



universität
wien

MASTERARBEIT / MASTER'S THESIS

Titel der Masterarbeit / Title of the Master's Thesis

„Untersuchungen des Einflusses einer chronischen
Ethanolaufnahme auf Enzyme des Alkoholstoffwechsels im
Modellorganismus“

verfasst von / submitted by

Melanie Gsöllpointner, BSc

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of

Master of Science (MSc)

Wien, 2018 / Vienna 2018

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

A066 838

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Masterstudium Ernährungswissenschaften

Betreut von / Supervisor:

Univ.-Prof. Dipl. oec. troph. Dr. Ina Bergheim,
Privatdoz.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Alkohol: Konsum und Stoffwechsel.....	1
1.2. Alkohol: Folgeschäden	6
1.2.1. Alkoholbedingte Lebererkrankung: Krankheitsbild, Prävalenz und Pathogenese.....	8
Krankheitsbild & Risikofaktoren der ALD	8
Epidemiologie & Prävalenz.....	9
Pathogenese & molekulare Mechanismen der ALD	9
2. Zielstellung der Arbeit.....	17
3. Material	18
3.1. Proteinisolation	18
3.2. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	18
3.3. Bestimmung der Aktivität der Alkoholdehydrogenase	19
3.4. Bestimmung der Aktivität von Cytochrom P450 2E1	19
3.5. Bestimmung der Proteinkonzentration der ADH und CYP 2E1 mittels Western Blot	21
3.6. Allgemeine Verbrauchsmaterialien	23
3.7. Software.....	24
4. Methoden.....	25
4.1. Versuchstiere und Versuchstierhaltung.....	25
4.2. Proteinisolation	26
4.3. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	26
4.4. Messung der Alkoholdehydrogenase-Aktivität.....	27
4.5. Messung der CYP2E1-Aktivität	29
4.6. Bestimmung der Proteinkonzentration von ADH1 und CYP2E1 mittels Western Blot	31
4.7. Statistische Auswertung.....	34

5. Ergebnisse	35
5.1. Einfluss der chronischen Aufnahme einer mit Ethanol angereicherten Lieber DeCarli Flüssigdiät auf die Aktivität und Proteinkonzentration der ADH in Lebergewebe und im Plasma von Mäusen.....	35
5.2. Einfluss der chronischen Aufnahme einer mit Ethanol angereicherten Lieber DeCarli Flüssigdiät auf die Aktivität und die Proteinkonzentration von CYP2E1 in der Leber von Mäusen.	38
6. Diskussion.....	40
6.1. Mausmodell zur Untersuchung molekularer Mechanismen alkohol-bedingter Leberschäden.....	41
6.2. Einfluss der chronischen Aufnahme von Alkohol auf die Aktivität und Proteinkonzentration der ADH in der Leber und im Plasma	42
6.3. Einfluss der chronischen Aufnahme von Alkohol auf die Aktivität und Proteinkonzentration von Cytochrom P450 2E1 in der Leber	46
7. Fazit und Ausblick	49
8. Zusammenfassung	50
9. Summary	52
Literaturverzeichnis	53
Anhang	i
Danksagung.....	iii
Selbständigkeitserklärung	iv

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassifizierung der ADH-Isoformen. (modifiziert nach Crabb et al. & Edenberg 2007) [17], [18].	4
Tabelle 2: Auftretende Symptomatik nach Schweregrad der Blutalkohol-konzentration. (aus Krankheitslehre, 2015) [43].	7
Tabelle 3: Herstellung des KCP-Puffers: 10 mM Phosphatpuffer mit 150 mM KCl	26
Tabelle 4: Herstellung der Standardreihe zur Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford.	27
Tabelle 5: Zusammensetzung des ADH-Analysepuffers zur Bestimmung der ADH-Aktivität.	28
Tabelle 6: Herstellung des Assaypuffers zur Bestimmung der CYP2E1-Aktivität.	29
Tabelle 7: Herstellung der Lösung 1 zur Bestimmung der CYP2E1-Aktivität.	29
Tabelle 8: Herstellung der Lösung 2 zur Bestimmung der CYP2E1-Aktivität.	30
Tabelle 9: Herstellung des Assay-Standards zur Bestimmung der CYP2E1-Aktivität.	30
Tabelle 10: Herstellung des Standard 1 zur Bestimmung der CYP2E1-Aktivität.	30
Tabelle 11: Herstellung der Standards 2-7 zur Bestimmung der CYP2E1-Aktivität.	31
Tabelle 12: Ansatzschema zur Bestimmung der CYP2E1-Aktivität.	31
Tabelle 13: Zusammensetzung des Trenngels (10 %), für 2 Gele mit 1 mm Abstandshalter	32
Tabelle 14: Zusammensetzung des Sammelgels (5 %), für 2 Gele mit 1 mm Abstandshalter	32

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Prozentueller Anteil alkoholischer Getränke am jährlichen österreichischen Alkoholkonsum. (aus Global Status Report on alcohol and health, 2014) [3].....	1
Abbildung 2: Trend des jährlichen Alkoholkonsums pro Kopf in europäischen WHO-Regionen von 1990-2014. (aus Public health successes and missed opportunities, 2016) [4].	2
Abbildung 3: Darstellung des Alkoholabbaus. (aus Ratna und Mandrekar, 2017) [136]....	6
Abbildung 4: Das Spektrum der Alkoholischen Lebererkrankung. (modifiziert nach Pellicoro et al., 2014 & Gao und Bataller, 2011) [50],[137].	9
Abbildung 5: Pathogenese der ALD durch alkoholinduzierten Zinkmangel. (modifiziert nach Skalny et al., 2017) [69].....	12
Abbildung 6: CYP2E1 induziert oxidativen Stress in ALD. (aus Leung und Niet, 2013) [35]..	14
Abbildung 7: Molekulare Mechanismen der dieser Arbeit zu Grunde liegenden Hypothese zur Pathogenese der ALD. (modifiziert nach Gao und Bataller, 2011 & Skalny et al., 2017) [51], [69].....	16
Abbildung 8: Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs des 47-tägigen Fütterungsversuchs..	25
Abbildung 9: Aufbau des „Blottingsandwiches“.	33
Abbildung 10: Einfluss der Aufnahme einer mit Ethanol angereicherten Lieber DeCarli Flüssigdiät auf die ADH1-Proteinkonzentration in murinem Lebergewebe.....	35
Abbildung 11: ADH-Aktivität in Lebergewebe von Mäusen nach chronischer EtOH-Aufnahme im Vergleich zu Kontrollen.....	36
Abbildung 12: Einfluss der Aufnahme einer mit Ethanol angereicherten Lieber DeCarli Flüssigdiät auf die ADH1-Proteinkonzentration im Plasma von Mäusen.	36
Abbildung 13: ADH-Aktivität im Plasma von Mäusen nach chronischer EtOH-Aufnahme im Vergleich zu Kontrollen..	37
Abbildung 14: CYP2E1-Proteinkonzentration in der mikrosomalen Fraktion von murinem Lebergewebe nach chronischer EtOH-Aufnahme im Vergleich zu Kontrollen.	38
Abbildung 15: CYP2E1-Aktivität in der mikrosomalen Fraktion von murinem Lebergewebe nach chronischer EtOH-Aufnahme im Vergleich zu Kontrollen.	39

Abkürzungsverzeichnis

ADH	Alkoholdehydrogenase
ALD	Alkoholbedingte Lebererkrankung
ALDH	Aldehyddehydrogenase
AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i>
BAK	Blutalkoholkonzentration
BSA	Bovines Serumalbumin
CoA	Coenzym A
CYP2E1	Cytochrom P450 2E1
EtOH	Ethanol
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i>
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthetase
IL	Interleukin
IRS	<i>Insulin receptor substrate</i>
KCP	Kaliumchlorid-Phosphat
LPS	Lipopolysaccharide
LPB	Lipopolysaccharid-bindende Proteine
MT	Metallothionein
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response 88</i>
NAD	Nikotinamidadenindinukleotid
NADP	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NAFLD	Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung
NF- κ B	<i>Nuclear factor κ-light chain enhancer of activated B-cells</i>
NPK	Nitrophenolkontrolle
PPAR α	<i>Peroxisome-proliferator-activated receptor</i>
PVDF	<i>Polyvinylidene difluoride</i>
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RNS	Reaktive Nitritspezies
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>

SEM	<i>Standard error of mean</i>
SREBP1c	<i>Sterol regulatory element binding protein 1c</i>
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor-β</i>
TLR4	<i>Toll like receptor 4</i>
TNF α	Tumornekrosefaktor α
β -OX	β -Oxidation

1. Einleitung

1.1. Alkohol: Konsum und Stoffwechsel

Konsum

Alkohol und alkoholische Getränke werden bereits seit mehreren tausend Jahren produziert und konsumiert [1]. Besonders der frühere Gebrauch von alkoholischen Getränken ist auf die anregenden Wirkungen, auf den medizinischen Nutzen, seine antiseptische Wirkung und die hohe Energiezufuhr aber natürlich auch auf den Geschmack zurückzuführen [1]. In Österreich wie auch in anderen europäischen Ländern stellt Alkohol seit vielen Jahren ein gesellschaftlich akzeptiertes Konsumgut dar und ist Bestandteil des sozialen Lebens [2]. 2010 lag der jährliche Pro-Kopf-Konsum von allen österreichischen Bürgern und Bürgerinnen über 15 Jahren bei ca. 10,3 Liter reinem Alkohol und somit unter den durchschnittlichen europäischen Werten von ca. 10,9 Liter pro Jahr [3]. Dies entspricht einer täglichen Aufnahme von 29,6 g purem Alkohol pro Österreicher und Österreicherin über 15 Jahre. Mit einem mittleren Konsum von ca. 15,4 Litern pro Jahr tranken Männer mehr als das Doppelte an Alkohol, verglichen mit Frauen, deren jährlicher Konsum bei ca. 6,3 Liter lag [3]. Bier war 2010 mit einem Anteil von etwa 50,4 % am gesamten jährlichen Alkoholkonsum das am meisten verzehrte alkoholische Getränk, gefolgt von Wein (35,5 %) und Spirituosen (14 %) in Österreich (siehe Abbildung 1) [3].



Abbildung 1: Prozentueller Anteil alkoholischer Getränke am jährlichen österreichischen Alkoholkonsum. (aus Global Status Report on alcohol and health, 2014) [3].

Seit den 90er Jahren scheint der jährliche Alkoholkonsum in Europa rückläufig zu sein, wobei dieser Entwicklung regionale Schwankungen unterliegen [4]. Während in Zentraleuropa und in den südeuropäischen Regionen ein Rückgang des Alkoholkonsums verzeichnet wurde, übersteigen die Werte der Osteuropäer und -europäerinnen die des

Einleitung

europäischen Durchschnitts, obwohl diese 1990 noch unter allen anderen Regionen, ausgenommen des Südwestens, lagen (Abbildung 2) [4].

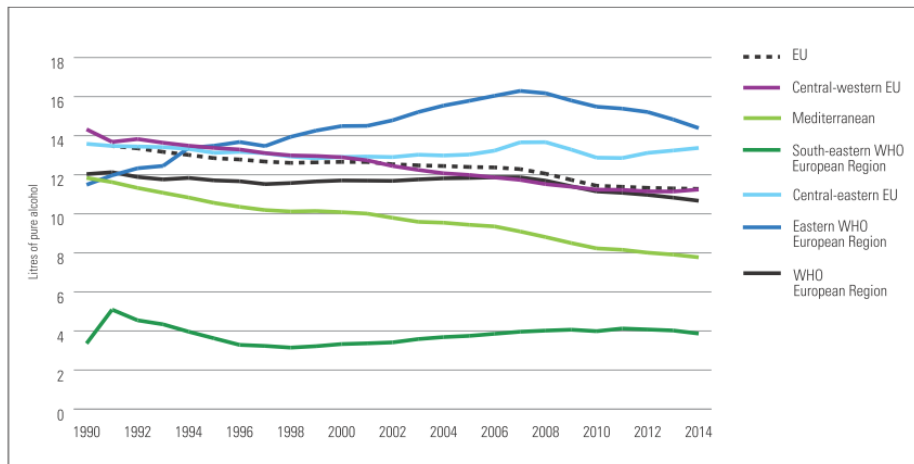


Abbildung 2: Trend des jährlichen Alkoholkonsums pro Kopf in europäischen WHO-Regionen von 1990-2014. (aus Public health successes and missed opportunities, 2016) [4].

Alkoholstoffwechsel

Der Abbau von exogen zugeführtem Alkohol beginnt unmittelbar nach seiner Aufnahme. Ein geringer Teil des zugeführten Alkohols erreicht den systemischen Blutkreislauf nicht, da der sogenannte First-Pass-Metabolismus im Magen für einen raschen Abbau sorgt [5]. Dieser Mechanismus wird als Regulator für die Toxizität von Alkohol beschrieben, da die Effizienz des First-Pass-Metabolismus im Magen ein entscheidender Faktor für die Bioverfügbarkeit sein könnte [5]. Die vorherrschenden alkohol-metabolisierenden Enzyme im Magen sind Isoformen der Alkoholdehydrogenase (ADH I und III). Die Magenentleerung sowie ADH-Konzentrationen im Magen sind determinierende Faktoren für das Ausmaß des Alkoholabbaus [6]. Frauen und Alkoholabhängige weisen durch verminderte ADH-Magen-Konzentrationen einen verminderten First-Pass-Effekt sowie erhöhte Ethanol-Blutkonzentrationen auf [6]. Der verbliebene Ethanol wird entlang eines Konzentrationsgradienten über passive Diffusion im Duodenum und Jejunum aufgenommen [5],[6].

Ethanol wird in der Leber, welche das Hauptorgan des Ethanolmetabolismus darstellt, im ersten Schritt zu Acetaldehyd abgebaut [9]. Dieser reversible Vorgang kann entweder durch das sich im Cytosol befindende Enzym ADH erfolgen oder durch Cytochrom P450 2E1 (CYP2E1), welches im endoplasmatischen Retikulum vorliegt, bewerkstelligt werden [9]. Einen weitaus geringeren, unbedeutenden Anteil des Abbaus übernimmt das Enzym

Katalase [10]. Im Folgenden wird der Ethanolmetabolismus über die ADH im Hepatozyten sowie die verschiedenen Isoformen der ADH genauer beschrieben.

Die Alkoholdehydrogenase und deren Regulierung

Der Großteil der oben genannten Reaktion wird durch das ADH Isoenzym ADH I im Hepatozyten katalysiert [11]. Diese ist eine dimere, zinkhaltige Oxidoreduktase, die aus zwei Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von jeweils 40 kDa besteht. Jede Untereinheit besitzt zwei Zinkionen, die essentiell für die Funktion des Enzyms sind [12]. Im menschlichen Körper kommen insgesamt sechs Isoformen der ADH vor, die nach Isoenzymmuster und ihren elektrophoretischen und kinetischen Eigenschaften klassifiziert werden (siehe Tabelle 1) [13].

Neben der alkohol-oxidierenden Funktion ist ADH I auch am Metabolismus von Biogenen Aminen und Prostaglandinen beteiligt und katalysiert die Oxidation von Retinol zu Retinal und spielt somit eine wesentliche Rolle bei der Synthese von Retinsäure [13]. Das Enzym weist eine hohe Substratspezifität auf und hat eine geringe Michaelis-Menten-Konstante (1mM) (=Substratkonzentration bei halbmaximaler Umsatzrate), wodurch Ethanol bereits bei geringen Konzentrationen schnell zu Acetaldehyd abgebaut wird. Hierbei wird der Cofaktor Nikotinamidadenindinukleotid (NAD^+) zu $\text{NADH} + \text{H}^+$ reduziert [12].

Isoenzyme der ADH-Klasse II weisen eine hohe Affinität zu Ethanol auf und bestimmen den Abbau von Adrenalin und Noradrenalin mit [14]. ADH III-Isoformen werden ubiquitär exprimiert und katalysieren Reaktionen des Lipidmetabolismus. Studien zeigen, dass ADH III auch bei hohen Mengen Ethanol nicht sättigbar ist [15]. Substrate der Klasse IV-Isoformen sind endogen produzierter, sowie oral zugeführter Ethanol, Produkte der Lipidperoxidation und Nitrobenzaldehyd [16]. Die funktionelle Rolle der ADH-Klasse V ist noch weitgehend unbekannt.

Tabelle 1: Klassifizierung der ADH-Isoformen. (modifiziert nach Crabb et al. & Edenberg 2007) [17],[18].

Klasse	Genlokus	Neue Nomenklatur	Untereinheiten	Vorkommen
I	ADH1	ADH1A	α	Leber
	ADH2	ADH1B	β	Leber, Lunge
	ADH3	ADH1C	γ	Leber, Magen
II	ADH4	ADH2	π	Leber, Kornea
III	ADH5	ADH3	χ	ubiquitär
IV	ADH7	ADH4	σ, μ	Magen, Ösophagus,
V	ADH6	ADH5	-	Leber, Magen

Die Ergebnisse mehrerer Studien bei Patienten und Patientinnen mit alkoholischer Lebererkrankung (ALD) weisen darauf hin, dass die Aktivität der ADH im Lebergewebe vermindert ist [19]–[22], wohingegen die Ergebnisse aus Tier- und Zellkulturstudien keine einheitlichen Ergebnisse liefern [23]–[26]. Die Ergebnisse tierexperimenteller Studien weisen weiterführend darauf hin, dass der hepatische Zinkgehalt einen Einfluss auf die ADH-Aktivität hat [27]. Verringerte hepatische Zinkspiegel gehen mit einer verminderten Aktivität der ADH in Ratten einher [27],[28]. Bei Alkoholikern und Patienten und Patientinnen mit ALD wurde ein Zinkmangel als Konsequenz einer verminderten Aufnahme von Zink, sowie auch eines veränderten Zinkmetabolismus durch Ethanol beschrieben und stellt daher eine beeinflussende Komponente auf die ADH-Aktivität und den Ethanolmetabolismus bei ALD dar [29] (nähere Erläuterung in „Zinkmetabolismus in der Pathogenese der ALD“). Studien der eigenen Arbeitsgruppe konnten zudem zeigen, dass eine verminderte Expression des Insulin-Rezeptors und *Insulin receptor substrate* (IRS) sowie erhöhten Tumornekrosefaktor (TNF α) -Spiegeln mit einer verminderten Aktivität der ADH in ob/ob Mäusen mit nicht-alkoholischer Fettlebererkrankung (NAFLD) assoziiert werden [30]. Jene Werte sind Marker einer Insulinresistenz, die auch bei Alkoholikern und Patienten und Patientinnen mit ALD eine wichtige Rolle spielt [31]. Veränderungen der Insulinsignalkaskade könnten daher auch bei der Regulation der ADH bei Patienten und Patientinnen mit ALD, aufgrund der ähnlichen Pathogenese zur nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung (NAFLD) [32], beteiligt sein. Weiterführend konnte in frühen Phasen der ALD eine Induktion des Transforming growth factor β (TGF- β) mit einer

Verringerung der hepatischen ADH1 und vermehrten Leberschäden assoziiert werden [33].

Cytochrom P450 2E1 und dessen Regulierung

Die Cytochrome P450 sind Häm-Proteine, die in allen Organen des Menschen vorkommen und eine wichtige Rolle bei der Oxidation von Steroiden, Fettsäuren und Xenobiotika spielen [34]. CYP2E1 befindet sich hauptsächlich in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums, der sogenannten mikrosomalen Fraktion im Hepatozyten, und hat unter den Cytochromen P450 die höchste Aktivität für die Oxidation von Ethanol zu Acetaldehyd [35]. Bei geringen Ethanol-Konzentrationen entfallen nur etwa 10 % des hepatischen Ethanolabbaus auf Cytochrome P450 [12]. CYP2E1 besitzt, verglichen mit ADH, eine um das 10-fache höhere Michaelis-Menten-Konstante (10 mM) und hat deshalb bei steigenden Blutalkoholkonzentrationen (BAK) eine höhere Relevanz beim Abbau von Ethanol [12].

Aus experimentellen Studien geht hervor, dass die chronische Aufnahme von Alkohol zu einer Induktion von CYP2E1 führt [36]. Eine Induktion von CYP2E1 konnte auch bei Patienten und Patientinnen mit alkoholbedingter Steatose festgestellt werden [37]. Diese scheint mit dem Grad der Leberschädigung zu korrelieren [38]. Ein möglicher zugrundeliegender Mechanismus für die Induktion von CYP2E1 ist die Erhöhung der Proteinstabilität des Enzymsystems und eine verringerte proteasomale Degradation [34],[39]. Zudem konnte eine Korrelation zwischen der Aktivität von CYP2E1 und alkoholinduzierten Leberschäden und Lipidperoxidation gezeigt werden [40]. Die Rolle von CYP2E1 bei der Pathogenese der ALD wird in Kapitel 1.2.1 näher erläutert.

