

Aus der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Die Bedeutung der IL-1-Zytokinfamilie für die Entwicklung der  
Metabolischen Dysfunktion-assoziierten steatotischen Lebererkrankung

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
Medizin  
der Universitätsmedizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Lea Josefin Hofmann  
aus Dernbach

Mainz, 2025

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. med. Philipp Drees

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 29. August 2025

Nachnutzungslizenz: CC-BY-ND-4.0

Meinen Eltern

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>VI</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Literaturdiskussion .....</b>	<b>4</b>
2.1 Das Immunsystem und die IL-1-Zytokinfamilie .....	4
2.1.1 Übersicht.....	4
2.1.2 IL-1 .....	8
2.1.3 IL-33.....	10
2.1.4 IL-36.....	11
2.2 Leberstoffwechsel und Insulinhaushalt.....	13
2.2.1 Aufbau, Physiologie und Biochemie der Leber .....	13
2.2.2 Insulinwirkung und -resistenz.....	19
2.3 Die Metabolische Dysfunktion-assoziierte steatotische Lebererkrankung .....	23
2.3.1 Definition .....	23
2.3.2 Epidemiologie.....	24
2.3.3 Ätiologie und Pathogenese .....	25
2.3.4 Klinik .....	28
2.3.5 Diagnostik .....	28
2.3.6 Therapie.....	30
2.3.7 Prognose.....	31
2.4 Die Rolle der IL-1-Zytokinfamilie in der Pathogenese der MASLD .....	33
<b>3. Material und Methoden.....</b>	<b>38</b>
3.1 Material.....	38
3.1.1 Zellmaterial.....	38
3.1.2 Zellkulturmedien und -zusätze .....	39

3.1.3 Primer .....	40
3.1.4 Antikörper.....	41
3.1.5 Kits .....	41
3.1.6 Chemikalien .....	42
3.1.7 Verbrauchsmaterialien .....	43
3.1.8 Geräte .....	44
3.1.9 Datenverarbeitungsprogramme.....	46
3.2 Methoden .....	47
3.2.1 Zellkultur .....	47
3.2.1.1 HepG2-Zellen.....	47
3.2.1.1.1 Kultivierung und Passagierung.....	47
3.2.1.1.2 Bestimmung der Zellzahl.....	48
3.2.1.1.3 Kryokonservierung und Rekultivierung.....	49
3.2.1.2 Primäre humane Hepatozyten.....	50
3.2.2 Stimulationsexperimente .....	50
3.2.3 Analyse des Zellüberlebens mittels MTT-Assay.....	51
3.2.4 Analyse der Triglyzerid-Akkumulation .....	52
3.2.5 Analyse der Genexpression .....	53
3.2.5.1 RNA-Isolation .....	53
3.2.5.2 cDNA-Synthese.....	54
3.2.5.3 Quantitative Real Time- PCR.....	55
3.2.6 Proteinanalyse .....	57
3.2.6.1 Proteinisolation.....	57
3.2.6.2 Proteinmessung nach Bradford.....	58
3.2.6.3 Proteingelelektrophorese mittels SDS-PAGE.....	58
3.2.6.4 Western Blot und Antikörperdetektion.....	60
3.2.6.5 ELISA.....	62
3.2.7 Statistische Auswertung.....	63

<b>4. Ergebnisse</b> .....	<b>64</b>
4.1 Stimulation der Hepatozyten mit Ölsäure .....	64
4.1.1 Lipidakkumulation in HepG2-Zellen .....	64
4.1.2 Zytotoxizität der Fettsäurestimulation .....	64
4.1.3 Beeinflussung der Genexpression in HepG2-Zellen und primären humanen Hepatozyten .....	66
4.2 Stimulation der Hepatozyten mit Zytokinen der IL-1-Familie .....	69
4.2.1 Genexpression .....	69
4.2.2 Proteinsynthese .....	74
4.3 Kombinierte Stimulation .....	76
4.3.1 Einfluss auf den Lipidstoffwechsel .....	76
4.3.2 Einfluss auf inflammatorische Antwort .....	78
4.4 Wirksamkeit monoklonaler rekombinanter Antikörper gegen IL-1RacP .....	80
<b>5. Diskussion</b> .....	<b>83</b>
5.1 Humane Hepatozyten werden durch IL-1 und IL-36 zu einer pro- inflammatorischen Antwort angeregt .....	83
5.2 Die Fettsäure-induzierte Steatose führt im In-vitro-Modell zu einer Umstellung des hepatozellulären Stoffwechsels .....	85
5.3 Interferenz von Fettsäure-induzierter Steatose und Zytokin-induzierter Hepatitis .....	87
5.4 Möglicher Einsatz von IL-1RacP-Antikörpern und Ausblick .....	89
<b>6. Zusammenfassung</b> .....	<b>93</b>
<b>7. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>95</b>
<b>8. Danksagung</b> .....	<b>114</b>
<b>9. Tabellarischer Lebenslauf</b> .....	<b>115</b>

# Abkürzungsverzeichnis

## SI-Einheiten

Größe	Größensymbol	Einheit	Einheitensymbol
Masse	m	Kilogramm	kg
Länge	l	Meter	m
Zeit	t	Sekunde	s
Temperatur	T	Kelvin	K
Stromstärke	I	Ampère	A
Stoffmenge	n	Mol	mol
Lichtstärke	I <sub>v</sub>	Candela	cd

## Abgeleitete Einheiten

Größe	Größensymbol	Einheit	Einheitensymbol
Volumen	V	Liter	L
Masse	m	Atomare Masseneinheit Dalton	u  Da
Massen- konzentration	C <sub>m</sub>	Gramm pro Liter	g/L
Stoffmengen- konzentration	c	Molarität	M = mol/L
Elektrische Spannung	U	Volt	V
Drehzahl	n	revolutions per minute	rpm

## Zehnerpotenzen

Dezimale Teile und Vielfache	Symbol	Präfix
10 <sup>-15</sup>	f	Femto-
10 <sup>-12</sup>	p	Pico-
10 <sup>-9</sup>	n	Nano-
10 <sup>-6</sup>	μ	Mikro-
10 <sup>-3</sup>	m	Milli-
10 <sup>-2</sup>	c	Zenti-
10 <sup>-1</sup>	d	Dezi-
10 <sup>3</sup>	k	Kilo-
10 <sup>6</sup>	M	Mega-
10 <sup>9</sup>	G	Giga-
10 <sup>12</sup>	T	Tera-
10 <sup>15</sup>	P	Peta-

## Weitere Abkürzungen

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
AASLD	American Association for the Study of Liver Disease
ACC	Acetyl-CoA-Synthetase
ALD	Alcohol-associated Liver Disease
AP-1	activator protein 1
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovine serum albumin
CCL2 (syn. MCP-1)	Chemokine (C-C Motif) Ligand 2 (syn. Monocyte Chemotactic Protein 1)
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary desoxyribonucleic acid
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
CPT-1 $\alpha$	Carnithin-Palmitoyl-Transferase 1 $\alpha$
DAG	Diacylglycerin
DAMP	danger-associated molecular pattern
DC	dendritic cell
DGAT	diacylglycerol acyltransferase
DGVS	Deutsche Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
dNTP	2'-Desoxyribonucleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EASL	European Association for the Study of the Liver
ECL	Elektrochemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	Extracellular-signal regulated kinase
FAS	fatty acid synthase
FATP	fatty acid transport protein
FCS	fetal calf serum
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GLP-1	Glucagon-like peptide 1
GLUT	glucose transporter
HCC	hepatocellular carcinoma
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HEV	High endothelial venules
HFD	high fat diet
HRP	horse raddish peroxidase
Ig	immunoglobulin
IKK	I $\kappa$ B kinase
IL-1	Interleukin-1
IL-1RA	IL-1 receptor antagonist
IL-1RacP	IL-1 receptor accessory protein
ILC	innate lymphoid cell
INF- $\gamma$	interferon- $\gamma$

## Abkürzungsverzeichnis

---

I $\kappa$ B	inhibitor of nuclear factor kappa B
JNK	c-Jun N-terminal kinase
MAFL	Metabolic Dysfunction-associated Fatty Liver
MALT	mucosa associated lymphoid tissue
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MASH	Metabolic Dysfunction-associated Steatohepatitis
MASLD	Metabolic Dysfunction-associated Steatotic Liver Disease
MetALD	Metabolic Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease with increased alcohol intake
MTT	3-(4,5Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MyD88	myeloid differentiation primary response protein 88
NAFLD	Non-alcoholic fatty liver disease
NASH	Non-alcoholic steatohepatitis
NF- $\kappa$ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NLRP3	nucleotide-binding domain, leucine-rich-containing family, pyrin domain-containing-3
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PGC-1 $\alpha$	peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor
PRR	pattern recognition receptor
qRT-PCR	quantative real time PCR
Raf	rapidly accelerated fibrosarcoma
Ras	rat sarcoma
RELA	V-Rel Avian Reticuloendotheliosis Viral Oncogene Homolog A
RIPA	radioimmunoprecipitation assay
RNA	ribonucleic acid
RNase	ribonuklease
ROS	reactive oxygen species
SCD	Stearoyl-CoA-Desaturase
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SEM	standard error of mean
SLD	Steatotic Liver Disease
SREBP-1c	sterol regulatory element binding protein 1c
TAG	Triacylglycerine
Taq	Thermus aquaticus
TBS-T	Tris-buffered saline with Tween20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF- $\beta$	transforming growth factor $\beta$
TIR	Toll/IL-1R-Domäne
TNF $\alpha$	tumor necrosis factor $\alpha$
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
WHO	World Health Organization

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Synthese, Wirkweise und 3D-Struktur von Zytokinen der IL-1-Familie ..	7
Abbildung 2: Vereinfachte Übersicht des Leberstoffwechsels .....	18
Abbildung 3: Signaltransduktionskaskade des Insulin-Rezeptors.....	22
Abbildung 4: Übersicht zu Ätiologie und Pathogenese der MASLD.....	27
Abbildung 5: Diagnostische Befunde der MASLD .....	32
Abbildung 6: HepG2-Zellen in Kultur .....	38
Abbildung 7: Primäre humane Hepatozyten in Kultur .....	39
Abbildung 8: Triglyzerid-Akkumulation in HepG2-Zellen nach Stimulation mit BSA-Oleat.....	65
Abbildung 9: Relatives Zellüberleben von HepG2-Zellen bei Stimulation mit BSA-Oleat.....	65
Abbildung 10: Genexpression in qRT-PCR bei Stimulation von HepG2-Zellen mit BSA-Oleat über 24h .....	67
Abbildung 11: Genexpression in qRT-PCR bei Stimulation von primären humanen Hepatozyten mit BSA-Oleat über 24h.....	68
Abbildung 12: Genexpression in HepG2 Zellen nach Zytokinstimulation über 3-18h: Inflammatorisches Read-out.....	70
Abbildung 13: Genexpression in HepG2 Zellen nach Zytokinstimulation über 3h: Metabolisches Read-out.....	71
Abbildung 14: Genexpression in primären humanen Hepatozyten nach Zytokinstimulation über 3-6h: Inflammatorisches Read-out.....	73
Abbildung 15: Genexpression in primären humanen Hepatozyten nach Zytokinstimulation über 6h: Metabolisches Read-out .....	74

Abbildung 16: NF- $\kappa$ B (p65) Western Blot und ELISA von nukleärem Proteinisolat aus HepG2-Zellen nach Stimulation mit IL-1 $\alpha$  bzw. IL-1 $\beta$  ..... 76

Abbildung 17: Kombinierte Stimulation von HepG2-Zellen mit BSA-Oleat und IL-1 $\beta$  79

Abbildung 18: Kombinierte Stimulation primärer humaner Hepatozyten mit BSA-Oleat und Zytokinen der IL-1-Superfamilie..... 80

Abbildung 19: Wirksamkeit monoklonaler rekombinanter Antikörper gegen IL-1RacP in primären humanen Hepatozyten..... 82

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die Mitglieder der IL-1-Zytokinfamilie .....	6
Tabelle 2: Zellkulturmedien und -zusätze .....	40
Tabelle 3: Primer-Paare mit Forward- und Reverse-Sequenz.....	41
Tabelle 4: Primär- und Sekundärantikörper für Western Blot .....	41
Tabelle 5: Kits .....	41
Tabelle 6: Chemikalien .....	43
Tabelle 7: Verbrauchsmaterialien .....	44
Tabelle 8: Geräte .....	46
Tabelle 9: Datenverarbeitungsprogramme .....	46
Tabelle 10: Übersicht Zellkulturmedien .....	48
Tabelle 11: cDNA-Synthese-Ansatz .....	55
Tabelle 12: Mastermix RT-PCR.....	56
Tabelle 13: Übersicht Lysepuffer .....	58
Tabelle 14: Übersicht Gele und Puffer.....	61
Tabelle 15: Übersicht Antikörper-Ansätze für Western Blot.....	61
Tabelle 16: ELISA-Reagenzien für 8 Proben.....	63

# 1. Einleitung

Die Medizin der Gegenwart sieht sich mit einer wachsenden Zahl an Menschen konfrontiert, die ein überhöhtes Körpergewicht aufweisen und unter den daraus resultierenden gesundheitlichen Folgen leiden. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) schätzt die globale Prävalenz der Adipositas auf über 890 Millionen Erkrankte (1-3). Seit 1990 hat sich der Anteil fettleibiger Menschen im Erwachsenenalter mehr als verdoppelt, weshalb die WHO von einer globalen Epidemie spricht (4, 5). Insbesondere sind zunehmend auch bereits Kinder und Jugendliche betroffen (6). Die wachsende Übergewichtigkeit in der Bevölkerung geht mit der Zunahme eines breiten Spektrums assoziierter Krankheitsbilder einher, die von degenerativen Skeletterkrankungen bis hin zu Herz-Kreislauf-Erkrankungen reichen (7, 8). Unter dem Begriff des metabolischen Syndroms, auch Wohlstandssyndrom genannt, wird der Komplex aus stammbetonter Adipositas, arterieller Hypertonie, Cholesterinstoffwechselstörung, Hypertriglyzeridämie und gestörter Glucosetoleranz zusammengefasst (9, 10). Während zu Beginn des vergangenen Jahrhunderts noch Infektionskrankheiten die häufigste Todesursache darstellten, stehen heute kardiovaskuläre Ereignisse an erster Stelle (11, 12). Diese Entwicklung wird unter anderem auf den weltweit zunehmenden wirtschaftlichen Wohlstand zurückgeführt, der häufig zu einer Überernährung bei gleichzeitig verminderter körperlicher Aktivität führt. Der menschliche Stoffwechsel nutzt den entstehenden Energieüberschuss zur Bildung von zusätzlichem Körperfett als Energiespeicher. Während diese Strategie im Laufe der menschlichen Evolution sicherlich von Vorteil war zum Überdauern längerer Hungerperioden, scheint sie sich heute jedoch ins Gegenteil zu verkehren (13-15).

Zum Spektrum Adipositas-assoziiierter Erkrankungen zählt auch die Metabolische Dysfunktion-assoziierte steatotische Lebererkrankung (metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease, MASLD), die unter dem Begriff der Nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung (NAFLD) erstmals 1980 von Ludwig et al. an der Mayo Clinic in Rochester beschrieben wurde (16, 17). Sie umfasst ein breites Spektrum unterschiedlicher Ausprägungsformen von der einfachen Leberverfettung bis hin zur Steatohepatitis mit Leberzellschädigung, entzündlichem Infiltrat und Leberfibrose (18, 19). Schließlich können sich als späte Komplikationen der chronischen Schädigung eine Leberzirrhose und ein hepatozelluläres Karzinom

(hepatocellular carcinoma, HCC) entwickeln (20, 21). Die MASLD ist die häufigste chronische Lebererkrankung der Gegenwart mit einer geschätzten globalen Prävalenz von 30% innerhalb der erwachsenen Bevölkerung (22, 23). Der Global Burden of Disease Studie (GBD) zufolge trägt die MASLD wesentlich zur weltweiten Krankheitslast und Behinderung durch chronische Lebererkrankungen bei (24, 25). Auch die sozioökonomischen Kosten für westliche Gesellschaften sind beträchtlich (26, 27). So stellt die MASLD schon heute die zweithäufigste Indikation für eine Lebertransplantation in den USA dar (28-30). Ein weiterer Anstieg der Fallzahlen wird erwartet (31-33).

Trotz ihrer wachsenden Bedeutung konnte die genaue Pathogenese der MASLD bislang nicht hinreichend geklärt werden. In der klinischen Praxis wird der Einfluss der MASLD auf die Lebergesundheit oft unterschätzt und die Erkrankung erst spät oder gar nicht diagnostiziert. Aufgrund des mangelhaften Verständnisses der Krankheitsentstehung fehlen weiterhin spezifische Therapiekonzepte (34). In einem gemeinsamen Positionspapier haben bereits 2021 verschiedene Fachgesellschaften und Verbände wie die Deutsche Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) auf die steigende Anzahl an MASLD-Patienten aufmerksam gemacht und auf die Notwendigkeit verbesserter Präventions- und Früherkennungsmaßnahmen hingewiesen (35).

Zur Erklärung der Pathogenese der MASLD wird heute die sogenannte Multiple-Hit-Hypothese herangezogen, die das Zusammenwirken unterschiedlicher Einflussfaktoren für die Entstehung der Leberverfettung verantwortlich macht (36). Im Zentrum steht dabei zunehmend die gegenseitige Beeinflussung von Lipidakkumulation und Inflammation (37, 38). Nach heutigem Stand der Wissenschaft ist das menschliche Immunsystem nicht nur an der Abwehr akuter Infektionen beteiligt, sondern tritt immer häufiger auch im Rahmen chronischer Erkrankungen in Erscheinung (39, 40). Eine wichtige Komponente des angeborenen Immunsystems sind lösliche Signalmoleküle, darunter auch die Zytokine der IL-1-Familie, die in den 1970er Jahren erstmals beschrieben wurden (41, 42). Zur IL-1-Familie gehören unter anderem die Zytokine IL-1 $\alpha/\beta$ , IL-33 und IL-36 $\alpha/\beta/\gamma$ , denen allen gemein ist, dass sie neben ihrem spezifischen Oberflächenrezeptor zur Signaltransduktion zusätzlich den Korezeptor IL-1RacP benötigen (43). In klinischen und experimentellen Studien wurde in der Vergangenheit bereits eine Beteiligung der IL-1-Zytokine an der

Entstehung verschiedener immunvermittelter Krankheiten wie der rheumatoiden Arthritis, dem Asthma bronchiale oder der Psoriasis nachgewiesen (44). Darüber hinaus finden sich in der Fachliteratur ebenfalls einzelne Belege für eine Beteiligung der Zytokine IL-1 $\alpha$  sowie IL-1 $\beta$  an der Pathogenese der MASLD. So wurden beispielsweise in übergewichtigen MASLD-Patienten erhöhte Konzentrationen an IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  sowie IL-1RA im Blut gemessen (45). Im Mausmodell führt ein Knock-out von IL-1 $\alpha$  oder IL-1 $\beta$  zu einer Verringerung von Steatosis und Steatohepatitis (46). Als zugrundeliegender Mechanismus wird die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms in Kupffer-Zellen durch zytotoxische Fettsäuremetabolite diskutiert, die im Rahmen der Leberzellverfettung unter oxidativem Stress entstehen (47, 48). Auf diese Weise wird die Freisetzung von IL-1 $\beta$  induziert, welches wiederum eine Inflamationsreaktion auslöst mit Rekrutierung und Aktivierung von Immunzellen (49, 50).

Diese Erkenntnisse machen die IL-1-Zytokine zu möglichen Angriffszielen in der Therapie der MASLD. Für die oben genannten Erkrankungen existieren bereits Therapeutika mit Wirkung gegen die IL-1-Zytokinfamilie wie der Anti-IL-1 $\beta$ -Antikörper Canakinumab oder der IL-1-Rezeptorantagonist Anakinra (51, 52). Die Wirksamkeit eines Antikörpers gegen den gemeinsamen Korezeptor IL-1RacP in der Therapie immunvermittelter Krankheiten sowie maligner Erkrankungen wird derzeit erforscht (53-55).

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurde ein In-vitro-Modell der MASLD in HepG2-Zellen sowie primären humanen Hepatozyten etabliert und charakterisiert. Damit wurde der Einfluss der IL-1-Zytokinfamilie auf den Energiestoffwechsel sowie die Entzündungsreaktion der Hepatozyten untersucht. Im zweiten Schritt wurde die Wirksamkeit eines rekombinanten Antikörpers gegen den Korezeptor IL-1RacP beurteilt. Ziel der Dissertation ist ein besseres Verständnis des Einflusses der IL-1-Zytokine auf den Hepatozyten in der Pathogenese der MASLD sowie des möglichen therapeutischen Nutzens einer medikamentösen Intervention.

## 2. Literaturdiskussion

### 2.1 Das Immunsystem und die IL-1-Zytokinfamilie

#### 2.1.1 Übersicht

Das Immunsystem stellt das zentrale Abwehrsystem des Körpers dar, welches sich sowohl gegen exogene humanpathogene Keime als auch gegen endogene Gefahrenquellen wie beispielsweise entartete Körperzellen richtet. Die Erkennung von körperfremden und pathogenen Strukturen erfolgt anhand von proteinbasierten Antigenen (56).

Die Immunantwort setzt sich zusammen aus einer angeborenen und einer erworbenen Immunität, die wiederum beide einen zellulären und einen humoralen Anteil besitzen. Zu Beginn einer Immunantwort tritt vor allem das angeborene Immunsystem in Aktion, welches eine sehr schnelle und breit gefächerte Antwort auf Pathogene vermittelt, aber nicht sehr spezifisch reagiert (57). Zu den Komponenten des angeborenen Immunsystems gehören auf zellulärer Ebene Granulozyten, Natürliche Killerzellen (NK-Zellen), dendritische Zellen (dendritic cells, DCs), Makrophagen und Mastzellen. Auf humoraler Ebene besteht das natürliche Immunsystem im Wesentlichen aus dem Komplementsystem und den Zytokinen. Die zirkulierenden und gewebeständigen Zellen des angeborenen Immunsystems erkennen Pathogen- oder Gefahren-assoziierte molekulare Strukturen (pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), danger-associated molecular patterns (DAMPs)) mithilfe von hochkonservierten Mustererkennungsrezeptoren (pattern recognition receptors (PRRs)). Als Antwort auf die Mustererkennung beginnen die Immunzellen einerseits mit einer eigenen lokalen Abwehrreaktion beispielsweise durch Phagozytose oder Lysozymausschüttung (58). Andererseits leiten sie die adaptive Immunantwort ein, indem sie die erkannten Antigene auf ihrer Zelloberfläche präsentieren und die Zellen der adaptiven Immunabwehr durch Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen alarmieren. Zu dieser Antigenpräsentation sind neben den Immunzellen auch alle anderen kernhaltigen Körperzellen befähigt. Die adaptive Immunabwehr basiert auf der Aktivität von T- und B-Zellen sowie den von den B-Zellen in Gestalt von Plasmazellen produzierten Antikörpern. Das spezifische Immunsystem reagiert mit einiger Latenz, ist jedoch für die zielgerichtete und vollständige Eradikation von Pathogenen essentiell. Durch die

## 2. Literaturdiskussion

---

Bildung eines immunologischen Gedächtnisses in Form von Gedächtniszellen wird ein langfristiger Schutz etabliert (59).

Zytokine stellen wichtige Signalstoffe für die Kommunikation zwischen verschiedenen Zelltypen im Körper dar. Es handelt sich um kleine Proteine, die auf einen bestimmten Reiz hin sekretiert werden und auf ihre Zielzellen durch Bindung an spezifische Oberflächenrezeptoren wirken. Es sind heute über 60 Zytokine bekannt, die sich anhand ihrer Struktur in 4 Familien einteilen lassen: die IL-1-Zytokin-Superfamilie, die Hämatopoetinsuperfamilie, die Interferone (INFs) sowie die Tumornekrose-Faktoren (TNFs) (60).

Die IL-1-Zytokin-Superfamilie besteht aus 11 Zytokinen, welche sich aufgrund ihrer Aminosäuresequenz sowie ihres Rezeptorrepertoires wiederum in 3 Untergruppen einteilen lassen: die IL-1-Subfamilie, die IL-18-Subfamilie sowie die IL-36-Subfamilie (Tab. 1) (42, 43). Die Zytokine werden klassischerweise von Zellen des angeborenen Immunsystems wie Makrophagen oder DCs sekretiert, teilweise aber auch von anderen Körperzellen wie beispielsweise Hepatozyten oder Epithelzellen. Die Mehrzahl der Zytokine wird in Form von inaktiven Vorstufen produziert, für deren Aktivierung die Abspaltung eines aminoterminalen Peptids notwendig ist (61). Die Synthese der Propeptide wird durch die Stimulation von PRRs, insbesondere von Toll-like-Rezeptoren (TLRs), aber auch von den Zytokinrezeptoren selbst hervorgerufen, indem sie pro-inflammatorische Signalwege anschalten und zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B führen. In einem zweiten Schritt kommt es bei einer Schädigung der Zelle zur Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms, das durch Freisetzung der Caspase-1 die Prozessierung der Propeptide und die Sekretion der fertigen Zytokine mit ihrer klassischen Faserstruktur aus  $\beta$ -Faltblättern bewirkt (Abb. 1a-c). Daneben ist oftmals auch eine Aktivierung durch extrazelluläre Proteasen möglich. (62).

Die Zytokine der IL-1-Familie entfalten ihre Wirkung auf Zielzellen durch spezifische Bindung an ihre Rezeptoren, denen allen gemein ist, dass sie auf intrazellulärer Seite über eine hochkonservierte TIR-Domäne verfügen, die auch Toll-Like-Rezeptoren aufweisen (63). Bei den Zielzellen handelt es sich um Zellen des adaptiven Immunsystems, also T- und B-Lymphozyten, aber auch um viele andere Körperzellen. Die Bindung von IL-1 $\alpha/\beta$ , IL-33 und IL-36 $\alpha/\beta/\gamma$  an ihre jeweiligen Rezeptoren führt durch eine Konformationsänderung zur Assoziation des Rezeptors mit dem gemeinsamen Korezeptor IL-1RacP und damit zur Bildung eines sogenannten

## 2. Literaturdiskussion

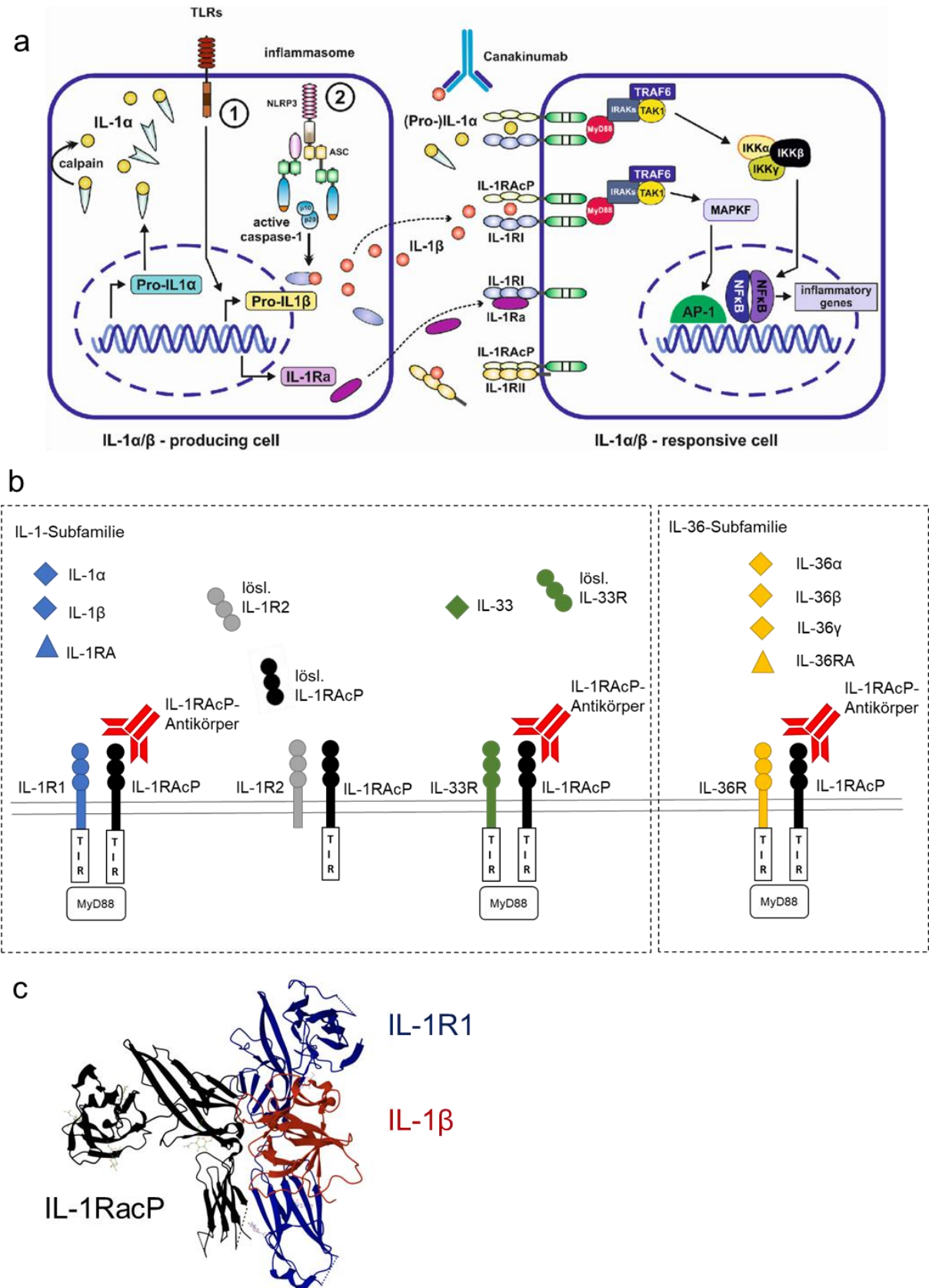
trimeren Komplexes (Abb.1c) (64). Durch Annäherung der beiden TIR-Domänen kann das Signalmolekül MyD88 binden, welches multiple pro-inflammatorische Signalkaskaden unter Beteiligung von Mitogen-aktivierten Kinasen wie JNKs, p38-Kinasen und ERKs in Gang setzt (43). Diese führen im Wesentlichen zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und AP-1 und in der Folge zur Synthese pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , CCL2 und wiederum IL-1 $\alpha/\beta$  (65, 66). Die Zytokine der IL-1-Familie sind von zentraler Bedeutung für die Initiierung einer adäquaten Immunantwort. Allerdings tragen sie ebenfalls zur Pathogenese verschiedener immunvermittelter Krankheiten bei (44).

Subfamilie	Zytokin	Rezeptor	Korezeptor	Pharmaka	
<b>IL-1-Subfamilie</b>	<b>IL-1<math>\alpha</math></b>	IL-1R1	IL-1R3 (IL1RAP) (IL-1RAcP)	Anti-IL-1 $\beta$ <sup>1</sup>	<i>Canakinumab</i> <sup>1</sup>
	<b>IL-1<math>\beta</math></b>	IL-1R2		IL-1R1-IL-1RAcP-IgG1-Fp <sup>2</sup>	<i>Gevokizumab</i> <sup>1</sup>
	<b>IL-33</b>	IL-1R4 (ST2) (IL-1RL1) (IL-33-R)		Anti-IL-1RAcP <sup>3</sup>	<i>Rilonacept</i> <sup>2</sup>
	<b>IL-1RA</b>	IL-1R1		---	rh-IL-1RA <sup>4</sup>
IL-18-Subfamilie	IL-18	IL-1R5	IL-1R7		
	IL-37		IL-1R8		
<b>IL-36-Subfamilie</b>	<b>IL-36<math>\alpha</math></b>	IL-1R6 (IL1RL2) (IL-36-R)	IL-1R3 (IL1RAP) (IL-1RAcP)	Anti-IL-36-R <sup>5</sup>	<i>Spesolimab</i> <sup>5</sup>
	<b>IL-36<math>\beta</math></b>		---		
	<b>IL-36<math>\gamma</math></b>		---		
	<b>IL-36RA</b>		---		
	IL-38		IL-1R9		

**Tabelle 1: Übersicht über die Mitglieder der IL-1-Zytokinfamilie**

Dargestellt sind die Zytokine der 3 Subfamilien mit ihren korrespondierenden Rezeptoren und Korezeptoren. Fett markiert sind die in dieser Dissertationsarbeit untersuchten Zytokine. In Klammern finden sich in Grau die gängigsten Alternativbezeichnungen für einige Rezeptoren. Auf der rechten Seite sind bereits existierende Pharmaka aufgeführt, die in den IL-1-Haushalt eingreifen: <sup>1</sup>Canakinumab und Gevokizumab sind monoklonale Antikörper, die gegen IL-1 $\beta$  gerichtet sind. <sup>2</sup>Rilonacept ist ein Fusionsprotein bestehend aus den extrazellulären Domänen von IL-1R1 und IL-1RAcP sowie des Fc-Anteils von humanem IgG1. <sup>3</sup>Nadunolimab ist ein monoklonaler Antikörper gegen den Korezeptor IL-1RAcP. <sup>4</sup>Anakinra ist ein rekombinanter humaner IL-1RA. <sup>5</sup>Spesolimab ist ein rekombinanter Antikörper gegen den IL-36-Rezeptor.

## 2. Literaturdiskussion



**Abbildung 1: Synthese, Wirkweise und 3D-Struktur von Zytokinen der IL-1-Familie**  
**a** Synthese, Freisetzung, Rezeptorbindung und Signaltransduktion durch IL-1 $\alpha/\beta$  (67).  
**b** Zytokine und Rezeptoren der IL-1-, IL-33, und IL-36-Zytokinfamilie (eigene Darstellung).  
**c** Dreidimensionale Struktur des trimeren Komplexes aus IL-1 $\beta$ , IL-1R1 und IL-1RAcP.  
 Adaptiert von *Thomas et al., Nat Struct Mol Biol. 2012* (PDB ID: 4DEP) (68).

### 2.1.2 IL-1

IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  gehören zur IL-1-Subfamilie und vermitteln ihre Wirkung durch Bindung an den IL-1R1. Darüber hinaus existiert mit dem IL-1R2 ein Decoy-Rezeptor für IL-1 $\beta$  sowohl in löslicher als auch in membrangebundener Form. Dieser bindet das Zytokin, löst jedoch keine Signaltransduktion aus und sequestriert es damit (69). Die Wirkung des löslichen IL-1R2 wird um ein Vielfaches gesteigert, indem dieser sich mit der ebenfalls existierenden löslichen Form von IL-1RacP assoziiert (65). Der membranständige IL-1R2 verhindert außerdem durch Bindung von Pro-IL-1 $\alpha$  dessen Freisetzung und Prozessierung (70). Der IL-1-Rezeptorantagonist (IL-1RA) ist ein lösliches Protein, das mit hoher Affinität an den IL-1R1 bindet und diesen blockiert (65).

IL-1 $\alpha$  wird von einem breiten Spektrum an epithelialen und mesenchymalen Zelltypen konstitutiv exprimiert, sodass es sich auch im entzündungsfreien Zustand in vielen Geweben wie beispielsweise in Haut, Niere, Leber, Lunge, Nervengewebe, gastrointestinalem Epithel und Gefäßendothel wiederfindet (71). Im Rahmen von Entzündungsreaktionen wird die Expression durch myeloide Zelltypen zusätzlich gesteigert. Bei IL-1 $\alpha$  handelt es sich um ein Zytokin mit dualer Funktion, welches sich sowohl im Zellkern als auch im Zytosol wiederfindet. Im Zellkern fördert es als Transkriptionsfaktor die Expression pro-inflammatorischer Signale wie IL-8 (72). Im Zytosol befindliches IL-1 $\alpha$  wird durch Verlust der Membranintegrität bei einer Zellnekrose aufgrund von Trauma, Ischämie oder viraler Infektion freigesetzt und initiiert als Alarmin bzw. DAMP eine lokale Entzündungsreaktion (73). Im extrazellulären Raum kann es durch Serinproteasen neutrophiler Granulozyten wie der Neutrophilenelastase, der Proteinase 3 oder Cathepsin G prozessiert und auf diese Weise in seiner Wirkung verstärkt werden. Eine Sonderform stellt membrangebundenes IL-1 $\alpha$  auf der Zelloberfläche von aktivierten Makrophagen dar, welches als juxtakrines Signal benachbarte Immunzellen stimuliert (74). Auf diese Weise ist IL-1 $\alpha$  essentiell für die Bekämpfung lokaler Organinfektionen. Zu den einzigartigen Funktionen von IL-1 $\alpha$  gehört die Bildung von Granulomen, beispielsweise bei Infektion mit dem *Mycobacterium tuberculosis* (75), sowie die Bekämpfung immunevasiver Viren (76). Aufgrund seines ubiquitären Vorkommens ist IL-1 $\alpha$  jedoch auch an der Pathogenese einer Vielzahl von auto-immunen und auto-inflammatorischen Erkrankungen beteiligt. So spielt IL-1 $\alpha$  eine zentrale Rolle in der

Entstehung neutrophiler Dermatosen wie beispielsweise der Hidradenitis suppurativa oder der Pyoderma gangraenosum. Betrachtet man die Lunge, so zeigt sich eine Beteiligung an der Genese der COPD, der Lungenfibrose, der zystischen Fibrose sowie der bronchopulmonalen Dysplasie bei Frühgeborenen. Auch im gastrointestinalen System findet sich ein kausaler Zusammenhang mit der Entstehung chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen. Auf dem Gebiet der Rheumatologie sind Vaskulitiden wie der Morbus Behçet und das Kawasaki-Syndrom zu nennen, daneben Kollagenosen wie die Systemische Sklerose, die Myositiden und das Sjögren-Syndrom (77).

IL-1 $\beta$  wird im Gegensatz zu IL-1 $\alpha$  hauptsächlich von Immunzellen wie Neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Makrophagen produziert und nur bei Vorliegen eines pro-inflammatorischen Stimulus sekretiert (42). IL-1 $\beta$  ist in seiner Proform nicht aktiv, sondern muss erst aktiviert werden. Dies kann wie oben beschrieben intrazellulär durch Caspase-1 oder extrazellulär durch Proteinasen erfolgen (78). Während IL-1 $\alpha$  vor allem an der Initiierung der Immunantwort beteiligt ist, wirkt IL-1 $\beta$  an der Aufrechterhaltung der Immunantwort durch Rekrutierung von Makrophagen mit (79). Außerdem tritt IL-1 $\beta$  in die Blutzirkulation ein und kann so systemische Reaktionen wie beispielsweise Fieber induzieren (80). Auch für IL-1 $\beta$  wurde eine Beteiligung an der Pathogenese einer sehr großen Anzahl an unterschiedlichsten Krankheiten nachgewiesen. Bei einer Reihe seltener Erbkrankheiten führt eine unkontrollierte Ausschüttung von IL-1 $\beta$  zu schweren systemischen Entzündungsreaktionen mit wiederkehrenden Fieberschüben, Fatigue, Myalgie, Arthralgie, Serositiden, gastrointestinalen Symptomen und Hautausschlägen (81). Hierzu zählen beispielsweise das Familiäre Mittelmeerfieber (FMF), das durch eine fehlerhafte Aktivierung der Caspase-1 ausgelöst wird (82), oder das Cryopyrin-assoziierte periodische Syndrom (CAPS), das auf Mutationen im NLRP3- Inflammasom beruht (83). Eine weitere genetische Erkrankung mit Bezug zur IL1-Zytokinfamilie ist die Defizienz von Interleukin-1-Antagonist (DIRA). Aufgrund einer Loss-of-Function-Mutation des endogenen IL-1RA kommt es zu einer überschießenden Aktivität von IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$ , die zu einer Entzündung von Haut, Gelenken und Knochen führt (84). Daneben existiert eine lange Liste an auto-immunen und auto-inflammatorischen Erkrankungen, an deren Entstehung IL-1 $\beta$  beteiligt ist. Darunter fallen zum Beispiel die rheumatoide Arthritis, die Ankylosierende Spondylitis, die Psoriasis-Arthritis, die Gicht, die Purpura Schönlein-Henoch, der Morbus Behçet, das

Kawasaki-Syndrom oder die Riesenzellerarteriitis. Dies sind nur wenige Beispiele einer wesentlich größeren Anzahl an Krankheitsbildern. Aber auch bei anderen Krankheiten, die nicht primär immunvermittelt sind, kann ein Einfluss von IL-1 $\beta$  nachgewiesen werden, zum Beispiel bei der Herzinsuffizienz, beim Diabetes mellitus Typ 1 und 2, bei der Arteriosklerose oder beim metabolischen Syndrom (81). Letztlich fördert IL-1 $\beta$  bei einer Reihe maligner Neoplasien die Tumorangio-genese sowie die Metastasenbildung (85). Zur Therapie IL-1-vermittelter Krankheiten stehen heute mehrere Pharmaka zur Verfügung. Anakinra ist ein rekombinant hergestellter IL-1-Rezeptorantagonist, der den IL-1-Rezeptor blockiert (51). Daneben stehen mit Canakinumab und Gevokizumab monoklonale Antikörper gegen IL-1 $\beta$  zur Verfügung (52, 86). Bei Rilonacept handelt es sich um ein dimeres Fusionsprotein bestehend aus den extrazellulären Domänen von IL-1R1 und IL-1RAcP sowie des Fc-Anteils von humanem IgG1. Es kann sowohl IL-1 $\alpha$  als auch IL-1 $\beta$  binden und so unschädlich machen (87). Letztlich wurde 2019 bereits ein monoklonaler Antikörper gegen den Korezeptor IL-1RacP entwickelt und seine Wirksamkeit im Mausmodell bei 3 verschiedenen, zytokinvermittelten Krankheitsbildern nachgewiesen: die Gabe von Anti-IL-1RacP führte zu einer Verbesserung der IL-1 $\beta$ -abhängigen Peritonitis, der IL-33-abhängigen allergischen Atemwegsinflammation sowie der IL-36-abhängigen Psoriasis (53). Daneben wird seit mehreren Jahren der Einsatz des Anti-IL-1RacP-Antikörpers Nadunolimab in der Therapie der akuten und chronischen myeloiden Leukämie sowie in der Behandlung solider Tumore wie des Nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms (NSCLC) oder des Ewing-Sarkoms untersucht (54, 55, 88-90). In diesem Jahr wurde erstmals für den Anti-IL-1RAcP-Antikörper nachgewiesen, dass er zu einer Reduktion der Inflammation in atherosklerotischen Plaques sowie zu einer Reduktion der Fibrosebildung im Rahmen der systemischen Sklerose beiträgt (91, 92).

### 2.1.3 IL-33

IL-33 gehört ebenfalls zur IL-1-Subfamilie und bindet spezifisch an den IL-1R4 (IL-33-R) (93). Neben der membranständigen Form gibt es auch hier eine lösliche Form des IL-1R4, die durch Bindung von IL-33 zu dessen Sequestrierung führt (94). IL-33 wird im menschlichen Organismus überwiegend von Epithel- und Endothelzellen wie Hautkeratinozyten, Atemwegsepithel, Magenepithel sowie Blutgefäßendothelien konstitutiv exprimiert (95, 96). Darüber hinaus findet man IL-33 in lymphatischen

Gewebe wie Lymphknoten, Milz und MALT, in denen sie von fibroplastischen Retikulumzellen und HEV-Endothelzellen sekretiert werden (97). Im Rahmen einer Entzündung wird IL-33 in vielen Geweben zusätzlich von Fibroblasten produziert, beispielsweise in der Leber oder im Darm (98). Seine Wirkung entfaltet IL-33 insbesondere durch Stimulation von ILC2-Zellen, welche daraufhin große Mengen IL-5 sowie IL-13 sekretieren (99). Zudem können weitere gewebeständige Immunzellen, darunter Basophile, Eosinophile, Mastzellen, dendritische Zellen, Makrophagen, NK-Zellen, aber auch B- und T-Zellen durch IL-33 aktiviert werden (95). Bei IL-33 handelt es sich wie bei IL-1 $\alpha$  auch um ein Zytokin mit dualer Funktion, welches sich sowohl im Nukleus als auch im Zytosol befinden kann. Die Funktion von IL-33 als Transkriptionsfaktor im Zellkern ist bisher wenig erforscht (100). Zytosolisches IL-33 wird als Alarmin im Zuge einer zellulären Schädigung durch mechanisches Trauma oder Infektion freigesetzt (101). Durch extrazelluläre Proteasen wie beispielsweise die Neutrophilenelastase kann IL-33 so modifiziert werden, dass eine Steigerung der Aktivität um den Faktor 10 resultiert (102). Durch Caspase-1 wird IL-33 im Gegensatz zu den anderen Zytokinen inaktiviert (103). IL-33 wirkt mit an der Bekämpfung parasitärer Infektionen mit Helminthen oder Nematoden (104) sowie viraler Infektionen wie der Influenza (105). Andererseits wurde eine Beteiligung an der Pathogenese von allergischen bzw. autoimmunen Reaktionen nachgewiesen wie dem Asthma bronchiale, der allergischen Rhinitis, der chronischen Rhinosinusitis und der atopischen Dermatitis (106, 107). Letztlich fand sich im Mausmodell auch eine Beteiligung an der Entstehung von akuter Hepatitis und Kolitis (108, 109). Darüber hinaus ist für IL-33 beschrieben, dass es zur Gewebefibrosierung im Rahmen chronischer Entzündungen beiträgt, beispielsweise bei chronischen Pankreatitiden oder bei der systemischen Sklerose (98). In einzelnen Tiermodellen ergaben sich jedoch auch Hinweise auf anti-inflammatorische bzw. immunregulatorische Effekte. So vermittelte die Gabe von rekombinantem IL-33 einen Schutz gegen experimentell induzierte Arthritiden (110).

### 2.1.4 IL-36

Die IL-36-Subfamilie besteht unter anderem aus den Zytokinen IL-36 $\alpha/\beta/\gamma$  sowie dem Rezeptorantagonist IL-36RA, welche spezifisch an den IL-1R6 (IL-36-R) binden (111, 112). Die Freisetzung der IL-36-Zytokine ist Caspase-1-abhängig und ihre Aktivität kann durch extrazelluläre Proteasen wie Proteinase-3, Cathepsin G und Elastase um

den Faktor 200-500 gesteigert werden (113). Sie werden von einem großen Spektrum an Zelltypen exprimiert und finden sich daher in nahezu jedem menschlichen Gewebe. Besonders hervorzuheben sind Epithelzellen, Fibroblasten sowie Immunzellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems, darunter dendritische Zellen, Makrophagen, T-Zellen und Plasmazellen (114). Das Muster und die Anzahl an exprimierten IL-36-Zytokine variieren hierbei (115). Unter den Geweben mit hoher Konzentration an IL-36-Isoformen finden sich insbesondere Haut und Schleimhäute wie Bronchialepithel und intestinales Epithel, die in Kontakt mit der Umwelt stehen und ein hohes Maß an immunologischer Überwachung benötigen (116). So wird den IL-36-Zytokinen eine zentrale Rolle bei der Bekämpfung akuter, vornehmlich bakterieller, Infektionen zugeschrieben. In diesem Zusammenhang sind die IL-36-Zytokine auch an der Wundheilung beteiligt, die der Wiederherstellung der epithelialen Integrität dient. Im Rahmen chronischer autoimmuner Prozesse kehren sich diese Funktionen jedoch ins Negative um. So tragen die IL-36-Zytokine, insbesondere IL-36 $\alpha$  und IL-36 $\gamma$ , unter anderem zur Entstehung der Psoriasis (117) und der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen bei (118, 119). Im Fall der Psoriasis stehen mit Ambrisentan und Spesolimab auch bereits Pharmaka zur Verfügung, die die IL-36-Zytokinfamilie als therapeutisches Target besitzen. Ambrisentan bewirkt als Endothelin-Rezeptor-A-Antagonist eine Suppression der IL-36 $\gamma$ -Produktion (120). Bei Spesolimab handelt es sich um einen monoklonalen Antikörper, der den IL-36-Rezeptor blockiert (121). Außerdem sind die Zytokine der IL-36-Familie auch an der Fibrosierung von Geweben im Rahmen chronischer Entzündungen wie der Lungenfibrose (122), der renalen, myokardialen und intestinalen Fibrose beteiligt (123, 124).

