
- [166] Goppelt-Struebe M. Molecular mechanisms involved in the regulation of prostaglandin biosynthesis by glucocorticoids. *Biochemical Pharmacology* 1997; 53: 1389–1395
- [167] Czaja AJ, Carpenter HA. Decreased fibrosis during corticosteroid therapy of autoimmune hepatitis. *Journal of Hepatology* 2004; 40: 646–652
- [168] Buchman AL. Side effects of corticosteroid therapy. *Journal of Clinical Gastroenterology* 2001; 33: 289–294
- [169] Mueller KM, Kornfeld J-W, Friedbichler K, et al. Impairment of hepatic growth hormone and glucocorticoid receptor signaling causes steatosis and hepatocellular carcinoma in mice. *Hepatology* 2011; 54: 1398–1409
- [170] Dolinsky VW, Douglas DN, Lehner R, et al. Regulation of the enzymes of hepatic microsomal triacylglycerol lipolysis and re-esterification by the glucocorticoid dexamethasone. *The Biochemical Journal* 2004; 378: 967–974
- [171] Patrignani P, Patrono C. Cyclooxygenase inhibitors: From pharmacology to clinical read-outs. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1851: 422–432
- [172] Maier TJ, Tausch L, Hoernig M, et al. Celecoxib inhibits 5-lipoxygenase. *Biochemical Pharmacology* 2008; 76: 862–872
- [173] Nissen SE, Yeomans ND, Solomon DH, et al. Cardiovascular Safety of Celecoxib, Naproxen, or Ibuprofen for Arthritis. *N Engl J Med* 2016; 375: 2519–2529

- [174] Simon TG, Henson J, Osganian S, et al. Daily Aspirin Use Associated With Reduced Risk For Fibrosis Progression In Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2019; 17: 2776-2784.e4
- [175] Malehmir M, Pfister D, Gallage S, et al. Platelet GPIIb/IIIa is a mediator and potential interventional target for NASH and subsequent liver cancer. *Nature Medicine* 2019; 25: 641–655
- [176] Simon TG, Ma Y, Ludvigsson JF, et al. Association Between Aspirin Use and Risk of Hepatocellular Carcinoma. *JAMA Oncology* 2018; 4: 1683–1690
- [177] Simon TG, Duberg A-S, Aleman S, et al. Association of Aspirin with Hepatocellular Carcinoma and Liver-Related Mortality. *N Engl J Med* 2020; 382: 1018–1028
- [178] Aspirin for the Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease - ClinicalTrials.gov (04.05.2021). In Internet: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04031729?term=cox&cond=naflld&draw=2&rank=4>; Stand: 04.05.2021
- [179] Pettersen D, Davidsson Ö, Whatling C. Recent advances for FLAP inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2015; 25: 2607–2612
- [180] López-Parra M, Titos E, Horrillo R, et al. Regulatory effects of arachidonate 5-lipoxygenase on hepatic microsomal TG transfer protein activity and VLDL-triglyceride and apoB secretion in obese mice. *J Lipid Res* 2008; 49: 2513–2523
- [181] Horrillo R, Planagumà A, González-Pérez A, et al. Comparative protection against liver inflammation and fibrosis by a selective cyclooxygenase-2 inhibitor and a nonredox-type 5-lipoxygenase inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther* 2007; 323: 778–786
- [182] Rockey DC, Caldwell SH, Goodman ZD, et al. Liver biopsy. *Hepatology* 2009; 49: 1017–1044
- [183] Looma R, Quehenberger O, Armando A, et al. Polyunsaturated fatty acid metabolites as novel lipidomic biomarkers for noninvasive diagnosis of nonalcoholic steatohepatitis. *J Lipid Res* 2015; 56: 185–192

