Die Bedeutung des Transkriptionsfaktors Nrf2 in chronischen Lebererkrankungen insbesondere der alkoholischen und nicht-alkoholischen Steatohepatitis

> Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

> > zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften Dr.rer.nat. genehmigte Dissertation von

Dipl.-Biotech. Jutta Lamlé

geboren am 23. Januar 1980 in Volkmarsen

2010

Referenten	Prof. Dr. rer. nat. Bernd Otto
	Tierärztliche Hochschule Hannover
	Prof. Dr. rer. nat. Walter Müller
	Medizinische Hochschule Hannover
Korreferent	PD Dr. med. Arndt Vogel
Konelelelik	Medizinische Hochschule Hannover
Koncicient	Medizinische Hochschule Hannover
Tag der Promotion	19.02.2010

Zusammenfassung

Der Transkriptionsfaktor NF-E2-related factor 2 (Nrf2) ist für den Schutz der Zellen vor xenobiotischem und oxidativem Stress von essentieller Bedeutung. Erhöhter oxidativer Stress wird mit der Pathogenese vieler weit verbreiteter Krankheiten in Zusammenhang gebracht, darunter auch die der alkoholischen und nicht-alkoholischen Leberschädigung. Aus diesem Grund haben wir die Rolle von Nrf2 in Verbindung mit diesen Erkrankungen näher untersucht.

Zur Simulation der alkoholischen Lebererkrankung wurden Wildtyp (WT) und *Nrf2^{-/-}* Mäuse mit einer Lieber-deCarli Ethanol Diät gefüttert. Im Anschluss erfolgte die Analyse von Mortalität, Leberhistologie und Ethanol-Metabolismus. Hinsichtlich der nicht-alkoholischen Fettleber-Erkrankung wurden die gleichen Genotypen entweder mit einer Methionin und Cholin-defizienten Diät (MCD) oder mit einer stark fetthaltigen Diät (HFD) gefüttert.

Nach Fütterung einer Ethanolmenge, welche von WT Mäusen gut toleriert wurde, wiesen Nrf2^{-/-} Mäuse eine dramatisch erhöhte Mortalität auf, die mit einem Leberversagen verbunden war. Dabei zeigten Nrf2^{-/-} Mäuse eine signifikant reduzierte Fähigkeit zur Detoxifizierung von Acetaldehyd, die zu einer Akkumulation des toxischen Metaboliten führte. Der Verlust von Nrf2 verursachte weiterhin eine hochgradige Lebersteatose in Ethanol-gefütterten Mäusen, wobei SREBP-1 in diesem Zusammenhang als potentieller Transkriptionsfaktor für die Induktion lipogener Enzyme identifiziert wurde. Des Weiteren führte der Konsum von Ethanol zu einer progressiven Depletion in der totalen sowie der mitochondrialen GSH-Konzentration. Dies war mit einer ausgeprägten strukturellen und funktionalen Veränderung in den Mitochondrien der Nrf2-/- Mäuse verbunden. Zusätzlich löste die Ethanolbehandlung in den Nrf2-/- Mäusen eine schwere, durch Kupfferzellen vermittelte inflammatorische Reaktion aus, welche anhand einer erhöhten TNF-α Ausschüttung und der Aktivierung des IL-6 / STAT3 Signalweges nachgewiesen wurde. Insgesamt führten die Veränderungen zu einem Circulus vitiosus, in dem der zunehmende hepatozelluläre Schaden schließlich in einem Leberversagen und dem Tod der Nrf2^{-/-} Mäuse endete.

Während sich die Lipidakkumulation in den MCD-gefütterten WT und *Nrf2*^{-/-} Mäusen nicht unterschied, wiesen die *Nrf2*^{-/-} Mäuse unter der HFD eine signifikant verlangsamte Gewichtszunahme auf. Erstaunlicherweise stand diese Verzögerung in keinerlei Zusammenhang mit Unterschieden bezüglich oxidativem Stress, Leberschädigung oder metabolischen Veränderungen. Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen löste der Verlust von Nrf2 unter der MCD-Behandlung eine vermehrte, durch oxidativen Stress-induzierte Lipidperoxidation aus. Die Belastung durch die chronische Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) verursachte wiederum eine verstärkte Produktion von Zytokinen und eine gesteigerte Rekrutierung inflammatorischer Zellen sowohl des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems. Diese gesteigerte inflammatorische Antwort führte letztendlich zu einer verstärkten Fibroseentwicklung.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit eine zentrale Bedeutung von Nrf2 im Schutz gegen alkoholische und nicht-alkoholische Lebererkrankungen nachgewiesen werden.

Schlagworte: oxidativer Stress, Acetaldehyd, Lipidakkumulation

Abstract

The transcription factor NF-E2-related factor 2 (Nrf2) is essential for protecting cells against xenobiotic and oxidative stress. Increased oxidative stress has been implicated in the pathology of many common diseases including alcoholic and non-alcoholic liver injury. Therefore, we investigated the role of Nrf2 in conjunction with these diseases.

In terms of alcoholic liver disease, wildtype (WT) and *Nrf2^{-/-}* mice were fed with the Lieber-deCarli ethanol diet, followed by examination of mortality, liver histology and ethanol metabolism. Regarding non-alcoholic fatty liver disease, the same genotypes were fed with either a methionine- and choline-deficient diet (MCD) or a high fat diet (HFD).

*Nrf*2^{-/-} mice displayed a dramatically increased mortality associated with liver failure when fed doses of ethanol that were tolerated by WT mice. *Nrf*2^{-/-} mice exhibited a significantly reduced ability to detoxify acetaldehyde leading to an accumulation of this toxic metabolite. Loss of Nrf2 caused marked steatosis in livers of ethanol-fed mice, and SREBP-1 was identified as a candidate transcription factor responsible for lipogenic enzyme induction. Furthermore, ethanol consumption led to a progressive depletion of total and mitochondrial GSH, which was associated with more pronounced structural and functional changes to mitochondria of *Nrf*2^{-/-} mice. Additionally, ethanol feeding elicited an aggravated inflammatory response mediated by Kupffer cells in livers of *Nrf*2^{-/-} mice as shown by an increased TNF-α secretion and activation of the IL-6 / STAT3 pathway. Together these changes led to a vicious circle of accumulating hepatocellular damage, ultimately leading to liver failure and death of *Nrf*2^{-/-} mice.

While lipid accumulation did not differ in MCD-fed WT and *Nrf2*^{-/-} mice, weight gain was significantly decelerated in *Nrf2*^{-/-} mice fed with the HFD. Surprisingly this delay was not accompanied by any differences in oxidative stress, liver damage or metabolic changes in HFD-fed *Nrf2*^{-/-} mice. Contrary to these observations loss of Nrf2 led to an increase in oxidative stress-induced lipid peroxidation under MCD treatment. The burden of chronic reactive oxygen species (ROS) formation in turn accelerated cytokine production and recruitment of inflammatory cells derived from both innate and adaptive immune system. The elevated inflammatory response in turn resulted in an aggravated development of liver fibrosis.

In summary, this data establish a central role for Nrf2 in the protection against alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease.

Keywords: oxidative stress, acetaldehyde, lipid accumulation

Inhaltsverzeichnis

Zusammer	nfassung		11
Abstract			. IV
Inhaltsverz	eichnis		V
Abkürzung	Isverzeichnis		VIII
Tabellenve	erzeichnis		. XI
Abbildungs	sverzeichnis		XII
1.	Einleitung		. 15
1.1	Der Transkr	iptionsfaktor Nrf2	.15
	1.1.1	Oxidativer Stress	. 15
	1.1.2	Der "anti-oxidative response element"-vermittelte Signalweg	. 15
	1.1.3	Die Regulation von Nrf2 durch Keap1	.16
	1.1.4	Keap1 reguliert die Stabilität von Nrf2	.17
	115	Die Rolle von Nrf2 in der Leber	19
	116	Die Rolle von Nrf2 in der Regulation des Immunsystems	20
12	Alkoholmeta		21
1.2	1 2 1	Acetaldebyd als reaktives Intermediärnrodukt	23
13	Linidstoffwa	cheol	24
1.5	131	ß Ovidation	. 27
	1.3.1		. 2J 26
	1.3.2	Degulation des Estteäurometebolismus	.20
4 4	I.J.J	Regulation des Feitsauremetabolismus	. 21
1.4	von der Fell	Des restats l'astra Ornatione	.29
	1.4.1	Das metabolische Syndrom	. 30
	1.4.2	Der Zusammennang zwischen NAFL und Insulinresistenz	.32
	1.4.3	Die Entstehung einer hepatischen Steatose	. 33
	1.4.4	Der Weg von der hepatischen Steatose zur Steatohepatitis	.35
2	Ziel dieser S	Studie	. 37
3	Material und	I Methoden	.38
3.1	Versuchstie	re	. 38
	3.1.1	Experimentelles Tiermodell zur Simulation einer ASH	. 38
	3.1.2	Experimentelles Tiermodell zur Simulation einer NASH	.39
3.2	Blutserumar	nalyse	. 40
3.3	Bestimmund	des hepatischen Cholesterin-, Triglycerid- und Phospholipidgehalts	.40
3.4	Bestimmung der freien Fettsäuren in der Leber		
3.5	Western Blo	, t Analvsen	.42
3.6	Färbungen.	,	.44
	3.6.1	Hämatoxylin und Eosin	.44
	362	TUNEL Färbung	45
	363	Ölrot-Q Färbung	45
	364	Sirius Rot Färbung	46
	365	Immunhistochemie auf Gefrierschnitten	<u>46</u>
	366	Immunhistochemie auf Daraffinschnitton	.⊤0 ⊿7
	0.0.0		.+/

3.7	Elektronenmikroskopie	48
3.8	Untersuchung der transkriptionellen Genexpression	49
	3.8.1 Isolation der RNA	49
	3.8.2 Spektrophotometrische Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration	49
	3.8.3 Herstellung der cDNA	50
	3.8.4 Semiguantitative Reverse Transkriptase-PCR	50
	3.8.5 Quantitative PCR	51
	3.8.6 Durchführung des mRNA Mikroarrays	53
3.9	Untersuchung von oxidativem Stress	53
	3.9.1 Oxidative Modifikation von Proteinen	53
	3.9.2 Oxidative Modifikation von Nukleinsäuren	53
	3.9.3 Bestimmung der MDA Konzentration mittels TBARS Assay	54
	3.9.4 Bestimmung des reduzierten Glutathions (GSH)	54
	3.9.5 Bestimmung der hepatischen ATP Konzentration	55
3.10	Bestimmung der Hydroxyprolin-Konzentration	55
3.11	Bestimmung der hepatischen Acetaldehyd-Konzentration	56
3.12	Aktivitätsmessung Alkohol-metabolisierender Enzyme	56
3.13	Statistische Auswertung	58
4	Ergebnisse	59
4.1	Der Verlust von Nrf2 führt zu einem geringeren Körpergewicht	59
4.2	Nrf2 [*] Mäuse zeigen Störungen im Glukose- und Fettsäuremetabolismus	60
4.3	Der Verlust von Nrf2 führt unter Alkohol zu einem drastischen Anstieg der Mortalitä	t62
4.4	Der Verlust von Nrf2 bewirkt einen verminderten Acetaldehyd-Metabolismus	64
4.5	Identifikation von funktionalen Genen und transkriptionellen Netzwerken in	
	ethanolbehandelten <i>Nrf2⁻⁷</i> und WT Mäusen	66
4.6	Ethanol-behandelte Nrf2 ⁴ Mäuse weisen keine signifikant vermehrte oxidative	
	Schädigung von DNA und Proteinen auf	69
4.7	Nrf2 ^{**} Mäuse zeigen eine abgeschwächte zelluläre anti-oxidative und xenobiotische	Э
	Stressantwort	70
4.8	Ethanol löst eine stärkere Immunantwort in Lebern von Nrf2 Mäusen aus	73
4.9	Der Verlust von Nrf2 führt sowohl unter der MCD als auch unter der HFD zu einer	
	Veränderung in der Gewichtszunahme	76
4.10	Der Verlust von Nrf2 hat abhängig von der Diät unterschiedliche Auswirkungen auf	
	den Lipidmetabolismus	80
4.11	Durch die Behandlung mit MCD und HFD verändert sich die Auswirkung der Nrf2-	
	Depletion auf den Glu-kosemetabolismus	82
4.12	Die Behandlung mit MCD führt zu einer deutlichen Induktion der Zellproliferation, di	ie
	durch den Verlust von Nrf2 jedoch vermindert wird	84
4.13	Der Verlust von Nrf2 verursacht erhöhten oxidativen Stress unter MCD-Fütterung .	86
4.14	Die durch MCD und HFD ausgelöste Steatose mani-festiert sich unter der MCD Dia	ät
	als Steatohepatitis	89
5	Diskussion	93
5.1	Die Akkumulation von Acetaldehyd bewirkt eine gesteigerte Mortalität in Nrf2 ^{-/-}	
0.1	Mäusen als Eolge einer verstärkten Induktion von SREBP-1	93
5.2	Die erhöhte mitochondriale Schädigung in $Nrf2^{-7}$ Mäusen sensibilisiert die Zellen fü	r
	weiteren Schaden	96
5.3	Nrf2 spielt eine entscheidende Rolle in der Regulation der angeborenen	
	Immunantwort in der ALD	97

5.4	Die Regulation der Lipid-Homöostase unterliegt einem Nrf2-abhängigen	
	Mechanismus	100
5.5	Die Progression zur NASH wird durch den Verlust von Nrf2 beschleunigt	
5.6	Derzeitige Mausmodelle sind nur eingeschränkt zur Simulation der humane	n NASH
	fähig	107
6.	Schlussfolgerung	109
Literaturve	erzeichnis	110
Lebenslau	f/Vita	121
Danksagu	ng	123
Erklärung	zur Dissertation	

Abkürzungsverzeichnis

8-oxo-dG	8-Oxo-7,8-dihydro-2'-desoxyguanosin
Abb	Abbildung
ACC	Acetyl-CoA-Carboxylase
ACS	Acyl-CoA-Synthetase
ADH	Alkoholdehydrogenase
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
AHA	American Heart Association
AKT	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 3
ALD	alcoholic liver disease
ALDH	Acetaldehyd-Dehydrogenase
ALT	Alanin-Aminotransferase
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
АроВ	Apolipoprotein B
ARE	anti-oxidative response element
AS160	AKT-Substrat
ASH	alkoholische Steatohepatitis
ATF	activating trasncription factor
ATP	Adenosintriphosphat
BAT	braunes Fettgewebe
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	bovines Serumalbumin
BSEP	bile salt export pump
bZIP	basischer Leucin-Zipper
CAT	Carnitin-Acetyltransferase
CCL	Chemokin Ligand
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
ChREBP	carbohydrate-responsive element-binding protein
СОТ	Carnitin-Oktanyltransferase
CPT	Carnitin-Palmityltransferase
CREB	cAMP responsive element binding protein
CYP2E1	Cytochrom P450 2E1
DAOS	N-ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3,5-dimethoxyanilin
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dG	Desoxyguanosin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNP	2,4-Dinitrophenylhydrazon
DNPH	2,4-Dinitrophenylhydrazin
ECD	elektrochemische Detektion
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK	extracellular signal-regulated kinase
ESI-MS	Elektrospray-Ionisation-Massenspektrometrie
EtOH	Ethanol
FABP	fatty acid binding protein
FAS	Fettsäure-Synthase
FATP	fatty acid transporter protein
Fos	v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase

GCLC	Glutamat-Cystein Ligase, katalytische Untereinheit
GCLM	Glutamat-Cystein Ligase, regulatorische Untereinheit
GCS	γ-Glutamylcystein Synthetase
GLUT	Glukose-Trasnporter
GP	Glutathion-Peroxidase
GR	Glutathion-Reduktase
Grb	growth factor receptor-bound protein
GS	Glykogen Synthase
GSH	reduziertes Glutathion
GSK	Glykogen Synthase Kinase
GSSG	oxidiertes Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
GTT	Glukose-Toleranztest
H&E	Hämatoxylin & Eosin
HCC	hepatozelluläres Karzinom
HED	high fat diet
HFE	Hämochromatose-Gen
HO-1	Hämoxygenase-1
HPI C	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
HSC	henatische Sternzelle
	International Diabetes Federation
	Interleukin
IRS	Incition Rezentor Substrat
	Insulin-Toleranztest
	Individuell belüfteter Käfig
	n lun N terminale Kinase
	Linidtrönfehon
	Lipopolycaccharido
	Mitogon aktiviarta Protainkingan
MAPK	Mathianin/Chalin Defiziente Diët
MCD	Mecrophage/Managuta Chamatastia Protain
	Malandialdabud
MDR	
MEUS	mikrosomales etnanoloxidierendes System
	macrophage innammatory protein
MRP	multidrug-resistance protein
MSREBP	
MIP	I rigiycerid- i ransferprotein
NAC	N-Acetylcystein
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukieotid-Phosphat
NAFL	
NAFLD	
NASH	nicht-alkonolische Steatonepatitis
NCEP-ATP	National Cholesterol Education Program-Adult Treatment Panel
NEFA	nicht veresterte freie Fettsäuren
NF-KB	nukleärer Faktor-KB
NHLBI	National Heart-, Lung- and Blood-Institute
NQO	NADPH-Quinon-Oxidoreduktase
Nrt2	NF-E2-related factor 2
NTCP	Na - I aurocholat Kotransporter
OATP	organic anion transport protein
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung

PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
Pl₃K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-biphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor
PPI	Phosphoprotein-Phosphatase Inhibitor
PPRE	peroxisome proliferator response element
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	quantitative PCR
RANTES	regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted
rER	raues Endoplasmatisches Retikulum
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RSP	ribosomales Protein
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
RXR	Retinoid X Rezeptor
SCD	Stearoyl-Coenzym A Desaturase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIM	single ion monitoring
SMA	glattes Muskelzell-Aktin
SOCS	suppressor of cytokine signaling
SOD	Superoxid-Dismutase
SOS	son of sevenless
SREBP	sterol regulatory element-binding protein
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TBARS	Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen
TdT	terminale Desoxynukleotid-Transferase
TE	Tris / EDTA
TG	Triglycerid
TGF	transforming growth factor
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinase
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TUNEL	I d I -vermittelte dU I P-Fluorescein-gekoppelte DNA-Fragment- Markierung
UDCA	Ursodesoxycholsäure
UGT	UDP-Glukuronosyltransferase
VLDL	very low density lipoprotein
WAT	weißes Fettgewebe
WT	Wildtyp

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Neue Kriterien zur klinischen Diagnose des metabolischen Syndroms	31
Tabelle 2: Verwendete Primärantikörper für Western Blot Analysen	43
Tabelle 3: Verwendete Sekundarantikörper für Western Blot Analysen	44
Tabelle 4: In der Immunhistochemie eingesetzte Primärantikörper	47
Tabelle 5: In der Immunhistochemie eingesetzte Sekundärantikörper	48
Tabelle 6: Sequenzen der verwendeten Primer für die semi-quantitative RT-PCR	50
Tabelle 7: Sequenzen der für die quantitative RT-PCR verwendeten Primer	51
Tabelle 8: Zusammensetzung der verwendeten Reaktionsansätze	58

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Prinzip der Nrf2-vermittelten Genexpression.	16
Abbildung 2: Schematische Darstellung eines alternativen Nrf2-Keap1 Signalweges	19
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Ethanolmetabolismus	21
Abbildung 4: Einfluss von Alkohol auf den Fettstoffwechsel der Leber.	22
Abbildung 5: Lipidkatabolismus und -anabolismus im Überblick	24
Abbildung 6: Schematische Darstellung der β-Oxidation	25
Abbildung 7: Zusammenfassung der durch PPAR regulierten Gene und ihre Rolle im	
Lipidmetabolismus	29
Abbildung 8: Vereinfachte Darstellung der Insulin-Signalwege	32
Abbildung 9: Abbildung der Primersequenzen mit Darstellung der entsprechenden Banden.	38
Abbildung 10: Absorptionsverlauf von NAD ⁺ und NADH	56
Abbildung 11: Beispiel einer fortlaufenden Enzymaktivitätsmessung	57
Abbildung 12: Im Vergleich zu gleichaltrigen WT Mäusen zeigten Nrf2 ^{-/-} Mäuse eine Redukt	on
in Körper- und Lebergewicht	59
Abbildung 13: Der Verlust von Nrf2 führte weder zu makroskopischen noch mikroskopische	า
Veränderungen in der hepatozellulären Struktur	59
Abbildung 14: Eine verminderte Nahrungsaufnahme war nicht ursächlich für das geringere	
Gewicht der <i>Nrf2^{-/-}</i> Mäuse verantwortlich	60
Abbildung 15: WT und <i>Nrf2</i> Mäuse zeigten identische Körpertemperaturen	60
Abbildung 16: Der Verlust von Nrf2 führte zu einem leicht aber signifikant erhöhten	
Glukosespiegel nach 16 h Nahrungsentzug	61
Abbildung 17: Der Glukosetoleranztest zeigte, dass Nrf2 ⁴ Mäuse im Vergleich zu WT Tiere	1
nach Glukoseinjektion mit einer verzögerten Insulinantwort reagierten	61
Abbildung 18: Der Verlust von Nrf2 führte zu einer spezifischen Reduktion in der hepatische	n
Akkumulation von Triglyceriden	61
Abbildung 19: Der Verlust von Nrf2 speigelte sich in einer teilweise signifikanten Reduktion	der
hepatozellularen Fettsaurekonzentrationen wider	62
Abbildung 20: Reprasentative H&E, TUNEL und BrdU Farbung von WT und Nriz Mausen	aur
Kontrolidiat sowie Ethanol-benandelten moribunden Tieren	63
Abbildung 21. $N/2$ Mause Zeigien einen urasiischen ALT-Anslieg im Behändungsverlaut.	03
Abbildung 22. Obenebensialen von wir und 1///2 Mausen unter Ethanoibenandrung	04
Abbildung 23. qPCR Analysen zur Untersuchung der transkiptionellen Genexpression von A	
Abbildung 24: ADH und ALDH Enzymaktivitäten in benatischen Proteinevtrakten	04 65
Abbildung 25: CVD2E1 Proteinevpression von W/T und Nrf2 ^{-/-} Mäusen ohne sowie nach 3tä	
Ethanolbehandlung	51901 65
Abbildung 26: Übergrüfung des Ethanolgehalts im Blut und Bestimmung der henstischen	05
Acetaldehyd-Konzentration pach definierter Ethanolgabe	66
Abbildung 27° In silico identifizierte Netzwerke von Genen, die in WT und Nrf2 ^{-/-} Mäusen unt	er.
Ethanolbehandlung differentiell reguliert waren	67
Abbildung 28. Bestimmung der Expression zentraler Proteine des Fettsäuremetabolismus v	on
WT und <i>Nrf2^{-/-}</i> Mäusen	68
Abbildung 29: Expression relevanter Proteine in Bezug auf die Regulation von SREBP-1	68
Abbildung 30: Die Ethanolbehandlung führte in keiner Grupppe zu einer signifikanten Erhöh	una
des 8oxoG / dG Verhältnisses	69

Abbildung 31:	Nrf2 ^{-/-} Mäuse zeigten sowohl mit der Kontrolldiät als auch mit der Ethanoldiät eine
	leicht erhöhte Anzahl an Carbonylresten69
Abbildung 32:	Die Ethanolbehandlung führte in der gesamten Leber sowie in den
	hepatozellulären Mitochondrien von moribunden Nrf2 ^{-/-} Mäusen zu einer
	signifikanten Abnahme der GSH-Konzentration70
Abbildung 33:	mRNA Konzentration von GCLC und Proteinkonzentrationen von GCLC und
	GCLM in Nrf2 ^{-/-} und WT Mäusen im Verlauf der Ethanolbehandlung71
Abbildung 34:	Hepatozelluläre ATP Konzentrationen waren in moribunden Nrf2 ^{-/-} Mäusen
	signifikant niedriger
Abbildung 35:	Elektronenmikroskopische Aufnahmen von vergrößerten Mitochondrien in
	Hepatozyten Ethanol-behandelter Mäuse71
Abbildung 36:	Semiquantitative RT-PCR von relevanten Genen des zellulären
	Detoxifikationssystems72
Abbildung 37:	Durch die zusätzliche Behandlung mit NAC konnte die Entstehung einer Steatose
	nicht verhindert werden73
Abbildung 38:	Leberschnitte von Kontrollen und Ethanol-behandelten moribunden Mäusen
	wurden auf die Expression von CD68 und CD11b analysiert74
Abbildung 39:	Bestimmung der TNF-a und IL-6 Konzentrationen im Blutserum von moribunden
	WT und <i>Nrf2^{-/-}</i> Mäusen75
Abbildung 40:	Western Blot Analysen zeigten eine massive STAT3 Aktivierung in moribunden
	<i>Nrf2^{-/-}</i> Mäusen
Abbildung 41:	6 h nach LPS-Gabe zeigten die Ethanol-behandelten Nrf2 ^{-/-} Mäuse eine
	verstärkte hepatozelluläre Schädigung75
Abbildung 42:	Bestimmung der ALT-Konzentration im Blutserum von Ethanol-behandelten WT
	und Nrf2 ^{-/-} Mäusen vor und 6 h nach LPS Injektion76
Abbildung 43:	Analyse der Proteinexpression und Aktivierung von STAT3, c-Jun und der MAPK
	ERK1/2 und JNK in WT und Nrf2 ^{-/-} Mäusen 1,5 h und 6 h nach LPS Injektion76
Abbildung 44:	Die MCD führte unabhängig vom Genotyp zu einer Reduktion des
	Körpergewichtes
Abbildung 45:	Der Verlust von Nrf2 führte unter der HFD zu einer signifikant verlangsamten
	Gewichtszunahme
Abbildung 46:	Repräsentative makroskopische Aufnahmen von WT und Nrf2 ^{-/-} Lebern nach
	MCD und HFD Behandlung78
Abbildung 47:	Darstellung der Veränderungen im Lebergewicht von WT und Nrf2 ^{-/-} Mäusen
	während der Behandlung mit MCD und HFD78
Abbildung 48:	Darstellung des Verhältnisses zwischen Körper- und Lebergewicht im
	Behandlungsverlauf
Abbildung 49:	Der Verlust von Nrf2 führte unter der HFD zu einer verlangsamten Zunahme im
	Fettgewebe
Abbildung 50:	In <i>Nrf2^{-/-}</i> Mäusen war der Anstieg der ALT-Konzentration im Blutserum während
	des Behandlungsverlaufs signifikant verringert
Abbildung 51:	Repräsentative H&E & Ölrot O Färbungen nach Fütterung mit MCD oder HFD 80
Abbildung 52:	Auswirkungen der MCD und HFD Behandlung auf die Triglyceridkonzentration im
	Blutserum sowie auf die hepatischen Triglycerid-, Cholesterin- und
	Phospholipidspiegel
Abbildung 53:	Verhältnis aus den gesättigten Fettäuren Palmitat und Stearat sowie den
	entsprechenden einfach ungesättigten Fettsäuren Palmitoleat und Oleat81
Abbildung 54:	Die transkriptionelle Analyse zeigte, dass die Fütterung mit MCD eine differen-
	tielle Regulation einiger an der Lipidsynthese beteiligten Gene induzierte82

Abbildung 56: Der Verlust von Nrf2 spiegelte sich lediglich unter HFD-Behandlung nach 16 h Nahrungsentzug in einem stärkeren Glukoseabfall wider
 Abbildung 56: Der Verlust von Nrf2 spiegelte sich lediglich unter HFD-Behandlung nach 16 h Nahrungsentzug in einem stärkeren Glukoseabfall wider
 Nahrungsentzug in einem stärkeren Glukoseabfall wider
 Abbildung 57: Der Glukosetoleranztest zeigte, dass die basalen Unterschiede zwischen den WT und Nrf2^{-/-} Mäusen durch die Behandlung mit MCD und HFD Diät aufgehoben waren
84 Abbildung 58: Repräsentative immunhistochemische Färbungen von BrdU, Ki67, p27 und
Abbildung 58: Reprasentative immunnistochemische Farbungen von BrdU, Ki67, p27 und
TUNEL
Abbildung 59: Die quantitative Auswertung der Ki67 Färbung zeigte einen signifikanten Anstieg an proliferierenden Zellen in WT Mäusen unter der MCD Diät85
Abbildung 60: Expressionsanalyse wichtiger Zellzyklus-regulierender Proteine in Leberlysaten von WT und <i>Nrf2^{-/-}</i> Mäusen nach 2 und 5 Wochen MCD-Behandlung
Abbildung 61: Quantitativer Nachweis von oxidativem Stress mittels TBARS-Assay zeigte signifikant höhere MDA-Konzentrationen in <i>Nrf2^{-/-}</i> Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen nach Behandlung mit MCD-Diät
Abbildung 62: Die Bestimmung der hepatischen GSH-Konzentration zeigte keine Beeinflussung der zellulären anti-oxidativen Stressantwort unter MCD-Behandlung
Abbildung 63: Semiquantitative RT-PCR Analyse von Phase-3-Transportergenen und
Bestimmung der Proteinexpression von oxidativem Stress-sensitiven Genen in
MCD-behandelten WT und Nrf2 ^{-/-} Mäusen
Abbildung 64: Repräsentative immunhistochemische Färbung gegen Makrophagen (CD68), Neutrophile (CD11b), B Zellen (CD20) und T-Zellen (CD3) in <i>Nrf2^{-/-}</i> Mäusen mit
und ohne MCD Behandlung89
Abbildung 65: Western Blot Analyse von Proteinen, denen eine wichtige Rolle in
inflammatorischen Signalwegen zukommt
Abbildung 66: mRNA Expression relevanter Zytokine in MCD-behandelten Mäusen
Abbildung 67: Repräsentative Sirius Rot und α-SMA Färbungen
Abbildung 68: Die guantitative Auswertung der Sirius Rot Färbung zeigte unter MCD-
Behandlung in <i>Nrf2^{-/-}</i> Mäusen eine signifikant stärkere Zunahme kollagenhaltiger
Fasern als in WT Mäusen91
Abbildung 69: Transkriptionelle Untersuchung von relevanten Genen für die Regulation der
Fibrose
Abbildung 70: Nur unter der MCD-Diät kam es zu einem Anstieg in der Hydroxyprolin-
Konzentration

1. Einleitung

1.1 Der Transkriptionsfaktor Nrf2

1.1.1 Oxidativer Stress

Oxidativer Stress entsteht durch ein Ungleichgewicht zwischen Oxidantien und Antioxidantien im Organismus. Dabei liegen vermehrt reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS), wie O_2 , H_2O_2 und OH Radikale, vor. Durch die Einwirkung oxidativer Radikale auf biologisches Material kommt es zu strukturellen und funktionellen Veränderungen in nahezu allen Makromolekülen innerhalb einer Zelle. Beispielsweise entstehen in Proteinen an einer Reihe von Aminosäuren neue funktionelle Gruppen, wie Hydroxyl- und Carbonylgruppen. Diese Modifikation von Aminosäuren kann unterschiedlichste Folgen haben. Sie reichen von Quervernetzungen über Proteinfragmentierung und Zerstörung der Tertiärstruktur bis hin zum vollständigen Verlust der Funktionalität [1]. Ebenso wie Proteine können auch Lipide durch die Einwirkung von ROS oxidiert werden. In diesem Fall führen die oxidativen Prozesse vor allem zu strukturellen und funktionellen Veränderungen in den Zellmembranen, deren Hauptbestandteil Lipide sind. Bei der Oxidation ungesättigter Fettsäuren entstehen außerdem Hydroperoxyl- und Alkoxylradikale, die DNA-Schädigungen induzieren können. Sie stehen im Verdacht als Promotoren an der Hepatokarzinogenese beteiligt zu sein [2,3]. Unabhängig von der Lipidperoxidation wird ebenfalls der direkte Einfluss oxidativer DNA-Schäden bei der Tumorentstehung diskutiert [4]. Eine direkte Schädigung der DNA geschieht vorwiegend durch Hydroxylradikale, die durch Reduktion von Wasserstoffperoxid in unmittelbarer Umgebung der DNA entstehen. Dabei kommt es zu Veränderungen im Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA, die zu Strangbrüchen oder zum Verlust einzelner Basen führen können.

1.1.2 Der "anti-oxidative response element"-vermittelte Signalweg

Zum Schutz vor der Schädigung durch ROS induziert oxidativer Stress in der Zelle die Expression von Detoxifikationsenzymen und antioxidativen Proteinen. Innerhalb der Promotorregion der induzierten Gene befindet sich das sogenannte "anti-oxidative response element" (ARE), eine cis-agierende DNA-Sequenz über welche die transkriptionelle Aktivierung vermittelt wird [5]. Die ARE-Kernsequenz wurde mit Hilfe von Mutationsanalysen identifiziert und um-

fasst die Sequenz 5'-TGACnnnGC-3'. Darüber hinaus wird die Wirksamkeit der ARE-Sequenz auch über die 5'- und 3'-flankierenden Bereiche bestimmt [5,6]. Neben der stark induzierten Genexpression durch oxidativen Stress unterliegen Gene mit ARE-Sequenz auch unter ungestressten Bedingungen einer geringen konstitutiven Expression. Weil ROS und andere endogene reaktive Moleküle dauerhaft in geringen Mengen durch den aeroben Metabolismus produziert werden, ist die konstitutive Genexpression unter der Kontrolle der ARE-Sequenz für die Erhaltung der zellulären Redox-Homöostase unter ungestressten Bedingungen ebenfalls von zentraler Bedeutung.

1.1.3 Die Regulation von Nrf2 durch Keap1

Die Aktivierung über die ARE-Sequenz erfolgt in erster Linie durch Nrf2 (*NF-E2-related factor 2*), einem Mitglied der "cap'n'collar" Familie von basischen Leucin-Zipper (bZIP) Transkriptionsfaktoren, zu denen auch Nrf1, Nrf3, Bach1 und Bach2 gehören [6,7]. Dabei haben frühere Studien gezeigt, dass Nrf2 sowohl die induzierbare als auch die konstitutive Genexpression kontrolliert [8].

Die Aktivität von Nrf2 wird in erster Linie durch Keap1 reguliert, welches seinerseits durch Wechselwirkungen mit Aktinfilamenten des Zytoskeletts in der Zelle verankert ist [9]. Bisher wurde angenommen, dass Nrf2 an Keap1 gebunden ist und so im Zytoplasma zurückgehalten wird.



Abbildung 1: Prinzip der Nrf2-vermittelten Genexpression.

Es wurde vermutet, dass die durch oxidativen Stress steigende Anzahl von Elektrophilen in der Zelle zu einer Veränderung im zellulären Redoxstatus führt,

welcher eine Oxidation von SH-Gruppen in Keap1 bewirkt. Die Aktivierung von Nrf2 würde demnach aufgrund einer Konformationsänderung ausgelöst, die wiederum zur Aufhebung der Bindung von Nrf2 führt. Durch die Freisetzung kann das aktivierte Nrf2 in den Zellkern translozieren, wo es zur Heterodimer-Bildung mit anderen basischen Leucin-Zipper-Proteinen, wie kleinen Maf Proteinen, c-Jun, Fos (*V-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog*), ATF-4 (*activating transcription factor-4*) oder CREB (*cAMP responsive element binding protein*) und zur anschließenden Induktion der Zielgene kommt [10].

Unabhängig davon konnte gezeigt werden, dass es sich bei Nrf2 um ein sehr unstabiles Molekül handelt ($t_{1/2} \sim 15$ min), welches der Ubiquitin-vermittelten proteolytischen Degradation durch das 26S Proteasom unterworfen ist. Es wurde deshalb vermutet, dass die Aktivierung von Nrf2 von Mechanismen abhängig ist, die zur Stabilisierung von Nrf2 und somit seiner zellulären Akkumulation beitragen [11,12]. Diese Entdeckung legte nahe, dass Nrf2 nicht in einem passiven Komplex im Zytosol zurückgehalten wird. In Übereinstimmung mit dieser Vermutung konnte Keap1 eine aktive Rolle in der Stabilisierung von Nrf2 nachgewiesen werden. Demnach fördert Keap1 aktiv die Ubiquitinylierung von Nrf2 durch einen Cullin-3 abhängigen Signalweg und führt Nrf2 so einer beschleunigten proteasom-abhängigen Degradierung zu [13,14]. Damit Nrf2 in ungestressten Zellen kontinuierlich degradiert werden kann, muss es sich bei Keap1 um ein konstitutiv aktives Protein handeln, welches in Bezug auf die Ubiquitinylierung von Nrf2 keinerlei Regulation unterliegt. Diese Vermutung wird durch die Beobachtung gestützt, dass eine Überexpression von Keap1 zu einer Zunahme von ubiquitin-konjugiertem Nrf2 in der Zelle führt [6]. Des Weiteren ist die Ubiquitinylierungsrate von Nrf2 und dessen Degradation in ungestressten Zellen in großen Teilen abhängig von der Anwesenheit von Keap1. So wurde in einem Mausmodell mit Leber-spezifischer Deletion von Keap1 gezeigt, dass es zu einer Akkumulation von Nrf2 im Zellkern kommt. Die Mäuse wiesen eine erhöhte Expression charakteristischer Nrf2-Zielgene sowie eine Resistenz gegenüber einer Acetaminophen-induzierter Leberschädigung auf [15]. Eine gleichzeitige Deletion von Nrf2 führte zu einer Aufhebung dieses Phänomens [16]. Diese Studien zeigen, dass die Interaktion zwischen Keap1 und Nrf2 eher einer transienten als einer andauernden Verbindung entspricht. Um in diesem Zusammenhang das Gleichgewicht von Nrf2 in der Zelle zu erhalten, bedingt es eine de novo Transkription und Proteinsynthese von Nrf2.

