Untersuchungen zur Modulation des Glucosestoffwechsels in primären Hepatozyten der Wistar-Ratte

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Zahnmedizin (Dr. med. dent.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Nicola Fritsch

Betreuerin:

PD Dr. rer. nat. Dr. rer. medic. habil. Ivonne Bazwinsky-Wutschke

Gutachter*innen:

Prof. Dr. med. Alexander Zipprich, Innere Medizin IV Universitätsklinikum Jena

Prof. Dr. med Lutz P. Müller, Innere Medizin IV Universitätsklinikum Halle

Datum der Verteidigung:

05.08.2025

Referat

In dieser Arbeit wurde die Reaktion primärer Hepatozyten auf Stimulationen mit unterschiedlichen Konzentrationen von Insulin und Glucose (kombiniert oder einzeln) untersucht, um ihre Eignung als Modellsystem für Untersuchungen des hepatischen Glucosestoffwechsels zu überprüfen. Die Untersuchung konzentrierte sich auf die Bestimmung der Proteinmengen von Glucosetransportern (GLUT-1 und GLUT-2) sowie von Schlüsselenzymen der Glykolyse und Gluconeogenese, um Veränderungen im hepatischen Glucosestoffwechsel zu erfassen. Die Experimente umfassten Kurz- und Langzeitstimulationen (2 h und 18 h) der Hepatozyten mit Insulin bzw. Glucose. Dabei wurde mittels Western-Blot-Methode die Proteinmenge der untersuchten Glucosetransporter und Enzyme analysiert.

Die Ergebnisse zeigen, dass die primären Hepatozyten auf verschiedene Glucose- und/oder Insulinkonzentrationen unterschiedlich reagieren. Unter normoglykämischen Bedingungen (5,5 mM Glucose) führt die Insulin-Applikation zu einer Zunahme der GLUT-1 Proteinmenge, während GLUT-2 unverändert bleibt. Hypo- und hyperglykämische Bedingungen unter Insulinzugabe induzieren bei GLUT-1 eine Abnahme der Proteinmenge, während GLUT-2 unter Hypoglykämie (2,8 mM Glucose) zunimmt und unter Hyperglykämie (25 mM Glucose) abnimmt. Diese Effekte bleiben bei GLUT-2 auch nach 18 h unter 2,8 und 25 mM Glucose erhalten während GLUT-1 unter Insulin und 5,5 bzw. 11,1 mM Glucose abnimmt. Die Betrachtung der Proteinmenge von Glucokinase (GCK) zeigte die stärksten Effekte nach 18 h. Eine langfristige Insulinexposition bewirkt die Abnahme der Proteinmengen von GCK, besonders bei steigender Insulinkonzentration und unter erhöhten Glucosekonzentrationen. Die Proteinmenge von Phosphoenolpyruvat-Caboxykinase (PEPCK) zeigt unter hyperglykämischen sowie hohen Insulinkonzentrationen die stärksten Veränderungen überwiegend durch die Steigerung der Proteinmenge. Dadurch kann von einer synergistischen Wirkung von Insulin und Glucose auf die Regulation der Proteinmenge von PEPCK ausgegangen werden. Glucose-6-Phosphatase (G6P) zeigt die stärksten Schwankungen der Proteinmenge, vornehmlich kommt es zu einer Abnahme der Proteinmengen mit steigenden Insulin- und Glucosekonzentrationen zu beiden Stimulationszeiträumen. Die Ergebnisse zeigen zusammenfassend, dass sich unter den getesteten Bedingungen, primäre Hepatozyten als Modellsystem eignen, um zum Beispiel perspektivisch die Wirkung bestimmter Pharmaka auf den hepatischen Glucosestoffwechsel zu untersuchen.

Nicola Fritsch: Untersuchungen zur Modulation des Glucosestoffwechsels in primären Hepatozyten der Wistar-Ratte, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 74 Seiten, 2025

Inhaltsverzeichnis

REFERAT I

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS IV

ABBILDUNGSVERZEICHNIS VI

1. EINLEITUNG 1

1.1. DIE LEBER (HEPAR) 1
1.1.1. HISTOLOGIE DER LEBER MIT FOKUS AUF DEN HEPATOZYTEN 1
1.1.2. ISOLATION VON PRIMÄREN HEPATOZYTEN UND DIE GESCHICHTLICHE ENTWICKLUNG DER METHODE 3
1.2. GLUCOSESTOFFWECHSEL DER LEBER 5
1.3. DIABETES MELLITUS 8

2. ZIELSTELLUNG 11

3. MATERIAL UND METHODEN 12

3.1. MATERIAL UND GERÄTE 12
3.2. METHODEN 15
3.2.1. VERSUCHSTIERHALTUNG UND RATTENMODELL 15
3.2.2. ISOLATION PRIMÄRER HEPATOZYTEN 16
3.2.3. EXPERIMENTELLES DESIGN 19
3.2.4. PROTEINANALYSEN 20
3.2.5. TRANSKRIPTNACHWEISE 24
3.3. STATISTISCHE AUSWERTUNG DER WESTERN-BLOT ERGEBNISSE 27

4. ERGEBNISSE 28

4.1. UNTERSUCHUNG DER GLUCOSETRANSPORTER UNTER VERSCHIEDENEN BEDINGUNGEN AN PRIMÄREN HEPATOZYTEN 30
4.1.1. GLUCOSETRANSPORTER-1 (GLUT-1) 30
4.1.2. GLUCOSETRANSPORTER-2 (GLUT-2) 34
4.2. ANALYSE VON ENZYMEN DES GLUCOSESTOFFWECHSELS IN PRIMÄREN HEPATOZYTEN NACH DER BEHANDLUNG MIT GLUCOSE BZW. INSULIN 40
4.2.1. GLUCOKINASE (GCK) 40
4.2.2. PHOSPHOENOLPYRUVAT-CARBOXYKINASE (PEPCK) 45
4.2.3. GLUCOSE-6-PHOSPHATASE (G6P) 50

5. DISKUSSION 56

5.1. METHODISCHE BETRACHTUNG 56

5.2. VERÄNDERUNGEN DER GLUCOSETRANSPORTER DURCH DIE STIMULATION MIT INSULIN UND/ODER GLUCOSE IN DEN PRIMÄREN HEPATOZYTEN 57
5.3. EINFLUSS DER BEHANDLUNG MIT GLUCOSE UND/ODER INSULIN AUF ENZYME DES GLUCOSESTOFFWECHSELS 59
5.3.1. GLUCOKINASE (GCK) 59
5.3.2. GLUCOSE-6-PHOSPHATASE (G6P) 61
5.3.3. PHOSPHOENOLPYRUVAT-CARBOXYKINASE (PEPCK) 62
5.4. ANALYSE DER GEWÄHLTEN KONZENTRATIONEN UND INKUBATIONSZEITEN 64
5.5. LIMITATIONEN DER ARBEIT 64
5.6. SCHLUSSFOLGERUNG 65

6. LITERATURVERZEICHNIS 67

7. THESEN 74

ERKLÄRUNGEN IX

Abkürzungsverzeichnis

BSA	Bovines Serumalbumin
$CaCl_2$ $2H_2O$	Calciumchlorid-Dihydrat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DMEM	Dulbeccos modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco's Balanced Salt Solution
EGTA	Ethylenglycol-bis-tetraessigsäure
FKS	fetales Kälberserum
G6P	Glucose-6-Phosphatase
GCK	Glucokinase
Glc	Glucose
GLUT-1 (Glut1)	Glucosetransporter 1
GLUT-2 (Glut2)	Glucosetransporter 2
h	Stunde
H_2O	Wasser
HCL	Salzsäure
HEPES	Hydroxyethylpiperazinyl-Ethansulfonsäure
Ins	Insulin
KCl	Kaliumchlorid
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
$MgSO_47H_2O$	Magnesiumsulfat-Heptahydrat
min	Minuten

mRNA	messenger Ribonukleinsäure
mV	Millivolt
N	Stichprobenumfang
$Na_2HPO_4\ 2H_2O$	Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat
NaCl	Natriumchlorid
$NaHCO_3$	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
nM	Nanomol
O_2	Sauerstoff
OP	Operation
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion*, real-time quantitative PCR*
PEPCK	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
PES	Polyethersulfon
qPCR	quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehung pro Minute
SEM	Standardabweichung (standard error of mean)

Abbildungsverzeichnis

ABB. 1: AUFTRAGUNG DER PCR-PROBEN AUF EIN SDS-GEL MIT 15 GELTASCHEN, BEISPIELHAFT DARGESTELLT FÜR DIE KONZENTRATIONEN 2,8 MM GLUCOSE UND 1 NM INSULIN. DIE AUFTRAGUNG WURDE FÜR ALLE WEITEREN KONZENTRATIONEN IDENTISCH ANGEWENDET (5,5 MM GLUCOSE, 11,1 MM GLUCOSE, 25 MM GLUCOSE; 10 NM INSULIN, 100 NM INSULIN, OHNE INSULIN)..... 22
ABB. 2: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG AUFBAU WESTERN BLOT. EIGENE DARSTELLUNG..... 23
ABB. 3: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER PCR. EIGENE DARSTELLUNG..... 26
ABB. 4: NACHWEIS DER MRNA VOM GLUCOSETRANSPORTER-1 (GLUT1, 174 BP), GLUCOSETRANSPORTER-2 (GLUT2, 170 BP), GLUCOKINASE (GCK, 173 BP) UND GLUCOSE-6-PHOSPHATASE (G6PC, 193 BP) UND PHOSPHOENOLPYRVATCARBOXYKINASE (PEPCK, 174 BP) MITTEL REAL-TIME PCR. NACHWEIS IN VERSCHIEDENEN ZELLLINIEN UND GEWEBEN DER WISTAR-RATTE. L: STANDARD, INS-1 (RATTENINSULINOMAZELLLINIE), NTC: WASSERKONTROLLE..... 29
ABB. 5: VERGLEICH DER PROTEINMENGE VON GLUT-1 NACH 2 H UND 18 H IN PRIMÄREN HEPATOZYTEN UNTER 2,8 MM GLUCOSE BEI STIMULATION MIT INSULINKONZENTRATIONEN VON 1 NM, 10 NM, 100 NM UND OHNE INSULIN (= KONTROLLE).. 30
ABB. 6: VERGLEICH DER PROTEINMENGE VON GLUT-1 NACH 2 H UND 18 H IN PRIMÄREN HEPATOZYTEN UNTER 5,5 MM GLUCOSE BEI STIMULATION MIT INSULINKONZENTRATIONEN VON 1 NM, 10 NM, 100 NM UND OHNE INSULIN (= KONTROLLE). 31
ABB. 7: VERGLEICH DER PROTEINMENGE VON GLUT-1 NACH 2 H UND 18 H IN PRIMÄREN HEPATOZYTEN UNTER 11,1 MM GLUCOSE BEI STIMULATION MIT INSULINKONZENTRATIONEN VON 1 NM, 10 NM, 100 NM UND OHNE INSULIN (= KONTROLLE). 31
ABB. 8: VERGLEICH DER PROTEINMENGE VON GLUT-1 NACH 2 H UND 18 H IN PRIMÄREN HEPATOZYTEN UNTER 25 MM GLUCOSE BEI STIMULATION MIT INSULINKONZENTRATIONEN VON 1 NM, 10 NM, 100 NM UND OHNE INSULIN (= KONTROLLE). 32
ABB. 9: VERGLEICH DER PROTEINMENGE VON GLUT-1 NACH 2 H UND 18 H IN PRIMÄREN HEPATOZYTEN UNTER DER BEHANDLUNG OHNE INSULIN BEI STIMULATION MIT GLUCOSEKONZENTRATIONEN VON 2,8 MM, 5,5 MM (= KONTROLLE), 11,1 MM, 25 MM.. 32
ABB. 10: VERGLEICH DER PROTEINMENGE VON GLUT-1 NACH 2 H UND 18 H IN PRIMÄREN HEPATOZYTEN UNTER 1 NM INSULIN BEI STIMULATION MIT GLUCOSEKONZENTRATIONEN VON 2,8 MM, 5,5 MM (= KONTROLLE), 11,1 MM, 25 MM. 33
ABB. 11: VERGLEICH DER PROTEINMENGE VON GLUT-1 NACH 2 H UND 18 H IN PRIMÄREN HEPATOZYTEN UNTER 10 NM INSULIN BEI STIMULATION MIT GLUCOSEKONZENTRATIONEN VON 2,8 MM, 5,5 MM (= KONTROLLE), 11,1 MM, 25 MM. 33
ABB. 13: VERGLEICH DER PROTEINMENGE VON GLUT-2 NACH 2 H UND 18 H IN PRIMÄREN HEPATOZYTEN UNTER 2,8 MM GLUCOSE BEI STIMULATION MIT INSULINKONZENTRATIONEN VON 1 NM, 10 NM, 100 NM UND OHNE INSULIN (= KONTROLLE). 35
ABB. 14: VERGLEICH DER PROTEINMENGE VON GLUT-2 NACH 2 H UND 18 H IN PRIMÄREN HEPATOZYTEN UNTER 5,5 MM GLUCOSE BEI STIMULATION MIT INSULINKONZENTRATIONEN VON 1 NM, 10 NM, 100 NM UND OHNE INSULIN (= KONTROLLE). 35
ABB. 15: VERGLEICH DER PROTEINMENGE VON GLUT-2 NACH 2 H UND 18 H IN PRIMÄREN HEPATOZYTEN UNTER 11,1 MM GLUCOSE BEI STIMULATION MIT INSULINKONZENTRATIONEN VON 1 NM, 10 NM, 100 NM UND OHNE INSULIN (= KONTROLLE). 36
ABB. 16: VERGLEICH DER PROTEINMENGE VON GLUT-2 NACH 2 H UND 18 H IN PRIMÄREN HEPATOZYTEN UNTER 25 MM GLUCOSE BEI STIMULATION MIT INSULINKONZENTRATIONEN VON 1 NM, 10 NM, 100 NM UND OHNE INSULIN (= KONTROLLE). 36

ABB. 17: VERGLEICH DER PROTEINMENGE VON GLUT-2 NACH 2 H UND 18 H IN PRIMÄREN HEPATOZYTEN UNTER DER BEHANDLUNG OHNE INSULIN BEI STIMULATION MIT GLUCOSEKONZENTRATIONEN VON 2,8 MM, 5,5 MM (= KONTROLLE), 11,1 MM, 25 MM. 37
ABB. 18: VERGLEICH DER PROTEINMENGE VON GLUT-2 NACH 2 H UND 18 H IN PRIMÄREN HEPATOZYTEN UNTER 1 NM INSULIN BEI STIMULATION MIT GLUCOSEKONZENTRATIONEN VON 2,8 MM, 5,5 MM (= KONTROLLE), 11,1 MM, 25 MM. 38
ABB. 19: VERGLEICH DER PROTEINMENGE VON GLUT-2 NACH 2 H UND 18 H IN PRIMÄREN HEPATOZYTEN UNTER 10 NM INSULIN BEI STIMULATION MIT GLUCOSEKONZENTRATIONEN VON 2,8 MM, 5,5 MM (= KONTROLLE), 11,1 MM, 25 MM. 38
ABB. 20: VERGLEICH DER PROTEINMENGE VON GLUT-2 NACH 2 H UND 18 H IN PRIMÄREN HEPATOZYTEN UNTER 100 NM INSULIN BEI STIMULATION MIT GLUCOSEKONZENTRATIONEN VON 2,8 MM, 5,5 MM (= KONTROLLE), 11,1 MM, 25 MM. 39
ABB. 21: VERGLEICH DER PROTEINMENGE VON GCK NACH 2 H UND 18 H IN PRIMÄREN HEPATOZYTEN UNTER 2,8 MM GLUCOSE BEI STIMULATION MIT INSULINKONZENTRATIONEN VON 1 NM, 10 NM, 100 NM UND OHNE INSULIN (= KONTROLLE).. 40
ABB. 22: VERGLEICH DER PROTEINMENGE VON GCK NACH 2 H IN PRIMÄREN HEPATOZYTEN UNTER 5,5 MM GLUCOSE BEI STIMULATION MIT INSULINKONZENTRATIONEN VON 1 NM, 10 NM, 100 NM UND OHNE INSULIN (= KONTROLLE). 41
ABB. 23: VERGLEICH DER PROTEINMENGE VON GCK NACH 2 H IN PRIMÄREN HEPATOZYTEN UNTER 11,1 MM GLUCOSE BEI STIMULATION MIT INSULINKONZENTRATIONEN VON 1 NM, 10 NM, 100 NM UND OHNE INSULIN (= KONTROLLE). 41
ABB. 24: VERGLEICH DER PROTEINMENGE VON GCK NACH 2 H UND 18 H IN PRIMÄREN HEPATOZYTEN UNTER 25 MM GLUCOSE BEI STIMULATION MIT INSULINKONZENTRATIONEN VON 1 NM, 10 NM, 100 NM UND OHNE INSULIN (= KONTROLLE). 42
ABB. 25: VERGLEICH DER PROTEINMENGE VON GCK NACH 2 H UND 18 H IN PRIMÄREN HEPATOZYTEN UNTER DER BEHANDLUNG OHNE INSULIN BEI STIMULATION MIT GLUCOSEKONZENTRATIONEN VON 2,8 MM, 5,5 MM (= KONTROLLE), 11,1 MM, 25 MM. 42
ABB. 26: VERGLEICH DER PROTEINMENGE VON GCK NACH 2 H UND 18 H IN PRIMÄREN HEPATOZYTEN UNTER 1 NM INSULIN BEI STIMULATION MIT GLUCOSEKONZENTRATIONEN VON 2,8 MM, 5,5 MM (= KONTROLLE), 11,1 MM, 25 MM. 43
ABB. 27: VERGLEICH DER PROTEINMENGE VON GCK NACH 2 H UND 18 H IN PRIMÄREN HEPATOZYTEN UNTER 10 NM INSULIN BEI STIMULATION MIT GLUCOSEKONZENTRATIONEN VON 2,8 MM, 5,5 MM (= KONTROLLE), 11,1 MM, 25 MM. 44
ABB. 28: VERGLEICH DER PROTEINMENGE VON GCK NACH 2 H UND 18 H IN PRIMÄREN HEPATOZYTEN UNTER 100 NM INSULIN BEI STIMULATION MIT GLUCOSEKONZENTRATIONEN VON 2,8 MM, 5,5 MM (= KONTROLLE), 11,1 MM, 25 MM. 44
ABB. 29: VERGLEICH DER PROTEINMENGE VON PEPCK NACH 2 H UND 18 H IN PRIMÄREN HEPATOZYTEN UNTER 2,8 MM GLUCOSE BEI STIMULATION MIT INSULINKONZENTRATIONEN VON 1 NM, 10 NM, 100 NM UND OHNE INSULIN (= KONTROLLE). 45
ABB. 30: VERGLEICH DER PROTEINMENGE VON PEPCK NACH 2 H UND 18 H IN PRIMÄREN HEPATOZYTEN UNTER 5,5 MM GLUCOSE BEI STIMULATION MIT INSULINKONZENTRATIONEN VON 1 NM, 10 NM, 100 NM UND OHNE INSULIN (= KONTROLLE). 46
ABB. 31: VERGLEICH DER PROTEINMENGE VON PEPCK NACH 2 H UND 18 H IN PRIMÄREN HEPATOZYTEN UNTER 11,1 MM GLUCOSE BEI STIMULATION MIT INSULINKONZENTRATIONEN VON 1 NM, 10 NM, 100 NM UND OHNE INSULIN (= KONTROLLE).. 46
ABB. 32: VERGLEICH DER PROTEINMENGE VON PEPCK NACH 2 H UND 18 H IN PRIMÄREN HEPATOZYTEN UNTER 25 MM GLUCOSE BEI STIMULATION MIT INSULINKONZENTRATIONEN VON 1 NM, 10 NM, 100 NM UND OHNE INSULIN (= KONTROLLE). 47
ABB. 33: VERGLEICH DER PROTEINMENGE VON PEPCK NACH 2 H UND 18 H IN PRIMÄREN HEPATOZYTEN UNTER DER BEHANDLUNG OHNE INSULIN UND STEIGENDENGLUCOSEKONZENTRATIONEN VON 2,8 MM, 5,5 MM (= KONTROLLE), 11,1 MM, 25 MM 47

ABB. 34: VERGLEICH DER PROTEINMENGE VON PEPCK NACH 2 H UND 18 H IN PRIMÄREN HEPATOZYTEN UNTER 1 NM INSULIN BEI STIMULATION MIT GLUCOSEKONZENTRATIONEN VON 2,8 MM, 5,5 MM (= KONTROLLE), 11,1 MM, 25 MM. 48
ABB. 35: VERGLEICH DER PROTEINMENGE VON PEPCK NACH 2 H UND 18 H IN PRIMÄREN HEPATOZYTEN UNTER 10 NM INSULIN BEI STIMULATION MIT GLUCOSEKONZENTRATIONEN VON 2,8 MM, 5,5 MM (= KONTROLLE), 11,1 MM, 25 MM. 48
ABB. 36: VERGLEICH DER PROTEINMENGE VON PEPCK NACH 2 H UND 18 H IN PRIMÄREN HEPATOZYTEN UNTER 100 NM INSULIN BEI STIMULATION MIT GLUCOSEKONZENTRATIONEN VON 2,8 MM, 5,5 MM (= KONTROLLE), 11,1 MM, 25 MM. 49
ABB. 37: VERGLEICH DER PROTEINMENGE VON G6P NACH 2 H UND 18 H IN PRIMÄREN HEPATOZYTEN UNTER 2,8 MM GLUCOSE BEI STIMULATION MIT INSULINKONZENTRATIONEN VON 1 NM, 10 NM, 100 NM UND OHNE INSULIN (= KONTROLLE). 50
ABB. 38: VERGLEICH DER PROTEINMENGE VON G6P NACH 2 H UND 18 H IN PRIMÄREN HEPATOZYTEN UNTER 5,5 MM GLUCOSE BEI STIMULATION MIT INSULINKONZENTRATIONEN VON 1 NM, 10 NM, 100 NM UND OHNE INSULIN (= KONTROLLE). 51
ABB. 39: VERGLEICH DER PROTEINMENGE VON G6P NACH 2 H UND 18 H IN PRIMÄREN HEPATOZYTEN UNTER 11,1 MM GLUCOSE BEI STIMULATION MIT INSULINKONZENTRATIONEN VON 1 NM, 10 NM, 100 NM UND OHNE INSULIN (= KONTROLLE). 51
ABB. 40: VERGLEICH DER PROTEINMENGE VON G6P NACH 2 H UND 18 H IN PRIMÄREN HEPATOZYTEN UNTER 25 MM GLUCOSE BEI STIMULATION MIT INSULINKONZENTRATIONEN VON 1 NM, 10 NM, 100 NM UND OHNE INSULIN (= KONTROLLE). 52
ABB. 41: VERGLEICH DER PROTEINMENGE VON G6P NACH 2 H UND 18 H IN PRIMÄREN HEPATOZYTEN UNTER DER BEHANDLUNG OHNE INSULIN BEI STIMULATION MIT GLUCOSEKONZENTRATIONEN VON 2,8 MM, 5,5 MM (= KONTROLLE), 11,1 MM, 25 MM. 53
ABB. 42: VERGLEICH DER PROTEINMENGE VON G6P NACH 2 H UND 18 H IN PRIMÄREN HEPATOZYTEN UNTER 1 NM INSULIN BEI STIMULATION MIT GLUCOSEKONZENTRATIONEN VON 2,8 MM, 5,5 MM (= KONTROLLE), 11,1 MM, 25 MM. 53
ABB. 43: VERGLEICH DER PROTEINMENGE VON G6P NACH 2 H UND 18 H IN PRIMÄREN HEPATOZYTEN UNTER 10 NM INSULIN BEI STIMULATION MIT GLUCOSEKONZENTRATIONEN VON 2,8 MM, 5,5 MM (= KONTROLLE), 11,1 MM, 25 MM. 54
ABB. 44: VERGLEICH DER PROTEINMENGE VON G6P NACH 2 H UND 18 H IN PRIMÄREN HEPATOZYTEN UNTER 100 NM INSULIN BEI STIMULATION MIT GLUCOSEKONZENTRATIONEN VON 2,8 MM, 5,5 MM (= KONTROLLE), 11,1 MM, 25 MM.. 54

1. Einleitung

1.1. Die Leber (Hepar)

Die Leber macht circa 2.5 % unseres gesamten Körpergewichts aus und ist damit das größte innere Organ mit einer zentralen Stoffwechselfunktion (Si-Tayeb et al. 2010). Oral aufgenommene Substanzen gelangen, bevor sie in den Körperkreislauf aufgenommen werden, in die Leber und werden dort verstoffwechselt (*First-pass*-Effekt). Die Entgiftung von endo- und exogenen Substanzen zählt zu den wichtigsten Aufgaben. Weiterhin wird aus dem Pfortaderblut Glucose aufgenommen, diese kann in Form von Glykogen in der Leber gespeichert und bei Bedarf wieder abgegeben oder auch für die Energiegewinnung zu ATP synthetisiert werden.

Topografisch ist die Leber im rechten Oberbauch intraperitoneal lokalisiert. Die menschliche Leber kann makroskopisch in zwei Lappen eingeteilt werden. Den linken und den rechten Leberlappen (*Lobus sinister und dexter*), die durch das *Ligamentum falciforme hepatis* getrennt werden, wobei der *Lobus dexter* durch die *Facies viszeralis* in zwei weitere kleine Lappen unterteilt wird: *Lobus quadratus* und *Lobus caudatus.* Die Einteilung ist rein morphologisch und hat keine funktionelle Relevanz. Innerhalb dieser makroskopischen Lappen wird die Leber funktionell durch die *portale Trias* in acht Segmente unterteilt (COUINAUD 1954, 1999).

In dem Nagetier befindet sich der größte Teil des Organs in dem intrathorakalen Teil der Bauchhöhle, nur ein kleiner Teil befindet sich im extrathorakalen Teil der Bauchhöhle. Ebenfalls kann man die Leber in einen *Lobus hepatis sinister* und *dexter* einteilen, die jeweils einen medialen und einen lateralen Lappen aufweisen (Kogure et al. 1999). Die Ratte besitzt keinen *Lobus quadratus*, aber einen *Lobus caudatus*, der einen *Proc. papillaris* und einen *Proc. caudatus* aufweist. Aufgrund der veränderten Lappeneinteilung besitzt sie auch nur sieben Segmente (Salomon et al. 2020). Ein weiterer Unterschied zum Menschen liegt darin, dass die Ratte keine Gallenblase besitzt und somit die Galle in der Leber gebildet wird. Der *Ductus choledochus* mündet circa 2 cm vom Pylorus entfernt in das Duodenum (Salomon et al. 2020).

1.1.1. Histologie der Leber mit Fokus auf den Hepatozyten

Die Zellen der Leber sind in zwei große Gruppen einteilbar, zum einen in die parenchymalen Zellen, zu denen die Hepatozyten zählen, und zum anderen in die nicht-parenchymalen Zellen,

zu denen die Kupffer-Zellen, sinusoidalen Endothelzellen, Sternzellen und Cholangiozyten zählen (Juza und Pauli 2014).

Carl Wilhelm von Kupffer beschrieb 1876 Zellen der Leber. Er erwähnte phagozytierende Sinusendothelzellen und nannte sie aufgrund ihrer Form Sternzellen (Kupffer 1876). 1950 wurden durch den Japaner T. Ito lipidhaltige perisinusoidale Zellen beschrieben, die 1971 durch Wake weiter erforscht wurden. Damit wurde nachgewiesen, dass Kupffer und Ito die gleichen Zellen beschrieben hatten. Aufgrund dessen sind diese Zellen als Sternzellen, Ito-Zellen oder perisinusoidale Zellen bekannt und machen circa 5-8 % der Gesamtzahl der Leberzellen aus (Geerts 2001). Die tatsächlichen Makrophagen der Leber wurden nach Kupffer als Kupffer-Zellen benannt. Die sinusoidalen Endothelzellen, LSEC (*liver sinusoidal endothel cells*), wurden erstmals durch Wisse (1970) beschrieben. Sie bilden die Sinuswand und weisen kapillarähnliche Strukturen auf, jedoch besitzen sie keine organisierte Basallamina und das Zytoplasma ist gefenstert und somit wird das mikrovaskuläre Endothel der Leber diskontinuierlich (Braet und Wisse 2002).

Das Leberparenchym wird auch als isotropes Parenchym bezeichnet, weil durch jeden Anschnitt immer das gleiche histologische Bild erkennbar ist (Matsumoto und Kawakami 1982). Es ist in hexagonale Läppchen (*Lobuli hepatis*) eingeteilt und am Rande jedes Läppchens sind Äste der *A. hepatica*, *V. portae* und des *Ductus hepatis* zu finden. Durch die LSEC mit ihrem gefensterten Endothel kann ein Stoffaustausch zwischen dem Blut und den Hepatozyten stattfinden, dieser läuft im Spaltraum zwischen den Endothelzellen der Sinusoide und den Leberzellen ab. Diesen Raum nennt man *Disse-Raum*, benannt nach Josef Disse, der diesen 1892 als einen 10-15 µm breiten Spalt beschrieb.

Die Sinusoide sind mit den bereits erwähnten LSECs ausgekleidet, sodass die umliegenden Hepatozyten mit dem Blut kommunizieren können (Matsumoto und Kawakami 1982; Ekataksin und Kaneda 1999). Dadurch können Nährstoffe und auszuscheidende Substanzen aufgenommen und synthetisierte Stoffe wie Plasmaproteine in das Blut abgegeben werden. Matsumoto und Kawakami (1982) führten das Läppchen-Modell als funktionelle Einheit der Leber ein. Es existieren unterschiedliche Möglichkeiten zur Gliederung des Lebergewebes.

Die Hepatozyten machen circa 78 % des gesamten Lebervolumen aus und sind auch die Zellen mit dem größten Anteil von circa 60 % (Blouin et al. 1977). Sie besitzen eine polygonale Form mit einem Durchmesser von etwa 25 µm (Weibel et al. 1969). Ihre Lebensdauer beträgt 150 Tage, sie besitzen aber die unbegrenzte Fähigkeit zur Regeneration (Michalopoulos und Bhushan

2021). Durch mitotische Neubildung können kleine bis mittlere Schäden behoben werden, das ist die Grundlage der regenerativen Funktion der Leber (Ramboer et al. 2014; Welsch et al. 2022). Aufgrund der hohen Stoffwechselrate ist das Zytoplasma reich an Organellen, die die vielfältigen Zellfunktionen koordinieren. 50 % des gesamten Zellvolumens sind durch eine Vielzahl von Mitochondrien, Golgi-Apparat, dem rauen und glatten endoplasmatischen Retikulum und weiteren Zellorganellen besetzt (Weibel et al. 1969; Blouin et al. 1977). Das Zellvolumen ist auch stark vom Ernährungszustand des jeweiligen Individuums abhängig und kann durch eine Hungerperiode von 48 h fast auf die Hälfte schrumpfen (Epstein 1967).

Die Hepatozyten sind, wie alle Epithelzellen, polar aufgebaut (Gissen und Arias 2015). Das spiegelt sich sowohl in Aufbau als auch Funktion wider, es existiert eine basolaterale (sinusoidale) Membrandomäne und eine kanalikuläre, die sich aus morphologischen Aspekten apikal befindet. Zusätzlich kann ein weiterer funktioneller Abschnitt unterschieden werden, die interzelluläre Domäne. Diese Domänen unterscheiden sich in ihrer Ausstattung bezüglich den Enzymen und Rezeptoren, den Transportsystemen und in ihrer Fluidität (Bartles et al. 1985; Gissen und Arias 2015). Die basolaterale Seite, auch Blutpol genannt, ist für den Austausch der Hepatozyten mit dem Blut verantwortlich. Sie steht mit dem Disse-Raum über Mikrovilli in Verbindung (Weibel et al. 1969). Die Mikrovilli sind durch die vergrößerte Oberfläche, für die Resorption von Stoffen verantwortlich und tragen Rezeptoren für beispielsweise Insulin und Glukagon. Weiterhin sind die Hepatozyten an der Synthese der Blutgerinnungsfaktoren V, VII, IX, X, XI, XII sowie Fibrinogen, Protein C und S beteiligt sind. Ebenso produzieren sie einige Protease-Inhibitoren wie Antithrombin. Die Polarität der Hepatozyten ist notwendig für die regelrechte physiologische Funktion dieser. Durch Störungen des polarisierten Aufbaus der Leberzellen unterschiedlicher Art (genetisch, infektiös, tumorös) kann es zu pathologischen Veränderungen wie beispielsweise Leberfibrose kommen (Gissen und Arias 2015).

1.1.2. Isolation von primären Hepatozyten und die geschichtliche Entwicklung der Methode

Die Leber stellt das wichtigste Organ für den Metabolismus und die Toxizität von Xenobiotika dar. Unter Xenobiotikum werden chemische Verbindungen zusammengefasst, die dem Organismus fremd sind, weil sie Strukturelemente enthalten, die selten in Naturstoffen vorkommen. Daher ist es notwendig, Hepatozyten isolieren zu können und sie in Kultur zu halten, um attraktive in-vitro-Modelle auf dieser Grundlage zu entwickeln (Papeleu et al. 2006).

Die Verwendung von Zelllinien ist unbegrenzt möglich und stellt einen einfacheren Weg dar. Jedoch weisen sie keine ausreichende Funktionalität auf, um pharmakologisch toxische

Relevanzen zu untersuchen (Ramboer et al. 2014). Etablierte Zelllinien werden teilweise über Jahre hinweg in Kultur gehalten und verändern sich im Vergleich zu der Ausgangszelllinie, vor allem im Phänotyp. Der Vorteil von Zelllinien ist, dass sie einfach zu handhaben sind, sich in Kultur ständig vermehren und es existiert bereits viel Datenmaterial. Durch die Arbeit mit ihnen entfallen interindividuelle Unterschiede, da immer die gleiche Zelllinie, die aus einem Individuum stammt, verwendet wird. Primäre Zellen hingegen kommen direkt aus einem Gewebe oder einem Organ. Da für experimentelle Zwecke eine höhere Fallzahl benötigt wird, werden auch mehrere Gewebe oder Organe zur Isolation der Zellen benötigt und somit sind interindividuelle Unterschiede nicht zu vermeiden. Primäre Hepatozyten stellen trotzdem den Goldstandard in der Zellkultur für Stoffwechselstudien dar, weil sie dem in-vivo Zelltypenmodell entsprechen (Ng et al. 2021). Für einen gewissen Zeitraum weisen sie auch die physiologischen Funktionen und die volle metabolische Kapazität des Ursprungsorgans beziehungsweise Gewebes auf (Spitzbart und Schmidt 1970; Bissell et al. 1978). Aus diesen Gründen wurden in den Experimenten der vorliegenden Dissertation primäre Zellen verwendet.

