

# **Mechanismen und Regulation der Lipid-vermittelten Leberentzündung**

## **Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
im Fachbereich Chemie, Fakultät für Mathematik, Informatik  
und Naturwissenschaften der Universität Hamburg

vorgelegt von

**Leah Eissing**

aus Eckernförde

Hamburg, 2013

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 2010 bis Januar 2013 extern im Institut für Biochemie und Molekulare Zellbiologie des Universitäts-klinikums Hamburg-Eppendorf unter der Leitung von Prof. Dr. Jörg Heeren angefertigt. Prof. Dr. Dr. Christian Betzel betreute diese Arbeit im Fachbereich Chemie der Universität Hamburg.

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Christian Betzel

2. Gutachter: Prof Dr. Jörg Heeren

Datum der Disputation: 07.06.2013

## Inhalt

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	1
1.1	Nicht-alkoholische Fettleber-Erkrankung und nicht-alkoholische Steatohepatitis.....	1
1.2	Veränderung des Lipid-Stoffwechsels bei NAFLD .....	2
1.2.1	Leberverfettung durch Lipide aus dem Fettgewebe .....	2
1.2.2	Leberverfettung durch Nahrungslipide .....	2
1.2.3	Leberverfettung durch <i>de novo</i> Lipogenese.....	3
1.3	Mechanismen der Leberentzündung bei NAFLD.....	5
1.3.1	Metabolische Endotoxämie.....	5
1.3.2	Beteiligung inflammatorischer Zytokine .....	6
1.4	Beteiligung der Leberzellen an Entzündungsprozessen .....	8
1.5	Aktivierung des angeborenen Immunsystems in der Leber.....	9
1.6	Modulation von TLR-Signalen .....	10
1.7	Triggering Receptors Expressed on Myeloid cells .....	11
1.7.1	TLR-Signal-Verstärkung durch TREM1.....	12
1.7.2	TLR-Signal-Hemmung durch TREM2.....	12
1.8	PML als Stress-Regulator .....	13
<b>2</b>	<b>Methoden</b> .....	17
2.1	Biochemische Reagenzien .....	17
2.2	Human-Studien.....	17
2.3	Zellkultur.....	17
2.3.1	HepaRG-Zelllinie .....	17
2.3.2	Isolation und Kultur von primären murinen Kupffer-Zellen und sinusoidalen Endothelzellen.....	17
2.3.3	Isolation von primären murinen Hepatozyten .....	18
2.3.4	Isolation von primären murinen Sternzellen (HSC).....	18
2.4	Zytokin-Konzentrationsbestimmung mittels ELISA .....	18
2.5	Genotypisierung .....	18
2.6	Mausmodelle und Diäten .....	19
2.7	Plasma-Analyse.....	20
2.8	Isolation und Markierung von Lipoproteinen .....	20
2.9	Lipidbestimmung in Lebergewebe .....	20
2.10	RNA-Extraktion und quantitative <i>real time</i> -PCR .....	20

2.11	Histologie und Immunhistochemie .....	21
2.12	Western Blot.....	21
2.13	Statistik .....	22
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>23</b>
3.1	Das metabolische Syndrom und NAFLD in einer humanen Kohorte .....	23
3.1.1	Charakterisierung der Kohorte.....	23
3.1.2	Veränderung der DNL beim metabolischen Syndrom und NAFLD.....	25
3.1.3	Veränderung inflammatorischer Signalwege bei NAFLD .....	28
3.2	Mechanismen der NASH.....	32
3.2.1	LPS-Detektion in Plasma und Lipoproteinen .....	32
3.2.2	TRL-vermittelte pro-inflammatorische Antwort in der Leber .....	33
3.2.3	TRL-Aufnahme in Leberzellen.....	34
3.2.4	Beteiligung der Leberzellen an der pro-inflammatorischen Reaktion .....	34
3.3	Regulation der NAFLD durch PML .....	38
3.3.1	PML-Expression in primären Leberzellen und einer Hepatom-Zelllinie .....	38
3.3.2	Charakterisierung der PML-defizienten Mäuse .....	39
3.3.3	Effekte einer pro-steatotischen Hochfettdiät in Wildtyp- und PML-defizienten Mäusen	41
3.4	Regulation der NAFLD durch TREM1 und TREM2 .....	44
3.4.1	TREM-Expression in primären Leberzellen.....	44
3.4.2	Zytokin-Sekretion aus TREM1- und TREM2-defizienten Kupffer-Zellen .....	45
3.4.3	Funktion von TREM1 und TREM2 bei der akuten Lipid-vermittelten Entzündungsreaktion	46
3.4.4	Effekte einer NAFLD-induzierenden Diät in Wildtyp- und TREM-defizienten Mäusen.....	47
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>55</b>
4.1	Rolle der DNL für metabolische Erkrankungen .....	55
4.2	Rolle pro-entzündlicher Signalwege für metabolische Erkrankungen .....	56
4.3	Rolle der metabolischen Endotoxämie für die Leberentzündung.....	57
4.4	Regulation der NAFLD durch PML .....	57
4.5	Regulation der NAFLD durch TREMs .....	59
4.5.1	TREM1 .....	59
4.5.2	TREM2 .....	60
4.6	Ausblick: Integration von Stoffwechsel und Entzündung.....	62

<b>5</b>	<b>Anhang</b> .....	66
5.1	Literaturverzeichnis .....	66
5.2	Abkürzungsverzeichnis .....	77
5.3	Abbildungsverzeichnis .....	80
5.4	Chemikalien .....	82
	Danksagung .....	84
	Eidesstattliche Erklärung .....	85
	Lebenslauf .....	86

# EINLEITUNG

---

Der Energie-Stoffwechsel des Organismus dient der Versorgung aller Zellen mit den benötigten Substraten für ihre biochemischen Reaktionen und beinhaltet die Speicherung überschüssiger Energie, um diese bei Bedarf wieder freizusetzen. Übergewicht (Adipositas) ist eine sog. Zivilisationskrankheit, die auf Verschiebungen dieses Stoffwechsels durch Veränderungen der Lebensumstände zurückzuführen ist. Insbesondere eine erhöhte Nahrungsaufnahme bei reduzierter Bewegung, sowie eine veränderte Zusammensetzung der Mahlzeiten mit hohem Fett- und Kohlenhydrat-Anteil, tragen dazu bei, dass sich die Fett-Depots des Organismus füllen. Dabei lagern sich Lipide jedoch nicht nur im Fettgewebe, sondern häufig auch in der Leber ein (Steatose). Mit den weiteren Faktoren Bluthochdruck, Insulinresistenz und veränderten Blutfettwerten (Dyslipidämie) ist Adipositas ein wichtiger Risikofaktor für Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Die Adipositas tritt häufig zuerst auf und begünstigt dann die Entstehung der anderen Erkrankungen. Das gemeinsame Auftreten von drei oder mehr dieser Faktoren wird als metabolisches Syndrom bezeichnet, welches das Risiko einer Herz-Kreislauf-Erkrankung deutlich erhöht.

Dyslipidämie, Insulinresistenz und daraus u. U. entstehender Diabetes sind die Folge von chronischen Entzündungsprozessen in den Stoffwechsel-aktiven Organen Fettgewebe und Leber. Diese Entzündungsprozesse sind eine Folge von Stressreaktionen, die durch die Lipid-Überladung und damit einhergehenden zellulären Veränderungen entstehen können. Eine solche chronische Entzündung in der Leber kann dazu führen, dass das Gewebe vernarbt (Fibrose). Während die Steatose, ebenso wie Übergewicht, häufig durch Verbesserung der Ernährung und Verhaltensänderungen reduziert werden kann, ist ab dem Auftreten von Fibrose das Organ irreversibel geschädigt. Dies kann bis zum Organversagen führen und dann eine Transplantation erfordern. Eine weiter anhaltende chronische Entzündung in der Leber kann auch zur Entstehung von Leberkrebs (Hepatozelluläres Karzinom) führen. Es ist wichtig, die Ursachen der sog. metabolischen Entzündung zu verstehen, um diesen Prozess gezielt rechtzeitig aufzuhalten.

## **1.1 Nicht-alkoholische Fettleber-Erkrankung und nicht-alkoholische Steatohepatitis**

Die nicht-alkoholische Fettleber-Erkrankung (NAFLD) ist als hepatische Manifestation des metabolischen Syndroms in Gesellschaften mit Nahrungsüberfluss weit verbreitet und mit Übergewicht assoziiert. (1). In dem Maß, in dem sich die Übergewicht-Epidemie verbreitet, nimmt entsprechend auch die Prävalenz der Fettleber-Erkrankung zu und liegt beispielsweise in den USA aktuell im Mittel bei 20% (2). Die Bezeichnung NAFLD umfasst ein breites Spektrum unterschiedlicher Schweregrade der Krankheit. Während es sich bei der leichteren Form um eine reine Steatose (Verfettung, mit vier Abstufungen) handelt, die kaum Symptome verursacht, ist die nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH) durch histologisch sichtbare Infiltration von Immunzellen in das Lebergewebe und das Auftreten klinisch messbarer Entzündungsparameter charakterisiert. Diese schwerere Form hat eine Prävalenz von 2-5% (2), d. h. bei 10-25% der Patienten entwickelt sich die Lebersteatose zur Leberentzündung, welche wiederum einen Risikofaktor für weiteres Fortschreiten der Erkrankung über eine Fibrose bis zum Hepatozellulären Karzinom darstellt (3;4). Die Steatose ist

hierbei der erste Schritt und kann durch verschiedenartige Veränderungen des Lipid-Stoffwechsels ausgelöst werden.

## **1.2 Veränderung des Lipid-Stoffwechsels bei NAFLD**

Die ektope Speicherung von Lipiden in der Leber ist mit einem Ungleichgewicht im Lipid-Stoffwechsel assoziiert. Diese Veränderungen können eine Folge erhöhter Lipid-Aufnahme aus dem Fettgewebe und / oder aus der Nahrung, reduzierter Nutzung von Lipiden als Energiequelle, und / oder die Folge von Lipid-Neusynthese (*de novo* Lipogenese, DNL) sein. Diese verschiedenen Mechanismen und ihre Beteiligung an der Steatose sollen im Folgenden erläutert werden.

### **1.2.1 Leberverfettung durch Lipide aus dem Fettgewebe**

Das Fettgewebe ist das Organ, das auf die langfristige Speicherung von Energie in Form von Lipiden spezialisiert ist. Fettsäuren werden dabei durch Veresterung mit Glycerol als Triglyzeride in den Adipozyten gespeichert. Bei Bedarf, z. B. nach mehrstündigem Fasten, wird die Freisetzung von Fettsäuren aus den Adipozyten durch lipolytische Prozesse stimuliert, sodass andere Organe mit Energie versorgt werden können. Bei dauerhaftem Überschuss von Lipiden werden diese im Fettgewebe gespeichert und bewirken die Expansion der Fett-Depots durch Vergrößerung der Fettzellen (sog. Hypertrophie). Ab einem gewissen Grenzwert löst die übermäßige Einlagerung von Lipiden intrazelluläre Stress-Antworten aus. Diese beinhalten die Aktivierung von Signalwegen mit dem Ziel, ein Gleichgewicht in der Zelle wiederherzustellen. Eine chronische Aktivierung dieser Signalwege bewirkt jedoch eine Insulinresistenz (5). In Insulin-resistenten Adipozyten wird die Lipolyse nicht mehr effektiv gehemmt, sodass es zur Freisetzung von Fettsäuren kommt. Diese gelangen dann über die Zirkulation in die Leber und werden von Hepatozyten aufgenommen und gespeichert (6). Die Entstehung von Insulinresistenz zeigt meist an, dass die Speicherkapazität des Fettgewebes erreicht ist, sodass es zum *spill-over* von Lipiden kommt, die v. a. von der Leber aufgenommen werden. Auf diesem Weg trägt das Fettgewebe zur Steatose bei.

Vieles spricht dafür, dass die Lipid-Speicherung bei Überschreiten der Speicherkapazität auch in Hepatozyten intrazellulären Stress auslöst, sodass auch sie Insulin-resistent werden. Die Aktivierung entsprechender Signalwege kann durch die Induktion von Chemokinen zur Rekrutierung von Immunzellen führen, welche dann an der Leberentzündung beteiligt sind (6) (s. Kapitel 1.3.1).

### **1.2.2 Leberverfettung durch Nahrungslipide**

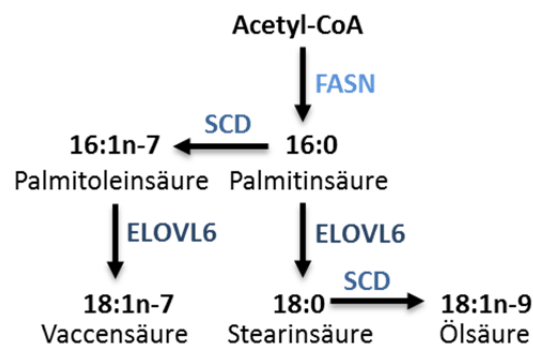
Mit der Nahrung aufgenommene Lipide werden im sog. exogenen Lipid-Stoffwechselweg von den Enterozyten des Darms aufgenommen und in Form von Chylomikronen über die Lymphe (unter Umgehung der Leber) in die Zirkulation abgegeben. Im Fettgewebe und der Peripherie werden durch die Aktivität der Lipoprotein-Lipase Fettsäuren abgespalten und aufgenommen. Die resultierenden Chylomikronen-*remnants* werden, nachdem sie das austauschbare Apolipoprotein ApoE erhalten haben, von Hepatozyten Rezeptor-vermittelt aufgenommen (7). Die Fütterung einer Hochfettdiät bewirkt entsprechend in Mäusen nicht nur eine Vergrößerung der Fettdepots sondern auch eine Akkumulation von Lipiden in der Leber. In einer Humanstudie konnte außerdem gezeigt werden, dass der Lipid-Gehalt der Nahrung bei gleicher Kalorienzufuhr mit dem Lipid-Gehalt der Leber korreliert

(8), sodass auch dieser Faktor zur Lebersteatose beiträgt. Darüber hinaus scheint nicht nur die Quantität sondern auch die Qualität der Lipide eine Rolle zu spielen. So konnte gezeigt werden, dass Cholesterole die Komponente ist, die in einem Hochfett-diät-Mausmodell NASH verursacht (9). Mindestens ebenso wichtig sind jedoch auch die mit der Nahrung aufgenommenen Kohlenhydrate.

### 1.2.3 Leberverfettung durch *de novo* Lipogenese

Da Glucose nur zu einem kleinen Teil in Zellen gespeichert werden kann, muss sie, wenn nicht direkt zur Deckung des Energiebedarfs der Zelle verwertet, in eine speicherbare Form umgewandelt werden. Die Leber ist ein Organ, das einen Überschuss an Kohlenhydraten aus der Nahrung zu einem gewissen Teil in Glycogen, und weiteren Überschuss durch Umwandlung in Fettsäuren speichern kann. In Hepatozyten neu synthetisierte Lipide werden vom gesunden Organismus in *very low density* Lipoproteine (VLDL) verpackt und in die Zirkulation abgegeben, die Fettsäuren werden im Fettgewebe und anderen peripheren Geweben aus den Lipoproteinen abgespalten, aufgenommen und in den entsprechenden Zellen wieder als Triglyzeride gespeichert bzw. zur Energiegewinnung genutzt. Bei einem Ungleichgewicht im Lipid-Stoffwechsel, wenn die Speicherkapazität des Fettgewebes annähernd ausgelastet ist, sowie bei hoher Lipid-Syntheserate aufgrund hoher Substratverfügbarkeit, werden die neu synthetisierten Lipide jedoch auch in der Leber gespeichert. Die Neusynthese von Lipiden, die sog. *de novo* Lipogenese (DNL), ist tatsächlich an der Leberverfettung maßgeblich beteiligt: so wurde gezeigt, dass bei NAFLD-Patienten 60% der Leberlipide aus vom Fettgewebe freigesetzten Fettsäuren stammen (d. h. gespeicherte Nahrungslipide und Lipide aus DNL-Prozessen), 10% aus mit der Nahrung aufgenommenen Fettsäuren (auf direktem Weg in die Leber gelangt), und 30% aus DNL-Wegen (10).

Bei hohen intrazellulären Glucose-Konzentrationen kommt es deshalb zur Induktion und Aktivierung von DNL-Schlüsselenzymen wie der Fettsäure-Synthase (FASN), welche Fettsäuren aus Acetyl-CoA-Bausteinen aufbaut. Diese C2-Bausteine stammen hierbei vom Pyruvat, dem Produkt der Glykolyse, aus dem Abbau von Aminosäuren sowie Alkohol. Ebenfalls induziert werden die Fettsäure-Elongase 6 (ELOVL6, und weitere Elongasen)(11), welche die Verlängerung von C16-Fettsäuren um C2-Bausteine (z. B. Palmitinsäure zu Stearinsäure) katalysiert, sowie die Stearoyl-CoA-Desaturase (SCD), welche die Synthese einfach ungesättigter Fettsäuren wie Ölsäure und Palmitoleinsäure katalysiert. Die von diesen drei Schlüsselenzymen katalysierten Reaktionen sind in Abb. 1.2 vereinfacht dargestellt.

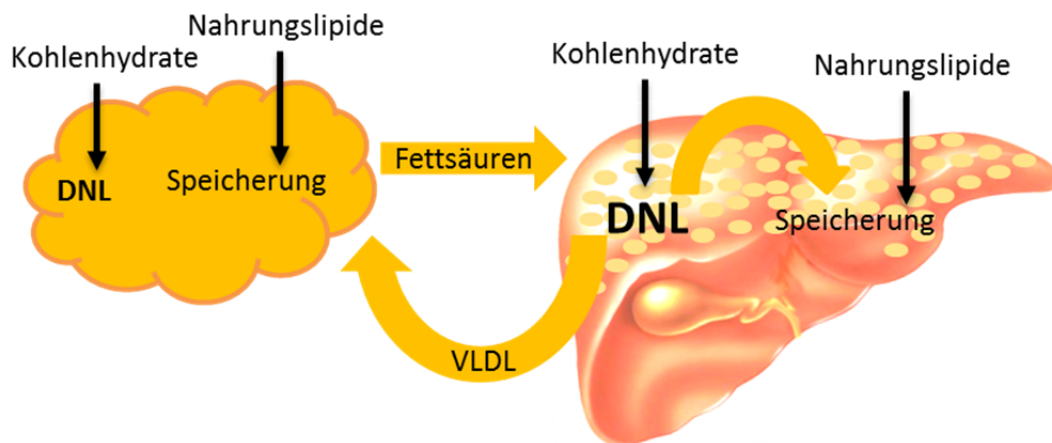


**Abb. 1.1: Reaktionen der DNL-Schlüsselenzyme FASN, SCD und ELOVL6.** Edukte für die Fettsäure-Synthese durch FASN ist Acetyl-CoA. FASN katalysiert die Verknüpfung der C2-Bausteine zu Palmitinsäure. Diese kann durch ELOVL6 zu Stearinsäure verlängert werden, ebenso wie Palmitoleinsäure zu Vaccensäure. SCD kann Doppelbindungen in Fettsäuren einfügen, sodass ungesättigte Fettsäuren wie Palmitoleinsäure und Ölsäure entstehen.



Die Expression der DNL-Enzyme wird vor allem von zwei Transkriptionsfaktoren reguliert: *sterol response element binding* Protein 1 (SREBP1) und *carbohydrate response element binding* Protein (ChREBP). Die Transkription des SREBP1-Gens wird durch Insulin induziert und SREBP1 ist ein wichtiger Effektor der lipogenen Wirkung von Insulin in der Leber (12), da SREBP1 anschließend die Expression von u. a. FASN, SCD und ELOVL6 induziert (13-15). Die Regulation der Gene der DNL-Schlüsselenzyme durch SREBP1 ist jedoch in Mäusen nur zu etwa 50% für die Expression verantwortlich (16). Für den fehlenden Anteil der Expression ist der Transkriptionsfaktor ChREBP zuständig. Die Aktivität von ChREBP wird durch Glucose reguliert, indem ein Abbauprodukt der Glucose eine Phosphatase aktiviert. Diese dephosphoryliert ChREBP, daraufhin erfolgt die Translokation in den Zellkern und ermöglicht die Bindung an entsprechende responsive Elemente in den Promoter-Regionen von Lipogenese-Genen (17;18). Die Expression von ChREBP selbst wiederum scheint Insulin-responsiv zu sein (19). Kürzlich wurde für diesen Transkriptionsfaktor eine weitere Isoform beschrieben: ChREBP $\beta$  ist eine kürzere Isoform, die durch die größere, Glucose-sensitive Variante induziert wird. Da dieser Isoform die Kernexportsignale fehlen, korreliert ihre Expression stark mit der transkriptionellen Aktivität (20).

Die Regulation der *de novo*-Lipogenese im Fettgewebe wurde in verschiedenen Mausstudien und auch in humanen Kohorten beschrieben. So wurde gezeigt, dass die Expression von DNL-Schlüsselenzymen wie FASN im Fettgewebe invers mit der Adipozyten-Größe korreliert, d. h. die DNL im Fettgewebe ist bei Übergewicht herunterreguliert (21). Da FASN den entscheidenden Schritt des Fettsäure-Biosynthese-Weges katalysiert, wird die Expression dieses Schlüsselenzyms als Maß für die Kapazität eines Gewebes zur DNL angesehen. Im Gegensatz zum Fettgewebe ist die DNL in der Leber, sowohl in Tierstudien als auch in humanen Kohorten, bei Übergewicht verstärkt und trägt somit zur NAFLD und vermutlich auch zur Insulinresistenz bei (22). In Abb. 1.2 sind die an der Leberverfettung beteiligten Mechanismen zusammengefasst dargestellt.



**Abb. 1.2: Faktoren der Leber-Steatose.** Lipide werden v. a. im Fettgewebe gespeichert, bei Überschreiten der Speicherkapazität werden jedoch in Adipozyten als Triglyzeride gespeicherte Fettsäuren freigesetzt und von der Leber aufgenommen. Bei einem Überangebot von Energiesubstraten werden Kohlenhydrate im Fettgewebe und in der Leber in Lipide als eine speicherbare Energieform überführt. Diese werden von der Leber als VLDL sezerniert und die exportierten Lipide wiederum im Fettgewebe gespeichert, können aber auch in der Leber akkumulieren und dadurch zur Steatose beitragen.

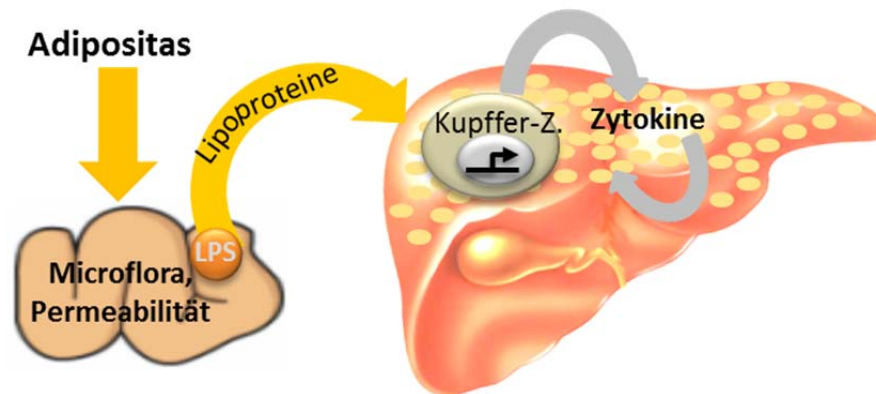
### 1.3 Mechanismen der Leberentzündung bei NAFLD

Das wichtigste Kennzeichen von NAFLD ist die Akkumulation von Triglyzeriden in Hepatozyten. Die Speicherung von Triglyzeriden im Gegensatz zu freien, gesättigten Fettsäuren allein ist zunächst jedoch nicht toxisch. Die Beobachtung, dass nur etwa 20% der Patienten mit Lebersteatose auch eine Steatohepatitis mit messbarer Entzündung entwickeln, führte zu der *two hit*-Hypothese als Erklärung der NASH-Pathogenese (23). Diese Hypothese besagt, dass im ersten Schritt die Lipid-Akkumulation in Hepatozyten die Leber für eine Entzündungsreaktion sensibilisiert, die durch verschiedene Faktoren ausgelöst werden kann. Hierzu gehört der in 1.2.1 erwähnte ER-Stress und die dadurch induzierte Bildung pro-inflammatorischer Moleküle. Neben dieser durch intrazelluläre Ursachen ausgelösten „sterilen“ Entzündung scheinen jedoch auch Bakterien des Darms eine Rolle bei der Leberentzündung zu spielen.

#### 1.3.1 Metabolische Endotoxämie

Vor einigen Jahren wurde das Konzept der sterilen Entzündung bei NAFLD ergänzt durch die sog. metabolische Endotoxämie. In einer Fütterungsstudie wurde gefunden, dass die Fütterung einer Hochfettdiät die Erhöhung der Plasma-Konzentration von Lipopolysaccharid (LPS), einer Komponente der Zellwand Gram-negativer Bakterien, auf zwei- bis dreifach höhere Werte bewirkte (24). Die Quelle des LPS sind Bakterien im Darm, deren Abbauprodukte grundsätzlich in die Zirkulation gelangen können, die Translokation ist im Übergewichtsmodell erhöht. Aufgrund des lipophilen Charakters von LPS gelangt dieses nicht nur direkt ins Blut sondern wird zu einem vermutlich signifikanten Teil in Lipoproteinen transportiert. Hierzu wurde gezeigt, dass LPS von Darm-Epithelzellen aufgenommen und zum Golgi-Apparat transportiert wird, wo die Chylomikronen gebildet werden. Eine Verabreichung von Lipiden mittels Schlundsonde und die resultierende Bildung dieser Lipoproteine hatte erhöhte Plasma-LPS-Werte zur Folge (25). Die Chylomikronen gelangen zwar über die Lymphe unter Umgehung der Leber zunächst in die Peripherie, nach Abspaltung von Fettsäuren gelangen die *Remnants* jedoch in die Leber und werden dort aufgenommen. Tatsächlich konnte der Großteil des intestinal absorbierten LPS auf Chylomikronen-*Remnants* im Blut gefunden werden (25). Bei übermäßiger Lipid-Aufnahme mit der Nahrung werden auch diese Lipoproteine vermehrt gebildet und also vermutlich zusammen mit ihnen LPS transportiert. Auch jüngere Humanstudien konnten zeigen, dass der Verzehr einer Mahlzeit mit hohem Fettgehalt die Endotoxin-Konzentration postprandial erhöht (26).

Die Translokation der bakteriellen Substanzen involviert zwei wichtige Mechanismen: einerseits ist die Permeabilität des Darms bei Adipositas erhöht, wie in genetisch übergewichtigen Mäusen gezeigt wurde (27). In diesen Tieren korreliert die Darm-Permeabilität mit erhöhter Endotoxämie in der Pfortader, die das Blut aus dem Darm zur Leber transportiert, sowie mit erhöhten Konzentrationen von pro-inflammatorischen Zytokinen im Blut. Andererseits ist die Zusammensetzung der Mikroflora des Darms nachweislich im Tiermodell (28) sowie auch bei Patienten mit dem metabolischen Syndrom und speziell auch bei Patienten mit NASH verändert (29).



**Abb. 1.3: Entstehung metabolischer Endotoxämie und Effekte auf die Leber.** Adipositas verändert die Mikroflora des Darms und erhöht die Permeabilität, sodass vermehrt bakterielle Moleküle in die Zirkulation gelangen können. Diese assoziieren mit Lipoproteinen und werden von der Leber aufgenommen, wo sie Kupffer-Zellen aktivieren können. Die resultierende Zytokin-Sekretion stimuliert die Lipid-Akkumulation und erzeugt chronische Entzündung.

Weitere Studien haben metabolische Endotoxämie mit der chronischen Entzündung bei Übergewicht in Verbindung gebracht (30). Speziell in Hinblick auf die metabolische Entzündung in der Leber wurde schon früher gezeigt, dass einerseits eine LPS-Gabe NASH induziert (31) und dass andererseits durch die Behandlung mit Polymyxin B, welches Gram-negative Bakterien eliminiert, die Lebersteatose reduziert wird (32). Humanstudien haben darüber hinaus gezeigt, dass LPS-Konzentrationen im Plasma von NAFLD-Patienten erhöht sind (33). Außerdem lassen sich spezifische Antikörper gegen LPS im Plasma von Patienten mit NASH finden, deren Spiegel mit erhöhtem Schweregrad der NASH ebenfalls ansteigen (34). Es ist zu vermuten, dass dies auch funktionale Bedeutung bei der chronischen Entzündung in der Leber hat.

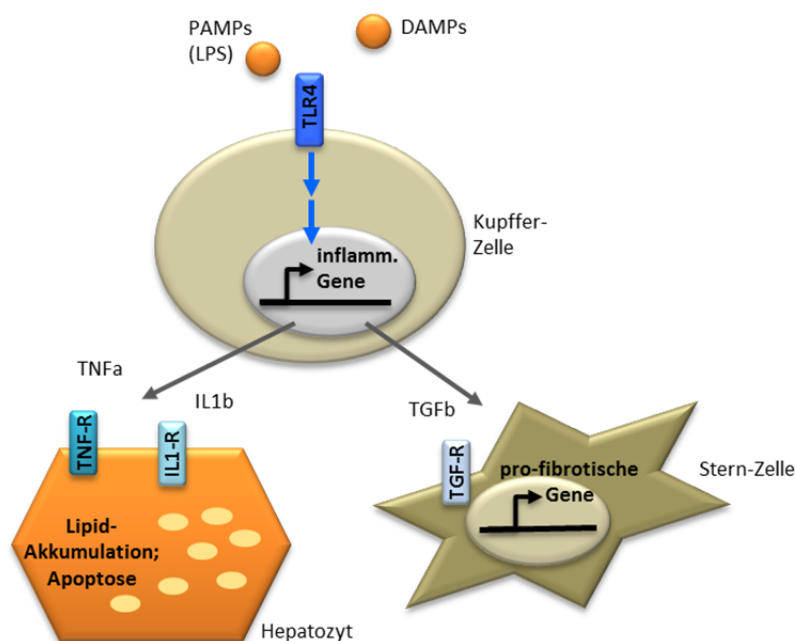
### 1.3.2 Beteiligung inflammatorischer Zytokine

Der Einfluss des Fettgewebes auf die Leberentzündung rührt neben der durch Lipolyse freigesetzten Fettsäuren und deren Aufnahme in die Leber auch von den Zytokinen her, die im entzündeten (viszeralen) Fettgewebe von eingewanderten Makrophagen gebildet werden und z. T. über die Zirkulation in die Leber gelangen (35). Zusätzlich werden auch in der Leber selbst Zytokine gebildet, die den Entzündungszustand unmittelbar beeinflussen. Die Bildung der beiden prototypischen proinflammatorischen Zytokine TNF $\alpha$  und IL6 ist eines der frühesten Ereignisse bei verschiedenen Leberentzündungen. Ihre Freisetzung löst die Bildung weiterer Zytokine aus, welche u. a. Immunzellen rekrutieren. Auch eine Fibrose (eigentlich ein Heilungsprozess des verletzten Gewebes, der jedoch bei chronischer Aktivierung selbst irreversible Leberschäden bewirkt) wird durch diese und weitere Zytokine ausgelöst (36).

Die Expression von TNF $\alpha$  ist in der Leber und im Fettgewebe von NASH-Patienten erhöht (37). Die TNF $\alpha$ -Inhibition reduziert Steatose im Mausmodell (38) und verbessert die klinischen Parameter von NASH-Patienten (39). TNF $\alpha$  interferiert mit dem Insulin-Signalweg, da über den TNF-Rezeptor u. a. die Kinase JNK aktiviert wird, welche einen Faktor des Insulin-Signalwegs inhibitorisch phosphoryliert (40). TNF $\alpha$  hemmt so die Aufnahme von Fettsäuren und Glucose in Adipozyten und stimuliert gleichzeitig die Lipolyse (41), während kompensatorisch erhöhte Insulin-Werte die Aufnahme von Fettsäuren in Hepatozyten und die Lipogenese stimulieren (42). In steatotischen Hepatozyten kann

TNF $\alpha$  u. U. Apoptose auslösen und induziert außerdem in verschiedenen Leberzellen IL6 und Chemokine, was die zentrale Rolle von TNF $\alpha$  bei der Rekrutierung von Immunzellen bei NASH betont (43). Auch die Aktivierung von Sternzellen wird durch TNF $\alpha$  ausgelöst (42).

Ein weiteres inflammatorisches Zytokin ist IL1 $\beta$ , das durch Aktivierung des sog. Inflammasoms freigesetzt wird (s. Kapitel 1.5). Erhöhte IL1 $\beta$ -Werte sind ein Risiko-Faktor beim metabolischen Syndrom und Polymorphismen im IL1 $\beta$ -Gen sind assoziiert mit NASH (44;45). Auch IL1 $\beta$  kann die Lipid-Akkumulation in Hepatozyten stimulieren und kann zusammen mit anderen Faktoren zum Zelltod führen (46). IL1 $\beta$  wirkt ebenfalls pro-fibrotisch, indem es in Sternzellen die Transkription von TGF $\beta$  und TIMP1 aktiviert (47;48). Auch die Plasma-Konzentration eines weiteren Zytokins, IL6, ist in NAFLD- und NASH-Patienten im Vergleich zu Patienten mit gesunder Leber erhöht (49). IL6 ist möglicherweise ebenfalls an der Insulin-Resistenz in Hepatozyten beteiligt, indem die intrazellulär aktivierten Signalwege die Weiterleitung des Insulinsignals hemmen (50).



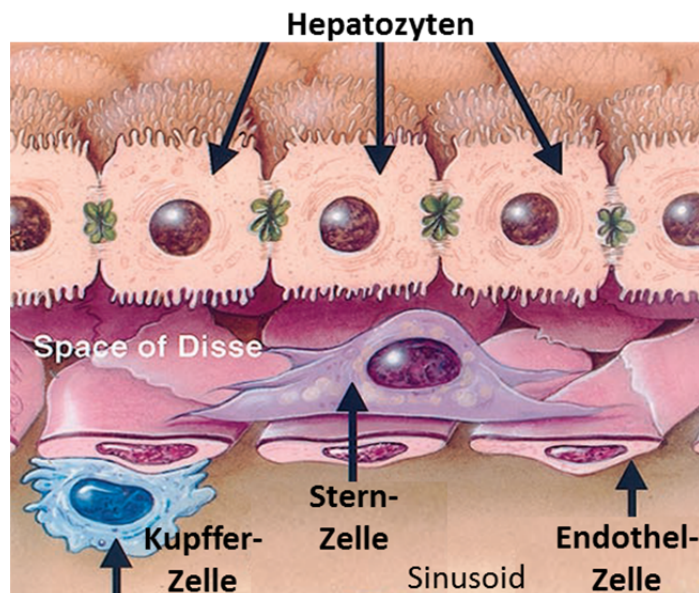
**Abb. 1.4: Aktivierung von Leber-Zellen durch Zytokine aus aktivierten Kupffer-Zellen.** Die Aktivierung des TLR4-Rezeptors von Kupffer-Zellen durch PAMPs oder DAMPs bewirkt die Induktion inflammatorischer Gene. Zytokine wie TNF $\alpha$  und IL1 $\beta$  stimulieren die Lipid-Akkumulation in Hepatozyten und pro-fibrotische Prozesse in Sternzellen und sind somit an der Pathogenese der NAFLD beteiligt. Die Induktion von Chemokinen bewirkt außerdem die Rekrutierung von Immunzellen (nicht gezeigt) (Abb. adaptiert nach (51)). PAMPs: *pathogen associated molecular patterns*, DAMPs: *damage associated molecular patterns*.

Histologisch wird der Zustand der Leber erst als entzündet bezeichnet, wenn Immunzellen das Gewebe infiltrieren. Chemokine bewirken diese Infiltration von Leukozyten zur Quelle der Chemokin-Sekretion entlang eines Konzentrationsgradienten. Im Gegensatz zu klassischen Zytokinen werden Chemokine auch von nicht-myeloiden Zellen der Leber sekretiert (52). CCL2 ist ein Chemokin, das die Infiltration von Makrophagen in das produzierende Gewebe stimuliert. In Patienten korreliert die CCL2-Expression im Fettgewebe mit dem BMI und die Serum-Spiegel sind bei Typ 2-Diabetes erhöht (53), was auch auf genetische und Diät-Mausmodelle mit NAFLD zutrifft (54;55). Die wichtige Rolle von CCL2 in der Leberentzündung zeigt sich auch daran, dass CCL2-defiziente Mäuse vor akuter Leberentzündung und Fibrose geschützt sind (56). Abgesehen von der Rekrutierung von Makrophagen, die wiederum in der chronisch entzündeten Leber aktiviert werden können, vermittelt

CCL2 auch die Lipid-Akkumulation in Hepatozyten, indem es die Lipid-Synthese stimuliert und die Sekretion in Form von VLDL hemmt (57). Die Rekrutierung von T-Zellen wird durch ein weiteres Chemokin, CXCL10, ausgelöst. Eine verstärkte Expression von CXCL10 in den Blutgefäßen der Leber (Sinusoide) und Hepatozyten ist mit einer erhöhten T-Zell-Infiltration bei chronischer Hepatitis assoziiert (58). Die Infiltration von T-Zellen trägt zur Leberschädigung bei, da u. a. Hepatozyten abgetötet werden.

#### 1.4 Beteiligung der Leberzellen an Entzündungsprozessen

Die mengenmäßig größte Zellpopulation der Leber sind die Hepatozyten, die das Parenchym bilden und wichtige Stoffwechsel-Funktionen ausführen, von der Energie-Speicherung (Kohlenhydrate in Form von Glycogen) und -Freisetzung (Lipide in Form von VLDL) über den Cholesteroll-Abbau bis zur Umwandlung und Ausscheidung von Giftstoffen. Etwa 20% der Zellen einer gesunden Leber sind jedoch nicht-parenchymale Zellen mit ebenfalls wichtigen Aufgaben. Die Hälfte dieses Anteils stellen die Endothelzellen der Leber, welche die Sinusoide begrenzen und auf deren Funktion in dieser Arbeit nicht weiter eingegangen wird. Auch die Lymphozyten (T-, B- und NK-Zellen), welche etwa ein Viertel der restlichen Zellen ausmachen, stehen hier nicht im Fokus. Einen sehr geringen Anteil (1% der nicht-parenchymalen Leberzellen) bilden die Sternzellen in der gesunden Leber, welche jedoch nach Aktivierung und Proliferation die für fibrotische Prozesse verantwortliche Zellpopulation sind. Den restlichen Teil nicht-parenchymaler Leberzellen (ca. 20%, d. h. ca. 4-5% der gesamten Leberzellen) stellen die Kupffer-Zellen (59), auf die hier näher eingegangen werden soll.



**Abb. 1.5: Lokalisation der Leber-Zellen.** Das Parenchym besteht aus Hepatozyten, die vom Sinusoid-Lumen durch ein fenestriertes Endothel abgegrenzt sind. In den Sinusoiden befinden sich Kupffer-Zellen, im Dissé-Raum zwischen Endothel und Parenchym sind die Stern-Zellen lokalisiert. (nach: (60), modifiziert)

Kupffer-Zellen wurden 1876 von Karl Wilhelm von Kupffer als distinkte Leberzellpopulation beschrieben und 1898 von Tadeusz Browicz als Gewebe-residente Makrophagen identifiziert (61). Als solche sind sie Teil des angeborenen Immunsystems, deren wichtigste Funktion, in Kombination mit ihrer Fähigkeit zur Phagozytose, die Präsentation aufgenommener Antigene ist. Die Leber hat eine

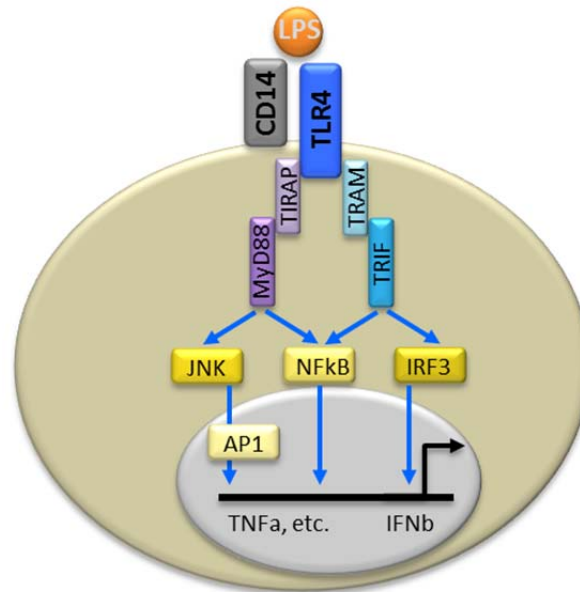
prominente Rolle bei der Aufnahme und Entgiftung von Toxinen und pathogenen Substanzen, da diese nach der Aufnahme über Magen und Darm im Blut über die Pfortader direkt in die Leber gelangen. Diese Aufgabe wird von den Kupffer-Zellen übernommen, deren Lokalisation in den Sinusoiden und der dort relativ langsamen Fließgeschwindigkeit des Blutes i. d. R. die effektive Phagozytose von Mikroorganismen und Endotoxinen ermöglicht. Ihre Aktivierung bewirkt die Bildung inflammatorischer Moleküle, die vermutlich maßgeblich mit an der Entzündung bei NAFLD beteiligt sind (62).