Unter physiologischen Bedingungen ist die Konzentration an Acetaldehyd durch den sofortigen Abbau zu Acetat gering [13]. Aldehyddehydrogenase (ALDH) ist hierbei das vorherrschende Enzym und katalysiert die Oxidation von mehr als 90 % des durch Ethanol produzierten Acetaldehyd, unter der Reduktion des Cofaktors NAD^+ zu NADH [13]. Bei Personen mit chronischem Alkoholkonsum wurden erhöhte Acetaldehydwerte festgestellt [41]. Es wird angenommen, dass die Akkumulation des toxischen Acetaldehyd aus einer verminderten Oxidation zu Acetat durch eine verringerte ALDH-Aktivität resultiert [42]. Ein Zusammenhang mit alkoholbedingten Leberschäden wird angenommen, da Alkohol zu funktionellen und strukturellen mitochondrialen

Veränderungen führt und ALDH2 intramitochondrial seine oxidierende Funktion ausübt [41]. Das entstandene Acetat wird im weiteren Verlauf aus der Leber, über den Blutstrom zu verschiedenen Organen transportiert und zu CO_2 oxidiert [11]. Acetat wird zudem zu Acetyl-CoA metabolisiert, welches wiederum an der Lipid- und Cholesterinsynthese in Mitochondrien des peripheren Gewebes und im Gehirn beteiligt ist [11]. Zudem wird angenommen, dass bei chronischem Alkoholkonsum Ethanol als Energiequelle im Gehirn herangezogen werden kann [11].

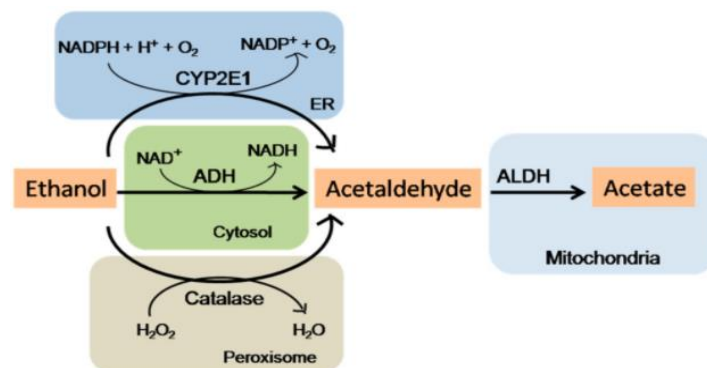


Abbildung 3: Darstellung des Alkoholabbaus. (aus Ratna und Mandrekar, 2017) [136]. Ethanol wird durch die cytosolische Alkoholdehydrogenase (ADH) zu Acetaldehyd metabolisiert. Das benötigte Oxidationsmittel ist NAD^+ (Nicotinamadenindinukleotid). Eine untergeordnete, aber dennoch wichtige Rolle übernimmt das Enzym Cytochrom P450 2E1 (CYP2E1), das Ethanol unter Verbrauch von NADPH (Nicotinamadenindinukleotidphosphat) ebenfalls zu Acetaldehyd abbaut. Acetaldehyd wird in den Mitochondrien durch Aldehyddehydrogenase (ALDH) zu Acetat abgebaut.

1.2. Alkohol: Folgeschäden

Bei den durch Alkohol verursachten Folgeschäden kann zwischen den Symptomen einer akuten Alkoholintoxikation und den Konsequenzen des chronischen Alkoholkonsums unterschieden werden [43]. Das Ausmaß der akuten Alkoholvergiftung ist von der aufgenommenen Menge an Alkohol und den daraus resultierenden BAK abhängig. Zudem gibt es interindividuelle Unterschiede, die stark mit der Körperzusammensetzung und den Trinkgewohnheiten korrelieren [44]. Ab 0,3 ‰ treten erste Anzeichen auf, die sich mit zunehmenden BAK verschlimmern und bis hin zum alkoholischen Koma mit akuter Bedrohung durch Dämpfung des Atemzentrums führen können [43]. Eine genauere Beschreibung der auftretenden Symptome bei entsprechender BAK sind in Tabelle 2 dargestellt. Als Rauschmittel beeinflusst Alkohol ein breites Spektrum an Strukturen und Prozessen des zentralen Nervensystems, welche zusammenspielend mit persönlichen

Einleitung

Charakteristika und assoziiertem Verhalten kausale Faktoren für die Gefährdung des Trinkers und auch anderer Menschen darstellen können [45]. Zudem ist der Konsum von Alkohol in großen Mengen ein Risikofaktor für riskantes sexuelles Verhalten, sexuell übertragbare Erkrankungen und Ausübung von Gewalt [45].

Tabelle 2: Auftretende Symptomatik nach Schweregrad der Blutalkoholkonzentration. (aus Krankheitslehre, 2015) [43].

BAK	Symptome
>0,3‰	• Beeinträchtigung der Aufmerksamkeit, der Konzentration und des Reaktionsvermögens • Euphorisierung, Verlust von Ängsten • Steigerung des Leistungsgefühls • Abnahme der Selbstkritik
0,8-1,2‰	• Zusätzliche Störungen des Gleichgewichts, der Koordination und Feinmotorik
1,2-1,6‰	• Erhebliche Beeinträchtigung der Aufmerksamkeit und des Reaktionsvermögens • Gangunsicherheit und verstärkte motorische Einschränkungen • Enthemmung und Situationsverkennung
1,6-2,0‰	• Weitere Zunahme der Symptome
>2,0‰	• Gedächtnisstörung, Bewusstseinsstörung, Verwirrtheit
>3,0‰	• Bewusstlosigkeit
>5,0‰	• Akute vitale Bedrohung mit erhöhter Mortalität

Bereits in den 1920er Jahren haben erste Studien den Zusammenhang zwischen dem Konsum von Alkohol und dem verstärkten Auftreten von Verletzungen und etlichen Erkrankungen erläutert [46]. Seit vielen Jahren wird Alkohol als Ursache für mehr als 60 Erkrankungen und Konditionen angesehen. Dazu zählen: Verletzungen, psychische Erkrankungen und Verhaltensstörungen, gastrointestinale Konditionen, Krebserkrankungen, kardiovaskuläre Erkrankungen, Lungenerkrankungen, Störungen des Bewegungsapparates und pränatale Schädigungen [46]. Das Alkoholvolumen eines lebenslangen Konsums, sowie die Kombination aus der Frequenz und dem Gehalt an Getrunkenen pro Inzidenz, erhöhen das Risiko einer alkoholbedingten Schädigung weitgehend über eine Dosis-Wirkungs-Beziehung [47]. Es besteht ein kausaler Zusammenhang zwischen dem Missbrauch von Alkohol und dem Auftreten von Mundhöhlen-, Rachen-, Kehlkopf-, Ösophagus-, Leber-, Kolon-, Rektum- und weiblichen

Brustkrebs [48]. Zudem ist Alkohol, neben Fehl- und Überernährung, eine der häufigsten Ursachen für Lebererkrankungen in westlichen Ländern [49].

1.2.1. Alkoholbedingte Lebererkrankung: Krankheitsbild, Prävalenz und Pathogenese

Krankheitsbild & Risikofaktoren der ALD

Die alkoholbedingte Lebererkrankung (ALD; *alcoholic liver disease*) umfasst verschiedene Stadien einer durch chronischen Alkoholkonsum ausgelösten Lebererkrankung und stellt die bedeutendste Organmanifestation chronischen Alkoholmissbrauchs dar (Abbildung 4) [50]. Der chronische Konsum von Alkohol führt bei ca. 90 % der Betroffenen durch die vermehrte Einlagerung von Lipiden im Hepatozyten zur einfachen Steatose [51]. Die einfache Verfettung der Leber ist durch Alkoholabstinenz reversibel [49]. In vielen Fällen gibt es, mit Ausnahme der Vergrößerung der Leber (Hepatomegalie), keine klinischen Symptome [50]. Bei etwa 20-40 % der Menschen mit Fettleber kommt es zur Ausbildung schwererer Formen der ALD [51]. Die alkoholbedingte Hepatitis ist durch die Persistenz einer makrovesikulären Steatose von mehr als 30 % der Hepatozyten, der Ausbildung von Entzündungsherden sowie entzündlichen Infiltraten, vorwiegend durch Neutrophile Granulozyten, gekennzeichnet [52]. Als weitere Charakteristika der Steatohepatitis sind eine Fibrosierung funktionellen Lebergewebes und die Schwellung der Hepatozyten (ballooning degeneration) zu nennen [52]. Bei ca. 8-20 % der Personen mit Steatohepatitis kommt es zur Entwicklung einer Leberzirrhose, welche als irreversibles Endstadium der alkoholischen Lebererkrankung beschrieben wird [53]. Durch die Ausbildung von Bindegewebssepten und Regeneratknoten kommt es zur destruktiven Veränderung der Leberarchitektur (Läppchen und Gefäßstruktur) [54]. Dies hat eine mögliche Störung der Gefäßversorgung und Durchblutung der Leber zur Folge und kann zur Portalen Hypertension führen [54].

Als Hauptrisikofaktor für ALD steht die zugeführte kumulative Menge an Alkohol im Vordergrund [55]. Zudem scheint das Trinkmuster entscheidend, da die tägliche Aufnahme großer Mengen Alkohol in frühen Stadien der ALD das Risiko schwerere Formen zu entwickeln im Vergleich zu „Binge-Drinking“ und episodischem Trinken erhöht [55]. Auch das weibliche Geschlecht stellt einen individuellen Risikofaktor dar [56]. Hierbei scheinen vor allem die verringerte gastrische ADH, ein höherer Fettanteil und ein höherer Östrogenspiegel die zugrundeliegenden Mechanismen zu sein [56]. Als Faktoren,

Einleitung

die die Pathogenese von Leberschäden begünstigen, zählen zudem Übergewicht bzw. Adipositas sowie die ethnische Herkunft und genetische Faktoren [57] .

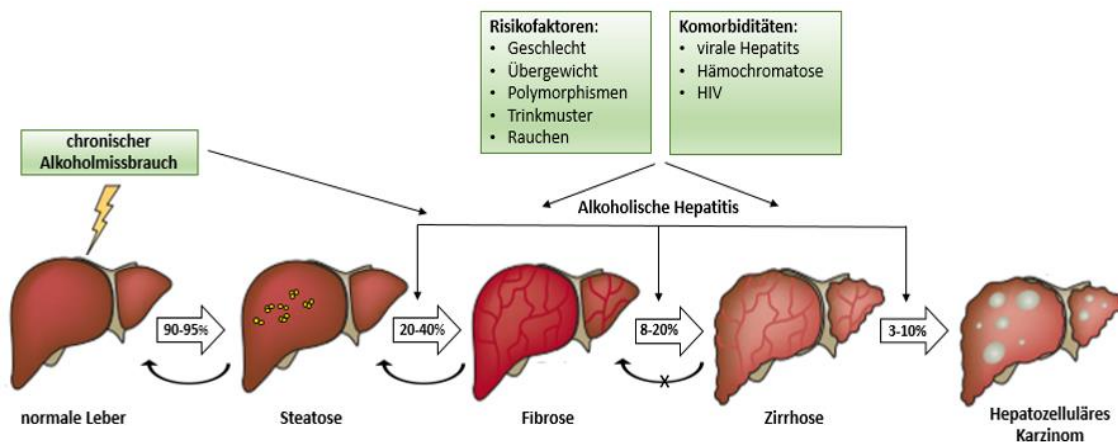


Abbildung 4: Das Spektrum der Alkoholischen Lebererkrankung. (modifiziert nach Pellicoro et al., 2014 & Gao und Bataller, 2011) [50],[137].

Epidemiologie & Prävalenz

Alkohol stellt neben Adipositas und Insulinresistenz eine der häufigsten Ursachen für Lebererkrankungen in westlichen Ländern dar [32]. Die genaue Prävalenz der ALD ist nicht bekannt, zumal vor allem die alkoholische Steatose, aber auch die Steatohepatitis, häufig symptomfrei ablaufen und nicht diagnostiziert werden [58],[49]. Aus histologischen Studien geht hervor, dass etwa 10-35 % der hospitalisierten Alkoholpatienten und -patientinnen an alkoholischer Hepatitis leiden [58]. Bei chronischem Konsum kommt es bei 8-20 % der Personen, die einen dauerhaften Alkoholmissbrauch betreiben, zur Entwicklung einer Leberzirrhose [51]. Im Jahr 2012 starben in Österreich durchschnittlich 30 Bürger und Bürgerinnen pro 100 000 Einwohner (>15 Jahre) an alkoholbedingter Leberzirrhose [3]. Weltweit starben im Jahr 2010 ca. 493 300 Personen an alkoholbedingter Leberzirrhose und ca. 80 600 Menschen an alkoholbedingtem Leberkarzinom [59].

Pathogenese & molekulare Mechanismen der ALD

Lipidstoffwechsel in der Pathogenese der ALD

Die Pathogenese der ALD ist multifaktoriell bedingt und umfasst mehrere sich überschneidende pathophysiologische Prozesse [60]. Die Leber reagiert als erstes mit der vermehrten Einlagerung von Fetten, insbesondere Triglyzeriden, Phospholipiden und

Cholesterinestern [61]. Beim Abbau von Alkohol wird sowohl bei der Oxidation zu Acetaldehyd durch die ADH und der weiteren Metabolisierung zu Acetat NAD^+ zu NADH reduziert. Der übermäßige Konsum von Alkohol führt zur Anhäufung von NADH im Zytosol und den Mitochondrien und resultiert in einer Störung der mitochondrialen Fettsäure β -Oxidation [62]. Es wird angenommen, dass die Hemmung des Fettsäureabbaus zur vermehrten Akkumulation von Lipiden im Hepatozyten führt. Diese Effekte konnten *in vitro* in einem alternativen NADH -generierenden System nachgewiesen werden [63]. Eine Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen NADH und NAD^+ könnte zudem die Glukoneogenese beeinflussen und den Citratzyklus hemmen, wodurch Acetyl-CoA vermehrt als Substrat zur Fettsäuresynthese und Ketogenese verwendet werden könnte [60]. Weiters werden, neben dem NADH/NAD^+ Quotienten, im Lipidmetabolismus involvierte Transkriptionsfaktoren als Inhibitoren der β -Oxidation von Fettsäuren diskutiert. Alkohol hemmt den Fettsäureabbau hauptsächlich durch die Inaktivierung des *Peroxisome-proliferator-activated receptor* (PPAR-) α , einem nuklearen Hormonrezeptor, der die Transkription von mehreren Genen, die im Lipidmetabolismus involviert sind, steuert [64].

Der gesteigerten Fettsäuresynthese liegt die Induktion des Transkriptionsfaktors *sterol regulatory element binding protein 1c* (SREBP-1c) durch Ethanol zugrunde. Diese resultiert entweder direkt aus der Steigerung der Transkription des SREBP-1c-Gens durch den Metaboliten Acetaldehyd [61] oder indirekt über die Hochregulierung der SREBP-1c-Expression [51]. Indirekt steuert Alkohol zusätzlich die Expression von SREBP-1c über die Herunterregulierung von SREBP-1c reduzierenden Faktoren (AMPK, Sirtuin1, Adiponectin, STAT3) [65]. Eine gesteigerte Lipidabsorption aus dem Dünndarm sowie eine vermehrte Mobilisierung von Fettsäuren aus dem Fettgewebe und die erhöhte hepatische Aufnahme von Fettsäuren könnten zudem die Pathogenese der Steatose begünstigen [66]. Des Weiteren wird bei chronischem Alkoholkonsum die Autophagozytose gehemmt [67]. Diese ist ein wichtiger Mechanismus zur Entfernung von angesammelter Lipidtropfen im Hepatozyten [68]. Alkohol greift den Organismus nicht nur direkt durch die Regulierung des Lipidmetabolismus an, sondern auch durch die Beeinträchtigung der zuständigen Reparatursysteme.

Zinkmetabolismus in der Pathogenese der ALD

Zink, welches als Cofaktor von ADH fungiert und somit eine wesentliche Rolle im Alkoholstoffwechsel einnimmt, wird als ein weiterer Faktor für die Entstehung von ALD diskutiert [69]. Bei ca. 30-50 % der Alkoholiker ohne Leberschäden konnte ein Zinkmangel festgestellt werden [70]. Ähnliche Ergebnisse konnten auch bei Personen mit ALD gezeigt werden [71]. So fand sich bei Patienten und Patientinnen mit ALD ein verminderter Zinkspiegel in der Leber [72], verringerte Plasma-Zinkspiegel und eine vermehrte Ausscheidung von Zink über den Urin [73]. Auch in Ethanol-gefütterten Ratten wurden verringerte Serum- und Leberzinkspiegel festgestellt [74]. Zudem wurde bei Ratten ein Zinkmangel mit einer Verringerung der hepatischen ADH-Aktivität assoziiert [74]. Als Ursache für diese auftretenden Zinkmängel werden sowohl die verringerte Aufnahme, aber hauptsächlich beeinträchtigte Transportmechanismen diskutiert: Aus der Studie von Sun et al. geht hervor, dass die Aufnahme von Alkohol bei Mäusen zur Induktion der Transporter Zip5 und Zip14 sowie zur Herabregulierung von Zip7 und Znt7 durch oxidativen Stress führt [75]. Signifikant verringerte Zinkwerte im Endoplasmatischen Retikulum und den Mitochondrien in Assoziation mit erhöhten Zip8-, Zip13- und Znt4-Spiegeln konnten zudem in ethanol-gefütterten Ratten verzeichnet werden [76]. Sun et al. gehen davon aus, dass der durch Ethanol induzierte Zinkmangel zur Beeinträchtigung der mitochondrialen Neubildung in der Leber und zur Veränderung der Komplexe I, III und IV der mitochondrialen Atmungskette führt, wodurch vermehrt reaktive Sauerstoffspezies (ROS) freigesetzt werden und das Membranpotential beeinträchtigt wird [77]. *In vitro* wurde bei HepG2-Zellen ein Zinkmangel mit einer verringerten Zellproliferation und -regeneration, sowie der geringeren Produktion des Hepatozyten-Wachstumsfaktors (HGF) und Metallothionein (MT) assoziiert [78]. Überdies konnten bei Mäusen mit Zinkmangel Entzündungsreaktionen sowie die Akkumulation von Lipiden durch oxidativen Stress und der Expression proinflammatorischer Cytokine (Interleukin (IL)-1 β , TNF α) verstärkt nachgewiesen werden [75]. Es wird diskutiert, dass die eben genannte veränderte Expression verschiedener Gene bei ALD über Histon-Modifikation reguliert wird und die vermehrte Freisetzung proinflammatorischer Cytokine durch die

Einleitung

Aktivierung von *Nuclear factor κ -light chain enhancer of activated B-cells* (NF- κ B) vermittelt wird [79],[80]. (siehe Abbildung 5)

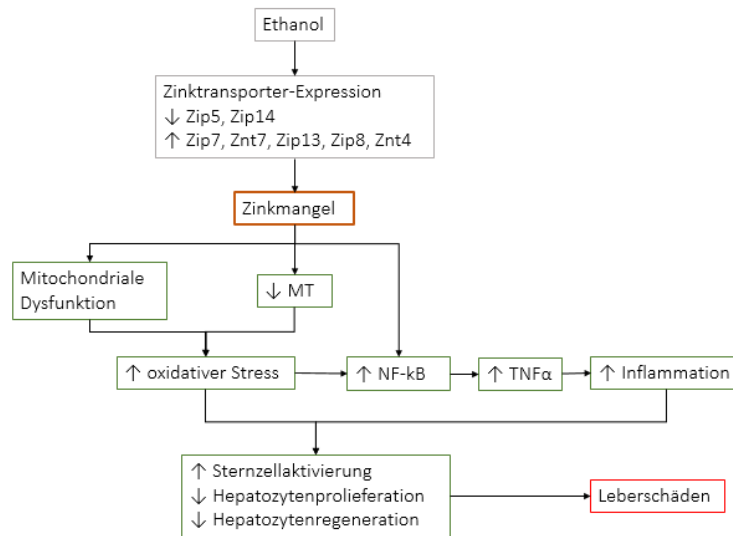


Abbildung 5: Pathogenese der ALD durch alkoholinduzierten Zinkmangel. (modifiziert nach Skalny et al., 2017) [69]. Ethanol führt über die veränderte Expression von hepatischen Zinktransportern zum Zinkmangel. Dieser geht mit einer mitochondrialen Dysfunktion und der verringerten Produktion von Metallothionein (MT) und vermehrtem oxidativen Stress einher. Über die Aktivierung des NF- κ B Signalweges werden verstärkt proinflammatorische Cytokine freigesetzt, wodurch Entzündungsprozesse die Folge sind. Durch die vermehrte Aktivierung von Sternzellen und der verringerten Hepatozytenregeneration und-proliferation kommt es zu Leberschäden.

