

**Die Bedeutung von erhöhter Energiezufuhr für den
Lipidstoffwechsel der Leber –
Zwischen NASH-Entwicklung und Adaption**

Dissertation

Zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften des Fachbereichs Chemie,
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
der Universität Hamburg,

vorgelegt von

Anna-Franziska Worthmann

aus Soltau

Hamburg, 2016

Druckfreigabe: 19. Dezember 2016

1. Gutachter: Prof. Dr. Markus Fischer

2. Gutachter: Prof. Dr. Jörg Heeren

Die vorliegende Arbeit wurde von August 2013 bis August 2016 extern am Institut für Biochemie und Molekulare Zellbiologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter der Leitung von Prof. Dr. Jörg Heeren angefertigt. Die Arbeit wurde von Herrn Prof. Dr. Markus Fischer am Fachbereich Chemie der Universität Hamburg betreut.

Disputation: 16. Dezember 2016

1 Wissenschaftliche Publikationen, Vorträge und Poster, die aus der Promotion hervorgegangen sind

1.1 Publikationen

1 J. F. Berbee, M. R. Boon, P. P. Khedoe, A. Bartelt, C. Schlein, A. Worthmann, S. Kooijman, G. Hoeke, I. M. Mol, C. John, C. Jung, N. Vazirpanah, L. P. Brouwers, P. L. Gordts, J. D. Esko, P. S. Hiemstra, L. M. Havekes, L. Scheja, J. Heeren, and P. C. Rensen, 'Brown Fat Activation Reduces Hypercholesterolaemia and Protects from Atherosclerosis Development', *Nat Commun*, 6 (2015), 6356

2 C. John, P. Werner, A. Worthmann, K. Wegner, K. Todter, L. Scheja, S. Rohn, J. Heeren, and M. Fischer, 'A Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry-Based Method for the Simultaneous Determination of Hydroxy Sterols and Bile Acids', *J Chromatogr A*, 1371 (2014), 184-95.

1.2 Eingereichte Manuskripte

A. Bartelt*, C. John*, N. Schaltenberg*, J. F. Berbée*, A. Worthmann*, M. L. Cherradi, C. Schlein, J. Schmidt, M. R. Boon, F. Rinninger, M. Heine, K. Toedter, A. Niemeier, S. K. Nilsson, M. Fischer, S. L. Wijers, W. van Marken Lichtenbelt, L. Scheja, P. C. Rensen and J. Heeren, 'Thermogenic adipocytes promote HDL turnover and reverse cholesterol transport'

A. Worthmann*, C. John*, M.C. Rühlemann, M. Baguhl, F.-A. Heinsen, N. Schaltenberg, M. Heine, C. Mineo, M. Fischer, M. Dandri, C. Kremoser, L. Scheja, A. Franke, P. W. Shaul, J. Heeren, 'Cold-induced bile acid synthesis shapes the gut microbiome'

* geteilte Erstautorenschaft

1.3 Vorträge auf nationalen und internationalen Kongressen

- *Brown Adipose Tissue Activation Regulates Bile Acid Metabolism and Shapes the Gut Microbiome*
2015, Keystone Symposia on: The Crossroad of Lipid Metabolism and Diabetes, Kopenhagen, Dänemark
- *Systemic control of cholesterol metabolism after BAT activation*
2015, 38th European Lipoprotein Club Meeting, Tutzing
- *Increased hepatic bile acid production shapes the gut microbiome after cold induced brown adipose tissue activation*
2015, XIX Lipid Meeting, Leipzig

- *Cold Regulated Bile Acid Synthesis Shapes the Gut Microbiome*
2016, Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie, Hamburg
- *Cold Regulated Bile Acid Synthesis Shapes the Gut Microbiome*
2016, 22nd Annual Scandinavian Atherosclerosis Conference, Humlebæk, Dänemark

1.4 Poster auf internationalen Kongressen

- *Cold-activated Brown Adipose Tissue Regulates Systemic Cholesterol Metabolism*
2014, 4th European Lipidomics Meeting, Graz, Österreich
- *Brown Adipose Tissue Activation Regulates Bile Acid Metabolism and Shapes the Gut Microbiome*
2015, Keystone Symposia on: The Crossroad of Lipid Metabolism and Diabetes, Kopenhagen, Dänemark

1	Wissenschaftliche Publikationen, Vorträge und Poster, die aus der Promotion hervorgegangen sind	I
1.1	Publikationen	I
1.2	Eingereichte Manuskripte	I
1.3	Vorträge auf nationalen und internationalen Kongressen	I
1.4	Poster auf internationalen Kongressen.....	II
Teil A	Zusammenfassung.....	1
Teil B	Abstract	3
Teil C	Einleitung.....	4
1	Lipoproteinstoffwechsel.....	4
1.1	Transport von Lipiden im Blut: Lipoproteine	4
1.2	Vaskulärer Lipoproteinstoffwechsel	5
1.3	Zentrale Organe im Lipoproteinstoffwechsel	6
1.3.1	Weißes Fettgewebe	6
1.3.2	Braunes Fettgewebe	7
2	Lipidstoffwechsel in der Leber	10
2.1	Leber im TG Stoffwechsel.....	10
2.1.1	VLDL Synthese.....	10
2.1.2	De novo Lipogenese.....	11
2.2	Die Leber im Cholesterin und Gallensäure Stoffwechsel	11
2.2.1	Cholesterin-Exkretion	12
2.2.2	Gallensäuren	12
2.2.3	Gallensäuresynthese.....	13
2.2.4	Enterohepatische Zirkulation	15
2.2.5	Wirkung von Gallensäuren auf den Stoffwechsel.....	17
3	Die Intestinale Mikrobiota	19
3.1	Die Interaktion der Mikrobiota mit Gallensäuren.....	20
3.2	Mikrobiotaänderungen im Zusammenhang mit braunem Fettgewebe.....	21
4	Nicht-alkoholische Fettleber Erkrankung	22
4.1	NAFLD Beschreibung	22

4.2	Mechanismen der NASH Entwicklung.....	22
4.2.1	Entwicklung von Steatose.....	23
4.3	Mechanismen der Leberentzündung.....	24
4.3.1	Die Rolle von Zytokinen in der Leberentzündung.....	25
4.3.2	Aktivierung des angeborenen Immunsystems.....	26
4.3.3	Regulation von TLR Signalen durch TREM-Moleküle.....	27
4.3.4	TREM1.....	28
4.3.5	TREM2.....	28
Teil D	Zielsetzung und Problemstellung der Arbeit.....	31
Teil E	Ergebnisse.....	32
1	Auswirkungen von gesteigerter Lipidzufuhr zur Leber: Die Rolle von TREM Proteinen bei der Progression von Einfacher-Steatose zu Nichtalkoholischer Steatohepatitis (NASH)	32
1.1	Die Rolle von TREM Rezeptoren für die Pathogenese von NASH im diätetischen NAFLD Modell.....	32
1.1.1	Analyse der Gewichtszunahme, Organgewichte, Glucose-Toleranz sowie Plasmalipide.....	33
1.1.2	Analyse entzündlicher Marker sowie der Lipidakkumulation in der Leber.....	35
1.2	TREM Rezeptoren in genetischem NAFLD Modell der <i>ApoE</i> - Defizienz auf <i>chow</i> -Diät.....	37
1.2.1	Analyse des Körpergewichts sowie das Plasma- und Leberlipide.....	38
1.2.2	Analyse der hepatischen Genexpression und der Fibrose in <i>ApoE</i> ^{-/-} <i>Trem1</i> ^{-/-} bzw. <i>Trem2</i> ^{-/-} - Mäusen nach Fütterung einer <i>chow</i> -Diät.....	39
1.3	Trem Rezeptoren im kombinierten NAFLD Modell aus <i>ApoE</i> -Defizienz und WTD-Fütterung.....	41
1.3.1	Analyse der Gewichtszunahme, Organgewichte und Glucose-Toleranz... ..	41
1.3.2	Analyse der Plasma- und Leberlipide sowie der Genexpression in der Leber	42
1.4	TREM2 im kombinierten CDHFD Modell aus <i>ApoE</i> -Defizienz und WTD-Fütterung.....	45
1.4.1	Analyse der Gewichtszunahme, Leberschädigung, Körper- und Organgewichte.....	45

1.4.2	Analyse der Leberlipidakkumulation, des Leberschadens und der hepatischen Genexpression.....	46
2	Auswirkungen von gesteigerter Energieaufnahme durch Adaption an einen Kälte-Reiz	49
2.1	Systemische Änderungen des Cholesterin-Stoffwechsels nach BAT Aktivierung	49
2.1.1	Postprandiale Cholesterinaufnahme nach Aktivierung des braunen Fettgewebes.....	49
2.1.2	Induktion der hepatischen Gallensäuresynthese nach Kälte-Aktivierung des BAT	50
2.1.3	Verstärkte fäkale Ausscheidung von Gallensäuren nach Kälte-Behandlung	52
2.2	Änderungen des Gallensäure-Stoffwechsels sind abhängig von Cyp7b1 und diätetischer Cholesterinzufuhr	53
2.2.1	Cyp7b1 kontrolliert Kälte-induzierte Gallensäuresynthese	53
2.2.2	Reduktion der hepatischen Cholesterinzufuhr durch Blockieren der intestinalen Cholesterinaufnahme	55
2.3	Gallensäuren modulieren das intestinale Mikrobiom nach Kälte	59
Teil F	Diskussion.....	62
1	Auswirkungen von gesteigerter Lipidzufuhr zur Leber: Die Rolle von TREM Proteinen bei der Progression von Einfacher Steatose zu Nichtalkoholischer Steatohepatitis (NASH)	62
1.1	Die Rolle von TREM Rezeptoren für die Pathogenese von NASH im diätetischen NAFLD Modell.....	62
1.2	TREM Rezeptoren in genetischem NAFLD Modell der <i>ApoE</i> - Defizienz.....	64
2	Auswirkungen von gesteigerter Energieaufnahme durch Adaption an einen Kälte-Reiz	68
2.1	Systemische Änderungen des Cholesterin-Stoffwechsels nach BAT Aktivierung	68
2.2	Änderungen des Gallensäure-Stoffwechsels sind abhängig von Cyp7b1 und diätetischer Cholesterinzufuhr	71
2.3	Gallensäuren modulieren das intestinale Mikrobiom nach Kälte	73

Teil G	Material und Methoden.....	76
1	Mausmodelle, Diäten und Interventionen.....	76
1.1	Tierhaltung und Mausmodelle	76
1.2	Diäten.....	77
1.3	Interventionen	77
1.3.1	Oraler Glucose-Toleranztest	77
1.3.2	BAT Aktivierung durch Kälte.....	77
1.3.3	Postprandiale Cholesterin-Aufnahme	77
1.3.4	Ezetimib-Behandlung.....	78
2	Genotypisierung.....	78
2.1	DNA Reinigung	78
2.2	PCR Reaktionen.....	79
3	Blut und Plasmaanalyse	80
3.1	Blutglucosemessung.....	80
3.2	Plasma-Gewinnung	80
3.3	Bestimmung von Cholesterin und Triglyzeriden im Plasma	81
3.4	Erstellung des Lipoproteinprofils mittels FPCL	81
3.5	Insulinbestimmung.....	81
3.6	Bestimmung der Transaminasen	81
4	Enzymatische Bestimmung des Gesamtlipidgehalts in Lebergewebe	81
5	Histologie.....	82
6	Genexpressionsanalyse	82
6.1	RNA-Isolation und cDNA-Synthese.....	82
6.2	Quantitative <i>real time</i> PCR.....	83
7	Semiquantitative Methode zur Bestimmung von Lipidpezies der Hauptlipidklassen via UPLC-ESI-QqTOF	83
7.1	Extraktion.....	83
7.2	UPLC-MS Methode	84
7.3	Auswertung.....	86

8	Quantitative Methode zur Bestimmung von Sterol-Derivaten mittels HPLC-ESI-QqQ	
	86	
8.1	Extraktion.....	86
8.2	HPLC-MS Methode	86
8.3	Auswertung	87
9	Mikrobiomanalytik	88
10	Statistik	88
Teil H	Literaturliste	89
Teil I	Anhang.....	108
1	Material.....	108
1.1	Verzeichnis der verwendeten Chemikalien inklusive verwendeter Gefahrstoffe nach GHS.....	108
1.2	Verzeichnis der verwendeten Kits und Reagenzien.....	114
1.3	Verzeichnis der verwendeten Puffer und Lösungen	115
1.4	Verzeichnis der verwendeten Verbrauchsmaterialien.....	117
1.5	Verzeichnis der verwendeten Arbeitsgeräte.....	118
1.6	Verzeichnis der verwendeten Software.....	119
2	Ergänzungen zum Teil E – Ergebnisse	120
Teil J	Abbildungsverzeichnis.....	121
Teil K	Tabellenverzeichnis	124
Teil L	Danksagung.....	125
Teil M	Eidesstattliche Versicherung.....	126

µg	Mikrogramm
18 F-FDG	¹⁸ F-Flourdesoxyglukose
AB	Antibiotika
ABCA1	<i>ATP-binding cassette transporter A1</i>
ABCB11	<i>ATP-binding cassette sub-family B member 11</i>
ABCB4	<i>ATP Binding Cassette Subfamily B Member 4</i>
ABCG5	<i>ATP-binding cassette transporter G5</i>
ABCG8	<i>ATP-binding cassette transporter G8</i>
ALT	Alanin-Aminotransferase
ANGPTL3	<i>angiopoietin-like protein 3</i>
ANGPTL4	<i>angiopoietin-like protein 4</i>
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
Apo	Apolipoprotein
ApoE	Apolipoprotein E
ASBT	<i>apical sodium dependent bile acid transporter</i>
AUC	<i>Area under the Curve</i>
BA	<i>Bile acid</i>
BAAT	<i>BA-CoA:amino acid N-acyltransferase</i>
BACS	BA-CoA-Synthase
BAT	<i>brown adipose tissue</i>
BHT	Butylhydroxytoluol
BMI	<i>body mass index</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
BSEP	<i>Bile salt export pump</i>
BSH	<i>bile salt hydrolase</i>
CA	<i>cholic acid</i>
cAMP	<i>cyclic Adenosinmonophosphat</i>
CBA	<i>Conjugated bile acids</i>
CCL2	<i>CC-chemokine ligand 2</i>
CDCA	<i>chenodeoxycholic acid</i>
CD 36	<i>cluster of differentiation 36</i>
CD-14	<i>cluster of differentiation 14</i>
CDHFD	Cholin-defiziente Hochfett-diät
CE	Cholesterylester
Chol	Cholesterin
ChREBP	<i>carbohydrate response element binding protein</i>
CoA	Coenzym A
COL1A1	<i>Alpha-1 type I collagen</i>
CT	Computertomographie
CXCL10	<i>C-X-C motif chemokine 10</i>
CYP27A1	<i>Sterol 27-hydroxylase</i>
CYP7A1	<i>Cholesterol-7α-hydroxylase</i>
CYP7B1	<i>Oxysterol-7α-hydroxylase</i>
CYP8B1	<i>Sterol-12-α-hydroxylase</i>
DAMPs	<i>danger associated molecular pattern</i>
DAP12	<i>DNAX-activating protein 12</i>
DCA	Deoxycholsäure
DEN	Diethylnitrosamin

DG	Diacylglyceride
dl	Deziliter
ELOVL 6	<i>Fatty Acid Elongase 6</i>
EMR1	<i>Adhesion G protein-coupled receptor E1</i>
epiWAT	epididymales weißes Fettgewebe
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	<i>extracellular-signal-regulated kinase</i>
ESI	<i>Electrospray ionization</i>
EtOH	Ethanol
EZ	Ezetimib
FA	<i>Formic acid</i>
FABP	<i>fatty acid binding proteins</i>
FC	freies Cholesterin
FGF15/19	<i>fiboblast growth factor 15/19</i>
FPLC	<i>Fast performance liquid chromatography</i>
FXR	Farnesoid X Rezeptor
g	Gramm
GCA	Glycocholsäure
GCDCA	Glycochenodeoxycholsäure
GDCA	Glycodeoxycholsäure
GF	<i>germ-free</i>
GLP-1	<i>Glucagon-like-peptide 1</i>
GPBAR1	<i>G-protein-coupled bile acid receptor 1</i>
H ₂ O a.i.	Aqua ad iniectabilia
HCC	<i>hepatocellular carcinom</i>
HDL	<i>high density lipoproteins</i>
HE	Hämatoxylin-Eosin
HFCS	Hochfett-, Cholesterin-, Sucrose Diät
HMGB1	<i>high-mobility group box 1</i>
HPLC	<i>Ultra high-performance liquid chromatography</i>
HSP70	<i>heat shock protein 70</i>
IDL	<i>intermediate density lipoproteins</i>
IL1b	<i>Interleukin-1 beta</i>
ingWAT	inguinales weißes Fettgewebe
IPA	Isopropanol
IS	Interner Standard
ITAM	Immunrezeptor Tyrosin-basiertes Aktivierungsmotiv
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
kg	Kilogramm
ko	<i>knockout</i>
l	Liter
LC	<i>Liquid chromatography</i>
LDL	<i>low density lipoproteins</i>
LDLR	LDL-Rezeptor
LPL	Lipoprotein Lipase
LRH-1	<i>liver receptor homologue</i>
LRP1	<i>LDLR-related protein 1</i>
LSEC	<i>liver sinusoidal endothelial cells</i>
Lyso-PC	Lyso-Phosphatidylcholine

m	murin
MD-2	<i>myeloid differentiation factor-2</i>
MDR2	<i>multidrug resistance protein 2</i>
MDR3	<i>multidrug resistance protein 3</i>
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minuten
min	Minuten
ml	Mililiter
MRM	<i>multiple reaction monitoring</i>
MRP3	<i>multidrug resistance-associated proteins 3</i>
MRP4	<i>multidrug resistance-associated proteins 4</i>
MS	Mass spectrometry
MTTP	<i>microsomal TG-transfer protein</i>
NAFLD	<i>non-alcoholic fatty liver disease</i>
NASH	<i>non-alcoholic steatohepatitis</i>
NF κ B	<i>nuclear-factor κB</i> ,
ng	Nanogramm
NH ₄ Ac	Ammoniumacetat
NPC1L1	<i>Niemann-Pick C 1-like 1</i>
Nr0b2	<i>Nuclear receptor subfamily 0 group B member 2</i>
NTCP	<i>Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide</i>
OGTT	Oraler Glucose-Toleranztest
OST	<i>organic solute transporter</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PC	Phosphatidylcholine
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PE	Phosphatidylethanolamine
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PGLYRP1	<i>peptidoglycan recognition protein 1</i>
PI	Phosphatidylinositole
PI3K	<i>phosphatidy-inositol 3-kinase</i>
PKA	Proteinkinase A
PL	Phospholipide
PLC γ	<i>phospholipase Cγ</i>
PRR	<i>pattern recognition receptors</i>
Q	Quadrupol
qPCR	quantitative PCR
QqQ	Tripel-Quadrupol
RCT	reverser Cholesterintransport
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SCAP	<i>SREBP cleavage activating protein</i>
SCD1	Stearoyl-CoA-Desaturase
SEM	<i>standard error of the mean</i>

SHP	<i>Small heterodimer partner</i>
SM	Sphingomyeline
SR-B1	<i>scavenger receptor-B1</i>
SREBP	<i>sterol response element binding protein 1</i>
T1	TREM1
T2	TREM2
TBE	Tris-Borat-EDTA
TCA	Taurocholsäure
TCDCA	Taurochenodeoxycholsäure
TDCA	Taurodeoxycholsäure
TG	Triglyzeride
TGF- β 1	<i>Transforming growth factor beta-1</i>
THDCA	Taurohyodeoxycholsäure
TICE	<i>trans-intestinal cholesterol excretion</i>
TIMP 1	<i>tissue inhibitor of metalloproteinases 1</i>
TLCA	Taurolithocholsäure
TLR	<i>toll-like receptor</i>
Tnfa	<i>Tumor necrosis factor-α</i>
TOF	<i>Time of flight</i>
TREM	<i>Triggering receptor expressed on myeloid cells</i>
TRL	<i>triglyceride-rich lipoproteins</i>
TUDCA	Tauroursodeoxycholsäure
T- α -MCA	Tauro- α -Muricholsäure
T- β -MCA	Tauro- β -Muricholsäure
UBA	<i>Unconjugated bile acids</i>
UCP1	<i>uncoupling protein 1</i>
UDCA	Ursodeoxycholsäure
UHR	ultra-high resolution
ÜN	über Nacht
UPLC	<i>Ultra performance liquid chromatography</i>
VLDL	<i>very low density lipoproteins</i>
WAT	<i>white adipose tissue</i>
WT	Wildtyp
WTD	Western Typ Diät
α -MCA	α -Muricholsäure
β -MCA	β -Muricholsäure
ω -MCA	ω -Muricholsäure

Teil A Zusammenfassung

Übergewicht entsteht durch ein Ungleichgewicht aus Energieaufnahme und Energieverbrauch. Neben einem Überangebot an Nahrung führt aber auch die meist sesshafte Lebensweise zur beinahe pandemischen Entwicklung von Übergewicht. Einhergehend mit Adipositas und Fettleibigkeit kommt es oftmals zur Entwicklung von Insulin-Resistenz, kardiovaskulären Erkrankungen oder der Entwicklung einer Fettleber. Ein gestörter Lipidmetabolismus trägt zur Ausprägung dieser Pathologien bei.

Die Leber ist ein zentrales Organ im Lipidstoffwechsel. Sie integriert sowohl bei Nahrungsüberschuss als auch bei Nahrungsmangel eine Verteilung von Lipiden im Organismus. Ein vermehrter Einstrom von Lipiden und Störungen des Lipidmetabolismus der Leber können zu einer ektopen Einlagerung von Fett in die Leber (Steatose) führen, welche im Folgenden die Entwicklung klinisch-relevanter Leberpathologien begünstigen kann. Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Anpassungsmechanismen in der Leber auf eine chronisch erhöhte Energieaufnahme.

Einerseits erfolgte die gesteigerte Energieaufnahme bei gleichbleibendem Energieverbrauch und ging daher mit der Entwicklung von Adipositas und Fettleber einher. Insbesondere wurde hier untersucht, welchen Einfluss das Immunantworten- modulierende Molekül TREM2 auf die Progression von einer einfachen Steatose zu einer Steatohepatitis nimmt. Hier konnte in verschiedenen Modellen gezeigt werden, dass TREM2 an der Progression beteiligt ist und, dass der Verlust dieses Moleküls insbesondere mit der verstärkten Bildung von Fibrose einherging. Ferner wurde insbesondere das Lipid Cholesterin als essentiell für die Entwicklung der Steatohepatitis identifiziert.

Andererseits wurde untersucht, wie sich eine gesteigerte Energieaufnahme bei gleichzeitiger Aktivierung des braunen Fettgewebes, also bei hohem Energieverbrauch, auf die Leber auswirkt. Da die verstärkt aufgenommenen Nahrungsbestandteile Glucose und Triglyzeride direkt im braunen Fettgewebe metabolisiert werden können, lag der Fokus hier auf dem Lipid Cholesterin, welches bei Akkumulation toxisch wirkt und zur Atherosklerose der Gefäße führt. In dieser Studie wurde gezeigt, dass in der Leber ein Mechanismus existiert, der die gesteigerte Aufnahme von Cholesterin kompensiert. Dieser Mechanismus beinhaltet die Katabolisierung von Cholesterin zu Gallensäuren und deren fäkale Exkretion. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass dieser Mechanismus einerseits abhängig von CYP7B1 und der diätetischen Zufuhr von Cholesterin ist. Die verstärkte Exkretion der Gallensäuren resultierte zudem in einer Umorganisation der intestinalen Mikrobiota, die sich positiv auf den Metabolismus auswirkt.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit nochmals die Anpassungsfähigkeit des Lipidstoffwechsels in der Leber in Abhängigkeit von der systemischen Stoffwechselsituation. Die Arbeit verdeutlicht, dass auch bei verstärkter Energiezufuhr Mechanismen im Organismus vorhanden sind, die die Akkumulation von potentiell toxischen Nahrungskomponenten, wie Cholesterin, verhindern können, falls ein erhöhter Energieverbrauch gegeben ist. Basierend auf der Erkenntnis, dass auch im Menschen aktives braunes Fettgewebe vorhanden ist, scheint die Manipulation dieser Mechanismen, durch z.B. eine Kälte- oder auch pharmakologisch-vermittelte Aktivierung, einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz für die Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen, der entzündlichen Fettlebererkrankung oder Hyperlipoproteinämie darzustellen.

Teil B Abstract

Obesity arises from an imbalance between energy intake and energy expenditure. The excess of food as well as the modern sedentary lifestyle give rise to its pandemic spread. Obesity is often accompanied by disturbances in lipid metabolism finally resulting in comorbidities such as insulin resistance, cardiovascular disease, and the development of a fatty liver.

As a pivotal organ in lipid metabolism, the liver supplies lipids to peripheral organs in times of deprivation and surplus of food. Disturbances in the lipid metabolism as well as an increased flux of lipids into the liver can cause the ectopic deposition of fat in the liver (steatosis) which can further progress to clinically- relevant liver pathologies. Aim of this study was to investigate how the liver adapts to enhanced influxes of lipids during different settings of increased energy intake.

On the one hand, energy intake was increased while energy expenditure remained the same and hence resulted in the development of obesity and fatty liver. In this setting, especially the role of TREM2 for progression of steatohepatitis was investigated. In different models we could show, that the immunomodulatory protein TREM2 is involved in NASH progression, as its loss resulted in higher fibrogenesis. Additionally, in this setting cholesterol was found to be pivotal for progression of steatohepatitis.

On the other hand, it was examined, how an increased energy intake affects the lipid metabolism in the liver, when energy expenditure is increased at the same time. This was achieved due to activation of the brown adipose tissue by cold exposure. Since dietary glucose and triglycerides can be directly metabolized by both liver and adipose tissue, we aimed to investigate the fate of cholesterol. Cholesterol is a dietary lipid which cannot be metabolized but relies on transformation into bile acid and subsequent hepatobiliary excretion. The accumulation of cholesterol is cytotoxic and promotes the development of atherosclerosis. We found, that after cold exposure the liver compensated the enhanced intake of cholesterol by increasing CYP7B1 dependent alternative bile acid synthesis. Additionally, fecal bile acid excretion was increased and the elevated bile acid levels led to beneficial changes in the intestinal microbiota.

In conclusion this study demonstrates the adaptive capacity of the liver depending on the systemic metabolic state. Even under conditions of enhanced energy intake there exist mechanisms to excrete potentially harmful dietary components such as cholesterol when energy expenditure is increased at the same time. Based on the notion, that active brown adipose tissue is present in humans, the pharmacological manipulations of these mechanisms are appealing targets for the treatment of cardiovascular diseases, fatty liver disease and hyperlipidemia.

Teil C Einleitung

1 Lipoproteinstoffwechsel

Neben Proteinen und Kohlenhydraten bilden Lipide die Hauptenergiequelle im menschlichen Organismus. Sie dienen als Energiespeicher und -versorger und sind ein wichtiger Bestandteil von Zellmembranen. Lipide übernehmen zudem Funktionen in der zellulären Signaltransduktion und wirken als Signalmoleküle, indem sie unter anderem nukleäre Rezeptoren aktivieren.

1.1 Transport von Lipiden im Blut: Lipoproteine

Während Fettsäuren an Albumin gebunden durch die Zirkulation transportiert werden können, erfolgt der Transport komplexer Lipide und lipophiler Vitamine aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften in Form von Lipoproteinen. Diese Lipoproteine bestehen neben Lipiden aus Apolipoproteinen (Apo). Apolipoproteine üben einerseits eine strukturgebende Funktion aus, fungieren andererseits aber auch als Liganden für die Aufnahme von Lipoproteinen in Zielgewebe und vermitteln deren Hydrolyse. Zusammen mit Phospholipiden (PL), Sphingomyelinen (SM) und freiem Cholesterin (FC) bilden Apolipoproteine die amphiphile Hülle der Mizellen-artigen Lipoproteine, während sich der hydrophobe Kern vorwiegend aus Triglyzeriden (TG) und Cholesterylestern (CE) zusammensetzt.

Unterschieden werden Lipoproteine einerseits anhand ihrer Dichte und Zusammensetzung. So bilden die Chylomikronen zusammen mit den *very low density lipoproteins* (VLDL) die Klasse der Triglyzerid-reichen Lipoproteine (*triglyceride-rich lipoproteins*=TRL). Zur Klasse der Cholesterin-reichen Lipoproteine werden die *low density lipoproteins* (LDL) sowie die *high density lipoproteins* (HDL) gezählt. Zudem erfolgt eine Klassifizierung basierend auf ihrem Durchmesser sowie anhand ihrer strukturgebenden Proteine. Tabelle C- 1 fasst die Eigenschaften der verschiedenen Lipoproteine zusammen.

Tabelle C- 1: Eigenschaften von Lipoproteinpartikeln

Angaben zu Dichte, Durchmesser, Apolipoprotein- und Lipidanteil der einzelnen Lipoproteinklassen (Apo=Apolipoprotein, TG=Triglyzeride, CE=Cholesterylester, FC= freies Cholesterin, PL=Phospholipide)

	Chylomikronen	VLDL	LDL	HDL
Dichte (g/ml)	<0,93	0,93-1,006	1,019-1,063	1,063-1,21
Durchmesser (nm)	75-1200	30-80	18-25	5-12
Strukturgebendes Apolipoprotein	B48	B100	B100	A1
Funktionelle Apolipoproteine	A1, AIV, CI-III, E	AV, CI-III, E, M	(E)	AII, AIV-V, CI-III, E,M
Anteil Apo (%)	~2	~8	~22	~42
Anteil TG (%)	~86	~55	~6	~4
Anteil CE, FC (%)	~5	~19	~50	~19
Anteil PL (%)	~7	~18	~22	~34

1.2 Vaskulärer Lipoproteinstoffwechsel

Grundsätzlich wird der vaskuläre Lipoproteinstoffwechsel in den exogenen und den endogenen Lipoproteinstoffwechsel sowie den HDL-Stoffwechsel unterschieden, der auch als reverser Cholesterintransport (RCT) bezeichnet wird. Während der exogene Lipoproteinstoffwechsel die postprandiale Verteilung von Lipiden veranschaulicht, beschreibt der endogene Lipoproteinstoffwechsel die Lipidversorgung des Organismus unter Nahrungskarenz.

Nach der Mahlzeit werden Nahrungslipide mit Hilfe von ins Duodenum sezernierten Gallensäuren mizelliert und dadurch für eine Prozessierung durch Lipasen zugänglich gemacht. Die Resorption der so entstandenen Spaltprodukte von Triglyzeriden und anderen Lipiden in die Mukosa erfolgt über die Fettsäuretransporter wie *cluster of differentiation 36* (CD36) oder *fatty acid binding proteins* (FABP). Diätetische Sterole werden hingegen über das Transportprotein *Niemann-Pick- C 1-like 1* (NPC1L1) in die Enterozyten aufgenommen (Altmann et al. 2004; Davis et al. 2004), wo Phytosterole nach erfolgter Sortierung direkt über *ATP-binding cassette transporter G5* und *G8* (ABCG5 und ABCG8) zurück ins Darmlumen sekretiert werden. Freies Cholesterin und die aufgenommenen Fettsäuren werden hingegen in den Enterozyten zu CE, TG und PL revereestert und im Endoplasmatischen Retikulum (ER) mit Hilfe des *microsomal TG-transfer protein* (MTTP) zusammen mit ApoB48, ApoAI, ApoAIV, ApoIV zu Chylomikronen assembliert. Nach Abgabe in intestinale Lymphgänge gelangen die Chylomikronen über in den Ductus thoracicus in den Blutkreislauf. Im endogenen Lipidstoffwechsel werden die Triglyzerid-reichen VLDL von der Leber gebildet, welche ApoB100 als Strukturprotein besitzen (siehe Teil C2.1.1). Sowohl Chylomikronen als auch VLDL Partikel nehmen in der Zirkulation ApoCII von HDL-Partikeln auf. ApoCII als essentieller Kofaktor reguliert zusammen mit modulatorisch-wirkenden ApoAV, *angiopoietin-like proteins 3* und *4* (ANGPTL3 und ANGPTL4) die Aktivität der endothelständigen Lipoprotein-Lipase (LPL) (Schaap et al. 2004; Merkel et al. 2005; Nilsson et al. 2011; Nilsson et al. 2012). Diese hydrolysiert die TG der TRL Partikel und freigesetzte Fettsäuren werden anschließend von den peripheren Geweben (Muskel und Fettgewebe) insbesondere über CD36 aufgenommen. Während der Lipolyse kommt es erneut zum Austausch von Apolipoproteinen und Lipiden zwischen TRL und HDL. Während HDL ApoE auf TRL übertrage3erhalten sie von den TRL ApoAI, ApoIV, ApoC und vor allem PL. Die nun TG-armen und CE-reichen sogenannten TRL-*Remnant* Partikel werden von der Leber aus der Zirkulation entfernt. Die Aufnahme der *Remnants* in die Leber erfolgt über Rezeptor-vermittelte Endocytose. Hierbei bindet ApoE an den LDL-Rezeptor (LDLR) (Brown et al. 1981; Brown and Goldstein 1986) oder den *LDLR-related protein 1* (LRP1) (Herz et al. 1988; Beisiegel et al. 1989; Rohmann et al. 1998). Alternativ können VLDL-*Remnants* auch von der hepatischen Lipase zu *intermediate density lipoproteins* (IDL) hydrolysiert werden. Unter

Verlust von ApoE an HDL-Partikel reifen diese zu LDL, die nun lediglich ApoB100 enthalten. Verglichen mit den anderen Lipoproteinen enthalten LDL am meisten Cholesterin und transportieren dieses zu peripheren Organen, wo es als Membranbestandteil oder zur Synthese von Steroidhormonen verwendet wird. Über Ligandation des LDLR mit ApoB100 werden LDL in die Zellen aufgenommen und das aufgenommene Cholesterin reguliert dort im Folgenden die zelluläre Cholesterinhomeostase. Der Abtransport von überschüssigem Cholesterin aus der Peripherie wird als reverser Cholesterintransport bezeichnet und wird vorwiegend über den Transport mittels HDL bewältigt. HDL Vorstufen werden von der Leber und vom Darm gebildet und enthalten ApoAI. Außerdem können sie bei der Hydrolyse von TRL als sogenannte *surface remnants* entstehen (Eisenberg and Olivecrona 1979). Der Efflux von freiem Cholesterin aus peripheren Zellen oder Makrophagen auf HDL Partikel erfolgt über *ATP-binding cassette transporter A1* (ABCA1) (Wang and Tall 2003). Durch die Einwirkung der Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT), die die Reaktion von Cholesterin und Phosphatidylcholin (PC) zu CE und Lysophosphatidylcholin (LPC) katalysiert, nimmt der Gehalt an CE innerhalb der HDL Partikel zu. Über den *scavenger receptor-BI* (SR-B1) werden die CE der HDL schließlich selektiv in die Leber aufgenommen (Acton et al. 1996), wo Cholesterin dann direkt oder nach Umwandlung in Gallensäuren über die hepatobiliäre Route fäkal ausgeschieden werden kann.