## 1.5 Aktivierung des angeborenen Immunsystems in der Leber

Der Kontakt mit pathogenen Substanzen (*pathogen associated molecular patterns*, PAMP) sowie z. T. mit durch Nekrose freigesetzten Molekülen (*damage associated molecular patterns*, DAMP) aktiviert Zellen über Ligation entsprechender Rezeptoren des angeborenen Immunsystems (63). Zu diesen gehören eine Reihe zytoplasmatischer, intravesikulärer sowie Zellmembran-gebundener Rezeptoren. In der gesunden Leber ist die Responsivität der Kupffer-Zellen aufgrund konstanter Exposition gegen niedrige PAMP-Konzentrationen und damit einhergehenden Toleranz-Mechanismen gering. Bei einer Infektion können diese Rezeptoren jedoch effektiv aktiviert werden (64).

Ein prominentes Beispiel eines zytoplasmatischen Rezeptors, dessen Beteiligung an der chronischen Entzündung bei NASH in verschiedenen Studien gezeigt wurde, ist *NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3* (NLRP3) als aktivierbare Komponente des sog. Inflammasoms. Dieser intrazelluläre Rezeptor des angeborenen Immunsystems wird u. a. in Makrophagen bei der Phagozytose von Makromolekülen aktiviert, wenn diese z. B. aufgrund ihres kristallinen Charakters die Phagolysosom-Membran zerstören, wie für Cholesterolkristalle gezeigt wurde (65). Inflammasom-Aktivierung führt über eine Caspase-Kaskade zur proteolytischen Spaltung der Vorstufen von u. a. IL1 $\beta$ , welches daraufhin sekretiert wird und am Entzündungsprozess, auch im metabolischen Kontext, beteiligt ist (s. 1.3.2).

Die Induktion der Transkription des IL1 $\beta$ -Gens erfordert die Aktivierung einer anderen Klasse von Rezeptoren, von denen der *Toll-like* Rezeptor (TLR) 4 am besten untersucht ist und welcher vielleicht eine noch prominentere Rolle als NLRP3 in der Fettleber-assoziierten Leberentzündung spielt. Der bekannteste Ligand des TLR4 ist Lipopolysaccharid (LPS), eine Komponente der Zellwand Gramnegativer Bakterien (s. 1.3.1). Die Bindung von LPS an einen Komplex aus TLR4 und den Corezeptoren CD14 und MD2 aktiviert eine intrazelluläre Signalkaskade, die in der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren *nuclear factor- $\kappa$ B* (NF $\kappa$ B), *activator protein 1* (AP1) und *interferon regulatory factor 3* (IRF3) resultiert, welche die Transkription responsiver Gene für eine entsprechende Immunreaktion, darunter auch pro-inflammatorische Zytokine, induzieren (66).



**Abb. 1.6: Übersicht des TLR4-Signalwegs.** Die Aktivierung von TLR4 durch LPS erfordert den Corezeptor CD14 sowie Cofaktoren (MD2 und LBP, nicht gezeigt). Intrazellulär werden zwei Signalwege, MyD88-abhängig und TRIF-abhängig, durch Rekrutierung von Adapterproteinen (TIRAP bzw. TRAM) aktiviert. Durch Aktivierung der gezeigten Transkriptionsfaktoren kommt es zur Expression entsprechender, teilweise überlappender Zielgene, die an der Initiation einer Immunantwort beteiligt sind.

Die Aktivierung von Kupfer-Zellen über TLR4 bewirkt die Bildung diverser Zytokine, u. a. TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$  und IL6, sowie auch TGF $\beta$ , welches hepatische Sternzellen aktiviert und so eine fibrotische Antwort auslösen kann. Die Beteiligung von TLR4 an der Entstehung von NASH wurde in verschiedenen Tiermodellen gezeigt. So wurde beobachtet, dass in der NASH, die in einem Fütterungsmodell ausgelöst wird, die LPS-Responsivität erhöht ist und zu verstärkter Bildung von Zytokinen führt (67). TLR4-defiziente Mäuse in diesem Modell haben dagegen reduzierte Steatose-Werte, niedrigere TNF $\alpha$ - und IL1 $\beta$ -Werte und zeigen eine reduzierte Expression von Fibrose-Markern (68;69). Auch genetisch adipöse Mäuse mit Lebersteatose zeigen höhere LPS-Responsivität und entwickeln NASH nach Injektion einer geringen LPS-Dosis (70;71). Die Behandlung dieses genetischen Mausmodells mit Probiotika reduziert wiederum den Grad der NASH, was die Beteiligung der Darmflora an der Leberentzündung unterstreicht (72;73). Auch in einem kombinierten NASH-Modell (ApoE-Defizienz und Fütterung einer Hochfett-Cholesteroldiät) mit und ohne TLR4-Defizienz bestätigte sich die wichtige Rolle von TLR4 an den induzierten Entzündungsprozessen (74).

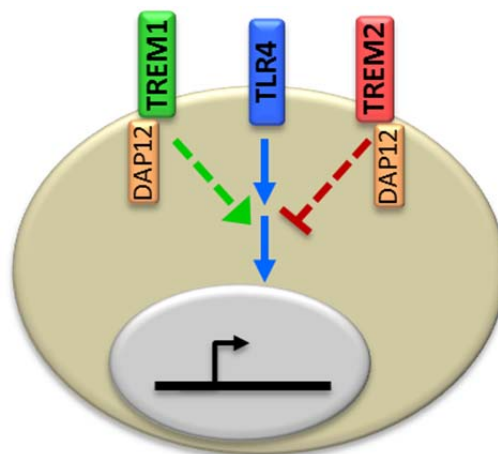
## 1.6 Modulation von TLR-Signalen

Die zentrale Rolle von TLR-Signalen bei der Auslösung einer Entzündungsreaktion und die mögliche Stärke einer solchen Antwort (z. B. septischer Schock) zeigen, wie wichtig die Regulation der beteiligten Signalwege ist, um eine überschießende Antwort und eine damit verbundene Gefahr für den Organismus zu vermeiden. Die Regulation des TLR4-Signalweges erfolgt auf verschiedenen Ebenen, von der Sequestrierung des Rezeptor-Komplexes von der Zellmembran (75) bis zur Induktion der Expression von negativen Regulatoren als Rückkopplungsmechanismus (76). Zu letzteren gehört u. a. A20 (auch: TNF $\alpha$ -induced protein 3, TNFAIP3), das durch Modifikation des TRAF6-Proteins in der Signalkette im Zytosol die Signalweiterleitung in den Zellkern hemmt. Die Wichtigkeit dieses

Modulators zeigt sich an der lethalen Entzündung nach TLR-Aktivierung in A20-defizienten Mäusen (77). Der zyttoplasmatische Regulator IL1-Rezeptor-assoziierte Kinase M (IRAK-M) bewirkt, dass das strukturell verwandte IRAK1-Molekül vom Rezeptor-Komplex dissoziieren kann und hemmt so die Signalweiterleitung bereits am Anfang der Signalkaskade. In einer Studie wurde gefunden, dass Monozyten zirrhotischer Patienten keine IRAK-M-Induktion zeigen und gleichzeitig LPS-sensitiver sind (78). SIGIRR (*single Ig IL-1-related receptor*), ein Plasmamembran-verankertes Protein, hemmt das TLR4-Signal vermutlich dadurch, dass es gemeinsame Adapter-Moleküle sequestriert. SIGIRR-defiziente Mäuse haben einen ähnlichen Phänotyp wie A20-defiziente Tiere, mit verstärkten proinflammatorischen Reaktionen (79). Dieser kurze Überblick deutet die Komplexität der Entzündungsregulation bereits an. Neben den genannten gibt es eine Vielzahl weiterer TLR-Modulatoren, von denen die zwei im Folgenden vorgestellten in dieser Arbeit untersucht wurden.

### 1.7 Triggering Receptors Expressed on Myeloid cells

Die *Triggering Receptors Expressed on Myeloid cells*, TREM1 und TREM2, gehören zur Immunglobulin-Superfamilie und enthalten eine einzelne Immunglobulin-Domäne des variablen Typs im extrazellulären Teil des Proteins. TREMs sind über eine Transmembrandomäne in der Zellmembran verankert, die zyttoplasmatische Domäne ist nur kurz und beinhaltet keine Motive zur Signalweiterleitung. Stattdessen assoziieren TREMs durch Wechselwirkungen ihrer positiv geladenen Transmembrandomäne mit dem Signaladapter-Protein DAP12, das essenziell für die Zelloberflächenlokalisierung sowie für die Initiation einer intrazellulären Signaltransduktion ist. DAP12 beinhaltet ein sog. Immunrezeptor Tyrosin-basiertes Aktivierungsmotiv (ITAM), welches nach der Ligation des assoziierten Rezeptors phosphoryliert wird. Eine anschließende Signalkaskade resultiert in der Aktivierung von Proteinkinase B, Proteinkinase C, und Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPKs), mit verschiedenen resultierenden Effekten von der Veränderung des Zytoskeletts bis zur Aktivierung der Gentranskription (80;81).



**Abb. 1.7: Modulation von TLR-Signalen durch TREM1 und TREM2.** TREMs sind Rezeptoren in der Plasmamembran, die zur Signalweiterleitung intrazellulär jeweils mit DAP12 assoziieren. Trotz desselben Signaladapterproteins hat TREM1 einen amplifizierenden, TREM2 dagegen einen attenuierenden Effekt auf TLR-Signale. Die molekularen Mechanismen dieser Modulation sind bislang jedoch ungeklärt.



### 1.7.1 TLR-Signal-Verstärkung durch TREM1

TREM1 wurde im Jahr 2000 zuerst auf Neutrophilen und Monozyten beschrieben (82) und hat verstärkende Wirkung auf inflammatorische Signale. So wirkt die Aktivierung von TREM1 zusammen mit der Aktivierung von TLRs synergistisch, d. h. die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine ist bei gleichzeitiger Rezeptor-Ligation höher als die Summe der Sekretion bei der Aktivierung von jeweils nur einem Rezeptor. (82;83). Eine physiologische Relevanz zeigt sich daran, dass verschiedene Studien eine wichtige Funktion von TREM1 beim Krankheitsbild der Sepsis gefunden haben. So sind TREM1-defiziente Mäuse resistent gegen eine für Wildtyp-Tiere lethale Endotoxin-Dosis (84). *In vivo* Experimente mit einem blockierenden TREM1-Fusionsprotein zeigten, dass dessen Einsatz in murinen Endotoxämie-Modellen in einer Reduktion des Ausmaßes der Entzündung und einer verbesserten Überlebensrate resultiert (85).

Einem positiven Rückkopplungsmechanismus entsprechend wird die Expression dieses Signalverstärkers bei einer Sepsis stark induziert, wobei LPS die entsprechende stimulierende Substanz ist (86). Parallel zur Induktion der TREM1-Expression auf Neutrophilen und Monozyten bei der Sepsis kommt es im Plasma auch zu erhöhten Konzentrationen einer löslichen Variante, sTREM1 (*soluble* TREM1). Die Behandlung mit einem synthetischen sTREM1-Peptid bewirkte *in vitro* eine Reduktion pro-inflammatorischer Zytokine und im Mausmodell eine verbesserte Überlebensrate, sodass sTREM1 scheinbar als *decoy*-Rezeptor wirkt und dadurch eine anti-inflammatorische Funktion besitzt (87).

Die TREM1-Expression ist nicht, wie in den ersten Studien beschrieben, auf myeloide Zellen beschränkt: TREM1-mRNA konnte neben Leber-Makrophagen auch in Leber-Endothelzellen nachgewiesen werden, ebenso wie die Induzierbarkeit der TREM1-Expression in diesen Zellen bei akuter Endotoxämie (88). Auf molekularer Ebene binden die Transkriptionsfaktoren PU.1, AP1 und RelA (eine Komponente von NFκB) an den TREM1-Promoter und regulieren somit das TREM1-Gen (89). Die basale TREM1-Expression wird von CEBPα und NFκB reguliert und diese Transkriptionsfaktoren sind, wie AP1, auch an der LPS-vermittelten Induktion beteiligt (90).

Die Frage nach dem oder den TREM1-Liganden ist noch nicht eindeutig beantwortet, obwohl Bindungsstudien gezeigt haben, dass ein TREM1-Bindungspartner auf Bakterien vorhanden ist (91). Ein endogener Ligand befindet sich möglicherweise auf (humanen) Blutplättchen (92). Als weitere potentielle endogene Liganden werden auch die Proteine HMGB1 und HSP70 genannt, welche von nekrotischen Zellen freigesetzt werden und für die gezeigt wurde, dass sie eine LPS-induzierte Zytokinsekretion TREM1-abhängig verstärken (93).

### 1.7.2 TLR-Signal-Hemmung durch TREM2

TREM2 wurde im Jahr 2002 zunächst bei einem genetischen Screening von Patienten mit der Nasu-Hakola-Krankheit beschrieben: Patienten mit dieser rezessiv vererbten Krankheit, die sich mit Knochen-Zysten und präseniler Demenz manifestiert, haben eine *loss of function*-Mutation im TREM2-Gen (94). Alternativ zeigen sich die gleichen Krankheitssymptome bei Patienten mit einer Mutation im DAP12-Gen (95), was die funktionelle Zusammenwirkung der beiden Moleküle zeigt. Die Symptome der Nasu-Hakola-Krankheit lassen sich mit Defekten der Phagozytosefunktion in den myeloiden Zellen des Knochens (Osteoklasten) und des Gehirns (Microglia) erklären, wodurch die Knochenresorption (96) bzw. die phagozytotische Entfernung apoptotischer Neuronen (97) gestört

sind. Dies ist vermutlich auch die Ursache für die Assoziation einer Punktmutation im TREM2-Gen mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer Alzheimer-Erkrankung, wie kürzlich gezeigt wurde (98;99). Des Weiteren ist im Mausmodell für Multiple Sklerose die TREM2-Expression erhöht, und die Antagonisierung dieses Rezeptors verstärkt den Krankheitsverlauf (100).

In Knochenmark-abgeleiteten Makrophagen, in denen die TREM2-Expression durch shRNA reduziert wurde, zeigte sich eine verstärkte TNF $\alpha$ -Sekretion nach TLR-Stimulation (101). Und auch Knochenmark-abgeleitete Makrophagen aus TREM2-defizienten Mäusen sekretieren größere Mengen der pro-inflammatorischen Zytokine TNF $\alpha$  und IL6 nach Stimulation der Zellen mit verschiedenen TLR-Liganden (102), sodass auf eine inhibierende Funktion von TREM2 auf die TLR-vermittelte Makrophagen-Aktivierung geschlossen wurde. *In vivo* zeigte sich, dass es bei TREM2-defizienten Mäusen, die keinen Phänotyp unter normalen Haltungsbedingungen haben, bei Verletzungen der Darmschleimhaut nur zur unvollständigen Wundheilung kommt, da am Entzündungsherd im Vergleich zu Wildtyp-Tieren vermehrt pro-inflammatorische Zytokine wie TNF $\alpha$  und weniger anti-inflammatorische Zytokine gebildet werden (103).

TREM2 wird nicht von zirkulierenden Monozyten, jedoch von dendritischen Zellen und rekrutierten, differenzierten Makrophagen, Mikroglia im Gehirn, sowie von Makrophagen der Leber und Leber-Endothelzellen, zumindest auf mRNA-Ebene, exprimiert. Die Transkriptionsfaktoren, welche die TREM2-Expression regulieren, sind bisher noch nicht identifiziert. Dem Konzept alternativer im Gegensatz zu klassischer Makrophagen-Aktivierung folgend, ist die Expression von TREM2 mit dem eher anti-inflammatorischen M2-Makrophagen-Subtyp assoziiert, da die TREM2-Expression durch das alternativ aktivierende Zytokin IL4 induziert wird (102). Entsprechend dieser entgegengesetzten Funktion ist auch die Regulation der Expression invers zu der von TREM1: so führt eine Stimulation von Makrophagen mit LPS zur Verringerung der TREM2-Transkription (104) sowie -Expression auf der Zelloberfläche (102).

Die Identität des oder der TREM2-Liganden ist bisher nicht geklärt. Eine Studie hat nahegelegt, dass TREM2 eine Bindungsaffinität zu verschiedenen polyanionischen mikrobiellen Substanzen hat (105), wobei eine Aktivierung durch letztere noch nicht nachgewiesen werden konnte. Auch die Möglichkeit eines endogenen Liganden ist zu vermuten, konnte bisher aber noch nicht eindeutig bewiesen werden. Obwohl die Funktion für inflammatorische Prozesse noch nicht geklärt ist, gilt jedoch der Transmembranrezeptor Plexin-A1 als Bindungspartner von TREM2. Die Bindung des Liganden Semaphorin 6D an seinen Rezeptor Plexin-A1 löst DAP12-abhängige Signalwege aus (106), woran TREM2 beteiligt ist. Plexin-Semaphorin-Interaktionen sind u. a. wichtig für die Knochen-Homöostase, die auch durch TREM2 und DAP12 reguliert wird (96).

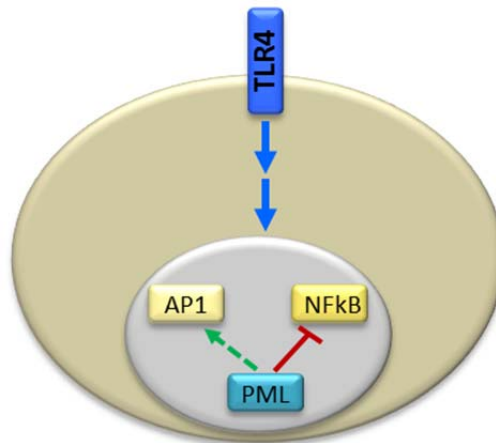
## 1.8 PML als Stress-Regulator

Eine weitere Möglichkeit der zellulären Modulation von TLR-Signalen kann auf der Ebene der Regulation transkriptioneller Prozesse im Zellkern erfolgen. Eine mögliche Rolle könnten PML-Kerndomänen spielen, die als eine nukleäre Plattform zur Modulation diverser Stress-Signale angesehen werden. Diese Kerndomänen sind supramolekulare Protein-Komplexe, die lichtmikroskopisch sichtbar gemacht werden können. Die Anzahl der Kerndomänen ist variabel und abhängig vom Gewebe bzw. Zelltyp sowie vom Differenzierungs- und Aktivierungsgrad. Zellen des

Immunsystems zeigen beispielsweise eine starke PML-Expression und in entzündetem Gewebe sowie in Tumoren ist diese erhöht (107). Das promyelozytische Leukämie-Protein (PML) ist der essentielle Bestandteil der hochmolekularen Protein-Komplexe, die sich in den Zellkernen fast aller Säugerzelltypen finden. Es existieren mindestens sieben Isoformen des PML-Proteins mit Molekulargewichten von 48-97 kDa, die durch alternatives Spleißen entstehen. Sie beinhalten jeweils das sog. RBCC-Motiv, das die homo-Multimerisierung und dadurch Bildung makromolekularer Komplexe ermöglicht. Je nach Spleißvariante unterscheidet sich die Lokalisation der Isoformen, die sich außer in Kerndomänen auch im Nukleoplasma und im Zytoplasma befinden können. Dadurch können sich die Isoformen auch in ihren Interaktionspartnern und der funktionellen Spezifität unterscheiden (108;109).

Die mit den PML-Kerndomänen assoziierenden Proteine haben vielfältige Funktionen, die vermutlich durch ihre Lokalisation und u. U. Modifikation in den Kerndomänen koordiniert werden. Die Regulation der Apoptose durch Regulation des Tumor-Suppressors p53 beispielsweise ist gut aufgeklärt: dieser Tumor-Suppressor wird aktiviert, indem p53 in PML-Kerndomänen rekrutiert und dort acetyliert und phosphoryliert wird. Diese und ähnliche Prozesse werden durch zellulären Stress und / oder DNA-Schäden ausgelöst, indem Stress-Kinasen aktiviert werden und daraufhin PML modifizieren, was eine Veränderung der interagierenden Proteine in den Kerndomänen zur Folge hat (110). Neben der Regulation von p53 interagieren beispielsweise auch CBP (CREB bindendes Protein) und eIF4 (*eukaryotic initiation factor*) mit PML-Kerndomänen. Am Beispiel der CBP-Interaktion lässt sich die Wirkung von PML auf Transkriptionsprozesse veranschaulichen: CBP ist (aufgrund intrinsischer Histonacetyltransferase-Aktivität, welche die Dekondensation von Chromatin bewirkt) ein Coaktivator verschiedener Transkriptionsfaktoren inklusive des Glucocorticoid-Rezeptors. Die Aktivierung Glucocorticoid-responsiver Gene erfordert PML-Kerndomänen. Obwohl keine direkte Interaktion zwischen dem Glucocorticoid-Rezeptor und PML stattfindet, ist die Rekrutierung des Coaktivators CBP in PML-Kerndomänen für die Aktivierung des Rezeptors notwendig (111). CBP ist auch ein Coaktivator für weitere Transkriptionsfaktoren wie Jun, Fos und verschiedene *signal transducers and activators of transcription* (STATs), sodass auch hier ein Effekt von PML zu vermuten ist, was bereits für Fos gezeigt wurde (112). Die Coaktivator-Funktion von CBP bei p53-abhängigen Prozessen erklärt auch die Beteiligung von PML an p53-abhängiger Apoptose, da PML den Komplex aus Transkriptionsfaktor und Coaktivator stabilisiert (113).

Neben Histonacetyltransferasen interagiert PML auch mit Histon-Deacetylasen, welche durch Chromatin-Kondensation die Transkription reprimieren (114). Auch an diesen Prozessen sind vermutlich weitere Faktoren beteiligt, die aufgrund der Komplexität der Transkriptionsregulation bisher nicht vollständig aufgeklärt sind. Es wurde jedoch bereits gezeigt, dass PML die Induktion von Zielgenen des für Entzündungsprozesse wichtigen Transkriptionsfaktors NFκB hemmt: indem PML mit einer NFκB-Untereinheit interagiert, wird dessen Bindung an entsprechende responsive Elemente behindert und damit die transkriptionelle Aktivität reduziert (115). Diese inhibierende Funktion von PML auf die Funktion des Transkriptionsfaktors NFκB steht im Gegensatz zu der aktivierenden Wirkung von PML auf AP1-abhängige Transkriptionsprozesse und ist in Abb. 1.8 schematisch dargestellt. Beide Transkriptionsfaktoren werden u. a. von TLRs aktiviert (s. Abb. 1.6), sodass sich die Effekte theoretisch aufheben könnten. Kürzlich wurde jedoch gezeigt, dass PML-defiziente Mäuse resistent gegen eine lethale LPS-Dosis sind, sodass in diesem Kontext die aktivierende Funktion auf pro-inflammatorische Signale überwiegt (116).



**Abb. 1.8: Modulation inflammatorischer Transkriptionsfaktoren durch PML.** In PML-Kerndomänen werden transkriptionelle Prozesse verschiedener Art moduliert. Für eine Komponente des Transkriptionsfaktors AP1 wurde eine aktivierende, für eine NFκB-Komponente dagegen eine inhibierende Wirkung von PML beschrieben.

Die in den letzten Abschnitten beschriebene komplexe Regulation verschiedener Stress- und Entzündungsprozesse zeigt deren Wichtigkeit sowohl für die einzelne Zelle als auch den gesamten Organismus. Nur durch die feinschichtige Modulation kann ein Gleichgewichtszustand erhalten bzw. nach Veränderung der äußeren Bedingungen eine Homöostase wiederhergestellt werden. Diese Aspekte sind im Rahmen der vorliegenden Arbeit im Zusammenhang mit der PML- und TREM-Expression näher untersucht worden.

# ZIELE DER ARBEIT

---

In dieser Arbeit sollten Aspekte der nicht-alkoholischen Fettleber-Erkrankung (NAFLD) untersucht werden. Die Pathologie der NAFLD scheint eng mit der Synthese und Speicherung neuer Lipide verknüpft zu sein. Zur Prüfung dieser Hypothese sollte die *de novo* Lipogenese (DNL) als Steatose-begünstigender Faktor näher untersucht werden. Die Analyse der Veränderung und Regulation entsprechender lipogener Prozesse in den beiden wichtigsten DNL-Organen Fettgewebe und Leber erfolgte in einem Patienten-Kollektiv mit einem breiten Spektrum der Erkrankung. Chronische Entzündungsprozesse sind an der Pathogenese und Aufrechterhaltung metabolischer Erkrankungen beteiligt. Die Regulation dieser Prozesse und Assoziationen mit dem Krankheitsgrad sollten mit Hilfe von Mausmodellen untersucht werden, um mögliche neue Angriffspunkte zwischen Fettleber und Leberentzündung zu identifizieren.

Zur Analyse der Regulation chronischer metabolischer Entzündung durch den intrazellulären Stress-Modulator PML sowie durch die Modulatoren extrazellulär aktivierter inflammatorischer Signalwege, TREM1 und TREM2, wurden Fütterungsmodelle zur Induktion einer NAFLD durchgeführt. Die Effekte einer Defizienz der jeweiligen Proteine sollte neben chronischen Modellen durch Fütterung auch in akuten Lipid-vermittelten Entzündungsmodellen charakterisiert werden.

## 2 METHODEN

---

### 2.1 Biochemische Reagenzien

Alle Chemikalien wurden von den Herstellern Sigma-Aldrich, Merck oder Roth bezogen, sofern nicht anders angegeben. Zellkultur-Medien und -Lösungen stammen von Invitrogen.

### 2.2 Human-Studien

Die humanen Leber- und Fettgewebeproben wurden im Universitätsklinikum Ulm im Zeitraum von 2002-2010 mit dem Einverständnis der Patienten während bariatrischer Operationen bzw. während abdomineller Operationen zur Behandlung von Sigmadivertikulitis und Darmkrebs entnommen. Die Messung der klinischen und Plasma-Parameter, die H&E-Färbung der Leber-Biopsien sowie die pathologischen Diagnosen wurden ebenfalls im Universitätsklinikum Ulm durchgeführt. Die Analyse der Daten und der Gewebeproben erfolgte in Kooperation mit Dr. U. Knippschild und Dr. A. M. Wolf.

### 2.3 Zellkultur

#### 2.3.1 HepaRG-Zelllinie

Die humane Hepatom-Zelllinie HepaRG wurde in William's E + GlutaMAX (GIBCO) mit Zusatz von 10% FBS-Gold, 2% Antibiotic-Antimycotic und Supplementation von Hydrocortison (5 µg/mL) und Insulin (100 µg/mL) kultiviert. Die lentiviral stabil transduzierte Zelllinie wurde freundlicherweise von Dr. Hüseyin Sirma zur Verfügung gestellt.

#### 2.3.2 Isolation und Kultur von primären murinen Kupffer-Zellen und sinusoidalen Endothelzellen

Nichtparenchymale Leberzellen (Kupffer-Zellen und sinusoidale Endothelzellen) wurden aus den Lebern von 8-12 Wochen alten Mäusen isoliert, indem durch die Pfortader mit einer Collagenase-Lösung (Collagenase NB4G, Serva, 0,05% in GBSS) perfundiert und die entnommenen, zerkleinerten Lebern im Schüttelwasserbad verdaut wurden (30 min). Die Suspension wurde durch ein Sieb (100 µm) gestrichen und die Parenchymzellen mittels Zentrifugation (2x 4 min, 40x g) entfernt. Die nichtparenchymalen Zellen wurden pelletiert (10 min, 430x g) und die Erythrozyten durch ACK-Lyse entfernt. Die Zellen wurden mit einem Optiprep-PBS-Gradienten (25 min ohne Bremse, 400x g) in der Interphase angereichert und anschließend in MACS-Puffer (0,5 mM EDTA, 0,5% BSA in PBS) mit Maus-IgG (15 min, 4°C) und mit Fc-Block (eBioscience) (10 min, 4°C) inkubiert. Kupffer-Zellen wurden durch Inkubation mit APC-gekoppeltem F4/80-Antikörper (15 min, 4°C), mit anti-APC magnetic beads (Miltenyi Biotec) (15 min, 4°C), und einer Säule im Magnetfeld (Miltenyi Biotec) als F4/80-positive Fraktion eluiert. Sinusoidale Endothelzellen wurden durch Inkubation mit anti-CD146 magnetic beads und mit Hilfe einer Säule im Magnetfeld isoliert. Die so erhaltenen Zellen wurden in einer Dichte von

$2,5 \times 10^5$  Zellen in collagenisierten 96-well-Zellkulturplatten in RPMI 1640 (10% FCS, 2% Antibiotic-Antimycotic) ausgesetzt und über Nacht (18 h für Zytokin-Sekretion) oder an Tag 1 (4 h für RNA-Expression) stimuliert. Die Stimulation erfolgte in Kulturmedium mit 10 ng/mL LPS.

### 2.3.3 Isolation von primären murinen Hepatozyten

Primäre murine Hepatozyten wurden aus Lebern von 8-12 Wochen alten Mäusen isoliert, indem die Leber für ca. 1 h über die Pfortader mit einer EDTA-Lösung (0,14 M NaCl, 5 mM KCl, 0,8 mM  $MgCl_2$ , 1,6 mM  $Na_2HPO_4$ , 0,4 mM  $KH_2PO_4$ , 2,1 g/L  $NaHCO_3$ , 0,745 g/L EDTA, 2,97 g/L Glucose, 0,846 g/L Lactat, 0,022 g/L Pyruvat, sterilfiltriert, pH 7,4) perfundiert wurde. Die Hepatozyten wurden in Kulturmedium (DMEM-GlutaMAX, 10% FCS, 2% Antibiotic-Antimycotic) aufgenommen und pelletiert (28 g, 4 min, langsame Beschleunigung und Bremsung). Die verbliebenen nichtparenchymalen Zellen wurden durch einen Percoll-Gradienten entfernt, die Hepatozyten in Kulturmedium resuspendiert und mit einer Dichte von  $10^5$  Zellen / 24-well ausgesetzt und über Nacht (18 h für Zytokin-Sekretion) oder an Tag 1 (4 h für RNA-Expression) stimuliert. Die Stimulation erfolgte in Kulturmedium mit 10 ng/mL und 1  $\mu$ g/mL LPS.

### 2.3.4 Isolation von primären murinen Sternzellen (HSC)

Die HSC wurden freundlicherweise von Nina Günther, AG Dr. Johannes Kluwe (UKE), durch Collagenase-Pronase Perfusion der Leber und Anreicherung über einen Nycodenz-Gradienten isoliert (117), mit LPS (10 ng/mL und 1  $\mu$ g/mL) stimuliert und die lysierten Zellen für Expressionsanalysen zur Verfügung gestellt.

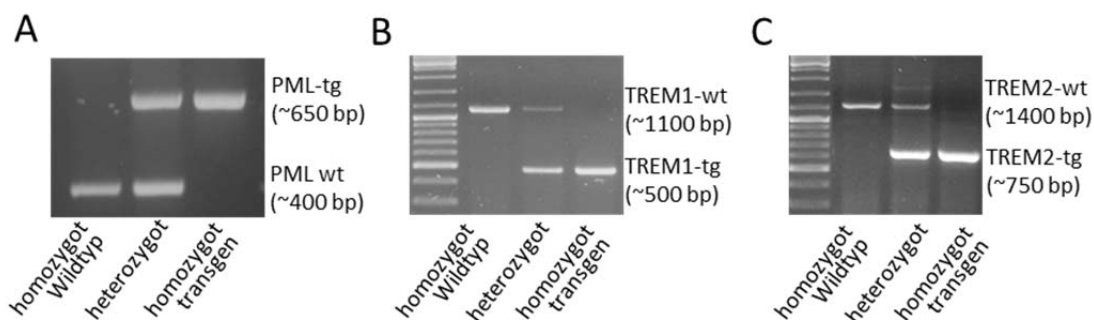
## 2.4 Zytokin-Konzentrationsbestimmung mittels ELISA

Die Konzentration sekretierter Zytokine wurde mit Hilfe von *capture*- und Detektionsantikörpern aus kommerziellen Kits (DuoSet, R&D) im Zellkultur-Überstand bestimmt. Dazu wurden MaxiSorb-Microtiterplatten (Nunc) mit dem ersten Antikörper über Nacht beschichtet, nicht belegte Bindungsstellen mit BSA (1% in Waschpuffer) blockiert und 2 h mit den Proben inkubiert. Die Detektion erfolgte mit entsprechenden Peroxidase-gekoppelten Antikörpern und einer TMB-Substratlösung (KPL). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,5 M  $H_2SO_4$  (0,5x Volumen) gestoppt und die Intensität bei einer Wellenlänge von 450 nm ausgelesen. Als Standard zur Quantifizierung diente eine Verdünnungsreihe des entsprechenden rekombinanten Proteins.

## 2.5 Genotypisierung

Die Genotypisierung transgener Mäuse erfolgte durch eine jeweils spezifische PCR (PCR-Puffer, DMSO,  $MgCl_2$ , dNTPs, spezifische Primer, Taq-Polymerase; alles Fermentas) aus Schwanzbiopsie-Lysaten (Proteinase K [Fermentas] in Lyse-Puffer [PeqLab]). Durch ein Primer-Paar, das vor und nach dem potentiellen Insertionslokus bindet sowie einem weiteren Primer, der einen Teil der transgenen Sequenz erkennt, ergaben sich PCR-Produkte spezifischer Größe, welche mittels Agarose-

Gelelektrophorese aufgetrennt und durch den DNA-Farbstoff RotiSafe (Roth) unter UV-Licht sichtbar gemacht wurden. Für die Genotypisierung der PML-defizienten und Wildtyp-Mäuse waren dies folgende Primer: mPML-F1 TTTCAAGTTTCTGCGCTGCC, PML-F2-neo ACCACCAAGCGAAACATCG, mPML-R1 TTGACTTGCGCGTACTGTC. Die TREM1-Genotypisierung erfolgte mit den Primern for-Trem1-wt CCTCATGCAGTTGGAAATTCTGC, rev-Trem1 GTACCATCCAGGAGAAGGACAAGAGG, for-3'-Uni-Neo GCAGCCTCTGTTCCACATACACTTCA. TREM2-defiziente und -Wildtyp-Mäuse wurden mit den Primern for-Trem2 CTTAGACCCCCTGGCAGTGACT, rev-Trem2 CAGGTTTATCATTGTCCTCAGCCTGC und for-3'-Uni-Neo GCAGCCTCTGTTCCACATACACTTCA identifiziert. Das Protokoll der *touchdown*-PCR beinhaltete 35-40 Zyklen mit jeweils individuellen Annealing-Temperaturen (PML: 57°C, TREM1: 58°C, TREM2: 62°C). Die PCR-Produkte wurden mittels Elektrophorese in einem Agarose-Gel aufgetrennt und ausgewertet. Exemplarische Gele sind in Abb. 2.1 gezeigt.



**Abb. 2.1: Genotypisierung transgener und Wildtyp-Tiere mittels PCR.** A, exemplarisches Agarose-Gel mit PCR-Produkten der PML-PCR. B, PCR-Produkte von homozygoten und heterozygoten TREM1-Wildtyp- und transgenen Tieren und C, exemplarische Ergebnisse entsprechender TREM2-Mäuse. tg, transgen, wt, Wildtyp.

## 2.6 Mausmodelle und Diäten

Die Tierexperimente wurden mit Genehmigung des Tierschutzkomitees des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf und der Behörde für Wissenschaft und Gesundheit (Stadt Hamburg) durchgeführt. PML<sup>-/-</sup> Mäuse (118), und C57Bl/6J Wildtyp-Tiere sowie TREM1<sup>-/-</sup> und TREM2<sup>-/-</sup> Mäuse (KOMP, *knockout mouse project*, USA) und die entsprechenden C57Bl/6 Wildtypen wurden unter einem 12 h Tag / Nacht-Zyklus gehalten. Die Fütterungsstudie mit PML<sup>-/-</sup> Mäusen wurde mit der Hochfettdiät (HFD) BioServ F3283 (35% w/w Fett) ad libitum für 24 Wochen, beginnend in einem Alter von 4 Wochen, durchgeführt. Die Fütterungsstudien mit TREM<sup>-/-</sup> Mäusen wurden einerseits mit der Hochfett-, -Cholesterol-, und -Sucrose-Diät (HFCSD), Ssniff S8301-E020 (21% Butter, 0,2% Cholesterol, 35,5% Sucrose) und andererseits mit der Hochfett-Kohlenhydrat-Diät (HFHCh) (119), OpenSource Diets D12331 (35,8% Fett) und mit Zusatz von Glucose und Fructose (41 g/L, 45% bzw. 55%) im Trinkwasser ad libitum für 16 Wochen, beginnend in einem Alter von 8 Wochen, durchgeführt.



## 2.7 Plasma-Analyse

Vor Sakrifizierung zur Organentnahme wurden die Tiere 4 h gefastet. Triglyzeride und Cholesterol im Plasma wurden mit kommerziellen Kits (Roche) bestimmt. Die Konzentration des Leber-Enzyms ALT wurde freundlicherweise von Benjamin Claaß, AG Dr. Gisa Tiegs (UKE), mit einem Cobas Mira-Gerät (Roche) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Messung der Insulin-Konzentration erfolgte mit einem ELISA-Kit (Chrystal.Chem). Die LPS-Konzentration in Serum und isolierten TRL wurde mit dem LAL-Kit (Hycultech) ermittelt.

Zur Bestimmung der oralen Glucosetoleranz (OGTT) wurden 1,5 mg/g Körpergewicht in 200 µL NaCl (0,9%) nach 4 h Fasten mit Hilfe einer Schlundsonde verabreicht und die Blutglucose-Konzentration wurde zu den angegebenen Zeitpunkten mit AccuCheck-Aviva-Teststreifen (Roche) gemessen.

## 2.8 Isolation und Markierung von Lipoproteinen

Triglyzerid-reiche Lipoproteine (TRL: Chylomikronen und VLDL) wurden aus humanem hyperlipämischem Plasma isoliert, indem mit KBr eine Dichte von 1,21 eingestellt wurde. Diese wurde in Polyallomer-Röhrchen (für SW32-Rotoren, Beckmann) unter eine Dichtelösung ( $\rho = 1,006$  g/mL, KBr in 0,9% NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,6) geschichtet und in der Ultrazentrifuge zentrifugiert (20.000 rpm, 2 h). Die Triglyzerid-reichen Lipoproteine mit einer Dichte  $<1,006$  sammeln sich so an der Oberfläche und können abgenommen und bei 4°C gelagert werden. Vor der Verwendung wurden sie nochmals mit KBr versetzt, unter PBS geschichtet und zentrifugiert.

Zur Visualisierung der TRL-Aufnahme wurden diese Partikel mit DiD (Invitrogen) markiert, indem die Lipoproteine 3 h mit dem Farbstoff (250 µg/mL) inkubiert wurden (30°C, 300 rpm). Reste des Farbstoffs wurden mittels PD10-Säule (GE Healthcare) entfernt. Triglyzerid-reiche, mit fluoreszierenden Nanopartikeln (Quantum Dots) markierte rekombinante Lipoproteine wurden nach der Methode von Bruns et al. (120) hergestellt. Die Lipoproteine wurden intravenös injiziert und die Aufnahme mittels konfokaler Mikroskopie untersucht.

## 2.9 Lipidbestimmung in Lebergewebe

Ca. 100 mg gefrorenes Lebergewebe wurden in Lysispuffer (10 µL/mg Leber, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 80 mM NaCl, 1% Triton-X100, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0) homogenisiert. Die Triglyzerid-Konzentration wurde mittels o. a. Kit bestimmt. Die Normierung auf Leberprotein erfolgte durch Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry (s. 2.12, Western Blot).

## 2.10 RNA-Extraktion und quantitative *real time*-PCR

RNA aus Zellen oder Gewebe wurde mittels TriFast (Peqlab), ggf. TissueLyzer (Qiagen) und NucleoSpin RNA II Kit (Macherey & Nagel) isoliert. 1 µg RNA wurden in 50 µL Reaktionsvolumen mit High Capacity cDNA RT Kit (Invitrogen) umgeschrieben. Quantitative *real time*-PCR zur Expressionsanalyse wurden mit einem 7900HT Detektionssystem (Applied Biosystems) und TaqMan

Assay-on-Demand Primer-Sonden-Paaren (Applied Biosystems) durchgeführt. Die Genexpression wurde mit der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode und dem Haushältergen Tbp (murine Gene) bzw. TAF1 (humane Gene) errechnet. Die Expression von ChREBP $\beta$  wurde mittels SYBR green basierter qPCR (Primer wie publiziert: (20;121) im Mx3000P-System (Stratagene) ermittelt. Die detaillierte Expressionsanalyse der Exone des murinen Pml-Gens wurde mittels SYBR green basierter qPCR im Detektionssystem von Roche unter Verwendung von custom-made Primer-Paaren (mPML\_Exon1\_fwd: 5'-AGTTTCCGTGCAGAAGGT-3' mPML\_Exon1\_rev: 5'-GCTGTGTTTCATAGTCTTCGG-3'; mPML\_Exon3\_fwd: 5'-GATGAAGCTCTATGCCTCC-3' mPML\_Exon3\_rev: 5'-CTTGAACCTCTCGAAACCT-3'; mPML\_Exon6\_fwd: 5'-CTCCCACGAAGATTGCTC-3' mPML\_Exon6\_rev: 5'-CTCTCAGGGTTGGAAGTC-3') in Kooperation mit Jan Konzick, AG Dr. Johannes Herkel, durchgeführt.

## 2.11 Histologie und Immunhistochemie

Für histologische Analysen wurden die Lebern nach PBS-Perfusion in 4% Formaldehyd fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Schnitte mit einem Durchmesser von 5  $\mu$ m wurden mit Hematoxylin und Eosin (H&E) freundlicherweise im Institut für Anatomie I, UKE, gefärbt (Deparaffinierung in einer Alkoholreihe, Inkubation zuerst in Hematoxylin, anschließend in Eosin, jeweils 10 min). Zur histologischen Untersuchung der Fibrose wurden Paraffin-Schnitte mit Sirius-Red (Fluka) in Kooperation mit Nina Günther, AG Dr. Johannes Kluwe (UKE), gefärbt (Deparaffinierung in einer Alkoholreihe, Inkubation in Sirius Red-Lösung 1,5 h).