Als Vater der Zellkultur gilt Alexis Carrel. Er zeigte, anhand von embyronalen Hühnerzellen, dass Zellen länger in Kultur gehalten werden können, wenn man sie füttert und ein aseptisches Umfeld geschaffen wird (Carrel und Burrows 1911; Carrel 1912). Die Zellkultur wurde durch die Entdeckung von Penicillin durch Alexander Fleming 1928 revolutioniert (Fleming 1944). Es war nun möglich, ein weitgehend antibakterielles Umfeld für die Zellen zu schaffen und sie so länger zu erhalten. Jedoch beruhten die Techniken auf der mechanischen Isolation (Anderson 1953; Kaltenbach 1954), wodurch zwar eine Zellausbeute erreicht werden konnte, die Zellen aber starke mechanische Schäden erlitten, mit denen sie nicht lebensfähig und funktional waren. Das konnten Berry und Simpson (1962) durch elektronenmikroskopische Aufnahmen nachweisen. Ein großer Fortschritt wurde durch die Einführung von Enzymen als Dissoziationsmittel erreicht (Howard et al. 1967). Howard et al. beschrieben den Einsatz von Kollagenase und Hyaluronidase zum enzymatischen Verdau der Leber. Die Leberschnitte wurden in der enzymhaltigen Lösung geschwenkt, die Zellmembran blieb somit weiterhin intakt, jedoch war die Zellausbeute sehr gering (< 5 %) (Howard und Pesch 1968). Dieses Verfahren wurde durch Berry und Friend (1969) modifiziert, indem sie die Leber nicht erst nach der Entnahme mit der enzymhaltigen Pufferlösung behandelten, sondern direkt in-situ perfundierten und somit eine in-situ-Kollagenase-Perfusionstechnik an der Rattenleber etablierten. Ihre Pufferlösung enthielt Kollagenase Typ I, Hyaluronidase Typ I und wurde mit 95 % O_2 und 5 % CO_2 begast (Berry und Friend 1969). Durch diese Veränderung konnte eine 6-fach höhere Zellausbeute mit

Funktionalität erreicht werden, weshalb sie auch als „*High-Yield-Preparation*“ bezeichnet wurde (Papeleu et al. 2006).

Die heute am meisten verwendete Technik ist auf die Modifikation von Seglen (1972) zurückzuführen. Bis heute wurden nur wenige Modifikationen an dieser Methode vorgenommen; sie gilt als Standardverfahren zur Isolierung von primären Hepatozyten (Gebhardt 1998). Seglen entwickelte die Theorie, dass zuerst der Zellverband aufgelöst werden muss, indem man die Zell-Zell-Verbindungen trennt. Dazu nahm er zwei Perfusionsschritte mit unterschiedlichen Lösungen. Die erste enthielt EGTA und kein Ca^{2+}. Zwischen den Zellen existieren Ca^{2+}-Brücken, die irreversibel getrennt werden, da EGTA das Ca^{2+} löst und kein neues zur Verfügung steht. Im zweiten Schritt enthielt die Perfusionslösung Ca^{2+} und Kollagenase, hier wird das Ca^{2+} benötigt, um die Kollagenase zu aktivieren, die die Matrix verdauen soll (Seglen 1972). Das Ergebnis der „Two-Step-Kollagenase-Perfusionstechnik“ waren Zellpopulationen von Hepatozyten mit < 5 % nicht-parenchymalen Zellen (Seglen 1972, 1979).

1.2. Glucosestoffwechsel der Leber

Glucose und Glucosetransporter

Durch die Nahrungsaufnahme gelangt Zucker, nach vorheriger Umwandlung aus Kohlenhydraten in das Monosaccharid, in den Magen-Darm-Trakt. Dort kann Glucose durch den ATP-abhängigen Na^{+}-gekoppelten Transport des SGLT1 apikal in die Enterozyten aufgenommen werden. Basolateral befindet sich der Glucosetransporter-2 (GLUT-2), der die Glucose durch erleichterte Diffusion in den Blutkreislauf schleust. Sie gelangt über die Pfortader in die Leber und kann von den Hepatozyten ebenfalls über Glucosetransporter, vor allem GLUT-2, aufgenommen und verarbeitet werden (Horn 2021). Da der Glucosemetabolismus intrazellulär abläuft, ist dieser Vorgang essentiell notwendig, weil dadurch der Zelle Nährstoffe für das Wachstum, die Proliferation und auch für die Differenzierung zur Verfügung gestellt werden (Cao et al. 2021). Dadurch stellen die Glucosetransporter Schlüsselregulatoren für den Glucosestoffwechsel dar (Cao et al. 2021). Auf der Oberfläche der meisten Zellen im Körper sind sie aufgrund dessen exprimiert.

Der GLUT-1 wird auch als Erythrozyten-Typ bezeichnet, weil er dort am stärksten exprimiert vorliegt, ist aber auch im Gehirn, der Blut-Hirn-Schranke, in Muskeln und Fettgewebe und in geringen Konzentrationen auch in der Leber lokalisiert (Baldwin und Lienhard 1980; Mueckler et al. 1985). Die Expression wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst wie den Transkriptionsfaktor HIF-1α, Tumorsuppressorgene und auch durch hormonelle Einflüsse der

Schilddrüse (Chen et al. 2001). Insulin fördert die Translokation von GLUT-1 vom Zytoplasma zur Plasmamembran und beeinflusst auch die Expression in den Zellen (Cifuentes et al. 2011). Durch den Km-Wert, die Michaelis-Menten Konstante, kann die Substratkonzentration für ein Enzym angegeben werden, bei der das Enzym auf halber Geschwindigkeit arbeitet. Je niedriger der Km-Wert ist, desto höher ist also die Affinität. GLUT-1 weist einen sehr niedrigen Km-Wert von 1,5 mM auf. In normal gefütterten Ratten wird GLUT-1 nur in einer Reihe von Hepatozyten exprimiert, die unmittelbar an einer terminalen Vene liegen (Tal et al. 1991). Damit kann GLUT-1 nur durch vorheriges Fasten und/oder Insulinmangel in adulten Hepatozyten nachgewiesen werden, weil dadurch die Expression in Hepatozyten stimuliert wird (Gould und Holman 1993; Levitsky et al. 1994).

In der Leber wird vorwiegend der GLUT-2 exprimiert, der deshalb auch als Glucosetransporter vom Leber-Typ bezeichnet wird (Gould und Holman 1993). Weiterhin ist er aber auch in β-Zellen des Pancreas, in der basolateralen Membranseite von Zellen des proximalen Tubulus der Niere und in Dünndarmepithelien zu finden. Sein Km-Wert ist sehr viel höher als der von GLUT-1 und somit die Affinität geringer. Der Wert liegt mit 15-20 mM höher als der physiologische Blutzuckerspiegel von circa 5 mM (Colville et al. 1993; Levitsky et al. 1994). Der hohe Km-Wert gibt GLUT-2 die Fähigkeit eines Glucose-Sensors. Durch den Abfall der Glucosekonzentration, beispielsweise durch Fasten, kommt es durch die Aktivierung des Nervus vagus zur Ausschüttung von Glucagon und somit zur Sekretion von Glucose (Donovan und Bohland 2009).

Insulin, Insulinrezeptor

Insulin ist ein Proteohormon, das in den β-Zellen des Pancreas gebildet wird. Es besteht aus 2 Peptidketten, die als A- und B-Kette bezeichnet werden (Mayer et al. 2007). Die grundlegende Aufgabe des Insulins besteht darin, die Blutglucosekonzentration während des Fastens und Essens konstant zu halten. Unter physiologischen Umständen funktioniert Insulin wie folgt: der Blutzuckerspiegel steigt an, dadurch wird die Insulinproduktion und Sekretion gesteigert und führt zu einer verstärkten Aufnahme von Glucose in die Zelle über die entsprechenden GLUT. In der Leber erfolgt die Umwandlung der Glucose durch deren Metabolismus. Das bedeutet, dass der primäre Stimulus zur Insulinsekretion ein hoher Blutzuckerspiegel ist (Jitrapakdee et al. 2010).

Als Entdecker des Insulins gelten Frederick Banting und Charles Best (Hegele und Maltman 2020), obwohl die beiden nicht die ersten waren, die Insulin erwähnten, aber ihnen gelang es,

Insulin aus dem Pancreas eines Hundes zu extrahieren und sie wendeten es erstmals erfolgreich therapeutisch beim Diabetes Typ 1 an (Banting et al. 1922; Cheng et al. 2021).

Insulin bindet an seinen eigenen Rezeptor, der zu den Tyrosinkinase-Rezeptoren gehört. Anhand isolierter Hepatozyten konnte herausgefunden werden, dass auf der Zellmembran eines Hepatozyten sich circa 20 000 Insulinrezeptoren befinden (Taylor 1991). Der Rezeptor ist ein tetrameres Transmembranprotein, dessen vier Baueinheiten zwei α- und zwei β- Untereinheiten sind. Nachdem das Insulin an den Rezeptor gebunden hat, kommt es zu einer Konformationsänderung des Rezeptors. In der Leber bewirkt diese Bindung eine intrazelluläre Abnahme von cAMP und somit eine Hemmung der Glykogenolyse, Lipolyse und Gluconeogenese. Dessen Gegenspieler, die Glykolyse, wird durch die Aktivierung der Glukokinase durch den Transkriptionsfaktor SREP1c, aktiviert (Taylor 1991; Lee und Pilch 1994). Jeder Rezeptor kann theoretisch zwei Insulinmoleküle binden, aber nach der ersten Bindung nimmt die Affinität rapide um das 100-fache ab, sodass es zu keiner zweiten Bindung kommt (Taylor 1991). Der Rezeptor wird nach Ende der Aktivität durch eine Invagination der Zellmembran als Endosom in die Zelle geschleust, das Insulin wird durch die pH-Wert Änderung gelöst, inaktiviert und der Rezeptor wieder in die Zellmembran eingegliedert. Die Aktivierung und Expression des Rezeptors können eingeschränkt sein. Dieses Krankheitsbild wird als metabolisches Syndrom bezeichnet und geht mit verringerter Rezeptorexpression bei hohen Insulinkonzentrationen einher, so wie es bei Diabetes mellitus Typ 2 der Fall ist.

Glykolyse und Gluconeogenese

Die Leber spielt eine wichtige Rolle im Glucose Metabolismus und dessen Kontrolle (Han et al. 2016). Dazu zählen die akute und die chronische Kontrolle der an den Stoffwechselprozessen beteiligten Enzyme. Die allosterische Regulation durch verschiedene metabolische Zwischenprodukte und posttranslationale Modifikationen dieser Enzyme zählt zu der akuten Kontrolle. Die chronische hingegen besteht aus dem Einfluss auf die Expression der Enzyme für die Stoffwechselwege durch ihre Transkriptionsfaktoren (Han et al. 2016).

Die Glykolyse ist ein kataboler Prozess der Glucose zur Energieerzeugung (Han et al. 2016). Sie kann in allen tierischen und menschlichen Zellen im Zytosol ablaufen. Die aufgenommene Glucose wird hierbei zu Pyruvat umgewandelt. Die Glykolyse besitzt geschwindigkeitsregulierende Enzyme, zu denen die Glucokinase (GCK), Pyruvatkinase (PK) und die Phosphofructokinase-1 gehört (Pilkis und Claus 1991). Diese Enzyme katalysieren irreversible Reaktionen, die durch die Gluconeogenese dann umgangen werden müssen. Die GCK wird, im

Gegensatz zu anderen Hexokinasen, nicht allosterisch durch ihr Produkt Glucose-6-phosphat gehemmt. Dadurch nimmt die Leber unter Bedingungen erhöhter Glucose-Konzentrationen Glucose kontinuierlich auf. Die GCK unterliegt hormonellen Regulationen durch Insulin und Glucagon auf Transkriptionsebene, wobei Insulin die Transkription steigert und Glucagon diese hemmt (Han et al. 2016). Weiterhin wird GCK durch ihr Regulatorprotein GKRP (Glucokinaseregulatorprotein) beeinflusst, denn GCK bindet unter niedrigen intrazellulären Glucosekonzentrationen, beispielsweise Fasten, an dieses Protein und dieser Komplex gelangt dadurch in den Zellkern. Die Bindung des Komplexes und dessen Lokalisation wird durch Fructose-6-phosphat verstärkt. Steigt der Glucosespiegel wieder an, konkurriert das mit der Fructose-6-phosphat um die Bindungsstelle, um GCK wieder zu aktivieren (Han et al. 2016).

Die Gluconeogenese ist im Grunde die umgekehrte Glykolyse und hat bis auf drei Schritte den gleichen Stoffwechselweg. Sie läuft fast nur in den Hepatozyten ab, zu einem sehr geringen Teil in den Zellen der Niere. Die Aufgabe der Gluconeogenese ist es, aus den Metaboliten der Glykolyse Glucose zu produzieren. Während einer normalen Stoffwechsellage reicht die Glucoseaufnahme aus, nur in Zeiten der Nahrungskarenz (> 24 h) muss auf diesen Mechanismus zurückgegriffen werden. Der Nachteil dieses Stoffwechselweges ist, dass mehr Energie verwendet wird als durch die Glykolyse gewonnen werden kann (Han et al. 2016). Um die irreversiblen Schritte der Glykolyse zu umgehen, werden Schlüsselenzyme benötigt. Dazu zählen Glucose-6-phoshphatase (G6Pase), Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK), Fructose-1,6-bisphosphatase und Pyruvat-Carboxykinase (Nuttall et al. 2008). Weiterhin wird die Gluconeogenese auch hormonell reguliert, durch Insulin wird der Stoffwechselweg gehemmt und durch Glucagon aktiviert. Damit ist die hormonelle Regulation genau gegensätzlich zu der der Glykolyse.

Durch den Nachweis der Proteinmenge der Stoffwechselwege kann man demzufolge Rückschlüsse auf die Modulation dieser Stoffwechselwege ziehen.

1.3. Diabetes mellitus

„Diabetes mellitus ist der Sammelbegriff für heterogene Störungen des Stoffwechsels, deren Leitbefund die chronische Hyperglykämie ist. Ursache ist entweder eine gestörte Insulinsekretion oder eine gestörte Insulinwirkung oder meist beides.“ (Nauck et al. 2020)

So lautet die aktuell gültige Definition der *Deutschen Diabetes Gesellschaft (DDG).* Der Name Diabetes mellitus stammt aus dem griechischem und bedeutet „honigsüßer Durchfluss“. Das kommt daher, weil die Hyperglykämie zum Ausscheiden von Glucose mit dem Urin führt. Diese

Erkrankung wird auch als „Volkskrankheit“ bezeichnet, weil laut der Weltgesundheitsorganisation (WHO) 2022 bereits 422 Millionen Menschen weltweit an Diabetes leiden. Diabetes und seine Folgeerkrankungen stellen weltweit die fünfthäufigste Todesursache dar, jährlich sterben 1,5 Millionen Menschen an dieser Erkrankung. Dabei sind immer mehr Kinder und Jugendliche betroffen, was auf den Anstieg von Übergewicht und Adipositas in diesen Altersgruppen zurückzuführen ist. Von der Gesamtheit der Erkrankten leiden circa 95 % an Diabetes Typ 2 und nur 5 % an Typ 1.

Durch Insulin wird die Aufnahme und Speicherung der Nahrung in der Zelle ermöglicht und die entsprechenden Enzyme werden stimuliert, beispielsweise Glykogen zu bilden (Guthrie und Guthrie 2004). Wenn Insulin nicht vorhanden ist oder nicht aufgenommen werden kann, kann die Glucose nicht gespeichert werden und die Prozesse in der Leber, die für die Produktion von Glucose verantwortlich sind, werden nicht gehemmt. Somit ist die Gluconeogenese der wichtigste Prozess, der zu einer Hyperglykämie führt (Guthrie und Guthrie 2004). Unbehandelt kann eine chronische Hyperglykämie zur Schädigung von Blutgefäßen und Nerven führen und stellt somit ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen, Nierenversagen oder Erblindung dar (Diagnosis and classification of diabetes mellitus 2013). Zu den anfänglichen Symptomen des Diabetes zählt die Polyurie, da durch die erhöhte Glucosekonzentration die Osmolarität ansteigt und folglich Flüssigkeit entzogen wird, daraus resultiert dann eine Polydipsie. Weiterhin ist die Veränderung des Gewichts zu erwähnen. Typ 1 führt zu einem Verlust durch die gesteigerte Lipidsynthese, zu einer Zunahme kommt es durch Typ 2, Glucose wird vermehrt gespeichert und die Lipolyse gehemmt (Heidemann et al. 2013).

Diabetes mellitus umfasst eine ganze Gruppe von Stoffwechselerkrankungen, die genetische und immunologische Ursachen haben können, aber auch durch Umwelteinflüsse begünstigt werden. Grundsätzlich kann man den Diabetes in Typ 1 und 2 einteilen. Typ 1 stellt dabei die „juvenile“ autoimmune Form dar, weil sie hauptsächlich bei jungen Patienten diagnostiziert wird, bei denen ein absoluter Insulinmangel durch den Untergang der β-Zellen vorliegt (Bailes 2002). Bei einem relativen Insulinmangel liegt Typ 2 vor. Das bedeutet, dass die Patienten eine Insulinresistenz entwickelt haben bei normaler Sekretionsrate. Bei diesem Typ ist die Ursache meist Übergewicht oder Adipositas (Guthrie und Guthrie 2004).

Die Reaktion der Zellen bei physiologischen Glucosekonzentrationen von 5,5 mM sind bereits bekannt (Bissell et al. 1978; Agius 2016) und wurden als Kontrollwert verwendet. Für weitere Konzentrationen für die Bedingungen in der vorliegenden Arbeit wurden extreme Schwankungen im Glucosemetabolismus ausgewählt. Einerseits wurde eine hypoglykämische

Stoffwechsellage durch eine Konzentration von 2,8 mM Glucose bewirkt, diese sollte das Gegenstück zu den hyperglykämischen Situationen darstellen, wofür Konzentrationen von 11,1 mM und 25 mM verwendet wurden (Couper et al. 1994; Zibolka et al. 2018). Diese Werte sollten die diabetischen Stoffwechsellagen des Diabetes Typ 1 und 2 widerspiegeln. Zusätzlich wurden die Hepatozyten mit Insulin in hohen oder niedrigen Konzentrationen behandelt, um eine diabetische Situation nachzuahmen.

2. Zielstellung

Das Ziel dieser Arbeit war es, Glucose und Insulin an primären Hepatozyten einzusetzen, um festzustellen, unter welchen Konzentrationen - als Einzelapplikation oder Kombinationen beider Substanzen - und Einwirkzeiten Veränderungen am Glucosestoffwechsel der Hepatozyten induzierbar sind. Ein Einfluss auf den Glucosestoffwechsel sollte über Veränderungen von Schlüsselenzymen des Glucosestoffwechsels (GCK, G6P, PEPCK) und Glucosetransportern (GLUT-1, GLUT-2) nachgewiesen werden. Vorteilhaft für die vorliegende Arbeit ist, dass gesunde Kontrolltiere (Wistar-Ratten) genutzt wurden und die damit erzielten Ergebnisse letztendlich für jede weitere Forschung an Hepatozyten als Grundlage herangezogen werden können. Dabei sollte festgestellt werden, ob sich die aus gesunden Wistar-Ratten isolierten Hepatozyten unter den festgelegten Bedingungen als Modell eignen, um Effekte auf den Glucosestoffwechsel zu untersuchen. An den isolierten Hepatozyten standen daher folgende Fragestellungen im Fokus.

A) Wie wird der Glucosemetabolimus durch hohe oder niedrige Konzentrationen von Insulin und/oder Glucose in isolierten primären Hepatozyten beeinflusst?
   - A.1. Gibt es konzentrationsbedingte Abhängigkeiten, die sich in einer veränderten Proteinmenge der Enzyme von Glykolyse und Gluconeogenese sowie Glucosetransportern, widerspiegeln?
   - A.2. Wie wirkt sich die Einzelbehandlung mit Insulin oder Glucose versus der Co-Behandlung mit Insulin und Glucose aus?

B) Ist die Regulation der Proteinmenge dieser Enzyme und Glucosetransporter von der Einwirkzeit von Insulin und/oder Glucose abhängig?
   - B.1. Welche Veränderungen treten unter Kurzzeitstimulation (2 h) versus Langzeitstimulation (18 h) auf?

C) Kann durch die Erhöhung der Glucose- und/oder Insulinkonzentrationen in gesunden isolierten Hepatozyten eine metabolische Stoffwechselsituation geschaffen werden, die der des Diabetes mellitus ähnlich ist und mit Veränderungen in den Proteinmengen von Enzymen und Glucosetransportern einhergeht?

3. Material und Methoden

3.1. Material und Geräte

Materialliste

Im Folgenden werden alle eingesetzten Materialien detailliert aufgeführt.

Tabelle 1: Materialien

Name	**Hersteller**
2-Mercaptoethanol	MERCK
Agarose	BIOSELL
Ammoniumperoxidsulfat	ROTH
Bromphenolblau Na-Salz	MERCK
BSA	ROTH
Calciumchloriddihydrate	MERCK
Collagenase 100	Vita Cyte
Coomassie Brillant Blue	AppliChem
Cupfer-2	Thermo Scientific
D(+)Glucose wasserfrei	MERCK
Desoxyribonuclease 1 from Bovine	Sigma
Di-Natriumhydrogenphosphat	ROTH
DMEM (-) D-Glucose	gibco by life technologies
DMEM (+) D-Glucose	gibco by life technologies
Ethanol	SIGMA-ALDRICH
FKS	Invitrogen
Glycerol	Sigma
Glycine	SERVA
HEPES	SERVA
Kaliumchlorid	ROTH

Kaliumdihydrogenphosphat	ROTH
Magnesiumsulfat	SIGMA-ALDRICH
Methanol	Honeywell
Milchpulver	ROTH
Na-Deoxycholate	SIGMA-ALDRICH
Na-Orthovanadate	AppliChem
Natriumchlorid	ROTH
Nonidet P-40	Fluka
PBS Dulbecco	Biochrom
Penstreb	Sigma
Polyacrylamid	SERVA
Ponceau S	MERCK
Precision Plus Protein Kaleidoskope	BIO-RAD
Proteaseinhibitor-Cocktail	Sigma
Restore Western Blot Stripping Buffer	Thermo Scientific
Rotiblock	ROTH
Salzsäure	ROTH
SDS Pellets	ROTH
TEMED	ROTH
TRIS	ROTH
Triton X-100	Alfa Aesar
Trizol	QIAGEN
Trypan blue solution	Fluka
Trypsin	Sigma
Tween 20	PanReac AppliChem
Western Bright Peroxide	advansta

Western Bright Quantum	advansta
PERCOLL	SIGMA-ALDRICH
DPBS	Cytogen

Geräteliste

Die nachstehende Tabelle enthält eine vollständige Übersicht der eingesetzten Geräte.

Tabelle 2: Geräte

Name	**Hersteller**
Brutschrank, steril	Heracell, Heraeus, Hanau, Deutschland
Brutschrank, unsteril	Thermo scientific, Heraeus, Hanau, Deutschland
Chemilumineszens-Analysekamera	Fusion Fx7, peQlab
Fluoreszenzmikroskope	Biozero, Keyence, Deutschland
Heizblock	Mixing Block MB-102, Bioer, Biozym, Deutschland
Labormessgerät	inoLab, WTW
Magnetrührer	MR3001 K, Heidolph
Magnetrührer	IKA-combimag-RCO, IKA, Deutschland
Mikroskop	Olympus CKX41, Olympus Corporations, Tokio, Japan
Labornetzgerät	Power-Pac Basic , Bio-RAD, California, USA
Labornetzgerät	EPS 2A200, Hoefer
Rüttler	Rocky-3D, Labortechnik Fröbel GmbH, Deutschland
Software Bio1D	Vilber Lourmat, Frankreich
Software MPM6	Bio-RAD, California, USA
Zentrifuge	Biofuge fresco, Heraeus, Hanau, Deutschland

Antikörper

Diese Übersicht enthält sämtliche Antikörper, die im Rahmen dieser Untersuchung zum Einsatz kamen.

Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Primärantikörper für den Western Blot

Antikörper	**Firma**	**Größe**	**Verdünnung**	**Blockierung**
Rabbit anti-GLUT-1	Millipore (07-1401-I)	54 kDa	1:4000	1 % Rotiblock
Rabbit anti-GLUT-2	Millipore (07-1402-I, Lot.NG1643015)	~50 kDa	1:2000	1 % Rotiblock
Rabbit anti-Vinculin	Applied Biosystem (ab129002)	116 kDa	1:5000	5 % Milch
Insulin	Hölzel-Biotech (E92090)	12 kDa	1:1000	5 % Milch
Rabbit anti-Glucokinase	St Johns Laboratory (STJ23760)	53 kDa	1:1000	5 % Milch
Rabbit anti-Glucose-6-phosphatase	Invitrogen (PA5-42541)	40 kDa	1:500	5 % Milch
Rabbit anti-Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK)	Santa Cruz (sc-32879)	62 kDa	1:200	5 % Milch

3.2. Methoden

3.2.1. Versuchstierhaltung und Rattenmodell

Aufgrund von etablierten Tiermodell-Versuchen werden ausschließlich männliche Wistar-Ratten verwendet. Männliche Tiere unterliegen im Vergleich zu weiblichen Tieren keinen zyklischen

Schwankungen, die sich auf den Metabolismus und somit auf die Versuchsergebnisse auswirken können. Die Haltung der Tiere erfolgt über die standardisierten Haltungsbedingungen für Wistar-Ratten in der Versuchstierhaltung der Medizinischen Fakultät der MLU. Die Tiere werden in fensterlosen, klimatisierten Versuchstierräumen mit einem gewöhnlichen 12 h Tag- und Nachtrhythmus gehalten. Wasser und normales handelsübliches Trockenfutter, in Form von Pellets, steht ihnen *ad libitum* zur Verfügung. Für die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ist es wichtig, dass die Tiere immer dem gleichen Stamm entstammen, dasselbe Alter und Geschlecht aufweisen. Außerdem müssen die Fütterungsbedingungen, die Zusammensetzung des Futters und auch der Tag/Nacht-Rhythmus identisch sein (Papeleu et al. 2006).
Die Tiere werden von Janvier Labs, einem französischen Händler für Labortiere, der seit dem Jahr 2000 mit der ISO9001 zertifiziert ist, bezogen. Wistar-Ratten sind Albino-Ratten mit dunkelroten Augen. Ihre Lebenserwartung entspricht der von normalen Farbratten. In der vorliegenden Dissertation wurden ausschließlich stoffwechselgesunde Tiere verwendet.
Diese experimentelle Tierforschung wurde auf Grundlage der Richtlinie des europäischen Parlaments (2010/63/EU) durchgeführt sowie unter einem Aktenzeichen für die Tötung zur Organentnahme (K6/M12). Alle Personen, die in diesem Projekt tätig waren, haben gemäß §3 der Tierschutz-Versuchstierordnung einen Sachkundenachweis erbracht. Es wurden insgesamt 10 Ratten verwendet, die zwischen 12 und 14 Wochen alt waren. Ihr mittleres Gewicht lag bei 533,1 g und der durchschnittliche Glucosespiegel im Blut bei 181 mg/dl.

3.2.2. Isolation primärer Hepatozyten

Zur Isolation der primären Hepatozyten wurde ein modifiziertes zweistufiges Kollagenase-Perfusionsverfahren angewendet (Seglen (1972). Seglen ergänzte das durch Howard et al. (1967) erstmals erwähnte Verfahren zur Isolation durch Kollagenase und Hyaluronidase. Er gab der Kollagenase Lösung im zweiten Perfusionsschritt Calcium hinzu. Gebhardt (1998) entwickelte auf diesen Grundlagen ein Protokoll zur Isolation primärer Hepatozyten.

Zuerst werden die Perfusionslösungen HANKS I_1, HANKS I_2 sowie HANKS II auf 37°C im Wasserbad erwärmt. Die Lösungen sind am Tag des Versuches frisch herzustellen. HANKS, als wichtiger Bestandteil der Lösungen, kann aus 1,37 M NaCl, 53,6 mM KCL, 0,8 mM $MgSO_4$ $7H_2O$, 0,33 mM Na_2HPO_4 $2H_2O$ und 1 L Wasser 10-fach konzentriert bereits auf Vorrat hergestellt werden. Auch KREBS als Stock kann 4-fach konzentriert aus 472,3 mM NaCl, 19,3 mM KCL, 3,8 mM KH_2PO4, 4,8 mM $MgSO_4$ $7H_2O$, 95,2 mM $NaHCO_3$ in 500 ml Wasser angemischt werden. Beide müssen im Kühlschrank bei 4°C gelagert werden. Daraus kann am Versuchstag HANKS

HEPES (60 ml HANKS 10x, 25 mM $NaHCO_3$, 12,6 mM HEPES, 540 ml H_2O) hergestellt werden, daraus wiederum HANKS I (200 ml HANKS HEPES, 600 µM EGTA, 1.6 % BSA) und HANKS II (300 ml HANKS HEPES, 1,2 mM $CaCl_2\,2H_2O$). Alle drei Lösungen müssen 20 Minuten mit Carbogen (95 % O_2 und 5 % CO_2) begast werden, danach kann der pH auf 7.4 mit NaOH bzw. HCL eingestellt werden. Anschließend werden die Lösungen unter der Sterilwerkbank durch eine PES-Membran (0.22 µl) filtriert und abgefüllt. Im weiteren Vorgehen werden 0,2 ml Heparin in HANKS I_1 gegeben. Der OP-Bereich muss mit sterilen Tüchern abgedeckt und das OP-Besteck bestehend aus einer chirurgischen Pinzette, Schere, Ligaturen, gebogener Präzisionspinzette, Skalpell, Kanüle (14) und Klemme bereitgelegt werden. Als Unterlage dient ein Styroportisch, der mit Alufolie ausgekleidet auf den mit sterilen Tüchern abgedeckten OP-Bereich platziert wird. Jetzt kann das Tier gewogen und narkotisiert werden. Sobald die Ratte tief narkotisiert (Isofluran, inhalativ) ist, nehmen wir sie heraus und spritzen intraperitoneal 0.3 ml Heparin, um die Gerinnung des Blutes in der Leber zu verhindern und 0.2 ml Narcoren® (Papeleu et al. 2006).

Mit Klebestreifen wurde das Tier in dorsaler Lage an allen vier Extremitäten am Styroportisch fixiert, das Abdomen mit 70 % Ethanol desinfiziert. Entlang der *Linea alba* wird ein longitudinaler Schnitt, beginnend in der suprapubischen Region bis cranial auf Höhe der Axillarregion, durchgeführt. Es ist wichtig, die Bauchdecke stumpf vom Peritoneum zu entfernen, um die im Bauchraum liegenden Organe nicht zu verletzen. Die Bauchdecke kann nun seitlich mit Nadeln fixiert werden. Um wieder ein sauberes OP-Feld zu erlangen, müssen das Besteck und das noch geschlossene Peritoneum mit 1-fach PBS gespült werden, um die Fellhaare zu entfernen. Mit der gleichen Schnittführung, mit der eben die Bauchdecke eröffnet worden ist, kann nun auch der Bauchraum eröffnet werden. Wichtig ist hier, dass die Organe unverletzt bleiben. Nachdem das Peritoneum ebenfalls seitlich fixiert worden ist, kann der gesamte Magen-Darm-Trakt des Tieres außerhalb der Ratte nach links verlagert werden. Dadurch erhält man gute Sicht auf die Leber und deren Gefäße, die für die Perfusion gebraucht werden. Es sind zwei Ligaturen an der *Vena Portae* und eine an der *Vena cava inferior* anzubringen. An der *Vena portae* wird die erste Ligatur maximal distal der Leber und die zweite Ligatur circa 5 mm weiter proximal angelegt, beide bleiben noch lose. Auch an der *Vena cava inferior* wird die Ligatur erst zu einem späteren Zeitpunkt zugezogen. Zwischen den beiden Ligaturen an der Portalvene wird nun die Kanüle (20 G x $1\frac{1}{2}$‘‘, 14 mm) in einem flachen Winkel eingeführt. Zur Befestigung dieser kann die proximale Ligatur zugezogen werden.

Da alles für die Perfusion vorbereitet ist, kann die peristaltische Pumpe mit 20 ml/min gestartet werden. Es ist darauf zu achten, dass sich keine Luft in dem Schlauch befindet. Die Pumpe kann nun an die Flexüle angeschlossen und die Leber mit einem EGTA-haltigen Puffer perfundiert

werden. Dieser dient dazu, das restliche Blut aus der Leber zu spülen und durch Komplexbildung die Calcium-Ionen zu entziehen, um somit die Desmosomen, die die Zellen miteinander verbinden, irreversibel zu trennen. Anschließend folgt für 5 Minuten die Perfusion (10 ml/min) mit HANKS II, zu der kurz vorher 30 mg Kollagenase hinzugefügt worden ist. Dieser Puffer enthält Calcium, da dies gebraucht wird, um die Kollagenase zu aktivieren (Seglen 1972). Nachdem die Ligatur der *Vena cava inferior* nun auch festgezogen ist, die Perfusionsgeschwindigkeit auf 5 ml/min reduziert worden ist, kommt es dadurch zum Anschwellen der Leber. Es ist zu sehen, dass sie ihre Struktur verliert und keine typische dunkelrot-bräunliche Färbung mehrzeigt.