Darmpermeabilität und Endotoxinämie in der Pathogenese der ALD

Endotoxine, welche chemisch gesehen Lipopolysaccharide (LPS) sind, sind Bestandteile der Zellmembran gramnegativer Bakterien, die beim Zerfall der Bakterien durch Tod oder Lyse freigesetzt werden [81]. Unter physiologischen Bedingungen gelangen nur geringe Mengen LPS aus dem Darmlumen in den Blutkreislauf und werden in der Leber eliminiert [82]. Der chronische Konsum von Alkohol wird mit einer erhöhten Darmpermeabilität assoziiert, wodurch vermehrt Makromoleküle und LPS in den Blutstrom vordringen können [83],[84]. Zellkulturstudien zeigen, dass die chronische Behandlung von Ethanol mit erhöhten Acetaldehyd-Konzentrationen assoziiert wird und der Metabolit die Umlagerung der Tight Junction Proteine Occludin und ZO-1 und Adhäsionsverbindungen aus dem interzellulären in den intrazellulären Raum bedingt, wodurch die Permeabilität erhöht wird [85], [86]. Zudem geht aus Tier- und Zellkulturstudien hervor, dass Ethanol zu einer gesteigerten Expression der induzierbaren Stickstoffmonoxidsynthase (iNOS)

und dadurch zu einer gestörten Barrierefunktion der Darmmukosa führt [87],[88]. Außerdem konnten Unterschiede im intestinalen Mikrobiom bei Personen mit chronischem Alkoholmissbrauch, verglichen mit abstinenten Personen festgestellt werden [89]. Eine Überbesiedelung der Darmmikrobiota kann zu mukosalen Schädigungen beisteuern und zur vermehrten Freisetzung von Endotoxinen führen [90]. Diese Effekte können ausschlaggebend für die verstärkte Translokation von Endotoxinen in das Pfortaderblut sein [83]. Nach dem Transport von Endotoxin durch die Bindung an Lipopolysaccharid-bindende Proteine (LBP) zur Leber [91] werden diese von Makrophagen (Kupfferzellen) und einem Rezeptor-Komplex, bestehend aus *Toll-like receptor 4* (TLR4) und dem Cofaktor CD14, erkannt und gebunden [82]. Die nachfolgende Rekrutierung des Adaptermoleküls *Myeloid differentiation primary response 88* (MyD88) kann eine Aktivierung der iNOS und der Produktion von reaktiven Nitritspezies (RNS) und ROS zur Folge haben [92]. Weiters konnte nachgewiesen werden, dass durch die TLR4-Signalkaskade der Transkriptionsfaktor NF- κ B aktiviert wird, was wiederum zur vermehrten Produktion proinflammatorischer Cytokine (TNF α , IL-6, IL-1 β) führt und zur Pathogenese der ALD beiträgt [93],[94]. In Studien an TLR4-Knockout Mäusen konnte gezeigt werden, dass der LPS-vermittelte Signalweg an der Pathogenese der ALD beteiligt ist [94],[95]. Im Vergleich zu Kontrollen führte die Fütterung von Ethanol bei TLR4-Knockout Mäusen zur verringerten Expression proinflammatorischer Cytokine (TNF α , IL-6) und hemmte die Induktion von CYP2E1 und damit auch die Produktion von ROS. Das Abschalten des TLR4-Gens konnte vor der Entwicklung einer Steatose schützen [94].

CYP2E1 in der Pathogenese der ALD

Oxidativer Stress sowie die Bildung von ROS und Lipidperoxiden stellen wichtige Mechanismen in der Pathogenese der ALD dar [35]. Die Induktion von CYP2E1 durch chronischen Alkoholmissbrauch bewirkt nicht nur die vermehrte Produktion von Acetaldehyd, sondern auch die Freisetzung von ROS, die wiederum mit Zellschäden einhergehen [96]. Frühere Studien zeigen eine Korrelation zwischen alkoholinduzierten Leberschäden und CYP2E1-Spiegeln sowie der gesteigerten Lipidperoxidation [33],[97]. In Tierstudien konnte die Verringerung der CYP2E1-Aktivität mit einer Reduktion der alkoholinduzierten Leberschäden assoziiert werden [84],[85]. Eine verringerte Toxizität durch Ethanol konnte zudem bei CYP2E1-defizienten Mäusen gezeigt werden. Die

Einleitung

Ergebnisse lassen auf eine Beteiligung von CYP2E1 an der Pathogenese der ALD schließen [100]. (siehe Abbildung 6)

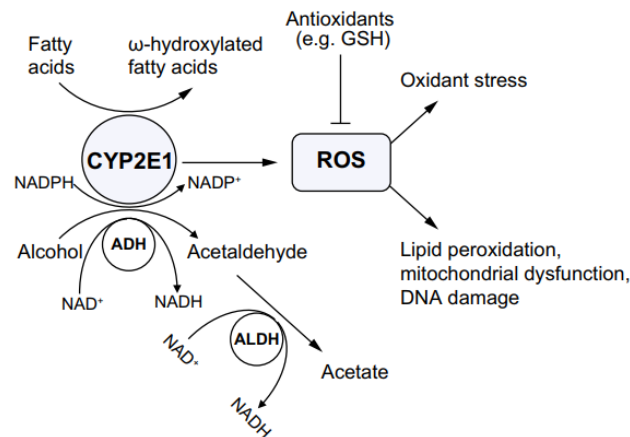


Abbildung 6: CYP2E1 induziert oxidativen Stress in ALD. (aus Leung und Niet, 2013) [35]. Ethanol wird durch CYP2E1 und ADH metabolisiert, wobei dadurch toxische Intermediate, wie Acetaldehyd, Acetat und freie Radikale generiert werden. CYP2E1 erzeugt überdies durch die Metabolisierung von Fettsäuren ω-hydroxylierte Fettsäuren und induziert die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Oxidativer Stress und Zellschäden sind die Folge.

Inflammation in der Pathogenese der ALD

Zusätzlich zur Steatose sind die zentrilobuläre „Balloonierung“ der Hepatozyten, die Infiltration von Immunzellen, zytoplasmische Einschlüsse (Mallory-Körper) und die „maschendrahtartige“ Veränderung der Leberstruktur histologische Charakteristika der Steatohepatitis [101]. Entzündungsprozesse werden als maßgebliche Ursachen dieser Entwicklungen angenommen [51]. Die chronische Zufuhr von Alkohol bedingt eine Hochregulierung zahlreicher Faktoren, die zur Induktion inflammatorischer Prozesse führen und die Pathogenese der ALD begünstigen [102]. Die Aktivierung von Kupferzellen durch LPS und TLR4 aber auch die Induktion von CYP2E1 und der Generierung von ROS tragen maßgeblich zur Entstehung inflammatorischer Prozesse bei [103]. Nekrose ist eine pathologische Form des Zelltodes und ist ein charakteristisches Merkmal der alkoholbedingten Steatohepatitis [104]. Faktoren, die zur Induktion von Nekrosen führen, sind oxidativer Stress, proinflammatorische Cytokine, vorrangig TNF α und Fas Liganden [102]. Nekrotische Zellen sind in der Lage inflammatorische Antworten auszulösen, die in der Folge zur Freisetzung von IL-1 α und IL-1 β führen [105]. Diese aktivieren wiederum Makrophagen, die eine ganze Reihe an Entzündungsprozessen

Einleitung

induzieren können, unter anderem die Infiltration von Neutrophilen Granulozyten in die Leber [106]. Es wird angenommen, dass die Interleukine 8 und 17 eine wesentliche Rolle bei der intralobulären Infiltration von Neutrophilen Granulozyten spielen [102]. Die Dichte der Infiltrate sowie auch deren Häufigkeit scheinen mit dem Schweregrad der Leberschädigung zu korrelieren [107]. Acetaldehyd ist das direkte Abbauprodukt von Ethanol und übt seine hepatotoxische Wirkung über die Bildung von Protein- und DNA-Addukten aus, wodurch es zur Aktivierung von Kupfferzellen und zur Schädigung der Mitochondrien und des mikrotubulären Systems kommt [108]. Der Metabolit fördert überdies die Apoptose durch die Verminderung des Glutathionspiegels, der Erhöhung der Toxizität von freien Radikalen und der Induktion der Lipidperoxidation. Acetaldehyd blockiert durch die Bindung an Mikrotubuli die Sekretion von Proteinen, wodurch es zur Schwellung des Hepatozyten, dem sogenannten „Ballooning“ kommt [62].

Die in dieser Arbeit beschriebenen Mechanismen zur Pathogenese der ALD sind in Abbildung 7 dargestellt.

Ein fortbestehender Alkoholkonsum bei bereits vorhandenen Entzündungen kann zur Fibrosierung der Leber, welche durch die exzessive Vermehrung von kollagenen Fasern charakterisiert ist, sowie auch zu Leberzirrhosen übergehen [52]. Der Krankheitsverlauf der ALD kann bis zum hepatozellulären Karzinom reichen [109].

Einleitung

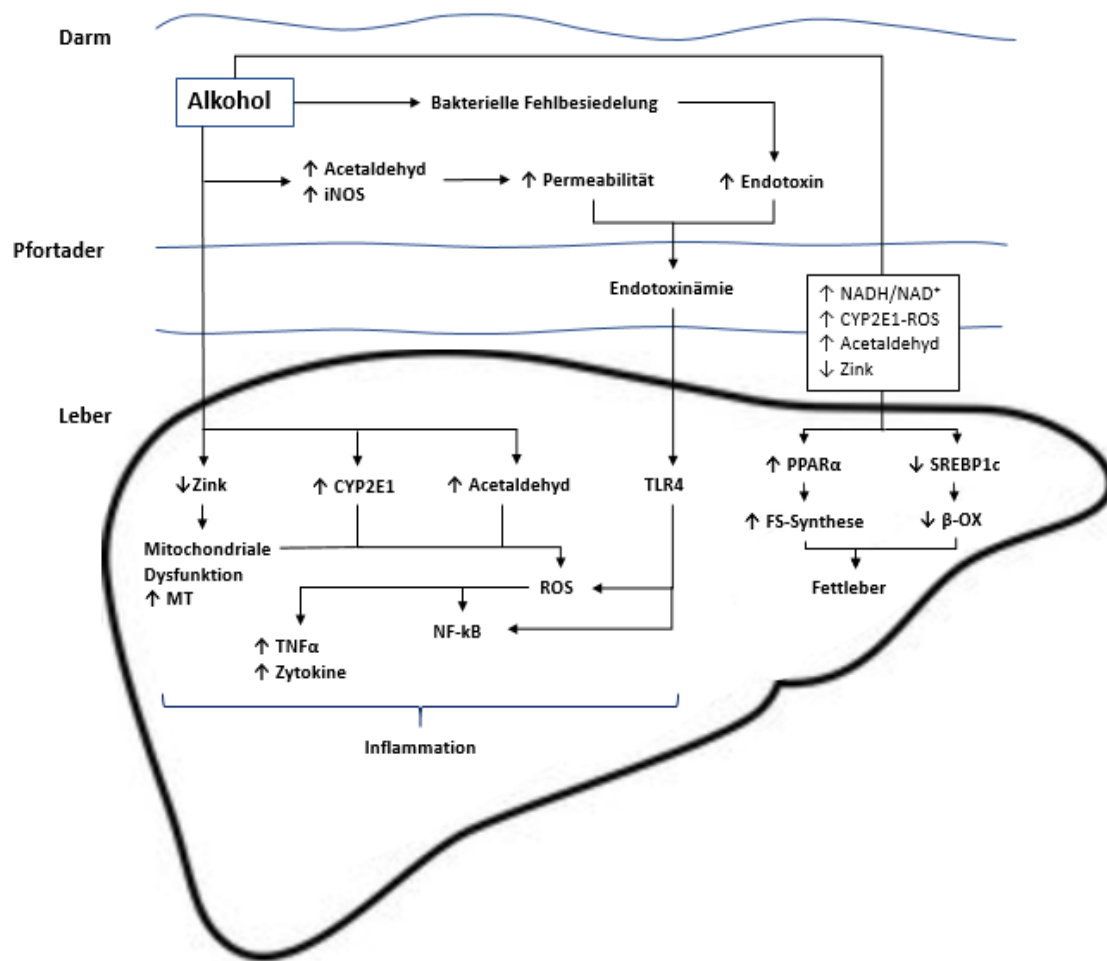


Abbildung 7: Molekulare Mechanismen der dieser Arbeit zu Grunde liegenden Hypothese zur Pathogenese der ALD. (modifiziert nach Gao und Bataller, 2011 & Skalny et al., 2017) [51],[69]. Ethanol führt durch die Akkumulation von NADH, der Induktion von CYP2E1 und der vermehrten Generierung von Acetaldehyd zur Verringerung der β -Oxidation (β -OX) und einer gesteigerten Fettsäure (FS)-Synthese und damit zur Steatose. Zudem werden durch eine alkoholbedingte, bakterielle Fehlbesiedelung und der erhöhten Darmpermeabilität über den TLR4- (*Toll like receptor 4*) Signalweg ROS und andere proinflammatorische Zytokine produziert. Zinkmangel und die dadurch entstehende mitochondriale Dysfunktion und die Verringerung von Metallothionein (MT), sowie die Induktion von CYP2E1 und die vermehrte Generierung von Acetaldehyd führen ebenfalls zur vermehrten Produktion von ROS sowie zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors *Nuclear factor κ -light chain enhancer of activated B-cells* (NF- κ B). Die Produktion proinflammatorischer Zytokine und inflammatorische Prozesse sind die Folge und tragen maßgeblich zur Pathogenese der ALD bei.

2. Zielstellung der Arbeit

Der chronische Konsum von Alkohol wird weltweit als einer der Hauptgründe für die Entstehung von Lebererkrankungen beschrieben [110]. Das Spektrum der alkoholbedingten Lebererkrankung reicht von einer einfachen Steatose über Fibrose, Zirrhose bis hin zum Hepatozellulären Karzinom [111]. Die im Alkoholstoffwechsel vorrangigen Enzyme ADH und CYP2E1 scheinen durch die chronische Zufuhr von Alkohol modifiziert zu werden. So wird in Humanstudien der chronische Missbrauch von Alkohol und die dadurch entstehenden Leberschäden mit einer Verringerung der ADH-Aktivität assoziiert [20]. Resultate aus Tierstudien zeigen jedoch keine einheitlichen Ergebnisse [23]–[25]. In einer Studie der eigenen Arbeitsgruppe wurden zudem verringerte ADH-Plasmawerte bei Patienten mit ALD festgestellt (nicht publizierte Daten). Aus tierexperimentellen Studien geht hervor, dass der dauerhafte Konsum von Alkohol mit einer Induktion von CYP2E1 assoziiert wird. Die damit verbundene Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies und Generierung von oxidativem Stress könnten maßgeblich zur Pathogenese der ALD beitragen [21],[112]. Bei der Regulation der Enzymsysteme scheinen das Ausmaß der Leberschädigung und die Dauer des Alkoholkonsums eine Rolle zu spielen, allerdings sind die genauen Mechanismen, speziell zur Regulation der ADH trotz intensiver Forschung weitgehend ungeklärt.

Ausgehend von diesem Hintergrund war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, den Einfluss einer chronischen Zufuhr von Ethanol auf die im Alkohol-Metabolismus vorherrschenden hepatischen Enzyme ADH und CYP2E1 *in vivo* zu untersuchen. Zudem sollten die Zusammenhänge einer Veränderung der ADH-Aktivität und -Proteinkonzentration in der Leber mit jenen im Plasma verglichen werden. Dabei wurden folgende Fragestellungen erarbeitet:

1. *Führt die chronische Aufnahme einer mit Ethanol angereicherten Lieber DeCarli Diät zu einer Veränderung der ADH-Aktivität sowie der -Proteinkonzentration in der Leber und im Plasma?*
2. *Hat die chronische Aufnahme von Ethanol einen Einfluss auf die Proteinkonzentration und Aktivität von CYP2E1 in murinem Lebergewebe?*
3. *Besteht ein Zusammenhang zwischen der hepatischen ADH-Aktivität und -Proteinkonzentration und den im Plasma gemessenen Werten?*

3. Material

3.1. Proteinisolation

Verbrauchsmaterialien & Geräte

Präzisionswaage Sartorius RC 210S	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Glas-Homogenisator, lose	Wheaton Industries Inc., New Jersey, USA
Optima XPN-100 Ultracentrifuge	Beckman Coulter GmbH, Wien, Österreich
Adapter, Delrin, Tube, 8 mm, dia	Beckman Coulter GmbH, Wien, Österreich
2.0 mL Ultra-Clear™ Centrifuge Tube, 8 x 49 mm	Beckman Coulter GmbH, Wien, Österreich
Cap Assembly, Aluminium, Tube, 8 mm, dia	Beckman Coulter GmbH, Wien, Österreich
Zentrifuge Z216 MK	HERMLE Labortechnik GmbH, Wehingen, Deutschland

Chemikalien

Kaliumchlorid (KCL)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphatdodeca- hydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydrogenphosphatdihydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

3.2. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Verbrauchsmaterialien & Geräte

96-Well-Platten	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
SpectraMax M3 Multi-Mode Microplate Reader	Molecular Devices, Biberach and der Riss, Deutschland

Chemikalien

Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
----------------------------	--

Material

BioRad Protein Assay Dye Reagent Concentrate	BioRad Laboratories, München, Deutschland
--	---

3.3. Bestimmung der Aktivität der Alkoholdehydrogenase

Verbrauchsmaterialien & Geräte

96-Well-Platten	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
SpectraMax M3 Multi-Mode Microplate Reader	Molecular Devices, Biberach and der Riss, Deutschland

Chemikalien

Semicarbazid ($\text{CH}_5\text{N}_3\text{O}$)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Nicotinamidadenindinukleotid (NAD)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
L-Glutathion reduziert ($\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tetra-Natriumdiphosphat Decahydrat ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \times 10\text{H}_2\text{O}$)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Glycin ($\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

3.4. Bestimmung der Aktivität von Cytochrom P450 2E1

Verbrauchsmaterialien & Geräte

Zentrifuge Z216 MK	HERMLE Labortechnik GmbH, Wehingen, Deutschland
Mixing Block MB-102	BIOER, Hangzhou, China
96-Well-Platte	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
SpectraMax M3 Multi-Mode	Molecular Devices, Biberach and der Riss,

Material

Microplate Reader

Deutschland

Chemikalien

Dinatriumhydrogenphosphatdodecahydrat
($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)

Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe,
Deutschland

Natriumhydrogenphosphatdihydrat
($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)

Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe,
Deutschland

Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)

Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe,
Deutschland

Dikaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)

Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe,
Deutschland

Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim,
Deutschland

Natriumcitrat ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$)

Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe,
Deutschland

Magnesiumchlorid (MgCl₂)

Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe,
Deutschland

Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
(NADP⁺)

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim,
Deutschland

Glucose-6-phosphat ($\text{C}_6\text{H}_{13}\text{O}_9\text{P}$)

Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe,
Deutschland

p-Nitrophenol ($\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_3$)

Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe,
Deutschland

p-Nitrocatechol ($C_6H_5NO_4$)

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim,
Deutschland

Trichloressigsäure ($\text{C}_2\text{HCl}_3\text{O}_2$)

Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe,
Deutschland

Natriumhydroxid (NaOH)

Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe,
Deutschland

3.5. Bestimmung der Proteinkonzentration der ADH und CYP 2E1 mittels Western Blot

Verbrauchsmaterialien & Geräte

PVDF-Membran Hybond P	BioRad Laboratories, München, Deutschland
Extra Thick Blot Paper	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Impuls Schweißgerät PM-FS-200-S	ALLPAX GmbH & Co. KG, Papenburg, Deutschland
Schlauchfolie	ALLPAX GmbH & Co. KG, Papenburg, Deutschland
Mini-PROTEAN® Glass Plates	BioRad Laboratories, München, Deutschland
Mini-PROTEAN® Spacer Plates (1,5 mm)	BioRad Laboratories, München, Deutschland
Mini-PROTEAN® System Comb 15 well, 1.0	BioRad Laboratories, München, Deutschland
Mini-PROTEAN® Casting Stand	BioRad Laboratories, München, Deutschland
Gaskets	BioRad Laboratories, München, Deutschland
Mini-PROTEAN® Tetra Cell	BioRad Laboratories, München, Deutschland
Casting Stands & Clamps	
Mini-PROTEAN® Tetra Vertical	BioRad Laboratories, München, Deutschland
Electrophoresis Cell	
Orbi-Blotter TM	Benchmark, Frankfurt, Deutschland
PowerPac™ HC High-Current Power Supply	BioRad Laboratories, München, Deutschland
Trans Blot Turbo Transfer System	BioRad Laboratories, München, Deutschland
Mixing Block MB-102	BIOER, Hangzhou, China
Multifunktionsrotor PS-M3D	Grant Instruments Ltd, Cambridge, England
Zentrifuge Z216 MK	HERMLE Labortechnik GmbH, Wehingen, Deutschland
ChemiDoc™ Imaging Systems (XRS+ System)	BioRad Laboratories, München, Deutschland

Material

Chemikalien

TRIS ($C_4H_{11}NO_3$)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Acrylamid (C_3H_5NO)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumpersulfat ($(NH_4)_2S_2O_8$) (APS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tetramethylethyldiamin ($C_6H_{16}N_2$) (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat ($NaC_{12}H_{25}SO_4$) (SDS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Dithiothreitol ($C_4H_{10}O_2S_2$) (DTT)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Glycin ($C_2H_5NO_2$)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Mercaptoethanol (C_2H_6OS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau ($C_{19}H_{10}Br_4O_5S$)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Glycerol ($C_3H_8O_3$)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Tween [®] 20 ($C_{58}H_{114}O_{26}$)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Methanol (CH_3OH)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ponceau S ($C_{22}H_{16}N_4O_{13}S_4$)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure ($C_2H_4O_2$)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Precision Plus Protein Standard	BioRad Laboratories, München, Deutschland

Material

Salzsäure (HCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid (KCL)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
ADH1 Antibody 5295	Cell Signaling Technology, Leiden, Niederlande
Anti-rabbit IgG, HRP linked Antibody	Cell Signaling Technology, Leiden, Niederlande
Cytochrom P450 2E1 polyclonal Antibody	Enzo Life Sciences (ELS) AG, Lausen, Schweiz
Beta Actin (13E5) Rabbit mAb 4970	Cell Signaling Technology, Leiden, Niederlande
SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

3.6. Allgemeine Verbrauchsmaterialien

Kolbenhubpipetten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Serologische Pipetten	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Mehrkanalpipetten	Brand GmbH & Co KG, Wertheim, Deutschland
Spitzen für Kolbenhubpipetten	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Falcon Tubes mit Schraubverschluss	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Vortex Reax 2000	Heidolph-Instruments, Schwabach, Deutschland
Alufolie	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Wiegeschale	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland

Material

Stoppuhr	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Magnetheizrührer RSM-10HS	Phoenix Instrument GmbH, Garbsen, Deutschland
Rotalibo®-Economy-Magnetstäbchen	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Orion 420A pH Meter	Orion Research, Inc., Jacksonville, USA
Rotilabo®-Reaktionsgefäßständer	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Laborhandschuhe	STARLAB GmbH, Hamburg, Deutschland
Laborstift	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Aluminiumblock zum Kühlen	Laborbestand
Pinzetten	Laborbestand
Pufferwanne	Laborbestand
Stickstoffbehälter	KGW-Isotherm Karlsruher Glastechnisches Werk-Schieder GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Rasierklinge	Hugo Herkenrath GmbH & Co.KG, Sollingen, Deutschland

3.7. Software

Mendeley	Mendeley Ltd, London, England
GraphPad Prism 7.0	GraphPad Software Inc., La Jolla, USA
Image Lab 5.0 Software	BioRad Laboratories, München, Deutschland
Microsoft Office 2016	Microsoft Corporation, Redmond, USA
SoftMax Pro7 Software	Molecular Devices GmbH, Biberach an der Riss, Deutschland

4. Methoden

4.1. Versuchstiere und Versuchstierhaltung

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Proben stammen aus dem Tierversuchsvorhaben Nr.02.-061/13, das nach Genehmigung durch das Thüringer Landesamt für Verbraucherschutz an der Friedrich-Schiller-Universität Jena unter Standardbedingungen durchgeführt wurde. Insgesamt wurden Proben von 18 Tieren des Versuchs verwendet. Im Folgenden sind die Versuchsbedingungen und der Versuchsablauf kurz zusammengefasst. Eine detaillierte Beschreibung des Fütterungsversuchs befindet sich in der Masterarbeit von Finn Jung.