1.3 Zentrale Organe im Lipoproteinstoffwechsel

Neben der Leber, deren Funktion im Lipid- und Lipoproteinstoffwechsel in Teil C2 noch näher beleuchtet werden soll, sind vor allem die Muskeln und die Fettgewebe von zentraler Bedeutung für den Lipoproteinstoffwechsel. Beide Gewebe exprimieren die LPL und können nach TRL-Hydrolyse Fettsäuren zur Energieversorgung (im Falle des Muskels und des braunen Fettgewebes) sowie zur Energiespeicherung (im Falle der Fettgewebe) aufnehmen. Das Muskelgewebe ist für die vorliegende Arbeit von nebensächlicher Bedeutung und wurde nur der Vollständigkeit halber genannt.

1.3.1 Weißes Fettgewebe

Das weiße Fettgewebe dient hauptsächlich als Energiespeicher. Nach Aufnahme von Fettsäuren werden diese wieder zu TG verestert und in unilokulären Lipidtröpfchen gespeichert. In Zeiten der Nahrungskarenz werden diese gespeicherten Triglyzeride hydrolysiert und die entstehenden freien Fettsäuren in die Zirkulation abgegeben. Auf diesem Wege gelangen sie zur Leber und werden dort nach Umwandlung in TG in VLDL Partikel inkorporiert und sekretiert, um die Energieversorgung im gefasteten Zustand zu gewährleisten. Neben seiner Rolle in der Energiehomeostase ist das weiße Fettgewebe zudem ein wichtiges endokrines Organ. So kann es durch die Produktion von Adipokinen (z.B. Adiponektin und Leptin) zur Regulation des Stoffwechsels beitragen (Rosen and Spiegelman 2014). Einer Studie der NCD Risk Factor Collaboration zufolge (2016), stieg der Anteil übergewichtiger Menschen,

gemessen am *body mass index* (BMI) in den letzten 30 Jahren stark an. Bedingt durch Überernährung und Bewegungsmangel kommt es zur Hypertrophie und Hyperplasie von Adipozyten und einem Umbau des Fettgewebes, der unter anderem durch Einwanderung von Makrophagen in das Gewebe charakterisiert ist (Rosen and Spiegelman 2014). In Folge dessen werden insbesondere pro-inflammatorische Zytokine, wie *tumor necrosis factor- α* (TNF- α), im Fettgewebe produziert (Olefsky and Glass 2010), welches direkt an der Entstehung von Insulinresistenz beteiligt ist (Hotamisligil et al. 1993). Neben der Insulinresistenz ist Übergewicht aber auch mit der Entstehung von Bluthochdruck, kardiovaskulären Erkrankungen, der entzündlichen Fettlebererkrankung und Krebs assoziiert (Hotamisligil 2006).

1.3.2 Braunes Fettgewebe

Neben dem weißen Fettgewebe spielt vor allen Dingen das braune Fettgewebe (*brown adipose tissue*= BAT) eine wichtige Rolle für den Lipoproteinstoffwechsel (Bartelt et al. 2011). Als Wärme-produzierendes Organ ermöglicht das braune Fettgewebe einzig den Säugetieren die Aufrechterhaltung der Körpertemperatur bei Kältestress, wie zum Beispiel bei Winterschlaf oder peri- und postnatal. Die Existenz von aktivem BAT in Nagetieren und Neugeborenen ist hinlänglich bekannt (Cannon and Nedergaard 2004). Mit der Erkenntnis, dass aktives BAT auch im adulten Menschen existiert (Cypess et al. 2009; Saito et al. 2009; van Marken Lichtenbelt et al. 2009; Virtanen et al. 2009; Zingaretti et al. 2009) erlebte die BAT Forschung eine Renaissance und die Hoffnungen aktives BAT zur Therapie von metabolischen Erkrankungen zu nutzen, wurde bestärkt. Klassisches braunes Fettgewebe ist stark sympathisch innerviert und vaskularisiert. Im Gegensatz zum weißen Fettgewebe enthalten Adipozyten des BAT multilokuläre Lipidtröpfchen. Aufgrund der hohen Dichte an Mitochondrien erscheinen die Adipozyten braun, worin auch der Name des Gewebes begründet ist. Braune Adipozyten zeichnen sich insbesondere durch eine hohe Produktion von *uncoupling protein 1* (UCP1) aus, welches in der inneren Mitochondrien Membran lokalisiert ist und die zitterfreie Thermogenese ermöglicht (Cannon and Nedergaard 2004). Neben den klassischen braunen Adipozyten gibt es sogenannte beige Adipozyten. Diese manchmal auch *brite* (*brown-in-white*) genannten Adipozyten sind Mitochondrien-reiche Zellen mit multilokulären Lipidtröpfchen, (Bartelt and Heeren 2014) die sich durch eine signifikant erhöhte Expression von UCP1 auszeichnen und im weißen Fettgewebe lokalisiert sind (Nedergaard and Cannon 2014). Man geht davon aus, dass beige Fettzellen sowohl aus Vorläufer Zellen heranreifen können (Schulz et al. 2011; Lee et al. 2012; Wu et al. 2012), aber auch durch Transdifferenzierung aus weißen Adipozyten entstehen können (Barbatelli et al. 2010; Rosenwald et al. 2013). Die Umwandlung von weißem in thermogenes Fettgewebe durch das vermehrte Auftreten beiger Adipozyten wird als *browning* bezeichnet.

Das braune Fettgewebe wird am effektivsten zentral über das sympathische Nervensystem aktiviert. Neben der Stimulation von Thermorezeptoren durch Kälte kann auch die Einnahme einer fettreichen Mahlzeit *per se* oder eine erhöhte Konzentration von z.B. Leptin final in der sympathischen Freisetzung von Noradrenalin resultieren. Die Bindung von Noradrenalin an β_3 -adrenerge Rezeptoren auf braunen Fettzellen stimuliert eine G_s -Protein vermittelte intrazelluläre Signalkaskade, die durch Aktivierung der Adenylatzyklase zu einem Anstieg der zellulärem cAMP-Spiegel führt und letztendlich in einer aktiven Proteinkinase A (PKA) resultiert.

In der Folge aktiviert die PKA einerseits *mitogen-activated protein kinases* (MAPK), welche nachfolgend verschiedene Transkriptionsfaktoren phosphorylieren kann. Neben dem *cAMP - response element binding protein* (CREB) wird auch der cAMP-abhängige Transkriptionsfaktor ATF-2 durch MAPK phosphoryliert. ATF-2 reguliert die Expression von UCP1 selbst sowie die Expression von *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha* (*Pgc1 α*) (Cao et al. 2004). PGC1 α ist eines der wichtigsten Regulatoren der zitterfreien Thermogenese, da es neben der Expression von UCP1 viele Enzyme der mitochondrialen Atmungskette reguliert (Puigserver et al. 1998). CREB reguliert die Expression von *type 2 iodothyronine deiodinase* (DIO2), welches die Umwandlung von inaktivem Thyroxin (T₄) in aktives Triiod-L-thyronin (T₃) katalysiert. Über Bindung von T₃ an den Thyroid-Hormon Rezeptor im UCP1-Promotor resultiert auch dies letztendlich in gesteigerter UCP1 Expression (Bartelt and Heeren 2014). Andererseits stimuliert die PKA aber auch die Lipolyse. Parallel zur inaktivierenden Phosphorylierung von Perilipin werden die Hormonsensitive Lipase (HSL) und die Adipozyten-Triglyzerid Lipase (ATGL) aktiviert und so Fettsäuren aus gespeicherten Triglyzeriden freigesetzt. Die freigesetzten Fettsäuren aktivieren einerseits UCP1 (Fedorenko et al. 2012) und ermöglichen so die Entkopplung der Elektronentransportkette von der ATP-Synthese und damit die Wärmeproduktion. Zum anderen werden die Fettsäuren in der β -Oxidation für die Generation von Reduktionsäquivalenten benötigt, welche anschließend in der Atmungskette zur Herstellung des Protonengradienten und letztlich für die UCP1-abhängige Wärmeproduktion genutzt werden können (Cannon and Nedergaard 2004). Neuere Studien liefern außerdem Hinweise für eine UCP1-unabhängige Thermogenese (Kazak et al. 2015; Long et al. 2016). Die Aktivierung des braunen Fettgewebes wird zudem auch über pharmakologische Stimulation des β_3 -adrenergen Rezeptors durch z.B. CL316248 erreicht. Aber auch endokrine Faktoren sind in der Lage das braune Fettgewebe zu aktivieren. So wurde gezeigt, dass Schilddrüsenhormone, Mitglieder der Familie der *bone morphogenetic proteins* (BMP) sowie der *fibroblast growth factors* (FGF) (Heeren and Munzberg 2013) oder das vom Muskel sekretierte Protein Irisin *browning* stimulieren können (Bostrom et al. 2012). Über die

Aktivierung von DIO2 sind auch Gallensäuren in der Lage, den Energieverbrauch im BAT zu stimulieren (Watanabe et al. 2006).

Als therapeutisches Target für die Behandlung von Übergewichts-assoziierten Erkrankungen ist das BAT insbesondere deswegen so attraktiv, weil es metabolisch hochaktiv ist. So konnte gezeigt werden, dass aktives braunes Fettgewebe nach oraler Verabreichung selbst in adipösen Mäusen große Mengen Glucose aufnehmen und damit aus der Zirkulation entfernen kann (Bartelt et al. 2011). Weiterhin erhöht die Transplantation von braunem Fettgewebe die Glucose-Toleranz der Empfänger-Mäuse und hebt sogar Diät-induzierte Insulinresistenz auf (Stanford et al. 2013). Von besonderer Wichtigkeit ist das braune Fettgewebe auch für den Lipidstoffwechsel. Aktiviertes braunes Fettgewebe nimmt neben Fettsäuren auch ganze TRL Partikel auf und normalisiert dadurch, nach nur 24- stündiger Aktivierung, Hypertriglyzeridämie in ApoAV-defizienten Mäusen (Bartelt et al. 2011). Übergewicht geht neben Hyperglykämie und Hyperlipidämie oft mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von kardiovaskulären Komplikationen einher. Auch hier gibt es Hinweise, dass aktiviertes BAT eine vielversprechende Therapieoption darstellt. In Mäusen mit einem humanisiertem Lipoproteinprofil schützte die Aktivierung des BAT vor Artherosklerose (Berbee et al. 2015). Zudem konnte gezeigt werden, dass BAT Aktivität einen starken Einfluss auf die Gewichtsentwicklung in Mäusen hat. So führte UCP1-Defizienz unter Bedingungen der Thermoneutralität durch den Verlust der Diät-induzierten Thermogenese zu Gewichtszunahme und die genetische Ablation von BAT zur Entwicklung von Übergewicht (Lowell et al. 1993; Feldmann et al. 2009). Auch im Menschen konnte gezeigt werden, dass BAT Aktivität invers mit BMI und Alter korreliert (Saito et al. 2009; Pfannenberg et al. 2010). Wie auch in Mäusen führte hier sowohl Kälte-Exposition als auch die Einnahme eines Capsinoids zur Rekrutierung von BAT und erhöhte den Energieumsatz (van der Lans et al. 2013; Yoneshiro et al. 2013). Auch nach Gabe des β_3 -adrenergen Rezeptoragonisten Mirabegron sowie nach Gabe von Chenodeoxycholsäure (CDCA) konnte in kombinierten Positronen-Emissions-Tomographie/ Computertomographie (PET/CT) Scans eine gesteigerte Aufnahme von ^{18}F -Fluordesoxyglucose (^{18}F -FDG) in den Nacken- und Schulterbereich (humane BAT-Regionen) beobachtet werden (Broeders et al. 2015; Cypess et al. 2015). Diese Studien unterstreichen das Potential von aktivem BAT zur Therapie von Übergewicht und assoziierten Erkrankungen.

2 Lipidstoffwechsel in der Leber

Die Leber ist eines der größten Organe im Körper und besteht zu ungefähr 60-70% aus Parenchymzellen, den Hepatozyten. Hepatozyten sind die Stoffwechsel-aktiven Zellen in der Leber und weisen ihrer Lokalisation bedingt eine funktionelle Heterogenität auf. Während

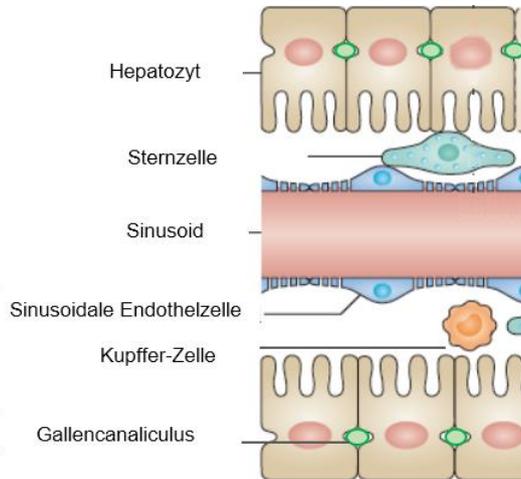


Abbildung C- 1: Schematischer Aufbau eines Leber Sinusoids adaptiert nach Pellicoro et al. 2014

periportale Hepatozyten sich durch Glykogenabbau, Gluconeogenese, Fettsäureoxidation und Gallensäureausscheidung auszeichnen, finden in den perivenösen Hepatozyten vor allem Glykogensynthese, Glykolyse, Lipogenese und Biotransformation von Xenobiotika statt. Zudem enthält die Leber die Gallengangs-bildenden Cholangiozyten.

Etwa 20 % der Leber bestehen aus nicht-parenchymalen Zellen, wobei hier die Leber-sinusoidalen Endothelzellen (*liver sinusoidal endothelial cells* =LSEC) den größten Teil ausmachen. LSEC bilden das gefensterete Endothel, die sogenannten Sinusoide. Neben den Sternzellen, die nach Leberschädigung für fibrotische Prozesse verantwortlich sind, verfügt die Leber auch über Leber-ansässige Makrophagen, die sogenannten Kupfferzellen. Auch Lymphozyten, wie T- und B-Zellen, sowie Antigen-präsentierende Zellen wie dendritische Zellen, können in der Leber gefunden werden. Der schematische Aufbau der Leber ist in Abbildung C- 1 dargestellt.

Im Lipidstoffwechsel nimmt die Leber eine zentrale Rolle ein. Einerseits kann sie aufgenommene oder *de novo* synthetisierte Fettsäuren reverestern und als VLDL Partikel sezernieren. Andererseits ist die Leber zentrales Organ für die Aufnahme von Lipoproteinen (siehe Teil C1.2) und die Cholesterinhomöostase.

2.1 Leber im TG Stoffwechsel

2.1.1 VLDL Synthese

In der Leber hergestellte VLDL Partikel besitzen als Strukturprotein das ApoB₁₀₀, welches essentiell für deren Synthese ist. Mutationen und oder andere Pathologien, die in falsch gefaltetem oder nicht Lipid-bindendem ApoB₁₀₀ resultieren, führen zur vorzeitigem Abbau von ApoB₁₀₀ und dem Abbruch der VLDL Synthese (Sundaram and Yao 2010). TG und CE werden mit Hilfe des MTTP in ER-Lumen transportiert, wo sie dann auf ApoB₁₀₀ übertragen werden. Über den Golgi Apparat, wo sie durch Lipidierung und Aufnahme anderer Apolipoproteine wie ApoE weiter heranreifen, werden die reifen VLDL schließlich sekretiert (Mensenkamp et al. 2001). Neben ApoB und MTTP beeinflussen weitere Faktoren die VLDL

Synthese. So konnte gezeigt werden, dass die VLDL Sekretion in ApoE defizienten *chow*-gefütterten Mäusen sowie primären Hepatozyten herabgesetzt ist (Mensenkamp et al. 2001) und ApoE^{-/-}-Mäuse folglich eine Steatose entwickeln (Bartelt et al. 2011; Schierwagen et al. 2015). Dem gegenüber fanden Gusarova et al. keine herabgesetzte VLDL Sekretion in Ratten-Hepatomzellen, in denen die ApoE-Synthese gehemmt war (Gusarova et al. 2007). Auch die Verfügbarkeit von insbesondere Phosphatidylcholin wirkt sich auf die VLDL Sekretion aus. Defekte in der Phosphatidylcholin-Synthese sind mit herabgesetzter VLDL Sekretion und der Entwicklung einer Fettleber verbunden (Noga et al. 2002; Jacobs et al. 2004; Jacobs et al. 2008). Ein nicht zu unterschätzender Faktor für die Synthese- und Sekretionsrate von VLDL ist die Verfügbarkeit von Substrat in Form von TG. Quellen für hepatische TG sind einerseits aufgenommene Chylomikronen- und VLDL- *Remnants*, sowie aus der Zirkulation aufgenommene freie Fettsäuren (z.B. aus dem Fettgewebe), die in den Hepatozyten zu TG verestert werden, andererseits aber auch *de novo* synthetisierte Fettsäuren. (siehe Teil C2.1.2) (Choi and Ginsberg 2011).

2.1.2 De novo Lipogenese

Überschüssige Glucose kann in der Leber außer in Form von Glykogen auch in Form von Fettsäuren gespeichert werden. Die *de novo* Lipogenese beschreibt die Synthese von Fettsäuren aus Nichtlipidvorstufen, wie z.B. Abbauprodukten der Glucose. Neben der Leber können auch Fettgewebe auf diesem Wege Fettsäuren herstellen. Das in der Glykolyse entstehende Pyruvat wird nach dem Transport in die Mitochondrien zunächst durch eine dehydrierende Decarboxylierung in Acetyl-CoenzymA (CoA) umgewandelt. Katalysiert durch die Citratsynthase reagiert dieses zusammen mit Oxalacetat unter Bildung von Citrat. Im Folgenden erfolgt über den Citrat/Malat-Carrier eine Abgabe von Citrat ins Cytosol, wo dieses durch Einwirkung der ATP-Citratlyase wieder in Oxalacetat und Acetyl-CoA gespalten wird. Dieses Acetyl-CoA wird schließlich als Substrat für die Fettsäuresynthase (FASN) zur Generierung von Fettsäuren verwendet. Neben der FASN tragen verschiedene Elongasen (z.B. *Fatty Acid Elongase 6*= ELOVL6) und die Stearoyl-CoA-Desaturase (SCD1) zur Fettsäuresynthese bei. Die wichtigsten Transkriptionsfaktoren, die die DNL regulieren sind das *sterol response element binding protein 1-c* (SREBP-1c) und das *carbohydrate response element binding protein* (ChREBP). Während SREBP-1c Insulin-abhängig induziert wird und so die lipogene Wirkung von Insulin in der Leber mediiert (Foretz et al. 1999), ist die Wirkung von ChREBP Insulin-unabhängig. Aktivierend dephosphoryliert wird ChREBP in Abhängigkeit der aufgenommenen Glucosemenge (Yamashita et al. 2001; Uyeda and Repa 2006).

2.2 Die Leber im Cholesterin und Gallensäure Stoffwechsel

Cholesterin ist ein wichtiger Bestandteil von Membranstrukturen und für deren Organisation und somit für intra- und extrazelluläre Transport- und Signalwege unerlässlich. Es dient als

Substrat für die Synthese von Steroidhormonen, Vitamin D und Gallensäuren. Eine gestörte Homöostase von Cholesterin führt zur Entstehung von chronischen Erkrankungen, wobei die Ablagerung von Cholesterin in Gefäßen mit der Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen verbunden ist. Neben der diätetischen Aufnahme von Cholesterin, kann Cholesterin auch in jeder Zelle des Organismus hergestellt werden. Über LDLR-vermittelte Aufnahme von ApoB100-haltigen LDL Partikeln werden periphere Zellen mit Cholesterin versorgt. Darüber hinaus ist die zelluläre Cholesterinhomöostase streng reguliert und die dafür wichtigsten Transkriptionsfaktoren sind die SREBP1 und 2. Zusammen mit dem SREBP *cleavage activating protein* (SCAP) bilden sie einen Komplex, wobei eine Transmembrandomäne von SCAP als Sterol-Sensor fungiert. Bei hohen Cholesterin-Konzentrationen wird der SREBP-SCAP Komplex am ER zurückgehalten. Sinkt die zelluläre Cholesterin-Konzentration allerdings ab, verlässt SREBP das ER, wird proteolytisch gespalten und kann im Folgenden die Transkription des LDLR oder der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase), des Schlüsselenzyms der Cholesterinsynthese, initiieren (Goldstein et al. 2006). Die Ausscheidung von überschüssigem Cholesterin in peripheren Geweben erfolgt primär über den ABCA1- und ABCG1-vermittelten Efflux von Cholesterin auf HDL Partikel (Maxfield and Tabas 2005).

2.2.1 Cholesterin-Exkretion

Anders als Glucose und Triglyzeride kann Cholesterin weder zur Energiegewinnung genutzt noch vollständig abgebaut werden, weswegen überschüssiges Cholesterin hepatobiliär ausgeschieden wird. Bei diesem Prozess übernimmt die Leber eine zentrale Rolle. Nach Aufnahme von Cholesterin aus TRL-Remnants und HDL wird dieses dort in Gallensäuren umgewandelt, welche anschließend in die Galle sekretiert und fäkal ausgeschieden werden. Ein geringer Anteil von Cholesterin kann zudem ABCG5- und ABCG8- abhängig direkt in die Galle abgegeben werden. Daneben gibt es Hinweise dafür, dass in Mäusen eine Cholesterin Ausscheidung auch direkt, im sogenannten *trans-intestinal cholesterol excretion* (TICE) erfolgen kann (van der Velde et al. 2007; van der Velde et al. 2008; van der Veen et al. 2009). Obwohl der molekulare Mechanismus des TICE noch nicht im Detail verstanden ist, geht man davon aus, dass sowohl HDL als auch ApoB-haltige Lipoproteine Cholesterin auf der basolateralen Seite an die Enterozyten übertragen. Dieses wird anschließend apikal über ABCG5 und ABCG8 ins Lumen abgegeben und somit ausgeschieden (Jakulj et al. 2013).

Da der Fokus dieser Arbeit auf dem Lipidstoffwechsel der Leber liegt, wird im Folgenden die hepatobiliäre Ausscheidung des Cholesterins und der damit verbundene Gallensäure-Stoffwechsel näher beleuchtet. **Gallensäuren**

Gallensäuren sind amphiphile Sterolderivate, die in der Leber aus Cholesterin synthetisiert werden. Neben Phospholipiden, Cholesterin und Bilirubin sind sie der größte Bestandteil der Gallenflüssigkeit (Thomas et al. 2008). Gallensäuren übernehmen im Lipidstoffwechsel

verschiedene Funktionen. Zum einem ermöglichen sie im Darm die Bildung von Mizellen und sind somit essentiell für die Aufnahme von Nahrungslipiden und lipophilen Vitaminen. Zum anderen bildet die hepatische Umwandlung von Cholesterin in Gallensäuren und deren anschließende fäkale Exkretion den Hauptausscheidungsweg von Cholesterin. In der Gallenblase mizellieren Gallensäuren darüber hinaus Cholesterin und verhindern so die Bildung von Gallensteinen. Eine weitere wichtige Rolle übernehmen Gallensäuren durch ihre Eigenschaften als systemische Signalmoleküle. Über Bindung an Rezeptoren wie den Farnesoid X Rezeptor (FXR, kodiert durch *Nr1h4*) können sie Prozesse im Glucose-, Lipid- und Energiestoffwechsel steuern (de Aguiar Vallim et al. 2013). Täglich werden in der humanen Leber ca. 500 mg Gallensäuren aus Cholesterin hergestellt und in die Galle abgegeben. Postprandial gelangen die Gallensäuren ins Darmlumen und sind dort an der Lipidverdauung beteiligt. Im Rahmen der enterohepatischen Zirkulation werden ca. 95% der Gallensäuren aus dem Darm rückresorbiert und zurück zur Leber transportiert. Der fäkale Verlust dieser restlichen 5 % wird durch hepatische Synthese von Gallensäuren kompensiert und bestimmt somit den Cholesterin-Umsatz (Kuipers et al. 2014).

2.2.3 Gallensäuresynthese

An der Synthese von Gallensäuren (*bile acids*= BA) aus Cholesterin sind 17 vorwiegend in der Leber exprimierte Enzyme beteiligt (Abbildung C- 2). Prinzipiell ist die Gallensäuresynthese ein mehrstufiger Prozess, der die Modifikation der Ringstruktur von Cholesterin, weitere Oxidationsschritte und die Verkürzung der Seitenketten sowie eine anschließende Konjugation mit Aminosäuren beinhaltet (Russell 2003). Unterschieden wird zudem in einen klassischen und einen alternativen oder auch sauren Gallensäuresyntheseweg. Es konnte gezeigt werden, dass das Enzym Cholesterol-7 α -Hydroxylase (CYP7A1) das erste und Geschwindigkeits-bestimmende Enzym im klassischen Gallensäuresyntheseweg darstellt. CYP7A1 katalysiert die 7 α -Hydroxylierung von Cholesterin und führt folglich zur Bildung von 7 α -Hydroxycholesterin. Mäuse mit *Cyp7a1*-Defizienz haben eine gestörte intestinale Lipid- und Vitaminresorption was sich in erhöhter perinataler Sterblichkeit äußert. Ebenso haben diese Mäuse einen um 75% verringerten Gallensäurepool (Ishibashi et al. 1996; Schwarz et al. 1996). Der alternative Gallensäuresyntheseweg beginnt mit der Hydroxylierung der Seitenkette. Neben der Produktion von 24- und 25-Hydroxycholesterin kommt es hauptsächlich zur Produktion von 27-Hydroxycholesterin, welche durch das Enzym Sterol 27-hydroxylase (CYP27A1) katalysiert wird und auch in extrahepatischen Geweben, wie der Lunge und im Gehirn stattfinden kann (Bjorkhem et al. 2010). Das Enzym Oxysterol-7 α -Hydroxylase (CYP7B1) katalysiert im Folgenden die für die Gallensäuresynthese unerlässliche 7 α -Hydroxylierung des Sterolrings. Eine *Cyp7b1*-Defizienz resultiert in Mäusen in erhöhten 25- und 27-Hydroxycholesterin und erhöhter CYP7A1 Aktivität (Li-Hawkins et al. 2000). Man nimmt an, dass der Oxysterol-CYP7B1 Syntheseweg zu ungefähr 25-30% zum

Gallensäurepool beiträgt (Russell 2003). Nach weiterer Modifikation der Ringstruktur kommt es zur Generation von 4-Cholesten-7- α -ol-3-on. Durch Einwirkung der Sterol-12- α -Hydroxylase (CYP8B1) und nachfolgenden Oxidationsschritten wird aus 4-Cholesten-7 α -ol-3-on schließlich die primäre BA Cholsäure (*cholic acid* =CA) gebildet. Ohne Einwirkung von CYP8B1 werden ebenfalls nach weiterer Modifikation die primären Gallensäuren Chenodeoxycholsäure

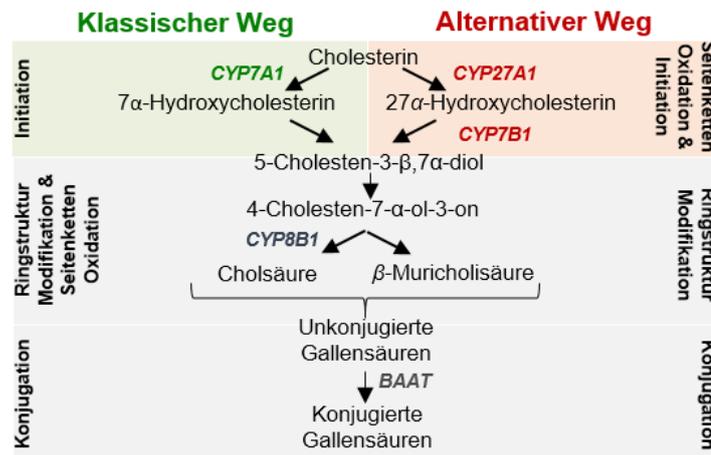


Abbildung C- 2: Gallensäuresynthesewege

Die hepatische Gallensäuresynthese erfolgt über den klassischen (grün hinterlegt) oder den alternativen Weg (rot hinterlegt). Während im alternativen Weg zunächst durch Einwirkung der Sterol-27-hydroxylase (CYP27A1) Hydroxysterole gebildet werden und damit die Seitenketten oxidiert werden, bevor es Oxysterol-7 α -Hydroxylase (CYP7B1)-abhängig zur Initiation kommt, katalysiert Cholesterol-7 α -Hydroxylase (CYP7A1) im klassischen Weg direkt die Initiation. Über mehrere Zwischenschritte kommt es zur Modifikation der Ringstruktur und schließlich zur Bildung von primären Gallensäuren. Sofern dies Sterol-12- α -Hydroxylase (CYP8B1)-abhängig geschieht, kommt es zur Synthese von Cholsäure andernfalls wird β -Muricholsäure hergestellt. Im letzten Schritt werden die unkonjugierten Gallensäuren durch das Enzym BA-CoA:amino acid *N*-acyltransferase (BAAT) mit dem Aminosäuren Glycin oder Taurin konjugiert. Diese Darstellung ist stark vereinfacht und angelehnt an Thomas et al. 2008 dargestellt.

(*chenodeoxycholic acid* = CDCA, im Menschen) sowie α - oder β -Muricholsäure (*muricholic acid* = MCA, in der Maus) gebildet. Während CYP7A1 also die Menge an Gallensäuren bestimmt, determiniert CYP7B1 die Gallensäure-zusammensetzung (Pandak et al. 2001; Li-Hawkins et al. 2002). Die Position und Anzahl der Hydroxyl-gruppen bestimmt neben der Löslichkeit auch die Hydrophobizität der Gallen-säuren und damit ihre Affinität zur Bindung an nukleäre Rezeptoren. Von CDCA über CA nach MCA nimmt die Hydrophobizität der Gallen-säuren ab. Hydrophile Gallensäuren sind weniger toxisch, fördern den Gallefluss und beein-trächtigen zudem die intestinale Cholesterinaufnahme (Thomas et al. 2008).

Den finalen Schritt der Gallensäuresynthese bildet die Konjugation der unkonjugierten Gallen-säuren (*unconjugated bile acids*= UBA) mit Aminosäuren. In einem zweistufigen Prozess wird zunächst durch die BA-CoA-Synthase (BACS) eine aktivierte BA gebildet (Shonsey et al. 2005). Diese wird im Folgenden durch die *bile acid coenzyme A:aminoacid N-acyl-transferase* (BAAT) mit Glycin (im Menschen) oder Taurin (in der Maus) amidiert und

resultiert in der Bildung von konjugierten Gallensäuren (*conjugated bile acids*= CBA). Die BAAT arbeitet dabei sehr effizient, ca. 98% aller Gallensäuren werden konjugiert. Die Konjugation senkt den pKA-Wert der Gallensäuren und erhöht dadurch deren Hydrophilie und Löslichkeit. So wird sichergestellt, dass die Gallensäuren ionisiert als Gallensalz vorliegen. Zudem schützt die Konjugation vor der starken Detergenz-Wirkung von freien Gallensäuren und verhindert deren ungehinderte Diffusion durch Membranen. Dies hat zur Folge, dass für den Membrantransport von Gallensäuren spezielle Transporterproteine benötigt werden (Russell 2003).

2.2.4 Enterohepatische Zirkulation

Um an unterschiedlichen Wirkorten physiologische Funktionen zu erfüllen, zirkulieren Gallensäuren in einem Kreislauf zwischen Leber, Gallenblase und Darm. Dieser Prozess wird als enterohepatische Zirkulation bezeichnet (Abbildung C- 3) und ermöglicht dem Organismus die Aufrechterhaltung wichtiger Gastrointestinaler Funktionen, wie z.B. den Gallefluss, die Solubilisierung und Exkretion von Cholesterin und die intestinale Aufnahme von Lipiden. In Abhängigkeit ihres Wirkortes beeinträchtigen Gallensäuren zudem den Metabolismus und üben antimikrobielle Effekte aus (Hofmann 2009). Wie häufig der Gallensäurepool (im Menschen ca. 2-4 g) täglich diesen Kreislauf passiert, ist abhängig von der Nahrungsaufnahme (Kuipers et al. 2014). Nur ca. 5% der Gallensäuren entkommen der intestinalen Wiederaufnahme und werden mit den Fäzes ausgeschieden. Da ihre Herstellung sehr aufwendig ist und 17 Enzyme erfordert, werden die Gallensäuren auf diese Weise einerseits effizient recycelt, andererseits erfordert die enterohepatische Zirkulation effektive Transportmechanismen (Love and Dawson 1998). Nach ihrer Synthese in den Hepatozyten werden CBA mit Hilfe der *bile salt export pump* (BSEP, codiert durch *Abcb11*) in einem ATP-abhängigen Prozess durch die Membran der Gallengangskanälchen (-Canaliculi) transportiert und so exkretiert (Gerloff et al. 1998). Auch die anderen Bestandteile der Galle werden in einem Energie-verbrauchenden, aktiven Transport in die Galle sekretiert, wobei Phospholipide durch *multidrug resistance protein 3* (MDR3 in Menschen, MDR2 in Nagetieren, codiert von *ATP Binding Cassette Subfamily B Member 4* =ABCB4) und Cholesterin mit Hilfe von ABCG5 und ABCG8 abgegeben werden. Letztendlich werden die verschiedenen Gallebestandteile in der Gallenblase als gemischte Mizellen gespeichert. Überflüssige Gallensäuren können alternativ zum Schutz der Hepatozyten auch basolateral zurück ins sinusoidale Blut abgegeben und anschließend renal ausgeschieden werden.