Um den Verdau der Leber fortzuführen, werden 100 ml HANKS II (Aufnahmepuffer) mit 10 mg Kollagenase versetzt, die Leber vorsichtig aus dem Tierkörper entnommen und in eine Petrischale überführt. Alle weiteren Schritte werden unter der Sterilwerkbank durchgeführt. Dort wird die Leber mit einem Skalpell zerkleinert und nun das Gewebe in den Aufnahmepuffer vorsichtig pipettiert und geschwenkt. Dieser wird bei 37 °C 10 min inkubiert und gelegentlich leicht geschüttelt. Es ist äußerst wichtig, dass die Zellen kaum mechanischer Beanspruchung ausgesetzt werden. Um grobe unverdaute Teile der Leber aufzufangen, wird die Lebersuspension durch ein Zellsieb filtriert (100 µm) und auf 4 Falcons je 25 ml aufgeteilt. Die KREBS I Lösung kann aus dem Stock hergestellt werden (50 ml KREBS 4x, 231.3 µM $CaCL_2$ $2H_2O$, 31.5 mM HEPES, 150 ml H_2O), um damit die Falcons auf jeweils 50 ml aufzufüllen. Die Zellsuspension kann nun bei 4 °C 3 min mit 550 rpm zentrifugiert werden, danach wird der Überstand in ein neues Falcon gefüllt und das Pellet verworfen. Darauf folgt eine weitere Zentrifugierung bei 4 °C 10 min mit 2200 rpm, sodass jetzt das Pellet übrigbleibt, welches in PBS resuspendiert auf 50 ml aufgefüllt worden ist. Es folgen zwei weitere Zentrifugationsvorgänge. Nun können 3,3 ml der Zellsuspension in vorher vorbereitete PERCOLL-Röhrchen gefüllt werden. Die PERCOLL Lösung dient zur Dichtegradientenzentrifugation und besteht aus zwei Schichten (50 % und 25 %), die jeweils aus der Stock -Lösung (Sigma Aldrich) und DPBS (Cytogen) hergestellt werden. Wichtig hierbei ist, dass sich die Schichten nicht untereinander vermischen. Nach einer erneuten Zentrifugation bei 4 °C 25 min mit 2200 rpm bildet sich zwischen den PERCOLL-Schichten eine Phase, die vorsichtig abgesaugt und in ein neues Falconröhrchen überführt wird. Nachdem die Suspension nun mit PBS auf 14 ml aufgefüllt und nochmals zentrifugiert worden ist, kann das Pellet mit 10 ml DMEM resuspendiert und in eine Petrischale zur Inkubation bei 37 °C für 20 min gegeben werden. Es folgt die Überführung in eine Zellkulturschale und nach 15 min Inkubation, bei gleichbleibender Temperatur, wird der Überstand in eine kollagenbeschichtete Zellkulturschale gefüllt. Die Inkubationszeit erstreckt sich dann über Nacht bei 37 °C, 5 % CO_2 und 100 % Luftfeuchtigkeit. Am nächsten Tag erfolgen

die mikroskopische Kontrolle der Zellen, die Bestimmung der Vitalität und Zellzahl und daraufhin das Ausplattieren der Hepatozyten auf die kollagenbeschichteten 6-Well-Platten.

3.2.2.1. Bestimmung der Zellzahl und Vitalität

Die Bestimmung der Zellzahl und der Vitalität ist wichtig, um die Menge der Zellsuspension zu errechnen, die in ein Well der Platten gefüllt werden muss, um eine konstante Zellzahl für alle Versuche zu erlangen. Es wird dafür die Methode mit der Fuchs-Rosenthal Zählkammer verwendet. Die Zellen werden hierfür in 15 ml Waschpuffer aufgenommen, daraus werden 20 µl der Zellsuspension mit 60 µl PBS zusammen in ein Eppendorf-Mikroreaktionsgefäß gefüllt und mit 80 µl Trypanblau vorsichtig vermischt. Die Herstellung der Zellsuspension erfolgt steril, da die Zählkammer und das Mikroskop nicht steril sind, wird die Probe in ein steriles Eppi-Cap gefüllt. 10 µl davon werden in die Zählkammer gefüllt. Trypanblau bindet an Proteinen und somit nur an Zellen, deren Zellmembran nicht mehr intakt ist, die also nicht mehr lebendig sind. Dadurch sind tote Zellen blau eingefärbt und vitale Zellen bleiben hell. Es werden nun sowohl die toten als auch die vitalen Zellen separat gezählt. Die Zellzahl je 15 ml, da auf 15 ml verdünnt wird, errechnet sich aus folgender Gleichung:

$$Mittelwert\ der\ Zellzahl\ der\ ausgezählten\ Quadranten\ x\ Verdünnungsfaktor\ x\ 10\ 00.$$

Die Vitalität wird in Prozent angeben und kann durch folgende Formel berechnet werden:

$$\frac{vitale\ Zellzahl\ x\ 100}{ges.\ Zellzahl}.$$

3.2.3. Experimentelles Design

Der Versuchsansatz erstreckte sich über zwei Tage. Am ersten Tag wurden die Zellen isoliert, die Vitalität bestimmt und 6-Well-Platten steril ausplattiert. Die Platten mussten zuvor mit Collagen-Typ 1 steril beschichtet werden, da Hepatozyten ohne die Beschichtung (*Coating*) nur eine sehr schlechte Haftung erzielen und häufig seneszent werden. Außerdem wird durch das *Coating* die Differenzierung der primären Zellen gefördert (Isom et al. 1985; Koike et al. 1996). Um reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen, befand sich in jedem Well die gleiche Zellzahl, 6 x 10^5 Zellen/ml. Die primären Hepatozyten konnten nun zusammen mit einem geeigneten Medium in die Well-Platten gefüllt werden. Dieses bestand aus MEM (*Eagle's Minimal Essential Medium,* ein synthetisches Nährmedium), 5 % FKS, 500 ng/ml Insulin, 50 µg/ml Gentamycin. Für 2 h verblieben sie im Brutschrank um anzuheften (Levitsky et al. 1994). Nach dieser Zeit wurde das Medium ausgewechselt und über Nacht inkubiert. Das neue Medium bestand aus HGM

(*hepatocyte growth medium*), 5 % FKS, Dexamethason und Wachstumsfaktoren. Tag zwei begann mit der Kontrolle der Zellen im Mikroskop und anschließend wurde das Medium abgenommen. Auf die Zellen wurde nun ein Medium ohne Glucose gegeben (DMEM –Glucose), damit die Zellen für 6 h „hungern". Anschließend folgte die Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen Glucose und Insulin. Für die Glucose wurden folgende Konzentrationen gewählt: 2,8 mM, 5,5 mM, 11,1 mM, 25 mM (Bissell et al. 1978; Nagarajan et al. 2019). Insulin kam in Konzentrationen von 0 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM zur Anwendung (Peschke et al. 2006). In diesem Design erfolgten zwei Versuchsansätze. Eine Kurzzeitstimulation mit 2 h und eine Langzeitstimulation mit 18 h (Levitsky et al. 1994). Nach Beendigung der Einwirkzeiten wurden die primären Hepatozyten abgelöst. Dazu wurden die Zellkulturschalen auf Eis gestellt und das Medium abgesaugt. Anschließend folgte zweifach eine Spülung mit kaltem PBS. Nach sorgfältigem Entfernen des Puffers konnte eine Hälfte der Platten mit 50 µl RIPA-Puffer befüllt werden, dann bei 4 °C für 20 min inkubiert und folgend vorsichtig mit einem Zellschaber werden. Die andere Hälfte der Platten wurde mit 200 µl TRIzol™ befüllt und direkt mit einem Zellschaber entfernt, dieser Vorgang musste aufgrund des Phenols, dass in der Substanz enthalten ist, unter dem Abzug erfolgen. Die geernteten Zellsuspensionen wurden jeweils in zuvor beschriftete Eppendorf-Gefäße überführt und bei -80 °C gelagert.

3.2.4. Proteinanalysen

3.2.4.1. *Proteinkonzentrationsbestimmung*

Angelehnt an den Lowry-Test (1951) wurde von Smith et al. (1985) die BCA-Methode veröffentlicht. Bei dem BCA-Test werden Proteine mittels Bicinchoninsäure quantitativ bestimmt. Jeweils 5 µl der Proteinprobe der primären Hepatozyten werden mit 45 µl Natriumchlorid verdünnt und 10 µl von diesem Gemisch werden in Doppelbestimmung auf eine durchsichtige 96-Well-Platte aufgetragen. Es werden 200 µl der Reaktionslösung hinzugegeben. Die Reaktionslösung besteht aus BCA und Kupfersulfat-Pentahydrat in einem Verhältnis von 50:1. Zweiwertige Kupferionen binden an die Peptide und werden bei alkalischem pH zu einwertigen Kupferionen, die wiederrum in Anwesenheit von BCA einen blau-violetten Farbstoffkomplex verursachen. Es folgt eine Inkubationszeit von 30 min bei 37 °C. Bei einer Wellenlänge von 560 nm wird der entstandene Farbstoff quantifiziert. Bei dieser Messung wird eine Standartreihe von BSA mit 0,9 % NaCl (BCA Konzentrationen: 1 µg/µl, 0,8 µg/µl, 0,6 mg/µl, 0,4 µg/µl, 0,2 µg/µl, 0.´,1 µg/µl, 0 µg/µl) mitgeführt und der Leerwert der Platte abgezogen.

3.2.4.2. *Auftrennung von Proteinen*

Um mit dem Auftrennen der Proteine aus den primären Hepatozyten starten zu können, müssen Natrium-Dodecyl-Sulfat-Gele hergestellt werden. Dazu wurde eine Apparatur der Firma peQlab Biotechnology GmbH verwendet. In diese Apparatur konnten zwei Glasplatten eingespannt werden, die zuvor mit 70 % Ethanol gereinigt wurden. Zuerst wurde das Trenngel (Rezept siehe unten) hergestellt und zwischen die Platten pipettiert, nach dessen vollständiger Polymerisierung folgte das Sammelgel, in welches abschließend ein Plastikkamm mit 15 Vertiefungen eingesetzt wurde.

Die häufigste Labormethode zum Auftrennen von Proteinen ist die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese, kurz SDS-PAGE. Die Proben werden mit einem Probenpuffer versetzt, der aus 950 µl SDS und 50 µl Mercaptoethanol besteht. Durch das Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS) werden die Proteine aufgefaltet und erhalten eine negative Ladung, die proportional zur Masse ist, weil SDS stabil an die Aminosäure-Kette bindet. Die Disulfidbrücken im Protein werden durch Mercaptoethanol aufgelöst. Das Probenmaterial wird bei 95 °C für 5 Minuten denaturiert. In dem Polyacrylamidgel können die Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt werden, kleine Moleküle wandern schneller durch das Gel. Polyacrylamidgel dient dabei als molekulares Sieb. Es besteht aus zwei Anteilen, dem Sammelgel und dem Trenngel. Der Unterschied liegt im Anteil des Polyacrylamids, bei dem Sammelgel beträgt er 7 %, bei dem Trenngel hingegen beträgt der Anteil 10 %.

Das fertige Gel kann nun in die Elektrophoresekammer eingesetzt, der Puffertank mit 1 x Laufpuffer aufgefüllt und die Proben zu gleichen Volumina in die Geltaschen gefüllt werden. In jedem Gel wird ein Proteinmolekularmarker mitgeführt, um die Höhe der Proteine genau ermitteln zu können. Dieser befindet sich stets in der ersten Tasche. Die Auftragung der Proben ist aus Abb. 1 zu entnehmen.

Gel		Gel	
1	Marker	1	Marker
2	2,8mM Glucose/ ohne Insulin	2	1nM Insulin/ 2,8mM Glucose
3	2,8mM Glucose/ ohne Insulin	3	1nM Insulin/ 2,8mM Glucose
4	2,8mM Glucose/ ohne Insulin	4	1nM Insulin/ 2,8mM Glucose
5	2,8mM Glucose/ 1nM Insulin	5	1nM Insulin/ 5,5mM Glucose
6	2,8mM Glucose/ 1nM Insulin	6	1nM Insulin/ 5,5mM Glucose
7	2,8mM Glucose/ 1nM Insulin	7	1nM Insulin/ 5,5mM Glucose
8	2,8mM Glucose/ 10nM Insulin	8	1nM Insulin/ 11,1mM Glucose
9	2,8mM Glucose/ 10nM Insulin	9	1nM Insulin/ 11,1mM Glucose
10	2,8mM Glucose/ 10nM Insulin	10	1nM Insulin/ 11,1mM Glucose
11	2,8mM Glucose/ 100nM Insulin	11	1nM Insulin/ 25mM Glucose
12	2,8mM Glucose/ 100nM Insulin	12	1nM Insulin/ 25mM Glucose
13	2,8mM Glucose/ 100nM Insulin	13	1nM Insulin/ 25mM Glucose
14	Pankreas	14	Pankreas
15	Leberlysate	15	Leberlysate

Abb. 1: Auftragung der PCR-Proben auf ein SDS-Gel mit 15 Geltaschen, beispielhaft dargestellt für die Konzentrationen 2,8 mM Glucose und 1 nM Insulin. Die Auftragung wurde für alle weiteren Konzentrationen identisch angewendet (5,5 mM Glucose, 11,1 mM Glucose, 25 mM Glucose; 10 nM Insulin, 100 nM Insulin, ohne Insulin).

Die Auftrennung erfolgt elektrophoretisch, 1 h bei 80 mV, dann befinden sich die Proteine gesammelt im Trenngel und die weitere Auftrennung erfolgt bei 110 mV für 2-3 h.

Nachdem Southern 1975 das erste Blot-Verfahren eingeführt hatte für den Nachweis von DNA-Fragmenten, wurde der Nachweis von RNA als Northern-Blot und der von Proteinen als Western Blot bezeichnet. Die Auftrennung von Proteinen durch SDS-PAGE muss zuvor erfolgen. Die Proteine werden mithilfe eines elektrischen Felds von dem Polyacrylamidgel auf eine, durch Methanol aktivierte, Polyvinylfluorid (PVDF)-Membran übertragen. Die Membran ist zuvor auf die Größe des Gels zugeschnitten worden. Der Aufbau des Blots erfolgt wie in Abb. 2 gezeigt, es wird darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten befinden.

Bei einer Spannung von 250 mA wird für 18 h geblottet.

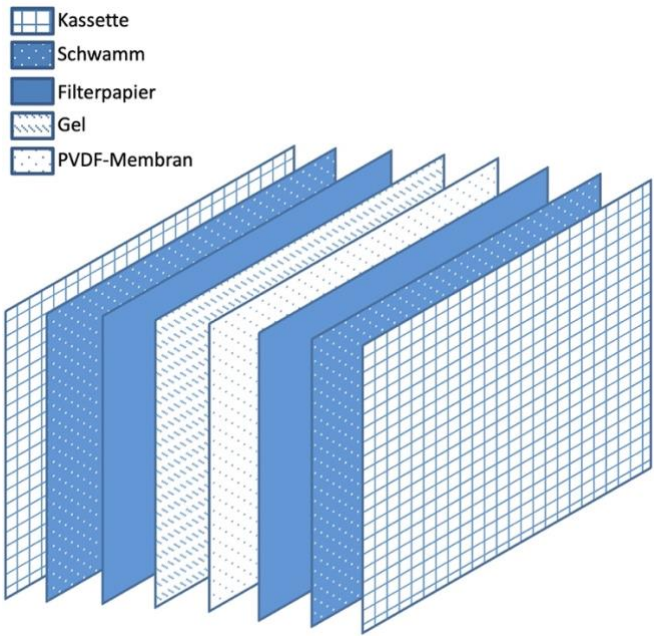

Abb. 2: Schematische Darstellung Aufbau Western Blot. Eigene Darstellung.

3.2.4.3. *Nachweis von Proteinen*

Nachdem die Proteine fest auf der Membran verankert sind, müssen die freien Bindungsstellen auf der Membran für 1 h blockiert werden, durch Milchpulver oder Bovines Serumalbumin (BSA). Der primäre Antikörper inkubiert über Nacht und bindet direkt an das gesuchte Protein mit einem Antikörper-Antigen-Komplex. Durch Waschen der Membran werden unspezifisch gebundene Antikörper entfernt, sodass der sekundäre Antikörper nur an den spezifisch gebundenen primären Antikörper bindet. Die Membran wurde 1 x mit 1-fach Blotto gewaschen und mit dem sekundären Antikörper für 1 h inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde, da alle verwendeten Primärantikörper aus dem Kaninchen stammten, ein HRP-linked Anti-rabbit IgG (1:1000, Cell Signaling, 7074) verwendet. Dieser ist mit einem Enzym (HRP) verbunden, welches eine Farbreaktion katalysiert. Die Detektion erfolgt mit Western Bright Quantum (Advansta). Die Substanz wird gleichmäßig auf die Membran aufgetragen, für zwei Minuten inkubiert und danach abgenommen. Die Membran wird in eine Folie geschlagen und durch die hochempfindliche Analysekamera des Fusion Fx7 (peQlab Biotechnology) können Fluoreszenzaufnahmen aufgenommen werden. Aufgrund der umfangreichen Menge an erhobenen Daten wurden exemplarisch Fluoreszenzaufnahmen der Western Blot Ergebnisse präsentiert.

3.2.5. Transkriptnachweise

3.2.5.1. RNA-Isolierung und Extraktion

Aus den Zellpellets der primären Hepatozyten wird auch die RNA isoliert. Bei der Isolierung der RNA ist es wichtig, die RNA frühzeitig von RNasen zu trennen. Die Methode beruht darauf, dass die Zellen lysiert werden und somit die RNAsen denaturieren. Es folgt eine Auftrennung der übrigen zellulären Bestandteile. Für die Gewinnung der RNA aus dem Probenmaterial wird die Single-Step-Methode mit der Reagenz TRIzol™ nach Chomczynski und Sacchi (1987) angewendet.

Durch das im TRIzol™ enthaltene Guanidiniumthiocyanat werden die Zellen lysiert und RNasen inaktiviert. Phenol ist ebenfalls in dem Reagenz enthalten und löst die RNA. Nach der Zugabe von 200 µl Chloroform sind drei Phasen zu erkennen. In der unteren Phase, Chloroformphase, befinden sich Proteine, in der Interphase DNA. Die obere, wässrige, Phase enthält RNA und wird mit Isopropanol präzipitiert.

Der erste Arbeitsschritt war die Zugabe von TRIzol™ (500 µl/je 6-Well) zu dem extrahierten Gewebe. Die Zellen werden durch mehrmaliges Aufziehen lysiert und können dann in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt werden. Um eine vollständige Dissoziation der Nukleotidkomplexe zu erreichen, folgt eine fünfminütige Inkubationszeit. Durch die Zugabe von Chloroform (0,2 ml/1 ml TRIzol™-Reagenz), wird in einer weiteren Inkubationszeit von 10 Minuten die Abtrennung der übrigen Gewebsbestandteile von der RNA erreicht. Durch Zentrifugation, bei 12000 rpm 5 Minuten, kann die Phasentrennung erreicht werden. Wie bereits erwähnt, befindet sich in der oberen Phase RNA, deshalb wird diese Phase wird abgenommen und mit Isopropanol versetzt (0,5 ml/1 ml TRIzol™), nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten auf Eis ist die RNA ausgefällt. Nach einer erneuten Zentrifugation entsteht ein Pellet, welches mit 70 % Ethanol (1 ml/1 ml TRIzol™) gewaschen wird. Ethanol wird nach erfolgter Zentrifugation (12000, 10 min, 4 °C) vorsichtig abgenommen und das Pellet 5-10 Minuten an der Luft getrocknet. Nachdem das Pellet in RNase-freiem Wasser (60 µl) gelöst und im Wärmeblock für 5 Minuten bei 60 °C erwärmt worden ist, kann das Eppendorf-Gefäß nun bei -80 °C gelagert werden.

Es wird ständig mit RNase-freien Materialien gearbeitet, denn die RNA ist immer der Gefahr ausgesetzt, von den stabilen RNasen enzymatisch abgebaut zu werden. RNasen sind wesentlich stabiler als die ihnen verwandten DNasen und benötigen auch keine Cofaktoren wie z.B. Magnesium für ihre katalytische Aktivität. Deshalb muss unbedingt eine Kontamination mit RNasen verhindert werden.

3.2.5.2. *c-DNA Synthese*

Um sicher zu gehen, dass keine DNA in den Proben enthalten ist, ging der RT-PCR ein DNA-Verdauungsschritt voraus durch das Enzym DNase.
Im Folgenden sind die Arbeitsschritte kurz zusammengefasst aufgeführt:

DNase-Behandlung von RNA-Proben

1. Zugabe von 2 µl DNAse-Puffer zu je 20 µl RNA in Lösung im 1,5 ml Eppendorfgefäß auf Eis
2. Zugabe von 1 µl DNAse-Enzym
3. Proben vortexen
4. Inkubation bei 37 °C für 25 min
5. Zugabe von 2 µl DNAse-Inaktivierungsreagenz je Ansatz
6. Proben vortexen
7. Inkubation bei Raumtemperatur für 2 min; zwischendurch die Proben vortexen
8. Zentrifugation 90 s (Eppendorfzentrifuge 10000 rpm, bei Raumtemperatur)
9. Proben auf Eis stellen
10. Überstand (DNA-freie RNA) in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß übertragen
11. Proben messen und bei -80 °C lagern

3.2.5.3. *Real-time PCR*

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der Vervielfältigung beliebiger Nukleinsäuresequenzen und deren Quantifizierung in vitro. In Echtzeit kann die Amplifikation verfolgt werden, nach jedem Amplifikationszyklus wird die Menge der entstandenen DNA gemessen und analysiert, um Aussagen über die Kinetik der Amplifikationsreaktion zu treffen. Es wird kein gesamter DNA-Doppelstrang vervielfältigt, sondern nur bestimmte Abschnitte, diese müssen für die DNA-Polymerase gekennzeichnet werden. Die DNA-Polymerase benötigt synthetisch hergestellte DNA-Oligonucleotide, sogenannte Startsequenzen (Primer), die aus 20-30 Basenpaaren bestehen. Dadurch kann die DNA-Polymerase einen komplementären DNA-Strang, ausgehend vom 3`-Ende der Primer, synthetisieren. Um gezielt eine DNA-Sequenz amplifizieren zu können, ist es wichtig, Primer mit komplementären Sequenzen auf den gegenüberliegenden Strängen der Template-DNA auszuwählen. Die PCR weist drei Temperaturzyklen auf, Denaturierung, Annealing und Elongation. Für eine genaue Einhaltung

dieser Zyklen werden sogenannte Thermocycler verwendet, das Gerät ist in der Lage, die Temperaturzyklen einer Polymerase-Kettenreaktion selbstständig durchzuführen. Um die Anlagerung der Primer an die Sequenz zu ermöglichen, wird die DNA zuerst auf 90 °C erhitzt und denaturiert, sodass sich die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basenpaaren auflösen und zwei Einzelstränge entstehen. Die im Überschuss vorliegenden Primer können sich nun an die komplementäre Sequenz der Einzelstränge, durch die Abkühlung des Reaktionsgemisches, anlagern (Annealing). Die Temperatur ist primer-spezifisch. Bei 70 °C haben die DNA-Polymerasen ihre optimale Arbeitstemperatur und beginnen nun mit der Anlagerung von komplementären Basenpaaren an den Primern (Elongation). Es sind nun aus zwei Einzelsträngen zwei Doppelstränge entstanden (Abb. 3).

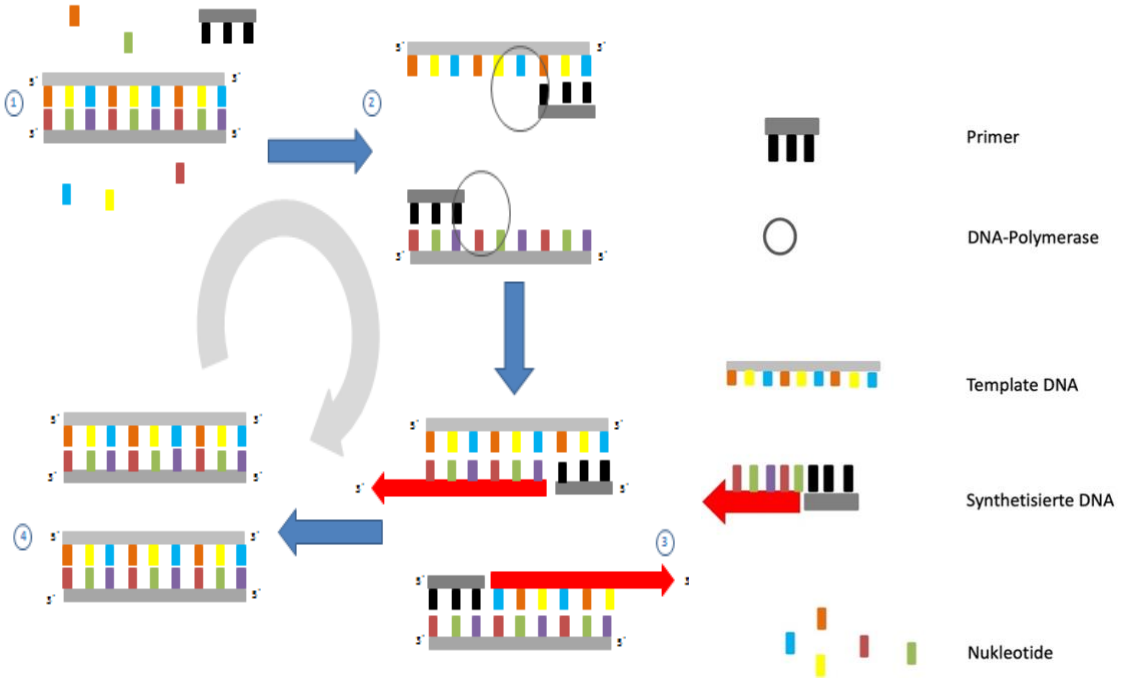

Abb. 3: Schematische Darstellung der PCR. Eigene Darstellung.

Diese Zyklen wiederholen sich. Nach jedem Zyklus wurde die Ziel-DNA Sequenz verdoppelt, sodass nach mehreren Zyklen eine exponentielle Anreicherung zu beobachten ist. Der Vorteil der verwendeten real-time PCR ist, dass auch bei schwach exprimierten Genen, aufgrund der hohen Sensitivität, nach wenigen Amplifikationszyklen ein Unterschied des mRNA-Gehalts nachweisbar ist. Der Name real-time sagt, das direkt nach jedem Amplifikationszyklus die Menge der synthetisierten DNA gemessen werden kann. Dazu gibt man einen Fluoreszenzfarbstoff hinzu, dieser reagiert mit der neu synthetisierten DNA und ermöglicht die Messung der Fluoreszenz. Dabei ist die Fluoreszenzintensität proportional zur Menge der DNA im

Reaktionsansatz. Im Idealfall wurde die Ausgangs-DNA Menge nach 30 Zyklen um das 10^6-fache vervielfältigt.

Die Reverse Transkription, als Vorbereitung der Proben zur PCR, wird mit dem *Convenient System for Reverse Transcription* (Promega Corporation, Madison, WI, USA, A3500) durchgeführt. Die Gesamtmenge von 20 µl pro Ansatz darf die RNA-Konzentration von 1 µg/µl nicht übersteigen. Zu 4 µl cDNA folgen 4,5 µl Nuklease-freies Wasser, 0,25 µl Fluoreszenzfarbstoff. Im Mastermix, wovon 10 µl der Probe zugegeben werden, befinden sich folgende Inhalte: 4 µl $MgCl_2$, 2 µl RT, 2 µl dNTP's, 0,5 µl rekombinant RNasin Ribonuklease Inhibitor, 0,63 µl AMV reverse Transkriptase, 1 µl Random Primer.

3.3. Statistische Auswertung der Western-Blot Ergebnisse

Durch das Statistikprogramm GraphPad 7 (GraphPad Software Inc., CA, USA) ist es möglich, einen ungepaarten Mann-Whitney U-Test, für nicht standardnormalverteilte Varianzen, durchzuführen. Als statistisch signifikant werden Ergebnisse mit einem Signifikanzniveau kleiner als 5 % ($p < 0,05$) eingestuft. Die Daten werden als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben (± SEM).

4. Ergebnisse

Isolierte primäre Hepatozyten wurden verwendet, um Effekte von Insulin und/oder Glucose unter verschiedenen Bedingungen auf den Glucosestoffwechsel zu untersuchen. Damit sollte auch festgestellt werden, wie reaktionsfreudig primäre Hepatozyten sind und ob sich diese als Modellsystem für Untersuchungen des hepatischen Glucosestoffwechsels eignen. Dazu wurden Glucosetransporter und Enzyme an Schlüsselstellen der Glykolyse und der Gluconeogenese herangezogen. Nach einer Kurz- und einer Langzeitstimulation der Hepatozyten von 2 h und 18 h konnte die Proteinmenge der Glucosetransporter GLUT-1 und GLUT-2 sowie der Enzyme Glucose-6-Phosphatase (G6P), Glucokinase (GCK) und Phosphoenolpyruvatcarboxykinase (PEPCK) mittels Western Blot nachgewiesen und verglichen werden. Die Stimulation erfolgte mit Glucose in folgenden Konzentrationen: 2,8 mM, 5,5 mM, 11,1 mM und 25 mM, außerdem mit Insulin in den Konzentrationen 1 nM, 10 nM und 100 nM. Dabei wurden 5,5 mM Glucose (normoglykämisch) und die Behandlung ohne Insulin als Referenzwerte (Kontrolle) genommen.

Es sind zwei verschiedene Auftragungsarten der Proben im Western Blot angewandt worden. Zum einen wurde die Glucosekonzentration konstant gesetzt und die Veränderung der Proteinmenge von Glucose Transportern oder Enzymen durch Insulin gemessen. Damit ließ sich feststellen, wie unterschiedliche Insulinkonzentrationen unter einer gleichbleibenden Glucosekonzentration wirken. Zum anderen wurde der Einfluss von unterschiedlichen Glucosekonzentrationen unter einer gleichbleibenden Insulinkonzentration betrachtet.

Vor Beginn der Experimente wurde mittels PCR überprüft, ob die zu untersuchende Enzyme des Glucosestoffwechsels sowie die Glucosetransporter in isolierten primären Hepatozyten vorhanden sind. Die Gelbilder in Abb. 4 verdeutlichen, dass die Transkripte von *G6p*, *Gck* und *Pepck* sowie Transkripte der Glucosetransporter (*Glut1, Glut2*) in primären Hepatozyten nachweisbar sind. Demgegenüber ist beispielsweise in der zum Vergleich hinzugezogenen Zelllinie MH1C1 kein *Gck*-Transkript nachweisbar. MH1C1 ist eine etablierte Leberzelllinie der Ratte, die grundsätzlich Eigenschaften zeigt, die denen tumorös veränderter Zellen ähneln, was dazu führt, dass hepatische Stoffwechselwege verändert sein können. Auch Sternzellen, als ein Zelltyp des Lebergewebes, weist nicht alles Enzyme des Glucosestoffwechsels auf. Im Pankreas und einer pankreatischen Zelllinie (INS-1), als Negativkontrollen geführt, sind die Enzyme *Pepck, G6pc* und *Gck* nicht nachweisbar. Dagegen kommen die Glucosetransporter *Glut-1* und *Glut-2* im Pankreas und in der Leber vor.

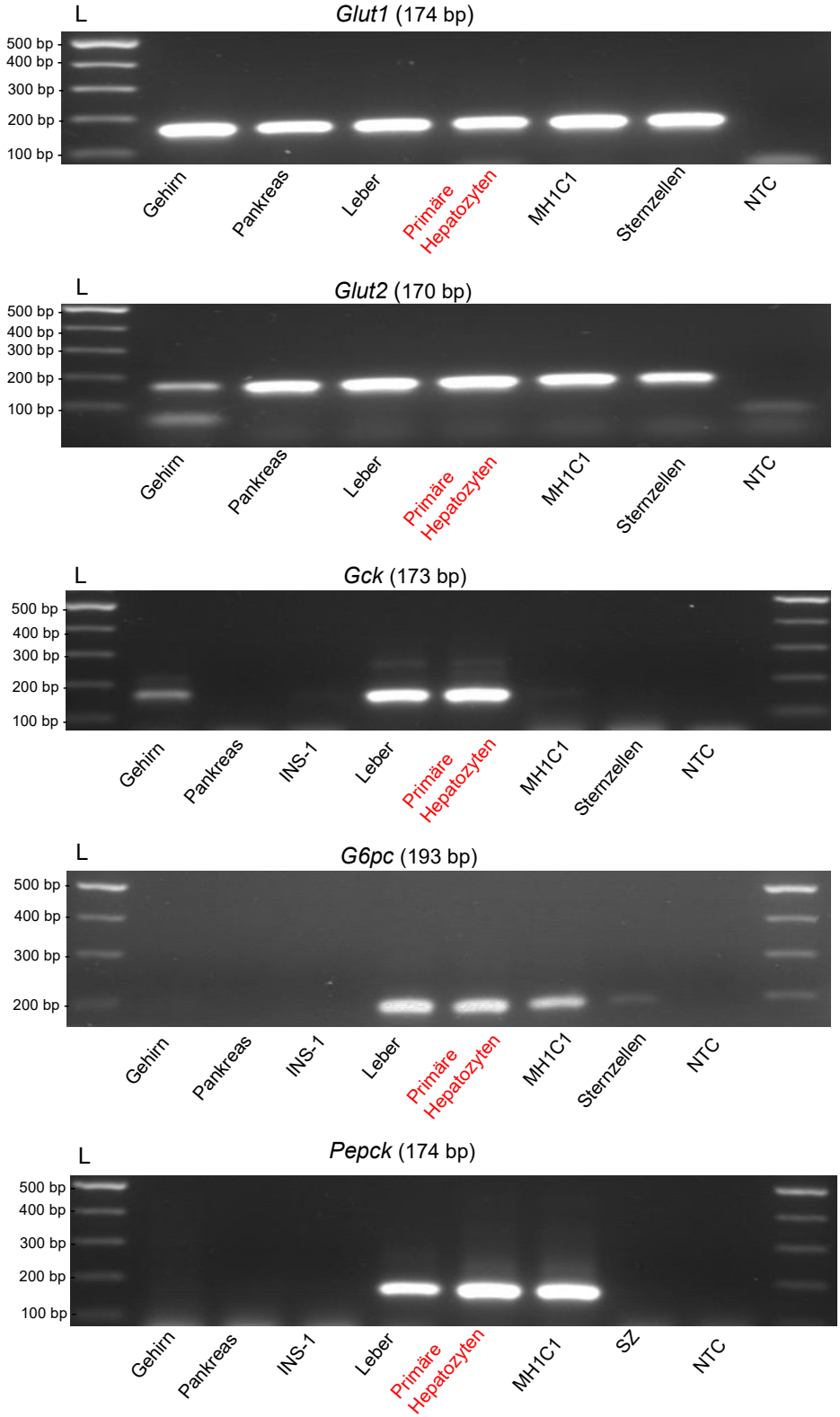

Abb. 4: Nachweis der mRNA vom Glucosetransporter-1 (Glut1, 174 bp), Glucosetransporter-2 (Glut2, 170 bp), Glucokinase (Gck, 173 bp) und Glucose-6-Phosphatase (G6pc, 193 bp) und Phosphoenolpyrvatcarboxykinase (Pepck, 174 bp) mittel real-time PCR. Nachweis in verschiedenen Zelllinien und Geweben der Wistar-Ratte. L: Standard, INS-1 (Ratteninsulinomazelllinie), NTC: Wasserkontrolle.