Die Tiere (C57BL/6J Mäuse, weiblich, 6-8 Wochen alt) erhielten nach einer 12-tägigen Adaptionsphase an die flüssige, sogenannte Lieber DeCarli Diät (Zusammensetzung siehe Anhang) [113] für insgesamt 35 Tage entweder eine Ethanol (EtOH)-Diät oder eine Kontrolldiät. Der EtOH-Gehalt wurde über 6 Tage von 0 auf 3 % wt/wt erhöht und wurde nach der Adaptionsphase bis Ende des Versuches auf 3,33 % wt/wt gehalten.

Der kalorische Ausgleich der Kontrollgruppe erfolgte mittels Maltodextrin, sodass eine isokalorische Nahrungszufuhr gewährleistet wurde. Die nachfolgende Abbildung 8 soll die zeitliche Abfolge des Fütterungsversuchs verständlich darstellen.

Nach Ende des Versuchs wurde den Tieren eine terminale Narkoselösung (Ketamin 80mg/kg + Xylazin 6mg/kg) intraperitoneal injiziert und nach Blutabnahme wurden diese durch zervikale Dislokation getötet.

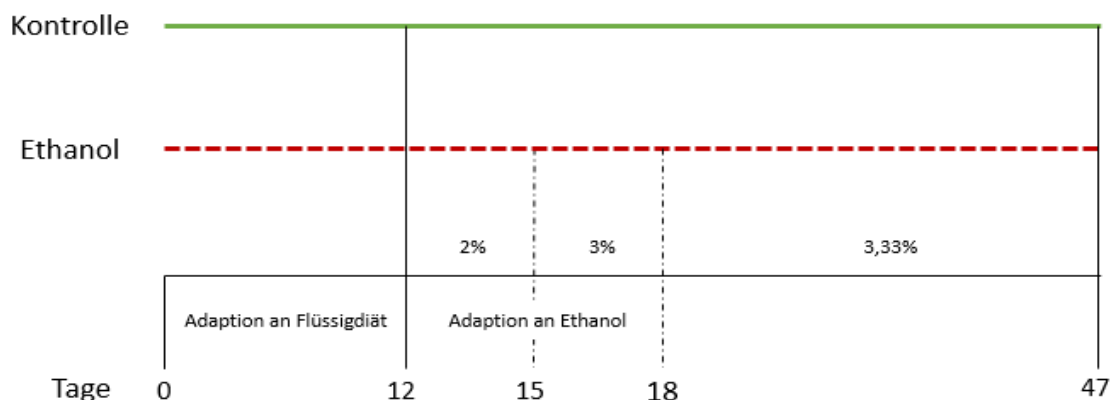


Abbildung 8: Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs des 47-tägigen Fütterungsversuchs.

4.2. Proteinisolation

Um die ADH-Aktivität im Lebergewebe messen zu können, wurde zunächst das cytosolische Protein isoliert.

Dazu wurden 100 mg Leber auf der Feinwaage abgewogen und im Glashomogenisator in 300 µl KCl homogenisiert. Das Homogenat wurde auf insgesamt 1900 µl mit eiskaltem Extraktionspuffer aufgefüllt und bei 4°C und 9000 rcf für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in ein Ultrazentrifugen-Röhrchen überführt.

Um das cytosolische Protein letztlich zu erhalten, wurden die Proben eine Stunde bei 100000 rcf und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für die weiteren Messungen verwendet.

Um das sich in der mikrosomalen Fraktion befindende Protein CYP2E1 weiterverwenden zu können, wurde das verbleibende Pellet in 70 µl Kaliumchlorid-Phosphat-Puffer (KCP-Puffer) (Zusammensetzung siehe Tabelle 3) resuspendiert und bei -80°C eingefroren.

Tabelle 3: Herstellung des KCP-Puffers: 10 mM Phosphatpuffer mit 150 mM KCl

KCP Puffer		
Lösung 1	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$	1,42 g / 100 ml
Lösung 2	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,56 g / 100 ml
➔ Lösung 1 (0,1 M) und Lösung 2 (0,1 M) herstellen. 8 ml Lösung 1 + 2 ml Lösung 2 vermengen und auf 100 ml mit H_2O auffüllen. Zugabe von 1,12 g KCl.		

Abkürzungen: Na_2HPO_4 , Dinatriumhydrogenphosphatdodecahydrat; NaH_2PO_4 , Natriumdihydrogenphosphathydrat

4.3. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Der Proteingehalt im Cytosol, der mikrosomalen Fraktion und im Plasma wurde mit Hilfe der Methode nach Bradford et al., bestimmt. Die Bradford-Methode ist eine photometrische Methode zur quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentration, welche nach ihrem Entwickler Marion M. Bradford benannt wurde. [114]

Dem Prinzip des hier beschriebenen Verfahrens liegt eine Messung der Verschiebung des Absorptionsspektrums zugrunde. Durch die spezifische Bindung des verwendeten Triphenylmethan-Farbstoffes Coomassie-Brilliant-Blue G-250 an die hydrophobe Seitenkette von Proteinen ändert sich dessen Farbe von Rot auf Blau und somit das Absorptionsmaximum von 465 nm auf 595 nm [114]. Durch eine Standardgrade mit

Methoden

definierten Konzentrationen (siehe Tabelle 4) kann der Proteingehalt errechnet werden. Zur Herstellung der Standardgerade wurde der Extraktionspuffer im selben Verhältnis wie die Proben verdünnt. Die Probenverdünnung erfolgte bei Leberproben im Verhältnis 1:40 und bei Plasmaproben 1:250.

Der Farbstoff Coumassie Blue G250 wurde im Verhältnis 1:5 mit destilliertem Wasser in einem 50 ml Reaktionsgefäß angesetzt. Die Lösung wurde dunkel gehalten. Zur Messung wurden zunächst 5 µl der Probenverdünnungen in eine 96 Well-Platte pipettiert und anschließend mit 200 µl der Farblösung versetzt.

Tabelle 4: Herstellung der Standardreihe zur Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford.

	Extraktionspuffer (µl)	Protein	Konzentration (mg BSA/ml)
A	198	2 BSA Stocklösung	1
B	100	100	0,5
C	100	100	0,25
D	100	100	0,125
E	100	100	0,0625
F	100	—	0

Abkürzungen: BSA, Bovines Serumalbumin

4.4. Messung der Alkoholdehydrogenase-Aktivität

Zur Messung der ADH-Aktivität wurde eine modifizierte Methode nach Walker et al. angewandt, welche auf dem Prinzip der Messung der Umsatzrate von NAD⁺ zu NADH beruht. Durch die Umsatzrate von NAD⁺ zu NADH, welche direkt proportional zu ADH ist, kann die Kinetik des Enzyms ermittelt werden [115].

Zur Bestimmung der ADH-Aktivität wurden zunächst 140 µl ADH-Analysepuffer (Zusammensetzung siehe Tabelle 5) in eine 96 Well-Platte vorgelegt. Die Auftragung der unverdünnten Proben erfolgte im Zweifachansatz (Plasma) bzw. im Dreifachansatz (Leber) mit einem Volumen von 10 µl in die bereits mit Puffer vorgelegten Wells.

Tabelle 5: Zusammensetzung des ADH-Analysepuffers zur Bestimmung der ADH-Aktivität.

ADH-Analysepuffer 100ml	
Semicarbazid	832 mg
Na ₄ P ₂ O ₇ ·10 H ₂ O	334 mg
Glycin	150 mg
TND	
Zusätze für 10ml ADH-Analysepuffer	
NAD	13,3 mg
Ethanol	330 µl
L-Glutathion reduziert	30,7 mg

Abkürzungen: TND, Tetra-Natriumdiphosphat Dehydrat; NAD, Nicotinamidadeninnukleotid

Die Menge an umgesetztem Substrat wird bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen [115], wodurch in weiterer Folge die Enzymaktivität mit folgender Formel berechnet wurde:

$$E_A = \frac{V_t}{\varepsilon * d * V_s} * \Delta E / \text{min}$$

E_A = Enzymaktivität (U/ml)

V_t = Gesamtvolumen (ml)

ε = Extinktionskoeffizient von NADH (6,22 cm²/µmol)

d = Schichtdicke (cm)

V_s = Probenvolumen (ml)

$\Delta E / \text{min}$ = Extinktionsanstieg pro Minute (U/min)

Bei Leberproben bezieht sich die Aktivität der ADH auf die Zellzahl. Die Zellzahl wurde über die Messung der DNA-Konzentration bestimmt. Dabei wurde die Aktivität pro Zelle ermittelt um letztendlich die Aktivität der ADH pro 1000 Zellen anzugeben.

Bei Plasmaproben bezieht sich die Aktivität der ADH auf die Proteinmenge, welche mittels Western-Blot Methode analysiert wurde. Die auf die individuelle Proteinmenge bezogene Enzymaktivität wurde in Prozent relativ zur Kontrolle ausgegeben.

4.5. Messung der CYP2E1-Aktivität

Das Protein CYP2E1 befindet sich in der mikrosomalen Fraktion der Zelle, welche sich im Pellet des Ultrazentrifugenhomogenats befand und in KCP-Puffer resuspendiert wurde. Die hier verwendete photometrische Messmethode basiert auf einer Hydroxylierungsreaktion von p-Nitrophenol zu p-Nitrocatechol, welche von CYP2E1 katalysiert wird [116]. Die Messung der Absorption erfolgte bei 535 nm.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde ebenfalls mittels Bradford-Methode durchgeführt. Die Verdünnung der Proben und des Extraktionspuffers erfolgte im Verhältnis 1:40. Das Protein wurde auf 200µg/32µl mit Assaypuffer (Zusammensetzung in Tabelle 6) eingestellt. Für die Messung wurden zudem das Substrat p-Nitrophenol (100 mM) und p-Nitrocatechol (100 mM) für die Kontrolle verwendet.

Tabelle 6: Herstellung des Assaypuffers zur Bestimmung der CYP2E1-Aktivität.

Assaypuffer (50 mM)	
Stock 1: KH_2PO_4 (1M)	6,805 g in 50 ml dest. Wasser
Stock 2: K_2HPO_4 (1M)	8,705 g in 50 ml dest. Wasser
➔ 1,2 ml Stock 1 + 3,88 ml Stock 2 mit dest. Wasser auf 100 ml auffüllen	

Abkürzungen: KH_2PO_4 , Kaliumdihydrogenphosphat; K_2HPO_4 , Dikaliumhydrogenphosphat

Die Lösungen 1 und 2, welche für das weitere Vorgehen wesentlich waren, setzten sich folgendermaßen zusammen:

Tabelle 7: Herstellung der Lösung 1 zur Bestimmung der CYP2E1-Aktivität.

Lösung 1 (L1)	
MgCl_2 (66 mM)	130 µl
NADP^+ (26 mM)	260 µl
G6P (26 mM)	260 µl

Abkürzungen: MgCl_2 , Magnesiumchlorid; NADP^+ , Nicotinamadenindinukleotidphosphat; G6P, Glucose-6-Phosphat

Tabelle 8: Herstellung der Lösung 2 zur Bestimmung der CYP2E1-Aktivität.

Lösung 2 (L2)
G6PDH (40 U/ml)
Natriumcitrat (5mM)
➔ G6PDH wurde in 2,5ml Natriumcitrat gelöst

Abkürzungen: G6PDH, Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase

L2 wurde zum Teil hitzeinaktiviert (30 min, 60°C). Dieser wurde später für den Assay-Standard und Standard 1 benötigt. Von dem nicht hitzeinaktiviertem L2 wurden je 5 µl zum Proben-Gesamtansatz sowie zur Phenolkontrolle pipettiert.

Die Bestimmung der Konzentration von CYP2E1 setzt eine Standardgerade voraus, für welche erneut ein Standard-Puffer verwendet wurde, der sich wie folgt zusammengesetzt hat:

Tabelle 9: Herstellung des Assay-Standards zur Bestimmung der CYP2E1-Aktivität.

Assay-Standard	
Assay Puffer	3010 µl
Nitrophenolstock	70 µl
Lösung 1	175 µl
Lösung 2 (hitzeinaktiviert)	35 µl

Aus dem Assay Standard wurde zunächst Standard 1 hergestellt werden, aus welchem wiederum die Standards 2-7 pipettiert wurden.

Tabelle 10: Herstellung des Standard 1 zur Bestimmung der CYP2E1-Aktivität.

Standard 1	
Assay Puffer	900 µl
Nitrophenolstock	20 µl
Nitrocatecholstock	20 µl
Lösung 1	50 µl
Lösung 2 (hitzeinaktiviert)	10 µl

Tabelle 11: Herstellung der Standards 2-7 zur Bestimmung der CYP2E1-Aktivität.

	Assay Standard	Standard 1
Standard 2	300 µl	200 µl
Standard 3	400 µl	100 µl
Standard 4	450 µl	50 µl
Standard 5	475 µl	25 µl
Standard 6	490 µl	10 µl
Standard 7	495 µl	5 µl

Nach Herstellung der erwähnten Puffer und Standards wurden folgende Ansätze für jede Probe und für eine Nitrophenolkontrolle (NPK) pipettiert:

Tabelle 12: Ansatzschema zur Bestimmung der CYP2E1-Aktivität.

	AP	NPK	L1	L2	Probe	KCP
NPK	440	10	25	5	-	20
Proben	440	10	25	5	20	-

Abkürzungen: AP, Assay-Puffer; NPK, Nitrophenolkontrolle; L1, Lösung 1; L2, Lösung 2; KCP, Kaliumchlorid-phosphatpuffer

Der Inkubation der NPK- und Proben-Gemische sowie auch der Standards 1-7 für 30 Minuten bei 37 °C im Heizblock folgte die Zugabe von 100 µl 20%iger Trichloressigsäure zum Stoppen der enzymatischen Reaktion. Es folgte eine Zentrifugation bei 10000 rcf für 5 min und 4 °C.

Aus den abgestoppten Gemischen wurden jeweils 500 µl entnommen und mit 200 µl 2 M NaOH neutralisiert. Die Proben, Standards und die Nitrophenolkontrolle wurden im Dreifachansatz auf einer 96-Well Platte zu je 200 µl aufgetragen und bei 535nm im Spektrophotometer gemessen. Zur Berechnung der Enzymaktivität wurde der Standard mit bekannter Menge an p-Nitrocatechol herangezogen.

4.6. Bestimmung der Proteinkonzentration von ADH1 und CYP2E1 mittels Western Blot

Die Western-Blot Methode wird zum Nachweis von Proteinen in einem Proteingemisch verwendet. Dem Auftrennen des Proteingemisches folgt das Blotten und anschließend das Übertragen der Proteine auf eine feste Membran. Durch die spezifische Bindung von

Antikörpern an antigene Epitope, an das sich auf der Membran befindende Protein, kann die Proteinexpression ermittelt werden [117].

Auftrennung der Proteine nach molekularer Masse

Die Auftrennung der Proteine nach ihrer molekularen Masse erfolgte mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE). Hierfür wurden 10 %-ige-Trenngele und 5 %-ige Sammelgele hergestellt (Zusammensetzungen siehe Tabelle 13 und Tabelle 14). Nach Auspolymerisieren der Gele wurden diese in die Gelelektrophorese-Apparatur eingebaut und mit Elektrophoresepuffer überschichtet.

Tabelle 13: Zusammensetzung des Trenngels (10 %), für 2 Gele mit 1 mm Abstandshalter

Trenngel (10 %)	
dH ₂ O	4170 µl
1,5 M Tris (pH 8,8)	2600 µl
30 % Acrylamid/Bis	3300 µl
10 % SDS	100 µl
10 % APS	100 µl
TEMED	6 µl

Abkürzungen: dH₂O, destilliertes Wasser; SDS, Natriumdodecylsulfat; APS, Ammoniumpersulfat; TEMED, N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin

Tabelle 14: Zusammensetzung des Sammelgels (5 %), für 2 Gele mit 1 mm Abstandshalter

Sammelgel (5 %)	
dH ₂ O	1512,5 µl
1,5 M Tris (pH 8,8)	625 µl
30 % Acrylamid/Bis	312,5 µl
10 % SDS	25 µl
10 % APS	25 µl
TEMED	3 µl

Abkürzungen: dH₂O, destilliertes Wasser; SDS, Natriumdodecylsulfat; APS, Ammoniumpersulfat; TEMED, N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin

Nach Durchführung der Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford wurde zunächst die benötigte Proteinmenge für jede Probe für die Gelbeladung der Elektrophorese berechnet. Plasmaproben wurden auf eine Zielkonzentration von 5 µg/µl

Methoden

und Leberproben auf 0,1 µg/µl (ADH) bzw. 0,5 µg/µl (CYP2E1) eingestellt. Die genannten Konzentrationen wurden durch die Zugabe von dem jeweiligen Extraktionspuffer und SDS-Ladepuffer, welcher zur Überführung der Proteine in die linearisierte Form dient, erreicht. Schließlich folgte nach der Vorbereitung des Proben-Puffer-Gemisches zur Beladung der Geltaschen die Zugabe von Dithiothreitol (DTT) zur vollständigen Denaturierung des Proteins. Dem Aufheizen auf 95°C für 5 min im Heizblock, folgte eine high-speed Zentrifugation (3000rcf) bei 4°C. Anschließend wurden die Proben gemeinsam mit einem Protein-Standard auf das Gel aufgetragen und in der Gelelektrophoresekammer bei 110V für 1,5 Stunden aufgetrennt.

Blotten

Der Auftrennung der Proteine folgte die Überführung der Proben auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran. Zunächst wird die PVDF-Membran mit Methanol aktiviert und zusammen mit zwei Filterpapieren 10 min in Transferpuffer gelegt. Die beladenen Gele wurden ebenfalls für 10 min in Transferpuffer eingelegt und geschwenkt. Das Gel und die Membran wurden schließlich zwischen die Filterpapiere gelegt (siehe **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**). Im Turboblottter (25V, 1A, 30min) erfolgte der Transfer der Proteine vom Gel auf die Membran. Die mit Protein beladene Membran wurde über Nacht getrocknet um mit den weiteren Membran-Behandlungen fortfahren zu können.