1.1.4 Keap1 reguliert die Stabilität von Nrf2

Damit Nrf2 sowohl die basale als auch die induzierbare Genexpression kontrollieren kann, bedarf dieser dynamische Prozess einer entsprechenden Regulation. Für die Kontrolle der basalen Expression anti-oxidativer Proteine muss Nrf2 auch unter ungestressten Bedingungen konstitutiv im Zellkern lokalisiert sein. Dies widerspricht der bisherigen Annahme, dass sich Nrf2 in ungestressten Zellen, kolokalisiert mit Keap1, im Zytoplasma befindet [17,18]. Diese Diskrepanz könnte aufgrund unspezifischer Kreuzreaktionen des anti-Nrf2 Antikörpers (C-20, Santa Cruz Biotechnology) entstanden sein, der in nahezu allen früheren Studien zur subzellulären Lokalisation eingesetzt wurde. Zu den Problemen im immunhistochemischen Nachweis von Nrf2, kamen zusätzliche Schwierigkeiten in der Detektion von Nrf2 in der Western Blot Analyse. Aufgrund der Tatsache, dass die Mobilität des Proteins auf Tris/Glycin-gepufferten SDS-Gelen nicht mit seinem Molekulargewicht korrespondiert, war eine eindeutige Identifikation von Nrf2 nicht möglich [19]. Vor allem in ungestressten Zellen, in denen die Konzentration von Nrf2 ohnehin gering ist, erschwert dies die Möglichkeit, beweiskräftige Ergebnisse zu erzielen.

Mittlerweile wurde ein verbesserter anti-Nrf2 Antikörper mit sehr geringer Kreuzreaktivität hergestellt, mit dem nachweisbar war, dass endogenes Nrf2 auch in Abwesenheit von Stressoren vorwiegend im Zellkern lokalisiert ist [11]. Diese Ergebnisse legen nahe, dass es sich bei Nrf2 um ein nukleäres Protein handelt, dessen Translokation in den Zellkern – nach erfolgter zytosolischer Proteinsynthese an den Ribosomen – keiner Regulation unterliegt. Vielmehr stellt sich die stressinduzierte Akkumulation von Nrf2 im Zellkern als Ergebnis einer verbesserten Stabilität dar, welche durch eine verminderte Degradationsrate begründet ist. Daraus ergibt sich allerdings die Frage, wie die Interaktion von Keap1 und Nrf2 zur Ubiquitinylierung zustande kommen kann. Bisher wurde dies noch nicht eindeutig geklärt. In einigen Studien gelang es, Keap1 eine transiente Shuttle-Aktivität zwischen Nukleus und dem Zytoplasma nachzuweisen [20,21]. In anderen Arbeiten hingegen gelang dieser Nachweis nicht [22]. Die Beobachtung, dass die Inhibition der Proteasomaktivität durch MG132 eine Akkumulation sowohl von intaktem als auch von ubiquitinyliertem Nrf2 im Zellkern verursacht, weist jedoch darauf hin, dass beide Reaktionen – Ubiquitinylierung und Degradation – im Zellkern stattfinden [11]. Der exakte Mechanismus, wie Nrf2 der Degradation unterzogen wird, ist bislang noch nicht vollständig aufgeklärt. Die Stabilität vieler Transkriptionsfaktoren ist jedoch an die Potenz ihrer Transaktivierungsdomäne geknüpft, die oftmals überlappend mit deren Degron ist [23]. Da Nrf2 eine starke Transaktivierungsdomäne besitzt, die in direkter Nähe zur Keap1-interagierenden Neh2 Domäne lokalisiert ist, könnte die Degradation über Mechanismen reguliert werden, welche an die transkriptionelle Aktivität von Nrf2 geknüpft sind [24,25]. Der auf diesen Erkenntnissen basierende alternative Signalweg zur Regulation der Stabilität von Nrf2 durch Keap1 ist in Abbildung 2 zusammengefasst.



Abbildung 2:

Schematische Darstellung eines alternativen Nrf2-Keap1 Signalweges.

aus: Nguyen T et al. J. Biol. Chem. 2005;280:32485-32492

Obwohl die Stabilität von Nrf2 als Antwort auf oxidativen Stress durch eine reduzierte Degradationsrate ansteigt, lässt die zwar verlangsamte aber dennoch hohe Abbaurate vermuten, dass Nrf2 auch unter Stressbedingungen einem regulatorischen Mechanismus unterliegt, der eine unkontrollierte Akkumulation verhindert [12]. Bisher ist allerdings noch völlig unklar, ob die stress-bedingte Stabilisierung von Nrf2 unabhängig von der generellen Degradation agiert oder eine Kopplung zwischen beiden Prozessen existiert.

Aufgrund der vielen Cystein-Reste in seiner Primärstruktur ist Keap1 ein attraktives Ziel für eine potentielle Regulation durch Thiol-reaktive Substanzen. Tatsächlich wurde die Modifikation von Keap1 mit Inhibition seiner Aktivität bereits mehrfach als wichtiger Mechanismus für die Aktivierung von Nrf2 diskutiert [10,18]. Diese Modifikation von Keap1 könnte zu einer eingeschränkten Bindung mit Nrf2 führen. Jedoch wurde bereits gezeigt, dass diese strukturellen Veränderungen in Keap1 keinen Einfluss auf dessen Shuttle-Aktivität haben [26]. Die genauen Mechanismen, die zur Stabilisierung von Nrf2 führen, müssen demnach noch näher erforscht werden.

1.1.5 Die Rolle von Nrf2 in der Leber

Die durch ARE / Nrf2 koordinierte Induktion von Genen ermöglicht einen maximalen Schutz vor oxidativem Stress. Mittlerweile wurden mittels Mikroarray-Analysen mehr als 200 Nrf2-regulierte Gene identifiziert, unter anderem Phase-2-Detoxifikationsenzyme wie NADPH-Quinon-Oxidoreduktase (NQO) 1, NQO2 und Glutathion-S-Transferasen (GSTs), aber auch Antioxidantien wie Hämoxygenase-1 (HO-1), Ferritin, Superoxid-Dismutase (SOD), Glutathion-Reduktase (GR) und Glutathion-Peroxidase (GP) sowie NADPH-generierende Enzyme wie UDP-Glukose-Dehydrogenase, Malat-Oxidoreduktase und Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase [27,28]. Phase-2-Detoxifikationsenzyme spielen bei der Metabolisierung von Arzneimitteln und anderen Xenobiotika eine entscheidende Rolle. Das Vermögen zu dieser Metabolisierung hängt entscheidend von der Fähigkeit eines Organismus ab, die Expression und Aktivität der dazu notwendigen Entgiftungsenzyme bedarfsgerecht zu regulieren. Die essentielle Bedeutung dieser regulierten Gen-Induktion in der Leber wurde durch Studien an Nrf2-Knockout-Mäusen (Nrf2^{-/-}) weiter untermauert. So wurde gezeigt, dass Nrf2-defiziente Mäuse eine erhöhte Sensitivität gegenüber einer Reihe von toxischen Substanzen aufweisen und bereits nach wesentlich geringeren Dosen an Acetaminophen oder Fas aufgrund eines akuten Leberversagens sterben [29,30]. Da die erhöhte Sensibilität der Nrf2^{-/-} Mäuse durch die Gabe von N-Acetylcystein (NAC) verringert wird, wurde diese primär auf die mangelnde Induzierbarkeit der Synthese von reduziertem Glutathion (GSH) zurückgeführt. Zusätzlich zu den Studien im Mausmodell wurde in in vitro Experimenten gezeigt, dass auch humane Phase-2-Detoxifikationsenzyme, wie die UDP-Glukuronosyltransferase UGT1A1, ebenfalls durch Nrf2 in der Leber reguliert werden [31]. Obwohl Nrf2 in erster Linie für die Regulation von Phase-2-Enzymen verantwortlich ist, wurde in jüngster Zeit auch nachgewiesen, dass Nrf2 ebenfalls an der Regulation von einigen Phase-3-Transportersystemen beteiligt ist. Dazu zählen die multidrugresistance Proteine (MRP)1 – 4 [32,33] sowie das hauptsächlich für den Abtransport von Gallensalzen verantwortliche BSEP (bile salt export pump) [34]. Die protektive Wirkung von Ursodesoxycholsäure (UDCA) in cholestatischen Lebererkrankungen wurde dementsprechend auf eine Induktion von Nrf2 zurückgeführt [35].

1.1.6 Die Rolle von Nrf2 in der Regulation des Immunsystems

Neben der Genregulation von detoxifizierenden Enzymen ist Nrf2 auch an der Aktivierung des Immunsystems – vor allem von Makrophagen – beteiligt [36]. Arbeiten zu diesem Thema haben gezeigt, dass es bei $Nrf2^{-/-}$ Mäusen während einer experimentell induzierten Sepsis zu einer deutlich erhöhten Mortalität kam. Des Weiteren wurde eine verstärkte Aktivierung des Immunsystems durch Lipopolysaccharide (LPS) und Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) nachgewiesen. Neuere Studien belegen außerdem, dass die im Alterungsprozess verminderte T_H1-Immunantwort vom zellulären Redoxpotential abhängig ist. Durch Aktivierung von Nrf2 und der damit verbundenen Wiederherstellung des oxidativen Gleichgewichts wurde zusätzlich eine Verbesserung in der angeborenen Immunantwort erreicht [37]. In chronischen Leberschädigungen durch Hepatitis C-Infektionen führte zudem die Aktivierung von Nrf2 zur Induktion von Proteinen,

die zum zellulären Überleben beitragen [38] und unterstreicht damit eine wichtige Funktion von Nrf2 im Immunsystem.

1.2 Alkoholmetabolismus

Per os aufgenommener Alkohol wird vor allem durch Resorption an Schleimhäuten aufgenommen. Dazu zählen zu einem geringen Prozentsatz die Mundschleimhaut, vor allem aber die Magenschleimhaut und die des Dünndarms. Dabei hängt die Menge des resorbierten Alkohols von der Kontaktdauer mit der Schleimhaut ab. Diese wird unter anderem durch Geschlecht, Alter und genetische Faktoren, aber auch durch die aufgenommene Nahrung, eventuell eingenommene Medikamente oder Vorerkrankungen beeinflusst [39]. Anschließend gelangt der Alkohol über die Pfortader in die Leber, in der ein Großteil (>90%) des Alkoholmetabolismus stattfindet. Die drei möglichen Stoffwechselwege sind in Abbildung 3 dargestellt.



Abbildung 3: Schematische Darstellung des Ethanolmetabolismus (aus: www.benbest.com/health/alcohol.com).

Der Hauptanteil des Ethanols wird im Zytosol der Hepatozyten unter NAD⁺-Verbrauch durch das Enzym Alkohol-Dehydrogenase (ADH) zu Acetaldehyd oxidiert. Bis zu 10% des Ethanols können durch das mikrosomale ethanoloxidierende System (MEOS) verstoffwechselt werden, in dem CYP2E1 – ein Enzym der Cytochrom P450 Familie – von essentieller Bedeutung ist. Chronischer Alkoholkonsum führt zur Induktion des MEOS-Systems und bewirkt durch posttranskriptionelle Modifikationen eine bis zu 10fache Erhöhung der CYP2E1-Konzentration in der Leber. Die Induktion von CYP2E1 führt jedoch neben einer erhöhten Produktion freier Radikale auch zu Veränderungen in der Glutathion-Homöostase. In vitro Studien haben gezeigt, dass die Überexpression von CYP2E1 zu einer erhöhten GSH-Konzentration sowie einem Anstieg in der GSH Syntheserate und der mRNA Expression der y-Glutamylcystein-Synthase (GCS) führt [40]. Aus diesem Grund wird angenommen, dass CYP2E1 signifikant zur Alkohol-induzierten Leberschädigung beiträgt [41-43]. Der dritte Stoffwechselweg verläuft über eine Wasserstoffperoxid-verbrauchende peroxisomale Katalase, spielt allerdings nur eine untergeordnete Rolle [44]. Alle drei Stoffwechselwege führen zur Entstehung von Acetaldehyd, welches in den Mitochondrien durch die Acetaldehyd-Dehydrogenase (ALDH) in Acetat überführt wird [45]. Durch eine Thiokinase kann das Acetat zu Acetyl-CoA aktiviert und so dem Citratzyklus zugeführt werden.



Abbildung 4: Einfluss von Alkohol auf den Fettstoffwechsel der Leber (aus: Mueller S und Seitz HK "Alkohol und Lebererkrankungen" MedWelt 6/2008).

Wie in Abbildung 4 dargestellt verursacht chronischer Alkoholkonsum eine verstärkte Einlagerung von Triglyceriden in der Leber. Dies geschieht einerseits durch eine gesteigerte Zufuhr freier Fettsäuren aus dem Darm. Andererseits führt Ethanol zur Steigerung der Katecholamin-Konzentration und einer Lipase-Aktivierung, welche die vermehrte Freisetzung freier Fettsäuren aus dem Fettgewebe zur Folge haben. Zusätzlich verändert sich das Redox-Potential der Leber durch die vermehrte Bildung von reduziertem NADH. Dieses hemmt die β-Oxidation in Mitochondrien und stimuliert die Synthese von freien Fettsäuren aus Acetcy-CoA. Außerdem verursacht chronischer Alkoholkonsum eine vermehrte Expression mikrosomaler Enzyme zur Veresterung freier Fettsäuren und steigert damit die Triglycerid-Synthese. Des Weiteren hemmt Acetaldehyd die Sekretion von *very low density lipids* (VLDLs), welche für den Transport von Triglyceriden in die Peripherie verantwortlich sind. Das Resultat ist eine Überladung der Leber mit Triglyceriden und die Aktivierung alternativer Stoffwechselwege zum Abbau freier Fettsäuren.

1.2.1 Acetaldehyd als reaktives Intermediärprodukt

Regelmäßiger Konsum von Alkohol resultiert in einer bis zu dreifachen Steigerung des Ethanolmetabolismus. Diese Steigerung betrifft jedoch nur den ersten Abschnitt des Stoffwechselweges, was zu einer Akkumulation des Intermediärproduktes Acetaldehyd führt. Acetaldehyd ist ein hoch reaktives Elektrophil, welches sofort mit nucleophilen Gruppen, wie Amino- oder Sulfhydrylgruppen von biologischen Makromolekülen reagiert. Die Bildung von Addukten mit Aminogruppen von Proteinen [46,47] als auch mit Basen der DNA [48,49] wurde bereits intensiv untersucht. Zudem stellen die gebildeten Protein-Addukte Anreize für das Immunsystem dar, welche zu einer allgemeinen inflammatorischen Stimulation und zur Bildung spezifischer Antikörper führen [50-52]. Des Weiteren wurde gezeigt, dass Acetaldehyd in in vitro Experimenten mit Säugetierzel-Ien chromosomale Aberrationen und den Austausch von Schwesterchromatiden induziert [53,54]. Acetaldehyd trägt außerdem zur Bildung freier Radikale bei, die entweder zur Lipidperoxidation oder – durch direkte Bindung an die DNA – zu Ablesefehlern und Mutationen im Erbgut führen [55]. Auch die direkte Inhibition der O6-Methylguanin-Transferase, einem Enzym des DNA-Reparaturmechanismus, wurde nachgewiesen [56]. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind jedoch noch nicht vollständig verstanden. Es wird angenommen, dass die zytotoxischen und mutagenen Effekte des Acetaldehyds im direkten Zusammenhang mit dem Voranschreiten der Alkohol-induzierten Schädigung sowohl der Leber als auch des gesamten Organismus stehen [43,57,58].

1.3 Lipidstoffwechsel

Lipide erfüllen im Organismus im Wesentlichen zwei Aufgaben: zum einen sind sie wichtiger Grundbaustein von Membranen, zum anderen dienen sie als Energiereserve und werden zu diesem Zweck vornehmlich in Adipozyten gespeichert.

Im Zentrum des Lipidstoffwechsels steht die aktivierte Essigsäure (Acetyl-CoA), die sowohl das Endprodukt aller katabolen Vorgänge als auch die Ausgangsverbindung für die Biosynthese sämtlicher Lipide darstellt. Einen Überblick über die zentrale Rolle von Acetyl-CoA bietet Abbildung 5.



Abbildung 5: Lipidkatabolismus und -anabolismus im Überblick.

Für den Energiemetabolismus sind vor allem die Fettsäuren von Bedeutung, die vom Organismus abgebaut aber auch – mit Ausnahme der beiden essentiellen Aminosäuren Linol- und Linolensäure – synthetisiert und in Form von Triglyceriden gespeichert werden können. Je nach Energiebedarf der Zelle kommt es zur Mobilisierung von Fettsäuren, die durch β -Oxidation, Citratzyklus und Atmungskette unter hohem Energiegewinn abgebaut werden. Die freigesetzte Energie wird in Form von Adenosintriphosphat (ATP) anderen Stoffwechselvorgängen zur Verfügung gestellt. Fehlt ein entsprechender Energiebedarf erfolgt hingegen der Einbau von Fettsäuren in Triglyceride oder Phospholipide. Entscheidend dafür, welcher metabolische Weg eingeschlagen wird, ist die Konzentration an Glukose im Blut. Hohe Glukosekonzentrationen im Blut inhibieren die β -Oxidation; die Energiegewinnung erfolgt hauptsächlich aus dem Abbau von Glukose. Sinkt die Glukosekonzentration im Blut zu weit ab, werden vermehrt Fettsäuren zur Gewinnung von Energie genutzt.

1.3.1 β-Oxidation

Vor Eintritt in den energieliefernden Katabolismus müssen die Fettsäuren zunächst aktiviert und anschließend zum Transport durch die innere Mitochondrienmembran an einen Transporter gebunden werden. Die Aktivierung erfolgt im Zytoplasma durch Coenzym A unter Verbrauch von ATP.



Abbildung 6: Schematische Darstellung der β-Oxidation (http://chemistry.gravitywaves.com).

Die Verbindung von Fettsäure und ATP unter Freisetzung von Pryophosphat wird durch die Acyl-CoA-Synthetase (ACS) katalysiert (Abb. 6). Das Zwischenprodukt Acyladenylat bleibt an das Enzym gekoppelt. Die folgende Reaktion, in der das Coenzym A die Adenosingruppe verdrängt und Acyl-CoA entsteht, wird ebenfalls von der ACS katalysiert. Auf der Außenseite der inneren Mitochondrienmembran treffen die nun als Acyl-CoA vorliegenden aktivierten Fettsäuren auf verschiedene Carnitin-Acyltransferasen, welche die Übertragung des Acyl-Rests vom Coenzym A auf L-Carnitin – und umgekehrt – katalysieren. Nach bisherigem Wissen existieren drei verschiedene Carnitin-Acyltransferasen mit unterschiedlichen Spezifitäten für verschiedene Kettenlängen der Substrate. Im Einzelnen sind dies die Carnitin-Aceyltransferase (CAT), die CarnitinOktanyltransferase (COT) und die Carnitin-Palmityltransferase (CPT) [59-61]. Das Carnitin-Palmityltransferasesystem besteht aus zwei, immunologisch gegeneinander abgrenzbaren, auf unterschiedlichen Genen kodierten Komponenten: CPT1 und CPT2 [62]. CPT1 katalysiert die Kopplung des Acyl-CoA an L-Carnitin unter Freisetzung von Coenzym A. Bei diesem Enzym handelt es sich um ein durch Malonyl-CoA hemmbares Protein, welches auf der inneren Oberfläche der äußeren mitochondrialen Membran lokalisiert ist [63,64]. Der Transport des Acyl-Carnitins durch die Membran erfolgt mittels Carnitin-Acylcarnitin-Translokase. Im Matrixraum der Mitochondrien katalysiert die in der inneren Membran lokalisierte CPT 2 die Übertragung des Acyl-Restes auf ein mitochondriales Coenzym A und macht die Fettsäure so dem Abbau durch β -Oxidation zugänglich. Im Gegensatz zur CPT 1 ist CPT 2 nicht durch Malonyl-CoA hemmbar [65].

An diesem Punkt sei erwähnt, dass die Hemmung von CPT1 durch Malonyl-CoA – dem Ausgangsstoff des Fettsäureanabolismus – der entscheidende Mechanismus zur Regulation des Fettsäurekatabolismus darstellt. Eine direkte Regulation der β -Oxidation ist nicht möglich, so dass einmal in die Mitochondrien eingeschleuste Fettsäuren auch abgebaut werden.

In der nachfolgenden β -Oxidation werden pro Durchlauf ein FADH₂ und ein NADH/H⁺ frei, welche in die Atmungskette eingespeist werden. Zusätzlich entstehen ein Acetyl-CoA, das entweder in den Citratzyklus übergeht oder in seiner Transportform als Ketonkörper anderen Organen als Energielieferant dient, sowie eine um zwei C-Atome verkürzte aktivierte Fettsäure.

1.3.2 Lipogenese

Der Hauptprozess der Lipogenese ist die Umwandlung von Acetyl-CoA zu Palmitinsäure (C₁₆). Dieser Prozess wird von dem Enzymkomplex Fettsäure-Synthase (*fatty acid synthase*, FAS) katalysiert und dient der Speicherung von Energie. Der Syntheseprozess besteht aus sieben Einzelreaktionen, die sechsmal hintereinander in derselben Reihenfolge durchgeführt werden. Die Expression von FAS wird durch SREBP-1c (*sterol regulatory element-binding protein-1c*) reguliert.

Die Fettsäure-Synthese kann in nahezu allen Zellen ablaufen, hauptsächlich findet sie jedoch in der Leber statt. Aus dem größtenteils aus der Glykolyse stammende Acetyl-CoA wird zunächst in einer Reaktion mit Oxalacetat ein Citrat-Molekül, welches über den Citrat-Malat-Shuttle von den Mitochondrien ins Zytosol transportiert werden kann. Im Zytosol vorhandenes Citrat stimuliert die Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC), ein Enzym welches nach erfolgter Spaltung des Citrats das entstandene Acetyl-CoA carboxyliert. Diese Reaktion ist die einzige, die nicht vom Multienzymkomplex FAS katalysiert wird. Sie wird als Schrittmacherreaktion bezeichnet und ist die wichtigste Kontrollstelle der Fettsäure-Synthese. Im Anschluss folgt die Bindung einer Acetylgruppe an die periphere SH-Gruppe sowie eines Malonyl-Restes an die zentrale SH-Gruppe von FAS. Die dicht nebeneinander lokalisierten C₂- und C₃-Reste können nun in einer Kondensationsreaktion unter Abspaltung von CO₂ verbunden werden. Durch die Bindung weiterer Malonyl-Reste kommt es zur Verlängerung der Fettsäurekette um jeweils 2 C-Atome bis sich schließlich eine Palmitoyl-Gruppe (C₁₆) an der zentralen SH-Gruppe von FAS befindet. Nach Abspaltung dissoziiert die Palmitinsäure aufgrund des physiologischen pH-Wertes sofort zu Palmitat und liegt anschließend als freie Fettsäure im Zytosol vor. Die weitere Verlängerung sowie die Herstellung ungesättigter Fettsäuren erfolgt über eine Anzahl verschiedener Enzyme. Die Umwandlung von Palmitat und Stearat (C₁₈) in ihre einfach ungesättigten Derivate Palmitoleat (C16:1) und Oleat (C18:1) erfolgt beispielsweise über das Enzym Stearoyl-Coenzym A Desaturase-1 (SCD-1) [67]. Durch Verknüpfung mit Glycerin werden die in den Hepatozyten synthetisierten Fettsäuren in Triglyceride umgewandelt, an VLDLs gebunden sezerniert und so zum eigentlichen Speicherort – den Adipozyten – transportiert.

1.3.3 Regulation des Fettsäuremetabolismus

Die Regulation des Fettsäuremetabolismus erfolgt auf zwei voneinander unabhängigen Wegen. Zum einen existiert eine Kurzzeitregulation, die vor allem von der Höhe des Blutzuckerspiegels und der damit verbundenen Konzentration an regulatorischen Enzymen abhängig ist. Wie bereits erwähnt stellt ACC den limitierenden Schritt in der Fettsäuresynthese dar. Es kann einerseits durch Citrat aktiviert und durch Palmitoyl-CoA oder andere aktivierte langkettige Fettsäuren inhibiert werden. Andererseits wird die Aktivität von ACC durch Phosphorylierung reguliert, welche in erster Linie durch die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) erfolgt und ACC in einen Zustand geringerer Aktivität versetzt. Aber auch die durch Glucagon aktivierte cAMP-abhängige Proteinkinase (Proteinkinase A, PKA) ist in der Lage, ACC zu phosphorylieren und damit zu inhibieren. Zusätzlich führt die Aktivierung von PKA zur Aktivierung des Phosphoprotein-Phosphatase Inhibitors 1 (PPI1), was eine reduzierte Fähigkeit zur Dephosphorylierung von ACC zur Folge hat. Insulin hingegen fördert die Aktivierung von Phosphatasen, die zur Dephosphorylierung und somit zur Aktivierung von ACC führen. Die Kurzzeitregulation ist also vorwiegend bedingt durch Verfügbarkeit von Substraten, allosterischen Effektoren und der Modifikation von Enzymen.

Die Langzeitregulation beruht auf der Veränderung in der Enzymsynthese. So bewirkt Insulin nicht nur eine Steigerung der ACC-Aktivität, sondern auch eine Erhöhung in der Synthese von ACC und FAS. Damit verbunden ist eine gesteigerte Glycogen- und Triglyceridsynthese. Nährstoffmangel hingegen führt zu einer Abnahme in der Synthese dieser beiden Enzyme und zur Erhöhung der β -Oxidation.

Transkriptionsfaktoren spielen in der Regulation des Lipidmetabolismus eine entscheidende Rolle. Der aus der Helix-Loop-Helix / Leucin-Zipper Familie stammende Transkriptionsfaktor ChREBP (*carbohydrate-responsive elementbinding protein*) ist einer der wichtigsten Glukose-abhängigen Regulatoren in der Leber. Es induziert in Synergie mit SREBP Gene der Lipogenese, wie ACC und FAS. Aber auch die zur Familie der nukleären Rezeptoren gehörenden PPAR (*peroxisome proliferator-activated receptor*) übernehmen eine entscheidende Funktion in der Lipidregulation. Nach Aktivierung durch seine biologischen Liganden heterodimerisiert PPAR mit dem Retinoid X Rezeptor (RXR). Diese Bindung verursacht eine Konformationsänderung, die es dem Komplex ermöglicht an eine PPRE (*peroxisome proliferateor response element*) DNA-Sequenz zu binden, welche in der Promotorregion spezifischer Zielgene lokalisiert ist [68].

PPARy reguliert in erster Linie die Differenzierung von Preadipozyten zu reifen Adipozyten [69]. Aus diesem Grund ist die Konzentration von PPARy im Fettgewebe am höchsten. Nur 10 – 30% der Expression von PPARy findet unter normalen Bedingungen in der Leber statt [70]. Trotzdem wurden bereits in mehreren Arbeiten erhöhte Konzentrationen von PPARy mit der Entstehung von Fettlebern in Zusammenhang gebracht [71]. Während PPARy vornehmlich die Fettsäuresynthese, deren Transport und Aufnahme in Adipozyten, sowie die Stimulation der Triglyceridsynthese und deren Speicherung begünstigt, beeinflusst PPARa in erster Linie den Fettsäurekatabolismus [72]. Es reguliert die Expression von Genen, die am Transport und der β-Oxidation von freien Fettsäuren beteiligt sind. Aus diesem Grund wird PPARa hauptsächlich in Geweben exprimiert, welche eine erhöhte mitochondriale und peroxisomale β-Oxidationsrate aufweisen, wie der Leber, aber auch Herz- und Skelettmuskel, den Nieren und braunem Fettgewebe (brown adipose tissue, BAT) [73,74]. Die primären Liganden von PPARα stellen sowohl gesättigte als auch ungesättigte Fettsäuren dar [75]. Eine Übersicht über die Gene, die durch PPARa reguliert werden, und deren Rolle im intrazellulären Lipidmetabolismus ist in Abbildung 7 dargestellt. In erster Linie steigert PPARa die Expression des Fettsäure-Transporter-Proteins (fatty acid transporter protein, FATP), welcher die Aufnahme von langkettigen Fettsäuren in die Leber ermöglicht. Im Zytosol der Hepatozyten werden die Fettsäuren entweder durch ACS aktiviert und der βOxidation zugänglich gemacht oder an das Fettsäure-Bindeprotein (*fatty acid binding protein*, FABP) gebunden und so der Verlust von freien Fettsäuren verhindert. Sowohl die Promotorregion von ACS als auch die von FABP enthält eine PPRE-Bindesequenz. Neben CPT1, dessen Gensequenz ebenfalls eine PPRE-Bindestelle enthält [76], werden weitere Schlüsselenzyme der β-Oxidation in Mitochondrien, Peroxisomen und Mikrosomen durch PPARα aktiviert. Entsprechend hemmt PPARα die beiden wichtigsten Enzyme der Lipogenese: ACC und FAS [77].



Hepatocyte

Abbildung 7: Zusammenfassung der durch PPAR regulierten Gene und ihre Rolle im Lipidmetabolismus [78].

1.4 Von der Fettleber zur Steatohepatitis

Der Begriff Fettleber – oder hepatische Steatose – bezeichnet die vermehrte intrazelluläre Akkumulation von Lipiden in der Leber. Die Speicherung der Lipide findet dabei in sogenannten Lipidtröpfchen (*lipid droplets*, LD) statt. Mit zunehmender Bildung solcher LD im Zytoplasma der Hepatozyten kommt es zunächst zu einer Vergrößerung der Leber (Hepatomegalie), welche für die Patienten jedoch meist ohne Beschwerden und somit unbemerkt bleibt. Eine weitere Progression der Steatose hin zu einer Steatohepatitis ist durch eine chronische inflammatorische Reaktion gekennzeichnet, die schließlich zur Entwicklung einer Leberfibrose führt. In einigen Fällen kann daraus eine Leberzirrhose entstehen, welche wiederum mit einem erhöhten Risiko der Entstehung eines hepatozellulären Karzinoms (HCC) verbunden ist.

Die molekularen Mechanismen hinter der Entstehung sowie dem Fortschreiten der Erkrankung sind bislang nicht vollständig verstanden. Es wurde gezeigt, dass der vermehrten Lipidakkumulation unterschiedliche Ursachen zugrunde liegen können. Zum einen kann übermäßiger Alkoholkonsum Auslöser einer Lebersteatose sein – in diesem Fall spricht man allgemein von einer alkoholischen Lebererkrankung (alcoholic liver disease, ALD) oder, beim entzündlichen Fortschreiten der Erkrankung, von einer alkoholischen Steatohepatitis (ASH). Für die Induktion der alkoholischen Leberverfettung wird vor allem das durch den hepatischen Alkoholabbau gesteigerte Anfallen von NADH, freien Radikalen und Acetaldehyd verantwortlich gemacht. Bei etwa 20% der Patienten kommt es zu einer entzündlichen Progression im Krankheitsverlauf. Die Entstehung einer ASH ist dabei auf eine durch Endotoxine und pro-inflammatorische Zytokine ausgelöste hepatische Entzündungsreaktion zurückzuführen, welche unter anderem zum Absterben von Hepaotzyten und damit einhergehend dem Anstieg der hepatischen Transaminasen im Blut führen kann. Des Weiteren werden durch Umbauprozesse hepatische Sternzellen (hepatic stellate cells,

HSC) aktiviert. Dies führt zu einer vermehrten Einlagerung von Bindegewebe und zur Entstehung einer Leberfibrose, die schließlich eine Leberzirrhose zur Folge haben kann.

Ist Alkohol als Hauptursache für die Entstehung der Krankheit auszuschließen, handelt es sich um eine nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH). Sowohl die nicht-alkoholische Fettleber (NAFL) als auch die entzündlich-progressive Form der NASH werden in der Literatur unter dem gemeinsamen Begriff der nichtalkoholischen Fettleber-Erkrankung (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) zusammengefasst. Als häufigste Ursache für die Entstehung einer NAFLD gilt das Überangebot an Nährstoffen und der daraus resultierenden Adipositas in der westlichen Zivilisation. Rund 15 – 20% der Bevölkerung sind dort von einer NAFL betroffen, in den US amerikanischen Staaten sind es sogar 25%. Davon leiden etwa 8% an einer NASH, in 2% der Fälle ist diese bereits im fortgeschrittenen Stadium der Zirrhose [79,80]. Die Anzahl der Patienten mit metabolischer Prädisposition für die Entstehung einer NAFLD steigt stetig [81-83]. Des Weiteren wurde eine verstärkte Inzidenz für NAFLD bei Patienten festgestellt, die bereits an einem Typ 2-Diabetes erkrankt sind [84,85]. Man nimmt daher an, dass die Entstehung einer NAFLD mit einer vorausgehenden Insulinresistenz verbunden ist [86].

1.4.1 Das metabolische Syndrom

Die NAFLD ist eine multifunktionale Erkrankung, die meist in Verbindung mit Hypertriglyzeridämie, Fettleibigkeit und Insulinresistenz steht. Aufgrund der Tatsache, dass ein Zusammenhang zwischen der Diagnose einer NAFLD und dem Bestehen eines metabolischen Syndroms beobachtet wurde, gilt die hepatische Steatose heute als Teil des metabolischen Syndroms [87].

Im Oktober 2009 wurde von nationalen und internationalen Fachorganisationen erstmals eine Definition des metabolischen Syndroms mit einheitlichen Kriterien zur klinischen Diagnose veröffentlicht [88]. An der Ausarbeitung dieser globalen Richtlinien waren die *"International Diabetes Federation"* (IDF), das *"National Heart-, Lung- and Blood-Institute"* (NHLBI), die *"World Heart Federation"*, die *"International Atherosclerosis Society"* sowie die *"American Heart Association"* (AHA) beteiligt. Bis zu diesem Zeitpunkt galten vor allem die Definitionen von IDF und NCEP-ATP III (*National Cholesterol Education Program-Adult Treatment Panel III*) als Richtlinien für die klinische Diagnostik. Jedoch unterschieden sich die festgelegten Richtlinien der jeweiligen Organisationen in vielen Aspekten, vor allem in Bezug auf die abdominale Fettverteilung.

Kriterium	Grenzwert
Erhöhter Taillenumfang	Bevölkerungs- und Länder-spez. Definitionen
Erhöhte Triglyceride	≥ 150 mg/dL
Vermindertes HDL Cholesterol	<40 mg/dL für Männer und <50 mg/dL für Frauen
Erhöhter Blutdruck	≥ 130/85 mmHg
Erhöhter Nüchternblutzucker	>100 mg/dL

 Tabelle 1:
 Neue Kriterien zur klinischen Diagnose des metabolischen Syndroms.

Ein Problem, welches auch in der neuen Definition weiterhin besteht, sind die weltweit beträchtlichen regionalen Unterschiede bezüglich des Taillenumfangs. Aus diesem Grund berücksichtigt die neue Definition geographische Unterschiede hinsichtlich Bevölkerungsgruppe und -land. Außerdem gilt die abdominale Fettverteilung nicht mehr als obligatorisch, sondern ist vielmehr eins von fünf Kriterien, die zur Diagnose des metabolischen Syndroms herangezogen werden (Tab. 1). Demnach leiden Patienten, die drei der fünf Kriterien erfüllen, am metabolischen Syndrom.

1.4.2 Der Zusammenhang zwischen NAFL und Insulinresistenz

In den meisten Fällen tritt eine NAFL zusammen mit einer Insulinresistenz in Erscheinung. Unter normalen Bedingungen wird Insulin von den pankreatischen β -Zellen der Langerhans'schen Inseln zur Regulation des Blutzuckerspiegels ausgeschüttet. Erhöhte Glukosekonzentrationen im Blut führen zur Sekretion von Insulin, welches an seinen Rezeptor bindet, Signalkaskaden aktiviert und so zu einer Absenkung des Blutzuckerspiegels führt. Dabei kommt es entweder direkt oder durch Bindung des Insulin Rezeptor Substrates (IRS) an den Insulin-rezeptor zur Aktivierung verschiedener zellulärer Signalwege (Abb. 8).



Abbildung 8: Vereinfachte Darstellung der Insulin-Signalwege [89].

Zum einen kann es durch die Bindung von Grb2 (*growth factor receptor-bound protein 2*) und SOS (*Son of Sevenless*) an den aktivierten Rezeptor zur Aktivierung des kleinen G-Proteins Ras kommen. Ras aktiviert anschließend die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Kaskade. Durch aufeinander folgende Phosphorylierungen der Proteinkinasen Raf, MEK und ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) wird schließlich die Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren ausgelöst, welche PPRE als charakteristisches Bindemotif in der Promotorregion ihrer Zielgene haben. In Muskel- und Fettzellen führt ein weiterer Signalweg zur Rekrutierung der Phosphatidylinositol-3-kinase (PI₃K) durch Bindung an das phosphorylierte IRS. Die gebundene PI₃K phosphoryliert wiederum Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂). Das entstandene Produkt PIP₃ dient als Membrananker für die Proteinkinase B (PKB oder *v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 3*, AKT). Die anschließende Aktivierung des AKT-Substrates (AS160) sowie der GTPase Rab bewirken die Translokation des Glukose-Transporters 4 (GLUT4) zur Zellmembran, was eine gesteigerte Glukoseaufnahme in die Zellen zur Folge hat. Insulin führt außerdem zur Aktivierung der Proteinkinase C (PKC), die wiederum das Schlüsselenzym Phosphofruktokinase aktiviert und damit einen erhöhten Glukoseverbrauch auslöst. Des Weiteren führt die Aktivierung von AKT zu einer Inhibition der Glykogen Synthase Kinase 3 (GSK3), welche die Dephosphorylierung der Glykogen-Synthase (GS) verursacht und die Umwandlung von Glukose in Glykogen erhöht.