Zur immunhistochemischen Analyse wurden perfundierte Lebern in Tissue-Tek<sup>®</sup> eingebettet, 6-8  $\mu$ m Schnitte mit einem Cryostat hergestellt und auf Objektträger transferiert. Die Schnitte wurden getrocknet, in Aceton fixiert (15 min) und vor der Antikörper-Inkubation mit PBS gewaschen. Die Färbung des Makrophagenmarkers F4/80 erfolgte mit einem Cy5-gekoppelten Antikörper (BioLegend), CD31 wurde mittels primär- (Acris) und Cy2-gekoppeltem sekundär-Antikörper (Dianova) detektiert. PML wurde mit einem polyklonalen Antikörper (E15, Santa Cruz) und entsprechendem sekundär-Antikörper (Alexa-546-gekoppelt, Dianova) gefärbt. Zellkerne wurden mit dem DNA-Farbstoff Hoechst 33258 sichtbar gemacht.

## 2.12 Western Blot

Proteinlysate aus murinem Lebergewebe wurden durch Homogenisierung des nach Organentnahme in flüssigem Stickstoff schockgefrorenen Gewebes mit RIPA-Puffer (20 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 50 mM NaCl, 10 mM Na<sub>2</sub>H<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 50 mM NaF, 1% Nonidet-P40, 1% SDS, Protease-Inhibitor [Roche], 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) im TissueLyzer (Qiagen) hergestellt. Die Protein-Konzentration wurde mit der Methode nach Lowry (122) bestimmt. Eine für alle Proben einheitliche Proteinmenge (50  $\mu$ g) wurde mit Ladepuffer und Reduzierungsmittel (Invitrogen) vermischt und durch Erhitzen (10 min, 95°C) denaturiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in 4-12% Bis-Tris-Gradient-Gelen und MES-Puffersystem bei einer Spannung von 120 V (1 h). Die Proteine wurden mittels Nassblot-Verfahren auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert (400 mA, 1,5 h) und anschließend freie Bindungsstellen mit Milchpulver (5%, in TBS-T) blockiert. Die Detektion von phosphoryliertem JNK-Protein (p-JNK, Phosphorylierung an Thr183 und Tyr185) und dem gesamt-Protein (JNK) erfolgte durch Inkubation

(über Nacht, 4°C) mit spezifischen Antikörpern (cell signaling) und einer folgenden Inkubation der Membran in einem Peroxidase-gekoppelten sekundär-Antikörper (Jackson) sowie schließlich mittels Substrat-Lösung (ECL, GE Healthcare) und Chemilumineszenz-Belichtung eines Fotofilms. Die Quantifizierung der detektierten Proteinbanden wurde mit der Software ImageJ durchgeführt.

### **2.13 Statistik**

Für Vergleiche von zwei Gruppen wurde die statistische Signifikanz mit Hilfe des zweiseitigen, ungepaarten *student's T Test* analysiert. Die Daten der humanen Kohorte wurden mittels one way-ANOVA (analysis of variance) und Tukey's post-Test mit Hilfe des Statistik-Programms Prism auf statistische Signifikanz untersucht. Die Daten wurden vor der Analyse logarithmisch transformiert, um Normalverteilung zu erreichen. Bei  $p < 0,05$  wurde statistische Signifikanz angenommen.

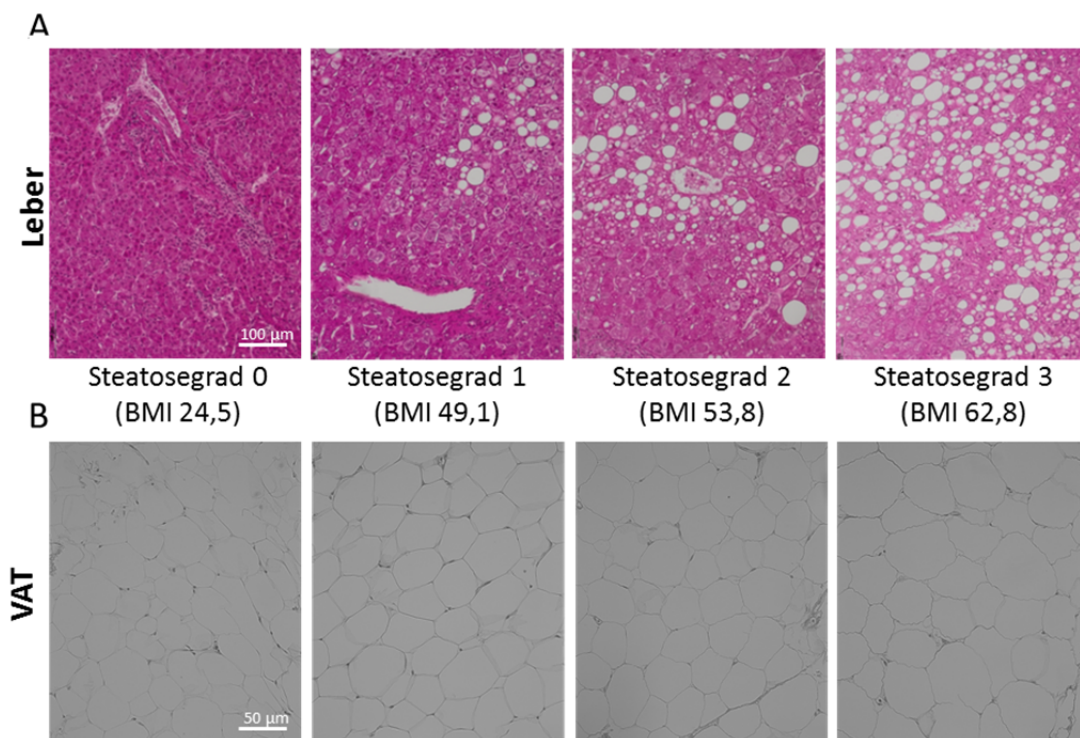
## 3 ERGEBNISSE

### 3.1 Das metabolische Syndrom und NAFLD in einer humanen Kohorte

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden zwei Aspekte des metabolischen Syndroms in einer humanen Kohorte untersucht. Der Schwerpunkt wurde hierbei auf die *de novo* Lipogenese in Fettgewebe und Leber einerseits sowie auf Aspekte der chronischen Entzündung in der Übergewicht-assoziierten nicht-alkoholischen Fettleber-Erkrankung (NAFLD) andererseits gesetzt.

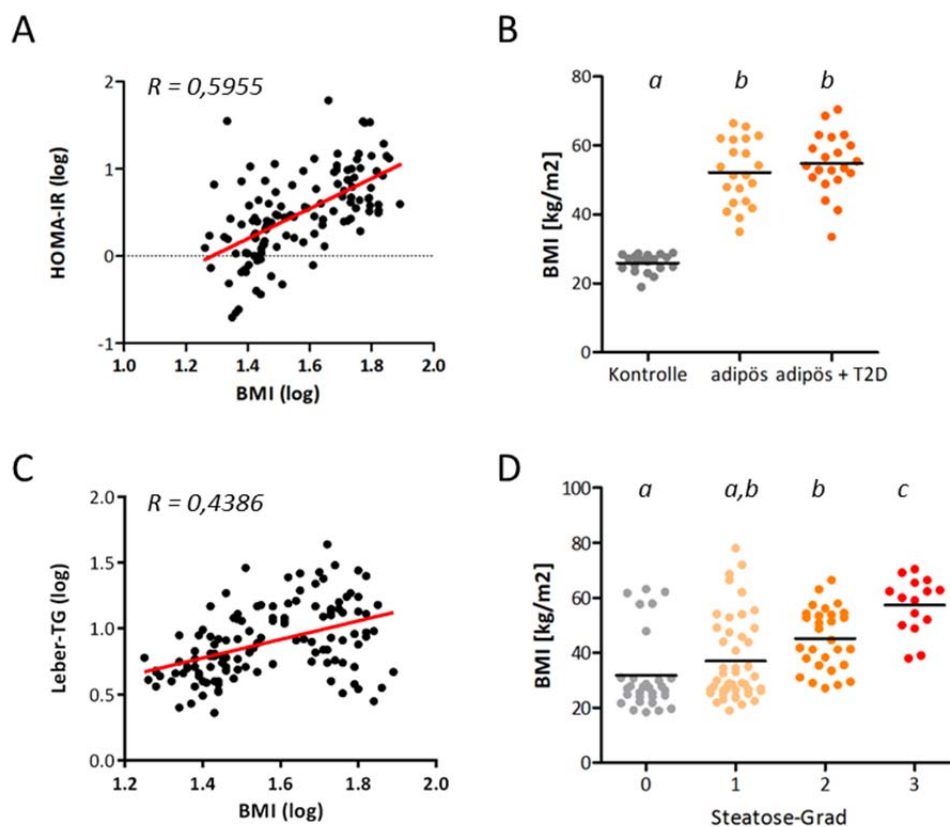
#### 3.1.1 Charakterisierung der Kohorte

Die folgenden Analysen wurden mit Fettgewebs- und Leber-Proben aus einer humanen Kohorte durchgeführt. Diese bestand aus 165 Patienten, die aufgrund von starkem Übergewicht bariatrisch operiert wurden. Die nicht-adipöse Kontrollgruppe waren Patienten mit abdominalen Operationen ohne pathologische metabolische Veränderungen. Übergewicht wird verursacht durch die Vergrößerung des Fettgewebes und seiner Triglyzerid-Depots, was sich mikroskopisch durch Zunahme der Adipozyten-Anzahl (Hyperplasie) sowie durch Vergrößerung der Fettgewebszellen (Hypertrophie) manifestiert. Dies ist auf die Einlagerung größerer Mengen Lipide zurückzuführen. Ein weiteres Organ, das besonders bei Übergewicht häufig verstärkt Lipide einlagert, ist die Leber. In Abb. 3.1 ist jeweils ein Beispiel für Steatosegrad 0, 1, 2 und 3 gezeigt. Die Patienten mit nachweisbarer Steatose waren alle morbid adipös (BMI  $\geq 30$ ).



**Abb. 3.1: Exemplarische histologische Darstellung von Leber- und viszeralen Fettgewebsproben der humanen Kohorte.** A, Mikroskopische Aufnahmen H&E-gefärbter Leberschnitte, B, Phasenkontrastaufnahmen von Fettgewebsschnitten. Biopsien von Leber- und Fettgewebe wurden während indizierter Operationen entnommen und der Steatosegrad der Lebern aufgrund des prozentualen Anteils von Hepatozyten mit Lipidtröpfchen histopathologisch diagnostiziert (0= <5%, 1= 5-33%, 2= >33%-66%, 3= >66%, Kriterien nach (123)).

In Abb. 3.1 ist zu sehen, dass die Adipozyten oberhalb des für die Diagnose von Adipositas definierten BMI-Grenzwertes von  $30 \text{ kg/m}^2$  größer sind als bei Normalgewicht. In den jeweiligen Leber-Biopsien derselben Patienten ist deutlich der unterschiedliche Verfettungsgrad sichtbar, der zur Diagnose des Steatosegrades dient. In einer Leber mit dem Steatosegrad 0 enthalten weniger als 5% der Hepatozyten Lipidtropfen, Steatosegrad 1 wird bei 5-33% Lipidtropfen-haltigen Hepatozyten diagnostiziert. Eine Leber mit Steatosegrad 2 hat bis zu 66% Lipid-positive Hepatozyten, während der schwerste Steatosegrad 3 bei einer Überschreitung dieses Grenzwertes vorliegt (123). Die Einteilung der Patienten nach dem Steatosegrad ist die Grundlage für die Gruppenanalysen in Bezug auf NASH in Kapitel 3.1.3, obwohl die Steatose nicht zwangsläufig mit Leberentzündung (Hepatitis) einhergeht. Der NAS (*NAFLD activity score* [0-8]) berücksichtigt neben dem Steatosegrad (0-3) noch zwei weitere Faktoren (lobuläre Inflammation [0-3] sowie Hepatozyten-*Ballooning* [0-2]), welche jedoch in der vorliegenden Kohorte seltener pathologisch diagnostiziert und deswegen zur Vereinfachung nicht weiter berücksichtigt wurden. Die statistischen Analysen ergaben jedoch vergleichbare Ergebnisse. Für die Analysen der *de novo* Lipogenese in Kapitel 3.1.2 wurden Patienten nach ihrem BMI sowie dem Vorliegen von Typ 2-Diabetes mellitus (T2D) ausgewählt. Zur Charakterisierung der Kohorte und der Patientengruppen für die folgenden Analysen sind einige Kennzeichen des metabolischen Syndroms in Abb. 3.2 und weitere metabolisch-klinische Parameter in Tab. 3.1 gezeigt.



**Abb. 3.2: Charakterisierung der humanen Kohorte nach Parametern des metabolischen Syndroms.** A, Korrelation des BMI mit dem HOMA-IR. B, Verteilung des BMI innerhalb der Adipositas-Gruppen. C, Korrelation des BMI mit der Triglyzerid (TG)-Konzentration der Leber. D, Verteilung des BMI innerhalb der Steatose-Gruppen (s. auch Tab. 3.2). Die Daten wurden mittels *one way* ANOVA statistisch untersucht, Gruppen mit dem gleichen Buchstaben (*a,b,c*) unterscheiden sich nicht signifikant ( $p \geq 0,05$ ). *R*, Pearson-Korrelationskoeffizient.

**A**

	Kontrolle	adipös	adipös + T2D	p
n (m / w)	(9 / 10)	(11 / 10)	(10 / 11)	
Alter [Jahre]	57,7 (40-70) <sup>a</sup>	46,0 (33-55) <sup>b</sup>	49,7 (35-59) <sup>b</sup>	<0,0001
BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	25,9 (18,9-28,8) <sup>a</sup>	52,1 (35,0-66,4) <sup>b</sup>	54,8 (33,5-70,4) <sup>b</sup>	<0,0001
CRP [mg/L]	3,2 (0,5-14,4) <sup>a</sup>	10,0 (2,7-25,0) <sup>b</sup>	13,5 (3,4-32,3) <sup>b</sup>	<0,0001
HOMA-IR	1,4 (0,2-4,4) <sup>a</sup>	5,1 (0,8-10,2) <sup>b</sup>	12,4 (1,7-35,0) <sup>c</sup>	<0,0001
Plasma-TG [mg/dL]	112 (49-362) <sup>a</sup>	140 (80-304) <sup>a,b</sup>	158 (72-279) <sup>b</sup>	0,0086
Leber-TG [mg/g]	4,9 (2,3-8,9) <sup>a</sup>	11,8 (3,8-27,7) <sup>b</sup>	13,5 (2,8-43,6) <sup>b</sup>	<0,0001

**B**

Steatose-Grad	0	1	2	3	p
n (m / w)	(14 / 16)	(21 / 25)	(17 / 12)	(10 / 5)	
Alter [Jahre]	55,1 (28-68) <sup>a</sup>	51,7 (17-70) <sup>a</sup>	47,4 (21-70) <sup>a</sup>	48,9 (36-66) <sup>a</sup>	0,1029
BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	31,8 (18,3-63,1) <sup>a</sup>	37,0 (18,9-78) <sup>a,b</sup>	45,1 (27,1-66,4) <sup>b</sup>	57,3 (38,0-70,4) <sup>c</sup>	<0,0001
CRP [mg/L]	8,0 (0,5-26,2) <sup>a,b</sup>	6,3 (0,5-32,3) <sup>a,b</sup>	8,9 (0,5-33,7) <sup>a</sup>	13,9 (2,2-30,5) <sup>b</sup>	0,0009
HOMA-IR	5,0 (0,6-35,5) <sup>a</sup>	4,6 (0,2-60,9) <sup>a</sup>	5,1 (1,4-15,0) <sup>a</sup>	14,9 (3,5-35,0) <sup>b</sup>	<0,0001
Plasma-TG [mg/dL]	133 (49-364) <sup>a</sup>	125 (52-362) <sup>a</sup>	135 (45-240) <sup>a</sup>	193 (100-366) <sup>b</sup>	0,0036
Leber-TG [mg/g]	5,1 (2,3-12,1) <sup>a</sup>	7,0 (2,7-14,9) <sup>b</sup>	12,4 (5,5-29,9) <sup>c</sup>	19,2 (8,8-43,6) <sup>d</sup>	<0,0001

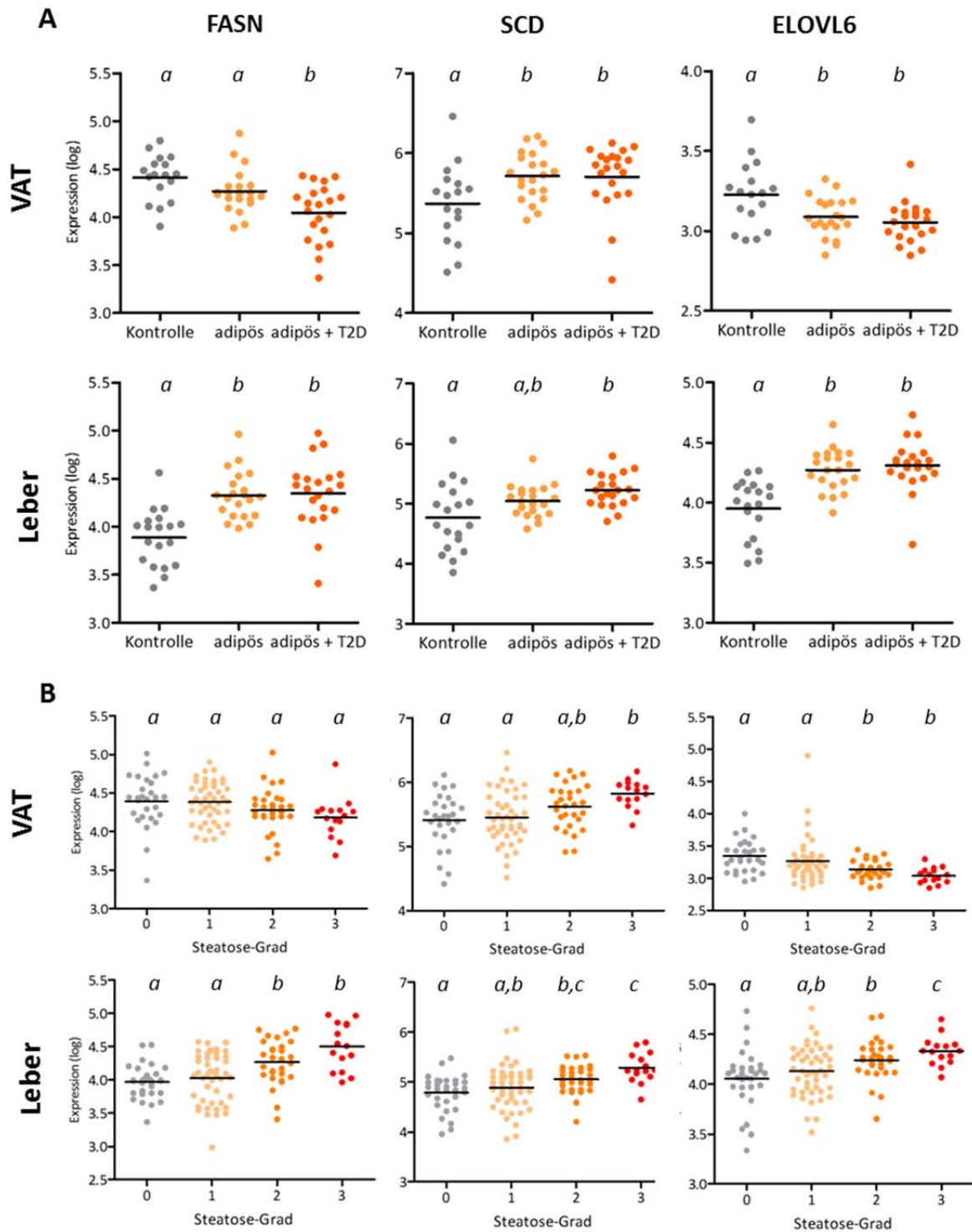
**Tab. 3.1: Einteilung und Charakterisierung der Patienten nach Übergewicht und Diabetes sowie nach Steatosegrad.** A, Aus der gesamten Kohorte (165 Patienten) wurden nach Geschlecht und Alter passende Gruppen gebildet, die metabolisch gesund (Kontrolle), adipös, bzw. adipös und diabetisch (adipös + T2D) waren. B, Aus der gesamten Kohorte wurden Patienten älter als 70 Jahre sowie mit diagnostizierten nicht-NAFLD-Lebererkrankungen ausgeschlossen und nach ihrem histopathologisch diagnostizierten Steatosegrad (0-3) in Gruppen eingeteilt [Mittelwert (min-max)]. Die klinischen Parameter BMI, CRP, HOMA-IR, Plasma-TG und Leber-TG wurden mittels *one way* ANOVA statistisch untersucht, Gruppen mit dem gleichen Buchstaben (*a,b,c*) unterscheiden sich nicht signifikant ( $p \leq 0,05$ ).

Um den Zusammenhang zwischen Übergewicht und Insulinresistenz in der Kohorte zu untersuchen, wurden die BMI- mit den HOMA-IR-Werten korreliert. HOMA-IR ist ein Surrogatmarker für Insulin-Resistenz und wird aus den Konzentrationen von nüchtern-Glucose und Plasma-Insulin berechnet (124). In Abb. 3.2A ist die starke Korrelation zwischen BMI und HOMA-IR in der humanen Kohorte zu sehen, welche den Zusammenhang zwischen Übergewicht und Insulinresistenz verdeutlicht. Da die analysierten Parameter keine Normalverteilung zeigen, wurden die Werte für die Darstellung der Korrelation und für die statistische Auswertung logarithmiert (dies gilt für alle folgenden statistischen Analysen). Auch zwischen dem BMI und dem mit einer klinisch-chemischen Methode bestimmten Triglyzeridgehalt der Leber zeigt sich eine signifikante Korrelation (Abb. 3.2C). In der untersuchten Kohorte bestätigt sich also der auch in vielen anderen Studien beobachtete Zusammenhang zwischen Übergewicht und Steatose. Die Einteilung der Kohorte nach dem histopathologisch bestimmten Steatosegrad zeigt ebenfalls, dass der BMI der Patienten mit dem Steatosegrad steigt (Abb. 3.2.D).

**3.1.2 Veränderung der DNL beim metabolischen Syndrom und NAFLD**

Aus Kohlenhydraten synthetisierte Lipide tragen in NAFLD-Patienten zur Leber-Steatose bei. Die Regulation der hepatischen DNL wurde jedoch bisher in humanen Kohorten nur indirekt analysiert.

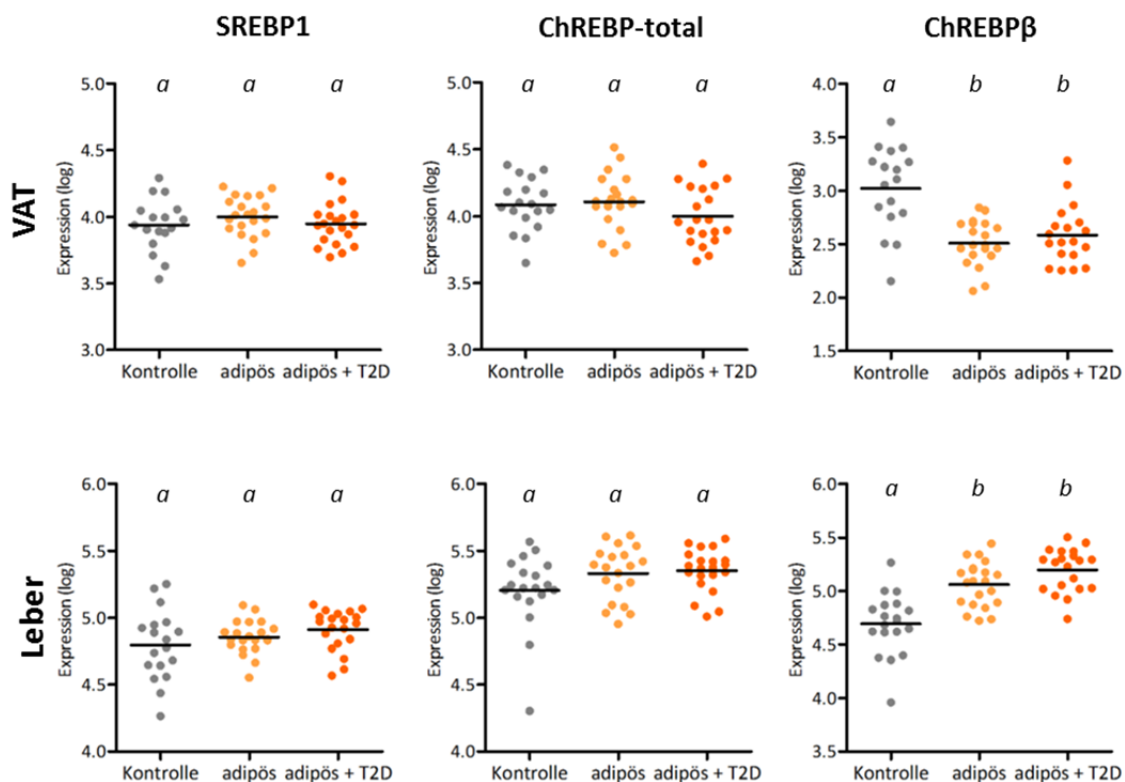
Andere Studien haben gezeigt, dass die Fähigkeit des Fettgewebes (viszerales Fettgewebe, *visceral adipose tissue*, VAT) zur DNL bei Übergewicht reduziert ist. Hier sollte die Regulation in den beiden wichtigsten DNL-Organen analysiert werden. Innerhalb der humanen Kohorte wurde die Expression von den Schlüsselenzymen der *de novo* Lipogenese, FASN, SCD und ELOVL6, untersucht. Die Verteilung der Expression in den Adipositas- und Steatose-Gruppen sind in Abb. 3.3 gezeigt.



**Abb. 3.3: Expression von DNL-Schlüsselenzymen in VAT und Leber in Adipositas- und Steatose-Gruppen.** A, Adipositas-Gruppen. B, Einteilung nach Steatose-Grad. Die Expression von FASN, SCD und ELOVL6 wurde mittels qPCR gemessen und mittels *one way* ANOVA statistisch untersucht, Gruppen mit dem gleichen Buchstaben (a,b,c) unterscheiden sich nicht signifikant ( $p \geq 0,05$ ).

Im Fettgewebe ist die Expression von FASN und ELOVL6 in den adipösen Gruppen signifikant niedriger, während SCD einen entgegengesetzten Verlauf zeigt und in den adipösen Gruppen erhöht ist. Gleichzeitig ist die Expression dieser drei Schlüsselenzyme in den adipösen Gruppen in der Leber signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Die Effekte sind in der adipös-diabetischen Gruppe jeweils tendenziell stärker ausgeprägt (Abb. 3.3A). Diese gegenläufige Regulation der Schlüsselenzyme zeigt, dass das metabolische Syndrom mit einer Verringerung der Fähigkeit zur *de novo*-Lipogenese im Fettgewebe einhergeht, während die Neubildung von Lipiden in der Leber gleichzeitig erhöht ist und dort vermutlich zur hepatischen Manifestierung des metabolischen Syndroms beiträgt. Dies gilt auch für die Expression genannter Enzyme in den Steatose-Gruppen: im Fettgewebe von Patienten mit Lebersteatose ist FASN tendenziell und ELOVL6 signifikant weniger exprimiert. Gleichzeitig korreliert der Grad der Leberverfettung deutlich mit einer erhöhten Expression von FASN, SCD und ELOVL6 in der Leber (Abb. 3.3B). Diese Daten suggerieren eine Beteiligung der *de novo*-Lipogenese an der Lebersteatose. Zusammengefasst ist also die Expression von Schlüsselenzymen der DNL in Fettgewebe und Leber bei Adipositas und Lebersteatose gegenläufig reguliert.

Zur Analyse der Ursache der veränderten Enzym-Expression wurde die Expression sog. lipogener Transkriptionsfaktoren untersucht. Hierbei handelt es sich um den durch Insulin aktivierten Transkriptionsfaktor SREBP1, den Glucose-sensitiven Transkriptionsfaktor ChREBP (ChREBP-total), sowie eine kürzere Isoform des letzteren, ChREBPβ.



**Abb. 3.4: Expression von lipogenen Transkriptionsfaktoren in VAT und Leber in den Adipositas-Gruppen.** Die Expression von SREBP1, ChREBP-total und ChREBPβ wurde mittels qPCR gemessen und mittels *one way* ANOVA statistisch untersucht, Gruppen mit dem gleichen Buchstaben (*a,b*) unterscheiden sich nicht signifikant ( $p \geq 0,05$ ).

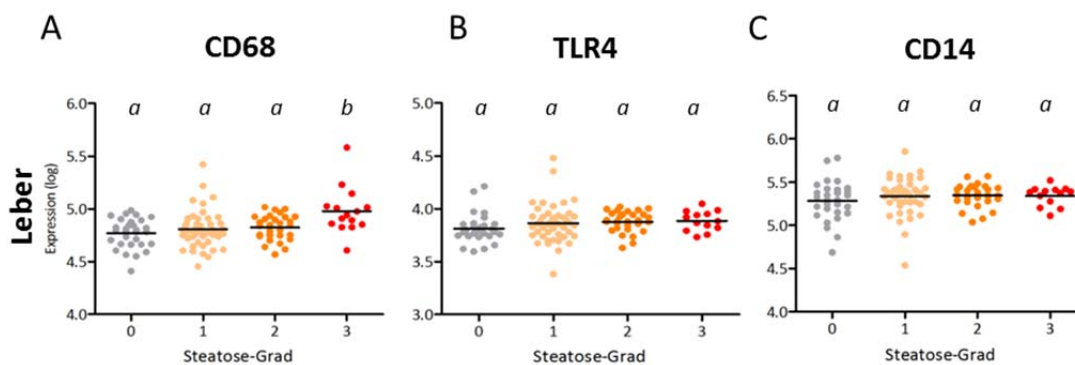
Die Expressionsanalyse der Transkriptionsfaktoren zeigt, dass SREBP1 und ChREBP insgesamt (ChREBP-total) bei Adipositas im Fettgewebe und in der Leber auf der Ebene ihrer Expression wenig



reguliert sind. Dagegen ist die kürzere Isoform, ChREBP $\beta$ , im Fettgewebe bei Übergewicht signifikant niedriger, in der Leber signifikant höher exprimiert. Für diese Isoform wurde gezeigt, dass ihre Expression gut mit der Aktivität des Transkriptionsfaktors korreliert (20), sodass die Beobachtung in der humanen Kohorte nahelegt, dass ChREBP $\beta$  für die entsprechende Regulation der DNL-Schlüsselenzyme in beiden Organen ausschlaggebend ist.

### 3.1.3 Veränderung inflammatorischer Signalwege bei NAFLD

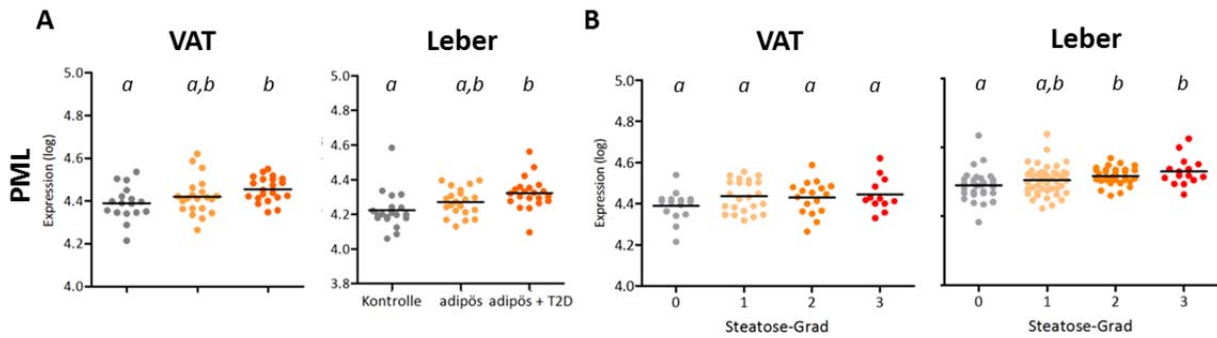
Das metabolische Syndrom ist mit schwacher, aber chronischer Entzündung in Fettgewebe und Leber assoziiert. Die Entstehung einer Entzündungsreaktion beinhaltet die Aktivierung des angeborenen Immunsystems, d. h. Aktivierung von Makrophagen über entsprechende Rezeptoren. Deshalb wurde die hepatische Expression des Makrophagenmarkers CD68 sowie die Expression der LPS-Rezeptoren (TLR4 und CD14), die mitverantwortlich für die Aktivierung des angeborenen Immunsystems sind, untersucht.



**Abb. 3.5: Expression eines Makrophagenmarker und LPS-Rezeptoren in NAFLD-Patienten in der Leber.** A, CD68-Expression in der Leber. B, und C, Hepatische Expression der LPS-Rezeptoren TLR4 und CD14, Einteilung nach Steatose-Gruppen. Die Expression wurde mittels qPCR gemessen und mittels *one way* ANOVA statistisch untersucht, Gruppen mit dem gleichen Buchstaben (*a, b*) unterscheiden sich nicht signifikant ( $p \geq 0,05$ ).

Die Analyse des Makrophagenmarkers CD68 (Abb. 3.5A) zeigt eine leicht erhöhte Expression und somit vermutlich eine vermehrte Anzahl von Makrophagen in der Patientengruppe mit dem stärksten Steatosegrad. Die Aktivierung der Makrophagen erfolgt über Mustererkennungsrezeptoren wie den Toll-like Rezeptor 4 (TLR4). Dessen Expression ist jedoch in der Leber nicht signifikant in Abhängigkeit vom Steatosegrad verändert (Abb. 3.5B), gleiches gilt für den LPS-Corezeptor CD14 (Abb. 3.5C). Diese Daten lassen vermuten, dass die Makrophagen nicht durch eine Veränderung der Expression der LPS-Rezeptoren für diesen Liganden sensibilisiert sind.

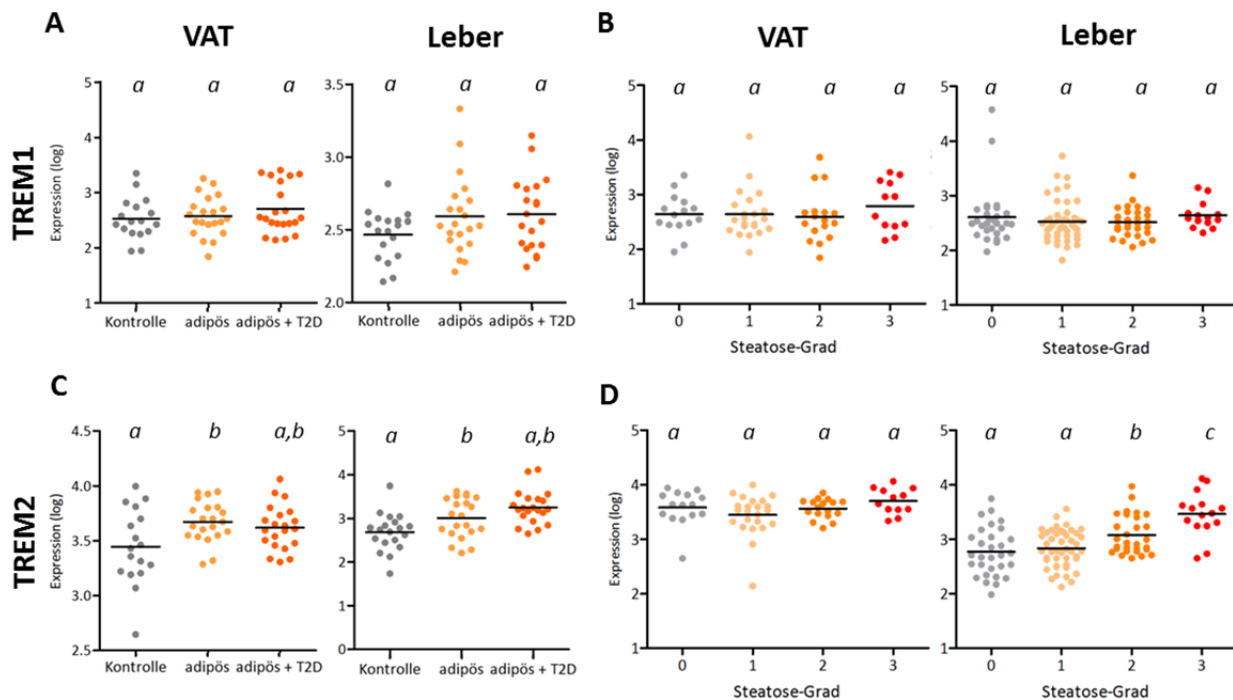
Die Aktivierung einer Immunantwort wird auf verschiedenen Ebenen reguliert. Dem PML-Protein wird eine Funktion in der Regulation zellulärer Stress-Antworten zugeschrieben, welche bisher jedoch nicht bei metabolischer Entzündung untersucht wurde. Im Folgenden sind die Ergebnisse der Expressionsanalyse von PML in Fettgewebe und Leber gezeigt.



**Abb. 3.6: Expression des Stress-Modulators PML in VAT und Leber.** A, PML-Expression in den Adipositas-Gruppen. B, PML-Expression bei Einteilung nach dem Steatose-Grad. Die Expression wurde mittels qPCR gemessen und mittels *one way ANOVA* statistisch untersucht, Gruppen mit dem gleichen Buchstaben (*a, b*) unterscheiden sich nicht signifikant ( $p \geq 0,05$ ).

Die Expressionsanalyse ergibt signifikant höhere Expressionswerte des nukleären Stress-Modulators PML in der adipös-diabetischen Gruppe im Fettgewebe und in der Leber. Im Fettgewebe steatotischer Patienten sind keine signifikanten Unterschiede zu finden, während die Expression in steatotischen Lebern mit steigendem Grad der Verfettung ebenfalls signifikant erhöht ist. Diese Ergebnisse bilden eine Grundlage für die Untersuchung einer funktionellen Rolle von PML bei Steatose und metabolischer Entzündung im Mausmodell. Die zugehörigen Ergebnisse sind in Kapitel 3.3 dargestellt.

Weitere Modulatoren von Stress-Antworten, im speziellen von TLR4, sind die Zellmembran-ständigen Rezeptoren TREM1 und TREM2, welche mit verschiedenen Erkrankungen assoziiert sind. Im Kontext metabolischer Entzündung sind sie jedoch bisher noch nicht untersucht worden. Die Expression der zugehörigen Gene wurde deshalb ebenfalls im Fettgewebe und in Leberproben der humanen Kohorte analysiert.

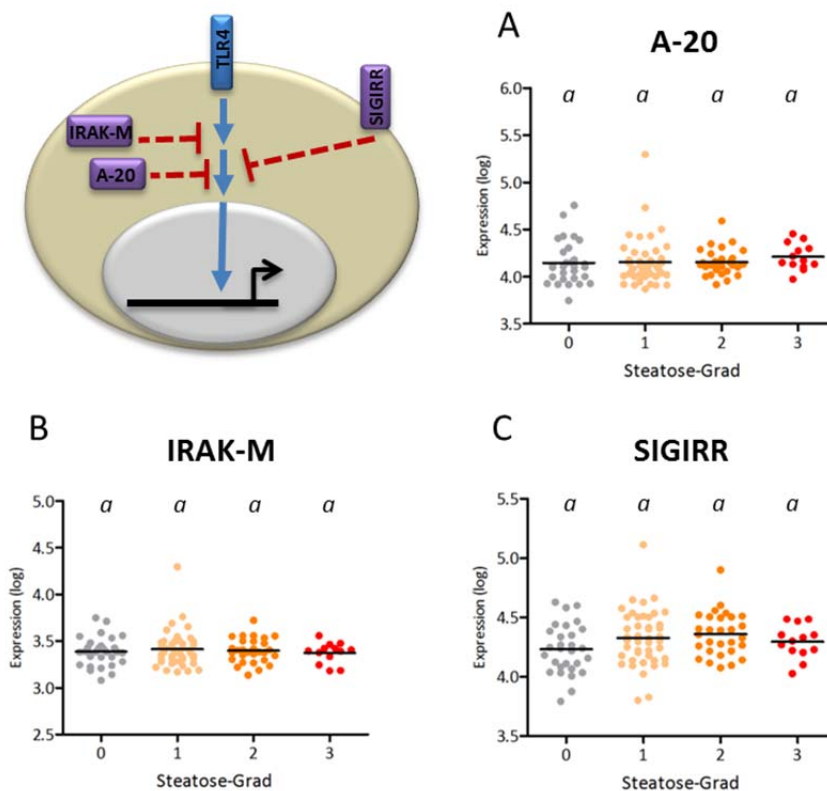


**Abb. 3.7: Expression der TLR4-modulierenden Proteine TREM1 und TREM2 in Fettgewebe und Leber.** A, und C, TREM1- bzw. TREM2-Expression in den Adipositas-Gruppen. B, und D, Einteilung nach dem Steatose-Grad.

Die Expression wurde mittels qPCR gemessen und mittels *one way* ANOVA statistisch untersucht, Gruppen mit dem gleichen Buchstaben (*a,b,c*) unterscheiden sich nicht signifikant ( $p \geq 0,05$ ).