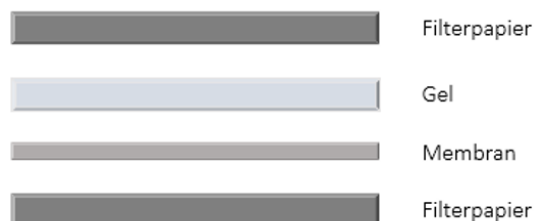


Abbildung 9: Aufbau des „Blottingsandwiches“.

Ponceau-Färbung & Blocken

Die getrocknete Membran wurde wiederum mit Methanol aktiviert und für 3 min in Ponceau geschwenkt. Nach Festhalten der Ponceau-gefärbten Membran und damit der Kontrolle zur gleichmäßigen Proteinauftrennung, wurden diese mit destilliertem Wasser gewaschen und für 1h bei Raumtemperatur mit bovinem Serumalbumin (BSA) in TBST

geblockt (5% BSA in TBST bei ADH und CYP2E1, 2,5% BSA in TBST bei β -Actin). Das Blocken der Membranen dient der unspezifischen Bindung von nicht gewünschten Proteinen.

Primärantikörper-Inkubation

Zur spezifischen Bindung an das antigene Epitop wurden die Antikörper mit BSA in TBST verdünnt (Plasma: ADH 1:250; Leber: ADH 1:500, β -Actin 1:1000, CYP2E1 1:1000). Die Inkubation erfolgte in einer zugeschweißten, luftblasenfreien Plastikfolie bei 4°C auf einem Rotationstisch.

Sekundärantikörper-Inkubation

Nach dreimaligen Waschen der Membran (5, 10, 15 min) folgte die Inkubation mit dem jeweiligen Sekundärantikörper (antirabbit). Dieser wurde im Verhältnis 1:5000 verdünnt und in eine Plastikschaale überführt, in welcher die Inkubation für 1h bei Raumtemperatur erfolgte.

Detektion

Als letzter Schritt erfolgte die Detektion der Banden. Die Membran wurde hierfür in eine abgedunkelte Schale mit einer 1:1 verdünnten Lösung aus Peroxidase Puffer und Luminol eingelegt. Nach der Inkubation folgten die Überführung der Membran und schließlich das Festhalten der detektierten Banden. Die densitometrische Auswertung der Banden erfolgte mithilfe der Software Image Lab™ 6.0

4.7. Statistische Auswertung

Die graphische Darstellung und die statistische Auswertung aller Daten erfolgte mittels GraphPad Prism 7. Zur Ermittlung der statistischen Unterschiede wurde ein parametrischer T-Test durchgeführt. Als Voraussetzung wurde eine Normalverteilung angenommen. Falls keine Normalverteilung gegeben war, wurde ein nicht-parametrischer T-Test durchgeführt. Die Anzahl der Tiere pro Gruppe belief sich auf 8 Exemplare. Aufgrund mangelnden Volumens einer Plasmaprobe bei EtOH-gefütterten Tieren wurden die Berechnungen mit $n = 7$ durchgeführt. Alle Daten sind als Mittelwerte (MW) $\pm$ Standardfehler (SEM = standard error of mean) dargestellt. Zusätzlich wurde auf statistische Ausreißer mittels Grubb's Test geprüft.

5. Ergebnisse

5.1. Einfluss der chronischen Aufnahme einer mit Ethanol angereicherten Lieber DeCarli Flüssigdiät auf die Aktivität und Proteinkonzentration der ADH in Lebergewebe und im Plasma von Mäusen.

Um zu untersuchen, ob die chronische Aufnahme von Ethanol einen Einfluss auf die Aktivität und/oder die Proteinkonzentration der ADH im Lebergewebe, sowie auch im Plasma von Mäusen hat, wurde die Aktivität mittels eines Enzymassay und die Proteinkonzentration mittels Western Blot bestimmt.

ADH1-Proteinkonzentration und Gesamt-ADH-Aktivität in murinem Lebergewebe

Zur Untersuchung der Gesamt-ADH-Aktivität und der ADH1-Proteinkonzentration wurde zunächst die cytosolische Fraktion des Leberhomogenats der Mäuse, die Ethanol- oder Kontrolldiät erhalten haben, isoliert.

Obwohl die mit Ethanol gefütterten Tiere im Mittel eine um 21,5 % geringere ADH1-Proteinkonzentration aufwiesen als die Kontrollgruppe, erreichen die Unterschiede aufgrund der Streuung innerhalb der Gruppen das Signifikanzniveau nicht ($p = 0,28$) (siehe Abbildung 10).

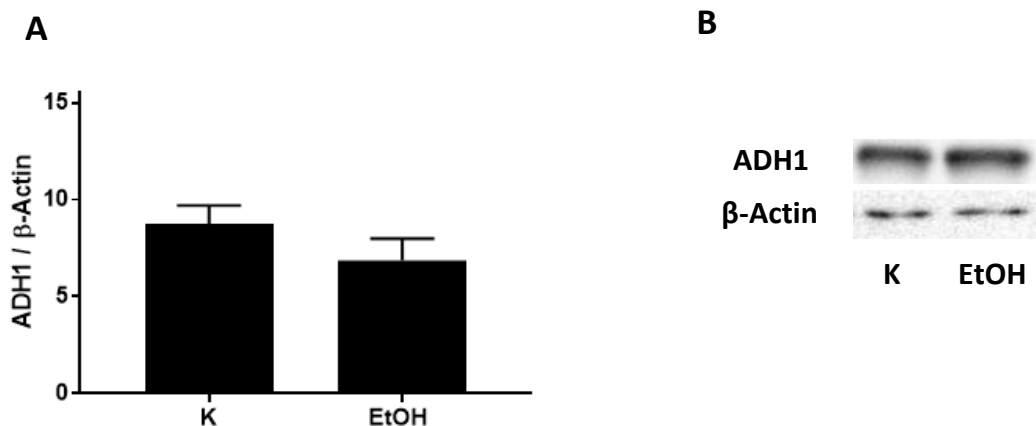


Abbildung 10: Einfluss der Aufnahme einer mit Ethanol angereicherten Lieber DeCarli Flüssigdiät auf die ADH1-Proteinkonzentration in murinem Lebergewebe. (A) Relative ADH1-Proteinkonzentration in Lebergewebe bezogen auf die Proteinkonzentration von β -Actin und, (B) Repräsentativer Western Blot. Ergebnisse sind angegeben als $MW \pm SEM$, $n = 7-8$. K = Kontrolle, EtOH = Ethanol.

Ergebnisse

Die Gesamt-ADH-Aktivität in Lebergewebe, welche auf die Zellzahl bezogen wurde, unterschied sich nicht zwischen der Kontroll- und der Ethanolgruppe (siehe Abbildung 11).

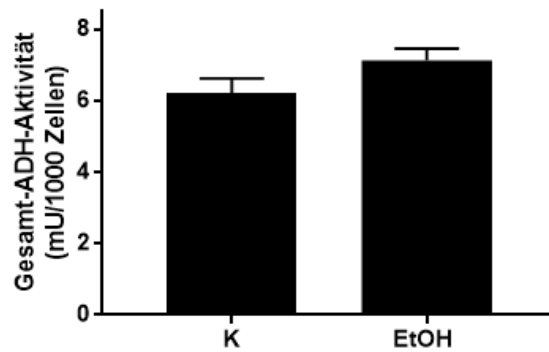


Abbildung 11: ADH-Aktivität in Lebergewebe von Mäusen nach chronischer EtOH-Aufnahme im Vergleich zu Kontrollen. Gesamt-Aktivität der ADH, bezogen auf die Zellzahl in murinem Lebergewebe. Ergebnisse sind angegeben als MW $\pm$ SEM, n = 8. K = Kontrolle, EtOH = Ethanol.

ADH1-Proteinkonzentration und Gesamt-ADH-Aktivität in Plasma von Mäusen

Zur Bestimmung der Gesamt-ADH-Aktivität und der ADH1-Proteinkonzentration im Blut wurde venöses Blut, dass aus der Pfortader der Mäuse entnommen wurde, verwendet.

Die ADH1-Proteinkonzentration unterschied sich nicht zwischen den Gruppen (siehe Abbildung 12).

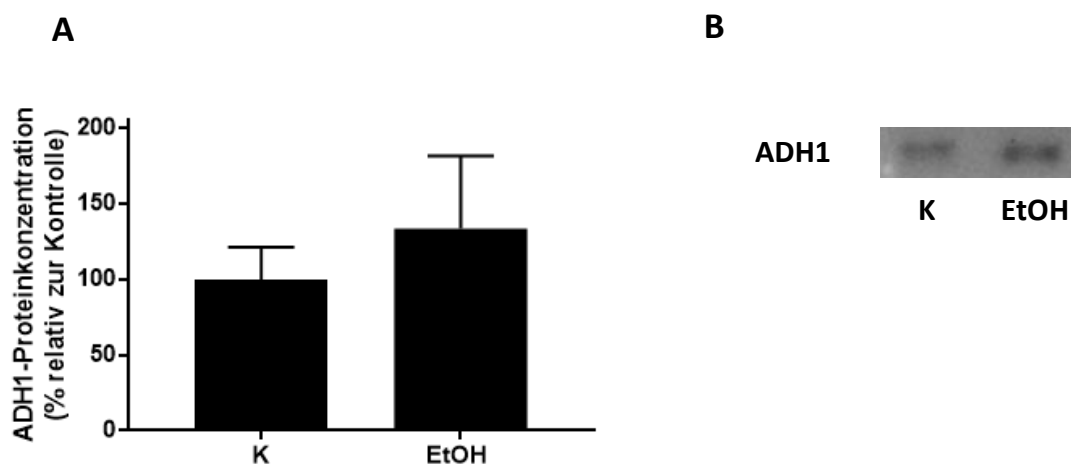


Abbildung 12: Einfluss der Aufnahme einer mit Ethanol angereicherten Lieber DeCarli Flüssigdiät auf die ADH1-Proteinkonzentration im Plasma von Mäusen. (A) Relative ADH1-Proteinkonzentration in Plasma und (B) Repräsentativer Western Blot. Ergebnisse sind angegeben als MW $\pm$ SEM, n = 7-8. K = Kontrolle, EtOH = Ethanol.

Ergebnisse

Auch die ADH-Aktivität, bezogen auf die ADH1-Proteinkonzentration im Plasma unterschied sich nicht zwischen den Gruppen (siehe Abbildung 13).

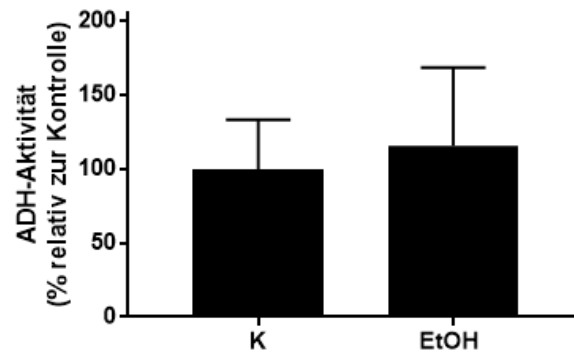


Abbildung 13: ADH-Aktivität im Plasma von Mäusen nach chronischer EtOH-Aufnahme im Vergleich zu Kontrollen. ADH-Aktivität bezogen auf die ADH1-Proteinkonzentration. Ergebnisse sind angegeben als MW $\pm$ SEM, n = 7-8. K = Kontrolle, EtOH = Ethanol.

5.2. Einfluss der chronischen Aufnahme einer mit Ethanol angereicherten Lieber DeCarli Flüssigdiät auf die Aktivität und die Proteinkonzentration von CYP2E1 in der Leber von Mäusen.

Um zu untersuchen, ob die 35-tägige Fütterung der mit Ethanol angereicherten Lieber DeCarli Flüssigdiät einen Einfluss auf die Aktivität und die Proteinkonzentration von CYP2E1 in murinem Lebergewebe hat, wurde die Proteinkonzentration mittels Western Blot und die Aktivität mittels einer spektrophotometrischen Methode untersucht.

Die Untersuchung der Proteinkonzentration von CYP2E1 in der mikrosomalen Fraktion des Leberhomogenats ergab keinen Unterschied zwischen den mit Ethanol gefütterten Tieren und der Kontrollgruppe ($p = 0,99$) (siehe Abbildung 14).

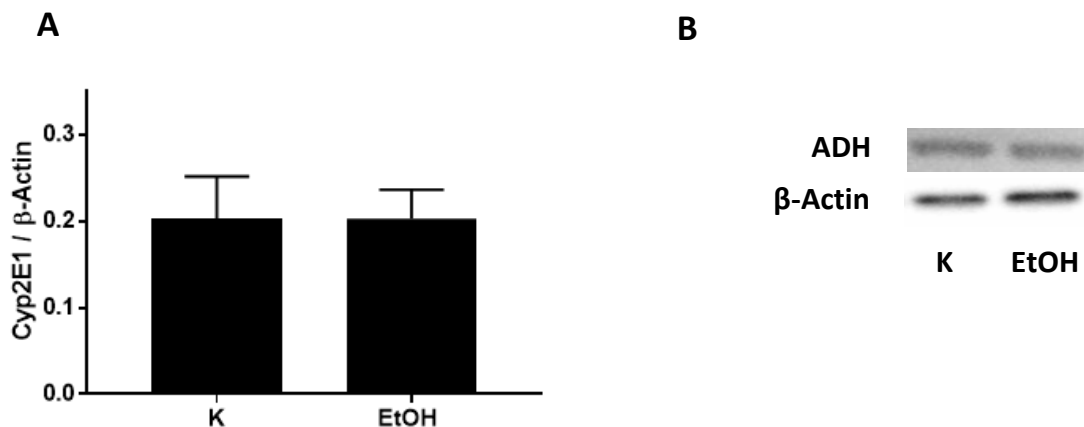


Abbildung 14: CYP2E1-Proteinkonzentration in der mikrosomalen Fraktion von murinem Lebergewebe nach chronischer EtOH-Aufnahme im Vergleich zu Kontrollen. (A) Relative CYP2E1-Proteinkonzentration in Lebergewebe, bezogen auf die Proteinkonzentration von β -Actin und (B) Repräsentativer Western Blot. Ergebnisse sind angegeben als MW $\pm$ SEM, $n = 8$. K = Kontrolle, EtOH = Ethanol.

Die Enzymaktivität von CYP2E1 in der Leber unterschied sich ebenfalls nicht zwischen der Kontroll- und der Ethanolgruppe ($p = 0,54$) (siehe Abbildung 15-A). Auch bei der auf die CYP2E1-Proteinkonzentration bezogene Aktivität konnte kein Unterschied zwischen den mit Ethanol gefütterten Tieren und der Kontrollgruppe festgestellt werden ($p = 0,88$) (siehe Abbildung 15-B).

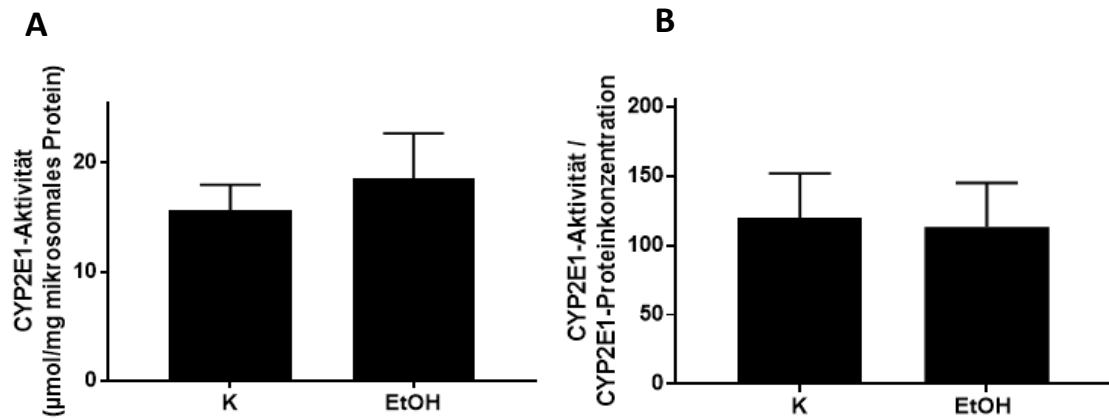


Abbildung 15: CYP2E1-Aktivität in der mikrosomalen Fraktion von murinem Lebergewebe nach chronischer EtOH-Aufnahme im Vergleich zu Kontrollen. (A) Enzymaktivität von CYP2E1 in murinem Lebergewebe, (B) CYP2E1-Enzymaktivität bezogen auf die CYP2E1-Proteinkonzentration. Ergebnisse sind angegeben als MW $\pm$ SEM, n = 8. K = Kontrolle, EtOH = Ethanol.

6. Diskussion

Seit Jahrzehnten stellen alkoholbedingte Leberschäden ein häufiges und ernstzunehmendes Problem für eine steigende Anzahl an Patienten dar [118]. Der chronische Konsum von Alkohol führt zunächst zur Entwicklung einer einfachen, reversiblen Steatose und kann bei bestehendem Alkohol-Missbrauch zur Leberfibrose und -zirrhose bis zum Hepatozellulären Karzinom führen [51]. In den letzten Jahrzehnten konnten eine Vielzahl an molekularen Mechanismen identifiziert werden, die in der Pathogenese der ALD eine Rolle spielen [51]. Zunächst kommt es durch einen gestörten Lipidmetabolismus zur Ablagerung von Fett im Hepatozyten und somit zur Ausbildung einer Steatose. [60]. Darüber hinaus konnten eine erhöhte Darmpermeabilität und die daraus resultierende Endotoxinämie [82], sowie eine Beeinträchtigung des Zinkmetabolismus, die zum einen mit mitochondrialen Dysfunktionen und der verstärkten Expression proinflammatorischer Cytokine assoziiert wird und zum anderen mit einer Verringerung des im Alkoholmetabolismus vorherrschenden Enzyms ADH in Verbindung steht [5],[6] bei Patienten mit ALD festgestellt werden. In frühen Phasen der ALD wurde eine Induktion des proinflammatorischen TGF- β mit einer Verringerung der hepatischen ADH1 und vermehrten Leberschäden assoziiert [33]. Studien der eigenen Arbeitsgruppe wiesen eine Assoziation zwischen Markern einer Insulinresistenz, welche auch Patienten mit ALD betrifft [31], und der Regulation der ADH nach [30]. Genaue Mechanismen der Regulation der ADH und der Beteiligung in der Pathogenese der ALD sind allerdings unzureichend erforscht. Das durch chronischen Alkoholkonsum induzierte Enzym CYP2E1 wurde mit einer vermehrten Freisetzung von ROS und der erhöhten Produktion von Acetaldehyd assoziiert und damit als mitwirkende Komponente in der Pathogenese der ALD charakterisiert [97]. Ausgehend von diesem Hintergrund wurden in der vorliegenden Arbeit die Aktivität und Proteinkonzentration der ADH sowie von CYP2E1 in murinem Lebergewebe untersucht. Eine Gegenüberstellung der ADH im Lebergewebe mit jenen Werten im Plasma soll Rückschlüsse über mögliche Zusammenhänge geben.