4.1. Untersuchung der Glucosetransporter unter verschiedenen Bedingungen an primären Hepatozyten

4.1.1. Glucosetransporter-1 (GLUT-1)

Bei der Stimulation mit 2,8 mM Glucose über 2 h ist eine Abnahme der Proteinmenge bei Zugabe von 1 nM Insulin zu sehen. Steigt die Insulinkonzentration auf 10 nM an, ist eine weitere, signifikante Abnahme, auf 63,79 %, zu beobachten. Die Langzeitstimulation zeigt keine signifikanten Unterschiede. Es ist eine Abnahme um 23,5 % von GLUT-1 unter 1 nM Insulin zu verzeichnen. Die gemessenen Daten decken sich auch mit den sichtbaren Ergebnissen des Western Blots, beispielhaft gezeigt (Abb. 5).

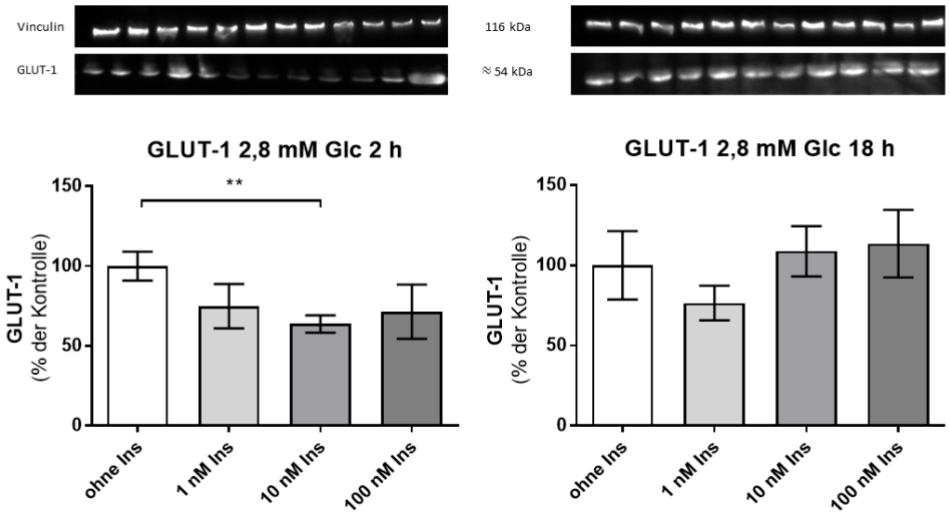

*Abb. 5: Vergleich der Proteinmenge von GLUT-1 nach 2 h und 18 h in primären Hepatozyten unter 2,8 mM Glucose bei Stimulation mit Insulinkonzentrationen von 1 nM, 10 nM, 100 nM und ohne Insulin (= Kontrolle). Die Gelbilder über den Diagrammen zeigen die Proteinexpression durch spezifische Banden, dargestellt mit dem Housekeeping-Gen Vinculin (3 Proben jeweils ohne Ins, 1 nM Ins, 10 nM Ins, 100 nM Ins). Sternchen symbolisieren Signifikanzen zur Kontrollgruppe: *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001. Daten in Mittelwert ± SEM von n=5 unabhängigen Experimenten mit je n=3 Auftragungen pro Probe, je Inkubationszeit. Auftragung der PCR-Proben siehe Abb. 4.*

Unter normoglykämischer Bedingung (5,5 mM Glucose) ist eine Zunahme der GLUT-1 Proteinmenge mit steigenden Insulinkonzentrationen nach 2 h zu sehen. Unter der Stimulation mit 100 nM Insulin erhöht sich die Proteinmenge um 106 %, jedoch mit einer Standartabweichung von 45,7 %. Nach 18 h Inkubation sind dagegen die Proteinmengen unter 1 nM und 10 nM Insulin annähernd bei 100 % (101,3 %; 96,58 %), während die Menge unter 100 nM Insulin auf 60,35 % sinkt (Abb. 6).

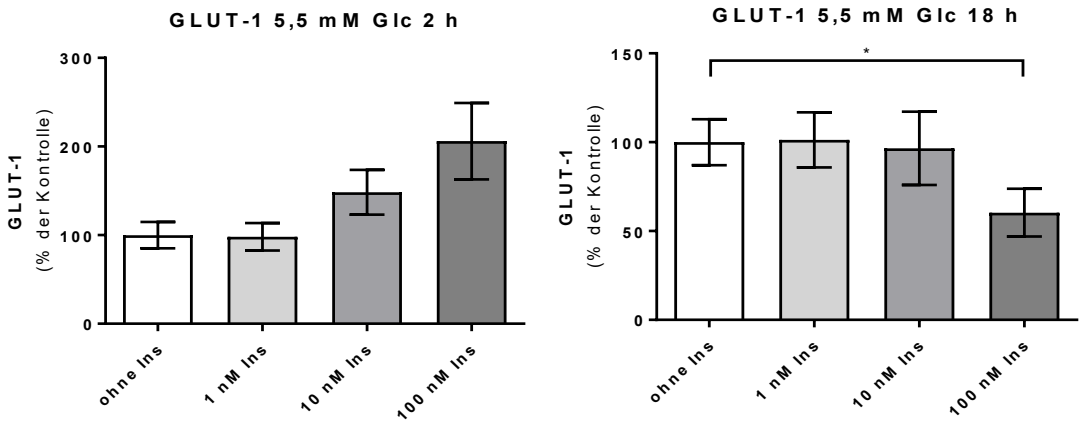

*Abb. 6: Vergleich der Proteinmenge von GLUT-1 nach 2 h und 18 h in primären Hepatozyten unter 5,5 mM Glucose bei Stimulation mit Insulinkonzentrationen von 1 nM, 10 nM, 100 nM und ohne Insulin (= Kontrolle). Sternchen symbolisieren Signifikanzen zur Kontrollgruppe: *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001. Daten in Mittelwert ± SEM von n=5 unabhängigen Experimenten mit je n=3 Auftragungen pro Probe, je Inkubationszeit.*

Die Messung von GLUT-1 zeigt unter 11,1 mM Glucose nach 2 h eine Abnahme unter 100 nM Insulin um 11,28 %. Dies ist nach 18 h unter diesen Bedingungen noch deutlicher zu sehen, da die Proteinmenge fast um die Hälfte gesunken ist, auf 52,85 % (Abb. 7).

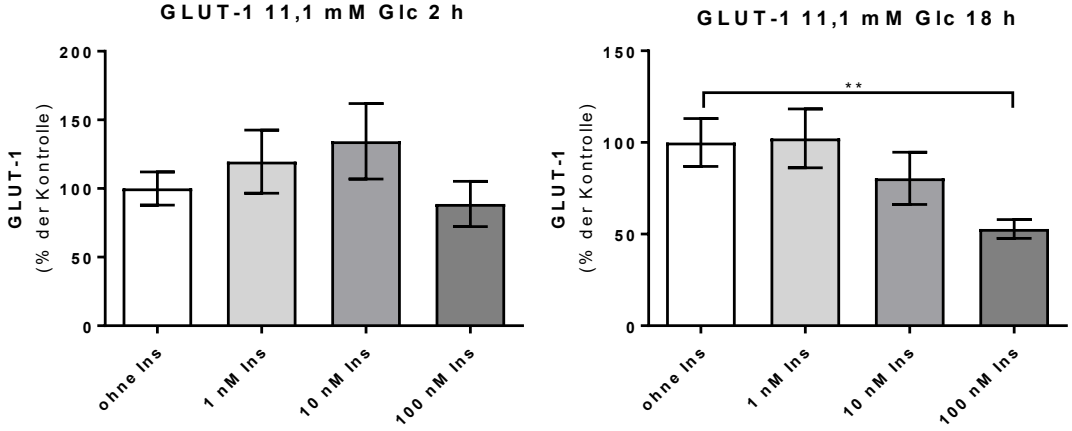

*Abb. 7: Vergleich der Proteinmenge von GLUT-1 nach 2 h und 18 h in primären Hepatozyten unter 11,1 mM Glucose bei Stimulation mit Insulinkonzentrationen von 1 nM, 10 nM, 100 nM und ohne Insulin (= Kontrolle). Sternchen symbolisieren Signifikanzen zur Kontrollgruppe: *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001. Daten in Mittelwert ± SEM von n=5 unabhängigen Experimenten mit je n=3 Auftragungen pro Probe, je Inkubationszeit.*

Nach 2 h erkennt man eine signifikante Abnahme um 58,4 % durch 100 nM Insulin, ebenfalls ist eine Abnahme unter 1 nM Insulin erkennbar. Einzig die Konzentration von 10 nM bringt keine nennenswerte Veränderung der Proteinmenge mit sich. Unter hyperglykämischen Bedingungen (25 mM) verändert sich nach längerer Inkubation (18 h) die Proteinmenge durch Zugabe des Insulins kaum (94,1 % unter 100 nM und 98,8% unter 10 nM Insulin). (Abb. 8). Lediglich durch

die Stimulation mit 1 nM Insulin kann ein geringer Rückgang in der Proteinmenge von GLUT-1 nach 18 h verzeichnet werden.

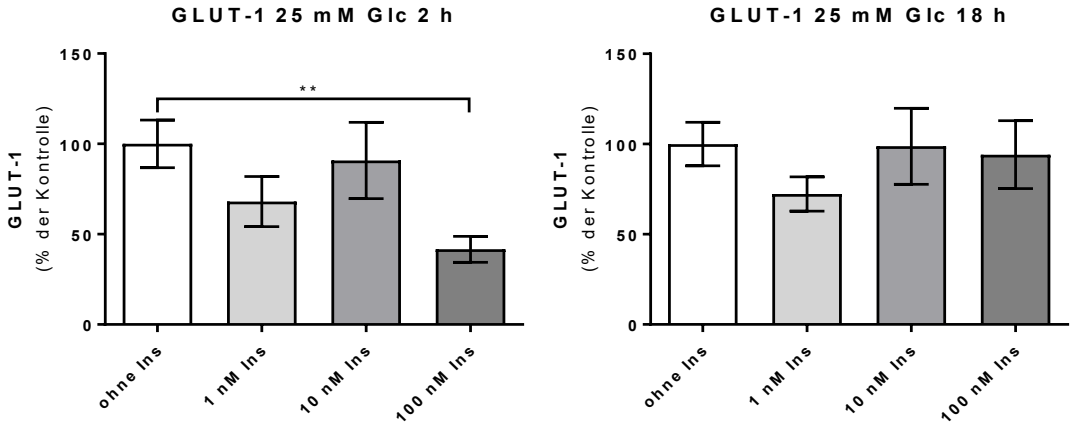

*Abb. 8: Vergleich der Proteinmenge von GLUT-1 nach 2 h und 18 h in primären Hepatozyten unter 25 mM Glucose bei Stimulation mit Insulinkonzentrationen von 1 nM, 10 nM, 100 nM und ohne Insulin (= Kontrolle). Sternchen symbolisieren Signifikanzen zur Kontrollgruppe: *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001. Daten in Mittelwert ± SEM von n=5 unabhängigen Experimenten mit je n=3 Auftragungen pro Probe, je Inkubationszeit.*

Die Behandlung ohne Insulin zeigt durch die Stimulation mit 11,1 mM Glucose nach 2 h eine signifikante Zunahme von GLUT-1 um 61,8 %. Bei hypo- und hyperglykämischen Stimulationen für diesen Zeitraum sind Werte nahe dem Kontrollwert erkennbar (Abb. 11). Eine fast lineare Zunahme mit steigender Glucosekonzentration ist nach 18 h zu erkennen. Hier ist die größte Zunahme um 61,6 % unter der Stimulation mit 25 mM Glucose ersichtlich. Die Standartabweichung beträgt 34,07 % und führt zu keiner Signifikanz.

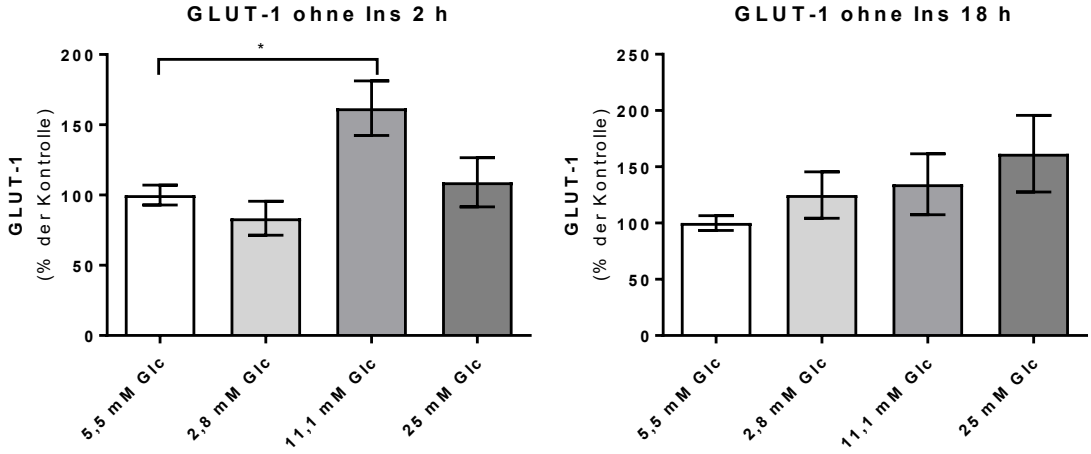

*Abb. 9: Vergleich der Proteinmenge von GLUT-1 nach 2 h und 18 h in primären Hepatozyten unter der Behandlung ohne Insulin bei Stimulation mit Glucosekonzentrationen von 2,8 mM, 5,5 mM (= Kontrolle), 11,1 mM, 25 mM. Sternchen symbolisieren Signifikanzen zur Kontrollgruppe: *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001. Daten in Mittelwert ± SEM von n=5 unabhängigen Experimenten mit je n=3 Auftragungen pro Probe, je Inkubationszeit.*

Deutlich erkennbar ist die gegensätzliche Regulation von GLUT-1 nach 18 h unter 1 nM und 10 nM Insulin (Abb. 10, Abb. 11). Die Proteinmenge unter 1 nM Insulin bei 2,8 mM verändert sich kaum (Abb. 11), durch die Erhöhung des Insulins auf 10 nM ist eine Abnahme unter 2,8 mM Glucose auf 60,8 % erkennbar (Abb. 11).

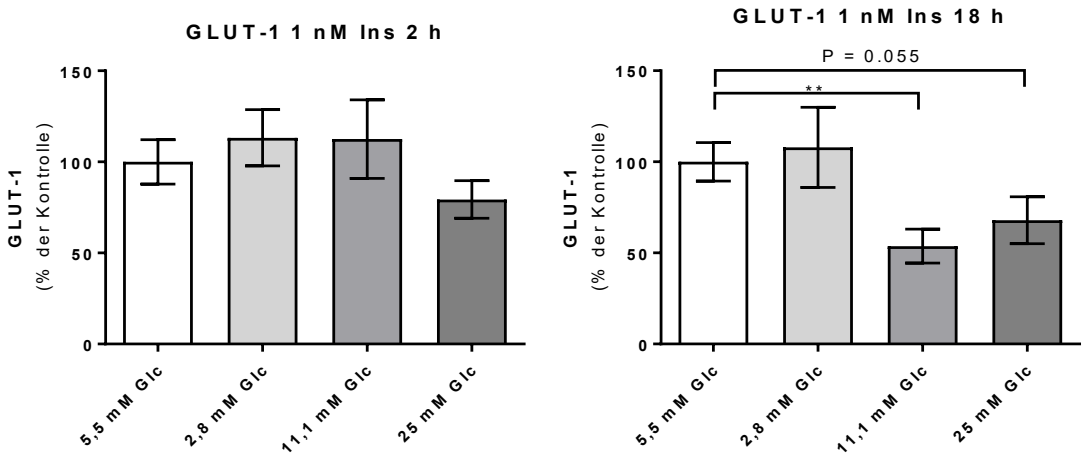

*Abb. 10: Vergleich der Proteinmenge von GLUT-1 nach 2 h und 18 h in primären Hepatozyten unter 1 nM Insulin bei Stimulation mit Glucosekonzentrationen von 2,8 mM, 5,5 mM (= Kontrolle), 11,1 mM, 25 mM. Sternchen symbolisieren Signifikanzen zur Kontrollgruppe: *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001. Daten in Mittelwert ± SEM von n=5 unabhängigen Experimenten mit je n=3 Auftragungen pro Probe.*

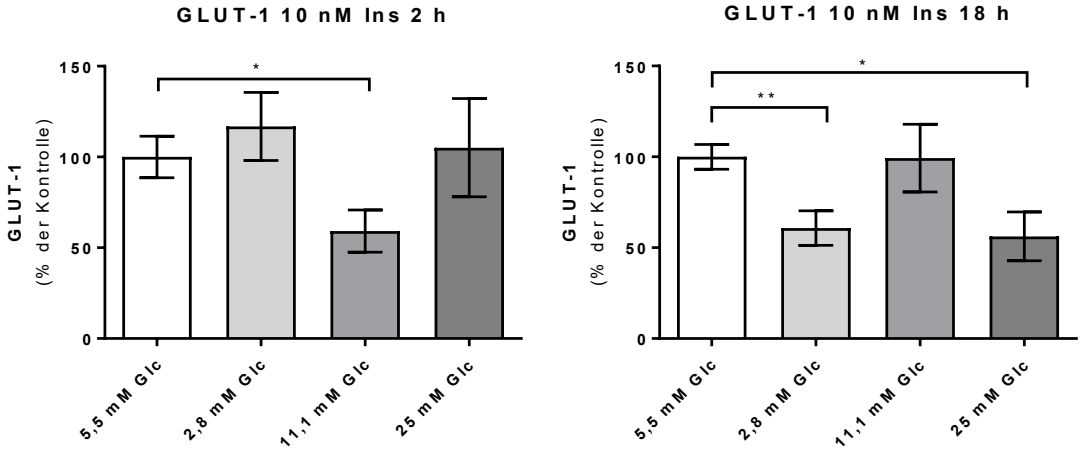

*Abb. 11: Vergleich der Proteinmenge von GLUT-1 nach 2 h und 18 h in primären Hepatozyten unter 10 nM Insulin bei Stimulation mit Glucosekonzentrationen von 2,8 mM, 5,5 mM (= Kontrolle), 11,1 mM, 25 mM. Sternchen symbolisieren Signifikanzen zur Kontrollgruppe: *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001. Daten in Mittelwert ± SEM von n=5 unabhängigen Experimenten mit je n=3 Auftragungen pro Probe, je Inkubationszeit.*

Konträr dazu verhält es sich unter erhöhten Glucosewerten (11,1 mM). Durch Insulin-arme Bedingungen (1 nM) sinkt die Menge von GLUT-1 auf 53,7 % (Abb. 11), wohingegen bei Zunahme der Insulin Konzentration auf 10 nM, die Proteinmenge mit 99,3 % nahezu der Kontrolle gleicht und keine Veränderung aufweist (Abb. 12). Durch die Stimulation mit 25 mM Glucose wird bei

beiden dieser genannten Bedingungen circa die gleiche Proteinmenge gemessen. Nach 2 h sind unter 10 nM Insulin gegensätzliche Ergebnisse augenscheinlich (Abb. 11).

Unter der Bedingung, die einer Hyperinsulinämie gleicht, sind nach 2 h kaum Veränderungen in der Proteinmenge, durch die zusätzliche Stimulation mit Glucose, sichtbar. Nach der verlängerten Inkubation von 18 h kann man einen Rückgang von GLUT-1 unter 2,8 mM (76,8 %) und 11,1 mM (66,29 %, P = 0,0511) beobachten (Abb. 12).

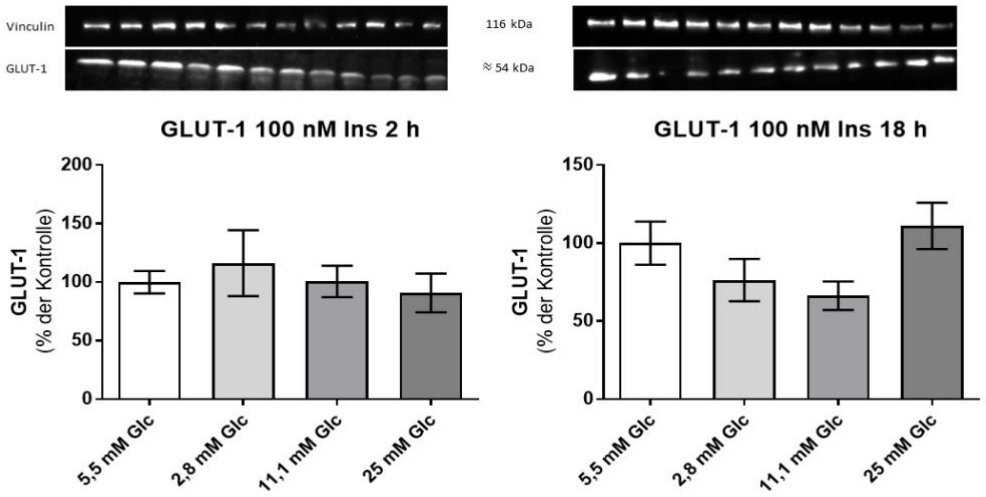

Abb. 12: Vergleich der Proteinmenge von GLUT-1 nach 2 h und 18 h in primären Hepatozyten unter 100 nM Insulin bei Stimulation mit Glucosekonzentrationen von 2,8 mM, 5,5 mM (= Kontrolle), 11,1 mM und 25 mM. Die Gelbilder über den Diagrammen zeigen die Proteinexpression durch spezifische Banden, dargestellt mit dem Housekeeping-Gen Vinculin (3 Proben jeweils mit 5,5 mM Glc, 2,8 mM Glc, 11,1 mM Glc, 25 mM Glc). *Sternchen symbolisieren Signifikanzen zur Kontrollgruppe: *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001. Daten in Mittelwert ± SEM von n*=5 unabhängigen Experimenten mit je n=3 Auftragungen pro Probe, je Inkubationszeit. Auftragung der PCR-Proben siehe Abb. 4

4.1.2. Glucosetransporter-2 (GLUT-2)

Zu einer signifikanten Steigerung der Menge von GLUT-2 kommt es unter hypoglykämischer Bedingung (2,8 mM) sowohl nach 2 h als auch nach 18 h. In der Kurzzeitstimulation (2 h) ist die Proteinmenge bei der Stimulation mit 1 nM Insulin signifikant um 95,9 % erhöht. Die Langzeitstimulation (18 h) zeigt eine signifikante Erhöhung durch alle Insulinkonzentrationen. Dabei ist unter 1 nM Insulin eine Erhöhung um 193,6 % zu erkennen, unter 10 nM steigt GLUT-2 auf 360,1 % und unter 100 nM auf 302 % (Abb. 13).

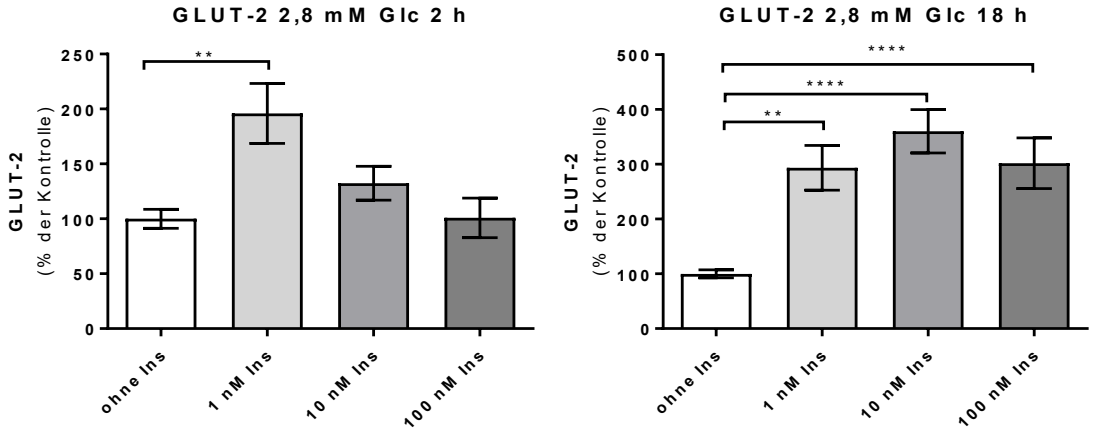

*Abb. 13: Vergleich der Proteinmenge von GLUT-2 nach 2 h und 18 h in primären Hepatozyten unter 2,8 mM Glucose bei Stimulation mit Insulinkonzentrationen von 1 nM, 10 nM, 100 nM und ohne Insulin (= Kontrolle). Sternchen symbolisieren Signifikanzen zur Kontrollgruppe: *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001; ****P<0.0001. Daten in Mittelwert ± SEM von n=5 unabhängigen Experimenten mit je n=3 Auftragungen pro Probe, je Inkubationszeit.*

GLUT-2 zeigt wenig Veränderungen in einem Milieu von 5,5 mM Glucose mit den genannten Insulinkonzentrationen. Die Proteinmenge ist fast unverändert zu beiden Stimulationszeiten (Abb. 14).

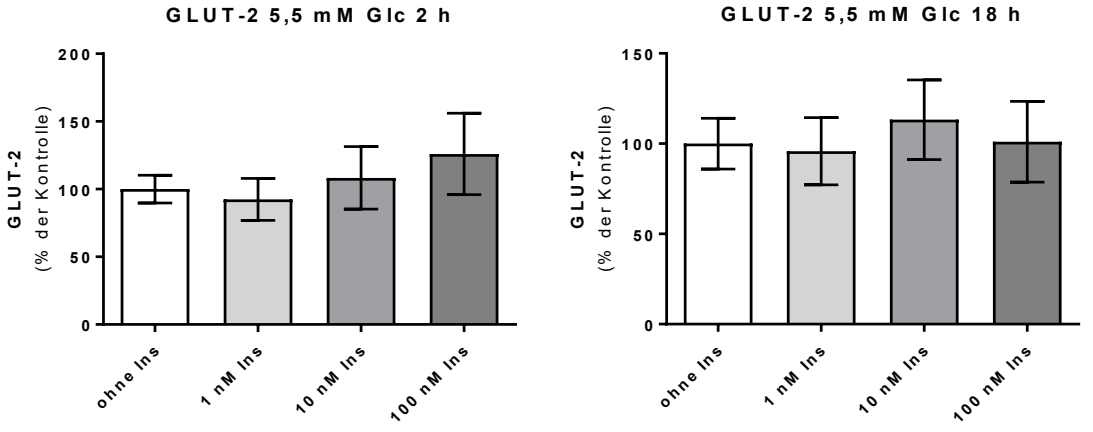

*Abb. 14: Vergleich der Proteinmenge von GLUT-2 nach 2 h und 18 h in primären Hepatozyten unter 5,5 mM Glucose bei Stimulation mit Insulinkonzentrationen von 1 nM, 10 nM, 100 nM und ohne Insulin (= Kontrolle). Sternchen symbolisieren Signifikanzen zur Kontrollgruppe: *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001. Daten in Mittelwert ± SEM von n=5 unabhängigen Experimenten mit je n=3 Auftragungen pro Probe, je Inkubationszeit.*

Auch unter Bedingungen von 11,1 mM Glucose sind kaum Änderungen zu verzeichnen. Die Proteinmenge nimmt nach der Inkubationszeit von 18 h bei hohen Insulinkonzentrationen von 100 nM um 39,2 % ab und weist damit einen Signifikanzwert von P = 0,063 auf (Abb. 15).

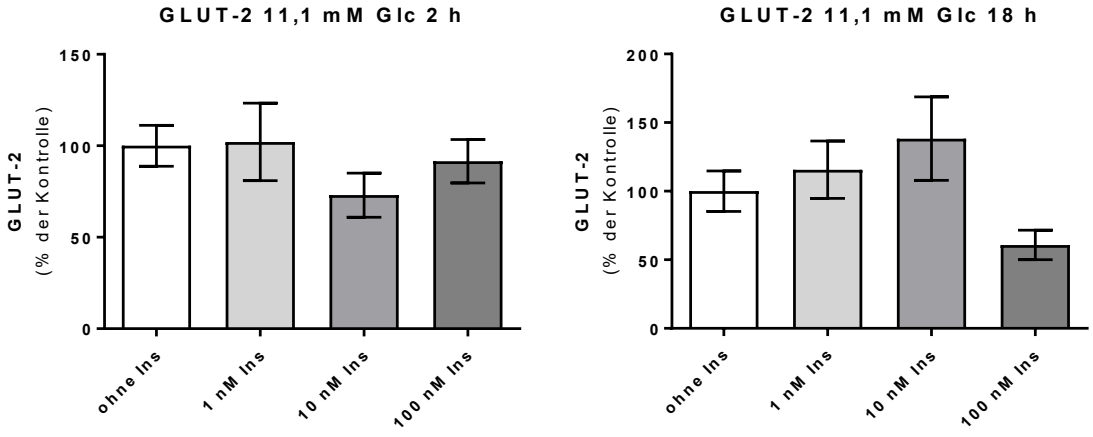

*Abb. 15: Vergleich der Proteinmenge von GLUT-2 nach 2 h und 18 h in primären Hepatozyten unter 11,1 mM Glucose bei Stimulation mit Insulinkonzentrationen von 1 nM, 10 nM, 100 nM und ohne Insulin (= Kontrolle). Sternchen symbolisieren Signifikanzen zur Kontrollgruppe: *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001. Daten in Mittelwert ± SEM von n=5 unabhängigen Experimenten mit je n=3 Auftragungen pro Probe, je Inkubationszeit.*

Unter hyperglykämischer Bedingung (25 mM Glucose), ist unter allen Behandlungen mit Insulin nach 2 h eine signifikante Abnahme festzustellen. Die Behandlung mit 100 nM Insulin führt zu einer Abnahme der Proteinmenge auf das 1,86-fache und stellt die stärkste Signifikanz dar. Die Abnahme kann bereits durch die visuelle Betrachtung der Ergebnisse des Western Blots vermutet werden (Abb. 16). Eine Abnahme der Proteinmenge kann unter 18 h nur bei Insulinkonzentrationen von 10 nM und 100 nM festgestellt werden, wobei unter 100 nM Insulin ebenfalls eine signifikante Verringerung (P = 0,0105) GLUT-2 auf 63,8 % nachweisbar ist. Bei geringer Insulinkonzentration (1 nM) zeigt die Zunahme der Proteinmenge auf 156,7 % bei einer Standardabweichung von 36,54 % keine Signifikanz (Abb. 16).

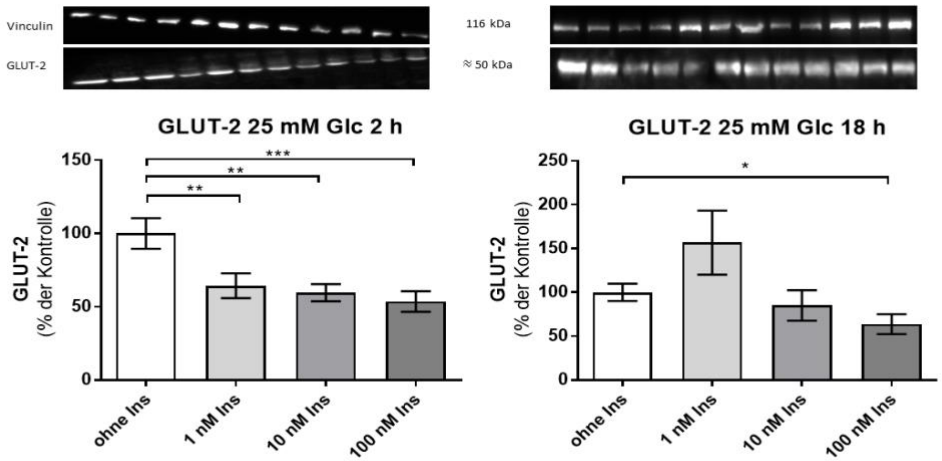

Abb. 16: Vergleich der Proteinmenge von GLUT-2 nach 2 h und 18 h in primären Hepatozyten unter 25 mM Glucose bei Stimulation mit Insulinkonzentrationen von 1 nM, 10 nM, 100 nM und ohne Insulin (= Kontrolle). Die Gelbilder über

*den Diagrammen zeigen die Proteinexpression durch spezifische Banden, dargestellt mit dem Housekeeping-Gen Vinculin (3 Proben jeweils ohne Ins, 1 nM Ins, 10 nM Ins, 100 nM Ins).Sternchen symbolisieren Signifikanzen zur Kontrollgruppe: *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001. Daten in Mittelwert ± SEM von n=5 unabhängigen Experimenten mit je n=3 Auftragungen pro Probe, je Inkubationszeit. Auftragung der PCR-Proben siehe Abb. 4.*

Nach 2 h Inkubation (ohne Insulin) ist die Menge von GLUT-2 unter 2,8 mM Glucose nur geringfügig erhöht, dagegen unter 11,1 mM (69,2 %) und 25 mM (71,3 %) erniedrigt. (

Abb. 17). Werden die primären Hepatozyten für 18 h nur mit Glucose behandelt, so erhöht sich die Proteinmenge (nicht-signifikant) von GLUT-2 unter 2,8 mM und 11,1 mM Glucose um circa 36 %. Durch 25 mM Glucose bleibt die Menge ähnlich der Kontrolle und zeigt einen Wert von 96,5 % an (Abb. 18).

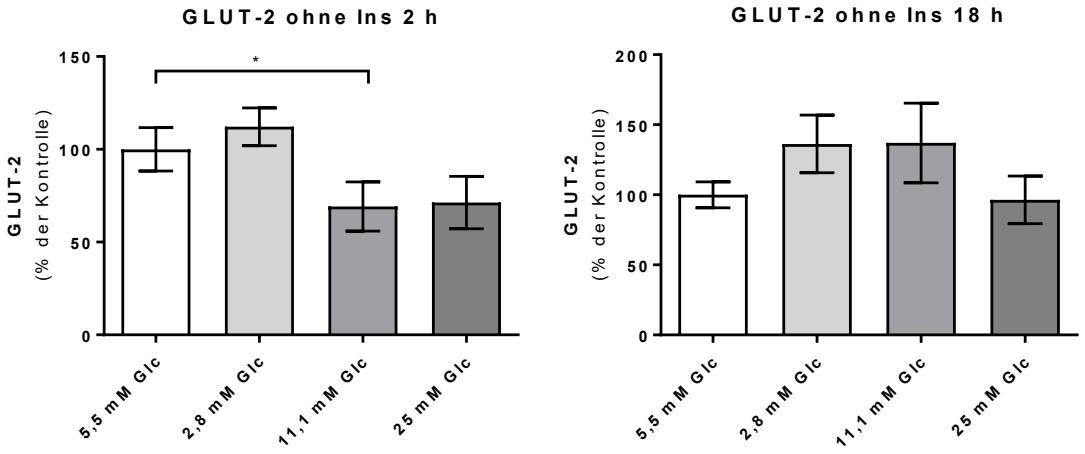

*Abb. 17: Vergleich der Proteinmenge von GLUT-2 nach 2 h und 18 h in primären Hepatozyten unter der Behandlung ohne Insulin bei Stimulation mit Glucosekonzentrationen von 2,8 mM, 5,5 mM (= Kontrolle), 11,1 mM, 25 mM. Sternchen symbolisieren Signifikanzen zur Kontrollgruppe: *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001. Daten in Mittelwert ± SEM von n=5 unabhängigen Experimenten mit je n=3 Auftragungen pro Probe, je Inkubationszeit.*

Unter einer Insulinkonzentration von 1 nM kommt es nach 2 h zu einer exponentiellen Abnahme der Menge von GLUT-2 unter steigenden Glucosekonzentrationen (Abb. 19). Unter 25 mM Glucose kann daher eine Proteinmenge von 79,4 % in Bezug auf den normoglykämischen Kontrollwert (5,5 mM) gemessen werden. Nach 18 h unter 1 nM Insulin und jeweils ansteigenden Glucosekonzentrationen ist wiederum gegenüber der Kontrolle die Zunahme von GLUT-2 unter 11,1 mM und 25 mM auf 142,3 % zu verzeichnen (Abb. 18).