Der TLR4-Signal-amplifizierende Modulator TREM1 zeigt sowohl im Fettgewebe als auch in der Leber keine Veränderungen der Expression in Abhängigkeit von Adipositas (Abb. 3.7A) und vom Steatosegrad (Abb. 3.7B). Adipöse Patienten zeigen eine signifikant erhöhte TREM2-Expression im Fettgewebe und in der Leber (Abb. 3.7C). Die stärkste Erhöhung des TLR4-Signal-attenuierenden Rezeptors TREM2 ist jedoch in der Leber bei steigendem Steatosegrad zu finden (Abb. 3.7D).

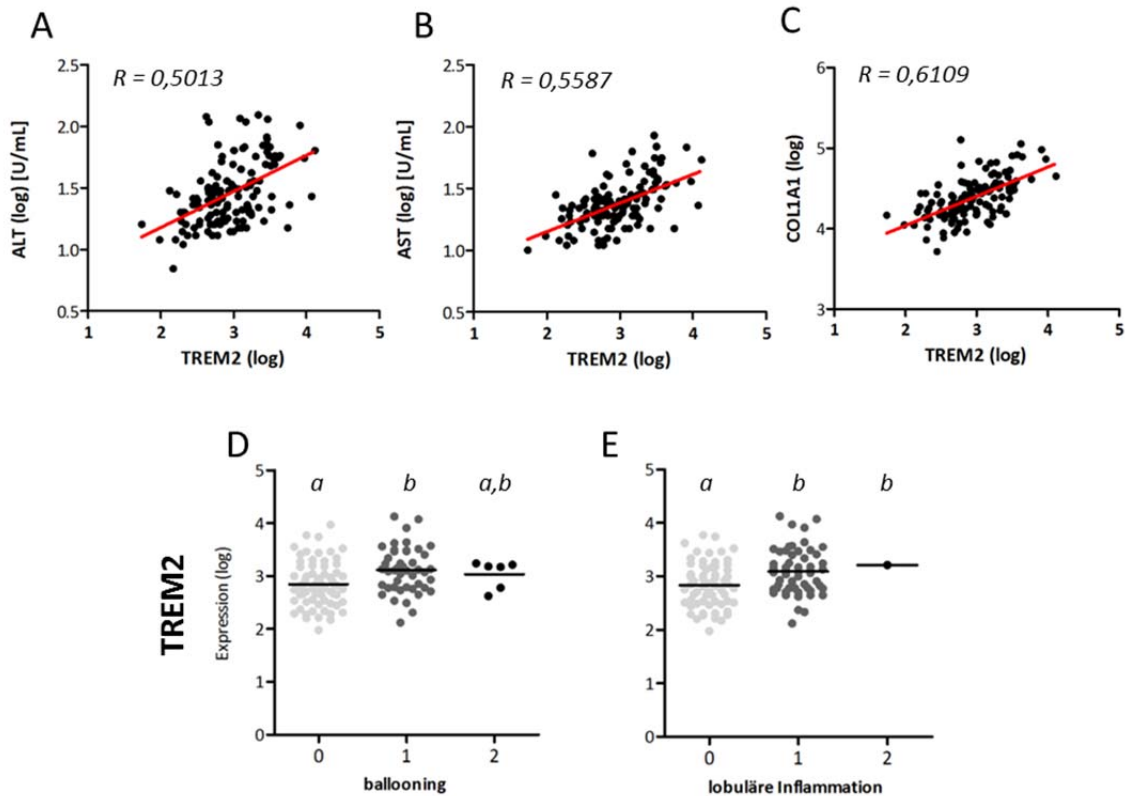
Die bisherigen Ergebnisse zeigen eine starke Korrelation des negativen TLR4-Modulators TREM2 mit dem Schweregrad der NAFLD in der Leber. Daraufhin wurden weitere negative Regulatoren des TLR4-Signalwegs in der Leber untersucht, deren Expressionswerte in Abb. 3.8 gezeigt sind.



**Abb. 3.8: Expression der TLR4 negativ regulierenden Proteine A-20, IRAK-M und SIGIRR in der Leber.** A, - C, Die Patienten sind nach dem Steatose-Grad eingeteilt. Die Expression wurde mittels qPCR gemessen und mittels *one way* ANOVA statistisch untersucht, Gruppen mit dem gleichen Buchstaben (*a*) unterscheiden sich nicht signifikant ( $p \geq 0,05$ ).

Die Expressionsanalyse dieser drei weiteren negativen Regulatoren des TLR4-Signalwegs in der Leber zeigt einheitliche Ergebnisse. Sowohl die beiden intrazellulär wirkenden Proteine A20 und IRAK-M als auch der Plasmamembran-ständige Rezeptor SIGIRR ändern sich nicht signifikant in Abhängigkeit vom Steatosegrad. Diese Ergebnisse führen zu der Hypothese, dass TREM2 als einziger der untersuchten negativen Regulatoren des TLR4-Signalwegs spezifisch in der Leber mit der Lebersteatose und möglicherweise mit der Entzündung bei der NASH assoziiert ist.

Um die Assoziation mit der Leberentzündung weiter zu analysieren, wurde die Korrelation zwischen der hepatischen TREM2-Expression und etablierten Parametern der Leberentzündung untersucht.



**Abb. 3.9: Korrelation der hepatischen TREM2-Expression mit Leberentzündungsparametern.** A, und B, Korrelation mit Plasma-ALT und -AST. C, Korrelation mit der COL1A1-Expression in der Leber. D, und E, Hepatische TREM2-Expression, die Patienten wurden nach dem histopathologischen Kriterium „Hepatozyten-Ballooning“ bzw. „lobuläre Entzündung“ eingeteilt. Die Expression wurde mittels qPCR gemessen und mittels *one way* ANOVA statistisch untersucht, Gruppen mit dem gleichen Buchstaben (*a,b*) unterscheiden sich nicht signifikant ( $p \geq 0,05$ ). *R*, Pearson-Korrelationskoeffizient.

Die Analyse zeigt, dass die TREM2-Expression in der Leber positiv mit den Plasma-Werten der Leberenzyme Alanin-Aminotransferase (ALT) und Aspartat-Aminotransferase (AST) korreliert, welche ein Maß für die Leberschädigung sind (Abb. 3.9A-B). Eine mögliche, irreversible Folge der Leberentzündung kann die Leberfibrose sein, die Vernarbung des Gewebes. Ein Marker hierfür ist die Collagen-Expression, welche besonders stark mit der TREM2-Expression korreliert. Weitere Kriterien, die neben dem Steatosegrad den Aktivitätsgrad der Erkrankung beeinflussen, sind die direkteren histopathologischen Merkmale des Hepatozyten-*Ballooning* und der lobulären Entzündung. Auch nach diesen Kriterien ist die TREM2-Expression bei höherem Grad signifikant erhöht (Abb. 3.9D-E). Die Patienten sind jedoch ungleichmäßig in diesen Kategorien verteilt und die Skala nicht vollständig ausgeschöpft (lobuläre Inflammation wird nach Grad 0-3 eingeteilt), da für diese Kohorte nicht explizit NASH-Patienten rekrutiert wurden. Dies macht deutlich, warum zur besseren Veranschaulichung der vorangehenden Ergebnisse die Einteilung der Patienten nach ihrem Lebersteatose-Grad erfolgte.

Zusammenfassend konnte in diesem Teil der vorliegenden Dissertation im direkten Vergleich von Fettgewebs- und Leberproben einer humanen Kohorte gezeigt werden, dass bei Adipositas die *de novo* Lipogenese in diesen beiden wichtigen metabolischen Organen invers reguliert ist. Während im viszeralen Fettgewebe die Expression von DNL-Schlüsselenzymen supprimiert ist, zeigen diese in

der Leber erhöhte Expressionswerte. Diese Veränderungen korrelieren mit Änderungen der Expression des lipogenen Transkriptionsfaktors ChREBP $\beta$ , der damit als wahrscheinlich entscheidender Transkriptionsfaktor lipogener Wege in Patienten mit dem metabolischen Syndrom bezeichnet werden kann. Diese Daten wurden kürzlich publiziert (121).

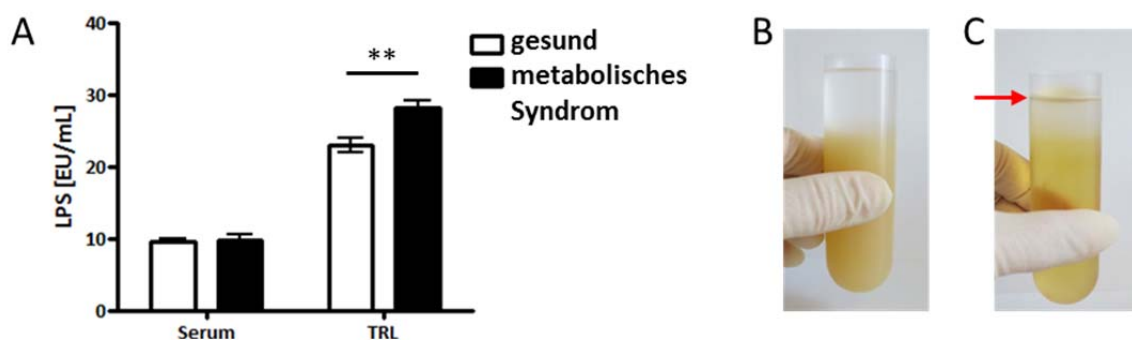
Die Expressionsanalyse von Proteinen, die möglicherweise an der chronischen metabolischen Entzündung beteiligt sind, ergab erhöhte PML-Werte bei Adipositas und steigendem Steatosegrad sowie eine Leber-spezifische Induktion des TLR4-Modulators TREM2 und Korrelationen mit weiteren Markern der NAFLD. Diese Daten liefern die Grundlage für die Experimente mit transgenen Mäusen, die in den Kapiteln 3.3 und 3.4 dargestellt sind.

### 3.2 Mechanismen der NASH

Analysen in humanen Kohorten erlauben Assoziationen verschiedener Parameter mit dem Krankheitsgrad. Auch Fütterungsstudien ermöglichen Rückschlüsse erst, nachdem sich Steatose und u. U. Entzündung durch chronische Lipid-Akkumulation bereits manifestiert haben. In diesem Kapitel werden Mechanismen untersucht, die durch Auslösung akuter Reaktionen potentiell auch an der chronischen Lipid-vermittelten Leberentzündung beteiligt sind. Hierbei wurde das inflammatorische Potential von Lipoproteinen charakterisiert und die Beteiligung der Leberzellen an einer entzündlichen Antwort analysiert.

#### 3.2.1 LPS-Detektion in Plasma und Lipoproteinen

Dem Konzept der metabolischen Endotoxämie entsprechend wurde Plasma von Patienten auf das Vorhandensein von LPS untersucht. Die Patienten wurden nach Vorliegen des metabolischen Syndroms (Erfüllung von drei der fünf revidierten Kriterien nach NCEP-ATP III: Bauchumfang  $\geq 102$  cm bzw. 88 cm [Männer bzw. Frauen], Serum-TG  $\geq 150$  mg/dL, HDL-Cholesterol  $< 40$  mg/dL bzw. 50 mg/dL, Nüchternblutzucker  $\geq 110$  mg/dL, Blutdruck  $\geq 130/85$  mmHg) in zwei Gruppen eingeteilt. Parallel wurden die Triglyzerid-reichen Lipoproteine (TRL) aus dem Plasma isoliert und ebenfalls die Konzentration von LPS darin gemessen.

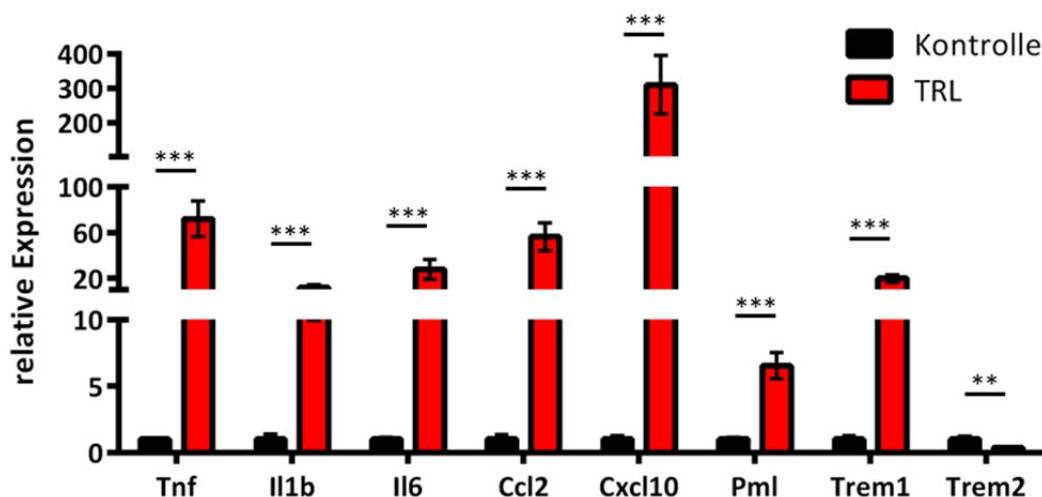


**Abb. 3.10: LPS-Detektion in humanem Serum und daraus isolierten TG-reichen Lipoproteinen.** A, LPS wurde mittels Limulus-Assay detektiert. Die Patienten wurden nach Erfüllung der NCEP-ATP III-Kriterien für das metabolische Syndrom in Gruppen eingeteilt. (n = 6, Mittelwert  $\pm$  s.e.m.,  $P \leq 0,01$ : \*\*) B, Hyperlipämisches Plasma vor und C, nach Dichtegradienten-Zentrifugation zur Isolation der TRL.

Die Detektion ergab LPS- Konzentrationen von ca. 10 EU/mL im Serum beider Gruppen ohne signifikante Unterschiede. Die LPS-Konzentration in den isolierten TRL war deutlich höher als im Serum und signifikant höher in der Patientengruppe mit metabolischem Syndrom (Abb. 3.10A). Diese Ergebnisse zeigen, dass LPS im Serum nachweisbar und auf TG-reichen Lipoproteinen ca. 2,5-fach angereichert ist. Die TRL aus dem Serum von Patienten mit metabolischem Syndrom, das bei diesen Patienten noch nicht in extremer Form ausgeprägt ist, enthalten signifikant mehr LPS. Demnach liegt bereits bei beginnendem metabolischem Syndrom eine Lipoprotein-assoziierte metabolische Endotoxämie vor. Die Isolation der TRL durch Ultrazentrifugation aus hyperlipämischem Plasma, d. h. von Spendern mit erhöhten Lipid-Werten, für die folgenden *in vivo* Experimente ist in Abb. 3.10B (trübes Plasma) und 3.10C (flotierte Lipoproteine, dadurch klares Plasma) zu sehen.

### 3.2.2 TRL-vermittelte pro-inflammatorische Antwort in der Leber

Um zu untersuchen, ob diese Lipoproteine eine Wirkung *in vivo* haben, wurden TRL aus hyperlipämischem Plasmaisoliert (Abb. 3.10C) und intravenös in Wildtyp-Mäuse injiziert. Nach 4 h wurden die Tiere sakrifiziert und die hepatische Expression inflammatorischer Parameter mittels qPCR untersucht.

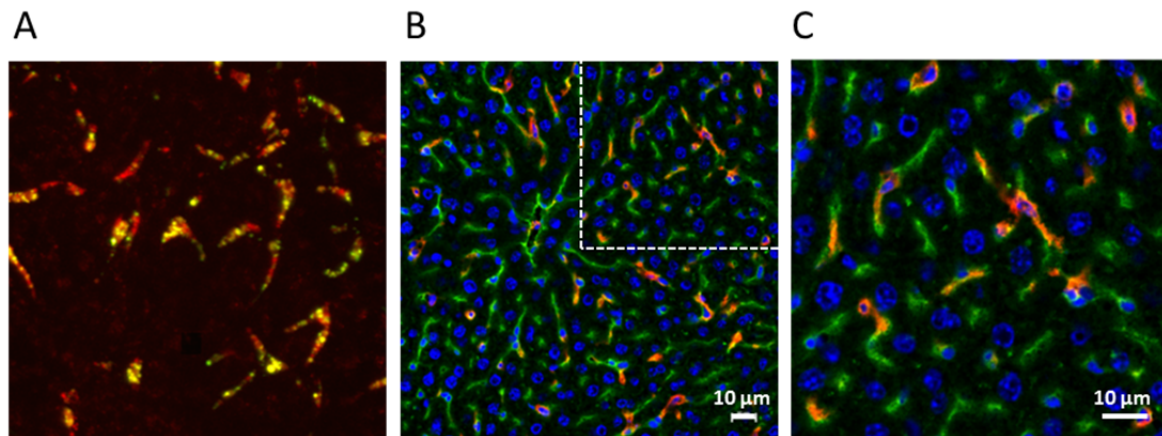


**Abb. 3.11: Hepatische Expression von Entzündungsmarkern nach TRL-Injektion.** TRL aus hyperlipämischem Plasma (bzw. physiologische Kochsalzlösung als Kontrolle) wurden intravenös injiziert, nach 4 h wurden die Mäuse sakrifiziert und die Lebern entnommen. Die Genexpression wurde mittels qPCR gemessen. (n = 6, Mittelwert ± s.e.m. Die Daten sind exemplarisch für drei unabhängige Experimente.  $P \leq 0,01$ : \*\*,  $P \leq 0,001$ : \*\*\*)

Die Expressionsanalyse zeigt, dass die TRL die Expression der pro-inflammatorischen Zytokine Tnf $\alpha$ , Il1 $\beta$ , Il6, Ccl2 und Cxcl10 induzieren, wobei das Ausmaß der Induktion sich unterscheidet (ca. 10x bis 300x im Verhältnis zur Expression nach Kontrollinjektion). Des Weiteren ist auch die Expression von Pml und Trem1 4 h nach der Injektion erhöht (7x bzw. 10x), während die Trem2-Expression signifikant reduziert ist (auf 20% verglichen mit der Kontrollgruppe). Die Expressionsanalyse im Fettgewebe, welches auch TRL aufnimmt, ergab ebenfalls eine Induktion der entsprechenden Gene, jedoch mit einem deutlich geringeren Ausmaß (Daten nicht gezeigt). Die TRL aus hyperlipämischem Plasma induzieren also eine pro-inflammatorische Antwort in der Leber.

### 3.2.3 TRL-Aufnahme in Leberzellen

Um zu analysieren, welche Zellen der Leber die injizierten Lipoproteine aufnehmen, wurden diese in einem separaten Experiment mit dem DiD-Farbstoff markiert. Diese sind anschließend bei Anregung durch einen Laser mit entsprechender Wellenlänge im konfokalen Mikroskop detektierbar, sodass nach der Injektion die Lokalisation mit Hilfe eines entsprechenden Mikroskops analysiert werden kann. Die Aufnahme wurde durch Alexander Bartelt aus der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt und wird in Abb. 3.12 mit einer immunhistochemischen Färbung der drei quantitativ wichtigsten Leberzelltypen verglichen.

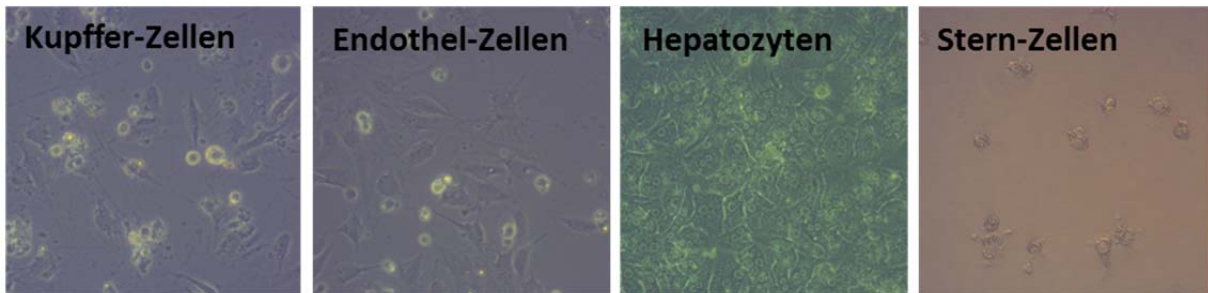


**Abb. 3.12: Aufnahme von TRL in Leberzellen.** A, TRL wurden mit dem Farbstoff DiD (rot) markiert und intravenös gleichzeitig mit Quantum Dot-Nanosomen (grün) injiziert, nach 15 min wurde die Lokalisation mittels konfokaler Lasermikroskopie untersucht. B, und C, Zur Veranschaulichung der Leber-Morphologie wurden Cryo-Schnitte mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern gegen F4/80 (Oberflächenmarker von Kupffer-Zellen, rot) und CD31 (Oberflächenmarker von sinusoidalen Leber-Endothel-Zellen, grün) sowie einem DNA-Farbstoff (blau) gefärbt.

DiD-markierte TRL sind 15 min nach Injektion z. T. diffus verteilt im Parenchym, v. a. aber akkumuliert in länglichen Zellen innerhalb der Sinusoide zu finden und kolokalisieren mit fluoreszierenden Nanosomen (120) (Abb 3.12A). Der Vergleich mit der Immunfluoreszenz-Färbung von Kupffer- und Endothelzellen (Abb 3.12B, Vergrößerung in Abb. 3.12C) zeigt, dass diese TRL offenbar zum Großteil von Kupffer-Zellen, den Gewebe-residenten Makrophagen der Leber, aufgenommen werden.

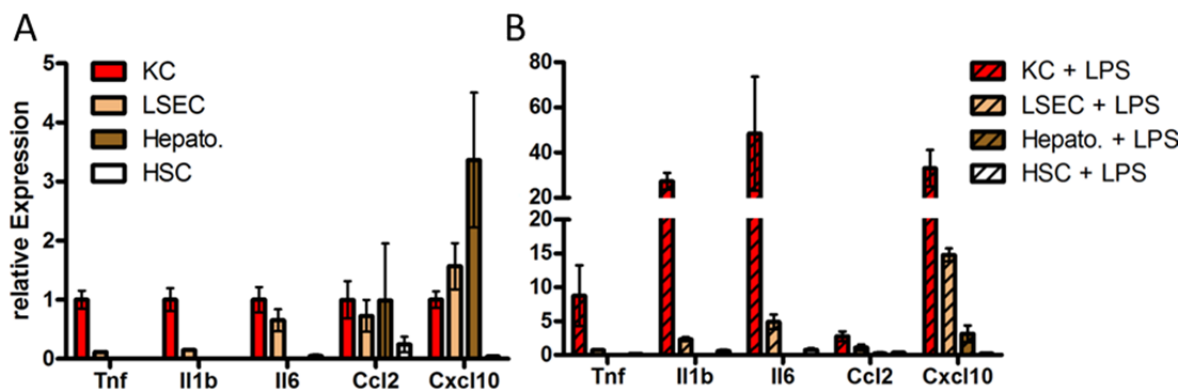
### 3.2.4 Beteiligung der Leberzellen an der pro-inflammatorischen Reaktion

Die bisherigen Ergebnisse dieses Abschnittes zeigen eine pro-inflammatorische Reaktion der Leber sowie die Aufnahme von TRL in Parenchymzellen (Hepatozyten) und Kupffer-Zellen. Die Leber enthält des Weiteren sinusoidale Endothelzellen (LSEC) sowie Stern-Zellen (HSC). Um die Rolle der verschiedenen Leberzelltypen bei der inflammatorischen Reaktion zu studieren, wurden diese nach etablierten Protokollen mit Hilfe von Antikörpern gegen spezifische Oberflächenmoleküle bzw. aufgrund ihrer Größe durch Dichtegradienten aufgereinigt.



**Abb. 3.13: Primäre Leberzellen nach Zelltyp-spezifischer Isolation.** Kupfer-Zellen, sinusoidale Leber-Endothel-Zellen, Hepatozyten und Stern-Zellen wurden nach etablierten Protokollen isoliert und in geeigneten Kultur-Medien ausplattiert. Durchlicht-mikroskopische Aufnahmen wurden an d1 vor Stimulation der Zellen aufgenommen (Kupfer-, Endothel-, Stern-Zellen: Vergrößerung 40x, Hepatozyten: 20x).

Die so isolierten primären Leberzellen wurden in entsprechenden Zellkulturmedien an d1 nach Isolation mit LPS, dessen Vorhandensein in den TRL vermutlich die pro-inflammatorische Antwort *in vivo* auslöst, *in vitro* stimuliert und die Induktion von Zytokin-Genen analysiert.

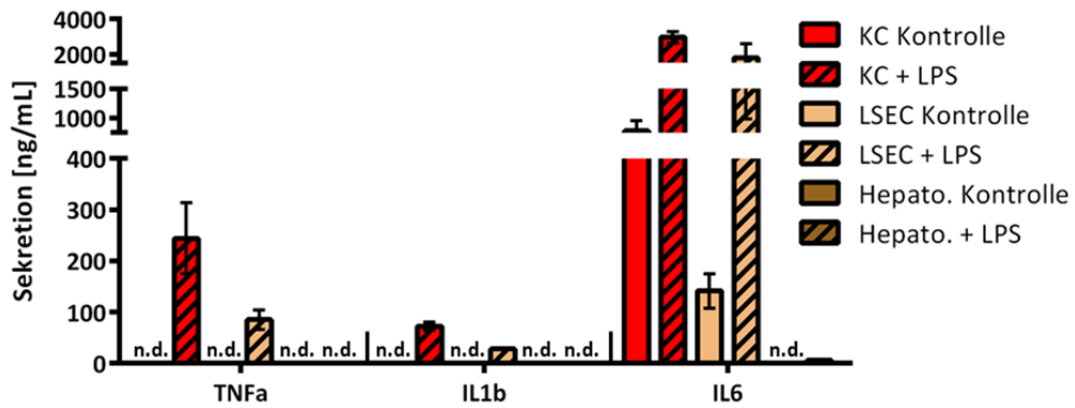


**Abb. 3.14: Zytokin-Expression in primären Leberzellen vor und nach LPS-Stimulation.** Primäre Leberzellen wurden 1 d nach Isolation für 4 h mit LPS stimuliert, die Zytokin-Expression wurde mittels qPCR gemessen. A, Basale Expression in unstimulierten Zellen. Die relative Expression, normiert auf die Werte in Kupfer-Zellen, ist dargestellt. B, Relative Expression nach LPS-Stimulation, bezogen auf die basale Expression in Kupfer-Zellen (A.). (Mittelwert  $\pm$  s.e.m. aus zwei unabhängigen Experimenten mit je  $n = 2$ ). KC, Kupfer-Zellen; LSEC, Endothelzellen; Hepato., Hepatozyten; HSC, hepatische Stern-Zellen.

Die Ergebnisse dieses Experiments zeigen, dass die Gene der pro-inflammatorischen Zytokine Tnf $\alpha$  und Il1 $\beta$  basal v. a. von Kupfer-Zellen exprimiert werden, Il6 zusätzlich auch von Endothelzellen. Die Chemokine Ccl2 und Cxcl10 werden basal auch vergleichbar hoch bzw. höher von LSEC und Hepatozyten exprimiert. Hepatische Stern-Zellen zeigen im Vergleich mit den anderen Leberzelltypen kaum detektierbare Expression der Zytokine. Die Stimulation mit LPS bewirkt eine Induktion aller Zytokine und Chemokine v. a. in Kupfer-Zellen; die Induktion in Endothelzellen ist deutlich schwächer, in Hepatozyten und Stern-Zellen findet praktisch keine Induktion der mRNA-Expression statt. Dies gilt auch für eine 100-fach höhere LPS-Konzentration (Daten nicht gezeigt).

Um die Sekretion ausgewählter Zytokine zu untersuchen, wurden primäre Kupfer-Zellen, Endothelzellen und Hepatozyten über einen Zeitraum von 4 h und 18 h mit LPS stimuliert. Die Konzentration der sekretierten Zytokine im Zellkultur-Überstand wurde mittels ELISA gemessen.

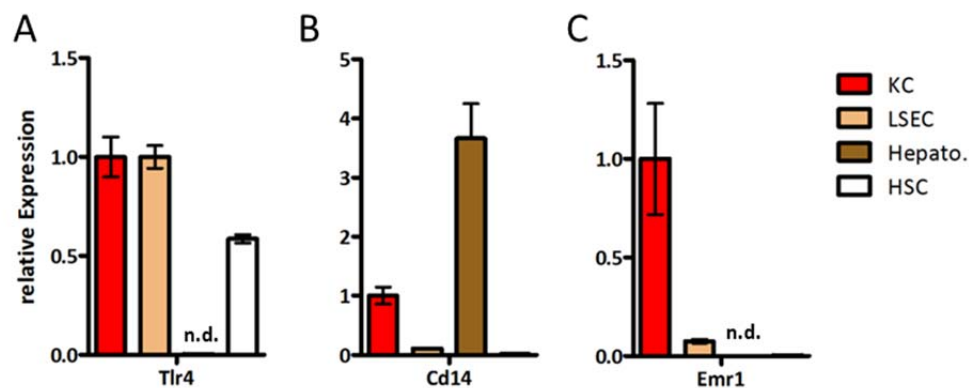




**Abb. 3.15: basale Zytokin-Sekretion aus primären Leberzellen und nach LPS-Stimulation.** Primäre Leberzellen wurden 4 h nach Isolation für 18 h mit LPS stimuliert und die Zytokin-Sekretion mittels ELISA gemessen. (Mittelwert ± s.e.m. aus zwei unabhängigen Experimenten mit je n = 2) n.d., nicht detektierbar.

Die Sekretionsdaten der Zytokine TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$  und IL6 zeigen, dass diese nach LPS-Stimulation am stärksten von Kupffer-Zellen sezerniert werden, während die Sekretion durch Endothelzellen etwa halb so hohe Werte erreicht. Hepatozyten dagegen sekretieren keine detektierbaren Konzentrationen von TNF $\alpha$  und IL1 $\beta$  und nur sehr geringe Mengen an IL6 nach LPS-Stimulation. Gleiches gilt bei den Hepatozyten nach Stimulation mit einer höheren LPS-Konzentration (Daten nicht gezeigt).

Um auf einen LPS-Stimulus reagieren zu können, benötigen Zellen neben dem TLR4 zusätzlich den Corezeptor CD14, welcher die LPS-Bindung an den Rezeptor vermittelt. Die Expression dieser beiden Moleküle wurde ebenfalls in den primären Zellen untersucht und ist im Folgenden dargestellt.

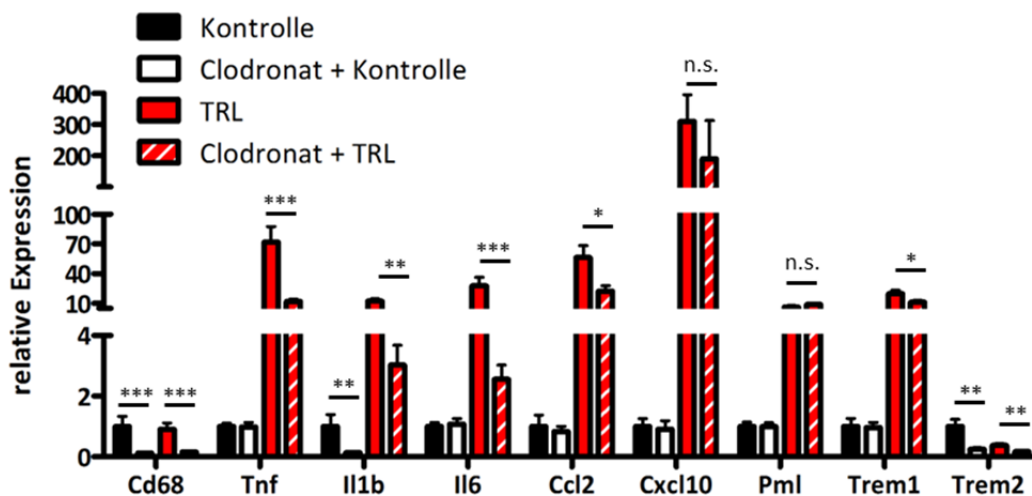


**Abb. 3.16: Expression der LPS-Rezeptoren und eines Makrophagenmarkers in primären Leberzellen.** Die Expression von Tlr4 (A) und des Corezeptors Cd14 (B) sowie des Kupfferzellmarkers Emr1 (C) wurde mittels qPCR gemessen. Die relative Expression, normiert auf die Werte in Kupffer-Zellen, ist dargestellt. (Mittelwert ± s.e.m. aus zwei unabhängigen Experimenten mit je n = 2) n.d., nicht detektierbar.

Die Expressionsanalyse der LPS-Rezeptoren zeigt, dass Endothelzellen zwar eine vergleichbar hohe Tlr4-Expression (Abb. 3.16A) wie Kupffer-Zellen haben, jedoch eine viel niedrigere Cd14-Expression (Abb. 3.16B). Mit etwas niedrigeren Werten gilt dies auch für Stern-Zellen. Hepatozyten exprimieren zwar mehr Cd14-mRNA als Kupffer-Zellen, es ist jedoch keine Tlr4-Expression detektierbar. Nur Kupffer-Zellen exprimieren sowohl Tlr4 als auch Cd14 in relativ hohem Maß. Diese Expressionsmuster erklären vermutlich die unterschiedliche Responsivität der primären Leberzellen. Die Expressionsanalyse des Kupfferzellmarkers Emr1 (Abb. 3.16C) dient zur Kontrolle der Reinheit der

isolierten Zellpopulationen. Eine messbare Expression in der Endothelzellfraktion lässt vermuten, dass ein kleiner Teil Kupffer-Zellen in dieser Fraktion vorhanden ist, welcher möglicherweise die Expression (Abb. 3.14) und Sekretion (Abb. 3.15) der Zytokine erhöht.

Kupffer-Zellen scheinen also für die LPS-Antwort eine zentrale Rolle einzunehmen und damit vermutlich auch für die pro-inflammatorische Wirkung von TRL in der Leber. Um zu analysieren, ob Kupffer-Zellen auch *in vivo* für die pro-inflammatorische Antwort auf die Lipoproteine verantwortlich sind, wurden Kupffer-Zellen depletiert. Dies erfolgte durch Injektion von Clodronat-Liposomen, welche nach phagozytotischer Aufnahme durch Makrophagen für diese zytotoxisch sind. Die Expression von Entzündungsmarkern nach TRL-Injektion in KC-depletierten Lebern im Vergleich zu nicht-Clodronat-behandelten Mäusen ist in Abb. 3.17 dargestellt.



**Abb. 3.17: Expression von Entzündungsmarkern nach TRL-Injektion in der Leber mit und ohne Kupfferzell-Depletion.** Kupffer-Zellen wurden depletiert, indem 4 d vor TRL-Injektion Clodronat-Liposomen intravenös appliziert wurden. TRL aus hyperlipämischem Plasma oder Kochsalzlösung (Kontrolle) wurden intravenös injiziert, nach 4 h wurden die Mäuse sakrifiziert und die Lebern entnommen. Die Genexpression wurde mittels qPCR gemessen. (n = 6, Mittelwert ± s.e.m. Die Signifikanzen zwischen Kontrolle und TRL sind nicht dargestellt. n.s., nicht signifikant,  $P \leq 0,05$ ; \*,  $P \leq 0,01$ ; \*\*,  $P \leq 0,001$ ; \*\*\*)

Die Expressionsmessung des Makrophagen-Markers Cd68 in den Lebern Clodronat-behandelter Mäuse ergibt eine signifikant reduzierte Expression. Dies zeigt zunächst, dass die Kupffer-Zell-Depletion erfolgreich war. Des Weiteren bewirkt die Clodronat-Applikation auch eine signifikante Reduktion der basalen Trem2- und Il1 $\beta$ -Expression. Die basale Expression der weiteren hier analysierten Gene ist durch die Clodronat-Behandlung nicht beeinflusst. Die Induktion der Genexpression durch TRL ist jedoch signifikant reduziert, wenn zuvor Clodronat injiziert wurde, mit Ausnahme von Cxcl10 und Pml. Dieses Experiment zeigt, dass Kupffer-Zellen für die pro-inflammatorische Antwort nach TRL-Injektion hauptverantwortlich sind. Die Gene, deren Expression durch Clodronat-Behandlung vor TRL-Injektion nicht beeinflusst sind, werden vermutlich vorrangig von anderen Leberzellen, wie für Cxcl10 gezeigt (s. Abb. 3.14), exprimiert.

Zusammenfassend lässt sich für diesen Teil der Arbeit sagen, dass eine Assoziation TRL-gebundener Endotoxämie mit dem metabolischen Syndrom in humanen Proben gezeigt werden konnte. Mit diesen pro-inflammatorischen Lipoproteinen wurde ein akutes *in vivo*-Modell der metabolischen Entzündung in der Leber etabliert und die Aufnahme dieser Lipoproteine in die Parenchym-Zellen und Makrophagen der Leber (Kupffer-Zellen) gezeigt. Mit *in vitro*-Experimenten wurde die

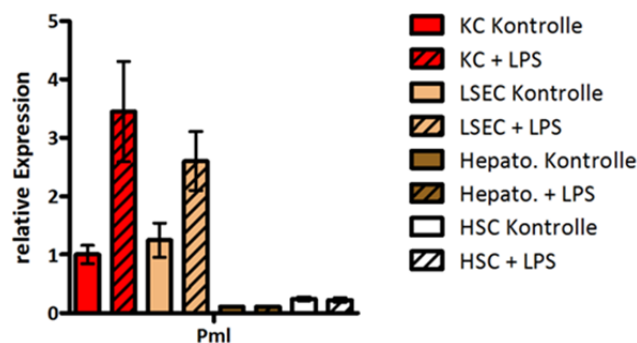
Beteiligung der verschiedenen Leberzelltypen an einer pro-inflammatorischen Antwort untersucht und eine dominante Rolle der Kupffer-Zellen gefunden, welche sich mit der Expression der LPS-Rezeptoren begründen lässt. In einem Experiment mit Makrophagen-Depletion konnte die wichtige Funktion der Kupffer-Zellen für die akute metabolische Stress-Antwort *in vivo* gezeigt werden.

### 3.3 Regulation der NAFLD durch PML

Im Rahmen der dieser Doktorarbeit vorausgehenden Diplomarbeit wurde bereits eine Rolle von PML bei der Regulation von Zytokinen in einer humanen Adipozyten-Zelllinie gefunden. Hier sollte nun eine mögliche Funktion des Stress-Regulators PML bei der Übergewicht-induzierten metabolischen Entzündung im Fettgewebe und v. a. bei der nicht-alkoholischen Fettleber-Erkrankung (NAFLD) untersucht werden, worauf bereits die Daten aus Kapitel 3.1 (Abb. 3.6) hindeuten.

#### 3.3.1 PML-Expression in primären Leberzellen und einer Hepatom-Zelllinie

Um die PML-Expression in primären Leberzellen zu untersuchen, wurden diese nach etablierten Protokollen isoliert. Zur Analyse der Induzierbarkeit des Pml-Gens durch inflammatorische Reize wurden die Zellen mit LPS stimuliert.

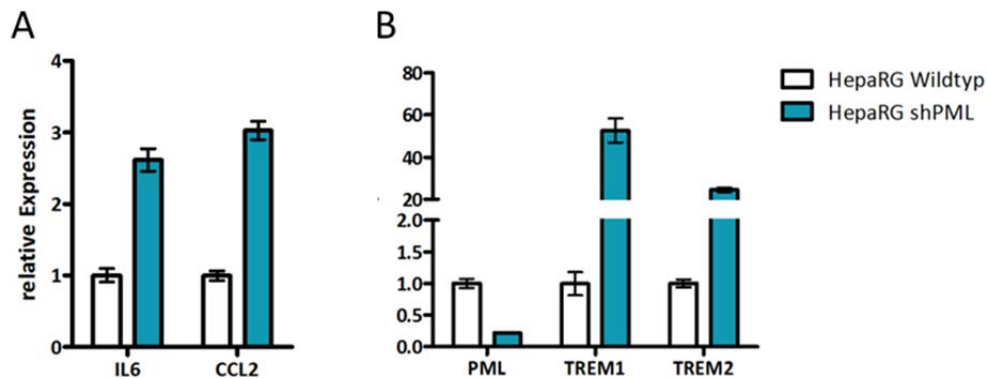


**Abb. 3.18: PML-Expression in primären Leber-Zellen.** Isolierte Zellen wurden an d1 nach Isolation für 4 h mit LPS stimuliert und die Pml-Expression mittels qPCR gemessen. Dargestellt ist die relative Expression im Verhältnis zur basalen Expression in Kupffer-Zellen. (Mittelwert  $\pm$  s.e.m. aus zwei unabhängigen Experimenten mit je n = 2) KC, Kupffer-Zellen; LSEC, Endothelzellen; Hepato., Hepatozyten; HSC, hepatische Stern-Zellen.

Der Vergleich der Pml-Expression in den vier isolierten primären Leberzellpopulationen zeigt eine vergleichbar hohe Expression in Kupffer-Zellen und Endothelzellen und eine viel geringere Expression in Hepatozyten sowie Stern-Zellen. Des Weiteren wird die Expression des Pml-Gens durch LPS-Stimulation induziert, jedoch nur in Kupffer- und Endothelzellen. Auch bei Stimulation mit einer 100-fach höheren LPS-Konzentration war keine Induktion der Pml-Expression in Hepatozyten und Stern-Zellen zu beobachten (Daten nicht gezeigt).

Vor der Durchführung von Experimenten mit PML-defizienten Mäusen zur Analyse der Rolle bei metabolischem Stress wurde PML in der humanen Hepatom-Zelllinie HepaRG analysiert. Mittels

shRNA wurde die PML-Expression reduziert, die Zelllinie wurde in Bezug auf die Expression ausgewählter Zytokine und weiterer potentiell relevanter Gene untersucht.