Kommt es aufgrund eines gestörten Fettstoffwechsels zu einer reduzierten Insulinwirkung, versucht der Organismus diesen Mangel durch eine erhöhte Insulinsekretion zu kompensieren. Da Insulin allerdings nicht nur auf den Glukosemetabolismus einwirkt, sondern auch den Lipidstoffwechsel beeinflusst, bewirken dauerhaft erhöhte Insulinkonzentrationen eine vermehrte Speicherung von Lipiden in Fett- und Lebergewebe. Kann die verminderte Insulinwirkung nicht mehr durch eine vermehrte Ausschüttung kompensiert werden, kommt es zur Entstehung des manifesten Typ-2-Diabetes.

1.4.3 Die Entstehung einer hepatischen Steatose

Die molekularen Mechanismen, auf denen die intrahepatische Lipidakkumulation und die Entstehung von Lipidtröpfchen beruhen, sind bis heute wenig verstanden. Zum einen ist die vermehrte Aufnahme von Lipiden durch die Nahrung dafür verantwortlich. Zum anderen werden aber auch Faktoren, wie eine erhöhte *de novo* Fettsäuresynthese, eine eingeschränkte Synthese und Sekretion von Lipoproteinen sowie eine verminderte β -Oxidation als mögliche Ursachen diskutiert [90-93]. In diesem Zusammenhang spielt die Leber als Organ zur Regulation der Energie-Homöostase eine zentrale Rolle.

Die Aufnahme von freien Fettsäuren in die Leber verläuft Insulin-unabhängig und steigt vorrangig linear zur Verfügbarkeit der Nährstoffe im Blut [90]. Durch die Nahrung aufgenommene Lipide werden in Form von Chylomikronen vom Dünndarm in die Lymphbahn sezerniert und über das lymphatische System mit anschließendem Übergang in die Blutbahn zur Leber transportiert. Dort werden sie durch hepatische Lipasen aus den Chylomikronen freigesetzt und von Hepatozyten internalisiert. Nach weiterer Prozessierung und Abbau der Triglyceride erfolgt der Abtransport noch verbleibender Triglyceride in die Peripherie. Dies geschieht gemeinsam mit Apolipoprotein B 100 (ApoB) durch die Bildung von VLDLs. Diese Partikel werden von den Hepatozyten wieder sezerniert und transportieren die Lipide zur langfristigen Lagerung zum weißen Fettgewebe (*white adipose tissue*, WAT). Als Konsequenz führt eine übermäßige Zufuhr von Glukose und Lipiden über die Nahrung zu einer hepatischen Lipidakkumulation [94]. Einerseits steigert die exzessive Zufuhr von Kohlehydraten die Insulinabhängige *de novo* Fettsäuresynthese aus Acetyl-CoA, andererseits resultieren stark fetthaltige Lebensmittel per se in einer erhöhten Fetteinlagerung in der Leber.

Bei Patienten mit NAFLD wird angenommen, dass der hepatozelluläre Gehalt an Triglyceriden in erster Linie von der systemischen Verfügbarkeit von freien Fettsäuren abhängig ist. Studien mit markierten Isotopen haben gezeigt, dass 59% der hepatischen Triglyceride aus nicht veresterten freien Fettsäuren (*nonesterified fatty acids*, NEFAs) aus dem Serum stammen [95]. Die erhöhten Konzentrationen an zirkulierenden freien Fettsäuren lassen sich wiederum durch den Verlust der Insulinsensitivität im Fettgewebe erklären, der durch eine defekte Inhibiton der Lipolyse bedingt ist [96,97]. Obwohl die Leber das zentrale Organ zur Verteilung der Lipide an die Peripherie darstellt, ist dessen Kapazität zur Lagerung von Fetten begrenzt. Aus diesem Grund kann eine insuffiziente periphere Lipidspeicherung – beispielsweise aufgrund einer peripheren Insulinresistenz – zu einer Überschwemmung der Leber mit Lipiden führen, die als Konsequenz in einer hepatischen Steatose resultiert [98].

Des Weiteren zeigten klinische Studien, dass die Rate der *de novo* Lipidsynthese in Patienten mit Insulinresistenz und NAFLD deutlich erhöht ist. Sie ist auf eine metabolische Verschiebung von der β -Oxidation hin zur Lipidsynthese zurückzuführen. Dieser Übergang ist durch eine erhöhte Aktivität unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren begründet, zu denen PPAR γ , ChREBP, sowie SREBP-1c gehören [99-102]. Die Akkumulation von Triglyceriden in der Leber ist zudem auch die Folge einer mangelhaften β -Oxidation. Dabei verursacht die Akkumulation von Malonly-CoA als Intermediärprodukt der Fettsäuresynthese eine Inhibition der für den mitochondrialen Fettsäure-Import bedeutsamen CPT [103]. Daneben wurde ebenfalls der unvollständige Abtransport von Triglyceriden mittels VLDLs als mögliche Ursache der hepatischen Steatose in der NAFLD diskutiert [104,105].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es keine einzelne kausale Erklärung für die Entstehung einer hepatischen Lipidakkumulation gibt. Vielmehr ist die Entwicklung als ein Zusammenspiel verschiedener Faktoren zu verstehen, die zu einer initialen Steatose beitragen. Klinische Studien belegen außerdem, dass neben metabolischen auch genetische Präsidpositionen zur hepatischen Akkumulation von Lipiden beitragen können. So wurde gezeigt, dass Polymorphismen in den Genen der Hämochromatose (HFE), des PPARγKoaktivators 1 und der hepatischen Lipase, sowie des mikrosomalen Triglycerid-Transferproteins (MTP) und SREBP-1 ein zusätzliches Risiko für die Entstehung einer hepatischen Steatose darstellen [106-111].

1.4.4 Der Weg von der hepatischen Steatose zur Steatohepatitis

Das initial vorgeschlagene "Two-Hit" Modell [112] bietet eine pathophysiologische Erklärung für das Voranschreiten einer Steatose hin zu einer Steatohepatitis. Es propagiert, dass Alkoholmissbrauch sowie Adipositas und Insulinresistenz eine gesteigerte Fettsäure- und Lipidsynthese verursachen. Dauerhaft führt dies zu einer reversiblen intrazellulären Ablagerung von Triglyceriden ("First Hit", erste Störung). Zusätzlich werden verstärkt reaktive Sauerstoffspezies freigesetzt, die in erster Linie eine Schädigung der Mitochondrien verursachen. Oxidativer Stress führt deshalb langfristig zu metabolischen und molekularen Veränderungen, welche die Leber anfälliger werden lassen für die zweite Störung ("Second Hit"). Neben der vermehrt auftretenden Lipidoxidation führt vor allem die Ausschüttung von TNF-α zu einer Zytokin-vermittelten Leberschädigung, welche den Übergang hin zur Steatohepatitis einleitet. Das Stadium der Steatohepatitis ist deshalb vornehmlich durch eine vermehrte Schädigung der Zellorganellen – vor allem der Mitochondrien – sowie durch erhöhte Konzentrationen systemischer und lokaler Zytokine und der Rekrutierung inflammatorischer Zellen gekennzeichnet. Weitere Veränderungen führen zu einer Umgestaltung der extrazellulären Matrix, die den Weg ebnet für die Entstehung einer Leberfibrose mit dem möglichen Übergang hin zur Zirrhose und der Entwicklung eines HCCs [93,107].

Tatsächlich wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt, dass die kurz- und langfristige Exposition gegenüber NEFAs gravierende Folgen haben kann. Neben vermehrt auftretendem oxidativen Stress kommt es zur Induktion von Proteinen der zellulären Stressantwort. Vor allem die PKC, MAPK sowie die c-Jun N-terminalen Kinase (JNK) und der nukleäre Faktor- κ B (NF- κ B) werden dabei vermehrt exprimiert. Außerdem wurde eine erhöhte Expression proinflammatorischer Zytokine, wie TNF- α , IL-1 β und IL-6, nachgewiesen [113]. Die Aktivierung von Stress-sensitiven Signalkaskaden führen im weiteren Verlauf zu einer Reduktion im zellulären Energiemetabolismus und zu einer Verminderung der Insulinsensitivität. Die Insulinresistenz fördert wiederum eine nochmals gesteigerte Lipidakkumulation und endet in einer irreversiblen Progression des Krankheitsverlaufs.

Die neusten Forschungsberichte gehen davon aus, dass die Progression der NAFL zur NASH auf einer Lipotoxizität basiert. Darunter wird die Entstehung (lipo)toxischer Substanzen aufgrund der fehlgesteuerten Aufnahme, Produktion
und Lagerung von Fettsäuren und Lipiden verstanden. Aus heutiger Sicht sind es diese toxischen Substanzen, welche die Dysfunktion von Zellen in der oben diskutierten Tragweite bewirken [114]. Die genauen molekularen Mechanismen benötigen dennoch weiterer Aufklärung.

2 Ziel dieser Studie

In den vergangenen Jahren kam es in den westlichen Ländern zu einer massiven Zunahme chronischer Lebererkrankungen. Diese Entwicklung hat dazu geführt, dass der Versuch zur Aufklärung der zellulären und molekularen Mechanismen der hepatischen Steatose, sowie deren Fortschreiten hin zur entzündlichen Steatohepatitis zunehmend in den Fokus der Wissenschaft gerückt ist.

Der Transkriptionsfaktor Nrf2 ist von essentieller Bedeutung für den Schutz der Zellen gegen xenobiotische Schädigung und oxidativen Stress. Die Pathophysiologie vieler Krankheiten steht mit erhöhtem oxidativen Stress in Zusammenhang. Meist ausgelöst durch immunologische Reaktionen kann die Bildung erhöhter Mengen an ROS zu unterschiedlichsten Erkrankungen der Leber führen, zu denen auch die alkoholische und nicht-alkoholische Steatohepatitis zählen. Ziel dieser Studie war es deshalb, die Rolle von Nrf2 in Zusammenhang mit den chronischen Leberschädigungsmodellen der ASH und NASH näher zu untersuchen.

Zu diesem Zweck wurden Wildtyp (WT) und *Nrf2^{-/-}* Mäuse mit etablierten Fütterungsmodellen behandelt, die in den Tieren eine ASH bzw NASH auslösen sollten. Anschließend erfolgten die Untersuchung der Mortalität sowie die pathophysiologische und metabolische Auswertung der erkrankten Lebern unter Berücksichtigung folgender Fragestellungen:

- 1. Welchen Einfluss hat der Verlust von Nrf2 auf den Metabolismus?
- 2. Führt der Verlust von Nrf2 zu einer erhöhten Leberschädigung?
- Steht die verstärkte Leberschädigung im Zusammenhang mit einer vermehrten Bildung von ROS?
- 4. Ist das zelluläre Detoxifikationssystem durch den Verlust von Nrf2 beeinträchtigt?
- 5. Beeinflusst der erhöhte oxidative Stress die mitochondriale Atmungskette?
- 6. Zeigt sich durch eine gesteigerte Bildung von ROS eine verstärkte inflammatorische Reaktion?
- 7. Führt der Verlust von Nrf2 zu einer gesteigerten Fibroseentstehung?

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Alle durchgeführten Tierexperimente wurden vom niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit genehmigt. Während der gesamten Versuchsdauer wurden die Stämme in konventioneller Haltung oder unter sterilen Bedingungen in individuell belüfteten Käfigen (IVCs, *individually ventilated cages*) unter Simulation eines 12 h Tag / Nacht-Rhythmus gehalten. Die Tiere erhielten dabei Wasser und Futter *ad libitum*. Zur Durchführung der Experimente wurden ausschließlich männliche Tiere im Alter zwischen 6 – 8 Wochen verwendet. Die *Nrf2^{-/-}* Mäuse wurden von M. Yamamoto (Sendai, Japan) zur Verfügung gestellt [7] und befanden sich im genetischen Hintergrund von C57BI/6J Mäusen. Als Kontrollen dienten C57BI/6N Männchen (WT), die von Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) bezogen wurden.

Zur Genotypisierung der *Nrf2*^{-/-} Tiere wurde aus der Schwanzspitze genomische DNA isoliert. Je nach Genotyp erfolgte die Amplifikation der spezifischen Gensequenz (WT: 700 bp, *Nrf2*^{-/-}: 400 bp) in einer dreistufigen PCR (35 Zyklen: 96°C 20s, 59°C 30s, 72°C 45s) mit anschließender elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel. Die Primer wurden in einer Konzentration von 1 µM eingesetzt. Abbildung 9 zeigt die Sequenzen der verwendeten Primer (links) sowie eine repräsentative Darstellung der visualisierten Banden (rechts).

		and the second se	
Nrf2 WT 3'	GCC GCC TTT TCA GTA GAT GGA GG		()
Nrf2 KO 3'	GCG GAT TGA CCG TAA TGG GAT AGG		A leased
Nrf2 5'	TGG ACG GGA CTA TTG AAG GCT G		
		Nrf2 ^{+/+} Nrf.	2 ^{-/-} Nrf2 ^{+/-}

Abbildung 9: Abbildung der Primersequenzen mit Darstellung der entsprechenden Banden.

3.1.1 Experimentelles Tiermodell zur Simulation einer ASH

Zur Untersuchung der durch chronischen Alkoholkonsum hervorgerufenen Leberschädigung erhielten alle Mäuse zunächst eine Lieber DeCarli-Kontrolldiät (BioServ, Frenchtown, NJ), in welcher der kalorische Unterschied gegenüber der ethanolhaltigen Lieber DeCarli-Diät (BioServ) durch den Zusatz von Maltodextrin ausgeglichen wurde. Nach einer dreitägigen Eingewöhnungsphase wurden die Tiere beider Genotypen in jeweils eine Kontrollgruppe und eine mit Ethanol gefütterte Gruppe (EtOH-Gruppe) unterteilt. Die Kontrollgruppe erhielt während des gesamten Versuchablaufs weiterhin die Lieber DeCarli-Kontrolldiät, während die Alkoholkonzentration im Futter der EtOH-Gruppe alle 3 Tage graduell um 2,1% (v/v) angehoben wurde. Die maximale Alkoholkonzentration wurde nach 9 Tagen erreicht und lag bei 6,3 % (v/v). Dieser Zeitpunkt wurde in den Versuchen als Startpunkt angenommen und in den dargestellten Zeitachsen als Nullwert angegeben. Im weiteren Verlauf blieb die Zusammensetzung der Diät unverändert. Da ein Großteil der *Nrf2*^{-/-} Mäuse bereits nach 4 – 7 Tagen bei 6,3% Ethanol moribund war, wurden diese Tiere zu einer Gruppe zusammengefasst. Für jede Ethanol-behandelte *Nrf2*^{-/-} Maus dieser Gruppe wurde eine Ethanol-behandelte WT Maus betäubt und das Gewebe für nachfolgende Experimente entsprechend aufbereitet.

Um den Effekt der schädigenden Wirkung des Alkohols noch zu verstärken, erhielten sowohl gesund erscheinende Mäuse der EtOH-Gruppe als auch die entsprechenden Kontrolltiere an Tag 4 eine einmalige intraperitoneale Injektion von 100 µg LPS (Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland) / Maus. 1,5 und 6 Stunden nach LPS Injektion wurden die Tiere betäubt und das Gewebe für nachfolgende Experimente entsprechend aufbereitet.

Die positive Wirkung antioxidativer Substanzen wurde in diesem Zusammenhang durch die intraperitoneale Verabreichung von 500 mg NAC (Sigma-Aldrich) / kg Körpergewicht analysiert. Die Gabe von NAC erfolgte zweimal täglich während des gesamten Fütterungszeitraums.

Die akute Wirkung von Alkohol auf die Leber wurde in einem zweiten Ansatz untersucht, in dem den Mäusen (n = 4) einmal pro Tag eine Dosis von 5 g Ethanol / kg Körpergewicht (Verdünnung 1:3 in Wasser) mittels gastraler Intubation verabreicht wurde. Diese Prozedur wurde an 4 aufeinanderfolgenden Tagen wiederholt. Während dieses Zeitraums verfügten die Tiere frei über Trockenfutter und Wasser.

3.1.2 Experimentelles Tiermodell zur Simulation einer NASH

Zur Untersuchung der NASH wurden zwei etablierte Modelle verwendet [115,116]. Dabei handelte es sich zum einen um die Verfütterung einer MCD (MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich), zum anderen um eine HFD (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland). In zwei unabhängigen Versuchsansätzen wurden sowohl 8 Wochen alten WT als auch *Nrf2*^{-/-} Mäusen einerseits die MCD und andererseits die HFD verfüttert. Dabei erstreckte sich der maximale Fütterungszeitraum bei der MCD über 5 Wochen, während die Gabe der HFD über einen Zeitraum von maximal 30 Wochen erfolgte. Als Kontrollen für die MCD-Fütterung dienten Tiere beider Genotypen, welche eine auf die Zusammensetzung der MCD Diät abgestimmte Kontrolldiät von MP Biomedicals erhielten. Für die HFD-Fütterung dienten Tiere mit regulärem Haltungsfutter als Kontrollen, da die entsprechende Kontrolldiät zur HFD in ihrer Zusammensetzung dem Haltungsfutter nahezu entsprach.

Die Durchführung der Glukose- und Insulintoleranztests erfolgte nach 2 Wochen MCD und 15 Wochen HFD Fütterung. Nachdem die Mäuse 4 h (MCD) bzw. 16 h (HFD) gefastet hatten, bekamen sie entweder eine intraperitoneale Injektion von 2 g Glukose / kg Körpergewicht oder 4 U Insulin / kg Körpergewicht. Der anschließende Verlauf der Glukosekonzentration im Blut wurde mit Hilfe des Blutzuckermessgerätes OneTouch[®]Ultra[®]2 (LifeScan, Neckargemünd, Deutschland) analysiert.

3.2 Blutserumanalyse

Die durchschnittlich entnommene Menge von 500 µl Blut wurde in Mikro-Probengefäßen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) aufgenommen, die einen Lithium-Heparin beschichteten Mischring enthielten. Das Blutserum wurde entsprechend den Angaben des Herstellers aufbereitet und bei -20°C für spätere Analysen gelagert.

Die Konzentrationsbestimmungen der Alanin-Aminotransferase (ALT), sowie die für Glukose und Triglyceride erfolgten photometrisch im Olympus AU 400 (Olympus, Hamburg, Deutschland). Die Konzentrationen von TNF- α und IL-6 im Blutserum wurden mit den jeweiligen ELISA BD OptEIATM Kits (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) entsprechend den Herstellerangaben bestimmt.

3.3 Bestimmung des hepatischen Cholesterin-, Triglyceridund Phospholipidgehalts

Die Bestimmung des hepatischen Cholesterin-, Triglycerid- und Phospholipidgehalts erfolgte durch Sanofi-Aventis (Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt, Deutschland) in Anlehnung an eine bereits veröffentlichte Methode [117]. Es wurden zunächst 300 – 500 mg gefrorenes Lebergewebe in 5 ml Folch Extrakt übernacht extrahiert [118], wobei der Anteil an Chloroform durch Dichlormethan ersetzt wurde. Am folgenden Tag erfolgten die Zugabe von 2 ml destilliertem Wasser und die Phasenseparation durch Zentrifugation. Anschließend wurde die obere Wasserphase verworfen und die Extraktion wiederholt. Nachdem beide unteren Phasen in graduierte Röhrchen überführt und mit Dichlormethan auf ein konstantes Volumen aufgefüllt wurden (5 – 10 ml), erfolgte die Überführung von 0,5 – 1 ml Extrakt in ein frisches Reaktionsgefäß. Das Flüssigkeitsvolumen wurde über Nacht oder im Stickstoffstrom abgedampft und das Extrakt im gleichen oder doppelten Volumen Isopropanol aufgenommen. Die Erstellung der Eichkurve erfolgte mit in Isopropanol gelösten Standards. Bei Bedarf wurden die Proben vor der Analyse auf 50 – 60 °C erhitzt und gevortext. Die anschließenden Analysen des Cholesterin- und Triglyceridgehalts erfolgten photometrisch mit den entsprechenden enzymatischen Assays für die Serumanalyse (Cholesterol CHOD-PAP, Triglyceride GPOP-POP, Roche, Mannheim, Deutschland). Zur Bestimmung der hepatischen Phospholipide wurde ebenfalls ein enzymatischer Assay verwendet, bei dem die Phospholipide in Gegenwart von Phospholipase D zu Cholin und Phosphatidsäuren hydrolysieren. Das Cholin bildet nach Oxidation durch Cholin-Oxidase Betain und Wasserstoffsuperoxid, welches in Anwesenheit einer Peroxidase mit N-ethyl-N-(2-hydroxy-3sulfopropyl)-3,5-dimethoxyanilin (DAOS) und Phenol zu einem blauen Farbstoff reagiert (LabAssay[™]Phospholipid, Wako Chemicals GmbH, Neuss, Deutschland).

3.4 Bestimmung der freien Fettsäuren in der Leber

Die Analyse der freien Fettsäuren in der Leber erfolgte ebenfalls durch Sanofi-Aventis. Dazu wurden zunächst etwa 50 mg gefrorenes Lebergewebe gewogen, um das exakte Gewicht der eingesetzten Probe zu bestimmen. Danach erfolgte die Homogenisation des Lebergewebes mit Hilfe des Dispergiergerätes T 18 basic ULTRA-TURRAX[®] (IKA[®]-Werke, Staufen, Deutschland). Dafür wurde so viel Phosphatpuffer (phsophate buffered saline, PBS) eingesetzt, dass man ein 5% iges Homogenat erhielt. Nach Zugabe der 3fachen Menge eines eiskalten Chloroform / Methanol-Gemisches (2:1) erfolgte die Extraktion in einer einstündigen Inkubation. Anschließend wurde die Probe zentrifugiert und die obere wässrige Phase verworfen. 300 µl der unteren Chloroform-haltigen Phase wurden in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und unter dem Abzug verdampft. Im Anschluss wurde das Extrakt in 100 µl PBS resuspendiert, mit 100 µl 2,5 M Kaliumhydroxid / Methanol-Gemisch (4:1) versetzt und für 3 Stunden bei 65°C inkubiert. Die Protonierung der freien Fettsäuren erfolgte durch Zugabe von 140 µl Ameisensäure (pH << 3) mit anschließender Extraktion in 350 µl Heptan / Heptadecansäure (5 µM). Aus der Heptan-Phase wurden 250 µl entnommen, evaporiert und in 1 ml Methanol resuspendiert. Die Separation von 1 µl Suspension erfolgte durch Flüssigchromatographie über eine C18-Säule und anschließender Analyse mittels Elektrospray-Ionisation-Massenspektrometrie (ESI-MS) unter Verwendung eines Triple-Quadrupols im SIM (*Single Ion Monitoring*) Modus.

3.5 Western Blot Analysen

Zur Analyse der gesamten hepatozellulären Proteinfraktion wurde gefrorenes Lebergewebe auf Eis in kaltem Zelllysepuffer (cell signaling, Danvers, MA, USA) mit Hilfe des Dispergiergerätes T 18 basic ULTRA-TURRAX® (IKA®-Werke) homogenisiert. Zum Schutz der phosphorylierten Proteine erfolgte die Anreicherung des Lysepuffers mit complete (Roche), einer Kombination unterschiedlicher Protease-Inhibitoren. Nach Aufschluss der Zellen wurden die Rückstände durch Zentrifugation (16.000 • g, 10 min, 4°C) abgetrennt und die Proteinextrakte in Laemmli Puffer [119] resuspendiert. Die Isolation der Kernextrakte erfolgte bei 4°C nach Homogenisation frisch entnommener Leberproben über einen Succrosegradienten in einer Ultrazentrifuge (Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland: Rotor SW28.1, 27.000 • g, 70 min, 4°C). Die Proteinkonzentrationen wurden in beiden Ansätzen mit einer Coomassie-Brilliantblau G250 Färbung nach Bradford [120] bestimmt. Zur Auflösung von Tertiär- und Sekundärstrukturen erfolgte die Erhitzung der Proben auf 95°C mit anschließender Auftrennung der Proteine mittels Polyacrylamid Gelelektrophorerse (PAGE) unter Verwendung des von U.K. Laemmli eingeführten SDShaltigen, diskontinuierlichen Tris-HCI/Tris-Glycin-Puffersystems. Nachfolgend wurden die Proteine nach der Methode von Renart [121] und Towbin [122] auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran; 0,2 µm, Bio-Rad, München, Deutschland) transferiert und das jeweilige Protein von Interesse in einer spezifischen Immundetektion nachgewiesen. Um unspezifische Antikörperbindungen während der Immundetektion zu vermeiden, wurde die Membran nach dem Transfer 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 10% [w/v] Trockenmilchpulver geblockt, welches in einem 0,1% (v/v) Tween 20-haltigem Tris-Puffer (0,5 M Tris (pH 7,5), 1,5 M NaCI) gelöst war. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4°C, die des Sekundärantikörpers für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sind den Tabellen 2 und 3 zu entnehmen. Die Detektion erfolgte mittels Chemolumineszenz unter Verwendung der Western Lightning-ECL Lösung (PerkinElmer, Rodgau-Jügesheim, Deutschland) mit anschließender Visualisierung auf einem Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare, München, Deutschland).

Spezifität	Quelle	Molekularge- wicht	Eingesetzte Verdünnung	Hersteller
ACC	Kaninchen	280 kDa	1:1000	Cell Signaling
p-ACC (Ser79)	Kaninchen	280 kDa	1:1000	Cell Signaling
ΑΜΡΚα	Kaninchen	62 kDa	1:1000	Cell Signaling
p-AMPKα (Thr172)	Kaninchen	62 kDa	1:250	Cell Signaling
Aktin (C-11)	Ziege	43 kDa	1:1000	Santa Cruz
c-Jun (60A8)	Kaninchen	43, 48 kDa	1:500	Cell Signaling
Cyclin D1 (M-20)	Kaninchen	37 kDa	1:500	Santa Cruz
CYP2E1	Schaf	50-57 kDa	1:5000	D.R.Koop
p-p44/42 MAPK (ERK1/2)	Kaninchen	42,44 kDa	1:1000	Cell Signaling
GCLC	Kaninchen	70 kDa	1:5000	T.J.Kavanagh
GCLM	Kaninchen	30 kDa	1:5000	T.J.Kavanagh
p-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185)	Kaninchen	46, 54 kDa	1:500	Cell Signaling
HO-1	Kaninchen	32 kDa	1:5000	Stressgen
MnSOD	Kaninchen	24 kDa	1:1000	Upstate
NF-кВ р65	Kaninchen	65 kDa	1:200	Santa Cruz
NQO1	Ziege	30 kDa	1:1000	Abcam
p21	Ziege	21 kDa	1:500	Santa Cruz
p27	Kaninchen	27 kDa	1:1000	Santa Cruz
р53	Ziege	53 kDa	1:1000	R&D
SOCS3	Maus	30 kDa	1:1000	Santa Cruz
SREBP-1	Kaninchen	68, 125 kDa	1:500	Santa Cruz
STAT3	Kaninchen	79,86 kDa	1:1000	Cell Signaling
p-STAT3	Kaninchen	79,86 kDa	1:1000	Cell Signaling

 Tabelle 2:
 Verwendete Primärantikörper für Western Blot Analysen.

Spezifität	lsotyp	Konjugat	Eingesetzte Verdünnung	Hersteller
Ziege anti-Kaninchen	IgG	HRP	1:2000	Santa Cruz
Esel anti-Ziege	lgG	HRP	1:2000	Santa Cruz
Esel anti-Schaf	IgG	HRP	1:2000	Sigma-Aldrich
Ziege anti-Maus	IgG	HRP	1:2000	Santa Cruz

Tabelle 3: Verwendete Sekundarantikörper für Western Blot Analysen.

3.6 Färbungen

Für die Färbungen wurde ein Teil des entnommenen Lebergewebes für Gefrierschnitte direkt in Tissue-Tek[®] OTC[™] Compound Einbettmedium (Sakura Finetek, Heppenheim, Deutschland) bei -20°C tiefgefroren. Ein weiterer Teil wurde zur späteren Einbettung in Paraffin über Nacht in 3,7% Paraformaldehydlösung (PFA) fixiert. Von den cryokonservierten Gewebeblöcken wurden im Kryostaten CM3050S (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) Probenschnitte von 7 µm Dicke hergestellt, während die im Microtom RM2255 (Leica Microsystems) angefertigten Gewebeschnitte der Paraffinblöcke eine Dicke von 2 – 3 µm hatten. Die Analyse der Färbungen erfolgte mit dem Digitalmikroskop DM 4000 B von Leica Microsystems, welches mit einer monochromen Fluoreszenz-Digitalkamera (DFC 350 FX) und einer digitalen Farbkamera für Hellfeld / Dunkelfeldapplikationen (DFC 320) ausgestattet war. Beide Kamerasysteme waren an einen PC angeschlossen, so dass digitale Aufnahmen softwarebasiert (Leica QWin Standard) analysiert und verarbeitet werden konnten.

3.6.1 Hämatoxylin und Eosin

Nach Deparaffinisierung und Rehydrierung der in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitte wurden diese zunächst für einige Sekunden in Mayers Hämalaun Lösung (Merck, Darmstadt, Deutschland) inkubiert. Alle basophilen Strukturen, insbesondere der Zellkern mit der darin befindlichen DNA sowie das raue endoplasmatische Retikulum (rER), werden durch das basische Hämalaun blau angefärbt. Dabei erscheinen alle gefärbten Bereiche aufgrund des niedrigen pH-Wertes der Färbelösung zunächst rötlich-braun. Erst durch die anschließende Inkubation in warmem Wasser und der damit einhergehenden pH-Wert Erhöhung schlägt der Farbton ins Blauviolette um (Bläuen). Nach einem kurzen Waschschritt folgte die zytoplasmatische Färbung in einer wässrigen Eosin Y Lösung (Sigma Aldrich). Durch weitere Spülschritte über Alkohollösungen in aufsteigender Konzentration bis zu absolutem Alkohol erfolgte die Verdrängung des Wassers aus den Gewebeschnitten. Schließlich wurde der entwässerte Schnitt in Xylol geklärt und mit GVA Eindeckmittel (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) und einem Deckglas bedeckt.

3.6.2 TUNEL Färbung

Der quantitative Nachweis von Zelltod erfolgte mittels In Situ Cell Death Fluorescein Detection Kit von Roche, welches die Detektion von DNA Einzel- und Doppelstrangbrüchen erlaubt. Dabei werden mit Hilfe einer terminalen Transferase freie 3'-OH Gruppen in genomischer DNA mit Fluorescein-dUTP markiert, welches anschließend direkt im Fluoreszenz-Mikroskop visualisiert wurde.

Zunächst erfolgte die Deparaffinisierung und Rehydrierung der in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitte. Zur Antigen-Demaskierung wurden die Schnitte in Citratpuffer (10 mM Citrat, 0,05% Tween 20; pH 6,0) zunächst für 3 – 5 Minuten bei 750 Watt, anschließend für 15 Minuten bei 150 Watt in der Mikrowelle erhitzt. Nach weiteren 10 Minuten der Abkühlung erfolgte eine Permeabilisierung des Gewebes mit 0,6 mAnsonU / ml Proteinase K (Merck) für 30 Minuten. Im Anschluss wurden die Schnitte eine Stunde in 3,7% PFA-Lösung fixiert und in 0,1% Natriumcitrat (w/v) mit 0,1% Triton X-100 (v/v) für 30 Minuten erneut permeabilisiert. Die Markierung mit Fluorescein erfolgte während einer 1,5 stündigen Inkubation mit 1:10 verdünntem TUNEL-Reagenz im Dunkeln, um eine Abschwächung des Fluoreszenzsignals zu verhindern. Als Eindeckmittel diente VECTASHIELD® von Vector Laboratories (Peterborough, UK), dem bereits 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) zur Markierung von DNA zugesetzt war. Die Visualisierung des Fluoresceins erfolgte im grünen Fluoreszenzbereich mit einem Alexa 488 Filter, während Dapi im blauen Fluoreszenzbereich mit einem Alexa 350 Filter sichtbar gemacht und so eine Überlappung der beiden Emissionsspektren vermieden wurde.

3.6.3 Ölrot-O Färbung

Ölrot-O ist ein Farbstoff, mit dem Lipide dargestellt werden können. Da sich durch die organischen Lösungsmittel während der Entparaffinisierung von Formalin-fixiertem Gewebe alle Lipide aus dem Schnitt herauslösen würden, ist es in diesem Fall notwendig, Gefrierschnitte für die Färbung zu verwenden.

Zunächst erfolgte eine 10 – 15 minütige Vorinkubation der Gewebeschnitte mit 100% 2-Propandiol. Es folgte die Inkubation mit 0,5% Ölrot-O Lösung in 2-

Propandiol für weitere 2 – 4 Stunden. Um überschüssiges Ölrot-O zu entfernen, wurden die Schnitte für mindestens 30 Minuten in 85% 2-Propandiol gewaschen und ein weiteres Mal mit Wasser gespült. Zur besseren Kontrastbildung erfolgte eine zusätzliche Färbung mit Hämatoxylin mit anschließender Konservierung mit GVA Eindeckmittel (Invitrogen).

3.6.4 Sirius Rot Färbung

Nach Deparaffinisierung und Rehydrierung erfolgte zunächst eine kurze Inkubation mit Mayers Hämalaun Lösung (Merck). Nachdem die Schnitte gründlich mit Wasser gespült waren, fand eine einstündige Färbung mit Sirius Rot (1 mg / ml Picrosirius Rot in Picrinsäure-gesättigtem Wasser) statt. Anschließend erfolgten 2 Waschschritte mit 0,5% Essigsäure und die Entwässerung der Schnitte über eine aufsteigende Alkoholreihe. Schließlich wurden die dehydrierten Schnitte in Xylol geklärt und mit dem harzhaltigen GVA Eindeckmittel von Invitrogen und einem Deckglas bedeckt.

Die Auswertung der Sirius Rot Färbung erfolgte mit Hilfe der Leica QWin Standard Software. Pro Gruppe wurden aus jeweils 4 verschiedenen Proben zehn Gesichtsfelder ausgewertet, indem der prozentuale Anteil an spezifisch gefärbten Bereichen berechnet wurde.

3.6.5 Immunhistochemie auf Gefrierschnitten

Die Charakterisierung inflammatorischer Zellen erfolgte unter anderem durch die immunhistochemische Detektion der 170 kDa αM Untereinheit von Mac-1 (CD11b; BD Biosciences). Mac-1 wird in unterschiedlichem Ausmaß von Granulozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und natürlichen Killerzellen exprimiert. Nach Aktivierung steigt die Expression von Mac-1 auf Neutrophilen rapide an.

Die Gefrierschnitte wurden zunächst in einem Gemisch aus Aceton und Methanol (1:1) für 10 Minuten auf Eis fixiert und danach getrocknet. Anschließend wurde das Gewebe für 30 Minuten mit 5% Pferdeserum (Vector Laboratories) geblockt, um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden. Die Inkubation mit primärem Ratte anti-Maus CD11b Antikörper erfolgte über Nacht bei 4°C in einer Verdünnung von 1:50 ebenfalls in 5% Pferdeserum. Als Sekundärantikörper diente ein AlexaFluor488 gekoppelter Huhn anti-Ratte Antikörper (Invitrogen), der in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt wurde. Die Inkubation erfolgte in 5% Pferdeserum für eine Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Schnitte mit VECTASHIELD[®] Eindeckmedium versiegelt und und die Färbung mit dem Fluoreszenzmikroskop unter Verwendung des Alexa 488 Filters visualisiert.

3.6.6 Immunhistochemie auf Paraffinschnitten

Die Durchführung der immunhistochemischen Färbungen auf Paraffinschnitten erfolgte nach einem standardisierten Protokoll. Eventuelle Abweichungen werden im Folgenden näher beschrieben.

Nach Deparaffinisierung und Rehydrierung erfolgte die Antigen-Demaskierung, die je nach primärem Antikörper entweder in 10 mM Citratpuffer (pH 6,0) oder 1 mM Tris / EDTA-Puffer (pH 9,0) durchgeführt wurde. Erfolgte der Nachweis mittels 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC)-Lösung (Invitrogen), wurde anschließend eine Inhibition der intrazellulären Peroxidase mit 3% Wasserstoffperoxid-Lösung durchgeführt. Beim Nachweis von Ki67 erfolgte zusätzlich ein Block des endogenen Biotins (Vector Laboratories). Unspezifische Primärantikörperbindungen wurden durch eine Vorinkubation der Gewebeschnitte mit normalem Ziegenserum oder bovinem Serumalbumin (BSA) verhindert.

Spezifität	Demaskierung	Serum- Block	Verdün- nung	Nachweis	Hersteller
αSMA	Citrat	-	1:100	Fluoreszenz	Dako
BrdU	Citrat	2%	1:200	AEC	Amersham
CD68	Tris/EDTA	10%	1:100	Fluoreszenz/AEC	AbD Serotec
Ki67	Tris/EDTA	5%	1:1000	AEC	Vector
p27	Citrat	10%	1:50	AEC	Santa Cruz
p47-phox	Tris/EDTA	10%	1:100	Fluoreszenz	Upstate
αSMA: α-glattes Muskelzell-Aktin (<i>smooth muscle actin</i>)					

Tabelle 4: In der Immunhistochemie eingesetzte Primärantikörper.

BrdU: Bromdesoxyuridin

Direkt im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurden die Schnitte für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Je nach Markierung des Antikörpers wurde die spezifische Färbung entweder über ein Fluoreszenzsignal oder durch enzymatische Umsetzung mittels AEC-Reagenz nachgewiesen und unter dem Mikroskop sichtbar gemacht.

Spezifität	Detektierter Isotyp	Konjugat	Eingesetzte Verdünnung	Hersteller
anti-Kaninchen	lgG	AlexaFluor 488	1:500	Invitrogen
anti-Ratte	IgG	AlexaFluor 647	1:500	Invitrogen
Anti-Maus	lgG _{2a}	biotinyliert	1:200	Invitrogen
Anti-Kaninchen	IgG (H+L)	biotinyliert	1:100	Invitrogen
Histostain Plus	broad spectrum antibody	biotinyliert	ready-to-use	Zymed

 Tabelle 5:
 In der Immunhistochemie eingesetzte Sekundärantikörper.