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Pathomechanismen der NAFL.....	9
Abb. 2:	Pathohistologische Unterschiede zwischen NAFL und NASH.....	10
Abb. 3:	Risikofaktoren, klinische Merkmale und Pathomechanismen der NAFLD.....	11
Abb. 4:	Sonografische Darstellung von normalem und steatotischem Lebergewebe.....	12
Abb. 5:	Chemische Strukturformel der Arachidonsäure.....	14
Abb. 6:	Stoffwechselwege des Arachidonsäure-Metabolismus.....	15
Abb. 7:	Enzyme und Metaboliten des Cyclooxygenase-Wegs.....	17
Abb. 8:	Enzyme und Metaboliten der Leukotrien-Biosynthese.....	18
Abb. 9:	PLA2G4A, PTGS2, HPGDS und ALOX5AP im Kontext des Arachidonsäure-Metabolismus.....	21
Abb. 10:	Schematische Darstellung des <i>in vitro</i> Steatose-Modells.....	36
Abb. 11:	Anordnung von Filterpapieren, Gel und PVDF-Membran im Blotting-Gerät.....	41
Abb. 12:	Relative mRNA-Expressionen von PLA2G4A, PTGS2, HPGDS und ALOX5AP in normalem, NAFL- und NASH-Lebergewebe.....	44
Abb. 13:	Korrelation der mRNA-Expressionen in Lebergewebe mit dem Steatosegrad.....	45
Abb. 14:	Korrelation der mRNA-Expressionen in Lebergewebe mit dem Inflammationsgrad.....	46
Abb. 15:	Korrelation der mRNA-Expressionen in Lebergewebe mit dem Fibrosegrad.....	48
Abb. 16:	Korrelation der mRNA-Expressionen in Lebergewebe mit dem NAS.....	49
Abb. 17:	Oil-Red-O-gefärbte HepG2-Zellen 24 h nach Inkubation mit OA/PA beziehungsweise PA.....	51

Abb. 18:	Relativer LDH-Release von HepG2-Zellen nach Inkubation mit PA .....	52
Abb. 19:	Relative mRNA-Expression von ALOX5AP in HepG2 nach Inkubation mit FFA .....	53
Abb. 20:	Relative mRNA-Expressionen von PLA2G4A, PTGS2, HPGDS und ALOX5AP in Huh7 nach Inkubation mit PA .....	54
Abb. 21:	Proteinexpression von COX-2 in Huh7 nach Inkubation mit PA für 24 h .	55
Abb. 22:	Proteinexpression von FLAP in Huh7 nach Inkubation mit PA für 24 h ...	56
Abb. 23:	RAW-264.7-Zellen 6 h und 24 h nach Inkubation mit PA.....	57
Abb. 24:	Relative mRNA-Expression von PLA2G4A, PTGS2, HPGDS und ALOX5AP in RAW-264.7-Zellen nach Inkubation mit PA beziehungsweise konditioniertem Huh7-Kulturmedium .....	59
Abb. 25:	Potentieller molekularer Mechanismus der Regulation von PLA2G4A, PTGS2, HPGDS und ALOX5AP durch Palmitat in Hepatozyten .....	64
Abb. 26:	Relative mRNA-Expressionen von PLA2G4A, PTGS2, HPGDS und ALOX5AP in normalem, NAFL- und NASH-Lebergewebe weiblicher und männlicher Patienten .....	71
Abb. 27:	Korrelation der mRNA-Expressionen im Lebergewebe weiblicher und männlicher Patienten mit dem Fibrosegrad .....	72

## 9 Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Humane Gene, zugehörige Primerpaare und Annealing-Temperaturen...27
Tab. 2:	Murine Gene, zugehörige Primerpaare und Annealing-Temperaturen .....28
Tab. 3:	Antikörper und zugehörige verwendete Konzentrationen .....28
Tab. 4:	Aufschlüsselung der Kohorte nach Alter, Grad der hepatischen Steatose, Inflammation, Fibrose, Ballonierung sowie dem NAS .....32
Tab. 5:	Anzahl der Zellen pro Well in Abhängigkeit von Zelllinie und Inkubationszeit.....35

## 10 Abkürzungsverzeichnis

ALOX5AP .....	Arachidonat-5-Lipoxygenase-aktivierendes Protein
BSA .....	Bovines Serumalbumin
COX.....	Cyclooxygenase
DEG.....	Differentiell exprimiertes Gen
DEPC .....	Diethylpyrocarbonat
DMEM .....	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO.....	Dimethylsulfoxid
DNL .....	<i>De-Novo</i> -Lipogenese
FBS .....	Fetales Kälberserum
FFA.....	Freie Fettsäuren
FLAP .....	5-Lipoxygenase-aktivierendes Protein
HCC.....	Hepatozelluläres Karzinom
HCl .....	Salzsäure
HPGDS.....	Hämatopoetische Prostaglandin-D <sub>2</sub> -Synthase
LDH .....	Laktatdehydrogenase
LOX .....	Lipoxygenase
LT .....	Leukotrien
LX .....	Lipoxin
MEM .....	Eagle's Minimal Essential Medium
NaCl .....	Natriumchlorid
NAFL .....	Nichtalkoholische Fettleber
NAFLD.....	Nonalcoholic Fatty Liver Disease
NAS .....	NAFLD Activity Score
NASH .....	Nichtalkoholische Steatohepatitis
OA .....	Oleat
PA.....	Palmitat
PBS .....	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
PG .....	Prostaglandin
PLA2G4A.....	Phospholipase A <sub>2</sub> Gruppe IVA
PNPLA3.....	Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3
PTGS2.....	Prostaglandinsynthase-2