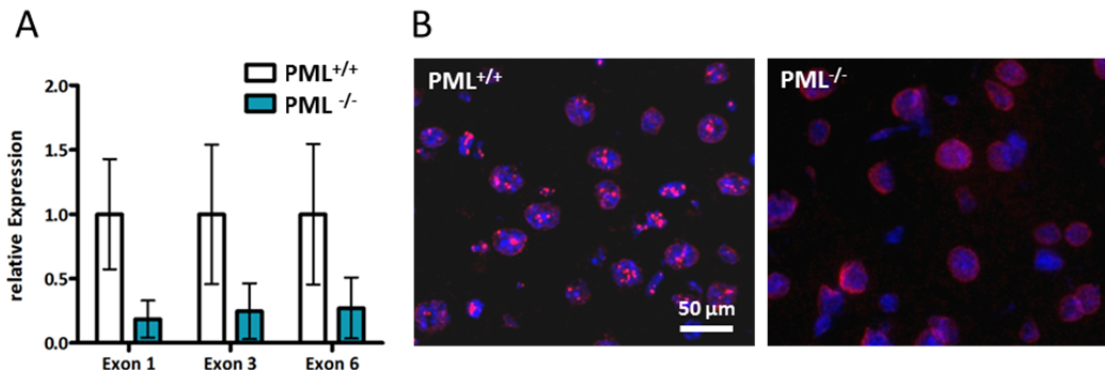


**Abb. 3.19: Charakterisierung der PML-knockdown HepaRG-Zellen.** Die humane Hepatom-Zelllinie HepaRG wurde lentiviral mit PML-spezifischer shRNA stabil transfiziert. Die Genexpression in kultivierten Zellen wurde mittels qPCR gemessen. A, Expression der pro-inflammatorischen Zytokine IL6 und CCL2. B, Expression von PML, TREM1 und TREM2. Dargestellt ist die relative Expression im Verhältnis zur Expression in Wildtyp-Zellen.

Diese Daten zeigen, dass die für metabolischen Stress mitverantwortlichen Zytokine IL6 und CCL2 von humanen Hepatom-Zellen mit reduzierter PML-Expression deutlich verstärkt exprimiert werden (Abb. 3.19A). Diese Ergebnisse spiegeln das Expressionsmuster in einer humanen Adipozyten-Zelllinie mit ebenfalls erhöhter IL6- und CCL2-Expression bei reduzierter PML-Expression im Vergleich zu Kontrollzellen wieder (Daten nicht gezeigt). In diesen beiden wichtigen metabolischen Zelltypen haben das PML-Protein oder PML-Kerndomänen also scheinbar einen hemmenden Effekt auf die Expression der untersuchten inflammatorischen Zytokine. Abb. 3.19B zeigt die reduzierte PML-Expression in den stabil transfizierten Hepatomzellen, die gleichzeitig eine deutlich erhöhte Expression von TREM1 und TREM2 mit sich bringt. In diesen Zellen scheint PML also an der Regulation inflammatorischer Gene beteiligt zu sein.

### 3.3.2 Charakterisierung der PML-defizienten Mäuse

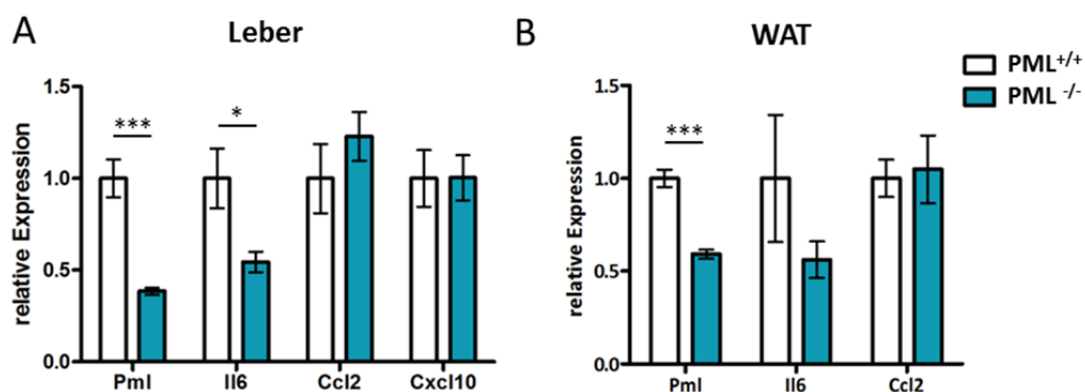
Eine physiologische Relevanz lässt sich nur mit in vivo-Experimenten analysieren, deshalb wurden die folgenden Experimente mit PML-defizienten Mäusen (118) und Wildtyp-Tieren durchgeführt. Das PML-Protein bildet die Basis für subnukleäre Proteinkomplexe, die PML-Kerndomänen. Zur Analyse der PML-Defizienz wurde die Expression des Exons 1, welches sich vor dem Insertionslokus des transgenen Vektors befindet, die des Exons 3 hinter dem Insertionslokus sowie des Exons 6, welches die Kernlokalisationssequenz enthält, analysiert. Die Kerndomänen lassen sich mit Hilfe eines spezifischen primär-Antikörpers und eines Fluoreszenz-gekoppelten sekundär-Antikörpers sichtbar machen. Die Daten in Abb. 3.20 sind in Kooperation mit Jan Kozik und Johannes Herkel (UKE) entstanden, Aufnahmen wurden von Jan Kozik zur Verfügung gestellt.



**Abb. 3.20: Charakterisierung der PML-defizienten Mäuse.** A, PML-Expression von Exon 1, 3 und 6 in der Leber von Wildtyp- (PML<sup>+/+</sup>) und PML-defizienten (PML<sup>-/-</sup>) Mäusen. Dargestellt ist die mittels qPCR gemessene relative Expression im Verhältnis zur Expression in Wildtyp-Zellen. (n = 3, Mittelwert ± s.e.m.) B, Immunhistochemische Färbung von PML in Leber-Schnitten. Diese wurden mit einem spezifischen Antikörper inkubiert und dessen Bindung mit einem Fluoreszenz-markierten sekundär-Antikörper (rot) detektiert. Zellkerne erscheinen durch einen DNA-Farbstoff blau.

Die quantitative Analyse spezifischer Exone ergab, dass die Expression des Exons vor (1) und nach (3) Insertionslokus des transgenen Vektors sowie das NLS-enhaltende Exon (6) überraschenderweise nur auf 20-30% der Expression in Wildtyp-Lebern reduziert ist. Die immunhistochemischen Färbungen zeigen deutlich die punktuelle Struktur der PML-Kerndomänen in den mit Hilfe des DNA-Farbstoffs blau erscheinenden Zellkernen in dem hier gezeigten Cryo-Schnitt einer Wildtyp-Leber (Abb. 3.20B, links). Aufgrund der Größe sind diese überwiegend als Hepatozyten-Zellkerne zu identifizieren. Die Inkubation von Leberschnitten aus PML-defizienten Mäusen mit dem spezifischen Antikörper (Abb. 3.20B, rechts) zeigt das Fehlen von PML-Kerndomänen. Es ist jedoch eine diffuse, Zellkern-assoziierte Färbung sichtbar.

Da die Rolle von PML bei der Integration metabolischer Stress-Signale analysiert werden sollte, wurden die beiden wichtigen metabolischen Organe Leber und Fettgewebe (WAT) von Mäusen zunächst unter basalen Bedingungen, d. h. ohne metabolischen Stress, auf die Expression typischer Zytokine untersucht (Abb. 3.21).



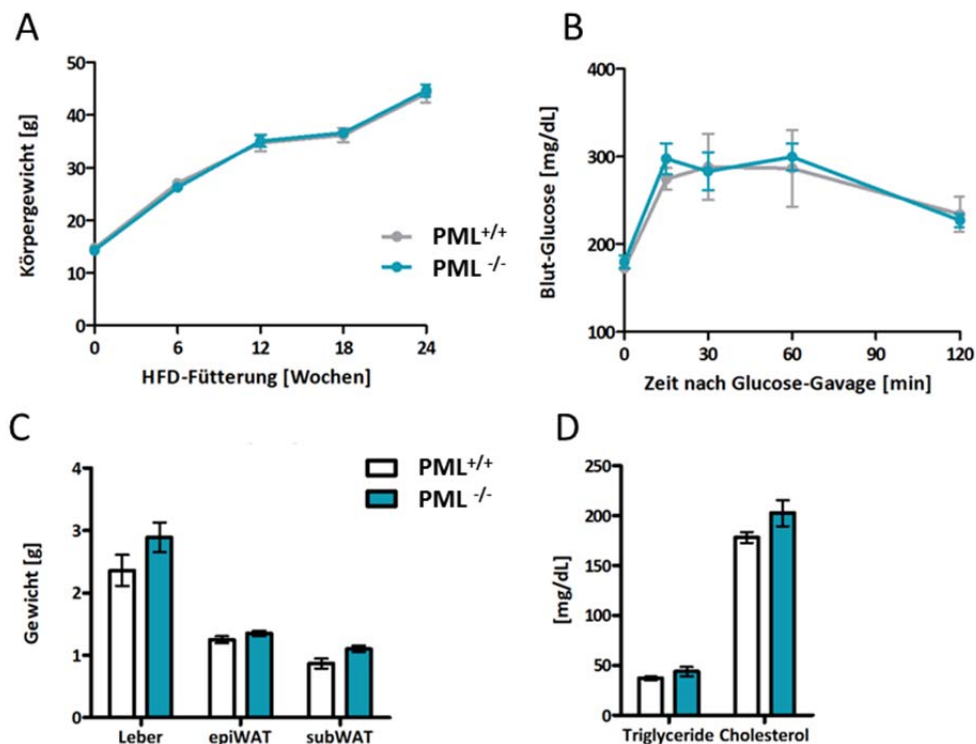
**Abb. 3.21: Genexpression von Pml und Zytokinen in metabolischen Organen von Wildtyp- und PML-defizienten Mäusen.** Die Expressionsanalysen in A, Leber und B, Fettgewebe wurden in Tieren, die unter Standard-Bedingungen gehalten wurden, mittels qPCR durchgeführt. Dargestellt ist die relative Expression im Verhältnis zur Expression in Wildtyp-Tieren. (n = 8, Mittelwert ± s.e.m.,  $P \leq 0,05$ ; \*,  $P \leq 0,001$ : \*\*\*)

Die Expressionsanalyse des Pml-Gens (mit einer Exon 1- und -2-überspannenden Sonde) zeigt in den PML-defizienten Tieren eine signifikante Reduktion in Leber und Fettgewebe im Vergleich zu Wildtyp-

Mäusen. Die hepatische Expression von Il6 ist in PML-defizienten Mäusen signifikant und im Fettgewebe tendenziell niedriger als in den entsprechenden Organen von Wildtyp-Tieren. Gleichzeitig ist die PML-Expression nicht vollständig depletiert. Ohne die Induktion von metabolischem Stress ist in diesen Tieren die Il6-Expression durch PML-Kerndomänen reguliert, die basale Expression weiterer Zytokine ist nicht verändert.

### 3.3.3 Effekte einer pro-steatotischen Hochfettdiät in Wildtyp- und PML-defizienten Mäusen

Zur Analyse einer potentiellen Funktion von PML bei der Modulation chronischer metabolischer Entzündung wurden Wildtyp- und PML-defiziente Mäuse mit einer Hochfettdiät über einen Zeitraum von 24 Wochen gefüttert. Zur detaillierteren Analyse des metabolischen Phänotyps PML-defizienter Mäuse wurde während der Fütterungsdauer die Entwicklung des Körpergewichts verfolgt und nach Sakrifizierung das Gewicht der metabolisch wichtigsten Organen ermittelt. Zuvor wurde ein oraler Glucose-Toleranztest (OGTT) zur Feststellung des Ausmaßes der Insulinresistenz durchgeführt.

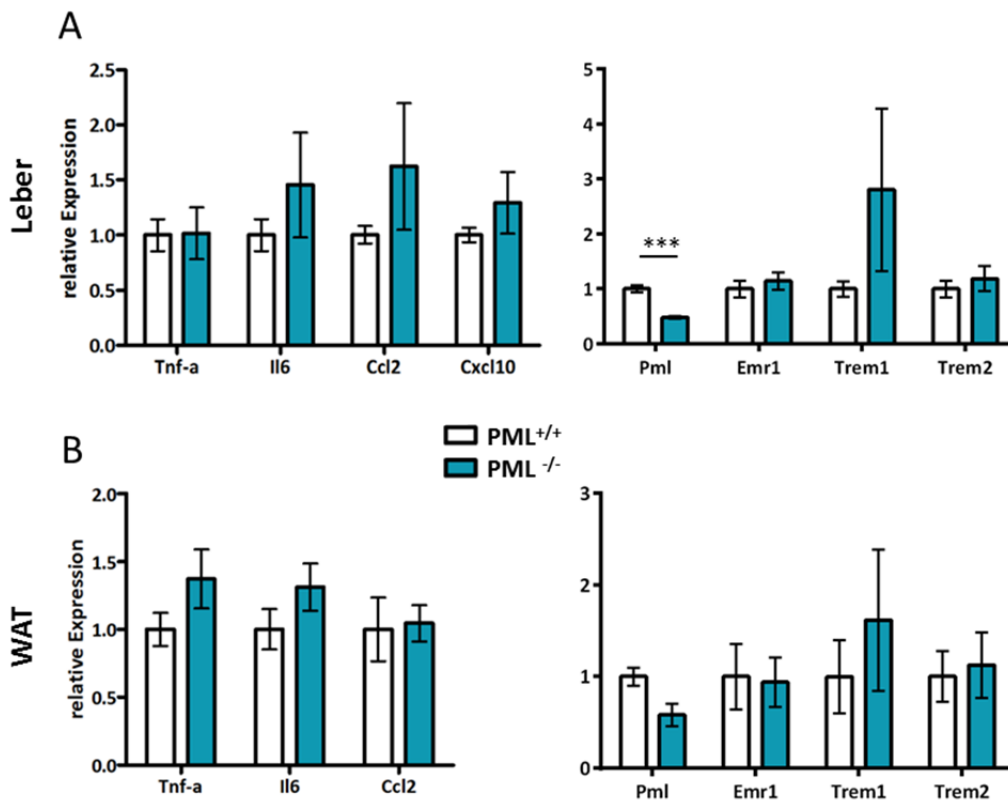


**Abb. 3.22: Phänotypische Parameter von Wildtyp- und PML-defizienten Mäusen nach Fütterung einer Hochfettdiät.** Die Mäuse wurden über einen Zeitraum von 24 Wochen mit einer Hochfettdiät gefüttert. A, Das Körpergewicht wurde über den Fütterungszeitraum erfasst. B, Nach 24-wöchiger Hochfettdiät wurde ein oraler Glucosetoleranztest durchgeführt. C, Nach Sakrifizierung der Tiere wurden die Organe entnommen und gewogen. D, Triglycerid- und Cholesterol-Konzentration im Plasma nach Fütterung der Hochfettdiät. (n = 8, Mittelwert ± s.e.m.)

Wie aus Abb. 3.22A hervorgeht, hatten Wildtyp- und PML-defiziente Mäuse im Mittel ein vergleichbares Gewicht beim Beginn der Fütterung und nahmen über den Fütterungszeitraum gleichermaßen zu, sodass keine Genotyp-spezifischen Unterschiede beim Körpergewicht zu erkennen sind. Die durch eine Hochfettdiät hervorgerufene Insulinresistenz lässt sich durch einen oralen

Glucose-Toleranz-Test erfassen. Es zeigen sich bei den Mäusen für eine Hochfetttdiät typische Glucose-Werte mit erhöhten basalen Glucose-Konzentrationen und über den Zeitraum von 1 h nach Glucose-Verabreichung hohen Werten. Es bestehen jedoch keine Unterschiede zwischen Wildtyp- und PML-defizienten Mäusen (Abb. 3.22B). Auch die Gewichte von Leber, epididymalem und subkutanem Fettgewebe sind nicht unterschiedlich zwischen den Genotypen (Abb. 3.22C). Die Plasma-Konzentrationen von Triglyzeriden und Cholesterol schließlich sind ebenfalls in beiden Gruppen vergleichbar.

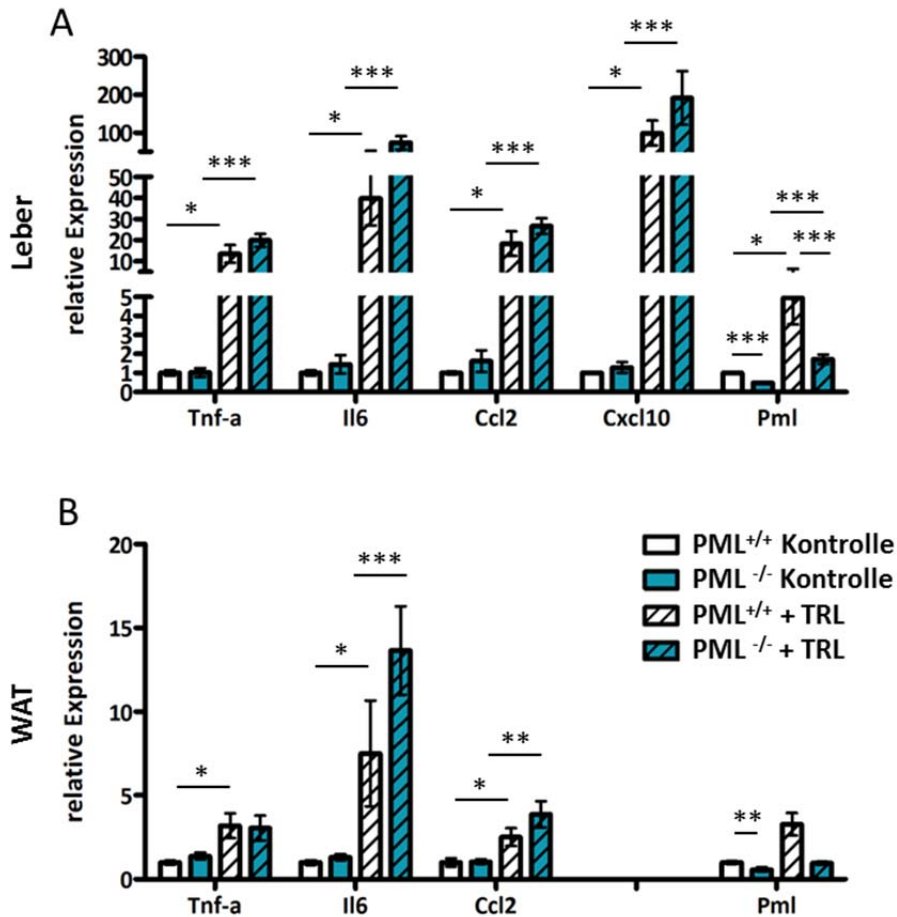
Am Ende dieser Fütterungsstudie wurden die Tiere sakrifiziert und es wurde die Expression an der metabolischen Entzündung beteiligter Zytokine sowie weiterer Gene in Leber und Fettgewebe gemessen.



**Abb. 3.23: Expressionsanalyse in metabolischen Organen von Wildtyp- und PML-defizienten Mäusen nach Fütterung einer Hochfetttdiät.** Die Expression in A, Leber und B, Fettgewebe wurde mittels qPCR durchgeführt. Die relative Expression im Verhältnis zur Genexpression in Wildtyp-Tieren ist dargestellt. (n = 4, Mittelwert ± s.e.m.,  $P \leq 0,001$ : \*\*\*)

Die Analyse von Leber und Fettgewebe nach Induktion von metabolischem Stress zeigt weiterhin eine reduzierte Pml-Expression in PML-defizienten Mäusen, während sich die Expressionswerte der an metabolischer Entzündung beteiligten Zytokine  $Tnf\alpha$ ,  $Il6$ ,  $Ccl2$  und  $Cxcl10$  nicht signifikant unterscheiden. Es ist lediglich ein Trend zu höheren Expressionswerten zu erkennen, der jedoch nicht konsistent zwischen Leber und Fettgewebe ist.  $Emr1$  (F4/80) ist ein Makrophagenmarker und dient der Abschätzung der Makrophagen-Anzahl im Gewebe, welche demnach in beiden Mausgruppen in der Leber und im Fettgewebe vergleichbar ist. Die Expression von  $Trem1$  zeigt die stärkste Tendenz aller analysierten Gene zu erhöhten Werten in PML-defizienten Tieren, erreicht jedoch aufgrund der hohen Varianz keine statistische Signifikanz. Auch die Expression von  $Trem2$  zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen Wildtyp- und PML-defizienten Mäusen.

Wie in Kapitel 3.2.2 gezeigt, bewirkt die Injektion von Lipoproteinen eine pro-inflammatorische Antwort in der Leber. Dieses Modell der akuten metabolischen Entzündung wurde ebenfalls in PML-defizienten Mäusen und einer Wildtyp-Kontrollgruppe, nach Fütterung der Hochfettdiät, angewandt und die Effekte in der Leber und im Fettgewebe mittels Expressionsanalyse ermittelt.



**Abb. 3.24: Pro-inflammatorische Antwort auf postprandiale Lipoproteine in Wildtyp- und PML-defizienten Mäusen.** Die Expression von Zytokinen und weiterer Gene wurde 4 h nach intravenöser Injektion von TRL oder Kochsalzlösung (Kontrolle) mittels qPCR gemessen. A, Expression in der Leber. B, Expression im Fettgewebe. Die relative Expression ist bezogen auf die mittlere Expression in Wildtyp-Tieren mit Kontrollinjektion dargestellt. (n = 4, Mittelwert ± s.e.m., P ≤ 0,05: \*, P ≤ 0,01: \*\*, P ≤ 0,001: \*\*\*)

Ähnlich zu den Ergebnissen in Abb 3.11 ist auch in diesem Experiment eine deutliche TRL-vermittelte Induktion der Expression verschiedener Gene mit unterschiedlichem Ausmaß zu beobachten. Die Expressionsinduktion in der Leber (Abb. 3.24A) ist hierbei jeweils deutlich höher als im Fettgewebe (Abb. 3.24B). Auch in den PML-defizienten Mäusen ist eine Induktion des Pml-Gens durch TRL zu erkennen, welche in der Leber statistische Signifikanz erreicht. Die Expression aller gemessenen Zytokine zeigt eine Tendenz zu höheren Werten in den PML-defizienten Tieren, welche jedoch nicht signifikant höher ist als in Wildtyp-Mäusen.

Die Ergebnisse dieses Kapitels lassen sich folgendermaßen zusammenfassen: während *in vitro*-Experimente mit Hepatom- und Adipozyten-Zelllinien erhöhte Expressionswerte pro-inflammatorischer Marker bei reduzierter PML-Expression zeigten, lässt sich dieser Phänotyp *in vivo* nicht bestätigen. In den analysierten metabolischen Organen Leber und Fettgewebe ist eine Pml-mRNA-Expression von mindestens 40% des Wertes in Wildtyp-Tieren detektierbar. Die



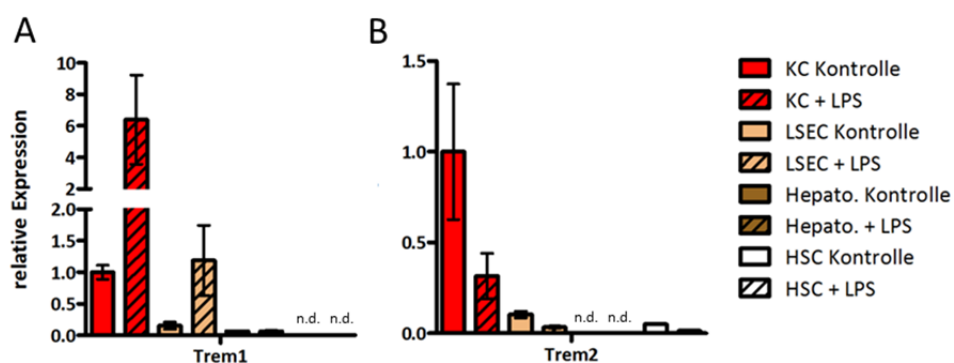
immunohistochemische Detektion des PML-Proteins in PML-defizienten Mäusen zeigt keine Ausbildung von Kerndomänen, jedoch eine diffuse, Zellkern-assoziierte Verteilung. Die Fütterung einer Hochfettdiät zur Erzeugung chronischen metabolischen Stresses bewirkt in den PML<sup>-/-</sup> Mäusen die gleiche Gewichtszunahme und Insulin-Resistenz. Gleiches gilt für die Expression von Entzündungsmarkern in Leber und Fettgewebe nach Fütterung der Hochfettdiät sowie nach einem akuten Stimulus durch TRL-Injektion. Aufgrund dieser Ergebnisse kann eine Funktion von PML-Kerndomänen bei der Regulation von chronischem und akutem metabolischem Stress ausgeschlossen werden. Die Induzierbarkeit des Pml-Gens durch pro-inflammatorische TRL legt jedoch die Vermutung nahe, dass das Pml-Gen in diesem transgenen Mausmodell nicht vollkommen inaktiviert sondern zumindest teilweise funktionell ist. Diese residuale Expression reicht möglicherweise aus, um den Phänotyp einer vollständigen PML-Defizienz zu maskieren.

### 3.4 Regulation der NAFLD durch TREM1 und TREM2

Im ersten Teil der Ergebnisse dieser Arbeit wurde eine starke Assoziation des TLR4-modulierenden TREM2 mit dem Ausprägungsgrad der NAFLD in einer humanen Kohorte gefunden: es zeigten sich spezifische Korrelationen der TREM2-Expression mit dem Steatosegrad, mit klinischen Leberentzündungsparametern sowie mit einem Fibrose-Marker (Abb. 3.7, 3.9). Des Weiteren wurden erhöhte Expressionswerte von TREM1 und TREM2 in einer humanen Hepatomzelllinie gemessen, wenn in dieser der potentielle Zellstress-Modulator PML reduziert war (Abb. 3.19). Aufgrund dieser Ergebnisse sollte eine potentielle Rolle dieser modulierenden Rezeptoren des angeborenen Immunsystems im Mausmodell untersucht werden, wofür TREM1- bzw. TREM2-defiziente Mauslinien etabliert wurden.

#### 3.4.1 TREM-Expression in primären Leberzellen

Zuerst sollte die relative Verteilung der TREM-Expression innerhalb der Leber untersucht werden. Hierfür wurden primäre Leberzellen isoliert und die Expression der Trem1- und Trem2-Gene sowie die Auswirkung eines LPS-Stimulus darauf gemessen.

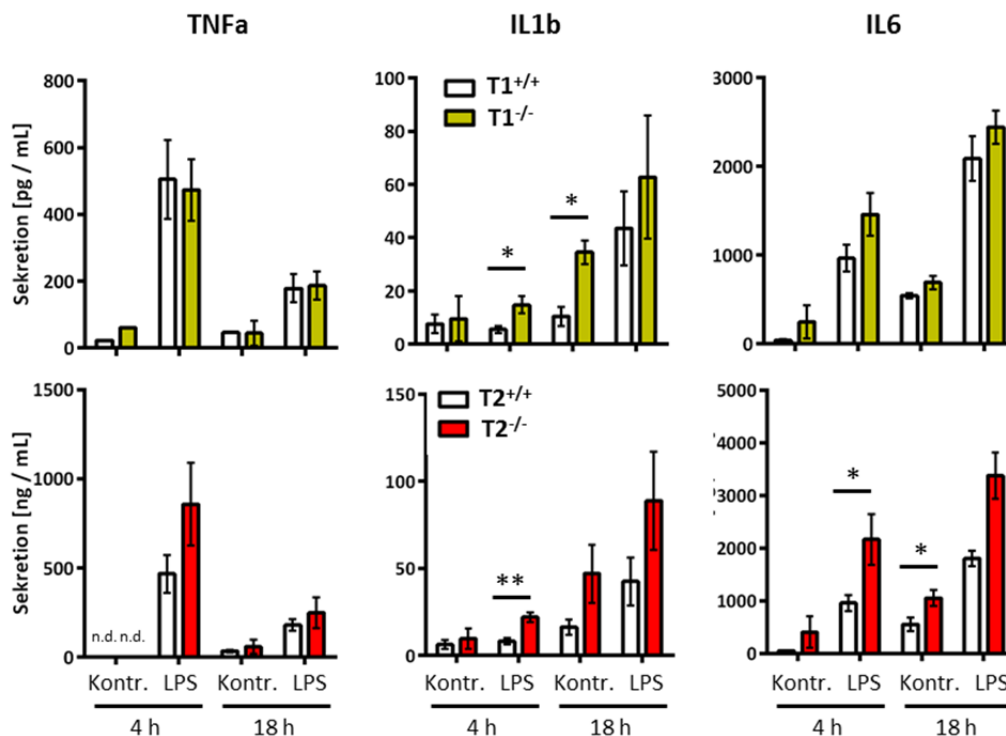


**Abb. 3.25: Trem-Expression in primären Leber-Zellen.** Isolierte Zellen wurden an d1 nach Isolation für 4 h mit LPS stimuliert und die Trem1- und Trem2-Expression mittels qPCR gemessen. Dargestellt ist die relative Expression im Verhältnis zur basalen Expression in Kupfer-Zellen. (Mittelwert ± s.e.m. aus zwei unabhängigen Experimenten mit je n = 2) n.d., nicht detektierbar.

Die Daten aus diesem *in vitro*-Experiment zeigen zunächst, dass sowohl Trem1 als auch Trem2 vorrangig in Kupffer-Zellen exprimiert werden, Endothelzellen exprimieren basal ca. 20% im Vergleich zu den Leber-residenten Makrophagen. Hepatozyten zeigen kaum eine Trem1- und keine detektierbare Trem2-Expression, in Stern-Zellen verhält sich diese Beobachtung umgekehrt. Der LPS-Stimulus zeigt inverse Effekte auf die Expression des Trem1- und des Trem2-Gens: Während Trem1 v. a. in Kupffer-Zellen durch LPS induziert wird, bewirkt dieser pro-inflammatorische Stimulus gleichzeitig eine Reduktion der Trem2-Expression in allen Zelltypen, die dieses Gen exprimieren. Eine vergleichbare Änderung der Expression erfolgt auch durch TRL-Injektion (Abb. 3.11). Dieses Regulationsmuster entspricht einer klassischen Regulation pro- bzw. anti-inflammatorischer Gene: ein akuter Stimulus wie LPS verstärkt die Expression pro-inflammatorischer Gene, deren Genprodukte eine effektive akute Antwort ermöglichen. Die Translation anti-inflammatorischer Gene, wie hier Trem2, wird dagegen durch pro-inflammatorische Stimuli kurzfristig gehemmt, um eine akute Entzündungsantwort nicht zu reduzieren.

### 3.4.2 Zytokin-Sekretion aus TREM1- und TREM2-defizienten Kupffer-Zellen

Kupffer-Zellen als Leber-residente Makrophagen zeigen im Vergleich mit den anderen Leber-Zellen die höchste TREM-Expression. Die Funktion von TREM1 und TREM2 in der Entzündung bisher nicht in Kupffer-Zellen analysiert, nur in Monozyten und Makrophagen aus anderen Geweben (82;83;102). Daher sollte die Zytokin-Sekretion durch diese Makrophagen-Population bei Vorhandensein bzw. Defizienz von TREM1 und TREM2 untersucht werden. Hierfür wurden primäre Kupffer-Zellen aus Wildtyp- und TREM1- bzw. TREM2-defizienten Mausethern isoliert und für zwei Zeiträume mit LPS stimuliert. Anschließend wurde die sezernierte Konzentration pro-inflammatorischer Zytokine mittels ELISA gemessen.



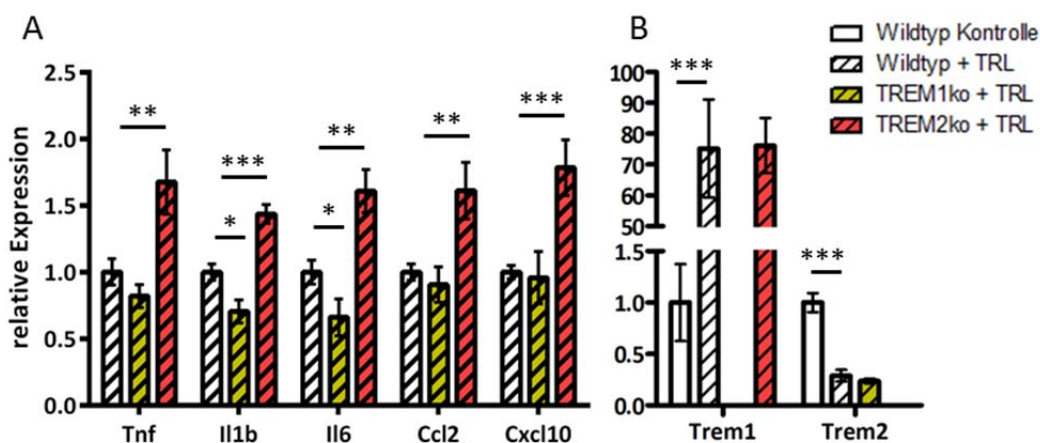
**Abb. 3.26: Zytokin-Sekretion durch TREM1- und TREM2-defiziente Kupffer-Zellen.** Primäre Leber-Makrophagen wurden isoliert und für einen Zeitraum von 4 h sowie 18 h mit LPS stimuliert. Die in das Medium

abgegebenen Zytokine wurden mittels ELISA quantifiziert. (Mittelwert  $\pm$  s.e.m. aus zwei unabhängigen Experimenten mit je  $n = 2-3$ ). n.d., nicht detektierbar.

Die Analyse zeigt, dass TREM1-defiziente Kupffer-Zellen zum Wildtyp vergleichbare Mengen der pro-inflammatorischen Zytokine TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$  und IL6 sezernieren. Die Konzentrationen der gleichen Zytokine nach Stimulation der Expression und Sekretion durch LPS sind dagegen im Kulturmedium TREM2-defizienter Kupffer-Zellen sichtbar höher als im Medium parallel isolierter Wildtyp-Zellen (Abb. 3.26 unten). TREM2 scheint demnach die LPS-Antwort zu attenuieren, während eine Regulation durch TREM1 unter diesen experimentellen Bedingungen nicht beobachtet werden konnte.

### 3.4.3 Funktion von TREM1 und TREM2 bei der akuten Lipid-vermittelten Entzündungsreaktion

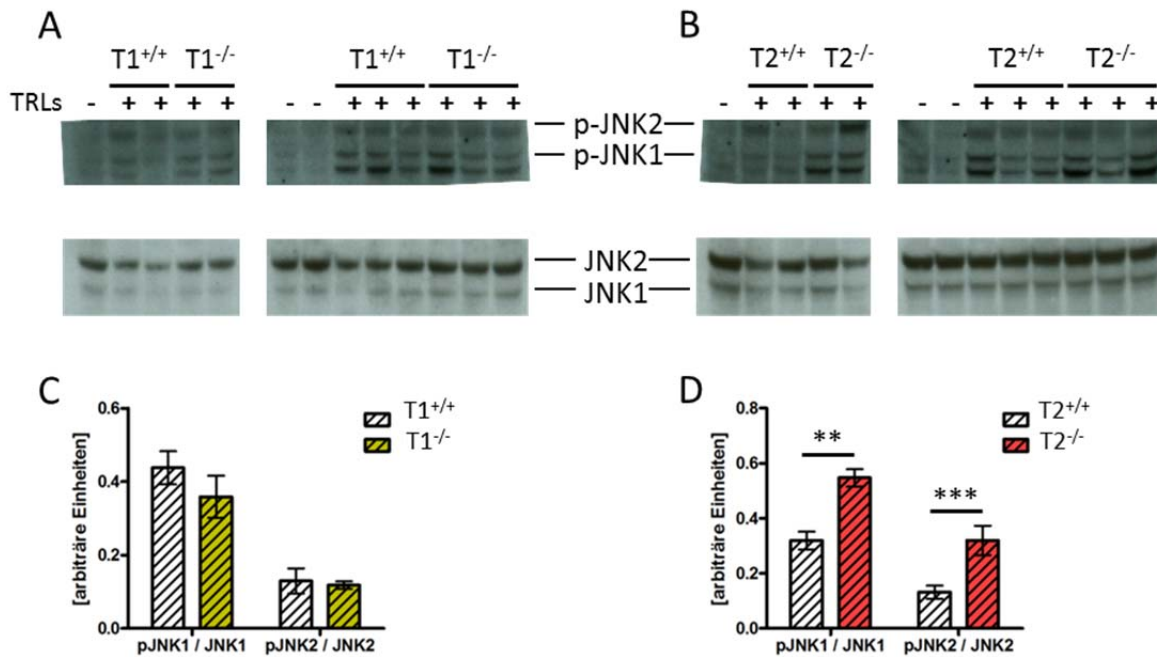
Wie in Abschnitt 3.2.2 gezeigt, wurde ein *in vivo*-Modell zur akuten Entzündungsreaktion in der Leber etabliert, die durch Lipoproteine aus hyperlipämischem Plasma ausgelöst wird. Mit Hilfe dieses Modells sollte ein möglicher Effekt von TREM1 und TREM2 bei der akuten Lipid-vermittelten pro-inflammatorischen Antwort untersucht werden.



**Abb. 3.27: Pro-inflammatorische Antwort auf Lipoproteine in TREM1- und TREM2-defizienten Mäusen.** A, Hepatische Expression pro-inflammatorischer Zytokine 4 h nach Injektion von TRL. Die relative Expression ist auf die mittlere Expression im Wildtyp mit TRL-Injektion bezogen ( $n = 7$  aus 2 unabhängigen Experimenten). B, Expression von Trem1 und Trem2 nach TRL-Injektion im Vergleich zu Lebern nicht-behandelter Wildtyp-Mäuse. Die relative Expression ist bezogen auf die mittlere Expression in Wildtyp-Tieren mit Kontrollinjektion dargestellt. ( $n = 3$ , Mittelwert  $\pm$  s.e.m.,  $P \leq 0,05$ : \*,  $P \leq 0,01$ : \*\*,  $P \leq 0,001$ : \*\*\*)

Die Ergebnisse dieses *in vivo*-Experiments zeigen, dass die Lipoprotein-induzierte Expression pro-inflammatorischer Zytokine in TREM1-defizienten Mäusen im Fall von IL1 $\beta$  und IL6 signifikant geringer im Vergleich mit Wildtyp-Tieren ist, während Mäuse ohne funktionelles Trem2-Gen für alle hier analysierten Zytokine signifikant höhere Expressionswerte erreichen. Demnach scheint funktionsfähiges TREM2 die hepatische Antwort auf diesen akuten Lipid-assoziierten pro-inflammatorischen Stimulus zu hemmen. Aus Abb. 3.27B geht hervor, dass die Trem1-Expression durch TRL-Injektion induziert wird, während die Trem2-Expression durch diesen Stimulus reduziert wird. Des Weiteren ist erkennbar, dass keine Kompensation der TREM1- oder TREM2-Defizienz durch veränderte Expression des jeweils gegenläufig wirkenden verwandten Rezeptors auf der Ebene der mRNA-Expression erfolgt.

Die Induktion der Genexpression erfolgt nach Aktivierung bestimmter Rezeptoren und daran anschließender Signalwege. Pro-inflammatorische Signale aktivieren häufig den Signalweg der Proteinkinase Jun-N-terminalen Kinase (JNK) durch Phosphorylierung dieser Kinase, woraufhin verschiedene Transkriptionsfaktoren aktiviert und die Expression entsprechender Zielgene induziert wird. Die Aktivierung des JNK-Signalweges durch TRL-Injektion wurde mittels Western Blot und spezifischen Antikörpern analysiert. Die Quantifizierung der Signalintensität und damit indirekt der Phosphorylierung erfolgte durch Normierung des jeweiligen p-JNK-Signals auf die Intensität des JNK-gesamt-Proteins bzw. der jeweiligen Isoformen JNK1 und JNK2.

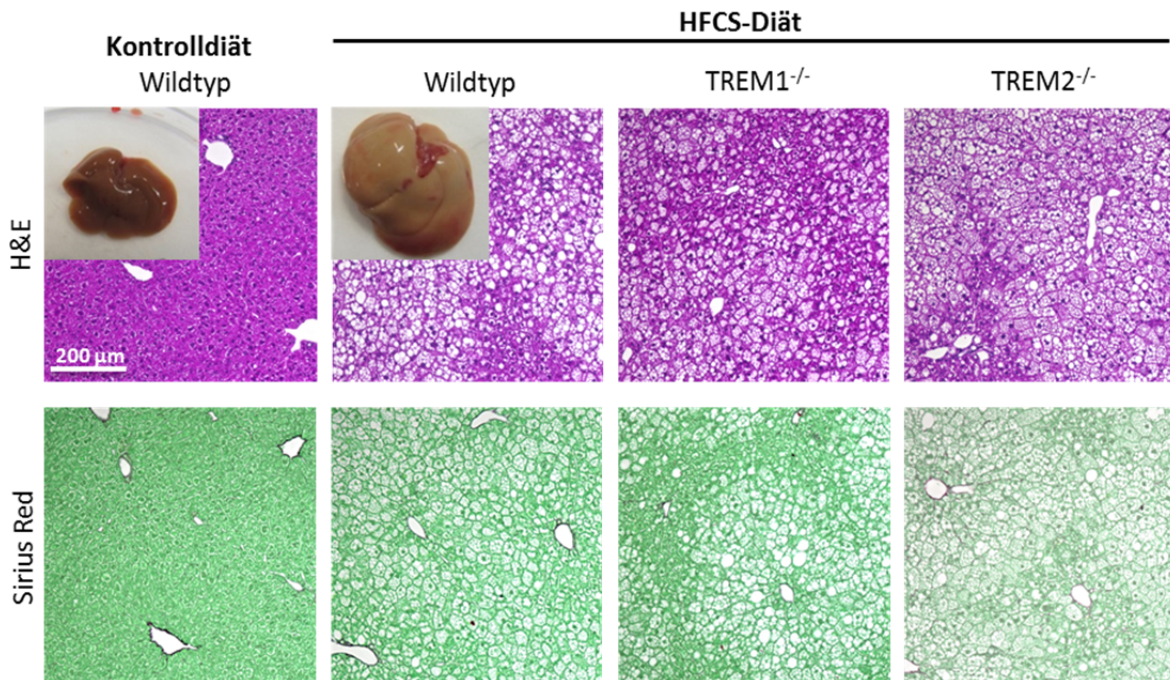


**Abb. 3.28: Aktivierung von JNK durch Lipoproteine in TREM1- und TREM2-defizienten Mäusen.** A, und B, Detektion von phospho-JNK und JNK 15 min nach Injektion von TRL mittels Western Blot in TREM1- bzw. TREM2-defizienten Lebern und Wildtyp-Kontrollen. C, und D, Quantifizierung der Phosphorylierung von JNK nach TRL-Injektion. (n=7 aus 2 unabhängigen Experimenten, Mittelwert ± s.e.m.,  $P \leq 0,01$ : \*\*,  $P \leq 0,001$ : \*\*\*)

Die Injektion von TRL löst in der Leber eine Phosphorylierung von JNK1 und JNK2 aus. Die Quantifizierung dieser Signale ergab, dass sich die Phosphorylierung in den Lebern TREM1-defizienter Tiere nicht von der Intensität in Wildtyp-Mäusen unterscheidet, wohingegen die TRL-Injektion in TREM2-defizienten Tieren signifikant stärkere Phosphorylierung beider JNK-Isoformen bewirkt (Abb. 3.28C-D).