Die genauen Angaben zur Durchführung der einzelnen Färbungen sind Tabelle 4 zu entnehmen. Bei der BrdU-Färbung wurde nach der Antigen-Demaskierung zusätzlich eine Inkubation mit 2 N Salzsäure durchgeführt. Die verwendeten Sekundärantikörper sind in Tabelle 5 aufgelistet. Die Auswertung der Ki67 Färbung erfolgte an jeweils vier unterschiedlichen Schnitten einer Gruppe. Von jedem Schnitt wurde in insgesamt zehn Gesichtsfeldern das Verhältnis aus Ki67positiven Zellen und der Gesamtzellzahl bestimmt.

3.7 Elektronenmikroskopie

Für die Probenpräparation zur Durchführung elektronenmikroskopischer Aufnahmen wurde zunächst durch Perfusion mit 0,1 M Natrium-Cacodylat (pH 7,3) das Blut aus dem Lebergewebe entfernt. Anschließend erfolgte eine vorläufige Fixierung mittels 2,5% Glutaraldehyd-Lösung. Das vorfixierte Gewebe wurde daraufhin mit einem Skalpell in kubische Segmente mit einer Kantenlänge von wenigen Millimetern unterteilt. Zur vollständigen Fixierung erfolgte eine Inkubation in 2,5% Glutaraledhyd-Lösung über Nacht bei 4°C. Durch wiederholte Waschschritte mit 0,1 M Natrium-Cacodylat wurde am nächsten Tag das überschüssige Glutaraldehyd aus der Probe entfernt. Im Anschluss erfolgte die Fixierung der Lipide durch eine einstündige Inkubation des Gewebes mit 2% Osmiumoxid in 0,1 M Natrium-Cacodylat bei Raumtemperatur. Die Dehydrierung des Gewebes erfolgte in einer aufsteigenden Alkoholreihe mit abschließender Inkubation in Epon als Einbettmedium. Vor der eigentlichen Einbettung mit einer Aushärtung von 20 Stunden bei 40°C und 40 Stunden bei 60°C wurde das Lebergewebe zunächst in einem 1:2 Gemisch aus Epon und Toluol für 30 Minuten, anschließend in reinem Epon für zweimal 45 Minuten bei 40°C inkubiert. Von den Blöcken wurden zunächst Probeschnitte angefertigt, um interessante Bereiche zu identifizieren. Nachdem diese eindeutig zugeordnet wurden, erfolgte die Anfertigung der eigentlichen Schnitte und die Vorbereitung zur Visualisierung unter dem Elektronenmikroskop.

3.8 Untersuchung der transkriptionellen Genexpression

3.8.1 Isolation der RNA

Zur Isolation der RNA aus tiefgefrorenem Lebergewebe wurden unterschiedliche Verfahren verwendet. Für alle Experimente, welche die Untersuchung der alkoholischen Steatohepatitis betrafen, erfolgte die RNA-Isolation mit Hilfe des RNeasy Kits von Qiagen (Hilden, Deutschland). Für die Experimente zur nichtalkoholischen Steatohepatitis erfolgte die Isolation einerseits mit TRIzol[®] Reagenz (Invitrogen), andererseits mit dem High Pure RNA Paraffin Kit von Roche. Pro Ansatz wurden 20 – 30 mg Lebergewebe eingesetzt. Die Isolation erfolgte bei allen Verfahren nach Herstellerangaben. Die aufgereinigte RNA wurde zum Schluss in 50 – 80 µl Diethylpyrocarbonat-haltigem Wasser (DEPC-Wasser) aufgenommen und bis zur weiteren Analyse bei -80°C gelagert.

3.8.2 Spektrophotometrische Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration

Um die Qualität sowie die Quantität von DNA- und RNA-Proben zu analysieren, wurden diese 1:100 in Tris/EDTA-Puffer (TE-Puffer) verdünnt und die Absorption bei 260 und 280 nm gemessen. Dabei entspricht eine optische Dichte von 1 einer Konzentration doppelsträngiger DNA von 50 μ g / ml sowie einzelsträngiger RNA von 40 μ g / ml. Der Quotient aus beiden Absorptionswerten entspricht dem Reinheitskoeffizienten und gibt Aufschluss über die Verunreinigung der Probe mit Protein. Er sollte im Idealfall zwischen 1,7 und 2,0 liegen.

3.8.3 Herstellung der cDNA

Die cDNA-Synthese erfolgte aus 4 µg RNA mittels SuperScript[™] II first-strand Sythese Kit (Invitrogen) für alle Experimente, die im Rahmen der alkoholischen Steatohepatitis durchgeführt wurden. Aufgrund einer internen Umstellung im Labor erfolgte für alle weiteren Experimente die Herstellung der cDNA mittels Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit von Roche. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben unter der Verwendung von Oligo(dT)-Primern im Thermocycler (Eppendorf, Hamburg, Deutschland).

3.8.4 Semiquantitative Reverse Transkriptase-PCR

Zur Bestimmung der transkriptionellen Genexpression der Phase-3-Transporter sowie der katalytischen Untereinheit der Glutamat-Cystein Ligase (GCLC) wurden semiquantitative Reverse Transkriptase-PCRs (RT-PCR) durchgeführt. Zunächst erfolgte die Amplifikation von 1 µl der zuvor hergestellten cDNA in einer dreistufigen PCR (95°C 30 sec, 60°C 30 sec, 72°C 40 sec), wobei die Anzahl der Zyklen (22 – 28 Zyklen) so angepasst wurde, dass die Reaktion im linearen Bereich gestoppt und analysiert wurde. Nur so konnten transkriptionelle Unterschiede der Gene in der anschließenden elektrophoretischen Auftrennung der PCR Produkte identifiziert werden. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in Tabelle 6 aufgelistet. Das 40S ribosomale Protein P9 (Rsp9) und die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (Gapdh) wurden als Beladungskontrollen verwendet.

Name des Gens	Vorwärts-Primer	Rückwärts-Primer
GR	CTT CCT TCG ACT ACC TGG	ATG CCT GCG ATC TCC ACA
GPx	AGT ACG GAT TCC ACG TTT GA	GGA ACT TCT CAA AGT TCC AG
Gst 3	TGA TTA GGC CCC TGC CAT GCT	TTG GGT CTG GGC ACC AAT GAA
Gst 4	CGG GGG TTC TGG GAA CAG TTG	GCT GGC AGG CAA GAC CAT CAA
Mrp 1	ATT CCT GAA GGA GCC CTT GT	CAC ACC CTT CTC ACC GAT CT
Mrp 2	CTG AGT GCT TGG ACC AGT GA	CAA AGT CTG GGG GAG TGT GT
Mrp 3	CGC TCT CAG CTC ACC ATC AT	GGT CAT CCG TCT CCA AGT CA

Tabelle 6: Sequenzen der verwendeten Primer für die semi-quantitative RT-PCR.

Mdr 1	GAC TCG GGA GCA GAA GTT TG	GCT GAT ACT TTG GCT TTC GC
Mdr 2	TGA AGT TGA GCT AAG TGA CG	TGT TCC CAC CAC AAA GTA GG
Oatp 1	TGG GGA GAA GGG TGT CCT TG	ATG GCT GCG AGT GAG AAG AT
Oatp 2	CCT TAA AGC CAA CGC AAG AC	CAC TCC TGC ACA GAC CAA AA
Bsep	GTT CAG TTC CTC CGT TCA AA	AAG CTG CAC TGT CTT TTC AC
Ntcp	ACA CTG CGC TCA GCG TCA TTC	GCC AGT AAG TCT GGT GTC ATG
Gclc	ATG CTG CTG GCT GAC CAG GGC	ATC TTG GGC CGG GCA CTG AGG
Rsp9	CTG GAC GAG GGC AAG ATG AAG C	TGA CGT TGG ATG AGC ACA
Gapdh	GGA TGC AGG GAT GAT GTT C	TGC ACC ACC AAC TGC TTA G

3.8.5 Quantitative PCR

Die Durchführung der quantitativen PCR (qPCR) erfolgte im Mikrotiterplatten-Format unter Verwendung des SYBR[®] Green PCR Master Mix von Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland) in einem 20 µl Ansatz. Pro Ansatz wurden 1 µl der zuvor synthetisierten cDNA sowie die entsprechenden Primer (Tab. 7) in einer Konzentration von 1 µM eingesetzt. Die qPCR wurde im Applied Biosystems 7000 Real-Time PCR System mit einem dreistufigen Programm durchgeführt (45 Zyklen: 95°C 15 sec, 60°C 30 sec, 72°C 30 sec). Auch hier diente Gapdh als Beladungskontrolle.

Name des Gens	Vorwärts-Primer	Rückwärts-Primer
Adh1	CAT CGA GGA CAT AGA AGT GCA	ATG ATG ACA GAC AGA CCG ACA
Aldh1	CCT CTC ACA TGG ATG TCG ACA A	TCC CAC TCT CAA TGA GAT CGA GTA TT
Aldh2	GCT GGG CTG ACA AGT ACC AT	TTG ATC AAG TTG GCC ACG TAG
Srebp-1	ATC GGC GCG GAA GCT GTC GGG GTA GCG TC	ACT GTC TTG GTT GTT GAT GAG CTG GAG CAT
Acc1	CAA TCT TCC TGC AGC ACA GCT CCA	CCC AAG GAG ATA CCC CAT ACA TCA TAC

 Tabelle 7:
 Sequenzen der f
 ür die qPCR verwendeten Primer.

-

Fas	TTC GGC TGC TGT TGG AAG TCA G	ACC CAC CCA GAC GCC AGT GTT C
Scd1	CTG TCA AAG AGA AGG GCG GAA AAC	GCA GGA GGC CGG GCT TGT AGT AC
Ppar α	CAT TTC CCT GTT TGT GGC TGC TAT AA	CTT AAG CAC GTG CAC AAT CCC CTC
Ppar γ	ACT CAT ACA TAA AGT CCT TCC CGC TGA	CCC ATC ATT AAG GAA TTC ATG TCG TAG A
Cpt1	GGA GGA GGT AAG ACT ACT ATG	TAC ATG CAA TGG ACA GAT TAG
Tnf-α	AAA TGG CCT CCC TCT CAT CA	AGA TAG CAA ATC GGC TGA CG
IL1β	TCC AGG ATG AGG ACA TGA GCA C	GAA CGT CAC ACA CCA GCA GGT TA
IL6	GAT GCT ACC AAA CTG GAT ATA ATC	GGT CCT TAG CCA CTC CTT CTG TG
α sma	ACA GCC CTC GCA CCC A	GCC ACC GAT CCA GAC AGA GT
KC	TGG CTG GGA TTC ACC TCA AG	GTG GCT ATG ACT TCG GTT TGG
Kollagen α1	TCC GGC TCC TGC TCC TCT TA	GTATGC AGC TGA CTT CAG GGA TGT
RANTES	GGT ACC ATG AAG ATC TCT GCA	AAA CCC TCT ATC CTA GCT CAT
Tgf β	AGA GGT CAC CCG CGT GCT AA	TCC CGA ATG TCT GAC GTA TTG A
Timp1	TCC TCT TGT TGC TAT CAC TGA TAG CTT	CGC TGG TAT AAG GTG GTC TCG TT
Mcp1	TCC ATG CAG GTC CCT GTC ATG CTT	CTA GTT CAC TGT CAC ACT GGT C
Mip2	CCT CAA CGG AAG AAC CAA AGA G	CTC AGA CAG CGA GGC ACA TC
Mmp3	GAT GGA CGA TGG ACA GAG GAT G	AGG GAG TGG CCA AGT TCA TG
Mmp13	GGA AGA CCC TCT TCT TCT CT	TCA TAG ACA GCA TCT ACT TTG TT
Gapdh	GGA TGC AGG GAT GAT GTT C	TGC ACC ACC AAC TGC TTA G

3.8.6 Durchführung des mRNA Mikroarrays

Zur Durchführung der mRNA Mikroarrays wurde isolierte RNA von Tieren beider Genotypen verwendet, die 2 Wochen mit der Kontrolldiät oder der Ethanoldiät behandelt wurden. Pro Gruppe wurde die RNA von 5 Tieren zu jeweils einer Probe vereinigt und anschließend in der Mikroarray Core Facility im Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung mit einem murinen Affymetrix GenChip MOE 430 2.0 (Affymetrix, Santa Clara, LA, USA) analysiert. Die Datenanalyse erfolgte mit der Affymetrix Expressionsanalyse Software GCOS 1.4. Zur Identifikation und Visualisierung differentiell regulierter Gene und der dazu gehörigen biologisch relevanten Netzwerke wurde zusätzlich die Ingenuity Pathway Analysis Software (Ingenuity Systems, Redwood City, CA, USA) verwendet.

3.9 Untersuchung von oxidativem Stress

3.9.1 Oxidative Modifikation von Proteinen

Bei der oxidativen Reaktion von Proteinen kommt es zu einer Modifikation der Seitenketten verschiedener Aminosäuren, welche zur Veränderung ihrer biochemischen Eigenschaften führt [123]. Dies kann die Reaktivität von Enzymen genauso betreffen wie die Fähigkeit von Transkriptionsfaktoren zur Bindung an DNA. Außerdem wird durch die oxidative Modifikation die Anfälligkeit zur proteolytischen Degradation beeinflusst. Die durch Metallionen katalysierte Oxidation von Proteinen führt beispielsweise zur Entstehung von Carbonylgruppen in bestimmten Seitenketten. Das Ausmaß an Carbonylgruppen kann als Kennzeichen für den oxidativen Status von Proteinen genutzt und mittels Immunblot nachgewiesen werden. In dem für diese Studie verwendete OxyBlot™ Protein Oxidation Detection Kit von Chemicon (Millipore, Schwalbach, Deutschland) reagieren die Carbonylgruppen mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH) zu 2,4-Dinitrophenylhydrazon (DNP). Die DNP-derivatisierten Proteine wurden wie in Abschnitt 3.5 beschrieben durch eine SDS-PAGE aufgetrennt und im Anschluss mittels Western Blot Analyse auf einer PVDF-Membran fixiert. Die Detektion erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers.

3.9.2 Oxidative Modifikation von Nukleinsäuren

Bei der Reaktion von Sauerstoffradikalen mit DNA kann aus Deoxyguanosin (dG) 7,8-dihydro-8-oxo-deoxyguanosin (8-oxo-dG) entstehen, welches als sen-

sitiver Marker für oxidativen Stress bestimmt werden kann [124]. Zunächst erfolgte die Isolation genomischer DNA mittels Anionenaustausch-Chromatographiesäulen (Genomic tips) von Qiagen. Danach erfolgte eine Inkubation der aufgereinigten DNA-Proben mit den Verdauungsenzymen Micrococcus-Nuklease und Phosphodiesterase. Die so entstandenen Fragmente wurden mit Hilfe von LiChrocart 250-4 Hochdruckflüssigkeitschromatographiesäulen aufgetrennt und durch anschließende elektrochemische Detektion (HPLC-ECD; Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland) hinsichtlich 8-oxo-dG quantitativ ausgewertet.

3.9.3 Bestimmung der MDA Konzentration mittels TBARS Assay

Die Quantifikation von Thiobarbitursäure-reaktiver Substanzen (TBARS, *thiobarbituric acid reactive substances*) gilt als valide Methode zur Untersuchung von oxidativem Stress. TBARS – zu denen auch das Malondialdehyd (MDA) zählt – entstehen bei der Lipidperoxidation, welche als Folge einer verstärkten O_2 -Radikalbildung stattfindet.

Das Prinzip der Messung bestand aus dem Nachweis der Addukte, die sich aus MDA und Thiobarbitursäure bilden. Der dazu verwendete Reaktionsansatz setzte sich aus 0,2 ml 8,1% SDS, 1,5 ml 20% Essigsäure (pH 3,5) sowie 1,5 ml 0,8% Thiobarbitursäure (80 mg in 1 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) und 9 ml H₂O) zusammen. Diesem Ansatz wurden 0,2 ml Leberhomogenat zugegeben, welches zuvor mit 3 mM EDTA-haltigem 0,1 mM Phosphatpuffer hergestellt wurde. Nach anschließender Zugabe von 0,5 ml destilliertem Wasser und 0,1 ml 10 mM butyliertem Hydroxytoluol wurde der Gesamtansatz für 60 Minuten auf 95°C erhitzt. Danach erfolgte die Absorptionsmessung bei 532 nm. Der TBARS-Gehalt wurde in nmol MDA / mg Protein dargestellt, wobei die Proteinkonzentration der Leberhomogenate mittels Bradford-Assay (s. 3.5) bestimmt wurde.

3.9.4 Bestimmung des reduzierten Glutathions (GSH)

Zur Untersuchung des hepatischen Glutathion-Systems wurden zunächst Homogenate aus 100 mg Lebergewebe in eiskalter 5% Meta-Phosphorsäure hergestellt. Nach Zentrifugation (3000 • g für 10 min bei 4°C) wurden die Überstände durch einen 0,2 µm Spritzenfilter gegeben. Die Bestimmung des GSH-Gehaltes erfolgte anschließend entsprechend den Herstellerangaben mit Hilfe eines Assay Kits von Calbiochem (Darmstadt, Deutschland). Zur Analyse der mitochondrialen GSH Konzentrationen wurden die Mitochondrien zunächst durch mehrere aufeinanderfolgende Zentrifugationsschritte aus frisch entnommenen Leberproben isoliert [125] und durch wiederholtes Einfrieren aufgeschlossen. Die Bestimmung der GSH Konzentration erfolgte anschließend analog zu den Leberhomogenaten laut Herstellerangaben.

3.9.5 Bestimmung der hepatischen ATP Konzentration

Die Bestimmung des hepatischen ATP-Gehalts erfolgte mit einem ATP Biolumineszenz Assay Kit für somatische Zellen von Sigma Aldrich. Alle benötigten Lösungen wurden entsprechend der Herstellerangaben angesetzt. Als einzige Abweichung vom Protokoll wurde kein interner Standard, sondern eine externe Standardkurve erstellt. Pro Ansatz wurden 50 – 100 mg Lebergewebe in der 10fachen Menge Wasser homogenisiert und vor der Messung erneut 1:10 in TE-Puffer verdünnt. Die Messung der ATP Biolumineszenz erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers im Röhrchen-Luminometer Lumat LB 9507 (Berthold, Barsinghausen, Deutschland) über einen Zeitraum von 5 – 10 sec.

3.10 Bestimmung der Hydroxyprolin-Konzentration

Für die Bestimmung von Hydroxyprolin in der Leber wurden 200 mg tiefgefrorenes Gewebe in 4 ml 6 N Salzsäure bei 1100 min⁻¹ homogenisiert und für 16 – 24 Stunden bei 110°C inkubiert. Das Homogenat färbte sich während der Inkubation dunkel. Um feste Bestandteile aus der Probe zu entfernen, wurde diese nach erfolgter Inkubation über einen Faltenfilter (595 1/2, Ø 159 nm, Whatman Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland) in ein frisches Gefäß überführt. 50 µl dieses Überstandes wurden anschließend mit 450 µl 2,2% Natronlauge in Citrat-Acetat Puffer, pH 6,0 (0,24 M Citronensäure, 0,6% Eisessig, 0,88 M Na-Acetat, 0,85 M Natronlauge) neutralisiert. 500 µl der neutralisierten Probe wurden mit 500 µl Citrat-Acetat Puffer ohne zusätzliche Natronlauge und 250 µl Chloramin T-Lösung (77 mM Chloramin T, 37,5% Methoxyethanol, 62,5% Citrat-Acetat Puffer) für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 250 µl 70 – 72% Perchlorsäure und eine Inkubation von 12 min bei Raumtemperatur. Die Probe färbte sich bei diesem Schritt wieder weißlich bis klar. Im letzten Schritt wurden dem Reaktionsansatz 250 µl 20% Dimethylbenzaldehyd in Methoxyethanol zugegeben und für 20 min bei 60°C inkubiert. Anschließend erfolgte innerhalb einer Stunde die photometrische Messung der Proben bei 565 nm gegen einen Leerwert. Zur Berechnung der Hydroxyprolin-Konzentrationen wurde eine Standardreihe von 0,1 µg bis 1,5 µg Hydroxyprolin bei jeder Messung mitgeführt. Um zu untersuchen, ob es innerhalb der verschiedenen Leberlappen Unterschiede in den Hydroxyprolinmengen gab, wurden die Messungen unter identischen Bedingungen an zwei verschiedenen Lappen durchgeführt. Es stellte sich allerdings heraus, dass sich das Hydroxyprolin homogen über die gesamte Leber verteilte.

3.11 Bestimmung der hepatischen Acetaldehyd-Konzentration

Das frisch entnommene Lebergewebe wurde sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und mit Hilfe eines Mörsers zu feinem Staub zerkleinert. Das gemahlene Gewebe wurde dann in 5% Perchlorsäure aufgenommen, welche 40 mM Thioharnstoff enthielt. Nach Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und zur weiteren Bestimmung der Acetaldehydkonzentration mittels Headspace-Gaschromatographie eingesetzt [126].

3.12 Aktivitätsmessung Alkohol-metabolisierender Enzyme

Die Aktivität der beiden wichtigsten Enzyme des Ethanolmetabolismus – ADH und ALDH – wurde spektrometrisch durch die Reduktion von NAD⁺ zu NADH und dem damit verbundenen Absorptionsanstieg bei 340 nm ermittelt.



Abbildung 10: Absorptionsverlauf von NAD⁺ und NADH.

Die Absorptionsverläufe von NAD⁺ und NADH sind in Abbildung 10 schematisch dargestellt. Bei bekanntem Extinktionskoeffizienten kann die Extinktionsveränderung in diesem enzymatisch-optischen Test zur Substratbestimmung herangezogen werden. Dabei ergibt sich aus dem Lambert-Beer'schen Gesetz für die Konzentration in der Küvette:

$$c = \frac{\Delta E}{\varepsilon \cdot d} \left[mol \cdot L^{-1} \right]$$

wobei ΔE der Extinktionsdifferenz nach Zugabe des Enzyms, d der Schichtdicke der Küvette und ε dem molaren Extinktionskoeffizienten entspricht. Bei einer Wellenlänge von 340 nm ist ε für NADH in der Literatur mit 6,3 · 10² [L • mol⁻¹ • mm⁻¹] angegeben. Zur Ermittlung der Konzentration in der Probenlösung geht das Verhältnis von Testvolumen V_T (Küvetteninhalt) zu Probenvolumen V_P mit in die Formel ein:

$$c = \frac{\Delta E \cdot V_T}{\varepsilon \cdot d \cdot V_P} \left[mmol \cdot L^{-1} \right].$$

Da die Reaktionsgeschwindigkeit ($\Delta c / \Delta t$) direkt proportional zur Änderung der Extinktion mit der Zeit ist ($\Delta E / \Delta t$), kann über die zeitliche Änderung der Konzentration die katalytische Enzymaktivität bestimmt werden. Der Substratumsatz wird dabei in U / L [(µmol / min) • L⁻¹] angegeben:

$$\frac{\Delta c}{\Delta t} = \frac{\frac{\Delta E}{\Delta t} \cdot V_T}{\varepsilon \cdot d \cdot V_P} \quad \left[\frac{U}{L}\right]$$

mit

Δc Änderung der Konzentration [µmol]

Δt Änderung der Zeit [min⁻¹]

- ΔE Änderung der Extinktion
- d Schichtdicke der Küvette [mm]
- ϵ mol. Extinktionskoeffizient [L mol⁻¹ mm⁻¹]
- V_T eingesetztes Volumen in der Küvette [ml]
- V_P eingesetztes Probenvolumen [ml]



Abbildung 11: Beispiel einer fortlaufenden Enzymaktivitätsmessung

Die verwendeten Reaktionsansätze zur Bestimmung der ADH- und ALDH-Aktivitäten sind in Tabelle 8 dargestellt. Die Reaktionsansätze wurden vor Zugabe der Probe gründlich durchmischt und in das Photometer gestellt, welches an einen Schreiber angeschlossen war. Die Grundlinie des Schreibers wurde auf 0 eingestellt und die Messung gestartet. Nach einem zweiminütigen Vorlauf, bei dem der Nullwert konstant verlaufen sollte, erfolgte zunächst der Funktionalitätstest der Reaktionsansätze. Hierzu wurde dem jeweiligen Ansatz das entsprechende reine Enzym (ADH bzw ALDH) beigefügt, was einen sofortigen Anstieg im Schreibersignal bewirkte. Die anschließende die Messung erfolgte nach identischer Vorgehensweise.

ALDH Pufferansatz
65,5 mM Glycin / Na-pyrophosphat-Puffer, pH 8,8
5 mM Acetaldehyd
1 mM NAD⁺
0,1 mM Pyrazol
2 µM Rotenon

 Tabelle 8:
 Zusammensetzung der verwendeten Reaktionsansätze.

Allerdings wurde die Reaktion nicht durch die Zugabe von Enzym sondern durch die Probe gestartet. Hierzu wurden die Proben frisch in Zell-Lysepuffer homogenisiert und die Konzentration kurz vor der Messung auf eine einheitliche Konzentration von 10 μ g / μ l eingestellt. Der Absorptionsanstieg wurde über einen Zeitraum von 3 – 4 Minuten aufgezeichnet und die Enzymaktivität anhand der linearen Steigung berechnet.

3.13 Statistische Auswertung

Die während der Auswertung erhobenen Daten wurden mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogramms Microsoft Excel (Microsoft Deutschland, Unterschleißheim, Deutschland) gesammelt, die Einzeldaten der jeweiligen Versuchsgruppe als Mittelwert mit Standardabweichung (MW \pm SD) zusammengefasst und zur statistischen Analyse herangezogen. Der Vergleich zweier Versuchsgruppen miteinander erfolgte mittels Student's t-Test. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von p < 0,05 wurden die Ergebnisse zwischen den Versuchsgruppen als statistisch signifikant angenommen. Die Darstellung der Überlebenskurven sowie die Flächenberechnungen unter Graphen und den dazugehörigen Signifikanzberechnungen erfolgte mit GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

4 Ergebnisse

4.1 Der Verlust von Nrf2 führt zu einem geringeren Körpergewicht

Langzeitbeobachtungen ergaben, dass – unter identischen Haltungsbedingungen – *Nrf2*^{-/-} Mäuse sowohl kleiner als auch leichter waren als gleichaltrige WT Mäuse. Dabei kam es durch den Verlust von Nrf2 nicht nur zu einer Verminderung des Körpergewichtes, sondern auch zu einer signifikanten Reduktion des Lebergewichtes. Diese war verhältnismäßig stärker ausgeprägt als der gesamte Gewichtsverlust der *Nrf2*^{-/-} Mäuse (Abb. 12).



Durch den Gewichtsverlust kam es makroskopisch allerdings zu keinen morphologischen Veränderungen der Leber. Ebenso zeigten H&E Färbungen keine mikroskopischen Unterschiede zwischen der hepatozellulären Struktur einer WT Maus und der einer *Nrf2*^{-/-} Maus (Abb. 13).





Der Verlust von Nrf2 führte weder zu makroskopischen noch mikroskopischen Veränderungen in der hepatozellulären Struktur. Die H&E Färbung zeigt repräsentative Abbildungen in einer 200x Vergrößerung.

Um zu ermitteln, ob der Gewichtsunterschied auf eine geringere Futteraufnahme der *Nrf2^{-/-}* Mäuse zurückzuführen war, wurde über einen Zeitraum von 2 Wochen die tägliche Futteraufnahmerate der Tiere bestimmt. Jedoch zeigte sich, dass Tiere beider Genotypen nahezu identische Futtermengen pro Tag verzehrten (Abb. 14).



Des Weiteren konnte der Gewichtsunterschied auch nicht auf einen gesteigerten Energieverlust aufgrund erhöhter Körpertemperaturen der *Nrf2^{-/-}* Mäuse zurückgeführt werden. Dies zeigten rektale Temperaturmessungen, die täglich über einen Zeitraum von 2 Wochen durchgeführt wurden (Abb. 15).



Der Gewichtsunterschied ließ sich demnach nicht auf eine Differenz im Energieumsatz zurückführen.

4.2 *Nrf2^{-/-}* Mäuse zeigen Störungen im Glukose- und Fettsäuremetabolismus

Weiterführende metabolische Untersuchungen ergaben, dass der Verlust von Nrf2 zu Veränderungen im Glukosemetabolismus führte. Bei normaler Futteraufnahme zeigten die Messungen der Glukosekonzentration im Blut der *Nrf2*^{-/-} Mäuse keine Unterschiede im Vergleich zu WT Tieren. Zur genaueren Untersuchung wurde den Tieren über einen Zeitraum von 16 Stunden das Futter vollständig entzogen und die Entwicklung des Glukosespiegels während des Fastens analysiert. Obwohl die Glukosekonzentration im Blut der *Nrf2*^{-/-} Mäuse nach Futterentzug ebenfalls abfiel (Abb. 16), zeigte sich nach 16 Stunden gegenüber WT Tieren ein leicht aber dennoch signifikant erhöhter Glukosespiegel im Blut der *Nrf2*^{-/-} Mäuse.



Abbildung 16:

Der Verlust von Nrf2 führte zu einem leicht aber signifikant erhöhten Glukosespiegel nach 16 h Nahrungsentzug (WT: schwarz; $Nrf2^{-/-}$: weiß; n > 18; *p < 0,05).

Die weitere Durchführung von Glukose- und Insulin-Toleranztests (GTT bzw. ITT) offenbarte, dass die *Nrf2^{-/-}* Mäuse sowohl eine gestörte Glukosetoleranz als auch eine erhöhte Insulinresistenz aufwiesen (Abb. 17).



Erste Analysen hinsichtlich des Fettsäuremetabolismus ergaben zudem, dass es durch den Verlust von Nrf2 zu einer verringerten Akkumulation von Triglyceriden in der Leber kam.



Abbildung 18:

Der Verlust von Nrf2 führte zu einer spezifischen Reduktion in der hepatischen Akkumulation von Triglyceriden (TG). Alle leberspezifischen Konzentrationen sind in mg/g Leber angegeben (WT: schwarz; *Nrf2^{-/-}:* weiß; n = 10, ***p < 0,001). Diese reduzierte Fetteinlagerung spiegelte sich jedoch nicht in einer veränderten Triglyceridkonzentration im Blutserum der *Nrf2*^{-/-} Mäuse wider. Ebenso wurden die hepatischen Cholesterin- und Phospholipidkonzentrationen nicht vom Nrf2-Verlust beeinflusst (Abb. 18). Die genauere Analyse der hepatozellulären Fettsäuren offenbarte tendenziell geringere Fettsäure-Konzentrationen bei *Nrf2*^{-/-} Mäusen. Allerdings kam es nur in Bezug auf Palmitoleinsäure sowie Palmitinsäure zu einer signifikanten Reduktion (Abb. 19).



Abbildung 19:

Der Verlust von Nrf2 spiegelte sich in einer teilweise signifikanten Reduktion der hepatozellulären Fettsäurekonzentrationen wider (WT: schwarz; *Nrf2^{-/-}:* weiß; n = 10, *p < 0,05).

4.3 Der Verlust von Nrf2 führt unter Alkohol zu einem drastischen Anstieg der Mortalität

Um die Rolle von Nrf2 in der Ethanol-induzierten Leberschädigung zu untersuchen, wurden WT und Nrf2^{-/-} Mäuse mit einer ethanolhaltigen Flüssignahrung gefüttert. Obwohl die Nrf2^{-/-} Mäuse, welche über einen Zeitraum von 12 Tagen mit der Kontrolldiät gefüttert wurden, im Vergleich zu den WT Kontrolltieren leicht erhöhte Basiswerte in der systemischen ALT-Konzentration aufwiesen $(28 \pm 4,3 \text{ U/L} \text{ vs. } 12 \pm 7,5 \text{ U/L}; \text{ n} = 4)$, zeigten die histologischen Untersuchungen keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Kontrollgruppen (C). In Abbildung 20 sind repräsentative H&E, TUNEL und BrdU Färbungen von Leberschnitten in 200facher Vergrößerung gezeigt. Die Entwicklung einer periportalen mikrovesikulären Steatose wurde in beiden Ethanol-behandelten Gruppen beobachtet. Die moribunden Nrf2^{-/-} Mäuse (M) entwickelten unter der Ethanolbehandlung zusätzlich eine deutlich erkennbare makrovesikuläre Steatose mit starker Ausprägung im perivenösen Bereich sowie in der Mittelzone, wohingegen die WT Mäuse nur geringe morphologische Veränderungen aufwiesen. Des Weiteren zeigten moribunde Nrf2^{-/-} Mäuse einen deutlichen Anstieg in der Anzahl TUNEL- und BrdU-positiver Zellen. Außerdem wurden in den H&E Färbungen zahlreiche Anhäufungen infiltirerender Zellen sichtbar, die auf eine fokale Inflammation der Leber hindeuteten.



Abbildung 20: Repräsentative H&E, TUNEL und BrdU Färbung von WT und *Nrf2*^{-/-} Mäusen auf Kontrolldiät (C) sowie Ethanol-behandelten moribunden Tieren (M). Die mikround makrovesikuläre Steatose ist durch Pfeilköpfe bzw. Pfeile gekennzeichnet (200x Vergrößerung).

In Übereinstimmung mit den mikroskopischen Befunden stieg die ALT-Konzentration im Blutserum aller Gruppen im Behandlungsverlauf stetig an, wobei es erst in den moribunden *Nrf*2^{-/-} Tieren (M) zu einem massiven Anstieg kam (Abb. 21).



Abbildung 21:

Nrf2^{-/-} Mäuse zeigten einen drastischen ALT-Anstieg im Behandlungsverlauf. Dargestellt sind ALT-Konzentrationen von Tieren beider Genotypen auf Kontrolldiät (C), sowie nach 3 Tagen Ethanolbehandlung (3d) und moribunde Tiere (M) (n = 8, ***p < 0,001).

Mit dem Anstieg in der ALT-Konzentration verloren die *Nrf2*^{-/-} Tiere drastisch an Gewicht. Eine durch Alkohol induzierte Kachexie wurde in den WT Mäusen jedoch nicht beobachtet. Im Vergleich zu den *Nrf2*^{-/-} Tieren wiesen diese zusätzlich eine deutlich geringere Mortalität auf (Abb. 22). Während 90% der WT Mäuse eine über 4 Wochen andauernde Ethanolbehandlung überlebten, starben alle $Nrf2^{-/-}$ Mäuse innerhalb von 24 Tagen (n = 20, p < 0,001).



Abbildung 22: Überlebensraten von WT und Nrf2^{-/-} Mäusen unter Ethanolbehandlung.

4.4 Der Verlust von Nrf2 bewirkt einen verminderten Acetaldehyd-Metabolismus

Um den Alkoholmetabolismus auf transkriptioneller Ebene zu untersuchen, wurden RNA-Microarrays und qPCR Analysen durchgeführt. Die Untersuchungen mittels RNA-Microarray ergaben, dass es durch den Verlust von Nrf2 zu einer verminderten basalen Genexpression der Enzyme kam, welche maßgeblich am Ethanolmetabolismus beteiligt sind. Der Konsum von Ethanol bewirkte eine transkriptionelle Induktion dieser Gene, wobei die Modifikation an Nrf2 keinen signifikanten Einfluss auf die Transkription der ADH1 hatte.



Allerdings führte der Verlust von Nrf2 unter der Ethanoldiät zu einer massiv reduzierten Genexpression der zytosolischen ALDH1 sowie der mitochondrialen ALDH2. Die Expressionsmuster der mittels Microarray untersuchten Gene wurden anhand von qPCR Analysen bestätigt (Abb. 23). In Übereinstimmung mit den Daten der mRNA Analysen zeigten Untersuchungen zur Enzymaktivität in hepatischen Proteinextrakten in Bezug auf die ADH keine Veränderungen durch die Ethanolbehandlung. Der Anstieg in der Enzymaktivität der ALDH nach Ethanolbehandlung war jedoch in den WT Mäusen signifikant höher im Vergleich zu den *Nrf2*^{-/-} Mäusen (Abb. 24).



Um ferner zu untersuchen, ob es durch den Verlust von Nrf2 zu einer Verschiebung hinsichtlich des MEOS Stoffwechsels kam, wurde die hepatozelluläre Proteinexpression von CYP2E1 nach Ethanolbehandlung untersucht. Dabei wurde gezeigt, dass die Fütterung von Ethanol bei beiden Gruppen eine vergleichbare Erhöhung in der Expression von CYP2E1 induzierte (Abb. 25).



Um die Hypothese zu unterstreichen, dass es durch den Verlust von Nrf2 zu einem verzögerten Abbau des Intermediärproduktes Acetaldehyd in der Leber kam, sollten die hepatischen Acetaldehyd-Konzentrationen nach Ethanolbehandlung bestimmt werden. Es zeigte sich allerdings, dass die reguläre Zufütterung von Ethanol über das Futter als Modell für die Untersuchung des Ethanol-Intermediärmetabolismus ungeeignet war. Zum einen waren die Acetaldehyd-Konzentrationen sehr gering, zum anderen wiesen die gemessenen Werte innerhalb einer Gruppe deutliche Schwankungen auf. Um standardisierte experimentelle Bedingungen zu schaffen, wurde den Tieren per Magensonde einmal täglich eine definierte Menge Ethanol zugeführt. Während sich die Konzentration von Ethanol im Blut der Tiere nicht unterschied, ergab die anschließende Analyse signifikant höhere Konzentrationen an Acetaldehyd in den Lebern der *Nrf2*^{-/-} Mäuse (Abb. 26, p < 0,01).