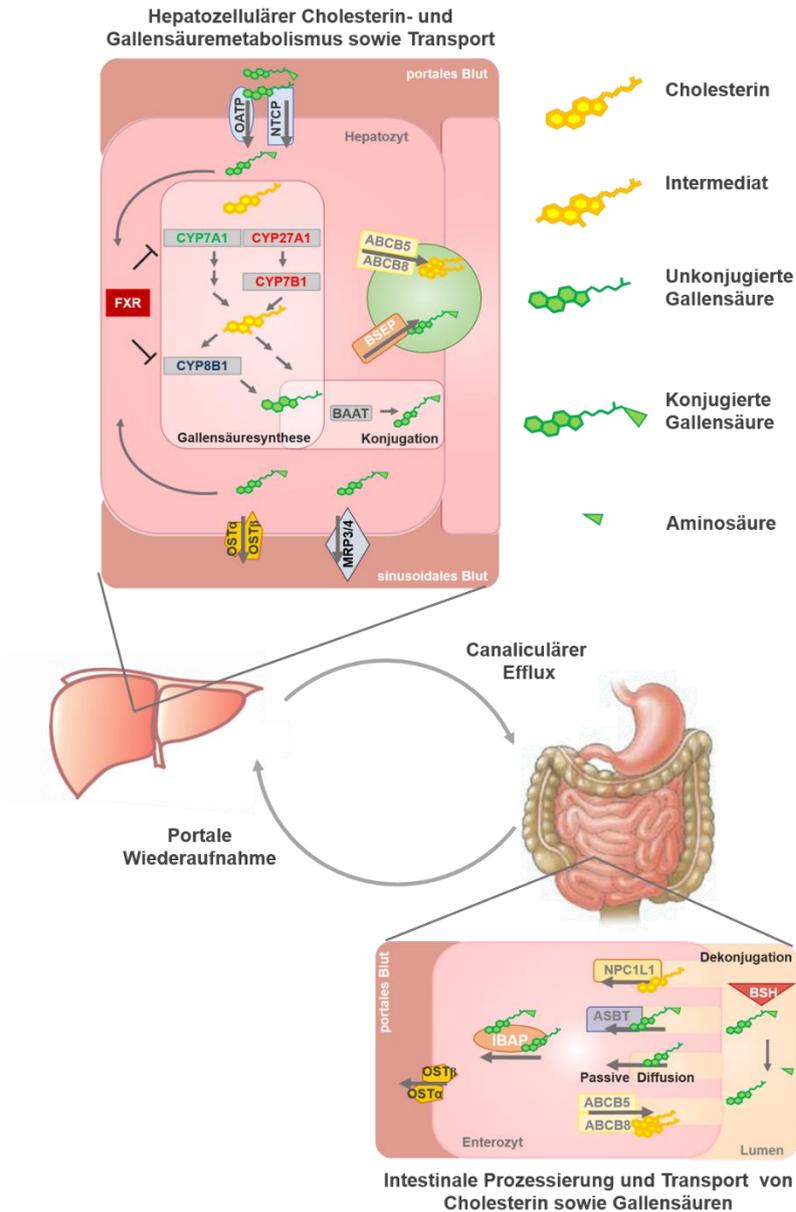


Abbildung C- 3: Enterohepatische Zirkulation

In Hepatozyten erfolgt über den klassischen (*Cholesterol-7 α -Hydroxylase* = CYP7A1) oder den alternativen Syntheseweg (*Sterol 27-hydroxylase* = CYP27A1 und *Oxysterol-7 α -Hydroxylase* = CYP7B1) die Gallensäuresynthese aus Cholesterin über verschiedene Intermediate. Nach ihrer Konjugation mit Aminosäuren durch BAAT (*bile acid coenzyme A:aminoacid N-acyl-transferase*) werden die Gallensäuren im Regelfall über BSEP (*Bile Salt Export Pump*) in die Gallencanaliculi exportiert. Cholesterin kann aber auch direkt über ABCG5/8 (*ATP-binding cassette transporter G5/8*) in die Galle abgegeben werden. Um die Aufnahme von Lipiden aus der Nahrung zu vermitteln, werden die Gallensäuren nach einer Mahlzeit ins Darmlumen ausgeschüttet. Nach ihrer Prozessierung durch bakterielle Enzyme wie z.B. der *Bile salt hydrolase* (BSH =Dokonjugation), die zur Dekonjugation und zur Bildung von sekundären Gallensäuren führen, werden Gallensäuren in die Enterozyten aufgenommen. Dies geschieht entweder über passive Diffusion (unkonjugierte Gallensäuren) oder den *apical sodium dependent bile acid transporter* (ASBT) (konjugierte Gallensäuren). Die Aufnahme von Cholesterin erfolgt über *Niemann-Pick C1-like protein 1* (NPC1L1) und eine mögliche direkte Exkretion von Cholesterin erfolgt über ABCG5/8. An das *ileal bile acid binding protein* IBAP gebunden passieren Gallensäuren die Enterozyten, wo sie dann basolateral über *organic solute transporter* (OST α /OST β) in die portale Zirkulation abgegeben werden und auf diesem Weg zurück in die Leber gelangen. Durch *Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide* (NTCP) und *organic anion transporter* (OATP) werden die Gallensäuren aus der portalen Zirkulation wieder in die Leber aufgenommen, wo sie über Binding an FXR ihre eigene Synthese regulieren können. Bei hohen Gallensäure-Konzentrationen können diese OST α /OST β - bzw. *multidrug resistance-associated protein 3/4* (MRP3/4)- vermittelt in das sinusoidale Blut abgegeben und schließlich renal exkretiert werden.

Die hierfür erforderlichen Transporter sind *multidrug resistance-associated proteins 3* (MPR3) und MRP4 sowie das heterodimere Protein *organic solute transporter* OST α /OST β (Trauner and Boyer 2003). Die in der Gallenblase gespeicherten Gallensäuren werden in Folge einer Nahrungszufuhr Cholezystokinin-vermittelt ins Darmlumen ausgeschüttet, um dort die Mizellenbildung und die Fettaufnahme zu vermitteln. Hier erfolgt zudem die Dekonjugation und die Herstellung von sekundären Gallensäuren durch Interaktion mit den intestinalen Mikrobiota (Teil C3.1). Im terminalen Ileum werden die CBA dann aktiv durch den *apical sodium dependent BA transporter* (ASBT) wieder in die Enterozyten aufgenommen (Wong et al. 1994; Dawson et al. 2003). Zudem können UBA auch passiv über Diffusion wieder aufgenommen werden (Dietschy 1968). Innerhalb der Enterozyten werden die Gallensäuren an das *ileal bile acid binding protein* (I-BABP) gebunden (Gong et al. 1994) und zur basolateralen Seite befördert, wo sie dann mit Hilfe von OST α /OST β sowie über MPR3 in das Pfortaderblut abgegeben werden und auf diesem Weg zurück in die Leber gelangen (Halilbasic et al. 2013). Die Wiederaufnahme von Gallensäuren aus dem portalen Blut in die Hepatozyten erfolgt vor allem über *Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide* (NTCP) (Ananthanarayanan et al. 1994) und zu einem geringeren Anteil auch über *organic anion transporter* (OATP) (Jacquemin et al. 1994). Die hohen Konzentrationen von Gallensäuren im portalen Blut werden nicht vollständig von der Leber resorbiert und gelangen in der Folge in deutlichen geringeren Konzentrationen in das systemische Blut. Sowohl portale und auch systemische Gallensäure-Konzentrationen schwanken in Abhängigkeit der Nahrungszufuhr, wobei die Spiegel postprandial in der Resorptionsphase am höchsten sind (Angelin et al. 1982).

2.2.5 Wirkung von Gallensäuren auf den Stoffwechsel

Das Zusammenspiel der Gallensäure-synthetisierenden und transportierenden Enzyme erfordert eine strenge Regulation. Einerseits muss ein effektives Recycling von Gallensäuren garantiert werden, um den Verlust von Gallensäuren zu vermeiden, andererseits können Gallensäuren bei Akkumulation Entzündungsprozesse, Apoptose und Nekrose von Leberzellen auslösen. Ein nukleärer Rezeptor, der durch Bindung von Gallensäuren aktiviert wird und somit die Gallensäurespiegel in den Zellen detektiert, ist der FXR (Makishima et al. 1999; Parks et al. 1999; Wang et al. 1999). FXR wird insbesondere in den Organen der enterohepatischen Zirkulation hoch exprimiert, wobei auch geringe Mengen in Fettgewebe, Magen, Niere, Pankreas sowie Endothel- und Immunzellen zu finden sind (Kuipers et al. 2014). Mit absteigender Affinität binden CDCA, Desoxycholsäure (DCA), Litocholsäure (LCA) und CA an FXR und aktivieren ihn. Die hydrophile Gallensäure Tauro- β -MCA (T- β -MCA) antagonisiert FXR hingegen (Sayin et al. 2013). Das wichtigste Zielgen von FXR ist das *small heterodimer partner* (SHP, kodiert durch *Nr0b2*) welches zusammen mit *liver receptor homologue 1* (LRH-1) die Expression von *Cyp7a1* inhibiert (Goodwin et al. 2000;

Lu et al. 2000). Durch Interaktion von SHP mit dem *hepatocyte nuclear factor 4 α* (HNF4 α) wird zudem die Expression von *Cyp8b1* reduziert (Zhang and Chiang 2001). Auf diese Weise reduziert FXR Aktivierung also die hepatische Gallensäuresynthese. In Hepatozyten resultiert eine FXR Aktivierung zudem in reduzierter NTPC Expression und dadurch in verminderter portaler BA Aufnahme (Calkin and Tontonoz 2012). Nach FXR Aktivierung kommt es zudem zur Induktion von BACS, BAAT, *Abcb11* (BSEP) und MRP2 (Ananthanarayanan et al. 2001) und somit zu gesteigerter BA Konjugation und vermehrtem BA Export (Kast et al. 2002; Pircher et al. 2003). Eine Reduzierung von ASBT als Folge intestinaler FXR Aktivierung verhindert die Wiederaufnahme von BA in hohen, potentiell toxischen Konzentrationen. Zudem wird durch intestinale FXR-Aktivierung neben OST α /OST β und IBAB auch die Expression von *fiboblast growth factor 15/19* (FGF15/19; FGF15 in der Maus und FGF 19 im Menschen) induziert (Matsubara et al. 2013). FGF15/19 wird in die Zirkulation sekretiert und gelangt über die Pfortader zur Leber, wo es über Bindung an den FGF Rezeptor 4 (FGFR4) letztendlich die Expression von *Cyp7a1* senkt (Inagaki et al. 2005).

Neben dieser negativen Rückkopplung regulieren Gallensäuren zudem andere Prozesse des Stoffwechsels, wie beispielsweise den Lipidstoffwechsel. So senkt eine FXR Aktivierung die Konzentration von Lipoproteinen im Plasma, indem die Expression von *ApoCII* induziert und die von *Srebp1c* unterdrückt wird (Kast et al. 2001; Watanabe et al. 2004). Gallensäuren haben auch einen Einfluss auf den Glucose-Stoffwechsel. FXR-abhängig wird einerseits die Expression der Glucose-6-Phosphatase in der Leber reduziert und andererseits die hepatische Gluconeogenese durch die Insulin-ähnlichen Eigenschaften von FGF15/19 vermindert (Ma et al. 2006; Kir et al. 2011). FXR defiziente Mäuse haben im Übergewichtsmodell eine verringerte Gewichtszunahme und eine verbesserte Glucose-Toleranz (Prawitt et al. 2011). Darüber hinaus konnte mit Hilfe von Mäusen mit Organ-spezifischer FXR- Defizienz gezeigt werden, dass intestinales FXR für die Hochfett-Diät induzierte Entwicklung von Übergewicht, Insulinresistenz und Fettleber verantwortlich ist (Li et al. 2013; Jiang et al. 2015). Zudem gibt es Hinweise, dass intestinaler FXR-Agonismus das *browning* des weißen Fettgewebes fördert (Fang et al. 2015) und dass die positiven metabolischen Veränderungen, die mit einer Magenbypassoperation einhergehen, FXR-abhängig auf Gallensäurewirkungen beruhen (Ryan et al. 2014). Aus diesen Gründen wurden zahlreiche klinische Studien mit synthetischen FXR-Agonisten für die Therapie von Typ2-Diabetes und Fettleber initiiert (Kuipers et al. 2014)

Zusätzlich zu FXR binden Gallensäuren an den membranständigen G-Protein gekoppelten Rezeptor TGR5, der auch *G-protein-coupled bile acid receptor 1* (GPBAR1) (Maruyama et al. 2002; Kawamata et al. 2003) genannt und durch hydrophobe Gallensäuren aktiviert wird. Neben nicht-parenchymalen Zellen der Leber (Epithelzellen, Cholangiozyten und Kupffer-Zellen) wird TGR5 in braunem Fettgewebe, enteroendokrinen Zellen und im Gehirn

exprimiert. TGR5 Aktivierung reguliert außer Stoffwechselprozessen auch Immunantworten. In Makrophagen unterbindet die BA-vermittelte Aktivierung von TGR5 beispielsweise die Expression pro-inflammatorischer Zytokine (Wang et al. 2011). Durch *Glucagon-like-peptide 1* (GLP-1) Sekretion in enteroendokrinen L-Zellen trägt die BA-vermittelte TGR5-Aktivierung zudem zur Glucosehomöostase bei (Katsuma et al. 2005). Über verschiedene Mechanismen üben Gallensäuren zudem regulatorische Funktionen auf den Energiestoffwechsel aus. In Mäusen führt die Aktivierung von TGR5 durch CA im braunen Fettgewebe zur Induktion von *Dio2*, die vermehrt T₄ zu T₃ umwandelt und dabei den Energieumsatz steigert (Watanabe et al. 2006). Dies konnte auch im Menschen durch CDCA-Supplementation erreicht werden (Broeders et al. 2015).

3 Die Intestinale Mikrobiota

Die intestinale Mikrobiota bezeichnet die gesamte mikrobielle Gemeinschaft, die den Intestinaltrakt eines Organismus besiedelt. Entlang des menschlichen Darms leben ca. 100 Billionen Mikroorganismen, darunter vorwiegend Bakterien und Archaeen, wobei die Besiedlungsdichte des Darms in distaler Richtung zunimmt (Qin et al. 2010). Die im humanen Darm vorherrschenden Phyla sind 5 bakterielle und sowie die *Euryarchaeota*, die zu den Archaeen gehören. 90% dieser bakteriellen Phyla werden von den *Firmicutes* und den *Bacteroidetes* ausgemacht. Der Rest gehört zu den *Actinobacteria*, den *Proteobacteria* sowie den *Verrucumicrobia* (Tremaroli and Backhed 2012). Die Komposition der intestinalen Mikrobiota variiert zwischen verschiedenen Individuen und auch innerhalb eines Individuums im Laufe des Lebens. Sie wird durch Ernährung (David et al. 2014), Medikation, Bewegung, Hygiene und den generellen metabolischen Zustand beeinflusst (Sommer and Backhed 2013).

Das kollektive Genom dieser Mikroorganismen, das als intestinales Mikrobiom bezeichnet wird, ist in etwa 150- mal größer als das menschliche Genom. Die aus dieser Vielfalt resultierenden Genprodukte können den Wirt zum Beispiel bei der Verdauung unterstützen (Hamady and Knight 2009). Darüber hinaus übernehmen die intestinalen Mikrobiota essentielle Funktionen für den Wirt. Zum einen ermöglichen sie den Stoffwechsel von, für den Wirt unverdaulichen, Kohlenhydraten und produzieren Vitamine. Andererseits beeinflussen sie das Immunsystem des Wirts und spielen eine wichtige Rolle in der Abwehr von pathogenen Keimen (Sommer and Backhed 2013).

Zahlreiche Studien liefern Hinweise dafür, dass die Beschaffenheit der intestinalen Mikrobiota mit Übergewicht und der Entwicklung des metabolischen Syndroms assoziiert sind. Eine Kolonisierung von keimfreien Mäusen (*germ-free* =GF) mit konventioneller Mikrobiota resultierte in Gewichtszunahme und der Entwicklung von Insulinresistenz (Backhed et al. 2004). Zudem wurde gezeigt, dass in übergewichtigen Mäusen und Menschen die relative Häufigkeit der *Firmicutes* und *Bacteroidetes* verändert ist und dass diese Änderungen mit

einem erhöhten Energiegewinn aus der Nahrung einhergehen (Turnbaugh et al. 2006). Auch in Zwillingen wurde gefunden, dass Übergewicht mit veränderter Komposition der bakteriellen Phyla, veränderter Häufigkeit bakterieller Gene und insgesamt mit verminderter bakterieller Diversität verbunden ist (Turnbaugh et al. 2009). Der metabolische Phänotyp von entweder dünnen oder übergewichtigen Zwillingen lässt sich zudem durch eine Fäzestransplantation in GF-Mäuse übertragen (Ridaura et al. 2013). Auch in Patienten mit Typ-2 Diabetes wurden Dysbiosen entdeckt (Qin et al. 2012; Karlsson et al. 2013) und die Transplantation von Fäzes aus schlanken, Glucose-toleranten Donoren konnte die Insulin-Sensitivität in Patienten mit metabolischem Syndrom verbessern (Vrieze et al. 2012).

3.1 Die Interaktion der Mikrobiota mit Gallensäuren

Die nach einer Mahlzeit ins Darmlumen freigesetzten Gallensäuren interagieren auf vielfältige Weise mit den intestinalen Mikrobiota. Sie modulieren die mikrobielle Gemeinschaft, indem sie das Wachstum von Gallensäure-metabolisierenden Bakterien fördern und das von Gallensäure-sensiblen Bakterien behindern. So führte z.B. die Fütterung von CA in Ratten zu einer veränderten Komposition der Darmbakterien, die durch den Überwuchs bestimmter Bakterienklassen charakterisiert war (Islam et al. 2011). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Unterbrechung des Galleflusses in Ratten zu quantitativen Änderungen der caecalen Mikroflora führte (Deitch et al. 1990; Clements et al. 1996). Auch eine mit der Diätzusammensetzung einhergehende Änderung von bestimmten Gallensäurespezies kann Auswirkungen auf die Mikrobiota haben. So führte eine Erhöhung von TCA in Mäusen, die mit einer MilCHFett-Diät gefüttert wurden, zur Dominanz von *B.wadsworthia* (Devkota et al. 2012). Neben diesen direkten bakteriostatischen Wirkungen wurde auch beschrieben, dass Gallensäuren das Mikrobiom über antimikrobielle Peptide regulieren, die vom Immunsystem sekretiert werden. So führte eine Unterbrechung des Galleflusses zum Überwuchs spezieller Bakterien, der durch FXR-Agonismus und daraus resultierender, gesteigerter Produktion von anti-mikrobiellen Peptiden verhindert werden konnte (Inagaki et al. 2006). Änderungen in der Komposition der Mikrobiota und vermehrte Produktion antimikrobieller Peptide wird auch nach Aktivierung des Inflammasoms durch eine erhöhte Konzentration von Taurin beschrieben (Levy et al. 2015). Das mit den Gallensäuren als CBA in den Darm sezernierte Taurin entsteht dabei lokal durch Dekonjugation der Gallensäuren. Denn durch z.B. Dekonjugation modulieren die intestinalen Mikrobiota auch die Gallensäuren und ihre Interaktionen sind somit bidirektional. Die mikrobielle Dekonjugation von Gallensäuren, also das Entfernen von Glycin und Taurin findet vor allem im distalen Ileum und im Colon statt. Der ASBT-vermittelten Wiederaufnahme entgangene CBA dienen als Substrat und eine Dekonjugation von CBA verhindert in der Folge auch deren aktive Wiederaufnahme. Das bakterielle Enzym, was die Dekonjugation ausführt ist die *bile salt hydrolase* (BSH). Sie ermöglicht eine enzymatische Hydrolse der N-Acyl-Bindung der Gallensäuren mit Taurin oder

Glycin (Ridlon et al. 2006; Joyce et al. 2014). Nahezu alle im menschlichen Darm vorhandenen Bakteriengruppen, wie z.B. *Lactobacilli*, *bifidobacteria*, *Clostridium* und *Bacteroides* haben funktionelle BSH (Wahlstrom et al. 2016) und es wird vermutet, dass eine BSH-Aktivität die Bakterien vor den potentiell toxischen Wirkungen der Gallensäuren schützt (Ridlon et al. 2006). Im Anschluss an die Dekonjugation kommt es zur bakteriell-vermittelten 7- α -Dehydroxylierung und somit zur Bildung von sekundären Gallensäuren wie Lithocholsäure (*lithocholic acid* =LCA) und Deoxycholsäure (*deoxycholic acid* =DCA). Der Gallensäurepool wird durch diese und mögliche andere noch folgende Modifikationen zunehmend hydrophober, was in einer verstärkten fäkalen Ausscheidung resultiert (Sayin et al. 2013). GF-Tiere haben aufgrund der fehlenden mikrobiellen Modifikationen einen vergrößerten Gallensäurepool, der weniger divers ist (Wostmann 1973; Swann et al. 2011). Der Grund dafür scheint ein verändertes FXR-*signaling* zu sein. Durch das Fehlen der Bakterien kommt es zur Anreicherung von CBA wie T- α / β -MCA. Diese antagonisieren FXR und heben dadurch unter anderem die Hemmung der Gallensäuresynthese auf (Sayin et al. 2013).

3.2 Mikrobiotaänderungen im Zusammenhang mit braunem Fettgewebe

Aktuelle Studien konnten einen Zusammenhang zwischen den intestinalen Mikrobiota und der Aktivität des braunen beziehungsweise der weißen Fettgewebe herstellen. Die Trajkovski Gruppe zeigte einerseits, dass die 4-wöchige Aktivierung des braunen Fettgewebes durch Kälte zu einer geänderten Komposition der Darmmikrobiota führt, die durch einen Anstieg der *Firmicutes* bei gleichzeitiger Reduktion der *Bacteroidetes* und insbesondere durch eine drastische Verminderung von *Akkermansia muciniphila* gekennzeichnet war. Ein Transfer dieser sogenannten „kalten“ Mikrobiota in GF-Mäuse erhöhte deren Insulinsensitivität und führte zum *browning* des weißen Fettgewebes. Darüber hinaus zeigten Kälte-exponierte Mäuse eine Umorganisation des Darms, die zu erhöhter Darmlänge und gesteigerter Aufnahmekapazität des Darms führte. Auch dieser Phänotyp war durch Transplantation in GF-Mäuse übertragbar (Chevalier et al. 2015). Eine andere Studie zeigte ebenfalls, dass Kälte-Adaption sowohl bei Fütterung einer *chow*-Diät als auch einer Hochfett-Diät in geänderter Komposition der intestinalen Mikrobiota resultiert. Ebenso konnte durch Transfer dieser Mikrobiota in GF-Mäuse eine verbesserte metabolische Gesundheit in den Empfängern gemessen werden. Einhergehend mit den Kälte-induzierten Änderungen der Darmbakterien, fanden die Autoren erhöhte Plasmagallensäurespiegel (Zietak et al. 2016). In einer anderen Studie führte die Ablation der Darmbakterien durch Antibiotika zum *browning* der weißen Fettgewebe, ein Prozess der auch in GF-Mäusen gefunden wurde und mit verbesserter Glucose-Toleranz einherging. Abermals war der Phänotyp transplantierbar. Auslöser für dieses *browning*, könnte den Autoren zu Folge, eine ebenfalls beobachtete Infiltration von

Eosinophilen in die WATs und verstärktes Typ-2-Zytokin *signaling* sein (Suarez-Zamorano et al. 2015).

4 Nicht-alkoholische Fettleber Erkrankung

4.1 NAFLD Beschreibung

Unter *non-alcoholic fatty liver disease* (NAFLD) versteht man eine Bandbreite von Leberpathologien, die durch hepatische Akkumulation von Lipiden gekennzeichnet sind und nicht durch den Missbrauch von Alkohol hervorgerufen wurden. Wegen der starken Assoziation von NAFLD mit Übergewicht, Typ-2 Diabetes und Dyslipidämie (Levene and Goldin 2012), wird NAFLD häufig auch als Lebermanifestation des metabolischen Syndroms betrachtet (Marchesini et al. 2005).

Die Deposition von TG in Lipidtropfen der Hepatozyten wird als einfache Steatose oder Fettleber bezeichnet, bildet eine milde Ausprägung und begünstigt die Entstehung von klinisch-relevanten NAFLD Pathologien. Im weiteren Verlauf der Erkrankung kann eine Steatose zur *non-alcoholic steatohepatitis* (NASH) voranschreiten. Neben der Steatose ist eine NASH vor allem durch Hepatozytenschädigung, wie das sogenannte *ballooning* und die Infiltration von Immunzellen in das Lebergewebe gekennzeichnet (Cohen et al. 2011). Zudem kann es durch Ablagerung von Kollagen, zur sogenannten Fibrose kommen. Eine NASH kann sich im Folgenden zu Leberzirrhose und auch direkt in ein Leberzellkarzinom (*hepatocellular carcinoma* =HCC) entwickeln. Populationsbasierte Studien zeigen, dass die Prävalenz von NAFLD in der US-amerikanischen Bevölkerung bei mittlerweile mindestens 21% liegt (Lazo et al. 2013). Im Gegensatz zu dieser, auf Sonografie-basierten Datenerhebung, ist die Abschätzung der Prävalenz von NASH deutlich schwieriger, da zur Diagnose von NASH Leberbiopsien erforderlich sind. Man nimmt dennoch an, dass ca. 30% der Patienten mit Steatose eine NASH und von denen wiederum 20% eine Zirrhose entwickeln (Levene and Goldin 2012). Die Behandlung von NAFLD beinhaltet vor allem *lifestyle* Interventionen, da eine Steatose reversibel ist und es derzeit keinen zugelassenen Wirkstoff zur NASH Behandlung gibt (Ratziu et al. 2015).

4.2 Mechanismen der NASH Entwicklung

Was zur Entwicklung von NAFLD führt und vor allem wie und warum die Transition von der benignen Steatose zur NASH oder zur Zirrhose abläuft, ist bisher noch unzureichend verstanden. Ein populäres Modell zur Erklärung wurde 1998 von Day und James vorgeschlagen. Die sogenannte „*two-hit*“ Hypothese besagt, dass die Leber infolge einer Steatose, dem „*first-hit*“, empfänglich für die Entwicklung von Entzündung, den „*second-hit*“, wird und somit die Steatose zur NASH voranschreitet (Day and James 1998). Das derzeit am besten akzeptierteste Modell ist die „*multiple parallel-hit*“ -Hypothese (Tilg and Moschen 2010). Neben Komponenten wie Alter, Geschlecht oder genetischen Polymorphismen kann

vor allem der Lebensstil, also Bewegungs- und Ernährungsstatus, zur NASH Pathogenese beitragen. Insbesondere die Entwicklung von Übergewicht und Insulinresistenz (Bugianesi et al. 2010) und eine damit verbundene metabolische Entzündung sind treibende Kräfte der NASH.

4.2.1 Entwicklung von Steatose

Unter physiologischen Bedingungen wird die Leber einerseits über die Nahrung mit TG (Chylomikronen) oder über das Fettgewebe und die Eigensynthese (DNL) mit Fettsäuren versorgt, die anschließend verestert werden. Diese TG können dann entweder mit den VLDL sekretiert oder hydrolysiert und als Fettsäuren in der β -Oxidation verbrannt werden. Herrscht als Folge eines gestörten Lipid-Stoffwechsels allerdings ein Ungleichgewicht zwischen TG Versorgung und TG Verbrauch, kommt es zur ektopen Speicherung von Lipiden und damit zur Lebersteatose. Tracer-Studien konnten zeigen, dass die in der Leber von NAFLD-Patienten gespeicherten TG zu ca. 60% aus freien Fettsäuren entstammen (Donnelly et al. 2005). Dies ist vermutlich auf die Beobachtung zurück zu führen, dass NASH oft mit Insulinresistenz einhergeht (Sanyal et al. 2001) und dass Insulin in NASH Patienten die Lipolyse im Fettgewebe nicht mehr ausreichend unterdrücken kann. In der Folge werden dort TG hydrolysiert und gelangen als freie Fettsäuren in die Leber, wo sie verestert und gespeichert werden (Postic and Girard 2008). In derselben Studie konnten Donnelly et al. zudem zeigen, dass ca. 30 % der Lebertriglyzeride in NAFLD Patienten von Fettsäuren ausgemacht wurden, die *de novo* in der Leber synthetisiert wurden (siehe: Teil C2.1.2). Der Prozess wird insbesondere durch eine hohe Kohlenhydratzufuhr beschleunigt und so resultiert Fructose Fütterung in Mäusen in vermehrter Lebersteatose und Fibrose (Kohli et al. 2010; DeBosch et al. 2014). Ein wichtiger DNL induzierender Transkriptionsfaktor ist ChREBP und sowohl murine als auch humane Studien liefern Hinweise dafür, dass ChREBP in der Entwicklung von NAFLD eine Rolle spielt. Zum einen konnte eine signifikante Korrelation der hepatischen ChREBP Expression mit Insulinresistenz und Steatose gezeigt werden (Benhamed et al. 2012; Eissing et al. 2013). Zum anderen führte die Leber-spezifische Inhibierung von ChREBP in Insulin-resistenten Mäusen zu verminderter Steatose (Dentin et al. 2006). Zusätzlich erhöhte die ChREBP Inhibition auch die β -Oxidation und untermauert die wichtige Funktion dieses Transkriptionsfaktors in der NASH Entwicklung. Wie schon oben in Teil C2.1.1 erwähnt, ist eine reduzierte VLDL Synthese (z.B. durch einen ApoE-Verlust) auch mit der Entwicklung einer Steatose verbunden. Ein funktioneller Phosphatidylcholin Metabolismus ist essentiell für die VLDL Synthese und neben der genetischen Modulation des Phosphatidylcholin-Ssyntheseweges führt auch die diätische Depletion von Cholin (besonders in Kombination mit Methionin) zu einer Fettleber (Corbin and Zeisel 2012). Eine Methionin- und Cholin-defiziente-Diät wird daher gefüttert um in Mäusen Steatose und NASH zu induzieren (Hebbard and George 2011).

Es gibt aber auch Hinweise dafür, dass die Akkumulation von TG in der Leber *per se* nicht toxisch, sondern eher protektiv ist und dass intermediäre Metabolite sowie andere Lipide eine Toxizität vermitteln. Einerseits führte nämlich eine Inhibierung der TG Synthese zwar zu reduzierter Lebersteatose aber zu erhöhtem Leberschaden (Yamaguchi et al. 2007) und andererseits konnte gezeigt werden, dass freie Fettsäuren und Cholesterin in der Leber die Expression des pro-inflammatorischen Zytokins TNF- α sowie die Produktion von *reactive oxygen species* (ROS) steigern (Feldstein et al. 2004; Wouters et al. 2008). Diese sogenannte Lipotoxizität und die damit verbundene entzündliche Veränderung der Leber könnte auch einer Steatose vorausgehen (Neuschwander-Tetri 2010; Tilg and Moschen 2010).

4.3 Mechanismen der Leberentzündung

Die bei einer NASH auftretende Immunantwort kann gleichermaßen durch fremde Signale, die sogenannten *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs) oder durch *danger associated molecular patterns* (DAMPs) ausgelöst werden.

DAMPs sind endogene Moleküle, die von geschädigten Zellen freigesetzt werden. So kann es zum Beispiel infolge einer Lipidüberladung sowie infolge von Lipotoxizität in Hepatozyten zur Produktion von ROS kommen (Feldstein et al. 2004). ROS beeinflussen die intrazellulären Funktionen von ER und Mitochondrien und bilden mit Lipiden toxische Peroxide, die DNA Schäden hervorrufen können. Auf diese Weise geschädigte Hepatozyten aktivieren in der Folge einerseits zelluläre Stress Kinasen, wie z.B: *c-Jun N-terminal kinase* (JNK) und setzen andererseits *danger associated molecular pattern* (DAMPs) frei, die in der Folge eine sogenannte sterile Entzündung auslösen (Lade et al. 2014).