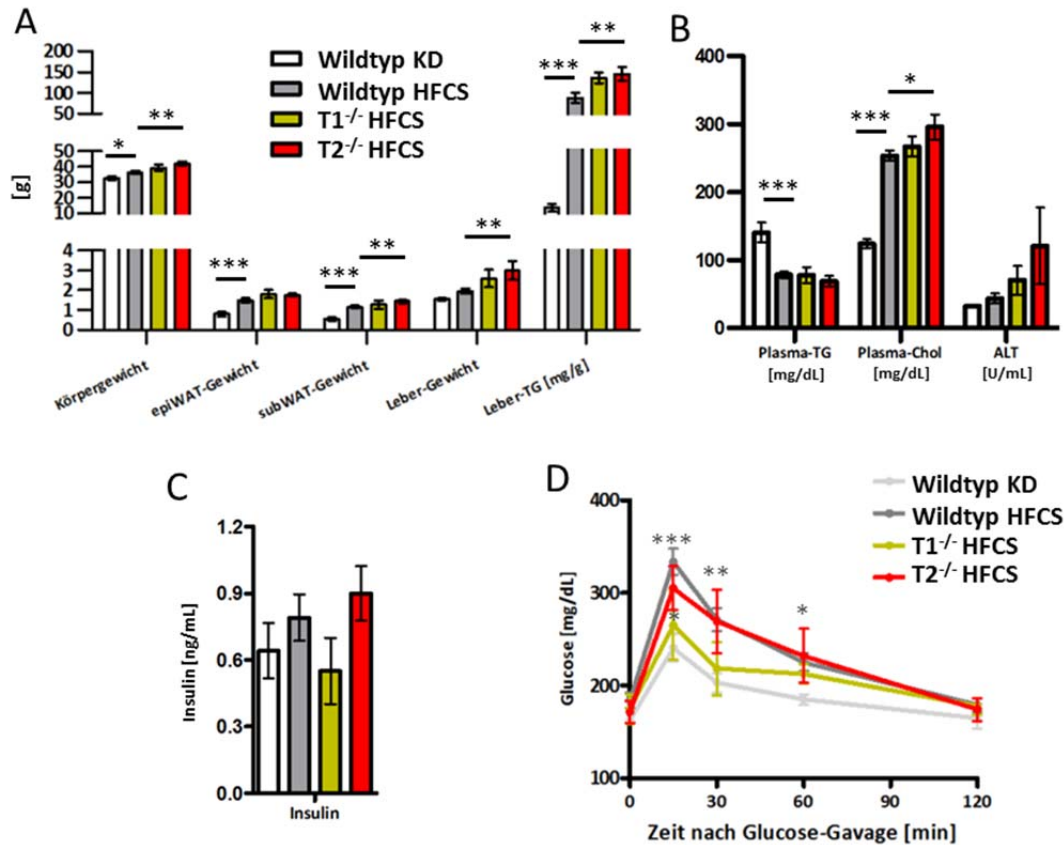
### 3.4.4 Effekte einer NAFLD-induzierenden Diät in Wildtyp- und TREM-defizienten Mäusen

Um die Funktion der immun-modulatorischen Rezeptoren TREM1 und TREM2 im Kontext von chronischem, metabolischem Stress in der Leber zu untersuchen, wurde ein Mausmodell für die Induktion einer NAFLD- und evtl. NASH-Veränderung gewählt. Wildtyp-, TREM1- und TREM2-defiziente Mäuse wurden über einen Zeitraum vom 16 Wochen mit einer speziellen Diät gefüttert, die einen hohen Gehalt an Fett, Cholesterin und Sucrose aufwies, anschließend sakrifiziert und analysiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.29-3.31 dargestellt.



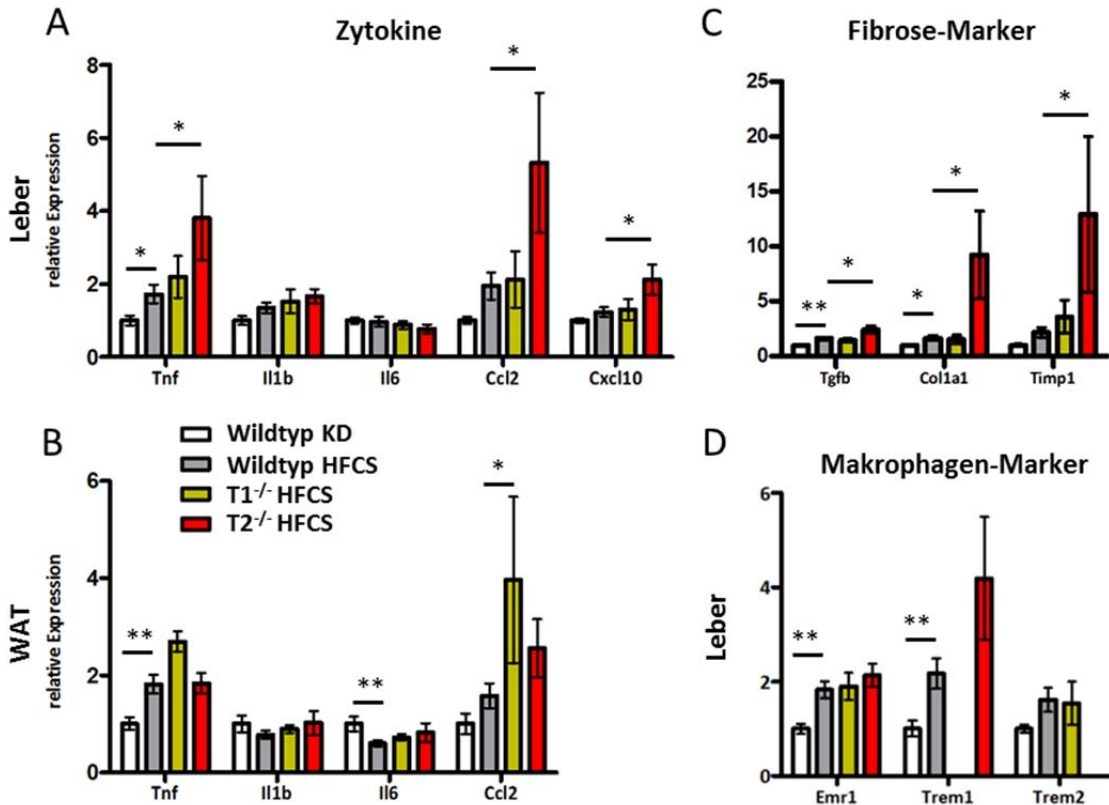
**Abb. 3.29: Charakterisierung des Effektes einer HFCS-Diät auf die Leber.** Exemplarisch sind eine Wildtyp-Leber eines KD-gefütterten Tieres und eines HFCS-gefütterten Tieres nach Organentnahme gezeigt. Die H&E- und Sirius Red-gefärbten Leber-Schnitte sind exemplarisch für Wildtyp- sowie TREM1- und TREM2-defiziente Tiere dargestellt.

Bereits makroskopisch ist zu erkennen, dass die HFCS-Diät zur Vergrößerung der Leber und Lipid-Einlagerung in die Leber führt. Dies bestätigt sich mikroskopisch, wie an H&E-gefärbten Schnitten zu sehen ist, in denen sich deutlich Lipid-Tropfen innerhalb der Hepatozyten nach Prozessierung der Schnitte als weiße Löcher zeigen. In diesen Schnitten erscheinen Zellkerne durch die Hematoxylin-Färbung blau, das Zytoplasma durch Reaktion mit Eosin rötlich. Sirius Red reagiert mit Collagen in der extrazellulären Matrix. Die Färbung zeigt, dass diese Diät keine histologisch erkennbare Fibrose auslöst. Zwischen HFCS-gefütterten Wildtyp- und TREM-defizienten Tieren sind histologisch keine offensichtlichen Unterschiede sichtbar. Da der Lipid-Gehalt in verschiedenen Zonen eines Leberlappens schwankt und sich nur im Rahmen festgelegter Grenzen beschreiben lässt, wurde eine biochemische Quantifizierung durchgeführt (s. Abb. 3.30A).



**Abb. 3.30: Metabolische und klinische Parameter von Wildtyp- und TREM-defizienten Mäusen nach Fütterung einer NAFLD-induzierenden HFCS-Diät.** A, Gewicht der Tiere sowie von Organen und Quantifizierung der Leber-Lipide. B, Plasma-Konzentrationen von Lipiden sowie des Leberschaden-Markers ALT und C, Insulin-Konzentration im Plasma. D, Blutglucose-Konzentration im Zeitverlauf eines Glucose-Toleranz-Tests. (n der Gruppen: 5/11/3/5, Mittelwert ± s.e.m.,  $P \leq 0,05$ : \*,  $P \leq 0,01$ : \*\*,  $P \leq 0,001$ : \*\*\*) KD: Kontrolldiät, HFCS: Hochfett-Cholester-Sucrose-Diät.

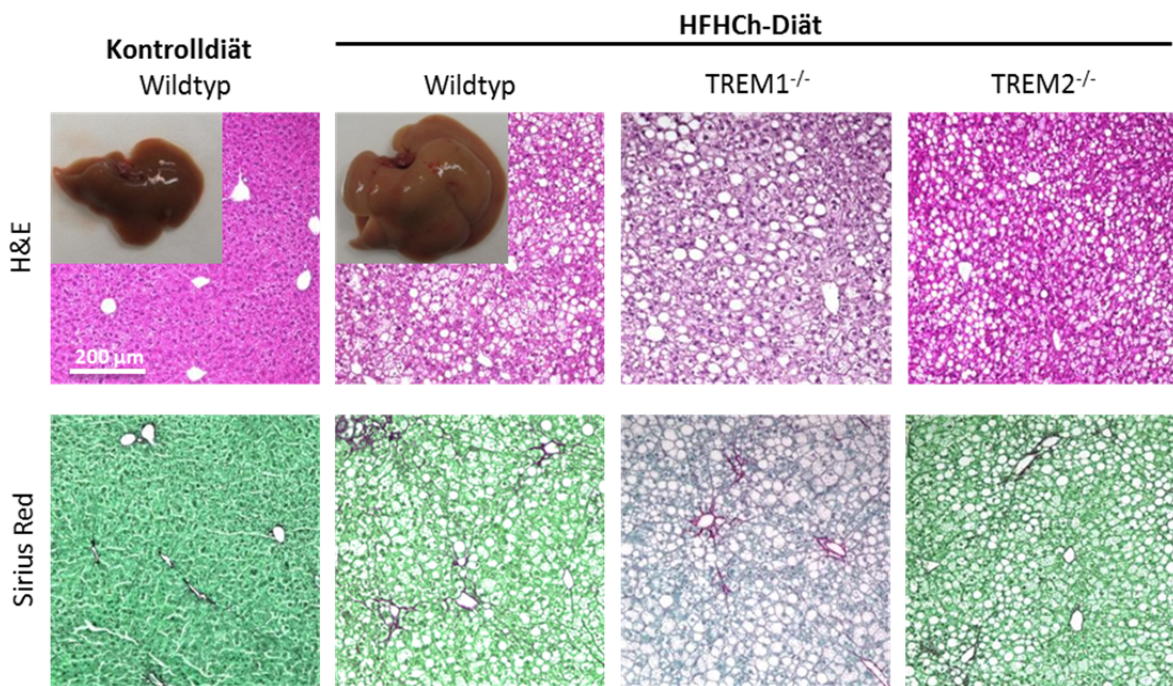
Die Analyse weiterer Parameter zeigt, dass die Fütterung der HFCS-Diät das Körper- und das Gewicht zweier Fettdepots (epididymal und subcutan) sowie tendenziell auch der Leber erhöht. Insbesondere wird eine Lebersteatose induziert, was an der Quantifizierung des Triglyzerid-Gehaltes erkennbar ist, der in Wildtyp-Tieren sechsfach ist gegenüber Kontrolldiät-gefütterten Tieren (Abb. 3.30A). Mit Ausnahme des epiWAT-Gewichts sind diese Parameter jeweils signifikant höher in TREM2-defizienten Tieren, mit ähnlichen Tendenzen in TREM1-defizienten Mäusen, die jedoch keine statistische Signifikanz erreichen (Abb. 3.31A). Die Plasma-Lipide sind ebenfalls verändert, mit signifikant höheren Plasma-Cholesterol-Werten bei TREM2-Defizienz. ALT, ein Marker für die Schädigung der Leber, ist in TREM-defizienten Tieren erhöht, ohne statistische Signifikanz zu erreichen (Abb. 3.30B). Die Diät bewirkt keine starken Veränderungen der Plasma-Insulin-Konzentrationen (Abb. 3.30C), die Tendenzen finden sich jedoch im Verlauf des oralen Glucose-Toleranz-Tests wieder: hier zeigen HFCS-gefütterte Wildtyp-Tiere nach Glucose-Verabreichung innerhalb der ersten Stunde eine signifikant schlechtere Glucose-Entfernung aus dem Blut, TREM2-defiziente Tiere zeigen ein ähnliches Verhalten. TREM1-defiziente Mäuse haben, ihren Insulin-Werten entsprechend, ein Profil, das unter dem der HFCS-Wildtyp-Tiere verläuft (Abb. 3.30D).



**Abb. 3.31: Expression inflammatorischer Marker in der Leber und im Fettgewebe nach Fütterung einer NAFLD-induzierenden HFCS-Diät in Wildtyp- und TREM-defizienten Mäusen.** Die Fütterung erfolgte über einen Zeitraum von 16 Wochen. A, Expression pro-inflammatorischer Zytokine in der Leber und B, im Fettgewebe. C, hepatische Expression von Fibrose- und D, Makrophagen-Markern. (n der Gruppen: 5/11/3/5, Mittelwert  $\pm$  s.e.m.,  $P \leq 0,05$ : \*,  $P \leq 0,01$ : \*\*,  $P \leq 0,001$ : \*\*\*) KD: Kontrolldiät, HFCS: Hochfett-Cholesterolsucrose-Diät.

Im nächsten Schritt wurde die Expression von Zytokinen gemessen, die an der NAFLD beteiligt sind. Die Analyse zeigt eine moderate Induktion einiger Gene durch Fütterung der HFCS-Diät in Wildtyp-Lebern und -Fettgewebe, wobei nur bei *Tnf $\alpha$*  statistische Signifikanz erreicht wird. TREM1-defiziente Tiere zeigen vergleichbare Expressionswerte nach Fütterung der Diät, mit einer signifikant höheren *Ccl2*-Expression im Fettgewebe (Abb. 3.31B). TREM2-Defizienz bewirkt dagegen in der Leber eine signifikant höhere Induktion von *Tnf $\alpha$* , *Ccl2* und *Cxcl10* (Abb. 3.31A). NAFLD bzw. NASH kann eine Vorstufe von Leber-Fibrose sein, die durch Aktivierung von Stern-Zellen und verstärkter Bildung extrazellulärer Matrix bei gleichzeitig reduziertem Abbau entsteht. Die Expressionsanalyse fibrogener Marker zeigt eine Induktion des Sternzell-aktivierenden *Tgfb* in Wildtyp-HFCS-Lebern sowie des *Col1 $\alpha$ 1*-Gens, das für einen Bestandteil der extrazellulären Matrix codiert, und tendenziell auch eine Erhöhung der *Timp1*-Expression (das codierte Protein inhibiert die Degradation extrazellulärer Matrix) (Abb. 3.31C). Die Expression besonders der letzten zwei Fibrose-Marker ist in TREM2-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren nach Induktion der NAFLD vielfach erhöht. Diese Diät scheint die Infiltration von Monozyten / Makrophagen zu induzieren, worauf die signifikant erhöhte Expression des Makrophagen-Markers *Emr1* hindeutet (Abb. 3.31D). Auch *Trem1* ist signifikant höher exprimiert, mit tendenziell höheren Werten in TREM2-defizienten Lebern.

Die Daten in Abb. 3.30 und 3.31 zeigen, dass sich eine TREM1-Defizienz in diesem Modell für metabolische Leberentzündung kaum auswirkt, wohingegen die stärksten Effekte einer TREM2-Defizienz sich bei der Expression von Fibrose-Markern zeigen (Abb. 3.31C). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde ein weiteres Modell angewandt, welches als Diät-induziertes Fibrose-Modell gilt. Die sog. HFHCh-Diät (*High fat high carbohydrate*) enthält hohe Mengen an Fett (inklusive gehärteter Transfettsäuren) und das Fütterungsprotokoll beinhaltet die Verabreichung von Glucose und Fructose im Trinkwasser über einen Fütterungszeitraum von ebenfalls 16 Wochen. Der Zusatz von Kohlenhydraten im Trinkwasser entspricht dabei der Zusammensetzung Zucker-haltiger *soft drinks* (119). Die Tiere in dieser Studie wurden analog zu den Wildtyp- und TREM-defizienten Mäusen nach Fütterung der HFCS-Diät analysiert.

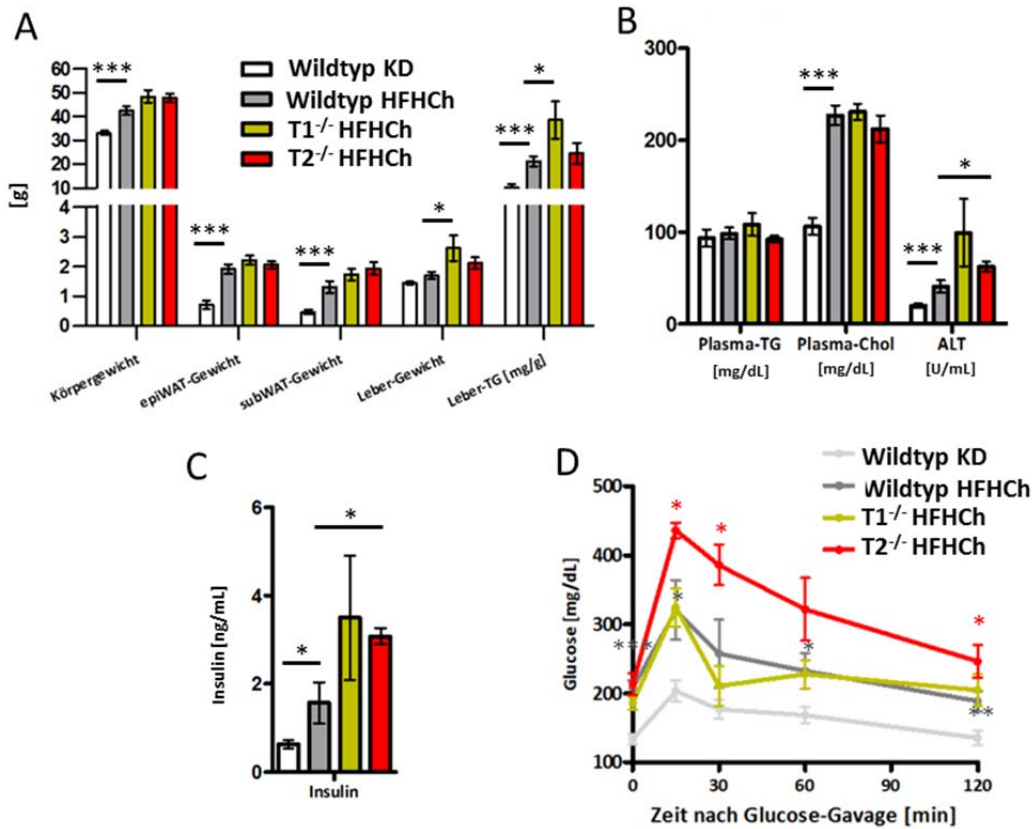


**Abb. 3.32: Charakterisierung des Effektes der HFHCh-Diät auf die Leber.** Es sind exemplarisch eine Wildtyp-Leber eines KD-gefütterten Tieres und einer HFHCh-gefütterten Maus nach Organentnahme gezeigt. Die H&E- und Sirius Red-gefärbten Leber-Schnitte sind exemplarisch für Wildtyp- sowie TREM1- und TREM2-defiziente Tiere dargestellt.

Der makroskopische Vergleich von Lebern nach dieser Fütterung zeigt ebenfalls eine Vergrößerung des Organs sowie Lipid-Akkumulation in Hepatozyten. Im Vergleich zu Lebern nach HFCS-Fütterung sind zusätzlich auch Sirius Red-positive Bereiche zu erkennen, in denen also Collagen extrazellulär angereichert ist. Zwischen Wildtyp und TREM-Defizienz sind histologisch allerdings keine starken Unterschiede zu sehen.

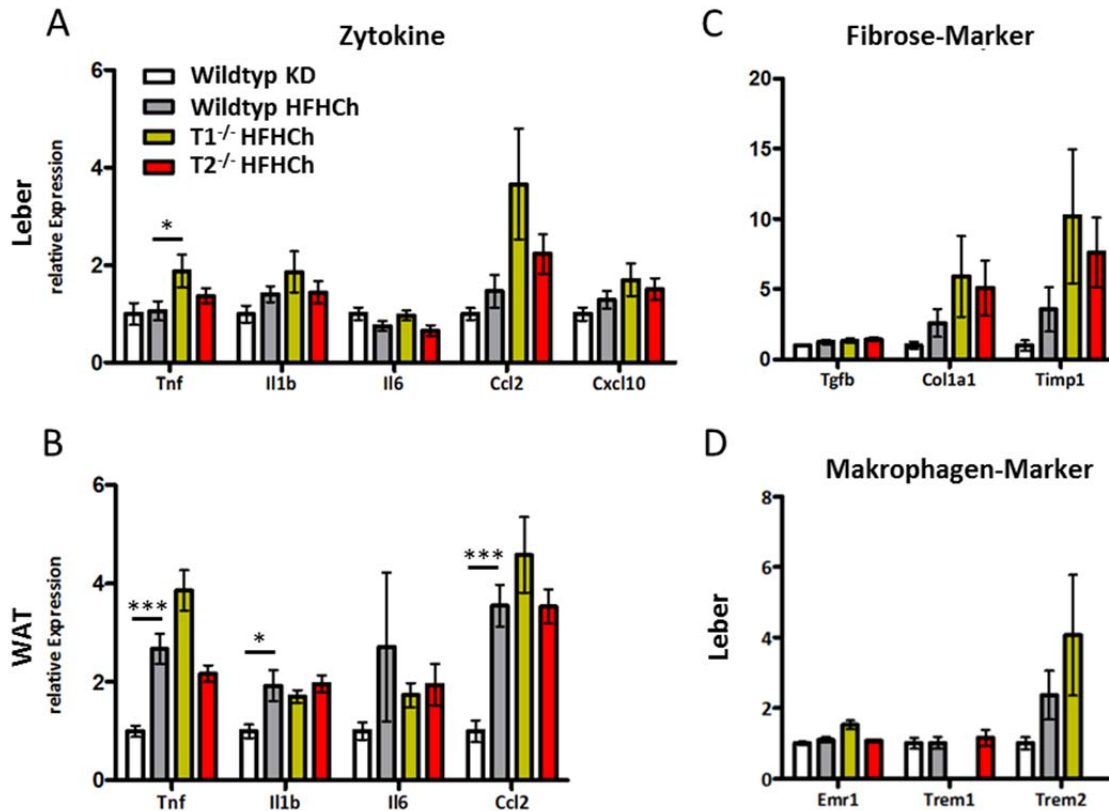
Auch in diesen Tieren wurden nach 16-wöchiger Fütterungsdauer die metabolischen Organe sowie das Plasma auf das Vorhandensein verschiedener NAFLD-Parameter untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.33-3.34 gezeigt.





**Abb. 3.33: Metabolische und klinische Parameter von Wildtyp- und TREM-defizienten Mäusen nach Fütterung der HFHCh-Diät.** A, Gewicht der Tiere sowie von Organen und Quantifizierung der Leber-Lipide. B, Plasma-Konzentrationen von Lipiden sowie des Leberschaden-Markers ALT und C, Insulin-Konzentration im Plasma. D, Blutglucose-Konzentration im Zeitverlauf eines Glucose-Toleranz-Tests. (n der Gruppen: 5/11/3/5, Mittelwert  $\pm$  s.e.m.,  $P \leq 0,05$ : \*,  $P \leq 0,01$ : \*\*,  $P \leq 0,001$ : \*\*\*) KD: Kontrolldiät, HFHCh: Hochfett-Kohlenhydrat-Diät.

In Wildtyp-Tieren bewirkt die Fütterung der HFHCh-Diät eine signifikante Zunahme des Körpergewichts sowie der Fettmasse zweier Depots und eine Erhöhung des Triglyzerid-Gehalts der Leber (Abb. 3.33A). Die Cholesterolkonzentration im Plasma ist erhöht, ebenso wie die ALT-Werte (Abb. 3.33B). Auch die Insulin-Konzentration ist nach Fütterung der HFHCh-Diät in Wildtyp-Tieren signifikant höher (Abb. 3.33C), was sich in höheren Werten der Glucose-Konzentration im Toleranz-Test widerspiegelt (Abb. 3.33D). Die TREM1-Defizienz wirkt sich bei diesen Krankheitsparametern signifikant auf das Leber-Gewicht und den Leber-Triglyzerid-Gehalt aus, die im Vergleich zu Wildtyp-Tieren nach Fütterung der HFHCh-Diät signifikant höher sind. TREM2-defiziente Mäuse zeigen dagegen signifikant höhere ALT-Werte, sowie höhere Insulin-Spiegel als die Wildtyp-Tiere und in Einklang damit eine langsamere Entfernung von Glucose aus der Zirkulation. Die TREM2-Defizienz bewirkt in diesem Modell also eine verstärkte Insulinresistenz.



**Abb. 3.34: Expression inflammatorischer Marker in der Leber und im Fettgewebe nach Fütterung der HFHCh-Diät in Wildtyp- und TREM-defizienten Mäusen.** Die Fütterung erfolgte über einen Zeitraum von 16 Wochen. A, Expression pro-inflammatorischer Zytokine in der Leber und B, im Fettgewebe. C, hepatische Expression von Fibrose- und D, Makrophagen-Markern. (n der Gruppen: 6/8/5/5, Mittelwert ± s.e.m.,  $P \leq 0,05$ : \*,  $P \leq 0,01$ : \*\*,  $P \leq 0,001$ : \*\*\*) KD: Kontrolldiät, HFHCh: Hochfett-Kohlenhydrat-Diät.

Die Expressionsdaten pro-inflammatorischer Zytokine zeigen, dass diese in der Leber in Wildtyp-Tieren durch Fütterung der HFHCh-Diät nicht signifikant erhöht werden (Abb. 3.34A), im Fettgewebe ist dagegen eine Induktion von Tnf $\alpha$ , Il1 $\beta$  und Ccl2 zu verzeichnen (Abb. 3.34B). Die histologisch erkennbare Fibrose (Abb. 3.32) korreliert mit erhöhten Col1 $\alpha$ 1- und Timp1-Expressionswerten (Abb. 3.34C). Eine Infiltration von Makrophagen scheint aufgrund der gleichbleibenden Emr1-Expression nicht vorzuliegen, gleichzeitig ist eine Erhöhung der Trem2-Expression erkennbar (Abb. 3.34.D). Auf der Expressionsebene bewirkt eine TREM1-Defizienz in diesem NAFLD-Modell tendenziell höhere Werte, während eine TREM2-Defizienz v. a. erhöhte Werte der fibrogenen Marker Col1 $\alpha$ 1 und Timp1 zeigt.

Die Ergebnisse aus diesem Abschnitt lassen sich folgendermaßen zusammenfassen: von den vier Leberzellpopulationen exprimieren v. a. die Kupffer-Zellen Trem1 und Trem2. Während eine TREM1-Defizienz die Zytokin-Sekretion durch primäre Kupffer-Zellen nicht beeinflusst, ist diese bei TREM2-Defizienz erhöht. Ähnliche Resultate ergeben sich für die akute pro-inflammatorische Antwort in der Leber nach Lipoprotein-Injektion, bei der TREM2-defiziente Tiere erhöhte Expressionswerte zeigen. Diese gehen mit verstärkter JNK-Phosphorylierung, ausgelöst durch die Lipoprotein-Injektion, einher. Die Fütterung zweier NAFLD-induzierender Diäten zeigte unterschiedliche Ergebnisse für TREM1- und TREM2-Defizienz. Beide Diäten bewirkten praktisch keine Unterschiede bei TREM1-Defizienz, dagegen zeigten Tiere ohne TREM2 nach HFCS-induzierter NAFLD höhere Werte einiger

inflammatorischer Zytokine und v. a. deutlich höhere Fibrose-Marker in der Leber. Die HFHCh-Diät zeigte schwächere Tendenzen zu erhöhten Fibrose-Markern, allerdings ging eine TREM2-Defizienz in diesem Modell mit signifikant stärker ausgeprägter Insulinresistenz einher.

## 4 DISKUSSION

---

Die nicht-alkoholische Fettleber-Erkrankung ist eng mit der Übergewicht-Epidemie verknüpft und hat entsprechend eine hohe Prävalenz mit voraussichtlich steigender Tendenz. Die damit verbundene chronische Entzündung hat verschiedene Ursachen, die sich nicht isoliert betrachten lassen und vermutlich auch erst in der Kombination mehrerer Faktoren zur Manifestation der Krankheit führen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Aspekte der Lipid-assoziierten Leberentzündung untersucht, indem zunächst in einer humanen Kohorte Mechanismen der Steatose analysiert und potentielle Regulatoren der Erkrankung identifiziert wurden. Es wurde ein Modell für akute Leberentzündung durch Nahrungslipide etabliert und die identifizierten Regulatoren im akuten sowie in chronischen Modellen der NAFLD untersucht. Die erhaltenen und in Kapitel 3 dargestellten Ergebnisse werden im Folgenden diskutiert.

### 4.1 Rolle der DNL für metabolische Erkrankungen

Die *de novo* Lipogenese als an der Lebersteatose beteiligter Faktor wurde in einer humanen Kohorte untersucht. Da die Leber bei Übergewicht vom veränderten Fettgewebe beeinflusst wird, wurden diese beiden Organe durch Analyse von Proben derselben Patienten miteinander verglichen. Die Analyse der Expression von Schlüsselenzymen der DNL in Fettgewebe und Leber ergab eine gegenläufige Regulation: während diese im Fettgewebe bei Übergewicht prinzipiell herunterreguliert sind, ist ihre Expression in der Leber signifikant erhöht (Abb. 3.3). Diese Beobachtungen decken sich mit anderen Studien, die eine reduzierte Expression entsprechender Gene im Fettgewebe fanden (125). Die hepatische DNL wurde in Humanstudien jedoch bisher nur indirekt ermittelt (10), sodass die hier vorliegenden Daten zum ersten Mal die gleichzeitige inverse Regulation zeigen. Coautoren der Publikation, in der Teile der im Rahmen dieser Arbeit entstandenen Daten zur DNL veröffentlicht wurden, konnten zeigen, dass die mRNA-Expression von u. a. FASN mit der Protein-Konzentration korreliert (121). Eine weitere Studie hat gezeigt, dass die FASN-Expression auch mit der Aktivität des Enzyms korreliert (126), sodass hier tatsächlich von einer Veränderung der DNL-Rate in beiden Geweben in Abhängigkeit vom Übergewicht gesprochen werden kann. Die kontinuierliche Erhöhung der Expression aller analysierten Schlüsselenzyme bei steigendem Steatosegrad (Abb. 3.3) lässt die Schlussfolgerung zu, dass DNL tatsächlich an der Lebersteatose beteiligt ist, was durch die Beobachtung einer erhöhten hepatischen FASN-Expression bei Lebersteatose in einer anderen Humanstudie unterstützt wird (127). Die reduzierte DNL im Fettgewebe korreliert auch mit der Insulinresistenz, da Insulin-resistente Adipozyten weniger Glucose als Substrat für die Lipid-Synthese aufnehmen. Daher scheint die verstärkte DNL in der Leber zunächst paradox, da auch Hepatozyten durch die chronische metabolische Entzündung Insulin-resistent werden. Hepatozyten nehmen Glucose jedoch Insulin-unabhängig über den Glucose-Transporter 2 in Abhängigkeit von der Glucose-Konzentration im Plasma auf. Des Weiteren liefert vermutlich auch der steigende Anteil von Fructose in der Nahrung, die ebenfalls Insulin-unabhängig in die Leber gelangt, das Substrat für die DNL.

Eine Veränderung der Gen-Expression wird durch Transkriptionsfaktoren reguliert. Viele DNL-Schlüsselenzyme werden v. a. durch Insulin-sensitives SREBP1 und Glucose-sensitives ChREBP induziert. Während in dieser Kohorte die Expression von SREBP1 und ChREBP-total in Fettgewebe

und Leber unabhängig von Adipositas auf vergleichbarem Niveau ist, ist ChREBP $\beta$  parallel zur Expression der DNL-Enzyme im Fettgewebe signifikant reduziert, in der Leber dagegen signifikant erhöht exprimiert (Abb. 3.4). Diese erst kürzlich identifizierte Isoform besitzt eine stärkere transkriptionelle Aktivität, da sie dauerhaft im Zellkern lokalisiert ist (20). Somit ist zu vermuten, dass die Veränderung der ChREBP $\beta$ -Expression in beiden metabolischen Geweben einen wichtigen Anteil an der Reduktion bzw. Induktion der DNL bei Adipositas hat.

## 4.2 Rolle pro-entzündlicher Signalwege für metabolische Erkrankungen

Es ist inzwischen vielfach gezeigt worden, dass metabolische Erkrankungen mit chronischer Entzündung durch Aktivierung inflammatorischer Signalwege einhergehen. Obwohl die auslösenden Faktoren verschiedenen Ursprungs sind, resultieren sie in der Aktivierung zweier zentraler intrazellulärer Signalwege, dem JNK-Weg einerseits und dem NF $\kappa$ B-Weg andererseits. Dies hat die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und dadurch die Induktion inflammatorischer Gene zur Folge. So wurde eine erhöhte JNK-Aktivität in Fettgewebe und Leber genetisch übergewichtiger Mäuse mit Lebersteatose gefunden (128). Zusätzlich schützt JNK-Defizienz im Tiermodell vor Übergewicht und Insulinresistenz (129). Für NF $\kappa$ B wurde eine erhöhte Aktivität in der Leber von NAFLD-Patienten und eine Korrelation mit dem Schweregrad der Krankheit gezeigt (130). Zusammen unterstreichen diese Studien die Relevanz dieser Signalwege für die metabolische Entzündung.

Die Aktivierung der Signalwege lässt sich grundsätzlich in zwei Kategorien einteilen: eine intrazelluläre Aktivierung durch Zellstress, und eine extrazelluläre Aktivierung durch endogene und exogene Warnmoleküle (PAMPs und DAMPs). Während die intrazelluläre Aktivierung durch ER-Stress vermutlich überwiegend in den Lipid-akkumulierenden Adipozyten und Hepatozyten erfolgt, werden durch die Warnmoleküle die Zellen des angeborenen Immunsystems, wie Gewebe-residente Makrophagen, aktiviert. Aufgrund der überwiegenden Zytokin-Produktion durch Kupffer-Zellen und im Vergleich kaum Expression und Sekretion durch Hepatozyten (Abb. 3.14 und 3.15) ist zu vermuten, dass der Zytokin-involvierende Teil der chronischen Entzündung durch Makrophagen verursacht wird. Die Aktivierung der inflammatorischen Signalwege in Adipozyten und Hepatozyten ist dagegen verantwortlich für die Insulinresistenz (5), die durch von Makrophagen gebildete Zytokine verstärkt wird.

Übergewicht und das metabolische Syndrom sind mit einer erhöhten Makrophagen-Anzahl im Fettgewebe parallel zur lokalen chronischen Entzündung assoziiert (131). Die Expressionsanalyse des Makrophagenmarkers CD68 deutet darauf hin, dass die Makrophagen-Anzahl nur bei Patienten mit dem höchsten Steatosegrad etwas erhöht ist (Abb. 3.5). In diesem Stadium ist die Aktivierung und damit Entzündung vermutlich am stärksten, obwohl der Schweregrad der Steatose aufgrund vielfältiger Faktoren nicht immer linear mit Entzündung korreliert. Trotz scheinbar nicht veränderter Makrophagen-Anzahl in den schwächeren Steatose-Stadien ist denkbar, dass die Makrophagen eine veränderte Polarisierung hin zum pro-inflammatorischen sog. M1-Typ zeigen, wie für Makrophagen in murinem Fettgewebe gezeigt wurde (132). Die Beteiligung metabolischer Endotoxämie an Entzündungsprozessen bei NASH wirft die Möglichkeit auf, dass eine erhöhte Sensitivität für LPS besteht, wie im Mausmodell gezeigt wurde (71). In dieser Publikation wurde auch gezeigt, dass in humanen NAFLD- und NASH-Lebern der LPS-bindende TLR4-Corezeptor CD14 erhöht ist. In der in dieser Arbeit analysierten humanen Kohorte konnte dagegen weder eine Erhöhung der TLR4- noch

der Corezeptor-Expression gefunden werden (Abb. 3.5), sodass die Leberentzündung folglich nicht über eine erhöhte LPS-Rezeptor-abhängige Responsivität erklärt werden kann.

### 4.3 Rolle der metabolischen Endotoxämie für die Leberentzündung

Es wurde vermutet, dass die metabolische Endotoxämie an Entzündungsprozessen in der NASH beteiligt ist, da die LPS-Konzentration im Plasma von NAFLD-Patienten gegenüber gesunden Probanden erhöht ist und LPS-Antikörper im Plasma zu finden sind (33;34). Da NAFLD und die daraus teilweise hervorgehende NASH die hepatische Manifestation des metabolischen Syndroms sind, wurde Serum von gesunden Probanden und solchen mit diagnostiziertem metabolischem Syndrom auf das Vorhandensein von LPS untersucht. Im Serum dieser kleinen Kohorte konnte kein signifikanter Unterschied in der LPS-Konzentration gefunden werden (Abb. 3.10), was sich vermutlich mit der eher milden Ausprägung des metabolischen Syndroms (max. BMI 35) erklären lässt. Die LPS-Konzentration in isolierten Triglyzerid-reichen Lipoproteinen aus denselben Proben war dagegen deutlich erhöht, was eine Maus-Studie bestätigt, in der die gemessenen Plasma-LPS-Werte nach Triolein-Gavage in Chylomikronen-Remnants gefunden wurden (25). Die hier analysierten TRL zeigten im Gegensatz zum Serum eine signifikant höhere LPS-Konzentration in den Proben von Probanden mit metabolischem Syndrom (Abb. 3.10), sodass geschlussfolgert werden kann, dass bereits bei beginnendem metabolischem Syndrom eine Lipoprotein-assoziierte metabolische Endotoxämie vorliegt.

Experimente der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, dass diese Lipoproteine ein pro-inflammatorisches Potential besitzen, da die Injektion in Wildtyp-Mäuse die Induktion verschiedener inflammatorischer Zytokine und Chemokine auslöste (Abb. 3.11). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass diese Lipoproteine nicht nur von Hepatozyten, sondern auch von Kupffer-Zellen aufgenommen werden (Abb. 3.12), was die Ergebnisse des Experiments der Makrophagen-Depletion komplettiert: die Induktion der pro-inflammatorischen Gene nach Lipoprotein-Injektion ist signifikant niedriger, wenn Kupffer-Zellen durch Clodronat-Behandlung depletiert wurden (Abb. 3.17). Mit der Expressionsanalyse des LPS-Rezeptors Tlr4 und des Corezeptors Cd14 (Abb. 3.16) lässt sich zusätzlich begründen, dass Kupffer-Zellen hauptverantwortlich für die Zytokin-Expression durch exogene Stimuli in der Leber sind: nur diese Zellpopulation exprimiert gleichzeitig Tlr4 und Cd14, welche beide essentiell für die LPS-Antwort sind, auf hohem Niveau. Die Bedeutung von Kupffer-Zellen für die Entzündung wurde auch durch Depletion in einem Fütterungsmodell gezeigt, gemeinsam mit der Bedeutung des von Kupffer-Zellen produzierten TNF $\alpha$  (133).