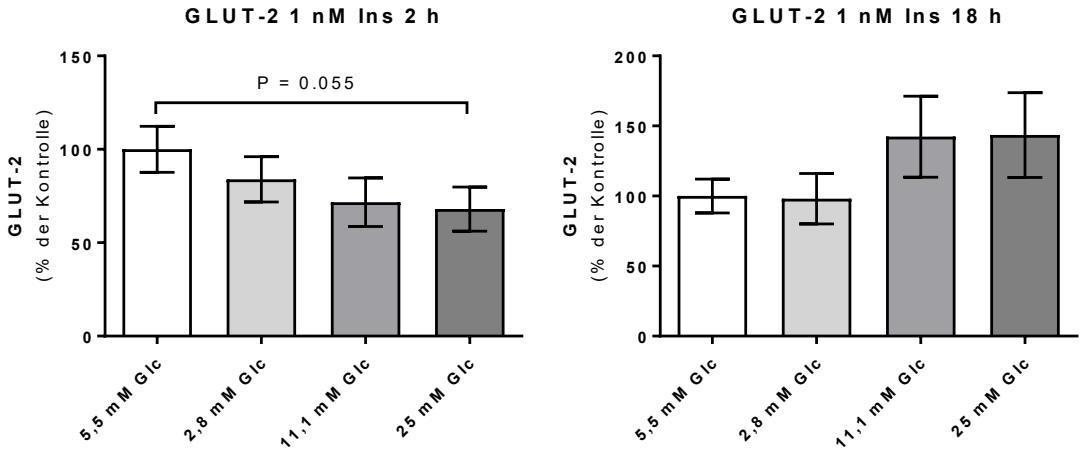

*Abb. 18: Vergleich der Proteinmenge von GLUT-2 nach 2 h und 18 h in primären Hepatozyten unter 1 nM Insulin bei Stimulation mit Glucosekonzentrationen von 2,8 mM, 5,5 mM (= Kontrolle), 11,1 mM, 25 mM. Sternchen symbolisieren Signifikanzen zur Kontrollgruppe: *=P<0.05; **=P<0.01; ***=P<0.001. Daten in Mittelwert ± SEM von n=5 unabhängigen Experimenten mit je n=3 Auftragungen pro Probe, je Inkubationszeit.*

Die Behandlung mit 10 nM Insulin über 2 h zeigt einen Anstieg der Proteinmenge mitunter Glucosekonzentrationen von 11,1 mM (auf 129,3 %) und 25 mM (auf 137,8 %) gegenüber der Kontrolle. Durch die Verlängerung der Inkubationszeit wird die Proteinmenge durch hypo- und hyperglykämische Stimulation (2,8 mM; 25 mM) um 12,2 % leicht erniedrigt (Abb. 19).

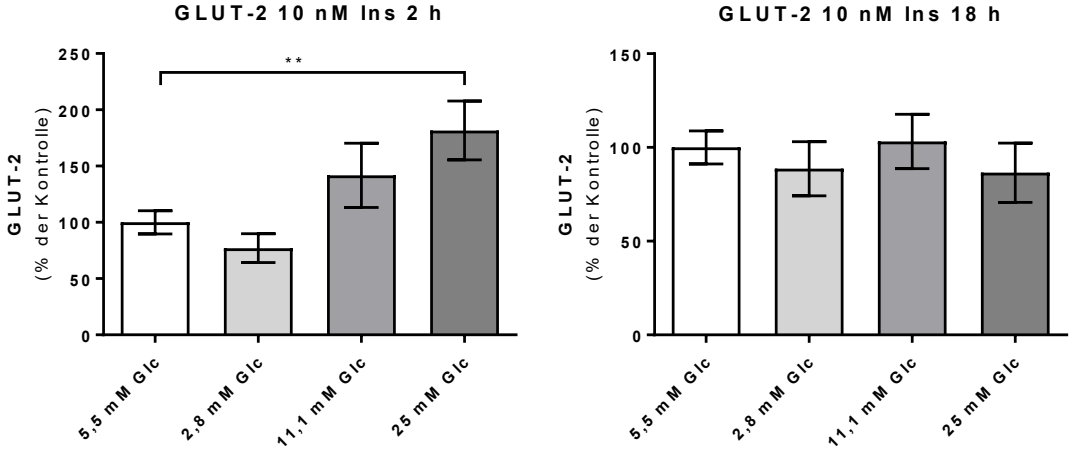

*Abb. 19: Vergleich der Proteinmenge von GLUT-2 nach 2 h und 18 h in primären Hepatozyten unter 10 nM Insulin bei Stimulation mit Glucosekonzentrationen von 2,8 mM, 5,5 mM (= Kontrolle), 11,1 mM, 25 mM. Sternchen symbolisieren Signifikanzen zur Kontrollgruppe: *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001. Daten in Mittelwert ± SEM von n=5 unabhängigen Experimenten mit je n=3 Auftragungen pro Probe, je Inkubationszeit.*

Unter der Bedingung, die einer Hyperinsulinämie (100 nM) gleicht, sind nach 2 h kaum Veränderungen in der Proteinmenge von GLUT-2 erkennbar. Alle gemessenen Werte befinden sich zwischen 90-100 %. Während der Langzeitinkubation (18 h) liegt die Zunahme der Menge

von GLUT-2 unter 11,1 mM Glucose bei 65 %, mit der Standardabweichung von 29,1 %, (Abb. 20). Vergleichend dazu kann man die Proteinmenge unter 2,8 mM Glucose betrachten, die auf 68 % gesunken ist. Unter 25 mM Glucose ist nur eine leichte Veränderung messbar (106 %).

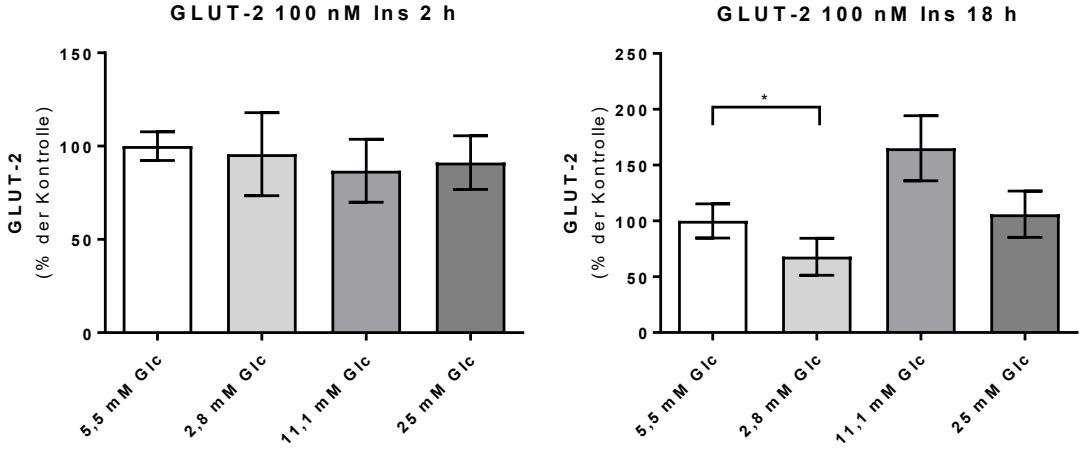

*Abb. 20: Vergleich der Proteinmenge von GLUT-2 nach 2 h und 18 h in primären Hepatozyten unter 100 nM Insulin bei Stimulation mit Glucosekonzentrationen von 2,8 mM, 5,5 mM (= Kontrolle), 11,1 mM, 25 mM. Sternchen symbolisieren Signifikanzen zur Kontrollgruppe: *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001. Daten in Mittelwert ± SEM von n=5 unabhängigen Experimenten mit je n=3 Auftragungen pro Probe, je Inkubationszeit.*

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass GLUT-1 unter konstanter Glucosekonzentration (11,1 mM und 25 mM) und Stimulation mit Insulin (100 nM) nach 2 h die stärksten Veränderungen durch abnehmende Proteinmenge zeigt, die nach 18 h unter 100 nM Insulin noch nachweisbar sind (5,5 und 11,1 mM Glucose, 25 mM minimale Abnahme um 5,9%).

GLUT-2 zeigt sowohl nach 2 h als auch nach 18 h unter 2,8 mM und 25 mM Glucose die stärksten Veränderungen. Die Inkubationszeit von 18 h bewirkt insgesamt bei der Betrachtung von GLUT-2 die stärksten Effekte. Dabei steigt die Proteinmenge unter 2,8 mM und steigenden Insulin Konzentrationen an und verhält sich unter hyperglykämischen Bedingungen (25 mM) konträr mit einer Proteinmengenabnahme.

GLUT-1 weist unter hypo- (2,8 mM) und hyperglykämischen Bedingungen (25 mM) nach 2 h eine Abnahme der Proteinmenge auf. GLUT-2 reagiert zu beiden Inkubationszeiten unter 2,8 mM konträr mit einer Zunahme bei steigenden Insulinkonzentrationen. GLUT-1 reagiert unter normoglykämischen Bedingungen nach 2 h durch die Insulin-Stimulation mit einer Zunahme der Proteinmenge. Durch längere Inkubation (18 h) kann dieser Effekt nicht mehr nachgewiesen werden, die Proteinmenge bleibt durch 1 nM und 10 nM Insulin nahezu

unverändert und sinkt durch die Stimualtion von 100 nM Insulin. Unter diesen Bedingungen kommt es zu kaum Veränderungen von GLUT-2 durch Insulin.

4.2. Analyse von Enzymen des Glucosestoffwechsels in primären Hepatozyten nach der Behandlung mit Glucose bzw. Insulin

4.2.1. Glucokinase (GCK)

GCK ist ein die Geschwindigkeit regulierendes Enzym in der Glykolyse und soll bezüglich seiner Proteinmenge analysiert werden. Die Proteinmenge von GCK bei 2,8 mM Glucose sinkt nach 2 h nur leicht mit steigender Insulin Konzentration und erreicht unter 100 nM Insulin mit 87,6 % die niedrigste Proteinmenge. Nach 18 h ist die Proteinmenge mit steigender Insulinkonzentration leicht erhöht (Abb. 21).

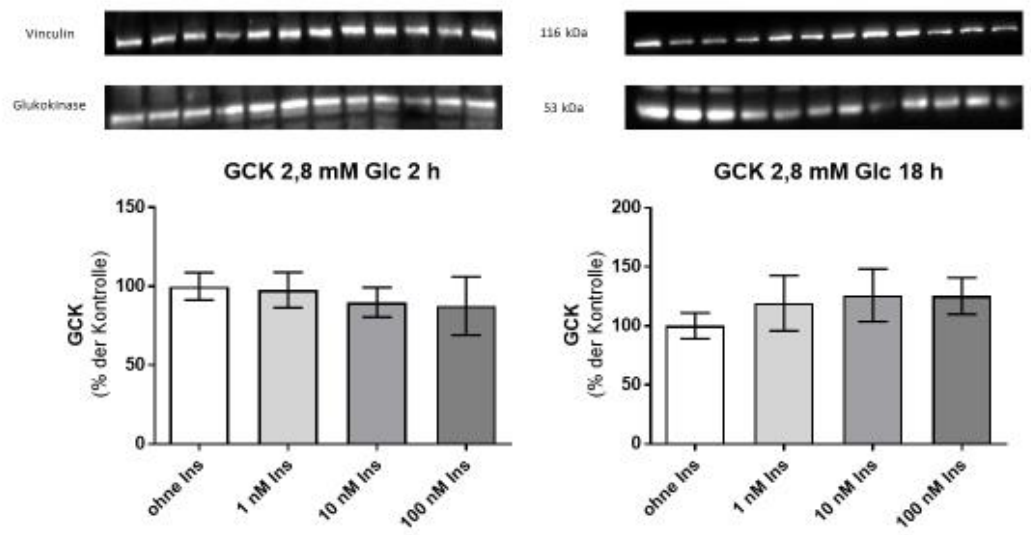

*Abb. 21: Vergleich der Proteinmenge von GCK nach 2 h und 18 h in primären Hepatozyten unter 2,8 mM Glucose bei Stimulation mit Insulinkonzentrationen von 1 nM, 10 nM, 100 nM und ohne Insulin (= Kontrolle). Die Gelbilder über den Diagrammen zeigen die Proteinexpression durch spezifische Banden, dargestellt mit dem Housekeeping-Gen Vinculin (3 Proben jeweils ohne Ins, 1 nM Ins, 10 nM Ins, 100 nM Ins). Sternchen symbolisieren Signifikanzen zur Kontrollgruppe: *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001. Daten in Mittelwert ± SEM von n=5 unabhängigen Experimenten mit je n=3 Auftragungen pro Probe, je Inkubationszeit. Auftragung der PCR-Proben siehe Abb. 4.*

Bei Applikation von 5,5 mM Glucose kommt es nach 2 h zu (nicht-signifikanten) Erhöhungen des GCK-Proteins unter steigenden Insulinkonzentrationen. Dagegen sind nach 18 h Verringerungen im Proteingehalt messbar, insbesondere unter 10 und 100 nM Insulin (Abb. 23).

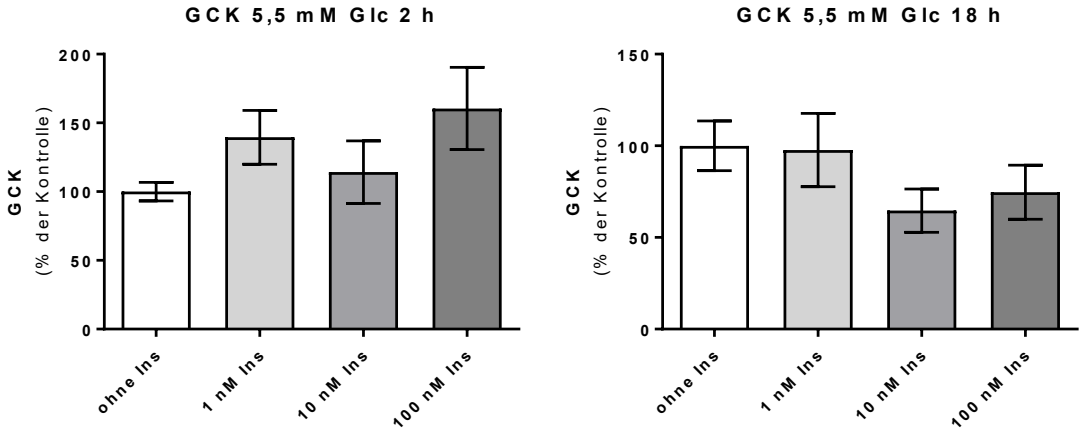

*Abb. 22: Vergleich der Proteinmenge von GCK nach 2 h in primären Hepatozyten unter 5,5 mM Glucose bei Stimulation mit Insulinkonzentrationen von 1 nM, 10 nM, 100 nM und ohne Insulin (= Kontrolle). Sternchen symbolisieren Signifikanzen zur Kontrollgruppe: *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001. Daten in Mittelwert ± SEM von n=5 unabhängigen Experimenten mit je n=3 Auftragungen pro Probe, je Inkubationszeit.*

Weiterhin kann durch die hyperglykämische Behandlung über einen Zeitraum von 2 h mit 11,1 mM Glucose eine lineare Abnahme der GCK-Proteinmenge beobachtet werden. Die Behandlung mit 100 nM Insulin zeigt eine Abnahme der Proteinmenge um 46,2 % (P = 0,0037) in diesem Zeitfenster. In der Langzeitstimulation sind ebenfalls unter 11,1 mM Glucose Verringerungen der Proteinmenge unter steigenden Insulinkonzentrationen sichtbar, allerdings weniger deutlich (Abb. 23).

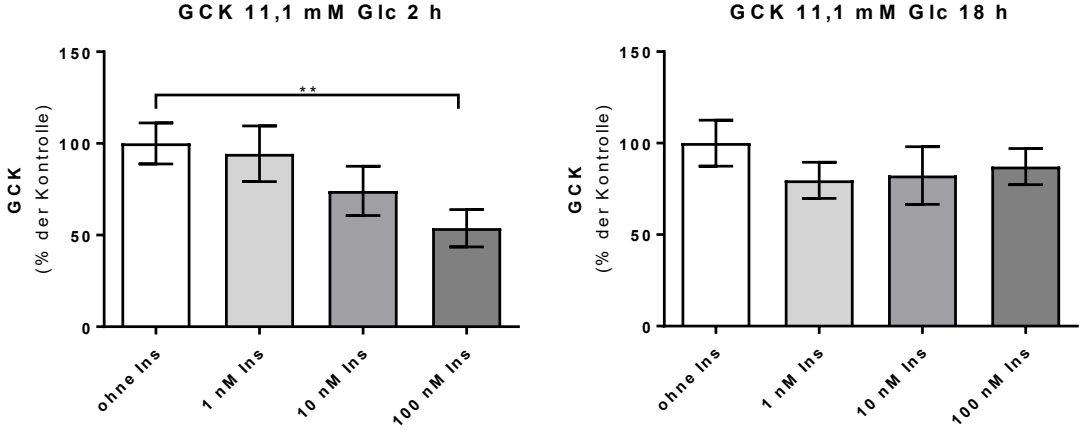

*Abb. 23: Vergleich der Proteinmenge von GCK nach 2 h in primären Hepatozyten unter 11,1 mM Glucose bei Stimulation mit Insulinkonzentrationen von 1 nM, 10 nM, 100 nM und ohne Insulin (= Kontrolle). Sternchen symbolisieren Signifikanzen zur Kontrollgruppe: *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001. Daten in Mittelwert ± SEM von n=5 unabhängigen Experimenten mit je n=3 Auftragungen pro Probe, je Inkubationszeit.*

Nach der Behandlung der primären Hepatozyten mit 25 mM Glucose über 2 h ist kaum eine veränderte Proteinmenge unter 1 nM Insulin (102,2 %) messbar. Steigt die Konzentration jedoch auf 10 nM Insulin und 100 nM Insulin, ist eine Zunahme des GCK-Proteins um circa 50 %

nachweisbar (Abb. 24), was gegensätzlich auffällt zur Proteinmenge unter 11,1 mM Glucose (Abb. 24) Bei Inkubation über 18 h lässt sich beobachten, dass die Proteinmenge unter 1 nM Insulin ebenfalls etwa auf dem Niveau der Kontrolle, aber unter 10 nM und 100 nM Insulin um 26,4 % abnimmt (Abb. 25).

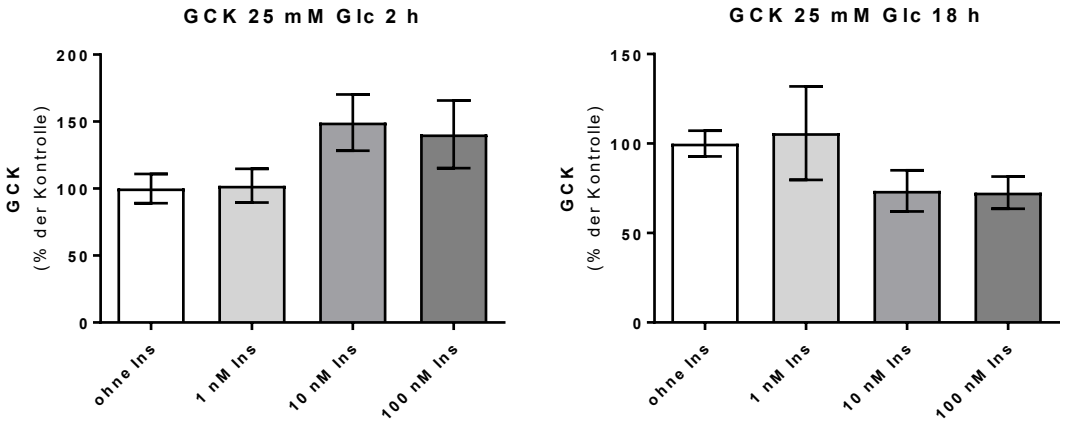

*Abb. 24: Vergleich der Proteinmenge von GCK nach 2 h und 18 h in primären Hepatozyten unter 25 mM Glucose bei Stimulation mit Insulinkonzentrationen von 1 nM, 10 nM, 100 nM und ohne Insulin (= Kontrolle). Sternchen symbolisieren Signifikanzen zur Kontrollgruppe: *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001. Daten in Mittelwert ± SEM von n=5 unabhängigen Experimenten mit je n=3 Auftragungen pro Probe, je Inkubationszeit.*

Durch die Behandlung ohne Insulin und 2,8 mM Glucose über 2 h wird nimmt die Proteinmenge signifikant ab. Hingegen ist nach 18 h unter 2,8 mM Glucose eine Zunahme um 168,6 % zu verzeichnen, unter 11,1 und 25 mM Glucose dagegen eine Abnahme (Abb. 25).

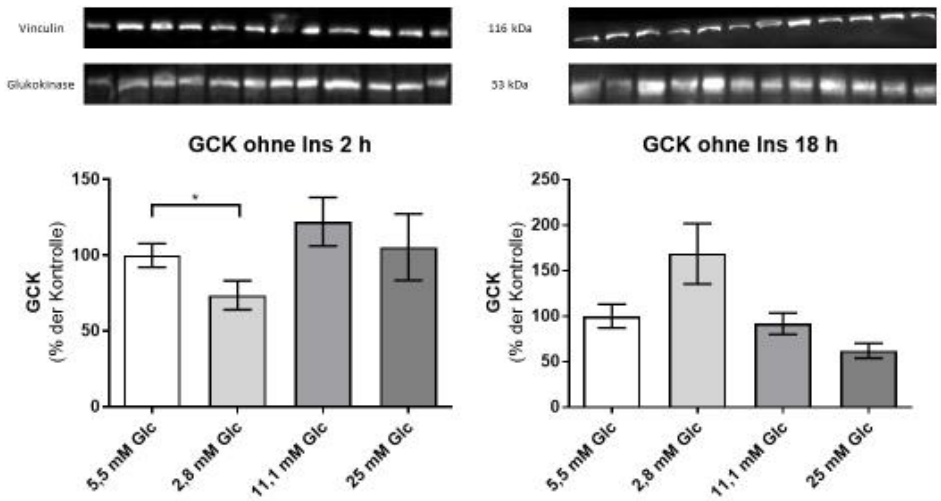

*Abb. 25: Vergleich der Proteinmenge von GCK nach 2 h und 18 h in primären Hepatozyten unter der Behandlung ohne Insulin bei Stimulation mit Glucosekonzentrationen von 2,8 mM, 5,5 mM (= Kontrolle), 11,1 mM, 25 mM. Die Gelbilder über den Diagrammen zeigen die Proteinexpression durch spezifische Banden, dargestellt mit dem Housekeeping-Gen Vinculin (3 Proben jeweils mit 5,5 mM Glc, 2,8 mM Glc, 11,1 mM Glc, 25 mM Glc). Sternchen symbolisieren Signifikanzen zur Kontrollgruppe: *P<0.05; **P<0.01; **=P<0.001. Daten in Mittelwert ± SEM von n=5 unabhängigen Experimenten mit je n=3 Auftragungen pro Probe, je Inkubationszeit. Auftragung der PCR-Proben siehe Abb. 4.*

Unter einer Insulinkonzentration von 1 nM zeigen sich nach 2 h kaum Veränderungen in der Proteinmenge. Auch nach 18 h verändert sich die Menge von GCK durch 2,8 mM und 11,1 mM nur unwesentlich. Unter 25 mM Glucose hingegen sinkt nach 18 h die Proteinmenge um 55,8 % (P = 0,0029, Abb. 26).

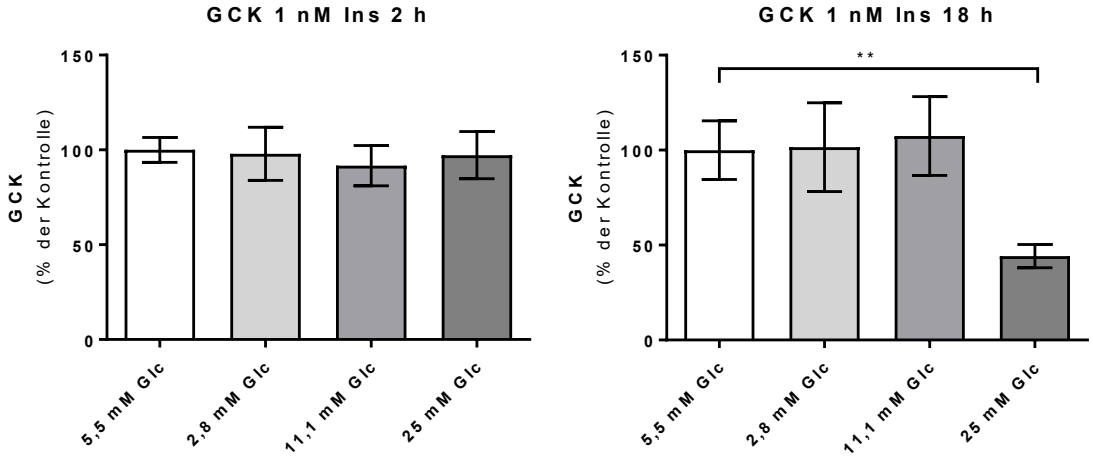

*Abb. 26: Vergleich der Proteinmenge von GCK nach 2 h und 18 h in primären Hepatozyten unter 1 nM Insulin bei Stimulation mit Glucosekonzentrationen von 2,8 mM, 5,5 mM (= Kontrolle), 11,1 mM, 25 mM. Sternchen symbolisieren Signifikanzen zur Kontrollgruppe: *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001. Daten in Mittelwert ± SEM von n=5 unabhängigen Experimenten mit je n=3 Auftragungen pro Probe, je Inkubationszeit.*

Unter der Behandlung mit 10 nM Insulin und einer steigenden Glucosekonzentration wird die Proteinmenge erhöht (Abb. 28). Die Ergebnisse der Kurzeitstimulation sind konträr zu denen der Langzeitstimulation. Die 2 h Inkubation zeigt einen Anstieg der des Proteins unter 25 mM Glucosekonzentration (140 %), wohingegen bei einer Behandlung über 18 h in einer signifikante Abnahme des Proteingehaltes resultiert (auf 57,4 %).

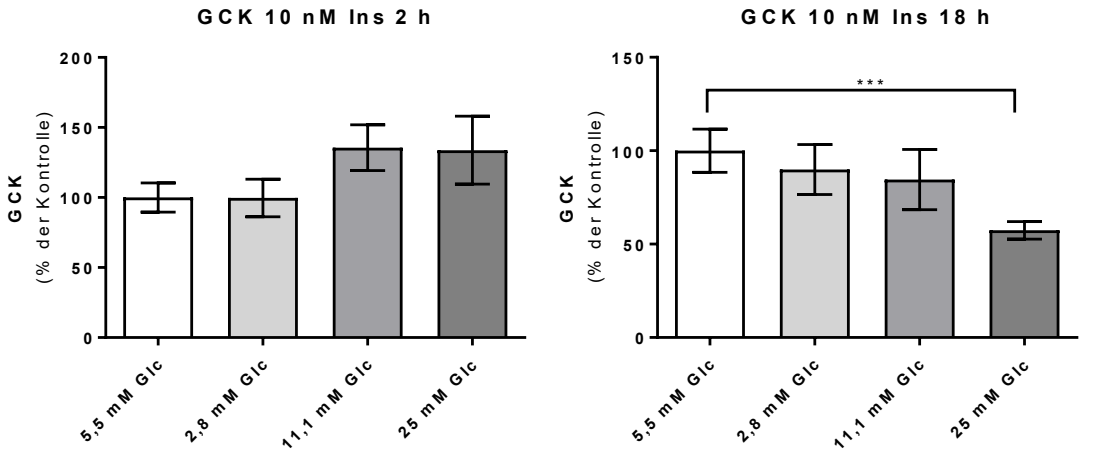

*Abb. 27: Vergleich der Proteinmenge von GCK nach 2 h und 18 h in primären Hepatozyten unter 10 nM Insulin bei Stimulation mit Glucosekonzentrationen von 2,8 mM, 5,5 mM (= Kontrolle), 11,1 mM, 25 mM. Sternchen symbolisieren Signifikanzen zur Kontrollgruppe: *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001. Daten in Mittelwert ± SEM von n=5 unabhängigen Experimenten mit je n=3 Auftragungen pro Probe, je Inkubationszeit.*

Unter einer Behandlung von 100 nM Insulin zeigt sich unter steigenden Glucosekonzentrationen nach 2 h eine leichte Zunahme des GCK-Proteingehaltes. Dagegen sind nach 18 h unter 10 und 100 nM Insulin und steigenden Glucosekonzentrationen (Abb. 29) verminderte Proteingehalte feststellbar (52,07 % bei 2,8 mM Glucose und 58,6 % bei 25 mM Glucose).

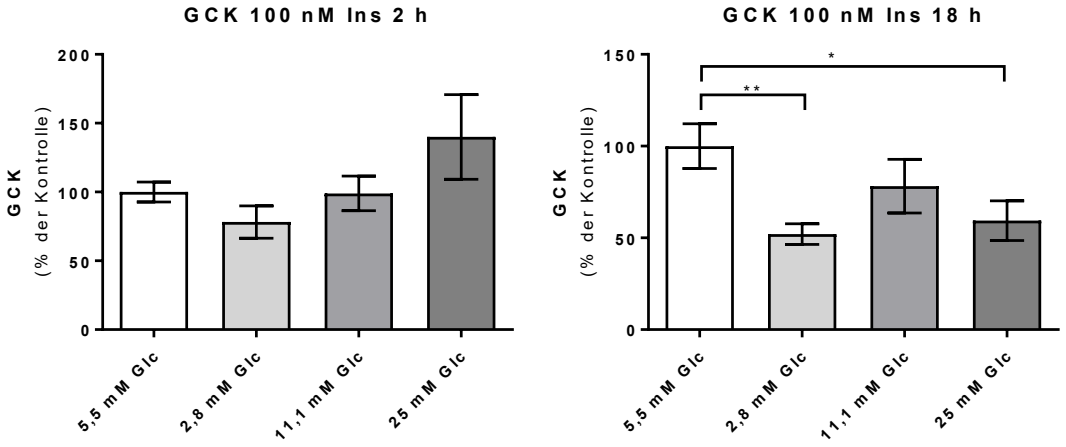

*Abb. 28: Vergleich der Proteinmenge von GCK nach 2 h und 18 h in primären Hepatozyten unter 100 nM Insulin bei Stimulation mit Glucosekonzentrationen von 2,8 mM, 5,5 mM (= Kontrolle), 11,1 mM, 25 mM. Sternchen symbolisieren Signifikanzen zur Kontrollgruppe: *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001. Daten in Mittelwert ± SEM von n=5 unabhängigen Experimenten mit je n=3 Auftragungen pro Probe, je Inkubationszeit.*

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass bei gleichbleibender Glucosekonzentration und gleichzeitig applizierten unterschiedlichen Insulinkonzentrationen kaum Veränderungen in den Proteinmengen messbar sind. Davon ausgenommen ist die 2 h-Behandlung unter 11,1 mM Glucose und steigenden Insulinkonzentrationen, die mit einer Abnahme der Proteinmenge von GCK einhergeht.

Glucose in der Konzentration von 2,8 mM bewirkt eine Abnahme von GCK nach 2 h. Unter 2-stündiger Behandlung ist unter 10 nM Insulin mit steigenden Glucosekonzentrationen eine Zunahme von GCK messbar. Durch die Stimulation mit 25 mM Glucose (ohne Insulin) kommt es zu einer Erniedrigung der Proteinmenge. Durch Zugabe von 1 nM, 10 nM oder 100 nM Insulin bleibt dieser senkende Effekt bestehen bzw. wird mit steigenden Insulinkonzentrationen noch verstärkt.

4.2.2. Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK)

PEPCK ist ein geschwindigkeitsbestimmendes Enzym der Gluconeogenese, welches die Umwandlung von Oxalacetat zu Phosphoenolpyruvat katalysiert. Unter 2,8 mM Glucose und 1 nM Insulin über 2 h Behandlungsdauer steigt die Proteinmenge leicht an (Abb. 29) und fällt unter 10 und 100 nM Insulin wieder ab. Nach 18 h Behandlungsdauer sind vergleichbare Veränderungen der Proteinmenge messbar (z.B. unter 1 nM Insulin Anstieg auf 132,1 %).

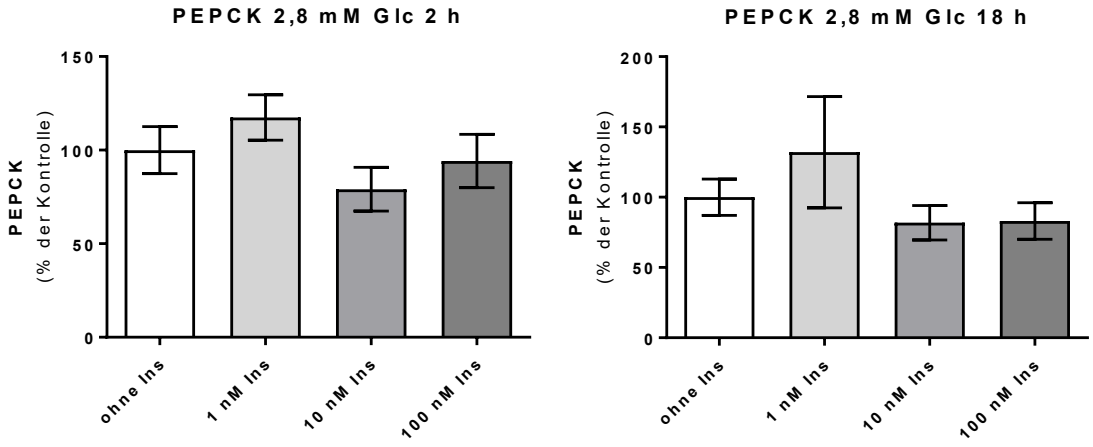

*Abb. 29: Vergleich der Proteinmenge von PEPCK nach 2 h und 18 h in primären Hepatozyten unter 2,8 mM Glucose bei Stimulation mit Insulinkonzentrationen von 1 nM, 10 nM, 100 nM und ohne Insulin (= Kontrolle). Sternchen symbolisieren Signifikanzen zur Kontrollgruppe: *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001. Daten in Mittelwert ± SEM von n=5 unabhängigen Experimenten mit je n=3 Auftragungen pro Probe, je Inkubationszeit.*

Unter einer normoglykämischen Bedingung (5,5 mM) ist eine Zunahme der Proteinmenge bei steigenden Insulinkonzentrationen zu erkennen nach 2 h als auch 18 h Behandlungsdauer (Abb. 30).