Neben dieser sterilen Entzündung gibt es zudem das Konzept der metabolischen Endotoxämie, welches über PAMPs eine pro-inflammatorische Antwort in der Leber auslösen kann. Übergewicht und Typ-2 Diabetes sind mit einer Dysbiose verbunden. Auch Patienten mit NASH weisen eine Dysbiose auf und der Darmmikrobiota wird eine nicht zu unterschätzende Rolle in der NASH Progression eingeräumt (Wigg et al. 2001; Shanab et al. 2011; Moschen et al. 2013). Sowohl Übergewicht als auch Typ-2 Diabetes und NASH sind Erkrankungen, die mit einer kontinuierlichen, geringen Entzündungsreaktion (*low grade inflammation*) einhergehen und man nimmt an, dass durch Dysbiosen freigesetzte bakterielle Komponenten als PAMPs zu dieser beitragen (Delzenne et al. 2011). Eine dieser Komponenten ist Lipopolysaccharid (LPS), ein Bestandteil der Zellwand von Gram-negativen Bakterien. In Mäusen, die eine Hochfett-Diät erhielten, wurde eine erhöhte Konzentration von LPS im Plasma gefunden (Cani et al. 2007). Neben der direkten Translokation von LPS aus dem Darm in das Pfortaderblut durch erhöhte Darmpermeabilität (Brun et al. 2007; Cani et al. 2009) ist vor allem eine Aufnahme von LPS über Lipoproteine belegt (Ghoshal et al. 2009; Laugerette et al. 2011). Auch in NASH Patienten wurde in Zusammenhang mit bakterieller

Überbesiedlung des Dünndarms eine erhöhte Darmpermeabilität beobachtet (Miele et al. 2009) und die Einnahme einer Hochfett-Diät führte ebenso in Menschen zu erhöhten Plasmakonzentrationen von LPS (Erridge et al. 2007; Amar et al. 2008). Da die höchsten Konzentrationen von LPS auf Chylomikronen *Remnants* gefunden wurden (Ghoshal et al. 2009), welche letztendlich in die Leber aufgenommen werden, ist es sehr wahrscheinlich, dass LPS dort eine Entzündungsreaktion initiiert. In NASH Patienten wurden zudem erhöhte LPS Konzentrationen (Harte et al. 2010) sowie positiv mit dem NASH-Grad korrelierende Konzentrationen von Antikörpern gegen Endotoxin gefunden (Verdam et al. 2011). Hinweise für die Beteiligung der intestinalen Mikrobiota an der NASH-Pathogenese liefern auch Studien, bei denen die Darmmikrobiota manipuliert wurden. Wurde die Darmflora von übergewichtigen Mäusen entweder durch Antibiotika- oder Probiotika-Behandlung verändert, konnte reduzierte NASH beobachtet werden. (Li et al. 2003; Jiang et al. 2015). Auch eine Transplantation vom Stuhl übergewichtiger Mäuse in keimfreie Mäuse verursachte in diesem die Akkumulation von Lipiden in der Leber (Backhed et al. 2004).

Sowohl durch metabolische Endotoxämie in die Leber gelangte PAMPs als auch während der sterilen Entzündung freigesetzte DAMPs können in der Folge sogenannte *pattern recognition receptors* (PRR) aktivieren., die insbesondere in den Leber-ansässigen Makrophagen, den Kupfferzellen zur Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen wie Interleukin-6 (IL-6), TNF- α und IL-1 β führen (Bilzer et al. 2006).

4.3.1 Die Rolle von Zytokinen in der Leberentzündung

Pro-inflammatorische Zytokine sind von besonderer Bedeutung für das Voranschreiten der Steatohepatitis, wobei vor allem die Rolle von IL-6 und TNF- α besonders gut untersucht ist. So führte der Verlust von IL-6 oder des Rezeptors für TNF- α im Übergewichtsmodell zu vermindert hepatischer Steatose und Entzündung und reduzierte auch die Entwicklung von Tumoren (Park et al. 2010). In NASH Patienten wurden neben einer verstärkten Expression von TNF- α (Crespo et al. 2001) eine erhöhte Konzentration an TNF- α im Serum gefunden (Wigg et al. 2001). Im Kontext von Übergewicht und *low grade inflammation* scheint neben der Leber besonders die vermehrte Produktion von IL-6 und TNF- α im Fettgewebe zur NASH Progression beizutragen. So konnte in Fettzellen von übergewichtigen und Insulin-resistenten Patienten eine verstärkte Expression von IL-6 und TNF- α detektiert werden (Hotamisligil et al. 1993). In murinen Studien konnte belegt werden, dass IL-6, welches von Adipozyten während einer Stressantwort sekretiert wird, in der Leber einerseits Insulin-resistenz und andererseits auch Steatose auslöst (Sabio et al. 2008).

Neben der Produktion von Zytokinen gehört zum entzündlichen Status der Leber zudem die Infiltration mit weiteren Leukozyten, welche durch Chemokine entlang eines Konzentrationsgradienten angelockt werden. *CC-chemokine ligand 2* (CCL2) ist ein

Chemokin, welches vorrangig von geschädigten Hepatozyten oder aktivierten Kupffer-Zellen produziert wird und zur Infiltration mit Monozyten und Makrophagen aber auch NK-Zellen führt. Es gibt Hinweise, dass eine CCL2-vermittelte Immunzellinfiltration zur NASH Entwicklung beiträgt. In Patienten oder Mausmodellen mit Leberschädigung wurden erhöhte intrahepatische und Serumlevel von CCL2 detektiert (Possamai et al. 2010). Zudem führte eine Überexpression von CCL2 in Mäusen zu verstärkter Lebersteatose und der Verlust von CCL2 schützte vor Leberschädigung (Kanda et al. 2006; Zamara et al. 2007). Die rekrutierten Makrophagen können nach Aktivierung durch das pro-inflammatorische Zytokin-Milieu in der Leber ihrerseits weitere Zytokine produzieren, die dann z.B. Lymphozyten in die Leber rekrutieren (über Freisetzung von *C-X-C motif chemokine 10* (CXCL-10)) oder Sternzellen aktivieren (über Freisetzung von *Transforming growth factor beta* (TGF- β)), die infolgedessen fibrotische Prozesse induzieren.

4.3.2 Aktivierung des angeborenen Immunsystems

PAMPs und DAMPs werden von PR-Rezeptoren, die auf verschiedenen Populationen der Leber exprimiert werden, erkannt und aktivieren sowohl das angeborene als auch das adaptive Immunsystem.

Für diese Arbeit sind die *toll-like receptors* (TLRs) von besonderer Relevanz. TLRs sind eine Rezeptorfamilie, die PAMPs erkennt und in der Leber werden sie von Kupffer-Zellen, Hepatozyten, LSECs und Sternzellen exprimiert. Während TLRs 3, 7, 8, 9 intrazellulär in z.B. in Endosomen oder dem ER lokalisiert sind und vor allem Nukleinsäuren erkennen, sind TLR 1, 2, 4, 5, 6 und 11 extrazelluläre Rezeptoren. Kürzlich wurde eine Rolle für TLR9 bei der Pathogenese von NASH beschrieben. Hochfett-Diät induzierte Schädigung von Hepatozyten führte zur Freisetzung von mitochondrieller DNA, welche anschließend TLR9-vermittelt NASH auslöste. Sowohl die Antagonisierung von TLR9 als auch der Verlust von TLR9 auf Kupfferzellen verhinderte NASH Entwicklung (Garcia-Martinez et al. 2016). Sehr gut erforscht ist auch die Rolle des TLR4 in der NASH Progression. Der Ligand für TLR 4 ist LPS (Poltorak et al. 1998; Hoshino et al. 1999). Die Moleküle *cluster of differentiation 14* (CD-14) und *myeloid differentiation factor-2* (MD-2) bilden zusammen mit dem TLR4 einen LPS-Rezeptor-Komplex und sind für die Aktivierung von TLR4 unerlässlich (Takeda and Akira 2007). In Folge der Aktivierung wird eine intrazelluläre Signalkaskade gestartet, die über unterschiedliche Adapterproteine (MyD88 und TRIF) die Transkriptionsfaktoren *activator protein 1* (AP-1), *nuclear factor κ B* (NF κ B) sowie *interferon regulatory factor 3* (Irf3) aktiviert, die anschließend die Transkription pro-inflammatorischer Zytokine stimulieren (Barton and Medzhitov 2003). Dass TLR4 Aktivierung am Voranschreiten von NASH beteiligt ist, belegen zahlreiche Studien. Mäuse, die nach Fütterung einer MCD das Krankheitsbild einer NASH entwickelt hatten, produzierten nach einem LPS-Stimulus mehr Zytokine (Szabo et al. 2005). Die Fütterung einer MCD in WT Mäusen ging zudem mit

erhöhter Expression von TLR4 einher und löste NASH aus, die in TLR4-defizienten Tieren oder in Tieren, in denen die Kupffer Zellen durch Chlodronat-Liposomen depletiert waren, ausblieb (Rivera et al. 2007). Diese Studie unterstreicht noch einmal die Relevanz von Kupffer-Zellen für die NASH Progression. Auch die Defizienz des TLR4-Korezeptors MD-2 verminderte eine NASH Entwicklung (Csak et al. 2011).

4.3.3 Regulation von TLR Signalen durch TREM-Moleküle

Die Aktivierung von TLR-Signalwegen ist einerseits für die Steigerung der Immunantwort zur Abwehr von Pathogenen unerlässlich, kann andererseits aber auch zu überschießenden Immunreaktionen, Autoimmunität und Sepsis führen. Um Schäden für den Organismus zu vermeiden, müssen diese Prozesse balanciert und reguliert werden. TLR4-Signalwege werden sowohl über extra- als auch intrazelluläre Mechanismen reguliert. Einerseits wurde eine lösliche Form von TLR4 entdeckt, die vermutlich mit MD-2 und CD-14 interagiert und blockt und folglich eine LPS induzierte Signalweiterleitung verhindert (Liew et al. 2005). Intrazelluläre Mechanismen würden die Modulation der an der Signaltransduktion beteiligten Moleküle beinhalten. Exemplarisch soll hier ein Rückkopplungsmechanismus vorgestellt werden. Durch LPS und TNF- α wird die Expression von A20 initiiert, welches durch Manipulation von Ubiquitinierung letztendlich die Translokation von NF κ B unterbindet (Boone et al. 2004). Mäuse mit A20-Defizienz starben 2 Stunden nach LPS Injektion an einer überschießenden Entzündungsreaktion (Turer et al. 2008), was die Wichtigkeit zur Regulation von TLR4 Antworten nochmals hervorhebt.

Neben den TLRs, die den generellen Status von Zellen regulieren (z.B. Aktivierung oder Differenzierung), gibt es auch Rezeptoren, die selbst keine Antwort auslösen, aber Zellen auf eine bestimmte Reaktion vorbereiten und somit die Zellantwort modulieren. Zu diesen Rezeptoren gehören die *triggering receptors expressed on myeloid cells* (TREM).

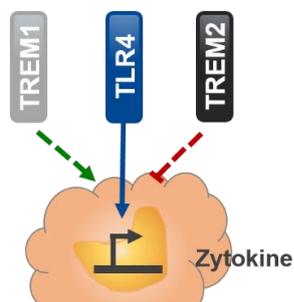


Abbildung C- 4: TREM Rezeptoren als TLR Signalmodulatoren

Während TREM 1 als TLR-Signalverstärker angesehen wird, scheint TREM 2 klassischerweise pro-inflammatorische Signalweiterleitung zu dämpfen. Neueren Erkenntnissen zufolge scheint die Rolle von TREM2 jedoch nicht eindeutig dämpfend bzw. verstärkend zu sein.

TREM 1 und TREM2 sind Transmembranglycoproteine, enthalten eine einzelne Immunglobulindomäne des variablen Typs und gehören somit zur Immunglobulin-Superfamilie. Durch ihre positiv geladene Transmembrandomäne assoziieren sie mit dem transmembranen Adapterprotein *DNAX-activating protein 12* (DAP 12). Für die Lokalisation und Signalweiterleitung von TREM1 und TREM2 ist DAP12 unerlässlich. Die cytosolische Domäne von DAP12 enthält nämlich ein Immunrezeptor Tyrosin-basiertes Aktivierungsmotiv (ITAM), welches nach Ligation von TREM phosphoryliert wird. Diese Phosphorylierungen

bilden Bindestellen für weitere Tyrosinkinassen, die in der Folge eine Signalkaskade auslösen, die zur Aktivierung von *phosphatidy-inositol 3-kinase* (PI3K), *phospholipase C γ* (PLC γ) und *extracellular-signal-regulated kinase* (ERK) führen (Colonna 2003; Klesney-Tait et al. 2006).

4.3.4 TREM1

Initial wurde eine Expression von TREM1 auf Neutrophilen und Monozyten beschrieben und die Stimulation dieser Zellen mit LPS resultierte in verstärkter TREM1-Expression (Bouchon et al. 2000). Die Ligation von TREM1 auf isolierten humanen Neutrophilen führte bei gleichzeitiger Stimulation mit TLR-Liganden zu synergistisch gesteigerter Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen (Bouchon et al. 2000; Bleharski et al. 2003). TREM1 hat auch bei der Entwicklung von Sepsis eine bedeutende Funktion. In peritonealen Neutrophilen, die aus Sepsis-Patienten isoliert wurden, war die TREM1 Expression gesteigert und sowohl Blockade von TREM1 als auch die genetische Deletion von TREM1 führte nach Gabe einer letalen Dosis von Endotoxin zu erhöhter Überlebensrate und verminderter Entzündung (Bouchon et al. 2001; Gibot et al. 2007; Wang et al. 2012). TREM 1 positive Makrophagen wurden zudem aus der Lamina propria von Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen isoliert und eine TREM1-Ligation dieser Zellen resultierte in verstärkter Produktion pro-inflammatorischer Zytokine (Schenk et al. 2007). Außerdem reduzierte Antagonisierung von TREM1 im Colitis Modell die Colitis sowie daraus resultierende Tumorgenese (Zhou et al. 2013). TREM1 Aktivierung scheint also pro-inflammatorische Prozesse zu begünstigen. Neben myeloiden Zellen wurde zudem gezeigt, dass in der Leber TREM1 auch von Endothelzellen exprimiert werden kann (Chen et al. 2008). Ferner wurde in TREM1-defizienten Mäusen eine verminderte Kupfferzellaktivierung und damit verbundene Leberzellkarzinogenese beobachtet, die durch Transfer mit WT Kupfferzellen aufgehoben werden konnte (Wu et al. 2012). Ein TREM1-Ligand wurde noch nicht eindeutig beschrieben. Neben dem Vorhandensein eines endogenen Liganden auf Blutplättchen sowie in nekrotischen Zelllysaten wurde auch *high-mobility group box 1* (HMGB1), 70 (HSP70) sowie ein bakterieller TREM1-Ligand diskutiert (El Mezayen et al. 2007; Haselmayer et al. 2007; Yu et al. 2010; Aad et al. 2013). Kürzlich wurde gezeigt, dass bakterielles Peptidoglykan im Komplex mit *peptidoglycan recognition protein 1* (PGLYRP1) TREM1 bindet und aktiviert (Read et al. 2015).

4.3.5 TREM2

TREM2 ist ein Oberflächenrezeptor auf Mikroglia, Osteoklasten und auf aus dem Knochenmark-abgeleiteten Makrophagen sowie Gewebsmakrophagen. Zudem wird er auf dendritischen Zellen exprimiert, die aus Monozyten abgeleitet sind (Bouchon et al. 2001; Paloneva et al. 2002; Schmid et al. 2002; Correale et al. 2013). TREM2 wurde initial in Zusammenhang mit der Nasu-Hakola Krankheit entdeckt. Die Krankheit manifestiert sich in der Bildung von Knochenzysten und in präseniler Demenz. Neben einer Mutation im *DAP12*

Gen konnte auch eine *loss of function* Mutation im *TREM2* Gen gefunden werden, die in Nasu-Hakola resultiert (Paloneva et al. 2002). Sowohl der Knochen- als auch der Gehirn-Phänotyp sind vermutlich auf die *TREM2*-abhängige, gestörte Funktion von Phagozytose zurück zu führen. So resultierte *TREM2*-Defizienz in gestörter Osteoklasten-Differenzierung und ein *TREM2* knockdown in Mikroglia des Gehirns in veränderter Phagozytose von apoptotischen Neuronen (Paloneva et al. 2003; Takahashi et al. 2005). Kürzlich wurde in *genome wide association studies* (GWAS) eine Mutation im *TREM2* Gen entdeckt, die mit dem erhöhten Risiko zur Entwicklung von Morbus Alzheimer assoziiert ist (Guerreiro et al. 2013; Jonsson et al. 2013). In einem Morbus Alzheimer Mausmodell führte der Verlust von *TREM2* zu Mikrogliazellapoptose und verstärkter β -Amyloid Akkumulation, was vermutlich der Mechanismus für die in der GWAS gefundene Assoziation ist. In derselben Studie konnte gezeigt werden, dass *TREM2* an- und zwitterionische Lipide detektiert und dass diese Bindung durch die bei Alzheimer im *TREM2* Gen auftretende Mutation aufgehoben ist (Wang et al. 2015). Auch eine andere Studie lieferte Hinweise dafür, dass *TREM2* für Lipiderkennung und Mikrogliafunktion essentiell ist (Poliani et al. 2015). In einem Mausmodell für Multiple Sklerose milderte die Injektion von *TREM2*-überexprimierenden myeloiden Vorläuferzellen den Krankheitsverlauf (Takahashi et al. 2007). Neben den oben beschriebenen Liganden wurden auch Polyanionen, bakterielle Lipooligosaccharide und verschiedene Phospholipide als *TREM2* Bindepartner beschrieben (Daws et al. 2003; N'Diaye et al. 2009; Cannon et al. 2012). Zwei aktuelle Studien haben außerdem ApoE als *TREM2*-Liganden identifiziert (Atagi et al. 2015; Bailey et al. 2015). *TREM2* bindet Bakterien und kann deren Phagozytose initiieren (N'Diaye et al. 2009; Read et al. 2015). In Makrophagen wurde *TREM2*-Expression durch alternative Aktivierung mit IL-4 induziert und durch Stimulation mit LPS reduziert. *TREM2*-defiziente Makrophagen hatten eine überschießende Antwort auf Stimulation mit TLR Liganden, was auf eine anti-entzündliche Rolle von *TREM2* hindeutet (Turnbull et al. 2006). Außerdem konnte in Makrophagen die TLR-Antwort *TREM2*- und DAP12-abhängig inhibiert werden und *TREM2* knockdown reduzierte TLR induzierte TNF- α Produktion (Hamerman et al. 2006) Demgegenüber konnte in weiteren Studien Hinweise für eine pro-inflammatorische Funktion von *TREM2* nachgewiesen werden. In der Dickdarmmucosa von Patienten mit Chronisch-entzündlicher Darmerkrankung sowie in aktivierten Alveolarmakrophagen aus Rauch-exponierten Mäusen wurde eine verstärkte *TREM2* Expression gefunden (Woodruff et al. 2009; Correale et al. 2013). Auch für die Wundheilung scheint *TREM2* von Bedeutung zu sein (Seno et al. 2009). Eine Studie zeigte zudem, dass *TREM2* die Adipogenese fördert (Park et al. 2015).

Vorarbeiten in unserem Labor konnten in einer humanen Adipositas-Kohorte eine Assoziation von hepatischer *TREM2* Expression und Steatose zeigen. Mit steigendem Steatose-Grad war eine gesteigerte hepatische Expression von *TREM2* beobachten (Abbildung C- 5) (Eissing

2013). Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war die funktionelle Relevanz von TREM2 für die entzündliche Lebererkrankung noch nicht hinlänglich untersucht.

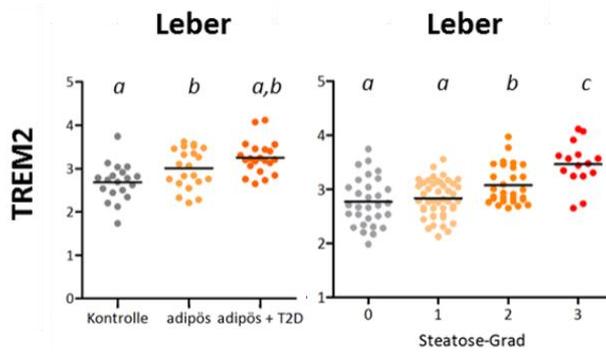


Abbildung C- 5: Expression von TREM2 in Lebern einer humanen Adipositas Kohorte

Die statistische Analyse der Daten wurde mittels ANOVA durchgeführt, Gruppen mit demselben Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant $P \geq 0,05$, Adaptiert aus der Doktorarbeit von Leah Eissing.

Teil D Zielsetzung und Problemstellung der Arbeit

Die Leber ist ein zentrales Organ in der Stoffwechselregulation und passt sich verschiedenen Stoffwechselsituationen rasch an. Sie reagiert flexibel auf einen Überschuss an Energie, indem sie diese im Körper verteilt, kann aber auch in Zeiten des Energiemangels Reserven mobilisieren und damit die Peripherie versorgen.

Störungen dieser Funktionen können vor allem im Kontext von dauerhaft erhöhter Energiezufuhr vorkommen. Die Kombination aus Überernährung, Adipositas und daraus folgender Insulinresistenz führt zur Entwicklung von Pathologien, die in der Leber zusammenfassend Nicht-alkoholische Fettlebererkrankungen genannt werden. Charakterisiert sind sie durch die ektope Deposition von Fett in der Leber und einem pro-inflammatorischen Milieu in der Leber.

Eine erhöhte Energiezufuhr in die Leber ist aber nicht nur bei Überernährung gegeben, die mit Adipositas assoziiert ist, sondern kann auch dann erfolgen, wenn die Überernährung Teil einer anderen Stoffwechseladaption ist. Eine solche Stoffwechseladaption entsteht zum Beispiel bei Kälte-Exposition und damit einhergehender Aktivierung des braunen Fettgewebes. Halten sich Säugetiere in einer kalten Umgebung auf, kommt es zwecks Erhaltung der Körpertemperatur zur Aktivierung des braunen Fettgewebes, das Energie in Wärme umwandelt. Auch dieser Prozess führt zu gesteigerter Energiezufuhr.

Gegenstand dieser Arbeit ist es, die adaptiven Mechanismen der Leber auf beide Zustände der Überernährung mit dem Fokus auf dem Lipidstoffwechsel zu untersuchen. Im ersten Teil soll insbesondere die Relevanz eines Immunreaktion-modulierenden Proteins, TREM2, für die Progression von der Fettleber zur NASH untersucht werden. Im zweiten Teil dieser Arbeit soll die physiologische Adaption des hepatischen Cholesterin-Stoffwechsels nach Aktivierung des braunen Fettgewebes analysiert werden, um neue Erkenntnisse in der systemischen Regulation des Lipidstoffwechsels nach Kälte-Exposition zu erlangen.

Teil E Ergebnisse

1 Auswirkungen von gesteigerter Lipidzufuhr zur Leber: Die Rolle von TREM Proteinen bei der Progression von Einfacher-Steatose zu Nichtalkoholischer Steatohepatitis (NASH)

Eine chronisch erhöhte Energiezufuhr bei gleichbleibendem Energieumsatz resultiert in einer positiven Energiebilanz und begünstigt so langfristig die Entstehung von Übergewicht. Überschüssige Energie wird üblicherweise in Form Triglyzeriden im Fettgewebe gespeichert. Übersteigt die Energiemenge allerdings die Kapazität der Fettgewebe, kann es zur ektopen Lipidablagerung in anderen Geweben kommen. Im ersten Teil dieser Arbeit sollten die Auswirkungen einer gesteigerten Lipidzufuhr in die Leber untersucht werden. Die gesteigerte Lipidzufuhr resultierte aus vermehrter Energiezufuhr bei gleichbleibendem Energieumsatz und ging somit mit der Entstehung von Übergewicht einher. Eine dauerhafte Akkumulation von Lipiden in der Leber, die sogenannte Steatose, ist pathologisch und ist unter anderem symptomatisch für das Krankheitsbild der NAFLD. Die Entwicklung von NAFLD ist noch nicht ausreichend verstanden. Insbesondere wie eine einfache Steatose zur NASH voranschreitet ist unzureichend geklärt. Das derzeit bestakzeptierte Konzept zur Pathogenese von NAFLD ist die sogenannte „multiple hit“- Hypothese (Tilg and Moschen 2010). Dieser Hypothese zu Folge, fördert ein komplexes Zusammenspiel von Umweltfaktoren, Genetik und intestinalem Mikrobiom des Patienten die Pathogenese von NAFLD. Neben Überernährung und resultierendem Übergewicht tragen ebenso mikrobielle Produkte und das Immunsystem des Wirts zur Pathogenese von NASH bei. Vorarbeiten aus der Dissertation von Leah Eissing liefern Anhaltspunkte, dass Rezeptoren des angeborenen Immunsystems, TREM-Rezeptoren, einerseits an Lipid-vermittelten, akuten Entzündungsreaktionen der Leber, andererseits aber auch an Hochfett-Diät induzierter NASH Progression beteiligt sind. Im folgenden Teil der Arbeit soll der Beitrag von TREM1 und insbesondere TREM2 zur Pathogenese von NASH validiert werden.

1.1 Die Rolle von TREM Rezeptoren für die Pathogenese von NASH im diätetischen NAFLD Modell

Die von Leah Eissing gewonnen Erkenntnisse zur Beteiligung von TREM Rezeptoren an der NASH Pathogenese ließen keine eindeutige Schlussfolgerung zu. So wirkte sich der Verlust von *Trem2* nach Fütterung einer Hochfett-Sucrose-Cholesterin-Diät nachteilig auf das Voranschreiten von NASH aus, während es nach Fütterung einer mit Kohlenhydraten angereicherten Diät keinen Unterschied in der NASH gab (Eissing 2013). Hier sollte nun geklärt werden, welche Rolle TREM 1 und TREM 2 für die NASH Pathogenese spielen, wenn beide oben genannten Diätkomponenten kombiniert werden. Wildtyp- (WT), *Trem1*^{-/-} und *Trem2*^{-/-} - Mäuse erhielten hierzu für 16 Wochen eine Hochfett-Sucrose-Cholesterin-Diät und

gleichzeitig mit Glucose und Fructose angereichertes Trinkwasser (Kohli et al. 2010) (HFCS). Chow gefütterte WT- Mäuse dienten als zusätzliche Kontrolle.

1.1.1 Analyse der Gewichtszunahme, Organgewichte, Glucose-Toleranz sowie Plasmalipide

Über den gesamten Zeitraum wurde die Gewichtszunahme beobachtet. Wie zu erwarten nahmen die HFCS gefütterten Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren deutlich mehr an Gewicht zu. So wogen die chow gefütterten Tiere nur ca. 5 g mehr als zu Studienbeginn, während alle Tiere, die eine HFCS erhielten, ca. 20 g Gewicht gewonnen (Abbildung E- 1A). Folglich hatte sich das Endpunktkörpergewicht der HFCS gefütterten Tiere verglichen mit den chow-Kontrollen nahezu auf ca. 45 g verdoppelt (Abbildung E- 1B). Auch die Organgewichte der HFCS gefütterten Tiere waren signifikant erhöht (Abbildung E- 1C). Insbesondere nahm der Anteil der Fettgewebe am Gesamtkörpergewicht deutlich zu (von 2% in chow- auf ca. 5% in HFCS gefütterten Tieren) (Abbildung E- 1C). Der Verlust der TREM Rezeptoren wirkte sich, mit Ausnahme des Lebergewichts von T1^{-/-} Mäusen (Abbildung E- 1C), nicht auf die Gewichtszunahme aus.

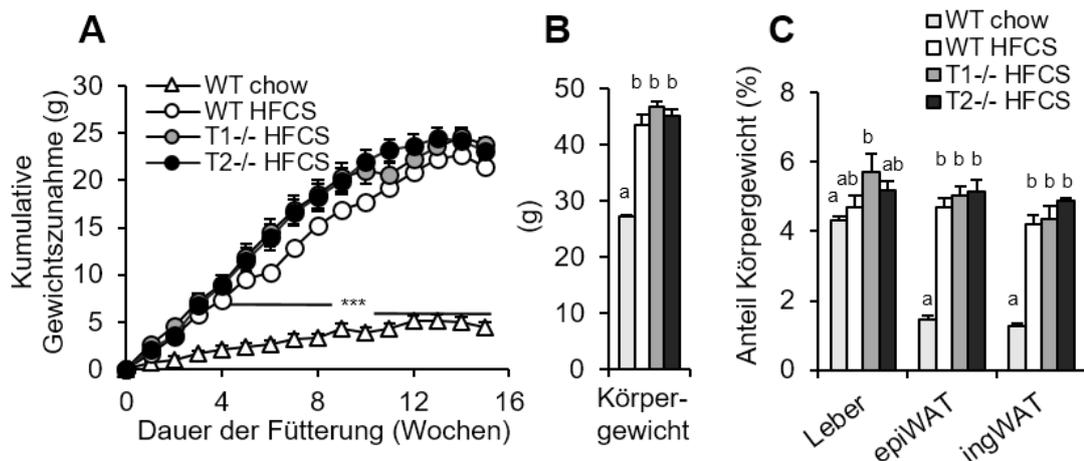


Abbildung E- 1: Zunahme sowie Endpunkt Körper- und Organgewichte nach Fütterung einer HFCS- bzw. chow-Diät in Trem1^{-/-} (T1^{-/-}) und Trem2^{-/-} (T2^{-/-}) Tieren sowie Wildtyp (WT)-Kontrollen (A) Die Fütterung einer Hochfett-, Cholesterin-, Sucrose-Diät (HFCS) für 16 Wochen resultiert in WT und Trem-defizienten Tieren gleichermaßen in einer gesteigerten, signifikanten Gewichtszunahme im Vergleich zu chow-gefütterten Kontrolltieren, die sich auch in einem signifikant erhöhten Endpunktkörpergewicht (B) widerspiegelt. Dieses ist hauptsächlich durch signifikant erhöhte Zunahme an Fettgewebmasse zu erklären (C). Die Defizienz von TREM-Molekülen scheint unter diesen Bedingungen keinen Einfluss auf das Gewicht zu haben. (n=6-10). Die statistische Analyse der Daten wurde mittels ANOVA durchgeführt, Gruppen mit demselben Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant $P \geq 0,05$; $***P < 0,001$; $**P < 0,01$; $*P < 0,05$; epiWAT=epididymales weißes Fettgewebe, ingWAT=inguinales weißes Fettgewebe).

Vor Organentnahme und -Analyse wurde ein oraler Glucose-Toleranztest (OGTT) durchgeführt. Auch hier zeigte sich eine verschlechterte Glucose-Toleranz nach Fütterung der HFCS. Der Verlust von Trem1 führte zu einer weiteren Verschärfung (Abbildung E- 2A). Mäuse, die eine HFCS erhielten, wiesen signifikant höhere Konzentrationen an

Plasmacholesterin auf (ca. 200 mg/dl), während es keine Änderung der Plasmatriglyzeride gab (Abbildung E- 2B).

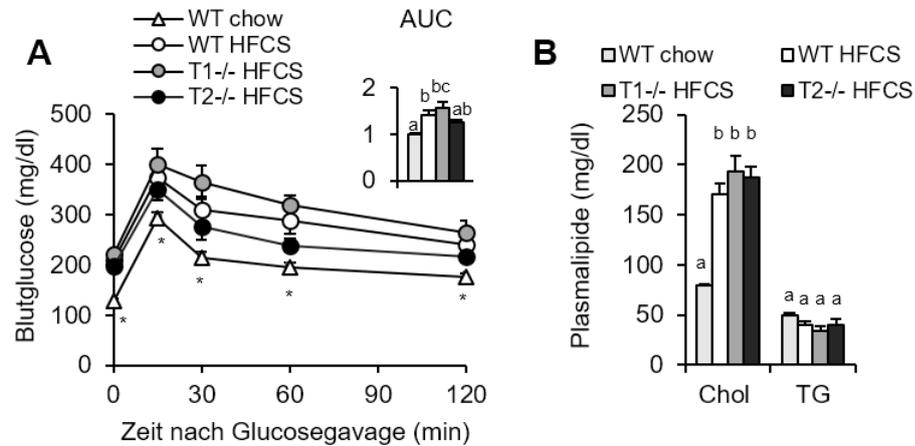


Abbildung E- 2: Orale Glucose-Toleranztest und Plasmacholesterin- (Chol) und Plasmatriglyzerid-(TG) Konzentrationen in *Trem1*^{-/-} (T1-/-) und *Trem2*^{-/-} (T2-/-) und Wildtyp (WT) Mäusen nach Fütterung einer HFCS-Diät sowie *chow*-Kontrolldiät

(A) Verglichen mit *chow*-gefütterten Tieren weisen alle 16 Wochen Hochfett-, Cholesterin-, Sucrose-Diät (HFCS)-gefütterten Tiere eine signifikant verminderte Glucose-Toleranz auf. (B) Gemäß der erhöhten Cholesteringehalts der HFCS-Diät haben alle mit dieser Diät gefütterten Tiere signifikant höhere Plasmacholesterin-Konzentrationen (Chol), wohingegen sich die Triglyzeridlevel (TG) nicht unterscheiden. Das Fehlen der TREM-Moleküle scheint sich ebenfalls nicht auf diese Parameter auszuwirken. (n=6-10). Die statistische Analyse der Daten wurde mittels ANOVA durchgeführt, Gruppen mit demselben Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant $P \geq 0,05$; *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$).

1.1.2 Analyse entzündlicher Marker sowie der Lipidakkumulation in der Leber

In der Histologie ist sowohl in WT- als auch *Trem*-defizienten Tieren eine deutlich gesteigerte Lipidakkumulation nach Fütterung der HFCS zu erkennen (Abbildung E- 3A).