### 4.4 Regulation der NAFLD durch PML

Die Akkumulation von Lipiden in Adipozyten und Hepatozyten löst intrazellulären Stress aus und aktiviert Signalwege, die über Transkriptionsfaktoren die Genexpression verändern. Die Regulation der Expression ist vielschichtig und erfordert meist die Integration verschiedener sowohl stimulierender als auch inhibitorischer Signale. Ein Protein, für das eine wichtige Rolle bei der Regulation zellulärer Stress-Signale in unterschiedlichem Kontext gezeigt wurde, ist PML. Sowohl PML selbst als auch Proteine, die in PML-Kerndomänen lokalisieren, sind an der Regulation

transkriptioneller Prozesse beteiligt. In dieser Arbeit sollte die Bedeutung von PML bei der Integration von metabolischem Stress untersucht werden.

In der humanen Kohorte zeigte sich eine signifikante Erhöhung der PML-Expression im Fettgewebe bei Adipositas und Diabetes sowie in Abhängigkeit vom Steatosegrad (Abb. 3.6). Des Weiteren deuten die Daten aus humanen Hepatomzellen, in denen das PML-Protein mittels shRNA depletiert war, auf eine Funktion von PML in inflammatorischen Prozessen hin. Diese exprimieren verstärkt inflammatorische Gene (Abb. 3.19), sodass die Hypothese einer negativen Regulation aufgestellt wurde. Trotz der mRNA-Expressionsdaten (Abb. 3.18) scheint PML insbesondere von Hepatozyten exprimiert zu werden, wie die Lokalisation der Kerndomänen (Abb. 3.20) und die bei Depletion von Kupffer-Zellen nicht reduzierte Pml-Expression in der Leber (Abb. 3.17) implizieren. Somit könnte PML für die Regulation von zellulärem Stress wichtig sein, der durch Lipid-Akkumulation in metabolischen Zellen ausgelöst wird. Dies sollte *in vivo* durch eine Fütterungsstudie PML-defizienter Mäuse überprüft werden.

PML-defiziente Mäuse haben unter Standard-Bedingungen keinen Phänotyp (118). Die Analyse der Expression inflammatorischer Gene in Leber und Fettgewebe normal gefütterter Tiere ergab entsprechend keine Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp, mit Ausnahme einer reduzierten IL6-Expression (Abb. 3.21). Diese Daten sind zwar im Widerspruch zu der erhöhten *in vitro*-Expression, jedoch konsistent mit einer Studie, die in primären Zellen aus PML<sup>-/-</sup> Mäusen ähnliche Werte explizit für die Sekretion von IL6 gefunden hat (116). Der Effekt von PML-Defizienz auf die IL6-Expression ist jedoch in Hochfett-diät-gefütterten Mäusen aufgehoben und zeigt sogar die Tendenz zu erhöhten Werten im Vergleich zum Wildtyp, was auch auf die Expression anderer inflammatorischer Zytokine in Leber und Fettgewebe zutrifft (Abb. 3.23). In Bezug auf andere Parameter verhalten sich die PML-defizienten Tiere jedoch nahezu identisch wie die Wildtyp-Kontrollen: sie erreichen das gleiche Maß an Adipositas und zeigen ein vergleichbares Verhalten bei einem oralen Glucose-Toleranztest, der für beide Genotypen eine Insulinresistenz nach Fütterung der Hochfett-diät ergab (Abb. 3.22). Diese Daten sind teilweise übereinstimmend und teilweise widersprüchlich zu einer Studie, die publiziert wurde, während dieser Arbeit entstand: die Autoren fütterten PML-defizienten Mäusen ebenfalls eine Hochfett-diät für die gleiche Zeitdauer und fanden keinen Unterschied in der oralen Glucose-Toleranz. In dieser Studie zeigten die PML-defizienten Mäuse jedoch nach etwa 12 Wochen eine verstärkte Zunahme des Körpergewichts, die v. a. auf die Vergrößerung subkutaner Fettgewebsdepots zurückzuführen war (134). Dies ist vermutlich auch die Erklärung, dass trotz der verstärkten Adipositas keine Effekte auf die Insulin-Signalwege zu finden waren: die negativen Effekte von vergrößertem Fettgewebe sind i. d. R. auf viszerale Fettdepots, die auch die Leber beeinflussen, zurückzuführen, wohingegen subkutanes Fettgewebe auf die Ausprägung von Merkmalen des metabolischen Syndroms, z. B. Insulinresistenz, deutlich weniger Einfluss hat (135).

Trotz fehlender statistischer Signifikanz zeigen PML-defiziente Mäuse jedoch im Modell akuter Lipid-vermittelter Entzündung durch Injektion von Lipoproteinen konsistente Tendenzen zu erhöhten inflammatorischen Markern. In diesem Modell wird die Pml-Expression induziert, was auch in PML-defizienten Tieren zu beobachten ist (Abb. 3.24). Tatsächlich zeigen die sog. PML-defizienten Mäuse in allen Experimenten eine zwar reduzierte, jedoch weiterhin detektierbare mRNA-Expression, die teilweise bis zu 50% der Expression in Wildtypen erreicht. Die differenzierte Analyse der Expression von Exonen vor und hinter dem Insertionslokus des transgenen Vektors zeigt, dass beispielsweise das Kernlokalisationssequenz-enthaltende Exon 6 auf mRNA-Ebene detektierbar ist (Abb. 3.20). Die immunhistochemische Färbung des PML-Proteins zeigt zwar, dass in PML<sup>-/-</sup> Leberschnitten die

charakteristische Kerndomänen-Lokalisation des Proteins nicht mehr zu finden ist, es ist aber eine diffuse, jedoch distinkte Zellkernfärbung zu erkennen. Es scheint also, dass die vorhandene Restexpression auch auf Protein-Ebene existiert. Daher ist nicht auszuschließen, dass das exprimierte, wenn auch verkürzte, Protein im Zellkern weiterhin zu Interaktionen mit Transkriptionsfaktoren fähig ist, die eine Funktion in der metabolischen Entzündung haben, sodass der hypothetische Phänotyp einer vollständigen PML-Defizienz maskiert sein könnte. Die Frage nach einer physiologisch relevanten Funktion von PML ließe sich nur mit einer neuen transgenen Mauslinie mit vollständiger PML-Defizienz beantworten.

## 4.5 Regulation der NAFLD durch TREMs

Inflammatorische Signalwege werden nicht nur im Zellkern reguliert. Entzündungsprozesse, die durch extrazelluläre Faktoren wie Endotoxämie oder endogene Warnmoleküle aktiviert werden, werden durch Rezeptoren des angeborenen Immunsystems moduliert. Für den TLR4-Weg wurde bereits pathophysiologische Relevanz im Mausmodell gezeigt (67;74). Die durch TLR4 aktivierten Signalwege werden durch die ebenfalls an der Zellmembran lokalisierten *Triggering Receptors Expressed on Myeloid Cells* (TREMs) moduliert, die in verschiedenen Krankheiten eine Funktion haben. Hinweise auf eine Rolle dieser Rezeptoren in metabolischen Entzündungsprozessen ergaben sich aus der Induktion ihrer Expression in Zellen, denen der Stress-Modulator PML fehlt, und besonders aus der in dieser Arbeit gefundenen spezifischen Assoziation von TREM2 mit dem Schweregrad der NAFLD in der humanen Kohorte. Da für TREM1 und TREM2 entgegengesetzte Effekte bei der Modulation inflammatorischer Prozesse beschrieben wurden, werden die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse einzeln betrachtet.

### 4.5.1 TREM1

Obwohl die Rolle von TREM1 bei infektiösen Prozessen wie der Sepsis eindeutig und mehrfach beschrieben ist, wodurch vermutlich die Sensitivität zur Pathogen-Detektion für eine effektive Immunantwort erhöht wird, scheint dieser Modulator mit der chronischen metabolischen Entzündung nicht zu korrelieren (Abb.3.7). Zunächst scheint erstaunlich, dass Kupffer-Zellen aus TREM1-defizienten Mäusen keine reduzierte Zytokin-Sekretion zeigen (Abb. 3.26). Eine Erklärung hierfür könnte jedoch sein, dass die Publikationen, in denen TREM1-abhängige, LPS-induzierte Zytokin-Sekretion untersucht wurde, nicht mit TREM1-defizienten Zellen sondern mit einem aktivierenden Antikörper durchgeführt wurden (82). Dagegen ist nicht sicher, ob im Medium isolierter Kupffer-Zellen ein TREM1-Ligand anwesend ist. Des Weiteren ist anzumerken, dass die erwähnten Studien mit Neutrophilen und Monozyten durchgeführt wurden, während gleichzeitig gezeigt wurde, dass TREM1 auch vorrangig auf diesen Zelltypen, nicht jedoch auf differenzierten Makrophagen exprimiert wird (82;83). Tatsächlich war die absolute gemessene Trem1-Expression in Kupffer-Zellen eher niedrig. Auch diese Beobachtungen passen in das Konzept, dass TREM1 v. a. von Zellen exprimiert wird, die bei einer Infektion möglichst schnell reagieren sollen, Gewebemakrophagen wie Kupffer-Zellen dagegen würden bei starker Aktivierung eine Schädigung des Gewebes bewirken. Die Relevanz unterschiedlich polarisierter Makrophagen-Populationen zeigt sich beispielsweise daran, dass im Darm nur 10% der Makrophagen TREM1 exprimieren, im Gegensatz zu 90% der zirkulierenden Monozyten (136).



Entsprechend zeigen TREM1-defiziente Mäuse auch kaum reduzierte Zytokin-Expression im akuten Modell Lipoprotein-vermittelter Entzündung in der Leber, wenngleich hier zumindest Tendenzen zu niedrigeren Werten zu erkennen sind (Abb. 3.27, 3.28). Auch in den Modellen chronischer metabolischer Entzündung ergibt eine TREM1-Defizienz keinen konsistenten Phänotyp. Kürzlich wurde dagegen in einem Leberkrebs-Modell gezeigt, dass TREM1-defiziente Mäuse weniger Tumore ausbilden (137). Dieses Modell basiert auf chronischer Entzündung, die durch chemische Schädigung der Hepatozyten und Aktivierung von Kupffer-Zellen durch DAMPs aus nekrotischen Hepatozyten hervorgerufen wird. In dieser Studie wurde HMGB1, das bei Nekrose freigesetzt wird, als Bindungspartner von TREM1 und somit als potentieller endogener Ligand identifiziert. Ähnliche Prozesse wären auch bei NAFLD denkbar, jedoch ist aufgrund der niedrigen ALT-Werte in beiden Modellen zu vermuten, dass die Schädigung der Hepatozyten zu gering ist, um eine relevante TREM1-Aktivierung auszulösen. Zusammenfassend sprechen diese Daten dafür, dass TREM1 keine Funktion in der Lipid-vermittelten Leber-Entzündung hat.

#### 4.5.2 TREM2

Für TREM2 wurde eine Leber-spezifische, signifikant erhöhte Expression bei steigendem Steatosegrad gefunden (Abb. 3.7). Die Analyse weiterer negativer Regulatoren des TLR4-Signalweges, für die ebenfalls noch keine Funktion im Kontext metabolischer Leberentzündung untersucht wurde, ergab keine Veränderungen der Expression (Abb. 3.8), sodass TREM2 als einziger der analysierten Modulatoren induziert ist. Des Weiteren korreliert die hepatische TREM2-Expression in der humanen Kohorte mit den Plasma-Werten der Leber-Enzyme ALT und AST, die ein klinisches Maß des Leberschadens sind, sowie mit der Expression eines Fibrose-Markers (COL1A1, Abb. 3.9). Diese Daten implizieren die Hypothese, dass TREM2 als kompensatorischer, protektiver Mechanismus bei vermutlich erhöhter TLR4-Aktivierung in der NASH und bei der Aktivierung fibrotischer Prozesse wirken könnte.

Die potentielle Funktion wurde mit Hilfe TREM2-defizienter Mäuse untersucht. Primäre Kupffer-Zellen, die Leberzellpopulation, die praktisch als einzige TREM2 exprimieren (Abb. 3.25), zeigen bei TREM2-Defizienz eine erhöhte Zytokin-Sekretion (Abb. 3.26). Entsprechende Effekte wurden bereits in der ersten Studie zur TREM2-Funktion mit Makrophagen verschiedenen Ursprungs (Knochenmark-abgeleitet sowie Peritoneal-Makrophagen) beschrieben (102), sodass die hier erzielten Resultate die Literatur um Daten für Leber-Makrophagen ergänzt und bestätigt.

Im hier etablierten Modell für akute Lipid-vermittelte Entzündung durch Lipoprotein-Injektion zeigten TREM2-defiziente Mäuse erhöhte Werte aller analysierten Zytokine, was mit einer verstärkten JNK-Phosphorylierung einherging (Abb. 3.27, 3.28). Obwohl die Modulation intrazellulärer Signalwege durch TREM2 noch nicht vollständig geklärt ist, zeigen diese Daten, dass TREM2 die Aktivität dieser für inflammatorische Antworten wichtigen Kinase kontrolliert. Die erhöhte Zytokin-Expression ist somit vermutlich zumindest teilweise auf eine verstärkte transkriptionelle Aktivität des durch JNK aktivierten AP1-Transkriptionsfaktors zurückzuführen. Die Lipoprotein-Injektion bewirkte eine Reduktion der TREM2-Expression bei gleichzeitiger Induktion von TREM1 (Abb. 3.11, 3.27). Eine analoge Regulation wurde ebenfalls *in vitro* bei der Stimulation primärer Leberzellen mit LPS beobachtet (Abb. 3.25). Dieses Muster entspricht der klassischen Regulation inflammatorischer Prozesse: so verstärkt ein akuter Stimulus die Expression pro-inflammatorischer Gene, deren Genprodukte dann eine effektive Antwort ermöglichen. Gleichzeitig

wird die Transkription anti-inflammatorischer Gene, wie hier Trem2, durch pro-inflammatorische Stimuli kurzzeitig gehemmt, um die akute Entzündungsantwort nicht zu reduzieren. Mittel- und langfristig ist es biologisch gesehen jedoch sinnvoll, durch Aktivierung anti-inflammatorischer Gene die akute Entzündungsantwort wieder zu reduzieren bzw. zu beenden, um eine Schädigung des Organismus durch eine zu starke Immunantwort zu limitieren. Diese langfristige Hochregulation bei chronischer Entzündung liefert auch die Basis für die Hypothese der protektiven Wirkung von TREM2 bei NAFLD, die sich aus den humanen Daten ergab.

Somit war es naheliegend, die Funktion von TREM2 in murinen Modellen für NAFLD zu untersuchen. Zunächst wurde eine Intervention durchgeführt, das aus der Fütterung einer Diät mit hohen Anteilen von Fett, Cholesterol und Sucrose (HFCS) bestand. In diesem Modell zeigten TREM2-defiziente Mäuse höhere Werte einiger inflammatorischer Zytokine in der Leber, jedoch nicht im Fettgewebe, was die Gewebsspezifität der humanen Daten unterstützt. Diese Diät bewirkte in TREM2-defizienten Mäusen außerdem eine höhere Körpergewicht-Zunahme, die mit höherem Lebergewicht und stärker ausgeprägter Triglyzerid-Akkumulation in der Leber einherging (Abb. 3.30). Diese Tiere zeigen jedoch keine veränderte Insulinsensitivität bzw. Glucose-Toleranz, was die aktuelle Diskussion unterstreicht, dass Lebersteatose und Insulinresistenz nicht zwangsläufig kausal verknüpft sind (138). Durch einen oralen Glucose-Toleranztest wird v. a. die periphere Insulinsensitivität ermittelt, sodass die Daten zu den nicht vorhandenen Unterschieden inflammatorischer Marker im Fettgewebe passen. Bisher gibt es keine Publikationen zu der hier verwendeten HFCS-Diät, sodass keine Vergleiche angestellt werden können. In dieser Fütterungsstudie bewirkt sie eine Lebersteatose und eine erhöhte Makrophagen-Anzahl, wenn auch ohne ausgeprägte Erhöhung inflammatorischer Marker. Dagegen bewirkt dieses Fütterungsmodell in TREM2-defizienten Mäusen eine starke Erhöhung fibrogener Marker (Abb. 3.31), die auch die Korrelation von TREM2 mit der Collagen-Expression in der humanen Kohorte bestätigen (Abb. 3.9).

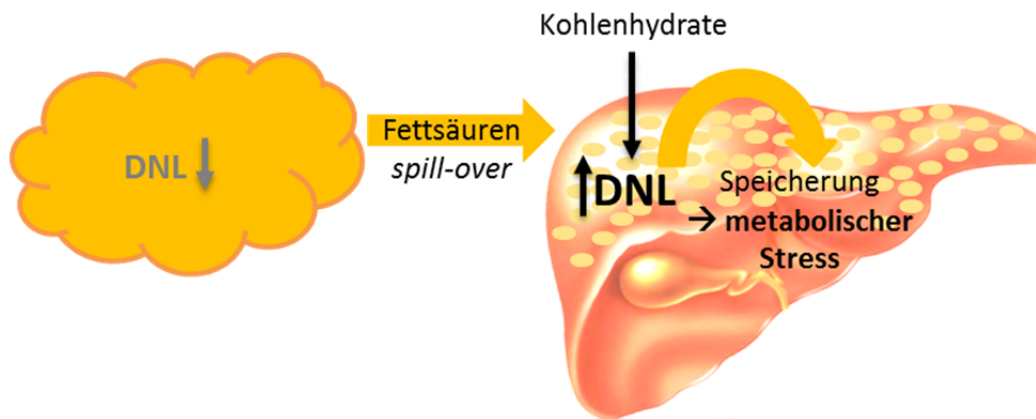
Ein weiteres Fütterungsmodell, die sog. HFHCh-Diät, die im Fettanteil auch gehärtete Transfettsäuren enthält und deren Protokoll die Gabe von Glucose-Fructose-angereichertem Trinkwasser beinhaltet, induziert neben der Leberverfettung auch Fibrose (119). Der Mechanismus dahinter scheint auf einer vermehrten Anzahl pro-inflammatorisch aktivierter Makrophagen in der Leber zu beruhen, die zur Aktivierung fibrotischer Prozesse in den Stern-Zellen führt. Die Durchführung dieses Modells ergab hier jedoch keine vermehrte Makrophagen-Infiltration und entsprechend eine sehr moderate Fibrose (Abb. 3.32, 3.33). Dies könnte eine Erklärung dafür sein, dass TREM2-defiziente Mäuse in dieser Fütterungsstudie keinen Leber-Phänotyp zeigen. Der Vergleich der Daten aus beiden Diäten (HFCS und HFHCh) ergibt, dass letztere nicht so sehr inflammatorische Effekte in der Leber, sondern vielmehr im Fettgewebe auslöst, wo durch HFHCh eine signifikante Induktion inflammatorischer Marker stattfindet (Abb. 3.34). Hochfettdiäten führen zwar zur Lebersteatose, besonders aber auch zur Lipid-Speicherung im Fettgewebe, wie der Vergleich von Leber-Triglyzeriden (bei HFCS 6x höher im Vergleich zur Kontrolldiät, bei HFHCh nur 2x höher) und Fettgewebsgewicht (höher bei HFHCh: 2,7x vergrößert, bei HFCS nur 1,8x) zeigt. Eine ausgeprägte Vergrößerung der Fettgewebsdepots geht auch mit erhöhten Insulin-Werten (nach HFHCh 2x so hoch wie nach HFCS), höheren basalen Glucose-Werten sowie schlechterer Glucose-Toleranz einher (Abb. 3.33). Interessanterweise zeigen TREM2-defiziente Mäuse hier signifikant höhere Insulin-Werte und damit einhergehende verschlechterte Glucose-Toleranz. Tatsächlich ist die TREM2-Expression in der humanen Kohorte im Fettgewebe zwar nicht bei der Einteilung nach Steatose-Grad, wohl aber bei Einteilung nach Adipositas signifikant erhöht (Abb. 3.7). Der Vergleich der beiden Fütterungsstudien unterstützt also

die Beobachtung anderer Studien, dass die Cholesterol-Komponente im Futter entscheidend für eine metabolische Entzündung der Leber zu sein scheint (139), die dann durch TREM2 reguliert wird. Die Hochfettdiät ohne Cholesterol bewirkt dagegen v. a. eine Manifestation im Fettgewebe mit Insulinresistenz, die in diesem Fall durch TREM2 reguliert wird. Für zukünftige Studien zur metabolischen Entzündung wäre vermutlich eine Fütterung, die beide hier angewandten Diäten kombiniert, zu empfehlen: der Fettanteil einerseits zur Induktion von Übergewicht und Steatose, mit dem Kohlenhydrat-angereicherten Trinkwasser für die Ausprägung von Insulinresistenz, und schließlich die Cholesterol-Komponente für messbare Entzündungsreaktionen in der Leber.

Während die humanen Daten eine spezifische Funktion von TREM2 bei der NAFLD implizieren, sind die Daten aus den Fütterungsstudien mit TREM2-defizienten Mäusen teilweise unterstützend, jedoch weniger eindeutig. Trotz der scheinbaren Spezifität der TREM2-Induktion im Vergleich zu anderen Modulatoren des TLR4-Signalweges ist nicht auszuschließen, dass diese im Mausmodell induziert werden. Es ist auch zu vermuten, dass weitere, eventuell noch nicht identifizierte, Regulatoren kompensatorisch die TREM2-Defizienz ausgleichen. Auch die Assoziation mit einem breiten Spektrum anderer Krankheiten, wie Alzheimer (98;99) und dem Mausmodell für Multiple Sklerose, in dem die Antagonisierung von TREM2 eine Verstärkung des Krankheitsbildes auslöst (100), legen eine wichtige Funktion dieses Proteins bei chronischen Entzündungsprozessen nahe. Daher kann davon ausgegangen werden, dass TREM2 bei der NAFLD ein protektiver Faktor ist, was am besten durch Studien mit einem zukünftigen TREM2-Agonisten getestet werden könnte. TREM2 kann also als ein für die NAFLD und weitere Krankheiten therapeutisch interessantes Zielprotein angesehen werden.

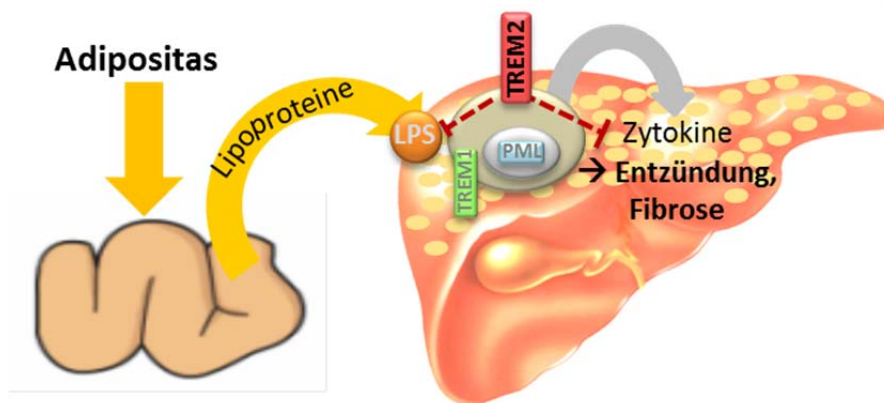
#### **4.6 Ausblick: Integration von Stoffwechsel und Entzündung**

Die Ergebnisse dieser Arbeit reihen sich in die Erkenntnisse des letzten Jahrzehnts über die Verbindung von metabolischen und inflammatorischen Prozessen ein. Entzündungsprozesse ohne exogene Auslöser entstehen, wenn die Homöostase einer Zelle oder eines Organs gestört ist. Die Entzündungsreaktion trägt, wenn sie zu gegebenem Zeitpunkt beendet wird, zur Wiederherstellung des Gleichgewichts bei (63). Bei der metabolischen Entzündung im Fettgewebe und in der Leber ist durch die übermäßige Lipid-Einlagerung das intrazelluläre Gleichgewicht gestört. Aus biologischer Sicht ist es daher sinnvoll, dass durch Aktivierung inflammatorischer Wege Insulinresistenz entsteht, um die weitere Einlagerung zu reduzieren. Im Fettgewebe wird so u. a. die Speicherung weiterer Lipide durch Reduktion der *de novo* Lipogenese reduziert, wie die Daten dieser Arbeit zeigen. In der Leber wirkt die Insulinresistenz jedoch nicht hemmend auf die Lipid-Synthese, und die erhöhte Rate bei hoher Substrat-Verfügbarkeit trägt zur Lebersteatose und dadurch zum metabolischen Stress bei, wie in Abb. 4.1 illustriert ist.



**Abb. 4.1: Modell zur Regulation der DNL im Fettgewebe und in der Leber und Beteiligung an der NAFLD.** Während die Neusynthese von Lipiden im Fettgewebe bei Adipositas reduziert ist, ist sie in der Leber erhöht und an der Steatose und Sensibilisierung für metabolische Entzündung beteiligt.

Entzündungsprozesse werden nicht nur durch intrazellulären Stress sondern auch durch exogene Faktoren ausgelöst. Bei Adipositas und NAFLD sind dies v. a. bakterielle Substanzen aus dem Darm, da die Zusammensetzung der Mikroflora bei Übergewicht nachweislich verändert ist und ihre Immunzell-aktivierenden Bestandteile vermehrt in die Zirkulation gelangen. Es konnte gezeigt werden, dass beim metabolischen Syndrom verstärkt LPS mit Lipoproteinen aus dem Darm assoziiert ist und in der Leber eine inflammatorische Antwort auslöst. Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass die Reaktion durch den TLR4-modulierenden Rezeptor TREM2 reguliert wird (s. Abb. 4.2).



**Abb. 4.2: Modell zur Leberentzündung durch metabolische Endotoxämie.** Lipoproteine aus dem Darm transportieren bei Adipositas vermehrt bakterielle Substanzen, die in der Leber eine inflammatorische Antwort bewirken. Diese wird durch TREM2 moduliert.

Die chronische Entzündung in Fettgewebe und Leber bei Übergewicht ist vielschichtig und wird auf verschiedenen Ebenen reguliert. Während im Tiermodell keine Regulation durch PML und TREM1 gefunden werden konnten, zeigte TREM2 eine Assoziation mit Fibrose-Markern, sodass dieses Protein vermutlich an der Progression der NAFLD zur irreversiblen Leberschädigung beteiligt ist. Zukünftige Studien werden zeigen müssen, ob die Behandlung mit TREM2-Liganden eine therapeutische Option zur Behandlung von entzündlichen Lebererkrankungen sein kann.

# ZUSAMMENFASSUNG

---

Die nicht-alkoholische Fettleber-Erkrankung ist eng mit Adipositas und dem metabolischen Syndrom verknüpft und hat eine hohe, weiter steigende Prävalenz. Die Erkrankung beginnt meist mit einer Leberverfettung, aus der sich eine chronische Entzündung entwickeln kann, diese ist wiederum ein Risikofaktor für eine dauerhafte Leberschädigung. Der Übergang von Steatose zu Inflammation und evtl. folgender Fibrose bis hin zu Hepatozellulärem Karzinom ist jedoch unklar. Die Identifikation beteiligter Faktoren trägt deshalb zum Verständnis und damit zu besserer Prävention und Behandlung entzündlicher Lebererkrankungen bei.

In dieser Arbeit wurden sowohl Aspekte, die an der Leberverfettung beteiligt sind, als auch solche, die zur Entzündung beitragen, analysiert. Es wurde gefunden, dass die Neusynthese von Fetten, die *de novo* Lipogenese, bei Adipositas und Steatose verändert und invers reguliert ist. Während die Lipogenese-Kapazität des Fettgewebes bei Adipositas verringert ist, ist diese in der Leber adipöser Patienten erhöht. Demnach ist die *de novo* Lipogenese an der Steatose beteiligt, da die Lipid-Akkumulation als charakteristisches Kennzeichen der Krankheit durch Erhöhung der Lipogenese-Rate in der Leber begünstigt wird.

Nach der Identifikation dieses pro-steatotischen Mechanismus wurde im zweiten Teil der Arbeit die Lipid-assoziierte Entzündung in der Leber analysiert. Die chronische metabolische Entzündung wird durch Aktivierung von Zellen des angeborenen Immunsystems ausgelöst. Dies kann einerseits durch endogene Warnmoleküle aus metabolisch gestressten, abgestorbenen Zellen erfolgen. Zusätzlich implizieren verschiedene Studien jedoch auch eine Aktivierung durch exogene, bakterielle Warnmoleküle aus dem Darm. In dieser Arbeit konnte ein Modell etabliert werden, welches das pro-inflammatorische Potential von Lipoproteinen aus dem Darm, die bakterielle Substanzen transportieren, aufzeigt. Für die inflammatorische Antwort wurden Kupffer-Zellen, die Leber-residenten Makrophagen, als hauptverantwortliche Zellpopulation identifiziert. Mit Hilfe des akuten Modells einer metabolischen Entzündung sowie im chronischen Fütterungsmodell wurden auf molekularer Ebene potentielle Funktionen von zwei Gruppen regulatorischer Proteine untersucht. Das PML-Protein ist der essentielle Bestandteil von PML-Kerndomänen, die an der Regulation von zellulären Stress-Antworten verschiedenen Ursprungs beteiligt sind. Mit Hilfe PML-defizienter Mäuse wurde *in vivo* die Rolle bei metabolischem Stress untersucht. Es zeigten sich zwar Tendenzen zu einem verstärkten Phänotyp bei PML-Defizienz, diese erreichten jedoch keine statistische Signifikanz, was möglicherweise auf eine Restexpression des Proteins zurückzuführen ist. Weitere Regulatoren inflammatorischer Reaktionen sind die *Triggering Receptors Expressed on Myeloid Cells* (TREM), welche Signalwege des angeborenen Immunsystems gegenläufig regulieren. Während für den amplifizierenden TREM1 keine Effekte in den untersuchten Modellen gefunden wurden, zeigte der attenuierende TREM2 starke Assoziationen mit dem Steatosegrad und der Fibrose sowohl in einer humanen Kohorte als auch im Mausmodell. TREM2 konnte somit als protektiver Faktor bei der Lipid-vermittelten akuten und chronischen Leberentzündung identifiziert werden.

# SUMMARY

---

Non-alcoholic fatty liver disease is strongly associated with obesity and the metabolic syndrome, and shows high prevalence in industrialized countries. This disease begins with lipid accumulation in the liver that can develop into chronic inflammation, a risk factor for irreversible liver damage. The transition from simple steatosis to detectable liver inflammation, fibrosis and potentially even hepatocellular carcinoma is still unclear. Therefore, the identification of factors that are involved in metabolic inflammation will contribute to the prevention and treatment of the disease.

This project aimed to analyze aspects contributing to liver steatosis as well as those contributing to inflammation. We found that the synthesis of lipids (*de novo* lipogenesis) is altered and inversely regulated in obese and steatotic patients. In other words, the lipogenic capacity of adipose tissue is reduced in adipose tissues of obese patients while it is elevated in liver samples of the same patients. In conclusion, *de novo* lipogenesis is involved in the manifestation of steatosis because lipid accumulation as a characteristic feature of fatty liver disease is favored by an increased hepatic lipogenic rate in the obese state.

After identification of this pro-steatotic mechanism, factors contributing to lipid-associated liver inflammation were analyzed. Chronic metabolic inflammation is triggered by activation of cells of the innate immune system. Activation can occur by endogenous damage-associated molecules which are released by cells that died because of metabolic stress. In addition, several studies imply activation of inflammatory pathways by exogenous pathogen-associated molecules that originate from intestinal bacteria. This work could establish a model showing the pro-inflammatory potential of lipoproteins which are formed in the intestine and transport bacterial molecules. The inflammatory response to lipoprotein associated endotoxemia was found to be largely attributed to Kupffer cells, the tissue resident macrophages of the liver. This model of acute metabolic inflammation, as well as feeding-based chronic models were used to analyze potential functions of two classes of regulatory proteins in metabolic inflammation. The PML protein is the essential component of PML nuclear bodies which are involved in the regulation of different cellular stress responses. Using PML-deficient mice, the role of this protein in metabolic stress was analyzed. We found a tendency toward a more pronounced phenotype with PML deficiency, however it was not statistically significant. This could be due to residual expression of the protein that was found in all samples. Triggering Receptors Expressed on Myeloid cells are another class of modulators and two members were shown to have opposed effects on inflammatory signaling pathways of the innate immune system. While amplifying TREM1 showed no effects in the analyzed models of metabolic inflammation, TREM2 was found to associate with steatosis grade and fibrosis in a human cohort as well as in a mouse model. Therefore, TREM2 was identified as a protective factor in processes of lipid mediated acute and chronic liver inflammation.

# ANHANG

---

## 5.1 Literaturverzeichnis

1. Marchesini,G., Marzocchi,R., Agostini,F., and Bugianesi,E. 2005. Nonalcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome. *Curr. Opin. Lipidol.* 16:421-427.
2. Chalasani,N., Younossi,Z., Lavine,J.E., Diehl,A.M., Brunt,E.M., Cusi,K., Charlton,M., and Sanyal,A.J. 2012. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: Practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Am. J. Gastroenterol.* 107:811-826.
3. Vernon,G., Baranova,A., and Younossi,Z.M. 2011. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 34:274-285.
4. Marrero,J.A., Fontana,R.J., Su,G.L., Conjeevaram,H.S., Emick,D.M., and Lok,A.S. 2002. NAFLD may be a common underlying liver disease in patients with hepatocellular carcinoma in the United States. *Hepatology* 36:1349-1354.
5. Gregor,M.F., and Hotamisligil,G.S. 2007. Thematic review series: Adipocyte Biology. Adipocyte stress: the endoplasmic reticulum and metabolic disease. *J. Lipid Res.* 48:1905-1914.
6. Mollica,M.P., Lionetti,L., Putti,R., Cavaliere,G., Gaita,M., and Barletta,A. 2011. From chronic overfeeding to hepatic injury: role of endoplasmic reticulum stress and inflammation. *Nutr. Metab Cardiovasc. Dis.* 21:222-230.
7. Loeffler G 2007. Biochemie und Pathobiochemie.
8. Westerbacka,J., Lammi,K., Hakkinen,A.M., Rissanen,A., Salminen,I., Aro,A., and Yki-Jarvinen,H. 2005. Dietary fat content modifies liver fat in overweight nondiabetic subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 90:2804-2809.
9. Wouters,K., van Gorp,P.J., Bieghs,V., Gijbels,M.J., Duimel,H., Lutjohann,D., Kerksiek,A., van,K.R., Maeda,N., Staels,B. et al 2008. Dietary cholesterol, rather than liver steatosis, leads to hepatic inflammation in hyperlipidemic mouse models of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 48:474-486.
10. Donnelly,K.L., Smith,C.I., Schwarzenberg,S.J., Jessurun,J., Boldt,M.D., and Parks,E.J. 2005. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J. Clin. Invest* 115:1343-1351.
11. Jakobsson,A., Westerberg,R., and Jacobsson,A. 2006. Fatty acid elongases in mammals: their regulation and roles in metabolism. *Prog. Lipid Res.* 45:237-249.

12. Foretz,M., Guichard,C., Ferre,P., and Foufelle,F. 1999. Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96:12737-12742.
13. Shimano,H., Yahagi,N., Amemiya-Kudo,M., Hasty,A.H., Osuga,J., Tamura,Y., Shionoiri,F., Iizuka,Y., Ohashi,K., Harada,K. et al 1999. Sterol regulatory element-binding protein-1 as a key transcription factor for nutritional induction of lipogenic enzyme genes. *J. Biol. Chem.* 274:35832-35839.
14. Horton,J.D., Shah,N.A., Warrington,J.A., Anderson,N.N., Park,S.W., Brown,M.S., and Goldstein,J.L. 2003. Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100:12027-12032.
15. Moon,Y.A., and Horton,J.D. 2003. Identification of two mammalian reductases involved in the two-carbon fatty acyl elongation cascade. *J. Biol. Chem.* 278:7335-7343.
16. Liang,G., Yang,J., Horton,J.D., Hammer,R.E., Goldstein,J.L., and Brown,M.S. 2002. Diminished hepatic response to fasting/refeeding and liver X receptor agonists in mice with selective deficiency of sterol regulatory element-binding protein-1c. *J. Biol. Chem.* 277:9520-9528.
17. Yamashita,H., Takenoshita,M., Sakurai,M., Bruick,R.K., Henzel,W.J., Shillinglaw,W., Arnot,D., and Uyeda,K. 2001. A glucose-responsive transcription factor that regulates carbohydrate metabolism in the liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98:9116-9121.
18. Uyeda,K., and Repa,J.J. 2006. Carbohydrate response element binding protein, ChREBP, a transcription factor coupling hepatic glucose utilization and lipid synthesis. *Cell Metab* 4:107-110.
19. Wang,H., Kouri,G., and Wollheim,C.B. 2005. ER stress and SREBP-1 activation are implicated in beta-cell glucolipototoxicity. *J. Cell Sci.* 118:3905-3915.
20. Herman,M.A., Peroni,O.D., Villoria,J., Schon,M.R., Abumrad,N.A., Bluher,M., Klein,S., and Kahn,B.B. 2012. A novel ChREBP isoform in adipose tissue regulates systemic glucose metabolism. *Nature* 484:333-338.
21. Roberts,R., Hodson,L., Dennis,A.L., Neville,M.J., Humphreys,S.M., Harnden,K.E., Micklem,K.J., and Frayn,K.N. 2009. Markers of de novo lipogenesis in adipose tissue: associations with small adipocytes and insulin sensitivity in humans. *Diabetologia* 52:882-890.
22. Postic,C., and Girard,J. 2008. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *J. Clin. Invest* 118:829-838.
23. Day,C.P. 2006. From fat to inflammation. *Gastroenterology* 130:207-210.
24. Cani,P.D., Amar,J., Iglesias,M.A., Poggi,M., Knauf,C., Bastelica,D., Neyrinck,A.M., Fava,F., Tuohy,K.M., Chabo,C. et al 2007. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56:1761-1772.
25. Ghoshal,S., Witta,J., Zhong,J., de,V.W., and Eckhardt,E. 2009. Chylomicrons promote intestinal absorption of lipopolysaccharides. *J. Lipid Res.* 50:90-97.



26. Erridge,C., Attina,T., Spickett,C.M., and Webb,D.J. 2007. A high-fat meal induces low-grade endotoxemia: evidence of a novel mechanism of postprandial inflammation. *Am. J. Clin. Nutr.* 86:1286-1292.
27. Brun,P., Castagliuolo,I., Di,L., V, Buda,A., Pinzani,M., Palu,G., and Martines,D. 2007. Increased intestinal permeability in obese mice: new evidence in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol* 292:G518-G525.
28. Turnbaugh,P.J., Backhed,F., Fulton,L., and Gordon,J.I. 2008. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host. Microbe* 3:213-223.
29. Mouzaki,M., Comelli,E., Arendt,B., Bonengel,J., Fung,S., Fischer,S., McGilvray,I., and Allard,J. 2013. Intestinal microbiota in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatology*.
30. Sun,L., Yu,Z., Ye,X., Zou,S., Li,H., Yu,D., Wu,H., Chen,Y., Dore,J., Clement,K. et al 2010. A marker of endotoxemia is associated with obesity and related metabolic disorders in apparently healthy Chinese. *Diabetes Care* 33:1925-1932.
31. Vyberg,M., Ravn,V., and Andersen,B. 1987. Pattern of progression in liver injury following jejunioileal bypass for morbid obesity. *Liver* 7:271-276.
32. Pappo,I., Becovier,H., Berry,E.M., and Freund,H.R. 1991. Polymyxin B reduces cecal flora, TNF production and hepatic steatosis during total parenteral nutrition in the rat. *J. Surg. Res.* 51:106-112.
33. Harte,A.L., da Silva,N.F., Creely,S.J., McGee,K.C., Billyard,T., Youssef-Elabd,E.M., Tripathi,G., Ashour,E., Abdalla,M.S., Sharada,H.M. et al 2010. Elevated endotoxin levels in non-alcoholic fatty liver disease. *J. Inflamm. (Lond)* 7:15.
34. Verdam,F.J., Rensen,S.S., Driessen,A., Greve,J.W., and Buurman,W.A. 2011. Novel evidence for chronic exposure to endotoxin in human nonalcoholic steatohepatitis. *J. Clin. Gastroenterol.* 45:149-152.
35. Wellen,K.E., and Hotamisligil,G.S. 2005. Inflammation, stress, and diabetes. *J. Clin. Invest* 115:1111-1119.
36. Tilg,H., and Hotamisligil,G.S. 2006. Nonalcoholic fatty liver disease: Cytokine-adipokine interplay and regulation of insulin resistance. *Gastroenterology* 131:934-945.
37. Crespo,J., Cayon,A., Fernandez-Gil,P., Hernandez-Guerra,M., Mayorga,M., Dominguez-Diez,A., Fernandez-Escalante,J.C., and Pons-Romero,F. 2001. Gene expression of tumor necrosis factor alpha and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients. *Hepatology* 34:1158-1163.
38. Barbuio,R., Milanski,M., Bertolo,M.B., Saad,M.J., and Velloso,L.A. 2007. Infliximab reverses steatosis and improves insulin signal transduction in liver of rats fed a high-fat diet. *J. Endocrinol.* 194:539-550.