6.1. Mausmodell zur Untersuchung molekularer Mechanismen alkoholbedingter Leberschäden

Zur Untersuchung molekularer Mechanismen der ALD werden häufig Tiermodelle verwendet, da speziell die Untersuchungen an menschlichem Lebergewebe oft nicht möglich sind [119]. Darüber hinaus bieten Tiermodelle im Vergleich zu klinischen Studien die Möglichkeit mehrere Proben zu unterschiedlichen Zeitpunkten zu entnehmen, die Durchführung unter standardisierten Bedingungen und die Minimierung äußerer Einflussgrößen [120]. Außerdem kann im Tiermodell ein schnellerer Krankheitsfortschritt erzielt werden [120]. Zur Erforschung von alkoholinduzierten gastrointestinalen Erkrankungen wurden bereits eine Vielzahl an Spezies verwendet [121]. Tierische Primaten stellen den menschlichen Organismus in der Progression zur ALD am ähnlichsten nach, werden jedoch aus kosteneffizienten und ethischen Gründen seltener verwendet [121]. Aufgrund der einfachen und kontrollierbaren Haltungsbedingungen, sowie der genetischen Modifizierbarkeit stellen Maus- und Rattenmodelle die am häufigsten verwendeten Modellorganismen bei ALD dar [119]. Die Ergebnisse von tierexperimentellen Studien müssen in Bezug auf die Übertragbarkeit auf den Menschen immer kritisch beleuchtet werden, da speziell metabolische Beschaffenheiten nicht gänzlich ident zu denen im Menschen sind [122]. Um die Entwicklung einer ALD im Menschen bestmöglich im Tiermodell nachahmen zu können sind Modelle mit oraler Ethanolaufnahme von Interesse [119]. Nagetiere weisen jedoch eine sehr starke natürliche Aversion gegen den Geruch und den Geschmack von Ethanol auf, wodurch nicht genügend große Mengen konsumiert werden, um Leberschäden hervorzurufen [123]. Diesem Problem steuerte die Entwicklung der auch in dieser Arbeit verwendeten Lieber DeCarli Diät entgegen [113]. Die von Charles Lieber und Leonore DeCarli entwickelte ad libitum Flüssigdiät gewährleistet durch den Austausch von Maltodextrin mit Ethanol die Aufnahme von bis zu 36 % der gesamten Kalorienmenge mit Ethanol [123]. Als einzige kalorische Aufnahmequelle wird die natürliche Abneigung der Tiere für Ethanol überwunden und es können durch eine langfristige tägliche Aufnahme Leberschäden, die jenen der anfänglichen ALD im Menschen, nämlich Steatose und leichte hepatische Entzündungen, ähnlich sind reproduziert werden [113]. Mit diesem Modell konnte die Hypothese, dass Ethanol direkt hepatotoxisch wirkt nachgewiesen werden und zahlreiche andere Pathomechanismen der ALD erforscht werden [113]. Es

konnte gezeigt werden, dass die chronische Anwendung einer 4-wöchigen Lieber DeCarli Diät mit der Generierung von ROS, erhöhten Triglyzeridwerten sowie der Infiltration von Immunzellen einhergeht [121]. Die Lieber DeCarli Flüssigdiät bietet im Gegensatz zum Trinkwasser-Modell den Vorteil, dass ein höherer Grad an Leberschäden erreicht werden kann [119]. Im Gegensatz dazu führt das enterale Fütterungsmodell, in dem Ethanol über eine gastrische Sonde zugeführt wird zwar zu schwereren Leberschäden, ist im Vergleich zur Flüssigdiät aber mit höheren Kosten, laboratorischen Mindestanforderungen und höherem Haltungsaufwand verbunden [119]. Die Verwendung von C57BL/6 Mäusen beruht auf der höheren freiwilligen Konsumation von Alkohol, verglichen mit anderen Mäusestämmen [124]. Weibliche C57BL/6 Mäuse weisen im Vergleich zu männlichen Tieren eine höhere Anfälligkeit für alkoholinduzierte Leberschäden auf [125]. In einem enteralen Fütterungsmodell wurde festgestellt, dass die Aufnahme von Ethanol mit einer schnelleren Progression zur Steatose in weiblichen Mäusen verglichen mit männlichen Tieren einhergeht. Zudem wurden bei weiblichen Mäusen höhere Endotoxinwerte im Plasma und eine um 2-2,5-fach höhere Infiltration inflammatorischer Zellen in der Leber festgestellt [125].

Ausgehend von diesem Hintergrund wurde in dieser Arbeit die chronische Ethanolzufuhr mittels Lieber DeCarli Flüssigdiät an weiblichen C57BL/6 Mäusen angewendet.

6.2. Einfluss der chronischen Aufnahme von Alkohol auf die Aktivität und Proteinkonzentration der ADH in der Leber und im Plasma

Die chronische Aufnahme von Ethanol geht weder mit einer Veränderung der ADH1-Proteinkonzentration, noch mit der Veränderung der ADH-Aktivität in murinem Lebergewebe einher.

Das frühe Stadium der ALD ist charakterisiert durch die Verfettung der Leber und tritt bei mehr als 90% der Personen mit chronischem Alkoholmissbrauch ein [51]. Aus epidemiologischen Studien geht hervor, dass bei der Progression der ALD das Hauptenzym im Alkoholstoffwechsel ADH eine Rolle spielt: Figuera und Klotz waren eine der ersten die diesen Zusammenhang untersuchten und dabei eine Verringerung der ADH-Aktivität bei Patienten mit alkohol-bedingter Leberzirrhose feststellten [22]. Die Untersuchungen von Panés et al. an 60 Patienten in unterschiedlichen ALD-Stadien zeigten ähnliche Ergebnisse [19]. Abhängig vom Schweregrad der ALD wurde eine

Verringerung der ADH-Aktivität dokumentiert, wobei bereits bei leichter Steatose eine reduzierte ADH-Aktivität gezeigt werden konnte, der Abfall jedoch bei zirrhotischen Patienten am stärksten war [19]. Zudem konnte eine stärkere Reduktion bei zirrhotischen ALD-Patienten im Vergleich zu Patienten mit nicht-alkoholischer Fettleber verzeichnet werden [19]. Die Autoren dieser Studie kamen zu dem Schluss, dass die Verringerung der ADH-Aktivität auf eine Schädigung der zentrilobulären Region, in welcher ADH vorwiegend freigesetzt wird und welche speziell bei ALD betroffen ist, zurückzuführen ist [19]. Ergebnisse der Arbeitsgruppe von Vidal et al. untermauern diese Ergebnisse [20]. Es wird angenommen, dass die hepatische ADH-Aktivität nicht durch den Konsum von Alkohol modifiziert wird, sondern eine Konsequenz der durch Alkohol entstehenden Leberschäden ist [20]. Eine weitere Humanstudie konnte diese Hypothese mit einer um 50 %-verringerten ADH-Aktivität bei ALD Patienten bestätigen [21]. Ergebnisse von *in vivo* und *in vitro* Studien hingegen scheinen keine klaren Schlussfolgerungen ziehen zu können: Wohingegen in einem 6-wöchigen intragastrischen Modell zur chronischen Alkoholfuhr eine signifikante Verringerung der ADH verzeichnet wurde [33], wiesen andere Studien den genau gegenteiligen Effekt, nämlich eine Induktion der ADH nach chronischer Fütterung mit Ethanol in Ratten nach [23],[24]. Lediglich eine Studie kam zu ähnlichen Ergebnissen wie die in dieser Arbeit erhobenen Resultate. In der Studie von Tobon und Mezey konnten bei einer 2-wöchigen Fütterung mit Ethanol ebenfalls keine Änderungen der ADH in der Leber festgestellt werden [25]. Die direkte Vergleichbarkeit der Studien und die daraus resultierenden Ergebnisse stellen aufgrund der heterogenen Studiendesigns ein Problem dar. Dabei scheint die Aufnahmeform sowie die Aufnahmemenge des Alkohols eine wichtige Rolle zu spielen [126]. Während in der vorliegenden Arbeit eine Ethanolgabe von bis zu max. 3,3 % wt/wt gegeben wurde, wurden in anderen Studien weitausgrößere Mengen, nämlich bis zu 5 % der Flüssigdiät an EtOH verabreicht [127]. Der Grad der Leberschädigung scheint entscheidend für die Verringerung der ADH-Aktivität zu sein [20]. Da in dieser Arbeit der Schweregrad der Leberschädigung nicht über die Akkumulation von Fett und der leichten Infiltration der Leber mit neutrophilen Granulozyten hinausreichte (nicht publizierte Daten) könnte eine geringe Schädigung der Leber eine mögliche Erklärung für die gleichbleibende ADH-Aktivität und ADH1-Proteinkonzentration sein. Ciucan et al. konnten den Nachweis erbringen, dass eine Ethanol-induzierte Hochregulierung von TGF- β zur

Herunterregulierung der ADH im ALD-Mausmodell führt [33]. In der genannten Studie wurde im Gegensatz zu der in dieser Arbeit angewendeten oralen Flüssigdiät ein intragastrisches EtOH-Modell verwendet. Mit einem solchen Modell können auch fortgeschrittene Stadien der ALD, wie zum Beispiel Nekrosen und Fibrosen, erreicht werden [126]. Wiederum könnte ein weniger ausgeprägter Leberschaden mitverantwortlich dafür sein, dass die ADH-Aktivität und -Proteinkonzentration im Lebergewebe in dieser Arbeit auf dem Niveau der Kontrollen blieb. In den bereits erwähnten Studien wurden im Gegensatz zu der hier vorliegenden Arbeit männliche Mäuse bzw. Ratten verwendet [7],[23]–[25]. Da sich die Metabolisierung von Ethanol geschlechtsspezifisch unterscheidet, lassen sich die Ergebnisse dieser Studien mit jenen in der vorliegenden Arbeit nur schwer vergleichen [128]. Weitere Studien sollen Rückschlüsse geben ob sich die gegenteiligen Ergebnisse dieser Arbeit aufgrund des Geschlechts ergeben haben. Da Zink essentiell für die Aktivität der ADH ist, könnte ein Ethanol-induzierter Zinkmangel als Ursache für eine Verringerung der ADH-Aktivität bei ALD angenommen werden [27]. Nicht nur eine zu geringe Aufnahme an Zink, sondern auch der direkt durch Ethanol veränderte Zinktransport führen zu einer Verringerung der ADH in der Leber. Es besteht die Annahme, dass auch hier die geringere Ethanolmenge im Vergleich zu anderen Studien verantwortlich für die gleichbleibende ADH-Aktivität ist. Shun et al. konnten bei einer Gabe von 28 % EtOH der gesamten Energiezufuhr über max. 8 Wochen eine Veränderung des Zinkmetabolismus feststellen, der mit einer Verringerung des Zinkspiegels in der Leber einherging [75], wohingegen der kalorische Anteil an Ethanol in der vorliegenden Arbeit max. 23,3 % betrug. Werden durch eine zu geringe Menge an Ethanol die Zinktransporter nicht modifiziert, besteht die Annahme, dass es zu keiner Manifestation eines Zinkmangels kommt und so das Enzym ADH mittels seinem Cofaktor Zink adäquat funktionieren könnte und dies ein möglicher Grund für die stagnierenden ADH-Spiegel in der Leber bei EtOH-gefütterten Tieren sein könnte. Die Regulation der hepatischen ADH könnte außerdem über Insulinsignalwege gesteuert werden [30]. Studien der eigenen Arbeitsgruppen fanden eine Assoziation zwischen charakteristischen Markern einer Insulinresistenz, nämlich eine verringerte Expression des Insulinrezeptors und dem *Insulin receptor substrate* sowie erhöhten TNF α -Spiegeln, und der Verringerung der hepatischen ADH-Aktivität in ob/ob Mäusen mit NAFLD [30]. Da Insulinresistenz nicht nur bei Patienten mit nicht-alkoholischer Fettleber, sondern

auch bei Alkoholikern und Patienten und Patientinnen mit ALD eine Rolle spielt und die Pathogenese der ALD ähnlich jener der NAFLD ist, könnte eine gestörte Insulinsignalkaskade zur Regulierung der ADH auch bei ALD beitragen [31]. Da in diesem Zusammenhang keine Daten erhoben wurden, sollten weitere Forschungen zu diesem Thema angestrebt werden.

Genaue Mechanismen zur Regulierung der ADH bei ALD sind nicht bekannt, doch scheint diese ein komplexes Zusammenspiel einer Vielzahl von Faktoren zu sein [33]. Die bisherige Literatur spricht für eine Verringerung der hepatischen ADH, wobei diese Effekte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden können. Weitere Studien sind notwendig, um klare Schlüsse zur Regulation und den molekularen Mechanismen der ADH bei ALD ziehen zu können.

Die chronische Aufnahme von Alkohol führt zu keiner Veränderung der ADH-Aktivität und ADH1-Proteinkonzentration im Plasma.

Aus früheren Studien geht hervor, dass das im Alkoholstoffwechsel wichtigste Enzym ADH bei vorliegenden Leberschäden beeinträchtigt ist. Diese Ergebnisse konnten vor allem in Humanstudien mit fortgeschrittenen Stadien der ALD gezeigt werden [20],[21]. Neueste Studien zeigen, dass bei anderen Erkrankungen, wie zum Beispiel Tumorerkrankungen aber auch Lebertransplantationen die Messung der ADH im Blut als ein diagnostischer Marker verwendet werden könnte [27],[28]. Bei Lebertransplantationen könnte die Messung der ADH im Serum die Funktion, aber auch eine eventuelle Schädigung der transplantierten Leber widerspiegeln [130]. Ergebnisse einer erst vor kurzem publizierten Studie zeigen, dass die ADH-Aktivität im Blut als ein möglicher Parameter der Krebsdiagnostik verwendet werden könnte [129]. Ausgehend von diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit die ADH-Aktivität in murinem Plasma gemessen. Eine Gegenüberstellung der Plasma ADH-Aktivität mit der ADH-Aktivität in der Leber sollte Rückschlüsse geben, ob die Werte im Plasma indikativ als Marker für Leberschäden sind. In der vorliegenden Arbeit konnte kein Unterschied der ADH-Aktivität im Plasma bei Mäusen mit alkoholbedingter Steatose verglichen mit Kontrollen gemessen werden. Im Gegensatz dazu konnten Mezey et al. eine erhöhte ADH-Aktivität im Serum bei Patienten mit Leberkrankung, verglichen mit gesunden Personen feststellen [131]. Mezey et al. konnten eine Assoziation zwischen der Serum ADH-Aktivität und hepatozellulären

Nekrosen zeigen und die ADH-Aktivität als reflektierende Komponente für Leberschäden schlussfolgern [131]. Bei Patienten mit Hepatitis C wurde ebenfalls eine signifikant erhöhte ADH-Aktivität der Isoenzyme ADH I und II im Serum nachgewiesen [132]. Die Autoren schließen daraus, dass die Erhöhung der ADH-Aktivität im Serum aus der Freisetzung der ADH von beschädigten Leberzellen resultiert [132]. In der Studie von Meier-Tackmann et al. wurde eine signifikante Steigerung der ADH-Aktivität im Plasma nur zusammen mit erhöhten GPT und γ -GT-Werten nachgewiesen, was auf generelle Leberschäden hinweisen könnte [133]. Kontrovers dazu konnte in einer Untersuchung der eigenen Arbeitsgruppe eine signifikant verringerte ADH-Aktivität im Plasma bei Patienten mit ALD nachgewiesen werden (nicht publizierte Daten). Im Gegensatz zu den bisher genannten Studien wurde die Gesamt-ADH-Aktivität hierbei jedoch auf die Proteinkonzentration, die mittels Western Blot bestimmt wurde, bezogen. Wird die ADH-Aktivität auf eine gesteigerte Proteinkonzentration bezogen, so ergibt sich im Vergleich zur unbezogenen ADH-Aktivität eine Verringerung der bezogenen Aktivität. Eine Verringerung der ADH-Aktivität, bezogen auf die Plasma-Proteinkonzentration, könnte demnach ein Indiz für alkoholinduzierte Leberschäden sein. In dieser Arbeit konnte eine solche Hypothese allerdings nicht bestätigt werden, da weder die ADH1-Proteinkonzentration noch die Gesamt-ADH-Aktivität in murinem Plasma eine Veränderung im Vergleich zu Kontrollen zeigte. Somit kann aus den hier vorgestellten Ergebnissen kein Rückschluss über einen möglichen Zusammenhang zwischen der ADH-Aktivität im Plasma und den durch Alkohol-induzierten Leberschäden gezogen werden. Weitere Studien werden benötigt um genauere Schlüsse über die ADH-Aktivität und Proteinkonzentration im Plasma bei ALD ziehen zu können.

6.3. Einfluss der chronischen Aufnahme von Alkohol auf die Aktivität und Proteinkonzentration von Cytochrom P450 2E1 in der Leber

Die chronische Fütterung von Ethanol geht mit keiner Veränderung der CYP2E1-Aktivität und Proteinkonzentration in murinem Lebergewebe einher.

Unter physiologischen Bedingungen spielt CYP2E1 nur eine untergeordnete Rolle bei der Verstoffwechselung von Ethanol in der Leber [36]. Aus Studien am Menschen und auch im Tiermodell geht hervor, dass der chronische Konsum von Alkohol und die daraus resultierenden Leberschäden mit einer Induktion von CYP2E1 einhergehen [34],[37],

[134],[135]. Darüber hinaus scheint CYP2E1 eine funktionelle Rolle in der Pathogenese der ALD durch die vermehrte Produktion von Acetaldehyd und der Freisetzung von ROS zu haben [98]. In der Studie von Morimoto et al. wurde eine 10-fache Steigerung von CYP2E1 bei Mäusen, die mittels einer intragastrischen Sonde für 72 Tage Ethanol verabreicht bekamen, festgestellt [134]. Auch in der Studie von Nanji et al. wurde ein ähnliches Ergebnis gezeigt, nämlich dass eine 4-wöchige Gabe von Ethanol über eine gastrische Sonde zu einer Induktion von CYP2E1 führt [34]. Auch andere Arbeitsgruppen konnten diese Ergebnisse bestätigen [135]. In den genannten Arbeiten wurde zusätzlich untersucht, ob die Art einer fettreichen Diät zusammen mit der Gabe von Ethanol Einfluss auf den Schweregrad der Leberschäden hat [34],[134],[135]. Dabei wurden schwerere Leberschäden in Mäusen mit Ethanol- und Fischölgabe im Vergleich zu Mäusen, die Ethanol zusammen mit Maisöl verabreicht bekamen festgestellt. Diese verstärkten Leberschäden wurden mit einer höheren Induktion von CYP2E1 und der vermehrten Lipidperoxidation, durch den höheren Gehalt an ungesättigten Fettsäuren in Fischöl, assoziiert [34]. Die Studie von Lu et al. aus dem Jahr 2008 untersuchte die Rolle von CYP2E1 bei ALD in einem oralen Fütterungsmodell [112]. CYP2E1-Knockoutmäuse und Wildtypmäuse wurden dazu für zwei bis vier Wochen mit einer Ethanol-haltigen Lieber DeCarli Flüssigdiät oder einer isokalorischen Kontrolldiät gefüttert [112]. Wildtypmäuse entwickelten nach dieser Fütterungsperiode eine Fettleber, wohingegen bei CYP2E1-defizienten Mäusen keine Steatose festgestellt wurde. Die Gabe von CYP2E1 bei Knockoutmäusen führte im weiteren Verlauf auch in solchen Mäusen zur Entwicklung einer Steatose [112]. Obwohl in der hier vorgestellten Arbeit durch eine 4-wöchige Gabe von Ethanol sowohl eine Fettleber als auch die Infiltration von Immunzellen in die Leber dokumentiert wurde (nicht veröffentlichte Daten), konnte keine Induktion von CYP2E1 festgestellt werden. Die direkte Vergleichbarkeit der Studien stellt sich auch hier als sehr schwierig heraus, da sich die Studiendesigns stark voneinander unterscheiden. In der Studie von Morimoto et al. als auch von Nanji et al. erfolgte die Ethanolzufuhr über eine gastrische Sonde [134],[135]. Diese Art der Ethanolzufuhr stellt ein gängiges und gutes Modell dar, um die Effekte durch chronische hohe Mengen an Alkohol zu untersuchen [126], unterscheidet sich jedoch von dem in der vorliegenden Arbeit angewandten Modell. Zudem wurden weitaus höhere Anteile an Alkohol über die Flüssigdiät verabreicht. Im Gegensatz zu den in dieser Arbeit verabreichten 23,3 % Ethanol wurden

in den anderen beiden Studien bis zu 36% Ethanol der Gesamtenergie gegeben [37],[40]. Die geringere Ethanolkonzentration könnte ein möglicher Grund dafür sein, weshalb es in dieser Arbeit zu keiner Induktion von CYP2E1 kam. Auch hier stellt sich die Frage, ob das Geschlecht der Tiere Einfluss auf die Enzymaktivität nimmt. In den vorgestellten *in vivo* Studien, die eine Induktion von CYP2E1 festgestellt haben wurden männliche Wistar-Ratten verwendet. Wie bereits diskutiert gibt es geschlechtsspezifische Unterschiede in der Metabolisierung von Ethanol [128], welche beeinflussende Faktoren für die in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse sein könnten. Zukünftige Studien sollen Einblicke geben, in welchem Stadium der ALD eine Modifikation von CYP2E1 eintritt und ob eine Abhängigkeit der Regulation zur Ethanolkonzentration und dem Geschlecht besteht. Die in dieser Arbeit erhaltenen Daten lassen keinen Rückschluss über die Regulation von CYP2E1 im chronischen Fütterungsmodell mit geringer Alkoholkonzentration und anfänglicher ALD zu.

7. Fazit und Ausblick

Die chronische Fütterung einer mit Ethanol-angereicherten Lieber DeCarli Flüssigdiät ging in der vorliegenden Arbeit weder mit einer Veränderung der ADH-Aktivität, noch mit einer Veränderung der ADH1-Proteinkonzentration in der Leber und im Blut, verglichen mit Kontrolltieren einher. Untersuchungen der CYP2E1-Aktivität und -Proteinkonzentration im Lebergewebe zeigen ebenfalls keinen Unterschied zwischen der EtOH- und der Kontrollgruppe.

Basierend auf den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen scheint es jedoch zumindest bei der CYP2E1 Aktivität und Proteinkonzentration bei höheren Ethanolkonzentrationen zu einer Induktion zu kommen. Die zu geringe Gabe von Ethanol und die daraus resultierenden leichten Leberschäden scheinen mögliche Gründe für die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse zu sein. Um ein besseres Verständnis für die Regulation der alkoholmetabolisierenden Enzyme in der Leber sowie auch im Plasma bei ALD zu erlangen wäre es erstrebenswert weitere Versuche in diesem Kontext durchzuführen. Dabei sollte vor allem die Gabe höherer Konzentrationen von Ethanol im Tiermodell erfolgen, um prüfen zu können, ob bei höherer Dosierung eine Modifikation der Enzyme in der Leber als auch im Plasma auftreten. Zudem sollen weiterführende Studien der Frage nachgehen, ob das Geschlecht einen Einfluss auf die Enzym-Aktivitäten und -Proteinkonzentrationen hat. Speziell die Regulation und molekularen Mechanismen der ADH sind noch weitgehend unbekannt, weswegen auch hier noch weitere Studien benötigt werden.