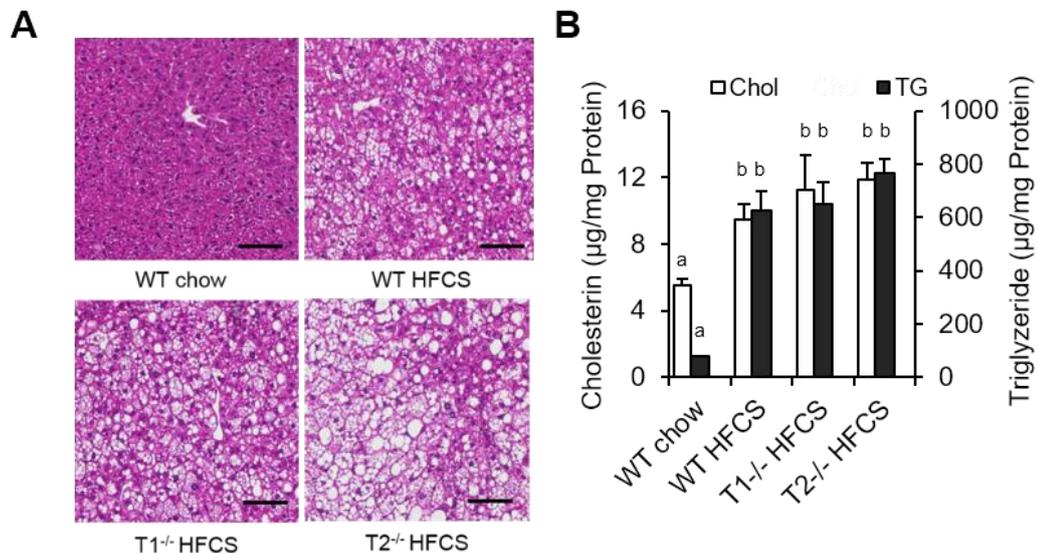


Abbildung E- 3: Lipidakkumulation in der Leber in *Trem1*^{-/-} (T1^{-/-}) und *Trem2*^{-/-} (T2^{-/-}) und Wildtyp (WT)- Mäusen nach Fütterung mit HFCS- bzw. Kontrolldiät (chow)

(A) 16 Wochen nach Fütterung wurde den Tieren die Leber entnommen zur histologischen Analyse mit Hämatoxylin-Eosin-gefärbt. Sowohl die histologischen Aufnahmen (A) als auch die Quantifizierung (B) belegen eine Steatose in den HFCS-gefütterten Tieren. Sowohl Lebercholesterin- (Chol) als auch Triglyzeridkonzentrationen (TG) sind erhöht. (n=6-10). Die statistische Analyse der Daten wurde mittels ANOVA durchgeführt, Gruppen mit demselben Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant $P \geq 0,05$, Balken= 100 µM).

Diese gesteigerte Lipidakkumulation ließ sich auch biochemisch quantifizieren. Verglichen mit den *chow*-Kontrollen wurden pro mg Protein signifikant mehr Cholesterin und Triglyzeride in der Leber detektiert (Abbildung E- 3B). Erneut wirkte sich ein Verlust von *Trem1* bzw. *Trem2* nicht aus.

Zur weiteren Charakterisierung der akkumulierten Lipide wurden diese mittels eines semi-quantitativen *ultra performance liquid chromatography electrospray ionization quadrupole time-of-flight* (UPLC-ESI-Q-TOF)-basierten *mass spectrometry* (MS)Ansatzes analysiert. Die Fütterung der HFCS führte zu einer deutlichen Verschiebung der Lipidzusammensetzung (Abbildung E- 4A). Während sich der Anteil der Diacylglyzeride (DG) nur marginal änderte, nahm der Anteil der Cholesterylester (CE) tendenziell zu. Die stärksten Verschiebungen wurden aber bei den Phospholipiden und den Triglyzeriden gemessen. So sank insbesondere der Anteil der Phospholipide (PC und PE) am Gesamtpool signifikant und der Anteil der Triglyzeride stieg etwa in selben Maße an (Abbildung E- 4A). Das Verhältnis aus PC/PE war tendenziell nach Fütterung der HFCS reduziert (Abbildung I- 1A).

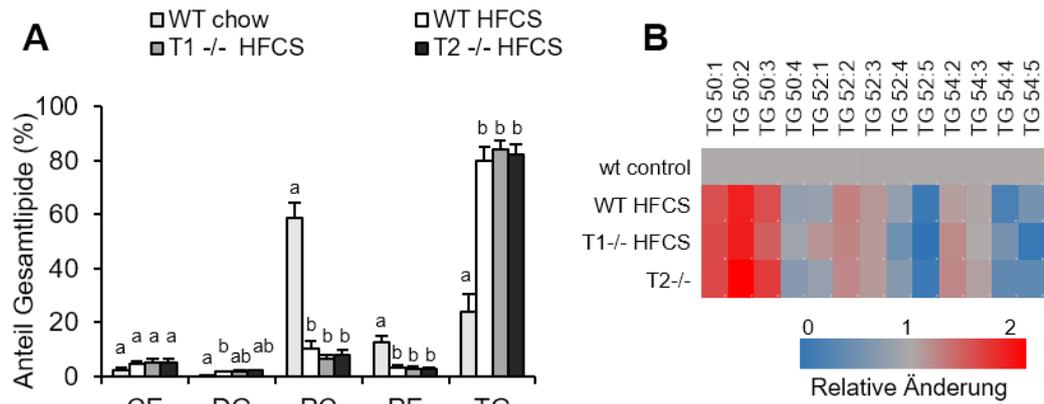


Abbildung E- 4: Lipidkomposition der Leber nach Fütterung einer HFCS- und Kontroll (*chow*)-Diät in *Trem1*^{-/-} (T1^{-/-}) und *Trem2*^{-/-} (T2^{-/-}) und Wildtyp (WT) Tieren

(A) Die Fütterung einer HFCS-Diät für 16 Wochen führt sowohl in den WT als auch den T1^{-/-} und T2^{-/-} Tieren zu einer Reorganisation der Lipidkomposition in der Leber. Es werden weniger Phospholipide (Phosphatidylcholine (PC) und Phosphatidylethanolamine (PE)) dafür mehr Triglyzeride (TG) gefunden. (B) Auch die Komposition der TG-Spezies ist nach Gabe der HFCS verändert (Die Daten sind relativ zur Kontrolle dargestellt). Unter diesen Bedingungen scheint es keinen Einfluss von TREM-Molekülen auf die Komposition der Lipide in der Leber zu geben (n=6-10). Die statistische Analyse der Daten wurde mittels ANOVA durchgeführt, Gruppen mit demselben Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant P≥0,05., CE= Cholesterylester; DG=Diacylglyzeride).

Exemplarisch ist weiterhin gezeigt, wie die starken Änderungen innerhalb der Triglyzeride auf dem Level der einzelnen Lipidspezies begründet sind. Im Verhältnis zur *chow* Kontrolle nahm der Anteil an TG mit eher gesättigten Fettsäureresten (TG50:1-TG50:3, TG52:2-TG52:3 und TG54:2) zu und der Anteil an TG mit eher mit ungesättigten Fettsäureresten ab (Abbildung E-4B). Innerhalb der HFCS gefütterten Gruppe wurden auch hier keine Unterschiede detektiert.

Die Analyse inflammatorischer Zytokine und Chemokine spiegelte die Ergebnisse der Lipidakkumulation wider. Mit zunehmender Lipidakkumulation wurden mehr inflammatorische Zytokine und Chemokine (Abbildung E- 5A) detektiert. Die erhöhte Expression von Makrophagen-Marken wies auf eine verstärkte Infiltration von Makrophagen in die Lebern hin (Abbildung E- 5B). Zudem führte die Fütterung der HFCS auch zur gesteigerten Produktion von Fibrose Markern wie *Tgfb-1*, *Colla1* sowie *Timpl* und damit einhergehend vermutlich zu verstärkter Fibrose (Abbildung E- 5).

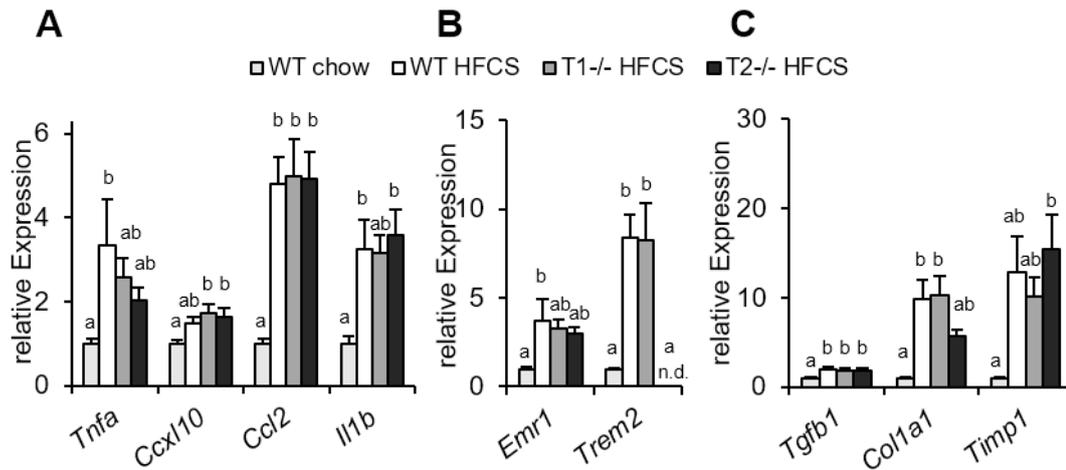


Abbildung E- 5: Genexpression inflammatorischer sowie fibrotischer Gene in Lebergewebe von HFCS- bzw. chow gefütterten *Trem1*^{-/-} (T1^{-/-}) und *Trem2*^{-/-} (T2^{-/-}) und Wildtyp (WT) Tieren

A) Mit zunehmender Lipidakkumulation wird auch die Genexpression inflammatorischer Zytokine und Chemokine in der Leber verstärkt. (B) Die 16-wöchige HFCS Fütterung führt zudem zu gesteigerter Expression von Makrophagen- (B) sowie Fibrose-Markern (C). Zusammenfassend scheint die HFCS-Diät eine Leberentzündung zu verursachen, die allerdings auch hier nicht durch TREM-Moleküle beeinflusst wird. (n=6-10). Die statistische Analyse der Daten wurde mittels ANOVA durchgeführt, Gruppen mit demselben Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant $P \geq 0,05$; n.d.= nicht detektiert).

Abschließend zeigen diese Daten, dass die 16-wöchige Fütterung einer HFCS zu signifikant gesteigerter Gewichtszunahme, vermehrter Lipidakkumulation in der Leber und zur verstärkten Expression inflammatorischer Mediatoren sowie Fibrose-Marker führte und letztendlich also die NASH-Progression förderte. Alle diese Prozesse geschahen allerdings unabhängig von der Anwesenheit von TREM-Molekülen.

1.2 TREM Rezeptoren in genetischem NAFLD Modell der *ApoE*- Defizienz auf chow-Diät

Um die Bedeutung von TREM-Molekülen für die NASH Pathogenese von mehreren Seiten zu beleuchten, wurde neben den diätetischen NAFLD-Modellen zudem ein genetisches NAFLD-Modell etabliert. Zu diesem Zweck wurden *ApoE*-defiziente (*ApoE*^{-/-}) Mäuse verwendet (Piedrahita et al. 1992). Diese Tiere weisen einen Defekt im Lipoproteinstoffwechsel auf, der zur Hyperlipoproteinämie und Atherosklerose-Entwicklung führt (Plump et al. 1992; Zhang et al. 1992). *ApoE*^{-/-}- Mäuse sind zudem anfälliger gegenüber Leberschädigungen (Ferre et al. 2009), entwickeln nach Fütterung einer Hochfett-Diät Steatose (Bartelt et al. 2011) und nach Fütterung einer *Western*-Typ-Diät sogar NASH in Kombination mit Leberfibrose (Schierwagen et al. 2015). Insbesondere von der Leber produziertes ApoE scheint hierfür von besonderer Bedeutung zu sein (Wagner et al. 2015) In dem hier untersuchten Mausmodell wurden *Trem1* bzw. *Trem2* defiziente Tiere auf einen *ApoE*-defizienten Hintergrund gekreuzt. Im ersten Schritt sollten die erhaltenen doppel-*knockout* Mäuse zunächst nach Fütterung einer normalen *chow*-Diät charakterisiert werden.

1.2.1 Analyse des Körpergewichts sowie das Plasma- und Leberlipide

Zur Klärung der Frage, ob *Trem1* bzw. *Trem2* Defizienz im *ApoE*^{-/-} NAFLD Modell bereits auf *chow* die NASH Pathogenese beeinflusst, wurden *ApoE*^{-/-} *Trem1*^{-/-} und *ApoE*^{-/-} *Trem2*^{-/-} Mäuse sowie *ApoE*^{-/-} Mäuse 16 Wochen mit einer *chow*-Diät gefüttert. Am Ende der Fütterungsperiode wurde das Körpergewicht und nach Organentnahme die Organgewichte bestimmt.

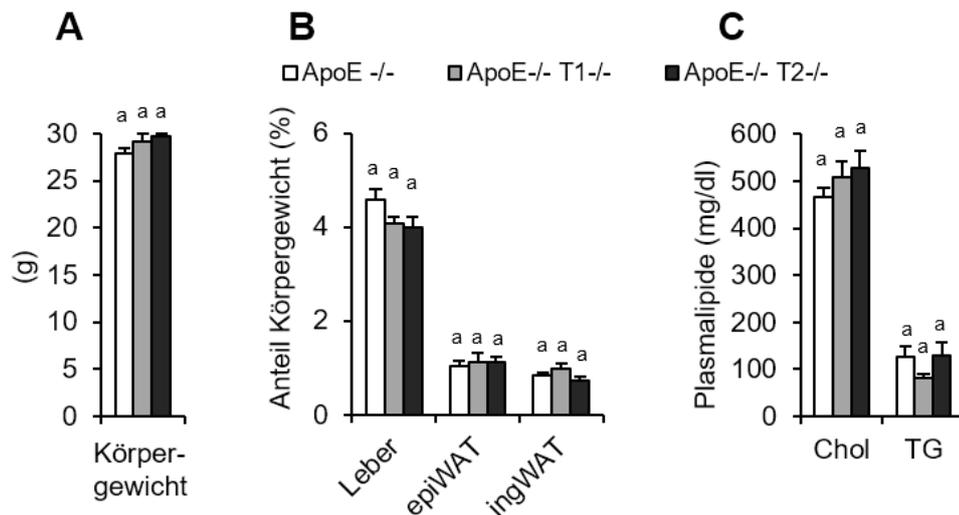


Abbildung E- 6: Körper- und Organgewichte sowie Plasmalipide von Kontrolltieren (*ApoE*^{-/-}) sowie *Trem1*^{-/-} (*T1*^{-/-}) und *Trem2*^{-/-} (*T2*^{-/-})-Tieren im genetischen Steatose-Modell (*ApoE*^{-/-}) auf *chow*-Diät

Im Alter von 20 Wochen zeigen *chow* gefütterte *ApoE* sowie gleichzeitig *Trem1* (*ApoE*^{-/-} *T1*^{-/-}) bzw. *Trem2*^{-/-} (*ApoE*^{-/-} *T2*^{-/-}) defiziente Tiere und respektive Kontrollen (*ApoE*^{-/-}) keine Unterschiede im Körper- (A) sowie Organgewicht (B). Auch die Plasmalipidkonzentrationen der verschiedenen Gruppen unterscheiden sich nicht (C). (n=8). Die statistische Analyse der Daten wurde mittels ANOVA durchgeführt, Gruppen mit demselben Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant $P \geq 0,05$; Chol=Cholesterin, TG=Triglyzeride, epiWAT=epididymales weißes Fettgewebe, ingWAT=inguinales weißes Fettgewebe).

Zwischen allen drei Gruppen gab es weder Unterschiede im Körper- noch im Organgewicht (Abbildung E- 6A,B).

Da die Tiere eine normale Standard *chow*-Diät erhielten, waren die Endpunktkörpergewichte mit einem Maximalgewicht von 30 g entsprechend geringer (Abbildung E- 6A), als in der HFCS Studie zuvor (Abbildung E- 1B). Auch die Plasmalipide waren innerhalb der Gruppen sehr ähnlich. Gemäß der *ApoE*-Defizienz waren die Plasmacholesterin-Konzentrationen auf einem sehr hohen Niveau (bei ca. 500 mg/dl) und die Konzentration der Plasmatriglyzeride war mit ca. 100 mg/dl moderat erhöht (Abbildung E- 6C). Trotz der Ähnlichkeiten der Plasmaparameter ergab die Analyse der Lipidklassenverteilung in der Leber ein anderes Bild. Während der Anteil der Phospholipide (PC, PE und Phosphatidylinositole (PI)), Sphingomyeline (SM) und DG in allen drei Gruppen unverändert war, sank, verglichen mit den *ApoE*^{-/-}-Kontrollen, der Anteil der TG in Lebern von *ApoE*^{-/-} *Trem1*^{-/-} -Tieren moderat und in Lebern von *ApoE*^{-/-} *Trem2*^{-/-} -Tieren sogar signifikant. In ähnlichem Maße stiegen in diesen Gruppen dagegen tendenziell die Cholesterylester an (Abbildung E- 7A). Diese Unterschiede

waren insbesondere bei den *ApoE^{-/-}Trem2^{-/-}*-Tieren sehr prominent und durch den Anstieg an vor allem CE 16:1, CE18:1 und 18:3 (Abbildung E- 7B). sowie durch die Reduktion von TG 50:1, 50:3 54:0 begründet (Abbildung E- 7C). Das Verhältnis von PC/PE war unverändert (Abbildung I-1:B). Der Verlust von *Trem2* führte in diesem Modell also zu einer Umverteilung der Lipide in der Leber.

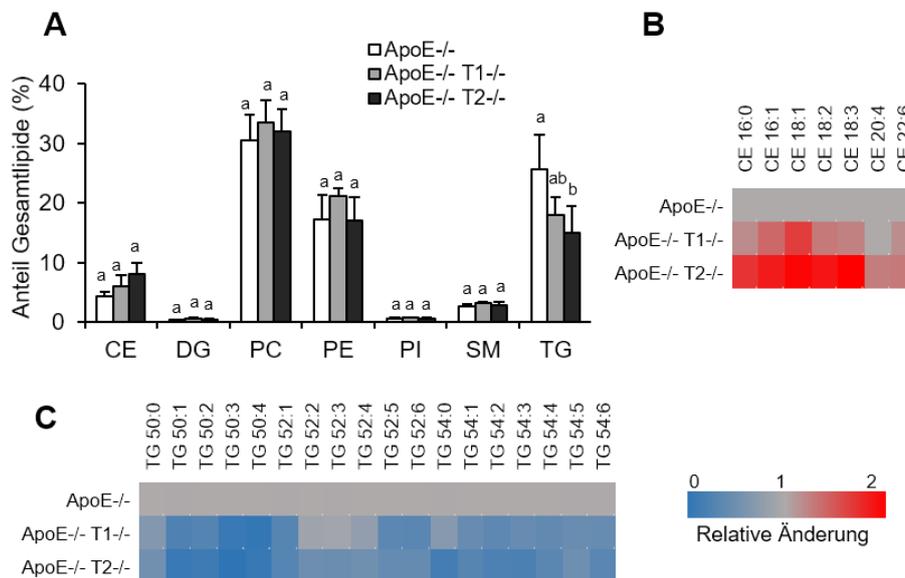


Abbildung E- 7: Veränderung der Leberlipidkomposition in *ApoE^{-/-}Trem1^{-/-}* (*ApoE^{-/-} T1^{-/-}*), *ApoE^{-/-}Trem2^{-/-}* (*ApoE^{-/-}T2^{-/-}*) sowie Kontrolltieren (*ApoE^{-/-}*) auf chow-Diät

Die auf Lipiklassenebene beobachtete Verminderung von Triglyceriden in den Kos, die in *Trem2*-defizienten Tieren sogar signifikant ist und mit einem mäßigem Anstieg an Cholesterylesteren einhergeht (A), zeigt sich auch auf Ebene der Lipidspezies (B,C). Der Verlust von *Trem2* scheint hier einen größeren Einfluss auf die Lipidkomposition in der Leber zu haben als der Verlust von *Trem1*. (n=8). Die statistische Analyse der Daten wurde mittels ANOVA durchgeführt, Gruppen mit demselben Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant $P \geq 0,05$; CE=Cholesterylester, DG= Diacylglyceride, PC=Phosphatidylcholine, PE=Phosphatidylethanolamine, PI=Phosphatidylinositol, SM=Sphingomyeline, TG=Triglyzeride).

1.2.2 Analyse der hepatischen Genexpression und der Fibrose in *ApoE^{-/-}Trem1^{-/-}* bzw. *Trem2^{-/-}* - Mäusen nach Fütterung einer chow-Diät

Zur Bestimmung der NASH-Entwicklung wurden die Lebern der Tiere mittels quantitativer PCR (qPCR) auf die Expression von entzündlichen Zytokinen, Chemokinen, Markern für Makrophagen sowie auf Fibrosemarker untersucht. Passend zu den gleichbleibenden Gewichten exprimierten die verschiedenen Gruppen gleiche Mengen an Zytokinen und Chemokinen (Abbildung E- 8A). Im Vergleich zur Kontrolle wurde keine unterschiedliche Anzahl an Makrophagen in den Lebern der TREM-defizienten Tiere detektiert (Abbildung E- 8B). Ähnlich wie bei der Leberlipidkomposition führte der Verlust von *Trem1* zu einer signifikant verstärkter Expression der Fibrosemarker *Tgfb1*, *Alpha-1 type I collagen (Colla1)* und *tissue inhibitor of metalloproteinases (Timp1)*, die bei Defizienz von *Trem2* noch deutlicher war (*Tgfb1*, *Colla1*) (Abbildung E- 8C)

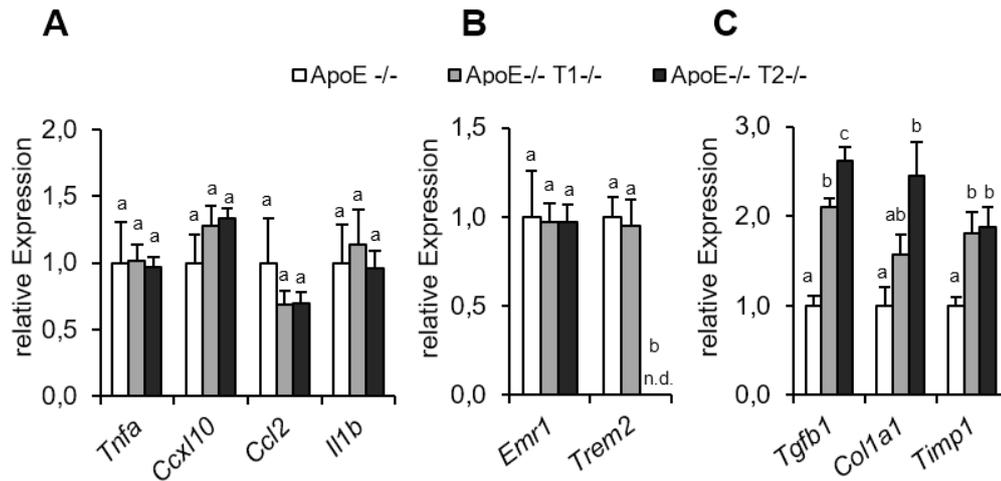


Abbildung E- 8: Hepatische Expression inflammatorischer Gene sowie Fibrose-Marker in *Trem1*- und *Trem2*- defizienten Tieren auf *ApoE*^{-/-}-Hintergrund sowie deren Kontrollen (*ApoE*^{-/-}) gefüttert mit *chow*-Diät

(A) Während die Genexpression inflammatorischer Zytokine und Chemokine sowie die Expression von Makrophagen-Markern (B) in der Leber nicht von der Defizienz von *Trem1* oder *Trem2*-beeinflusst wird, ist die Expression der Fibrose-Marker in *Trem2*-defizienten *ApoE*^{-/-}-Tieren im Vergleich zur *ApoE*^{-/-}-Kontrolle signifikant erhöht (C). (n=8). Die statistische Analyse der Daten wurde mittels ANOVA durchgeführt, Gruppen mit demselben Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant (P≥0,05).

Die unterschiedliche Ausprägung der Fibrose sollte auch histologisch bestätigt werden und zu diesem Zweck wurden Leberschnitte mit *Sirius-Red* gefärbt. Der auf Genexpression gemessene Unterschied konnte auch histologisch bestätigt werden. Wie in Abbildung E- 9 zu erkennen, zeigten die Leberschnitte insbesondere von *ApoE*^{-/-}*Trem2*^{-/-}- Mäusen mehrere rot gefärbte Areale und damit eine verstärkte Deposition an Kollagen, welches ein Indikator einer Leberfibrose ist.

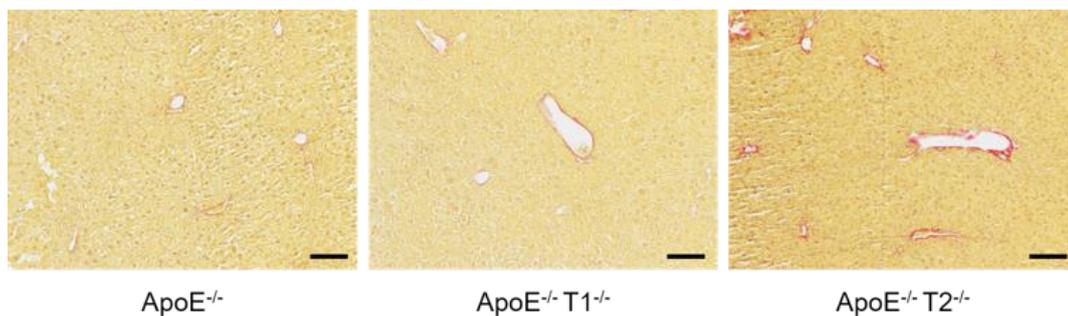


Abbildung E- 9: *Sirius-Red* gefärbte Leberschnitte von mit *chow*-gefütterten *ApoE*^{-/-}*Trem1*^{-/-}- (*ApoE*^{-/-} T1^{-/-}), *ApoE*^{-/-}*Trem2*^{-/-}- (*ApoE*^{-/-} T2^{-/-}) sowie Kontrolltieren (*ApoE*^{-/-})

Die erhöhte Genexpression von Fibrose-Marker kann auch makroskopisch bestätigt werden. Die *Sirius-Red*-Färbung von Lebergewebe zeigt mehr Fibrose in *Trem2*-defizienten Tieren im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen (Balken= 100 μM).

Zusammenfassend wurde durch Verwendung der *ApoE*^{-/-}-Maus ein genetisches Modell zur Pathogenese von NAFLD etabliert. Obwohl es weder Unterschiede in den Organengewichten noch in den Plasmalipidkonzentrationen gab, begünstigte der Verlust von *Trem2* neben Verschiebungen in der Leberlipidkomposition vor allem die Progression von NASH zur Fibrose. Der Verlust von *Trem1* wirkte sich in diesem Modell hingegen nicht auf die Fibrose-Entstehung aus.

1.3 Trem Rezeptoren im kombinierten NAFLD Modell aus *ApoE*-Defizienz und WTD-Fütterung

Zur Verstärkung der auf *chow*-Diät beobachteten detrimentalen Effekte, die durch den Verlust von *Trem2* ausgelöst wurden, sollte die NASH-Entwicklung durch gleichzeitige, zusätzliche Fütterung einer WTD gesteigert werden. In *ApoE*^{-/-}-Mäusen resultierte die 7-wöchige Fütterung einer WTD in der Ausbildung des metabolischen Syndroms und in der Entwicklung von NASH mit kombinierter Fibrose (Schierwagen et al. 2015). Für 16 Wochen erhielten *ApoE*^{-/-}*Trem1*^{-/-}-, *ApoE*^{-/-}*Trem2*^{-/-}- Mäusen und *ApoE*^{-/-}-Kontrollen eine WTD und das Körpergewicht wurde über den gesamten Zeitraum überwacht. Im Alter von 20 Wochen wurde mittels (OGTT) die Glucose-Toleranz bestimmt bevor die Organe entnommen und anschließend analysiert wurden.

1.3.1 Analyse der Gewichtszunahme, Organgewichte und Glucose-Toleranz

Über den 16-wöchigen Zeitraum nahmen alle Gruppen an Gewicht zu. Interessanterweise steigerten die *ApoE*^{-/-}-Tiere ihr Ausgangsgewicht um ca. 15 g, während die gleichzeitig *Trem1*- defizienten Tiere signifikant mehr (insgesamt ca. 18 g) und die gleichzeitig *Trem2*-defizienten Tiere signifikant weniger (insgesamt ca. 12 g) Gewicht zulegten (Abbildung E-10A). Dieser Unterschied zeigte sich auch in den Körpergewichten am Ende der Fütterung. *ApoE*^{-/-}-Kontrollen wogen ca. 35 g, *ApoE*^{-/-}*Trem1*^{-/-}-Mäuse mit ca. 40 g signifikant mehr und *ApoE*^{-/-}*Trem2*^{-/-}- Mäuse mit ca. 33 g tendenziell weniger (Abbildung E- 10B). Dieser Unterschied zeigte sich auch in den Körpergewichten am Ende der Fütterung. *ApoE*^{-/-}-Kontrollen wogen ca. 35 g, *ApoE*^{-/-}*Trem1*^{-/-}-Mäuse mit ca. 40 g signifikant mehr und *ApoE*^{-/-}*Trem2*^{-/-}- Mäuse mit ca. 33 g tendenziell weniger (Abbildung E- 10B).

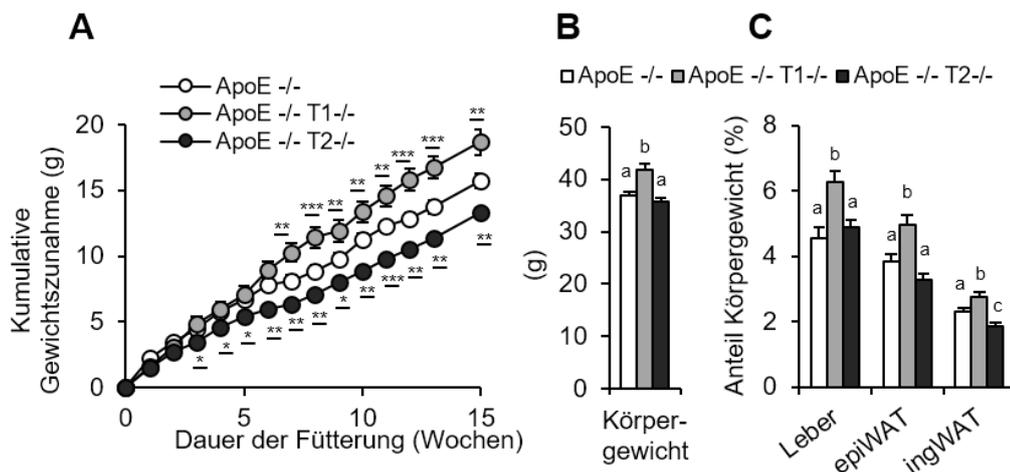


Abbildung E- 10: Zunahme sowie Körper- und Organgewichte nach Fütterung einer WTD in *ApoE*^{-/-}*Trem1*^{-/-} (*ApoE*^{-/-}*T1*^{-/-}) und *ApoE*^{-/-}*Trem2*^{-/-} (*ApoE*^{-/-}*T2*^{-/-}) Tieren sowie *ApoE*^{-/-}

Die 16-wöchige Fütterung einer WTD führt zu signifikant verstärkter (*ApoE*^{-/-}*Trem1*^{-/-}) sowie signifikant reduzierter (*ApoE*^{-/-}*Trem2*^{-/-}) Gewichtszunahme verglichen mit *ApoE*^{-/-}-Kontrolltieren (A), welche sich in *Trem1*-defizienten Tieren auch im Körpergewicht zum Endzeitpunkt (B) und den Organgewichten (C) widerspiegelt. Die Reduktion in der Gewichtszunahme in *Trem2* ist möglicherweise durch ein signifikant vermindertes ingWAT-Gewicht zu erklären (C). (n=8-11). Die statistische Analyse der Daten wurde mittels ANOVA durchgeführt, Gruppen mit demselben Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant $P \geq 0,05$; $***P < 0,001$; $**P < 0,01$; $*P < 0,05$; epiWAT=epididymales weißes Fettgewebe, ingWAT=inguinales weißes Fettgewebe).

Auch die Organengewichte der *Trem1*-defizienten Tiere waren signifikant höher, als die der Kontrollen. Das tendenziell geringere Körpergewicht der *ApoE^{-/-}Trem2^{-/-}*-Mäuse ist möglicherweise durch das reduzierte ingWAT-Gewicht begründet, da einzig dieses Organ verglichen mit der Kontrolle eine signifikante Reduktion aufwies (Abbildung E- 10C). Verglichen mit der in Teil E1.1.1 beschriebenen Zunahme (25 g) auf dem Wildtyp-Hintergrund ist eine deutlich verminderte Gewichtszunahme der Tiere auf dem *ApoE^{-/-}*-Hintergrund (ca. 18 g) zu messen, die sich auch in der Reduktion des anteiligen Fettgewichtes widerspiegelte. Während das ingWAT auf dem *ApoE^{-/-}*-Hintergrund nur ca. 3% zum Gesamtgewicht beitrug, waren es nach Fütterung der HFCS ca. 5-6% (Abbildung E- 1C).

Trotz des Körpergewichtsphänotyps wirkte sich ein Verlust von *Trem1*, verglichen mit den *ApoE^{-/-}*- Kontrollen, nicht auf die Glucose-Toleranz aus. Allerdings zeigten *ApoE^{-/-}Trem2^{-/-}*-Mäuse initial eine verminderte Glucose-Toleranz, die im Verlauf abklang (Abbildung E- 11A). Auch die Insulinwerte, die vor und 15 Minuten nach der Glucose-Verabreichung gemessen wurden, unterschieden sich nicht (Abbildung E- 11B).