### 2.2 Leberstoffwechsel und Insulinhaushalt

#### 2.2.1 Aufbau, Physiologie und Biochemie der Leber

Die Leber stellt das zentrale Drehkreuz unseres Stoffwechsels dar (125).

Histologisch gliedert sie sich in etwa 1 – 1,5 Millionen Zentralvenenläppchen oder Lobuli hepatis, die annähernd eine Sechseckform aufweisen. Die im Zentrum befindliche Zentralvene ist umgeben von radiär angeordneten Hepatozytenbälkchen (126). Zwischen den Leberzellsäulen laufen Sinusoide mit diskontinuierlichem, gefensterter Endothel speichenförmig auf die Zentralvene zu. Sie führen gemischtes arteriovenöses Blut aus der Arteria hepatis und der Vena portae hepatis. Innerhalb der Periportalfelder an den Eckpunkten des Zentralvenenläppchens befindet sich die Glisson-Trias aus A. interlobularis, V. interlobularis und Ductus biliferus interlobularis. Letzterer wird über Hering-Kanälchen aus den Canaliculi biliferi gespeist, die die von den Hepatozyten produzierte Galle entgegen der Richtung des Blutflusses ableiten (127). Zwischen den Hepatozytenbälkchen und den Sinusendothelzellen befindet sich der Disse-Raum, in dem der Stoffaustausch zwischen Hepatozyten und Blutkreislauf stattfindet. In diesem perisinusoidalen Spaltraum findet man außerdem Ito-Zellen umgeben von retikulären Fasern. Die Ito-Zellen speichern die im Darm resorbierten Fette, insbesondere Vitamin A, in großen Lipidtropfen und bilden Kollagenfasern (128). An die lumenwärtige Seite des sinusoidalen Endothels sind Kupffer-Zellen angelagert. Dabei handelt es sich um leberspezifische Makrophagen, die als Teil des Mononukleären Phagozytensystems der immunologischen Überwachung des Gewebes dienen (129).

Die Leber erfüllt innerhalb unseres Organismus eine beträchtliche Anzahl lebenswichtiger Funktionen. Neben ihrer zentralen Rolle im Energiestoffwechsel stellt sie eine Reihe wichtiger Proteine her wie beispielsweise Albumin, Transferrin, Gerinnungsfaktoren und Komplementfaktoren (130). Außerdem besitzt die Leber eine Abbau-, Entgiftungs- und Ausscheidungsfunktion. Sie befreit den Körper von nutzlosen oder schädlichen Stoffwechselendprodukten und Fremdstoffen, die über die Galle ausgeschieden werden, und wandelt im Harnstoffzyklus neurotoxischen Ammoniak in Harnstoff um (131). Darüber hinaus dient die von ihr produzierte Gallenflüssigkeit auch der Fettresorption im Dünndarm. Letztlich greift sie in den Hormonhaushalt von Sexualhormonen und Vitamin D ein (132). Welche Folgen ein

## 2. Literaturdiskussion

---

Funktionsverlust der Leber hat, zeigt sich eindrücklich bei Patienten mit einem akuten Leberversagen ebenso wie bei Patienten mit fortgeschrittener Leberzirrhose (133).

Im Folgenden wird der Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel der Leber in vereinfachter Form dargestellt, wobei der Fokus insbesondere auf jenen Stoffwechselwegen liegt, die für diese Dissertationsarbeit von vorrangigem Interesse sind. Eine Übersicht über die wichtigsten Prozesse findet sich auch in Abbildung 2.

Im Kohlenhydratstoffwechsel nehmen die Hepatozyten Glucose, die im Darm resorbiert wurde, über GLUT2-Transporter auf. Im Gegensatz zu den GLUT4-Transportern von Fettgewebe und Skelettmuskulatur arbeiten die GLUT2-Transporter insulinunabhängig und im Vergleich zu den GLUT1- und GLUT3-Transportern des Nervengewebes besitzen sie eine geringere Affinität für Glucose. Aus diesem Zusammenhang resultiert, dass die Glucoseaufnahme proportional zur Konzentration im Blut erfolgt, wodurch die Leber wesentlich zur Konstanthaltung der Blutglucosekonzentration beiträgt (125). Anschließend wird die aufgenommene Glucose im Zytosol durch die Hexokinase IV, auch Glucokinase genannt, zu Glucose-6-Phosphat phosphoryliert und verliert dabei ihre Membrangängigkeit. Im katabolen Stoffwechsel wird Glucose-6-Phosphat der zytosolischen Glykolyse zugeführt und unter Gewinnung von ATP und Reduktionsäquivalenten in Pyruvat umgewandelt. Das geschwindigkeitsbestimmende Enzym ist dabei die Phosphofruktokinase 1. Daneben kann die Leber auch andere Monosaccharide wie Fructose oder Galactose in Glucose umwandeln und so dem Stoffwechsel zugänglich machen. Pyruvat wird nach dem Transport ins Mitochondrium durch den Pyruvatdehydrogenasekomplex in Acetyl-CoA umgewandelt. Diese oxidative Decarboxylierung ist irreversibel, woraus resultiert, dass Kohlenhydrate zu Acetyl-CoA abgebaut und ausgehend davon Fettsäuren gebildet werden können, aber nicht umgekehrt (134). Im mitochondrialen Citratzyklus wird die Acetyl-Gruppe des Acetyl-CoA durch die Citratsynthase auf Oxalacetat übertragen und anschließend schrittweise abgebaut unter Gewinnung von GTP und Reduktionsäquivalenten. Der Citratzyklus stellt das Zentrum des Intermediärstoffwechsels dar, da er von vielen Stoffwechselwegen gespeist wird und gleichzeitig Ausgangspunkt vieler Biosynthesen ist. In der mitochondrialen Atmungskette können schließlich im Rahmen der Endoxidation die gewonnenen Reduktionsäquivalente eingesetzt werden, um ATP zu generieren, welches dem Körper als universeller Energielieferant zur Verfügung steht. Wenn die hepatozellulären Energiespeicher gefüllt sind, kommen

## 2. Literaturdiskussion

---

Citratzyklus und Atmungskette zum Erliegen und das Acetyl-CoA wird hauptsächlich zur Fettsäure- und Cholesterinbiosynthese eingesetzt. Daneben wird aus Glucose-6-Phosphat Glykogen synthetisiert, das als Energiespeicher im Zytosol lagert (135). Unter anabolen Stoffwechselbedingungen kann die Leber im Gegensatz zu den meisten anderen Geweben durch Gluconeogenese Glucose neu herstellen aus Nicht-Kohlenhydratvorstufen. Die Quellen des Pyruvats für die Gluconeogenese sind im Wesentlichen Lactat aus anaerober Glykolyse in der Muskulatur, Glycerin aus der Lipolyse des Fettgewebes sowie glucogene Aminosäuren. Hierbei sei nochmals angemerkt, dass zwar ein Großteil der Energie für die Gluconeogenese aus der Fettsäureoxidation stammt, Fettsäuren jedoch nicht unmittelbar in Glucose umgewandelt werden können. Die Gluconeogenese stellt eine Umkehr der Glykolysereaktion dar, wobei 3 Schritte gezielt unter Aufwendung von Energie umgekehrt werden müssen. Die 3 Schlüsselenzyme der Gluconeogenese sind die Pyruvatcarboxylase im Mitochondrium, die Fructose-1,6-Bisphosphatase im Zytosol sowie die Glucose-6-Phosphatase im glatten ER. Außerdem kann durch Glykogenolyse Glucose aus Glykogen zurückgewonnen werden (136). Auf diese Weise trägt die Leber wesentlich zur Aufrechterhaltung eines konstanten Blutglucosespiegels in Hungerzeiten bei, wenn die Glykogenvorräte der Muskulatur aufgebraucht sind. Besonders wichtig ist diese Funktion für Gewebe, für die die Blutglucose die einzige Energiequelle darstellt, allen voran das Nervengewebe oder aber die Skelettmuskulatur unter anaeroben Bedingungen (137).

Im Fettstoffwechsel erhält die Leber bei Nahrungsaufnahme wenig Lipide aus dem Darm, da diese in Form von Chylomikronen unter Umgehung der Leber direkt in den Körperkreislauf gelangen. Anfallende Triacylglycerine können mithilfe der hepatischen Triacylglycerinlipase in Glycerin und Fettsäuren gespalten werden. Bei Nahrungskarenz im anabolen Stoffwechsel erhält die Leber an Albumin gebundene freie Fettsäuren, die aus der Lipolyse im Fettgewebe stammen. Bei hohen Fettsäurekonzentrationen erfolgt die Aufnahme in die Hepatozyten durch freie Diffusion. Daneben gibt es die Carrier-vermittelte Fettsäureaufnahme durch Fettsäuretransportproteine (FATPs, SLC27), insbesondere durch die Isoformen 2 und 5. Die Fettsäuretranslokase CD28 hat in der Leber im Gegensatz zu den meisten anderen Geweben keine Bedeutung für den Fettsäuretransport. Intrazellulär wird der Transport von Fettsäuren im hydrophilen Zytoplasma durch Fettsäuren-Bindeproteine (fatty acid binding proteins, FABPs) erleichtert (138). Das bei der Lipolyse

freiwerdende Glycerin kann in Glycerin-3-Phosphat umgewandelt und anschließend in den Glucosestoffwechsel der Leber eingespeist werden. Die reaktionsträgen Fettsäuren werden im Zytosol durch die Acyl-CoA-Synthetase auf Coenzym A übertragen (139). Acyl-CoA wird mithilfe des Carnithin-Transportsystems in die mitochondriale Matrix importiert, wobei die Carnithin-Palmitoyl-Transferase 1 den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt katalysiert. In der nachfolgenden  $\beta$ -Oxidation wird das Kohlenstoffgerüst durch zyklische Abspaltung von Acetyl-CoA und unter Gewinnung von Reduktionsäquivalenten abgebaut. Acetyl-CoA kann in den Citratzyklus eingespeist oder zur Cholesterin- und Ketonkörpersynthese verwendet werden. Die Reduktionsäquivalente werden der Atmungskette zugeführt. Der Abbau langkettiger Fettsäuren mit mehr als 18 C-Atomen sowie der Abbau verzweigtkettiger Fettsäuren findet in den Peroxisomen statt (125).

Im gegenläufigen Prozess wird Acetyl-CoA mithilfe des Citrat-Malat-Antiporters aus den Mitochondrien ins Zytosol transportiert und unter Energieverbrauch zur Fettsäuresynthese eingesetzt. Die Carboxylierung von Acetyl-CoA zu Malonyl-CoA durch die Acetyl-CoA-Carboxylase stellt den ersten und gleichzeitig den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar. Im Anschluss erfolgt die zyklische Erweiterung des Fettsäurestrangs durch den Multienzymkomplex der Fettsäuresynthese. Die gebildeten Fettsäuren können zu unterschiedlichen einfachen und komplexen Lipiden weiterverarbeitet werden. Zur Energiespeicherung werden die Fettsäuren klassischerweise mit Glycerin zu Triacylglycerinen verestert. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt wird hierbei durch die Glycerophosphat-Acyltransferase katalysiert. Von der Leber synthetisierte Triglyceride werden in VLDL-Partikel verpackt und in den Blutkreislauf gegeben (134).

Im Fettstoffwechsel der Leber nehmen neben Fettsäuren und Triacylglycerinen auch freies Cholesterin und Cholesterinester eine zentrale Stellung ein. Bei Nahrungsaufnahme erhält die Leber im Darm resorbiertes Cholesterin über Chylomikronen-Remnants. Außerdem nimmt die Leber in HDL-Partikeln enthaltenes, überschüssiges Cholesterin aus den extrahepatischen Geweben auf. Das Cholesteringerüst kann von der Leber nicht energiegewinnend abgebaut, sondern lediglich in Form von Gallensäuren bzw. -salzen ausgeschieden werden (135). Umgekehrt können Hepatozyten wie alle kernhaltigen Zellen Cholesterin aus Acetyl-CoA in einem vielschrittigen Prozess herstellen. Das Schlüsselenzym der Cholesterinbiosynthese ist die HMG-CoA-Reduktase. Die Cholesterinmoleküle

## 2. Literaturdiskussion

---

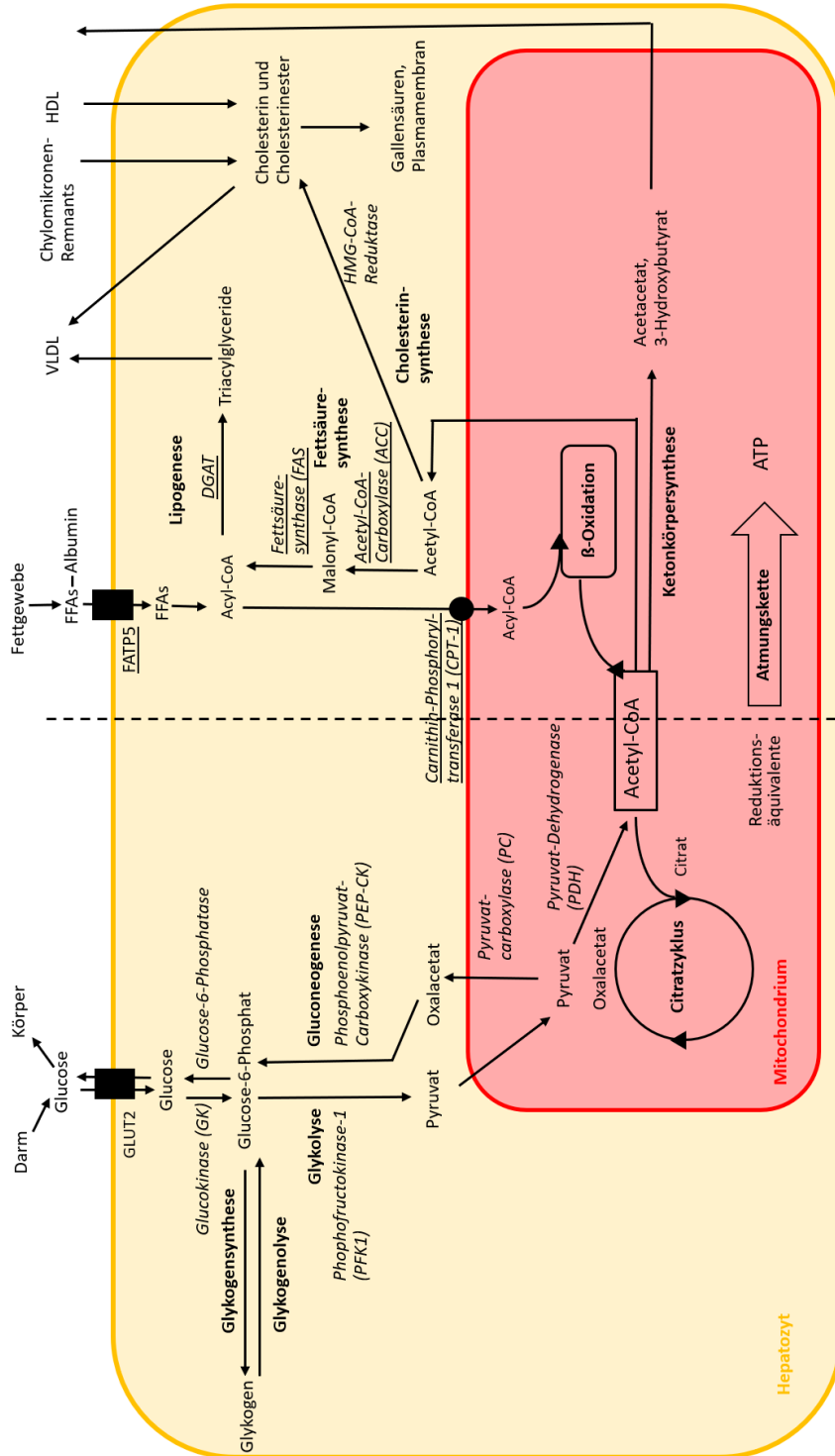
können durch die Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase im rauen ER mit Acyl-CoA verestert werden und in Form von Lipidtröpfchen im Zytosol gespeichert werden. Ebenso können Cholesterinester durch die Acylcholesterinesterase wieder hydrolysiert werden. In der Leber synthetisiertes Cholesterin kann sowohl in freier als auch veresterter Form als VLDL-Partikel in den Körperkreislauf abgegeben werden. Insgesamt stammen etwa 2/3 des Cholesterins im Körper aus endogener Synthese, insbesondere in der Leber, und etwa 1/3 aus der Nahrung (139).

Insgesamt betreibt die Leber bei Nahrungskarenz zunächst Glykogenolyse und später auch Gluconeogenese zur Aufrechterhaltung der Blutglucosekonzentration. Außerdem stellt die Leber aus aufgenommenen Fettsäuren Ketonkörper her und sekretiert diese ebenfalls zur Energieversorgung des Organismus. Bei Nahrungszufuhr nimmt die Leber Glucose auf und speichert diese in Form von Glykogen und Lipiden. Triacylglycerine und Cholesterin können in Form von VLDL-Partikeln in den Blutkreislauf abgegeben werden (125).

Der Energiestoffwechsel in der Leber wird durch eine Vielzahl an Mechanismen reguliert, um an das aktuelle Energieangebot und den aktuellen Energieverbrauch sowohl jedes einzelnen Hepatozyten als auch des gesamten Organismus angepasst zu werden. Zur kurzfristigen Regulation des zelleigenen Stoffwechsels werden Reaktionen bzw. die sie katalysierenden Enzyme häufig von ihren Edukten stimuliert und ihren Produkten gehemmt. Katabole Stoffwechselwege werden durch AMP stimuliert und ATP gehemmt, während es sich bei anabolen Stoffwechselwegen genau umgekehrt verhält. Langfristig kann durch Transkriptionsfaktoren die Expression von Schlüsselenzymen des Stoffwechsels reguliert werden. Neben diesen zellulären Regulationsmechanismen existieren mit Insulin und Glucagon zwei Hormone, die den Gesamtstoffwechsel des Körpers koordinieren und an den aktuellen Energiehaushalt anpassen. So können sie kurzfristig die Aktivität einzelner Stoffwechsellzyme beeinflussen oder langfristig das Niveau der Enzymexpression variieren (136). Die beiden wichtigsten Transkriptionsfaktoren in diesem Zusammenhang sind SREBP-1c und die PPAR-Transkriptionsfaktoren. SREBP-1c wird durch Insulin aktiviert und fördert die Glucoseverwertung sowie die Fettsäuresynthese durch Transkriptionssteigerung von Enzymen wie der Glucokinase und der Fettsäuresynthase (140-142). Die PPAR-Familie besteht aus den 3 Transkriptionsfaktoren PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$  und PPAR $\beta/\delta$ , die in unterschiedlichen Geweben schwerpunktmäßig exprimiert werden. In der Leber hat PPAR $\alpha$  die größte

## 2. Literaturdiskussion

Bedeutung. Er wird durch Fettsäuren aktiviert und stimuliert daraufhin die  $\beta$ -Oxidation durch Transkriptionssteigerung von Enzymen wie der Acyl-CoA-Synthetase und CPT-1 $\alpha$  (143, 144).



**Abbildung 2: Vereinfachte Übersicht des Leberstoffwechsels (eigene Darstellung)**

In der linken Bildhälfte ist überwiegend der Glukosestoffwechsel dargestellt, in der rechten Bildhälfte der Fettstoffwechsel. Im oberen Bildteil sind die Stoffwechselreaktionen im Zytosol, im unteren Bildteil jene des Mitochondriums gezeigt. Von oben nach unten sind katabole Stoffwechselwege, von unten nach oben anabole Stoffwechselwege eingezeichnet. Edukte und Produkte sind in einfacher Schrift dargestellt, wichtige Reaktionsstritte sind fett gedruckt. Schlüsselenzyme sind kursiv geschrieben und zusätzlich unterstrichen, wenn sie in dieser Arbeit untersucht wurden. Zur Wahrung der Übersichtlichkeit werden die einzelnen Reaktionswege stark vereinfacht dargestellt bzw. Reaktionsschritte weggelassen. Eine genauere Erläuterung der Reaktionswege und ihrer Regulation findet sich im vorangegangenen Textabschnitt 2.1.1.

### 2.2.2 Insulinwirkung und -resistenz

Bei Insulin handelt es sich um ein 5,8 kDa großes Peptidhormon, das von den  $\beta$ -Zellen des endokrinen Pankreas produziert und in Abhängigkeit von der Blutglucosekonzentration sekretiert wird. Die Insulinsekretion wird postprandial durch ein hohes Substratangebot, insbesondere durch hohe Blutglucosekonzentrationen, aber auch durch Aminosäuren, Fettsäuren und Ketonkörper stimuliert (145). Des Weiteren wird die Freisetzung durch Inkretine wie das gastroinhibitorische Peptid (GIP) oder das Glucagon-like-peptide-1 (GLP-1) gefördert. Glukagon, Adrenalin, Noradrenalin und Somatostatin hingegen hemmen die Sekretion. Insulin liegt im Blut als freies Monomer mit einer Konzentration von 0,4 – 4 ng/mL vor. Die Beendigung der Insulinwirkung erfolgt durch die Spaltung des Hormons durch hochaktive enzymatische Systeme in Leber und Niere, wobei die Halbwertszeit von Insulin im Blut 7 – 15 min beträgt (125).

Das freigesetzte Insulin vermittelt seine Wirkung durch Bindung an spezifische Rezeptoren auf der Oberfläche von Körperzellen. Die drei wichtigsten insulinsensitiven Gewebe sind Leber, Skelettmuskulatur und weißes Fettgewebe. Die zentrale Funktion des Insulins stellt im Wesentlichen die Stimulation insulinsensitiver Gewebe zur Aufnahme und Verwertung der Nahrungsglucose dar. Auf diese Weise wird die Energieversorgung des peripheren Gewebes gewährleistet, die Blutglucosekonzentration konstant gehalten und eine effiziente Speicherung des Substratangebots in Form von Glykogen und Triacylglycerinen vermittelt. Die Insulinwirkung variiert in Abhängigkeit vom betrachteten Gewebe und beinhaltet sowohl kurz- als langfristige Beeinflussungsmechanismen (134). Kurzfristige Wirkungen des Insulins bestehen aus dem Einbau von Glucosetransportern in die Plasmamembran sowie der Stimulation oder Inhibition von Schlüsselenzymen des Stoffwechsels, die meist durch Phosphorylierung oder Dephosphorylierung vermittelt wird. Langfristige Wirkungen des Insulins sind veränderte Expressionsmuster der Enzyme sowie eine Stimulation von Zellteilung und Proteinbiosynthese (139). In Fettgewebe und Muskulatur stimuliert Insulin die Glucoseaufnahme durch den Einbau von GLUT4-Transportern (146), während die GLUT2-Transporter in der Leber wie bereits beschrieben insulinunabhängig sind. Darüber hinaus wird die Glykolyse in Leber und Fettgewebe stimuliert und die Gluconeogenese in der Leber reprimiert. Außerdem wird in Leber und Muskel die Glycogensynthese gefördert und die

Glykogenolyse gehemmt. Schließlich wird die Lipogenese in Leber und Fettgewebe gesteigert und die Lipolyse gehemmt. Im Muskelgewebe werden Aminosäureaufnahme sowie Proteinbiosynthese stimuliert (136).

Die Insulinwirkung wird durch die Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signaltransduktionskaskaden durch den Insulinrezeptor vermittelt (Abb. 3). Der Insulinrezeptor ist ein tetrameres integrales Membranprotein aus je 2  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten. Die  $\alpha$ -Untereinheiten vermitteln die Insulinbindung, während die  $\beta$ -Untereinheiten typische Rezeptortyrosinkinasen darstellen. Die Insulinbindung bewirkt eine Konformationsänderung und die Aktivierung der Autophosphorylierung von Tyrosinresten innerhalb der Tyrosinkinasedomänen (135). Dadurch wird die Bindung und Transphosphorylierung von Insulinrezeptorsubstraten (IRS) als Adapterproteine ermöglicht. Diese wiederum können weitere Proteine wie die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und das Protein GRBP2 binden (147). Die PI3K vermittelt die Phosphorylierung von Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat ( $PIP_2$ ) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat ( $PIP_3$ ). Das Membranphospholipid vermittelt die Aktivierung der Proteinkinase B (PKB, Akt), wodurch eine Vielzahl an Signalkaskaden in Gang gesetzt wird, die schließlich zur insulintypischen Beeinflussung des Zellstoffwechsels führen (148-151). Beispielsweise aktiviert Insulin mithilfe der PKB den Transkriptionsfaktor SREBP-1c, der in der Leber die Transkription mehrerer lipogenetischer Enzyme stimuliert, darunter die Acetyl-CoA-Carboxylase und die Fettsäuresynthase (152, 153). Im Fettgewebe stimuliert Insulin den Einbau von Fettsäuretransportern (FATPs) in die Plasmamembran, die Veresterung der Fettsäuren sowie die Adipogenese (154, 155). Das Protein GRB2 vermittelt über SOS und Ras die Aktivierung der mitogenaktivierten Proteinkinase-Kaskade (MAPK-Kaskade), welche in der Stimulation von Zellproliferation und -differenzierung mündet (137).

Die Insulinresistenz ist definiert als eine unzureichende metabolische Antwort insulinsensitiver Gewebe auf hohe physiologische Insulinkonzentrationen im Blut (156). Sie führt zu erhöhten Blutglucosekonzentrationen und in der Folge auch zu einer Hyperinsulinämie (157). Bei Versagen der pankreatischen  $\beta$ -Zellen manifestiert sich die Insulinresistenz als Diabetes mellitus Typ 2. Sie wird jedoch auch als wichtiger Faktor bei der Entstehung weiterer Krankheitsbilder wie dem metabolischen Syndrom, der Arteriosklerose oder der MASLD angesehen (158). Obwohl der

Mechanismus der Insulinresistenz bislang nicht vollständig aufgeklärt werden konnte, existieren mehrere Modelle zur Erklärung der Pathophysiologie (159).

Das älteste Modell ist der Glucose-Fettsäure-Zyklus (glucose fatty acid cycle) von Randle et al. aus dem Jahr 1963. Laut diesem Modell entsteht die Insulinresistenz in der Muskulatur durch ein Überangebot an freien Fettsäuren. In der mitochondrialen  $\beta$ -Oxidation entstehen große Mengen an Acetyl-CoA, welche zu einer Hemmung der Glykolyse und damit zu einer intrazellulären Akkumulation von Glucose sowie einer verminderten Glucoseaufnahme in die Zelle führt (160).

Auf dieser Grundlage wurde das Modell des Hexosamin-Biosynthese-Signalwegs (hexosamine biosynthesis pathway) durch Marshall et al. etabliert. In diesem Modell wird Fructose-6-Phosphat zu Glucosamin-6-Phosphat und weiter zu Uridin-5-Diphosphat-N-Acetylglucosamin (UDP-GlcNAc) verarbeitet, welches zur Glykosylierung und O-GlcN-Acylierung von Proteinen führt. Eine Modifikation von Enzymen und Signalmolekülen des Insulinsignalwegs resultiert in einer Verminderung der Insulinwirkung (161-163).

Das Modell der Ektopen Lipidakkumulation sieht die Anhäufung von Lipiden in Leber oder Skelettmuskulatur – und nicht etwa im viszeralen Fettgewebe – als ursächlich für die Entstehung der Insulinresistenz an. Das Modell wird gestützt durch die Beobachtung, dass bei Menschen mit Lipodystrophie das Fettgewebe nicht in der Lage ist, die postprandial anfallenden Fettsäuren aufzunehmen, was zu einer Einlagerung in Leber und Muskulatur führt und eine schwere Insulinresistenz auslöst (164). Dabei interferieren Lipidmoleküle wie Diacylglycerine (DAG), Lysophosphatidsäuren, Ceramide und Acylcarnithine mit der Signaltransduktionskaskade des Insulinrezeptors (165). Laut der DAG-Hypothese aktiviert in Leber und Skelettmuskel anfallendes DAG bestimmte Unterformen der Proteinkinase C (PKC), welche die Tyrosinkinaseaktivität des Insulinrezeptors hemmen (166, 167).

Als weitere Faktoren, die zur Insulinresistenz beitragen, wurden unter anderem ER-Stress und oxidativer Stress identifiziert. Der ER-Stress wird in der Leber durch eine Stimulation der Synthese von Stoffwechsellenzymen im ER erklärt, die zu einer Akkumulation ungefalteter Proteine und Initiierung einer Unfolded-Protein-Response (UPR) führt (168). Darüber hinaus wurde ein Zusammenhang zwischen pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 oder IL-18 sowie Adipozytokinen und einer verminderten Insulinsensibilität nachgewiesen (169, 170). In beiden Fällen



### 2.3 Die Metabolische Dysfunktion-assoziierte steatotische Lebererkrankung

#### 2.3.1 Definition

Die Metabolische Dysfunktion-assoziierte steatotische Lebererkrankung (MASLD) ist definiert als eine Leberzellverfettung in Patienten, die mindestens einen von fünf kardiometabolischen Risikofaktoren (cardiometabolic risk factors, CMRFs) aufweisen und bei denen keine andere Ursache für eine sekundäre Steatose wie z.B. exzessiver Alkoholkonsum vorliegt (18, 174, 175). Als kardiometabolische Kriterien dienen definierte Normwerte zu Body Mass Index (BMI) bzw. Taillenumfang, Blutglucose, Triglyceriden, HDL-Cholesterin sowie Blutdruck (176). Von der MASLD müssen die Alkohol-assoziierte Lebererkrankung (alcohol-associated liver disease, ALD) sowie das Overlap-Syndrom MetALD abgegrenzt werden, die alle unter dem Überbegriff der Steatotischen Lebererkrankung (steatotic liver disease, SLD) zusammengefasst werden (177). Dabei gilt laut der US-amerikanischen Fachgesellschaft AASLD (American Association of the Study of Liver Disease) ein täglicher Alkoholkonsum von  $\geq 20$  g für Frauen und  $\geq 30$  g für Männer als Ausschlusskriterium für die MASLD (18, 174). Die Deutsche Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGSV) hingegen setzt den täglichen Alkoholgrenzwert bei 10 g für Frauen und 20 g für Männer an (178, 179). Weitere sekundäre Ursachen für eine Leberzellverfettung sind beispielsweise chronische virale Hepatitiden oder die Einnahme hepatotoxischer Medikamente (180). Die MASLD Nomenklatur wurde auf Grundlage eines internationalen Delphi-Konsens-Verfahrens eingeführt und ersetzt den Begriff der Nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) (175). Retrospektive Studien zeigen jedoch hohe Konkordanzraten von  $> 99\%$  zwischen den MASLD und NAFLD Patientenkohorten auf (181). Die MASLD kann weiter unterteilt werden in die Metabolische Dysfunktion-assoziierte Steatotische Leber (Metabolic Dysfunction-Associated Steatotic Liver, MASL) und die Steatohepatitis (Metabolic Dysfunction-Associated Steatohepatitis, MASH). Die MASL beschreibt eine Steatosis hepatis  $\geq 5\%$ , also eine Einlagerung von Fettvakuolen in mindestens 5% aller Hepatozyten (178). Die MASH weist zusätzlich eine lobuläre Entzündung sowie eine Leberzellschädigung mit Ballonierung von Hepatozyten auf (182). Die MASH kann eine progrediente Leberfibrose verursachen,

also zu einer Vermehrung bindegewebiger Anteile in der Leber führen (178). Letztlich kann die Leberfibrose in eine mikronoduläre Leberzirrhose münden, die von der Zerstörung der Läppchen- und Gefäßstruktur der Leber mit Bildung von Regeneratknoten geprägt ist und den Endpunkt vieler chronischer Lebererkrankungen darstellt (183). Auf dem Boden der MASH-Zirrhose kann ein hepatozelluläres Karzinom (hepatocellular carcinoma, HCC) oder seltener ein intrahepatisches Cholangiokarzinom (intrahepatic cholangiocarcinoma, iCCA) entstehen (21, 184).

### 2.3.2 Epidemiologie

Die MASLD stellt die häufigste chronische Lebererkrankung in den westlichen Industrieländern dar (22, 185). Die Prävalenz der MASLD in der erwachsenen Allgemeinbevölkerung beträgt weltweit etwa 30%, die der MASH 3-5%. (22, 23, 177, 186). Die stärkste Verbreitung findet sich in Südamerika sowie Mittleren Osten und Nordafrika, gefolgt von Asien, Nordamerika und Europa (32). Bezüglich des Geschlechterverhältnis zeigt sich keine eindeutige Prädisposition, da beide Geschlechter etwa gleich häufig betroffen sind. Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt in der 4.-5. Lebensdekade (187), allerdings treten Fettlebererkrankungen auch in allen anderen Altersstufen einschließlich Kindern und Neugeborenen auf (188, 189). Betrachtet man die ethnische Herkunft der Patienten, so zeigt sich innerhalb der US-amerikanischen Bevölkerung eine geringere Erkrankungsrate bei Farbigen (190). In epidemiologischen Studien zeigt sich darüber hinaus eine starke Assoziation zu den Komponenten des metabolischen Syndroms (17, 191). Die MASLD-Inzidenz steigt mit der Anzahl erfüllter Kriterien des metabolischen Syndroms (192). Beispielsweise leiden etwa 70% der übergewichtigen Typ-2-Diabetiker an einer MASLD (193). Etwa 80% der MASLD-Patienten sind adipös (194, 195). Allerdings gibt es auch normalgewichtige Patienten, welche vor Einführung der aktuellen Nomenklatur unter dem Begriff der Lean-NAFLD zusammengefasst wurden (196). Im Zusammenhang mit dem metabolischen Syndrom wurden als weitere, direkte oder indirekte Risikofaktoren eine kalorienreiche Ernährung mit hohem Fett- und Kohlenhydratanteil, Bewegungsmangel, obstruktive Schlafapnoe sowie Rauchen identifiziert (19, 197). Darüber hinaus lässt sich aber auch eine Korrelation zu anderen Erkrankungen mit Einfluss auf den Körperstoffwechsel nachweisen wie beispielsweise das

Polyzystische Ovarialsyndrom (PCOS) und die Hypothyreose (198). Insgesamt ist festzustellen, dass die MASLD und ihre Folgeerkrankungen häufig gar nicht oder erst sehr spät diagnostiziert werden, weshalb sich die tatsächliche Prävalenz wahrscheinlich noch deutlich höher gestaltet (199). In den vergangenen Jahrzehnten hat sich ein exponentieller Anstieg der weltweiten Prävalenz von MASLD und MASH gezeigt (24). Bereits heute stellt die MASH-Zirrhose in den USA die zweithäufigste Indikation für eine Lebertransplantation dar (29) und verzeichnet den stärksten Zuwachs, weshalb sie Prognosen zufolge die Alkohol-bedingte Leberzirrhose als die häufigste Indikation in naher Zukunft ablösen wird (30). Die medizinischen Kosten zur Behandlung der MASLD-Patienten wurde 2016 in den USA auf 103 Milliarden US-Dollar (27) und in Deutschland 2018 auf 210-560 Millionen Euro geschätzt (26).

### 2.3.3 Ätiologie und Pathogenese

Die Ätiologie der MASLD basiert nach derzeitigem Stand der Wissenschaft auf dem Zusammenwirken unterschiedlicher genetischer und erworbener Risikofaktoren, welche auch unter dem Begriff der Multiple-Hit-Hypothese zusammengefasst werden (36). Im Zentrum dieses Modells stehen die Dysfunktion des hepatischen Stoffwechsels sowie die Ausbildung einer Inflammationsreaktion. Aufgrund von zucker- und fettreicher Ernährung bei gleichzeitigem Bewegungsmangel kommt es zu einem Überangebot an Energie und einer Überlastung des Fettgewebstoffwechsels mit unzureichender Fettspeicherkapazität. Auf diese Weise bilden sich in den Adipozyten eine Insulinresistenz sowie eine Fettgewebsinflammation aus (200). Die Insulinresistenz führt zu einer Steigerung der Lipolyse im Fettgewebe mit Freisetzung freier Fettsäuren in die Zirkulation (38). Die Fettgewebsinflammation resultiert in der Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-6 oder TNF- $\alpha$  (201). In der Leber kommt es aufgrund des Überangebots an Kohlenhydraten und freien Fettsäuren zu einer De-novo-Lipogenese von Triacylglycerinen, welche in Form von Lipidtröpfchen im Zytoplasma gespeichert werden und das Stadium der MAFL charakterisieren (202-204). Daneben fallen im hepatozellulären Fettstoffwechsel jedoch auch lipotoxische Moleküle wie Diacylglyceride und Ceramide an (205). Diese verursachen oxidativen Stress mit Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, ER-Stress, mitochondrialer Dysfunktion sowie Inflammasomaktivierung. Dies führt letztlich zur zellulären Schädigung der Hepatozyten und zur Ausbildung einer Entzündungsreaktion, welche das Stadium

der MASH charakterisieren (206-208). Es findet eine Rekrutierung von Gewebemakrophagen statt, die unter anderem zu einer Aktivierung von hepatischen Sternzellen mit Ablagerung von Kollagenfibrillen führt. Im Rahmen der chronischen Entzündung kommt es zunehmend zum Untergang von Hepatozyten und zum bindegewebigen Umbau des Organs (209, 210). Diese Leberfibrose kann bis zur Leberzirrhose fortschreiten. Daneben kann es zu einer Schädigung genomischer DNA kommen, welche das Risiko für die Ausbildung eines HCC sowohl in zirrhotischer wie auch in nicht-zirrhotischer Leber erhöht (21, 199, 211).

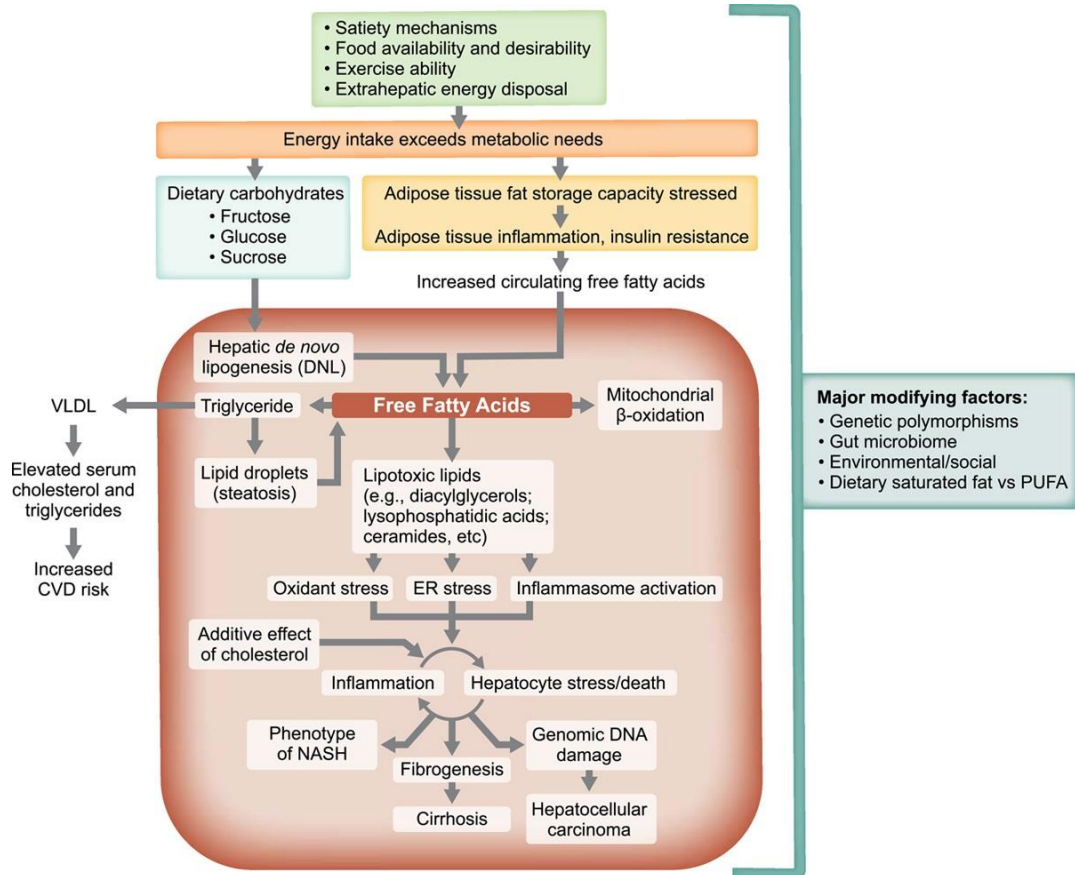
Die Multiple-Hit-Hypothese beinhaltet außerdem zusätzliche intrinsische und extrinsische Risikofaktoren, die zu Entstehung und Progress der MASLD beitragen, wie beispielsweise genetische Polymorphismen und die Zusammensetzung des Darmmikrobioms (212). Die genetische Analyse des MASLD-Patientenkollektivs ergibt eine Reihe von Varianten in Genen, die für Enzyme des hepatischen Fett- und Kohlenhydratstoffwechsels kodieren. Diese Varianten gehen mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung, das Voranschreiten und die Schwere der MASLD einher. Hierzu zählen beispielsweise Single-Nucleotide-Polymorphismen (SNPs) im PNPLA3-Gen oder im TM6SF2-Gen (213-215). Auch das Mikrobiom des Darms beeinflusst die Lebergesundheit, was durch den Begriff der Darm-Leber-Achse verdeutlicht wird. Zum Einen bestimmt die Darmflora die Nährstoffversorgung der Leber, zum anderen moduliert sie die entzündliche Aktivität in der Leber durch Freisetzung von Toll-like-Rezeptor-Liganden (216). So konnten in klinischen Studien Zusammenhänge zwischen bestimmten Mikrobiomkonstellationen und dem Schweregrad der MASLD sowie der Leberfibrose hergestellt werden (217).

Die Pathogenese der MASLD wird prinzipiell als schrittweiser Prozess charakterisiert von Steatose über Steatohepatitis und Leberfibrose hin zu Leberzirrhose und HCC. Jedoch kann sich auf Grundlage dieser pathogenetischen Sequenz der individuelle Krankheitsverlauf unterschiedlich gestalten. So kann die Erkrankung unterschiedlich schnell fortschreiten oder auf einer Stufe verharren. Es können Stufen übersprungen werden und eine Regression ist möglich. Bei einem Wegfall des metabolischen Insults kann es zu einem Abbau der Steatose, einem Ausheilen der Entzündung und auch zu einer teilweisen Rückbildung der Leberfibrose kommen (210, 218).

Letztlich bleiben die Ätiologie und Pathogenese der MASLD jedoch nur unvollständig verstanden und keines der aktuell existierenden Krankheitsmodelle kann das Krankheitsgeschehen in allen Patienten umfassend erklären.

## 2. Literaturdiskussion

a



b

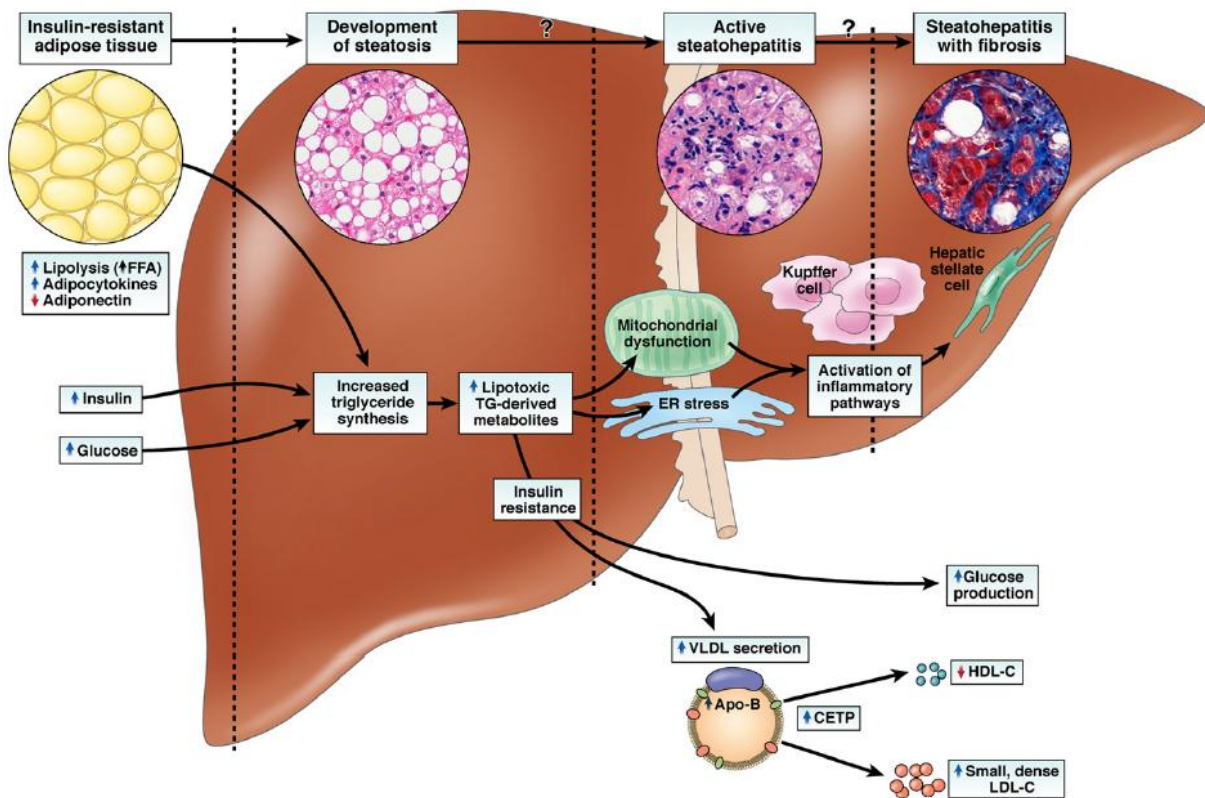


Abbildung 4: Übersicht zu Ätiologie und Pathogenese der MASLD (18, 38)

### **Abbildung 4: Übersicht zu Ätiologie und Pathogenese der MASLD (18, 38) (Fortsetzung)**

- a Überblick über die unterschiedlichen Einflussfaktoren bei der Entstehung der MASLD. Im Zentrum steht die Dysregulation des Energiestoffwechsels mit Akkumulation toxischer freier Fettsäuren (übernommen aus Rinella et al. 2023 (10)).
- b Pathogenetische Sequenz der Fettlebererkrankung über Steatose und MASH hin zur Leberfibrose. Dargestellt sind insbesondere die histologischen Erscheinungsformen sowie die beteiligten Zelltypen (übernommen aus Cusi et al. 2012 (174)).