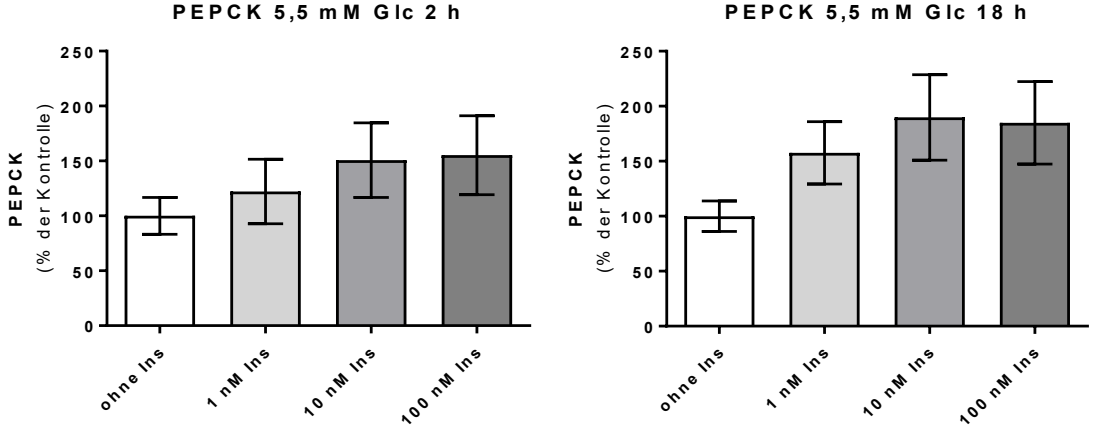

*Abb. 30: Vergleich der Proteinmenge von PEPCK nach 2 h und 18 h in primären Hepatozyten unter 5,5 mM Glucose bei Stimulation mit Insulinkonzentrationen von 1 nM, 10 nM, 100 nM und ohne Insulin (= Kontrolle). Sternchen symbolisieren Signifikanzen zur Kontrollgruppe: *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001. Daten in Mittelwert ± SEM von n=5 unabhängigen Experimenten mit je n=3 Auftragungen pro Probe, je Inkubationszeit.*

Nach 2 h ist unter 11,1 mM Glucose und 10 nM Insulin eine Zunahme der Proteinmenge zu erkennen (Abb. 31), dagegen unter 1 und 100 nM eine leichte Abnahme. Nach Behandlung mit 11,1 mM Glucose über 18 h ist eine Zunahme der Proteinmenge unter 1 nM (230,1%) und 10 nM Insulin messbar. 100 nM Insulin bewirkt hingegen einen Rückgang der Proteinmenge auf 78,6 % nach 18 h.

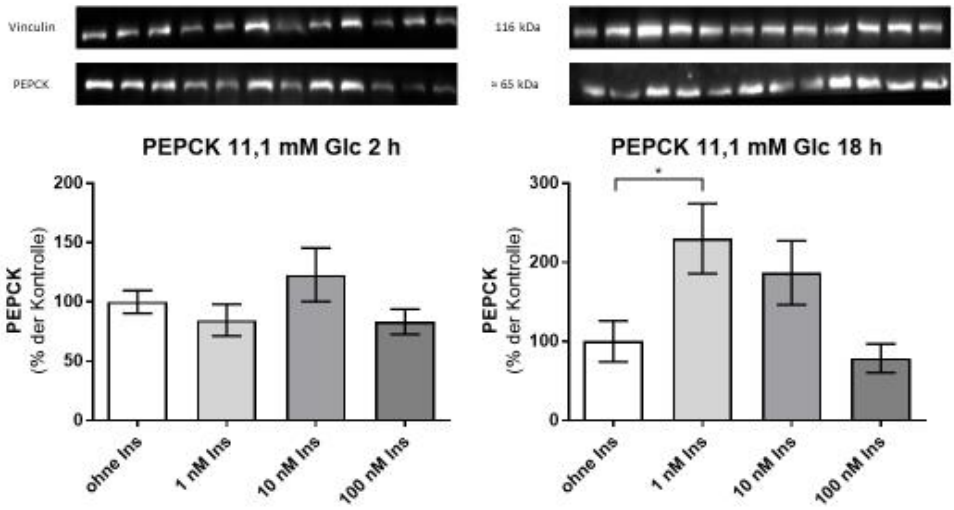

*Abb. 31: Vergleich der Proteinmenge von PEPCK nach 2 h und 18 h in primären Hepatozyten unter 11,1 mM Glucose bei Stimulation mit Insulinkonzentrationen von 1 nM, 10 nM, 100 nM und ohne Insulin (= Kontrolle). Die Gelbilder über den Diagrammen zeigen die Proteinexpression durch spezifische Banden, dargestellt mit dem Housekeeping-Gen Vinculin (3 Proben jeweils ohne Ins, 1 nM Ins, 10 nM Ins, 100 nM Ins). Sternchen symbolisieren Signifikanzen zur Kontrollgruppe: *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001. Daten in Mittelwert ± SEM von n=5 unabhängigen Experimenten mit je n=3 Auftragungen pro Probe, je Inkubationszeit. Auftragung der PCR-Proben siehe Abb. 4.*

Unter einer Glucosekonzentration von 25 mM lässt sich nach 2 h ein signifikanter Anstieg auf 128,9 %, der Proteinmenge unter 1 nM Insulin beobachten (Abb. 32). Nach längerer Inkubation (18 h) ist eine Abnahme der PEPC-Proteinmenge unter Insulinkonzentrationen von 1 nM (56,6 %) und 100 nM (50,1 %) zu verzeichnen (Abb. 32), wobei die Menge von PEPCK unter der Stimulation mit 10 nM Insulin fast auf Kontrollniveau bleibt (93,3 %).

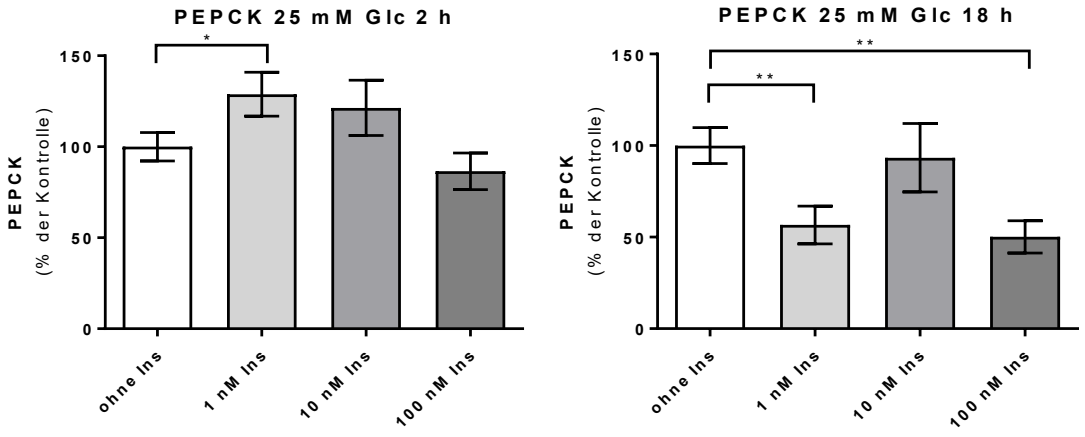

*Abb. 32: Vergleich der Proteinmenge von PEPCK nach 2 h und 18 h in primären Hepatozyten unter 25 mM Glucose bei Stimulation mit Insulinkonzentrationen von 1 nM, 10 nM, 100 nM und ohne Insulin (= Kontrolle). Sternchen symbolisieren Signifikanzen zur Kontrollgruppe: *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001. Daten in Mittelwert ± SEM von n=5 unabhängigen Experimenten mit je n=3 Auftragungen pro Probe, je Inkubationszeit.*

Durch die Behandlung der primären Hepatozyten allein durch Glucose bleibt nach 2 h die Proteinkonzentration etwa konstant. Nach 18 h steigt die PEPCK Proteinmenge unter 2,8 mM Glucose auf 190 %, während sie unter höheren Glucosekonzentrationen (11,1 mM und 25 mM) bis auf 73 % sinkt (Abb. 33).

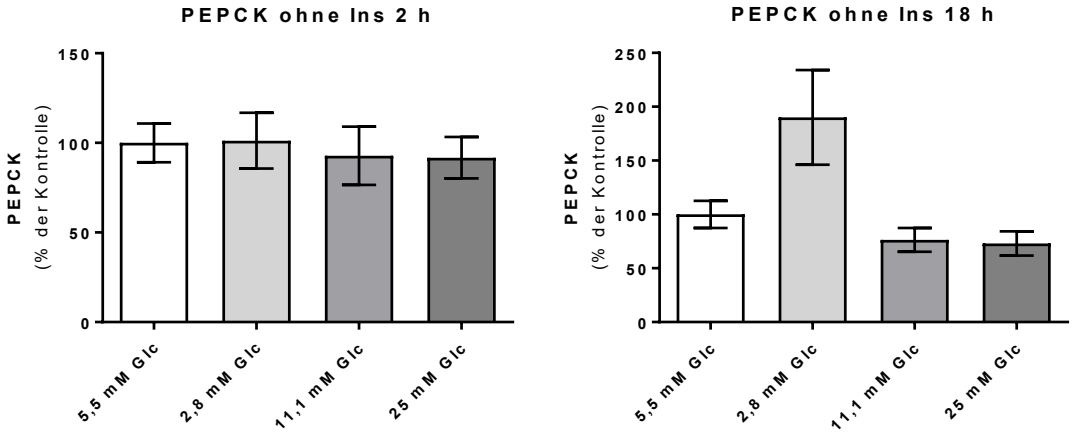

*Abb. 33: Vergleich der Proteinmenge von PEPCK nach 2 h und 18 h in primären Hepatozyten unter der Behandlung ohne Insulin und steigendenGlucosekonzentrationen von 2,8 mM, 5,5 mM (= Kontrolle), 11,1 mM, 25 mM. Sternchen symbolisieren Signifikanzen zur Kontrollgruppe: *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001. Daten in Mittelwert ± SEM von n=5 unabhängigen Experimenten mit je n=3 Auftragungen pro Probe, je Inkubationszeit.*

Unter der Behandlung von 1 nM Insulin sinkt die Menge von PEPCK nach 2 h mit steigender Glucosekonzentration (25 mM) auf 76,7 % (P = 0,067). Nach 18 h ist ein leichter Anstieg unter 2,8 mM Glucose erkennbar (115,6 %) und unter steigenden Glucosekonzentrationen wieder eine Abnahme (Abb. 34).

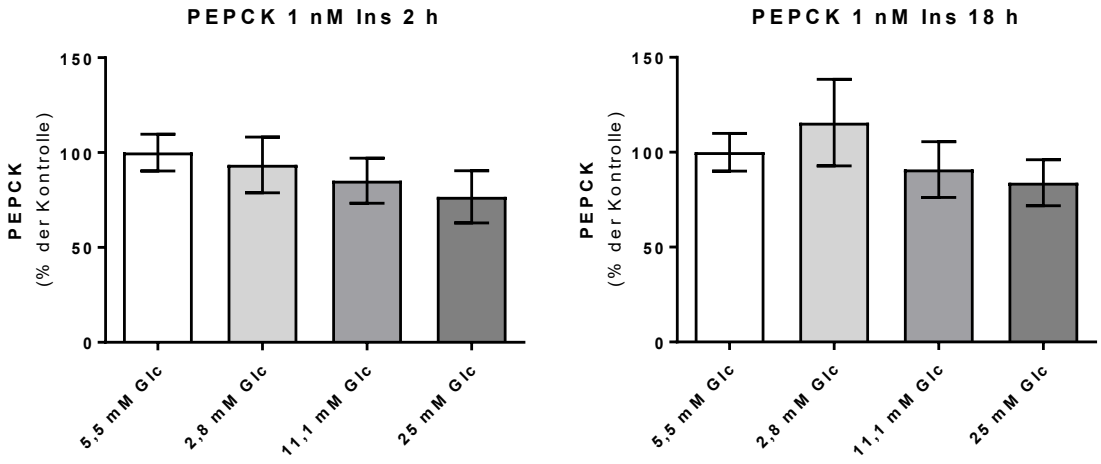

*Abb. 34: Vergleich der Proteinmenge von PEPCK nach 2 h und 18 h in primären Hepatozyten unter 1 nM Insulin bei Stimulation mit Glucosekonzentrationen von 2,8 mM, 5,5 mM (= Kontrolle), 11,1 mM, 25 mM. Sternchen symbolisieren Signifikanzen zur Kontrollgruppe: *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001. Daten in Mittelwert ± SEM von n=5 unabhängigen Experimenten mit je n=3 Auftragungen pro Probe, je Inkubationszeit.*

Die stärksten Veränderungen der Proteinmenge können mit Konzentrationen von Insulin von 10 nM und 100 nM Insulin erzielt werden (Abb. 35). Die Ergebnisse gleichen sich in der Lang- und in der Kurzzeitstimulation. Unter 10 nM Insulin nimmt die Proteinmenge um 80,8 % nach 18 h zu und zeigt damit auch eine Signifikanz bei der Stimulation mit 11,1 mM Glucose an. Ein erkennbarer Unterschied ist bei der Stimulation mit 25 mM Glucose zu erkennen, nach 2 h steigt die Menge von PEPCK (213,7 %) und nach weiteren 16 h nimmt sie wieder ab, ist aber in Bezug auf den Kontrollwert mit 126,7 % noch erhöht (Abb. 35).

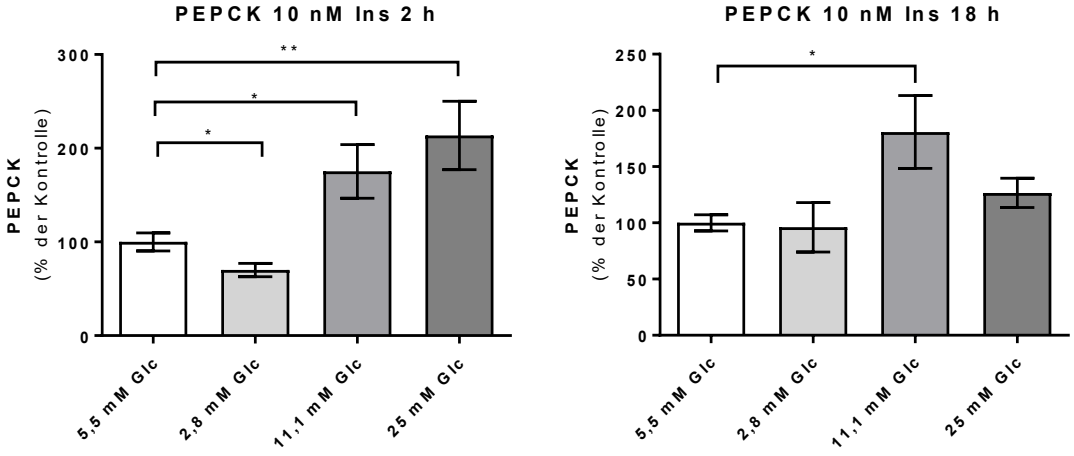

*Abb. 35: Vergleich der Proteinmenge von PEPCK nach 2 h und 18 h in primären Hepatozyten unter 10 nM Insulin bei Stimulation mit Glucosekonzentrationen von 2,8 mM, 5,5 mM (= Kontrolle), 11,1 mM, 25 mM. Sternchen symbolisieren Signifikanzen zur Kontrollgruppe: *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001. Daten in Mittelwert ± SEM von n=5 unabhängigen Experimenten mit je n=3 Auftragungen pro Probe, je Inkubationszeit.*

Nach 2 h wird die Proteinmenge unter 100 nM Insulin sowie 11,1 und 25 mM Glucose erhöht, wobei nach 18 h die Proteinmenge unter 11,1 mM Glucose am stärksten ansteigt (um 141,2 %). Unter 2,8 mM Glucose sinkt die Proteinmenge zu beiden Inkubationszeiten (Abb. 36), wobei nach 2 h die Abnahme der Proteinmenge unter 2,8 mM Glucose signifikant ausfällt.

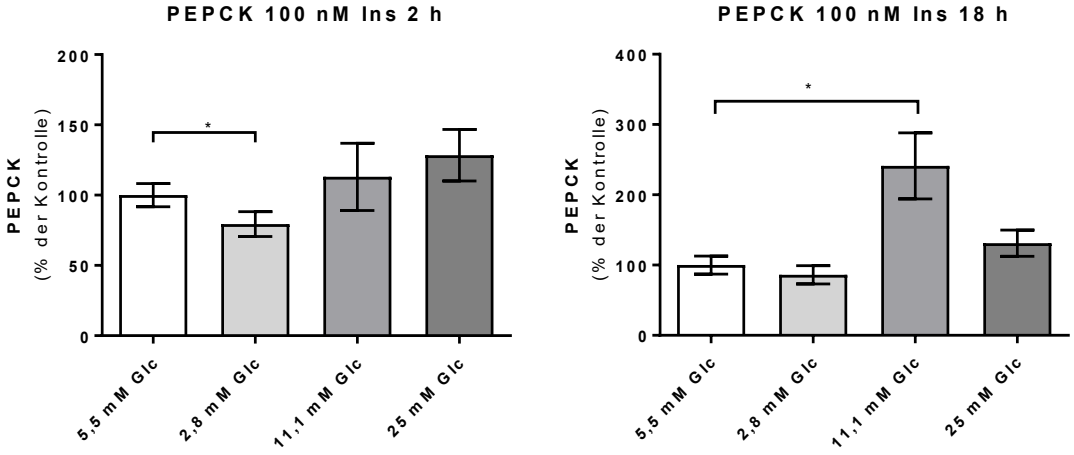

*Abb. 36: Vergleich der Proteinmenge von PEPCK nach 2 h und 18 h in primären Hepatozyten unter 100 nM Insulin bei Stimulation mit Glucosekonzentrationen von 2,8 mM, 5,5 mM (= Kontrolle), 11,1 mM, 25 mM. Sternchen symbolisieren Signifikanzen zur Kontrollgruppe: *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001. Daten in Mittelwert ± SEM von n=5 unabhängigen Experimenten mit je n=3 Auftragungen pro Probe, je Inkubationszeit.*

Zusammenfassend kann betrachtet werden, dass die Untersuchungen an PEPCK, durch die Behandlung mit jeweils 2,8 mM oder 5,5 mM Glucose unter steigenden Insulinkonzentrationen nach 2 h keine Veränderungen aufweisen. Davon ausgenommen sind 25 mM Glucose und 1 nM Insulin, welche die Proteinmenge steigern. Nach 18 h zeigt sich lediglich unter 5,5 mM Glucose und 100 nM Insulin eine Steigerung der Proteinmenge.Nach 18 h moduliert Insulin auch unter 11,1 und 25 mM Glucose (hyperglykämische) Bedingungen die Proteinmenge von PEPCK signifikant, unter 11,1 mM Glucose steigernd, unter 25 mM Glucose erniedrigend.

Unter fehlendem Insulin oder 1 nM Insulin werden keine Effekte auf den Proteingehalt sichtbar. Dagegen werden unter 10 nM oder 100 nM Insulin unter hyperglykämischen Bedingungen steigende, unter hypoglykämischen Bedingungen erniedrigte Proteinmengen nach 2 h und 18 h gemessen.

4.2.3. Glucose-6-Phosphatase (G6P)

G6P ist ebenfalls ein Enzym der Gluconeogenese, also dem Prozess, der der Neusynthese von Glucose dient. Nach 2 h kann bei einer konstanten Glucosekonzentration von 2,8 mM eine signifikante Abnahme der Proteinmenge von G6P durch die Behandlung mit 10 nM (61,2 %) oder 100 nM (58,3 %) Insulin gemessen werden. Wiederrum ist nach 18 h ist ein exponentieller Anstieg der Proteinmenge unter steigender Insulinkonzentration unter 2,8 mM Glucose nachweisbar. Die stärkste Zunahme der Proteinmenge ist damit nach der Stimulation mit 100 nM Insulin, 234 %, zu dokumentieren (Abb. 37).

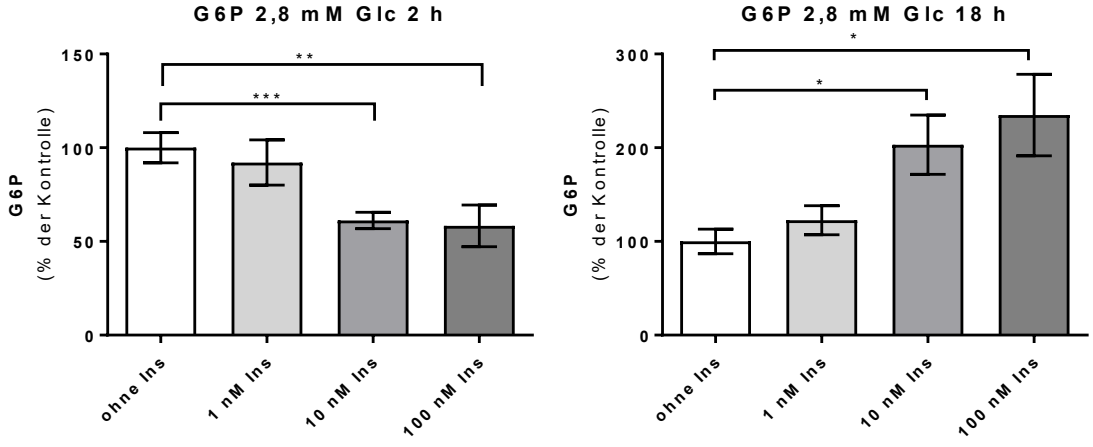

*Abb. 37: Vergleich der Proteinmenge von G6P nach 2 h und 18 h in primären Hepatozyten unter 2,8 mM Glucose bei Stimulation mit Insulinkonzentrationen von 1 nM, 10 nM, 100 nM und ohne Insulin (= Kontrolle). Sternchen symbolisieren Signifikanzen zur Kontrollgruppe: *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001. Daten in Mittelwert ± SEM von n=5 unabhängigen Experimenten mit je n=3 Auftragungen pro Probe, je Inkubationszeit.*

Auch unter normoglykämischen Bedingungen verändert sich die G6P-Proteinmenge nach 2 h. Durch 1 nM Insulin sinkt die Proteinmenge auf 67,9 %. Mit 10 nM Insulin kann eine signifikante Erniedrigung des Wertes um 55 % aufgezeichnet werden. Durch den weiteren Anstieg der Insulinkonzentration zeigt sich wieder ein Anstieg auf 80 %. Wird die Stimulation auf 18 h verlängert, so kommt es unter 10 nM und 100 nM zur Abnahme der Menge von G6P, 1 nM lässt einen Wert von 110,1 % verzeichnen (Abb. 38).

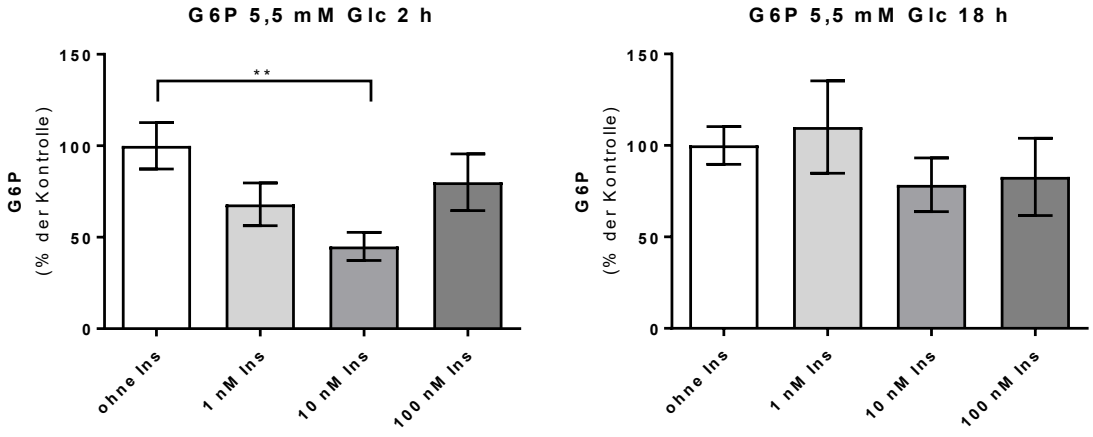

*Abb. 38: Vergleich der Proteinmenge von G6P nach 2 h und 18 h in primären Hepatozyten unter 5,5 mM Glucose bei Stimulation mit Insulinkonzentrationen von 1 nM, 10 nM, 100 nM und ohne Insulin (= Kontrolle). Sternchen symbolisieren Signifikanzen zur Kontrollgruppe: *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001. Daten in Mittelwert ± SEM von n=5 unabhängigen Experimenten mit je n=3 Auftragungen pro Probe, je Inkubationszeit.*

Durch die Behandlung der Hepatozyten mit 11,1 mM Glucose kann nach 2 h kaum eine Veränderung in der Proteinmenge beobachtet werden. Nach 18 h hingegen steigt die Menge an G6P durch die Insulinkonzentration von 1 nM signifikant an (158,8 %) und bei 10 nM (140,2 %), sinkt jedoch durch 100 nM auf 62,6 % ab (Abb. 39).

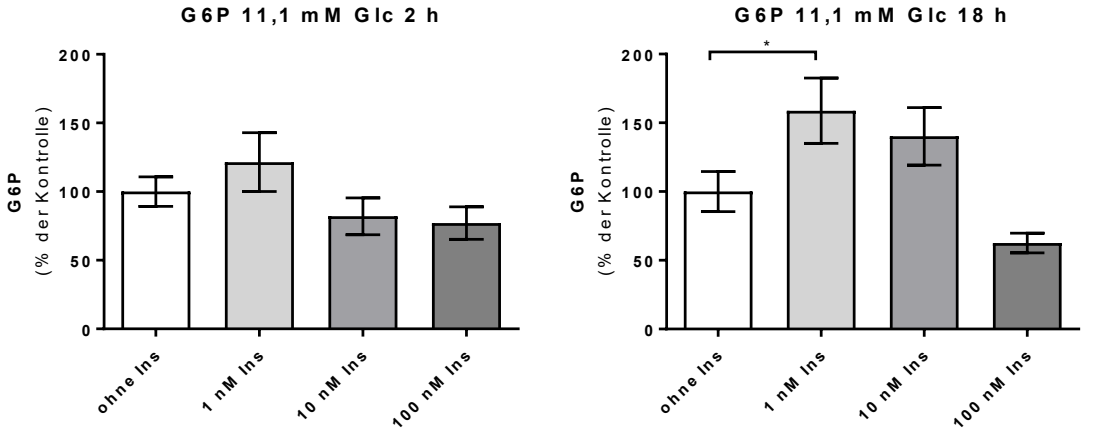

*Abb. 39: Vergleich der Proteinmenge von G6P nach 2 h und 18 h in primären Hepatozyten unter 11,1 mM Glucose bei Stimulation mit Insulinkonzentrationen von 1 nM, 10 nM, 100 nM und ohne Insulin (= Kontrolle). Sternchen symbolisieren Signifikanzen zur Kontrollgruppe: *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001. Daten in Mittelwert ± SEM von n=5 unabhängigen Experimenten mit je n=3 Auftragungen pro Probe, je Inkubationszeit.*

Bereits ersichtliche Veränderungen sind unter hyperglykämischen Bedingungen (25 mM Glucose) beispielhaft in den Gelbildern der Western Blots erkennbar (Abb. 41). In der Kurzzeitstimulation von 2 h ist die Proteinmenge unter 1 nM auf 89,2 % und unter 100 nM Insulin auf 89,7 % gesunken, durch 10 nM auf 127,1 % gestiegen (Abb. 40). Durch den direkten Vergleich der Kurz- mit der Langzeitstimulation ist zu sehen, dass die Proteinmenge innerhalb von 18 h

mit der Zunahme der Insulinkonzentrationen stark abnimmt. Die Stimulation mit 100 nM Insulin zeigt den stärksten Rückgang der Menge von G6P mit 32,3 %.

Bereits ersichtliche Veränderungen sind unter hyperglykämischen Bedingungen (25 mM Glucose) beispielhaft in den Gelbildern der Western Blots erkennbar (Abb. 42). In der Kurzzeitstimulation von 2 h ist die Proteinmenge unter 1 nM auf 89,2 % und unter 100 nM Insulin auf 89,7 % gesunken, durch 10 nM auf 127,1 % gestiegen (Abb. 40). Durch den direkten Vergleich der Kurz- mit der Langzeitstimulation ist zu sehen, dass die Proteinmenge innerhalb von 18 h mit der Zunahme der Insulinkonzentrationen stark abnimmt. Die Stimulation mit 100 nM Insulin zeigt den stärksten Rückgang der Menge von G6P mit 32,3 % (Abb. 41).

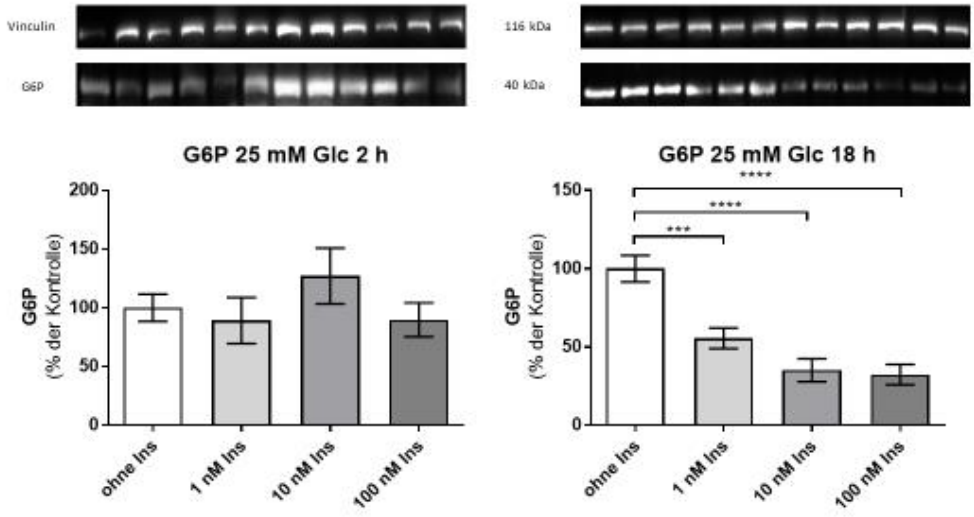

*Abb. 40: Vergleich der Proteinmenge von G6P nach 2 h und 18 h in primären Hepatozyten unter 25 mM Glucose bei Stimulation mit Insulinkonzentrationen von 1 nM, 10 nM, 100 nM und ohne Insulin (= Kontrolle). Sternchen symbolisieren Signifikanzen zur Kontrollgruppe: *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001; ****=P<0.0001.). Die Gelbilder über den Diagrammen zeigen die Proteinexpression durch spezifische Banden, dargestellt mit dem Housekeeping-Gen Vinculin (3 Proben jeweils ohne Ins, 1 nM Ins, 10 nM Ins, 100 nM Ins). Daten in Mittelwert ± SEM von n=5 unabhängigen Experimenten mit je n=3 Auftragungen pro Probe, je Inkubationszeit. Auftragung der PCR-Proben siehe Abb. 4.*

Die Behandlung ohne Insulin und unter steigenden Glucosekonzentration zeigt keinen Einfluss auf die Proteinmenge von G6P nach 2 h und 18 h (Abb. 41).

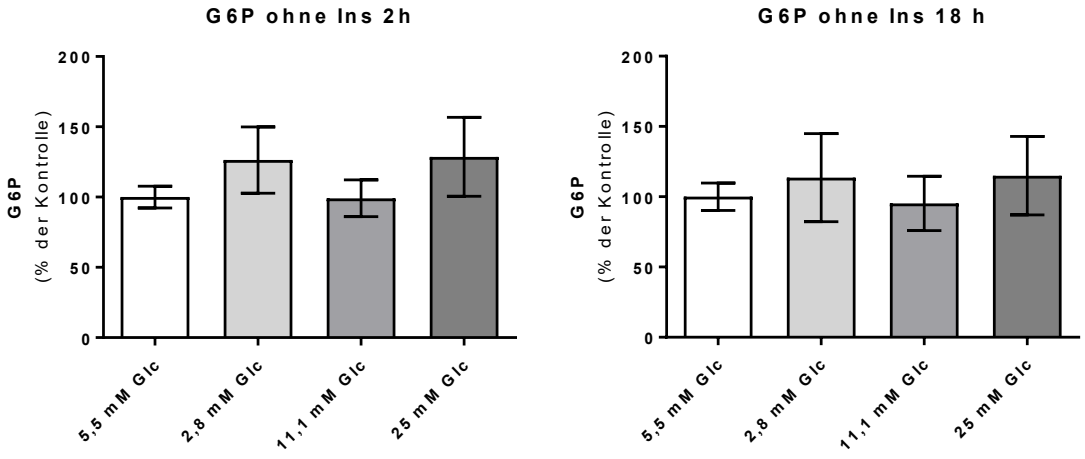

*Abb. 41: Vergleich der Proteinmenge von G6P nach 2 h und 18 h in primären Hepatozyten unter der Behandlung ohne Insulin bei Stimulation mit Glucosekonzentrationen von 2,8 mM, 5,5 mM (= Kontrolle), 11,1 mM, 25 mM. Sternchen symbolisieren Signifikanzen zur Kontrollgruppe: *=P<0.05; **=P<0.01; ***=P<0.001. Daten in Mittelwert ± SEM von n=5 unabhängigen Experimenten mit je n=3 Auftragungen pro Probe, je Inkubationszeit.*

In der Kurzzeitstimulation bleiben die Proteinmengen durch 1 nM Insulin unter 2,8 mM und 11,1 mM Glucose bei circa 100 %, nur durch 25 mM Glucose wird die Menge beeinflusst und auf 71,7 % reduziert. Nach 18 h hingegen wird unter 2,8 mM Glucose der Proteingehalt stark erhöht auf 248,6 % (P = 0,0613). Durch die Behandlung mit 11,1 mM Glucose sinkt wiederum die Proteinmenge signifikant auf 56,3 % ab (Abb. 42).