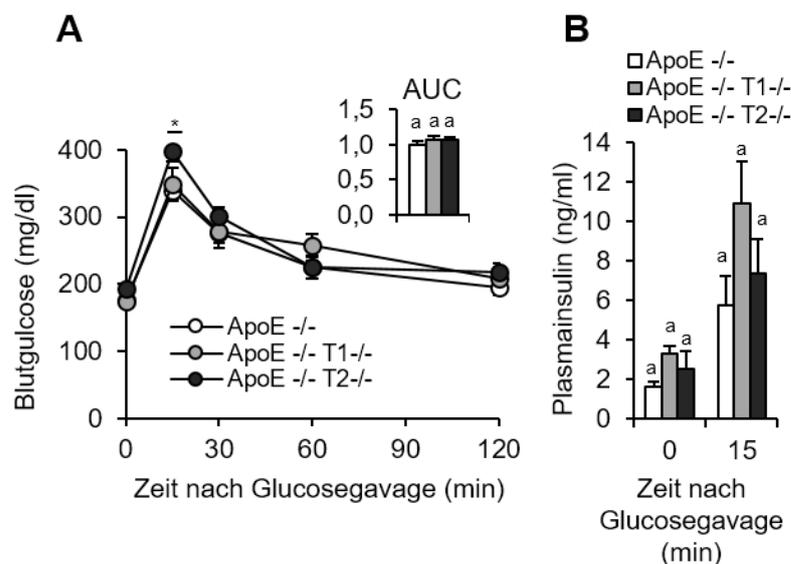


Abbildung E- 11: Oraler Glucose-Toleranztest und Plasmainsulinlevel vor sowie 15 Minuten nach Glucose Gavage in *ApoE^{-/-}Trem1^{-/-}* (*ApoE^{-/-}T1^{-/-}*) und *ApoE^{-/-}Trem2^{-/-}* (*ApoE^{-/-}T2^{-/-}*). Tieren sowie Kontrollen (*ApoE^{-/-}*) nach Fütterung einer WTD für 16 Wochen

(A) Durch den Verlust von *Trem1* und *Trem2* kommt es zu keiner Veränderung der Glucose-Toleranz. Allein nach 15 Minuten weisen *Trem2* defiziente Tiere eine erhöhte Blutglucose Konzentration auf, die sich aber im weiteren Verlauf den anderen Gruppen angleicht (A). Auch die Plasmainsulin-Konzentrationen der Gruppen unterscheiden sich nicht (B). (n=8). Die statistische Analyse der Daten wurde mittels ANOVA durchgeführt, Gruppen mit demselben Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant $P \geq 0,05$; *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$).

1.3.2 Analyse der Plasma- und Leberlipide sowie der Genexpression in der Leber

Obleich der detektierten Unterschiede in Körper- und Organengewichten unterschieden sich die Plasmacholesterin- und Triglyzeridkonzentrationen zwischen den Gruppen nicht. Die Fütterung der WTD verschärfte die ohnehin schon hohen Plasmacholesterin-Konzentrationen der *ApoE^{-/-}*- Tiere und so wurde bei allen Gruppen eine Konzentration von mindestens

1200 mg/dl gemessen (Abbildung E- 12A). Auch die Verfettung der Leber war in allen Gruppen gleichermaßen stark ausgeprägt. Wie schon in Teil E1.2.1 beschrieben, bewirkte der Verlust der TREM-Moleküle tendenziell eine verringerte Einlagerung von Triglyzeriden in die Leber (Abbildung E- 12B).

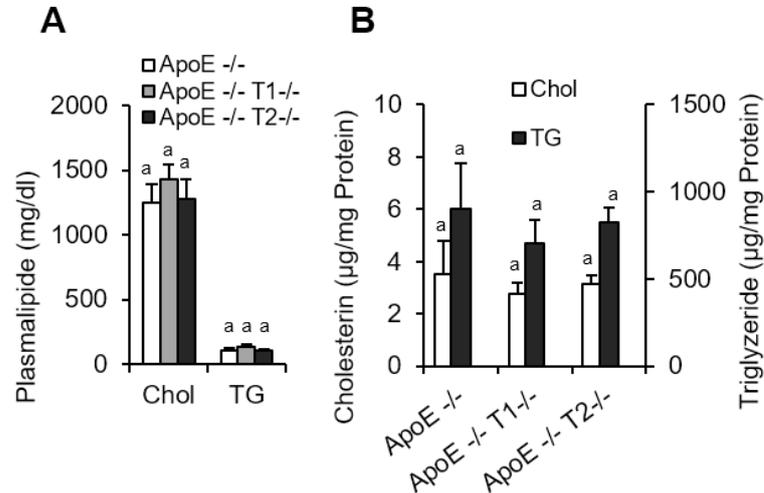


Abbildung E- 12: Plasma und Leberlipidkonzentrationen von *ApoE^{-/-}Trem1^{-/-}* (*ApoE^{-/-}T1^{-/-}*) und *ApoE^{-/-}Trem2^{-/-}* (*ApoE^{-/-}T2^{-/-}*) Tieren sowie Kontrollen (*ApoE^{-/-}*) nach Fütterung einer WTD für 16 Wochen

(A) Die Plasmacholesterin-Konzentrationen sind aufgrund des *ApoE^{-/-}* Hintergrundes und der cholesterinreichen WTD erwartungsgemäß sehr hoch, jedoch nicht unterschiedlich zwischen den Gruppen. Auch die biochemisch bestimmte Konzentration von Leberlipiden differiert nicht zwischen den einzelnen Gruppen. (n=8). Die statistische Analyse der Daten wurde mittels ANOVA durchgeführt, Gruppen mit demselben Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant (P>0,05, Chol=Cholesterin, TG=Triglyzeride).

Die Analyse der Genexpression von Zytokinen und Chemokinen ergab keine eindeutigen Ergebnisse. Während der Verlust von *Trem1* und vor allem der Verlust von *Trem2* zu einer verminderten Expression von *Tnfa* und insbesondere des Chemokins *Ccl2* führte, waren die Level von *Cxcl10* und *Il1b* unverändert (Abbildung E- 13A).

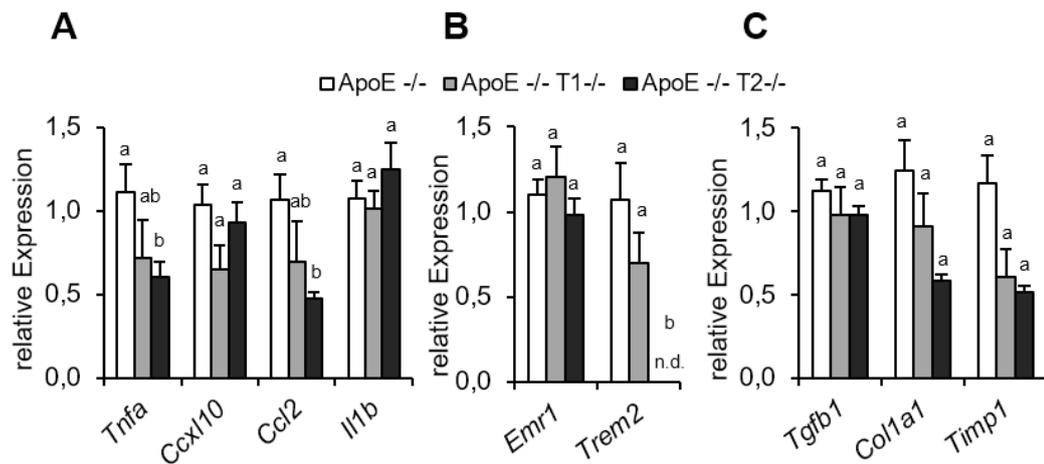


Abbildung E- 13: Genexpression inflammatorischer sowie fibrotischer Gene in Lebergewebe von WTD-gefütterten *ApoE^{-/-}Trem1^{-/-}* (*ApoE^{-/-}T1^{-/-}*) und *ApoE^{-/-}Trem2^{-/-}* (*ApoE^{-/-}T2^{-/-}*) Tieren sowie Kontrollen (*ApoE^{-/-}*)

(A) Die Expression der pro-inflammatorischen Zytokine *Tnfa* und *Ccl2* scheint nach 16-wöchiger WTD in *Trem2*-defizienten Tieren im Vergleich zur Kontrolle reduziert (A), während die Expression von Makrophagen (B)- und Fibrose-Markern (C) nicht verändert ist. Ein Verlust von *Trem1* ändert die hepatische Genexpression verglichen mit der *ApoE^{-/-}* Kontrolle nicht (A, B, C). (n=8). Die statistische Analyse der Daten wurde mittels ANOVA durchgeführt, Gruppen mit demselben Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant ($P \geq 0,05$).

Gemessen an der Expression ihrer Marker, infiltrierte ähnlich viele Makrophagen die Leber (Abbildung E- 13B). Im Gegensatz zu der vorher auf *chow*-Diät beobachteten, gesteigerten Expression von Fibrose-Markern in *ApoE^{-/-}Trem2^{-/-}* Mäusen (Teil E1.2.2), wurde hier tendenziell eine reduzierte Expression gemessen. Für den Verlust von *Trem1* ergab sich kein Unterschied (Abbildung E- 13C).

Abschließend führte die Fütterung einer WTD in *ApoE^{-/-}Trem1^{-/-}*, *ApoE^{-/-}Trem2^{-/-}*-Mäusen respektive *ApoE^{-/-}*-Kontrollen zu einer nur moderaten Gewichtszunahme, bedingt durch die geringe Zunahme an Fettgewebsmasse. Trotz des signifikant vermehrten Körpergewichts, resultierte der Verlust von *Trem1* nicht in weiteren phänotypischen Auffälligkeiten. Bis auf eine tendenziell reduzierte Fibrose wirkte sich der Verlust von *Trem2* in diesem Modell nicht auf die untersuchten Parameter aus. Da der Verlust von *Trem1* in den bisherigen Studien keinen Einfluss auf die Pathogenese von NASH hatte, wurde in folgenden Studien nur die Bedeutung von *Trem2* untersucht.

1.4 TREM2 im kombinierten CDHFD Modell aus *ApoE*-Defizienz und WTD-Fütterung

Ein gängiges Modell zur Induktion von NASH ist die Fütterung einer Methionin-Cholin defizienten Diät. Die physiologische Relevanz dieses Modells wird derzeit allerdings diskutiert, da die Fütterung einer solchen Diät oftmals mit drastischen Gewichtsverlusten und sogar Kachexie verbunden ist und somit den Verlauf einer meist mit Übergewicht und dem metabolischen Syndrom assoziierten NASH im Patienten nicht widerspiegelt (Hebbard and George 2011). Cholin scheint dennoch für die Pathogenese von NASH von enormer Bedeutung zu sein. So wurde unter anderem gezeigt, dass eine Methionin-Cholin-Defizienz ER- Stress fördert und dadurch die NASH Pathogenese steigert (Soon et al. 2010). Defekte in der Cholin-Synthese führen zudem zu reduzierter VLDL Synthese (Noga et al. 2002). Um sowohl die zentrale Rolle von Cholin als auch den Beitrag des metabolischen Syndroms zur NASH Pathogenese zu berücksichtigen, wurde kürzlich ein neues diätetisches NASH Modell vorgeschlagen, das diese beiden Ansätze kombiniert. Die Fütterung einer sogenannten Cholin-defizienten Hochfett-Diät (CDHFD) soll der tatsächlichen Physiologie im Patienten möglichst nahe kommen (Wolf et al. 2014).

1.4.1 Analyse der Gewichtszunahme, Leberschädigung, Körper- und Organgewichte

Die Relevanz von TREM2 für NASH und Fibrose sollte auch in diesem Modell untersucht werden und zu diesem Zweck erhielten *ApoE*^{-/-}*Trem2*^{-/-} und *ApoE*^{-/-} - Tiere über einen Zeitraum von 26 Wochen eine CDHFD. Chow-gefütterte *ApoE*^{-/-}-Tiere dienen als Kontrollen.

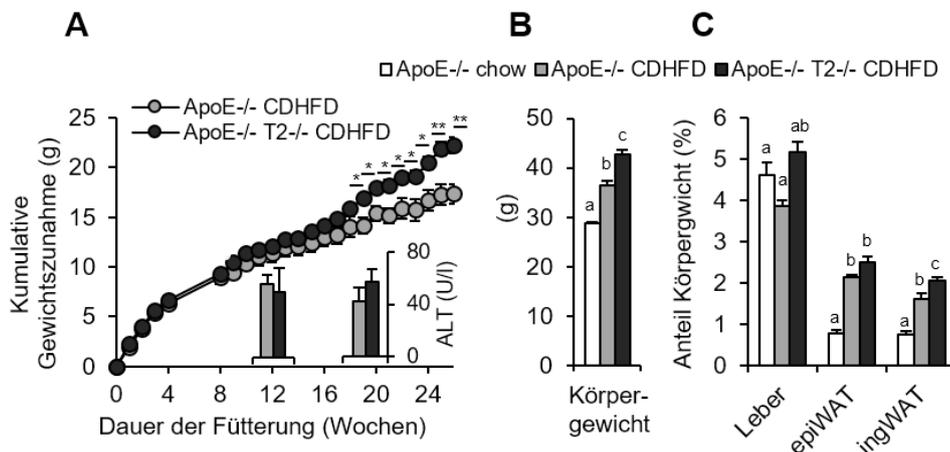


Abbildung E- 14: Zunahme sowie Körper- und Organgewichte nach Fütterung einer CDHFD in *ApoE*^{-/-}*Trem1*^{-/-} (*ApoE*^{-/-}*T1*^{-/-}) und *ApoE*^{-/-}*Trem2*^{-/-} (*ApoE*^{-/-}*T2*^{-/-}) Tieren sowie Kontrollen (*ApoE*^{-/-})

Die 26-wöchige Fütterung einer CDHFD an *ApoE*^{-/-}*Trem2*^{-/-} und *ApoE*^{-/-}-Tiere führte zu einer stetig gesteigerten Gewichtszunahme in *ApoE*^{-/-}*Trem2*^{-/-}-Tieren (A), die in signifikant erhöhte Körper- und Organgewichten resultiert (B,C). Nach 12 und 20 Wochen Fütterung unterscheiden sich die Level der Lebertransaminasen im Plasma nicht (A). Die CDHFD gefütterten *ApoE*^{-/-}-Kontrollen haben im Vergleich zu chow-gefütterten *ApoE*^{-/-}-Kontrollen ebenfalls signifikant erhöhtes Körpergewicht, das durch schwereres Fettgewebe (C) zu erklären ist (n= 5). Die statistische Analyse der Daten wurde mittels Student's t-test (bei 2 Gruppen) oder ANOVA (bei drei Gruppen) durchgeführt, Gruppen mit demselben Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant $P \geq 0,05$; $***P < 0,001$; $**P < 0,01$; $*P < 0,05$; epiWAT=epididymales weißes Fettgewebe, ingWAT=inguinales weißes Fettgewebe).

Die Analyse der Gewichtszunahme ergab eine Separation von CDHFD gefütterten *ApoE*^{-/-} *Trem2*^{-/-} - und *ApoE*^{-/-} - Tieren nach ca. 17 Wochen Fütterungsdauer. Bis dahin gab es weder Unterschiede in der Zunahme noch in der Leberschädigung, gemessen an Plasma-ALT Konzentrationen in Fütterungswoche 12 (Abbildung E- 14A). Der Verlust von *Trem 2* führte anschließend zur gesteigerten Gewichtszunahme, tendenziell erhöhter Leberschädigung (Woche 20) und einem signifikant erhöhten Körpergewicht am Ende der Fütterung (Abbildung E- 14A, B). Im Vergleich zu *chow*-gefütterten Kontrollen (ca. 30 g) resultierte die CDHFD in gesteigerten Körper- (ca. 35-40 g) sowie Organgewichten (Abbildung E- 14B, C). Der signifikant vermehrte Anteil an ingWAT in *Trem2*-defizienten Tieren begründet das erhöhte Gesamtgewicht, da sich sowohl epiWAT- und Lebergewicht nicht von den Gewichten der CDHFD gefütterten *ApoE*^{-/-}-Tieren unterschieden (Abbildung E- 14C).

Die Konzentration von Plasmatriglyzeriden und Plasmacholesterin änderte sich weder durch Fütterung einer CDHFD noch durch den Verlust von *Trem2* (Abbildung E- 15A) und auch die Lipoproteinprofile unterschieden sich nicht, wobei, typisch für eine *ApoE*-Defizienz, ein recht deutlicher TRL-*Remnant*-Peak detektiert wurde (Abbildung E- 15B, C).

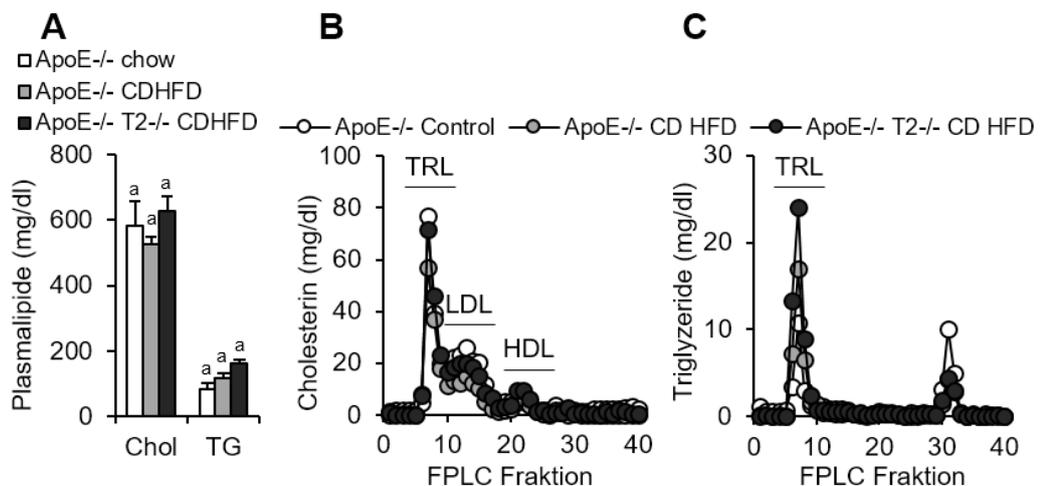


Abbildung E- 15: Plasmalipidkonzentrationen und Lipoproteinprofile von *ApoE*^{-/-}chow-, *ApoE*^{-/-}CDHFD- und *ApoE*^{-/-}*Trem2*^{-/-}CDHFD (*ApoE*^{-/-}T2^{-/-} CDHFD) -gefütterten Tieren

(A) Trotz der 26-wöchigen CDHFD Fütterung sind die Plasmacholesterin- (Chol) und Triglyzerid-Konzentrationen (TG) verglichen mit der *chow*-Kontrolle nicht unterschiedlich. (B) Auch die Lipoproteinprofile zeigen kaum Diskrepanzen. Auffällig in allen Gruppen ist die Akkumulation von *Remnant*-Partikeln, die durch den *ApoE*^{-/-}-Hintergrund zu erklären ist (n= 5). Die statistische Analyse der Daten wurde mittels ANOVA durchgeführt, Gruppen mit demselben Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant P≥0,05).

1.4.2 Analyse der Leberlipidakkumulation, des Leberschadens und der hepatischen Genexpression

Durch den langen Zeitraum der Fütterung war neben einer starken Lebersteatose auch eine hohe Leberschädigung sowie vermehrte Fibrose zu erwarten. Schon makroskopisch waren die Lebern der *ApoE*^{-/-}*Trem2*^{-/-} Tiere merklich größer und erschienen lipidhaltiger (Abbildung E- 16A). Auch die histologische Analyse zeigte eine deutliche Akkumulation von Lipiden nach

Fütterung der CDHFD, die durch den Verlust von *Trem2* noch verstärkt war (Abbildung E-16A). Die biochemische Quantifizierung der Leberlipide ergab, dass nach Fütterung der CDHFD eine vermehrte Akkumulation von Cholesterin in die Leber stattfand, welche durch den Verlust von *Trem2* tendenziell verstärkt wurde (Abbildung E-16B). Die Konzentration an Lebertriglyzeriden war unverändert (Abbildung E-16B). Zur Pathogenese von NASH gehört neben der Entwicklung von Steatose zudem die Entwicklung einer Fibrose. Wie in den *Sirius-Red* gefärbten Lebern in Abbildung E-16C zu erkennen, förderte die Fütterung einer CDHFD die Entwicklung von Fibrose, welche in *ApoE^{-/-}Trem2^{-/-}* Tieren stärker ausgeprägt war. Diese Beobachtung drückte sich auch in den Plasma ALT-Spiegeln aus, die ein Surrogat-Marker für Leberschädigung sind. Während die Kontrolltiere auf *chow*-Diät ALT Level um die 40 U/l aufwiesen, resultierte die CDHFD Fütterung in einer signifikanten Erhöhung (90 U/l), die durch den Verlust von *Trem2* noch um ein Vielfaches gesteigert wurde (ca. 300 U/l) und somit auf einen verschärften Leberschaden hindeutet (Abbildung E-16D).

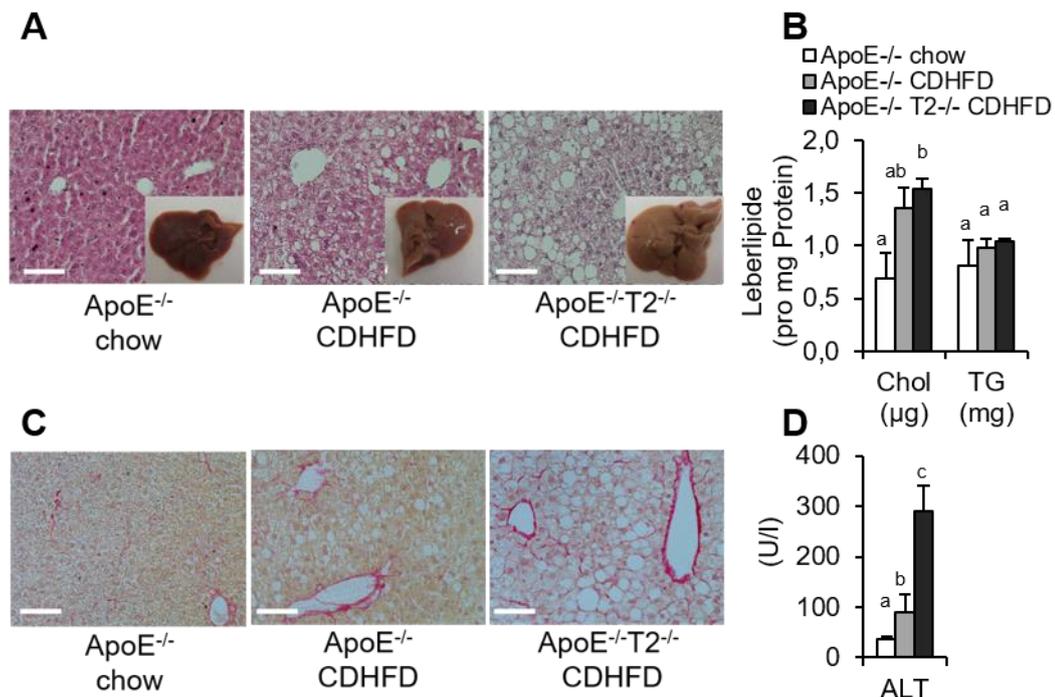


Abbildung E- 16: Lipidakkumulation und Schädigung in der Leber von *ApoE^{-/-}chow-*, *ApoE^{-/-}CDHFD-* und *ApoE^{-/-}Trem2^{-/-}CDHFD (ApoE^{-/-}T2^{-/-} CDHFD)* -gefütterten Tieren

Die 26-wöchige Fütterung einer CDHFD führt zur Ablagerung von Lipiden in die Leber, welche makroskopisch schon auf den ersten Blick und auch in der Hämatoxilin-Eosin-Färbung zu erkennen ist (A) und die sich auch biochemisch quantifizieren lässt (B). Der Verlust von *Trem2* verschärft die Lipidakkumulation und auch die Fibroseentwicklung, wie in den Sirius Red gefärbten Leberschnitten (C) zu erkennen ist. Auch die Plasmalevel der Alanin-Aminotransferase sind nach Fütterung der CDHFD erhöht, und deuten auf einen vermehrten Leberschaden hin. Deletion von *Trem2* hat hier einen exazerbierenden Effekt (n= 5). Die statistische Analyse der Daten wurde mittels ANOVA durchgeführt, Gruppen mit demselben Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant $P \geq 0,05$ Balken= 100 µM).

Die Analyse der Genexpression inflammatorischer Zytokine und Chemokine in der Leber war weder durch die Fütterung der CDHFD noch den Verlust von *Trem2* beeinflusst (Abbildung E- 17). Gemessen an der Expression von *Emr1* war die Anzahl der Makrophagen in der Leber

unverändert. Allerdings resultierte die CDHFD Fütterung in einer signifikant vermehrten Expression von *Trem2* (Abbildung E- 17B). Die Fütterung einer CDHFD resultierte zudem in einer signifikant verstärkten Expression von Fibrosemarkern. Passend zu den erhöhten ALT-Spiegeln (Abbildung E- 16D) und dem vermehrten *Sirius-Red* Signal (Abbildung E- 16C), führte der Verlust von *Trem2* zu einer nochmals gesteigerten Expression von Fibrosemarkern (Abbildung E- 17C).

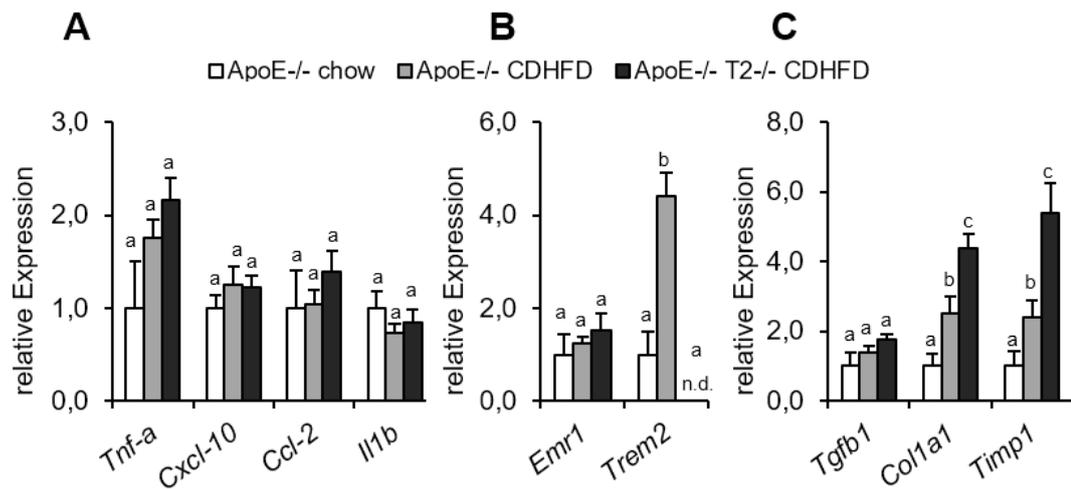


Abbildung E- 17: Hepatische Expression inflammatorischer Gene und fibrotischer Marker in ApoE^{-/-}chow-, ApoE^{-/-}CDHFD- und ApoE^{-/-}Trem2^{-/-}CDHFD-gefütterten Tieren Die Expression von inflammatorischen Genen (A) sowie Makrophagen-Markern (B) in der Leber wird weder durch Fütterung einer CDHFD noch durch den Verlust von *Trem2* beeinflusst. Die Expression von Fibrose-Markern (C) wird allerdings durch Fütterung einer CDHFD signifikant induziert (*Col1a1* und *Timp1*) und wird weiterhin durch den Verlust von *Trem2* verschärft (C) (n= 5). Die statistische Analyse der Daten wurde mittels ANOVA durchgeführt, Gruppen mit demselben Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant (P≥0,05).

Die 16-wöchige Fütterung einer CDHFD resultierte neben vermehrter Gewichtszunahme in gesteigerter Leberschädigung und vor allem Leberfibrose, die durch den Verlust von *Trem2* nochmals verstärkt wurde.

2 Auswirkungen von gesteigerter Energieaufnahme durch Adaption an einen Kälte-Reiz

Während im ersten Teil der Arbeit die Auswirkungen von gesteigerter Lipidzufuhr in die Leber im Kontext von Übergewicht untersucht wurden, sollte im zweiten Teil geklärt werden, welche Auswirkungen eine gesteigerte Lipidzufuhr in die Leber hat, wenn neben der Energiezufuhr auch der Energieumsatz erhöht ist. Zu diesem Zweck wurde der Energieverbrauch durch Induktion der Wärmeproduktion im braunen Fettgewebe (BAT) mittels Kälte-Exposition erhöht. Nach BAT-Aktivierung wird sowohl mit der Nahrung aufgenommene, als auch im Fettgewebe gespeicherte Energie in der sogenannten zitterfreien Thermogenese verbrannt und als Wärme abgegeben. Konsequenz dieses katabolen Prozesses ist eine gesteigerte Nahrungszufuhr. Ein besonderer Fokus dieser Studien lag auf der Untersuchung der Frage, inwieweit der Metabolismus in der Lage ist, eine erhöhte Zufuhr von Cholesterin zu kompensieren. Einerseits kann Cholesterin, anders als Triglyzeride und Glucose, nicht zur Energiegewinnung genutzt werden. Andererseits wirkt Cholesterin in zu hohen Konzentrationen toxisch und begünstigt zudem die Pathogenese verschiedener kardiovaskulärer Erkrankungen.

2.1 Systemische Änderungen des Cholesterin-Stoffwechsels nach BAT Aktivierung

Zunächst sollte untersucht werden, inwiefern sich die Aktivierung des braunen Fettgewebes auf den Cholesterin-Stoffwechsel auswirkt. Zu diesem Zweck erhielten C57BL/6J Wild-Typ-Mäuse (WT) im Alter von 12-14 Wochen für 10 Tage eine mit 0,2 % Cholesterin angereicherte WTD *ad libitum* und wurden für 7 Tage entweder bei 28 °C (warm) oder zur Aktivierung des BAT bei 6 °C (kalt) gehalten.

2.1.1 Postprandiale Cholesterinaufnahme nach Aktivierung des braunen Fettgewebes

Zunächst wurden gefasteten Wärme- und Kälte-adaptierten Mäusen Plasma entnommen und die Lipidkonzentrationen gemessen. Unter diesen Bedingungen zeigte sich eine deutliche Reduktion der Cholesterin-Konzentrationen im Plasma der Kälte-adaptierten Mäuse (Abbildung E- 18A). Um die Aufnahme von diätetischem Cholesterin zu untersuchen, wurde bei warmen und Kälte-exponierten Tieren nach 4-stündigem Fasten ein oraler Fetttoleranztest durchgeführt, wobei zusammen mit der verabreichten mizellaren Lipidmischung radioaktiv-markiertes Cholesterin als Tracer gegeben wurde. 4 Stunden nach der *Gavage* wurde den Tieren Blut und die Organe entnommen und die Organverteilung der Tracermenge mithilfe eines Szintillationszählers gemessen. Kälte-Adaption führte zu Änderungen in der Aufnahme von Cholesterin. Im Vergleich zu der Wärme-adaptierten Gruppe wurde in allen braunen Fettgewebsdepots eine doppelt bis dreifache Menge und somit signifikant mehr Radioaktivität gemessen, während die Counts im Plasma reduziert waren (Abbildung E- 18). Interessanterweise führte die Kälte-Aktivierung des BAT zur deutlich erhöhten Anzahl an

messbarer Tracer-Substanz in der Leber. So wurden durch die Kälte-Exposition 10 % der injizierten Gesamtdosis und damit ein sehr großer Anteil in der Leber wiedergefunden, während es in warmen Mäusen lediglich 5 % waren (Abbildung E- 18B). Kälte-Adaption resultierte demnach in einer vermehrten Aufnahme von Cholesterin in die braunen Fettgewebe und die Leber bei gleichzeitiger Reduktion von Plasmacholesterin.

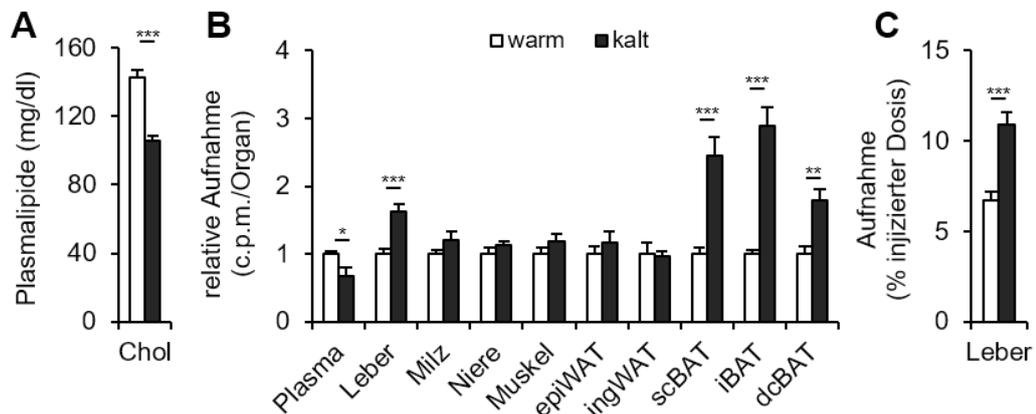


Abbildung E- 18: Plasmalipide und postprandiale Cholesterinaufnahme nach Aktivierung des braunen Fettgewebes durch Kälte

C57BL/6J-Mäuse wurden 10 Tage mit einer WTD gefüttert und bei 28° C (warm) oder zur Aktivierung des braunen Fettgewebes (BAT) 7 Tage bei 6° C (kalt) gehalten. Kälte-Adaption resultiert in signifikanter Reduktion der Plasma-Cholesterinkonzentration (A). Die Organverteilung von postprandial verabreichten, mit ³H-Cholesterin angereicherten Mizellen zeigt, dass in kalten Tiere signifikant mehr Cholesterin in alle BAT -Depots aufgenommen wird, während weniger Aktivität im Plasma zu finden ist (B). Unter kalten Bedingungen wird zudem mehr Aktivität in der Leber detektiert (C), was daraufhin deutet, dass die Leber in diesem Zustand mehr Cholesterin aufnimmt (n= 7). Die statistische Analyse der Daten wurde mittels *Student's T-test* durchgeführt, ****P* < 0,001; ***P* < 0,01; **P* < 0,05; epiWAT=epididymales weißes Fettgewebe, ingWAT=inguinales weißes Fettgewebe, scBAT= subscapuläres braunes Fettgewebe, iBAT=interscapuläres braunes Fettgewebe, dcBAT=deep cervical braunes Fettgewebe).