	EtOH [g/kg]	Acetaldhyde [nM/g]
	blood	liver
WT	1.91 ± 0.09	9.63 ± 1.88
Nrf2-/-	2.02 ± 0.42	28.28 ±10.0

Abbildung 26:

Überprüfung des Ethanolgehalts im Blut und Bestimmung der hepatischen Acetaldehyd-Konzentration nach definierter Ethanolgabe (n = 4; p < 0.01).

4.5 Identifikation von funktionalen Genen und transkriptionellen Netzwerken in ethanolbehandelten *Nrf2^{-/-}* und WT Mäusen

Um die molekularen Mechanismen besser verstehen zu können, mit denen Nrf2 eine Ethanol-induzierte Steatose verhindern kann, wurde eine mRNA Analyse von differentiell regulierten Genen aus Lebern von Mäusen mit und ohne 2wöchiger Ethanolbehandlung durchgeführt. Die Analyse erfolgte mittels Ingenuity Pathway Analysis Software.

Die durch Nrf2 am stärksten modifizierte Kategorie beinhaltete Gene, die in den Fettsäuremetabolismus involviert sind. Die Gruppe enthielt 60 Gene, welche unter anderem in der Biosynthese, der Oxidation, der Hydroxylierung sowie der Modifikation und Konvertierung von Lipiden eine wichtige Rolle spielen. In einem nächsten Schritt wurde untersucht, wie diese differentiell regulierten Gene in einzelne regulatorische Kaskaden oder Signalwege integriert sind. Mit Hilfe der Software wurden relevante Signalwege identifiziert, von denen 2 Netzwerke in Abbildung 27 dargestellt sind. Die Netzwerke bestehen graphisch aus Knotenpunkten, welche die Gene oder Genprodukte darstellen, während die Pfeile zwischen den Knoten die jeweilige biologische Interaktion zeigen. Die Farbintensität der Knotenpunkte gibt den Grad der Hoch- (rot) bzw. Runterregulation (grün) des betreffenden Gens an. Die Form des Knotenpunktes stellt die funktionelle Klasse des Genproduktes dar. Sowohl die funktionelle Klasse als auch die entsprechenden biologischen Interaktionen sind der nebenstehenden Legende zu entnehmen.

In Netzwerk 1 wurde SREBP-1 als zentraler Knoten von der Software identifiziert. Insgesamt zählten 33 differentiell exprimierte Fokusgene zu diesem Netzwerk, dessen Signifikanz mit dem Faktor 40 bewertet wurde und somit als hoch signifikant einzustufen war.





In Netzwerk 2 wurde c-Jun als zentraler Knotenpunkt identifiziert. Zu diesem Netzwerk zählten 31 Fokusgene mit einer Signifikanzbewertung von 36.

Um die Transkriptionsfaktoren SREBP-1 und c-Jun als wichtige Komponenten in der frühen Reaktion des Organismus auf Ethanolkonsum weiterführend zu untersuchen, wurde deren Expression auf Proteinebene bestimmt (Abb. 28).



Abbildung 28:

Bestimmung der Expression zentraler Proteine des Fettsäuremetabolismus von WT (W) und $Nrf2^{-/-}$ (N) Mäusen. Die Western Blots zeigen Proteinextrakte von Tieren mit Kontrolldiät (C) und 3tägiger Ethanolbehandlung (3d) sowie von moribunden (M) Tieren (n = 4).

In der Western Blot Analyse zeigte sich vor allem in moribunden *Nrf2^{-/-}* Mäusen ein beträchtlicher Anstieg in der SREBP-1-Expression. Allerdings wurde nur eine geringe Erhöhung im Bezug auf das funktionell aktive, nukleäre SREBP-1 (mSREBP-1) in den ethanolbehandelten *Nrf2^{-/-}* Mäusen nachgewiesen. Während die Expression von c-Jun in den WT Mäusen unverändert blieb, nahm sie in den ethanolbehandelten *Nrf2^{-/-}* Mäusen kontinuierlich zu.

Eine frühere Studie konnte nachweisen, dass AMPK eine Schlüsselrolle bei der Regulation der Effekte von Ethanol auf die Aktivierung von SREBP-1 zukommt [127]. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit Analysen hinsichtlich der Aktivierung von AMPK durchgeführt. Der Verlust von Nrf2 führte jedoch weder zu einer Veränderung der Gesamtkonzentration noch zu einer veränderten Aktivierung von AMPK.



Abbildung 29:

Expression relevanter Proteine in Bezug auf die Regulation von SREBP-1. Primäre murine Hepatozyten ohne (1) und mit (2) Metformin-Behandlung wurden als Positivkontrollen für p-AMPK verwendet (n = 4).

Des Weiteren wurde in WT Mäusen kein Effekt der Ethanolbehandlung auf die Phosphorylierung von ACC festgestellt. Im Vergleich dazu zeigten *Nrf2^{-/-}* Tiere unter Kontrollbedingungen eine verstärkte ACC-Inaktivierung. Im Verlauf der

Ethanolbehandlung nahm der Grad der Inaktivierung in den *Nrf2^{-/-}* Mäusen immer weiter ab (Abb. 29).

4.6 Ethanol-behandelte Nrf2^{-/-} Mäuse weisen keine signifikant vermehrte oxidative Schädigung von DNA und Proteinen auf

Wie bereits gezeigt wurde, fördert chronischer Alkoholkonsum oxidativen Stress [128]. Als Marker für die oxidative Schädigung der DNA wurde in dieser Arbeit das Verhältnis von 80xoG / dG bestimmt. In beiden Gruppen führte die Ethanoldiät zu einer leichten, jedoch nicht signifikanten Erhöhung des 80xoG / dG Verhältnisses (Abb. 30).



Abbildung 30:

Die Ethanolbehandlung führte in keiner Gruppe zu einer signifikanten Erhöhnung des 80xoG/dG Verhältnisses (n = 4).

Als Kennzeichen für den oxidativen Status der Proteine wurden reaktive Carbonylgruppen durch Derivatisierung mit DNP nachgewiesen. Dabei wurde unter Kontrollbedingungen bereits eine leicht erhöhte Anzahl an Carbonylgruppen pro Protein in den *Nrf2^{-/-}* Tieren festgestellt (Abb. 31).



Abbildung 31:

 $Nrf2^{-/-}$ Mäuse zeigten sowohl mit der Kontrolldiät als auch mit der Ethanoldiät eine leicht erhöhte Anzahl an Carbonylresten (n = 2).

Nach Ethanolbehandlung war die Konzentration an oxidierten Proteinen in beiden Gruppen moderat erhöht, blieb jedoch leicht höher in den *Nrf2*^{-/-} Mäusen.

4.7 *Nrf2^{-/-}* Mäuse zeigen eine abgeschwächte zelluläre anti-oxidative und xenobiotische Stressantwort

Zur Untersuchung der zellulären Detoxifikation wurde das Glutathion-System näher analysiert.

In den ersten Tagen der Ethanolbehandlung sank die Konzentration an GSH in allen Mäusen deutlich ab (Abb. 32). Allerdings zeigte sich im Verlauf, dass es bei den moribunden *Nrf2*^{-/-} Mäusen zu einem verstärkten Abfall der GSH-Konzentration kam, wohingegen die GSH-Werte in den WT Mäusen nach längerer Dauer der Ethanolbehandlung (28d) wieder stiegen. Außerdem waren die mitochondrialen GSH-Konzentrationen der moribunden *Nrf2*^{-/-} Mäuse leicht, aber dennoch signifikant reduziert im Vergleich zu den Ethanol-behandelten WT Tieren.



Abbildung 32: Die Ethanolbehandlung führte in der gesamten Leber sowie in den hepatozellulären Mitochondrien von moribunden $Nrf2^{-/-}$ Mäusen zu einer signifikanten Abnahme der GSH-Konzentration (n = 4; *p < 0,05; ***p < 0,001).

Die Synthese von Glutathion ist abhängig von der Verfügbarkeit der Glutamat-Cystein-Ligase (GCL), die aus einer schweren katalytischen Einheit (GCLC) und einer leichten regulatorischen Einheit (GCLM) besteht. In Übereinstimmung mit den Messungen der hepatischen GSH-Konzentration wurde bei der Analyse der mRNA- und Proteinkonzentrationen eine signifikante Reduktion in Bezug auf die katalytische Untereinheit bei *Nrf2*^{-/-} Mäusen nach Ethanolbehandlung festgestellt (Abb. 33).

Lluis et al. konnten 2003 zeigen, dass die Depletion von mitochondrialem GSH durch Acetaldehyd zu funktionalen und strukturellen Veränderungen in den Mitochondrien führen kann [129].



Abbildung 33:

mRNA Konzentration von GCLC (oben) und Proteinkonzentrationen von GCLC und GCLM (unten) in $Nrf2^{-/-}$ (N) und WT Mäusen (W) im Verlauf der Ethanolbehandlung (C: Kontrolle; 3d: 3 tägige Ethanolbehandlung; M: moribund; n = 4).

Um zu überprüfen, ob die Ethanol-bedingte Reduktion im mitochondrialen GSH-Gehalt auch eine Beeinträchtigung in der Energiebereitstellung verursacht, wurde die Konzentration an zellulärem ATP als Maß für die mitochondriale Funktionsfähigkeit analysiert (Abb. 34).



In Übereinstimmung mit den vorangegangenen Ergebnissen zeigte sich, dass im Vergleich zu Ethanol-behandelten WT Mäusen die ATP-Konzentration in moribunden *Nrf2*^{-/-} Mäusen signifikant geringer war. Durch elektronenmikroskopische Aufnahmen von Lebern Ethanol-behandelter Tiere wurden die strukturellen Schäden an den Mitochondrien sichtbar gemacht.



Abbildung 35:

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von vergrößerten Mitochondrien in Hepatozyten Ethanol-behandelter Mäuse.

Abbildung 35 zeigt zwei Aufnahmen, auf denen in beiden Fällen vergrößerte und geschwollene Mitochondrien in steatotischen Lebern zu erkennen sind. Die
Schädigung ist jedoch in den Hepatozyten der *Nrf2^{-/-}* Mäuse deutlich ausgeprägter.

Der Verlust von Nrf2 erstreckte sich nicht nur auf Gene, welche die Glutathionsynthese betreffen, sondern auch auf solche, die am Glutathion- sowie am zellulären Detoxifikationssystem beteiligt sind. So konnte mittels semiquantitativer RT-PCR gezeigt werden, dass die Transkription einer Reihe von Glutathion-Transferasen sowie die der Glutathion-Peroxidase in Ethanol-behandelten *Nrf2*^{-/-} Mäusen signifikant geringer war als bei vergleichbaren WT Tieren (Abb. 36).



Abbildung 36:

Semiquantitative RT-PCR von relevanten Genen des zellulären Detoxifikationssystems (n = 4).

Die Expression der Glutathion-Reduktase (GR), welche das oxidierte Glutathion (GSSG) wieder reduziert, wurde durch die Nrf2-Defizienz nicht beeinflusst. Der letzte Schritt im zellulären Detoxifikationssystem ist der Abtransport von toxischen Komponenten. Einige der daran beteiligten Transporter – wie Mrp1 und Mrp2 – tragen außerdem zur Überprüfung des intrazellulären GSSG Gehalts bei. Die Expression von Mdr1 und Mdr2 (*multidrug-resistence transporter*), Mrp1, Mrp2, Oatp2 (*organic anion transport protein*) und Bsep wurde durch den Verlust von Nrf2 ebenfalls nicht beeinflusst. In Bezug auf Mdr1 und 2 sowie Mrp1 war die Expression sogar verstärkt. Im Gegensatz dazu kam es zu einer

transkriptionellen Reduktion von Mrp3 und Oatp1 in den Hepatozyten der Ethanol-behandelten *Nrf2^{-/-}* Mäuse. Sowohl Mrp3 als auch Oatp1 sind in der sinusoidalen Membran von Hepatozyten lokalisiert und vermitteln die simultane Abgabe von GSH und Aufnahme von hydrophoben schwefelhaltigen Konjuganten. Mdr1 und 2 sowie Mrp2 und Bsep hingegen sind in der kanalikulären Membran der Hepatozyten in erster Linie für die Exkretion organischer Ionen in den Gallenkanalikulus verantwortlich.

Diese Ergebnisse machen deutlich, dass die Nrf2-Defizienz zu einer Einschränkung der Detoxifikation von Ethanol führte, welche nicht allein durch Veränderungen bezüglich verschiedener Phase-2-Enzyme begründet war, sondern ebenfalls eine Reihe von Phase-3-Transportern betraf.

Bisherige Studien haben gezeigt, dass eine Anreicherung des GSH-Gehalts zu einer Reduktion der Leberschädigung nach Acetaminophen-Gabe führt [130]. Um zu überprüfen, ob eine Erhöhung des GSH-Gehalts auch zu einer Verminderung des Steatoseverlaufs führen kann, wurde *Nrf2*^{-/-} Mäusen zusätzlich zur Ethanolbehandlung zweimal täglich NAC verabreicht. Aus NAC wird durch Deacetylierung L-Cystein, welches in der Zelle zu einer Steigerung der GSH-Synthese beitragen kann. Jedoch wurde weder in der frühen Entstehung mikrovaskulärer Verfettung noch im späteren Verlauf der makrovaskulären Steatose eine Verbesserung durch die zusätzliche Gabe von NAC beobachtet (Abb. 37).



Abbildung 37: Durch die zusätzliche Behandlung mit NAC konnte die Entstehung einer Steatose nicht verhindert werden (200x Vergrößerung).

4.8 Ethanol löst eine stärkere Immunantwort in Lebern von *Nrf2^{-/-}* Mäusen aus

Die Aktivierung von Kupfferzellen, den residenten Makrophagen in der Leber, und Neutrophilen ist von großer Bedeutung in der ALD [131]. Um einen Einblick zu bekommen, welchen Beitrag inflammatorische Zellen zum Ethanolinduzierten Leberschaden leisten, wurden Leberschnitte von Ethanolbehandelten Tieren auf Kupfferzellen (CD68), sowie auf Monozyten, NK-Zellen und Neutrophile (CD11b) untersucht. Des Weiteren wurde p47 phox als Untereinheit der Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat-Oxidase (NADPH-Oxidase) in einer Doppelfärbung mit CD68 nachgewiesen.



Abbildung 38: Leberschnitte von Kontrollen (C) und Ethanol-behandelten moribunden Mäusen (M) wurden auf die Expression von CD68 (100x Vergrößerung) und CD11b (200x Vergrößerung) analysiert. Die Doppelfärbung zeigt die Co-Lokalisation von CD68 (rot) und der NADPH-Oxidase Untereinheit p47 phox (grün) (400x Vergrößerung).

Abbildung 38 zeigt, dass sowohl in den WT als auch den *Nrf2*^{-/-} Mäusen auf Kontrolldiät diffus verteilt einzelne Kupfferzellen im sinusoidalen Zwischenraum identifiziert wurden. Während die WT Mäuse unter der Ethanolbehandlung keine Veränderungen zeigten, nahm die Anzahl der Kupfferzellen in der Leber von *Nrf2*^{-/-} Mäusen deutlich zu. Es wurden außerdem Anhäufungen von aggregierten Kupfferzellen sowie vermehrt CD11b-positive Zellen nachgewiesen. Parallel dazu kam es in diesen Tieren zu einer höheren Anzahl an p47 phox-positiven Zellen.

Da die NADPH-Oxidase eines der Schlüsselenzyme bei der Generierung von Superoxid (O_2^{-}) in Kupfferzellen darstellt, welches wiederum zur Produktion von zytotoxischem TNF- α führt [132], wurde die Proteinkonzentration von relevanten Zytokinen im Blutserum Ethanol-behandelter WT und *Nrf2*^{-/-} Mäuse bestimmt (Abb. 39). Durch den Nachweis massiv erhöhter TNF- α und IL-6 Spiegel im Blutserum moribunder *Nrf2*^{-/-} Mäuse wurde die starke Aktivierung des Immunsystems in diesen Tieren bestätigt.



Entsprechend zeigte die Analyse der Proteinexpression von STAT3, ein nachfolgendes Zielgen von IL-6, eine starke Aktivierung in moribunden *Nrf2^{-/-}* Mäusen (Abb. 40).



Um zu ermitteln, ob die verstärkte Immunantwort die *Nrf2*^{-/-} Mäuse auch für eine Leberschädigung durch LPS sensibilisiert [36], wurde sowohl 4 Tage mit Ethanol behandelten als auch nicht behandelten WT und *Nrf2*^{-/-} Mäusen LPS injiziert.



Abbildung 41:

6 h nach LPS-Gabe zeigten die Ethanolbehandelten *Nrf2^{-/-}* Mäuse eine verstärkte hepatozelluläre Schädigung. Es wurde jedoch kein Zelltod nachgewiesen (200x Vergrößerung).

Sechs Stunden nach LPS-Gabe wiesen die Lebern der Ethanol-behandelten *Nrf2^{-/-}* Mäuse eine verstärkte hepatozelluläre Schädigung auf, jedoch wurde keine Induktion von Apoptose nachgewiesen (Abb. 41). Durch die LPS Injektion kam es außerdem zu einem weiteren Anstieg der Transaminasen. In Abbildung

42 sind die ALT-Konzentrationen im Blutserum der Ethanol-behandelten Mäuse vor und nach LPS Injektion dargestellt.



Abbildung 42:

Bestimmung der ALT-Konzentration im Blutserum von Ethanol-behandelten WT und $Nrf2^{-/-}$ Mäusen vor (C) und 6 h nach LPS Injektion (M) (n = 4; *p < 0,05).

Die verstärkte Immunantwort wurde weiterhin begleitet von einer starken Aktivierung von STAT3 und c-Jun in *Nrf2*^{-/-} Mäusen.



Abbildung 43:

Analyse der Proteinexpression und Aktivierung von STAT3, c-Jun und der MAPK ERK1/2 und JNK in WT (W) und *Nrf*2^{-/-} Mäusen (N) 1,5 h und 6 h nach LPS Injektion (n = 4).

In den WT Mäusen hingegen induzierte die zusätzliche LPS Injektion eine erhöhte Phosphorylierung der MAP Kinasen ERK1/2 – diese Induktion wurde in den moribunden und LPS-stimulierten *Nrf2*^{-/-} Mäusen vollständig unterdrückt (Abb. 43).

4.9 Der Verlust von Nrf2 führt sowohl unter der MCD als auch unter der HFD zu einer Veränderung in der Gewichtszunahme

Um die Rolle von Nrf2 in der nicht-alkoholischen Leberschädigung zu untersuchen, wurden WT und *Nrf2^{-/-}* Mäuse einerseits für 5 Wochen mit einer MCD gefüttert. Andererseits erhielten die Tiere über einen Zeitraum von 30 Wochen eine HFD, in der etwa 60% der Energie aus Schweineschmalz stammte. Im Verlauf der Fütterungsperiode zeichneten sich bereits Unterschiede in den Effekten der beiden Diäten ab.



Wie bereits für die Behandlung mit MCD gezeigt wurde [133], verloren die Mäuse unter dieser Diät deutlich an Gewicht (Abb. 44), während die Tiere unter der HFD nahezu das doppelte ihres Ausgangsgewichtes zunahmen (Abb. 45). Im Gegensatz zur MCD machte sich hier der Verlust von Nrf2 allerdings durch eine signifikant verlangsamte Gewichtszunahme bemerkbar.



Abbildung 45: Der Verlust von Nrf2 führte unter der HFD zu einer signifikant verlangsamten Gewichtszunahme (WT: schwarz; $Nrf2^{-/-}$: weiß; n > 20; **p < 0,01).

Simultan zum Körpergewicht entwickelten sich auch Leber- und Fettgewebe. Während unter der MCD nahezu kein Fettgewebe vorhanden war und auch die Lebern im Behandlungsverlauf immer weiter an Gewicht verloren, nahmen sowohl das Fett- als auch das Lebergewebe unter der HFD stetig an Gewicht zu. Die makroskopischen Aufnahmen in Abbildung 46 geben den Größenunterschied der Lebern nach Beendigung der jeweiligen Fütterung bei identischer Vergrößerung wieder. Die Veränderungen im Lebergewicht während der Behandlungen mit MCD und HFD sind zusätzlich graphisch in Abbildung 47 dargestellt.



Abbildung 46: Repräsentative makroskopische Aufnahmen von WT und *Nrf2^{-/-}* Lebern nach MCD und HFD Behandlung.

Dabei wird deutlich, dass der Verlust von Nrf2 unter beiden Diäten zu signifikant geringeren Gewichten des hepatischen Gewebes führte.



Abbildung 47: Darstellung der Veränderungen im Lebergewicht von WT (schwarz) und *Nrf2^{-/-}* Mäusen (weiß) während der Behandlung mit MCD und HFD (**p < 0,01; ***p < 0,001).

Auch das Verhältnis zwischen Leber- und Körpergewicht war in den *Nrf2*^{-/-} Mäusen in beiden Behandlungsansätzen signifikant geringer als in den entsprechenden WT Mäusen (Abb. 48).



Abbildung 48: Darstellung des Verhältnisses zwischen Körper- und Lebergewicht im Behandlungsverlauf (n > 4; *p <0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001).

In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung kam es auch in Bezug auf das Fettgewebe unter der HFD zu einer signifikant langsameren Gewichtszunahme (Abb. 49).



Abbildung 49:

Der Verlust von Nrf2 führte unter der HFD zu einer verlangsamten Zunahme im Fettgewebe (n = 4; **p < 0,01; ***p < 0,001).

Während die basalen ALT-Konzentrationen in diesem Versuchsansatz mit Werten um 20 U / L nicht erhöht waren, stiegen sie im Fütterungsverlauf leicht an. Dabei führte die Depletion von Nrf2 in beiden Diäten zu einem deutlich geringeren Anstieg (Abb. 50).



Abbildung 50: In $Nrf2^{-/-}$ Mäusen war der Anstieg der ALT-Konzentration im Blutserum während des Behandlungsverlaufs signifikant verringert (WT: schwarz; $Nrf2^{-/-}$: weiß; n = 4; **p < 0,01; ***p < 0,001).

Des Weiteren zeigten mikroskopische Aufnahmen der Leber eine massive Schädigung des Gewebes nach 5 Wochen MCD- bzw. 30 Wochen HFD-Behandlung sowie eine ausgeprägte Steatose. Dass es sich bei den Einschlüssen tatsächlich um Lipide handelte, wurde mittels Ölrot-O Färbung nachgewiesen (Abb. 51). Die in den H&E Färbungen deutlich erkennbare makrovesikuläre Steatose breitete sich unter der MCD in beiden Genotypen gleichermaßen aus. Sie entwickelte sich zu Beginn vor allem im periportalen Bereich und war am Ende der Behandlung im gesamten Gewebe vorhanden. Zusätzlich wurden in den *Nrf2*^{-/-} Mäusen Aggregate von infiltrierenden Zellen nachgewiesen, welche in den WT Mäusen nicht oder nur wenig vorhanden waren.

Unter der HFD wies die Lebersteatose eine demgegenüber abweichende Morphologie auf. Während es sich bei der makrovesikulären Fetteinlagerung unter der MCD fast ausschließlich um einen einzelnen großen Lipidtropfen pro Zelle handelte, waren vor allem in den Lebern der *Nrf2^{-/-}* Mäuse unter HFD viele kleine Lipidtröpfchen pro Zelle sichtbar. Nur vereinzelt kam es zur Ausbildung von vergleichbar großen Tropfen, wie sie unter der MCD oder der Ethanolbehandlung beobachtet wurden.



Abbildung 51: Repräsentative H&E und Ölrot O Färbungen nach Fütterung mit MCD oder HFD (200x Vergrößerung).

4.10 Der Verlust von Nrf2 hat abhängig von der Diät unterschiedliche Auswirkungen auf den Lipidmetabolismus

Die Analyse des Lipidmetabolismus nach Beendigung der Fütterungsexperimente umfasste zum einen die Bestimmung der Triglyceridkonzentration im Blutserum der Mäuse, zum anderen die Messung der hepatischen Konzentrationen an Triglyceriden, Cholesterin sowie Phospholipiden (Abb. 52).

Während sich die Triglyceridwerte im Blutserum der behandelten Mäuse nicht von denen der Kontrolltiere unterschieden, zeigten sich in der Bestimmung der hepatischen Triglyceride deutliche Differenzen. Die basal verringerte Fetteinlagerung der *Nrf2*^{-/-} Mäuse war unter der MCD-Diät nicht mehr erkennbar. Vielmehr kam es in beiden Genotypen zu einem massiven Anstieg der hepatischen Triglyceride. Unter der HFD-Diät stieg die Konzentration in den WT Mäusen noch weiter an. In Bezug auf die HFD-behandelten *Nrf2*^{-/-} Mäuse wurde zum hier untersuchten Zeitpunkt eine signifikant geringere Akkumulation von hepatischen Triglyceriden beobachtet. Allerdings muss man bedenken, dass die allgemeine Gewichtszunahme durch den Verlust von Nrf2 massiv verzögert war. Der Unterschied im Körpergewicht zwischen beiden Gruppen war zum Zeitpunkt der Untersuchung am größten. Ist wäre deshalb möglich, dass der beo-





Abbildung 52: Auswirkungen der MCD und HFD Behandlung auf die Triglyceridkonzentration im Blutserum sowie auf die hepatischen Triglycerid-, Cholesterin- und Phospholipidspiegel (WT: schwarz; $Nrf2^{-/-}$: weiß; n = 8; *p < 0,05; ***p < 0,001).

Die Konzentrationen von Cholesterin und Phospholipiden blieb unter der HFD nahezu unverändert. Lediglich unter der MCD-Behandlung kam es zu geringen Schwankungen, die allerdings unabhängig vom Genotyp auftraten und deshalb nicht weiter untersucht wurden.



Abbildung 53: Verhältnis aus den gesättigten Fettäuren Palmitat und Stearat sowie den entsprechenden einfach ungesättigten Fettsäuren Palmitoleat und Oleat (WT: schwarz; $Nrf2^{-/-}$: weiß; n = 4; *p < 0,05; **p < 0.01; ***p < 0,001).

Eine genauere Analyse des Lipidstoffwechsels umfasste die Konzentrationsbestimmung relevanter Fettsäuren (Abb. 53) sowie die transkriptionelle Untersuchung wichtiger Gene des Lipidmetabolismus. Die Ergebnisse der mRNA-Expressionen wurden durch zusätzliche Bestimmungen einzelner Proteinexpression ergänzt (Abb. 54).



Abbildung 54: Die transkriptionelle Analyse (rechts) zeigte, dass die Fütterung mit MCD eine differentielle Regulation einiger an der Lipidsynthese beteiligten Gene induzierte (WT: schwarz; *Nrf2*^{-/-}: weiß; n = 4; *p < 0,05). Dies wurde bezüglich der Expression und Inaktivierung von ACC auf Proteinebene (links) bestätigt (n = 4).

Die Ergebnisse der mRNA-Expressionsanalyse von WT und *Nrf2^{-/-}* Mäusen vor und nach MCD Fütterung offenbarten eine differentielle Regulation von wichtigen Schlüsselgenen der Lipidsynthese. Während der Verlust von Nrf2 Auslöser einer basal leicht erhöhten Lipidsynthese war, führte die Behandlung mit MCD zu einer verringerten Expression von SREBP-1, ACC1 und FAS. Die gleiche Behandlung induzierte in den WT Mäusen hingegen eine signifikante Expressionssteigerung von ACC1. Die Analyse der Proteinexpression bestätigte, dass ACC in *Nrf2^{-/-}* Mäusen unter MCD Behandlung nahezu vollständig reprimiert wurde. Im Gegensatz dazu war die ACC-Expression in *Nrf2^{-/-}* Mäusen durch die Behandlung mit HFD deutlich stärker induziert als in vergleichbaren WT Mäusen. Zusätzlich kam es in *Nrf2^{-/-}* Mäusen zu einer gleichzeitigen Phosphorylierung von AMPK, welche die Phosphorylierung von ACC verursacht.

4.11 Durch die Behandlung mit MCD und HFD verändert sich die Auswirkung der Nrf2-Depletion auf den Glukosemetabolismus

Die Entstehung einer NASH geht laut Literatur mit der Entwicklung einer Insulinresistenz einher [96]. Daher wurde angenommen, dass es durch die speziellen Fütterungen zu einer Verstärkung der Stoffwechselstörung im Glukosemetabolismus kommen müsste, die durch den Verlust von Nrf2 bereits unter Basal-Bedingungen beobachtet wurde. Zunächst wurde die Glukosekonzentration im Blutserum von WT und *Nrf2^{-/-}* Mäusen vor und nach Fütterung der entsprechenden Diät bestimmt.

Wie aus Abbildung 55 ersichtlich wird, führte die MCD-Behandlung unabhängig vom Genotyp zu geringeren Glukosekonzentrationen. Im Gegensatz dazu stieg die Glukosekonzentration im Blutserum der WT Tiere durch die Behandlung mit HFD deutlich an, während sie in den *Nrf2*^{-/-} Mäusen nahezu unverändert blieb.



Abbildung 55:

Bestimmung der Glukosekonzentration im Blutserum von WT und $Nrf2^{-/-}$ Mäusen vor und nach Behandlung mit der entsprechenden Diät (WT: schwarz; $Nrf2^{-/-}$: weiß; n = 4; **p < 0,01).

Entzog man den Mäusen die Nahrung, fiel die Glukosekonzentration in MCDbehandelten Mäusen weitaus schneller ab und war bereits nach 4 Stunden nur noch halb so hoch wie in gefasteten Mäusen mit Kontrolldiät. Unter HFD kam es zu einer gegenläufigen Entwicklung. Nach 16 Stunden Fastenzeit lag die Blutzucker-Konzentration von WT Mäusen, die zuvor mit HFD behandelt wurden, immer noch deutlich höher als in den WT Tieren mit Kontrolldiät. Währenddessen hatte sich der Glukosewert der mit HFD-behandelten *Nrf2*^{-/-} Mäuse nahezu dem der *Nrf2*^{-/-} Kontrolltiere angenähert (Abb. 56).



Abbildung 56:

Der Verlust von Nrf2 spiegelte sich lediglich unter HFD-Behandlung nach 16 h Nahrungsentzug in einem stärkeren Glukoseabfall wider (WT: schwarz; $Nrf2^{-/-}$: weiß; n = 4; *p < 0.05; **p < 0.01). Es musste jedoch im GTT wider Erwarten festgestellt werden, dass der unter Kontrollbedingungen sichtbare Unterschied zwischen WT und *Nrf2^{-/-}* Mäusen unter den jeweiligen Fütterungsbedingungen nicht mehr vorhanden war.



Abbildung 57: Der Glukosetoleranztest (GTT) zeigte, dass die basalen Unterschiede zwischen den WT und $Nrf2^{-/-}$ Mäusen durch die Behandlung mit MCD (links) und HFD Diät (rechts) aufgehoben waren (n = 8).

Anstatt deutlicher hervor zu treten, zeigten beide Genotypen einen nahezu identischen Kurvenverlauf (Abb. 57). Ausgehend von einer durch das vorherige Fasten bereits geringeren Ausgangskonzentration an Glukose, stieg diese nach der Glukose-Injektion in MCD-behandelten Mäusen relativ gesehen ähnlich stark an wie in WT-Kontrolltieren und fiel in einem vergleichbaren Zeitraum wieder auf seine Ausgangswerte ab. Auf der anderen Seite kam es durch die HFD-Behandlung tatsächlich zur Entstehung einer Insulinresistenz, welche sich durch das verlangsamte Absinken der Glukosekonzentration nach erfolgter Injektion bemerkbar machte. Allerdings war dieser Effekt in beiden Genotypen in gleicher Weise ausgeprägt. Demnach war in beiden Fällen lediglich der Effekt der jeweiligen Diät zu beobachten.

4.12 Die Behandlung mit MCD führt zu einer deutlichen Induktion der Zellproliferation, die durch den Verlust von Nrf2 jedoch vermindert wird

Um besser differenzieren zu können, ob die Behandlung tatsächlich zur Entstehung einer NASH geführt hatte, wurde zunächst das Proliferations- und Apoptoseprofil in den Leberproben näher untersucht. In Bezug auf die Proliferation zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen dem Nachweis des inkorporierten BrdU und der Ki67-Expression (Abb. 58). Nach 3tägiger BrdU-Gabe wurde in der entsprechenden immunhistochemischen Färbung eine Vielzahl an BrdU-positiven Zellen identifiziert. Dies betraf in erster Linie die MCD-behandelten Mäuse, deren Lebern eine starke Proliferation aufwiesen. Bei genauerer Betrachtung der BrdU Färbung wurde allerdings erkennbar, dass es sich bei einem Großteil der proliferierenden Zellen nicht um Hepatozyten handelte. Sowohl die Größe der Zellkerne als auch die Verteilung der Zellen ließ vermuten, dass es sich dabei um die zuvor beschriebenen Aggregate infiltrierender Zellen handelte.



Abbildung 58: Repräsentative immunhistochemische Färbungen von BrdU, Ki67, p27 und TUNEL (200x Vergrößerung).

Da eine quantitative Auswertung aufgrund der Vielzahl an positiven Zellen nicht möglich war, wurde die Ki67-Färbung zur Quantifizierung herangezogen (Abb. 59).



Abbildung 59:

Die quantitative Auswertung der Ki67 Färbung zeigte einen signifikanten Anstieg an proliferierenden Zellen in WT Mäusen unter der MCD Diät. In *Nrf2^{-/-}* Mäusen fiel dieser Anstieg jedoch deutlich geringer aus (WT: schwarz, *Nrf2^{-/-}:* weiß; n = 4; *p < 0,05). Die Ki67 Färbung zeigte zwar deutlich weniger positive Zellen, relativ gesehen entsprach das Ergebnis jedoch dem der BrdU Färbung.

Um die verringerte Proliferationsrate in den *Nrf2^{-/-}* Mäusen unter der MCD genauer zu untersuchen, wurde die Expression von Proteinen analysiert, die an der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind (Abb. 60).



Abbildung 60: Expressionsanalyse wichtiger Zellzyklus-regulierender Proteine in Leberlysaten von WT (W) und *Nrf2*^{-/-} (N) Mäusen nach 2 und 5 Wochen MCD-Behandlung (links, n = 4). Analyse der nukleären Proteinexpression von p27 und p53 nach 5wöchiger MCD-Behandlung (rechts). Die Western Blot Analyse von nukleärem p27 wurde an Einzelproben durchgeführt (n = 2).

Die Western Blot Analysen zeigten dabei einen früheren Anstieg in der Expression von Cyclin D1 – welches den Ablauf des Zellzyklus vorantreibt – in den MCD-behandelten *Nrf2*^{-/-} Mäusen. Allerdings wurde nach 5 Wochen MCD-Behandlung kein Unterschied mehr in der Cyclin D1-Expression zwischen WT und *Nrf2*^{-/-} Mäusen festgestellt. Es zeigte sich jedoch, dass der Verlust von Nrf2 zu einer Induktion von p21, einem Inhibitor cyclin-abhängiger Kinasen (CDKs, *cyclin-dependent kinases*), führte. Die Expression von p27, welches ebenfalls zu den Inhibitoren von CDKs gehört, war hingegen in beiden Genotypen induziert. Eine Analyse der nukleären Proteinexpression wies aber in den MCDbehandelten *Nrf2*^{-/-} Mäusen eine vermehrte Translokation von p27 in den Zellkern auf. Zusätzlich wurde in diesen Tieren eine stärkere nukleäre Translokation von p53 nachgewiesen, das die transkriptionelle Induktion von p21 verursacht.

4.13 Der Verlust von Nrf2 verursacht erhöhten oxidativen Stress unter MCD-Fütterung

Interessanterweise wurden bei der Quanitifkation von TBARS nur in den MCDbehandelten Mäusen Addukte aus MDA und Thiobarbitursäure nachgewiesen, wobei die Konzentration von MDA in den behandelten *Nrf2^{-/-}* Mäusen signifikant höher war als in vergleichbaren WT Mäusen. Die Behandlung mit HFD hingegen führte zu keiner Erhöhung des oxidativen Stresses (Abb. 61).



Zur Untersuchung des zellulären Detoxifkationssystems und dem Grad an mitochondrialer Schädigung wurden auch hier das Glutathion-System sowie die hepatischen ATP-Konzentrationen analysiert. Da nur in den MCD-behandelten Mäusen Anzeichen von oxidativem Stress nachweisbar waren, wurden HFDbehandelte Tiere in diesem Ansatz nicht berücksichtigt. Jedoch wurde hinsichtlich hepatischer GSH- und ATP-Konzentrationen kein Unterschied zwischen den MCD-behandelten Mäusen und den Kontrollen festgestellt (Abb. 62).



Abbildung 62: Die Bestimmung der hepatischen GSH-Konzentration (links) zeigte keine Beeinflussung der zellulären anti-oxidativen Stressantwort unter MCD-Behandlung. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen wurden auch keine reduzierten ATP-Konzentrationen (rechts) in der Leber nachgewiesen (WT: schwarz; *Nrf2*^{-/-}: weiß; n = 4).

Aus diesem Grund wurde auf eine nähere Analyse der zur Synthese von GSH essentiellen GLC-Untereinheiten verzichtet.

Stattdessen erfolgte die Untersuchung von Genen, deren Transkription durch Änderungen im Redoxpotential der Zelle reguliert wird (Abb. 63 rechts). Wie unter der Behandlung mit Ethanol kam es auch nach Fütterung der MCD-Diät zu einer massiv gesteigerten Proteinexpression von NQO1 in WT Mäusen, während der Verlust von Nrf2 die Induktion der NQO1-Proteinexpression unter MCD verhinderte. Das Expressionsmuster der HO-1 stellte sich jedoch anders als unter Ethanolbehandlung dar. Unter MCD zeigten beide Genotypen eine gesteigerte Proteinexpression, die in den *Nrf2^{-/-}* Mäusen noch stärker ausgeprägt war als in vergleichbaren WT Tieren.