### **2.3.4 Klinik**

Die Mehrzahl der Patienten mit einer nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung haben keine Symptome. Oftmals handelt es sich um einen Zufallsbefund bei Patienten mit erhöhten Laborparametern oder auffälliger Bildgebung (198). Bei Vorliegen einer MASH können unspezifische Beschwerden wie Müdigkeit, Völlegefühl, Übelkeit und abdominelle Schmerzen im rechten oberen Quadranten auftreten. Bei einer MASH-Zirrhose im dekompensierten Zustand zeigen die Patienten klassische Zeichen der Zirrhose und ihrer Komplikationen wie beispielsweise Ikterus, hepatische Enzephalopathie, Aszites oder Varizenblutungen (219).

### **2.3.5 Diagnostik**

In der Diagnostik der MASLD stehen verschiedene Untersuchungsmethoden zur Verfügung. Das Ziel der Diagnostik besteht neben dem Nachweis einer MASLD in der Einschätzung des Schweregrads der Erkrankung durch Identifikation von MASH und Leberfibrose (198). Durch Anamnese und körperliche Untersuchung lässt sich bereits eine erste Risikostratifizierung anhand prädisponierender Faktoren vornehmen. Des Weiteren können mögliche körperliche Symptome der MASLD wie beispielsweise eine Hepatomegalie erfasst und Komorbiditäten sowie Differentialdiagnosen evaluiert werden (220). Im Laborbefund findet sich häufig eine Erhöhung der Transaminasen AST und ALT um den Faktor 2-5 im Serum, wobei dies weder notwendig noch ausreichend für die Diagnosestellung einer Fettlebererkrankung ist (187, 219, 221). Weitere Indikatoren sind eine Erhöhung der  $\gamma$ -Glutamyltransferase, der alkalischen Phosphatase oder des Ferritins. Im Rahmen der Bildgebung stellt sich beim abdominalen Ultraschall eine vermehrte Echogenität des Leberparenchyms dar (222). Darüber hinaus zeigt sich im CT eine verminderte Attenuierung und im MRT ein erhöhtes Fettsignal. Die Magnetresonanzspektroskopie (MRS) lässt eine quantitative Messung der Leberverfettung zu. Daneben gibt es 3 Ultraschall- und 1 MRT-gestütztes Elastographieverfahren. Mithilfe der Ultraschall-basierten transienten Elastographie lässt sich heute sowohl der Steatosegrad in

Form des CAP-Werts (controlled attenuating parameter, dB/m) als auch der Fibrosegrad in Form der Lebersteife (liver stiffness, kPa) abschätzen (223). Als invasive Diagnostik steht die Leberbiopsie zur Verfügung. Sie stellt den Goldstandard zur Diagnosestellung dar und erlaubt als einzige Methode die sichere Unterscheidung zwischen MAFL und MASH (224, 225). Aufgrund ihrer invasiven Natur sollte sie jedoch nur unter strenger Indikationsstellung erfolgen, beispielsweise wenn durch nicht-invasive Diagnostik kein eindeutiger Befund erhoben werden konnte oder um den Schweregrad der Erkrankung genauer zu bestimmen. Die MAFL wird histologisch charakterisiert durch eine mikrovesikuläre Lipidakkumulation, beginnend im Bereich um die Zentralvene. Es kann zusätzlich auch bereits eine lobuläre bzw. portale Entzündungsreaktion oder eine hepatozelluläre Ballonierung vorliegen (226). Zur Diagnose einer MASH hingegen müssen alle 3 Kriterien vorliegen. Zusätzlich zeigen sich häufig azidophile Apoptosekörperchen, Mallory-Denk-Körperchen oder Megamitochondrien (227). Jedoch kann eine MASH histologisch nicht eindeutig von einer alkoholischen Steatohepatitis (ASH) unterschieden werden. Darüber hinaus findet sich häufig eine perisinusoidale Fibrose oder später eine mikronoduläre Zirrhose (228). Allerdings können bei fortgeschrittener Leberzirrhose Steatose und Inflammation oft nicht mehr nachgewiesen werden (Bild der ausgebrannten Zirrhose), sodass die Diagnose einer kryptogenen Zirrhose gestellt wird (225). Anhand histologischer Kriterien kann das Ausmaß der Steatose in Grade (S1-3) und der Progress der Fibrose in Stadien (F1-4) eingeteilt werden (225).

Auf Grundlage der erhobenen diagnostischen Befunde wurden eine große Anzahl an Biomarkern und Scores entwickelt, um den Schweregrad und die Prognose der Fettlebererkrankung einzuschätzen.

Steatose- und Fibrose-Biomarker sagen den zu erwartenden Steatose- bzw. Fibrosegrad der Leber anhand von nicht-invasiven Untersuchungsbefunden wie epidemiologischen Daten, klinischer Diagnostik sowie Laborwerten voraus (229). Wichtige Steatose-Biomarker sind z.B. der Fatty Liver Index (FLI) (230) und der NAFLD Liver Fat Score (NAFLD-LFS) (231). Der NAFLD Fibrosis Score (NFS) basiert auf dem Patientenalter, dem BMI, dem Hyperglykämie-Level, den Aminotransferasen, der Thrombozytenzahl und dem Albuminwert (232). Der FIB-4-Index (Fibrosis 4 Calculator) wird auf Grundlage von ALT, AST, Thrombozytenzahl sowie des Alters ermittelt und schätzt ebenfalls den Fibrosegrad ein (233).

Der NAFLD Activity Score (NAS) bestimmt die Krankheitsaktivität allein anhand von histologischen Merkmalen: dem Steatosegrad, der lobulären Inflammation und der hepatozellulären Ballonierung (234). Weitere histologische Tools sind beispielsweise der FLIP-Algorithmus (Fatty Liver Inhibition of Progression) oder der SAF-Score (Steatosis, Activity and Fibrosis) (235).

Zu den wichtigen Differentialdiagnosen, die im Rahmen der Diagnostik ausgeschlossen werden müssen, zählen neben der alkoholischen Fettlebererkrankung auch eine Reihe weiterer Krankheitsbilder und Faktoren, die mit einer Leberverfettung einhergehen können. Hier sind zu nennen: virale Hepatitiden, Medikamente wie Amiodaron, Methotrexat, Tamoxifen oder Valproat, Morbus Wilson, Hämochromatose, Morbus Crohn, Zöliakie, angeborene Stoffwechseldefekte wie der Morbus Gaucher, Fasten und parenterale Ernährung, Schwangerschaft und HELLP-Syndrom (18).

Die Leitlinien der verschiedenen Fachgesellschaften schlagen diagnostische Algorithmen zur strukturierten, risikoadaptierten Abklärung eines MASLD-Verdachts in der Primär- und Sekundärversorgung vor. Es bedarf eines nicht-invasiven und kostengünstigen Screeningverfahrens, mit dem eine große Anzahl an Menschen einfach und schnell untersucht werden können. Dadurch sollen Patienten mit hohem Risiko für einen schwerwiegenden Krankheitsverlauf möglichst frühzeitig erkannt und behandelt werden (178).

### 2.3.6 Therapie

In der Therapie der MASLD stehen konservative Verfahren im Vordergrund. Zu den Allgemeinmaßnahmen bei MASLD-Patienten mit Übergewicht ( $\text{BMI} > 25 \text{ kg/m}^2$ ) gehört eine Gewichtsreduktion um mindestens 5-7 % mit einer Rate von 0,5 – 1,0 kg/Woche durch Ernährungsumstellung sowie Bewegung (236, 237). Bei Patienten mit Hyperlipidämie wird eine lipidsenkende Therapie und bei Typ-2-Diabetikern eine Optimierung der Blutzuckerwerte empfohlen. Darüber hinaus sollte eine Impfung gegen Hepatitis A und B erfolgen, sofern keine serologische Immunität nachgewiesen werden kann. Ebenso werden alle Standardimpfungen entsprechend dem Alter des Patienten empfohlen (238). Außerdem sollte der Alkoholkonsum reduziert oder vollständig aufgegeben werden, da dieser zu einem Fortschreiten der Leberfibrose beiträgt (239). Zur medikamentösen Therapie kann bei Patienten, die an einer MASH mit Fibrosegrad  $\geq 2$  leiden, eine tägliche Dosis von 800 I.E. Vitamin E

gegeben werden (18, 240, 241). Die Wirksamkeit des Vitamin E wird auf seine antioxidativen Effekte zurückgeführt. Bei Patienten mit MASH und zusätzlichem Diabetes mellitus Typ 2 sollte zur antidiabetischen Therapie neben Metformin insbesondere der Einsatz der GLP-1-Analoga Liraglutid und Semaglutid (242, 243) sowie unter Umständen des Insulinsensitizers Pioglitazone (244) erwogen werden. Die positive Wirkung der genannten Antidiabetika auf die MASLD wird auf die verbesserte Insulinsensitivität zurückgeführt. Zukünftig steht mit Resmetirom, einem selektiven Thyroidhormon-Beta-Rezeptoragonisten, erstmals auch ein spezifisches Therapeutikum zur Behandlung der MASH mit Fibrose zur Verfügung (245). Darüber hinaus existieren eine Reihe weiterer Wirkstoffe, die möglicherweise zu einer Verbesserung der MASLD beitragen, für deren Einsatz aber bislang nicht genügend Evidenz vorliegt. Hierzu zählen beispielsweise Atorvastatin oder Omega-3-Fettsäuren (238). Des Weiteren wird aktuell eine große Anzahl unterschiedlichster neuer Wirkstoffe in Studien untersucht (246). Letztlich sollten im Rahmen der Sekundärprävention regelmäßige Verlaufskontrollen durchgeführt werden, bei Patienten mit MASH-Zirrhose zusätzlich ein HCC-Screening (18).

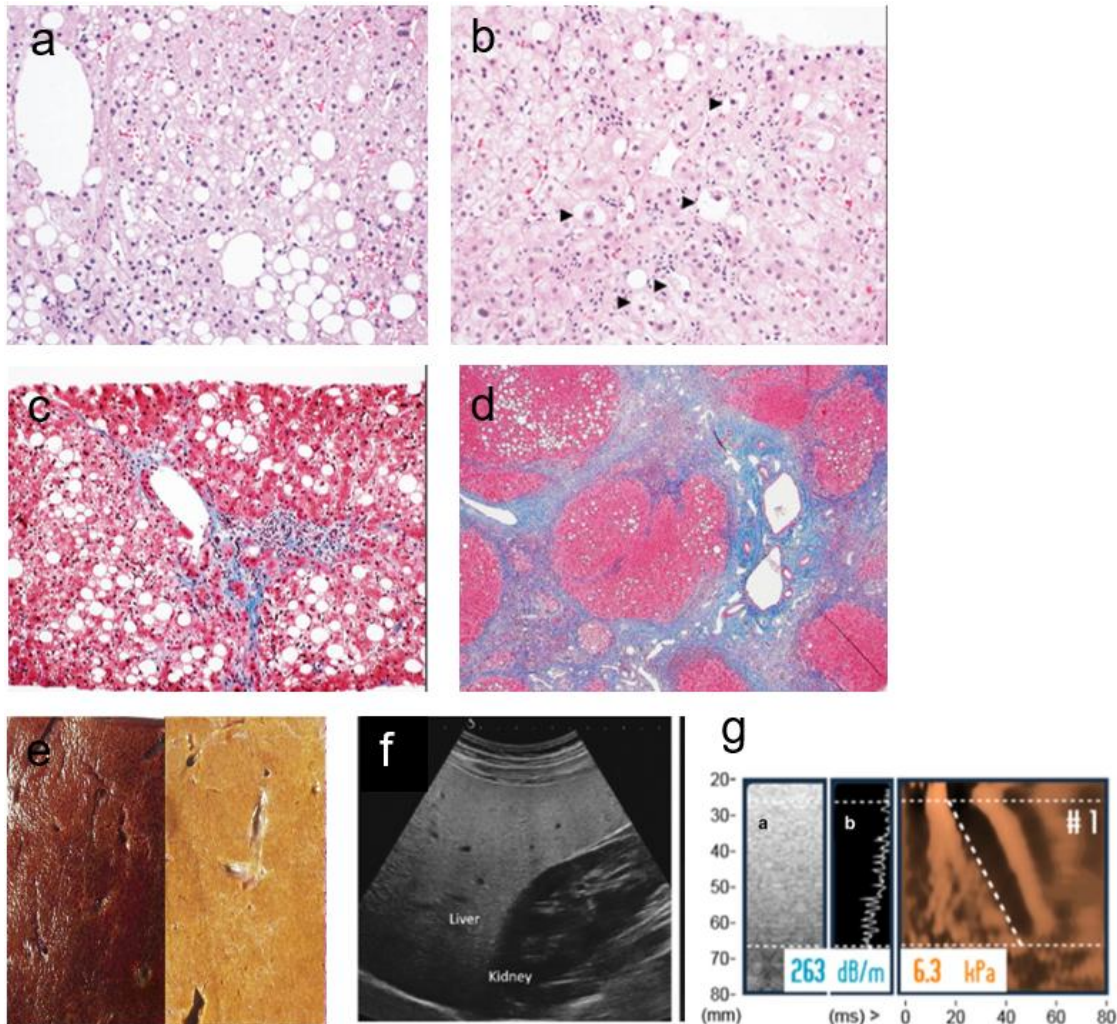
Die chirurgische Therapie kann in Form der bariatrischen Chirurgie zum Einsatz kommen bei Patienten, die an einer MASH oder einer fortgeschrittenen Leberfibrose leiden und bei denen eine konservative Gewichtsreduktion nicht erfolgreich war (247). In einer Kohortenstudie konnte gezeigt werden, dass die bariatrischen Eingriffe bei 85% der Patienten zu einer Rückbildung der MASH und bei 34% der Patienten zu einer Verbesserung der Leberfibrose führten (248). Letztlich kommen Patienten mit einer MASH-Zirrhose und oder einem HCC auch für eine Lebertransplantation infrage (249).

### 2.3.7 Prognose

Bei etwa einem Viertel der MASLD-Patienten entwickelt sich eine MASH. Etwa 41% der MASH-Patienten entwickeln eine Leberfibrose, welche mit einer Rate von ca. 5% in 10 Jahren zu einer Leberzirrhose voranschreitet. Die Inzidenzrate von HCCs in MASH-Patienten beträgt etwa 5,3 in 1.000 Personenjahren. Die MASLD stellt die häufigste Ursache für nicht-zirrhatische HCCs dar (211). Die Gesamtmortalität innerhalb der MASH-Kohorte beträgt ca. 25,6 pro 1.000 Personenjahren (32, 183). Die häufigste Todesursache sind kardiovaskuläre Ereignisse (250). Der Grad der Leberfibrose ist der wichtigste prognostische Faktor für Morbidität und Mortalität

## 2. Literaturdiskussion

innerhalb des MASLD-Patientenkollektivs (251, 252). Zu den Risikofaktoren für eine fortschreitende Leberfibrose zählen unter anderem Alkoholabusus, BMI  $\geq 28$  kg/m<sup>2</sup>, Diabetes mellitus sowie Alter  $\geq 50$  Jahre (238). Der Konsum von Kaffee zeigt hingegen eine protektive Wirkung (253).



**Abbildung 5: Diagnostische Befunde der MASLD**

- a Histologie der MAFL (254):** Mikro- und makrovesikuläre Verfettung in Form von intrazellulären Lipidtröpfchen unterschiedlicher Größe (200x Vergrößerung, HE-Färbung)
- b Histologie der MASH (254):** Neben der Steatose zeigen sich ballonierte Hepatozyten (Pfeilspitze) sowie eine lobuläre Inflammation mit Einwanderung von Immunzellen (200x Vergrößerung, HE-Färbung)
- c Histologie der MASH-Fibrose (254):** Beginn der perisinusoidalen Fibrosierung im Bereich der Zentralvene (200x Vergrößerung, Masson-Trichrom-Färbung)
- d Histologie der MASH-Zirrhose (224):** Zirrhoseknoten (40x Vergrößerung, Masson-Trichrom-Färbung)
- e Makroskopie von gesunder und verfetteter Leber (255):** Der Querschnitt durch eine Fettleber rechts stellt sich aufgrund der Fetteinlagerung gelblich bis ockerfarben dar im Vergleich zur dunkelbraunen gesunden Leber links.
- f Sonographiebefund der MAFL (256):** Durch die Fetteinlagerung präsentiert sich das Leberparenchym im Vergleich zum angrenzenden Nierenparenchym deutlich hyperdens.
- g Elastographiebefund der MAFL (257):** Transiente Elastographie mittels Fibroscan® zur Messung von Leberfettgehalt und Lebersteifheit

### 2.4 Die Rolle der IL-1-Zytokinfamilie in der Pathogenese der MASLD

Im Zentrum der Pathogenese der MASLD steht nach heutigem Kenntnisstand die wechselseitige Beeinflussung von metabolischer Dysfunktion und Inflammation (37) sowie die Kommunikation zwischen Leber und weißem Fettgewebe (258). Sowohl in klinischen Studien als auch in experimentellen Modellen konnte bereits eine Beteiligung der IL-1-Zytokinfamilie an der Entstehung der MASLD nachgewiesen werden (259, 260). Zu den Zytokinen IL-1 $\alpha$  und vor allem IL-1 $\beta$  liegen dabei die meisten Daten vor. Zu IL-33 gibt es nur wenige Publikationen und zu den IL-36-Isoformen existieren keinerlei Veröffentlichungen in der Fachliteratur (45, 261).

In klinischen Studien mit übergewichtigen MASLD-Patienten wurden erhöhte Konzentrationen an IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  sowie IL-1RA gemessen. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass diese Zytokine nur zu einem kleineren Teil aus der Leber und zu einem deutlich größeren Teil aus dem weißen Fettgewebe stammen, wo sie im Rahmen einer chronischen Fettgewebsinflammation freigesetzt werden (45, 262). In der Leber werden im gesunden Zustand IL-1 $\alpha$  und IL-1RA exprimiert, während IL-1 $\beta$  bei verschiedenen inflammatorischen Prozessen induziert wird (67). Im Blut von MASH-Patienten konnten erhöhte Konzentrationen der Neutrophilenelelastase nachgewiesen werden, welche die Aktivierung von mehreren Zytokinen der IL-1-Familie vermittelt (263). Im Blut von Menschen mit Leberfibrose wurden erhöhte Konzentrationen von IL-33 gemessen, genauso wie in Biopsaten humaner Leberfibrose (264, 265).

Zur genaueren Untersuchung der zugrundeliegenden Mechanismen wurden experimentelle Modelle der MASLD in Zellkultur und Tiermodell etabliert. Kamari et al. veröffentlichten 2011 Ergebnisse aus einem Mausmodell der MASLD, in dem die Mäuse unter atherogener Diät mit hohem Fett- und Cholesteringehalt sowie Natriumcholin eine Steatosis hepatis entwickeln, die im Verlauf zu Steatohepatitis und Leberfibrose progrediert (46). Im Zustand der Steatose konnten bereits erhöhte Konzentrationen an IL-1 $\alpha$  detektiert werden und bei Vorliegen der Steatohepatitis wurden erhöhte Spiegel an IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  nachgewiesen. Der Knock-Out von IL-1 $\alpha$  führte zu einer Abnahme des Inflammationsgeschehens mit niedrigeren Konzentrationen an IL-6, TNF- $\alpha$  und CXCL1 sowie eine Reduktion der

Leberfibrosierung mit niedrigeren Konzentrationen an TGF- $\beta$ . Der Knock-Out von IL-1 $\beta$  führte zusätzlich zu einer Abnahme der Steatose mit geringeren intrazellulären Mengen an Cholesterin und Triacylglycerinen. Darüber hinaus führte der Knock-Out eines der beiden Zytokine auch zur Reduktion des jeweils anderen (46). Negrin et al. konnten 2013 nachweisen, dass in der Leber von genetisch modifizierten ob/ob Mäusen sowie Mäusen mit fettreicher Ernährung (high fat diet, HFD) erhöhte Konzentrationen an TAGs und IL-1 $\beta$  vorliegen (45). Die Gabe von Anakinra führte bei den ob/ob Mäusen zu einer Abnahme von Inflammation sowie Steatose und De-novo-Lipogenese (DNL). Außerdem wurde gezeigt, dass die Zytokine IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  von leberresidenten Kupffer-Zellen sekretiert werden und nicht von einwandernden Monozyten aus dem Knochenmark. Die Depletion der Kupffer-Zellen mithilfe von Clodronat-haltigen Liposomen führte dementsprechend zu einer Abnahme von IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  sowie zur Abnahme der De-novo-Lipogenese mit Herunterregulation von PPAR $\gamma$ , Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC), Fettsäuresynthase (FAS) und Diacylglycerin-O-Acyltransferase (DGAT) (45). Daneben konnten Stienstra et al. 2010 zeigen, dass eine Kupffer-Zell-Depletion zu einer Reduktion der IL-1 $\beta$ -Konzentration führt, die mit einer Steigerung der Expression von PPAR $\alpha$ , CPT-1 und FATP2 und folglich mit einer Zunahme der  $\beta$ -Oxidation in den Hepatozyten einhergeht (266). Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass auch die Hepatozyten selbst IL-1 $\alpha$  produzieren (267). Cazanave et al. haben 2017 in ihrem Mausmodell mit einer DIAMOND-Diät mit hohem Fett- und Zuckergehalt Transkriptomanalysen in den unterschiedlichen Stadien der MASLD durchgeführt. Im Stadium der Steatose wurden vor allem Marker des Lipidstoffwechsels und für oxidativen Stress hochreguliert. Im Lipidstoffwechsel wurde sowohl eine Steigerung von Lipogenese als auch  $\beta$ -Oxidation beobachtet. Erst im Stadium der Steatohepatitis kam es zu einer signifikanten Induktion pro-inflammatorischer Signalwege und einer verstärkten Synthese von IL-1 $\beta$  (268). De Roos et al. konnten zeigen, dass ein Knock-Out des IL-1-Rezeptor 1 bei Mäusen im HFD-Modell zu einer Verbesserung der Insulinsensitivität, einer Abnahme von ER-Stress im Fettgewebe und einer Senkung des TAG-Gehalts in der Leber führt (269). Gieling et al. haben 2009 nachgewiesen, dass in ihrem IL-1R1-Knock-Out-Modell ein geringerer Umfang an Fibrogenese stattfindet aufgrund einer reduzierten Aktivierung von Ito-Zellen (270). Ein Knock-out von IL-1RA hingegen führte im Mausmodell zu einer Zunahme der hepatischen Steatose sowie einer Hypercholesterinämie (271). Stienstra et al.

haben 2010 gezeigt, dass in Mäusen mit HFD erhöhte Spiegel an Caspase-1 und IL-1 $\beta$  in Adipozyten vorliegen, die mit einer verminderten Insulinsensitivität einhergehen (272). Dixon et al. haben 2013 gezeigt, dass ein Knock-Out von Caspase-1 in Mäusen mit einer HFD dazu führt, dass sich keine Entzündung in der Leber entwickelt, ebenso wenig wie eine Steatose durch gesteigerte Lipogenese oder eine Fibrose (47). Csak et al. haben 2011 in einem MASH-Mausmodell nachgewiesen, dass freie Fettsäuren wie Palmitinsäure über eine Stimulation von Toll-like-Rezeptor 2 eine Aktivierung des Inflammasoms und folglich der Caspase-1 in Hepatozyten bewirken und eine Sekretion von IL-1 $\beta$  induzieren können (49). Des Weiteren konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass das NLRP3-Inflammasom ursächlich an der Entstehung der Insulinresistenz des Fettgewebes bei metabolischer Inflammation beteiligt ist und eine Blockierung des Inflammasoms zum Absinken der IL-1 $\beta$ -Konzentration im Plasma sowie zu einer Senkung von Inflammation und Fibrose in der Leber im Rahmen der MASLD führte (50, 273). Gleichermaßen konnte eine Beteiligung neutrophiler Serinproteasen an der Entstehung von Insulinresistenz und MASLD nachgewiesen werden. So bewahrte ein Knock-Out von Neutrophilenelelastase sowie Proteinase 3 Mäuse mit HFD vor einer Leberverfettung sowie der Ausbildung einer Insulinresistenz (274).

Im Mausmodell wurde ebenfalls die Wirkung von IL-33 untersucht. In experimentell induzierter Leberfibrose konnten erhöhte IL-33 mRNA-Expressionsniveaus gemessen werden (275). Die intraperitoneale Applikation von IL-33 in Mäusen mit diätätisch induzierter MASH führte zu einer Minderung der hepatischen Steatose, jedoch zu einer Verstärkung der Fibrose (275). Allerdings existieren auch Publikationen mit gegenteiligen Ergebnissen: Vasseur et al. konnten in ihrem HFD-Mausmodell keinen Einfluss eines homozygoten IL-33-Knock-outs auf hepatische Inflammation oder Fibrose nachweisen (276).

In zellulären Modellen mit primären murinen Hepatozyten sowie humanen Zelllinien wurde die Biologie der IL-1-Zytokinfamilie in Bezug auf einzelne Zelltypen genauer untersucht. So konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung primärer muriner Hepatozyten mit steigenden IL-1 $\beta$ -Konzentrationen zu einem proportionalen Anstieg der Fettsäuresynthase-Expression sowie der TAG-Akkumulation in den Hepatozyten führt (45). He et al. konnten 2005 zeigen, dass die Behandlung von 3T3-L1-Adipozyten mit rekombinantem IL-1 $\alpha$  zu einer verminderten Insulinwirkung führte. Diese wurde durch die Phosphorylierung von Serinresten des Insulinrezeptorsubstrats

1 (IRS-1) durch Serinkinasen wie I $\kappa$ B-Kinase und c-Jun-N-terminale Kinase verursacht (277). Parallel dazu konnten Lagathu et al. 2006 zeigen, dass die Stimulation muriner und humaner Adipozytenzelllinien mit IL-1 $\beta$  ebenfalls zu einer reduzierten Insulinsensitivität führt durch Interferenz mit der  $\beta$ -UE des Insulinrezeptors, mit IRS-1, mit der Proteinkinase B sowie mit ERK 1/2 (278).

Letztlich wurden in Studien mögliche Therapeutika mit Wirksamkeit gegen die IL-1-Zytokinfamilie zur Behandlung der MASLD und anderen Komponenten des metabolischen Syndroms untersucht. In der CANTOS-Studie konnte gezeigt werden, dass eine anti-inflammatorische Therapie mit dem monoklonalen IL-1 $\beta$ -Antikörper Canakinumab bei Patienten mit hohem kardiovaskulärem Risiko zu einer signifikant niedrigeren Zahl an kardiovaskulären Ereignissen führt (279). Darüber hinaus konnte in einer Phase-2-Studie mit Typ-2-Diabetikern nachgewiesen werden, dass die Gabe des IL-1RA Anakinra eine Verbesserung der  $\beta$ -Zellfunktion, eine Senkung der Hyperglykämie und eine Reduktion der systemischen Inflammation bewirkt (280). Darüber hinaus ist, wie bereits erwähnt, die Wirksamkeit einer medikamentösen Inhibition des NLRP3-Inflammasoms, der Caspase-1 sowie verschiedener neutrophiler Serinproteasen Gegenstand aktueller Forschung zur Therapie der MASLD (274).

Insgesamt lassen sich die beschriebenen Ergebnisse zu einem Modell verknüpfen, in dem die Leberzellverfettung aufgrund einer positiven Energiebilanz des Organismus zu einer Freisetzung von IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  aus Hepatozyten und Kupffer-Zellen führt. Als zugrundeliegender Mechanismus kann eine Aktivierung des Inflammasoms bei zellulärem Stress angenommen werden. Umgekehrt führen IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  selbst zu einer Steatose durch Stimulation der Fettsäuresynthese und möglicherweise auch Hemmung der  $\beta$ -Oxidation in den Hepatozyten. Sowohl die Lipidakkumulation als auch die Zytokinsekretion mindern die Insulinsensitivität, indem sie in die Signaltransduktionskaskaden des Insulinrezeptors eingreifen. Auch an der gegenseitigen Beeinflussung von Leber und Fettgewebe ist die IL-1-Zytokinfamilie beteiligt, da mindestens IL-1 $\beta$  zwischen den beiden Geweben zirkuliert. Die Bedeutung der anderen IL-1-Zytokine IL-33 und IL-36 $\alpha/\beta/\gamma$  in der Entstehung der MASLD ist wenig bis gar nicht erforscht. IL-33 wird mit einer Aggravation der Leberfibrose in Verbindung gebracht, zu den IL-36-Isoformen liegen keine Daten in Bezug auf die MASLD vor (259, 260). Abschließend lässt sich schlussfolgern, dass

## 2. Literaturdiskussion

---

ein gegen den gemeinsamen Korezeptor IL1RacP gerichteter Antikörper ein vielversprechender Ansatz in der Therapie der MASLD darstellen kann (281).

## 3. Material und Methoden

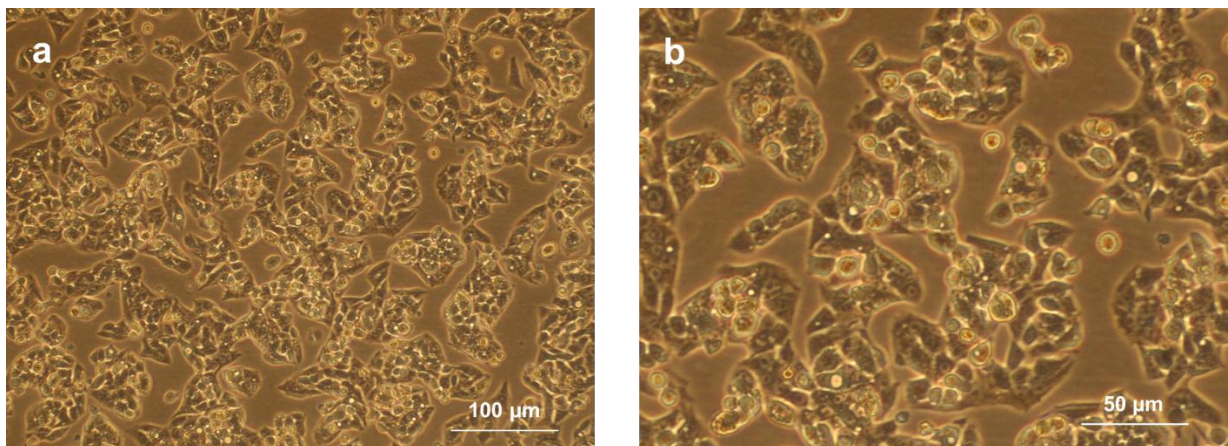
### 3.1 Material

#### 3.1.1 Zellmaterial

Alle Experimente wurden an HepG2-Zellen oder primären humanen Hepatozyten durchgeführt.

##### HepG2-Zellen

Die HepG2-Zelllinie ist eine humane immortalisierte Hepatomzelllinie, welche 1979 aus der Biopsie des hepatozellulären Karzinoms eines 15-jährigen Kaukasiers gewonnen wurde (282, 283). Das Zellmaterial für diese Promotionsarbeit wurde von der CLS Cell Lines Service GmbH (Eppelheim, Deutschland) erworben.

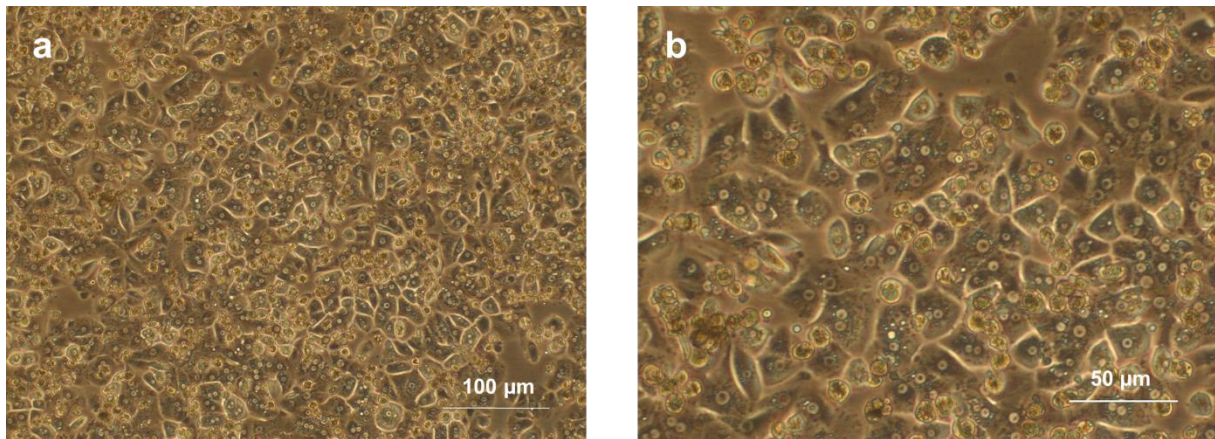


**Abbildung 6: HepG2-Zellen in Kultur (eigene Aufnahmen)**

- a** Lichtmikroskopische Aufnahme mit 100x Vergrößerung. Gleichmäßiger Zellrasen mittlerer Dichte mit gruppiert wachsenden Hep-G2-Zellen.
- b** Lichtmikroskopische Aufnahme mit 200x Vergrößerung. Typische Morphologie adhärenter HepG2-Zellen mit schlanken spitz zulaufenden Somata.

##### Primäre humane Hepatozyten

Die primären humanen Hepatozyten wurden von ThermoFisher Scientific (Waltham, USA) bezogen. Es wurden Zellen eines Spenders ausgewählt (Katalognummer HMCPIS, Lot Nummer HU8300), der die Merkmale männliches Geschlecht, normaler BMI sowie moderater Alkoholkonsum aufwies.



**Abbildung 7: Primäre humane Hepatozyten in Kultur**

- a** Lichtmikroskopische Aufnahme mit 100x Vergrößerung. Konfluenten Zellrasen mit gleichmäßig wachsenden primären Hepatozyten.
- b** Lichtmikroskopische Aufnahme mit 200x Vergrößerung. Typische Morphologie adhärenter primärer Hepatozyten mit großen polygonalen Somata. Daneben auch nicht adhärenente kleine kugelige Hepatozyten im Überstand.

#### 3.1.2 Zellkulturmedien und -zusätze

Substanz	Hersteller (Sitz)
Anti-IL-1-RAcP-Antikörper TPP-13298	Boehringer Ingelheim (Ingelheim am Rhein, Deutschland)
Anti-IL-1-RAcP-Antikörper BI765041	Boehringer Ingelheim (Ingelheim am Rhein, Deutschland)
Anti-TNP-Antikörper TPP-6026	Boehringer Ingelheim (Ingelheim am Rhein, Deutschland)
BSA-Oleat <i>Oleic Acid – Albumin from bovine serum</i>	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Cell Maintenance Supplement Pack	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
<i>Dimethylsulfoxid für die Molekularbiologie ≥ 99,5% (DMSO)</i>	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Dulbecco's Modified Eagle's Medium <i>DMEM 31966</i>	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Fetales Kälberserum (fetal calf serum, FCS) <i>Gold ADD</i>	Bio&SELL GmbH (Nürnberg, Deutschland)
Hepatocyte Thaw Medium (Part No: CM7500)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Penicillin-Streptomycin 10.000 U/ mL Penicillin 10 mg/mL Streptomycin	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline, PBS) <i>Roti®-CELL PBS</i> <i>CELLPURE® ready-to-use, steril</i>	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Rekombinante humane Zytokine IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-33, IL-36 $\alpha$ , IL-36 $\beta$ , IL-36 $\gamma$	R&D Systems (Minneapolis, USA)
Rinderserumalbumin <i>Bovine Serum Albumin</i>	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

### 3. Material und Methoden

Thawing/ Plating Supplement Pack	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Trypanblau (0,4%)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Trypsin <i>Trypsin-EDTA solution</i>	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Williams' Medium E (A1217601)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

**Tabelle 2: Zellkulturmedien und -zusätze**

#### 3.1.3 Primer

Alle Primerpaare wurden von Eurofins Scientific (Luxemburg, Luxemburg) erworben. Die PCRs wurden mithilfe des 5x Hot Start Taq EvaGreen® qPCR Mix des Unternehmens Axon Labortechnik GmbH (Kaiserslautern, Deutschland) durchgeführt.

Zielgen	Forward Primer-Sequenz (5' → 3')	Reverse Primer-Sequenz (5' → 3')
ACC	GAG GGA AGG GAA TTA GAA (18)	ATC ACC CCA GGG AGA TAC (18)
CPT-1α	ATG CGC TAC TCC CTG AAA GTG (21)	GTG GCA CGA CTC ATC TTG C (19)
FAS	CGC TCG GCA TGG CTA TCT (18)	CTC GTT GAA GAA CGC ATC CA (20)
FATP5	TGA TGG GAC TTG TCG TTG G (19)	CCA GAA GCA GGA AGT AGA GAA C (22)
FXR-α	TGT GAG GGG TGT AAA GGT TTC T (22)	GCC TGT ATA CAT ACA TTC AGC CA (23)
GAPDH	CTC TGC TCC TCC TGT TCG AC (20)	ACG ACC AAA TCC GTT GAC TC (20)
IL-1R1	AAG GTG GAG GAT TCA GGA CAT (21)	AGC CTA TCT TTG ACT CCA CTA (21)
IL-1RAcP	AGA ACC GCA TTA GTA AGG AGA AA (23)	CTT TAC AGT CAG AGT CCT GGT GAG (24)
IL-1α	CGCCAATGACTCAGAGGAAGA (21)	AGG GCG TCA TTC AGG ATG AA (20)
IL-1β	AAT CTG TAC CTG TCC TGC GTG TT (23)	TGG GTA ATT TTT GGG ATC TAC ACT CT (26)
IL-33R	TCC CAC TCA GGA AAG AA (17)	CTC CGA TTA CTG GAA ACA (18)
IL-36R	GCT GGA GTG TCC ACA GCA TA (20)	GCGATAAGCCCTCCTATCAA (20)
IL-8	TTG GCA GCC TTC CTG ATT (18)	AAC TTC TCC ACA ACC CTC TG (20)
CCL2	GCT CAT AGC AGC CAC CTT CAT TC (23)	TGC AGA TTC TTG GGT TGT GGA G (22)
NFκB (p65)	ATC CCA TCT TTG ACA ATC GTG C (22)	CGT GAA ATA CAC CTC AAT GTC CTC (24)
PGC-1α	CCA AAC CAA CAA CTT TAT CTC TTC C (25)	CAC ACT TAA GGT GCG TTC AAT AGT C (25)

### 3. Material und Methoden

PPAR- $\alpha$	TCA CAA GTG CCT TTC TGT CG (20)	TCT TGG CAT TCG TCC AAA A (19)
PPAR- $\gamma$	ACC ACT CCC ACT CCT TTG (18)	GCA GGC TCC ACT TTG ATT (18)
SREBP-1c	GGA GGG GTA GGG CCA ACG (18)	AGG GGT GGA GCT GAA CTG (18)
Stearoyl- CoA- Desaturase	AGT TCT ACA CCT GGC TTT G (19)	GTT GGC AAT GAT CAG AAA GAG C (22)
TGF- $\beta$	TTT CGC CTT AGC GCC CAC TG (20)	TCC AGC CGA GGT CCT TGC GG (20)
TNF- $\alpha$	ACA AGC CTG TAG CCC ATG TT (20)	AAA GTA GAC CTG CCC AGA CT (20)

**Tabelle 3: Primer-Paare mit Forward- und Reverse-Sequenz**

#### 3.1.4 Antikörper

<b>Primärantikörper</b>	<b>Hersteller (Sitz)</b>
Anti-Lamin B1-Antikörper (#13435)	Cell Signaling Technology (Cambridge, Großbritannien)
Anti-p-NF $\kappa$ B p65-Antikörper (27.Ser 536) (sc-136548)	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, USA)
<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Hersteller (Sitz)</b>
Anti-Rabbit-IgG-Antikörper (P 0448)	Agilent (Santa Clara, USA)
Anti-Mouse-IgG-Antikörper HRP-linked Antibody (#7076)	Cell Signaling Technology (Cambridge, Großbritannien)
Anti-Mouse-IgG-Antikörper m-IgG Fc BP-HRP (sc-525409)	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, USA)
Anti-Rabbit-IgG-Antikörper HRP-linked Antibody (#7074)	Cell Signaling Technology (Cambridge, Großbritannien)

**Tabelle 4: Primär- und Sekundärantikörper für Western Blot**

#### 3.1.5 Kits

<b>Kit</b>	<b>Hersteller (Sitz)</b>
RNA-Isolation mittels <i>RNeasy<sup>®</sup> Micro Kit</i>	Qiagen (Hilden, Deutschland)
cDNA-Synthese mittels <i>AffinityScript Multi-Temp cDNA Synthesis Kit</i>	Agilent Technologies (Santa Clara, USA)
Triglycerid-Messung mittels <i>Triglyceride Quantification Colorimetric/Fluorometric Kit</i>	BioVision/ Abcam (Cambridge, Großbritannien)
ELISA mittels <i>TransAM NF<math>\kappa</math>B p65 Activation Assay Kit</i>	Active Motif (Carlsbad, USA)

**Tabelle 5: Kits**

### 3.1.6 Chemikalien

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller (Sitz)</b>
1-Brom-3-Chlorpropan	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
2-Mercaptoethanol	Merck Schuchardt OHG (Hohenbrunn, Deutschland)
2-Propanol $\geq 99,5\%$	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)	Biomol GmbH (Hamburg, Deutschland)
4x Laemmli Sample Buffer	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
Acrylamidlösung (30%) <i>Rotiphorese® Gel 30</i>	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Albumin Standard (#23209)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Ammoniumpersulfat (APS)	Promega (Madison, USA)
Bio-Rad Protein Assay Farbstoffkonzentrat	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland)
Chloroform	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Dinatriumphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Entwicklerlösung Clarity™ Western ECL Substrate	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
Ethanol 70% vergällt Ethanol ROTIPURAN $\geq 99,8\%$	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ethylendiamintetraessigsäure, Dinatriumsalz-Dihydrat (EDTA) <i>Titriplex® III</i>	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Glycerol <i>ROTIPURAN® <math>\geq 86\%</math></i>	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Glycin	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Kaliumchlorid	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Magermilchpulver <i>Nonfat dried milk powder</i>	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland) PanReac (Barcelona, Spanien)
Methanol	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland) PanReac (Barcelona, Spanien)
N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure) (HEPES)	GERBU Biotechnik GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Natriumchlorid	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumorthovanadat ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ )	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Nonidet P-40 (NP-40)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Phosphataseinhibitor <i>PhosSTOP EASYpack Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets</i>	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland)
Proteaseinhibitor <i>complete Mini Protease inhibitor cocktail tablets</i>	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland)

### 3. Material und Methoden

Proteinstandard <i>Precision Plus Protein Dual Color Standards</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland)
RIPA Lysis Buffer System	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, USA)
Roti <sup>®</sup> -Block	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
SDS Pellets	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
TRI Reagent <sup>®</sup>	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
TRIS Hydrochlorid <i>PUFFERAN<sup>®</sup> ≥ 99,9%</i>	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan <i>PUFFERAN<sup>®</sup> ≥ 99,9%</i>	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Tween <sup>®</sup> 20	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Wasser steril und endotoxinfrei <i>Ampuwa<sup>®</sup> Spüllösung Plastipur<sup>®</sup></i>	Fresenius Kabi AG (Bad Homburg, Deutschland)

**Tabelle 6: Chemikalien**

#### 3.1.7 Verbrauchsmaterialien

<b>Material</b>	<b>Hersteller (Sitz)</b>
Aluminiumfolie	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Blotting-Papier <i>Gel Blotting Paper GB 005</i>	Cytiva (Marlborough, USA)
Chemilumineszenzfilm Amersham <i>Hyperfilm<sup>TM</sup> ECL</i>	GE Healthcare Ltd. (Buckinghamshire, Großbritannien)
Desinfektionsmittel <i>terralin<sup>®</sup> liquid</i>	Schülke & Mayr GmbH (Norderstedt, Deutschland)
Einweghandschuhe <i>VWR<sup>®</sup> Latex powder free gloves</i>	VWR International bv (Leuven, Belgien)
ELISA-Platten <i>ELISA MAX<sup>TM</sup> Uncoated Plates</i>	BioLegend (San Diego, USA)
Falcon (50 mL) <i>CELLSTAR<sup>®</sup> tubes, sterile</i>	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Halbmikro-Einmalküvette	Ratiolab GmbH (Dreieich, Deutschland)
Kryoröhrchen <i>CryoTube<sup>TM</sup> Vials (1,8 mL)</i>	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Nitrozellulosemembran Amersham <sup>TM</sup> <i>Protran<sup>TM</sup> (0,45 µm)</i>	GE Healthcare Ltd. (Buckinghamshire, Großbritannien)
PCR-Folie <i>Viewseal Sealer, clear</i>	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
PCR-Platte <i>Sapphire Microplatte</i>	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Pipettenfilterspitzen (10 µL, 100 µL, 1000 µL) <i>SafeSeal-Tips<sup>®</sup> professional</i>	Biozym (Hessisch Oldendorf, Deutschland)
Pipettenspitzen 10 µL 200 µL 1000 µL	Starlab (Hamburg, Deutschland) Starlab (Hamburg, Deutschland) Sarstedt

### 3. Material und Methoden

Pipettenspitzen (5 mL, 10 mL, 25 mL, 50 mL) <i>CELLSTAR® serological pipette, sterile</i>	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Pipettenspitzen für Gelelektrophorese <i>Prot/Elec™ Tips</i>	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
QIAshredder™	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Reagiergefäße 0,5 mL Multi TabTop Tube 1,5 mL, 2 mL SafeSeal Reagiergefäß	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, Deutschland)
Schraubdeckelflaschen (100 mL, 250 mL, 500 mL)	Schott DURAN (Mainz, Deutschland)
Scienceware® ELISA-Wannen	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Spatel	Bochem Instrumente GmbH
Sterilfilter Whatman® FP 30/0,2 CA-S	Whatman GmbH (Dassel, Deutschland)
Sterilfiltrationssystem Millipore® Stericup® Quick Release	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Verpackungsfolie Sarogold® Pro	Saropack GmbH (Lörrach, Deutschland)
Zellkulturflaschen CELLSTAR® cell culture flasks, sterile 25 cm <sup>2</sup> / 50 mL 75 cm <sup>2</sup> / 250 mL 175 cm <sup>2</sup> / 550 mL	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Zellkulturplatten <i>Collagen-I, Coated Plate (24-Well)</i>	Gibco/ Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Zellkulturplatten TPP® tissue culture plates (6-Well, 24-Well, 96-Well)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Zellschaber <i>Disposable cell scraper, sterile</i>	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Zellsieb <i>BD Falcon™ Cell Stainer, sterile</i>	Beckton, Dickson and Company (Franklin Lakes, USA)
Einlagig weisse Wischer <i>VWR Light-Duty Tissue Wipers</i>	VWR International bv (Leuven, Belgien)