2.1.2 Induktion der hepatischen Gallensäuresynthese nach Kälte-Aktivierung des BAT

Cholesterin kann vom Organismus nicht zur Energiegewinnung genutzt werden und wirkt bei Akkumulation cytotoxisch. Die Leber nimmt beim Abbau und der Exkretion von Cholesterin eine zentrale Rolle ein. Die Ausscheidung von überschüssigem Cholesterin erfolgt nach Transformation in Gallensäuren über die hepatobiliäre Route mit finaler fäkaler Exkretion. Die Kälte-induzierte vermehrte Aufnahme von Cholesterin in die Leber ließ vermuten, dass auch Mechanismen zur Exkretion von Cholesterin beeinflusst waren. Zu diesem Zweck wurde die hepatische Expression von Gallensäure-synthetisierenden und -transportierenden Enzymen nach Kälteaktivierung mittels qPCR bestimmt. Die Expression von *Cyp7a1*, welches das Schlüsselenzym der Gallensäuresynthese codiert, war nach Kälte unverändert. Das für die Synthese von Cholsäure verantwortliche Enzym CYP8b1 (kodiert durch *Cyp8b1*) war in der Expression signifikant erhöht. Auch die Genexpression von *Cyp7b1*, welches von zentraler Bedeutung für den alternativen Gallensäuresyntheseweg ist, war signifikant gesteigert. Tendenziell war auch die Expression des Gallensäure-konjugierenden Enzyms *bile acid amino transferase* (BAAT, codiert durch *Baat*) und des Gallensäureexporters *bile salt exporter Protein* (BSEP, codiert durch *Abcb11*) vermehrt. Die Expression des *small heterodimer*

binding partner (SHP, codiert durch *Nr0b2*) war durch Kälte nicht beeinflusst (Abbildung E-19). Insgesamt legten die Ergebnisse die Vermutung nahe, dass es nach Kälte-Adaption zur verstärkten hepatischen Gallensäuresynthese, insbesondere über den alternativen Gallensäuresyntheseweg, kommt.

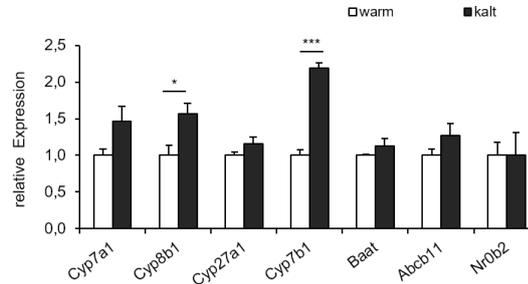


Abbildung E- 19: Hepatische Genexpression von Enzymen für Synthese und Transport von Gallensäuren nach Aktivierung des braunen Fettgewebes

C57BL/6J-Mäuse wurden 10 Tage mit einer WTD gefüttert und bei 28° C (warm) oder zur Aktivierung des braunen Fettgewebes (BAT) 7 Tage bei 6° C (kalt) gehalten. Die mRNA Expression in der Leber zeigt, dass es nach BAT Aktivierung zur signifikanten Induktion von Genen kommt, die für die Synthese (Cyp27a1, Cyp7b1, Cyp8b1) und den Export von Gallensäuren nötig sind (n=6). Die statistische Analyse der Daten wurde mittels *Student's T-test* durchgeführt, *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$).

Zur Validierung der Vermutung, dass es nach Kälte-Aktivierung neben verstärkter Expression von Gallensäuresyntheseenzymen auch zu vermehrter Gallensäuresynthese kommt, wurden anschließend mit Hilfe einer *liquid chromatography* (LC)-MS/MS-Methode (John et al. 2014) die Gallensäure-Konzentrationen in der Leber bestimmt. Wie erwartet, resultierte die Aktivierung des braunen Fettgewebes durch Kälte in signifikant erhöhten Gesamtspiegeln in der Leber. Sowohl die unkonjugierten (*unconjugated bile acids* UBA) als auch die konjugierten (*conjugated bile acids* CBA) Gallensäuren waren um ein Vielfaches vermehrt, wobei die CBA den größeren Anteil an der Summe bildeten (Abbildung E- 20A).

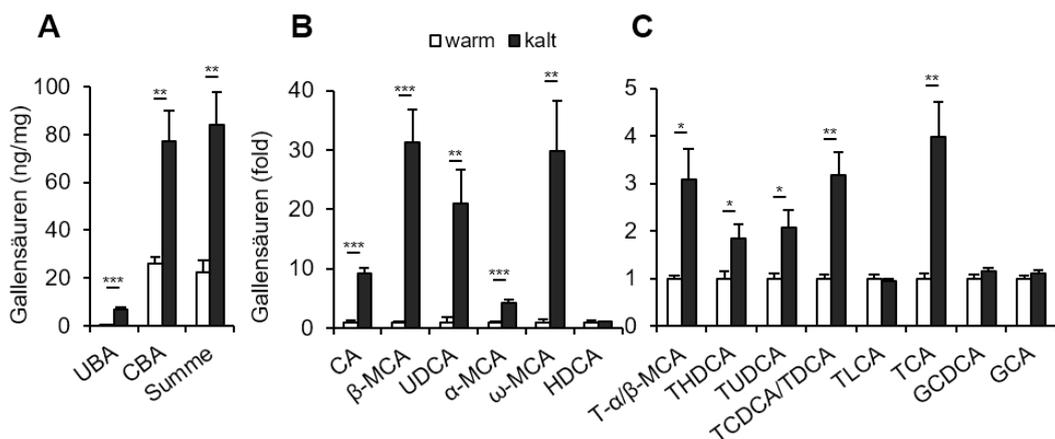


Abbildung E- 20: Hepatische Gallensäure-Konzentrationen nach Aktivierung des braunen Fettgewebes durch Kälte

C57BL/6J-Mäuse wurden 10 Tage mit einer WTD gefüttert und bei 28° C (warm) oder zur Aktivierung des braunen Fettgewebes (BAT) 7 Tage bei 6° C (kalt) gehalten. Nach Aktivierung des braunen Fettgewebes steigt die Gesamtkonzentration an unkonjugierten (UBA) und konjugierten (CBA) in der Leber signifikant an (A). Einige UBA-Spezies (B) sind im Vergleich zur warmen Kontrolle 30-fach induziert (β -MCA). Auch das Gros der CBA-Spezies (C) ist nach Kälte relativ zur Kontrolle signifikant erhöht (n= 5-6). Die statistische Analyse der Daten wurde mittels *Student's T-test* durchgeführt, *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$).

Die Konzentrationen einiger UBA-Spezies, wie z.B. die von β -Muricholic acid (β -MCA), waren durch die Kälte-Behandlung 30-fach induziert (Abbildung E- 20B). Auch die Konzentrationen der CBA-Spezies waren deutlich gesteigert. Insbesondere bewirkte die Kälte-Behandlung eine 4-fache Zunahme von *Tauro- α - β -muricholic acid* (T- α - β -MCA) und *Taurocholic acid* (TCA) (Abbildung E- 20C). Diese Ergebnisse unterstützen die Vermutung einer Kälte-induzierten Gallensäuresynthese.

2.1.3 Verstärkte fäkale Ausscheidung von Gallensäuren nach Kälte-Behandlung

Zur Klärung der Frage, ob die Aktivierung des braunen Fettgewebes durch Kälte neben der Stimulation des hepatischen Gallensäure-Stoffwechsels auch die fäkale Exkretion von Gallensäuren beeinflusst, wurden die Gallensäure-Konzentrationen in den Fäzes von warm und kalt behandelten Tieren gemessen. Wie aus Abbildung E- 21A hervorgeht, führte die Kälte-Aktivierung auch zur massiv gesteigerten, ca. verdreifachten Ausscheidung von Gallensäuren in den Fäzes (Summe). Während in warmen Tieren ca. 600 ng UBA pro mg Fäzes ausgeschieden wurden, verdoppelte sich die Ausscheidung von UBA auf ca. 1000 ng Gallensäuren pro mg Fäzes. In den warmen Tieren stellten die UBA auch den weitaus größeren Anteil an der Gesamtsumme aller ausgeschiedenen Gallensäuren. Dies änderte sich durch die Kälte-Behandlung stark, da der Anteil ausgeschiedener CBA massiv anstieg (von ca. 60 ng/mg Fäzes in warmen Tieren, auf ca. 1000 ng/mg Fäzes in kalten Tieren) und den halben Anteil des Pools ausmachte (Abbildung E- 21A). Dazu passend stieg nach Kälte der Anteil einiger CBA Spezies, wie zum Beispiel der von TCA und *Taurohyodeoxycholic acid* (THDCA) signifikant um ca. das 40-fache an (Abbildung E- 21B).

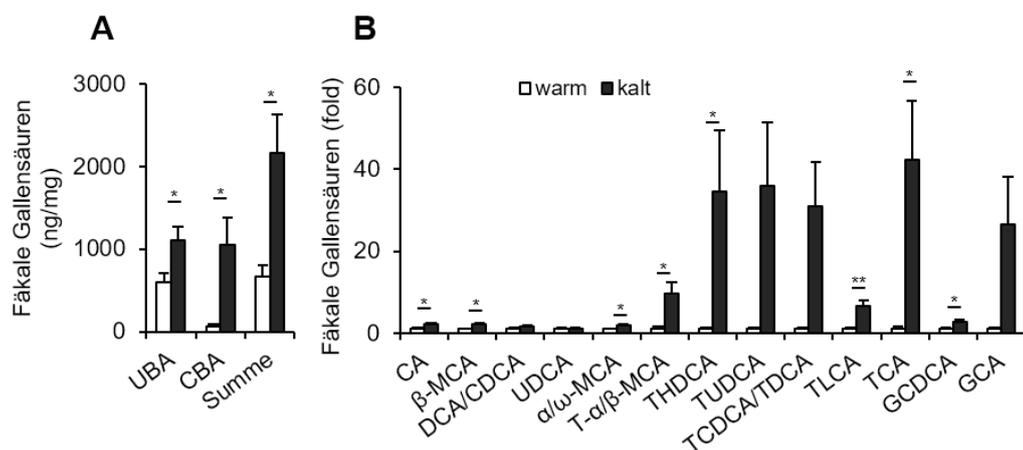


Abbildung E- 21: Gallensäure-Konzentrationen in den Fäzes nach Aktivierung des braunen Fettgewebes durch Kälte

C57BL/6J-Mäuse wurden 10 Tage mit einer WTD gefüttert und bei 28° C (warm) oder zur Aktivierung des braunen Fettgewebes (BAT) 7 Tage bei 6° C (kalt) gehalten. (A) Nach Kälte-Aktivierung des braunen Fettgewebes werden sowohl signifikant mehr unkonjugierte (UBA) als auch konjugierte (CBA) Gallensäuren im Fäzes ausgeschieden. Insbesondere die Ausscheidung von CBA ist massiv, für einige Spezies 50-fach, erhöht (n= 5). Die statistische Signifikanz der Daten wurde mittels *Student's T-test* bestimmt, *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$).

Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Kälte-Aktivierung des BAT zu systemischen Änderungen im Cholesterin- und Gallensäure-Stoffwechsel führte, welche durch erhöhte Cholesterinaufnahme in die Leber, stimulierte hepatische Gallensäuresynthese und gesteigerte fäkale Gallensäureexkretion charakterisiert waren.

2.2 Änderungen des Gallensäure-Stoffwechsels sind abhängig von *Cyp7b1* und diätetischer Cholesterinzufuhr

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, welche Faktoren für die Kälte-induzierte Gallensäuresynthese von essentieller Bedeutung sind. Einerseits wurde die Bedeutung der Enzyme der Gallensäuresynthese und andererseits aber auch die Bedeutung der Substratverfügbarkeit untersucht.

2.2.1 *Cyp7b1* kontrolliert Kälte-induzierte Gallensäuresynthese

Nach Kälte-Adaption wurde neben erhöhten hepatischen und fäkalen Gallensäure-Konzentrationen vor allen Dingen eine gesteigerte Expression von Gallensäure synthetisierenden Enzymen in der Leber detektiert (Abbildung E- 17, Abbildung E- 19, Abbildung E- 20, Abbildung E- 21). Das am stärksten regulierte Gen war hierbei *Cyp7b1*, welches das zentrale Enzym im alternativen Gallensäuresyntheseweg codiert. Um die funktionelle Relevanz dieser Regulation zu untersuchen, erhielten neben C57BL/6J WT-Mäusen auch *Cyp7b1*^{-/-}- Mäuse für 10 Tage eine WTD und wurden für 7 Tage Kälte exponiert (kalt). Bei 28 °C gehaltene Tiere (warm) dienten als Kontrollen. Es wurde das Gewicht überwacht und nach Organentnahme wurden Plasma und Leberlipide quantifiziert.

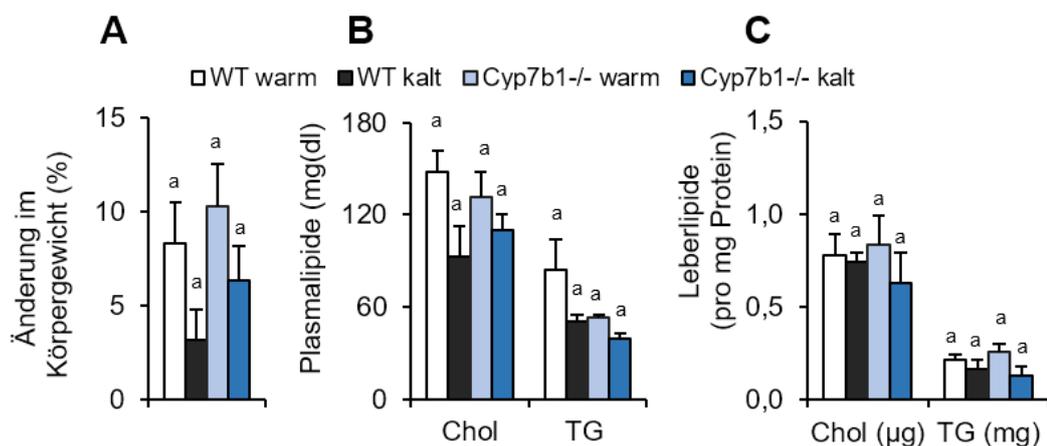


Abbildung E- 22: Körpergewicht, Plasma- und Leberlipide von *Cyp7b1*^{-/-}- und Kontrollmäusen (WT) nach Aktivierung des braunen Fettgewebes durch Kälte

Cyp7b1^{-/-}-Mäuse und respektive Kontrollen (WT) erhielten 10 Tage eine WTD und wurden dann 7 Tage entweder bei 28° C (warm) oder zur Aktivierung des braunen Fettgewebes (BAT) bei 6° C gehalten. (A) Tendenziell nehmen die warm gehaltenen Tiere unabhängig von der *Cyp7b1*-Defizienz etwas mehr Gewicht zu, als die kalt gehaltenen Tiere. (B) Ein ähnliches Muster ergibt sich auch für die Plasmacholesterinwerte (Chol). Hier führt Kälte-Behandlung *Cyp7b1*-unabhängig tendenziell zur moderaten Reduktion von Cholesterin, allerdings gibt es keine signifikanten Änderungen. Auch die Plasmatriglyzerid-Konzentration (TG; (B)) sowie die Leberlipide sind nicht verändert (n=4- 5). Die statistische Analyse der Daten wurde mittels ANOVA durchgeführt, Gruppen mit demselben Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant (P≥0,05).

Wie aus Abbildung E- 22 hervorgeht, unterschieden sich *Cyp7b1*^{-/-}-Tiere nicht von den WT-Tieren. Wie in den WT-Mäusen führte 7-tägige Kälteaktivierung auch in den *Cyp7b1*^{-/-}-Mäusen tendenziell zu Gewichtsverlust (Abbildung E- 22A) und zur Reduktion von Plasmacholesterin- und Plasmatriglyzerid-Konzentrationen (Abbildung E- 22B). Unter warmen Bedingungen waren die Plasmakonzentrationen an Triglyzerid in den *Cyp7b1*^{-/-}-Tieren (ca. 60 mg/dl) verglichen mit den WT-Tieren (ca. 100 mg/dl) schwach reduziert. Auch die Leberlipide unterschieden sich zwischen *Cyp7b1*^{-/-}- und WT-Kontrolltieren nicht (Abbildung E- 22C).

Im nächsten Schritt wurden die Gallensäure-Konzentrationen sowohl in der Leber als auch im Fäzes analysiert. In Abbildung E- 23 sind Änderungen der Gallensäure-Konzentrationen als *Heatmap* dargestellt. Die *Heatmaps* zeigen jeweils die relativen Änderungen verglichen mit der warm behandelten Wildtypgruppe. Zur verbesserten Übersichtlichkeit sind jeweils nur Kälte- behandelte Tiere dargestellt. Die in WT-Tieren detektierten Induktionen verschiedener Gallensäurespezies (wie z.B. β -MCA, T- α - β -MCA und TDCA) sowie der deutliche Anstieg an UBA in der Leber war in kalten *Cyp7b1*^{-/-}-Tieren dramatisch reduziert (Abbildung E- 23A). Obgleich nicht so deutlich wie für die UBA, war der Kälte-Effekt auch für die meisten CBA-Spezies in den *Cyp7b1*^{-/-}-Mäusen abgeschwächt (Abbildung E- 23A).

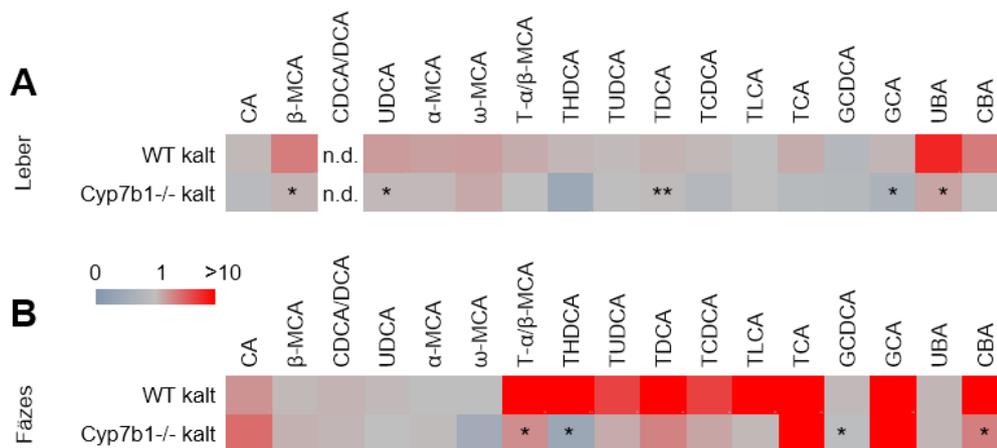


Abbildung E- 23: Gallensäure-Profile in der Leber sowie in den Fäzes von *Cyp7b1*^{-/-} und Kontrolltieren nach 7-tägiger Kälte-Exposition

Cyp7b1^{-/-}-Mäuse und respektive Kontrollen erhielten 10 Tage eine WTD und wurden dann 7 Tage entweder bei 28° C (warm) oder zur Aktivierung des braunen Fettgewebes (BAT) bei 6° C gehalten. (A) Nach Kälte-Aktivierung steigen die Gallensäurelevel in der Leber von WT-Kontrollmäusen stark an. Dieser Anstieg ist in den *Cyp7b1*^{-/-}-Tieren nach Kälte aufgehoben. (B) Auch die Gallensäuregehalte im Fäzes unterscheiden sich *Cyp7b1*-abhängig. Die Kälte-Behandlung im WT erhöht die Ausscheidung von Gallensäuren massiv. In *Cyp7b1*^{-/-}-Mäusen ist die Kälte-induzierte Ausscheidung reduziert. (Die Daten sind relativ zu warmen Kontrolltieren dargestellt; n=4-5 pro Gruppe, Die statistische Analyse der Daten wurde mittels *Student's T-test* durchgeführt, ****P* < 0,001; ***P* < 0,01; **P* < 0,05).

Im Fäzes führte der Verlust von *Cyp7b1* ebenfalls zu einer stark reduzierten Ausscheidung von Gallensäuren. Wurde im Fäzes von WT-Tieren nach Kälte eine 30-fach und teils signifikante verstärkte Ausscheidung vor allem von CBA, wie T- α - β -MCA und THDCA, detektiert, so war diese in den *Cyp7b1*^{-/-}-Tieren um das Dreifache verringert. Eine Ausnahme bildete hier CA zusammen mit TCA. Die Kälte-induzierte Ausscheidung dieser Gallensäuren

war vergleichbar mit der von WT-Tieren (Abbildung E- 23B). Zusammenfassend führte der Verlust *Cyp7b1* nach Kälte zu keinerlei Änderung des Körpergewichts oder der Plasmalipide, resultierte aber in deutlich reduzierten hepatischen und fäkalen Gallensäure-Konzentrationen.

2.2.2 Reduktion der hepatischen Cholesterinzufuhr durch Blockieren der intestinalen Cholesterinaufnahme

Um den Einfluss der diätetischen Cholesterinzufuhr für die Kälte-induzierte Gallensäuresynthese zu untersuchen, sollte die intestinale Cholesterinaufnahme unterbunden werden. Dies erfolgte durch eine pharmakologische Intervention mit Ezetimib (EZ). EZ blockiert den für die Cholesterinabsorption verantwortlichen Transporter NPC1L1 und hemmt somit die Aufnahme von Cholesterin aus der Diät. Für die Studie erhielten C57BL/6J WT-Mäuse 10 Tage lang eine WTD und wurden über einen Zeitraum von 7 Tagen entweder bei 4 °C (kalt) oder bei 28 °C (warm) gehalten. Je die Hälfte der warmen und kalten Gruppe erhielt EZ (6 mg/kg Körpergewicht) über das Futter. Über den gesamten Studienzeitraum wurde die Futtermenge gemessen und am Ende das Körpergewicht bestimmt. Nach Organentnahme wurden Plasma und Leberlipide quantifiziert.

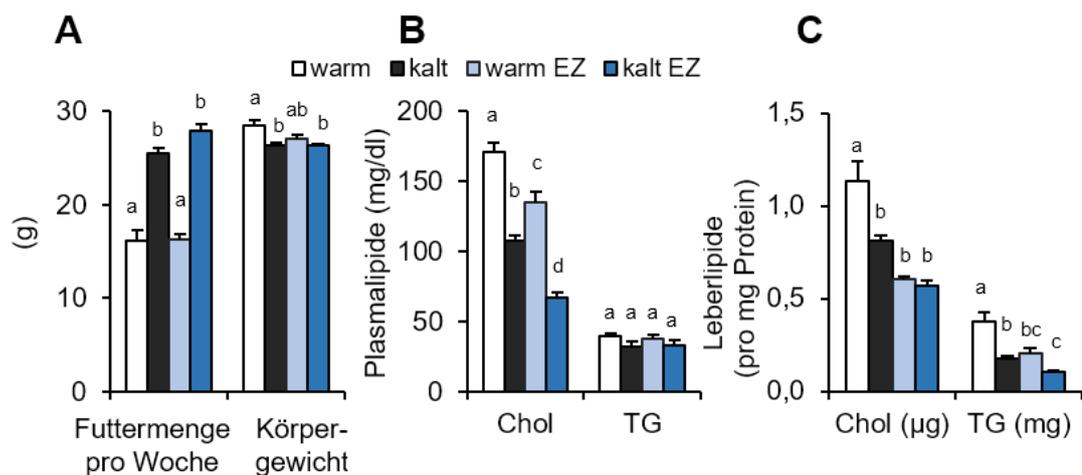


Abbildung E- 24: Futtermenge, Körpergewicht sowie Plasma- und Leberlipide in EZ-behandelten- und Kontrolltieren nach 7-tägiger Kälte-Exposition

C57BL/6J-Mäuse erhielten 10 Tage eine WTD und wurden bei 28° C (warm) oder zur Aktivierung des braunen Fettgewebes (BAT) 7 Tage bei 6° C (kalt) gehalten. Um die Aufnahme von diätetischem Cholesterin aus der Nahrung zu unterbinden, wurde den Tieren zusätzlich Ezetimib (EZ) verabreicht. (A) Unabhängig von der EZ-Behandlung nehmen kalt-gehaltene Tiere mehr Futter zu sich, haben aber ein reduziertes Körpergewicht verglichen mit warmen Kontrollen. (B) Während die Plasmakonzentration an Triglyzeriden (TG) weder durch Kälte noch durch EZ verändert ist, ist die Plasmacholesterin-Konzentration (Chol) nach EZ und Kälte signifikant reduziert. (C) Auch die Lipidakkumulation in der Leber nach Kälte- und/oder EZ-Behandlung ist verändert (n=8). Die statistische Analyse der Daten wurde mittels ANOVA durchgeführt, Gruppen mit demselben Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant (P≥0,05).

Kälte-Exposition führte annähernd zu einer Verdoppelung der Menge des konsumierten Futters (von ca. 15 g in warmen Tieren auf knapp 30 g in kalten Tieren pro Woche). Dies war unabhängig von der EZ-Behandlung (Abbildung E- 24A). Während das Körpergewicht von Kälte-exponierten Kontrolltieren leicht aber dennoch signifikant reduziert war, änderte sich

das Körpergewicht der warmen EZ-behandelten Tieren weder im Vergleich zu den warmen Kontrollen (warm) noch zu den kalten EZ-behandelten Tieren (Abbildung E- 24A). Wie zu erwarten, zeigten sich erhebliche Unterschiede in der Konzentration von Plasmacholesterin. In Kontrollen führte die Kälte-Aktivierung des BAT zu signifikant erniedrigten Cholesterinspiegeln (von ca. 170 mg/dl in warmen Tieren auf ca. 100 mg/dl in kalten Tieren). Schon basal bewirkte die EZ-Behandlung eine Senkung der Plasmacholesterin-Konzentration (auf ca. 130mg/dl), die durch die gleichzeitige Kälte-Exposition noch weiter verstärkt wurde (auf ca. 75 mg/dl) (Abbildung E- 24B). Die Plasmatriglyzerid-Konzentrationen waren weder durch Kälte- noch durch EZ-Behandlung verändert (Abbildung E- 24B). Die Interventionen wirkten sich auch auf die Leberlipidkonzentrationen aus. Verglichen mit warmen Kontrollen resultierte Kälte-Exposition in einer signifikanten Reduktion von Cholesterin (von ca. 1 auf ca. 0,75 $\mu\text{g}/\text{mg}$ Protein). Ähnlich wie im Plasma führte die Behandlung mit EZ schon basal zur Reduktion der Cholesterinkonzentration in der Leber, die aber durch Kälte nicht weiter gesteigert wurde (Abbildung E- 24C). In Kontrolltieren bewirkte Kälte-Exposition zudem eine verringerte Einlagerung von Triglyzeriden in die Leber. Verglichen mit den warmen Kontrolltieren erzielte die EZ-Behandlung denselben Effekt, wurde aber durch gleichzeitige Kälte-Exposition nicht mehr weiter verstärkt (Abbildung E- 24C).

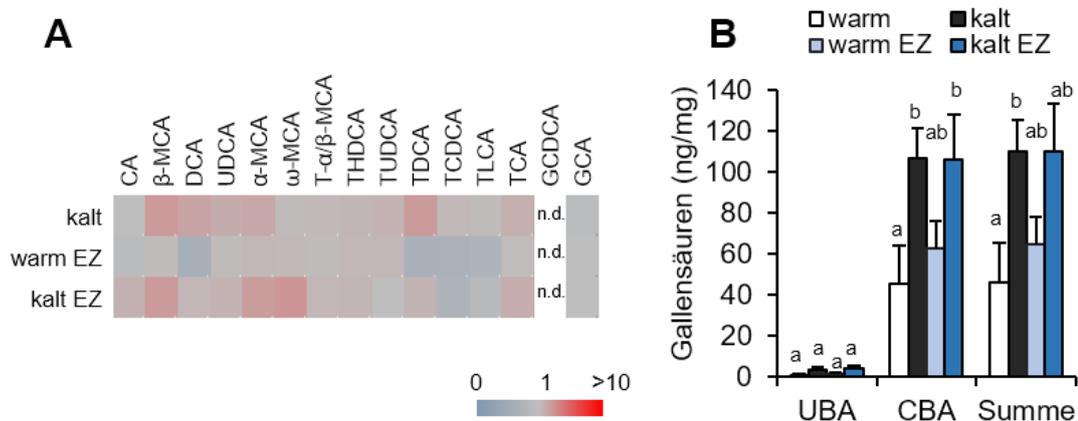


Abbildung E- 25: Hepatische Gallensäureprofile in EZ-behandelten- und Kontrolltieren nach 7-tägiger Kälte-Exposition

C57BL/6J-Mäuse erhielten 10 Tage eine WTD und wurden bei 28° C (warm) oder zur Aktivierung des braunen Fettgewebes (BAT) 7 Tage bei 6° C (kalt) gehalten. Um die Aufnahme von diätetischem Cholesterin aus der Nahrung zu unterbinden, wurde den Tieren zusätzlich Ezetimib (EZ) verabreicht. (A) Die nach Kälte beobachtete Erhöhung verschiedener Gallensäurespezies ist auch nach EZ-Behandlung vorhanden, wobei die EZ-Behandlung allein die Gallensäuregehalte nicht verändert. (B) Die Quantifizierung bestätigt, dass nach Kälte unabhängig von der EZ-Behandlung die Gallensäurekonzentrationen, insbesondere die der konjugierten (CBA), erhöht sind (n=8). Die Daten in (A) sind relativ zu warmen Kontrolltieren dargestellt. Die statistische Analyse der Daten wurde mittels ANOVA durchgeführt, Gruppen mit demselben Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant (P \geq 0,05).

Um die Wirkung von EZ auf den Gallensäure-Stoffwechsel zu untersuchen, wurden auch die Gallensäure-Konzentrationen in der Leber und in den Fäzes bestimmt. Abbildung E- 25A zeigt die Änderungen der einzelnen Gallensäurespezies in der Leber als *Heatmap* in Relation zu den warmen Kontrollen. Die schon vorher beobachtete Erhöhung der Gallensäure-

Konzentrationen nach Kälte zeigte sich auch in dieser Studie und erfolgte unabhängig von der EZ-Behandlung. Die Konzentrationen von z.B. α -MCA, β -MCA, und TCA waren sowohl in den Kälte- als auch in den gleichzeitig Kälte- und EZ-behandelten Tieren erhöht. EZ-Behandlung allein änderte die Gallensäurelevel kaum. Die Quantifizierung der Gallensäuren bestätigte diese Ergebnisse und unterstrich die signifikante Erhöhung insbesondere von CBA nach Kälte. Wie schon zuvor beschrieben (Teil E2.1.2), machten auch hier die CBA den Hauptanteil der hepatischen Gallensäuren aus. (Abbildung E- 25).

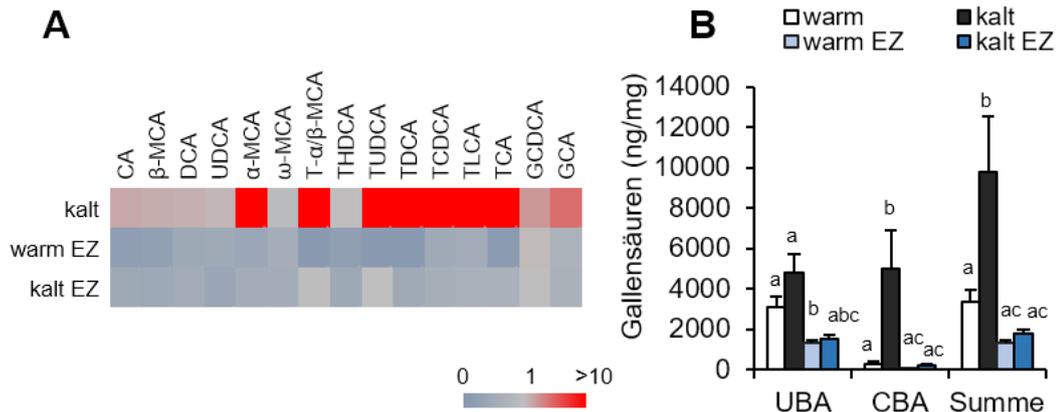


Abbildung E- 26: Gallensäureprofile von Fäzesproben EZ-behandelter- und Kontrolltiere nach 7-tägiger Kälte-Exposition

C57BL/6J-Mäuse erhielten 10 Tage eine WTD und wurden bei 28° C (warm) oder zur Aktivierung des braunen Fettgewebes (BAT) 7 Tage bei 6° C (kalt) gehalten. Um die Aufnahme von diätetischem Cholesterin aus der Nahrung zu unterbinden, wurde den Tieren zusätzlich Ezetimib (EZ) verabreicht. (A) Die Gallensäureprofile von kalten Kontroll- und EZ behandelten Mäusen unterscheiden sich deutlich. (B) Wie die Quantifizierung zeigt, ist die erhöhte Ausscheidung von Gallensäuren nach Kälte-Behandlung in EZ-behandelten Tieren signifikant reduziert (n=8). Die Daten in (A) sind relativ zu warmen Kontrolltieren dargestellt. Die statistische Analyse der Daten wurde mittels ANOVA durchgeführt, Gruppen mit demselben Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant P \geq 0,05).