Des Weiteren sind in Abbildung 63 (links) die Ergebnisse der semiquantitativen RT-PCR zur Analyse von Transportern des Phase-3-Detoxifikationssystems dargestellt. Anders als nach Ethanolbehandlung waren vor allem die Transporter Mdr2 und Mrp1 nach MCD-Behandlung deutlich stärker exprimiert. Die erhöhte Expression war jedoch nicht ausschließlich auf die WT Mäuse beschränkt. Vielmehr kam es durch den Verlust von Nrf2 zu einem früheren Anstieg in der Expression, die Stärke des Signals unterschied sich gegen Ende jedoch kaum von dem der behandelten WT Mäuse. Auch die reduzierte mRNA-Expression von Oatp1 war nicht allein auf die Nrf2-Deletion zurückzuführen. Gleichzeitig mit der Verminderung des Oatp1-Signals kam es zu einer reduzierten Transkription des Na⁺-Taurocholat Kotransporters (Ntcp, *Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide*), der – genauso wie Oatp – in der basolateralen Hepatozytenmembran lokalisiert ist und Gallensäuren aus dem Blut in die Hepatozyten transportiert.

4.14 Die durch MCD und HFD ausgelöste Steatose manifestiert sich unter der MCD Diät als Steatohepatitis

Wie bereits beschrieben, wurden in den H&E-Färbungen der *Nrf2^{-/-}* Mäuse unter MCD-Fütterung Aggregate infiltrierender Zellen beobachtet. Um zu überprüfen, ob es sich dabei um inflammatorische Zellen handelte, wurden verschiedene immunhistochemische Färbungen zur genaueren Charakterisierung der Infiltrate angefertigt. Aus den Aufnahmen in Abbildung 64 geht hervor, dass es sich in erster Linie um Makrophagen (CD68) und Neutrophile (CD11b) handelte. Des Weiteren wurden B-Zellaggregate (CD20), sowie ein geringer Anteil T-Zellen (CD3) identifiziert.



Abbildung 64: Repräsentative immunhistochemische Färbung gegen Makrophagen (CD68), Neutrophile (CD11b), B Zellen (CD20) und T-Zellen (CD3) in *Nrf2^{-/-}* Mäusen mit und ohne MCD Behandlung (200x Vergrößerung).

Auch die Analyse verschiedener pro-inflammatorischer Proteine ergab, dass es vor allem in den MCD-behandelten *Nrf2*^{-/-} Mäusen zu einer Aktivierung von STAT3 und JNK kam. Die Aktivierung erreichte ihren Höhepunkt bereits nach 2 Wochen. Des Weiteren erfolgte eine Induktion der c-Jun Expression, die ebenfalls nach 2 Wochen MCD-Behandlung am stärksten ausgeprägt war. Zusätzlich wurde anhand der p65 Untereinheit eine Translokation von NF-κB in den Zellkern der MCD-behandelten *Nrf2*^{-/-} Mäuse nachgewiesen (Abb. 65). SOCS3 (*suppressor of cytokine signaling 3*) wird durch aktiviertes STAT3 induziert und vermindert durch einen negativen Feedback-Mechanismus dessen Aktivität und Expression. Unter MCD-Fütterung führte der Verlust von Nrf2 im Vergleich zu MCD-behandelten WT Mäusen zu einer verstärkten Aktivierung von STAT3. Diese induzierte eine ebenfalls erhöhte Expression von SOCS3 in den *Nrf2*^{-/-} Mäusen. Während die STAT3-Aktivierung in WT Mäusen nach 5 Wochen MCD-

Behandlung inhibiert wurde, kam es in *Nrf2^{-/-}* Mäusen lediglich zu einer Reduktion der STAT3-Phosphorylierung.



Abbildung 65: Western Blot Analyse von Proteinen, denen eine wichtige Rolle in inflammatorischen Signalwegen zukommt (n = 4).

In Abbildung 66 sind die hepatischen mRNA-Expressionen einiger an der inflammatorischen Reaktion beteiligten Zytokine dargestellt. Dabei zeigte sich, dass es in *Nrf2*^{-/-} Mäusen vor allem zu einer verstärkten Induktion von TNF-α und des Chemokin Liganden 5 (CCL5 oder *Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted*, RANTES) kam, welches für die Rekrutierung von Gedächtnis-T-Zellen und Makrophagen verantwortlich ist.



Zur Analyse des hepatischen Fibrobierungsgrades wurden immunhistochemische Färbungen von α-SMA, welches als Marker für aktivierte HSCs eingesetzt wurde, und fibrillären Kollagenfasern (Sirius Rot), die von den Sternzellen als Folge ihrer Aktivierung produziert wurden und einen Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix darstellen, eingesetzt (Abb. 67).

In der Sirius Rot Färbung von Lebern aus Kontrolltieren lagen die kollagenhaltigen Strukturen deutlich sichtbar um die Gefäßwände verteilt vor. Außerdem waren geringe Mengen an bindegewebsartiger Struktur in allen drei Zonen erkennbar. Die α -SMA-Färbung von Lebern aus Kontrolltieren hingegen zeigten lediglich die arteriellen Gefäße.



Abbildung 67: Repräsentative Sirius Rot und α-SMA Färbungen (100x Vergrößerung).

Durch die Behandlung mit MCD nahm das Vorkommen von α-SMA und Kollagen vor allem in Zone 1 des Leberazinus zu. Die quantitative Auswertung der Sirius Rot Färbung zeigte zudem, dass es in den *Nrf2^{-/-}* Mäusen unter MCD-Behandlung zu einer signifikant stärker ausgeprägten Kollagenbildung kam als in vergleichbaren WT Mäusen (Abb. 68).



Die Ergebnisse der Färbungen wurden anhand von mRNA-Analysen mittels qPCR bestätigt. Durch den Verlust von Nrf2 kam es in nahezu allen untersuchten Genen zu einer stärkeren Induktion (Abb. 69).



Abbildung 69:

Transkriptionelle Untersuchung von relevanten Genen für die Regulation der Fibrose (WT: schwarz; *Nrf*2^{-/-}: weiß; n = 4; *p < 0,05). Erwartungsgemäß zeigte die Analyse des hepatozellulären Hydroxyprolins, welches der Stabilisierung der Kollagen-Triplehelix dient, ebenfalls einen Konzentrationsanstieg unter der MCD, der in den Nrf2 Mäusen signifikant höher ausfiel als in den WT Mäusen (Abb. 70).





Nur unter der MCD Diät kam es zu einem Anstieg in der Hydroxyprolin-Konzentration (WT: schwarz; $Nrf2^{-/-}$: weiß; n = 8; *p<0,05, ***p<0,001).

Während Nrf2 in der Literatur vorwiegend als wichtiger Transkriptionsfaktor in Bezug auf seine zytoprotektiven Fähigkeiten diskutiert wird, befasste sich die vorliegenden Arbeit mit der Beobachtung, dass der Verlust von Nrf2 bereits unter normalen Bedingungen zu phänotypischen und metabolischen Veränderungen führte. Obwohl der Energieumsatz von WT und Nrf2^{-/-} Mäusen nahezu identisch war, unterschieden sich die Nrf2^{-/-} Mäuse in Größe und Gewicht von gleichaltrigen WT Mäusen. Vor allem die Lebern waren durch den Verlust von Nrf2 signifikant kleiner und leichter. Die histo-morphologische Untersuchung der Lebern zeigte zunächst keine Auffälligkeiten. Die Analyse der hepatischen Lipidzusammensetzung offenbarte allerdings eine spezifische und hoch signifikante Reduktion im hepatischen Triglycerid-Gehalt der Nrf2^{-/-} Mäuse. Eine detaillierte Untersuchung der für die Lipidsynthese essentiellen Fettsäuren bestätigte, dass die verringerte Triglycerid-Konzentration eine Folge signifikant niedrigerer Konzentrationen der C16-Fettsäuren darstellte. Zudem entwickelten die Nrf2^{-/-} Mäuse eine Neigung zur Insulinresistenz. Die damit einhergehend reduzierte Lipogenese stellte eine weitere Ursache für die verringerten hepatischen Triglycerid-Konzentrationen dar. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass Nrf2 nicht nur in der Regulation von Detoxifikationsenzymen von entscheidender Bedeutung ist, sondern auch direkten Einfluss auf metabolische Vorgänge hat.

Um zu untersuchen, ob Nrf2 neben seiner Fähigkeit zur Regulation antioxidativer Enzyme ebenfalls eine wichtige Rolle im Glukose- und Fettsäurestoffwechsel – und damit eventuell auch im Insulinsignalweg – spielt, wurden die Tiere im Zustand eines metabolisch gestörten Lipidstoffwechsels untersucht. Um diesen Zustand zu simulieren, wurden die Tiere einerseits mit einer ethanolhaltigen Flüssignahrung gefüttert, die eine ASH auslösen sollte. Andererseits erhielten die Tiere zwei etablierte Diäten – MCD und HFD – zur Simulation einer NASH.

5.1 Die Akkumulation von Acetaldehyd bewirkt eine gesteigerte Mortalität in Nrf2^{-/-} Mäusen als Folge einer verstärkten Induktion von SREBP-1

In der alkoholischen Steatohepatitis war der Verlust von Nrf2 mit einer rapiden Progression im Krankheitsverlauf assoziiert. Dabei war der signifikante Anstieg der Mortalität in Ethanol-behandelten *Nrf2*^{-/-} Mäusen zum einen mit einer aus-

geprägten makrovesikulären Lipidakkumulation in der Leber und zum anderen mit einer massiven Zunahme der systemischen ALT-Konzentration verbunden. Dass die Ethanolbehandlung in den *Nrf2^{-/-}* Mäusen zu einer ausgeprägten Leberschädigung führte, wurde durch die signifikante Zunahme apoptotischer Zellen unterstrichen. Aus der vermehrten Anzahl proliferierender Zellen in den Lebern Ethanol-behandelter *Nrf2^{-/-}* Mäuse ging hervor, dass die Leberregeneration nicht durch den Verlust von Nrf2 beeinträchtigt wurde. Jedoch war das Ausmaß der Regeneration nicht ausreichend, um den entstandenen Schaden durch die Ethanolbehandlung zu kompensieren.

Eine genauere Analyse des Alkoholstoffwechsels in den Versuchstieren ließ erkennen, dass der Verlust von Nrf2 die Expression von Genen, welche an der metabolischen Oxidation von Ethanol zu Acetaldehyd beteiligt sind, nicht signifikant beeinträchtigte. Ebenfalls zeigte sich das mikrosomale Ethanoloxidierende System (MEOS) nicht von der Nrf2-Deletion beeinflusst. Die Ethanolbehandlung führte zwar erwartungsgemäß zur Induktion des alternativen Stoffwechselweges - was sich in einer verstärkten Proteinexpression von CYP2E1 widerspiegelte - allerdings waren keine Unterschiede zwischen WT und Nrf2^{-/-} Mäusen vorhanden. In Bezug auf die hepatischen Acetaldehyddetoxifizierenden Enzyme ALDH1 und ALDH2 zeigten die Ethanol-behandelten Nrf2^{-/-} Mäuse hingegen eine signifikant reduzierte Genexpression. Die entsprechend reduzierte Enzymaktivität führte nach direkter Zufuhr großer Ethanolmengen zu signifikant erhöhten Acetaldehyd-Konzentrationen in den Lebern von Nrf2^{-/-} Mäusen. Da Acetaldehyd als hoch reaktives Molekül ein toxisches Intermediat des Ethanolmetabolismus darstellt, trug dessen Anreicherung in hohem Maß zu einer raschen Manifestation der Leberschädigung bei, welche mit einer erhöhten Mortalität einherging.

Eine der frühesten Veränderungen bei übermäßigem Alkoholkonsum ist die Entstehung einer Lebersteatose. Diese Entwicklung wurde sowohl im Mausmodell als auch im Menschen eindrücklich gezeigt [134]. Die beschleunigte hepatische Akkumulation von Lipiden in *Nrf2^{-/-}* Mäusen spiegelte sich ebenfalls im Genexpressionsprofil hinsichtlich der hepatischen Lipid-Homöostase wider. Durch mRNA-Microarrays und deren *in silico* Analysen konnte SREBP-1 mit einer hohen Wahrscheinlichkeit als entscheidender Faktor für die frühzeitigen Veränderungen in *Nrf2^{-/-}* Mäusen identifiziert werden. Diese Erkenntnis wurde durch Proteinanalysen bestätigt, in denen bei Ethanol-behandelten *Nrf2^{-/-}* Mäusen eine verstärkte Zunahme von SREBP-1 nachgewiesen wurde.

Die Familie der SREBPs gehört zu den Helix-Loop-Helix Transkriptionsfaktoren mit Leucin-Zipper-Motif und reguliert Enzyme, die für die Synthese von endogenem Cholesterin, Fettsäuren, Triglyceriden und Phospholipiden in der Leber verantwortlich sind. Dabei spielt SREBP-1 vor allem in der Fettsäuresynthese und dem Insulin-abhängigen Glukosemetabolismus eine entscheidende Rolle [135]. Frühere Studien haben gezeigt, dass die Überexpression von SREBP-1 in Mäusen zur Entstehung einer massiven Leberverfettung führt [136]. Im Gegensatz dazu sind SREBP-1 Knockout Mäuse teilweise vor einem Ethanolinduzierten Leberschaden geschützt [137,138]. In WT Mäusen wiederum führt eine 4wöchige Ethanolbehandlung zu einem Anstieg der SREBP-1-Konzentration [139]. Ergebnisse aus *in vitro* Studien deckten auf, dass dieser Effekt durch Acetaldehyd vermittelt wird [134].

Als Folge der Aktivierung von SREBP-1 werden sowohl bei akutem als auch chronischem Alkoholkonsum SREBP-1-Zielgene induziert. Dazu zählen unter anderem die Acetyl-CoA Carboxylase (ACC), die Fettsäure Synthase (FAS) und die Stearyl-CoA Desaturase (SCD1), die ebenfalls alle an der de novo Fettsäuresynthese beteiligt sind [127,140]. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression und Aktivierung von ACC als exemplarisches Zielgen von SREBP-1 untersucht. Während die Expression in den WT Mäusen im gesamten Versuchsverlauf unverändert blieb, wurde in Nrf2^{-/-} Mäusen unter Kontrollbedingungen eine erhöhte Phosphorylierung - und damit Inaktivierung von ACC nachgewiesen. Die damit verbundene Hemmung der Lipogenese bestätigte die initialen Beobachtungen. Unter der Ethanolbehandlung kam es durch den Verlust von Nrf2 sowohl relativ zum Basalwert als auch im Vergleich zu den Ethanol-behandelten WT Mäusen zu einer verstärkten Aktivierung von ACC. Die damit einhergehende Steigerung der Lipogenese ist eine mögliche Erklärung für die beschleunigte Progression der Lebersteatose in den Ethanolbehandelten Nrf2^{-/-} Mäusen.

Die Aktivierung von SREBP-1 erfolgt durch AMPK [141]. AMPK ist hauptsächlich für die metabolische Regulation des zellulären Energiehaushalts verantwortlich. Es reagiert sensitiv auf das Verhältnis von AMP zu ATP und kann so simultane Abläufe ATP-aufwendiger und ATP-liefernder Prozesse verhindern Die Aktivierung von AMPK fördert energieliefernde Prozesse, wie die Glykolyse oder die β-Oxidation, wohingegen die Inhibition von AMPK energiespeichernde Prozesse, wie die Protein-, Fettsäure- und Cholesterinsynthese, induziert. Dabei reguliert AMPK die Lipidsynthese einerseits direkt über die Induktion von SREBP-1 und andererseits über die Inhibition von ACC. Außerdem aktiviert AMPK die Malonyl-CoA Decarboxylase, welche – ebenso wie die Inhibition von ACC – zu verringerten Mengen von Malonyl-CoA führt. Malonyl-CoA stellt einem wichtigen Grundbaustein für die Fettsäuresynthese dar. Zusätzlich inhibiert es CPT1, einem für die β-Oxidation essentiellen mitochondrialen Transportprotein [142]. In Studien mit Ethanol-behandelten Ratten konnte eine Reduktion in der AMPK-Aktivität nachgewiesen werden, die entsprechend mit einer erhöhten Aktivität von ACC, sowie vermehrtem Malonyl-CoA und einer verringerten

CPT1-Aktivität verbunden war [127,143]. Durch die Behandlung Ethanolgefütterter Mäuse mit Metformin, einem AMPK-Aktivator, wurde zum einen der Grad der ACC-Phosphorylierung wieder auf das Niveau der Kontrolltiere angehoben. Zum anderen blockierte die Behandlung mit Metformin die Ethanolinduzierte Aktivierung von SREBP-1 [127].

In der vorliegenden Arbeit konnte die Aktivierung von AMPK nach Metformin-Behandlung in primären murinen Hepatozyten bestätigt werden. Der Nachweis einer Inaktivierung von AMPK gestaltete sich aufgrund der bereits in den unbehandelten Kontrolltieren niedrigen Signalintensitäten allerdings als nicht möglich. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die Regulation von SREBP-1 unabhängig von AMPK ablief. Eine *in vitro* Studie legt die Vermutung nahe, dass die Aktivierung von SREBP-1 direkt durch Acetaldehyd vermittelt wird. Während in ADH-defizienten Hepatoma-Zellen keine erhöhten SREBP-1 Konzentrationen nachweisbar waren, verstärkte sich die SREBP-1 Expression deutlich nach Inhibition von ALDH in normalen Hepatoma-Zellen [144]. Daher könnte die reduzierte Kapazität der *Nrf2*^{-/-} Mäuse in Bezug auf die Detoxifikation von Acetaldehyd im direkten Zusammenhang mit einer stärkeren Aktivierung von SREBP-1 – und damit auch mit der beschleunigten Entstehung einer Lebersteatose – stehen.

5.2 Die erhöhte mitochondriale Schädigung in Nrf2^{-/-} Mäusen sensibilisiert die Zellen für weiteren Schaden

Die Pathogenese der ALD wird stets in Zusammenhang mit oxidativem Stress gebracht. Zwar führte der Verlust von Nrf2 nicht zu einer erhöhten Schädigung von Proteinen und DNA durch oxidativen Stress, jedoch wiesen die Ethanolbehandelten Nrf2^{-/-} Mäuse einen progressiven Verlust von anti-oxidativem GSH auf. Eine vergleichbare Beobachtung wurde in Acetaminophen-behandelten Nrf2^{-/-} Mäusen gemacht, bei denen die erhöhte Mortalität durch verminderte Konzentrationen von Glutathion bedingt war [130]. Die essentielle Bedeutung der GSH-Homöostase in der ALD wird weiterhin durch die Beobachtung unterstrichen, dass die Stimulation der GSH-Neusynthese vor chronischen Alkoholschäden schützt [145]. Durch die exogene Zufuhr des GSH-Bausteins Cystein in Form von NAC - sollte die Synthese von GSH gefördert und damit die Ethanol-bedingte Leberschädigung in den Nrf2^{-/-} Mäusen gemindert werden. Trotz gesteigerter Verfügbarkeit von Cystein trat die Steatose in Ethanol-behandelten Nrf2^{-/-} Mäusen dennoch unverändert auf. Der Grund dafür war eine Reduktion von GCLC, der für die Synthese von GSH essentiellen katalytischen Untereinheit von GLC, dessen Expression Nrf2-abhängig reguliert wird [146]. Obwohl

die Deletion von Nrf2 nicht zu einem vollständigen Verlust von GCLC führte, war die noch vorhandene Menge nicht ausreichend für eine effektive Steigerung der GSH-Synthese.

Lluis et al. (2003) zeigten zudem, dass Acetaldehyd den Transport von Glutathion in die Mitochondrien beeinträchtigt, was eine Reduktion in der mitochondrialen GSH-Konzentration zur Folge hat [129]. In Übereinstimmung damit wiesen die Ethanol-behandelten *Nrf2*^{-/-} Mäuse aufgrund der hepatozellulären Akkumulation von Acetaldehyd signifikant niedrigere Mengen an mitochondrialem GSH auf. Dies war zudem mit einer deutlich ausgeprägten, strukturellen und funktionellen Veränderung der Mitochondrien verbunden. Die mitochondriale Schädigung zeigte sich vor allem in den drastisch reduzierten ATP-Konzentrationen in den Lebern Ethanol-behandelter *Nrf2*^{-/-} Mäuse. Eine Studie an isolierten Mitochondrien aus der Ratte durch Farfán Labonne et al. bestätigte, dass es durch die Behandlung mit Acetaldehyd zu Veränderungen im Redoxstatus kam. Dies verursachte eine drastische Verschlechterung in der mitochondrialen Atmungskette sowie verringerte ATP-Konzentrationen. Des Weiteren führte die Vorbehandlung von Hepatozyten mit Acetaldehyd zu einer deutlichen Abnahme der Zellviabilität nach Antimycin A Behandlung [147].

Des Weiteren beeinträchtigte der Verlust von Nrf2 eine Reihe von Enzymen, die ebenfalls am Glutathion-System beteiligt sind. Besonders auffällig waren in diesem Zusammenhang die gegenüber WT Mäusen fehlende Induktion von GPx, Gst3 und Mrp3, sowie der vollständige Verlust von Oatp1 in *Nrf2*^{-/-} Mäusen unter Ethanolbehandlung. Die Dysregulation dieser Enzyme verursachte insgesamt eine deutliche Störung des anti-oxidativen Schutzsystems der Leber und untermauert damit die essentielle Bedeutung von Nrf2 sowohl für die Regulation des Phase-2-Metabolismus als auch der Phase-3-Transporter.

5.3 Nrf2 spielt eine entscheidende Rolle in der Regulation der angeborenen Immunantwort in der ALD

Die Entstehung der Steatose sensibilisiert die Leber für nachfolgende Pathomechanismen, die eine Progression der ALD zur entzündlichen NASH begünstigen. Entsprechend des derzeit akzeptierten Modells zur Inflammation in der alkoholischen Leberschädigung führt chronischer Alkoholkonsum zu erhöhten Konzentrationen an zirkulierenden Lipopolysacchariden (LPS) [148]. Diese wiederum induzieren über TLR4 (*Toll-like rezeptor 4*), der neben CD14, MD-2 und LBP (*LPS binding protein*) einen Hauptbestandteil des LPS Rezeptors darstellt, die Aktivierung hepatischer Kupfferzellen [149,150]. Durch eine andere Studie wurde die essentielle Bedeutung der TLR4-vermittelten Signaltransduktion in der chronischen Ethanolbehandlung bestätigt [151]. Als Antwort auf die TLR4vermittelte Stimulation produziert die NADPH-Oxidase vermehrt ROS. Zusätzlich wird in den Makrophagen eine Aktivierung verschiedener MAP-Kinasen mit anschließender Ausschüttung von TNF- α und anderen pro-inflammatorischen Zytokinen induziert [152,153]. Es zeigte sich, dass Ethanol – und Acetaldehyd im Speziellen – die Anfälligkeit von Hepatozyten für toxische Effekte erhöht. Dabei führt die Ethanol-bedingte Reduktion der mitochondrialen GSH-Konzentration zu einer erhöhten Permeabilität der hepatozellulären Mitochondrienmembran, welche die Zytotoxizität von TNF- α potenziert [154,155].

In der hier vorliegenden Arbeit löste die Behandlung mit Ethanol vor allem in den *Nrf2*^{-/-} Mäusen eine schwere inflammatorische Reaktion mit primärer Beteiligung von Makrophagen aus. Mittels Microarray-Analyse wurde bereits 3 Tage nach Behandlungsbeginn c-Jun als differentiell regulierter Faktor identifiziert. Die Regulation von c-Jun als Teil des AP-1 Transkriptionsfaktors verläuft über pro-inflammatorische Zytokine, oxidativen Stress, Wachstumsfaktoren und Endotoxin und stellt eine der wichtigsten MAPK Signalkaskaden im Zusammenhang mit Zellproliferation und –tod dar [156]. In der ALD werden über c-Jun verschiedene Gene reguliert, die am inflammatorischen Prozess beteiligt sind [157,158].

Im weiteren Krankheitsverlauf wurde in den Ethanol-behandelten *Nrf2^{-/-}* Mäusen ein signifikant stärkerer Anstieg in den Konzentrationen von zirkulierendem TNF-α und IL-6 beobachtet. Interessanterweise korrelierte dabei das Auftreten der hohen Zytokinkonzentrationen mit dem Zeitpunkt, an dem die *Nrf2^{-/-}* Mäuse bereits schwer krank waren. Dieser Zusammenhang legt die Vermutung nahe, dass eine durch Makrophagen vermittelte überschießende Immunantwort mit erhöhter Zytokinproduktion mit der hohen Mortalität der Ethanol-behandelten *Nrf2^{-/-}* Mäuse in Verbindung steht. Zum gleichen Zeitpunkt kam es in den *Nrf2^{-/-}* Mäusen zu einer starken Aktivierung von STAT3, die in den Ethanolbehandelten WT Mäusen hingegen nur sehr schwach ausfiel.

Aufgrund des massiven Anstiegs des zirkulierenden IL-6 in den *Nrf2^{-/-}* Mäusen wäre zunächst eine klassische STAT-Aktivierung durch IL-6 zu vermuten [159]. Es wurde jedoch gezeigt, dass akuter Alkoholkonsum zu einer LPS-induzierten Src-abhängigen STAT3-Aktivierung führt, welche die Regulation der IL-10 Produktion in Monozyten beeinflusst [160]. Zusätzlich wird die IL-6-vermittelte STAT3-Aktivierung durch akute Alkoholbehandlung in Monozyten blockiert. Darüber hinaus konnte eine gesteigerte Expression des inhibitorischen Moleküls SOCS3 beobachtet werden, die zusätzlich zur verringerten Aktivierung von STAT3 führte [161]. Auch in Patienten mit einer ASH im zirrhotischen Stadium wurde eine reduzierte STAT3-Aktivierung nachgewiesen [162]. In Studien an Ethanol-behandelten Mäusen mit einer spezifischen STAT3-Deletion in Hepatozyten wurde nachgewiesen, dass diese Tiere trotz geringerer Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine anfälliger für eine alkoholinduzierte Fettleber waren. Mäuse mit einem Makrophagen-spezifischen STAT3-Kockout hingegen zeigten sowohl eine stärkere Leberschädigung als auch eine gesteigerte hepatische Inflammation mit vermehrter Expression proinflammatorischer Zytokine [163]. Demnach reguliert STAT3 während der alkoholischen Leberschädigung die hepatische Inflammation in einer Zelltypabhängigen Weise. Während hepatozelluläres STAT3 inflammatorische Prozesse fördert, werden diese in Makrophagen durch STAT3 unterdrückt.

Um die Rolle von LPS in der ALD weiter zu analysieren, wurde sowohl Ethanolbehandelten als auch unbehandelten WT und Nrf2^{-/-} Mäusen LPS injiziert. Dabei wurde gezeigt, dass eine einzige Bolusinjektion LPS bei Ethanolbehandelten Nrf2^{-/-} Mäusen eine deutlich stärkere Leberschädigung verursacht als bei WT Tieren. Dennoch war der Anstieg in der ALT-Konzentration nach LPS-Gabe in beiden Genotypen wider Erwarten gering. Interessanterweise führte die LPS-Behandlung von Nrf2^{-/-} Mäusen, die zuvor 4 Tage mit Ethanol gefüttert wurden und bis zu dem Zeitpunkt noch keine Anzeichen einer ASH zeigten, zu einer vergleichbaren Aktivierung von STAT3 und einer entsprechenden Erhöhung in der Expression von c-Jun wie in den moribunden Nrf2^{-/-} Mäusen. Diese Beobachtungen stimmen mit den bisher veröffentlichten Beobachtungen überein, dass der Verlust von Nrf2 zu einem dramatischen Anstieg in der Mortalität von Mäusen mit Endotoxin-vermitteltem septischen Schock führt [36]. Demnach löst LPS in Nrf2^{-/-} Mäusen eine stärkere pulmonale Inflammation aus als in WT Mäusen. Der direkte Zusammenhang zwischen Nrf2 und der Aktivierung von Makrophagen wurde weiterhin durch die Beobachtung gestärkt, dass LPS in peritonealen Makrophagen aus Nrf2^{-/-} Mäusen eine stärkere Aktivierung von NF-κB mit vermehrter Sekretion von TNF-α auslöst [164].

In Bezug auf die Aktivierung der MAPK Familie zeigte die Behandlung mit LPS ebenfalls eindeutige Unterschiede im Phosphorylierungsgrad von ERK1/2. Während in den *Nrf2*^{-/-} Mäusen erstaunlicherweise keine Phosphorylierung von ERK1/2 zu beobachten war, zeigten die WT Mäuse bereits 1,5 h nach LPS-Injektion eine deutliche Aktivierung. Mehrere Studien belegen, dass ERK je nach Dauer der Ethanolbehandlung differentiell reguliert wird. Während chronischer Alkoholkonsum in murinen Makrophagen zu einer LPS-induzierten ERK1/2-Aktivierung mit anschließender Expression von EGR-1 (*early growth response receptor 1*) und TNF- α führte [165], zeigte sich in *in vitro* Experimenten an Ethanol-stimulierten Monozyten ein Abfall in der LPS-induzierten ERK1/2-Phosphorylierung [166].

5.4 Die Regulation der Lipid-Homöostase unterliegt einem Nrf2-abhängigen Mechanismus

In Übereinstimmung mit der Literatur [167] führte die MCD-Behandlung zu einem fortschreitenden Verlust des Körpergewichts. Damit verbunden war außerdem eine Abnahme des Lebergewichts. Zugleich reduzierte sich das viszerale Fettgewebe in den Mäusen auf ein Minimum. Währenddessen wurde durch die Behandlung mit HFD eine drastische Gewichtszunahme erreicht. In den ersten Wochen stiegen Körper- und Lebergewicht kontinuierlich an, wobei die Leber im Verhältnis zum gesamten Körpergewicht eine zusätzliche Gewichtszunahme erfuhr. Ebenso stieg der Gehalt des viszeralen Fettgewebes in diesem Zeitraum signifikant an. Die Entstehung der Steatose zeigte sich erwartungsgemäß durch eine zunehmende Akkumulation von Triglyceriden in der Leber. Dabei führte die durch HFD-Behandlung erhöhte exogene Zufuhr von Fettsäuren zu einer deutlich stärkeren Lipidakkumulation als unter MCD.

Der Verlust von Nrf2 wirkte sich in Abhängigkeit von der verwendeten Diät unterschiedlich auf die Krankheitsentwicklung aus. Während die Entwicklung der Steatose unter der MCD Nrf2-unabhängig verlief, verlangsamte sich der Krankheitsverlauf in den Nrf2^{-/-} Mäusen unter der HFD signifikant. Diese betraf nicht nur das gesamte Körpergewicht, sondern machte sich auch in einem geringeren hepatischen und viszeralen Fettgehalt bemerkbar. Im Verlauf der HFD-Fütterung glichen sich die Nrf2^{-/-} Mäuse sowohl in Bezug auf ihr Körpergewicht als auch auf das Gewicht des viszeralen Fettgewebes wieder den WT Mäusen an. Allerdings blieben die Unterschiede in den Lebergewichten erhalten. Da das Verhältnis zwischen den Lebergewichten von WT und Nrf2^{-/-} Mäusen im Behandlungsverlauf beider Diäten nahezu unverändert blieb, konnten die generell geringeren Lebergewichte der Nrf2^{-/-} Mäuse auf die Deletion von Nrf2 zurückgeführt werden. Eine mögliche Ursache für die Verringerung des Lebergewichtes in Nrf2-defizienten Tieren stellt die verminderte hepatozelluläre Proliferation dar. Während es unter dem Einfluss der MCD Diät in beiden Genotypen zu einer Induktion von Cyclin D1 kam, wurde lediglich in den Nrf2^{-/-} Mäusen eine Induktion des Cyclin-Inhibitors p21 bei gleichzeitiger nukleärer Akkumulation der Zellzyklus-inhibierenden Faktoren p53 und p27 nachgewiesen. Als Resultat zeigte sich eine verminderte Proliferation der Hepatozyten Nrf2-defizienter Mäuse.

Die unter chronischer HFD-Behandlung verlangsamte Zunahme an viszeralem Fettgewebe sowie die deutlich geringeren Konzentrationen an hepatischen Triglyceriden in den *Nrf2*^{-/-} Mäusen deuteten des Weiteren darauf hin, dass Nrf2 in die Entstehung der Lebersteatose involviert ist. Dabei scheint die Dauer der HFD-Behandlung von entscheidender Bedeutung zu sein. Studien haben gezeigt, dass eine relativ kurze Exposition mit einer hochkalorischen Diät (4 Wo-

chen) zur Inhibition von Nrf2 in WT Mäusen führt, während es bei längeren Fütterungsperioden (12 Wochen) zu einer Induktion von Nrf2 und dessen Zielgenen kommt [168,169]. Ein möglicher Grund für die unterschiedlichen Beobachtungen ist die adaptive Antwort auf oxidativen Stress als Folge der fortschreitenden Fettakkumulation in den WT Mäusen. Die Unterschiede könnten allerdings auch auf den unterschiedlich zusammengesetzten Diäten basieren. Wie bereits in anderen Arbeiten gezeigt wurde, ist die Zusammensetzung der akkumulierenden Triglyceride in der Leber abhängig von der Beschaffenheit der Diät. Dabei führt die Behandlung mit MCD oder HFD neben dem Anstieg im hepatischen Triglyceringehalt zu einer zusätzlichen Akkumulation freier Fettsäuren in der Leber [170]. Die beiden häufigsten Fettsäuren in den kommerziell erhältlichen HFD Diäten sind zum einen die gesättigte Palmitinsäure und zum anderen die einfach ungesättigte Ölsäure. Die Auswirkungen von gesättigten Fettsäuren (saturated fatty acids, SFAs) und einfach ungesättigten Fettsäuren (monounsaturated fatty acids, MUFAs) auf den Organismus sind allerdings sehr unterschiedlich. Das Verhältnis aus SFAs und MUFAs – der sogenannte Desaturations-Index – ist maßgeblich dafür verantwortlich, ob eine Adaption der Leber an die Überladung mit Fettsäuren erfolgt oder ob es zu einer Schädigung der Leber kommt. Da nur MUFAs in Triglyceride eingebaut und so in der Leber gespeichert werden können, führen erhöhte Konzentrationen an SFAs zu einer vermehrten Leberschädigung und der Progression der Steatose hin zur Steatohepatitis. Im Zusammenhang mit den in HFD am häufigsten vorkommenden Fettsäuren zeigte eine in vitro Studie, dass die Zufuhr von Oleat im Vergleich zu Palmitat in Hepatozyten eine verstärkte Steatose ohne Auswirkungen auf die Zellviabilität verursachte. Die mit Palmitat behandelten Hepatozyten hingegen zeigten eine deutlich niedrigere Viabilität, erhöhte Caspase-Aktivitäten sowie eine ausgeprägte Insulinresistenz bei geringerer Lipidakkumulation [171,172]. Zusätzlich offenbarte eine Analyse zur Zusammensetzung der freien Fettsäuren in MCD und HFD, dass in steatotischen Lebern unter HFD mehr MUFAs nachweisbar waren, während in fibrotischen Lebern unter MCD mehr SFAs akkumulierten [170].

SCD-1 katalysiert die Umwandlung der gesättigten Fettsäuren Palmitat und Stearat in die jeweiligen einfach ungesättigten Derivate Palmitoleat und Oleat [173]. In einer Vielzahl aktueller Studien wurde SCD-1 in Zusammenhang mit der Lipotoxizität sowie der damit verbundenen Progression der Steatohepatitis gebracht. Es wurde gezeigt, dass eine Aktivierung von SCD-1 apoptotische und inflammatorischer Prozesse inhibiert [170,174]. Außerdem ist eine reduzierte Expression von SCD-1 ausschlaggebend für die Verschiebung im Desaturations-Index nach MCD-Behandlung [167]. Der Abfall im Desaturations-Index führt dabei zu einer erhöhten apoptotischen Leberschädigung in MCD-behandelten SCD-1-Knockout Mäusen, obwohl die Tiere im Vergleich zu WT Tieren eine

reduzierte Akkumulation von Triglyceriden in der Leber aufweisen. Durch Gabe einer Oleat-reichen MCD Diät kann die Desaturation durch SCD-1 umgangen und so die MCD-induzierte Lipotoxizität vermindert werden [170]. SCD-1 wird zudem mit der Entstehung von Fettleibigkeit und Insulinresistenz in Zusammenhang gebracht [175]. So führt die Inhibition von SCD-1 durch Antisense-Oligonukleotide zu einer Resistenz gegenüber HFD-induzierter Fettleibigkeit in Mäusen [176]. Diese beruht auf einer verminderten Fähigkeit zum Einbau neu synthetisierter Fettsäuren in Triglyceride [177]. Zusätzlich zeigten SCD-1defiziente Mäuse eine gesteigerte β -Oxidation, die mit einem erhöhten Energieverbrauch einher ging [178].

Während der Verlust von Nrf2 unter MCD weder Einfluss auf die SCD-1 Expression noch auf den Desaturations-Index hatte, stieg der Index unter der HFD deutlich an. Die HFD-bedingt erhöhte exogene Zufuhr von Fettsäuren führte dabei zu einer vermehrten Aufnahme freier Fettsäuren in die Leber, welche wiederum eine verstärkte Umwandlung durch SCD-1 in einfach ungesättigte Fettsäuren auslöste. Der tendenziell geringere Anstieg im Desaturations-Index der *Nrf2*^{-/-} Mäuse liefert eine weitere Erklärung für die verlangsamte Lipidakkumulation unter der HFD. Demnach resultiert die erniedrigte Konzentration der für die Lipogenese essentiellen, einfach ungesättigten Fettsäuren in einer reduzierten Triglycerid-Synthese.