**Tabelle 7: Verbrauchsmaterialien**

#### 3.1.8 Geräte

<b>Gerätebezeichnung</b>	<b>Hersteller (Sitz)</b>
Laborabzug	Waldner Unternehmensgruppe (Wangen im Allgäu)
Dampfsterilisator Varioklav®	H+P Labortechnik GmbH (Oberschleißheim bei München, Deutschland)
Autoradiographie-Kassette Amersham™ Hypercassette™	GE Healthcare Ltd. (Buckinghamshire, Großbritannien)
Einfrierbehälter <i>Nalgene® Mr. Frosty Cryo 1°C Freezing Container</i>	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

### 3. Material und Methoden

Eismaschine	ZIEGRA Eismaschinen GmbH (Isernhagen, Deutschland)
Entwicklungsmaschine <i>Type 9462/106</i>	Agfa-Gevaert N.V. (Mortsel, Belgien)
Feinwaage <i>BP 221S</i>	Sartorius AG (Göttingen, Deutschland)
Gelelektrophoreseplatten <i>Mini Protean® 3 System Glass Plates</i>	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
Inkubator <i>HERA cell 240</i>	ThermoFisher Scientific (Waltham, USA)
Kühlschrank	Liebherr (Bulle, Schweiz)
PCR-Plattform <i>LightCycler® 480 II</i>	Roche Holding (Basel, Schweiz)
Magnetrührer mit Heizplatte <i>RCT basic</i> <i>IKA-COMBIMAG-RCO</i> <i>MR3001</i>	Jahnke & Kunkel GmbH und CO. KG IKA-Labortechnik (Staufen, Deutschland) Heidolph Instruments (Schwabach, Deutschland)
Mehrkanalpipette <i>Research plus (10-100 µL)</i>	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Mikroskop Nikon TMS	Nikon Corporation (Tokio, Japan)
Mikrozentrifuge <i>BIOFUGE pico</i> <i>2K15</i>	Heraeus (Hanau, Deutschland) SIGMA Laborzentrifugen GmbH (Osterode am Harz Deutschland)
Multipipette <i>Multipette® plus</i>	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Spektralphotometer <i>NanoDrop™ 2000/2000c</i>	ThermoFisher Scientific (Waltham, USA)
Photometer <i>BioPhotometer® D30</i>	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Pipetten <i>Research</i>	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Pipettierhilfe <i>pipetus®-akku</i>	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG (Eberstadt, Deutschland)
Plattformschüttler <i>IKA-VIBRAMAX-VXR</i>	Jahnke & Kunkel GmbH und CO. KG IKA-Labortechnik (Staufen, Deutschland)
Walzenmischer Bibby Scientific™ Stuart™ Roller Mixer SRT1	Bibby Sterilin Ltd. (Staffordshire, Großbritannien)
Magnetrührstäbchen	VWR International bv (Leuven, Belgien)
Sterilwerkbank <i>Clean Air</i> <i>SterilGARD Hood</i>	Camfil Clean Air Solutions (Stockholm, Schweden) The Baker Company (Sanford, USA)
Stickstofftank <i>GT 75</i>	AIR LIQUIDE Kryotechnik GmbH (Düsseldorf, Deutschland)
<i>Thermomixer 5436</i> <i>Thermomixer comfort</i>	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Tiefkühlschrank (-20°C)	Miele & Cie. KG (Gütersloh, Deutschland)

### 3. Material und Methoden

Überkopftaumler <i>REAX 2</i>	Heidolph Instruments (Schwabach, Deutschland)
Ultratiefkühlschrank (-80°C) <i>TSX Series</i>	ThermoFisher Scientific (Waltham, USA)
Vortexer Vibrofix VF1, VF 2	Jahnke & Kunkel GmbH und CO. KG IKA-Labortechnik (Staufen, Deutschland)
Wasserbad	Gesellschaft Für Labortechnik (Burgwedel, Deutschland)
Western Blot Spannungsquelle <i>Bio-Rad Electrophoresis Power Supply Model 250/2.5</i>	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
Western Blot-Kammer Gelelektrophorese-Kammer	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
Zählkammer <i>BRAND® counting chamber</i> <i>BLAUBRAND® Neubauer improved</i>	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Zentrifuge <i>Megafuge 1.0R</i>	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Mikroplatten-Leser <i>Appliskan® Multimode Microplate Reader</i>	ThermoFisher Scientific (Waltham, USA)

**Tabelle 8: Geräte**

#### 3.1.9 Datenverarbeitungsprogramme

<b>Programm</b>	<b>Hersteller</b>
LightCycler® 480 Software release 1.5.1.62 SP2	Roche Holding (Basel, Schweiz)
NanoDrop™ 2000/2000c Software	ThermoFisher Scientific (Waltham, USA)
Skant Software 2.3	ThermoFisher Scientific (Waltham, USA)
Microsoft Word, Microsoft Excel, Microsoft Powerpoint	Microsoft Corporation (Redmond, USA)
EndNote 20.2.1	Clarivate Analytics (London, Großbritannien)
Adobe Acrobat Reader DC	Adobe Inc. (San José, USA)
ImageJ	Wayne Rasband/ National Institutes of Health (Bethesda, USA)

**Tabelle 9: Datenverarbeitungsprogramme**

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Zellkultur

#### 3.2.1.1 HepG2-Zellen

##### 3.2.1.1.1 Kultivierung und Passagierung

Die Kultivierung und Passagierung der HepG2-Zellen wurde entsprechend existierender Standardprotokolle durchgeführt (283-285). Alle Zellkulturarbeiten wurden an Zellkultursterilbanken durchgeführt. Dabei wurden Einmalhandschuhe getragen sowie ausschließlich sterile Verbrauchsmaterialien verwendet. Die HepG2-Zellen wurden als adhärenente Zellen in Zellkulturflaschen unterschiedlicher Größe (25 cm<sup>2</sup>/ 75 cm<sup>2</sup>/ 175 cm<sup>2</sup>) in einem Brutschrank mit 37°C, 5% CO<sub>2</sub> sowie 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Als Zellkulturmedium wurde DMEM mit 4,5 g/L Glucose verwendet. Hinzugegeben wurden 20% FCS und 1% Penicillin-Streptomycin, um das HepG2 Vollmedium zu erzeugen (Tabelle 10). DMEM ist ein standardisiertes Medium zur Kultivierung verschiedenster humaner und tierischer Zellen mit einer definierten Konzentration an Aminosäuren, Vitaminen sowie Elektrolyten (286, 287). Das fetale Kälberserum enthält zusätzlich wichtige Substrate wie z.B. Wachstumsfaktoren, Hormone, Zytokine oder Adhäsionsfaktoren (288, 289). Die Zugabe von Antibiotika in das Zellkulturmedium ist unerlässlich, um eine bakterielle Kontamination zu verhindern (283). Die Zellen wurden alle 3 bis 6 Tage bei Erreichen einer Konfluenz von etwa 90% im Verhältnis 1:3 bis 1:6 gesplittet. Hierzu wurde das alte Zellkulturmedium entnommen und die Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für eine Dauer von 5 min bei 37°C mit Trypsin inkubiert, um eine Ablösung der Zellen vom Boden zu erreichen. Bei Trypsin handelt es sich um eine Serinprotease, die zur Aufspaltung von Proteinen der extrazellulären Matrix führt (290). Als Nächstes wurden die abgelösten Zellen in Vollmedium aufgenommen und mit 1.200 rpm für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment in frischem Vollmedium resuspendiert, um anschließend in neuen Zellkulturflaschen ausplattiert werden zu können. Wenn die Zelldichte noch keine Passagierung erforderte, wurden trotzdem alle 3 Tage 80% des Mediums ausgetauscht, um eine adäquate Versorgung der Zellen mit Nährstoffen zu gewährleisten.

<b>HepG2 Zellen</b>	Vollmedium	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ DMEM 31966</li> <li>▪ 20% FCS</li> <li>▪ 1% Penicillin-Streptomycin</li> </ul>
	BSA-Medium	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ DMEM 31966</li> <li>▪ 1% BSA</li> <li>▪ 1% Penicillin-Streptomycin</li> </ul>
	Hungermedium	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ DMEM 31966</li> <li>▪ 1% Penicillin-Streptomycin</li> </ul>
	Einfrüermedium	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 90% FCS</li> <li>▪ 10% DMSO</li> </ul>
<b>Primäre humane Hepatozyten</b>	Auftaumedium	Hepatocyte Thaw Medium (Part No: CM7500, Thermo Fisher Scientific)
	Plattiermedium	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Williams' Medium E (A1217601)</li> <li>▪ 5% FBS</li> <li>▪ 1 µM Dexamethason</li> <li>▪ 1% Penicillin/ Streptomycin</li> <li>▪ 4 µg/mL Hum. Rekomb. Insulin</li> <li>▪ 2 mM GlutaMAX™</li> <li>▪ 15 mM HEPES</li> </ul>
	Erhaltungsmedium	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Williams' Medium E (A1217601)</li> <li>▪ 0,1 µM Dexamethason</li> <li>▪ 0,5 % Penicillin/ Streptomycin</li> <li>▪ 6,25 µg/mL Hum. Rekomb. Insulin</li> <li>▪ 6,25 µg/mL Humanes Transferrin</li> <li>▪ 6,25 ng/mL Selenige Säure</li> <li>▪ 1,25 mg/mL BSA</li> <li>▪ 5,35 µg/mL Linolsäure</li> <li>▪ 2 mM GlutaMAX™</li> <li>▪ 15 mM HEPES</li> </ul>

**Tabelle 10: Übersicht Zellkulturmedien**

#### 3.2.1.1.2 Bestimmung der Zellzahl

Das Aussäen von Zellen in einer definierten Zelldichte sowie die Kryokonservierung setzen eine Bestimmung der Lebendzellzahl voraus. Diese erfolgte mithilfe eines Hämocytometers, genauer gesagt mit einer Neubauer-Zählkammer mit 1 mm Seitenlänge und 0,1 mm Tiefe. Außerdem wurde der Farbstoff Trypanblau verwendet, da dieser eine Unterscheidung zwischen lebenden und abgestorbenen Zellen ermöglicht. Dieser Azofarbstoff dringt nur in abgestorbene Zellen ein und färbt diese blau (291). Zur Zellzahlbestimmung wurden 10 µl einer Suspension von Zellen in 1x PBS entnommen und mit 90 µl Trypanblau im Verhältnis 1:10 verdünnt. Ein Volumen von 10 µl wurde in eine Seite der Zählkammer gegeben und die vitalen Zellen in 4 Großquadranten ausgezählt. Mittels nachstehender Formel wurde auf diese Weise die Gesamtzellzahl in der Ausgangszellsuspension bestimmt (283-285):

$$Z = N \times \frac{10^4}{\text{mL}} \times f \times V \quad \text{mit} \quad Z: \text{Gesamtzellzahl}$$

N: Zahl lebender Zellen in 1 Großquadrat

f: Verdünnungsfaktor

V: Volumen der Ausgangssuspension [mL]

#### 3.2.1.1.3 Kryokonservierung und Rekultivierung

Mithilfe der Kryokonservierung lassen sich Zelllinien zeitlich unbefristet bei Temperaturen unter  $-130^{\circ}\text{C}$  aufbewahren, während ihre Vitalität erhalten bleibt (292). Die Kryokonservierung und Rekultivierung erfolgte anhand spezifischer Protokolle für HepG2-Zellen (283, 285). Zur Kryokonservierung wurden die Zellen wie bereits oben beschrieben trypsinisiert und gezählt. Im Anschluss wurden die Zellen erneut mit 1.200 rpm für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Zellsediment wurde vorsichtig in FCS mit 10% DMSO resuspendiert und eine Konzentration von  $1-5 \times 10^6$  Zellen/ mL eingestellt. Das DMSO gewährleistet einen Schutz vor zellulärem Stress durch Eisbildung und Lösungseffekte im Zuge des Einfrierens und Auftauens der Zellen (293). Nun wurden Aliquots von 1 mL Zellsuspension in Kryoröhrchen transferiert. Die Röhrchen wurden für 24 h in einem Einfrierbehälter mit 2-Propanol auf  $-80^{\circ}\text{C}$  abgekühlt und anschließend in flüssigen Stickstoff zur dauerhaften Lagerung überführt.

Zur Rekultivierung der Hep G2-Zellen wurde 1 Kryoröhrchen dem flüssigen Stickstoff entnommen und für 1-2 min im Wasserbad bei  $37^{\circ}\text{C}$  erwärmt, bis die Zellsuspension vollständig aufgetaut war. Das Auftauen der Zellen sollte möglichst schnell erfolgen, um eine Beschädigung der Zellen durch Eiskristalle zu vermeiden. Als Nächstes wurden die Zellen zügig in ein 50 mL-Falcon mit 40 mL warmem Vollmedium überführt, um das zytotoxische DMSO zu verdünnen. Das Kryoröhrchen wurde mehrfach ausgespült, um die Zellausbeute zu erhöhen. Nun wurden die Zellen mit 1.200 rpm für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert und das Zellsediment erneut in Vollmedium resuspendiert, bevor die Zellen in einer mittleren Zellkulturflasche ( $75 \text{ cm}^2/ 250 \text{ mL}$ ) ausplattiert wurden.

#### **3.2.1.2 Primäre humane Hepatozyten**

Die Handhabung der primären humanen Hepatozyten erfolgte entsprechend den Empfehlungen des Herstellers sowie Angaben in der Fachliteratur (294-296). Die Zellen wurden vom Hersteller in Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff mit je  $8,1 \times 10^6$  Zellen pro Röhrchen geliefert und nach Empfang unmittelbar in einen hauseigenen Stickstofftank überführt. Zum Auftauen wurde 1 Kryoröhrchen dem Stickstoff entnommen und mittels eines portablen Stickstoffbehälters zur Sterilwerkbank transportiert. Nun wurde das Röhrchen einmal kurzzeitig unter der Werkbank geöffnet, um Gas entweichen zu lassen, und anschließend für 2-3 min im Wasserbad bei  $37^\circ\text{C}$  aufgetaut. Während dieses Zeitraums muss der Auftauprozess aufmerksam beobachtet werden, da ein unvollständiges oder exzessives Auftauen zu einer Verminderung von Zellausbeute und -viabilität führt (295). Als Nächstes wurden die Zellen in ein 50 mL-Falcon mit 45 mL Auftaumedium (Tabelle 10) überführt und das Kryoröhrchen gründlich ausgespült. Dann wurde die Zellsuspension durch zweimaliges Invertieren vorsichtig durchmischt und anschließend mit 100 g für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert und das Zellsediment in 2 mL Plattiermedium (Tabelle 10) durch leichtes Schütteln resuspendiert. Als Nächstes wurden 25  $\mu\text{L}$  der Zellsuspension in 75  $\mu\text{L}$  Trypanblau verdünnt (1:4) und analog zu den HepG2-Zellen gezählt. Nun wurde die Zellsuspension durch Zugabe zusätzlichen Plattiermediums auf eine Konzentration von  $8 \times 10^5$  Zellen/ mL eingestellt und die Zellen wurden auf einer Kollagen-beschichteten 24-Well-Platte mit je  $4 \times 10^5$  Zellen in 0,5 mL pro Well ausplattiert. Nach einer Inkubationszeit von 5 Stunden zur Ausbildung der Zelladhärenz wurde das Plattiermedium durch je 0,5 mL Erhaltungsmedium (Tabelle 10) pro Well ersetzt. Das Erhaltungsmedium basiert auf William's E Medium, welches sich besonders gut für die Kultivierung von Hepatozyten eignet (297). Fortan erhielten die primären Hepatozyten einen täglichen Mediumswechsel mit 0,5 mL Erhaltungsmedium bis zu ihrer definitiven Verwendung.

#### **3.2.2 Stimulationsexperimente**

Die Umsetzung der Stimulationsexperimente orientierte sich an den Protokollen anderer Forschungsgruppen zur Stimulation von HepG2-Zellen mit freien Fettsäuren (298-300). Zur Durchführung der Stimulationsexperimente wurden die HepG2-Zellen in den Zellkulturflaschen wie oben beschrieben trypsinisiert, gezählt und auf

unterschiedlichen Zellkulturplatten in Vollmedium ausgesät. Dabei wurden im 6-Well-Format  $1 \times 10^6$  Zellen in 2 mL Vollmedium pro Well ausplattiert, im 24-Well-Format  $2 \times 10^5$  Zellen in 0,5 mL pro Well und im 96-Well-Format  $4 \times 10^5$  Zellen in 200  $\mu$ L pro Well. Nach 24 Stunden wurden die Zellen einmal mit 1xPBS gewaschen und im Anschluss für weitere 24 Stunden in Hungermedium ohne FCS kultiviert (Tabelle 10). Nun wurden die HepG2-Zellen prinzipiell 3 verschiedenen Behandlungen unterzogen. Zum einen erfolgte eine Stimulation mit Ölsäure zur Provokation einer intrazellulären Steatose. Hierzu wurden die Zellen mit 100-1600  $\mu$ M BSA-Oleat in DMEM mit 1% BSA (BSA-Medium, Tabelle 10) über einen Zeitraum von 24 bis 48 Stunden inkubiert. Zum anderen wurde die Reaktion von Hepatozyten auf eine Stimulation mit IL-1-Zytokinen untersucht, indem die HepG2-Zellen mit den rekombinanten humanen Zytokinen IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-33, IL-36 $\alpha$ , IL-36 $\beta$  und IL-36 $\gamma$  in Konzentrationen von 10-100 ng/ mL für eine Dauer von 30 min bis 24 Stunden behandelt wurden. Darüber hinaus wurde ebenfalls eine kombinierte Testung von BSA-Oleat und Zytokinen durchgeführt. Zusätzlich hierzu wurde in Kooperation mit dem Unternehmen Böhlinger Ingelheim die Wirkung zweier monoklonaler rekombinanter Antikörper gegen IL-1RAcP in einer Konzentration von 100 nM analysiert. Im Anschluss an die Behandlung wurden die Ansätze entweder direkt einer Analyse unterzogen oder bis zur weiteren Verwendung tiefgefroren. Hierzu wurden die Zellüberstände entnommen und bei -20°C gelagert. Die adhärennten Zellen wurden einmal mit 1xPBS gewaschen und dann bei -80°C konserviert.

Die primären Hepatozyten wurden im Gegensatz zu den HepG2-Zellen bereits 24 Stunden nach ihrem Auftauen und Ausplattieren stimuliert. Alle Stimulationsexperimente wurden im Hepatozyten-spezifischen Erhaltungsmedium durchgeführt. Ansonsten wurden die Primärzellen in gleicher Weise wie die HepG2-Zellen mit Zytokin, BSA-Oleat und Antikörper behandelt.

#### **3.2.3 Analyse des Zellüberlebens mittels MTT-Assay**

Der MTT-Assay dient der orientierenden Einschätzung der Zellvitalität anhand der Messung der metabolischen Aktivität von Zellen. Die Tetrazoliumringe des 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromids (MTT) werden durch mitochondriale Dehydrogenasen gespalten, sodass ein farbiges Formazan entsteht (301, 302). Zur Durchführung des MTT-Assays wurde eine Lösung von 1 mg/mL MTT in PBS hergestellt. Im Anschluss an die verschiedenen Stimulationsexperimente

wurde die MTT-Lösung im Verhältnis 1:10 zum Zellüberstand hinzugegeben und die Zellen für 3 h im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Zeit wurde der Zellüberstand verworfen und die Zellen wurden einmal mit 1xPBS gewaschen. Nun wurde ein dem Ausgangsvolumen äquivalentes Volumen 2-Propanol hinzugefügt und für 10 min auf einem Plattformschüttler inkubiert. Zuletzt wurden je 100 µL Zellüberstand in eine 96-Well-Platte überführt und die Extinktion bei 550 nm mithilfe eines Spektralphotometers gemessen. Anhand der Extinktionswerte wurde das relative Zellüberleben behandelter Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen ermittelt (302, 303).

#### **3.2.4 Analyse der Triglyzerid-Akkumulation**

Die intrazelluläre Akkumulation von Triglyzeriden in den HepG2-Zellen nach Behandlung mit BSA-Oleat wurde mithilfe des Triglyceride Quantification Colorimetric/Fluorometric Kits von BioVision entsprechend dem Herstellerprotokoll bestimmt (304). Das Prinzip des Messverfahrens basiert darauf, dass die Triglyzeride mittels des Enzyms Lipase in Fettsäuren und Glycerol gespalten werden. Das Glycerol wird anschließend durch einen Enzymmix oxidiert und in ein farbiges Produkt umgewandelt. Das Farbsignal kann mittels Spektrophotometer gemessen werden und verhält sich proportional zum Triglyzeridgehalt. Mithilfe einer Standardreihe kann die absolute Triglyzeridmenge pro Well berechnet werden (305).

Für den Triglyzerid-Assay wurden die HepG2-Zellen zunächst mit dem Lysepuffer NP-40 inkubiert, um die intrazellulären Lipide zu isolieren. Hierzu wurden die Zellen mit 5%-iger NP-40 Lösung in Wasser behandelt und mit Zellschabern aus den Wells gelöst. Die Zellsuspension wurde in Reagiergefäße überführt, gevortext und für 2-5 min bei 80-100°C inkubiert. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt. Anschließend wurde das Zellysate für 2 min mit maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und der Überstand entnommen. Nun wurden Proben der Überstände sowie die Triglyzerid-Standardreihe in eine 96-Well-Platte überführt und mit Lipase für 20 min bei Raumtemperatur behandelt. Als Nächstes wurde der Enzymmix hinzugegeben und für 30-60 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Zuletzt wurde im Spektralphotometer die Absorption bei 570 nm gemessen und daraus die Triglyzeridmengen berechnet (306).

## 3.2.5 Analyse der Genexpression

### 3.2.5.1 RNA-Isolation

#### Klassische RNA-Isolation

Die klassische RNA-Isolation erfolgte auf Grundlage etablierter Protokolle aus der Fachliteratur (307-309). Zur klassischen RNA-Isolation wurden die Zellkulturplatten im 6-Well-Format auf Eis aufgetaut und in jedes Well 300  $\mu$ L TRI-Reagenz zur Zellyse gegeben. Das im TRI-Reagenz enthaltene Denaturierungsmittel Guanidinthiocyanat wirkt als starker RNase-Inhibitor (310). Die Zellen wurden für 5 min auf Eis auf einem Plattformschüttler inkubiert, bevor sie mithilfe eines Zellschabers gelöst und in Form einer Zellsuspension in ein Reagiergefäß überführt wurden. Anschließend wurden die Proben gevortext und mit 13.000 rpm für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Als Nächstes wurde der Überstand in ein neues Reagiergefäß überführt und für 5 min bei Raumtemperatur ruhen gelassen. Nun wurden 85  $\mu$ L Chloroform unter dem Abzug zu jeder Probe hinzugegeben. Das Chloroform bewirkt eine Auftrennung des Homogenats in 3 Phasen: Die wässrige Phase enthält die RNA, die Zwischenphase enthält DNA und die organische Phase enthält Protein (311). Die Proben wurden gründlich gevortext und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben zur Phasenbildung mit 13.000 rpm für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Die oberste Phase mit der enthaltenen RNA wurde in ein neues Reagiergefäß überführt und mit 150  $\mu$ L Isopropanol zur Fällung versetzt (312). Nach erneutem Vortexen wurde die Lösung für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Als Nächstes wurde die RNA durch Zentrifugation mit 13.000 rpm für 10 min bei 4°C pelletiert und der Überstand verworfen. Die weitere Aufreinigung der Proben erfolgte fortan wieder auf Eis. Zunächst wurde das RNA-Pellet in 750  $\mu$ L 70%igem Ethanol durch Vortexen gewaschen und anschließend mit 13.000 rpm für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand in größtmöglichem Maße abpipettiert und das Pellet für 10-30 min an der Luft trocknen gelassen. Nun wurde zu jedem Pellet 50  $\mu$ L Wasser hinzugefügt und die Proben bei 65°C für 5 min auf dem Thermomix inkubiert. Schließlich wurde das Pellet resuspendiert und gevortext, bevor die RNA-Messung erfolgte (313, 314).

#### **RNA-Isolation mittels *RNeasy® Micro Kit***

Die RNA-Isolation aus Zellen im 24-Well-Format wurde mithilfe des *RNeasy® Micro Kit* von Qiagen durchgeführt (315-317). Alle Schritte erfolgten bei Raumtemperatur. Zum Ernten und Lysieren der Zellen wurden 350 µL Buffer RLT Plus in jedes Well gegeben und es wurde mehrmals auf- und abpipettiert. Dem Puffer war im Vorhinein 1% β-Mercaptoethanol zugefügt worden, um einen besseren Schutz der Proben vor RNAsen zu erwirken. Die Zellsuspension wurde in ein Reagiergefäß transferiert und gevortext. Anschließend wurden die Zellen homogenisiert, indem das Zelllysate auf eine QIAshredder Spin Column gegeben und für 2 min mit 13.000 rpm zentrifugiert wurde. Im nächsten Schritt wurde die DNA eliminiert, indem der Durchfluss auf eine gDNA Eliminator Spin Column gegeben und für 30 s mit 10.000 rpm zentrifugiert wurde. Anschließend wurde die RNA an eine weitere Säule adheriert, indem der Durchfluss aus dem vorangegangenen Schritt mit 350 µL 70%igem Ethanol durchmischt und auf eine RNeasy MinElute Spin Column gegeben wurde. Diese wurde mit 10.000 rpm für 15 s zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Im Folgenden wurde die Säule mit der gebundenen RNA dreimal gewaschen. Der erste Waschvorgang erfolgte mittels 700 µL Buffer RW1 und einer Zentrifugation mit 10.000 rpm für 15 s. Als Nächstes wurde die Säule mit 500 µL Buffer RPE ebenfalls durch Zentrifugation mit 10.000 rpm für 15 s gewaschen. Der dritte Waschvorgang wurde mit 500 µL 80%igem Ethanol und einer Zentrifugation mit 10.000 rpm für 2 min durchgeführt. Nach dem Waschen wurde die Säule durch erneute Zentrifugation mit 13.000 rpm für eine Dauer von 5 min getrocknet. Im letzten Schritt wurde die isolierte und gereinigte RNA schließlich durch Zugabe von 14 µL RNase-freiem Wasser und Zentrifugation mit 13.000 rpm für 1 min von der Säule eluiert und in einem neuen Reagiergefäß aufgefangen (315).

#### **Messung der RNA-Ausbeute und -Qualität**

Die Messung der RNA-Ausbeute und -Qualität erfolgte mithilfe des Spektralphotometer *NanoDrop™*.(318). Die Proben wurden bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

#### **3.2.5.2 cDNA-Synthese**

Die cDNA-Synthese aus den RNA-Proben wurde mithilfe des *AffinityScript Multi-Temp cDNA Synthesis Kit* durchgeführt (319). Seit der Entdeckung der Reversen

### 3. Material und Methoden

---

Transkriptase in RNA-Viren ist es möglich, RNA-Sequenzen in komplementäre cDNA umzuschreiben, die eine deutlich höhere Stabilität aufweist und sich damit besser für weitere Analysen eignet (307, 308, 320). In Anwesenheit von Primern und dNTPs synthetisiert die Reverse Transkriptase einen der RNA komplementären cDNA-Strang, der ausschließlich aus Exons besteht (321, 322).

Bei der cDNA-Synthese wurden je nach Ausbeute zwischen 100 ng und 1 µg RNA umgeschrieben, wobei innerhalb eines Experiments für jede Probe die gleiche RNA-Menge transkribiert wurde. Als Erstes wurden die Kit-Komponenten sowie die RNA-Proben auf Eis aufgetaut und der 1. Mastermix auf Eis angesetzt (Tabelle 11). Als Nächstes wurde der erste Reaktionsansatz zusammenpipettiert, indem eine konstante RNA-Menge vorgelegt und mithilfe von RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 11,7 µL eingestellt wurde, bevor 4 µL Mastermix 1 hinzugefügt wurden. Nachdem der erste Reaktionsansatz gevortext und anzentrifugiert worden war, wurde er für 5 min bei 65°C auf dem Thermomixer inkubiert und anschließend für 10 min abgekühlt bei Raumtemperatur. Währenddessen wurde der 2. Mastermix (Tabelle 11) auf Eis angesetzt und nun je 4,3 µL zu den Proben pipettiert, sodass sich ein Gesamtvolumen von 20 µL ergab. Nachdem dieser wiederum gevortext und anzentrifugiert worden war, wurde er für 10 min bei 25°C, anschließend für 60 min bei 55°C und schließlich für 15 min bei 70°C auf dem Thermomixer inkubiert. Schließlich wurden je 20 µL Wasser zu jeder Probe hinzugefügt, um die endgültige cDNA-Lösung zu erhalten, welche bei 4°C gelagert wurde.

<b>Mastermix 1 (Angaben je Probe)</b>	<b>Mastermix 2 (Angaben je Probe)</b>
1 µl oligo(dT) primer (0,5 µg/µl) OR 3 µl random primer (0,1 µg/µl) OR	2,0 µl 10x Affinity Script RT Buffer 0,8 µl dNTP mix (25 mM each NTP) 0,5 µl RNase Block Ribonuclease Inhibitor (40 U/µl) 1 µl Affinity Script Multiple Temperature RT

**Tabelle 11: cDNA-Synthese-Ansatz**

#### 3.2.5.3 Quantitative Real Time- PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) ermöglicht die gezielte Vervielfältigung sehr geringer DNA-Mengen innerhalb kurzer Zeit. Sie besteht im Wesentlichen aus 3 Reaktionsschritten, deren zyklische Wiederholung zur exponentiellen Amplifikation des betreffenden DNA-Abschnitts führt. Im ersten Schritt findet eine thermische Denaturierung des DNA-Doppelstrangs in seine Einzelstränge

### 3. Material und Methoden

---

bei 90-95°C statt. Im zweiten Schritt kommt es zur Hybridisierung (annealing) spezifischer Primerpaare an die DNA-Einzelstränge. Jedes Primerpaar besitzt ein individuelles Temperaturoptimum, das in der Regel über 50°C liegt. Im dritten Schritt synthetisiert die hitzestabile Taq-Polymerase bei 72°C ausgehend von den Primern den zur Matrize komplementären Strang durch Anlagerung von Oligonukleotiden (307, 323-327). Zur DNA-Amplifikation wurde in dieser Arbeit eine HotStartTaq-DNA-Polymerase verwendet, die erst bei 95°C aktiv wird, sodass eine unspezifische Amplifikation bei niedrigeren Temperaturen vermieden wird (328). Bei der Reversen Transkriptase – PCR wird als Template cDNA eingesetzt, die, wie oben beschrieben, aus mRNA gewonnen wird (329, 330). Bei der hier angewendeten 2-Step-RT-PCR werden cDNA-Synthese und RT-PCR nacheinander in getrennten Reaktionsansätzen durchgeführt. Zur quantitativen Analyse der PCR-Produkte wurde in dieser Arbeit eine Real Time-PCR bzw. eine Real Time-RT-PCR angewendet als direktes Nachweissystem, bei der eine Messung der PCR-Produkte unter Zuhilfenahme des DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoffs EvaGreen® in Echtzeit erfolgte (331). Es wurde eine relative Quantifizierung im Vergleich zum Housekeeping-Gen Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogease (GAPDH) durchgeführt, die weitestgehend konstant von Hepatozyten exprimiert wird (307, 323).

Für die qRT-PCR wurde ein Mastermix aus dem 5x Hot Start Taq EvaGreen® qPCR Mix (Axon Labortechnik GmbH) mit DNA-Polymerase, Oligonukleotiden und EvaGreen®-Farbstoff sowie aus den jeweiligen Forward- und Reverse-Primer hergestellt (Tabelle 12). Die PCR-Platte wurde in eine Kühlhalterung eingesetzt und je 9 µL des Mastermix wurden in jedes Well pipettiert. Anschließend wurde von jeder cDNA-Probe 1µL hinzugefügt und die Platte mit einer PCR-Folie verschlossen. Als Nächstes wurde die Platte für 500 rpm für 2 min bei Raumtemperatur zentrifugiert und schließlich in den Thermocycler gestellt zur Durchführung der qRT-PCR über 40 Zyklen. Alle Proben wurden in Doppelbestimmung gemessen. Als Negativkontrolle diente der Mastermix ohne cDNA-Probe (307, 332).

<b>Mastermix RT-PCR (je Probe)</b>
2 µl 5x Hot Start Taq EvaGreen® qPCR Mix
0,5 µl Forward Primer (1:10)
0,5 µl Reverse Primer (1:10)
6 µl H <sub>2</sub> O

**Tabelle 12: Mastermix RT-PCR**

## 3.2.6 Proteinanalyse

### 3.2.6.1 Proteinisolation

#### Isolation von Gesamtprotein

Zur Analyse der Proteinexpression müssen die Proteine vorher mittels Zellyse isoliert und aufgereinigt werden, wobei es zu keiner Spaltung oder Aggregation der Proteine kommen darf (333, 334). Zur Isolation von Gesamtprotein aus HepG2 Zellen und primären Hepatozyten wurden die Zellkulturplatten auf Eis aufgetaut und der Lysepuffer A (Tabelle 13) auf Eis angesetzt. Nun wurden in jedes Well 50-100  $\mu$ L Lysepuffer gegeben und die Zellen mithilfe von Zellschabern vom Wellboden gelöst. Im Anschluss wurden die Zellysate in Reagiergefäße (1,5 mL) überführt, gründlich gevortext und für 15-20 min auf Eis inkubiert. Nach erneutem Vortexen wurden die Zellysate dann mit 13.000 rpm für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Durch die Zentrifugation bildeten sich im Reagiergefäß 3 Phasen: Lipide (oben), Proteinsuspension (mittig) sowie Zelldedritus (unten). Die mittlere Phase wurde vorsichtig in ein neues Reagiergefäß überführt. Die auf diese Weise isolierten Proteine konnten bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert werden (307).

#### Isolation nukleärer und zytosolischer Proteine

Zur getrennten Isolation nukleärer und zytosolischer Proteine wurden die Zellen ebenfalls auf Eis aufgetaut und die beiden Lysepuffer B und C (Tabelle 13) auf Eis angesetzt. Nun wurden 100 -500  $\mu$ L Lysepuffer B in jedes Well gegeben und die Zellen für 5-10 min inkubiert. Dann wurden die Zellen mittels Zellschaber vom Wellboden gelöst und das Zellysat in ein Reagiergefäß (1,5 mL) überführt. Das Zellysat wurde durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren durchmischt und anschließend für weitere 5 min inkubiert. Nun wurde mit 13.000 rpm für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand im Reagiergefäß, der nach der Zentrifugation die zytosolischen Proteine enthielt, wurde in ein neues Reagiergefäß überführt. Das Zellsediment mit den nukleären Proteinen wurde mit 1 mL Lysepuffer B durch Vortexen gewaschen, ohne dabei eine Resuspension zu bewirken. Nach einer erneuten Zentrifugation mit 13.000 rpm für 10 min bei 4°C wurde der Überstand verworfen und das Zellsediment in einem äquivalenten Volumen von Puffer C (30-50  $\mu$ L) resuspendiert. Als Nächstes wurde die Suspension für 30 min bei -80°C tiefgefroren und im Anschluss für 30 min wieder aufgetaut auf Eis. Nach einer weiteren Zentrifugation mit 13.000 rpm für 5 min bei 4°C konnte der Überstand mit

### 3. Material und Methoden

---

den nukleären Proteinen gewonnen werden. Sowohl zytosolische als auch nukleäre Proteine wurden bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -20°C gelagert (308).

<b>Lysepuffer A</b>			
1 mL	RIPA Lysis Buffer System		
4 %	Proteaseinhibitor		
1 %	Phosphataseinhibitor		
<b>Lysepuffer B</b>		<b>Lysepuffer C</b>	
20 mM	HEPES (pH 7,9)	20 mM	HEPES (pH 7,9)
10 mM	KCl	10 mM	KCl
1 mM	EDTA	1 mM	EDTA
10 %	Glycerol	20 %	Glycerol
0,2 %	NP-40	420 mM	NaCl
1 mM	DTT	1 mM	DTT
0,1 mM	Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	0,1 mM	Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>
0,5 mM	PMSF	0,5 mM	PMSF
4 %	Proteaseinhibitor	4 %	Proteaseinhibitor
1 %	Phosphataseinhibitor	1 %	Phosphataseinhibitor

**Tabelle 13: Übersicht Lysepuffer**

#### 3.2.6.2 Proteinmessung nach Bradford

Die Proteinmessung nach Bradford basiert darauf, dass der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 in saurer Lösung bei Bindung an Proteinseitenketten einen Farbumschlag vollzieht, welcher durch Messung der Absorption bei 595 nm quantifiziert werden kann (335). Zur Proteinmessung wurde zunächst mithilfe eines kommerziellen Albumin-Standards eine Standardreihe mit aufsteigender Konzentration angelegt und eine Eichgerade bestimmt. Anschließend wurden in einer Einmalküvette 800 µL destilliertes Wasser, 200 µL Bio-Rad Protein Assay Farbstoffkonzentrat und 1 µL der Proteinprobe gemischt und 5 min inkubiert. Schließlich konnte mithilfe eines Photometers die Extinktion gemessen und anhand der Eichgerade die Proteinkonzentration berechnet werden (336).

#### 3.2.6.3 Proteingelelektrophorese mittels SDS-PAGE

Das Prinzip der Proteingelelektrophorese ist die Auftrennung von Proteinen durch Wanderung in einem elektrischen Feld. Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) ist das gängigste Elektrophoreseverfahren für Proteine und besitzt das größte Auflösungsvermögen. Durch Zugabe des anionischen Tensids Natriumdodecylsulfat (SDS) erhalten alle Proteine die gleiche negative Ladung. Die Auftrennung der Proteine erfolgt somit in Abhängigkeit von ihrer Größe. Im Gel mitgeführte Marker ermöglichen die Größeneinordnung der Proteine. Weitere

### 3. Material und Methoden

---

wichtige Einflussfaktoren sind die Porengröße des Gels sowie die angelegte Spannung. Bei der diskontinuierlichen SDS-Gelelektrophorese durchläuft die Probe zunächst ein Sammelgel zur Aufkonzentrierung, bevor die Proteine im Trenngel der Größe nach aufgetrennt werden (307, 308).

In Vorbereitung auf den SDS-Page wurden die vormals isolierten Proteine nach dem Auftauen so mit Lysepuffer verdünnt, dass sich in jeder Proteinprobe 40 µg Protein in 15 µL Lysepuffer befanden. Zusätzlich wurden zu jeder Probe 5 µL Laemmli-Puffer hinzugegeben. Anschließend wurden die Proteine durch Inkubation bei 95°C für 5 min denaturiert und dann erneut abgekühlt auf Eis (336).

Parallel hierzu wurde das Polyacrylamidgel mit 0,75 mm Schichtdicke für die Gelelektrophorese unter dem Abzug gegossen. Dafür wurde die Gießapparatur mit 70%igem Ethanol gereinigt und zusammengebaut, wobei insbesondere auf die Dichtigkeit geachtet wurde, um ein Auslaufen zu vermeiden. Anschließend wurde das 10% Polyacrylamid-Trenngel (Tabelle 14) in einem 50 mL-Falcon angesetzt und etwa 3,7 mL in die Gießapparatur gegeben. Darüber wurde destilliertes Wasser geschichtet, um etwaige Luftblasen zu entfernen und einen geraden Gelrand zu erzeugen. Nach dem Abwarten der Polymerisationszeit von etwa 10 min wurde die Intaktheit des Sammelgels überprüft und das Wasser wieder abgeschüttet. Nun wurde in gleicher Weise das 5% Polyacrylamid-Sammelgel (Tabelle 14) angesetzt, gegossen und anschließend sofort mit Kämme zur Bildung der Proteintaschen versehen. Im nächsten Schritt wurde das Gel in die Elektrophoresekammer eingesetzt und letztere komplett mit Elektrodenpuffer (Tabelle 14) befüllt. Dann wurden die Kämme vorsichtig entfernt und die Geltaschen mit den Proteinproben beladen. Zusätzlich wurde eine Geltasche mit einem farbigen Proteinstandard mit definiertem Molekulargewicht befüllt. Nun wurde die Gelelektrophoresekammer an die Spannungsquelle angeschlossen und die Elektrophorese mit 80 V für 25 min durchgeführt zum Durchlaufen des Sammelgels. Anschließend wurde die Elektrophorese mit 140 V für 1-2 h fortgeführt bis zum Erreichen einer optimalen Auftrennung der Zielbanden, wobei der Proteinstandard als Orientierung diente (336, 337).

#### 3.2.6.4 Western Blot und Antikörperdetektion

Nach dem SDS-PAGE wurde ein klassischer Western Blot im Nassverfahren durchgeführt, gefolgt vom immunchemischen Nachweis spezifischer Proteine mithilfe von Antikörpern. Bei unserem Western Blot-Protokoll werden die Proteine aus dem Elektrophoresegel des SDS-PAGE durch elektrophoretischen Transfer senkrecht zur Trennrichtung auf eine proteinbindende Nitrocellulosemembran übertragen. Zum Proteinnachweis wird die Membran zunächst mit einem für das Protein spezifischen Erstantikörper inkubiert und anschließend mit einem gegen den ersten Antikörper gerichteten Zweitantikörper behandelt. An letzteren ist kovalent eine Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase, HRP) gebunden, die bei Zugabe von Luminol ein Chemilumineszenzsignal erzeugt, das auf einem Röntgenfilm detektiert werden kann (338-340).

In Vorbereitung auf den Western Blot wurden Zuschnitte von Nitrozellulosemembran und Blotting-Papier angefertigt und in Blotpuffer (Tabelle 14) getränkt. Anschließend wurde die Gelelektrophoresekammer auseinandergelöst und das Gel gemeinsam mit Membran, Blotting-Papier und Schwämmen zu einem Blot geschichtet. Als Nächstes wurde der Blot in die Blotting-Kammer eingestellt, die Kammer mit Blotpuffer befüllt, an die Spannungsquelle angeschlossen und das Blotting bei 140 mA für 1 h und 15 min durchgeführt. In Vorbereitung auf die Antikörper-vermittelte Proteindetektion wurde die Membran nach dem Blotten für 1 Stunde in einem 50 mL-Falcon mit 10 mL 5%iger Milch (Tabelle 14) auf einem Überkopftaumlager geblockt, um unspezifische Antikörperbindungen zu minimieren. Anschließend wurde die Membran dreimal für 5 min in 10 ml TBS-T (Tabelle 14) auf einem Plattformschüttler gewaschen. Schließlich wurde die Membran in einem 50 mL-Falcon mit 5 mL Erst-Antikörper-Lösung (Tabelle 15) über Nacht bei 4°C auf einem Walzenschüttler inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Membran dreimal für 10 min mit TBS-T gewaschen, bevor sie wiederum in einem 50 mL-Falcon mit 5 mL Zweit-Antikörper-Lösung (Tabelle 15) für 1,5 h auf einem Überkopftaumlager inkubiert wurde. Je nach Ursprungsorganismus des Erst-Antikörpers wurden entweder Anti-Mouse- oder Anti-Rabbit-Zweit-Antikörper in unterschiedlichen Trägerlösungen verwendet. Nach der Inkubation mit Zweit-Antikörper erfolgte wiederum ein dreimaliges Waschen in TBS-T für je 10 min. Im Anschluss wurden 2 mL ECL-Lösung angesetzt und die Membran für 5 min damit befeuchtet. Nun wurde die Nitrozellulosemembran gründlich mit

### 3. Material und Methoden

Blotting-Papier getrocknet und zur Entwicklung gemeinsam mit einem Chemilumineszenzfilm in eine Autoradiographie-Kassette eingelegt. Nach einer Entwicklungsdauer von 5-60 min wurde der Film entwickelt. Bevor die Membran mit einem weiteren Antikörperpaar inkubiert werden konnte, wurde sie einmal für 5 min mit TBS-T auf einem Plattformschüttler gewaschen zur Entfernung der ECL-Lösung. Anschließend wurde sie für 20 min mit Strip-Puffer gewaschen zur Ablösung der Antikörper. Nach zwei weiteren Waschschrritten mit TBS-T über 5 min konnte die Membran erneut geblockt und mit Antikörper inkubiert werden. Alternativ wurde die Membran in Folie eingeschlagen bei -20°C gelagert für eine spätere Verwendung (307, 336).

<b>10% Polyacrylamid-Trenngel</b>		<b>5% Polyacrylamid-Sammelgel</b>	
4,0 mL	H <sub>2</sub> O	3,4 mL	H <sub>2</sub> O
3,3 mL	30% Acrylamid	830 µL	30% Acrylamid
2,5 mL	1,5 M-Tris	630 µL	1,0 M-Tris
100 µL	10% SDS	50 µL	10% SDS
100 µL	10% APS	50 µL	10% APS
4 µL	TEMED	5 µL	TEMED
<b>Elektrodenpuffer</b>		<b>Blotpuffer (pH 7,5)</b>	
60 g	TRIS	2,4 g	TRIS
288 g	Glycin	11,5 g	Glycin
100 mL	20% SDS	80 mL	Methanol
300 mL	destilliertes Wasser	720 mL	destilliertes Wasser
<b>TBS-T</b>		<b>5%ige Milch</b>	
150 mM	NaCl	20 mL	TBS-T
100 mM	TRIS	1 g	Milchpulver
1 mL	Tween®		
999 mL	destilliertes Wasser		
<b>RotiBlock®-Lösung</b>		<b>Strip-Puffer (pH 2,8)</b>	
0,5 mL	RotiBlock®	15 g	Glycin
4,5 mL	destilliertes Wasser	1 mL	Tween-20
		999 mL	destilliertes Wasser

**Tabelle 14: Übersicht Gele und Puffer**

Primärantikörper	Verdünnung	Trägerlösung	Molekulargewicht [kDa]
Anti-Lamin A/C	1:1.000	5%ige Milch	70/28
Anti-IL-1R1	1:500 1:100-1:1000	5%ige Milch RotiBlock	80
Anti-alpha Tubulin	1:1000	RotiBlock	50
Anti-p-NFκB p65	1:100-1:1000 (1:200)	5%ige Milch	65

**Tabelle 15: Übersicht Antikörper-Ansätze für Western Blot**

#### 3.2.6.5 ELISA

Der Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay für phosphoryliertes (p-) NF $\kappa$ B p65 wurde mithilfe des *TransAM NF $\kappa$ B p65 Activation Assay Kit* des Unternehmens Active Motif (Carlsbad, USA) durchgeführt (341). Das Prinzip des ELISA basiert ähnlich wie beim Western Blot auf einem spezifischen Proteinnachweis durch einen monoklonalen Erstantikörper, gefolgt von einer Visualisierung mithilfe eines Enzym-gekoppelten Zweitantikörpers (342, 343)

Zu Beginn wurden anhand der vorausgegangenen Proteinmessung je 15  $\mu$ g Protein pro Probe in einem Reagiergefäß vorgelegt und mittels Complete Lysis Buffer (Tabelle 16) auf 20  $\mu$ L Reaktionsvolumen eingestellt. Zusätzlich zu den Versuchsproben wurden eine Positivkontrolle in Form von 1  $\mu$ L nukleärem Jurkat-Zell-Extrakt in 19  $\mu$ L Complete Lysis Buffer sowie eine Negativkontrolle in Form von 20  $\mu$ L Lysepuffer mitgeführt. Zu jedem dieser Ansätze wurden weitere 30  $\mu$ L Complete Lysis Buffer hinzupipettiert. Anschließend wurden die Reagiergefäße mit einer ELISA-Folie verschlossen und für 1 h bei Raumtemperatur auf einem Plattformschüttler inkubiert. Im Anschluss wurden die Wells dreimal mit je 200  $\mu$ L Wash Buffer mittels Mehrkanalpipette gewaschen und gründlich ausgeklopft. Im nächsten Schritt erfolgte die Bindung des Erst-Antikörpers. Hierzu wurde der Anti-pNF $\kappa$ B-Antikörper im Verhältnis 1:1.000 im Antibody Binding Buffer verdünnt und 100  $\mu$ L Antikörperlösung in jedes Well gegeben. Der Ansatz wurde für 1 h bei Raumtemperatur ohne Schütteln inkubiert und anschließend erneut dreimal gewaschen. Im dritten Schritt wurde in gleicher Weise mit dem HRP-konjugierten Zweit-Antikörper verfahren, jedoch wurde nach der einstündigen Inkubationszeit viermal mit 200  $\mu$ L Wash Buffer gewaschen. Als Letztes wurden zu jedem Well 100  $\mu$ L Developing Solution hinzupipettiert zum Starten der Farbreaktion, welche nach wenigen Minuten mittels 100  $\mu$ L Stop Solution pro Well abgestoppt wurde. Mithilfe eines Spektralphotometers konnte im Anschluss die Extinktion der Proben bei 450 nm sowie 550 nm bestimmt werden. Zur statistischen Auswertung wurde bei allen Proben der 550 nm-Extinktionswert vom 450 nm-Extinktionswert subtrahiert, um den Einfluss unspezifischer Hintergrundsignale zu minimieren. Dann wurde der Extinktionswert der Negativkontrolle als Blank-Messung von den anderen Extinktionswerten abgezogen. Nun konnte eine relative Quantifizierung der

### 3. Material und Methoden

---

stimulierten Proben in Relation zur unbehandelten Probe vorgenommen werden, wodurch auf die p-NFκB-Aktivierung geschlossen werden konnte (308, 336).