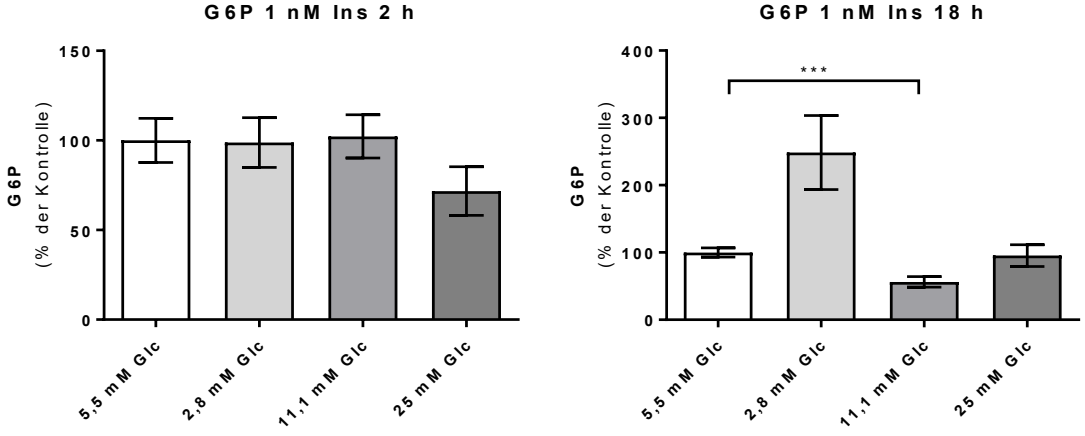

*Abb. 42: Vergleich der Proteinmenge von G6P nach 2 h und 18 h in primären Hepatozyten unter 1 nM Insulin bei Stimulation mit Glucosekonzentrationen von 2,8 mM, 5,5 mM (= Kontrolle), 11,1 mM, 25 mM. Sternchen symbolisieren Signifikanzen zur Kontrollgruppe: *=P<0.05; **=P<0.01; ***=P<0.001. Daten in Mittelwert ± SEM von n=5 unabhängigen Experimenten mit je n=3 Auftragungen pro Probe, je Inkubationszeit.*

Es kommt durch 10 nM Insulin zur Zunahme der Proteinmenge mit steigender Glucosekonzentration nach 2 h. Bei 25 mM Glucose wird die stärkste Zunahme um 131,2 %

erreicht. Wird die Inkubationszeit auf 18 h verlängert, sind kaum Veränderungen ersichtlich (Abb. 43).

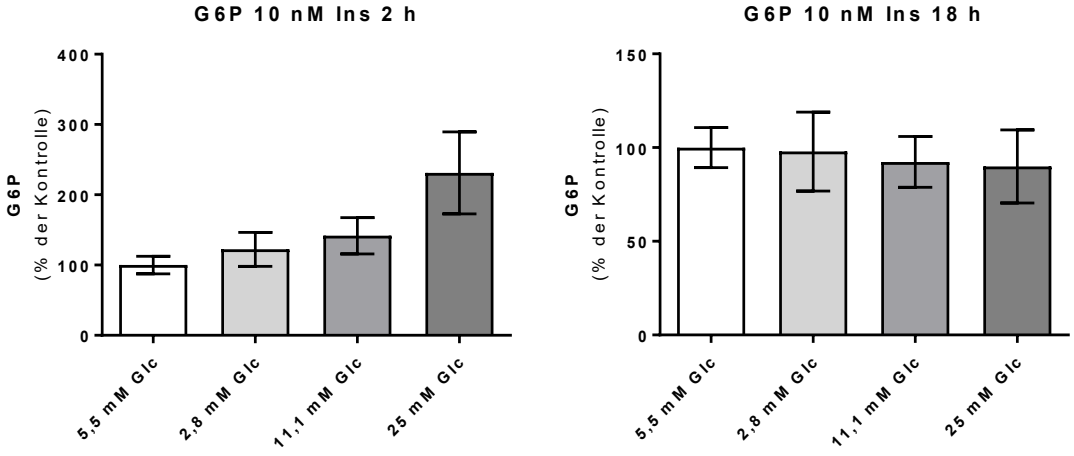

*Abb. 43: Vergleich der Proteinmenge von G6P nach 2 h und 18 h in primären Hepatozyten unter 10 nM Insulin bei Stimulation mit Glucosekonzentrationen von 2,8 mM, 5,5 mM (= Kontrolle), 11,1 mM, 25 mM. Sternchen symbolisieren Signifikanzen zur Kontrollgruppe: *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001; ****P<0.0001. Daten in Mittelwert ± SEM von n=5 unabhängigen Experimenten mit je n=3 Auftragungen pro Probe, je Inkubationszeit.*

Durch 100 nM Insulin kommt es unter 2,8 mM Glucose zur Abnahme der Menge. Nach 2 h wurde die Proteinmenge um 57,3 % signifikant verringert und nach 18 h um 34,8 %. Um weitere 46,8 % sinkt nach 18 h, ebenfalls signifikant, die Proteinmenge durch die Stimulation mit erhöhter Glucose (11,1 mM). Die Menge erhöht sich in diesem Zeitfenster durch 25 mM Glucose minimal auf 35,3 %, während sie nach 2 h mit dieser Stimulation ansteigt auf 161,6 % (Abb. 44).

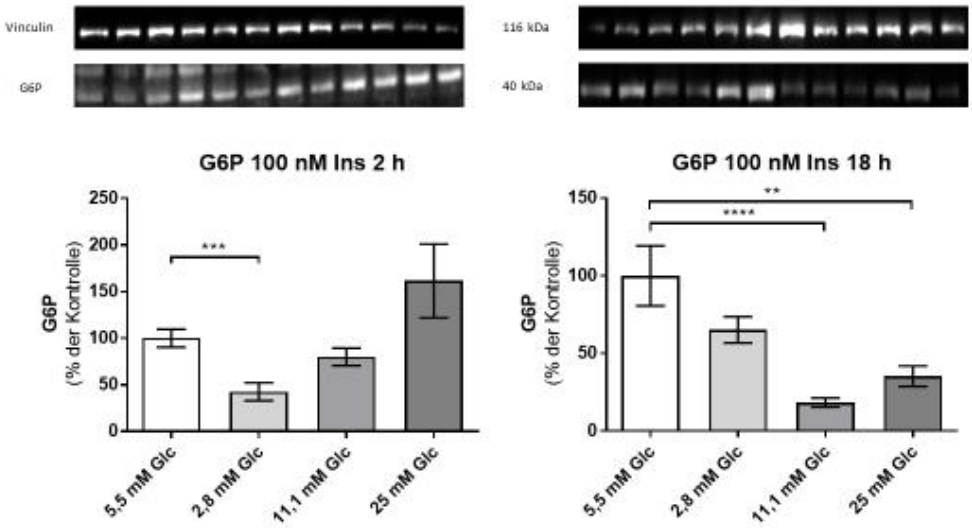

*Abb. 44: Vergleich der Proteinmenge von G6P nach 2 h und 18 h in primären Hepatozyten unter 100 nM Insulin bei Stimulation mit Glucosekonzentrationen von 2,8 mM, 5,5 mM (= Kontrolle), 11,1 mM, 25 mM. Sternchen symbolisieren Signifikanzen zur Kontrollgruppe: *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001; ****P<0.0001. Die Gelbilder über den*

Diagrammen zeigen die Proteinexpression durch spezifische Banden, dargestellt mit dem Housekeeping-Gen Vinculin (3 Proben jeweils ohne Ins, 1 nM Ins, 10 nM Ins, 100 nM Ins). Daten in Mittelwert ± SEM von n=5 unabhängigen Experimenten mit je n=3 Auftragungen pro Probe, je Inkubationszeit. Auftragung der PCR-Proben siehe Abb. 4.

Zusammenfassend lässt sich hier feststellen, dass die stärksten Veränderungen der Proteinmenge von G6P unter 2,8 mM und 25 mM Glucose nach 18 h festzustellen sind. Bei der 2stündigen Behandlung mit 2,8 mM Glucose kommt zur Abnahme der Menge von G6P mit steigender Insulinkonzentration und nach 18 h zu einer Zunahme. Auch durch 25 mM Glucose ist nach 18 h eine Verringerung der Proteinmenge bei steigender Insulinstimulation zu verzeichnen, während nach 2 h nur unter 5,5 mM Glucose ein senkender Effekt auf die Proteinmenge messbar ist.

Ebenfalls starke Effekte sind nach 18 h unter 1 nM und 100 nM Insulin zu erkennen. Unter 1 nM Insulin und 2,8 mM Glucose kommt es zu einer Zunahme der Proteinmenge, nach 2 h ist nur unter 1 nM Insulin und 25 mM Glucose eine Absenkung erzielbar. Eine erhöhte Proteinmenge zeigt sich nach 2 h unter 10 nM Insulin und 25 mM Glucose. Durch die Erhöhung der Insulinkonzentration auf 100 nM kommt es nach 18 h zur Abnahme der Menge von G6P bei allen Glucosekonzentrationen. Nach 2 h hingegen ist eine signifikante Abnahme nur unter 2,8 mM zu verzeichnen.

5. Diskussion

Das Fundament dieser Arbeit bildet die erfolgreiche Anwendung der verwendeten Methoden. Daher beginnt die Disskusion mit einer methodischen Betrachtung, gefolgt von einer kritischen Analyse der daraus resultierenden Ergebnisse.

5.1. Methodische Betrachtung

Da die Leber das zentrale und größte Stoffwechselorgan darstellt, ist dieses Organ gut geeignet, um metabolischen Wege zu untersuchen. Dabei stellen die Hepatozyten die beste Wahl für metabolische Studien und die Analyse des Lebermetabolismus dar, weil sie für ihren Stoffwechsel keine Supplementierung von Co-Faktoren benötigen (Gissen und Arias 2015). Als Goldstandard gelten primäre humane Hepatozyten (Akram et al. 2010). Jedoch sind diese sehr begrenzt verfügbar, sodass auf Alternativen zurückgegriffen werden muss. Die beste Alternative sind Rattenhepatozyten. Die wesentlichen Vorteile dieser Zellen liegen darin, dass das Erbgut der Ratte aufgeschlüsselt wurde und zu 90 % mit dem des Menschen übereinstimmt (Gibbs et al. 2004). Weiterhin erhält man pro Rattenwurf circa 6-8 Jungtiere und kann somit den notwendigen Stichprobenumfang schneller erreichen. Primärzellen aus der Leber eignen sich daher für metabolische und pharmakologische Zellstudien.

Nachteilig an der Verwendung von primären Hepatozyten ist, dass die Tiere unter standardisierten Idealbedingungen gehalten werden und somit wichtige Faktoren aus der Umgebung des Menschen nicht berücksichtigt werden. Schlussendlich ist die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen nicht vollständig möglich. Die Verwendung von Tieren generell wirft ethische Probleme und Fragen auf. Es kann darüber diskutiert und geforscht werden, ob diese Ergebnisse auch durch alternative Möglichkeiten reproduziert werden können. In der vorliegenden Dissertation wurden ausschließlich männliche Ratten verwendet. Im Zuge der Gender-Medizin muss die Forschung auch an weiblichen Tieren vorgenommen werden, um die zyklischen Schwankungen, die wir ausschließen wollten, mit einzubeziehen und dadurch herausfinden zu können, ob diese Schwankungen einen Einfluss auf die Proteinmenge haben.

Die heutige Gesellschaft neigt, durch den übermäßigen Konsum von Nahrung mit erhöhtem Zuckeranteil, zu Übergewicht, Adipositas und dem daraus resultierenden Diabetes mellitus. Die Erkrankung von Kindern und Jugendlichen an Diabetes Typ 2 nimmt rapide zu. In Zukunft müssen demzufolge Erkenntnisse erhoben werden, mit denen die folgenden Probleme im Organismus behoben werden können. Dafür müssen grundlegende Modelle von Zellen entworfen werden,

die dazu genutzt werden können, Medikamente, Inhibitoren, Aktivatoren etc. testen zu können. Um diese Ergebnisse einzuordnen, ist es notwendig, sich auf Daten beziehen zu können, die an gesunden Kontrolltieren entstanden sind. Die Isolation und Kultur von primären Hepatozyten aus der Rattenleber stellt eine geeignete Methode dar, um den Glucosestoffwechsel zu modulieren. Deutliche Veränderungen im Glucosestoffwechsel können als Ausgangsbedingung genutzt werden, um beispielsweise weiterführende Experimente mit pharmakologischen Substanzen anzuschließen.

Durch die „Two-Step-Kollagenase-Perfusionstechnik“ (Seglen 1972) wurden die Hepatozyten gewonnen. Anhand dieser Isolationstechnik kann eine Zellsuspension erreicht werden, die eine Mischung aus intakten normalen Hepatozyten, präneoplastischen Leberzellen, Kupffer-Zellen, Endothelzellen und Zelltrümmern beziehungsweise beschädigten Zellen enthält (Seglen 1979). Die beschädigten Zellen und deren Trümmer können durch differentielle Zentrifugation entfernt werden, es kann aber keine Zellsuspension erschaffen werden, die zu 100 % nur aus Hepatozyten besteht. Es gibt Hinweise, dass Co-Kulturen von Hepatozyten zusammen mit Kupffer-Zellen eine bessere in-vivo Situation in-vitro darstellen, weil metabolische Enzyme, die für die Arzneimittelforschung benötigt werden, sowie Transkriptionsfaktoren und Zytokine bereitgestellt werden. Dadurch können in-vivo ähnliche Reaktionen der Zellen hervorgerufen werden (Akram et al. 2010).

5.2. Veränderungen der Glucosetransporter durch die Stimulation mit Insulin und/oder Glucose in den primären Hepatozyten

In der Leber wird vorwiegend GLUT-2 exprimiert, aber auch GLUT-1 nimmt eine wichtige Rolle ein. Glucosetransporter stellen den Anfang des Glucosemetabolismus dar. Durch einen erhöhten Blutzuckerspiegel nehmen sie vermehrt Glucose in die Zelle auf und senken diesen somit. Außerdem wird die Ausschüttung von Insulin stimuliert und dadurch metabolische Vorgänge, die in der Zelle lokalisiert sind, aktiviert (DeFronzo et al. 2015). Aufgrund dieser Stoffwechselwege sinkt der Blutzuckerspiegel. Damit sinkt wiederrum der intrazelluläre Glucosespiegel und es kann, durch den dadurch entstanden Konzentrationsgradienten, mehr Glucose aufgenommen werden (Rui 2014). GLUT-1 und GLUT-2 sind insulinunabhängig (Cao et al. 2021), jedoch werden sie durch Insulin indirekt beeinflusst (Agius 2008). Die Glucose muss also verstoffwechselt werden, um die Insulinfreisetzung zu stimulieren (Ashcroft et al. 2023). Bei Patienten, die eine normale Glucosetoleranz aufweisen, sollte der Blutzuckerspiegel nach einer Mahlzeit durch die vermehrte Insulinausschüttung und die daraus resultierende

Hyperinsulinämie, nach 2 h auf das Normalniveau von circa 5 mM/L sinken (DeFronzo et al. 2015). Aufgrund dessen wurde in der vorliegenden Arbeit sowohl die physiologische Stimulation von 2 h als auch eine verlängerte Einwirkzeit von 18 h untersucht. Diesen Zusammenhang konnten wir unter normoglykämischen Konzentrationen von 5,5 mM zeigen. Nach 2 h ist die Proteinmenge von GLUT-1 als auch GLUT-2 mit steigender Insulinkonzentration erhöht, sodass von einer Insulinabhängigkeit unter normalen Glucosekonzentrationen gesprochen werden kann (Tal et al. 1991). Das konnte auch durch die Betrachtung des Einflusses der Glucose bestätigt werden. Die Ergebnisse unter diesen Bedingungen zeigen wenig Schwankungen in der Proteinmenge, Tal et al. untersuchten 1991 bereits die Ursache für eine veränderte GLUT-1 Expression. Sie fanden unter anderem heraus, dass besonders Fasten und der Zustand eines Diabetes eine GLUT-1 Expression induzieren, wobei die Expression mit dem niedrigen Insulinspiegel im Blut korreliert und nicht mit der Glucose. Nach 18 h hingegen sind kaum Veränderungen in der Proteinmenge mehr zu verzeichnen, was ebenfalls den oben beschriebenen Sachverhalt unter normalen Bedingungen bestätigt. Da also die Möglichkeiten zur Speicherung und Umwandlung der Glucose aufgebraucht sind, kann kein Konzentrationsgradient mehr hergestellt werden und somit stagniert die messbare Aktivität der Glucosetransporter. Auf dieser Grundlage ist es nun interessant, die Ergebnisse unter hypo- und hyperglykämischen Bedingungen zu betrachten.

GLUT-1 nimmt unter hypoglykämischen (2,8 mM) Bedingungen, höchstwahrscheinlich aufgrund des niedrigen Blutzuckerspiegels, unter steigenden Insulinkonzentrationen ab. Dadurch wird eine weitere Abnahme des Blutzuckerspiegels verhindert und somit eine kritische Stoffwechsellage vermieden. Durch längere Inkubationszeiten von 18 h nähert sich die Proteinmenge dem Kontrollwert wieder an, es kommt also zu einer Art Anpassung und Konstanthaltung der Aktivität des GLUT-1 bei Anhalten dieser Stoffwechselsituation. Die konstante Aktivität und somit die Aufnahme von Glucose muss in gewissen Mengen, auch während eines niedrigen Glucosespiegels, gewährleistet werden. Diese Reaktion ist unter allen getesteten Glucose-Stimulationen erkennbar, wodurch die These gestärkt wird. Die Betrachtung der Situation unter gleichbleibender Insulinkonzentration und Veränderung der Glucose zeigt bei allen Kombinationen nach 2 h kaum Veränderungen. Nach 18 h hingegen sind vor allem die abnehmende Proteinaktivität von GLUT-1 unter 5,5 mM und 11 mM Glucose erkennbar. Die Kombination aus der höchsten Insulinkonzentration stimuliert mit der höchsten Glucosekonzentration zeigt die Anpassung der Proteinmenge GLUT-1 an den Kontrollwert. Diese Situation ist demnach verwendbar als Modell für die Insulinresistenz.

Gegensätzlich dazu reagiert in unseren Experimenten GLUT-2, der den entscheidenden hepatischen Glucosetransporter darstellt. Schon bei geringen Konzentrationen an Glucose, 2,8 mM, steigt die Proteinmenge nach 18 h signifikant bei steigenden Insulinkonzentrationen an. Die Gegensätzlichkeit zu GLUT-1 ist damit zu begründen, dass GLUT-2 vermehrt in der Leber und somit in den primären Hepatozyten vorkommt und eine geringe Affinität aufweist. Damit setzt nach 2 h vermehrt GLUT-1 ein durch die anfänglich hohe Konzentration, nach einiger Zeit vor allem GLUT-2 (18 h). Es ist zu diskutieren, ob diese starke Zunahme des Transporters zu einer gefährlichen Stoffwechsellage und einem noch weiteren Abfall des Blutzuckerspiegels führt oder dadurch andere Stoffwechselwege, die Glucose aus Nicht-Kohlenhydrat-Vorstufen herstellen, vermehrt ablaufen. Diese Tatsache bestätigt der Nachweis der signifikant erhöhten Proteinmenge von G6P unter den gleichen Bedingungen (Agius 2008). Aus G6P kann durch Glucose-6-Phosphatase im glatten Endoplasmatischen Retikulum wieder Glucose hergestellt und somit abgegeben werden. Verbleibt diese Stoffwechsellage, so wird mehr Energie verbraucht, als gewonnen werden kann (Nuttall et al. 2008).

In einem Milieu von 25 mM Glucose, wodurch die Situation des Diabetes Typ 2 in der Ratte nachgeahmt werden sollte (Peschke et al. 2006), kann bei GLUT-2 unter allen Insulinkonzentrationen nach 2 h eine Abnahme beobachtet werden, das lässt eine Sättigungskinetik vermuten. Durch die sehr hohe Glucosekonzentration sind auch die intrazellulären Speicher aufgefüllt und es existiert kein Konzentrationsgradient mehr. Dadurch wird in diesem Zustand Glucose im Organismus vermehrt über den Urin ausgeschieden.

5.3. Einfluss der Behandlung mit Glucose und/oder Insulin auf Enzyme des Glucosestoffwechsels

5.3.1. Glucokinase (GCK)

Das Enzym GCK ist neben den Glucose Transportern interessant, weil es an der Konstanthaltung des Blutzuckerspiegels beteiligt ist (Mueckler et al. 1994). Erhöhte Glucosespiegel im Blut und somit auch in Hepatozyten, durch die Aufnahme von Glucose über GLUT-1 und GLUT-2 befördert, führen zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors ChREBP. Dieser ist als Schlüsselfaktor für glykolytische und lipogene Gene verantwortlich und transkribiert somit einige Enzyme der Glykolyse. Dadurch wird folgend die Glykolyse aktiviert (Dentin et al. 2006; Han et al. 2016). Die Glucokinase wird auch als Glucose-Sensor bezeichnet, weil sie an verschiedenen Stellen des Körpers an der Regulation der Glucosekonzentration aktiv, durch den Verbrauch von ATP, beteiligt ist. In der Leber erleichtert sie die Glykogenspeicherung und

postprandial ist sie vor allem für die Entfernung der Glucose aus dem Blut zuständig. Aber auch in den β-Zellen des Pancreas sorgt die GCK dafür, dass die Insulinsekretion an den Blutzuckerspiegel angepasst wird. Weiterhin dient sie in Neuronen und neuroendokrinen Zellen der Glucose-Erfassung (Ashcroft et al. 2023).

Nach Agius (2008) stimuliert Insulin die Expression von GCK und erhöht durch diesen Mechanismus die Glucose Aufnahme in die Zelle, unabhängig von der Glucosekonzentration (Iynedjian 1993). Diese insulinstimulierende Wirkung soll in kultivierten primären Hepatozyten durch Dexamethason in Konzentrationen von 1-100 nM verstärkt werden (Narkewicz et al. 1990). Dexamethason befand sich, in der Konzentration 1:10‘000, auch im Medium der primären Hepatozyten in den vorliegenden Experimenten, so dass ein positiver Einfluss auf die Proteinmenge von GCK nicht ausgeschlossen werden kann. Die Stimulation durch Insulin konnte nur nach der Inkubationszeit von 2 h und unter hohen Glucosekonzentrationen von 25 mM nachgewiesen werden. Dabei ist die Zunahme der Menge an GCK bei Insulinstimulationen von 10 nM und 100 nM bei gleichzeitig steigenden Glucosekonzentrationen zu beobachten, wodurch die Annahme, dass die vermehrte Expression nur durch Insulin und unabhängig von der Glucosekonzentration ist (Iynedjian 1993), nicht bestätigt werden konnte. Unter hypoglykämischen Bedingungen blieb die Proteinmenge auch nach der Stimulation mit Insulin nahezu konstant. Interessant ist, dass nach 18 h die Reaktionen umgekehrt vorzufinden sind. Es kommt durch Insulinkonzentrationen von 10 nM und 100 nM und steigender Glucosekonzentration von 25 mM hier zu einer Abnahme. Diese Konzentrationen gleichen einem Hyperinsulinismus und die Reaktionen der GCK können mit den Ergebnissen von Ashcroft et al. (2023) verglichen werden, die im folgenden Abschnitt beschrieben werden.

Weiterhin kann unter Bedingungen (11,1 mM Glucose), die einem Diabetes Typ 2 gleichen sollen (Peschke et al. 2006), nach 2 h eine von der Insulinkonzentration abhängige Abnahme der Glucokinase beobachtet werden. Durch dauerhaft hohe Blutzuckerkonzentrationen kommt es durch die gesteigerte Aktivität des Glucose Metabolismus zu einem Hyperinsulinismus und aufgrund dessen zum Untergang der β-Zellen (Ashcroft et al. 2023). Dadurch wird die Aufnahme der Glucose wiederum beeinträchtigt und der Glucosemetabolismus somit gebremst. Bisher wurden deshalb zur Therapie Glucokinase-Aktivatoren eingesetzt, um dadurch den Glucose-metabolismus wieder zu steigern und somit eine erhöhte Insulinsekretion zu erreichen. Jedoch ergaben neue Studien, dass durch GCK-Aktivatoren die Insulinsekretion nicht langfristig gesteigert werden kann und diese Medikamente als Antidiabetika nicht geeignet sind. Stattdessen sollen GCK-Inhibitoren eingesetzt werden, um einen weiteren Untergang der β-Zellen durch eine Hyperaktivierung des Glucosestoffwechsels zu vermeiden, entgegen der

bisher bestehenden Annahme, dass sie die Insulinfreisetzung verlangsamen und eine Entstehung des Diabetes unterstützen (Ashcroft et al. 2023). Auf Grundlage dieser Studie ist es möglich, dass die Abnahme der Proteinmenge der GCK eine eigene Reaktion der Zellen zum Schutz ist, da die Zustände des Diabetes nur in der Zellkultur hervorgerufen wurden, die Zellen aber aus gesunden Wistar-Ratten stammten. In unseren Experimenten war, anders als in der oben beschriebenen Theorie, Insulin dauerhaft vorhanden. Dadurch kann man den grundlegenden Mechanismus nahezu übernehmen und auf eine Insulinresistenz beziehen, die in unseren Experimenten zum Tragen kommt.

Bei der Betrachtung der alleinigen Stimulation durch Glucose ist auffällig, dass 2,8 mM die größten Veränderungen hervorruft. Nach 2 h nimmt die Proteinmenge von GCK um die Hälfte ab, während sie nach 18 h wieder zunimmt. Anhand der anderen Glucosekonzentrationen kann hier die Insulinabhängigkeit bestätigt werden, da es kaum zu Veränderungen kommt.

5.3.2. Glucose-6-phosphatase (G6P)

Nachdem die Glucose in die Zelle aufgenommen und durch GCK in Glucose-6-phosphat phosphoryliert wurde, kann sie die Zelle nicht direkt wieder verlassen, da G6P nicht von den Glucose Transportern transportiert werden kann (Rui 2014). Somit verbleibt G6P in den Hepatozyten und kann für die Gluconeogenese verwendet werden, wodurch Pyruvat entsteht und weitere Stoffwechselwege gefördert werden. Weiterhin kann G6P auch für den Pentosephosphatweg genutzt werden, dieser läuft ebenfalls vermehrt in Hepatozyten ab, da das entstehende NAPH für die Fettsäuresynthese benötigt wird (Rui 2014). Im nüchternen Zustand wird G6P ins endoplasmatische Retikulum eingeschleust, dort dephosphoryliert und als Glucose wieder freigesetzt. Somit nimmt G6P unterschiedliche Funktionen ein und stimuliert die Glykogensynthese sowie die Gluconeogenese und hemmt die Glucogenolyse (Rui 2014).

Die Gluconeogenese ist, wie bereits erwähnt, für die Freisetzung der Glucose zuständig, wenn der Blutzuckerspiegel niedrig ist. Durch die Versuche konnte gezeigt werden, dass die Aktivität von G6P vor allem durch eine sehr niedrige Glucosekonzentration (2,8 mM) und auch eine hohe Konzentration (25 mM) beeinflusst werden konnte. Im hypoglykämischen Milieu sollte die Aktivität hoch sein, um den Blutglucosewert konstant halten zu können. Jedoch kann diese Zunahme, die scheinbar durch die steigenden Insulinkonzentrationen positiv beeinflusst wird, erst nach 18 h beobachtet werden. Hier kann eine Steigerung der Menge von G6P unter 100 nM Insulin um das 1,5-fache beobachtet werden. Nach 2 h zeigt G6P eine deutliche Abnahme der Proteinmenge durch erhöhte Insulinkonzentrationen. Hypoglykämische Umstände stellen eine

Art Fasten dar, wodurch G6P sowie PEPCK aktiviert werden (Han et al. 2016). Dieser Mechanismus tritt bei längerem Fasten ein und es wird eine de-novo Glucose Synthese induziert, die hepatische Gluconeogenese (Han et al. 2016). In den vorliegenden Experimenten haben die Zellen alle 2 h gehungert und somit die gleiche Fastenzeit aufgewiesen, dennoch zeigte sich, entgegen der bereits bekannten Daten, keine Zunahme.

Die hyperglykämischen Umstände (25 mM) erfordern die Abnahme der Gluconeogenese um 20 % und somit auch die verminderte Menge der Schlüsselenzyme dieses Vorganges (Gastaldelli et al. 2001; Hatting et al. 2018). G6P zählt zu den geschwindigkeitsregulierenden Enzymen und wird nach 18 h durch die zusätzliche Stimulation mit Insulin herabgesetzt. Weiterhin kann die Abnahme auch auf die Aktivität der Glucogen Synthese deuten. Diese Reaktionen sind in der Langzeitstimulation zu beobachten, während nach 2 h kaum Veränderungen in der Proteinmenge zu verzeichnen sind. Nach DeFronzo et al. (2015) ist bei Glucose toleranten Patienten 2 h nach einer Hyperglykämie wieder ein normaler Blutzuckerspiegel erreicht. Die verwendeten Hepatozyten entstammen aus gesunden Kontrolltieren, sodass diese These bestätigt werden kann. Pilkis und Claus (1991) beschreiben, dass die Aktivität von G6P in diabetischen Ratten durch Hungern gesteigert wird, was auch Han et al. (2016) belegten. In den vorliegenden Versuchen hungerten gesunde Hepatozyten ebenfalls und wurden dann in den Zustand eines Diabetes Typ 1 sowie Typ 2 versetzt. Diese Bedingungen lösten nach 18 h gegensätzliche Ergebnisse aus, so dass die Aktivität von G6P unter einem Typ 1 Diabetes simulierten Zustand und der Zugabe von Insulin abnahm und unter der Konzentration von 11,1 mM Glucose, also eines Typ 2 Diabetes, entsprechend der Ergebnisse von Pilkis und Claus sowie Han et al., eine Zunahme aufzeigte.

5.3.3. Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK)

Das Enzym PEPCK wird überwiegend in der Leber, den Nieren und in Fettzellen exprimiert und stellt als erster Schritt der Gluconeogenese einen wichtigen Faktor im Glucose Haushalt dar. Die Gluconeogenese findet daher ausschließlich in der Leber und in der Niere statt. Sie wird während einer Hyperglykämie gehemmt, wenn der Blutzuckerspiegel jedoch gering ist, wieder aktiviert. Eine Überexpression von PEPCK führt zu Diabetes, da der Blutzuckerspiegel weiter gesteigert wird (Beale et al. 2007). Aber auch Knock-out-Versuche, die an Mäusen durchgeführt wurden, verdeutlichen die Entwicklung eines Diabetes bei Fehlen von PEPCK, weil Oxalactat nicht entfernt werden kann, der Citratzyklus damit auf circa 10 % verlangsamt wird, es somit zu einem Überschuss an Glucose kommt und damit eine Fettleber entstehen kann (Beale et al. 2007). Aber

auch eine extreme Überexpression von PEPCK führt zu einem Diabetes Typ 2 und/oder verwandten Phänotypen, die mit Fettleibigkeit oder Lipodysthopie einhergehen. Man geht davon aus, dass beide abnormalen Extreme und deren Auswirkungen bei Menschen ähnliche Folgen haben und zum Tod führen können (Beale et al. 2007). In Wirbeltieren kommt die Phosphoenolpyruvat-Carboxy-Kinase in verschiedenen Isoformen vor, der PCK1 und PCK2 (Ballard und Hanson 1969). Die PCK1 oder auch PEPCK-C ist im Zytosol lokalisiert und deren Transkription wird durch Insulin inhibiert. Die PCK2 oder auch PEPCK-M liegt mitochondrial vor und wird in dieser Arbeit nicht genauer untersucht.

Quinn und Yeagley (2005) zeigten eine Abnahme der Expression von PEPCK durch hohe Insulinspiegel aufgrund einer vorliegenden Hyperglykämie. Auch Hatting et al. (2018) konnten nachweisen, dass die Aktivität von PEPCK unter anderem durch Insulin und Glucose verändert wird. Dadurch, dass Insulin die Expression vermindert, liegt eine hormonelle Beeinflussung vor (O'Brien und Granner 1990). Stimuliert wird die Expression hingegen durch Perioden des Fastens oder auch durch Reaktionen auf Stresssituationen (Quinn und Yeagley 2005). Liegen eine Insulinresistenz oder ein Insulinmangel vor, so ist diese Regulation gestört und der Blutzuckerspiegel kann nicht mehr adäquat kontrolliert werden, sodass es zu krankhaften Zuständen kommt (Quinn und Yeagley 2005).

Eine Beeinflussung durch Insulin konnte anhand der vorliegenden Versuche bestätigt werden. Konzentrationen von 10 nM und 100 nM verursachten Veränderungen in der Proteinmenge zu beiden Inkubationszeiten. Die Menge an PEPCK wurde durch die Stimulation mit steigenden Insulin Konzentrationen, genau wie in den oben genannten Ergebnissen, in Kombination mit einer Hyperglykämie (11,1 mM und 25 mM Glucose) teilweise um die Hälfte reduziert.

Ebenfalls zu erkennen ist, dass die Proteinmenge sich durch die Stimulation mit 1 nM Insulin oder ohne Insulin kaum verändert. PEPCK wird durch Glukagon stimuliert. Durch fehlendes Insulin wird der Glykogenstoffwechsel nicht adäquat unterstützt und aktiviert, wodurch es zu einer fehlenden Aktivierung der PEPCK kommen kann.

Durch hyperglykämische Zustände mit einer Konzentration von 25 mM kann unter der Stimulation mit Insulin eine Abnahme der Menge an PEPCK erkannt werden, analog zu den Ergebnissen von Quinn und Yeagley (2005), Hatting et al. (2018). Die Autoren konnten zeigen, dass die Expression von PEPCK durch hohe Insulin-Spiegel aufgrund einer Hyperglykämie gehemmt wird. Die hormonelle Kontrolle durch Insulin konnte bestätigt werden. Es ist auffällig, dass bei Glucosekonzentrationen von 11,1 mM die Ergebnisse umgekehrt sind und eine Zunahme zu verzeichnen ist. Dadurch wird unter dieser Konzentration nach 18 h ein weiterer

Anstieg des Blutzuckerspiegels erzielt. Die primären Hepatozyten in unseren Experimenten hungerten vor der Stimulation 2 h. Wie oben bereits beschrieben konnte herausgefunden werden, dass es eine Korrelation zwischen Fastenperioden und der Expression von PEPCK gibt. Daher ist es möglich, dass die Ergebnisse dadurch etwas beeinflusst und die Proteinmenge gesteigert wurde.