8. Zusammenfassung

Der chronische Konsum von Alkohol führt bei mehr als 90 % der Betroffenen zu Leberschäden und stellt nach wie vor ein Problem in unserer Gesellschaft dar. Das Spektrum der Alkoholischen Lebererkrankung reicht von einer einfachen Steatose, über Fibrose bis hin zur Zirrhose und letztlich zum Hepatozellulären Karzinom. Alkoholdehydrogenase (ADH) und Cytochrom P450 2E1 (CYP2E1) sind die hauptmetabolisierenden Enzyme für Ethanol in der Leber. Vorangehende Studien zeigen eine verringerte Aktivität der hepatischen ADH bei Alkoholikern mit alkoholischer Lebererkrankung. Dabei wird die Verringerung der ADH-Aktivität mit dem Schweregrad der Leberschäden in Verbindung gebracht. Zudem wird angenommen, dass eine alkoholbedingte Induktion von Cyp2E1 mit einer vermehrten Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies einhergeht und damit zur Pathogenese der alkoholbedingten Lebererkrankung beiträgt. Genaue Mechanismen, die diesen Modifikationen zugrunde liegen sind jedoch noch nicht geklärt. Eine Studie der eigenen Arbeitsgruppe konnte zudem eine Verringerung der ADH im Plasma von Patienten mit alkoholischer Lebererkrankung im Vergleich zu gesunden Kontrollen feststellen. Bisher liegen keine Daten vor, ob der chronische Alkoholkonsum zu Veränderungen der ADH-Aktivität im Plasma und Lebergewebe sowie zu Veränderungen der CYP2E1-Aktivität in der Leber von Mäusen führt. Ausgehend von diesem Hintergrund, war es das Ziel dieser Arbeit die Aktivität und Proteinkonzentration der beiden Enzyme in murinem Lebergewebe zu untersuchen. Eine Gegenüberstellung der ADH im Lebergewebe mit jenen Werten im Plasma soll Rückschlüsse über mögliche Zusammenhänge geben und zeigen, ob die ADH-Aktivität im Plasma als Indikator für Leberschäden dienen könnte. Die Messungen der Enzymaktivitäten wurden mittels spektrophotometrischen Assays durchgeführt, wohingegen die Proteinkonzentrationen mittels Western Blot bestimmt wurden. Weder die ADH-Aktivität noch die ADH1-Proteinkonzentration in der Leber und im Plasma unterschieden sich bei Ethanol-gefütterten Tieren verglichen mit Kontrollen. Auch die CYP2E1-Aktivität und -Proteinkonzentration in der Leber der mit Ethanol gefütterten Tiere blieben auf dem Niveau der Kontrollen. Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit können keine Rückschlüsse auf die Regulation der im Alkoholstoffwechsel vorrangigen Enzyme und die ADH-Aktivität im Plasma als möglicher Indikator für Leberschäden bei chronischer Gabe von Ethanol im Mausmodell gezogen werden.

Zusammenfassung

Weiterführende Studien müssen klären, ob sich die von anderen Untersuchungen unterscheidenden Ergebnisse aus der Alkoholdosis, dem Geschlecht oder anderen Mechanismen ergeben haben.

9. Summary

Chronic consumption of alcohol leads to liver disease in more than 90 % of those affected and represents a major health problem in our society. The broad spectrum of alcoholic liver disease ranges from alcoholic fatty liver (steatosis) to more severe forms including fibrosis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Alcoholdehydrogenase (ADH) and Cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) are the major metabolizing enzymes for ethanol in the liver. Results of previous studies show a decreased activity of hepatic ADH in alcoholics with alcoholic liver disease. This reduction is associated with the severity of liver damage. In addition, it is believed that an alcohol-induced induction of CYP2E1 is associated with increased production of reactive oxygen species, thereby contributing to the pathogenesis of alcoholic liver disease. However, the regulation and molecular mechanisms underlying these modifications are not yet clear. In addition, a study of this workgroup could detect a reduction of ADH in plasma of patients with alcoholic liver disease compared to healthy controls. So far, there are no data available on whether chronic alcohol consumption leads to changes in ADH activity in liver tissue and plasma or to changes in CYP2E1 activity in mice. Based on this background, the aim of this work was to measure ADH activity and ADH1 protein concentration in murine liver tissue and plasma as well as of CYP2E1 in the liver of mice. Comparing ADH in liver tissue with that in plasma should reveal possible coherences and should also show whether ADH in plasma serves as a possible indicator for alcohol-induced liver damage. ADH and CYP2E1 activity were analyzed by using spectrophotometric assays, whereas proteinconcentration was analyzed via Western Blot. Both ADH activity and ADH1 proteinconcentration in liver and plasma did not differ between ethanol-fed animals and controls. Also, there was no difference of CYP2E1 activity and protein concentration in livers of animals fed with ethanol compared to controls. From the results of the presents study there is inconclusive information on the regulation of the predominant enzymes in alcohol metabolism and ADH-activity in plasma as an indicator for liver damage to draw reliable conclusions. Nevertheless, the results of the present study suggest that ADH activity can be determined in plasma of animals fed ethanol and that alcohol dose may be critical for the modulation of ADH and CYP2E1 activity in liver tissue. However, future studies will have to address this in more detail.

Literaturverzeichnis

- [1] David J. Hanson, "Historical evolution of alcohol consumption in society," *Oxford Scholarsh. Online*, 2013.
- [2] Bundesministerium für Gesundheit und Frauen, *Alkoholkonsum und mögliche Folgen*, 1st ed. Wien, 2017.
- [3] World Health Organisation, "Global status report on alcohol and health 2014," *Glob. status Rep. alcohol*, pp. 1–392, 2014.
- [4] K. D. Shield, M. Rylett, and J. Rehm, "Public health successes and missed opportunities: Trends in alcohol consumption and attributable mortality in the WHO European Region, 1990-2014," pp. 1–75, 2016.
- [5] C. DiPadova, T. M. Worner, R. J. K. Julkunen, and C. S. Lieber, "Effects of Fasting and Chronic Alcohol Consumption on the First-Pass Metabolism of Ethanol," *Gastroenterology*, vol. 92, no. 5, pp. 1169–1173, 1987.
- [6] Å. Norberg, a W. Jones, R. G. Hahn, and J. L. Gabrielsson, "Role of Variability in Explaining Ethanol Pharmacokinetics Research and Forensic Applications," *Blutalkohol*, vol. 42, no. 1, pp. 1–31, 2003.
- [7] E. Baraona *et al.*, "Gender Differences in Pharmacokinetics of Alcohol," *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, vol. 25, no. 4, pp. 502–507, 2001.
- [8] H. K. Seitz *et al.*, "Human gastric alcohol dehydrogenase activity: effect of age, sex, and alcoholism," *Gut*, vol. 34, no. 10, pp. 1433–7, 1993.
- [9] C. S. Lieber, "Ethanol metabolism, cirrhosis and alcoholism," *Clin. Chim. Acta*, vol. 257, no. 1, pp. 59–84, 1997.
- [10] R. Teschke, Y. Hasumura, and C. S. Lieber, "Hepatic ethanol metabolism: Respective roles of alcohol dehydrogenase, the microsomal ethanol-oxidizing system, and catalase," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 175, no. 2, pp. 635–643, 1976.
- [11] S. Zakhari, "Overview: how is alcohol metabolized by the body?," *Alcohol Res. Health*, vol. 29, no. 4, pp. 245–254, 2006.
- [12] A. I. Cederbaum, "Alcohol Metabolism," *Clin Liver Dis*, vol. 16, no. 4, pp. 667–685, 2013.
- [13] W. Jelski and M. Szmitkowski, "Alcohol dehydrogenase (ADH) and aldehyde dehydrogenase (ALDH) in the cancer diseases," *Clin. Chim. Acta*, vol. 395, no. 1–2, pp. 1–5, 2008.
- [14] H. Riveros-Rosas, A. Julian-Sanchez, and E. Pinã, "Enzymology of ethanol and acetaldehyde metabolism in mammals," *Arch. Med. Res.*, vol. 28, no. October, pp. 453–471, 1997.
- [15] T. Haseba, G. Duester, A. Shimizu, I. Yamamoto, K. Kameyama, and Y. Ohno, "In vivo contribution of Class III alcohol dehydrogenase (ADH3) to alcohol metabolism through activation by cytoplasmic solution hydrophobicity," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.*, vol. 1762, no. 3, pp. 276–283, 2006.
- [16] S. J. Yin, C. F. Chou, C. L. Lai, S. L. Lee, and C. L. Han, "Human class IV alcohol dehydrogenase: Kinetic mechanism, functional roles and medical relevance," *Chem. Biol. Interact.*, vol. 143, no. 144, pp. 219–227, 2003.
- [17] D. W. Crabb, M. Matsumoto, D. Chang, and M. You, "Overview of the role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase and their variants in the genesis of alcohol-

Literaturverzeichnis

- related pathology," *Proc. Nutr. Soc.*, vol. 63, no. 1, pp. 49–63, 2004.
- [18] H. J. Edenberg, "The genetics of alcohol metabolism: role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase variants," *Alcohol Res. Health*, vol. 30, no. 1, pp. 5–13, 2007.
 - [19] J. Panés *et al.*, "Influence of liver disease on hepatic alcohol and aldehyde dehydrogenases," *Gastroenterology*, vol. 97, no. 3, pp. 708–714, 1989.
 - [20] F. Vidal, J. Perez, J. Morancho, B. Pinto, and C. Richart, "Hepatic alcohol dehydrogenase activity in alcoholic subjects with and without liver disease," *Gut*, vol. 31, no. 6, pp. 707–11, 1990.
 - [21] D. J., K. N., and G. A., "Ethanol oxidizing enzyme activities in liver disease," *Br. J. Clin. Pharmacol.*, vol. 3, no. 3, pp. 461–467, 1976.
 - [22] R. Figueroa and A. Klotz, "Alterations of alcohol dehydrogenase and other hepatic enzymes following oral alcohol intoxication," *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 11, pp. 235–239, 1962.
 - [23] L. Buris, G. Csabai, M. Fodor, and M. Varga, "Increase of alcohol dehydrogenase and protein content of liver following chronic ethanol administration," *FEBS Lett.*, vol. 183, no. 1, pp. 143–144, 1985.
 - [24] G. X. Wang, B. Y. Wang, and C. R. Liu, "The relationship between activities of hepatic and gastric alcohol dehydrogenase and occurrence of chronic alcoholic liver disease," *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.*, vol. 1, no. 3, pp. 406–410, 2002.
 - [25] F. Tobon and E. Mezey, "Effect of ethanol administration on hepatic ethanol and drug-metabolizing enzymes and on rates of ethanol degradation," *J. Lab. Clin. Med.*, vol. 77, no. 1, pp. 110–121, 1971.
 - [26] S. Mistilis and A. Garske, "INDUCTION OF ALCOHOL DEHYDROGENASE IN LIVER AND GASTRO-INTESTINAL TRACT," *Intest. Med. J.*, vol. 18, no. 3, pp. 227–231, 1969.
 - [27] Y. Kawashima *et al.*, "Dietary Zinc Deficiency and its recovery responses in rat liver cytosolic alcohol dehydrogenase activity," *J. Toxicol. Sci.*, vol. 36, no. 1, pp. 101–108, 2011.
 - [28] Y. Indo, N. Nagata, H. Akimasa, I. Matsuda, N. Kashiwabara, and N. Ichiro, "Effects of Dietary Zinc Deficiency on Hepatic Ornithin Carbamoyltransferase and Alcohol Dehydrogenase Activity in Rats," *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, vol. 4, pp. 268–273, 1985.
 - [29] C. J. McClain and L. -C Su, "Zinc Deficiency in the Alcoholic: A Review," *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, vol. 7, no. 1, pp. 5–10, 1983.
 - [30] A. J. Engstler *et al.*, "Insulin resistance alters hepatic ethanol metabolism: Studies in mice and children with non-alcoholic fatty liver disease," *Gut*, vol. 65, no. 9, pp. 1564–1571, 2016.
 - [31] R. M. Carr and J. Correnti, "Insulin resistance in clinical and experimental alcoholic liver disease," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1353, no. 1, pp. 1–20, 2015.
 - [32] N. Toshikuni, M. Tsutsumi, and T. Arisawa, "Clinical differences between alcoholic liver disease and nonalcoholic fatty liver disease," *World J. Gastroenterol.*, vol. 20, no. 26, pp. 8393–8406, 2014.
 - [33] L. Ciuculan *et al.*, "TGF- β enhances alcohol dependent hepatocyte damage via down-regulation of alcohol dehydrogenase I," *J. Hepatol.*, vol. 52, no. 3, pp. 407–416, 2010.
 - [34] A. A. Nanji, S. Zhao, S. M. H. Sadrzadeh, A. J. Dannenberg, S. R. Tahan, and D. J. Waxman, "Markedly Enhanced Cytochrome P450 2E1 Induction and Lipid Peroxidation Is Associated

Literaturverzeichnis

- with Severe Liver Injury in Fish Oil—Ethanol-Fed Rats,” *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, vol. 18, no. 5, pp. 1280–1285, 1994.
- [35] T.-M. Leung and N. Nieto, “CYP2E1 and oxidant stress in alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease,” *J. Hepatol.*, vol. 58, no. 2, pp. 395–398, 2013.
- [36] Y. Lu and A. I. Cederbaum, “CYP2E1 and oxidative liver injury by alcohol,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 44, no. 5, pp. 723–738, 2008.
- [37] O. Niemelä, S. Parkkila, R. O. Juvonen, K. Viitala, H. V. Gelboin, and M. Pasanen, “Cytochromes P450 2A6, 2E1, and 3A and production of protein-aldehyde adducts in the liver of patients with alcoholic and non-alcoholic liver diseases,” *J. Hepatol.*, vol. 33, no. 6, pp. 893–901, 2000.
- [38] H. A. Järveläinen, C. Fang, M. Ingelman-Sundberg, T. A. Lukkari, H. Sippel, and K. O. Lindros, “Kupffer cell inactivation alleviates ethanol-induced steatosis and CYP2E1 induction but not inflammatory responses in rat liver,” *J. Hepatol.*, vol. 32, no. 6, pp. 900–910, 2000.
- [39] B. J. Roberts, B. J. Song, Y. Soh, S. S. Park, and S. E. Shoaf, “Ethanol induces CYP2E1 by protein stabilization: Role of ubiquitin conjugation in the rapid degradation of CYP2E1,” *J. Biol. Chem.*, vol. 270, no. 50, pp. 29632–29635, 1995.
- [40] L. N. Bell *et al.*, “Bariatric surgery-induced weight loss reduces hepatic lipid peroxidation levels and affects hepatic cytochrome P-450 protein content,” *Ann. Surg.*, vol. 251, no. 6, pp. 1041–1048, 2010.
- [41] M. A. Korsten, S. Matsuzaki, L. Feinman, and C. S. Lieber, “High Blood Acetaldehyde Levels after Ethanol Administration Difference between Alcoholic and Nonalcoholic Subjects,” *N Engl J Med*, vol. 292, no. 8, pp. 386–389, 1975.
- [42] K. R. Palmer and W. J. Jenkinst, “Impaired acetaldehyde oxidation in alcoholics*,” *Gut*, vol. 23, pp. 729–733, 1982.
- [43] C.-H. Bley, M. Centgraf, A. Cieslik, J. Hack, and T. Hell, *I care Krankheitslehre*, 2nd ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2015.
- [44] L. Vonghia, L. Leggio, A. Ferrulli, M. Bertini, G. Gasbarrini, and G. Addolorato, “Acute alcohol intoxication,” *Eur. J. Intern. Med.*, vol. 19, no. 8, pp. 561–567, 2008.
- [45] P. Anderson, L. Møller, and G. Galea, “Alcohol in the European Union,” 2012.
- [46] P. Anderson and B. Baumberg, *Alcohol in Europe – Public Health Perspective*, vol. 13, no. 6. 2006.
- [47] J. Rehm, D. Baliunas, and G. Borges, “The relation between different dimensions of alcohol consumption and burden of disease: An Overview,” *Addiction*, vol. 105, no. 5, pp. 817–843, 2010.
- [48] R. Baan *et al.*, “Carcinogenicity of alcoholic beverages,” *Lancet Oncol.*, vol. 8, no. 4, pp. 292–293, 2007.
- [49] R. Bruha, K. Dvorak, and J. Petrtyl, “Alcoholic liver disease,” vol. 4, no. 3, p. 85, 2012.
- [50] R. E. Mann, R. G. Smart, and R. Govoni, “The epidemiology of alcoholic liver disease,” *Alcohol Res. Heal.*, vol. 27, no. 3, pp. 209–219, 2003.
- [51] B. Gao and R. Bataller, “Alcoholic liver disease: Pathogenesis and new therapeutic targets,” *Gastroenterology*, vol. 141, no. 5, pp. 1572–1585, 2011.
- [52] F. Stickel and H. K. Seitz, “Alcoholic steatohepatitis,” *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*,

- vol. 24, no. 5, pp. 683–693, 2010.
- [53] W. C. Zhou, Q. B. Zhang, and L. Qiao, "Pathogenesis of liver cirrhosis," *World J. Gastroenterol.*, vol. 20, no. 23, pp. 7312–7324, 2014.
 - [54] D. Schuppan and N. H. Afdhal, "Liver cirrhosis.," *Lancet (London, England)*, vol. 371, no. 9615, pp. 838–51, 2008.
 - [55] J. Hatton, A. Burton, H. Nash, E. Munn, L. Burgoyne, and N. Sheron, "Drinking patterns, dependency and life-time drinking history in alcohol-related liver disease," *Addiction*, vol. 104, no. 4, pp. 587–592, 2009.
 - [56] B. Raynard *et al.*, "Risk factors of fibrosis in alcohol-induced liver disease," *Hepatology*, vol. 35, no. 3, pp. 635–638, 2002.
 - [57] C.-E. Cojocariu, A.-V. Trifan, I. Gîrleanu, and C. Stanciu, "Alcoholic liver disease--epidemiology and risk factors.," *Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iasi*, vol. 118, no. 4, pp. 910–7, 2014.
 - [58] R. S. O'Shea, S. Dasarathy, and A. J. McCullough, "Alcoholic liver disease," *Hepatology*, vol. 51, no. 1, pp. 307–328, 2010.
 - [59] J. Rehm, A. V. Samokhvalov, and K. D. Shield, "Global burden of alcoholic liver diseases," *J. Hepatol.*, vol. 59, no. 1, pp. 160–168, 2013.
 - [60] K. Rasineni and C. Casey, "Molecular mechanism of alcoholic fatty liver," *Indian J. Pharmacol.*, vol. 44, no. 3, p. 299, 2012.
 - [61] M. You, M. Fischer, M. A. Deeg, and D. W. Crabb, "Ethanol induces fatty acid synthesis pathways by activation of sterol regulatory element-binding protein (SREBP).," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 32, pp. 29342–29347, 2002.
 - [62] C. S. Lieber, "Alcoholic fatty liver: Its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis," *Alcohol*, vol. 34, no. 1, pp. 9–19, 2004.
 - [63] C. S. LIEBER and R. SCHMID, "The effect of ethanol on fatty acid metabolism; stimulation of hepatic fatty acid synthesis in vitro.," *J. Clin. Invest.*, vol. 40, pp. 394–399, 1961.
 - [64] A. Galli, J. Pinaire, M. Fischer, R. Dorris, and D. W. Crabb, "The transcriptional and DNA binding activity of peroxisome proliferator-activated receptor alpha is inhibited by ethanol metabolism. A novel mechanism for the development of ethanol-induced fatty liver," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 1, pp. 68–75, 2001.
 - [65] M. You, M. Matsumoto, C. M. Pacold, W. K. Cho, and D. W. Crabb, "The role of AMP-activated protein kinase in the action of ethanol in the liver," *Gastroenterology*, vol. 127, no. 6, pp. 1798–1808, 2004.
 - [66] E. Baraona and C. S. Lieber, "Effects of ethanol on lipid metabolism.," *J. Lipid Res.*, vol. 20, no. 3, pp. 289–315, 1979.
 - [67] T. M. Donohue, "Autophagy and ethanol-induced liver injury," *World Journal of Gastroenterology*, vol. 15, no. 10, pp. 1178–1185, 2009.
 - [68] M. J. Czaja, "Functions of autophagy in hepatic and pancreatic physiology and disease," *Gastroenterology*, vol. 140, no. 7, pp. 1895–1908, 2011.
 - [69] A. V. Skalny, M. G. Skalnaya, A. R. Grabeklis, A. A. Skalnaya, and A. A. Tinkov, "Zinc deficiency as a mediator of toxic effects of alcohol abuse," *Eur. J. Nutr.*, vol. 0, no. 0, pp. 1–10, 2017.