<b>Complete Lysis Buffer</b>	DTT	0,9 µl
	Protease Inhibitor Cocktail	1,8 µl
	Lysis Buffer AM2	177,3 µl
<b>Complete Binding Buffer</b>	DTT	0,54 µl
	Herring sperm DNA	2,7 µl
	Binding Buffer AM3	267 µl
<b>1x Wash Buffer</b>	10x Wash Buffer AM2	1,8 ml
	Destilliertes Wasser	16,2 ml
<b>1 x Antibody Binding Buffer</b>	10x Ab Binding Buffer AM2	180 µl
	Destilliertes Wasser	1,62 ml
<b>Developing Solution</b>		900 µl
<b>Stop Solution</b>		900 µl

Tabelle 16: ELISA-Reagenzien für 8 Proben

#### 3.2.7 Statistische Auswertung

Die Zellkulturexperimente wurden dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Alle Stimulationen erfolgten in Form von Duplikaten oder Triplikaten. Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe des Programms Microsoft Excel. In den Diagrammen sind die arithmetischen Mittelwerte der Messwerte sowie die Standardabweichung des Mittelwerts (standard error of mean, SEM) dargestellt. In Anbetracht der Tatsache, dass die Daten normalverteilt waren, wurde nach Überprüfung der Varianzhomogenität im F-Test zur Bestimmung der Signifikanz der zweiseitige Student's t-Test angewendet. Eine statistische Signifikanz wurde bei einem p-Wert < 0,05 angenommen. Unterschiedliche Signifikanzniveaus sind durch Sterne gekennzeichnet (p < 0,05 (\*); p < 0,01 (\*\*); p < 0,001 (\*\*\*); p < 0,0001 (\*\*\*)) (344, 345).

# 4. Ergebnisse

## 4.1 Stimulation der Hepatozyten mit Ölsäure

### 4.1.1 Lipidakkumulation in HepG2-Zellen

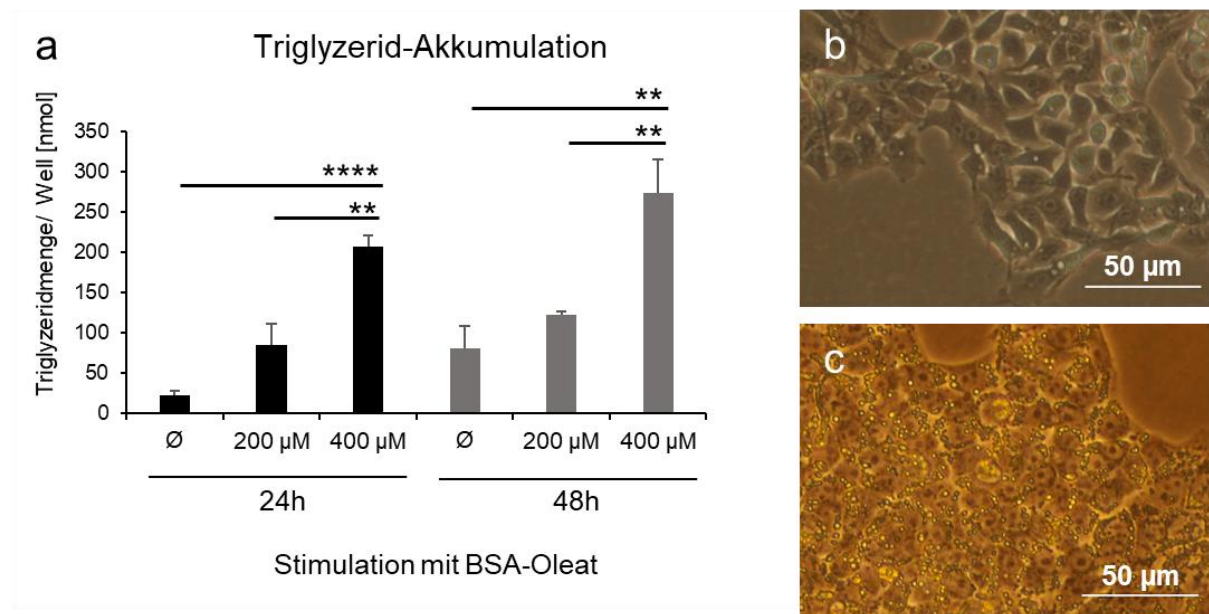
Nach Stimulation der HepG2-Zellen mit 200- 400  $\mu\text{M}$  BSA-Oleat für 24- 48 h erfolgte eine Messung der intrazellulären Triglyzerid-Akkumulation wie oben beschrieben (3.2.4.). Es zeigt sich eine deutliche Zunahme des zellulären Triglyzeridgehalts in den stimulierten HepG2-Zellen im Vergleich zu den unstimulierten Zellen (Abb. 8a). Die Lipidakkumulation steigt sowohl mit der Fettsäurekonzentration als auch mit der Inkubationsdauer an und erreicht bei 48-stündiger Inkubation mit 400  $\mu\text{M}$  BSA-Oleat etwa eine Erhöhung um mehr als den Faktor 10. Die Wirkung einer Verdopplung der Inkubationszeit von 24h auf 48h ist jedoch gering und nicht signifikant. Daraus lässt sich ableiten, dass die Aufnahme der Fettsäuren durch die HepG2-Zellen bereits innerhalb der ersten 24h erfolgt ist. Die Steigerung der Fettsäurekonzentration von 200  $\mu\text{M}$  auf 400  $\mu\text{M}$  hingegen führt zu einem signifikanten Anstieg der intrazellulären Triglyzeridmenge. Dies bedeutet, dass das extrazelluläre Fettsäureangebot das Ausmaß der Fettsäureaufnahme und -veresterung durch die Hepatomzelle beeinflusst. Die Messung der Triglyzerid-Akkumulation wird durch die lichtmikroskopische Morphologie der HepG2-Zellen unterstrichen, in deren Zytoplasma sich eine deutliche Steatose in Form von Lipidtröpfchen zeigt (Abb. 8c). Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass Hepatozyten bei hohen extrazellulären Fettsäurekonzentrationen schnell mit einem Import der Fettsäuren sowie einer Veresterung der Fettsäuren mit Glycerin zu Triacylglycerinen reagieren, wodurch sich eine intrazelluläre Steatose entwickelt. In Übereinstimmung mit der Fachliteratur (299, 300) kann die beschriebene Behandlung von HepG2-Zellen mit BSA-Oleat somit als zelluläres Modell für eine metabolisch bedingte Steatose angesehen werden.

### 4.1.2 Zytotoxizität der Fettsäurestimulation

Im nächsten Schritt wurde die zytotoxische Wirkung der Fettsäurestimulation untersucht durch eine MTT-basierte Messung des relativen Zellüberlebens der HepG2-Zellen bei zunehmender BSA-Oleat-Konzentration (3.2.3) (Abb. 9). Es zeigt sich eine kontinuierliche Abnahme des Zellüberlebens mit jeder Verdopplung der Fettsäurekonzentration. So beträgt beispielsweise der Anteil vitaler Zellen nach 24-

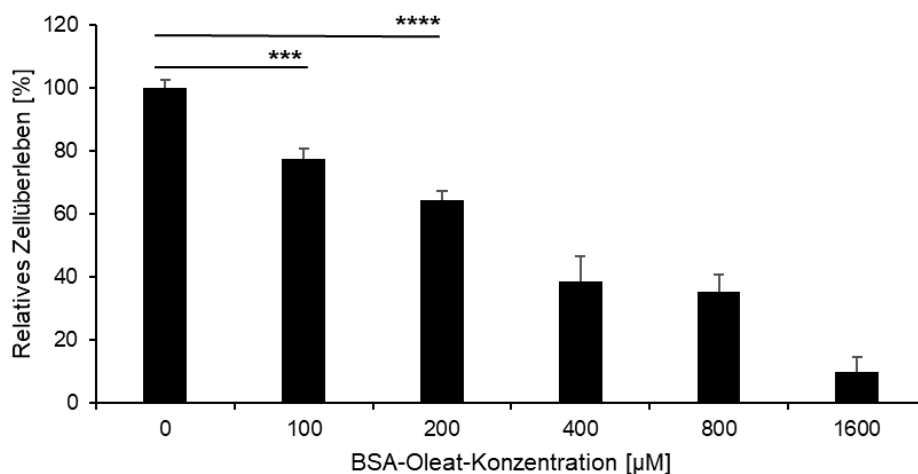
## 4. Ergebnisse

stündiger Behandlung mit 200  $\mu\text{M}$  BSA-Oleat noch etwa 64%. Neben der steatogenen Wirkung der Ölsäure muss also auch von einer zytotoxischen Wirkung ausgegangen werden, wobei im MTT-Assay nicht zwischen apoptotischem und nekrotischem Zelltod unterschieden werden kann.



**Abbildung 8: Triglyzerid-Akkumulation in HepG2-Zellen nach Stimulation mit BSA-Oleat**

- a** Messung der intrazellulären Triglyzeridmenge von HepG2-Zellen nach Stimulation mit 200-400  $\mu\text{M}$  BSA-Oleat für 24-48 h. Dargestellt sind die Mittelwerte +SEM bei 3 unabhängig durchgeführten Experimenten. Die statistische Signifikanz wurde mittels zweiseitigem Student's t-Test zu einem Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$  bestimmt ( $p < 0,05$  (\*);  $p < 0,01$  (\*\*);  $p < 0,001$  (\*\*\*);  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*))
- b** Lichtmikroskopische Aufnahme unstimulierter HepG2-Zellen.
- c** Lichtmikroskopische Aufnahme stimulierter HepG2-Zellen (400  $\mu\text{M}$  BSA-Oleat für 48 h). Deutliche intrazelluläre Steatose in Form von perinukleären Lipidtröpfchen.



**Abbildung 9: Relatives Zellüberleben von HepG2-Zellen bei Stimulation mit BSA-Oleat (Fortsetzung siehe nächste Seite)**

### **Abbildung 9: Relatives Zellüberleben von HepG2-Zellen bei Stimulation mit BSA-Oleat (Fortsetzung)**

Messung des Anteils vitaler HepG2-Zellen mittels MTT-Assay bei Stimulation mit BSA-Oleat in zunehmender Konzentration (100-1600  $\mu$ M) über einen Zeitraum von 24h.

*Dargestellt sind die Mittelwerte +SEM bei 3 unabhängig durchgeführten Experimenten. Die statistische Signifikanz wurde mittels zweiseitigem Student's t-Test zu einem Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$  bestimmt ( $p < 0,05$  (\*);  $p < 0,01$  (\*\*);  $p < 0,001$  (\*\*\*) ;  $p < 0,0001$  (\*\*\*)*)

### **4.1.3 Beeinflussung der Genexpression in HepG2-Zellen und primären humanen Hepatozyten**

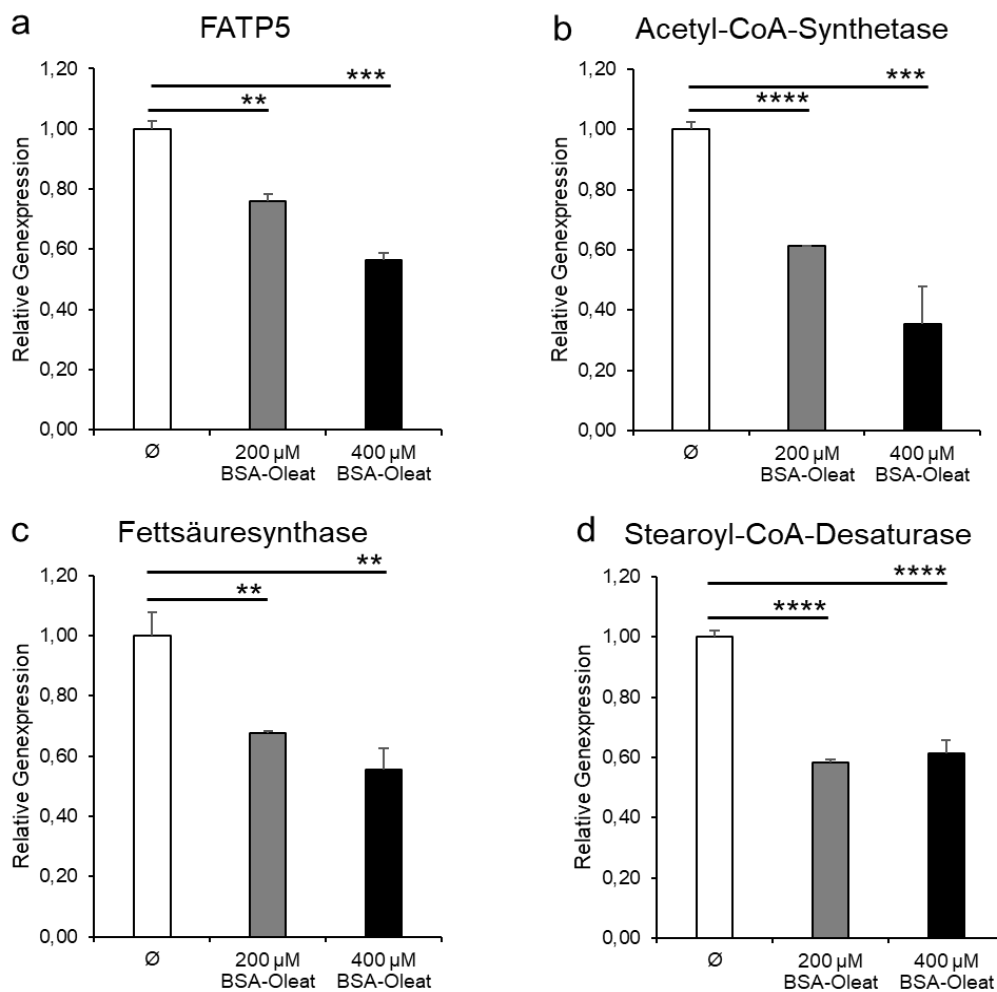
Die Wirkung der Fettsäurestimulation (3.2.2) auf die Genexpression von Schlüsselenzymen und Transportern des hepatozellulären Stoffwechsels wurde mittels qRT-PCR analysiert (3.2.5). Es zeigt sich eine signifikante Abnahme der Expression von FATP5, Acetyl-CoA-Synthetase (ACC), Fettsäuresynthase (FAS) sowie Stearoyl-CoA-Desaturase (SCD-1). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die HepG2-Zellen auf das erhöhte Fettsäureangebot mit einer Drosselung des Fettsäureimports durch den Fettsäuretransporter FATP5 reagieren. Außerdem erfolgt eine Suppression der Neusynthese von Fettsäuren aus Glucosemetaboliten durch Herunterregulation der entsprechenden Schrittmacherenzyme (Abb. 10a-d). Gleichzeitig kommt es durch signifikante Steigerung der CPT-1 $\alpha$ -Expression zu einer Zunahme der Fettsäureverwertung in der mitochondrialen  $\beta$ -Oxidation (Abb. 10e). Interessanterweise bewirkt die Fettsäurebehandlung der HepG2-Zellen ebenfalls eine Zunahme der Transkription pro-inflammatorischer Zytokine wie z.B. IL-8 (Abb. 10f).

Die Fettsäurestimulation primärer humaner Hepatozyten führt zu ähnlichen Veränderungen der Genexpression in der qRT-PCR. Auch hier reagieren die Hepatozyten mit einer Herunterregulation von FATP5, Acetyl-CoA-Synthetase, Fettsäuresynthase sowie Steatoyl-CoA-Desaturase (Abb. 11a-c). Daneben kann ein starker Anstieg der CCL2-Genexpression beobachtet werden, was wiederum für eine Entzündungsreaktion des Hepatozyten spricht (Abb. 11d).

Die beschriebene Regulation der Genexpression in HepG2-Zellen sowie primären humanen Hepatozyten kann als biologisch sinnvoller Anpassungsmechanismus des Hepatozyten an hohe extrazelluläre Fettsäurekonzentrationen gewertet werden. Im Überschuss vorliegende Fettsäuren werden zur  $\beta$ -Oxidation genutzt und darüber hinaus in Form von Triacylglyceriden als Energiedepot gespeichert. Eine zusätzliche

## 4. Ergebnisse

Fettsäuresynthese aus Glucosemetaboliten ist nicht notwendig. Eine Reduktion der Fettsäuretransporter in der Plasmamembran schützt den Hepatozyten vor zu großen Mengen zytotoxischer Fettsäuren, die ansonsten ungehindert durch freie Diffusion in die Zelle eintreten. Die gesteigerte Transkription pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-8 und CCL2 deutet daraufhin, dass der zelluläre Stress durch die Zytotoxizität der Ölsäure sowie der vermehrte Zelltod innerhalb der Kultur eine Entzündungsreaktion im Hepatozyten auslösen.



**Abbildung 10: Genexpression in qRT-PCR bei Stimulation von HepG2-Zellen mit BSA-Oleat über 24h (Fortsetzung siehe nächste Seite)**

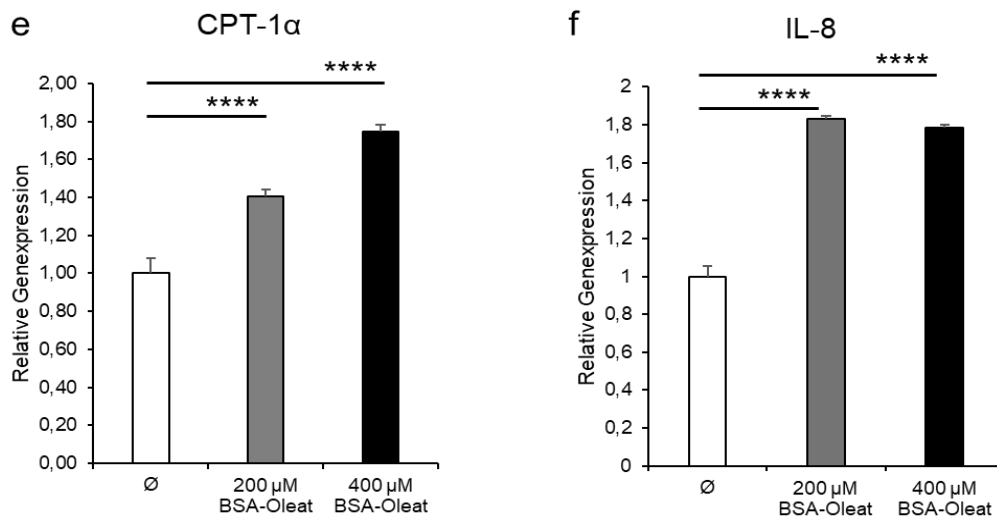
**a-d** Verminderte Expression des Fettsäuretransporters FATP5 sowie von Enzymen der Fettsäuresynthese

**e** Gesteigerte Expression von CPT-1 $\alpha$  als Schlüsselenzym der  $\beta$ -Oxidation

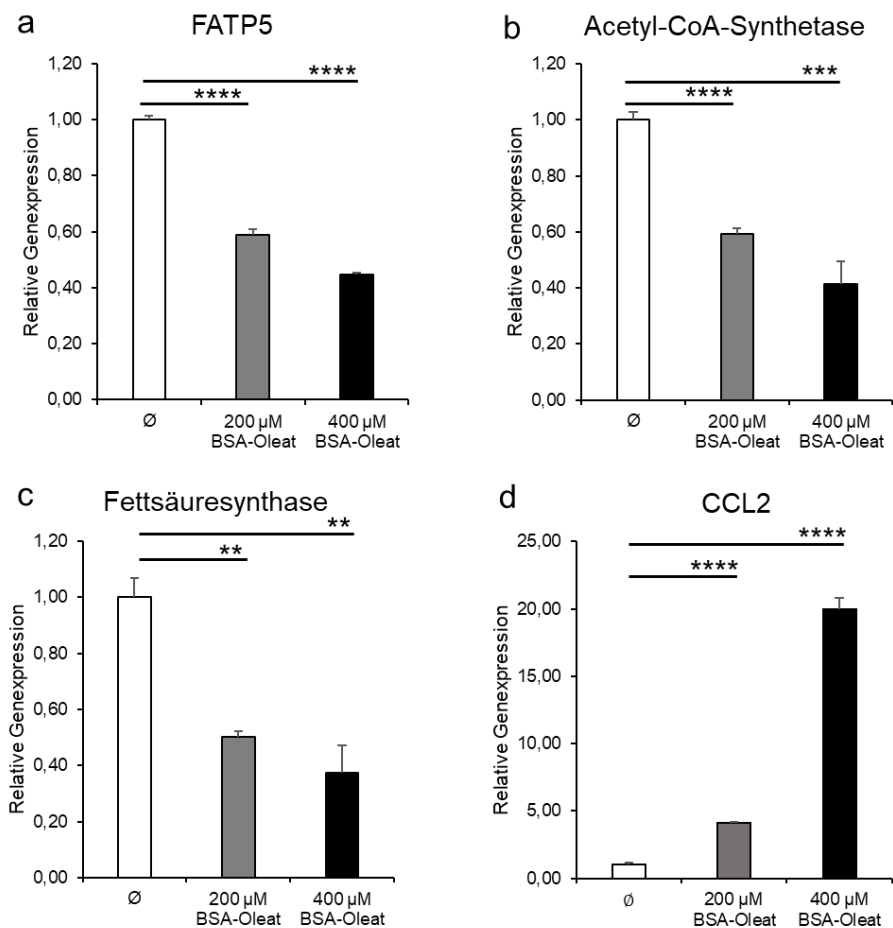
**f** Gesteigerte Expression des pro-inflammatorischen Zytokins IL-8

Dargestellt sind die Mittelwerte +SEM bei 3 unabhängig durchgeführten Experimenten. Die statistische Signifikanz wurde mittels zweiseitigem Student's *t*-Test zu einem Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$  bestimmt ( $p < 0,05$  (\*);  $p < 0,01$  (\*\*);  $p < 0,001$  (\*\*\*);  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*))

## 4. Ergebnisse



**Abbildung 10: Genexpression in qRT-PCR bei Stimulation von HepG2-Zellen mit BSA-Oleat über 24h (Fortsetzung)**



**Abbildung 11: Genexpression in qRT-PCR bei Stimulation von primären humanen Hepatozyten mit BSA-Oleat über 24h**

**a-c** Verminderte Expression des Fettsäuretransporters FATP5 sowie von Enzymen der Fettsäuresynthese.

**d** Gesteigerte Expression von CCL2

Dargestellt sind die Mittelwerte +SEM bei 3 unabhängig durchgeführten Experimenten. Die statistische Signifikanz wurde mittels zweiseitigem Student's *t*-Test zu einem Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$  bestimmt ( $p < 0,05$  (\*);  $p < 0,01$  (\*\*);  $p < 0,001$  (\*\*\*);  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*))

### 4.2 Stimulation der Hepatozyten mit Zytokinen der IL-1-Familie

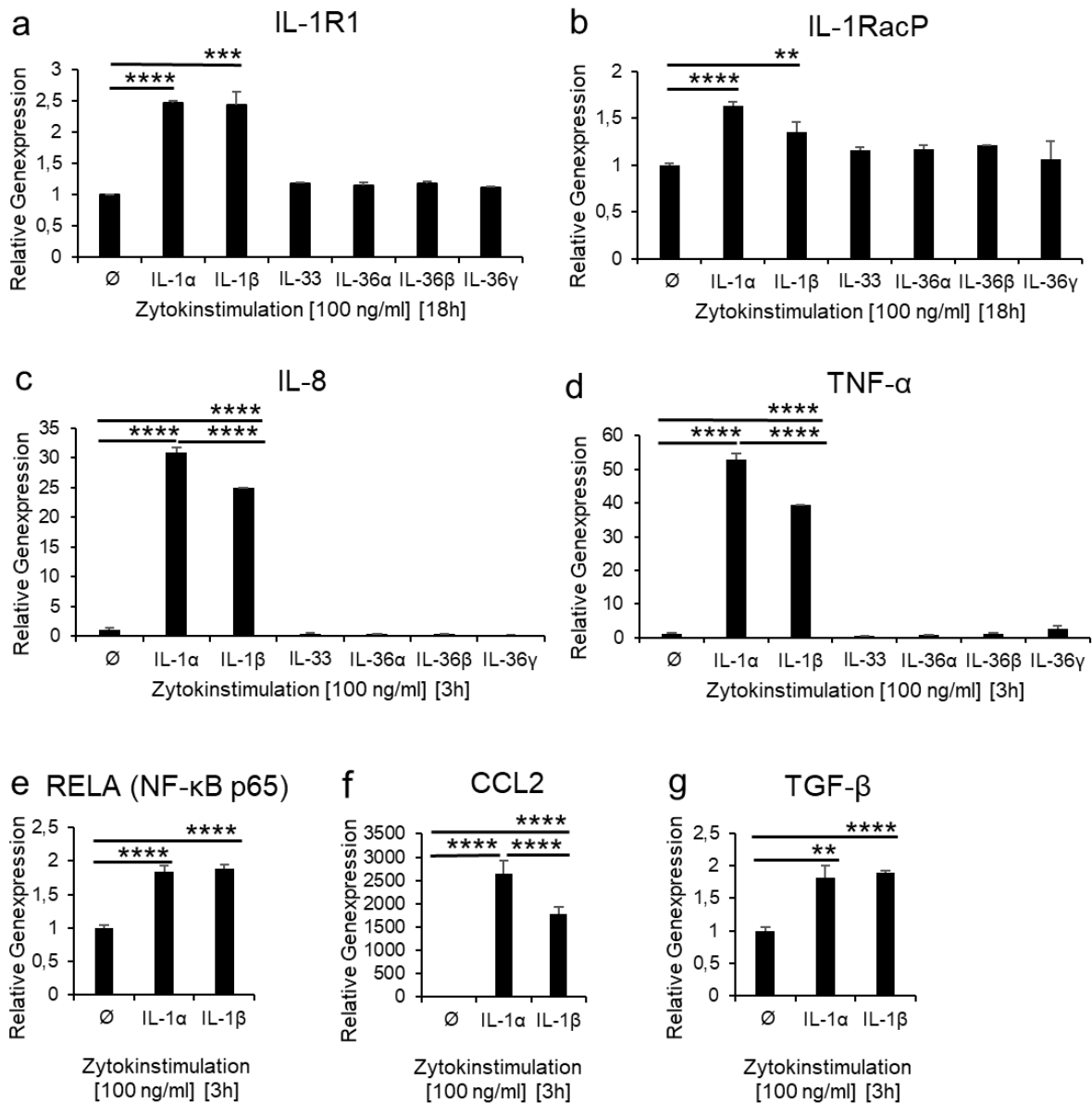
#### 4.2.1 Genexpression

Im zweiten Teil der Arbeit wurden HepG2-Zellen und primäre humane Hepatozyten mit verschiedenen Zytokinen der IL-1-Zytokin-Superfamilie stimuliert, um die zelluläre Antwort auf diese Signalmoleküle zu charakterisieren. Dazu wurden die Hepatozyten mit je 100 ng/mL rekombinantem IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-33, IL-36 $\alpha$ , IL-36 $\beta$  oder IL-36 $\gamma$  über einen Zeitraum von 3-18h stimuliert (3.2.2) und anschließend das Expressionsmuster verschiedener Gene, die für pro-inflammatorische Mediatoren sowie Schlüsselenzyme des Zellstoffwechsels codieren, mittels qRT-PCR analysiert (3.2.5). Die Stimulation der HepG2-Zellen mit IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  führt nach 18 h zu einer Steigerung der IL-1R1-Expression etwa um den Faktor 2,5, auch der Korezeptor IL-1RacP erfährt eine schwache Expressionssteigerung durch IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  nach 18h (Abb.12a-b). Bereits nach dreistündiger Stimulation mit IL-1 $\alpha$  bzw. IL-1 $\beta$  zeigt sich annähernd eine Verdopplung der Expression von RELA, welches für die p65-Untereinheit des pro-inflammatorischen Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B codiert (Abb. 12e). Passend hierzu zeigt sich ebenfalls nach 3h eine starke Expressionssteigerung der NF- $\kappa$ B-abhängigen pro-inflammatorischen Zytokine IL-8, TNF- $\alpha$  und CCL2 (MCP-1) (Abb. 12 c, d, f). Im Fall von IL-8 und TNF- $\alpha$  handelt es sich um eine Expressionssteigerung um den Faktor 10- 50, bei CCL2 werden Werte im Bereich von über 2500 erreicht. Bei allen 3 Zytokinen ist die Wirkung von IL-1 $\alpha$  signifikant größer als von IL-1 $\beta$ . Darüber hinaus zeigt sich eine leichte Transkriptionssteigerung von TGF- $\beta$  nach dreistündiger Stimulation mit den beiden genannten Zytokinen. Die Stimulation der HepG2-Zellen mit IL-33 sowie den IL-36-Isoformen zeigt hingegen keinerlei Wirkung im Hinblick auf die genannten Gene (Abb. 12 a-d). Auch eine Expression des IL-33-Rezeptors sowie des IL-36-Rezeptors konnte in der qRT-PCR nicht nachgewiesen werden (Daten nicht dargestellt).

In der Analyse metabolischer Read-outs nach Stimulation der HepG2-Zellen mit IL-1 $\beta$  zeigt sich nach 3h eine signifikante Herunterregulation des Transkriptionsfaktors PPAR $\alpha$ , seines Coaktivators PGC-1 $\alpha$  sowie seines Effektorgens CPT-1 $\alpha$ , was auf eine Suppression der oxidativen Fettsäureverwertung schließen lässt (Abb. 13 a-c). Andere wichtige Enzyme des Zellstoffwechsels wie Fettsäuresynthase oder Acetyl-

## 4. Ergebnisse

CoA-Synthetase wiesen hingegen keine eindeutige Veränderung ihrer Expression auf (Daten nicht dargestellt).

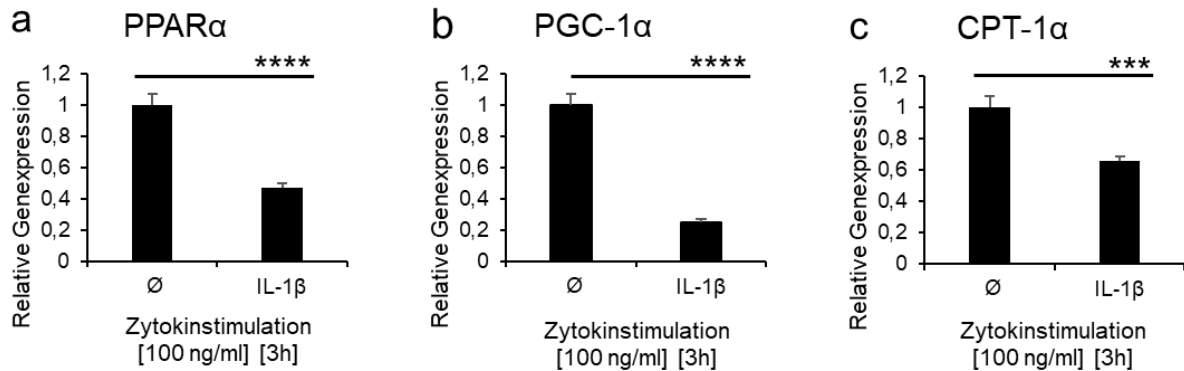


**Abbildung 12: Genexpression in HepG2 Zellen nach Zytokinstimulation über 3-18h: Inflammatorisches Read-out**

**a-g** Signifikante Expressionssteigerung nach Stimulation mit IL-1α und IL-1β.

**a-d** Keine Beeinflussung der Genexpression durch IL-33 und IL-36-Isoformen

Dargestellt sind die Mittelwerte +SEM bei 3 unabhängig durchgeführten Experimenten. Die statistische Signifikanz wurde mittels zweiseitigem Student's t-Test zu einem Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$  bestimmt ( $p < 0,05$  (\*);  $p < 0,01$  (\*\*);  $p < 0,001$  (\*\*\*);  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*))



**Abbildung 13: Genexpression in HepG2 Zellen nach Zytokinstimulation über 3h: Metabolisches Read-out**

**a-c** Signifikante Senkung der Genexpression von PPARα, PGC-1α und CPT-1α durch Stimulation mit IL-1β.

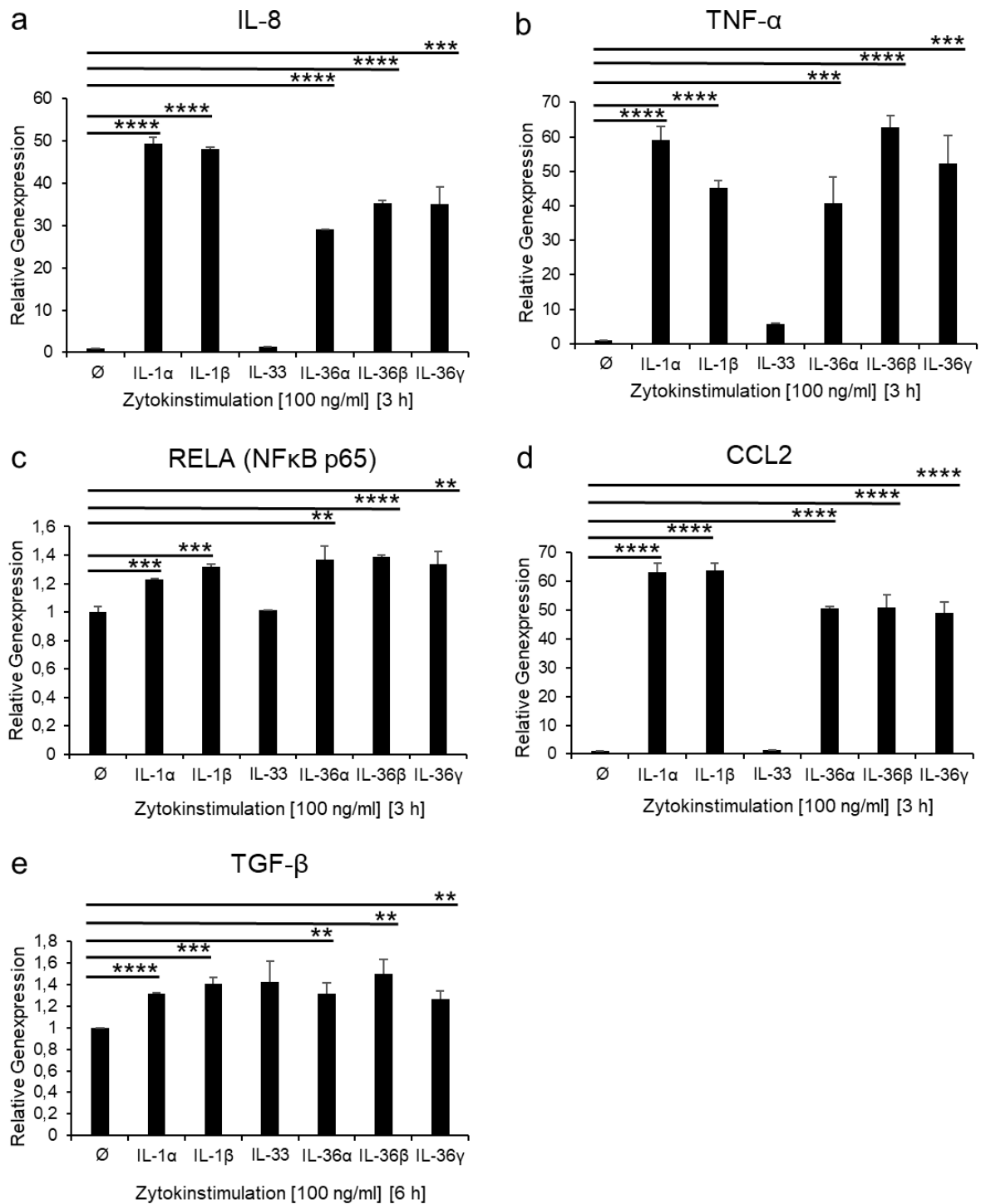
*Dargestellt sind die Mittelwerte +SEM bei 3 unabhängig durchgeführten Experimenten. Die statistische Signifikanz wurde mittels zweiseitigem Student's t-Test zu einem Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$  bestimmt ( $p < 0,05$  (\*);  $p < 0,01$  (\*\*);  $p < 0,001$  (\*\*\*);  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*))*

Bei der Stimulation der primären humanen Hepatozyten zeigen sich im Vergleich zu den HepG2-Zellen jedoch deutliche Unterschiede. Eine Heraufregulation pro-inflammatorischer Signale nach 3 h findet nicht nur bei den Zytokinen IL-1α und IL-1β statt, sondern auch bei den IL-36-Isoformen (Abb. 14). Einzig die Stimulation mit IL-33 zeigt keine Wirkung. So führt die Stimulation mit IL-1α/β sowie IL-36α/β/γ zu einem leichten Anstieg der Expression von RELA und zu einem starken Anstieg der Expression von IL-8, TNF-α und CCL2. Dabei zeigen die Zytokine wechselnde Potenzen je nach induziertem Gen – eine eindeutige Überlegenheit eines Zytokins ist jedoch nicht erkennbar. Eine Veränderung der Expression von Zytokinrezeptoren und -korezeptoren kann nach 3 h und 6 h nicht beobachtet werden, allerdings wurden die Werte bei 18-stündiger Stimulation wie bei den HepG2-Zellen nicht erhoben. Nach Stimulation mit IL-1α/β sowie IL-36α/β/γ zeigt sich nach 6 h eine leichte Steigerung der Expression des Fibrosemarkers TGF-β. In Hinblick auf die Beeinflussung des Zellstoffwechsels zeigt sich nach 6h eine deutliche Suppression der PGC-1α-Expression bei allen Zytokinen außer IL-33 (Abb. 15 b). Bei PPARα und CPT-1α findet eine relevante Reduktion im Wesentlichen nur bei den IL-1-Zytokinen statt (Abb. 15 a, c).

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass HepG2-Zellen und primäre humane Hepatozyten sich in Bezug auf ihre Stimulation durch Zytokine der IL-1-Familie deutlich unterscheiden. Bei den HepG2-Zellen kann lediglich die Expression

des IL-1-Rezeptors 1 sowie seines Korezeptors IL-1RacP nachgewiesen werden. Dementsprechend zeigt sich eine Veränderung der Genexpression von inflammatorischen und metabolischen Read-outs nur in Antwort auf eine Stimulation mit IL-1 $\alpha$  sowie IL-1 $\beta$ . Die primären humanen Hepatozyten hingegen reagieren nicht nur auf die Zytokine IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$ , sondern auch auf die IL-36-Isoformen. Somit ist es möglich, dass neben der bekannten Bedeutung der IL-1-Zytokine auch die IL-36-Zytokine eine Rolle bei der hepatozellulären Inflamationsreaktion im Rahmen der MASLD spielen. Die Experimente legen den Schluss nahe, dass humane Hepatozyten den IL-1-Rezeptor 1, den IL-36-Rezeptor und ihren Korezeptor IL-1RacP exprimieren und dass deren Stimulation über die Anschaltung pro-inflammatorischer Signalwege die Produktion wichtiger Zytokine bewirkt. Auch scheint eine Interaktion zwischen inflammatorischen und metabolischen Signalwegen zu bestehen, da es zu einer Abnahme der Expression von zentralen Regulatoren des oxidativen Fettstoffwechsels kommt. Durch eine Verminderung der  $\beta$ -Oxidation können die Zytokine eine Akkumulation intrazellulärer Fettsäuren im Sinne einer Steatose fördern.

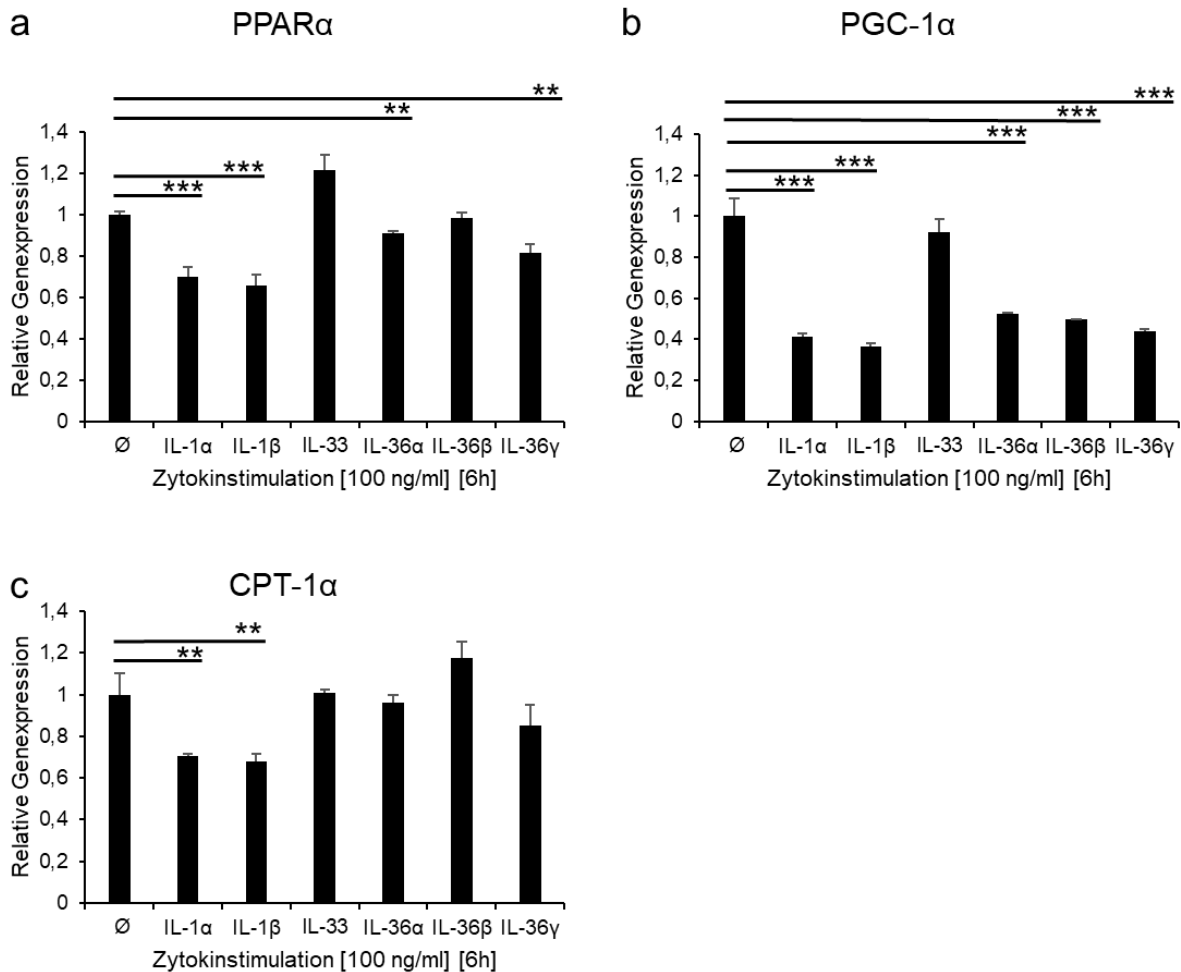
## 4. Ergebnisse



**Abbildung 14: Genexpression in primären humanen Hepatozyten nach Zytokinstimulation über 3-6h: Inflammatorisches Read-out**

**a - e** Signifikante Expressionssteigerung nach Stimulation mit IL-1α und IL-1β sowie den IL-36-Isoformen. Keine Beeinflussung der Genexpression durch IL-33.

Dargestellt sind die Mittelwerte +SEM bei 3 unabhängig durchgeführten Experimenten. Die statistische Signifikanz wurde mittels zweiseitigem Student's t-Test zu einem Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$  bestimmt ( $p < 0,05$  (\*);  $p < 0,01$  (\*\*);  $p < 0,001$  (\*\*\*);  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*))



**Abbildung 15: Genexpression in primären humanen Hepatozyten nach Zytokinstimulation über 6h: Metabolisches Read-out**

**a - c** Signifikante Senkung der Genexpression durch Stimulation mit IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$ , sowie teilweise durch Stimulation mit den IL-36-Isoformen. Keine Beeinflussung der Genexpression durch IL-33.