RPMI ..... Roswell Park Memorial Institute  
SDS ..... Natriumdodecylsulfat  
TAG ..... Triacylglyzerid  
TX ..... Thromboxan

## 11 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. Thomas Weiß für die Überlassung des interessanten Themas und die gute Betreuung in allen Phasen der Dissertation. Ohne seine Hilfestellung, die Bereitstellung der Infrastruktur und Finanzierung der Verbrauchsmaterialien wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Zudem hatte ich durch ihn die Gelegenheit Teile der Arbeit auf der 35. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber vorzustellen.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Dr. rer. nat. Sara Ibrahim, Frau Eva Wacker und Frau Susanne Heyn für die Unterstützung bei den Arbeiten im Labor bedanken. Sie hatten stets ein offenes Ohr für meine Probleme und konnte mir bei so manchen Schwierigkeiten weiterhelfen. Ein besonderer Dank gilt auch meiner Kommilitonin Katharina Schilcher, die mir während der Zeit im Labor durch ihre motivierende und lebensfrohe Art eine große Stütze war.

Zu guter Letzt bedanke ich mich bei meinen lieben Eltern, Prof. Dr. med. Rudolf und Ingeborg Riepl, für ihre Geduld und Unterstützung in allen Lebenslagen. Sie ermöglichten mir das Studium und standen mir bei der Anfertigung dieser Arbeit immer zur Seite.



## 12 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Jakob Riepl  
Geburtsdatum /-ort: 18.08.1991 / Erding  
Staatsangehörigkeit: Deutsch

### Ausbildung

12/2020 Approbation als Arzt  
09/2014 – 11/2020 Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg  
09/2011 – 09/2014 Studium der Zahnmedizin an der Universität Regensburg  
05/2011 Allgemeine Hochschulreife  
09/2004 – 05/2011 Korbinian-Aigner-Gymnasium Erding  
09/1998 – 07/2002 Grundschule Orterer-Schule Wörth

### Klinische Erfahrung

06/2020 – 10/2020 Drittes Tertial im Praktischen Jahr in der Abteilung für Chirurgie am Caritas Krankenhaus St. Josef in Regensburg  
03/2020 – 06/2020 Zweites Tertial im Praktischen Jahr in der Abteilung für Anästhesiologie am Universitätsklinikum Regensburg  
11/2019 – 03/2020 Erstes Tertial im Praktischen Jahr in der Abteilung für Innere Medizin am Krankenhaus der Barmherzigen Brüder in Regensburg  
08/2018 Famulatur in der Abteilung für Gynäkologie am University Teaching Hospital in Lusaka, Sambia  
08/2017 Famulatur in der Abteilung für Anästhesiologie am Krankenhaus der Barmherzigen Brüder in Wien, Österreich  
03/2017 Famulatur in der Abteilung für Orthopädie am Dhulikhel Hospital in Dhulikhel, Nepal  
09/2016 Famulatur in der Hausarztpraxis von Dr. med. Stefan Zellner in Erding

## 13 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt habe.

Regensburg, den 25.04.2022

Jakob Riepl

## 14 Posterbeiträge

### **35. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber (German Association for the Study of the Liver, GASL), Heidelberg, 2019:**

Riepl J, Schilcher K, Vlaic S, Guthke R, Melter M, Weiss TS. Palmitic acid treatment alters expression of arachidonic-acid pathway associated genes in hepatoma cells linking fatty acids to inflammation. In: 35. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber. Zeitschrift für Gastroenterologie. Georg Thieme Verlag KG; 2019. doi:10.1055/s-0038-1677181

Schilcher K, Riepl J, Melter M, Weiss TS. Gesättigte Fettsäure Palmitat induziert Amphiregulin durch Aktivierung von Stress induzierten Signalwegen wie PKC. In: 35. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber. Zeitschrift für Gastroenterologie. Georg Thieme Verlag KG; 2019. doi:10.1055/s-0038-1677182