39. Satapathy,S.K., Garg,S., Chauhan,R., Sakhuja,P., Malhotra,V., Sharma,B.C., and Sarin,S.K. 2004. Beneficial effects of tumor necrosis factor-alpha inhibition by pentoxifylline on clinical, biochemical, and metabolic parameters of patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Am. J. Gastroenterol.* 99:1946-1952.
40. Sabio,G., Das,M., Mora,A., Zhang,Z., Jun,J.Y., Ko,H.J., Barrett,T., Kim,J.K., and Davis,R.J. 2008. A stress signaling pathway in adipose tissue regulates hepatic insulin resistance. *Science* 322:1539-1543.
41. Cawthorn,W.P., and Sethi,J.K. 2008. TNF-alpha and adipocyte biology. *FEBS Lett.* 582:117-131.
42. Tomita,K., Tamiya,G., Ando,S., Ohsumi,K., Chiyo,T., Mizutani,A., Kitamura,N., Toda,K., Kaneko,T., Horie,Y. et al 2006. Tumour necrosis factor alpha signalling through activation of Kupffer cells plays an essential role in liver fibrosis of non-alcoholic steatohepatitis in mice. *Gut* 55:415-424.
43. Fox-Robichaud,A., and Kubes,P. 2000. Molecular mechanisms of tumor necrosis factor alpha-stimulated leukocyte recruitment into the murine hepatic circulation. *Hepatology* 31:1123-1127.
44. Jager,J., Gremeaux,T., Cormont,M., Le Marchand-Brustel,Y., and Tanti,J.F. 2007. Interleukin-1beta-induced insulin resistance in adipocytes through down-regulation of insulin receptor substrate-1 expression. *Endocrinology* 148:241-251.
45. Nozaki,Y., Saibara,T., Nemoto,Y., Ono,M., Akisawa,N., Iwasaki,S., Hayashi,Y., Hiroi,M., Enzan,H., and Onishi,S. 2004. Polymorphisms of interleukin-1 beta and beta 3-adrenergic receptor in Japanese patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 28:106S-110S.
46. Ma,K.L., Ruan,X.Z., Powis,S.H., Chen,Y., Moorhead,J.F., and Varghese,Z. 2008. Inflammatory stress exacerbates lipid accumulation in hepatic cells and fatty livers of apolipoprotein E knockout mice. *Hepatology* 48:770-781.
47. Zhang,Y.P., Yao,X.X., and Zhao,X. 2006. Interleukin-1 beta up-regulates tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 mRNA and phosphorylation of c-jun N-terminal kinase and p38 in hepatic stellate cells. *World J. Gastroenterol.* 12:1392-1396.
48. Aoki,H., Ohnishi,H., Hama,K., Ishijima,T., Satoh,Y., Hanatsuka,K., Ohashi,A., Wada,S., Miyata,T., Kita,H. et al 2006. Autocrine loop between TGF-beta1 and IL-1beta through Smad3- and ERK-dependent pathways in rat pancreatic stellate cells. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 290:C1100-C1108.
49. Coulon,S., Francque,S., Colle,I., Verrijken,A., Blomme,B., Heindryckx,F., De,M.S., Prawitt,J., Caron,S., Staels,B. et al 2012. Evaluation of inflammatory and angiogenic factors in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Cytokine* 59:442-449.
50. Klover,P.J., Zimmers,T.A., Koniaris,L.G., and Mooney,R.A. 2003. Chronic exposure to interleukin-6 causes hepatic insulin resistance in mice. *Diabetes* 52:2784-2789.
51. Miura,K., Kodama,Y., Inokuchi,S., Schnabl,B., Aoyama,T., Ohnishi,H., Olefsky,J.M., Brenner,D.A., and Seki,E. 2010. Toll-like receptor 9 promotes steatohepatitis by induction of interleukin-1beta in mice. *Gastroenterology* 139:323-334.

52. Saiman,Y., and Friedman,S.L. 2012. The role of chemokines in acute liver injury. *Front Physiol* 3:213.
53. Chacon,M.R., Fernandez-Real,J.M., Richart,C., Megia,A., Gomez,J.M., Miranda,M., Caubet,E., Pastor,R., Masdevall,C., Vilarrasa,N. et al 2007. Monocyte chemoattractant protein-1 in obesity and type 2 diabetes. Insulin sensitivity study. *Obesity. (Silver. Spring)* 15:664-672.
54. Kanda,H., Tateya,S., Tamori,Y., Kotani,K., Hiasa,K., Kitazawa,R., Kitazawa,S., Miyachi,H., Maeda,S., Egashira,K. et al 2006. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J. Clin. Invest* 116:1494-1505.
55. Obstfeld,A.E., Sugaru,E., Thearle,M., Francisco,A.M., Gayet,C., Ginsberg,H.N., Ables,E.V., and Ferrante,A.W., Jr. 2010. C-C chemokine receptor 2 (CCR2) regulates the hepatic recruitment of myeloid cells that promote obesity-induced hepatic steatosis. *Diabetes* 59:916-925.
56. Zamara,E., Galastri,S., Aleffi,S., Petrai,I., Aragno,M., Mastrocola,R., Novo,E., Bertolani,C., Milani,S., Vizzutti,F. et al 2007. Prevention of severe toxic liver injury and oxidative stress in MCP-1-deficient mice. *J. Hepatol.* 46:230-238.
57. Clement,S., Juge-Aubry,C., Sgroi,A., Conzelmann,S., Paziienza,V., Pittet-Cuenod,B., Meier,C.A., and Negro,F. 2008. Monocyte chemoattractant protein-1 secreted by adipose tissue induces direct lipid accumulation in hepatocytes. *Hepatology* 48:799-807.
58. Narumi,S., Tominaga,Y., Tamaru,M., Shimai,S., Okumura,H., Nishioji,K., Itoh,Y., and Okanoue,T. 1997. Expression of IFN-inducible protein-10 in chronic hepatitis. *J. Immunol.* 158:5536-5544.
59. Racanelli,V., and Rehermann,B. 2006. The liver as an immunological organ. *Hepatology* 43:S54-S62.
60. Friedman,S.L. 2000. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J. Biol. Chem.* 275:2247-2250.
61. Szymanska,R., and Schmidt-Pospula,M. 1979. [Studies of liver's reticuloendothelial cells by Tadeusz Browicz and Karl Kupffer. A historical outline]. *Arch. Hist Med. (Warsz. )* 42:331-336.
62. Baffy,G. 2009. Kupffer cells in non-alcoholic fatty liver disease: the emerging view. *J. Hepatol.* 51:212-223.
63. Medzhitov,R. 2008. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454:428-435.
64. Biswas,S.K., and Lopez-Collazo,E. 2009. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends Immunol.* 30:475-487.
65. Duewell,P., Kono,H., Rayner,K.J., Sirois,C.M., Vladimer,G., Bauernfeind,F.G., Abela,G.S., Franchi,L., Nunez,G., Schnurr,M. et al 2010. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* 464:1357-1361.

66. Barton,G.M., and Medzhitov,R. 2003. Toll-like receptor signaling pathways. *Science* 300:1524-1525.
67. Szabo,G., Velayudham,A., Romics,L., Jr., and Mandrekar,P. 2005. Modulation of non-alcoholic steatohepatitis by pattern recognition receptors in mice: the role of toll-like receptors 2 and 4. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 29:140S-145S.
68. Rivera,C.A., Adegboyega,P., van,R.N., Tagalicud,A., Allman,M., and Wallace,M. 2007. Toll-like receptor-4 signaling and Kupffer cells play pivotal roles in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *J. Hepatol.* 47:571-579.
69. Csak,T., Velayudham,A., Hritz,I., Petrasek,J., Levin,I., Lippai,D., Catalano,D., Mandrekar,P., Dolganiuc,A., Kurt-Jones,E. et al 2011. Deficiency in myeloid differentiation factor-2 and toll-like receptor 4 expression attenuates nonalcoholic steatohepatitis and fibrosis in mice. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol* 300:G433-G441.
70. Yang,S.Q., Lin,H.Z., Lane,M.D., Clemens,M., and Diehl,A.M. 1997. Obesity increases sensitivity to endotoxin liver injury: implications for the pathogenesis of steatohepatitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94:2557-2562.
71. Imajo,K., Fujita,K., Yoneda,M., Nozaki,Y., Ogawa,Y., Shinohara,Y., Kato,S., Mawatari,H., Shibata,W., Kitani,H. et al 2012. Hyperresponsivity to low-dose endotoxin during progression to nonalcoholic steatohepatitis is regulated by leptin-mediated signaling. *Cell Metab* 16:44-54.
72. Li,Z., Yang,S., Lin,H., Huang,J., Watkins,P.A., Moser,A.B., Desimone,C., Song,X.Y., and Diehl,A.M. 2003. Probiotics and antibodies to TNF inhibit inflammatory activity and improve nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 37:343-350.
73. Solga,S.F., and Diehl,A.M. 2003. Non-alcoholic fatty liver disease: lumen-liver interactions and possible role for probiotics. *J. Hepatol.* 38:681-687.
74. Ye,D., Li,F.Y., Lam,K.S., Li,H., Jia,W., Wang,Y., Man,K., Lo,C.M., Li,X., and Xu,A. 2012. Toll-like receptor-4 mediates obesity-induced non-alcoholic steatohepatitis through activation of X-box binding protein-1 in mice. *Gut* 61:1058-1067.
75. Nomura,F., Akashi,S., Sakao,Y., Sato,S., Kawai,T., Matsumoto,M., Nakanishi,K., Kimoto,M., Miyake,K., Takeda,K. et al 2000. Cutting edge: endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface toll-like receptor 4 expression. *J. Immunol.* 164:3476-3479.
76. Liew,F.Y., Xu,D., Brint,E.K., and O'Neill,L.A. 2005. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 5:446-458.
77. Turer,E.E., Tavares,R.M., Mortier,E., Hitotsumatsu,O., Advincula,R., Lee,B., Shifrin,N., Malynn,B.A., and Ma,A. 2008. Homeostatic MyD88-dependent signals cause lethal inflammation in the absence of A20. *J. Exp. Med.* 205:451-464.

78. Tazi,K.A., Quioc,J.J., Saada,V., Bezeaud,A., Lebrec,D., and Moreau,R. 2006. Upregulation of TNF-alpha production signaling pathways in monocytes from patients with advanced cirrhosis: possible role of Akt and IRAK-M. *J. Hepatol.* 45:280-289.
79. Wald,D., Qin,J., Zhao,Z., Qian,Y., Naramura,M., Tian,L., Towne,J., Sims,J.E., Stark,G.R., and Li,X. 2003. SIGIRR, a negative regulator of Toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling. *Nat. Immunol.* 4:920-927.
80. Lanier,L.L. 2009. *D. Immunol. Rev.* 227:150-160.
81. Klesney-Tait,J., Turnbull,I.R., and Colonna,M. 2006. The TREM receptor family and signal integration. *Nat. Immunol.* 7:1266-1273.
82. Bouchon,A., Dietrich,J., and Colonna,M. 2000. Cutting edge: inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes. *J. Immunol.* 164:4991-4995.
83. Bleharski,J.R., Kiessler,V., Buonsanti,C., Sieling,P.A., Stenger,S., Colonna,M., and Modlin,R.L. 2003. A role for triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in host defense during the early-induced and adaptive phases of the immune response. *J. Immunol.* 170:3812-3818.
84. Gibot,S., Massin,F., Marcou,M., Taylor,V., Stidwill,R., Wilson,P., Singer,M., and Bellingan,G. 2007. TREM-1 promotes survival during septic shock in mice. *Eur. J. Immunol.* 37:456-466.
85. Bouchon,A., Facchetti,F., Weigand,M.A., and Colonna,M. 2001. TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock. *Nature* 410:1103-1107.
86. Gibot,S., Massin,F., Le,R.P., Bene,M.C., Faure,G.C., Bollaert,P.E., and Levy,B. 2005. Surface and soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1: expression patterns in murine sepsis. *Crit Care Med.* 33:1787-1793.
87. Gibot,S., Kolopp-Sarda,M.N., Bene,M.C., Bollaert,P.E., Lozniewski,A., Mory,F., Levy,B., and Faure,G.C. 2004. A soluble form of the triggering receptor expressed on myeloid cells-1 modulates the inflammatory response in murine sepsis. *J. Exp. Med.* 200:1419-1426.
88. Chen,L.C., Laskin,J.D., Gordon,M.K., and Laskin,D.L. 2008. Regulation of TREM expression in hepatic macrophages and endothelial cells during acute endotoxemia. *Exp. Mol. Pathol.* 84:145-155.
89. Zeng,H., Ornatowska,M., Joo,M.S., and Sadikot,R.T. 2007. TREM-1 expression in macrophages is regulated at transcriptional level by NF-kappaB and PU.1. *Eur. J. Immunol.* 37:2300-2308.
90. Hosoda,H., Tamura,H., Kida,S., and Nagaoka,I. 2011. Transcriptional regulation of mouse TREM-1 gene in RAW264.7 macrophage-like cells. *Life Sci.* 89:115-122.
91. Yu ZH 2010. Study on the natural ligand(s) of triggering receptor expressed on myeloid cell-1 on bacteria cell wall. 335-339.

92. Haselmayer,P., Grosse-Hovest,L., von,L.P., Schild,H., and Radsak,M.P. 2007. TREM-1 ligand expression on platelets enhances neutrophil activation. *Blood* 110:1029-1035.
93. El,M.R., El,G.M., Seeds,M.C., McCall,C.E., Dreskin,S.C., and Nicolls,M.R. 2007. Endogenous signals released from necrotic cells augment inflammatory responses to bacterial endotoxin. *Immunol. Lett.* 111:36-44.
94. Paloneva,J., Manninen,T., Christman,G., Hovanes,K., Mandelin,J., Adolfsson,R., Bianchin,M., Bird,T., Miranda,R., Salmaggi,A. et al 2002. Mutations in two genes encoding different subunits of a receptor signaling complex result in an identical disease phenotype. *Am. J. Hum. Genet.* 71:656-662.
95. Kondo,T., Takahashi,K., Kohara,N., Takahashi,Y., Hayashi,S., Takahashi,H., Matsuo,H., Yamazaki,M., Inoue,K., Miyamoto,K. et al 2002. Heterogeneity of presenile dementia with bone cysts (Nasu-Hakola disease): three genetic forms. *Neurology* 59:1105-1107.
96. Paloneva,J., Mandelin,J., Kiiialainen,A., Bohling,T., Prudlo,J., Hakola,P., Haltia,M., Konttinen,Y.T., and Peltonen,L. 2003. DAP12/TREM2 deficiency results in impaired osteoclast differentiation and osteoporotic features. *J. Exp. Med.* 198:669-675.
97. Takahashi,K., Rochford,C.D., and Neumann,H. 2005. Clearance of apoptotic neurons without inflammation by microglial triggering receptor expressed on myeloid cells-2. *J. Exp. Med.* 201:647-657.
98. Guerreiro,R., Wojtas,A., Bras,J., Carrasquillo,M., Rogaeva,E., Majounie,E., Cruchaga,C., Sassi,C., Kauwe,J.S., Younkin,S. et al 2013. TREM2 variants in Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* 368:117-127.
99. Neumann,H., and Daly,M.J. 2013. Variant TREM2 as risk factor for Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* 368:182-184.
100. Piccio,L., Buonsanti,C., Mariani,M., Cella,M., Gilfillan,S., Cross,A.H., Colonna,M., and Panina-Bordignon,P. 2007. Blockade of TREM-2 exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur. J. Immunol.* 37:1290-1301.
101. Hamerman,J.A., Jarjoura,J.R., Humphrey,M.B., Nakamura,M.C., Seaman,W.E., and Lanier,L.L. 2006. Cutting edge: inhibition of TLR and FcR responses in macrophages by triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM)-2 and DAP12. *J. Immunol.* 177:2051-2055.
102. Turnbull,I.R., Gilfillan,S., Cella,M., Aoshi,T., Miller,M., Piccio,L., Hernandez,M., and Colonna,M. 2006. Cutting edge: TREM-2 attenuates macrophage activation. *J. Immunol.* 177:3520-3524.
103. Seno,H., Miyoshi,H., Brown,S.L., Geske,M.J., Colonna,M., and Stappenbeck,T.S. 2009. Efficient colonic mucosal wound repair requires Trem2 signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 106:256-261.
104. Schmid,C.D., Sautkulis,L.N., Danielson,P.E., Cooper,J., Hasel,K.W., Hilbush,B.S., Sutcliffe,J.G., and Carson,M.J. 2002. Heterogeneous expression of the triggering receptor expressed on myeloid cells-2 on adult murine microglia. *J. Neurochem.* 83:1309-1320.

105. Daws,M.R., Sullam,P.M., Niemi,E.C., Chen,T.T., Tchao,N.K., and Seaman,W.E. 2003. Pattern recognition by TREM-2: binding of anionic ligands. *J. Immunol.* 171:594-599.
106. Takegahara,N., Takamatsu,H., Toyofuku,T., Tsujimura,T., Okuno,T., Yukawa,K., Mizui,M., Yamamoto,M., Prasad,D.V., Suzuki,K. et al 2006. Plexin-A1 and its interaction with DAP12 in immune responses and bone homeostasis. *Nat. Cell Biol.* 8:615-622.
107. Terris,B., Baldin,V., Dubois,S., Degott,C., Flejou,J.F., Henin,D., and Dejean,A. 1995. PML nuclear bodies are general targets for inflammation and cell proliferation. *Cancer Res.* 55:1590-1597.
108. Jensen,K., Shiels,C., and Freemont,P.S. 2001. PML protein isoforms and the RBCC/TRIM motif. *Oncogene* 20:7223-7233.
109. Condemine,W., Takahashi,Y., Zhu,J., Puvion-Dutilleul,F., Guegan,S., Janin,A., and de,T.H. 2006. Characterization of endogenous human promyelocytic leukemia isoforms. *Cancer Res.* 66:6192-6198.
110. Yang,S., Kuo,C., Bisi,J.E., and Kim,M.K. 2002. PML-dependent apoptosis after DNA damage is regulated by the checkpoint kinase hCds1/Chk2. *Nat. Cell Biol.* 4:865-870.
111. Doucas,V., Tini,M., Egan,D.A., and Evans,R.M. 1999. Modulation of CREB binding protein function by the promyelocytic (PML) oncoprotein suggests a role for nuclear bodies in hormone signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96:2627-2632.
112. Vallian,S., Gaken,J.A., Gingold,E.B., Kouzarides,T., Chang,K.S., and Farzaneh,F. 1998. Modulation of Fos-mediated AP-1 transcription by the promyelocytic leukemia protein. *Oncogene* 16:2843-2853.
113. Guo,A., Salomoni,P., Luo,J., Shih,A., Zhong,S., Gu,W., and Pandolfi,P.P. 2000. The function of PML in p53-dependent apoptosis. *Nat. Cell Biol.* 2:730-736.
114. Wu,W.S., Vallian,S., Seto,E., Yang,W.M., Edmondson,D., Roth,S., and Chang,K.S. 2001. The growth suppressor PML represses transcription by functionally and physically interacting with histone deacetylases. *Mol. Cell Biol.* 21:2259-2268.
115. Wu,W.S., Xu,Z.X., Hittelman,W.N., Salomoni,P., Pandolfi,P.P., and Chang,K.S. 2003. Promyelocytic leukemia protein sensitizes tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis by inhibiting the NF-kappaB survival pathway. *J. Biol. Chem.* 278:12294-12304.
116. Lunardi,A., Gaboli,M., Giorgio,M., Rivi,R., Bygrave,A., Antoniou,M., Drabek,D., Dzierzak,E., Fagioli,M., Salmena,L. et al 2011. A Role for PML in Innate Immunity. *Genes Cancer* 2:10-19.
117. De,M.S., Seki,E., Uchinami,H., Kluwe,J., Zhang,Y., Brenner,D.A., and Schwabe,R.F. 2007. Gene expression profiles during hepatic stellate cell activation in culture and in vivo. *Gastroenterology* 132:1937-1946.
118. Wang,Z.G., Delva,L., Gaboli,M., Rivi,R., Giorgio,M., Cordon-Cardo,C., Grosveld,F., and Pandolfi,P.P. 1998. Role of PML in cell growth and the retinoic acid pathway. *Science* 279:1547-1551.

119. Kohli,R., Kirby,M., Xanthakos,S.A., Softic,S., Feldstein,A.E., Saxena,V., Tang,P.H., Miles,L., Miles,M.V., Balistreri,W.F. et al 2010. High-fructose, medium chain trans fat diet induces liver fibrosis and elevates plasma coenzyme Q9 in a novel murine model of obesity and nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 52:934-944.
120. Bruns,O.T., Ittrich,H., Peldschus,K., Kaul,M.G., Tromsdorf,U.I., Lauterwasser,J., Nikolic,M.S., Mollwitz,B., Merkel,M., Bigall,N.C. et al 2009. Real-time magnetic resonance imaging and quantification of lipoprotein metabolism in vivo using nanocrystals. *Nat. Nanotechnol.* 4:193-201.
121. Eissing,L., Scherer,T., Todter,K., Knippschild,U., Greve,J.W., Buurman,W.A., Pinnschmidt,H.O., Rensen,S.S., Wolf,A.M., Bartelt,A. et al 2013. De novo lipogenesis in human fat and liver is linked to ChREBP-beta and metabolic health. *Nat. Commun.* 4:1528.
122. LOWRY,O.H., ROSEBROUGH,N.J., FARR,A.L., and RANDALL,R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
123. Kleiner,D.E., Brunt,E.M., Van,N.M., Behling,C., Contos,M.J., Cummings,O.W., Ferrell,L.D., Liu,Y.C., Torbenson,M.S., Unalp-Arida,A. et al 2005. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 41:1313-1321.
124. Matthews,D.R., Hosker,J.P., Rudenski,A.S., Naylor,B.A., Treacher,D.F., and Turner,R.C. 1985. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28:412-419.
125. Ortega,F.J., Mayas,D., Moreno-Navarrete,J.M., Catalan,V., Gomez-Ambrosi,J., Esteve,E., Rodriguez-Hermosa,J.I., Ruiz,B., Ricart,W., Peral,B. et al 2010. The gene expression of the main lipogenic enzymes is downregulated in visceral adipose tissue of obese subjects. *Obesity. (Silver. Spring)* 18:13-20.
126. Wang,Y., Jones,V.B., Urs,S., Kim,S., Soltani-Bejnood,M., Quigley,N., Heo,Y.R., Standridge,M., Andersen,B., Dhar,M. et al 2004. The human fatty acid synthase gene and de novo lipogenesis are coordinately regulated in human adipose tissue. *J. Nutr.* 134:1032-1038.
127. Dorn,C., Riener,M.O., Kirovski,G., Saugspier,M., Steib,K., Weiss,T.S., Gabele,E., Kristiansen,G., Hartmann,A., and Hellerbrand,C. 2010. Expression of fatty acid synthase in nonalcoholic fatty liver disease. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 3:505-514.
128. Ozcan,U., Cao,Q., Yilmaz,E., Lee,A.H., Iwakoshi,N.N., Ozdelen,E., Tuncman,G., Gorgun,C., Glimcher,L.H., and Hotamisligil,G.S. 2004. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* 306:457-461.
129. Hirosumi,J., Tuncman,G., Chang,L., Gorgun,C.Z., Uysal,K.T., Maeda,K., Karin,M., and Hotamisligil,G.S. 2002. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 420:333-336.
130. Ribeiro,P.S., Cortez-Pinto,H., Sola,S., Castro,R.E., Ramalho,R.M., Baptista,A., Moura,M.C., Camilo,M.E., and Rodrigues,C.M. 2004. Hepatocyte apoptosis, expression of death receptors, and activation of NF-kappaB in the liver of nonalcoholic and alcoholic steatohepatitis patients. *Am. J. Gastroenterol.* 99:1708-1717.



131. Heilbronn,L.K., and Campbell,L.V. 2008. Adipose tissue macrophages, low grade inflammation and insulin resistance in human obesity. *Curr. Pharm. Des* 14:1225-1230.
132. Prieur,X., Mok,C.Y., Velagapudi,V.R., Nunez,V., Fuentes,L., Montaner,D., Ishikawa,K., Camacho,A., Barbarroja,N., O'Rahilly,S. et al 2011. Differential lipid partitioning between adipocytes and tissue macrophages modulates macrophage lipotoxicity and M2/M1 polarization in obese mice. *Diabetes* 60:797-809.
133. Tosello-Tramont,A.C., Landes,S.G., Nguyen,V., Novobrantseva,T.I., and Hahn,Y.S. 2012. Kupffer cells trigger nonalcoholic steatohepatitis development in diet-induced mouse model through tumor necrosis factor-alpha production. *J. Biol. Chem.* 287:40161-40172.
134. Kim,M.K., Yang,S., Lee,K.H., Um,J.H., Liu,M., Kang,H., Park,S.J., and Chung,J.H. 2011. Promyelocytic leukemia inhibits adipogenesis, and loss of promyelocytic leukemia results in fat accumulation in mice. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 301:E1130-E1142.
135. Kloting,N., Stumvoll,M., and Bluher,M. 2007. [The biology of visceral fat]. *Internist (Berl)* 48:126-133.
136. Schenk,M., Bouchon,A., Birrer,S., Colonna,M., and Mueller,C. 2005. Macrophages expressing triggering receptor expressed on myeloid cells-1 are underrepresented in the human intestine. *J. Immunol.* 174:517-524.
137. Wu,J., Li,J., Salcedo,R., Mivechi,N.F., Trinchieri,G., and Horuzsko,A. 2012. The proinflammatory myeloid cell receptor TREM-1 controls Kupffer cell activation and development of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 72:3977-3986.
138. Farese,R.V., Jr., Zechner,R., Newgard,C.B., and Walther,T.C. 2012. The problem of establishing relationships between hepatic steatosis and hepatic insulin resistance. *Cell Metab* 15:570-573.
139. Bieggs,V., Rensen,P.C., Hofker,M.H., and Shiri-Sverdlov,R. 2012. NASH and atherosclerosis are two aspects of a shared disease: central role for macrophages. *Atherosclerosis* 220:287-293.

## 5.2 Abkürzungsverzeichnis

A20	= TNFAIP3, <i>TNF<math>\alpha</math>-induced protein 3</i>
ALT	Alanin-Aminotransferase
AP1	<i>activator protein 1</i>
AST	Aspartat-Aminotransferase
BMI	<i>body mass index</i>
CBP	CREB bindendes Protein
CCL2	Chemokin (C-C-Motiv) Ligand 2
CD14	<i>cluster of differentiation 14</i> (TLR4-Corezeptor)
CD68	<i>cluster of differentiation 68</i> (Makrophagenmarker)
CEBP $\alpha$	CCAAT/ <i>enhancer-binding protein <math>\alpha</math></i>
COL1A1	Collagen 1 $\alpha$ 1
CREB	cAMP <i>response element</i> bindendes Protein
ChREBP	<i>Carbohydrate response element</i> bindendes Protein
CRP	C-reaktives Protein
DAMP	<i>damage associated molecular pattern</i>
DAP12	DNAX aktivierendes Protein 12
d. h.	das heißt
e-IF4	<i>eukaryotic initiation factor 4</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ELOVL6	<i>elongation of long-chain fatty acids family member 6</i> , Fettsäure-Elongase 6
EU	Endotoxin <i>units</i>
FASN	<i>fatty acid synthase</i> , Fettsäuresynthase
H&E	Hematoxylin & Eosin
HFCS	Hochfett-, -Cholesterol-, Sucrose-Diät
HFHCh	Hochfett-, -Kohlenhydrat-Diät
HFD	Hochfettdiät
HMGB1	<i>high mobility group</i> Protein B1
HOMA-IR	<i>homeostatic model assessment of insulin resistance</i>

HSC	<i>hepatic stellate cells</i> , hepatische Sternzellen
HSP70	Hitzeschockprotein 70
i. d. R.	in der Regel
IKK $\beta$	Inhibitor-NF $\kappa$ B Kinase $\beta$
IL1 $\beta$	Interleukin 1 beta
IL6	Interleukin 6
ITAM	Immunorezeptor-Tyrosin-basiertes aktivierendes Motiv
IRAK-M	IL1-Rezeptor assoziierte Kinase M
IRF3	<i>interferon regulatory factor 3</i>
JNK	Jun N-terminale Kinase
LBP	LPS-bindendes Protein
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCD	Methionin-Cholin-defiziente Diät
MD2	Lymphozyten-Antigen 96
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MyD88	<i>myeloid differentiation primary response gene 88</i>
NAFLD	nicht-alkoholische Fettleber-Krankheit
NAS	<i>NAFLD activity score</i>
NASH	nicht-alkoholische Steatohepatitis
NCEP-ATP III	<i>National Centers for Environmental Prediction – Adult Treatment Panel III</i>
NF $\kappa$ B	<i>nuclear factor <math>\kappa</math>B</i>
NLRP3	<i>NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3</i>
NLS	nukleäre Lokalisationssequenz
OFTT	oraler Fett-Toleranztest
OGTT	oraler Glucose-Toleranztest
PAMP	<i>pathogen associated molecular pattern</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PML	<i>Promyelocytic Leukemia Protein</i>

RBCC	<i>RING finger, B-BOX, and coiled-coil domain</i>
RNA	Ribonucleinsäure
SCD	Stearoyl-CoA-Desaturase
s.e.m.	<i>standard error of the mean</i>
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
SIGIRR	<i>single Ig IL-1-related receptor</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
sog.	sogenannt
SREBP1	<i>sterol response element binding protein 1</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TAG	Triacylglycerol
TAF1	TBP-assoziiierter Faktor
Tbp	TATA-Box bindendes Protein
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TIMP1	<i>tissue inhibitor of matrix proteases-1</i>
TIRAP	<i>toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing Adapterprotein</i>
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
TRAM	Toll-like Rezeptor Adaptermolekül 1
TREM	<i>Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells</i>
TRIF	<i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-<math>\beta</math></i>
TRL	Triglyzerid-reiche Lipoproteine
u. a.	unter anderem
u. U.	unter Umständen
v. a.	vor allem
VAT	viszerales Fettgewebe ( <i>visceral adipose tissue</i> )
VLDL	<i>very low density</i> Lipoproteine
WAT	weißes Fettgewebe ( <i>white adipose tissue</i> )
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

### 5.3 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Reaktionen der DNL-Schlüsselenzyme FASN, SCD und ELOVL6

Abb. 1.2: Faktoren der Leber-Steatose

Abb. 1.3: Entstehung metabolischer Endotoxämie und Effekte auf die Leber

Abb. 1.4: Aktivierung von Leber-Zellen durch Zytokine aus aktivierten Kupffer-Zellen

Abb. 1.5: Lokalisation der Leber-Zellen

Abb. 1.6: Übersicht des TLR4-Signalwegs

Abb. 1.7: Modulation von TLR-Signalen durch TREM1 und TREM2

Abb. 1.8: Modulation inflammatorischer Transkriptionsfaktoren durch PML

Abb. 2.1: Genotypisierung transgener und Wildtyp-Tiere mittels PCR

Abb. 3.1: Exemplarische histologische Darstellung von Leber- und viszeralen Fettgewebeproben der humanen Kohorte

Abb. 3.2: Charakterisierung der humanen Kohorte nach Parametern des metabolischen Syndroms

Tab. 3.1: Einteilung und Charakterisierung der Patienten nach Übergewicht und Diabetes sowie nach Steatosegrad

Abb. 3.3: Expression von DNL-Schlüsselenzymen in VAT und Leber in Adipositas- und Steatose-Gruppen

Abb. 3.4: Expression von lipogenen Transkriptionsfaktoren in VAT und Leber in den Adipositas-Gruppen

Abb. 3.5: Expression eines Makrophagenmarker und LPS-Rezeptoren in NAFLD-Patienten in der Leber

Abb. 3.6: Expression des Stress-Modulators PML in VAT und Leber. A, PML-Expression im Fettgewebe

Abb. 3.7: Expression der TLR4-modulierenden Proteine TREM1 und TREM2 in Fettgewebe und Leber

Abb. 3.8: Expression der TLR4 negativ regulierenden Proteine A-20, IRAK-M und SIGIRR in der Leber

Abb. 3.9: Korrelation der hepatischen TREM2-Expression mit Leberentzündungsparametern

Abb. 3.10: LPS-Detektion in humanem Serum und daraus isolierten TG-reichen Lipoproteinen

Abb. 3.11: Hepatische Expression von Entzündungsmarkern nach TRL-Injektion

Abb. 3.12: Aufnahme von TRL in Leberzellen

Abb. 3.13: Primäre Leberzellen nach Zelltyp-spezifischer Isolation

Abb. 3.14: Zytokin-Expression in primären Leberzellen vor und nach LPS-Stimulation

Abb. 3.15: basale Zytokin-Sekretion aus primären Leberzellen und nach LPS-Stimulation

Abb. 3.16: Expression der LPS-Rezeptoren und eines Makrophagenmarkers in primären Leberzellen

Abb. 3.17: Expression von Entzündungsmarkern nach TRL-Injektion in der Leber mit und ohne Kupfferzell-Depletion

Abb. 3.18: PML-Expression in primären Leber-Zellen

Abb. 3.19: Charakterisierung der PML-*knockdown* HepaRG-Zellen

Abb. 3.20: Charakterisierung der PML-defizienten Mäuse

Abb. 3.21: Genexpression von Pml und Zytokinen in metabolischen Organen von Wildtyp- und PML-defizienten Mäusen

Abb. 3.22: Phänotypische Parameter von Wildtyp- und PML-defizienten Mäusen nach Fütterung einer Hochfettdiät

Abb. 3.23: Expressionsanalyse in metabolischen Organen von Wildtyp- und PML-defizienten Mäusen nach Fütterung einer Hochfettdiät

Abb. 3.24: Pro-inflammatorische Antwort auf postprandiale Lipoproteine in Wildtyp- und PML-defizienten Mäusen

Abb. 3.25: Trem-Expression in primären Leber-Zellen

Abb. 3.26: Zytokin-Sekretion durch TREM1- und TREM2-defiziente Kupffer-Zellen

Abb. 3.27: Pro-inflammatorische Antwort auf Lipoproteine in TREM1- und TREM2-defizienten Mäusen

Abb. 3.28: Aktivierung von JNK durch Lipoproteine in TREM1- und TREM2-defizienten Mäusen

Abb. 3.29: Charakterisierung des Effektes einer HFCS-Diät auf die Leber

Abb. 3.30: Metabolische und klinische Parameter von Wildtyp- und TREM-defizienten Mäusen nach Fütterung einer NAFLD-induzierenden HFCS-Diät

Abb. 3.31: Expression inflammatorischer Marker in der Leber und im Fettgewebe nach Fütterung einer NAFLD-induzierenden HFCS-Diät in Wildtyp- und TREM-defizienten Mäusen

Abb. 3.32: Charakterisierung des Effektes der HFHCh-Diät auf die Leber

Abb. 3.33: Metabolische und klinische Parameter von Wildtyp- und TREM-defizienten Mäusen nach Fütterung der HFHCh-Diät

Abb. 3.34: Expression inflammatorischer Marker in der Leber und im Fettgewebe nach Fütterung der HFHCh-Diät in Wildtyp- und TREM-defizienten Mäusen

Abb. 4.1: Modell zur Regulation der DNL in Fettgewebe und Leber und Beteiligung an der NAFLD

Abb. 4.2: Modell zur Leberentzündung durch metabolische Endotoxämie.

## 5.4 Chemikalien

Substanz	GHS-Hinweis	H-Sätze	P-Sätze
Aceton	Gefahr	225-319-336	210-233-305+351+338
Chloroform	Achtung	302-315-351-373	302+352-314
CuSO <sub>4</sub>	Achtung	302-319-315-410	273-305+351+338-302+352
EDTA	Achtung	319	305+351+338
Ethanol	Gefahr	225	210
Formaldehyd	Gefahr	351-331-311-301-314-317	301+310-303+361+353-305+351+338 320-361-405-501
HCl	Gefahr	280-331-314	260-280-304+340-303+361+353 305+351+338-315-405-403
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Gefahr	314	280-301+330+331-309-310-305+351+338
KBr	Achtung	315-319-335	261-305+351+338
Methanol	Gefahr	225-331-311-301-370	210-233-280-302+352
NaF	Gefahr	301-319-315	305+351+338-302+352-309-310
NaOH	Gefahr	314-290	280-301+330+331-309+310-305+351+338
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>		301+311+331	309+310
Picrinsäure	Gefahr	201-331-311-301	210-280-301+310-312
SDS	Gefahr	228-311-302-335-315-319	210-280-304+340-305+351+338-309+310
Tris	Achtung	315-319-335	261-305+351+338
Xylol	Achtung	226-312+332-315	210-302+352

### H200-Reihe: Physikalische Gefahren

H201 Explosiv, Gefahr der Massenexplosion.

H225 Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar.

H226 Flüssigkeit und Dampf entzündbar.

H228 Entzündbarer Feststoff.

H280 Enthält Gas unter Druck; kann bei Erwärmung explodieren.

H290 Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.

### H300-Reihe: Gesundheitsgefahren

H301 Giftig bei Verschlucken.

H302 Gesundheitsschädlich bei Verschlucken.

H311 Giftig bei Hautkontakt.

H314 Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.

H315 Verursacht Hautreizungen.

H317 Kann allergische Hautreaktionen verursachen.

H319 Verursacht schwere Augenreizung.

H331 Giftig bei Einatmen.

H335 Kann die Atemwege reizen.

H336 Kann Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen.

H351 Kann vermutlich Krebs erzeugen (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).

H370 Schädigt die Organe (oder alle betroffenen Organe nennen, sofern bekannt) (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).  
 H373 Kann die Organe schädigen (alle betroffenen Organe nennen, sofern bekannt) bei längerer oder wiederholter Exposition (Expositionsweg angeben, wenn schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).

H301+H311+H331 Giftig bei Verschlucken, Hautkontakt oder Einatmen.

H312+H332 Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt oder Einatmen.

#### **H400-Reihe: Umweltgefahren**

H410 Sehr giftig für Wasserorganismen mit langfristiger Wirkung.

#### **P200-Reihe: Prävention**

P210 Von Hitze / Funken / offener Flamme / heißen Oberflächen fernhalten. Nicht rauchen.

P223 Kontakt mit Wasser wegen heftiger Reaktion und möglichem Aufflammen unbedingt verhindern.

P260 Staub / Rauch / Gas / Nebel / Dampf / Aerosol nicht einatmen.

P261 Einatmen von Staub / Rauch / Gas / Nebel / Dampf / Aerosol vermeiden.

P273 Freisetzung in die Umwelt vermeiden.

P280 Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz / Gesichtsschutz tragen.

#### **P300-Reihe: Reaktion**

H301 Giftig bei Verschlucken.

P309 Bei Exposition oder Unwohlsein:

P310 Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.

P312 Bei Unwohlsein Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.

P314 Bei Unwohlsein ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.

P315 Sofort ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.

P320 Besondere Behandlung dringend erforderlich (siehe ... auf diesem Kennzeichnungsetikett).

P361 Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen.

P301 + P310 Bei Verschlucken: Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.

P301 + P330 + P331 Bei Verschlucken: Mund ausspülen. Kein Erbrechen herbeiführen.

P302 + P352 Bei Kontakt mit der Haut: Mit viel Wasser und Seife waschen.

P303 + P361 + P353 Bei Kontakt mit der Haut (oder dem Haar): Alle beschmutzten, getränkten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen/duschen.

P304 + P340 Bei Einatmen: An die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert.

P305 + P351 + P338 Bei Kontakt mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.

P309 + P310 Bei Exposition oder Unwohlsein: Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.

#### **P400-Reihe: Aufbewahrung**

P403 An einem gut belüfteten Ort aufbewahren.

P405 Unter Verschluss aufbewahren.

#### **P500-Reihe: Entsorgung**

P501 Inhalt / Behälter ... zuführen.



# DANKSAGUNG

---

Zunächst möchte ich Prof. Dr. Dr. Christian Betzel für die offizielle Betreuung meiner Dissertation im Fachbereich Chemie und für die Begutachtung der Arbeit bedanken. Prof. Dr. Jörg Heeren aus dem Institut für Biochemie danke ich sehr herzlich für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe, für das interessante Thema, das Vertrauen und auch die Flexibilität bei den Unterthemen. Darüber hinaus bin ich dankbar für die Schonfrist, bevor das „echte Leben“ beginnt.

Auch Dr. Ludger Scheja aus dem Institut für Biochemie möchte ich danken für hilfreiche fachliche Gespräche und für die Einweihung in die Geheimnisse von Humanstudien. Sandra Ehret, Birgit Henkel und Eva-Marie Azizi haben bei Bedarf großartige Unterstützung im Labor geleistet, was ich sehr geschätzt habe.

Dank der unterschiedlichen Veranstaltungen im Rahmen des Graduiertenkollegs „Leberentzündung“ konnte ich meinen Horizont erweitern und Hilfe bei noch nicht etablierten Methoden finden, insbesondere durch Nina Günther und Jan Kozik.

Meinen Mitdotorandinnen Kirstin Albers, Brigitte Müller, Clara Weigelt, Kristina Gottschling, Denise Bargheer und Lucia Krott sowie den ehemaligen Doktorandinnen Barbara Freund, Britta Hoffzimmer, Caroline Brügelmann und dem Hahn im Korb, Alexander Bartelt, danke ich für die wunderbare Arbeitsatmosphäre im Schreibzimmer, im Labor und den einen oder anderen gelungenen Feierabend.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie danken, die immer geglaubt hat, dass ich irgendwas ganz tolles mache. Und schließlich Philipp, der mich in allen Phasen mit bewundernswerter Gelassenheit ertragen und unterstützt hat.

# EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

---

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und alle verwendeten Quellen und Hilfsmittel als solche gekennzeichnet habe.

Diese Arbeit ist zuvor in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungsbehörde zur Erlangung des Doktorgrades vorgelegt worden.

Hamburg, den 03.04.2013

Leah Eissing

# LEBENS LAUF

---

entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.