Dargestellt sind die Mittelwerte +SEM bei 3 unabhängig durchgeführten Experimenten. Die statistische Signifikanz wurde mittels zweiseitigem Student's *t*-Test zu einem Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$  bestimmt ( $p < 0,05$  (\*);  $p < 0,01$  (\*\*);  $p < 0,001$  (\*\*\*) ;  $p < 0,0001$  (\*\*\*)

#### 4.2.2 Proteinsynthese

Zur weiteren Analyse der hepatozellulären Antwort auf inflammatorische Stimuli wurde die Proteinsynthese der p65-Untereinheit des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B in HepG2-Zellen mittels Western Blot sowie ELISA untersucht. Für den Western Blot wurden die Hepatomzellen mit 100 ng/ml rekombinantem IL-1 $\beta$  für einen Zeitraum von 15 min bis 24 h stimuliert (3.2.2). Anschließend wurde die nukleäre Proteinfraction isoliert, mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und es erfolgte ein spezifischer Proteinnachweis mittels Antikörper (3.2.6). Zur relativen Quantifizierung wurde die NF- $\kappa$ B p65 Expression ins Verhältnis gesetzt zur

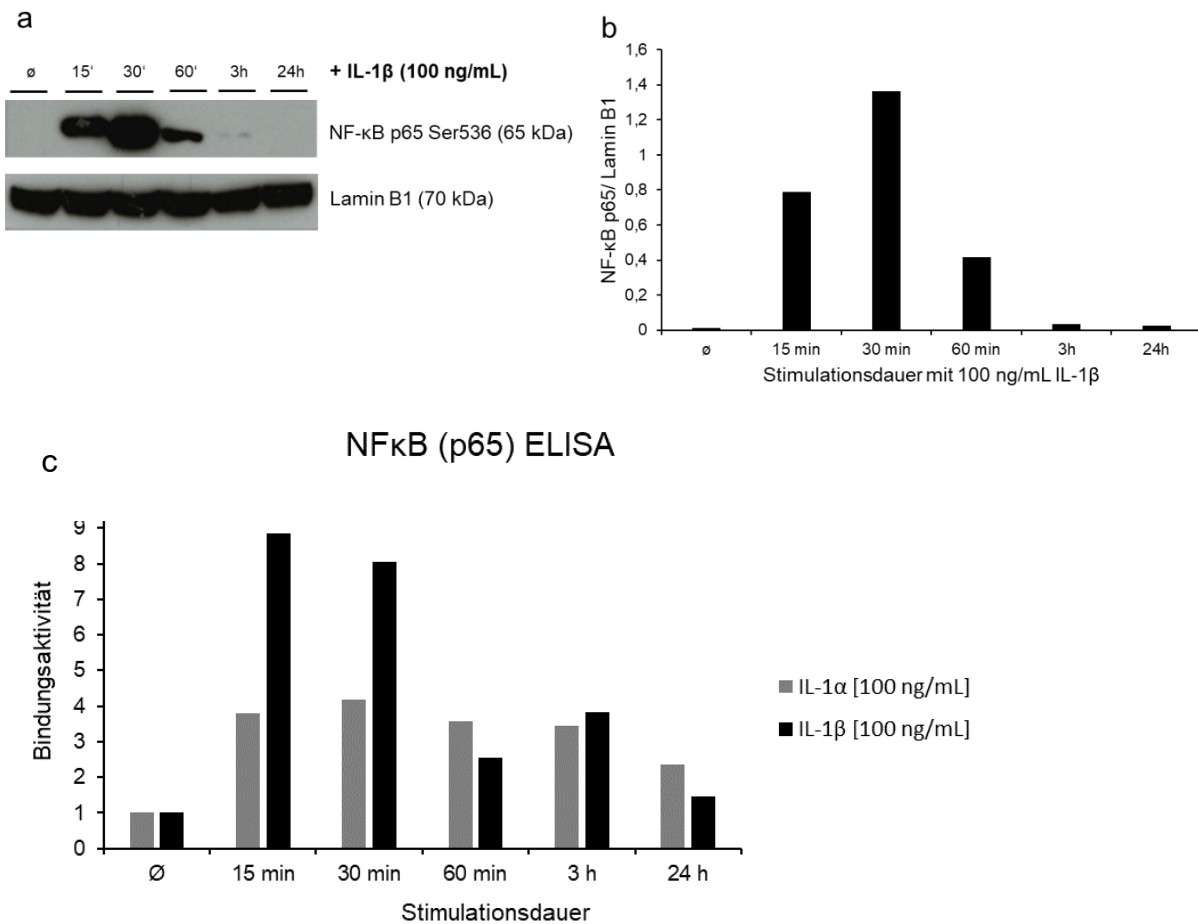
#### 4. Ergebnisse

---

Expression von Lamin B1, welches als Bestandteil der Kernlamina konstant exprimiert wird. Es zeigt sich eine deutliche Zunahme der NF- $\kappa$ B-p65 Expression nach 15 min Stimulationsdauer, welche nach 30 min noch weiter angewachsen ist. Nach 60 min Stimulation ist die Expression wieder unter den Wert nach 15min gefallen, jedoch weiterhin deutlich gesteigert im Vergleich zur unstimulierten Probe. Nach 3h und 24h ist sie weiter abgesunken und nur noch geringfügig erhöht. (Abb. 16a-b).

Im NF- $\kappa$ B (p65) ELISA wurde die Expression des pro-inflammatorischen Transkriptionsfaktors innerhalb der nukleären Proteinfraction nach Stimulation der HepG2-Zellen mit je 100 ng/mL rekombinantem IL-1 $\alpha$  oder IL-1 $\beta$  über einen Zeitraum von 15 min bis 24 h anhand der Bindungsaktivität gemessen (3.2.6.5). Es zeigte sich schnell eine deutliche Steigerung der Bindungsaktivität etwa um den Faktor 9 bei einer Inkubation mit IL-1 $\beta$  für 15 min (Abb. 16c). Im Anschluss fiel die Bindungsaktivität von nukleärem NF- $\kappa$ B p65 rasch wieder ab. Nach 60 min lag sie bei Faktor 2,5 und nach 24 h war sie kaum noch erhöht. Auch bei Stimulation mit IL-1 $\alpha$  zeigte sich eine Steigerung der NF- $\kappa$ B-p65 Bindungsaktivität, allerdings nur um den Faktor 4. Das Maximum wurde erst nach 30 min erreicht und blieb für einen längeren Zeitraum konstant als bei IL-1 $\beta$ . Die Daten aus Western Blot und NF- $\kappa$ B (p65) ELISA unterstreichen insgesamt die Ergebnisse der qRT-PCR, denn auch sie deuten auf eine Inflammationsreaktion des Hepatozyten mit Anschaltung NF- $\kappa$ B-abhängiger proinflammatorischer Signalwege hin.

## 4. Ergebnisse



**Abbildung 16: NF-κB (p65) Western Blot und ELISA von nukleärem Proteinisolat aus HepG2-Zellen nach Stimulation mit IL-1α bzw. IL-1β**

- Western Blot Film mit den Proteinbanden von NF-κB p65 (oben) und Lamin B1 (unten). Von links nach rechts sind nukleäre Proteinisolate aus HepG2-Zellen aus unstimuliertem Ansatz (ø) sowie nach 15 min, 30 min, 60 min, 3h sowie 24h Stimulation mit 100 ng/mL IL-1β aufgetragen.
- Verhältnis der nukleären Expression von NF-κB p65 zu Lamin B1 im nebenstehenden Western Blot (a).
- NF-κB (p65) ELISA von nukleärem Proteinisolat aus HepG2-Zellen nach Stimulation mit 100 ng/mL IL-1α und IL-1β.

## 4.3 Kombinierte Stimulation

### 4.3.1 Einfluss auf den Lipidstoffwechsel

Als Nächstes wurden die HepG2-Zellen und die primären Hepatozyten einer kombinierten Stimulation mit Fettsäure und Zytokin unterzogen, um die Reaktion der Hepatozyten auf das parallele Vorhandensein von Lipiden und pro-inflammatorischen Signalen zu untersuchen (3.2.2). Im Fall der HepG2-Zellen wurde eine Inkubation mit 200 μM BSA-Oleat für 24 h durchgeführt, bevor die Hepatomzellen mit 100 ng/mL IL-1β für 1,3 oder 6 Stunden stimuliert wurden. Die Veränderung der Genexpression wurde mittels qRT-PCR ermittelt. Abbildung 17 zeigt die Ergebnisse zu Genen, deren

#### 4. Ergebnisse

---

Expressionsmuster wesentlich beeinflusst wurde. Betrachtet man die Regulation von Genen mit Einfluss auf den zellulären Metabolismus (Abb. 17a-b), so zeigt sich, dass die Expression der Fettsäuresynthase zwar durch BSA-Oleat reprimiert wird, doch ein gleichzeitiges Vorhandensein von IL-1 $\beta$  diese Repression mehr als wett macht. So zeigt sich bei den HepG2-Zellen mit kombinierter Stimulation eine Nettoerhöhung der Fettsäuresynthaseexpression. Bei PGC-1 $\alpha$  zeigt sich eine deutliche Hemmung der Genexpression durch IL-1 $\beta$ , die auch durch Kombination mit BSA-Oleat nicht wesentlich verändert wird. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass bei kombinierter Stimulation eine Verschiebung des Lipidstoffwechsels von  $\beta$ -Oxidation hin zur De-novo-Fettsäuresynthese stattfindet.

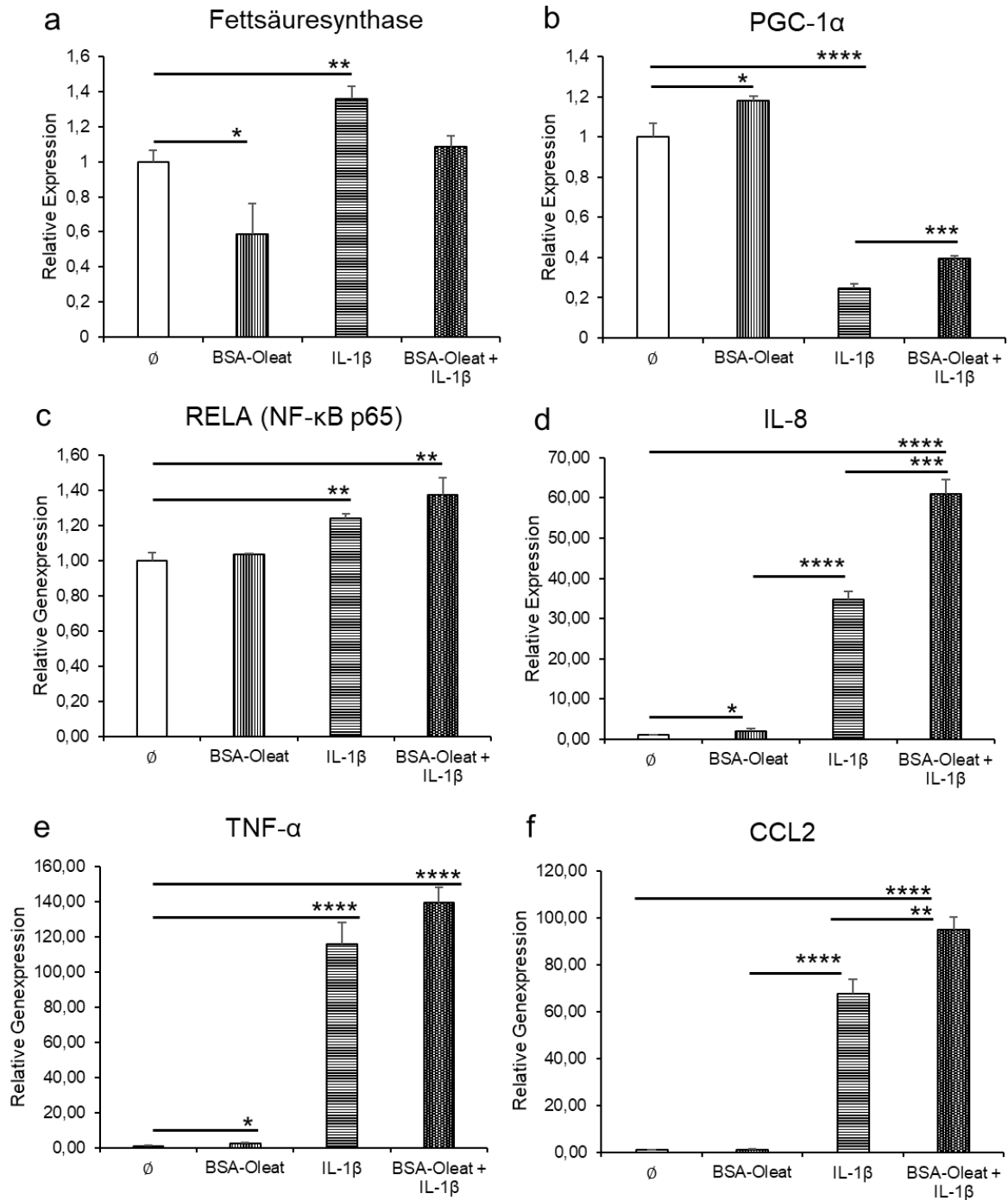
Die primären humanen Hepatozyten wurden aufgrund der Ergebnisse vorangegangener Stimulationsexperimente mit mehreren Zytokinen der IL-1-Superfamilie in Kombination mit BSA-Oleat behandelt. Zur Reduktion der Anzahl an Versuchsansätzen sowie des Verbrauchs an Zellmaterial wurden die Isoformen eines Zytokins miteinander kombiniert. Nach der 24-stündigen Inkubation mit 200  $\mu$ M BSA-Oleat wurden die primären humanen Hepatozyten in 3 unterschiedlichen Ansätzen für 3 h behandelt. Im ersten Ansatz wurden je 50 ng/mL IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  hinzugefügt, im zweiten Ansatz 100 ng/mL IL-33 und im dritten Ansatz je 33 ng/mL IL-36 $\alpha$ , IL-36 $\beta$  und IL-36 $\gamma$ , sodass die Gesamtzytokinkonzentration jeweils 100 ng/mL betrug. Bei der Auswertung der metabolischen Read-outs zeigt sich, dass PPAR $\alpha$  in Anwesenheit der Zytokine stark herunterreguliert wird. Diese Herunterregulation findet auch bei gleichzeitiger Stimulation mit BSA-Oleat statt (Abb. 18a). Ebenso kann bei PGC-1 $\alpha$  eine deutliche Supprimierung der Expression beobachtet werden, wobei diese nur im ersten und dritten Ansatz, also bei den IL-1-Isoformen sowie den IL-36-Isoformen, vorhanden ist (Abb. 18b). Diese Zytokine verstärken die bereits vorhandene PGC-1 $\alpha$ -Suppression durch die Fettsäure zusätzlich. IL-33 hingegen führt zu keiner signifikanten Änderung der PGC-1 $\alpha$ -Expression. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass die primären Hepatozyten in einer pro-inflammatorischen Umgebung die  $\beta$ -Oxidation trotz hoher Mengen an zur Verfügung stehenden Fettsäuren herunterreguliert, was zur intrazellulären Akkumulation dieser Fettsäuren beiträgt.

### 4.3.2 Einfluss auf inflammatorische Antwort

Bei der Regulation der Expression pro-inflammatorischer Transkriptionsfaktoren und Zytokine zeigt sich in den HepG2-Zellen ein additiver Effekt von Fettsäure und Zytokin (Abb. 17 c-f). Die pro-inflammatorische Wirkung der Zytokine übersteigt zwar deutlich die der Fettsäure, jedoch bewirkt eine kombinierte Stimulation eine zusätzliche Steigerung der Genexpression. So ist die Expression von RELA (NF- $\kappa$ B p65), IL-8, TNF- $\alpha$  und CCL2 bei einer kombinierten Stimulation mit BSA-Oleat und IL-1 $\beta$  am höchsten. Die Daten unterstützen die These, dass das Vorhandensein von hohen Fettsäurekonzentrationen in Verbindung mit Zytokinen der IL-1-Familie eine starke pro-inflammatorische Antwort der Hepatozyten verursacht.

Bei der Betrachtung der primären Hepatozyten zeigen sich ähnliche Ergebnisse für den IL-1 $\alpha/\beta$ -Ansatz sowie den IL-36- $\alpha/\beta/\gamma$ -Ansatz. In beiden Fällen zeigt sich eine deutliche Expressionssteigerung von IL-8 sowie CCL2 durch die Zytokingemische, die durch das BSA-Oleat zusätzlich verstärkt wird (Abb. 18 c-d). Dabei ist die Wirkung von zusätzlichem BSA-Oleat bei den IL-36-Isoformen erkennbar ausgeprägter als bei den IL-1-Isoformen. Die Stimulation mit IL-33 hat wiederum keinen Einfluss auf die Zytokinexpression. Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass auch in den primären Hepatozyten die Kombination aus Fettsäure und Zytokin eine deutliche pro-inflammatorische Wirkung besitzt.

## 4. Ergebnisse



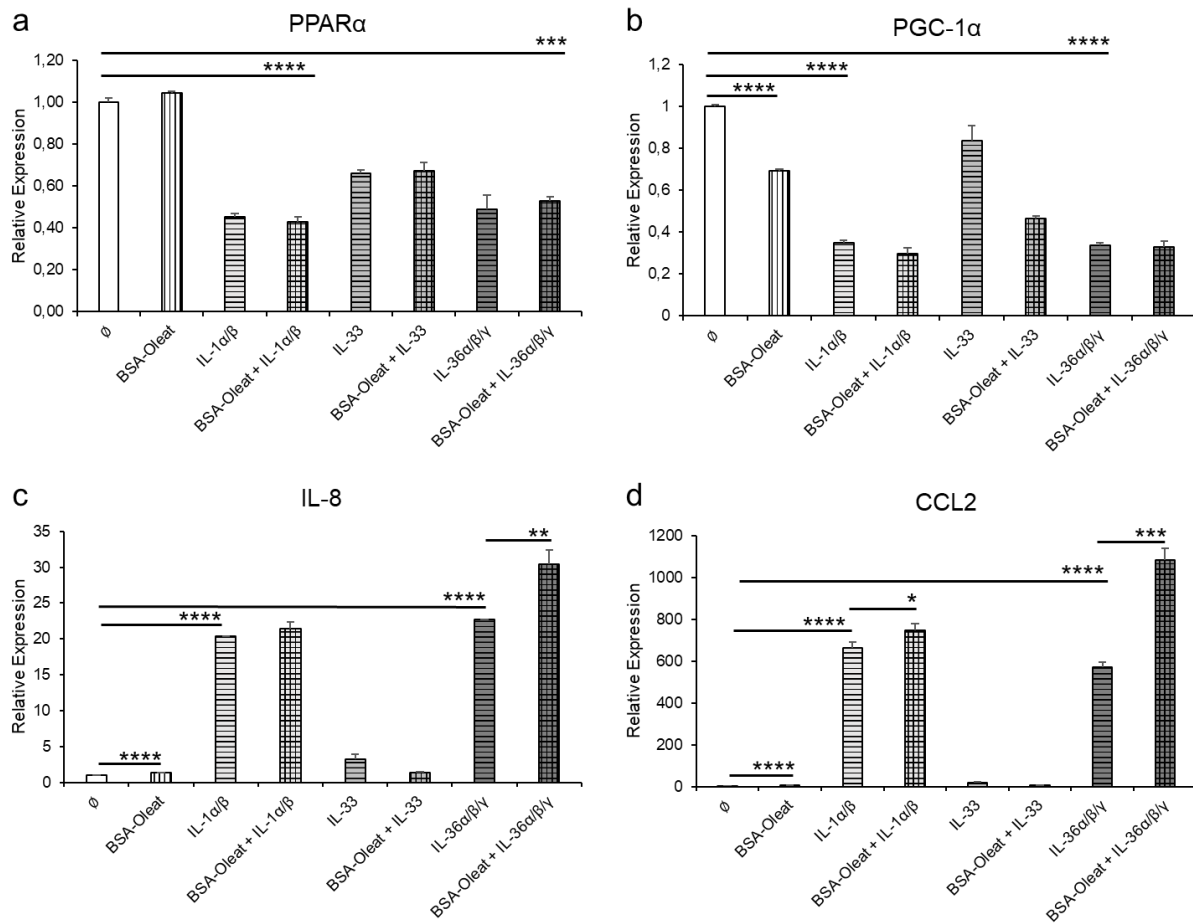
**Abbildung 17: Kombinierte Stimulation von HepG2-Zellen mit BSA-Oleat und IL-1β**  
qRT-PCR-Ergebnisse nach Stimulation von HepG2-Zellen mit 200  $\mu$ M BSA-Oleat für 24h und/oder IL-1 $\beta$  für 3h.

**a - b** Einfluss auf den Lipidstoffwechsel: Fettsäuresynthase und PGC-1 $\alpha$

**c - f** Einfluss auf inflammatorische Antwort: RELA (NF- $\kappa$ B p65), IL-8, TNF- $\alpha$ , CCL2

Dargestellt sind die Mittelwerte +SEM bei 3 unabhängig durchgeführten Experimenten. Die statistische Signifikanz wurde mittels zweiseitigem Student's t-Test zu einem Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$  bestimmt ( $p < 0,05$  (\*);  $p < 0,01$  (\*\*);  $p < 0,001$  (\*\*\*) ;  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*))

## 4. Ergebnisse



**Abbildung 18: Kombinierte Stimulation primärer humaner Hepatozyten mit BSA-Oleat und Zytokinen der IL-1-Superfamilie**

qRT-PCR-Ergebnisse nach Stimulation von primären humanen Hepatozyten mit 200  $\mu$ M BSA-Oleat für 24h und/oder Zytokinen der IL-1-Superfamilie für 3h.

**a - b** Einfluss auf den Lipidstoffwechsel: Suppression des Transkriptionsfaktors PPAR $\alpha$  und seines Koaktivators PGC-1 $\alpha$ .

**c - d** Einfluss auf inflammatorische Antwort: Induktion proinflammatorischer Zytokine IL-8 und CCL2

Dargestellt sind die Mittelwerte +SEM bei 3 unabhängig durchgeführten Experimenten. Die statistische Signifikanz wurde mittels zweiseitigem Student's t-Test zu einem Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$  bestimmt ( $p < 0,05$  (\*);  $p < 0,01$  (\*\*);  $p < 0,001$  (\*\*\*);  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*))

### 4.4 Wirksamkeit monoklonaler rekombinanter Antikörper gegen IL-1RacP

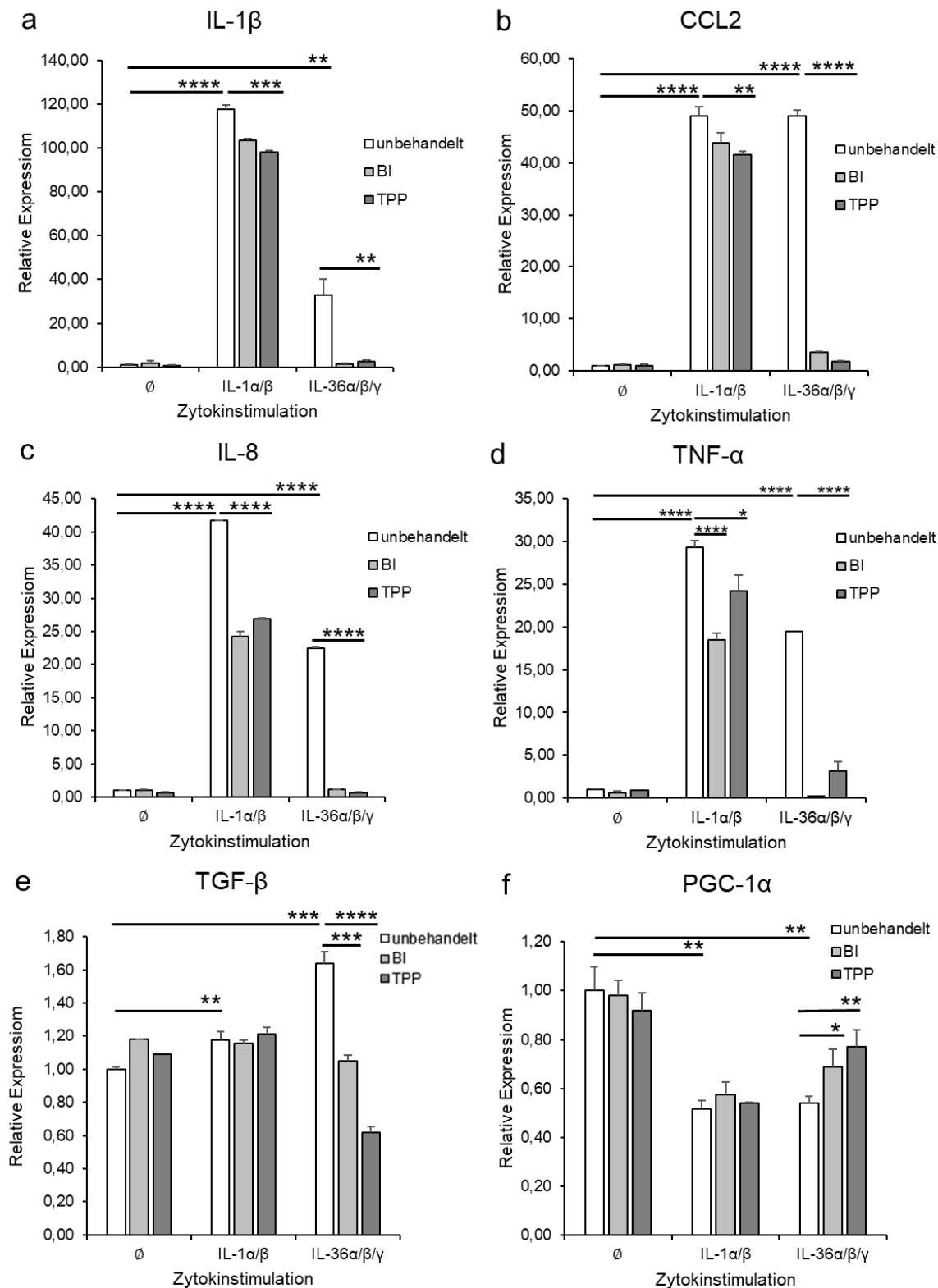
Im letzten Teil dieser Promotionsarbeit wurde schließlich die Wirksamkeit von IL-1RacP-Antikörpern im Hinblick auf die Blockierung der pro-inflammatorischen und metabolischen Wirkung der IL-1-Zytokine untersucht. Hierzu wurden primäre humane Hepatozyten mit 2 unterschiedlichen monoklonalen rekombinanten Antikörpern gegen IL-1RacP von TPP und BI behandelt, die von Böhlinger Ingelheim zur Verfügung gestellt wurden. Die Zellen wurden zunächst mit je 100 nM Antikörper für

#### 4. Ergebnisse

---

30 min vorinkubiert, bevor die Zytokingemische wie bereits beschrieben hinzugegeben wurden (4.3.1). Bei Betrachtung der Expression pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-1 $\beta$ , CCL2, IL-8 sowie TNF- $\alpha$  als Read-out zeigt sich, dass beide Antikörper grundsätzlich in der Lage sind, die Wirkung von IL-1- und IL-36-Zytokinen abzuschwächen (Abb. 19 a-d). Die Wirkstärke der Antikörper variiert jedoch je nach Zytokinstimulation sowie pro-inflammatorischem Read-out. Die Stimulation mit IL-1 $\alpha/\beta$  bewirkt eine ausgeprägtere Expressionssteigerung von IL-1 $\beta$ , IL-8 sowie TNF- $\alpha$  als die Stimulation mit IL-36 $\alpha/\beta/\gamma$  – bei CCL2 ist die Wirkung ebenmäßig. Gleichzeitig lässt sich erkennen, dass die Antikörper die ohnehin schwächere Wirkung der IL-36-Zytokine auf die Hepatozyten stärker unterdrücken können als die der IL-1-Zytokine. Eine vollständige Aufhebung der Zytokinwirkung kann nur bei den IL-36-Zytokinen beobachtet werden. Beispielsweise senkt der Anti-IL-1RAcP-Antikörper von BI die relative IL-1 $\beta$ -Expression nach Stimulation mit IL-1 $\alpha/\beta$  nur um 12% von 117 auf 103, wohingegen bei IL-36 $\alpha/\beta/\gamma$  eine Senkung um 96% von 33 auf 1,35 erreicht werden kann, was praktisch einer vollständigen Unterdrückung der pro-inflammatorischen Antwort gleichkommt (Abb. 19 a). Beim Vergleich beider Antikörper zeigt sich insgesamt keine eindeutige Überlegenheit. Bei IL-1 $\beta$  und CCL2 sind leichte Vorteile für den Antikörper von TPP erkennbar, während sich bei IL-8 und TNF- $\alpha$  der Antikörper von BI als wirkungsvoller erweist. Vergleicht man die pro-inflammatorischen Read-outs untereinander, so zeigt sich, dass die IL-8-Expression am stärksten von den Antikörpern beeinflussbar ist. Des Weiteren wurde die Expression des Fibrose-assoziierten Transkriptionsfaktors TGF- $\beta$  untersucht, der durch die oben genannten Zytokine eine mäßige Induktion um den Faktor 1,2 bis 1,6 erfährt (Abb. 19 e). Auch hier zeigt sich eine Suppression durch die Antikörper, allerdings nur bei der Stimulation mit den IL-36-Zytokinen. Ähnliches gilt für den Transkriptionsfaktor-Coaktivator PGC-1 $\alpha$ , dessen Expression durch die Zytokine um etwa 50% reduziert wird (Abb. 19 f). Diese Reduktion kann im Fall von IL-36 $\alpha/\beta/\gamma$  durch die Antikörperbehandlung teilweise wieder umgekehrt werden, nicht jedoch bei IL-1 $\alpha/\beta$ . Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass die getesteten Antikörper in der Lage sind, den Einfluss der IL-1- und IL-36-Zytokine auf die pro-inflammatorische Aktivität und den Stoffwechsel der primären Hepatozyten teilweise aufzuheben.

## 4. Ergebnisse



**Abbildung 19: Wirksamkeit monoklonaler rekombinanter Antikörper gegen IL-1RacP in primären humanen Hepatozyten**

**a - f** qRT-PCR Ergebnisse aus primären humanen Hepatozyten: Wirkung einer Vorbehandlung mit 100 nM IL-1RacP-Antikörpern über 30 min vor Stimulation mit Zytokinen der IL-1-Superfamilie

Dargestellt sind die Mittelwerte +SEM bei 3 unabhängig durchgeführten Experimenten. Die statistische Signifikanz wurde mittels zweiseitigem Student's *t*-Test zu einem Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$  bestimmt ( $p < 0,05$  (\*);  $p < 0,01$  (\*\*);  $p < 0,001$  (\*\*\*) ;  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*))

## 5. Diskussion

### 5.1 Humane Hepatozyten werden durch IL-1 und IL-36 zu einer pro-inflammatorischen Antwort angeregt

Die Hepatomzelllinie HepG2 reagiert bei Stimulation mit den Zytokinen IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  mit der Ausbildung einer pro-inflammatorischen Zellantwort. HepG2-Zellen exprimieren auf ihrer Zelloberfläche wahrscheinlich den IL-1R1 sowie den IL-1RacP, die bei Ligandenbindung eine pro-inflammatorische Signaltransduktionskette in Gang setzen. Diese besteht aus der Aktivierung und Synthese des pro-inflammatorischen Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B p65 sowie der Synthese proinflammatorischer Zytokine wie IL-8, TNF- $\alpha$  und CCL2. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit bereits publizierten Daten zur IL-1-Wirkung auf HepG2-Zellen. Für IL-1 $\alpha$  ist beschrieben, dass es in HepG2-Zellen die Anschaltung pro-inflammatorischer Signalwege sowie die Synthese von Zytokinen wie IL-6 und TNF- $\alpha$  bewirken kann (346, 347). In Bezug auf IL-1 $\beta$  ist bekannt, dass HepG2-Zellen das Zytokin prinzipiell selbst produzieren können (348) und auch auf eine Stimulation mit IL-1 $\beta$  reagieren (349, 350). Allerdings wurde die umfassende Produktion verschiedener pro-inflammatorischer Zytokine durch HepG2-Zellen nach Stimulation mit IL-1 $\beta$  bisher nicht beschrieben.

Zusätzlich zu IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  wurde in dieser Arbeit auch die Stimulation durch andere Zytokine der IL-1-Familie untersucht, deren Rezeptoren ebenfalls IL-1RacP als Korezeptor zur Signalweiterleitung benötigen. Jedoch zeigte die Stimulation von HepG2-Zellen mit IL-33 und IL-36 $\alpha/\beta/\gamma$  keinerlei Wirkung hinsichtlich der Expression der untersuchten Gene. Im Gegensatz dazu zeigten die primären humanen Hepatozyten sowohl bei Stimulation mit IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  als auch bei Stimulation mit allen IL-36-Isoformen eine pro-inflammatorische Antwort. Einzig IL-33 hat auch bei den primären humanen Hepatozyten keinen derartigen Effekt. Für IL-1 $\alpha$  ist in der Literatur bereits beschrieben, dass es auch diese Zellen stimulieren kann (346). Die Produktion von IL-1 $\beta$  in primären humanen Hepatozyten wurde ebenfalls beschrieben, sowohl im Rahmen der MASH (351) als auch im Rahmen anderer Entzündungsreaktionen wie z.B. bei einer Hepatitis-B-Infektion (352). Daneben wurde gezeigt, dass IL-1 $\beta$  selbst auch den hepatozellulären Stoffwechsel beeinflussen kann, beispielsweise im Rahmen der Anämie bei chronischer Erkrankung (anemia of chronic disease, ACD) (353, 354). Eine direkte

Stimulierbarkeit humaner Hepatozyten durch IL-36-Isoformen wurde jedoch bisher nicht beschrieben.

Allerdings finden sich in der Fachliteratur Daten aus Tiermodellen und klinischen Studien, die einen Bezug herstellen zwischen den Zytokinen IL-33 sowie IL-36 und chronischen Entzündungen in der Leber (355). Zu IL-36 liegen nur sehr vereinzelt Ergebnisse vor (356). Im Mausmodell führt eine pharmakologische oder genetische Ausschaltung des IL-36-Rezeptors zu einer Abnahme der Steatose und Inflammation im Rahmen der Alkohol-induzierten Steatohepatitis (alcoholic steatohepatitis, ASH) (357). In einem anderen Mausmodell wurden erhöhte Konzentrationen von IL-36 $\gamma$  beim akuten Paracetamol-induzierten Leberversagen gemessen. Eine Gabe von IL-36Ra führte zu einer Reduktion der Inflammation, jedoch zu einer Verschlechterung der Geweberegeneration (358). Auch für IL-33 liegen Daten aus Tiermodellen und klinischen Studien vor, die jedoch zum Teil widersprüchlich sind (359). IL-33 wurde als pathogenetischer Marker im Blut von Patienten mit Hepatitis B und C, Leberzirrhose und akutem Leberversagen nachgewiesen (360-362). Einerseits werden dem Zytokin pro-inflammatorische und pro-fibrogene Eigenschaften zugeschrieben (264, 363), andererseits wird es als immunregulatorisch und anti-inflammatorisch charakterisiert. In Bezug auf die MASLD ist beschrieben, dass IL-33 im Blut von MASH-Patienten und von Mäusen mit Diät-induzierter Steatohepatitis erhöht ist (261). Allerdings führte die Gabe von zusätzlichem IL-33 im Mausmodell zu einer Milderung der Steatose und einer Verstärkung der Fibrose (275). Ein homozygoter IL-33-Knockout hatte keinerlei Auswirkungen auf eine Diät-induzierte Steatohepatitis (276). Als zelluläre Quelle und Ziel von IL-33 wurden bei der Leberfibrose Sinusendothelzellen, hepatische Sternzellen sowie Lebermakrophagen identifiziert (264, 364). Dies könnte eine Erklärung dafür sein, dass in den hier durchgeführten Experimenten keine Wirkung von IL-33 auf den Hepatozyten selbst nachgewiesen werden konnte.

Die hier vorgestellten Ergebnisse darauf hin, dass nicht nur Leber-residente Immunzellen, sondern auch die Hepatozyten selbst zur Zytokinproduktion im Rahmen entzündlicher Prozesse befähigt sind und damit wesentlich an der Pathogenese inflammatorischer Krankheiten in der Leber beteiligt sein können (365). Außerdem zeigen die Experimente, dass die IL-36-Isoformen vergleichbare pro-inflammatorische Antworten in primären Hepatozyten hervorrufen können wie die IL-

1-Isoformen, wenn gleich ihre Wirkung insgesamt als weniger potent einzustufen ist als die von IL-1 $\alpha$ / $\beta$ . Zum umfassenden Verständnis von Entzündungsprozessen in der Leber ist es daher essentiell, sich nicht nur auf die lange bekannten und gut charakterisierten Zytokine IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  zu fokussieren, sondern auch die bisher weniger beachteten Zytokine in den Blick zu nehmen. In diesem Zusammenhang muss auch die HepG2-Zelllinie als in-vitro-Modell hinterfragt werden, da sie sich offensichtlich in ihren biologischen Eigenschaften von den primären humanen Hepatozyten unterscheidet. Diskrepanzen zwischen den beiden Zellarten wurden auch in Bezug auf andere Charakteristika beschrieben und werden in Kapitel 5.4 ausführlicher diskutiert. Im Fall von IL-33 muss jedoch angenommen werden, dass die Hepatozyten den IL-33-Rezeptor nicht exprimieren oder IL-33 keinen wesentlichen Einfluss hat auf die inflammatorische oder metabolische Aktivität der Hepatozyten. Somit ist die in der Literatur beschriebene Wirkung von IL-33 in der Leber vermutlich auf andere Zelltypen zurückzuführen, wie Kupffer-Zellen oder hepatische Sternzellen.

### **5.2 Die Fettsäure-induzierte Steatose führt im In-vitro-Modell zu einer Umstellung des hepatozellulären Stoffwechsels**

Zur Induktion einer Steatose im In-vitro-Modell der MASLD hat sich die Gabe von Fettsäuren, die an Serumalbumin aus Kälbern (bovine serum albumine, BSA) gebunden sind, etabliert. Als Fettsäuren werden in aller Regel Palmitinsäure, Ölsäure oder eine Kombination aus beiden verwendet in Konzentrationen von 0,5-2 mM (298-300, 366-373). Es handelt sich dabei um die beiden am häufigsten vorkommenden Fettsäuren in den hepatischen Triglyceriden sowohl von gesunden Menschen als auch von MASLD-Patienten. Dabei ist beschrieben, dass die gesättigte Palmitinsäure (C16:0) vor allem eine lipotoxische und pro-apoptotische Wirkung hat. Dagegen ruft die einfach ungesättigte Ölsäure (C18:1) eine stärkere, aber benigne Steatose hervor. Als In-vitro-Modell werden unter anderem sowohl HepG2-Zellen als auch primäre humane Hepatozyten verwendet, wobei sich die Ergebnisse nicht wesentlich unterscheiden. Insgesamt entsprechen die Menge und Zusammensetzung der intrazellulären Lipide in den In-vitro-Modellen weitgehend denen in der Leber von MASLD-Patienten (298, 366). In den hier durchgeführten Experimenten wurden

HepG2-Zellen mit 100-1600  $\mu\text{M}$  BSA-Oleat und primäre humane Hepatozyten mit 200  $\mu\text{M}$  BSA-Oleat stimuliert. Die Fettsäurebehandlung führte zu einer signifikanten Lipidakkumulation in den HepG2-Zellen, allerdings auch zu einer mit zunehmender Konzentration wachsenden Zytotoxizität. Frühere Experimente hatten gezeigt, dass Palmitinsäure jedoch eine deutlich toxischere Wirkung besitzt (374). Bei der Analyse der Genexpression zeigt sich, dass die HepG2-Zellen und die primären Hepatozyten biologisch sinnvoll auf die hohen Fettsäurekonzentrationen reagieren und sich vor der Lipotoxizität ausgelöst durch freie Fettsäuren schützen. Neben der Einlagerung überschüssiger Fettsäuren in Form von Triglyzeriden kommt es zu einer Stimulation der  $\beta$ -Oxidation, in der die Fettsäuren zur Energiegewinnung verwendet werden. Gleichzeitig findet eine Suppression des Fettsäureimports statt, um die weitere Fettsäureaufnahme zu drosseln. Ebenso wird die De-Novo-Synthese von Fettsäuren aus Kohlenhydrat-Vorstufen herunterreguliert. Vergleicht man diese Ergebnisse mit denen anderer Ölsäure-Stimulationen von Hepatozyten aus der Fachliteratur ergeben sich einige Parallelen. Rafiei et al. konnten zum Beispiel nachweisen, dass eine Behandlung von HepG2-Zellen mit 1,5 mM Ölsäure für 24h zu einer Stimulation der Fettsäureoxidation durch Induktion von CPT-1 $\alpha$  führt (300). Pan et al. haben gezeigt, dass die Simulation primärer Hepatozyten aus Gänsen mit einem Palmitat-Oleat-Gemisch zu einer Stimulation der Triglyzerid-Synthese (DGAT1, DGAT2) sowie der  $\beta$ -Oxidation (PPAR $\alpha$ , CPT-1 $\alpha$ ) und zu einer Suppression der De-novo-Fettsäuresynthese führt (367). Allerdings finden sich für die Stimulation mit Fettsäuregemischen oder reiner Palmitinsäure auch gegensätzlichen Ergebnisse. So berichten Zhang et al., dass eine Behandlung von HepG2-Zellen mit 250  $\mu\text{M}$  Palmitinsäure zu einer Minderung der  $\beta$ -Oxidation (PPAR $\alpha$ , CPT-1 $\alpha$ ) und zu einer Verschlechterung der Insulinsensitivität führt (369). Lee et al. und Mun et al. zeigen, dass es in HepG2-Zellen bei Stimulation mit 1 mM Fettsäuren (Ölsäure: Palmitinsäure = 2:1) ebenfalls zu einer Hemmung der  $\beta$ -Oxidation (PPAR $\alpha$ , CPT-1 $\alpha$ ) und einer Steigerung der Fettsäuresynthese (FAS) kommt (370, 371).

In Anbetracht dieser Ergebnisse wird deutlich, dass zwar alle Fettsäuren zu einer Steatose führen, die genaue Zusammensetzung der Fettsäuren aber einen entscheidenden Einfluss auf den hepatischen Stoffwechsel hat und dies bei der Wahl der Stimulation im In-vitro-Modell und deren Interpretation beachtet werden muss. Bei der hier gewählten Stimulation mit Ölsäure ergibt sich in weitgehender Übereinstimmung mit der Fachliteratur eine benigne Steatose und eine biologisch

sinnvolle Regulation des hepatozellulären Stoffwechsels mit Verwertung der Fettsäuren als Energielieferanten oder Speicherung in Form von Triglyzeriden.

### **5.3 Interferenz von Fettsäure-induzierter Steatose und Zytokin-induzierter Hepatitis**

Betrachtet man die gegenseitige Beeinflussung von Steatose und Hepatitis, so zeigt sich in den vorgestellten Experimenten, dass die Stimulation der Hepatozyten mit Ölsäure auch zu einer pro-inflammatorischen Antwort des Hepatozyten führt mit Expression von IL-8 und CCL2. Diese können zur Rekrutierung weiterer Immunzellen und Ausbildung einer Entzündungsreaktion in der Leber beitragen. Umgekehrt kann man bei der Zytokinstimulation sowohl in den HepG2-Zellen als auch in den primären Hepatozyten eine Herunterregulation von PGC-1 $\alpha$ , PPAR $\alpha$  sowie CPT-1 $\alpha$  beobachten, was zu einer Verminderung der  $\beta$ -Oxidation und potentiell zu einer Verstärkung der Akkumulation lipotoxischer Fettsäuren führt. Bei der kombinierten Stimulation mit Fettsäure und Zytokin wird dieser Effekt noch deutlicher. Trotz der Zugabe von Fettsäuren bleibt die Hemmung der  $\beta$ -Oxidation durch die IL-1- und IL-36-Isoformen bestehen. Somit hindern die pro-inflammatorischen Zytokine den Hepatozyten daran, seinen Stoffwechsel adäquat an die Nährstofflage anzupassen und fördern somit die Aggravation der Steatose. Diese wechselseitige Beeinflussung kann potentiell zu einem Circulus virtiosus führen, in dem sich Steatose und Inflammation gegenseitig befeuern. Parallel hierzu bildet sich die Insulinresistenz aus, die durch beide Faktoren begünstigt wird.

In der Fachliteratur finden sich bereits einige Beobachtungen, die diese Hypothese sowohl für die Leber als auch andere metabolisch aktive Gewebe bekräftigen. Im weißen Fettgewebe wurde beispielsweise ein Zusammenhang zwischen dem Fettstoffwechsel, der IL-1-Expression und der Insulinresistenz nachgewiesen (375). Die Förderung pro-inflammatorischer Zellantworten durch extra- und intrazelluläre Fettsäuren wird dadurch erklärt, dass die Fettsäuren von Toll-like-Rezeptoren als DAMPs erkannt werden und zur Anschaltung pro-inflammatorischer Signalkaskaden sowie zur Aktivierung des Inflammasoms führen. Gleiches gilt für lipotoxische Metabolite, die bei der Verstoffwechslung der Fettsäuren entstehen und zellulären Stress verursachen. Die Hepatozyten setzen pro-inflammatorische Zytokine frei oder treten in die Lipoapoptose ein (67, 205, 376, 377). Umgekehrt können chronische

Entzündungen zu Veränderungen im Zellstoffwechsel führen, wie man beispielsweise an der Leberzellverfettung im Rahmen chronischer viraler Hepatitiden sehen kann (378, 379). Parallel dazu trägt die Inflammationsreaktion zur Ausbildung einer Insulinresistenz bei (380). Zum Beispiel ist bekannt, dass erhöhte systemische TNF- $\alpha$ -Spiegel in adipösen Patienten mit einer gesteigerten Aktivität von IKK, p38 MAPK, JNK und PKC in der Leber einhergehen, die durch Hemmung der Insulinrezeptorsubstrate zur Insulinresistenz beitragen (381). Für IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  ist nachgewiesen, dass sie durch Bindung an den IL-1-Rezeptor zur Aktivierung der p38-mitogenaktivierten Proteinkinasen (p38 MAPK) sowie der c-Jun-N-terminalen Kinasen (JNK) führen, die die Insulinrezeptorsubstrate blockieren (277, 382). Dies könnte ursprünglich in der Evolution dazu gedient haben, infizierten Körperzellen die Glucosezufuhr zu entziehen. Auch die Steatose kann zur Insulinresistenz beitragen, indem das bei der Lipogenese entstehende Diacylglycerin die Proteinkinase C aktiviert, die ebenfalls die Phosphorylierung von Insulinrezeptorsubstraten inhibiert (166, 383). Letztlich handelt es sich auch um die Interferenz von Signalwegen, wie sie bereits in anderen Zusammenhängen häufiger beschrieben wurde (173).