Literaturverzeichnis

- [70] J. Deshpande, M. Joshi, and P. Giri, "Zinc: The trace element of major importance in human nutrition and health," *Int. J. Med. Sci. Public Heal.*, vol. 2, no. 1, p. 1, 2013.
- [71] D. Avsaroglu *et al.*, "Biochemical indicators and cardiac function tests in chronic alcohol abusers.," *Croat Med J*, vol. 46, no. 2, pp. 233–237, 2005.
- [72] J. C. Bode, P. Hanisch, H. Henning, W. Koenig, F. W. Richter, and C. Bode, "Hepatic zinc content in patients with various stages of alcoholic liver disease and in patients with chronic active and chronic persistent hepatitis," *Hepatology*, vol. 8, no. 6, pp. 1605–1609, 1988.
- [73] I. Bergheim, A. Parlesak, C. Dierks, J. C. Bode, and C. Bode, "Nutritional deficiencies in German middle-class male alcohol consumers: Relation to dietary intake and severity of liver disease," *Eur. J. Clin. Nutr.*, vol. 57, no. 3, pp. 431–438, 2003.
- [74] I. Das, R. E. Burch, and H. K. Hahn, "Effects of zinc deficiency on ethanol metabolism and alcohol and aldehyde dehydrogenase activities.," *J. Lab. Clin. Med.*, vol. 104, no. 4, pp. 610–617, 1984.
- [75] Q. Sun *et al.*, "Dysregulation of hepatic zinc transporters in a mouse model of alcoholic liver disease," *AJP Gastrointest. Liver Physiol.*, vol. 307, no. 3, pp. G313–G322, 2014.
- [76] Q. Sun *et al.*, "Zinc deficiency mediates alcohol-induced apoptotic cell death in the liver of rats through activating ER and mitochondrial cell death pathways," *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.*, vol. 308, no. 9, pp. G757–G766, 2015.
- [77] Q. Sun, W. Zhong, W. Zhang, and Z. Zhou, "Defect of mitochondrial respiratory chain is a mechanism of ROS overproduction in a rat model of alcoholic liver disease: role of zinc deficiency.," *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, vol. 310, no. 3, pp. G205–14, 2016.
- [78] X. Kang, Z. Song, C. J. McClain, Y. J. Kang, and Z. Zhou, "Zinc supplementation enhances hepatic regeneration by preserving hepatocyte nuclear factor-4 α in mice subjected to long-term ethanol administration," *Am. J. Pathol.*, vol. 172, no. 4, pp. 916–925, 2008.
- [79] Y. Zhao *et al.*, "Zinc deprivation mediates alcohol-induced hepatocyte IL-8 analog expression in rodents via an epigenetic mechanism," *Am. J. Pathol.*, vol. 179, no. 2, pp. 693–702, 2011.
- [80] A. Moghe *et al.*, "Histone modifications and alcohol-induced liver disease: Are altered nutrients the missing link?," *World J. Gastroenterol.*, vol. 17, no. 20, pp. 2465–2472, 2011.
- [81] R. Rao, "Endotoxemia and gut barrier dysfunction in alcoholic liver disease," *Hepatology*, vol. 50, no. 2, pp. 638–644, 2009.
- [82] G. Szabo and S. Bala, "Alcoholic liver disease and the gut-liver axis," *World J. Gastroenterol.*, vol. 16, no. 11, pp. 1321–1329, 2010.
- [83] C. Bode and J. C. Bode, "Effect of alcohol consumption on the gut," *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, vol. 17, no. 4, pp. 575–92, 2003.
- [84] R. K. Rao, a Seth, and P. Sheth, "Recent Advances in Alcoholic Liver Disease I. Role of intestinal permeability and endotoxemia in alcoholic liver disease.," *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, vol. 286, no. 6, pp. G881–4, 2004.
- [85] A. Seth, "L-Glutamine ameliorates acetaldehyde-induced increase in paracellular permeability in Caco-2 cell monolayer," *AJP Gastrointest. Liver Physiol.*, vol. 287, no. 3, pp. G510–G517, 2004.
- [86] K. J. Atkinson and R. K. Rao, "Role of protein tyrosine phosphorylation in acetaldehyde-

Literaturverzeichnis

- induced disruption of epithelial tight junctions.," *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, vol. 280, no. 6, pp. G1280–G1288, 2001.
- [87] a Banan, J. Z. Fields, H. Decker, Y. Zhang, and a Keshavarzian, "Nitric oxide and its metabolites mediate ethanol-induced microtubule disruption and intestinal barrier dysfunction," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 294, no. 3, pp. 997–1008, 2000.
 - [88] Y. Tang *et al.*, "Nitric oxide-mediated intestinal injury is required for alcohol-induced gut leakiness and liver damage," *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, vol. 33, no. 7, pp. 1220–1230, 2009.
 - [89] E. A. Mutlu *et al.*, "Colonic microbiome is altered in alcoholism," *AJP Gastrointest. Liver Physiol.*, vol. 302, no. 9, pp. G966–G978, 2012.
 - [90] V. Purohit *et al.*, "Alcohol, Intestinal Bacterial Growth, Intestinal Permeability to Endotoxin, and Medical Consequences: Summary of Symposium.," vol. 42, no. 5, pp. 349–361, 2009.
 - [91] P. Olofsson, G. Nylander, and P. Olsson, "Endotoxin: Routes of transport in experimental peritonitis," *Am. J. Surg.*, vol. 151, no. 4, pp. 443–446, 1986.
 - [92] S. E. McKim *et al.*, "Inducible Nitric Oxide Synthase Is Required in Alcohol-Induced Liver Injury: Studies with Knockout Mice," *Gastroenterology*, vol. 125, no. 6, pp. 1834–1844, 2003.
 - [93] J. C. Chow, D. W. Young, D. T. Golenbock, W. J. Christ, and F. Gusovsky, "Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction," *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 16, pp. 10689–10692, 1999.
 - [94] I. Hritz *et al.*, "The critical role of toll-like receptor (TLR) 4 in alcoholic liver disease is independent of the common TLR adapter MyD88," *Hepatology*, vol. 48, no. 4, pp. 1224–1231, 2008.
 - [95] T. Uesugi, M. Froh, G. E. Arteel, B. U. Bradford, and R. G. Thurman, "Toll-like receptor 4 is involved in the mechanism of early alcohol-induced liver injury in mice," *Hepatology*, vol. 34, no. 1, pp. 101–108, 2001.
 - [96] C. S. Lieber, "Microsomal Ethanol-Oxidizing System (MEOS): The First 30 Years (1968-1998)-A Review," *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, vol. 23, no. 6, pp. 991–1007, 1999.
 - [97] M. J. Ronis *et al.*, "Cytochrome P450 CYP 2E1 induction during chronic alcohol exposure occurs by a two-step mechanism associated with blood alcohol concentrations in rats.," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 264, no. 2, pp. 944–50, 1993.
 - [98] S. W. French *et al.*, "Lipid peroxidation, CYP2E1 and arachidonic acid metabolism in alcoholic liver disease in rats.," *J. Nutr.*, vol. 127, no. 5 Suppl, p. 907S–911S, 1997.
 - [99] N. D. Kim, M. K. Kwak, and S. G. Kim, "Inhibition of cytochrome P450 2E1 expression by 2-(allylthio)pyrazine, a potential chemoprotective agent: Hepatoprotective effects," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 53, no. 3, pp. 261–269, 1997.
 - [100] F. Bardag-Gorce *et al.*, "The effect of ethanol-induced cytochrome p4502E1 on the inhibition of proteasome activity by alcohol," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 279, no. 1, pp. 23–29, 2000.
 - [101] N. D. Theise, "Histopathology of alcoholic liver disease," *Clin. Liver Dis.*, vol. 2, no. 2, pp. 64–67, 2013.
 - [102] H. J. Wang, B. Gao, S. Zakhari, and L. E. Nagy, "Inflammation in Alcoholic Liver Disease," *Annu. Rev. Nutr.*, vol. 32, no. 1, pp. 343–368, 2012.

Literaturverzeichnis

- [103] G. Kolios, V. Valatas, and E. Kouroumalis, "Role of Kupffer cells in the pathogenesis of liver disease.," *World J. Gastroenterol.*, vol. 12, no. 46, pp. 7413–20, 2006.
- [104] S. Natori, C. Rust, L. M. Stadheim, A. Srinivasan, L. J. Burgart, and G. J. Gores, "Hepatocyte apoptosis is a pathologic feature of human alcoholic hepatitis," *J. Hepatol.*, vol. 34, no. 2, pp. 248–253, 2001.
- [105] S. S. Iyer *et al.*, "Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the Nlrp3 inflammasome," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 106, no. 48, pp. 20388–20393, 2009.
- [106] T. Eigenbrod, J.-H. Park, J. Harder, Y. Iwakura, and G. Núñez, "Cutting edge: critical role for mesothelial cells in necrosis-induced inflammation through the recognition of IL-1 alpha released from dying cells.," *J. Immunol.*, vol. 181, no. 12, pp. 8194–8198, 2008.
- [107] D. A. Elphick, A. K. Dube, E. McFarlane, J. Jones, and D. Gleeson, "Spectrum of liver histology in presumed decompensated alcoholic liver disease," *American Journal of Gastroenterology*, vol. 102, no. 4, pp. 780–788, 2007.
- [108] M. Setshedi, J. R. Wands, and S. M. De Monte, "Acetaldehyde Adducts in Alcoholic Liver Disease Acetaldehyde adducts in alcoholic liver disease," *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 3, no. 3, pp. 178–185, 2010.
- [109] H. B. El-Serag and K. L. Rudolph, "Hepatocellular Carcinoma: Epidemiology and Molecular Carcinogenesis," *Gastroenterology*, vol. 132, no. 7, pp. 2557–2576, 2007.
- [110] A. N. Sofair *et al.*, "The epidemiology and clinical characteristics of patients with newly diagnosed alcohol-related liver disease: Results from population-based surveillance," *J. Clin. Gastroenterol.*, vol. 44, no. 4, pp. 301–307, 2010.
- [111] S. Basra and B. S. Anand, "Definition, epidemiology and magnitude of alcoholic hepatitis," *World J. Hepatol.*, vol. 3, no. 5, pp. 108–113, 2011.
- [112] Y. Lu, J. Zhuge, X. Wang, J. Bai, and A. I. Cederbaum, "Cytochrome P450 2E1 contributes to ethanol-induced fatty liver in mice," *Hepatology*, vol. 47, no. 5, pp. 1483–1494, 2008.
- [113] C. S. Lieber and L. M. DeCarli, "The Feeding of Alcohol in Liquid Diets: Two Decades of Applications and 1982 Update," *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, vol. 6, no. 4, pp. 523–531, 1982.
- [114] M. M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding," *Anal. Biochem.*, vol. 72, no. 1–2, pp. 248–254, 1976.
- [115] J. Walker, "Spectrophotometric determination of enzyme activity: alcohol dehydrogenase (ADH)," *Biochem. Educ.*, vol. 20, no. 1, pp. 42–43, 1992.
- [116] A. I. Cederbaum, "Methodology to assay CYP2E1 mixed function oxidase catalytic activity and its induction," *Redox Biol.*, vol. 2, pp. 1048–1054, 2014.
- [117] T. Mahmood and P. C. Yang, "Western blot: Technique, theory, and trouble shooting," *N. Am. J. Med. Sci.*, vol. 4, no. 9, pp. 429–434, 2012.
- [118] I. Bergheim, P. K. Eagon, S. Dooley, and K. Breitkopf-Heinlein, "Alcoholic liver disease and exacerbation by malnutrition and infections: What animal models are currently available?," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1216, no. 1, pp. 41–49, 2011.
- [119] G. E. Arteel, "Animal models of alcoholic liver disease," *Dig. Dis.*, vol. 28, no. 6, pp. 729–736, 2010.
- [120] B. Delire, P. Stärkel, and I. Leclercq, "Animal Models for Fibrotic Liver Diseases: What We Have, What We Need, and What Is under Development," *J. Clin. Transl. Hepatol.*, vol. 3,

Literaturverzeichnis

no. 1, pp. 53–66, 2015.

- [121] L. W. Brandon-Warner, Elizabeth Schrum, M. C. Schmidt, and I. H. McKillop, "Rodent Models of Alcoholic Liver Disease: Of Mice and Men.," *Alcohol*, vol. 14, no. 4, pp. 384–399, 2010.
- [122] R. S. Holmes, J. A. Duley, E. M. Algar, P. B. Mather, and U. K. Rout, "Biochemical and Genetic Studies on Enzymes of Alcohol Metabolism: the Mouse As a Model Organism for Human Studies," *Alcohol & Alcoholism*, vol. 21, no. 1, pp. 41–56, 1986.
- [123] C. S. Lieber and L. M. Decarli, "Animal Models of Chronic Ethanol Toxicity," *Methods Enzym.*, vol. 233, no. 1963, pp. 585–594, 1994.
- [124] J. K. Belknap, J. C. Crabbe, and E. R. Young, "Voluntary consumption of ethanol in 15 inbred mouse strains," *Psychopharmacology (Berl.)*, vol. 112, no. 4, pp. 503–510, 1993.
- [125] Y. Iimuro, M. Frankenberg, G. Arteel, B. Bradford, C. Wall, and R. Thurman, "Female rats exhibit greater susceptibility to early alcohol-induced liver injury than males.," *Am. J. Physiol.*, vol. 272, pp. 1189–94, 1997.
- [126] N. B. D'Souza El-Guindy *et al.*, "Laboratory models available to study alcohol-induced organ damage and immune variations: Choosing the appropriate model," *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, vol. 34, no. 9, pp. 1489–1511, 2010.
- [127] A. Bertola, S. Mathews, S. H. Ki, H. Wang, and B. Gao, "Mouse model of chronic and binge ethanol feeding (the NIAAA model)," *Nat. Protoc.*, vol. 8, no. 3, pp. 627–637, 2013.
- [128] H. R. Thomasson, "Recent Development in Alcoholism.," *Gend. Differ. Alcohol Metab. Physiol. Responses to Ethanol*, vol. 12, pp. 163–179, 1995.
- [129] W. Jelski, M. Laniewska-Dunaj, K. Orywal, J. Kochanowicz, R. Rutkowski, and M. Szmikowski, "The Activity of Alcohol Dehydrogenase (ADH) Isoenzymes and Aldehyde Dehydrogenase (ALDH) in the Sera of Patients with Brain Cancer," *Neurochem. Res.*, vol. 39, no. 12, pp. 2313–2318, 2014.
- [130] N. Shimojima *et al.*, "Serum alcohol dehydrogenase: A sensitive biomarker of ongoing graft function after liver transplantation," *Clin. Transplant.*, vol. 21, no. 4, pp. 498–501, 2007.
- [131] E. Mezey, G. R. Cherrick, and P. R. Holt, "Serum Alcohol Dehydrogenase, an Indicator of intrahepatic Cholestasis.," *N. Engl. J. Med.*, vol. 279, no. 5, pp. 241–248, 1968.
- [132] W. Jelski, A. Strumnik, K. Orywal, T. Lapinski, M. Swiderska, and M. Szmikowski, "Serum Alcohol Dehydrogenase and Aldehyde Dehydrogenase Activity in the Course of Hepatitis C.," *Clin Lab*, vol. 62, no. 11, pp. 2155–2159, 2016.
- [133] D. Meier-Tackmann, D. P. Agarwal, and H. W. Goedde, "Plasma alcohol dehydrogenase in normal and alcoholic individuals," *Alcohol Alcohol*, vol. 19, no. 1, pp. 7–12, 1984.
- [134] M. Morimoto, M. A. Zern, A. L. Hagbjörk, M. Ingelman-Sundberg, and S. W. French, "Fish oil, alcohol, and liver pathology: role of cytochrome P450 2E1.," *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, vol. 207, no. 2, pp. 197–205, 1994.
- [135] A. A. Nanji, S. Zhao, R. G. Lamb, A. J. Dannenberg, S. M. H. Sadrzadeh, and D. J. Waxman, "Changes in Cytochromes P-450, 2E1, 2B1, and 4A, and Phospholipases A and C in the Intragastric Feeding Rat Model for Alcoholic Liver Disease: Relationship to Dietary Fats and Pathologic Liver Injury," *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, vol. 18, no. 4, pp. 902–908, 1994.
- [136] A. Ratna and P. Mandrekar, "Alcohol and cancer: Mechanisms and therapies," *Biomolecules*, vol. 7, no. 3, pp. 1–20, 2017.

Literaturverzeichnis

- [137] A. Pellicoro, P. Ramachandran, J. P. Iredale, and J. A. Fallowfield, "Liver fibrosis and repair: Immune regulation of wound healing in a solid organ," *Nature Reviews Immunology*, vol. 14, no. 3. pp. 181–194, 2014.

Anhang

Nährstoffzusammensetzung der Lieber DeCarli Diät, die im Tierversuch von Finn Jung verwendet wurde, aus welchem die in dieser Arbeit verwendeten Leber- und Plasmaproben stammen.

Nährstoff		Anteil an der Flüssigdiät	Anteil am Futtermittel
Protein	%	4,06	29,0
Arginin	%	0,16	1,15
Cystin	%	0,07	0,49
Glycin	%	0,09	0,65
Histidin	%	0,12	0,68
Isoleucin	%	0,22	1,54
Leucin	%	0,39	2,80
Lysin	%	0,33	2,34
Methionin	%	0,14	1,04
Phenylalanin	%	0,22	1,55
Tyrosin	%	0,23	1,62
Threonin	%	0,18	1,26
Tryptophan	%	0,05	0,35
Valin	%	0,26	1,85
Aspartat	%	0,30	2,11
Glutamat	%	0,92	6,55
Fett	%	3,9	27,8
Ballaststoffe	%	0,69	5,0
Kohlenhydrate	%	2,92	20,9
Mineralstoffe			
Calcium	%	0,14	0,98
Phosphor	%	0,11	0,77
Kalium	%	0,12	0,87
Magnesium	%	0,03	0,18
Schwefel	%	0,05	0,39
Natrium	%	0,05	0,39
Chlorid	%	0,05	0,38
Fluor	ppm	0,25	1,8
Eisen	ppm	18	113

Anhang

Zink	ppm	9,2	66
Mangan	ppm	14	98
Kupfer	ppm	2,4	17
Chrom	ppm		4,2
Jod	ppm	0,05	0,35
Molybdän	ppm	0,11	0,8
Selen	ppm	0,02	0,11
Vitamine			
Vitamin K	ppm	0,25	1,8
Thiamin	ppm	1,5	11
Riboflavin	ppm	1,7	12
Niacin	ppm	7,6	54
Pantothensäure	ppm	3,9	28
Cholinchlorid	ppm	265	1900
Folsäure	ppm	0,53	3,8
Pyridoxin	ppm	1,4	10
Biotin	ppm	0,06	0,4
Inositol	ppm	25	180
p-Aminobenzoessäure	ppm	12,5	89
Vitamin B ₁₂	mcg/kg	25	180
Vitamin A	IU/gm	3,0	21
Vitamin B ₃	IU/gm	0,4	2,9
Vitamin E	IU/kg	30	220
Ascorbinsäure	mg/gm	9,7	69

Danksagung

Hiermit möchte ich mich herzlich bei Frau Prof. Dr. Ina Berheim für die Betreuung meiner Masterarbeit, die sehr schnellen Korrekturen, sowie für Rückmeldungen auf anfallende Fragen meinerseits bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Kollegen und Kolleginnen der Arbeitsgruppe für die angenehme Zusammenarbeit bedanken. Einen besonderen Dank möchte ich an Dr. Anna Janina Engstler für die sehr nette Betreuung und Geduld bei Laborarbeiten und die motivierenden Worte während des Laboralltages aussprechen. Vielen Dank auch an Finn Jung für Ratschläge und Bemühungen vor allem bei technischen Fragen und die ständige Hilfsbereitschaft.

Mein ganz besonderer Dank geht an meinen Kollegen und Freund Vincent Winkler, der mir im Labor und auch beim Schreiben der Arbeit mit Rat und Tat zur Seite stand und mit dem ich sehr viele lustige Stunden im Labor verbringen durfte. Hiermit möchte ich mich auch bei meinen Schreibtischkolleginnen Stefanie Holper und Elisabeth Kaufmann für ihre unterhaltsame Gesellschaft und die netten Diskussionen und Gespräche bedanken.

Mein allerliebster Dank gilt meinen Eltern und meiner Schwester, die mich durch das gesamte Studium begleitet und motiviert haben und immer an meiner Seite gestanden haben. Ich möchte hiermit meinen lieben Dank auch an meinen Freund René richten. Danke, dass du mich mit deinen lieben Worten immer motiviert und bestärkt hast und für mich da warst.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel

**„Untersuchungen des Einflusses einer chronischen Ethanolaufnahme auf Enzyme des
Alkoholstoffwechsels im Modellorganismus“**

selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe, sowie alle wörtlich oder sinngemäß entnommenen Stellen aus anderen Schriften als solche kenntlich gemacht sind. Darüber hinaus versichere ich, dass die eingereichte Arbeit weder vollständig noch in wesentlichen Teilen Gegenstand eines anderen Prüfungsverfahrens gewesen ist.

.....
Ort, Datum

.....
Unterschrift