Die Analyse der regulierenden Enzyme des Fettsäure-Metabolismus deutet ebenfalls darauf hin, dass die Auswirkung der Nrf2-Deletion abhängig ist von der Wirkungsweise der jeweiligen Diät. Unter dem massiven exogenen Energieüberschuss der HFD unterband Nrf2 die Aktivierung von AMPK und fördert damit Energie-speichernde Prozesse, vor allem die Fettsäure-Synthese. Durch den Verlust von Nrf2 stieg die Phosphorylierung von AMPK massiv an, was in einer gesteigerten Inaktivierung von ACC resultierte. Der damit verbundene An-der Nrf2^{-/-} Mäuse zur Folge. Neben der kurzfristigen Regulation der ACC-Aktivität beeinflusst Nrf2 auch langfristig die transkriptionelle Expression. Während der Verlust von Nrf2 bei Energieüberschuss eine Steigerung in der ACC-Expression verursacht, führt die Inhibition der hepatischen VLDL-Sekretion unter MCD zu einer energetisch restringenten Situation und damit zu einer vollständigen Depletion der ACC-Expression. Diese Beobachtungen stimmen mit einer anderen Studie überein, in der die ACC-Expression bereits nach 4wöchiger HFD-Behandlung in Nrf2^{-/-} Mäusen anstieg [168]. Demnach ist die Dysregulation der hepatischen Lipidhomöostase durch den Verlust eines Nrf2abhängigen, negativen Regulationsmechanismus bedingt. Da beide von der Nrf2-Defizienz betroffenen Prozesse – sowohl die Aktivierung von AMPK als auch die transkriptionelle Regulation von ACC – Insulin-abhängig reguliert werden und der Verlust von Nrf2 bereits ohne Behandlung zu einer Insulinresistenz führte, liegt die Vermutung nahe, dass die Nrf2-bedingte Dysregulation der Lipid-Homöostase durch Insulin vermittelt wurde.

Die Untersuchung der Glukose-Homöostase ergab, dass sich unter der MCD unabhängig von Nrf2 eine Hypoglykämie entwickelte, die zusätzlich mit einer erhöhten Insulinsensitivität verbunden war. Hingegen zeigten die WT Mäuse bereits 10 Wochen nach Beginn der HFD-Fütterung erste Anzeichen einer Insulinresistenz. Zunächst fiel der Glukosegehalt im Blutserum von gefasteten WT Mäusen weniger deutlich ab als in unbehandelten WT Mäusen. Später wurde auch im ungefasteten Zustand der HFD-gefütterten WT Mäuse eine tendenziell höhere Glukosekonzentration im Blutserum gemessen. Der Verlust von Nrf2 ließ diese Entwicklung weniger stark ausfallen. Allerdings wiesen beide Genotypen im gleichen Umfang eine gestörte Glukosetoleranz auf. Die basal zu beobachtenden Unterschiede zwischen WT und *Nrf2*^{-/-} Mäusen in Bezug auf die Insulinsensitivität wurden durch die Behandlungen vollständig überlagert. Diese Beobachtung zeigt, dass die gewählten Modelle aufgrund der tiefgreifenden Veränderungen im Stoffwechsel der Tiere leider nur eingeschränkt für metabolische Untersuchungen der Nrf2-Deletion geeignet sind.

Einen Hinweis darauf, dass Nrf2 nicht nur an der Regulation der Glukose- sondern auch der Lipid-Homöostase beteiligt ist, bietet die verminderte Expression der PPARs in MCD-behandelten Nrf2^{-/-} Mäusen. Es wurde gezeigt, dass sowohl PPARα als auch PPARy an der Regulation der hepatischen Triglycerid- und Glukose-Homöostase beteiligt sind [179-181]. Eine Reihe von PPARy Polymorphismen wurden mit dem metabolischen Syndrom - insbesondere mit Fettleibigkeit, Insulinresistenz und Bluthochdruck - in Zusammenhang gebracht. Dabei fiel auf, dass dominant-negative Mutationen in PPARy zu einer schweren Insulinresistenz führen [182]. Auch Arbeiten an PPARy-Knockout Mäusen deuten auf eine essentielle Rolle in der Regulation der Insulinsensitivität sowohl in Fett- als auch in Leber- und Muskelgewebe hin [183,184]. Einige Studien konnten zudem eine Verbindung zwischen inflammatorischen Mediatoren (z.B. TNF- α und IL-6) und der PPARy-vermittelten Insulinsensitivität herstellen [185]. So wurde gezeigt, dass Aktivatoren von PPARy diverse inflammatorische Reaktionen inhibieren können [186]. TNF- α ist in der Lage, durch Phosphorylierung des Insulin Rezeptor Substrates-1 (IRS-1) eine Insulinresistenz auslösen [187]. Diese kann durch PPARy-Aktivatoren blockiert und so die TNF- α -induzierte Inhibition des Insulin-Signalweges aufgehoben werden [188]. Zudem zeigte eine Studie an Acetyl-CoA-Oxidase (ACOX)-defizienten Mäusen, dass diese in Abwesenheit von PPARa vor der ansonsten spontan auftretenden Entstehung einer NASH geschützt sind [189]. Die reduzierte Transkription der PPARs steht demnach möglicherweise mit dem Verlust von Nrf2 und der damit verbundenen Insulinresistenz in *Nrf2^{-/-}* Mäusen in Zusammenhang.

5.5 Die Progression zur NASH wird durch den Verlust von Nrf2 beschleunigt

Die dauerhafte Belastung durch die erhöhte Akkumulation freier Fettsäuren führt zu einer verstärkten Entstehung von ROS und somit oxidativem Stress. Als Folge kommt es in erster Linie zur Lipidperoxidation und Schädigung von Zellorganellen, vor allem der Mitochondrien. Reaktive Sauerstoffspezies führen außerdem zu einer vermehrten Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine und der Aktivierung des NF-kB-Signalweges. Durch die anschließende Immunantwort werden hepatische Sternzellen aktiviert, die zur Entstehung einer Leberfibrose beitragen.

Während unter der HFD eine Progression in der Pathogenese der NASH ausblieb, führte die Behandlung mit MCD erwartungsgemäß zu einer verstärkten Entstehung von ROS und oxidativem Stress. Die damit einhergehende Lipidperoxidation fiel in den Nrf2^{-/-} Tiere signifikant stärker aus als in MCD-behandelten WT Tieren. Die Vermutung, dass die gesteigerte Schädigung auf einer vermehrten Bildung von ROS beruht, die sich durch den Verlust von Nrf2 und der damit verbundenen verminderten anti-oxidativen Stressantwort nicht abfangen ließ, wurde nur teilweise bestätigt. Zwar kam es in Übereinstimmung mit der Literatur zu einem Ausbleiben der Nrf2-abhängigen NQO1 Aktivierung [190]; im Gegensatz dazu war die Expression von HO-1, welches laut Literatur ebenfalls Nrf2abhängig reguliert ist [191], deutlich stärker als in MCD-behandelten WT Mäusen. Obwohl bereits vielfach nachwiesen wurde, dass Nrf2 bei zahlreichen Prozessen an der Regulation weiterer anti-oxidativer Proteine sowie Detoxifikationsenzymen und Membrantransportern beteiligt ist [192], deutete die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene Regulation der Phase-3 Detoxifikationstransporter unter MCD nicht auf Nrf2-abhängige Prozesse hin. Die Ergebnisse deuteten vielmehr auf eine frühere Aktivierung der Detoxifikationsvorgänge in den Nrf2^{-/-} Mäusen aufgrund einer schnelleren Progression im Krankheitsverlauf hin.

Erstaunlicherweise wurde durch den Verlust von Nrf2 keine Beeinträchtigung im hepatischen GSH-System festgestellt. Zum einen hätte die Nrf2-abhängige Regulation der GCLC-Expression eine verminderte GSH-Konzentration in den *Nrf2*^{-/-} Mäusen bedingen können [193]. Zum anderen beeinflusst Nrf2 neben der *de novo* Synthese auch die Regeneration von GSH aus GSSG durch die Regulation der GR-Expression [194]. Erwartungsgemäß hätte dies zu einer Ver-

schiebung im GSH / GSSG-Verhältnis geführt, was durch verringerte GSH-Konzentrationen nachweisbar gewesen wäre.

Ein wesentlicher Auslöser und Ziel oxidativen Stresses sind die Mitochondrien. Oxidation ungesättigter Fettsäuren und Lipidperoxidation induzieren Schädigungen der mitochondrialen DNA [195]. Zusätzlich tritt ein durch TNF-α vermittelter eingeschränkter Elektronentransport entlang der mitochondrialen Atmungskette auf, der mit einer verstärkten Produktion von UCP-2 (*uncoupling protein-2*) und einer verminderten Generierung von ATP assoziiert ist. Allerdings war die mitochondriale Funktionalität durch den Verlust von Nrf2 nicht stärker eingeschränkt als bei vergleichbaren WT Tieren.

Obwohl die Ursache für eine vermehrte oxidative Schädigung in den Nrf2^{-/-} Mäusen unter MCD nicht eindeutig geklärt werden konnte, führte der Verlust von Nrf2 unter der dauerhaften Belastung von MCD zu einer stärkeren Aktivierung des Immunsystems. Dies zeigte sich einerseits in einer vermehrten Induktion von TNF-α sowie der damit in Zusammenhang stehenden Rekrutierung von Immunzellen in die Leber von MCD-behandelten Nrf2^{-/-} Mäusen. Die gesteigerte Expression von TNF-a ist von zentraler Bedeutung für die TLR4-vermittelte Progression der Immunreaktion. In MCD-behandelten Mäusen sind vor allem die TNF- α -induzierte Aktivierung von NF- κ B – dessen Translokation in den Zellkern nachgewiesen wurde - und JNK / c-Jun von besonderer Bedeutung. Durch die Inhibition von IKK2 kann in pharmakologische murinen, nichtparenchymalen Zellen der Leber eine schwächere inflammatorische Antwort sowie eine verminderte Steatose als Folge einer verbesserten β-Oxidation erreicht werden [196]. Des Weiteren ist in NASH-Patienten eine deutlich gesteigerte Bindung zwischen der DNA und NF-kB sowie AP-1 nachweisbar, die zudem in direkter Verbindung mit der Entstehung von oxidativem Stress und einer Insulinresistenz in der Leber stehen [197]. Während in Nrf2^{-/-} Mäusen unter MCD-Behandlung weniger NF-kB in den Zellkern translozierte als in vergleichbaren WT Mäusen, zeigten Nrf2^{-/-} Mäuse eine stärkere Aktivierung von JNK, die mit einer gesteigerten Expression von c-Jun einher ging. Eine erhöhte Konzentration an c-Jun war ebenfalls in Mäusen nachweisbar, die aufgrund einer aktivierten Stressantwort als Folge vermehrt auftretender ungefalteter Proteine im ER (unfolded protein response, UPR) an mikrovesikulärer Lebersteatose litten [198]. Die Aktivierung von c-Jun steht demnach im direkten Zusammenhang mit vermehrtem oxidativen Stress.

Zusätzlich führte der Verlust von Nrf2 zu einer deutlich stärkeren Aktivierung von STAT3. Die simultane Induktion von SOCS3 war in den WT Mäusen unter MCD ausreichend, um die Aktivierung von STAT3 zu inhibieren. Die inflammatorische Reaktion in den *Nrf2*^{-/-} Mäusen hingegen war so stark, dass selbst die massive SOCS3-Expression nicht ausreichte, um die Aktivierung des pro-

inflammatorischen STAT3-Signalweges vollständig zu unterdrücken. Die Expression von SOCS3 erfolgt durch pro-inflammatorische Zytokine, deren Ausschüttung vor allem durch STAT- und NF-κB-Signalwege aufgelöst werden [199]. SOCS3 bindet an den gp130-Rezeptor und verlangsamt damit den Phosphorylierungsprozess von STAT3 [200]. Dabei nimmt SOCS3 eine Schlüsselrolle in der Regulation der TLR-vermittelten divergenten Aktivität des pro-inflammatorischen IL-6 und dem potentiell anti-inflammatorischen IL-10 ein [201]. Beide Zytokine führen zu einer starken Induktion von SOCS3 und obwohl STAT3 für beide Signalwege essentiell ist [202], führt SOCS3 lediglich zu einer selektiven Inhibition der IL-6 Signalkaskade [203]. Aus diesem Grund induziert IL-6 eine transiente Aktivierung von STAT3, während es durch IL-10 zu einer dauerhaften STAT3-Aktivierung kommt. Die divergente Regulation der STAT3-Aktivierung liefert eine mögliche Erklärung für die differentiellen Unterschiede zwischen WT und *Nrf2^{-/-}* Mäusen unter der MCD-Behandlung.

Wie nähere Untersuchungen der Infiltrate zeigten, handelte es sich bei diesen inflammatorischen Zellen in erster Linie um Zellen des angeborenen Immunsystems. Vor allem Makrophagen und Neutrophile waren an der Immunantwort beteiligt. Ein geringerer Anteil der Zellen entstammte jedoch dem adaptiven Immunsystem. Während lange Zeit Makrophagen und Neutrophile für die Entstehung einer NASH verantwortlich gemacht wurden, steht nun die adaptive Immunantwort immer mehr im Zentrum aktueller Forschung. Vor allem die T-Zell-vermittelte Immunantwort spielt bei der Adipositas-induzierten Inflammation in Mäusen eine bedeutende, wenn auch bisher unbeachtete Rolle. Neueste Studien haben gezeigt, dass das adaptive Immunsystem sowohl den Auslöser (CD8⁺ T-Zellen) als auch den Inhibitor (CD4⁺ regulatorische oder T_H2 T-Zellen) des metabolischen Syndroms darstellen kann [204-206]. Die Hypothese zur Entstehung einer Steatohepatitis sieht demnach vor, dass sowohl eine Entzündung im Fettgewebe als auch fettspeichernde Hepatozyten zu einem Priming von CD8⁺ T-Zellen führen, welche daraufhin entweder direkt in die Leber einwandern oder zunächst Makrophagen aktivieren, welche dann durch proinflammatorische Faktoren in die Leber einwandern [205]. In Übereinstimmung mit dieser Literatur wurde in Nrf2^{-/-} Mäusen nach MCD-Behandlung eine signifikant stärkere transkriptionelle Induktion von RANTES nachgewiesen, das für die Rekrutierung von Gedächtnis-T-Zellen und Makrophagen verantwortlich ist.

In den Untersuchungen hinsichtlich fibrotischer Veränderungen in der Leber von MCD-behandelten Mäusen wurde eindeutig gezeigt, dass es durch oxidativen Stress und die gesteigerte hepatozelluläre Lipidperoxidation zur Entstehung einer NASH kam. Die dauerhafte Belastung durch Zytokine und oxidativen Stress führte zur Aktivierung von hepatischen Sternzellen [207]. Im Vergleich zu den WT Mäusen entwickelte sich in den *Nrf*2^{-/-} Mäusen eine deutlich stärker

ausgeprägte Fibrosierung der Leber unter MCD. Zwar wurde die Aktivierung der hepatischen Sternzellen durch eine immunhistochemische Färbung von α-SMA nachgewiesen, die Detektion einer gesteigerten Expression von TGFß als wichtigstes pro-fibrogenes Zytokin in hepatischen Wundheilungsprozessen war jedoch nicht möglich [208]. Dennoch wurde – in Übereinstimmung mit der Studie von Witek et al. - bereits nach 5 Wochen MCD-Behandlung in WT Mäusen sowohl durch die Sirius Rot Färbung als auch durch die Bestimmung der hepatischen Hydroxyprolin-Konzentration ein 2facher Anstieg der kollagenhaltigen Bereiche in der Leber nachgewiesen [209]. Der Verlust von Nrf2 führte sogar zu einer Verdreifachung der fibrotischen Areale. Ebenso zeigte sich das transkriptionelle Profil der Nrf2^{-/-} Mäuse unter MCD eine um ein Vielfaches stärkere Induktion der pro-fibrogenen Gene. Die massive Induktion der Matrix-Metalloproteinasen (MMP) 3 und 13 in Nrf2^{-/-} Mäusen nach MCD-Behandlung zeigte den Versuch zur Auflösung kollagenhaltiger Strukturen. Dies war jedoch nicht ausreichend, um die fibrotische Umstrukturierung der extrazellulären Matrix zu verhindern.

5.6 Derzeitige Mausmodelle sind nur eingeschränkt zur Simulation der humanen NASH fähig

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, dass eine Simulation des Krankheitsbildes der nicht-alkoholischen Steatohepatitis im Mausmodell nur eingeschränkt möglich ist. Es existierenden Modelle können nur einzelne Aspekte der NASH gut nachbilden. Die Krankheit in ihrer Gesamtheit darzustellen ist jedoch bisher nicht möglich. Es wurde gezeigt, dass durch die Fütterung einer hochkalorischen Diät eine erhöhte Zufuhr exogener Fettsäuren erreicht werden kann. Die daraus resultierende Adipositas induziert sowohl eine Lebersteatose als auch Fetteinlagerungen in der Peripherie, sowie eine persistente Insulinresistenz [210-212]. Da die Behandlung mit fettreichen Diäten jedoch selten zu inflammatorischen und fibrotischen Prozessen in der Leber führt, sind diese Diäten nur eingeschränkt für die Untersuchung der humanen NASH geeignet.

Als weitere Möglichkeit führt die Beseitigung von Methionin und Cholin aus der Nahrung zu einer schnellen Akkumulation von Fett in der Leber [115]. Ursache für die Entstehung einer Steatose ist in diesem Fall eine eingeschränkte Sekretion von Trigylceriden aus der Leber aufgrund eines Defekts in der Zusammensetzung der VLDLs [213]. Methionin und Cholin stellen dabei wichtige Vorläufer des Phosphatidylcholins dar, welches als Hauptbestandteil die äußere Hülle der VLDLs bildet [214]. Ein Mangel dieser essentiellen Aminosäuren beeinträchtigt
die VLDL-Produktion, was eine Akkumulation der Triglyceride in der Leber zur Folge hat [215]. Im Gegensatz zur HFD induzieren lipogene Methionin- und Cholin-defiziente Diäten nicht nur eine Lebersteatose, sondern verursachen auch hepatische Inflammation und Fibrose [216,217]. In diesem Punkt unterscheidet sich diese schwere und progressive Form der Leberschädigung von der durch fettreiche Diäten ausgelösten einfachen Steatose. Obwohl die MCD pathophysiologisch zu einem Krankheitsbild führt, welches dem er humanen Steatohepatitis sehr ähnelt, entspricht die Pathogenese nicht den Gegebenheiten im Menschen. Während NASH-Patienten meist aufgrund einer Adipositas mit zusätzlicher Insulinresistenz erkranken, führt die Behandlung mit MCD bei Mäusen zu einem deutlichen Gewichtsverlust [167]. Dieser geht einher mit einer Atrophie der Leber, Hypoglykämie und einer gesteigerten Insulinsensibilität – eine Entwicklung, die im absoluten Kontrast zur Pathophysiologie der humanen NASH steht [218].

6. Schlussfolgerung

In dieser Arbeit wurde Nrf2 zum einen als essentieller Regulator von Enzymen identifiziert, welche direkt an der Verstoffwechselung von Ethanol beteiligt sind. Dabei beeinträchtigte der Verlust von Nrf2 vor allem die Expression solcher Enzyme, die zur Detoxifikation von Acetaldehyd unabdingbar sind. Als Folge erhöhte sich die hepatische Acetaldehyd-Konzentration, was die Induktion von SREBP-1 und damit die Entstehung einer hepatischen Steatose begünstigte. Die verstärkte Akkumulation von Acetaldehyd in Ethanol-behandelten Nrf2^{-/-} Mäusen löste zudem eine gesteigerte mitochondriale Schädigung aus, welche zu einer Beeinträchtigung des anti-oxidativen Abwehrmechanismus führte. Als Folge kam es vermehrt zu oxidativem Stress, der die Zellen für eine zweite Störung sensibilisierte. Die dauerhafte zelluläre Belastung durch oxidativen Stress in Nrf2^{-/-} Mäusen förderte eine beschleunigte Progression des Krankheitsverlaufs. Der Konsum von Alkohol führte des Weiteren zu einer Aktivierung des Immunsystems. Die schädliche Wirkung der damit in Verbindung stehenden Zytokine wurde durch die ROS-bedingte mitochondriale Vorschädigung zusätzlich verstärkt, welche schließlich zum Leberversagen und Tod der Nrf2defizienten Mäuse führte. Aus den hier vorgelegten Daten geht demnach hervor, dass Nrf2 in Bezug auf die Alkohol-induzierte Leberschädigung eine zentrale zytoprotektive Rolle einnimmt.

In Bezug auf die Entwicklung der nicht-alkoholischen Steatohepatitis zeigte der Verlust von Nrf2 in den hier untersuchten NASH-Modellen unterschiedliche Auswirkungen. Die Deletion von Nrf2 führte im HFD Modell zu einer gesteigerten β-Oxidation und daraus folgend zu einer verlangsamten Lipidakkumulation. Eine vermehrte Leberschädigung mit anschließender Progression zur NASH blieb unter dieser Diät aus. Im MCD Modell verlief die Steatose-Entwicklung Nrf2-unabhängig. Allerdings führte der Verlust von Nrf2 zu einer deutlich beschleunigten Entstehung einer NASH. Dabei induzierte vor allem die aufgrund fehlender anti-oxidativer Mechanismen deutlich erhöhte Lipidperoxidation eine verstärkte Aktivierung des Immunsystems sowie die beschleunigte Entwicklung einer Leberfibrose. Dieser Abschnitt der Arbeit zeigte deutlich, dass Nrf2 neben der essentiellen Bedeutung für den Schutz der Zellen vor xenobiotischem und oxidativem Stress zusätzlich eine wichtige Rolle in der Regulation metabolischer Prozesse zukommt.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit eine zentrale Bedeutung von Nrf2 im Schutz gegen alkoholische und nicht-alkoholische Lebererkrankungen nachgewiesen werden.

Literaturverzeichnis

- 1. Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ: Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. Biochem J 1997;324 (Pt 1):1-18.
- 2. Sanchez-Perez Y, Carrasco-Legleu C, Garcia-Cuellar C, Perez-Carreon J, Hernandez-Garcia S, Salcido-Neyoy M, Aleman-Lazarini L, Villa-Trevino S: Oxidative stress in carcinogenesis. Correlation between lipid peroxidation and induction of preneoplastic lesions in rat hepatocarcinogenesis. Cancer Lett 2005;217:25-32.
- 3. Bartsch H, Nair J: Oxidative stress and lipid peroxidation-derived DNA-lesions in inflammation driven carcinogenesis. Cancer Detect Prev 2004;28:385-391.
- 4. Wiseman H, Halliwell B: Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. Biochem J 1996;313 (Pt 1):17-29.
- Rushmore TH, Morton MR, Pickett CB: The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity. J Biol Chem 1991;266:11632-11639.
- 6. Nguyen T, Sherratt PJ, Pickett CB: Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element. Annu Rev Pharmacol Toxicol 2003;43:233-260.
- Itoh K, Chiba T, Takahashi S, Ishii T, Igarashi K, Katoh Y, Oyake T, Hayashi N, Satoh K, Hatayama I, Yamamoto M, Nabeshima Y: An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. Biochem Biophys Res Commun 1997;236:313-322.
- McMahon M, Itoh K, Yamamoto M, Chanas SA, Henderson CJ, McLellan LI, Wolf CR, Cavin C, Hayes JD: The Cap'n'Collar basic leucine zipper transcription factor Nrf2 (NF-E2 p45-related factor 2) controls both constitutive and inducible expression of intestinal detoxification and glutathione biosynthetic enzymes. Cancer Res 2001;61:3299-3307.
- Kang MI, Kobayashi A, Wakabayashi N, Kim SG, Yamamoto M: Scaffolding of Keap1 to the actin cytoskeleton controls the function of Nrf2 as key regulator of cytoprotective phase 2 genes. Proc Natl Acad Sci U S A 2004;101:2046-2051.
- 10. Wakabayashi N, Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD, Kang MI, Kobayashi A, Yamamoto M, Kensler TW, Talalay P: Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers. Proc Natl Acad Sci U S A 2004;101:2040-2045.
- 11. Nguyen T, Sherratt PJ, Nioi P, Yang CS, Pickett CB: Nrf2 controls constitutive and inducible expression of ARE-driven genes through a dynamic pathway involving nucleocytoplasmic shuttling by Keap1. J Biol Chem 2005;280:32485-32492.
- 12. Stewart D, Killeen E, Naquin R, Alam S, Alam J: Degradation of transcription factor Nrf2 via the ubiquitin-proteasome pathway and stabilization by cadmium. J Biol Chem 2003;278:2396-2402.
- 13. Zhang DD, Hannink M: Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress. Mol Cell Biol 2003;23:8137-8151.
- 14. McMahon M, Itoh K, Yamamoto M, Hayes JD: Keap1-dependent proteasomal degradation of transcription factor Nrf2 contributes to the negative regulation of antioxidant response element-driven gene expression. J Biol Chem 2003;278:21592-21600.
- 15. Okawa H, Motohashi H, Kobayashi A, Aburatani H, Kensler TW, Yamamoto M: Hepatocyte-specific deletion of the keap1 gene activates Nrf2 and confers potent resistance against acute drug toxicity. Biochem Biophys Res Commun 2006;339:79-88.
- Wakabayashi N, Itoh K, Wakabayashi J, Motohashi H, Noda S, Takahashi S, Imakado S, Kotsuji T, Otsuka F, Roop DR, Harada T, Engel JD, Yamamoto M: Keap1-null mutation leads to postnatal lethality due to constitutive Nrf2 activation. Nat Genet 2003;35:238-245.
- Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, Igarashi K, Engel JD, Yamamoto M: Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. Genes Dev 1999;13:76-86.

- 18. Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD, Cole RN, Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Yamamoto M, Talalay P: Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. Proc Natl Acad Sci U S A 2002;99:11908-11913.
- Moi P, Chan K, Asunis I, Cao A, Kan YW: Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. Proc Natl Acad Sci U S A 1994;91:9926-9930.
- Karapetian RN, Evstafieva AG, Abaeva IS, Chichkova NV, Filonov GS, Rubtsov YP, Sukhacheva EA, Melnikov SV, Schneider U, Wanker EE, Vartapetian AB: Nuclear oncoprotein prothymosin alpha is a partner of Keap1: implications for expression of oxidative stress-protecting genes. Mol Cell Biol 2005;25:1089-1099.
- 21. Sun Z, Zhang S, Chan JY, Zhang DD: Keap1 controls postinduction repression of the Nrf2-mediated antioxidant response by escorting nuclear export of Nrf2. Mol Cell Biol 2007;27:6334-6349.
- 22. Watai Y, Kobayashi A, Nagase H, Mizukami M, McEvoy J, Singer JD, Itoh K, Yamamoto M: Subcellular localization and cytoplasmic complex status of endogenous Keap1. Genes Cells 2007;12:1163-1178.
- 23. Muratani M, Tansey WP: How the ubiquitin-proteasome system controls transcription. Nat Rev Mol Cell Biol 2003;4:192-201.
- 24. Katoh Y, Itoh K, Yoshida E, Miyagishi M, Fukamizu A, Yamamoto M: Two domains of Nrf2 cooperatively bind CBP, a CREB binding protein, and synergistically activate transcription. Genes Cells 2001;6:857-868.
- 25. Shen G, Hebbar V, Nair S, Xu C, Li W, Lin W, Keum YS, Han J, Gallo MA, Kong AN: Regulation of Nrf2 transactivation domain activity. The differential effects of mitogenactivated protein kinase cascades and synergistic stimulatory effect of Raf and CREBbinding protein. J Biol Chem 2004;279:23052-23060.
- 26. Kobayashi A, Kang MI, Watai Y, Tong KI, Shibata T, Uchida K, Yamamoto M: Oxidative and electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of Keap1. Mol Cell Biol 2006;26:221-229.
- Ishii T, Itoh K, Takahashi S, Sato H, Yanagawa T, Katoh Y, Bannai S, Yamamoto M: Transcription factor Nrf2 coordinately regulates a group of oxidative stress-inducible genes in macrophages. J Biol Chem 2000;275:16023-16029.
- 28. Thimmulappa RK, Mai KH, Srisuma S, Kensler TW, Yamamoto M, Biswal S: Identification of Nrf2-regulated genes induced by the chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray. Cancer Res 2002;62:5196-5203.
- 29. Leung L, Kwong M, Hou S, Lee C, Chan JY: Deficiency of the Nrf1 and Nrf2 transcription factors results in early embryonic lethality and severe oxidative stress. J Biol Chem 2003;278:48021-48029.
- 30. Morito N, Yoh K, Itoh K, Hirayama A, Koyama A, Yamamoto M, Takahashi S: Nrf2 regulates the sensitivity of death receptor signals by affecting intracellular glutathione levels. Oncogene 2003;22:9275-9281.
- 31. Yueh MF, Tukey RH: Nrf2-Keap1 signaling pathway regulates human UGT1A1 expression in vitro and in transgenic UGT1 mice. J Biol Chem 2007;282:8749-8758.
- 32. Aleksunes LM, Slitt AL, Maher JM, Augustine LM, Goedken MJ, Chan JY, Cherrington NJ, Klaassen CD, Manautou JE: Induction of Mrp3 and Mrp4 transporters during acetaminophen hepatotoxicity is dependent on Nrf2. Toxicol Appl Pharmacol 2008;226:74-83.
- 33. Hayashi A, Suzuki H, Itoh K, Yamamoto M, Sugiyama Y: Transcription factor Nrf2 is required for the constitutive and inducible expression of multidrug resistance-associated protein 1 in mouse embryo fibroblasts. Biochem Biophys Res Commun 2003;310:824-829.
- 34. Weerachayaphorn J, Cai SY, Soroka CJ, Boyer JL: Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 is a positive regulator of human bile salt export pump expression. Hepatology 2009;50:1588-1596.
- 35. Okada K, Shoda J, Taguchi K, Maher JM, Ishizaki K, Inoue Y, Ohtsuki M, Goto N, Takeda K, Utsunomiya H, Oda K, Warabi E, Ishii T, Osaka K, Hyodo I, Yamamoto M: Ursodeoxycholic acid stimulates Nrf2-mediated hepatocellular transport, detoxification,

and antioxidative stress systems in mice. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2008;295:G735-747.

- Thimmulappa RK, Lee H, Rangasamy T, Reddy SP, Yamamoto M, Kensler TW, Biswal S: Nrf2 is a critical regulator of the innate immune response and survival during experimental sepsis. J Clin Invest 2006;116:984-995.
- Kim HJ, Barajas B, Wang M, Nel AE: Nrf2 activation by sulforaphane restores the agerelated decrease of T(H)1 immunity: role of dendritic cells. J Allergy Clin Immunol 2008;121:1255-1261 e1257.
- 38. Burdette D, Olivarez M, Waris G: Activation of transcription factor Nrf2 by hepatitis C virus induces cell survival pathway. J Gen Virol 2009.
- 39. Seitz HK, Poschl G, Simanowski UA: Alcohol and cancer. Recent Dev Alcohol 1998;14:67-95.
- 40. Mari M, Wu D, Nieto N, Cederbaum AI: CYP2E1-dependent toxicity and up-regulation of antioxidant genes. J Biomed Sci 2001;8:52-58.
- 41. Roberts BJ, Shoaf SE, Jeong KS, Song BJ: Induction of CYP2E1 in liver, kidney, brain and intestine during chronic ethanol administration and withdrawal: evidence that CYP2E1 possesses a rapid phase half-life of 6 hours or less. Biochem Biophys Res Commun 1994;205:1064-1071.
- 42. Caro AA, Cederbaum AI: Oxidative stress, toxicology, and pharmacology of CYP2E1. Annu Rev Pharmacol Toxicol 2004;44:27-42.
- 43. Lieber CS: Hepatic and metabolic effects of ethanol: pathogenesis and prevention. Ann Med 1994;26:325-330.
- 44. Kurzinger R: [Clinically relevant aspects of ethanol metabolism]. Z Gesamte Inn Med 1981;36:538-543.
- 45. Crabb DW, Matsumoto M, Chang D, You M: Overview of the role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase and their variants in the genesis of alcoholrelated pathology. Proc Nutr Soc 2004;63:49-63.
- 46. Lin RC, Smith RS, Lumeng L: Detection of a protein-acetaldehyde adduct in the liver of rats fed alcohol chronically. J Clin Invest 1988;81:615-619.
- 47. Svegliati-Baroni G, Baraona E, Rosman AS, Lieber CS: Collagen-acetaldehyde adducts in alcoholic and nonalcoholic liver diseases. Hepatology 1994;20:111-118.
- 48. Dellarco VL: A mutagenicity assessment of acetaldehyde. Mutat Res 1988;195:1-20.
- 49. Fang JL, Vaca CE: Development of a 32P-postlabelling method for the analysis of adducts arising through the reaction of acetaldehyde with 2'-deoxyguanosine-3'monophosphate and DNA. Carcinogenesis 1995;16:2177-2185.
- 50. Israel Y, Hurwitz E, Niemela O, Arnon R: Monoclonal and polyclonal antibodies against acetaldehyde-containing epitopes in acetaldehyde-protein adducts. Proc Natl Acad Sci U S A 1986;83:7923-7927.
- 51. Niemela O, Klajner F, Orrego H, Vidins E, Blendis L, Israel Y: Antibodies against acetaldehyde-modified protein epitopes in human alcoholics. Hepatology 1987;7:1210-1214.
- 52. Hoerner M, Behrens UJ, Worner TM, Blacksberg I, Braly LF, Schaffner F, Lieber CS: The role of alcoholism and liver disease in the appearance of serum antibodies against acetaldehyde adducts. Hepatology 1988;8:569-574.
- 53. Feron VJ, Til HP, de Vrijer F, Woutersen RA, Cassee FR, van Bladeren PJ: Aldehydes: occurrence, carcinogenic potential, mechanism of action and risk assessment. Mutat Res 1991;259:363-385.
- 54. Obe G, Jonas R, Schmidt S: Metabolism of ethanol in vitro produces a compound which induces sister-chromatid exchanges in human peripheral lymphocytes in vitro: acetal-dehyde not ethanol is mutagenic. Mutat Res 1986;174:47-51.
- 55. Mufti SI, Eskelson CD, Odeleye OE, Nachiappan V: Alcohol-associated generation of oxygen free radicals and tumor promotion. Alcohol Alcohol 1993;28:621-628.
- 56. Espina N, Lima V, Lieber CS, Garro AJ: In vitro and in vivo inhibitory effect of ethanol and acetaldehyde on O6-methylguanine transferase. Carcinogenesis 1988;9:761-766.
- 57. Brooks PJ: DNA damage, DNA repair, and alcohol toxicity--a review. Alcohol Clin Exp Res 1997;21:1073-1082.
- Nicholls R, de Jersey J, Worrall S, Wilce P: Modification of proteins and other biological molecules by acetaldehyde: adduct structure and functional significance. Int J Biochem 1992;24:1899-1906.
- 59. Bieber LL: Carnitine. Annu Rev Biochem 1988;57:261-283.

- 60. Bremer J: Carnitine--metabolism and functions. Physiol Rev 1983;63:1420-1480.
- 61. Miyazawa S, Ozasa H, Osumi T, Hashimoto T: Purification and properties of carnitine octanoyltransferase and carnitine palmitoyltransferase from rat liver. J Biochem 1983;94:529-542.
- 62. Cox KB, Johnson KR, Wood PA: Chromosomal locations of the mouse fatty acid oxidation genes Cpt1a, Cpt1b, Cpt2, Acadvl, and metabolically related Crat gene. Mamm Genome 1998;9:608-610.
- 63. McGarry JD, Leatherman GF, Foster DW: Carnitine palmitoyltransferase I. The site of inhibition of hepatic fatty acid oxidation by malonyl-CoA. J Biol Chem 1978;253:4128-4136.
- 64. McGarry JD, Brown NF: Reconstitution of purified, active and malonyl-CoA-sensitive rat liver carnitine palmitoyltransferase I: relationship between membrane environment and malonyl-CoA sensitivity. Biochem J 2000;349:179-187.
- 65. Woeltje KF, Esser V, Weis BC, Cox WF, Schroeder JG, Liao ST, Foster DW, McGarry JD: Inter-tissue and inter-species characteristics of the mitochondrial carnitine palmitoyl-transferase enzyme system. J Biol Chem 1990;265:10714-10719.
- 66. Tsukamoto Y, Wong H, Mattick JS, Wakil SJ: The architecture of the animal fatty acid synthetase complex. IV. Mapping of active centers and model for the mechanism of action. J Biol Chem 1983;258:15312-15322.
- 67. Ntambi JM, Miyazaki M: Regulation of stearoyl-CoA desaturases and role in metabolism. Prog Lipid Res 2004;43:91-104.
- 68. Torra IP, Chinetti G, Duval C, Fruchart JC, Staels B: Peroxisome proliferator-activated receptors: from transcriptional control to clinical practice. Curr Opin Lipidol 2001;12:245-254.
- 69. Norris AW, Chen L, Fisher SJ, Szanto I, Ristow M, Jozsi AC, Hirshman MF, Rosen ED, Goodyear LJ, Gonzalez FJ, Spiegelman BM, Kahn CR: Muscle-specific PPARgammadeficient mice develop increased adiposity and insulin resistance but respond to thiazolidinediones. J Clin Invest 2003;112:608-618.
- 70. Brun RP, Tontonoz P, Forman BM, Ellis R, Chen J, Evans RM, Spiegelman BM: Differential activation of adipogenesis by multiple PPAR isoforms. Genes Dev 1996;10:974-984.
- 71. Memon RA, Tecott LH, Nonogaki K, Beigneux A, Moser AH, Grunfeld C, Feingold KR: Up-regulation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR-alpha) and PPARgamma messenger ribonucleic acid expression in the liver in murine obesity: troglitazone induces expression of PPAR-gamma-responsive adipose tissue-specific genes in the liver of obese diabetic mice. Endocrinology 2000;141:4021-4031.
- 72. Desvergne B, Wahli W: Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. Endocr Rev 1999;20:649-688.
- 73. Braissant O, Foufelle F, Scotto C, Dauca M, Wahli W: Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, beta, and -gamma in the adult rat. Endocrinology 1996;137:354-366.
- 74. Auboeuf D, Rieusset J, Fajas L, Vallier P, Frering V, Riou JP, Staels B, Auwerx J, Laville M, Vidal H: Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor-alpha in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients. Diabetes 1997;46:1319-1327.
- 75. Gottlicher M, Widmark E, Li Q, Gustafsson JA: Fatty acids activate a chimera of the clofibric acid-activated receptor and the glucocorticoid receptor. Proc Natl Acad Sci U S A 1992;89:4653-4657.
- Mascaro C, Acosta E, Ortiz JA, Marrero PF, Hegardt FG, Haro D: Control of human muscle-type carnitine palmitoyltransferase I gene transcription by peroxisome proliferator-activated receptor. J Biol Chem 1998;273:8560-8563.
- 77. Schoonjans K, Staels B, Auwerx J: Role of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression. J Lipid Res 1996;37:907-925.
- 78. van Raalte DH, Li M, Pritchard PH, Wasan KM: Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-alpha: a pharmacological target with a promising future. Pharm Res 2004;21:1531-1538.