Ein wichtiger Verknüpfungspunkt zwischen Inflammation und Steatose könnte in diesem Zusammenhang der PPAR $\gamma$ -Koaktivator 1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) sein. Alle Transkriptionsfaktoren der PPAR-Familie benötigen diesen Koaktivator, um eine Transkriptionssteigerung ihrer Zielgene zu bewirken. Ursprünglich wurde PGC-1 $\alpha$  im braunen Fettgewebe von Neugeborenen entdeckt, wo es sehr stark exprimiert wird und zur Thermogenese beiträgt. PGC-1 $\alpha$  wird jedoch auch in anderen Geweben mit hohem Energieverbrauch wie der Skelettmuskulatur und in der Leber exprimiert. Es ist von zentraler Bedeutung für die Mitochondrienbiogenese und den oxidativen Stoffwechsel. Seine genaue biologische Funktion und Regulation jenseits von braunem Fettgewebe und Muskulatur ist bislang nur unvollständig verstanden (384). Seine Expression in der Leber wird durch Glucagon stimuliert und PGC-1 $\alpha$  fördert anschließend durch Transkriptionssteigerung der entsprechenden Enzyme  $\beta$ -Oxidation und Gluconeogenese. So wird die Energieversorgung von Leber und Körper in Hungerzeiten gewährleistet. Bei einer dauerhaften hochkalorischen Diät und hohen Insulinspiegeln wird PGC-1 $\alpha$  jedoch stark reprimiert und die  $\beta$ -Oxidation heruntergefahren. Dies trägt jedoch bei weiterhin hohen Fettsäurekonzentrationen zur Ausbildung einer Steatose bei, da die Hepatozyten die Fettsäuren nicht mehr in der  $\beta$ -Oxidation verwerten können (385). Interessanterweise bilden PGC-1 $\alpha$ -Knock-

out-Mäuse eine Fettleber aus durch verminderte  $\beta$ -Oxidation und erhöhte Fettsäuresynthese (386). In retrospektiven Assoziationsstudien geht eine reduzierte PGC-1 $\alpha$ -Aktivität mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko für Typ-2-Diabetes einher (387). In den im Rahmen der Dissertation durchgeführten Experimenten trugen sowohl IL-1 $\alpha/\beta$  als auch IL-36 $\alpha/\beta/\gamma$  zu einer starken Repression von PGC-1 $\alpha$  bei. In einem anderen Zusammenhang wurde bereits beschrieben, dass NF- $\kappa$ B zu einer Transkriptionshemmung des PGC-1 $\alpha$ -Gens führt (388). Dies stellt einen möglichen Signalweg da, wie eine pro-inflammatorische Stimulation von Hepatozyten mit IL-1-Zytokinen zur Ausbildung einer Steatose beitragen kann. Aufgrund dieser Zusammenhänge könnte sich die Stimulation von PGC-1 $\alpha$  als vielversprechende Therapiestrategie in der Behandlung der MASLD erweisen. So wird die beispielsweise die die Wirksamkeit einzelner Glitazone wie dem Dualen-PPAR $\alpha/\gamma$ -Agonist Saroglitazar (368) teilweise auch auf eine Steigerung der PGC-1 $\alpha$ -Expression zurückgeführt, die zu einer Verbesserung der metabolischen Funktion beiträgt (372, 373). Zusätzliche positive Effekte von PPAR $\alpha$  sind seine anti-inflammatorische, anti-fibrotische und anti-tumoröse Wirkung (143, 385).

### **5.4 Möglicher Einsatz von IL-1RacP-Antikörpern und Ausblick**

Die beiden hier untersuchten Antikörper gegen den IL-1RacP haben sich als wirksam erwiesen in der Unterdrückung der pro-inflammatorischen und metabolischen Antwort des Hepatozyten. Auch die Expression des fibrosefördernden Transkriptionsfaktors TGF- $\beta$  kann teilweise gehemmt werden. Durch den Antikörper wird die Bindung der Zytokine an den Korezeptor blockiert, sodass diese ihren jeweiligen Rezeptor nicht mehr aktivieren können und intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden nicht mehr in Gang gesetzt werden. Insgesamt wird die Wirkung der IL-36-Zytokine stärker unterdrückt als die der IL-1-Zytokine. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die pro-inflammatorische Stimulation durch die IL-36-Zytokine ohnehin schwächer ausgeprägt ist und dadurch leichter antagonisiert werden kann. Ein anderer Erklärungsansatz ist, dass die Zytokine an unterschiedliche Epitope auf der Oberfläche des Korezeptors binden und dadurch unterschiedlich stark vom Antikörper blockiert werden. Gleiches gilt für die Bindungsstelle des jeweiligen Zytokinrezeptors am IL-1RacP-Korezeptor. Die Bindungsverhältnisse innerhalb dieses trimeren Komplexes (Abb. 1c) sind

Gegenstand aktueller Forschung. Für bereits existierende IL-1RacP-Antikörper wie Nadunolimab wurde bereits beschrieben, dass die Wirkung von IL-1 $\beta$  und IL-33 unterschiedlich stark supprimiert wird (88). Der IL-1RacP-Antikörper besitzt gegenüber den bereits existierenden Antikörpern gegen den IL-1-Rezeptor und den IL-36-Rezeptor den entscheidenden Vorteil, dass beide Zytokingruppen gleichzeitig blockiert werden. Auf diese Weise kann die Blockade des einen Rezeptors nicht durch Expressionssteigerung der anderen Zytokingruppe aufgehoben werden.

Im Allgemeinen kann ein solcher Antikörper bei einer Vielzahl von immunvermittelten und inflammatorischen Krankheiten eingesetzt werden, in deren Pathogenese die Zytokine der IL-1-Familie eingreifen. Auch in der Therapie schwerer Verlaufsformen der MASLD könnte ein solcher Antikörper eingesetzt werden, um das Inflammationsgeschehen in der Leber einzudämmen und den Progress hin zu Fibrose und Zirrhose mit irreversibler Organschädigung zu verhindern. Allerdings fehlen aktuell noch allgemein etablierte Screeningverfahren und einfache diagnostische Tests, um eine schwere Verlaufsform von einer benignen Steatose zu unterscheiden. Einem breiten Einsatz des Antikörpers stehen außerdem seine Pharmakokinetik und die zu erwartenden unerwünschten Arzneimittelwirkungen entgegen. Der Antikörper muss wie alle proteinbasierten Therapeutika subkutan appliziert werden, um einer enteralen Verdauung zu entgehen. Die Therapie setzt eine gute Compliance des Patienten voraus, der die Spritzen Therapie selbstständig durchführen muss. Aus der Therapie des Typ-2-Diabetes mit Insulinpräparaten und GLP-1-Analoga sind jedoch erfolgreiche Therapieregime bekannt, ebenso wie aus der immunsuppressiven Therapie mit Anakinra oder Canakinumab. Darüber hinaus ist aufgrund des breiten Expressionsmusters der IL-1-Zytokine und ihrer vielfältigen Funktionen innerhalb des Immunsystems mit einer Reihe an Nebenwirkungen zu rechnen. Mögliche unerwünschte Arzneimittelwirkungen können wie auch bei anderen Immunsuppressiva eine erhöhte Infektanfälligkeit und ein erhöhtes Karzinomrisiko sein. Vor einem möglichen therapeutischen Einsatz muss eine weitere molekularbiologische Charakterisierung der untersuchten Antikörper erfolgen. Darüber hinaus müssen im Mausmodell die Dosierung, die Wirksamkeit in vivo sowie die Nebenwirkungen untersucht werden, bevor eine Testung am Menschen möglich ist. Die publizierten Daten zum therapeutischen Einsatz bereits vorhandener IL-1RacP-Antikörper sind jedoch vielversprechend.

Abschließend müssen auch die in dieser Arbeit verwendeten Zellkulturmodelle diskutiert werden. In-Vitro-Modelle mit hepatischen Zelllinien oder primären Hepatozyten zeichnen sich vor allem durch ihre Einfachheit aus. Einerseits ermöglichen es diese Systeme, die Beteiligung einzelner Zellarten an der Pathogenese der MASLD zu untersuchen. Außerdem können komplexe Signalwege möglichst stark heruntergebrochen werden, um Ursache und Wirkung einzelner Faktoren charakterisieren zu können. Die Zellkultursysteme können flexibel an unterschiedliche Fragestellungen angepasst werden mit vergleichsweise geringem Zeit- und Kostenaufwand. Andererseits sind sie hochgradig artifiziell. Bei den HepG2-Zellen handelt es sich um schnell wachsende Karzinomzellen. Die primären Hepatozyten wurden aus ihrem Zellverband herausgerissen und sind in Kultur nur wenige Tage lebensfähig. Auch kann die Interaktion zwischen unterschiedlichen Zellarten wie Hepatozyten, Kupffer-Zellen, Ito-Zellen und Sinusendothelzellen in solchen Monokulturen nicht berücksichtigt werden. Auch die gegenseitige Beeinflussung verschiedener Gewebe wie Leber, Skelettmuskulatur, weißem Fettgewebe und endokrinem Pankreas können in vitro nicht abgebildet werden. Innerhalb der In-vitro-Modelle existieren einige Strategien, um die In-vivo-Situation besser zu imitieren. So können Hepatozyten mithilfe von Gelmatrices in einer dreidimensionalen Struktur angeordnet werden (389). Auch die Kokultur von Hepatozyten und Kupffer-Zellen ist möglich. (390). Letztlich wird die Herstellung von organoiden Systemen und Gewebeinkubatoren untersucht (391, 392). Darüber hinaus muss die Wahl der Hepatozytenart sowie der Stimulation diskutiert werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten klar daraufhin, dass sich HepG2-Zellen von primären humanen Hepatozyten in der Expression des IL-36-Rezeptors unterscheiden. Da die primären humanen Hepatozyten direkt aus menschlicher Leber isoliert wurden, ist davon auszugehen, dass sie die Situation in vivo besser wiedergeben. In einer Reihe von Studien wurden bereits die Eigenschaften von HepG2-Zellen und primären Hepatozyten verglichen. Die HepG2-Zelllinie ist eine gut etablierte und ausführlich charakterisierte Zelllinie mit einem stabilen Phänotyp. Die primären Hepatozyten werden jeweils aus individuellen Spendern isoliert und können dadurch variieren in ihrem biologischen Verhalten. Auch die Wahl der Fettsäure scheint einen erheblichen Einfluss haben, da sich bei Stimulation mit Palmitinsäure und Ölsäure unterschiedliche, teils entgegengesetzte Wirkungen ergeben. Es finden sich in der Fachliteratur auch Modelle, die zur Induktion der Fettleber Glucose

einsetzen, allein oder in Kombination mit Fettsäuren (393, 394). Dies erscheint sinnvoll, da auch in MASLD-Patienten häufig hohe Blutglucosespiegel vorliegen und ein Teil der Fettsäuren in den Hepatozyten durch De-novo-Lipogenese aus Kohlenhydrat-Vorstufen generiert wird. Unter Umständen kann auch die Kombination mit einem pro-inflammatorischen Stimulus sinnvoll sein. Dementsprechend müssen weitere Experimente durchgeführt werden, um die Situation in vivo möglichst gut zu modellieren.

Darüber hinaus muss geprüft werden, inwiefern sich die in der Zellkultur gewonnenen Erkenntnisse auch im Mausmodell bestätigen lassen und sich schließlich auf die Situation im Menschen übertragen lassen. Auch gilt es, zukünftig die Interferenz von pro-inflammatorischen und metabolischen Signalwegen weiter zu untersuchen, um die wechselseitige Beeinflussung von Steatose und chronischer Inflammation besser zu verstehen. Denn diese Wechselwirkungen sind auch von zentraler Bedeutung bei den anderen Komponenten des metabolischen Syndroms und eine Durchbrechung dieser pathogenetischen Sequenz stellt ein vielversprechendes Therapieziel dar. Der IL-1-RacP-Antikörper konnte im Zellkulturmodell die pro-inflammatorische Zellantwort effektiv unterdrücken, sodass seine Anwendbarkeit in der Therapie der MASLD weiter untersucht werden sollte.

# 6. Zusammenfassung

Die Metabolische Dysfunktion-assoziierte steatotische Lebererkrankung (metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease, MASLD) stellt weltweit die häufigste chronische Lebererkrankung dar mit einer gegenwärtigen Prävalenz von etwa 30% in der erwachsenen Bevölkerung (22, 23). Sie wird charakterisiert durch eine Leberzellverfettung, welche zu einer Steatohepatitis fortschreiten und schließlich in eine Leberzirrhose münden kann (18, 19). Ihr Auftreten ist eng vergesellschaftet mit den Komponenten des metabolischen Syndroms wie der Fettleibigkeit oder dem Diabetes mellitus Typ II (9, 192). Zur Erklärung der Pathogenese wird eine Multiple-Hit-Hypothese herangezogen, die ein Zusammenwirken genetischer und erworbener Risikofaktoren beschreibt (36, 38). Dabei tritt die wechselseitige Beeinflussung von metabolischer Dysfunktion und chronischer Inflammation zunehmend in den Fokus (170, 395). Nichtsdestotrotz bleibt die Entstehung der MASLD nur unvollständig verstanden und dringend benötigte Therapeutika fehlen (246).

Die Zytokine der IL-1-Superfamilie stellen wichtige Signalmoleküle innerhalb unseres Immunsystems dar und finden sich in vielen Geweben des Körpers wieder (42, 43, 65). Allerdings sind sie ebenfalls an der Entstehung von Autoimmunerkrankungen und chronischen Entzündungen beteiligt (71, 122, 356). Die Zytokine werden klassischerweise von Zellen des angeborenen Immunsystems sekretiert und entfalten ihre Wirkung durch Bindung an spezifische Oberflächenrezeptoren (62, 78). Den in dieser Arbeit untersuchten Zytokinen IL-1 $\alpha/\beta$ , IL-33 und IL-36 $\alpha/\beta/\gamma$  ist gemein, dass sie zusätzlich den Korezeptor IL-1RacP benötigen (64). Inwiefern die IL-1-Zytokine an der Pathogenese der MASLD beteiligt sind, wurde bislang nur unzureichend untersucht (259, 356).

In dieser Promotionsarbeit wurde auf Grundlage existierender Protokolle ein zelluläres Model der MASLD etabliert, indem HepG2-Zellen und primäre humane Hepatozyten mit BSA-Oleat behandelt wurden, wodurch eine intrazelluläre Lipidakkumulation herbeigeführt werden konnte (298, 300). Mit diesem Modell wurden unterschiedliche Stimulationsexperimente mit den IL-1-Zytokinen sowie rekombinanten Anti-IL-1RacP-Antikörpern durchgeführt. Zur Analyse der Zellantwort wurden die Beeinflussung der RNA-Expression mittels qRT-PCR sowie der Proteinsynthese mittels Western Blot und ELISA untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass humane Hepatozyten sowohl den IL-1-Rezeptor 1

als auch den IL-36-Rezeptor sowie den gemeinsamen Korezeptor IL-1RacP auf ihrer Zelloberfläche exprimieren. Bei Stimulation mit IL-1 $\alpha/\beta$  und IL-36 $\alpha/\beta/\gamma$ , nicht jedoch IL-33, reagieren sie mit Ausbildung einer pro-inflammatorischen Antwort, welche über Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B zur Synthese von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-8, TNF- $\alpha$  und CCL2 führt. Dies lässt darauf schließen, dass nicht nur leberresidente Immunzellen wie z.B. Kupffer-Zellen an der Entstehung der Steatohepatitis beteiligt sind, sondern auch die Hepatozyten selbst. Darüber hinaus konnte die wechselseitige Beeinflussung von metabolischer und inflammatorischer Zellantwort genauer charakterisiert werden. Einerseits konnte gezeigt werden, dass die Behandlung der Hepatozyten mit Fettsäure zu einem Anstieg der IL-8- bzw. CCL2-Expression führte. Eine mögliche Erklärung könnte darin bestehen, dass die Fettsäurebehandlung zu zellulärem Stress und der Bildung lipotoxischer Metabolite führt, welche als DAMPs zu einer Aktivierung des Inflammasoms beitragen. Umgekehrt führte allerdings auch eine Stimulation mit IL-1 $\beta$  zu einer leichten Verschlechterung des oxidativen Fettstoffwechsels mit Herunterregulation von PPAR $\alpha$ , PGC-1 $\alpha$  und dem Schlüsselenzym der  $\beta$ -Oxidation CPT-1 $\alpha$ . Diese Interferenz könnte die Grundlage für einen Circulus virtiosus sein, in dem sich Lipidakkumulation und Inflammation gegenseitig befeuern. Schließlich konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die beiden verwendeten Anti-IL-1RacP-Antikörper in der Lage sind, die Wirkung von IL-1 $\alpha/\beta$  und IL-36 $\alpha/\beta/\gamma$  auf die primären humanen Hepatozyten effektiv zu hemmen, was sich in einer signifikanten Reduktion der Expression pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-8 oder CCL2 widerspiegelt. Daraus lässt sich schließen, dass ein Anti-IL-1RacP-Antikörper prinzipiell zur anti-inflammatorischen Therapie bei schweren Formen der MASH geeignet sein könnte. Allerdings muss beachtet werden, dass die vorgestellten Zellkulturexperimente grundsätzlich nicht die Interaktion unterschiedlicher Zelltypen in der Leber sowie die komplexen Wechselwirkungen zwischen Leber, Fettgewebe und Muskulatur im lebenden Organismus wiedergeben kann. In zukünftigen Forschungsansätzen gilt es daher zu überprüfen, inwiefern die hier gewonnenen Erkenntnisse sich im Tiermodell bestätigen lassen und ob sich hieraus ein therapeutischer Nutzen für den Mensch ergibt.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Global burden of 87 risk factors in 204 countries and territories, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet*. 2020;396(10258):1223-49.
2. Valenzuela PL, Carrera-Bastos P, Castillo-García A, Lieberman DE, Santos-Lozano A, Lucia A. Obesity and the risk of cardiometabolic diseases. *Nat Rev Cardiol*. 2023;20(7):475-94.
3. Organization WH. World health statistics 2023: monitoring health for the SDGs, Sustainable Development Goals: World Health Organization; 2023.
4. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Organ Tech Rep Ser*. 2000;894:i-xii, 1-253.
5. Ruze R, Liu T, Zou X, Song J, Chen Y, Xu R, et al. Obesity and type 2 diabetes mellitus: connections in epidemiology, pathogenesis, and treatments. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2023;14:1161521.
6. Lister NB, Baur LA, Felix JF, Hill AJ, Marcus C, Reinehr T, et al. Child and adolescent obesity. *Nat Rev Dis Primers*. 2023;9(1):24.
7. Piché ME, Tchernof A, Després JP. Obesity Phenotypes, Diabetes, and Cardiovascular Diseases. *Circ Res*. 2020;126(11):1477-500.
8. Apovian CM. Obesity: definition, comorbidities, causes, and burden. *Am J Manag Care*. 2016;22(7 Suppl):s176-85.
9. Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, et al. 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;120(16):1640-5.
10. Huang PL. A comprehensive definition for metabolic syndrome. *Dis Model Mech*. 2009;2(5-6):231-7.
11. Goldsborough E, 3rd, Osuji N, Blaha MJ. Assessment of Cardiovascular Disease Risk: A 2022 Update. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2022;51(3):483-509.
12. North BJ, Sinclair DA. The intersection between aging and cardiovascular disease. *Circ Res*. 2012;110(8):1097-108.
13. Tang D, Tang Q, Huang W, Zhang Y, Tian Y, Fu X. Fasting: From Physiology to Pathology. *Adv Sci (Weinh)*. 2023;10(9):e2204487.
14. Mathur P, Pillai R. Overnutrition: Current scenario & combat strategies. *Indian J Med Res*. 2019;149(6):695-705.
15. Haslam DW, James WP. Obesity. *Lancet*. 2005;366(9492):1197-209.
16. Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc*. 1980;55(7):434-8.
17. Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, Cerrelli F, Lenzi M, Manini R, et al. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology*. 2003;37(4):917-23.
18. Rinella ME, Neuschwander-Tetri BA, Siddiqui MS, Abdelmalek MF, Caldwell S, Barb D, et al. AASLD practice guidance on the clinical assessment and management of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2023;10.1097/HEP.000000000000323.
19. Satapathy SK, Sanyal AJ. Epidemiology and Natural History of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Semin Liver Dis*. 2015;35(3):221-35.
20. Torres DM, Williams CD, Harrison SA. Features, diagnosis, and treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2012;10(8):837-58.
21. Banini BA, Sanyal AJ. NAFLD-related HCC. *Adv Cancer Res*. 2021;149:143-69.
22. Wong VW, Ekstedt M, Wong GL, Hagström H. Changing epidemiology, global trends and implications for outcomes of NAFLD. *J Hepatol*. 2023;79(3):842-52.
23. Younossi ZM, Golabi P, Paik JM, Henry A, Van Dongen C, Henry L. The global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and nonalcoholic steatohepatitis (NASH): a systematic review. *Hepatology*. 2023;77(4):1335-47.

## 7. Literaturverzeichnis

---

24. Estes C, Razavi H, Loomba R, Younossi Z, Sanyal AJ. Modeling the epidemic of nonalcoholic fatty liver disease demonstrates an exponential increase in burden of disease. *Hepatology*. 2018;67(1):123-33.
25. Paik JM, Golabi P, Younossi Y, Saleh N, Nhyira A, Younossi ZM. The Growing Burden of Disability Related to Chronic Liver Disease in the United States: Data From the Global Burden of Disease Study 2007-2017. *Hepatology Commun*. 2021;5(5):749-59.
26. Schattenberg JM, Lazarus JV, Newsome PN, Serfaty L, Aghemo A, Augustin S, et al. Disease burden and economic impact of diagnosed non-alcoholic steatohepatitis in five European countries in 2018: A cost-of-illness analysis. *Liver Int*. 2021;41(6):1227-42.
27. Younossi ZM, Blissett D, Blissett R, Henry L, Stepanova M, Younossi Y, et al. The economic and clinical burden of nonalcoholic fatty liver disease in the United States and Europe. *Hepatology*. 2016;64(5):1577-86.
28. Pais R, Barritt AS, Calmus Y, Scatton O, Runge T, Lebray P, et al. NAFLD and liver transplantation: Current burden and expected challenges. *J Hepatol*. 2016;65(6):1245-57.
29. Nouredin M, Vipani A, Bresee C, Todo T, Kim IK, Alkhoury N, et al. NASH Leading Cause of Liver Transplant in Women: Updated Analysis of Indications For Liver Transplant and Ethnic and Gender Variances. *Am J Gastroenterol*. 2018;113(11):1649-59.
30. Younossi ZM, Stepanova M, Ong J, Trimble G, AlQahtani S, Younossi I, et al. Nonalcoholic Steatohepatitis Is the Most Rapidly Increasing Indication for Liver Transplantation in the United States. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2021;19(3):580-9.e5.
31. Younossi Z, Anstee QM, Marietti M, Hardy T, Henry L, Eslam M, et al. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2018;15(1):11-20.
32. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*. 2016;64(1):73-84.
33. Anstee QM, Targher G, Day CP. Progression of NAFLD to diabetes mellitus, cardiovascular disease or cirrhosis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013;10(6):330-44.
34. Cotter TG, Rinella M. Nonalcoholic Fatty Liver Disease 2020: The State of the Disease. *Gastroenterology*. 2020;158(7):1851-64.
35. Zivilisationskrankheit Fettleber – gemeinsam Prävention, Vorsorge und Früherkennung stärken! *Z Gastroenterol*. 2021;59(09):997-9.
36. Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism*. 2016;65(8):1038-48.
37. Tack CJ, Stienstra R, Joosten LA, Netea MG. Inflammation links excess fat to insulin resistance: the role of the interleukin-1 family. *Immunol Rev*. 2012;249(1):239-52.
38. Cusi K. Role of obesity and lipotoxicity in the development of nonalcoholic steatohepatitis: pathophysiology and clinical implications. *Gastroenterology*. 2012;142(4):711-25.e6.
39. Szekanecz Z, McInnes IB, Schett G, Szamosi S, Benkő S, Szűcs G. Autoinflammation and autoimmunity across rheumatic and musculoskeletal diseases. *Nat Rev Rheumatol*. 2021;17(10):585-95.
40. Ray D, Yung R. Immune senescence, epigenetics and autoimmunity. *Clin Immunol*. 2018;196:59-63.
41. Dinarello CA, Renfer L, Wolff SM. Human leukocytic pyrogen: purification and development of a radioimmunoassay. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977;74(10):4624-7.
42. Mantovani A, Dinarello CA, Molgora M, Garlanda C. Interleukin-1 and Related Cytokines in the Regulation of Inflammation and Immunity. *Immunity*. 2019;50(4):778-95.
43. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:519-50.
44. Dinarello CA. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood*. 2011;117(14):3720-32.

## 7. Literaturverzeichnis

---

45. Negrin KA, Roth Flach RJ, DiStefano MT, Matevossian A, Friedline RH, Jung D, et al. IL-1 signaling in obesity-induced hepatic lipogenesis and steatosis. *PLoS One*. 2014;9(9):e107265.
46. Kamari Y, Shaish A, Vax E, Shemesh S, Kandel-Kfir M, Arbel Y, et al. Lack of interleukin-1 $\alpha$  or interleukin-1 $\beta$  inhibits transformation of steatosis to steatohepatitis and liver fibrosis in hypercholesterolemic mice. *Journal of hepatology*. 2011;55(5):1086-94.
47. Dixon LJ, Flask CA, Papouchado BG, Feldstein AE, Nagy LE. Caspase-1 as a central regulator of high fat diet-induced non-alcoholic steatohepatitis. *PLoS One*. 2013;8(2):e56100.
48. Mehal WZ. The inflammasome in liver injury and non-alcoholic fatty liver disease. *Dig Dis*. 2014;32(5):507-15.
49. Csak T, Ganz M, Pespisa J, Kodys K, Dolganiuc A, Szabo G. Fatty acid and endotoxin activate inflammasomes in mouse hepatocytes that release danger signals to stimulate immune cells. *Hepatology*. 2011;54(1):133-44.
50. Vandanmagsar B, Youm YH, Ravussin A, Galgani JE, Stadler K, Mynatt RL, et al. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat Med*. 2011;17(2):179-88.
51. Mertens M, Singh JA. Anakinra for rheumatoid arthritis: a systematic review. *J Rheumatol*. 2009;36(6):1118-25.
52. Alten R, Gomez-Reino J, Durez P, Beaulieu A, Sebba A, Krammer G, et al. Efficacy and safety of the human anti-IL-1 $\beta$  monoclonal antibody canakinumab in rheumatoid arthritis: results of a 12-week, Phase II, dose-finding study. *BMC Musculoskelet Disord*. 2011;12:153.
53. Højen JF, Kristensen MLV, McKee AS, Wade MT, Azam T, Lunding LP, et al. IL-1R3 blockade broadly attenuates the functions of six members of the IL-1 family, revealing their contribution to models of disease. *Nat Immunol*. 2019;20(9):1138-49.
54. Rydberg Millrud C, Deronic A, Grönberg C, Jaensson Gyllenbäck E, von Wachenfeldt K, Forsberg G, et al. Blockade of IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  signaling by the anti-IL1RAP antibody nadunolimab (CAN04) mediates synergistic anti-tumor efficacy with chemotherapy. *Cancer Immunol Immunother*. 2023;72(3):667-78.
55. Järås M, Johnels P, Hansen N, Agerstam H, Tsapogas P, Rissler M, et al. Isolation and killing of candidate chronic myeloid leukemia stem cells by antibody targeting of IL-1 receptor accessory protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(37):16280-5.
56. Kenneth Murphy CW. *Janeway Immunologie*. 9 ed. Heidelberg: Springer Spektrum Berlin; 2018.
57. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S, Baker DL. *Cellular and Molecular Immunology*: Elsevier; 2021.
58. Bröker B, Schütt C, Fleischer B. *Grundwissen Immunologie*: Springer Berlin Heidelberg; 2019.
59. Kaufmann SHE. *Basiswissen Immunologie*: Springer Berlin Heidelberg; 2013.
60. Vollmar A, Zündorf I, Dingermann T. *Immunologie: Grundlagen und Wirkstoffe*: Wiss. Verlag-Ges.; 2013.
61. Afonina IS, Müller C, Martin SJ, Beyaert R. Proteolytic Processing of Interleukin-1 Family Cytokines: Variations on a Common Theme. *Immunity*. 2015;42(6):991-1004.
62. Fields JK, Günther S, Sundberg EJ. Structural Basis of IL-1 Family Cytokine Signaling. *Front Immunol*. 2019;10:1412.
63. Gay NJ, Keith FJ. Drosophila Toll and IL-1 receptor. *Nature*. 1991;351(6325):355-6.
64. Wang D, Zhang S, Li L, Liu X, Mei K, Wang X. Structural insights into the assembly and activation of IL-1 $\beta$  with its receptors. *Nat Immunol*. 2010;11(10):905-11.
65. Dinarello CA. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunol Rev*. 2018;281(1):8-27.
66. Weber A, Wasiliew P, Kracht M. Interleukin-1 (IL-1) pathway. *Sci Signal*. 2010;3(105):cm1.
67. Tilg H, Moschen AR, Szabo G. Interleukin-1 and inflammasomes in alcoholic liver disease/acute alcoholic hepatitis and nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2016;64(3):955-65.
68. Thomas C, Bazan JF, Garcia KC. Structure of the activating IL-1 receptor signaling complex. *Nat Struct Mol Biol*. 2012;19(4):455-7.

## 7. Literaturverzeichnis

---

69. Colotta F, Re F, Muzio M, Bertini R, Polentarutti N, Sironi M, et al. Interleukin-1 type II receptor: a decoy target for IL-1 that is regulated by IL-4. *Science*. 1993;261(5120):472-5.
70. Zheng Y, Humphry M, Maguire JJ, Bennett MR, Clarke MC. Intracellular interleukin-1 receptor 2 binding prevents cleavage and activity of interleukin-1 $\alpha$ , controlling necrosis-induced sterile inflammation. *Immunity*. 2013;38(2):285-95.
71. Sims JE, Smith DE. The IL-1 family: regulators of immunity. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(2):89-102.
72. Werman A, Werman-Venkert R, White R, Lee JK, Werman B, Krelin Y, et al. The precursor form of IL-1 $\alpha$  is an intracrine proinflammatory activator of transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(8):2434-9.
73. Kim B, Lee Y, Kim E, Kwak A, Ryoo S, Bae SH, et al. The Interleukin-1 $\alpha$  Precursor is Biologically Active and is Likely a Key Alarmin in the IL-1 Family of Cytokines. *Front Immunol*. 2013;4:391.
74. Kaplanski G, Farnarier C, Kaplanski S, Porat R, Shapiro L, Bongrand P, et al. Interleukin-1 induces interleukin-8 secretion from endothelial cells by a juxtacrine mechanism. *Blood*. 1994;84(12):4242-8.
75. Di Paolo NC, Shafiani S, Day T, Papayannopoulou T, Russell DW, Iwakura Y, et al. Interdependence between Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor Regulates TNF-Dependent Control of Mycobacterium tuberculosis Infection. *Immunity*. 2015;43(6):1125-36.
76. Orzalli MH, Smith A, Jurado KA, Iwasaki A, Garlick JA, Kagan JC. An Antiviral Branch of the IL-1 Signaling Pathway Restricts Immune-Evasive Virus Replication. *Mol Cell*. 2018;71(5):825-40.e6.
77. Cavalli G, Colafrancesco S, Emmi G, Imazio M, Lopalco G, Maggio MC, et al. Interleukin 1 $\alpha$ : a comprehensive review on the role of IL-1 $\alpha$  in the pathogenesis and treatment of autoimmune and inflammatory diseases. *Autoimmun Rev*. 2021;20(3):102763.
78. Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A. The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity*. 2013;39(6):1003-18.
79. Rider P, Carmi Y, Guttman O, Braiman A, Cohen I, Voronov E, et al. IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  recruit different myeloid cells and promote different stages of sterile inflammation. *J Immunol*. 2011;187(9):4835-43.
80. Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*. 1996;87(6):2095-147.
81. Dinarello CA, van der Meer JW. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in humans. *Semin Immunol*. 2013;25(6):469-84.
82. Chae JJ, Aksentijevich I, Kastner DL. Advances in the understanding of familial Mediterranean fever and possibilities for targeted therapy. *Br J Haematol*. 2009;146(5):467-78.
83. Agostini L, Martinon F, Burns K, McDermott MF, Hawkins PN, Tschopp J. NALP3 forms an IL-1 $\beta$ -processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity*. 2004;20(3):319-25.
84. Aksentijevich I, Masters SL, Ferguson PJ, Dancey P, Frenkel J, van Royen-Kerkhoff A, et al. An autoinflammatory disease with deficiency of the interleukin-1-receptor antagonist. *N Engl J Med*. 2009;360(23):2426-37.
85. Carmi Y, Dotan S, Rider P, Kaplanov I, White MR, Baron R, et al. The role of IL-1 $\beta$  in the early tumor cell-induced angiogenic response. *J Immunol*. 2013;190(7):3500-9.
86. Cavelti-Weder C, Babians-Brunner A, Keller C, Stahel MA, Kurz-Levin M, Zayed H, et al. Effects of gevokizumab on glycemia and inflammatory markers in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2012;35(8):1654-62.
87. Church LD, Savic S, McDermott MF. Long term management of patients with cryopyrin-associated periodic syndromes (CAPS): focus on riloncept (IL-1 Trap). *Biologics*. 2008;2(4):733-42.
88. Fields JK, Kihn K, Birkedal GS, Klontz EH, Sjöström K, Günther S, et al. Molecular Basis of Selective Cytokine Signaling Inhibition by Antibodies Targeting a Shared Receptor. *Front Immunol*. 2021;12:779100.
89. Askmyr M, Ågerstam H, Hansen N, Gordon S, Arvanitakis A, Rissler M, et al. Selective killing of candidate AML stem cells by antibody targeting of IL1RAP. *Blood*. 2013;121(18):3709-13.

## 7. Literaturverzeichnis

---

90. Warda W, Larosa F, Neto Da Rocha M, Trad R, Deconinck E, Fajloun Z, et al. CML Hematopoietic Stem Cells Expressing IL1RAP Can Be Targeted by Chimeric Antigen Receptor-Engineered T Cells. *Cancer Res.* 2019;79(3):663-75.
91. Mulholland M, Depuydt MAC, Jakobsson G, Ljungcrantz I, Grentzmann A, To F, et al. Interleukin-1 receptor accessory protein blockade limits the development of atherosclerosis and reduces plaque inflammation. *Cardiovasc Res.* 2024;120(6):581-95.
92. Grönberg C, Rattik S, Tran-Manh C, Zhou X, Rius Rigau A, Li YN, et al. Combined inhibition of IL-1, IL-33 and IL-36 signalling by targeting IL1RAP ameliorates skin and lung fibrosis in preclinical models of systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* 2024.
93. Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity.* 2005;23(5):479-90.
94. Cayrol C, Girard JP. Interleukin-33 (IL-33): A nuclear cytokine from the IL-1 family. *Immunol Rev.* 2018;281(1):154-68.
95. Cayrol C, Girard JP. IL-33: an alarmin cytokine with crucial roles in innate immunity, inflammation and allergy. *Curr Opin Immunol.* 2014;31:31-7.
96. Moussion C, Ortega N, Girard JP. The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: a novel 'alarmin'? *PLoS One.* 2008;3(10):e3331.
97. Pichery M, Mirey E, Mercier P, Lefrançais E, Dujardin A, Ortega N, et al. Endogenous IL-33 is highly expressed in mouse epithelial barrier tissues, lymphoid organs, brain, embryos, and inflamed tissues: in situ analysis using a novel IL-33-LacZ gene trap reporter strain. *J Immunol.* 2012;188(7):3488-95.
98. Liew FY, Girard JP, Turnquist HR. Interleukin-33 in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2016;16(11):676-89.
99. Mjösberg JM, Trifari S, Crellin NK, Peters CP, van Drunen CM, Piet B, et al. Human IL-25- and IL-33-responsive type 2 innate lymphoid cells are defined by expression of CCR4 and CD161. *Nat Immunol.* 2011;12(11):1055-62.
100. Carriere V, Roussel L, Ortega N, Lacorre DA, Americh L, Aguilar L, et al. IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(1):282-7.
101. Bessa J, Meyer CA, de Vera Mudry MC, Schlicht S, Smith SH, Iglesias A, et al. Altered subcellular localization of IL-33 leads to non-resolving lethal inflammation. *J Autoimmun.* 2014;55:33-41.
102. Lefrançais E, Roga S, Gautier V, Gonzalez-de-Peredo A, Monsarrat B, Girard JP, et al. IL-33 is processed into mature bioactive forms by neutrophil elastase and cathepsin G. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(5):1673-8.
103. Cayrol C, Girard JP. The IL-1-like cytokine IL-33 is inactivated after maturation by caspase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(22):9021-6.
104. Yasuda K, Muto T, Kawagoe T, Matsumoto M, Sasaki Y, Matsushita K, et al. Contribution of IL-33-activated type II innate lymphoid cells to pulmonary eosinophilia in intestinal nematode-infected mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(9):3451-6.
105. Monticelli LA, Sonnenberg GF, Abt MC, Alenghat T, Ziegler CGK, Doering TA, et al. Innate lymphoid cells promote lung-tissue homeostasis after infection with influenza virus. *Nature Immunology.* 2011;12(11):1045-54.
106. Drake LY, Kita H. IL-33: biological properties, functions, and roles in airway disease. *Immunol Rev.* 2017;278(1):173-84.
107. Salimi M, Barlow JL, Saunders SP, Xue L, Gutowska-Owsiak D, Wang X, et al. A role for IL-25 and IL-33-driven type-2 innate lymphoid cells in atopic dermatitis. *J Exp Med.* 2013;210(13):2939-50.
108. Sedhom MA, Pichery M, Murdoch JR, Foligné B, Ortega N, Normand S, et al. Neutralisation of the interleukin-33/ST2 pathway ameliorates experimental colitis through enhancement of mucosal healing in mice. *Gut.* 2013;62(12):1714-23.

## 7. Literaturverzeichnis

---

109. Arshad MI, Piquet-Pellorce C, L'Helgoualc'h A, Rauch M, Patrat-Delon S, Ezan F, et al. TRAIL but not FasL and TNF $\alpha$ , regulates IL-33 expression in murine hepatocytes during acute hepatitis. *Hepatology*. 2012;56(6):2353-62.
110. Biton J, Khaleghparast Athari S, Thiolat A, Santinon F, Lemeiter D, Hervé R, et al. In Vivo Expansion of Activated Foxp3+ Regulatory T Cells and Establishment of a Type 2 Immune Response upon IL-33 Treatment Protect against Experimental Arthritis. *J Immunol*. 2016;197(5):1708-19.
111. Yuan ZC, Xu WD, Liu XY, Liu XY, Huang AF, Su LC. Biology of IL-36 Signaling and Its Role in Systemic Inflammatory Diseases. *Front Immunol*. 2019;10:2532.
112. Yi G, Ybe JA, Saha SS, Caviness G, Raymond E, Ganesan R, et al. Structural and Functional Attributes of the Interleukin-36 Receptor. *J Biol Chem*. 2016;291(32):16597-609.
113. Henry CM, Sullivan GP, Clancy DM, Afonina IS, Kulms D, Martin SJ. Neutrophil-Derived Proteases Escalate Inflammation through Activation of IL-36 Family Cytokines. *Cell Rep*. 2016;14(4):708-22.
114. van de Veerdonk FL, Netea MG. New Insights in the Immunobiology of IL-1 Family Members. *Front Immunol*. 2013;4:167.
115. Zhou L, Todorovic V. Interleukin-36: Structure, Signaling and Function. *Adv Exp Med Biol*. 2021;21:191-210.
116. Buhl AL, Wenzel J. Interleukin-36 in Infectious and Inflammatory Skin Diseases. *Front Immunol*. 2019;10:1162.
117. Towne JE, Sims JE. IL-36 in psoriasis. *Curr Opin Pharmacol*. 2012;12(4):486-90.
118. Boutet MA, Bart G, Penhoat M, Amiaud J, Brulin B, Charrier C, et al. Distinct expression of interleukin (IL)-36 $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ , their antagonist IL-36Ra and IL-38 in psoriasis, rheumatoid arthritis and Crohn's disease. *Clin Exp Immunol*. 2016;184(2):159-73.
119. Elias M, Zhao S, Le HT, Wang J, Neurath MF, Neufert C, et al. IL-36 in chronic inflammation and fibrosis - bridging the gap? *J Clin Invest*. 2021;131(2).
120. Todorović V, Su Z, Putman CB, Kakavas SJ, Salte KM, McDonald HA, et al. Small Molecule IL-36 $\gamma$  Antagonist as a Novel Therapeutic Approach for Plaque Psoriasis. *Sci Rep*. 2019;9(1):9089.
121. Bachelez H, Choon SE, Marrakchi S, Burden AD, Tsai TF, Morita A, et al. Inhibition of the Interleukin-36 Pathway for the Treatment of Generalized Pustular Psoriasis. *N Engl J Med*. 2019;380(10):981-3.
122. Borthwick LA. The IL-1 cytokine family and its role in inflammation and fibrosis in the lung. *Semin Immunopathol*. 2016;38(4):517-34.
123. Scheibe K, Kersten C, Schmied A, Vieth M, Primbs T, Carlé B, et al. Inhibiting Interleukin 36 Receptor Signaling Reduces Fibrosis in Mice With Chronic Intestinal Inflammation. *Gastroenterology*. 2019;156(4):1082-97.e11.
124. Melton E, Qiu H. Interleukin-36 Cytokine/Receptor Signaling: A New Target for Tissue Fibrosis. *Int J Mol Sci*. 2020;21(18).
125. Löffler G. *Basiswissen Biochemie: mit Pathobiochemie*: Springer Berlin Heidelberg; 2008.
126. Lüllmann-Rauch R, Paulsen F. *Taschenlehrbuch Histologie*: Thieme; 2012.
127. Welsch U, Sobotta J. *Lehrbuch Histologie: Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie ; mit 21 Tabellen ; [online Zugang + interaktive Extras]*: Elsevier, Urban & Fischer; 2006.
128. Kühnel W. *Taschenatlas Histologie*: Thieme; 2014.
129. Aumüller G, Aust G, Conrad A, Engele J, Kirsch J, Maio G. *Duale Reihe Anatomie*: Thieme; 2020.
130. Pape HC, Kurtz A. *Physiologie*: Thieme; 2019.
131. Behrends JC, KG GTV. *Duale Reihe Physiologie*: Thieme; 2021.
132. Silverthorn DU, Weber WM. *Physiologie*: Pearson Deutschland; 2009.
133. Herold G. *Innere Medizin*. Köln: Dr. Gerd Herold; 2022.
134. Müller-Esterl W. *Biochemie: Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler - Unter Mitarbeit von Ulrich Brandt, Oliver Anderka, Stefan Kerscher, Stefan Kieß und Katrin Ridinger*: Springer Berlin Heidelberg; 2017.
135. Rassow J, Netzker R, Hauser K. *Duale Reihe Biochemie*: Thieme; 2022.

## 7. Literaturverzeichnis

---

136. Jahn M, Jahn D, Moran LA, Horton HR, Scrimgeour KG, Perry MD, et al. *Horton Biochemie kompakt*: Pearson; 2020.
137. Christen P, Jaussi R, Benoit R. *Biochemie und Molekularbiologie: Eine Einführung in 40 Lerneinheiten*: Springer Berlin Heidelberg; 2015.
138. Smathers RL, Petersen DR. The human fatty acid-binding protein family: evolutionary divergences and functions. *Hum Genomics*. 2011;5(3):170-91.
139. Berg JM, Tymoczko JL, Gatto GJ, Stryer L, Held A, Maxam G, et al. *Stryer Biochemie*: Springer Berlin Heidelberg; 2017.
140. Eberlé D, Hegarty B, Bossard P, Ferré P, Foufelle F. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie*. 2004;86(11):839-48.
141. Ferré P, Phan F, Foufelle F. SREBP-1c and lipogenesis in the liver: an update1. *Biochem J*. 2021;478(20):3723-39.
142. Ferré P, Foufelle F. SREBP-1c transcription factor and lipid homeostasis: clinical perspective. *Horm Res*. 2007;68(2):72-82.
143. Francque S, Szabo G, Abdelmalek MF, Byrne CD, Cusi K, Dufour JF, et al. Nonalcoholic steatohepatitis: the role of peroxisome proliferator-activated receptors. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2021;18(1):24-39.
144. Wang Y, Nakajima T, Gonzalez FJ, Tanaka N. PPARs as Metabolic Regulators in the Liver: Lessons from Liver-Specific PPAR-Null Mice. *Int J Mol Sci*. 2020;21(6).
145. Weiss M, Steiner DF, Philipson LH. Insulin Biosynthesis, Secretion, Structure, and Structure-Activity Relationships. In: Feingold KR, Anawalt B, Blackman MR, Boyce A, Chrousos G, Corpas E, et al., editors. *Endotext*. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc. Copyright © 2000-2023, MDText.com, Inc.; 2000.
146. Leto D, Saltiel AR. Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;13(6):383-96.
147. Petersen MC, Shulman GI. Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. *Physiol Rev*. 2018;98(4):2133-223.
148. Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*. 1995;378(6559):785-9.
149. Newgard CB, Brady MJ, O'Doherty RM, Saltiel AR. Organizing glucose disposal: emerging roles of the glycogen targeting subunits of protein phosphatase-1. *Diabetes*. 2000;49(12):1967-77.
150. Dong XC, Copps KD, Guo S, Li Y, Kollipara R, DePinho RA, et al. Inactivation of hepatic Foxo1 by insulin signaling is required for adaptive nutrient homeostasis and endocrine growth regulation. *Cell Metab*. 2008;8(1):65-76.
151. Ros S, García-Rocha M, Domínguez J, Ferrer JC, Guinovart JJ. Control of liver glycogen synthase activity and intracellular distribution by phosphorylation. *J Biol Chem*. 2009;284(10):6370-8.
152. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest*. 2002;109(9):1125-31.
153. Krycer JR, Sharpe LJ, Luu W, Brown AJ. The Akt-SREBP nexus: cell signaling meets lipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab*. 2010;21(5):268-76.
154. Kersten S. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO Rep*. 2001;2(4):282-6.
155. Rieusset J, Andreelli F, Auboeuf D, Roques M, Vallier P, Riou JP, et al. Insulin acutely regulates the expression of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in human adipocytes. *Diabetes*. 1999;48(4):699-705.
156. Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*. 2001;414(6865):782-7.
157. Park SY, Gautier JF, Chon S. Assessment of Insulin Secretion and Insulin Resistance in Human. *Diabetes Metab J*. 2021;45(5):641-54.
158. Kahn SE. The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2003;46(1):3-19.

## 7. Literaturverzeichnis

---

159. Lee SH, Park SY, Choi CS. Insulin Resistance: From Mechanisms to Therapeutic Strategies. *Diabetes Metab J.* 2022;46(1):15-37.
160. Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet.* 1963;1(7285):785-9.
161. Marshall S, Bacote V, Traxinger RR. Discovery of a metabolic pathway mediating glucose-induced desensitization of the glucose transport system. Role of hexosamine biosynthesis in the induction of insulin resistance. *J Biol Chem.* 1991;266(8):4706-12.
162. Hawkins M, Barzilai N, Liu R, Hu M, Chen W, Rossetti L. Role of the glucosamine pathway in fat-induced insulin resistance. *J Clin Invest.* 1997;99(9):2173-82.
163. Marshall S, Bacote V, Traxinger RR. Complete inhibition of glucose-induced desensitization of the glucose transport system by inhibitors of mRNA synthesis. Evidence for rapid turnover of glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase. *J Biol Chem.* 1991;266(16):10155-61.
164. Frayn KN. Adipose tissue as a buffer for daily lipid flux. *Diabetologia.* 2002;45(9):1201-10.
165. Mastrototaro L, Roden M. Insulin resistance and insulin sensitizing agents. *Metabolism.* 2021;125:154892.
166. Ter Horst KW, Gilijamse PW, Versteeg RI, Ackermans MT, Nederveen AJ, la Fleur SE, et al. Hepatic Diacylglycerol-Associated Protein Kinase C $\epsilon$  Translocation Links Hepatic Steatosis to Hepatic Insulin Resistance in Humans. *Cell Rep.* 2017;19(10):1997-2004.
167. Szendroedi J, Yoshimura T, Phielix E, Koliaki C, Marcucci M, Zhang D, et al. Role of diacylglycerol activation of PKC $\theta$  in lipid-induced muscle insulin resistance in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(26):9597-602.
168. Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, et al. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science.* 2004;306(5695):457-61.
169. Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K, Kitazawa R, et al. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest.* 2006;116(6):1494-505.
170. Tilg H, Moschen AR. Inflammatory mechanisms in the regulation of insulin resistance. *Mol Med.* 2008;14(3-4):222-31.
171. Ozcan U, Yilmaz E, Ozcan L, Furuhashi M, Vaillancourt E, Smith RO, et al. Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science.* 2006;313(5790):1137-40.
172. Aguirre V, Uchida T, Yenush L, Davis R, White MF. The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). *J Biol Chem.* 2000;275(12):9047-54.
173. Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(2):85-96.
174. Kanwal F, Neuschwander-Tetri BA, Loomba R, Rinella ME. Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease: Update and impact of new nomenclature on the American Association for the Study of Liver Diseases practice guidance on nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2024;79(5):1212-9.
175. Rinella ME, Lazarus JV, Ratziu V, Francque SM, Sanyal AJ, Kanwal F, et al. A multisociety Delphi consensus statement on new fatty liver disease nomenclature. *J Hepatol.* 2023;79(6):1542-56.
176. Rinella ME. Examining the Nomenclature Change From NAFLD and NASH to MASLD and MASH. *Gastroenterol Hepatol (N Y).* 2023;19(11):697-9.
177. Kalligeros M, Vassilopoulos A, Vassilopoulos S, Victor DW, Mylonakis E, Nouredin M. Prevalence of Steatotic Liver Disease (MASLD, MetALD, and ALD) in the United States: NHANES 2017-2020. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2024;22(6):1330-2.e4.
178. Roeb E, Canbay A, Bantel H, Bojunga J, de Laffolie J, Demir M, et al. Aktualisierte S2k-Leitlinie nicht-alkoholische Fettlebererkrankung der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS). *Z Gastroenterol.* 2022;60(9):1346-421.