5.4. Analyse der gewählten Konzentrationen und Inkubationszeiten

Betrachtet man alle Enzyme unter den jeweiligen Stimulationsbedingungen, so lässt sich feststellen, dass die Behandlung mit den Extremen, 2,8 mM und 25 mM Glucose, die optimalen Veränderungen nach 18 h in der Proteinmenge hervorruft. Nach 2 h sind bei allen Enzymen weniger Veränderungen erkennbar. Generell ist bekannt, dass Veränderungen erst auf mRNA-Ebene und später erst auf Proteinebene sichtbar werden, dies wird hier bestätigt. Daher ist es für die Betrachtung der meisten Zusammenhänge von Vorteil, diesen Zeitraum der Stimulation zu wählen. Es kann auch ein Zusammenhang zwischen den Enzymen und deren Stoffwechselwegen aufgezeigt werden. Durch einen hohen Glucosewert von 25 mM sinkt die Proteinmenge der Enzyme der Gluconeogenese, G6P und PEPCK. Das Ziel der Gluconeogenese, Glucose freizusetzen, wird unter diesen Bedingungen nicht verfolgt und daher ist auch die Aktivität dieser Enzyme verringert. Weiterhin wird weniger Glucose aufgenommen, was durch die Abnahme des GLUT-2 nachgewiesen wurde. Zusätzlich zeigt die hypoglykämische Situation Veränderungen mit hoher Aussagekraft an. Da einige Enzyme wie die Glukokinase insulinabhängig sind, ist es vorteilhaft, geeignete Insulinkonzentrationen zu kennen. 100 nM Insulin stellen die optimale Konzentration an Insulin dar, weil in dieser Umgebung die primären Hepatozyten Reaktionen zeigen, die eine gute Grundlage für die weitere Forschung darstellen.

5.5. Limitationen der Arbeit

Die bisherige Datenlage zu Reaktionen primärer Hepatozyten unter nicht-physiologischen Bedingungen beschränkt sich auf ein Minimum. Wie bereits erwähnt, lag die Orientierung primär an den bisherigen Ergebnissen unter einem physiologischen Glucosespiegel von 5,5 mM. Weiterhin konnten wir Daten zu den Konzentrationen 11,1 mM und 25 mM verwenden. Die geringe Datenlage führte dazu, dass die Vitalität unter geänderten Konzentrationen, aufgrund der starken Belastung, schwankte. Um repräsentative und qualitative Ergebnisse zu erhalten, war die Vitalität trotzdem bei allen Versuchen bei mindestens 80 %.

In der Statistik führen tendenziell größere Stichproben, wie beispielsweise n=10 zu zuverlässigeren Ergebnissen, da sie repräsentativer für die gesamte Population sind. Kleinere Stichproben können anfälliger für Zufälligkeiten und Ausreißer sein. In den vorliegenden Experimenten wurde n=5 gewählt, um eine angemessene statistische Aussagekraft zu gewährleisten, während gleichzeitig die Anzahl der benötigten Tiere minimiert wurde. Die Entscheidung für n=5 ermöglicht es, eine repräsentative Datenbasis zu schaffen, die die biologischen Variationen innerhalb der Hepatozyten und der Individuen berücksichtigt und darstellt, jedoch ohne die ethischen Richtlinien für den Tierversuch zu verletzten. Durch die sorgfältige Auswahl der Anzahl der Proben und die Durchführung der Experimente mit den primären Hepatozyten können valide und aussagekräftige Ergebnisse erzielt werden, die zur weiteren Erforschung des Glucosestoffwechsels in der Leber beitragen.

5.6. Schlussfolgerung

Primäre Hepatozyten stellen ein sehr gutes Modell in der Zellkultur dar. Mit dieser Studie konnte gezeigt werden, dass diese Zellen sich eignen, um unter den genannten Bedingungen Änderungen im Glucosestoffwechsel zu induzieren. Durch diese Grundlagenforschung können die Zellen ideal gehalten werden und infolgedessen ist mit weniger Verlusten zu rechnen. Damit werden die wertvollen Zellen, die aus Tieren gewonnen werden müssen, effektiver genutzt.

Es konnte gezeigt werden, dass die größten Veränderungen in der Proteinmenge von glykolytischen und gluconeogenetischen Enzymen vor allem nach 18 h nachweisbar sind. Dennoch ist auch diese Aussage nicht für alle untersuchten Enzyme vollkommend zutreffend. GLUT-1 reagiert nach 2 h besser als nach 18 h. Dies ist eventuell auf den Km-Wert zurückzuführen.

Allgemein feststellbar ist weiterhin, dass unter Glucosekonzentrationen von 2,8 mM oder 25 mM die stärksten Effekte auf die Proteinmengen erzielt werden. Die Glucosekonzentration von 25 mM spiegelt eine diabetische Stoffwechsellage wider, durch die in den primären Hepatozyten Änderungen im Glucosestoffwechsel induziert werden. Damit ist es perspektivisch möglich, die Wirkung von Medikamenten, die an diesen Stoffwechselwegen angreifen, auszutesten und zu beschreiben. Zusätzlich spielt Insulin eine wichtige Rolle bei der Beeinflussung des Glucose Metabolismus, dabei ist die Konzentration von 100 nM, basierend auf den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, am besten geeignet, um eine deutliche Reaktion im Glucosestoffwechsel der Hepatozyten hervorzurufen. Am primären Hepatozyten-Modell könnten somit unter diesen induzierten Veränderungen des Glucosestoffwechsels Konzentrationen verschiedenster

Agonisten oder Antagonisten ausgetestet werden, um Effekte auf den hepatischen Glucosestoffwechsel zu analysieren. Ein Ziel kann hierbei sein, festzustellen, wie der Glucose-metabolismus beeinflusst wird und so eventuell verhindert werden kann, dass es zu vermehrten Fetteinlagerungen kommt.

In Zukunft können die vorliegenden Ergebnisse dazu genutzt werden, Studien zur Modulation des Glucosemetabolismus und assoziierten Krankheiten, aufgrund dieses Modells, zu entwerfen. Die Hepatozyten sind in den angegebenen Konzentrationen lebensfähig und deren Reaktion gleicht den physiologischen Abläufen. Außerdem ist es möglich, in-vivo Studien mit diesen Daten zu vergleichen.

In dieser Arbeit wurden einige Konzentrationen und Kombinationen aus Insulin und Glucose getestet und analysiert. Dies machte es möglich, für die untersuchten Enzyme und Glucosetransporter eine geeignete Konzentration und Inkubationszeit zu erfassen, unter denen die Proteinmengen die größten Veränderungen aufweisen. Es ist nicht zu pauschalisieren, mit welchen Konzentrationen von Insulin und Glucose sich generell für die Untersuchung von primären Hepatozyten die besten Ergebnisse hinsichtlich einer Proteinmenge erzielen lassen. Dennoch liefern die Ergebnisse der vorliegenden Studie grundlegenden Anhaltspunkte dafür, unter welchen Bedingungen der Glucosestoffwechsel sich modulieren lässt, erkennbar an veränderten Proteinmengen von Glucosetransportern und Proteinmengen. Auf Basis dieser Daten ist es beispielsweise möglich, gezielt die Wirkung bestimmter pharmakologischer Substanzen auf den Glucosestoffwechsel der Leber zu untersuchen, da sie eine zentrale Rolle im Metabolismus von Medikamenten spielt. Vorhandene Erkrankungen der Leber oder des gesamten Organismus können die Stoffwechselwege und -produkte, die für die Leberfunktion entscheidend sind, erheblich beeinträchtigen, was zu signifikanten Schäden führen kann. In dieser Studie wurden veränderte Stoffwechsellagen untersucht, indem der Glucosemetabolismus durch Glucose und Insulin modifiziert wurde. Dadurch wird ermöglicht, den Einfluss verschiedener Medikamente auf bereits veränderte Stoffwechsellagen zu evaluieren.

6. Literaturverzeichnis

Agius, L. (2008) Glucokinase and molecular aspects of liver glycogen metabolism. *The Biochemical journal* 414 (1), S. 1–18. DOI: 10.1042/BJ20080595.

Agius, L. (2016): Hormonal and Metabolite Regulation of Hepatic Glucokinase. *Annual review of nutrition* 36, S. 389–415. DOI: 10.1146/annurev-nutr-071715-051145.

Akram, M.; Iquebal, M.; Naimuddin, K.; Sahi, J.; Grepper, S.; Smith, C. (2010): Hepatocytes as a Tool in Drug Metabolism, Transport and Safety Evaluations in Drug Discovery. *CDDT* 7 (3), S. 188–198. DOI: 10.2174/157016310793180576.

ANDERSON, N. G. (1953): The mass isolation of whole cells from rat liver. In: *Science (New York, N.Y.)* 117 (3049), S. 627–628. DOI: 10.1126/science.117.3049.627.

Ashcroft, F. M.; Lloyd, M.; Haythorne, Elizabeth A. (2023): Glucokinase activity in diabetes: too much of a good thing? In: *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 34 (2), S. 119–130. DOI: 10.1016/j.tem.2022.12.007.

Bailes, Barbara K. (2002): Diabetes mellitus and its chronic complications. In: *AORN journal* 76 (2), 266-76, 278-82; quiz 283-6. DOI: 10.1016/S0001-2092(06)61065-X.

Baldwin, S. A.; Lienhard, G. E. (1980): Immunological identification of the human erythrocyte monosaccharide transporter. In: *Biochemical and biophysical research communications* 94 (4), S. 1401–1408. DOI: 10.1016/0006-291x(80)90575-6.

Ballard, F. J.; Hanson, R. W. (1969): Purification of phosphoenolpyruvate carboxykinase from the cytosol fraction of rat liver and the immunochemical demonstration of differences between this enzyme and the mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase. In: *The Journal of biological chemistry* 244 (20), S. 5625–5630.

Banting, F. G.; Best, C. H.; Collip, J. B.; Campbell, W. R.; Fletcher, A. A. (1922): Pancreatic Extracts in the Treatment of Diabetes Mellitus. In: *Canadian Medical Association journal* 12 (3), S. 141–146.

Bartles, J. R.; Braiterman, L. T.; Hubbard, A. L. (1985): Biochemical characterization of domain-specific glycoproteins of the rat hepatocyte plasma membrane. In: *The Journal of biological chemistry* 260 (23), S. 12792–12802.

Beale, Elmus G.; Harvey, Brandy J.; Forest, C. (2007): PCK1 and PCK2 as candidate diabetes and obesity genes. In: *Cell biochemistry and biophysics* 48 (2-3), S. 89–95. DOI: 10.1007/s12013-007-0025-6.

Berry, M. N.; Friend, D. S. (1969): High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. In: *The Journal of cell biology* 43 (3), S. 506–520. DOI: 10.1083/jcb.43.3.506.

Berry, M. N.; Simpson, F. O. (1962): FINE STRUCTURE OF CELLS ISOLATED FROM ADULT MOUSE LIVER. In: *The Journal of cell biology* 15 (1), S. 9–17. DOI: 10.1083/jcb.15.1.9.

Bissell, D. M.; Levine, G. A.; Bissell, M. J. (1978): Glucose metabolism by adult hepatocytes in primary culture and by cell lines from rat liver. In: *The American journal of physiology* 234 (3), C122-30. DOI: 10.1152/ajpcell.1978.234.3.C122.

Blouin, A.; Bolender, R. P.; Weibel, E. R. (1977): Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and nonhepatocytes in the rat liver parenchyma. A stereological study. In: *The Journal of cell biology* 72 (2), S. 441–455. DOI: 10.1083/jcb.72.2.441.

Braet, F.; Wisse, E. (2002): Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: a review. In: *Comparative hepatology* 1 (1), S. 1. DOI: 10.1186/1476-5926-1-1.

Cao, S.; Chen, Y.; Ren, Y.; Feng, Y.; Long, S. (2021): GLUT1 biological function and inhibition: research advances. In: *Future medicinal chemistry* 13 (14), S. 1227–1243. DOI: 10.4155/fmc-2021-0071.

Carrel, A. (1912): TECHNIQUE FOR CULTIVATING A LARGE QUANTITY OF TISSUE. In: *The Journal of experimental medicine* 15 (4), S. 393–396. DOI: 10.1084/jem.15.4.393.

Carrel, A.; Burrows, M. T. (1911): CULTIVATION OF TISSUES IN VITRO AND ITS TECHNIQUE. In: *The Journal of experimental medicine* 13 (3), S. 387–396. DOI: 10.1084/jem.13.3.387.

Chen, C.; Pore, N.; Behrooz, A.; Ismail-Beigi, F.; Maity, A. (2001): Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1. Interaction between H-ras and hypoxia. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (12), S. 9519–9525. DOI: 10.1074/jbc.M010144200.

Cheng, R.; Taleb, N.; Stainforth-Dubois, M.; Rabasa-Lhoret, R. (2021): The promising future of insulin therapy in diabetes mellitus. In: *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 320 (5), E886-E890. DOI: 10.1152/ajpendo.00608.2020.

Chomczynski, P.; Sacchi, N. (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. In: *Analytical biochemistry* 162 (1), S. 156–159. DOI: 10.1006/abio.1987.9999.

Cifuentes, M.; García, Maria A.; Arrabal, Pilar M.; Martínez, F.; Yañez, María J.; Jara, N. et al. (2011): Insulin regulates GLUT1-mediated glucose transport in MG-63 human osteosarcoma cells. In: *Journal of cellular physiology* 226 (6), S. 1425–1432. DOI: 10.1002/jcp.22668.

Colville, C. A.; Seatter, M. J.; Jess, T. J.; Gould, G. W.; Thomas, H. M. (1993): Kinetic analysis of the liver-type (GLUT2) and brain-type (GLUT3) glucose transporters in Xenopus oocytes: substrate specificities and effects of transport inhibitors. In: *The Biochemical journal* 290 (Pt 3) (Pt 3), S. 701–706. DOI: 10.1042/bj2900701.

COUINAUD, C. (1954): Lobes et segments hépatiques: notes sur l'architecture anatomiques et chirurgicale du foie. In: *La Presse medicale* 62 (33), S. 709–712.

COUINAUD, C. (1999): Liver anatomy: portal (and suprahepatic) or biliary segmentation. In: *Digestive surgery* 16 (6), S. 459–467. DOI: 10.1159/000018770.

Couper, J. J.; Littleford, K. D.; Couper, R. T.; Nakamura, T.; Ferrante, A. (1994): High glucose and hyperosmolality stimulate hepatocyte growth factor secretion from cultured human mesangial cells. In: *Diabetologia* 37 (5), S. 533–535. DOI: 10.1007/s001250050143.

DeFronzo, Ralph A.; Ferrannini, E.; Alberti, Kurt G. M. M.; Zimmet, P. (Hg.) (2015): International textbook of diabetes mellitus. 4th edition. Chichester, West Sussex, Hoboken, NJ: John Wiley & Sons Inc. Online verfügbar unter http://onlinelibrary.wiley.com/book/10.1002/9781118387658.

Deng, D.; Xu, C.; Sun, P.; Wu, J.; Yan, C.; Hu, M.; Yan, N. (2014): Crystal structure of the human glucose transporter GLUT1. In: *Nature* 510 (7503), S. 121–125. DOI: 10.1038/nature13306.

Dentin, R.; Denechaud, P.-D.; Benhamed, F.; Girard, J.; Postic, C. (2006): Hepatic gene regulation by glucose and polyunsaturated fatty acids: a role for ChREBP. In: *The Journal of nutrition* 136 (5), S. 1145–1149. DOI: 10.1093/jn/136.5.1145.

Diagnosis and classification of diabetes mellitus (2013). In: *Diabetes care* 36 Suppl 1 (Suppl 1), S67-74.

Donovan, Casey M.; Bohland, M. (2009): Hypoglycemic detection at the portal vein: absent in humans or yet to be elucidated? In: *Diabetes* 58 (1), S. 21–23. DOI: 10.2337/db08-1437.

Ekataksin, W.; Kaneda, K. (1999): Liver microvascular architecture: an insight into the pathophysiology of portal hypertension. In: *Seminars in liver disease* 19 (4), S. 359–382. DOI: 10.1055/s-2007-1007126.

Epstein, C. J. (1967): Cell size, nuclear content, and the development of polyploidy in the Mammalian liver. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 57 (2), S. 327–334. DOI: 10.1073/pnas.57.2.327.

Fleming, A. (1944): Penicillin: The Robert Campbell Oration. In: *The Ulster medical journal* 13 (2), 95-122.2.

Gastaldelli, A.; Toschi, E.; Pettiti, M.; Frascerra, S.; Quiñones-Galvan, A.; Sironi, A. M. et al. (2001): Effect of physiological hyperinsulinemia on gluconeogenesis in nondiabetic subjects and in type 2 diabetic patients. In: *Diabetes* 50 (8), S. 1807–1812. DOI: 10.2337/diabetes.50.8.1807.

Gebhardt, R. (1998): Isolation of periportal and pericentral hepatocytes. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 107, S. 319–328. DOI: 10.1385/0-89603-519-0:319.

Geerts, A. (2001): History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. In: *Seminars in liver disease* 21 (3), S. 311–335. DOI: 10.1055/s-2001-17550.

Gibbs, Richard A.; Weinstock, George M.; Metzker, Michael L.; Muzny, Donna M.; Sodergren, Erica J.; Scherer, Steven et al. (2004): Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. In: *Nature* 428 (6982), S. 493–521. DOI: 10.1038/nature02426.

Gissen, P.; Arias, Irwin M. (2015): Structural and functional hepatocyte polarity and liver disease. In: *Journal of hepatology* 63 (4), S. 1023–1037. DOI: 10.1016/j.jhep.2015.06.015.

Gould, G. W.; Holman, G. D. (1993): The glucose transporter family: structure, function and tissue-specific expression. In: *The Biochemical journal* 295 (Pt 2) (Pt 2), S. 329–341. DOI: 10.1042/bj2950329.

Guthrie, Richard A.; Guthrie, Diana W. (2004): Pathophysiology of diabetes mellitus. In: *Critical care nursing quarterly* 27 (2), S. 113–125. DOI: 10.1097/00002727-200404000-00003.

Han, Hye-S.; Kang, G.; Kim, Jun S.; Choi, Byeong H.; Koo, Seung-H. (2016): Regulation of glucose metabolism from a liver-centric perspective. In: *Experimental & molecular medicine* 48 (3), e218. DOI: 10.1038/emm.2015.122.

Hatting, M.; Tavares, Clint D. J.; Sharabi, K.; Rines, Amy K.; Puigserver, P. (2018): Insulin regulation of gluconeogenesis. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1411 (1), S. 21–35. DOI: 10.1111/nyas.13435.

Hegele, Robert A.; Maltman, Grant M. (2020): Insulin's centenary: the birth of an idea. In: *The lancet. Diabetes & endocrinology* 8 (12), S. 971–977. DOI: 10.1016/S2213-8587(20)30337-5.

Heidemann, C.; Du, Y.; Schubert, I.; Rathmann, W.; Scheidt-Nave, C. (2013): Prävalenz und zeitliche Entwicklung des bekannten Diabetes mellitus: Ergebnisse der Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS1). In: *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz* 56 (5-6), S. 668–677. DOI: 10.1007/s00103-012-1662-5.

Hernández, F. (2021): Glycolysis and gluconeogenesis: A teaching view. In: *The Journal of biological chemistry S.*296, 100016. DOI: 10.1016/j.jbc.2020.100016.

Horn, Florian (2021): Biochemie des Menschen. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.

Howard, R. B.; Christensen, A. K.; Gibbs, F. A.; Pesch, L. A. (1967): The enzymatic preparation of isolated intact parenchymal cells from rat liver. In: *The Journal of cell biology* 35 (3), S. 675–684. DOI: 10.1083/jcb.35.3.675.

Howard, R. B.; Pesch, L. A. (1968): Respiratory activity of intact, isolated parenchymal cells from rat liver. In: *The Journal of biological chemistry* 243 (11), S. 3105–3109.

Isom, H. C.; Secott, T.; Georgoff, I.; Woodworth, C.; Mummaw, J. (1985): Maintenance of differentiated rat hepatocytes in primary culture. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82 (10), S. 3252–3256. DOI: 10.1073/pnas.82.10.3252.

Iynedjian, P. B. (1993): Mammalian glucokinase and its gene. In: *The Biochemical journal* 293 (Pt 1) (Pt 1), S. 1–13. DOI: 10.1042/bj2930001.

Jitrapakdee, S.; Wutthisathapornchai, A.; Wallace, J. C.; MacDonald, M. J. (2010): Regulation of insulin secretion: role of mitochondrial signalling. In: *Diabetologia* 53 (6), S. 1019–1032. DOI: 10.1007/s00125-010-1685-0.

Juza, Ryan M.; Pauli, Eric M. (2014): Clinical and surgical anatomy of the liver: a review for clinicians. In: *Clinical anatomy (New York, N.Y.)* 27 (5), S. 764–769. DOI: 10.1002/ca.22350.

KALTENBACH, J. P. (1954): The preparation and utilization of whole cell suspensions obtained from solid mammalian tissues. In: *Experimental cell research* 7 (2), S. 568–571. DOI: 10.1016/s0014-4827(54)80101-7.

Kogure, K.; Ishizaki, M.; Nemoto, M.; Kuwano, H.; Makuuchi, M. (1999): A comparative study of the anatomy of rat and human livers. In: *Journal of hepato-biliary-pancreatic surgery* 6 (2), S. 171–175. DOI: 10.1007/s005340050101.

Koike, M.; Matsushita, M.; Taguchi, K.; Uchino, J. (1996): Function of culturing monolayer hepatocytes by collagen gel coating and coculture with nonparenchymal cells. In: *Artificial organs* 20 (2), S. 186–192. DOI: 10.1111/j.1525-1594.1996.tb00725.x.

Kupffer, C. (1876): Ueber Sternzellen der Leber. In: *Archiv f. mikrosk. Anat.* 12 (1), S. 353–358. DOI: 10.1007/BF02933897.

Lee, J.; Pilch, P. F. (1994): The insulin receptor: structure, function, and signaling. In: *The American journal of physiology* 266 (2 Pt 1), C319-34. DOI: 10.1152/ajpcell.1994.266.2.C319.

Levitsky, L. L.; Zheng, Q.; Mink, K.; Rhoads, D. B. (1994): GLUT-1 and GLUT-2 mRNA, protein, and glucose transporter activity in cultured fetal and adult hepatocytes. In: *The American journal of physiology* 267 (1 Pt 1), E88-94. DOI: 10.1152/ajpendo.1994.267.1.E88.

Livak, K. J.; Schmittgen, T. D. (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. In: *Methods (San Diego, Calif.)* 25 (4), S. 402–408. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.

Matsumoto, T.; Kawakami, M. (1982): The unit-concept of hepatic parenchyma--a re-examination based on angioarchitectural studies. In: *Acta pathologica japonica* 32 Suppl 2, S. 285–314.

Mayer, John P.; Zhang, F.; DiMarchi, Richard D. (2007): Insulin structure and function. In: *Biopolymers* 88 (5), S. 687–713. DOI: 10.1002/bip.20734.

Michalopoulos, George K.; Bhushan, B. (2021): Liver regeneration: biological and pathological mechanisms and implications. In: *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* 18 (1), S. 40–55. DOI: 10.1038/s41575-020-0342-4.

Mueckler, M.; Caruso, C.; Baldwin, S. A.; Panico, M.; Blench, I.; Morris, H. R. et al. (1985): Sequence and structure of a human glucose transporter. In: *Science (New York, N.Y.)* 229 (4717), S. 941–945. DOI: 10.1126/science.3839598.

Mueckler, M.; Kruse, M.; Strube, M.; Riggs, A. C.; Chiu, K. C.; Permutt, M. A. (1994): A mutation in the Glut2 glucose transporter gene of a diabetic patient abolishes transport activity. In: *The Journal of biological chemistry* 269 (27), S. 17765–17767.

Nagarajan, Shilpa R.; Paul-Heng, M.; Krycer, James R.; Fazakerley, Daniel J.; Sharland, Alexandra F.; Hoy, Andrew J. (2019): Lipid and glucose metabolism in hepatocyte cell lines and primary mouse hepatocytes: a comprehensive resource for in vitro studies of hepatic metabolism. In: *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 316 (4), E578-E589. DOI: 10.1152/ajpendo.00365.2018.

Narkewicz, M. R.; Iynedjian, P. B.; Ferre, P.; Girard, J. (1990): Insulin and tri-iodothyronine induce glucokinase mRNA in primary cultures of neonatal rat hepatocytes. In: *The Biochemical journal* 271 (3), S. 585–589. DOI: 10.1042/bj2710585.

Nauck, M.; Gerdes, C.; Petersmann, A.; Müller-Wieland, D.; Müller, Ulrich A.; Freckmann, G. et al. (2020): Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus: Update 2020. In: *Diabetologie und Stoffwechsel* 15 (S 01), S9-S17. DOI: 10.1055/a-1193-3185.

Ng, Inn Chuan; Zhang, Li; Shen, Narelle Nichola Yi Ying; Soong, Yun Ting; Ng, Chan Way; Koh, Phoebe Kang Sheing et al. (2021): Isolation of Primary Rat Hepatocytes with Multiparameter Perfusion Control. In: *Journal of visualized experiments : JoVE* (170). DOI: 10.3791/62289.

Nuttall, Frank Q.; Ngo, A.; Gannon, Mary C. (2008): Regulation of hepatic glucose production and the role of gluconeogenesis in humans: is the rate of gluconeogenesis constant? In: *Diabetes/metabolism research and reviews* 24 (6), S. 438–458. DOI: 10.1002/dmrr.863.

O'Brien, R. M.; Granner, D. K. (1990): PEPCK gene as model of inhibitory effects of insulin on gene transcription. In: *Diabetes care* 13 (3), S. 327–339. DOI: 10.2337/diacare.13.3.327.

Pape, Hans-C.; Kurtz, A.; Silbernagl, S. (Hg.) (2019): Physiologie. 9. vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart: Thieme. Online verfügbar unter http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:bsz:24-epflicht-1937803.

Papeleu, P.; Vanhaecke, T.; Henkens, T.; Elaut, G.; Vinken, M.; Snykers, S.; Rogiers, V. (2006): Isolation of rat hepatocytes. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 320, S. 229–237. DOI: 10.1385/1-59259-998-2:229.

Peschke, E.; Frese, T.; Chankiewitz, E.; Peschke, D.; Preiss, U.; Schneyer, U. et al. (2006): Diabetic Goto Kakizaki rats as well as type 2 diabetic patients show a decreased diurnal serum melatonin level and an increased pancreatic melatonin-receptor status. In: *Journal of pineal research* 40 (2), S. 135–143. DOI: 10.1111/j.1600-079X.2005.00287.x.

Pilkis, S. J.; Claus, T. H. (1991): Hepatic gluconeogenesis/glycolysis: regulation and structure/function relationships of substrate cycle enzymes. In: *Annual review of nutrition* 11, S. 465–515. DOI: 10.1146/annurev.nu.11.070191.002341.

Quinn, P. G.; Yeagley, D. (2005): Insulin regulation of PEPCK gene expression: a model for rapid and reversible modulation. In: *Current drug targets. Immune, endocrine and metabolic disorders* 5 (4), S. 423–437. DOI: 10.2174/156800805774912962.

Ramboer, E.; Craene, Bram de; Kock, Joery de; Vanhaecke, T.; Berx, G.; Rogiers, V.; Vinken, M. (2014): Strategies for immortalization of primary hepatocytes. In: *Journal of hepatology* 61 (4), S. 925–943. DOI: 10.1016/j.jhep.2014.05.046.

Rui, L. (2014): Energy metabolism in the liver. In: *Comprehensive Physiology* 4 (1), S. 177–197. DOI: 10.1002/cphy.c130024.

Salomon, Franz-V.; Geyer, H.; Gille, U. (Hg.) (2020): Anatomie für die Tiermedizin. 4. aktualisierte Auflage. Stuttgart: Thieme (VETEL EBook Library Tiermedizin). Online verfügbar unter http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:bsz:24-epflicht-1938787.

Seglen, P. O. (1972): Preparation of rat liver cells. I. Effect of Ca 2+ on enzymatic dispersion of isolated, perfused liver. In: *Experimental cell research* 74 (2), S. 450–454. DOI: 10.1016/0014-4827(72)90400-4.

Seglen, P. O. (1979): Hepatocyte suspensions and cultures as tools in experimental carcinogenesis. In: *Journal of toxicology and environmental health* 5 (2-3), S. 551–560. DOI: 10.1080/15287397909529766.

Si-Tayeb, K.; Lemaigre, Frédéric P.; Duncan, Stephen A. (2010): Organogenesis and development of the liver. In: *Developmental cell* 18 (2), S. 175–189. DOI: 10.1016/j.devcel.2010.01.011.

Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D. et al. (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. In: *Analytical biochemistry* 150 (1), S. 76–85. DOI: 10.1016/0003-2697(85)90442-7.

Southern, E. M. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. In: *Journal of molecular biology* 98 (3), S. 503–517. DOI: 10.1016/s0022-2836(75)80083-0.

Spitzbart, H.; Schmidt, F. (1970): Eigene Ergebnisse über die Züchtung von Ovarialkarzinomen in vitro und Testung gegenüber Zytostatika. In: *Zentralblatt fur Gynakologie* 92 (7), S. 201–205.

Tal, M.; Kahn, B. B.; Lodish, H. F. (1991): Expression of the low Km GLUT-1 glucose transporter is turned on in perivenous hepatocytes of insulin-deficient diabetic rats. In: *Endocrinology* 129 (4), S. 1933–1941. DOI: 10.1210/endo-129-4-1933.

Taylor, R. (1991): Insulin action 1991. In: *Clinical endocrinology* 34 (2), S. 159–171. DOI: 10.1111/j.1365-2265.1991.tb00287.x.

Teutsch, H. F.; Schuerfeld, D.; Groezinger, E. (1999): Three-dimensional reconstruction of parenchymal units in the liver of the rat. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 29 (2), S. 494–505. DOI: 10.1002/hep.510290243.

Tietz, Pamela S.; Larusso, Nicholas F. (2006): Cholangiocyte biology. In: *Current opinion in gastroenterology* 22 (3), S. 279–287. DOI: 10.1097/01.mog.0000218965.78558.bc.

Wake, K. (1971): "Sternzellen" in the liver: perisinusoidal cells with special reference to storage of vitamin A. In: *The American journal of anatomy* 132 (4), S. 429–462. DOI: 10.1002/aja.1001320404.

Weibel, E. R.; Stäubli, W.; Gnägi, H. R.; Hess, F. A. (1969): Correlated morphometric and biochemical studies on the liver cell. I. Morphometric model, stereologic methods, and normal morphometric data for rat liver. In: *The Journal of cell biology* 42 (1), S. 68–91. DOI: 10.1083/jcb.42.1.68.

Welsch, U.; Kummer, W.; Deller, T. (2022): Histologie. Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie : das Lehrbuch. 6. Auflage. München: Elsevier.

Wisse, E. (1970): An electron microscopic study of the fenestrated endothelial lining of rat liver sinusoids. In: *Journal of ultrastructure research* 31 (1), S. 125–150. DOI: 10.1016/s0022-5320(70)90150-4.

Wisse, E.; Zanger, R. B. de; Charels, K.; van der Smissen, P.; McCuskey, R. S. (1985): The liver sieve: considerations concerning the structure and function of endothelial fenestrae, the sinusoidal wall and the space of Disse. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 5 (4), S. 683–692. DOI: 10.1002/hep.1840050427.

Zibolka, J.; Bazwinsky-Wutschke, I.; Mühlbauer, E.; Peschke, E. (2018): Distribution and density of melatonin receptors in human main pancreatic islet cell types. In: *Journal of pineal research* 65 (1), e12480. DOI: 10.1111/jpi.12480.

7. Thesen

1. Die primären Hepatozyten reagieren unter unterschiedlichen Insulin- bzw-Glucosebehandlungen mit veränderten Proteinmengen von Glucosetransportern (GLUT) und Leitenzymen des hepatischen Glucosestoffwechsels, womit sich dieses Primärzellsystem eignet, um den Glucosestoffwechsel zu modulieren.
2. Der Glucotransporter-1 zeigt unter hyperglykämischen (25 mM Glucose) und hypoglykämischen Bedingungen (2,8 mM Glucose) die Abnahme der Proteinmenge, wobei die Kombinationen 25 mM Glucose mit 100 nM Inuslin und 2,8 mM Glucose mit 10 nM Inuslin die signifikant stärksten Abnahmen erzielten.
3. Der Glucosetransporter-2 zeigt die stärkste Abnahme der Proteinmenge unter 25 mM nach 2 h sowohl unter niedrigen Insulin Konzentrationen (1 nM) als auch unter erhöhten (100 nM). Die stärkste Zunahme ist nach 18 h unter hypoglykämischen Bedingungen erkennbar (2,8 mM).
4. Nach der Langzeitstimulation mit 18 h sind bei den Enzymen G6P, GCK und PEPCK die stärksten Veränderungen in der Proteinmenge zu erkennen.
5. Glucose-6-phosphatase (G6P), das Leitenzym der Glykolyse, zeigt sowohl in der Langzeit- als auch in der Kurzzeitstimulation unter steigenden Insulin- und Glucose-Konzentrationen die stärksten Veränderungen, sich widerspiegelnd in einer Abnahme der Proteinmenge.
6. Phosphoenolpyrvat-Carboxykinase (PEPCK), das Leitenzym der Gluconeogenese, zeigt nach 18 h unter 11,1 mM Glucose durch 1 nM Insulin bzw. 10 nM Insulin eine Zunahme der Proteinmenge, wohingegen unter 25 mM Glucose die Proteinmenge sinkt, vor allem durch 1 nM und 100 nM Insulin.
7. Glucokinase (GCK), eines der Leitenzyme der Glykolyse, zeigt nach 18 h unter der Stimulation mit steigenden Insulin- und Glucose-Konzentrationen die stärksten Effekte, die in einer Abnahme der Proteinmenge zu beobachten sind.
8. Glucosekonzentrationen von 2,8 mM oder 25 mM Glucose sind besonders geeignet, um unter einer hypo- bzw. hyperglykämischen Stoffwechsellage die größten Proteinmengenänderungen von glykolytischen und gluconeogenetischen Enzymen zu erzielen.
9. Über die Wahl einer Behandlung (Insulin, Glucose) von primären Hepatozyten können gezielt Änderungen im Glucosestoffwechsel induziert werden, was perspektivisch die Möglichkeit bietet pharmakologische Substanzen zu testen unter diesen Bedingungen.

Erklärungen

(1) Ich erkläre, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe.

(2) Ich erkläre, die Angaben wahrheitsgemäß gemacht und die wissenschaftliche Arbeit an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht zu haben.

(3) Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Alle Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis wurden eingehalten; es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Halle (Saale), 01.02.2025