- 79. Fassio E, Alvarez E, Dominguez N, Landeira G, Longo C: Natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a longitudinal study of repeat liver biopsies. Hepatology 2004;40:820-826.
- 80. Bugianesi E, Leone N, Vanni E, Marchesini G, Brunello F, Carucci P, Musso A, De Paolis P, Capussotti L, Salizzoni M, Rizzetto M: Expanding the natural history of nonalcoholic steatohepatitis: from cryptogenic cirrhosis to hepatocellular carcinoma. Gastroenterology 2002;123:134-140.
- 81. Zhou YJ, Li YY, Nie YQ, Ma JX, Lu LG, Shi SL, Chen MH, Hu PJ: Prevalence of fatty liver disease and its risk factors in the population of South China. World J Gastroenterol 2007;13:6419-6424.
- 82. Bedogni G, Miglioli L, Masutti F, Tiribelli C, Marchesini G, Bellentani S: Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: the Dionysos nutrition and liver study. Hepatology 2005;42:44-52.
- 83. Amarapurkar D, Kamani P, Patel N, Gupte P, Kumar P, Agal S, Baijal R, Lala S, Chaudhary D, Deshpande A: Prevalence of non-alcoholic fatty liver disease: population based study. Ann Hepatol 2007;6:161-163.
- 84. McGarry JD: Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes. Diabetes 2002;51:7-18.
- 85. Targher G, Bertolini L, Padovani R, Rodella S, Tessari R, Zenari L, Day C, Arcaro G: Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and its association with cardiovascular disease among type 2 diabetic patients. Diabetes Care 2007;30:1212-1218.
- Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, McCullough AJ, Natale S, Forlani G, Melchionda N: Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. Diabetes 2001;50:1844-1850.
- 87. Higuchi H, Gores GJ: Mechanisms of liver injury: an overview. Curr Mol Med 2003;3:483-490.
- 88. Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, Fruchart JC, James WP, Loria CM, Smith SC, Jr.: Harmonizing the Metabolic Syndrome. A Joint Interim Statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. Circulation 2009.
- 89. Van den Berghe G: How does blood glucose control with insulin save lives in intensive care? J Clin Invest 2004;114:1187-1195.
- 90. Bradbury MW, Berk PD: Lipid metabolism in hepatic steatosis. Clin Liver Dis 2004;8:639-671, xi.
- 91. Chitturi S, Farrell GC: Etiopathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. Semin Liver Dis 2001;21:27-41.
- 92. Charlton M, Sreekumar R, Rasmussen D, Lindor K, Nair KS: Apolipoprotein synthesis in nonalcoholic steatohepatitis. Hepatology 2002;35:898-904.
- 93. Farrell GC, Larter CZ: Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. Hepatology 2006;43:S99-S112.
- 94. Bray GA, Nielsen SJ, Popkin BM: Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. Am J Clin Nutr 2004;79:537-543.
- 95. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ: Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. J Clin Invest 2005;115:1343-1351.
- 96. Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, Sterling RK, Luketic VA, Shiffman ML, Clore JN: Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. Gastroenterology 2001;120:1183-1192.
- 97. de Almeida IT, Cortez-Pinto H, Fidalgo G, Rodrigues D, Camilo ME: Plasma total and free fatty acids composition in human non-alcoholic steatohepatitis. Clin Nutr 2002;21:219-223.
- 98. Roden M: Mechanisms of Disease: hepatic steatosis in type 2 diabetes--pathogenesis and clinical relevance. Nat Clin Pract Endocrinol Metab 2006;2:335-348.
- 99. Yahagi N, Shimano H, Hasty AH, Amemiya-Kudo M, Okazaki H, Tamura Y, Iizuka Y, Shionoiri F, Ohashi K, Osuga J, Harada K, Gotoda T, Nagai R, Ishibashi S, Yamada N: A crucial role of sterol regulatory element-binding protein-1 in the regulation of lipogenic gene expression by polyunsaturated fatty acids. J Biol Chem 1999;274:35840-35844.

- 100. Schadinger SE, Bucher NL, Schreiber BM, Farmer SR: PPARgamma2 regulates lipogenesis and lipid accumulation in steatotic hepatocytes. Am J Physiol Endocrinol Metab 2005;288:E1195-1205.
- 101. Shimomura I, Bashmakov Y, Horton JD: Increased levels of nuclear SREBP-1c associated with fatty livers in two mouse models of diabetes mellitus. J Biol Chem 1999;274:30028-30032.
- 102. Dentin R, Benhamed F, Hainault I, Fauveau V, Foufelle F, Dyck JR, Girard J, Postic C: Liver-specific inhibition of ChREBP improves hepatic steatosis and insulin resistance in ob/ob mice. Diabetes 2006;55:2159-2170.
- 103. Bandyopadhyay GK, Yu JG, Ofrecio J, Olefsky JM: Increased malonyl-CoA levels in muscle from obese and type 2 diabetic subjects lead to decreased fatty acid oxidation and increased lipogenesis; thiazolidinedione treatment reverses these defects. Diabetes 2006;55:2277-2285.
- 104. Sparks JD, Collins HL, Sabio I, Sowden MP, Smith HC, Cianci J, Sparks CE: Effects of fatty acids on apolipoprotein B secretion by McArdle RH-7777 rat hepatoma cells. Bio-chim Biophys Acta 1997;1347:51-61.
- 105. Zhang YL, Hernandez-Ono A, Ko C, Yasunaga K, Huang LS, Ginsberg HN: Regulation of hepatic apolipoprotein B-lipoprotein assembly and secretion by the availability of fatty acids. I. Differential response to the delivery of fatty acids via albumin or remnant-like emulsion particles. J Biol Chem 2004;279:19362-19374.
- 106. Wilfred de Alwis NM, Day CP: Genetics of alcoholic liver disease and nonalcoholic fatty liver disease. Semin Liver Dis 2007;27:44-54.
- 107. Pessayre D: Role of mitochondria in non-alcoholic fatty liver disease. J Gastroenterol Hepatol 2007;22 Suppl 1:S20-27.
- 108. Stefan N, Schafer S, Machicao F, Machann J, Schick F, Claussen CD, Stumvoll M, Haring HU, Fritsche A: Liver fat and insulin resistance are independently associated with the -514C>T polymorphism of the hepatic lipase gene. J Clin Endocrinol Metab 2005;90:4238-4243.
- 109. Valenti L, Dongiovanni P, Fracanzani AL, Santorelli G, Fatta E, Bertelli C, Taioli E, Fiorelli G, Fargion S: Increased susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease in heterozygotes for the mutation responsible for hereditary hemochromatosis. Dig Liver Dis 2003;35:172-178.
- 110. Eberle D, Clement K, Meyre D, Sahbatou M, Vaxillaire M, Le Gall A, Ferre P, Basdevant A, Froguel P, Foufelle F: SREBF-1 gene polymorphisms are associated with obesity and type 2 diabetes in French obese and diabetic cohorts. Diabetes 2004;53:2153-2157.
- 111. Gambino R, Cassader M, Pagano G, Durazzo M, Musso G: Polymorphism in microsomal triglyceride transfer protein: a link between liver disease and atherogenic postprandial lipid profile in NASH? Hepatology 2007;45:1097-1107.
- 112. Day CP, James OF: Steatohepatitis: a tale of two "hits"? Gastroenterology 1998;114:842-845.
- 113. Reddy JK, Rao MS: Lipid metabolism and liver inflammation. II. Fatty liver disease and fatty acid oxidation. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2006;290:G852-858.
- 114. Trauner M, Arrese M, Wagner M: Fatty liver and lipotoxicity. Biochim Biophys Acta 2009.
- 115. Leclercq IA, Farrell GC, Field J, Bell DR, Gonzalez FJ, Robertson GR: CYP2E1 and CYP4A as microsomal catalysts of lipid peroxides in murine nonalcoholic steatohepatitis. J Clin Invest 2000;105:1067-1075.
- 116. Ito M, Suzuki J, Tsujioka S, Sasaki M, Gomori A, Shirakura T, Hirose H, Ito M, Ishihara A, Iwaasa H, Kanatani A: Longitudinal analysis of murine steatohepatitis model induced by chronic exposure to high-fat diet. Hepatol Res 2007;37:50-57.
- 117. Herling AW, Burger H, Schubert G, Hemmerle H, Schaefer H, Kramer W: Alterations of carbohydrate and lipid intermediary metabolism during inhibition of glucose-6-phosphatase in rats. Eur J Pharmacol 1999;386:75-82.
- 118. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH: A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. J Biol Chem 1957;226:497-509.
- 119. Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970;227:680-685.

- 120. Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976;72:248-254.
- 121. Renart J, Reiser J, Stark GR: Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethylpaper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. Proc Natl Acad Sci U S A 1979;76:3116-3120.
- 122. Towbin H, Staehelin T, Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci U S A 1979;76:4350-4354.
- 123. Stadtman ER: Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. Annu Rev Biochem 1993;62:797-821.
- 124. Haghdoost S, Czene S, Naslund I, Skog S, Harms-Ringdahl M: Extracellular 8-oxo-dG as a sensitive parameter for oxidative stress in vivo and in vitro. Free Radic Res 2005;39:153-162.
- 125. Vogel A, Aslan JE, Willenbring H, Klein C, Finegold M, Mount H, Thomas G, Grompe M: Sustained phosphorylation of Bid is a marker for resistance to Fas-induced apoptosis during chronic liver diseases. Gastroenterology 2006;130:104-119.
- 126. Eriksson CJ, Sippel HW, Forsander OA: The determination of acetaldehyde in biological samples by head-space gas chromatography. Anal Biochem 1977;80:116-124.
- 127. You M, Matsumoto M, Pacold CM, Cho WK, Crabb DW: The role of AMP-activated protein kinase in the action of ethanol in the liver. Gastroenterology 2004;127:1798-1808.
- 128. Albano E: Alcohol, oxidative stress and free radical damage. Proc Nutr Soc 2006;65:278-290.
- 129. Lluis JM, Colell A, Garcia-Ruiz C, Kaplowitz N, Fernandez-Checa JC: Acetaldehyde impairs mitochondrial glutathione transport in HepG2 cells through endoplasmic reticulum stress. Gastroenterology 2003;124:708-724.
- 130. Chan K, Han XD, Kan YW: An important function of Nrf2 in combating oxidative stress: detoxification of acetaminophen. Proc Natl Acad Sci U S A 2001;98:4611-4616.
- Zhou Z, Wang L, Song Z, Lambert JC, McClain CJ, Kang YJ: A critical involvement of oxidative stress in acute alcohol-induced hepatic TNF-alpha production. Am J Pathol 2003;163:1137-1146.
- 132. Kono H, Rusyn I, Yin M, Gabele E, Yamashina S, Dikalova A, Kadiiska MB, Connor HD, Mason RP, Segal BH, Bradford BU, Holland SM, Thurman RG: NADPH oxidasederived free radicals are key oxidants in alcohol-induced liver disease. J Clin Invest 2000;106:867-872.
- 133. Rinella ME, Elias MS, Smolak RR, Fu T, Borensztajn J, Green RM: Mechanisms of hepatic steatosis in mice fed a lipogenic methionine choline-deficient diet. J Lipid Res 2008;49:1068-1076.
- 134. Sozio M, Crabb DW: Alcohol and lipid metabolism. Am J Physiol Endocrinol Metab 2008;295:E10-16.
- 135. Eberle D, Hegarty B, Bossard P, Ferre P, Foufelle F: SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. Biochimie 2004;86:839-848.
- 136. Horton JD, Shimomura I, Ikemoto S, Bashmakov Y, Hammer RE: Overexpression of sterol regulatory element-binding protein-1a in mouse adipose tissue produces adipocyte hypertrophy, increased fatty acid secretion, and fatty liver. J Biol Chem 2003;278:36652-36660.
- 137. Kaplowitz N, Ji C: Unfolding new mechanisms of alcoholic liver disease in the endoplasmic reticulum. J Gastroenterol Hepatol 2006;21 Suppl 3:S7-9.
- 138. Ji C, Chan C, Kaplowitz N: Predominant role of sterol response element binding proteins (SREBP) lipogenic pathways in hepatic steatosis in the murine intragastric ethanol feeding model. J Hepatol 2006;45:717-724.
- 139. Crabb DW: Alcohol deranges hepatic lipid metabolism via altered transcriptional regulation. Trans Am Clin Climatol Assoc 2004;115:273-287.
- 140. Yin HQ, Kim M, Kim JH, Kong G, Kang KS, Kim HL, Yoon BI, Lee MO, Lee BH: Differential gene expression and lipid metabolism in fatty liver induced by acute ethanol treatment in mice. Toxicol Appl Pharmacol 2007;223:225-233.
- 141. Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, Moller DE: Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. J Clin Invest 2001;108:1167-1174.

- 142. Saha AK, Ruderman NB: Malonyl-CoA and AMP-activated protein kinase: an expanding partnership. Mol Cell Biochem 2003;253:65-70.
- 143. Garcia-Villafranca J, Guillen A, Castro J: Ethanol consumption impairs regulation of fatty acid metabolism by decreasing the activity of AMP-activated protein kinase in rat liver. Biochimie 2008;90:460-466.
- 144. You M, Fischer M, Deeg MA, Crabb DW: Ethanol induces fatty acid synthesis pathways by activation of sterol regulatory element-binding protein (SREBP). J Biol Chem 2002;277:29342-29347.
- 145. Ronis MJ, Butura A, Sampey BP, Shankar K, Prior RL, Korourian S, Albano E, Ingelman-Sundberg M, Petersen DR, Badger TM: Effects of N-acetylcysteine on ethanolinduced hepatotoxicity in rats fed via total enteral nutrition. Free Radic Biol Med 2005;39:619-630.
- 146. Sekhar KR, Crooks PA, Sonar VN, Friedman DB, Chan JY, Meredith MJ, Starnes JH, Kelton KR, Summar SR, Sasi S, Freeman ML: NADPH oxidase activity is essential for Keap1/Nrf2-mediated induction of GCLC in response to 2-indol-3-ylmethylenequinuclidin-3-ols. Cancer Res 2003;63:5636-5645.
- 147. Farfan Labonne BE, Gutierrez M, Gomez-Quiroz LE, Konigsberg Fainstein M, Bucio L, Souza V, Flores O, Ortiz V, Hernandez E, Kershenobich D, Gutierrez-Ruiz MC: Acetaldehyde-induced mitochondrial dysfunction sensitizes hepatocytes to oxidative damage. Cell Biol Toxicol 2009;25:599-609.
- 148. Fujimoto M, Uemura M, Nakatani Y, Tsujita S, Hoppo K, Tamagawa T, Kitano H, Kikukawa M, Ann T, Ishii Y, Kojima H, Sakurai S, Tanaka R, Namisaki T, Noguchi R, Higashino T, Kikuchi E, Nishimura K, Takaya A, Fukui H: Plasma endotoxin and serum cytokine levels in patients with alcoholic hepatitis: relation to severity of liver disturbance. Alcohol Clin Exp Res 2000;24:48S-54S.
- Chow JC, Young DW, Golenbock DT, Christ WJ, Gusovsky F: Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. J Biol Chem 1999;274:10689-10692.
- 150. Visintin A, Mazzoni A, Spitzer JA, Segal DM: Secreted MD-2 is a large polymeric protein that efficiently confers lipopolysaccharide sensitivity to Toll-like receptor 4. Proc Natl Acad Sci U S A 2001;98:12156-12161.
- 151. Uesugi T, Froh M, Arteel GE, Bradford BU, Thurman RG: Toll-like receptor 4 is involved in the mechanism of early alcohol-induced liver injury in mice. Hepatology 2001;34:101-108.
- 152. Hines IN, Wheeler MD: Recent advances in alcoholic liver disease III. Role of the innate immune response in alcoholic hepatitis. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2004;287:G310-314.
- 153. Khoruts A, Stahnke L, McClain CJ, Logan G, Allen JI: Circulating tumor necrosis factor, interleukin-1 and interleukin-6 concentrations in chronic alcoholic patients. Hepatology 1991;13:267-276.
- 154. Pastorino JG, Hoek JB: Ethanol potentiates tumor necrosis factor-alpha cytotoxicity in hepatoma cells and primary rat hepatocytes by promoting induction of the mitochondrial permeability transition. Hepatology 2000;31:1141-1152.
- 155. Colell A, Garcia-Ruiz C, Miranda M, Ardite E, Mari M, Morales A, Corrales F, Kaplowitz N, Fernandez-Checa JC: Selective glutathione depletion of mitochondria by ethanol sensitizes hepatocytes to tumor necrosis factor. Gastroenterology 1998;115:1541-1551.
- 156. Shaulian E, Karin M: AP-1 in cell proliferation and survival. Oncogene 2001;20:2390-2400.
- 157. Wheeler MD, Thurman RG: Up-regulation of CD14 in liver caused by acute ethanol involves oxidant-dependent AP-1 pathway. J Biol Chem 2003;278:8435-8441.
- 158. Eferl R, Ricci R, Kenner L, Zenz R, David JP, Rath M, Wagner EF: Liver tumor development. c-Jun antagonizes the proapoptotic activity of p53. Cell 2003;112:181-192.
- 159. Kerr IM, Costa-Pereira AP, Lillemeier BF, Strobl B: Of JAKs, STATs, blind watchmakers, jeeps and trains. FEBS Lett 2003;546:1-5.
- 160. Norkina O, Dolganiuc A, Shapiro T, Kodys K, Mandrekar P, Szabo G: Acute alcohol activates STAT3, AP-1, and Sp-1 transcription factors via the family of Src kinases to promote IL-10 production in human monocytes. J Leukoc Biol 2007;82:752-762.
- 161. Norkina O, Dolganiuc A, Catalano D, Kodys K, Mandrekar P, Syed A, Efros M, Szabo G: Acute alcohol intake induces SOCS1 and SOCS3 and inhibits cytokine-induced

STAT1 and STAT3 signaling in human monocytes. Alcohol Clin Exp Res 2008;32:1565-1573.

- 162. Horiguchi N, Ishac EJ, Gao B: Liver regeneration is suppressed in alcoholic cirrhosis: correlation with decreased STAT3 activation. Alcohol 2007;41:271-280.
- 163. Horiguchi N, Wang L, Mukhopadhyay P, Park O, Jeong WI, Lafdil F, Osei-Hyiaman D, Moh A, Fu XY, Pacher P, Kunos G, Gao B: Cell type-dependent pro- and antiinflammatory role of signal transducer and activator of transcription 3 in alcoholic liver injury. Gastroenterology 2008;134:1148-1158.
- 164. Thimmulappa RK, Scollick C, Traore K, Yates M, Trush MA, Liby KT, Sporn MB, Yamamoto M, Kensler TW, Biswal S: Nrf2-dependent protection from LPS induced inflammatory response and mortality by CDDO-Imidazolide. Biochem Biophys Res Commun 2006;351:883-889.
- 165. Kishore R, Hill JR, McMullen MR, Frenkel J, Nagy LE: ERK1/2 and Egr-1 contribute to increased TNF-alpha production in rat Kupffer cells after chronic ethanol feeding. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2002;282:G6-15.
- Oak S, Mandrekar P, Catalano D, Kodys K, Szabo G: TLR2- and TLR4-mediated signals determine attenuation or augmentation of inflammation by acute alcohol in monocytes. J Immunol 2006;176:7628-7635.
- 167. Rizki G, Arnaboldi L, Gabrielli B, Yan J, Lee GS, Ng RK, Turner SM, Badger TM, Pitas RE, Maher JJ: Mice fed a lipogenic methionine-choline-deficient diet develop hypermetabolism coincident with hepatic suppression of SCD-1. J Lipid Res 2006;47:2280-2290.
- Tanaka Y, Aleksunes LM, Yeager RL, Gyamfi MA, Esterly N, Guo GL, Klaassen CD: NF-E2-related factor 2 inhibits lipid accumulation and oxidative stress in mice fed a high-fat diet. J Pharmacol Exp Ther 2008;325:655-664.
- 169. Kim S, Sohn I, Ahn JI, Lee KH, Lee YS, Lee YS: Hepatic gene expression profiles in a long-term high-fat diet-induced obesity mouse model. Gene 2004;340:99-109.
- 170. Li ZZ, Berk M, McIntyre TM, Feldstein AE: Hepatic lipid partitioning and liver damage in nonalcoholic fatty liver disease: role of stearoyl-CoA desaturase. J Biol Chem 2009;284:5637-5644.
- 171. Ricchi M, Odoardi MR, Carulli L, Anzivino C, Ballestri S, Pinetti A, Fantoni LI, Marra F, Bertolotti M, Banni S, Lonardo A, Carulli N, Loria P: Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes. J Gastroenterol Hepatol 2009;24:830-840.
- 172. Listenberger LL, Han X, Lewis SE, Cases S, Farese RV, Jr., Ory DS, Schaffer JE: Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. Proc Natl Acad Sci U S A 2003;100:3077-3082.
- 173. Ntambi JM, Miyazaki M, Dobrzyn A: Regulation of stearoyl-CoA desaturase expression. Lipids 2004;39:1061-1065.
- 174. Chen C, Shah YM, Morimura K, Krausz KW, Miyazaki M, Richardson TA, Morgan ET, Ntambi JM, Idle JR, Gonzalez FJ: Metabolomics reveals that hepatic stearoyl-CoA desaturase 1 downregulation exacerbates inflammation and acute colitis. Cell Metab 2008;7:135-147.
- 175. Gutierrez-Juarez R, Pocai A, Mulas C, Ono H, Bhanot S, Monia BP, Rossetti L: Critical role of stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD1) in the onset of diet-induced hepatic insulin resistance. J Clin Invest 2006;116:1686-1695.
- 176. Jiang G, Li Z, Liu F, Ellsworth K, Dallas-Yang Q, Wu M, Ronan J, Esau C, Murphy C, Szalkowski D, Bergeron R, Doebber T, Zhang BB: Prevention of obesity in mice by antisense oligonucleotide inhibitors of stearoyl-CoA desaturase-1. J Clin Invest 2005;115:1030-1038.
- 177. Miyazaki M, Kim YC, Ntambi JM: A lipogenic diet in mice with a disruption of the stearoyl-CoA desaturase 1 gene reveals a stringent requirement of endogenous monounsaturated fatty acids for triglyceride synthesis. J Lipid Res 2001;42:1018-1024.
- 178. Ntambi JM, Miyazaki M, Stoehr JP, Lan H, Kendziorski CM, Yandell BS, Song Y, Cohen P, Friedman JM, Attie AD: Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity. Proc Natl Acad Sci U S A 2002;99:11482-11486.
- 179. Chakravarthy MV, Pan Z, Zhu Y, Tordjman K, Schneider JG, Coleman T, Turk J, Semenkovich CF: "New" hepatic fat activates PPARalpha to maintain glucose, lipid, and cholesterol homeostasis. Cell Metab 2005;1:309-322.

- 180. Gavrilova O, Haluzik M, Matsusue K, Cutson JJ, Johnson L, Dietz KR, Nicol CJ, Vinson C, Gonzalez FJ, Reitman ML: Liver peroxisome proliferator-activated receptor gamma contributes to hepatic steatosis, triglyceride clearance, and regulation of body fat mass. J Biol Chem 2003;278:34268-34276.
- 181. Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA: An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). J Biol Chem 1995;270:12953-12956.
- 182. Gurnell M, Savage DB, Chatterjee VK, O'Rahilly S: The metabolic syndrome: peroxisome proliferator-activated receptor gamma and its therapeutic modulation. J Clin Endocrinol Metab 2003;88:2412-2421.
- 183. Hevener AL, He W, Barak Y, Le J, Bandyopadhyay G, Olson P, Wilkes J, Evans RM, Olefsky J: Muscle-specific Pparg deletion causes insulin resistance. Nat Med 2003;9:1491-1497.
- 184. He W, Barak Y, Hevener A, Olson P, Liao D, Le J, Nelson M, Ong E, Olefsky JM, Evans RM: Adipose-specific peroxisome proliferator-activated receptor gamma knockout causes insulin resistance in fat and liver but not in muscle. Proc Natl Acad Sci U S A 2003;100:15712-15717.
- 185. Dandona P, Aljada A, Bandyopadhyay A: Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. Trends Immunol 2004;25:4-7.
- 186. Daynes RA, Jones DC: Emerging roles of PPARs in inflammation and immunity. Nat Rev Immunol 2002;2:748-759.
- 187. Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM: IRS-1mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesityinduced insulin resistance. Science 1996;271:665-668.
- 188. Peraldi P, Xu M, Spiegelman BM: Thiazolidinediones block tumor necrosis factor-alphainduced inhibition of insulin signaling. J Clin Invest 1997;100:1863-1869.
- 189. Tanaka N, Aoyama T: [PPAR and NASH]. Nippon Rinsho 2006;64:1089-1094.
- Chowdhry S, Nazmy MH, Meakin PJ, Dinkova-Kostova AT, Walsh SV, Tsujita T, Dillon JF, Ashford ML, Hayes JD: Loss of Nrf2 markedly exacerbates nonalcoholic steatohepatitis. Free Radic Biol Med 2009.
- 191. He CH, Gong P, Hu B, Stewart D, Choi ME, Choi AM, Alam J: Identification of activating transcription factor 4 (ATF4) as an Nrf2-interacting protein. Implication for heme oxy-genase-1 gene regulation. J Biol Chem 2001;276:20858-20865.
- 192. Hayes JD, McMahon M: NRF2 and KEAP1 mutations: permanent activation of an adaptive response in cancer. Trends Biochem Sci 2009;34:176-188.
- 193. Reddy NM, Kleeberger SR, Cho HY, Yamamoto M, Kensler TW, Biswal S, Reddy SP: Deficiency in Nrf2-GSH signaling impairs type II cell growth and enhances sensitivity to oxidants. Am J Respir Cell Mol Biol 2007;37:3-8.
- 194. Harvey CJ, Thimmulappa RK, Singh A, Blake DJ, Ling G, Wakabayashi N, Fujii J, Myers A, Biswal S: Nrf2-regulated glutathione recycling independent of biosynthesis is critical for cell survival during oxidative stress. Free Radic Biol Med 2009;46:443-453.
- 195. Ikura Y, Ohsawa M, Suekane T, Fukushima H, Itabe H, Jomura H, Nishiguchi S, Inoue T, Naruko T, Ehara S, Kawada N, Arakawa T, Ueda M: Localization of oxidized phosphatidylcholine in nonalcoholic fatty liver disease: impact on disease progression. Hepatology 2006;43:506-514.
- 196. Beraza N, Malato Y, Vander Borght S, Liedtke C, Wasmuth HE, Dreano M, de Vos R, Roskams T, Trautwein C: Pharmacological IKK2 inhibition blocks liver steatosis and initiation of non-alcoholic steatohepatitis. Gut 2008;57:655-663.
- 197. Videla LA, Tapia G, Rodrigo R, Pettinelli P, Haim D, Santibanez C, Araya AV, Smok G, Csendes A, Gutierrez L, Rojas J, Castillo J, Korn O, Maluenda F, Diaz JC, Rencoret G, Poniachik J: Liver NF-kappaB and AP-1 DNA binding in obese patients. Obesity (Silver Spring) 2009;17:973-979.
- 198. Rutkowski DT, Wu J, Back SH, Callaghan MU, Ferris SP, Iqbal J, Clark R, Miao H, Hassler JR, Fornek J, Katze MG, Hussain MM, Song B, Swathirajan J, Wang J, Yau GD, Kaufman RJ: UPR pathways combine to prevent hepatic steatosis caused by ER stress-mediated suppression of transcriptional master regulators. Dev Cell 2008;15:829-840.

- 199. Starr R, Willson TA, Viney EM, Murray LJ, Rayner JR, Jenkins BJ, Gonda TJ, Alexander WS, Metcalf D, Nicola NA, Hilton DJ: A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. Nature 1997;387:917-921.
- 200. Lehmann U, Schmitz J, Weissenbach M, Sobota RM, Hortner M, Friederichs K, Behrmann I, Tsiaris W, Sasaki A, Schneider-Mergener J, Yoshimura A, Neel BG, Heinrich PC, Schaper F: SHP2 and SOCS3 contribute to Tyr-759-dependent attenuation of inter-leukin-6 signaling through gp130. J Biol Chem 2003;278:661-671.
- 201. Yasukawa H, Ohishi M, Mori H, Murakami M, Chinen T, Aki D, Hanada T, Takeda K, Akira S, Hoshijima M, Hirano T, Chien KR, Yoshimura A: IL-6 induces an antiinflammatory response in the absence of SOCS3 in macrophages. Nat Immunol 2003;4:551-556.
- 202. Murray PJ: The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. J Immunol 2007;178:2623-2629.
- 203. Johnston JA, O'Shea JJ: Matching SOCS with function. Nat Immunol 2003;4:507-509.
- 204. Feuerer M, Herrero L, Cipolletta D, Naaz A, Wong J, Nayer A, Lee J, Goldfine AB, Benoist C, Shoelson S, Mathis D: Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. Nat Med 2009;15:930-939.
- 205. Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Eto K, Yamashita H, Ohsugi M, Otsu M, Hara K, Ueki K, Sugiura S, Yoshimura K, Kadowaki T, Nagai R: CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. Nat Med 2009;15:914-920.
- 206. Winer S, Chan Y, Paltser G, Truong D, Tsui H, Bahrami J, Dorfman R, Wang Y, Zielenski J, Mastronardi F, Maezawa Y, Drucker DJ, Engleman E, Winer D, Dosch HM: Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. Nat Med 2009;15:921-929.
- 207. Parola M, Pinzani M, Casini A, Albano E, Poli G, Gentilini A, Gentilini P, Dianzani MU: Stimulation of lipid peroxidation or 4-hydroxynonenal treatment increases procollagen alpha 1 (I) gene expression in human liver fat-storing cells. Biochem Biophys Res Commun 1993;194:1044-1050.
- 208. Bissell DM, Roulot D, George J: Transforming growth factor beta and the liver. Hepatology 2001;34:859-867.
- 209. Witek RP, Stone WC, Karaca FG, Syn WK, Pereira TA, Agboola KM, Omenetti A, Jung Y, Teaberry V, Choi SS, Guy CD, Pollard J, Charlton P, Diehl AM: Pan-caspase inhibitor VX-166 reduces fibrosis in an animal model of nonalcoholic steatohepatitis. Hepatology 2009;50:1421-1430.
- 210. Nanji AA: Animal models of nonalcoholic fatty liver disease and steatohepatitis. Clin Liver Dis 2004;8:559-574, ix.
- 211. Koteish A, Diehl AM: Animal models of steatosis. Semin Liver Dis 2001;21:89-104.
- 212. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM: Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature 1994;372:425-432.
- 213. Yao ZM, Vance DE: The active synthesis of phosphatidylcholine is required for very low density lipoprotein secretion from rat hepatocytes. J Biol Chem 1988;263:2998-3004.
- 214. Vance JE, Vance DE: The role of phosphatidylcholine biosynthesis in the secretion of lipoproteins from hepatocytes. Can J Biochem Cell Biol 1985;63:870-881.
- 215. Kulinski A, Vance DE, Vance JE: A choline-deficient diet in mice inhibits neither the CDP-choline pathway for phosphatidylcholine synthesis in hepatocytes nor apolipoprotein B secretion. J Biol Chem 2004;279:23916-23924.
- 216. Weltman MD, Farrell GC, Liddle C: Increased hepatocyte CYP2E1 expression in a rat nutritional model of hepatic steatosis with inflammation. Gastroenterology 1996;111:1645-1653.
- 217. Ip E, Farrell G, Hall P, Robertson G, Leclercq I: Administration of the potent PPARalpha agonist, Wy-14,643, reverses nutritional fibrosis and steatohepatitis in mice. Hepatology 2004;39:1286-1296.
- 218. Rinella ME, Green RM: The methionine-choline deficient dietary model of steatohepatitis does not exhibit insulin resistance. J Hepatol 2004;40:47-51.

Lebenslauf/Vita

Jutta Lamlé, geb. 23.01.1980, Volkmarsen

Schulische Ausbildung

1986–1990	Nicolai Schule, Mengeringhausen	

1990–1999 Christian-Rauch-Schule, Bad Arolsen

Akademische Laufbahn

- 1999–2005 Universität Bielefeld, Dipl.-Biotech.
- 2005–heute Medizinische Hochschule Hannover

Veröffentlichungen

Rapamycin delays tumor development in murine livers by inhibiting proliferation of hepatocytes with DNA damage.

Buitrago-Molina LE, Pothiraju D, Lamlé J, Marhenke S, Kossatz U, Breuhahn K, Manns MP, Malek N, Vogel A.

Hepatology. 2009 Aug;50(2):500-9.

Activation of nuclear factor E2-related factor 2 in hereditary tyrosinemia type 1 and its role in survival and tumor development.

Marhenke S, Lamlé J, Buitrago-Molina LE, Cañón JM, Geffers R, Finegold M, Sporn M, Yamamoto M, Manns MP, Grompe M, Vogel A.

Hepatology. 2008 Aug;48(2):487-96.

Nuclear factor-eythroid 2-related factor 2 prevents alcohol-induced fulminant liver injury.

Lamlé J, Marhenke S, Borlak J, von Wasielewski R, Eriksson CJ, Geffers R, Manns MP, Yamamoto M, Vogel A.

Gastroenterology. 2008 Apr;134(4):1159-68.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Arndt Vogel, der mir mit der Bearbeitung dieses Themas die Möglichkeit zur Durchführung meiner Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe gegeben hat. Mit seiner kontinuierlichen und engagierten Förderung sowie seiner Fähigkeit wissenschaftliche Begeisterung zu wecken hat er entscheidend zu meiner persönlichen und beruflichen Entwicklung auf dem Gebiet der Forschung beigetragen.

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Michael P. Manns, Direktor der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie an der Medizinischen Hochschule Hannover möchte ich mich dafür bedanken, dass ich meine Doktorarbeit unter seiner Leitung durchführen durfte. Die großartigen Möglichkeiten an seinem Institut war ein Garant für die erfolgreiche Durchführung dieser Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Dieter Schmoll von der Sanofi-Aventis Deutschland GmbH möchte ich mich für die unkomplizierte und schnelle Analyse der Lipid- und Fettsäureanalysen ebenso bedanken, wie bei Herrn Dr. Robert Geffers für die Durchführung der mRNA Mikroarrays in der Mikroarray Core Facility am Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung und seiner anschließenden Unterstützung bei der Auswertung der Datenvielfalt.

Dr. Gustav Meyer danke ich, dass er mir die Möglichkeit zur Durchführung der Enzymaktivitätsmessungen in seinen Räumlichkeiten gegeben und mir die Bedienung der mittlerweile in die Jahre gekommenen Schreiber nahegebracht hat.

Selbstverständlich möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe und des Instituts bedanken, ohne deren Einsatz und Unterstützung die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Mein besonderer Dank geht dabei an Silke Marhenke für die großartige anfängliche Einarbeitung und die Vermittlung der Grundlagen im Umgang mit den Versuchstieren. Die danach folgenden fachlichen wie auch außer-fachlichen Diskussionen mit ihr haben meinen wissenschaftlichen Horizont erweitert und mir in mancher Situation psychologischen Beistand gegeben. Sie war mir eine unverzichtbare menschliche Stütze auf unserem gemeinsamen Weg. Die zahlreichen Stunden, die wir zusammen im Labor verbracht haben, werden mir stets in guter Erinnerung bleiben.

Ein weiterer Dank, der mir sehr am Herzen liegt, gilt Herrn Dr. med. Harald Schütt, der mir gerade in der letzten schwierigen Phase des Zusammenschreibens immer zur Seite stand, mich fachlich unterstützt und emotional aufgefangen hat. Sein Glauben in mich und meine Arbeit hat mir dafür die notwendige Kraft gegeben.

Insbesondere möchte ich an dieser Stelle auch meinen Eltern danken, deren selbstverständliche und kompromisslose Liebe und Unterstützung allgegenwärtig war, ist und immer sein wird. Sie waren mir stets ein Pol der Ruhe und haben mit ihrem Glauben an mich auch meinen Glauben an mich selbst gestärkt – Danke für alles!

Erklärung zur Dissertation

Hierdurch erkläre ich, dass ich meine Dissertation selbständig verfasst und die benutzten Hilfsmittel und Quellen sowie gegebenenfalls die zu Hilfeleistungen herangezogenen Institutionen vollständig angegeben habe.

Die Dissertation wurde nicht schon als Masterarbeit, Diplomarbeit oder andere Prüfungsarbeit verwendet.

Ort, Datum, Unterschrift