## 7. Literaturverzeichnis

---

179. Roeb E. Amendment „Neue Nomenklatur zur MASLD (Metabolic Dysfunction Associated Steatotic Liver Disease; metabolische Dysfunktion assoziierte steatotische Lebererkrankung)“ zur S2k-Leitlinie „Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung“ (v.2.0 /April 2022) der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS). 2024.
180. Liebe R, Esposito I, Bock HH, Vom Dahl S, Stindt J, Baumann U, et al. Diagnosis and management of secondary causes of steatohepatitis. *J Hepatol.* 2021;74(6):1455-71.
181. Hagström H, Vessby J, Ekstedt M, Shang Y. 99% of patients with NAFLD meet MASLD criteria and natural history is therefore identical. *J Hepatol.* 2024;80(2):e76-e7.
182. Loomba R, Friedman SL, Shulman GI. Mechanisms and disease consequences of nonalcoholic fatty liver disease. *Cell.* 2021;184(10):2537-64.
183. Herold G. Innere Medizin. Köln: Herold, Gerd; 2021.
184. Corrao S, Natoli G, Argano C. Nonalcoholic fatty liver disease is associated with intrahepatic cholangiocarcinoma and not with extrahepatic form: definitive evidence from meta-analysis and trial sequential analysis. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2021;33(1):62-8.
185. EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol.* 2016;64(6):1388-402.
186. Estes C, Anstee QM, Arias-Loste MT, Bantel H, Bellentani S, Caballeria J, et al. Modeling NAFLD disease burden in China, France, Germany, Italy, Japan, Spain, United Kingdom, and United States for the period 2016-2030. *J Hepatol.* 2018;69(4):896-904.
187. Falck-Ytter Y, Younossi ZM, Marchesini G, McCullough AJ. Clinical features and natural history of nonalcoholic steatosis syndromes. *Semin Liver Dis.* 2001;21(1):17-26.
188. Patel KR, White FV, Deutsch GH. Hepatic steatosis is prevalent in stillborns delivered to women with diabetes mellitus. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2015;60(2):152-8.
189. Schwimmer JB, Deutsch R, Kahen T, Lavine JE, Stanley C, Behling C. Prevalence of fatty liver in children and adolescents. *Pediatrics.* 2006;118(4):1388-93.
190. Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC, et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology.* 2004;40(6):1387-95.
191. Polyzos SA, Kountouras J, Mantzoros CS. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: From pathophysiology to therapeutics. *Metabolism.* 2019;92:82-97.
192. Kanwar P, Kowdley KV. The Metabolic Syndrome and Its Influence on Nonalcoholic Steatohepatitis. *Clin Liver Dis.* 2016;20(2):225-43.
193. Petersen KF, Dufour S, Feng J, Befroy D, Dziura J, Dalla Man C, et al. Increased prevalence of insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease in Asian-Indian men. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(48):18273-7.
194. Williams CD, Stengel J, Asike MI, Torres DM, Shaw J, Contreras M, et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis among a largely middle-aged population utilizing ultrasound and liver biopsy: a prospective study. *Gastroenterology.* 2011;140(1):124-31.
195. Milić S, Lulić D, Štimac D. Non-alcoholic fatty liver disease and obesity: biochemical, metabolic and clinical presentations. *World J Gastroenterol.* 2014;20(28):9330-7.
196. Patel AH, Peddu D, Amin S, Elsaid MI, Minacapelli CD, Chandler TM, et al. Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Lean/Nonobese and Obese Individuals: A Comprehensive Review on Prevalence, Pathogenesis, Clinical Outcomes, and Treatment. *J Clin Transl Hepatol.* 2023;11(2):502-15.
197. Paschetta E, Belci P, Alisi A, Liccardo D, Cutrera R, Musso G, et al. OSAS-related inflammatory mechanisms of liver injury in nonalcoholic fatty liver disease. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:815721.
198. Sheth SGC, S. Epidemiology, clinical features, and diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease in adults 2022.
199. Bertot LC, Jeffrey GP, Wallace M, MacQuillan G, Garas G, Ching HL, et al. Nonalcoholic fatty liver disease-related cirrhosis is commonly unrecognized and associated with hepatocellular carcinoma. *Hepatol Commun.* 2017;1(1):53-60.

## 7. Literaturverzeichnis

---

200. Kahn CR, Wang G, Lee KY. Altered adipose tissue and adipocyte function in the pathogenesis of metabolic syndrome. *J Clin Invest.* 2019;129(10):3990-4000.
201. Guilherme A, Virbasius JV, Puri V, Czech MP. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(5):367-77.
202. 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(5):1343-51.
203. Sanders FWB, Acharjee A, Walker C, Marney L, Roberts LD, Imamura F, et al. Hepatic steatosis risk is partly driven by increased de novo lipogenesis following carbohydrate consumption. *Genome Biol.* 2018;19(1):79.
204. Bugianesi E, Moscatiello S, Ciaravella MF, Marchesini G. Insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Pharm Des.* 2010;16(17):1941-51.
205. Neuschwander-Tetri BA. Non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Med.* 2017;15(1):45.
206. Neuschwander-Tetri BA. Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: the central role of nontriglyceride fatty acid metabolites. *Hepatology.* 2010;52(2):774-88.
207. Benedict M, Zhang X. Non-alcoholic fatty liver disease: An expanded review. *World J Hepatol.* 2017;9(16):715-32.
208. Cusi K. Role of insulin resistance and lipotoxicity in non-alcoholic steatohepatitis. *Clin Liver Dis.* 2009;13(4):545-63.
209. Schwabe RF, Tabas I, Pajvani UB. Mechanisms of Fibrosis Development in Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology.* 2020;158(7):1913-28.
210. Kisseleva T, Brenner D. Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2021;18(3):151-66.
211. Mittal S, El-Serag HB, Sada YH, Kanwal F, Duan Z, Temple S, et al. Hepatocellular Carcinoma in the Absence of Cirrhosis in United States Veterans is Associated With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2016;14(1):124-31.e1.
212. Petta S, Valenti L, Bugianesi E, Targher G, Bellentani S, Bonino F. A "systems medicine" approach to the study of non-alcoholic fatty liver disease. *Dig Liver Dis.* 2016;48(3):333-42.
213. Romeo S, Kozlitina J, Xing C, Pertsemlidis A, Cox D, Pennacchio LA, et al. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet.* 2008;40(12):1461-5.
214. Kawaguchi T, Sumida Y, Umemura A, Matsuo K, Takahashi M, Takamura T, et al. Genetic polymorphisms of the human PNPLA3 gene are strongly associated with severity of non-alcoholic fatty liver disease in Japanese. *PLoS One.* 2012;7(6):e38322.
215. Anstee QM, Day CP. The Genetics of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Spotlight on PNPLA3 and TM6SF2. *Semin Liver Dis.* 2015;35(3):270-90.
216. Federico A, Dallio M, Godos J, Loguercio C, Salomone F. Targeting gut-liver axis for the treatment of nonalcoholic steatohepatitis: translational and clinical evidence. *Transl Res.* 2016;167(1):116-24.
217. Caussy C, Hsu C, Lo MT, Liu A, Bettencourt R, Ajmera VH, et al. Link between gut-microbiome derived metabolite and shared gene-effects with hepatic steatosis and fibrosis in NAFLD. *Hepatology.* 2018;68(3):918-32.
218. Schuster S, Cabrera D, Arrese M, Feldstein AE. Triggering and resolution of inflammation in NASH. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2018;15(6):349-64.
219. Bacon BR, Farahvash MJ, Janney CG, Neuschwander-Tetri BA. Nonalcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity. *Gastroenterology.* 1994;107(4):1103-9.
220. Amarapurkar D, Kamani P, Patel N, Gupte P, Kumar P, Agal S, et al. Prevalence of non-alcoholic fatty liver disease: population based study. *Ann Hepatol.* 2007;6(3):161-3.
221. Mofrad P, Contos MJ, Haque M, Sargeant C, Fisher RA, Luketic VA, et al. Clinical and histologic spectrum of nonalcoholic fatty liver disease associated with normal ALT values. *Hepatology.* 2003;37(6):1286-92.

## 7. Literaturverzeichnis

---

222. Choudhury J, Sanyal AJ. Clinical aspects of fatty liver disease. *Semin Liver Dis.* 2004;24(4):349-62.
223. Karlas T, Petroff D, Sasso M, Fan JG, Mi YQ, de Lédinghen V, et al. Individual patient data meta-analysis of controlled attenuation parameter (CAP) technology for assessing steatosis. *J Hepatol.* 2017;66(5):1022-30.
224. Kleiner DE, Makhlof HR. Histology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis in Adults and Children. *Clin Liver Dis.* 2016;20(2):293-312.
225. Brunt EM, Tiniakos DG. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 2010;16(42):5286-96.
226. Kleiner DE, Brunt EM. Nonalcoholic fatty liver disease: pathologic patterns and biopsy evaluation in clinical research. *Semin Liver Dis.* 2012;32(1):3-13.
227. Brunt EM. Nonalcoholic steatohepatitis: definition and pathology. *Semin Liver Dis.* 2001;21(1):3-16.
228. Brunt EM. Pathology of fatty liver disease. *Mod Pathol.* 2007;20 Suppl 1:S40-8.
229. Fedchuk L, Nascimbeni F, Pais R, Charlotte F, Housset C, Ratzu V. Performance and limitations of steatosis biomarkers in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2014;40(10):1209-22.
230. Bedogni G, Bellentani S, Miglioli L, Masutti F, Passalacqua M, Castiglione A, et al. The Fatty Liver Index: a simple and accurate predictor of hepatic steatosis in the general population. *BMC Gastroenterol.* 2006;6:33.
231. Kotronen A, Peltonen M, Hakkarainen A, Sevastianova K, Bergholm R, Johansson LM, et al. Prediction of non-alcoholic fatty liver disease and liver fat using metabolic and genetic factors. *Gastroenterology.* 2009;137(3):865-72.
232. Angulo P, Hui JM, Marchesini G, Bugianesi E, George J, Farrell GC, et al. The NAFLD fibrosis score: a noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD. *Hepatology.* 2007;45(4):846-54.
233. Shah AG, Lydecker A, Murray K, Tetri BN, Contos MJ, Sanyal AJ. Comparison of noninvasive markers of fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2009;7(10):1104-12.
234. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2005;41(6):1313-21.
235. Bedossa P. Utility and appropriateness of the fatty liver inhibition of progression (FLIP) algorithm and steatosis, activity, and fibrosis (SAF) score in the evaluation of biopsies of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2014;60(2):565-75.
236. Promrat K, Kleiner DE, Niemeier HM, Jackvony E, Kearns M, Wands JR, et al. Randomized controlled trial testing the effects of weight loss on nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology.* 2010;51(1):121-9.
237. Kim D, Murag S, Cholankeril G, Cheung A, Harrison SA, Younossi ZM, et al. Physical Activity, Measured Objectively, Is Associated With Lower Mortality in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2021;19(6):1240-7.e5.
238. Chopra SL, M. Management of nonalcoholic fatty liver disease in adults 2022.
239. Ekstedt M, Franzén LE, Holmqvist M, Bendtsen P, Mathiesen UL, Bodemar G, et al. Alcohol consumption is associated with progression of hepatic fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *Scand J Gastroenterol.* 2009;44(3):366-74.
240. Rinella ME. Nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review. *Jama.* 2015;313(22):2263-73.
241. Hoofnagle JH, Van Natta ML, Kleiner DE, Clark JM, Kowdley KV, Loomba R, et al. Vitamin E and changes in serum alanine aminotransferase levels in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther.* 2013;38(2):134-43.

## 7. Literaturverzeichnis

---

242. Armstrong MJ, Gaunt P, Aithal GP, Barton D, Hull D, Parker R, et al. Liraglutide safety and efficacy in patients with non-alcoholic steatohepatitis (LEAN): a multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled phase 2 study. *Lancet*. 2016;387(10019):679-90.
243. Newsome PN, Buchholtz K, Cusi K, Linder M, Okanou T, Ratziu V, et al. A Placebo-Controlled Trial of Subcutaneous Semaglutide in Nonalcoholic Steatohepatitis. *N Engl J Med*. 2021;384(12):1113-24.
244. Boettcher E, Csako G, Pucino F, Wesley R, Loomba R. Meta-analysis: pioglitazone improves liver histology and fibrosis in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2012;35(1):66-75.
245. Harrison SA, Bedossa P, Guy CD, Schattenberg JM, Loomba R, Taub R, et al. A Phase 3, Randomized, Controlled Trial of Resmetirom in NASH with Liver Fibrosis. *N Engl J Med*. 2024;390(6):497-509.
246. Rotman Y, Sanyal AJ. Current and upcoming pharmacotherapy for non-alcoholic fatty liver disease. *Gut*. 2017;66(1):180-90.
247. Chavez-Tapia NC, Tellez-Avila FI, Barrientos-Gutierrez T, Mendez-Sanchez N, Lizardi-Cervera J, Uribe M. Bariatric surgery for non-alcoholic steatohepatitis in obese patients. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010;2010(1):Cd007340.
248. Lassailly G, Caiazzo R, Buob D, Pigeyre M, Verkindt H, Labreuche J, et al. Bariatric Surgery Reduces Features of Nonalcoholic Steatohepatitis in Morbidly Obese Patients. *Gastroenterology*. 2015;149(2):379-88; quiz e15-6.
249. Wang X, Li J, Riaz DR, Shi G, Liu C, Dai Y. Outcomes of liver transplantation for nonalcoholic steatohepatitis: a systematic review and meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2014;12(3):394-402.e1.
250. Kim D, Kim WR, Kim HJ, Therneau TM. Association between noninvasive fibrosis markers and mortality among adults with nonalcoholic fatty liver disease in the United States. *Hepatology*. 2013;57(4):1357-65.
251. Ekstedt M, Hagström H, Nasr P, Fredrikson M, Stål P, Kechagias S, et al. Fibrosis stage is the strongest predictor for disease-specific mortality in NAFLD after up to 33 years of follow-up. *Hepatology*. 2015;61(5):1547-54.
252. Angulo P, Kleiner DE, Dam-Larsen S, Adams LA, Bjornsson ES, Charatcharoenwitthaya P, et al. Liver Fibrosis, but No Other Histologic Features, Is Associated With Long-term Outcomes of Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*. 2015;149(2):389-97.e10.
253. Molloy JW, Calcagno CJ, Williams CD, Jones FJ, Torres DM, Harrison SA. Association of coffee and caffeine consumption with fatty liver disease, nonalcoholic steatohepatitis, and degree of hepatic fibrosis. *Hepatology*. 2012;55(2):429-36.
254. Pai RK. NAFLD Histology: a Critical Review and Comparison of Scoring Systems. *Current Hepatology Reports*. 2019;18(4):473-81.
255. Nissi Varki MD, Pathology Do, Medicine So, University of California SD. Normal & fatty liver 2023 [Available from: <https://medpics.ucsd.edu/index.cfm?curpage=image&course=path&mode=browse&lesson=21&img=1051>].
256. NAFLD and NASH - Biomarkers in Detection, Diagnosis and Monitoring: Springer Cham; 2020.
257. Ozturk A, Olson MC, Samir AE, Venkatesh SK. Liver fibrosis assessment: MR and US elastography. *Abdom Radiol (NY)*. 2022;47(9):3037-50.
258. Nov O, Shapiro H, Ovadia H, Tarnovskii T, Dvir I, Shemesh E, et al. Interleukin-1 $\beta$  regulates fat-liver crosstalk in obesity by auto-paracrine modulation of adipose tissue inflammation and expandability. *PLoS One*. 2013;8(1):e53626.
259. Mirea AM, Tack CJ, Chavakis T, Joosten LAB, Toonen EJM. IL-1 Family Cytokine Pathways Underlying NAFLD: Towards New Treatment Strategies. *Trends Mol Med*. 2018;24(5):458-71.
260. Tilg H, Moschen AR. IL-1 cytokine family members and NAFLD: neglected in metabolic liver inflammation. *J Hepatol*. 2011;55(5):960-2.

## 7. Literaturverzeichnis

---

261. Pejnovic N, Jeftic I, Jovicic N, Arsenijevic N, Lukic ML. Galectin-3 and IL-33/ST2 axis roles and interplay in diet-induced steatohepatitis. *World J Gastroenterol.* 2016;22(44):9706-17.
262. Moschen AR, Molnar C, Enrich B, Geiger S, Ebenbichler CF, Tilg H. Adipose and liver expression of interleukin (IL)-1 family members in morbid obesity and effects of weight loss. *Mol Med.* 2011;17(7-8):840-5.
263. Zang S, Ma X, Zhuang Z, Liu J, Bian D, Xun Y, et al. Increased ratio of neutrophil elastase to  $\alpha$ 1-antitrypsin is closely associated with liver inflammation in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2016;43(1):13-21.
264. Marvie P, Lisbonne M, L'Helgoualc'h A, Rauch M, Turlin B, Preisser L, et al. Interleukin-33 overexpression is associated with liver fibrosis in mice and humans. *J Cell Mol Med.* 2010;14(6b):1726-39.
265. Weiskirchen R, Tacke F. Interleukin-33 in the pathogenesis of liver fibrosis: alarming ILC2 and hepatic stellate cells. *Cell Mol Immunol.* 2017;14(2):143-5.
266. Stienstra R, Saudale F, Duval C, Keshtkar S, Groener JE, van Rooijen N, et al. Kupffer cells promote hepatic steatosis via interleukin-1beta-dependent suppression of peroxisome proliferator-activated receptor alpha activity. *Hepatology.* 2010;51(2):511-22.
267. Kamari Y, Werman-Venkert R, Shaish A, Werman A, Harari A, Gonen A, et al. Differential role and tissue specificity of interleukin-1alpha gene expression in atherogenesis and lipid metabolism. *Atherosclerosis.* 2007;195(1):31-8.
268. Cazanave S, Podtelezchnikov A, Jensen K, Seneshaw M, Kumar DP, Min HK, et al. The Transcriptomic Signature Of Disease Development And Progression Of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Sci Rep.* 2017;7(1):17193.
269. de Roos B, Rungapamestry V, Ross K, Rucklidge G, Reid M, Duncan G, et al. Attenuation of inflammation and cellular stress-related pathways maintains insulin sensitivity in obese type I interleukin-1 receptor knockout mice on a high-fat diet. *Proteomics.* 2009;9(12):3244-56.
270. Gieling RG, Wallace K, Han YP. Interleukin-1 participates in the progression from liver injury to fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2009;296(6):G1324-31.
271. Isoda K, Sawada S, Ayaori M, Matsuki T, Horai R, Kagata Y, et al. Deficiency of interleukin-1 receptor antagonist deteriorates fatty liver and cholesterol metabolism in hypercholesterolemic mice. *J Biol Chem.* 2005;280(8):7002-9.
272. Stienstra R, Joosten LA, Koenen T, van Tits B, van Diepen JA, van den Berg SA, et al. The inflammasome-mediated caspase-1 activation controls adipocyte differentiation and insulin sensitivity. *Cell Metab.* 2010;12(6):593-605.
273. Mridha AR, Wree A, Robertson AAB, Yeh MM, Johnson CD, Van Rooyen DM, et al. NLRP3 inflammasome blockade reduces liver inflammation and fibrosis in experimental NASH in mice. *J Hepatol.* 2017;66(5):1037-46.
274. Toonen EJ, Mirea AM, Tack CJ, Stienstra R, Ballak DB, van Diepen JA, et al. Activation of proteinase 3 contributes to Non-alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) and insulin resistance. *Mol Med.* 2016;22:202-14.
275. Gao Y, Liu Y, Yang M, Guo X, Zhang M, Li H, et al. IL-33 treatment attenuated diet-induced hepatic steatosis but aggravated hepatic fibrosis. *Oncotarget.* 2016;7(23):33649-61.
276. Vasseur P, Dion S, Filliol A, Genet V, Lucas-Clerc C, Jean-Philippe G, et al. Endogenous IL-33 has no effect on the progression of fibrosis during experimental steatohepatitis. *Oncotarget.* 2017;8(30):48563-74.
277. He J, Usui I, Ishizuka K, Kanatani Y, Hiratani K, Iwata M, et al. Interleukin-1alpha inhibits insulin signaling with phosphorylating insulin receptor substrate-1 on serine residues in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol.* 2006;20(1):114-24.
278. Lagathu C, Yvan-Charvet L, Bastard JP, Maachi M, Quignard-Boulangé A, Capeau J, et al. Long-term treatment with interleukin-1beta induces insulin resistance in murine and human adipocytes. *Diabetologia.* 2006;49(9):2162-73.

## 7. Literaturverzeichnis

---

279. Ridker PM, Everett BM, Thuren T, MacFadyen JG, Chang WH, Ballantyne C, et al. Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N Engl J Med*. 2017;377(12):1119-31.
280. Larsen CM, Faulenbach M, Vaag A, Vølund A, Eshes JA, Seifert B, et al. Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 2007;356(15):1517-26.
281. Tilg H, Effenberger M, Adolph TE. A role for IL-1 inhibitors in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)? *Expert Opin Investig Drugs*. 2020;29(2):103-6.
282. Aden DP, Fogel A, Plotkin S, Damjanov I, Knowles BB. Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature*. 1979;282(5739):615-6.
283. Vinken M, Rogiers V. *Protocols in In Vitro Hepatocyte Research*: Springer New York; 2016.
284. Schmitz S. *Der Experimentator: Zellkultur*: Spektrum Akademischer Verlag; 2011.
285. Maurel P. *Hepatocytes: Methods and Protocols*: Humana Press; 2016.
286. Dulbecco R, Freeman G. Plaque production by the polyoma virus. *Virology*. 1959;8(3):396-7.
287. Toba Y, Deguchi S, Mimura N, Sakamoto A, Harada K, Hirata K, et al. Comparison of commercially available media for hepatic differentiation and hepatocyte maintenance. *PLoS One*. 2020;15(2):e0229654.
288. Gstraunthaler G, Lindl T. *Zell- und Gewebekultur: Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen*: Springer Berlin Heidelberg; 2013.
289. Price PJ, Gregory EA. Relationship between in vitro growth promotion and biophysical and biochemical properties of the serum supplement. *In Vitro*. 1982;18(6):576-84.
290. Noel V, Berry MD. Culture of Adherent Cancer Cell Lines. *Methods Mol Biol*. 2022;2508:19-29.
291. Strober W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr Protoc Immunol*. 2015;111:A3.B.1-a3.B.
292. Morris CB. Cryopreservation of animal and human cell lines. *Methods Mol Biol*. 2007;368:227-36.
293. Murray KA, Gibson MI. Chemical approaches to cryopreservation. *Nat Rev Chem*. 2022;6(8):579-93.
294. Pichard L, Raulet E, Fabre G, Ferrini JB, Ourlin JC, Maurel P. Human hepatocyte culture. *Methods Mol Biol*. 2006;320:283-93.
295. Scientific T. Thawing and Plating Cryopreserved Hepatocytes 2011 [Available from: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/references/protocols/drug-discovery/adme-tox-protocols/thawing-and-plating-hepatocytes-protocol.html>].
296. Tanimizu N. *Hepatocytes: Methods and Protocols*: Springer US; 2022.
297. Williams GM, Gunn JM. Long-term cell culture of adult rat liver epithelial cells. *Exp Cell Res*. 1974;89(1):139-42.
298. Gómez-Lechón MJ, Donato MT, Martínez-Romero A, Jiménez N, Castell JV, O'Connor JE. A human hepatocellular in vitro model to investigate steatosis. *Chem Biol Interact*. 2007;165(2):106-16.
299. Li J, Wang T, Liu P, Yang F, Wang X, Zheng W, et al. Hesperetin ameliorates hepatic oxidative stress and inflammation via the PI3K/AKT-Nrf2-ARE pathway in oleic acid-induced HepG2 cells and a rat model of high-fat diet-induced NAFLD. *Food Funct*. 2021;12(9):3898-918.
300. Rafiei H, Omidian K, Bandy B. Dietary Polyphenols Protect Against Oleic Acid-Induced Steatosis in an in Vitro Model of NAFLD by Modulating Lipid Metabolism and Improving Mitochondrial Function. *Nutrients*. 2019;11(3).
301. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. *Cold Spring Harb Protoc*. 2018;2018(6).
302. Präbst K, Engelhardt H, Ringgeler S, Hübner H. Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin. *Methods Mol Biol*. 2017;1601:1-17.
303. Nozhat Z, Khalaji MS, Hedayati M, Kia SK. Different Methods for Cell Viability and Proliferation Assay: Essential Tools in Pharmaceutical Studies. *Anticancer Agents Med Chem*. 2022;22(4):703-12.

## 7. Literaturverzeichnis

---

304. BioVision. Triglyceride Quantification Colorimetric/Fluorometric Kit 2023 [Available from: <https://www.biovision.com/documentation/datasheets/K622.pdf>].
305. Wang Y, Zhang Y, Qian H, Lu J, Zhang Z, Min X, et al. The g0/g1 switch gene 2 is an important regulator of hepatic triglyceride metabolism. *PLoS One*. 2013;8(8):e72315.
306. Jin J, Iakova P, Breaux M, Sullivan E, Jawanmardi N, Chen D, et al. Increased expression of enzymes of triglyceride synthesis is essential for the development of hepatic steatosis. *Cell Rep*. 2013;3(3):831-43.
307. Jansohn M, Rothhämel S. *Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor: Spektrum Akademischer Verlag*; 2012.
308. Reinard T. *Molekularbiologische Methoden 2.0: UTB GmbH*; 2018.
309. Hengen PN. Carriers for precipitating nucleic acids. *Trends Biochem Sci*. 1996;21(6):224-5.
310. Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *biochemistry*. 1979;18(24):5294-9.
311. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry*. 1987;162(1):156-9.
312. Brown TA. *Essential molecular biology: IRL Press at Oxford University Press*; 1991.
313. Rodríguez A, Duyvejonck H, Van Belleghem JD, Gryp T, Van Simaey L, Vermeulen S, et al. Comparison of procedures for RNA-extraction from peripheral blood mononuclear cells. *PLoS One*. 2020;15(2):e0229423.
314. Mülhardt C. *Der Experimentator Molekularbiologie / Genomics: Springer Berlin Heidelberg*; 2013.
315. Qiagen. RNeasy Micro Kit 2021 [Available from: <https://www.qiagen.com/be/resources/resourcedetail?id=e112adfa-cc06-4e29-87f8-4820062ae44e&lang=en>].
316. Dastgheib S, Irajie C, Assaei R, Koohpeima F, Mokarram P. Optimization of RNA extraction from rat pancreatic tissue. *Iran J Med Sci*. 2014;39(3):282-8.
317. Asai S, Ianora A, Lauritano C, Lindeque PK, Carotenuto Y. High-quality RNA extraction from copepods for Next Generation Sequencing: A comparative study. *Mar Genomics*. 2015;24 Pt 1:115-8.
318. Desjardins P, Conklin D. NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *J Vis Exp*. 2010(45).
319. Technologies A. AffinityScript Multiple Temperature cDNA Synthesis Kit 2023 [Available from: <https://www.agilent.com/library/usermanuals/public/200436.pdf>].
320. Baltimore D. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature*. 1970;226(5252):1209-11.
321. Kelleher CD, Champoux JJ. Characterization of RNA strand displacement synthesis by Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase. *J Biol Chem*. 1998;273(16):9976-86.
322. Skalka AM, Goff S. *Reverse transcriptase: Cold Spring Harbor Laboratory Press*; 1993.
323. Kurreck J, Engels JW, Lottspeich F. *Bioanalytik: Springer Berlin Heidelberg*; 2022.
324. Gassen HG. *PCR: Grundlagen und Anwendungen der Polymerase-Kettenreaktion; 5 Tabellen: Fischer*; 1994.
325. Newton CR, Graham A, Ellison JS. *PcR: BIOS Scientific Publishers Oxford, UK*; 1997.
326. Müller H-J, Prange DR. *PCR-Polymerase-Kettenreaktion: Springer*; 2016.
327. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988;239(4839):487-91.
328. Chou Q, Russell M, Birch DE, Raymond J, Bloch W. Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. *Nucleic Acids Res*. 1992;20(7):1717-23.
329. Chen RH, Fuggle SV. In situ cDNA polymerase chain reaction. A novel technique for detecting mRNA expression. *Am J Pathol*. 1993;143(6):1527-34.
330. Bosch I, Melichar H, Pardee AB. Identification of differentially expressed genes from limited amounts of RNA. *Nucleic Acids Res*. 2000;28(7):E27.

## 7. Literaturverzeichnis

---

331. Navarro E, Serrano-Heras G, Castaño MJ, Solera J. Real-time PCR detection chemistry. *Clin Chim Acta*. 2015;439:231-50.
332. Gassen HG, Appelhans H. *Gentechnik: Einführung in Prinzipien und Methoden*; 33 Tab: Fischer; 1985.
333. Tan SC, Yiap BC. DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present. *J Biomed Biotechnol*. 2009;2009:574398.
334. Lillehoj EP, Malik VS. Protein purification. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 1989;40:19-71.
335. 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;72:248-54.
336. Rehm H, Letzel T. *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*: Springer Berlin Heidelberg; 2016.
337. Gallagher SR. One-dimensional SDS gel electrophoresis of proteins. *Curr Protoc Protein Sci*. 2012;Chapter 10:10.1.1-1.44.
338. 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(9):4350-4.
339. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Immunoblotting in the clinical laboratory. *J Clin Chem Clin Biochem*. 1989;27(8):495-501.
340. Egger D, Bienz K. Protein (western) blotting. *Mol Biotechnol*. 1994;1(3):289-305.
341. Motif A. *TransAM NFkB Manual 2021* [Available from: <https://www.activemotif.com/documents/70.pdf>].
342. Tabatabaei MS, Ahmed M. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Methods Mol Biol*. 2022;2508:115-34.
343. Reen DJ. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Methods Mol Biol*. 1994;32:461-6.
344. Khan-Malek R, Wang Y. *Statistical Analysis of Quantitative RT-PCR Results*. *Methods Mol Biol*. 2017;1641:281-96.
345. Mishra P, Singh U, Pandey CM, Mishra P, Pandey G. Application of student's t-test, analysis of variance, and covariance. *Ann Card Anaesth*. 2019;22(4):407-11.
346. Alexopoulos LG, Saez-Rodriguez J, Cosgrove BD, Lauffenburger DA, Sorger PK. Networks inferred from biochemical data reveal profound differences in toll-like receptor and inflammatory signaling between normal and transformed hepatocytes. *Mol Cell Proteomics*. 2010;9(9):1849-65.
347. Clarke DC, Morris MK, Lauffenburger DA. Normalization and statistical analysis of multiplexed bead-based immunoassay data using mixed-effects modeling. *Mol Cell Proteomics*. 2013;12(1):245-62.
348. Marin DE, Pistol GC, Bulgaru CV, Taranu I. Cytotoxic and inflammatory effects of individual and combined exposure of HepG2 cells to zearalenone and its metabolites. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2019;392(8):937-47.
349. Kanamori Y, Murakami M, Sugiyama M, Hashimoto O, Matsui T, Funaba M. Interleukin-1 $\beta$  transcriptionally activates hepcidin by inducing CCAAT enhancer-binding protein  $\delta$  (C/EBP $\delta$ ) expression in hepatocytes. *J Biol Chem*. 2017;292(24):10275-87.
350. Zhao Y, Meng C, Wang Y, Huang H, Liu W, Zhang JF, et al. IL-1 $\beta$  inhibits  $\beta$ -Klotho expression and FGF19 signaling in hepatocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2016;310(4):E289-300.
351. Gaul S, Leszczynska A, Alegre F, Kaufmann B, Johnson CD, Adams LA, et al. Hepatocyte pyroptosis and release of inflammasome particles induce stellate cell activation and liver fibrosis. *J Hepatol*. 2021;74(1):156-67.
352. Zhang Z, Trippler M, Real CI, Werner M, Luo X, Schefczyk S, et al. Hepatitis B Virus Particles Activate Toll-Like Receptor 2 Signaling Initially Upon Infection of Primary Human Hepatocytes. *Hepatology*. 2020;72(3):829-44.
353. Le Vee M, Gripon P, Stieger B, Fardel O. Down-regulation of organic anion transporter expression in human hepatocytes exposed to the proinflammatory cytokine interleukin 1beta. *Drug Metab Dispos*. 2008;36(2):217-22.

## 7. Literaturverzeichnis

---

354. Shanmugam NK, Chen K, Cherayil BJ. Commensal Bacteria-induced Interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) Secreted by Macrophages Up-regulates Hepcidin Expression in Hepatocytes by Activating the Bone Morphogenetic Protein Signaling Pathway. *J Biol Chem.* 2015;290(51):30637-47.
355. Tsutsui H, Cai X, Hayashi S. Interleukin-1 Family Cytokines in Liver Diseases. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:630265.
356. Barbier L, Ferhat M, Salamé E, Robin A, Herbelin A, Gombert JM, et al. Interleukin-1 Family Cytokines: Keystones in Liver Inflammatory Diseases. *Front Immunol.* 2019;10:2014.
357. Shang Y, Yang HX, Li X, Zhang Y, Chen N, Jiang XL, et al. Modulation of interleukin-36 based inflammatory feedback loop through the hepatocyte-derived IL-36R-P2X7R axis improves steatosis in alcoholic steatohepatitis. *Br J Pharmacol.* 2022;179(17):4378-99.
358. Scheiermann P, Bachmann M, Härdle L, Pleli T, Piiper A, Zwissler B, et al. Application of IL-36 receptor antagonist weakens CCL20 expression and impairs recovery in the late phase of murine acetaminophen-induced liver injury. *Sci Rep.* 2015;5:8521.
359. Neumann K, Schiller B, Tiegs G. NLRP3 Inflammasome and IL-33: Novel Players in Sterile Liver Inflammation. *Int J Mol Sci.* 2018;19(9).
360. Roth GA, Zimmermann M, Lubsczyk BA, Pilz J, Faybik P, Hetz H, et al. Up-regulation of interleukin 33 and soluble ST2 serum levels in liver failure. *J Surg Res.* 2010;163(2):e79-83.
361. Wang J, Cai Y, Ji H, Feng J, Ayana DA, Niu J, et al. Serum IL-33 levels are associated with liver damage in patients with chronic hepatitis B. *J Interferon Cytokine Res.* 2012;32(6):248-53.
362. Wang J, Zhao P, Guo H, Sun X, Jiang Z, Xu L, et al. Serum IL-33 levels are associated with liver damage in patients with chronic hepatitis C. *Mediators Inflamm.* 2012;2012:819636.
363. McHedlidze T, Waldner M, Zopf S, Walker J, Rankin AL, Schuchmann M, et al. Interleukin-33-dependent innate lymphoid cells mediate hepatic fibrosis. *Immunity.* 2013;39(2):357-71.
364. Jetric I, Jovicic N, Pantic J, Arsenijevic N, Lukic ML, Pejnovic N. Galectin-3 Ablation Enhances Liver Steatosis, but Attenuates Inflammation and IL-33-Dependent Fibrosis in Obesogenic Mouse Model of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Mol Med.* 2015;21(1):453-65.
365. Gehrke N, Hövelmeyer N, Waisman A, Straub BK, Weinmann-Menke J, Wörns MA, et al. Hepatocyte-specific deletion of IL1-RI attenuates liver injury by blocking IL-1 driven autoinflammation. *J Hepatol.* 2018;68(5):986-95.
366. Ricchi M, Odoardi MR, Carulli L, Anzivino C, Ballestri S, Pinetti A, et al. Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes. *J Gastroenterol Hepatol.* 2009;24(5):830-40.
367. Pan Z, Wang J, Kang B, Lu L, Han C, Tang H, et al. Screening and identification of differentially expressed genes in goose hepatocytes exposed to free fatty acid. *J Cell Biochem.* 2010;111(6):1482-92.
368. Jain MR, Giri SR, Bhoi B, Trivedi C, Rath A, Rathod R, et al. Dual PPAR $\alpha$ / $\gamma$  agonist saroglitazar improves liver histopathology and biochemistry in experimental NASH models. *Liver Int.* 2018;38(6):1084-94.
369. Zhang Q, Kong X, Yuan H, Guan H, Li Y, Niu Y. Mangiferin Improved Palmitate-Induced-Insulin Resistance by Promoting Free Fatty Acid Metabolism in HepG2 and C2C12 Cells via PPAR $\alpha$ : Mangiferin Improved Insulin Resistance. *J Diabetes Res.* 2019;2019:2052675.
370. Lee MR, Yang HJ, Park KI, Ma JY. *Lycopus lucidus* Turcz. ex Benth. Attenuates free fatty acid-induced steatosis in HepG2 cells and non-alcoholic fatty liver disease in high-fat diet-induced obese mice. *Phytomedicine.* 2019;55:14-22.
371. Mun J, Kim S, Yoon HG, You Y, Kim OK, Choi KC, et al. Water Extract of *Curcuma longa* L. Ameliorates Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Nutrients.* 2019;11(10).
372. da Silva Lima N, Fondevila MF, Nóvoa E, Buqué X, Mercado-Gómez M, Gallet S, et al. Inhibition of ATG3 ameliorates liver steatosis by increasing mitochondrial function. *J Hepatol.* 2022;76(1):11-24.
373. Mancina RM, Sasidharan K, Lindblom A, Wei Y, Ciociola E, Jamialahmadi O, et al. PSD3 downregulation confers protection against fatty liver disease. *Nat Metab.* 2022;4(1):60-75.

## 7. Literaturverzeichnis

---

374. Gehrke N, Hofmann LJ, Straub BK, Rühle F, Waisman A, Galle PR, et al. Hepatic interleukin-1 receptor type 1 signalling regulates insulin sensitivity in the early phases of nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Transl Med.* 2022;12(9):e1048.
375. Ballak DB, Stienstra R, Tack CJ, Dinarello CA, van Diepen JA. IL-1 family members in the pathogenesis and treatment of metabolic disease: Focus on adipose tissue inflammation and insulin resistance. *Cytokine.* 2015;75(2):280-90.
376. Malhi H, Bronk SF, Werneburg NW, Gores GJ. Free fatty acids induce JNK-dependent hepatocyte lipoapoptosis. *J Biol Chem.* 2006;281(17):12093-101.
377. Cannito S, Morello E, Bocca C, Foglia B, Benetti E, Novo E, et al. Microvesicles released from fat-laden cells promote activation of hepatocellular NLRP3 inflammasome: A pro-inflammatory link between lipotoxicity and non-alcoholic steatohepatitis. *PLoS One.* 2017;12(3):e0172575.
378. Basaranoglu M, Basaranoglu G. Pathophysiology of insulin resistance and steatosis in patients with chronic viral hepatitis. *World J Gastroenterol.* 2011;17(36):4055-62.
379. Gluchowski NL, Becuwe M, Walther TC, Farese RV, Jr. Lipid droplets and liver disease: from basic biology to clinical implications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2017;14(6):343-55.
380. Osborn O, Olefsky JM. The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease. *Nat Med.* 2012;18(3):363-74.
381. Ahmed B, Sultana R, Greene MW. Adipose tissue and insulin resistance in obese. *Biomed Pharmacother.* 2021;137:111315.
382. Watanabe Y, Nagai Y, Takatsu K. Activation and Regulation of the Pattern Recognition Receptors in Obesity-Induced Adipose Tissue Inflammation and Insulin Resistance. *Nutrients.* 2013;5(9):3757-78.
383. Sakurai Y, Kubota N, Yamauchi T, Kadowaki T. Role of Insulin Resistance in MAFLD. *Int J Mol Sci.* 2021;22(8).
384. Liang H, Ward WF. PGC-1alpha: a key regulator of energy metabolism. *Adv Physiol Educ.* 2006;30(4):145-51.
385. Barroso E, Rodríguez-Calvo R, Serrano-Marco L, Astudillo AM, Balsinde J, Palomer X, et al. The PPAR $\beta/\delta$  activator GW501516 prevents the down-regulation of AMPK caused by a high-fat diet in liver and amplifies the PGC-1 $\alpha$ -Lipin 1-PPAR $\alpha$  pathway leading to increased fatty acid oxidation. *Endocrinology.* 2011;152(5):1848-59.
386. Leone TC, Lehman JJ, Finck BN, Schaeffer PJ, Wende AR, Boudina S, et al. PGC-1alpha deficiency causes multi-system energy metabolic derangements: muscle dysfunction, abnormal weight control and hepatic steatosis. *PLoS Biol.* 2005;3(4):e101.
387. Hara K, Tobe K, Okada T, Kadowaki H, Akanuma Y, Ito C, et al. A genetic variation in the PGC-1 gene could confer insulin resistance and susceptibility to Type II diabetes. *Diabetologia.* 2002;45(5):740-3.
388. Chen L, Qin Y, Liu B, Gao M, Li A, Li X, et al. PGC-1 $\alpha$ -Mediated Mitochondrial Quality Control: Molecular Mechanisms and Implications for Heart Failure. *Frontiers in Cell and Developmental Biology.* 2022;10.
389. Janorkar AV, Harris LM, Murphey BS, Sowell BL. Use of three-dimensional spheroids of hepatocyte-derived reporter cells to study the effects of intracellular fat accumulation and subsequent cytokine exposure. *Biotechnol Bioeng.* 2011;108(5):1171-80.
390. Spruss A, Kanuri G, Uebel K, Bischoff SC, Bergheim I. Role of the inducible nitric oxide synthase in the onset of fructose-induced steatosis in mice. *Antioxid Redox Signal.* 2011;14(11):2121-35.
391. Fiegel HC, Kneser U, Kluth D, Rolle U. [Hepatic tissue engineering]. *Handchir Mikrochir Plast Chir.* 2010;42(6):337-41.
392. Kanuri G, Bergheim I. In vitro and in vivo models of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Int J Mol Sci.* 2013;14(6):11963-80.
393. Su RC, Lad A, Breidenbach JD, Blomquist TM, Gunning WT, Dube P, et al. Hyperglycemia induces key genetic and phenotypic changes in human liver epithelial HepG2 cells which parallel the

## 7. Literaturverzeichnis

---

Leprdb/J mouse model of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). PLoS One. 2019;14(12):e0225604.

394. Zhu X, Bian H, Wang L, Sun X, Xu X, Yan H, et al. Berberine attenuates nonalcoholic hepatic steatosis through the AMPK-SREBP-1c-SCD1 pathway. *Free Radic Biol Med*. 2019;141:192-204.

395. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 2006;444(7121):860-7.

## 8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Menschen, die mich bei der Anfertigung dieser Dissertationsarbeit unterstützt haben, meinen Dank aussprechen.

Zunächst möchte ich mich bei meinem ersten Gutachter bedanken für die Ermöglichung meiner experimentellen Promotion in seiner wissenschaftlichen Arbeitsgruppe an der Universitätsmedizin Mainz. Darüber hinaus möchte ich für die gute wissenschaftliche Betreuung und Diskussion experimenteller Fragestellungen bedanken. Insbesondere die ständige Erreichbarkeit sowie das kollegiale Verhalten mit Begegnung auf Augenhöhe sind an dieser Stelle hervorzuheben. Auf diese Weise konnte ich wertvolle Einblicke in die experimentelle medizinische Forschung gewinnen und eigenständig wissenschaftlich arbeiten.

Des Weiteren möchte ich mich bei meiner Kollegin bedanken für die Mitbetreuung meiner Promotionsarbeit. Insbesondere danke ich Ihr für die praktische Unterstützung im Labor, für das Einbringen ihrer technischen Expertise, für die wissenschaftlichen Anregungen und ihre Hilfsbereitschaft. Ebenso gilt mein Dank einer MTA für die Hilfestellungen und Ratschläge bei der Durchführung der Experimente.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich auf meinem bisherigen Lebensweg immer unterstützt haben und mir diese berufliche Ausbildung ermöglicht haben. Auch bei meinen Freunden möchte ich mich bedanken, die mir immer zur Seite gestanden und mich motiviert haben.

## 9. Tabellarischer Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name                                   Lea Josefin Hofmann  
Geburtsdatum und -ort       12.12.1994 in Dernbach



### Bildungsweg

10/2017 – 11/2024       **Studium der Humanmedizin**  
Johannes-Gutenberg-Universität Mainz  
07/2019 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 1,5)  
07/2023 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 3,0)  
11/2024 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 2,0)

10/2014 – 09/2017       **Studium der Molekularen Biomedizin (B.Sc.) (Note 1,6)**  
Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

03/2014                   **Abitur (Note 1,0)**  
Konrad-Adenauer-Gymnasium Westerburg

### Praktische Erfahrung

01/2025 – heute       **Ärztin in Weiterbildung** am Universitätsklinikum Frankfurt,  
Medizinische Klinik 1

11/2023 – 10/2024       **Praktisches Jahr**  
Innere Medizin       Universitätsmedizin Mainz  
Chirurgie             Evangelisches Stift Koblenz  
Neurologie           Bundeswehrzentral Krankenhaus Koblenz

08/2022 – 08/2022       **Famulatur:** Innere Medizin, Mayo Clinic Rochester (MN)

02/2021 – 03/2021       **Famulatur:** Innere Medizin

08/2020 – 09/2020       **Famulatur:** Allgemeinmedizin

02/2020 – 03/2020       **Famulatur:** Innere Medizin, Universitätsmedizin Mainz

### Wissenschaftliche Arbeiten

02/2017 – 07/2017       **Bachelorarbeit (Note 1,0)**  
*“Quantitative analysis of directed dendritic cell migration in response to haptotactic and chemotactic gradients of CCL21 and CCL19”*  
LIMES-Institut Bonn

04/2021 – 08/2024       **Experimentelle Promotion**  
*„Die Bedeutung der IL-1-Zytokinfamilie für die Entwicklung der Metabolischen Dysfunktion-assoziierten steatotischen Lebererkrankung“*  
I. Medizinische Klinik UM Mainz