Obwohl die EZ-Behandlung keinen Einfluss auf die hepatische Gallensäurekonzentration hatte, führte sie interessanterweise zu veränderten Gallensäurespiegeln in den Fäzes. Abbildung E- 26A zeigt die Änderungen der fäkalen Gallensäure-Konzentrationen relativ zu warmen Kontrollmäusen. Während die Aktivierung des BAT durch Kälte wiederum zur Erhöhung von besonders CBA im Fäzes führte, wurden diese Induktionen bei gleichzeitiger EZ-Behandlung nicht detektiert. Verglichen mit den warmen Kontrolltieren waren die meisten BA-Spezies in den warm EZ- und kalt EZ- behandelten Tieren unverändert. Die Konzentrationen von z.B. T- α / β -MCA und *Tauroursodeoxycholic acid* (TUDCA) waren in EZ-behandelten Tieren sogar vermindert (Abbildung E- 26A). Die Quantifizierung untermauerte die bereits oben gefundenen Ergebnisse (Teil E2.1.3) nochmals. Kälte-Behandlung führte zur vermehrten Ausscheidung von Gallensäuren, wobei vor allem die Ausscheidung von CBA massiv gesteigert war (Abbildung E- 1Abbildung E- 26B). Nach EZ-Behandlung war diese vermehrte Ausscheidung aufgehoben und die CBA-Konzentrationen der Kälte- und gleichzeitig EZ-behandelten Tiere waren vergleichbar zu denen der warmen Kontrolltiere. In der Summe resultierte die EZ-Behandlung, unabhängig von der

Umgebungstemperatur, sogar in einer tendenziellen Reduktion der fäkalen Gallensäure-Konzentrationen (Abbildung E- 26B). Insgesamt resultierte die Inhibition der diätetischen Cholesterinaufnahme in verminderten Plasma- und Lebercholesterin-Konzentrationen. Obwohl die hepatischen Gallensäure-Konzentrationen durch die EZ-Behandlung nicht beeinflusst waren, war die Kälte-induzierte vermehrte fäkale Ausscheidung von Gallensäuren durch die EZ-Behandlung aufgehoben.

2.3 Gallensäuren modulieren das intestinale Mikrobiom nach Kälte

Gallensäuren interagieren mit dem intestinalen Mikrobiom auf vielfältige Art und Weise. Einerseits wurde beschrieben, dass Gallensäuren bakteriostatisch wirken können (Islam et al. 2011) andererseits modifizieren Darmbakterien Gallensäuren. So katalysieren sie Dekonjugierungs- und Hydroxylierungs-Reaktionen und tragen so maßgeblich zum Gallensäure-Stoffwechsel bei. Aktuelle Studien zeigen, dass eine Kälte-Aktivierung des braunen Fettgewebes mit Änderungen in der Komposition des Darmmikrobioms assoziiert ist (Chevalier et al. 2015; Zietak et al. 2016). Der zugrundeliegende Mechanismus dieser Änderungen wird in diesen Studien teilweise diskutiert, aber experimentell nur unzureichend untersucht. Die oben beschriebenen Veränderungen des Gallensäure-Stoffwechsels, insbesondere die massiv gesteigerte fäkale Ausscheidung von Gallensäuren führte zur Hypothese, dass die geänderten Gallensäure-Konzentrationen für die beobachteten Veränderungen im Darmmikrobiom ausschlaggebend sein könnten. Um diese Vermutung zu prüfen, wurde aus frischen Fäzes-Proben DNA isoliert und zur Bestimmung der mikrobiellen Zusammensetzung die 16S-DNA sequenziert. Wie in Abbildung E- 27A zu sehen, führte die Kälte-Behandlung zur veränderten Zusammensetzung des Darmmikrobioms. In der, auf *weighted UniFrac distances* basierenden, *multi-dimensional scale* (MDS) Analyse zeigte sich eine klare Separation der kalten von der warmen Gruppe (Abbildung E- 27A).

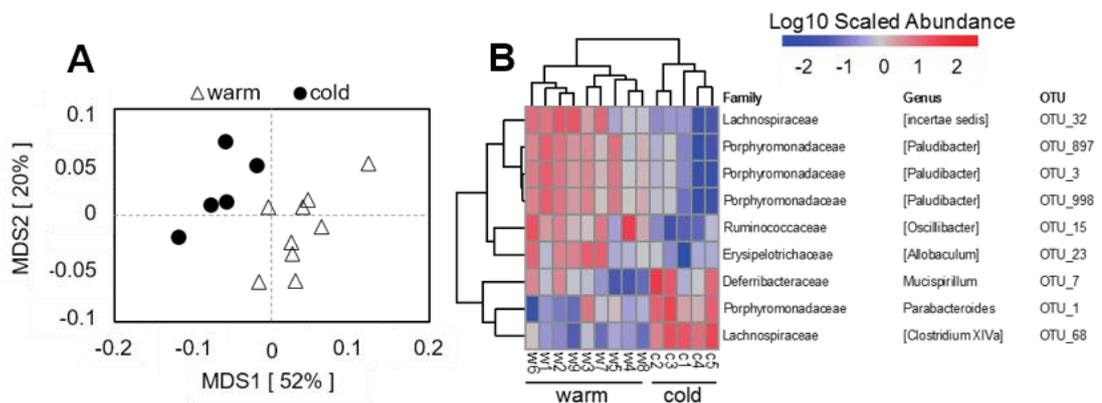


Abbildung E- 27: Änderung des intestinalen Mikrobioms nach Kälte-Aktivierung des braunen Fettgewebes

C57BL/6J-Mäuse wurden 10 Tage mit einer WTD gefüttert und bei 28° C (warm) oder zur Aktivierung des braunen Fettgewebes (BAT) 7 Tage bei 6° C (kalt) gehalten. Um die Komposition des intestinalen Mikrobioms zu bestimmen, wurde DNA aus Fäzes-Proben isoliert und die 16S-DNA sequenziert (A) *Multi-dimensional scale* (MDS) Analyse der Mikrobiomdaten basierend auf den *weighted UniFrac distances* zeigt eine haltungsabhängige Separation. Auch in einer Spezies-basierten, hierarchischen Clusteranalyse kann eine Trennung des warmen und des kalten Mikrobioms detektiert werden. (n= 5-9).

Auch die Spezies-basierte hierarchische Clusteranalyse, die auf *operational taxonomic units* (OTU) aufbaut, teilte eindeutig die warm- und einen kalt-gehaltenen Tieren in unterschiedliche Gruppen. Während in der warmen Gruppe mehr der oben aufgelisteten OTU gefunden wurden (*Lachnospiraceae*, *Porphyromonadaceae*, *Ruminococcaceae*), wurden weniger dieser OTUs

bei den Kälte-adaptierten Tieren detektiert und umgekehrt (Abbildung E- 27B). Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse, dass es auch nach vergleichsweise kurzer Kälte-Exposition zu Änderungen in der Komposition der Darmbakterien kommt.

Wie in Teil E2.2.2 beschrieben, resultierte die Behandlung mit EZ in einer Aufhebung des Kälte-Effektes in Bezug auf die fäkale Ausscheidung von Gallensäuren. Vielmehr führte die EZ-Behandlung dazu, dass sich die fäkalen Gallensäure-Konzentrationen nach Kälte den Konzentrationen der warmen Tiere angleichen (Abbildung E- 26). Gemäß der Hypothese, dass veränderte Gallensäure-Konzentrationen die Änderungen des Darmmikrobioms nach Kälte vermitteln, sollten folglich nach EZ-Behandlung keine oder verminderte Änderungen in der Komposition des Darmmikrobioms vorliegen. Um diese Vermutung zu untersuchen, wurde frischer Fäzes von warmen, Kälte-behandelten und gleichzeitig Kälte- sowie EZ-behandelten Tieren gesammelt. Nach Sequenzierung der 16S DNA wurden die Änderungen im Mikrobiom analysiert (Ruhlemann et al. 2016).

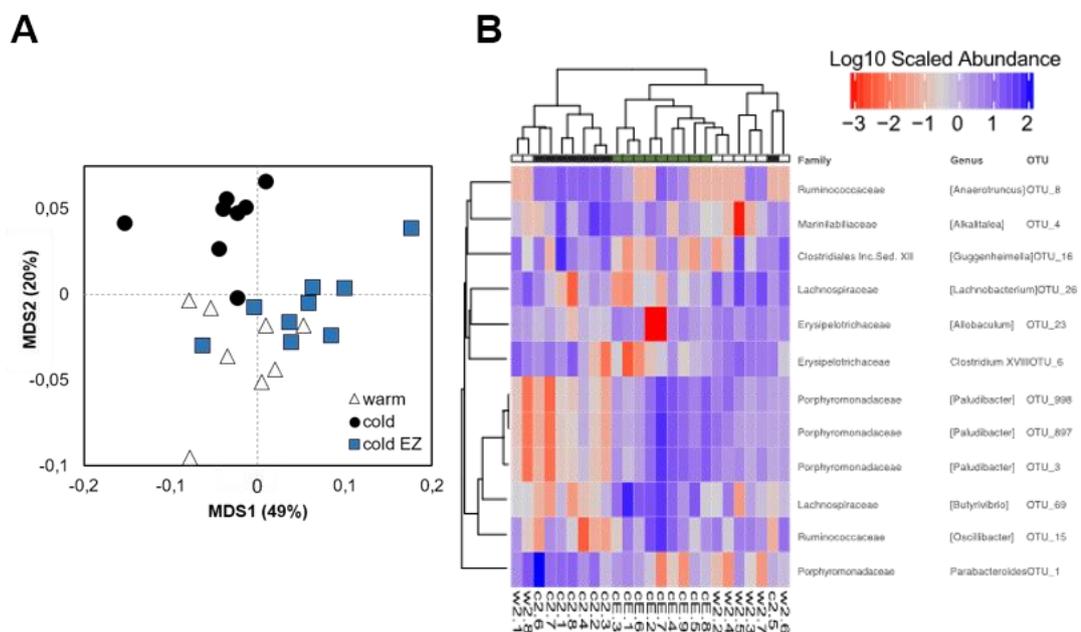


Abbildung E- 28: Änderungen des intestinalen Mikrobioms von EZ-behandelten- und Kontrolltieren nach 7-tägiger Kälte-Exposition

C57BL/6J-Mäuse erhielten 10 Tage eine WTD und wurden bei 28° C (warm) oder zur Aktivierung des braunen Fettgewebes (BAT) 7 Tage bei 6° C (kalt) gehalten. Um die Aufnahme von diätetischem Cholesterin aus der Nahrung zu unterbinden, wurde den Tieren zusätzlich Ezetimib (EZ) verabreicht. Zur Untersuchung des intestinalen Mikrobioms wurde die DNA aus Fäzesproben isoliert und die 16S-DNA sequenziert. (A) Eine auf den *weighted UniFrac distances* basierende *Multi-dimensional scale* (MDS) Analyse zeigt eine klare Separation von warmen und kalten Proben, während die Proben von EZ- und Kälte behandelten Tieren nicht von den warmen Proben abgesondert liegen. (B) Auch im hierarchischen Clustering zeigen die EZ-behandelten Tiere eine stärkere Nähe zu warmen Proben. (n=8).

Wie in Abbildung E- 28A zu sehen zeigte ein MDS Plot der *weighted Unifac Distances* eine klare Separation der kalten Gruppe. Im Gegensatz dazu führte die EZ-Behandlung kalter Mäuse dazu, dass keine eindeutige Trennung von der warmen Gruppe mehr erfolgte. Passend zu den angeglichenen Gallensäure-Konzentrationen, ähnelte auch hier das Mikrobiom der

kalten EZ-behandelten Gruppe dem der warmen Gruppe. Dieser Befund wurde zudem mit Hilfe einer hierarchischen Clusteranalyse bestätigt (Abbildung E- 28B). Einzig die ausschließlich mit Kälte-behandelten Tieren bildeten einen einzelnen Ast. Die gleichzeitig kalt- und EZ-behandelten Tiere entsprangen demselben Ast wie die warm gehaltenen Kontrolltiere. Während einige OTUs in der kalten Gruppe reduziert waren (z.B. *Porphyromonaceae*) waren diese in der warmen sowie in der kalt EZ-behandelten Gruppe gleichsam vermehrt (Abbildung E- 28B). Diese Ergebnisse zeigen, dass eine EZ-Behandlung nicht nur zur Reduktion von fäkalen Gallensäuren, sondern auch zur Aufhebung der damit verbundenen Änderungen im Darmmikrobiom führte.

Zusammenfassend zeigten die in Teil E2 beschriebenen Ergebnisse, dass eine gesteigerte Energiezufuhr in die Leber, wie sie nach Aktivierung des braunen Fettgewebes erfolgt, keine negativen Konsequenzen für den Organismus nach sich zieht. Vielmehr konnte die durch erhöhten Energieumsatz verursachte gesteigerte Energieaufnahme kompensiert werden. In dieser Arbeit wurde insbesondere die Bedeutung des alternativen Gallensäuresyntheseweges für die Exkretion von diätetischem Cholesterin beschrieben. Dieser beinhaltet den beschleunigten Zustrom zur Leber, wo Cholesterin als Substrat für eine gesteigerte CYP7B1-abhängige Synthese von Gallensäuren dient, welche anschließend vermehrt über den Fäzes ausgeschieden werden. Interessanterweise wurden Hinweise geliefert, dass die gesteigerten Konzentrationen von fäkalen Gallensäuren Änderungen im intestinalen Mikrobiom verursachen.

1 Auswirkungen von gesteigerter Lipidzufuhr zur Leber: Die Rolle von TREM Proteinen bei der Progression von Einfacher Steatose zu Nichtalkoholischer Steatohepatitis (NASH)

1.1 Die Rolle von TREM Rezeptoren für die Pathogenese von NASH im diätetischen NAFLD Modell

Durch die zunehmend pandemische Ausbreitung von Adipositas kommt es neben steigender Prävalenz von Insulinresistenz, Dyslipidämie und kardiovaskulären Erkrankungen auch zum vermehrten Auftreten von Fettleber und NASH. Man nimmt an, dass die entzündlichen Veränderungen in der Leber die Entstehung des hepatozellulären Karzinoms (HCC) begünstigt. Basierend auf epidemiologischen Erhebungen wird prognostiziert, dass NASH-assoziiertes HCC in den nächsten 5 Jahren den häufigsten Grund für eine Lebertransplantation in den USA darstellen wird (Michelotti et al. 2013). Da eine Fettleber *per se* benigne ist und keinen Grund für eine Transplantation darstellt, ist es von enormer Bedeutung, die molekularen Mechanismen aufzuklären, die das Voranschreiten von einer Fettleber zur NASH, Fibrose, Zirrhose und letztlich HCC bedingen. TREM1 und TREM2 sind Zelloberflächenrezeptoren von Immunzellen, die deren Zellantworten modulieren können (Klesney-Tait et al. 2006). Vorarbeiten aus unserer Arbeitsgruppe zeigten einerseits, dass die TREM2 Expression in Leberproben einer humanen Kohorte in Abhängigkeit des Steatose-Grades gesteigert war (Abbildung C- 5). Andererseits wurde gefunden, dass TREM2 und in geringen Maßen auch TREM1 auf Leber-residenten Makrophagen, den Kupfferzellen exprimiert ist und dass ein Verlust dieser Rezeptoren nach Stimulation mit LPS und LPS-beladenen Lipoproteinen einer humanen Kohorte zu einer veränderten pro-inflammatorischen Antwort führte. Für den Verlust von TREM1 ergab sich dadurch tendenziell eine verminderte und für den Verlust von TREM2 eine deutlich gesteigerte pro-inflammatorische Antwort. In verschiedenen diätetischen NASH Modellen wurde in der Arbeit auch der Einfluss der TREM-Rezeptoren für die NASH Entwicklung untersucht. Während TREM1 keinen Effekt hatte, gab es Hinweise dafür, dass der Verlust von TREM2 die NASH verstärkte. Bei Fütterung einer mit Zucker angereicherten Hochfett-Diät hatte TREM2 keinen Einfluss auf die NASH Progression, jedoch bewirkte der Verlust von TREM2 bei Fütterung einer mit Cholesterin angereicherten Diät eine verschlimmerte NASH (Eissing 2013).

Basierend auf diesen Ergebnissen sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, welche Bedeutung TREM1 und TREM2 haben, wenn beide Diäten kombiniert werden, also eine Diät gefüttert wird, die sowohl Zucker als auch Cholesterin angereichert ist (HFCS). Die Ergebnisse zeigen, dass eine 16-wöchige Fütterung einer HFCS zu gesteigerter Gewichtszunahme führt, die insbesondere auf eine Steigerung der Fettgewebsmenge

zurückführbar ist (Abbildung E- 1). Einhergehend mit diesen Beobachtungen zeigen sich in den HFCS gefütterten Tieren erwartungsgemäß eine reduzierte Glucose-Toleranz sowie bedingt durch das in der Diät enthaltene Cholesterin signifikant gesteigerte Plasma-Cholesterinspiegel und eine gesteigerte Lipideinlagerung in die Leber (Abbildung E- 2 Abbildung E- 3). Auch die Komposition der Leberlipide ist nach HFCS Fütterung verändert. Eine signifikant vermehrte Akkumulation von TG geht mit einer signifikanten Reduktion von PC und PE einher und das Verhältnis von PC/PE ist nach Fütterung der HFCS tendenziell reduziert (Abbildung I- 1A, Abbildung E- 4). Ähnliche Änderungen in der hepatischen Lipidzusammensetzung wurden in Leberbiopsien von NAFLD-Patienten gefunden. Auch hier zeigte sich ein verminderter PC/PE Ratio verglichen mit gesunden Kontrollen (Arendt et al. 2013). Ebenso wie hier wurde eine Reduktion von PC beobachtet, allerdings stieg der PE Gehalt an (Arendt et al. 2013). Eine Verminderung des PC/PE Verhältnisses führt zum Verlust der Membran-Integrität und verursacht in der Folge Lebersteatose und Leberschaden (Li et al. 2006). Außerdem resultierte die Fütterung der HFCS in einer Änderung der Triglyzerid-Komposition. Der Anteil an Triglyzeriden mit mehrfach-ungesättigten Fettsäuren, die mit der Nahrung aufgenommen werden, ist reduziert und der Anteil derjenigen TG, die gesättigte oder einfach ungesättigte Fettsäuren enthalten, ist erhöht (Abbildung E- 4B). Neben der Sucrose im Futter erhielten die Tiere zusätzlich mit Glucose und Fructose angereichertes Trinkwasser, um fibrotische Prozesse zu verstärken (Kohli et al. 2010). Der aufgenommene Zucker dient als Substrat für die *de novo* Lipogenese von Fettsäuren, die dann in der Leber vermehrt in TG eingebaut und gespeichert werden. Vermutlich durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors ChREBP (Herman et al. 2012) induziert die HFCS die ektope Lipidakkumulation in der Leber. Auch in Patienten mit NASH konnte eine verstärkte hepatische DNL detektiert werden (Eissing et al. 2013). Interessanterweise zeigen die Ergebnisse dieser Studie, dass der Verlust von *Trem1* oder *Trem2* sich nach Fütterung der HFCS nicht auf metabolische Parameter auswirkt. Da TREM-Rezeptoren vornehmlich Immunreaktionen modulieren (Klesney-Tait et al. 2006), wurde und die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine und die Makrophagen-Infiltration in der Leber gemessen. In Folge der HFCS kommt es neben erhöhter Expression von TNF- α und IL1- β zudem zu verstärkter Chemokin-Expression und dementsprechend zur vermehrten Einwanderung von Makrophagen in die Leber (Abbildung E- 5AB). TREM1 wird vornehmlich von neutrophilen Granulozyten exprimiert (Bouchon et al. 2000), die eher in der akuten Entzündung eine Rolle spielen. Im hier untersuchten chronischen Entzündungsmodell der NASH sollte der Verlust von *Trem1* dementsprechend keine Auswirkungen haben. Passend dazu wird keine veränderte NASH-Entwicklung in *Trem1*-defizienten Tieren gefunden. Dennoch gibt es auch eine Studie, die TREM1 und die Aktivierung von Kupffer-Zellen in Verbindung bringt. Hier wurde durch Diethylnitrosamin (DEN) ein Leberschaden induziert, wobei eine Deletion von *Trem1* zu einer verminderten Kupfferzell-Aktivierung

fürte (Wu et al. 2012). Allerdings sollte hier in Betracht gezogen werden, dass eine DEN-Behandlung mit vermehrter Infiltration von Neutrophilen, den am stärksten TREM1 exprimierenden Zellen, einhergeht (Tolba et al. 2015), sodass dieser Phänotyp möglicherweise über die Aktivität der eingewanderten Neutrophilen zu erklären ist. Für TREM2 würde man allerdings eine modulierende Rolle vermuten da TREM2 auf Kupferzellen exprimiert ist (Eissing 2013). Auch die Tatsache, dass die Expression von *Trem2* in den Lebern der HFCS gefütterten WT- und *Trem1*^{-/-}-Tiere signifikant erhöht ist (Abbildung E- 5B), suggeriert eine Beteiligung von TREM2 an der Progression von NASH und weiter fortgeschrittenen Leberpathologien. Ähnlich wie in diesem Entzündungsmodell wurde auch in Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen sowie im murinen Colitis-Modell eine verstärkte TREM2 Expression detektiert (Correale et al. 2013). In derselben Studie zeigten *Trem2*^{-/-}-Mäuse eine reduzierte Colitis, wohingegen aber auch gezeigt wurde, dass ein *Trem2*-Verlust in Mäusen zu vermehrter Zytokin-Produktion und Entzündung führt (Turnbull et al. 2006; Eissing 2013). In der vorliegenden Arbeit führte der Verlust von *Trem2* allerdings weder zu einer verstärkten noch zu einer verminderten inflammatorischen Antwort und diese Ergebnisse verdeutlichen nochmals die Wichtigkeit des zellulären Umfeldes und des daraus resultierenden Zytokinmilieus. Auch die Expression der fibrotischen Marker ist nach Fütterung der HFCS erhöht, gleichermaßen allerdings nicht durch den Verlust von *Trem1* und *Trem2* beeinträchtigt (Abbildung E- 5C). Zusammengekommen mit den Studien von Leah Eissing zeigt diese Arbeit, TREM-Molekülen die Progression von Leberentzündungen nur bei gleichzeitigem Übergewicht der Tiere modulieren.

1.2 TREM Rezeptoren in genetischem NAFLD Modell der *ApoE*- Defizienz

Da allerdings nicht alle Diäten zu einem veränderten Körpergewicht in den Fütterungsstudien führten, wurde ein genetisches NASH Modell etabliert. Zu diesem Zweck wurden *ApoE*^{-/-}-Mäuse (Piedrahita et al. 1992) mit *Trem1*- bzw. *Trem2*- defizienten Mäusen gekreuzt und die erhaltenen doppel *-knockout* Mäuse charakterisiert. Zunächst erhielten die Tiere bis zum Alter von 20 Wochen eine *chow*- Diät. Wie zu erwarten, haben die Mäuse nach der *chow*-Fütterung weder erhöhte Organgewichte noch ein erhöhtes Körpergewicht. Aufgrund der *ApoE*-Defizienz weisen die Tiere, verglichen mit WT-Mäusen (Abbildung E- 2) jedoch schon basal sehr hohe Plasmacholesterin-Konzentrationen auf und auch die TG-Konzentrationen im Plasma sind erhöht, wobei die Deletion von *Trem1* und *Trem2* diese metabolischen Parameter nicht beeinflusst (Abbildung E- 6). Trotz der ähnlich erhöhten Plasmalipide, führte die genetische Deletion von *Trem2* und tendenziell auch von *Trem1* zu einer reduzierten Akkumulation von Triglyzeriden und leicht erhöhten Cholesterinester-Konzentrationen in der Leber (Abbildung E- 7). Während durch den Verlust von *Trem1* und *Trem2*, ähnlich wie in der HFCS Fütterungsstudie, in der Leber keine veränderte Expression von Zytokinen und Chemokinen vorliegt und sich auch die Makrophagen-Infiltration nicht unterscheidet

(Abbildung E- 8A, B) scheint die Leber von *ApoE^{-/-}Trem2^{-/-}*- defizienten Tieren mehr Fibrose aufzuweisen (Abbildung E- 7C). Dies wird auch in der *Sirius-Red* Färbung bestätigt (Abbildung E- 8). Vor dem Hintergrund der Diskussion, dass die intrahepatische Cholesterinkonzentration die NASH Entwicklung beeinflusst ist dies von besonderem Interesse, da TREM2 offenbar in Abhängigkeit von der Diätzusammensetzung eine modulatorische Rolle bei der Progression zur Leberschädigung einnimmt. In ähnlicher Weise resultierte die Induktion des hepatischen Cholesterin-Effluxes durch Gabe von *liverX receptor* Agonisten (Wouters et al. 2010) und auch die Blockierung der diätetischen Cholesterin-Aufnahme in verminderter hepatischer Cholesterinkonzentration und reduzierter NASH (Zheng et al. 2008). Es ist also möglich, dass die, in den *ApoE^{-/-}Trem2^{-/-}*- Mäusen beobachtete erhöhte Cholesterin-Konzentration der Leber letztendlich in vermehrter Fibrose resultiert. Zudem zeigen Studien, dass bestimmte Lipide lipotoxische Effekte aufweisen (Feldstein et al. 2004) Auch denkbar ist, dass die hier beobachtete Reduktion in Leber TG mit einer Erhöhung von freien Fettsäuren einhergeht, die wiederum einen Leberschaden verursachen kann (Feldstein et al. 2004). Dass diese Lipidänderungen nur in Tieren mit *Trem2*-Defizienz beobachtet werden, ist möglicherweise auf die wichtige Funktion von TREM2 bei der Phagozytose zurückzuführen (Takahashi et al. 2007). Eine defekte Phagozytose von z.B. apoptotischen Hepatozyten könnte eine Akkumulation toxischer Lipidkomponenten bedingen, welche in der Folge das Voranschreiten der Leberschädigung begünstigen könnten.

Zusätzlich zur *chow*-Diät wurden die *ApoE*- und *Trem1*- bzw. *Trem2*- doppel-*knockout* Tiere auch mit einer Fett- und Cholesterinreichen WTD gefüttert, um die Entwicklung von NASH unter diesen diätetischen Bedingungen zu untersuchen. Verglichen mit Tieren aus der HFCS Studie und in Übereinstimmung mit der Literatur (Bartelt et al. 2011; Schierwagen et al. 2015), führt eine fettreiche Fütterung von Mäusen auf dem *ApoE^{-/-}*- Hintergrund nur zu einer moderaten Gewichtszunahme (ca. 50 g auf WT- und ca. 40 g auf dem *ApoE^{-/-}*-Hintergrund; Abbildung E- 1B, Abbildung E- 10B). In dieser Studie zeigte sich erstmalig ein TREM1-Phänotyp: Tiere mit *Trem1*-Defizienz nehmen schneller an Gewicht zu und haben erhöhte Organ- und Körpergewichte. Gegenteilig wirkt sich der Verlust von *Trem2* auf das Körpergewicht aus. *Trem2*-Defizienz bewirkt eine verminderte Zunahme und vermindertes ingWAT Gewicht (Abbildung E- 10). Passend zu diesen Ergebnissen wurde beschrieben, dass *Trem2* transgene Tiere vermehrte Adipogenese und daher erhöhtes Fett- und Körpergewicht haben (Park et al. 2015). Paradoxaerweise haben die *ApoE^{-/-}Trem2^{-/-}*- defizienten Tiere allerdings initial eine schlechtere Glucose-Toleranz, die sich im Lauf der Zeit allerdings normalisiert. Passend zu erhöhtem Körpergewicht in *ApoE^{-/-}Trem1^{-/-}*-defizienten Tieren zeigen diese, gemessen an ihren tendenziell erhöhten Insulinwerten, auch eine Insulinresistenz (Abbildung E- 11). Das diätetische Cholesterin der WTD steigert die ohnehin schon hohen Plasmacholesterin-Konzentrationen der *ApoE^{-/-}*- Tiere nochmalig verglichen mit der *chow*-

Diät (Abbildung E- 6;Abbildung E- 12). Trotz der Änderungen in der Zunahme wirkt sich weder der Verlust von *Trem1* noch von *Trem2* auf die Plasma- oder Leberlipide aus (Abbildung E- 12). Zu bemerken ist hier, dass der Leber TG-Gehalt mit dem der HFCS-gefütterten Tiere vergleichbar ist, der Cholesteringehalt aber um das 3-fache gesenkt ist. (Abbildung E- 4; Abbildung E- 12), was vermutlich durch den Verlust der ApoE-vermittelten Aufnahme von Cholesterin-reichen Lipoproteinen in die Leber zu erklären ist. Auch in diesem Modell bewirkt eine *Trem1*-Defizienz, wie wegen der schon oben diskutierten Gründe (keine Beteiligung von Neutrophilen in chronischer Entzündung) zu erwarten, keine veränderte Immunantwort (Abbildung E- 13). Interessanterweise führt der *Trem2*-Verlust in diesem Modell zu verminderter Expression von *Tnf- α* und *Ccl2* (Abbildung E- 13A). Dies widerspricht der ursprünglichen Hypothese einer eher anti-inflammatorischen Rolle von TREM2 (Hamerman et al. 2006; Turnbull et al. 2006) wurde aber auch schon in anderen Studien gezeigt. So sind *Trem2*^{-/-}-defiziente Mäuse vor Colitis geschützt (Correale et al. 2013). Analog dazu war auch die Expression fibrotischer Marker durch die *Trem2*- Defizienz reduziert (Abbildung E- 13C).

Neben vermehrter Steatose bedingt durch reduzierte VLDL-Sekretion (Noga et al. 2002) führen Defekte im Cholin-Metabolismus auch zu mitochondrialer Fehlfunktion sowie ER-Stress und können in der Folge oxidativen Stress und letztendlich Leberschädigungen hervorrufen (Malhi and Kaufman 2011, Soon et al. 2010). Auch in Menschen ist eine Mutation im Cholinsynthese Gen *PEMT* (phosphatidylethanolamine N-methyltransferase) mit der Entwicklung von NAFLD assoziiert (Song et al. 2005). Ein oft verwendetes Modell zur Induktion von NASH ist daher die Verwendung einer Methionin-Cholin-defiziente Diät (Hebbard and George 2011). Diese Diät löst allerdings eine drastische Gewichtsreduktion aus und entspricht daher nicht der physiologischen Situation, wie sie in NASH-Patienten häufig zu beobachten ist, da die NAFLD Entwicklung in der Regel mit Übergewicht und dem metabolischen Syndrom assoziiert ist (Marchesini et al. 2005) . Um diesen Gewichtsverlust zu vermeiden, wurde ein neues Diätmodell genutzt, das eine Hochfett- mit einer Cholin-defizienten-Diät verbindet, die sogenannte CDHFD (Wolf et al. 2014). *ApoE*^{-/-}- und *ApoE*^{-/-} *Trem2*^{-/-}- Mäuse erhielten die CDHFD über einen Zeitraum von 26 Wochen, da hier in der Studie von Wolf et al., in der der Fokus auf HCC-Entwicklung lag, schon eine deutliche NASH ausgeprägt war. *Chow*-gefütterte *ApoE*^{-/-}- Mäuse dienten als Kontrolle. Da bisher der Verlust von *Trem1* keinen Einfluss auf die NASH Progression hatte, lag der Fokus in der dieser Studie nur auf TREM2. Es zeigte sich, dass anders als zuvor beobachtet (Abbildung E- 10) und wie in der Literatur beschrieben (Park et al. 2015), ein Verlust von *Trem2* zu einer gesteigerten Gewichtszunahme und zu erhöhtem Fettgewebs- und Körpergewicht führt (Abbildung E- 14). In Woche 12 und 20 gemessene ALT-Spiegel im Plasma der Tiere unterscheiden sich nicht und sind aber in ähnlichem Bereich, wie bei der Fütterung der CDHFD zu erwarten wäre (Wolf

et al. 2014). Verglichen mit den *chow*-Kontrollen sind die Plasmalipide und auch die Lipoprotein-Profile trotz des gesteigerten Gewichts nach CDHFD und durch die *Trem2*-Defizienz unverändert, wobei *ApoE^{-/-}Trem2^{-/-}* Mäuse tendenziell mehr TRL-Partikel aufweisen (Abbildung E- 15). Bei Betrachtung der Leberlipidakkumulation wird nochmals deutlich, dass bei gleichbleibenden Leber-TG-Konzentrationen der Gehalt von Lebercholesterin durch die Deletion von *Trem2* erhöht ist. Neben einer histologisch sichtbar verstärkten Schädigung sind auch die ALT-Spiegel im Plasma durch die CDHFD erhöht (Abbildung E- 16). Während die *ApoE^{-/-}*-Tiere ähnliche ALT-Spiegel aufweisen wie in der Literatur angegeben (Wolf et al. 2014), führt der Verlust von *Trem2* zu einem zusätzlichen Anstieg der ALT-Werte. Dieser gesteigerte Leberschaden ist auch in der Histologie zu beobachten (Abbildung E- 16). Interessanterweise ist in den *ApoE^{-/-}*-Kontrollen auf CDHFD verglichen mit den *chow*-gefütterten Tieren die Zytokin-Expression unverändert, die Expression der Fibrose-Marker passend zu den histologischen Befunden moderat gesteigert und die Expression von *Trem2* deutlich (5-fach) erhöht. Eine Induktion von *Trem2* wurde auch im Colon von Colitis Patienten gefunden. Während TREM2 allerdings hier den Verlauf der Colitis beschleunigte (Correale et al. 2013), wurde wegen der erhöhten *Trem2* Expression in den humanen steatotischen Lebern unserer Kohorte (Abbildung C- 5) die Hypothese aufgestellt, dass TREM2 eine protektive Funktion hat und kompensatorisch hochreguliert ist (Eissing 2013). Dieser Hypothese folgend würde ein Verlust von TREM2 die NASH verschlimmern. Und tatsächlich, ebenso wie in den *ApoE^{-/-}Trem2^{-/-}* Tieren auf *chow*-Diät (Abbildung E- 8) resultierte der Verlust von *Trem2* nach CDHFD Fütterung weder in gesteigerter Zytokin und Chemokin Expression, dennoch aber in gesteigerter Expression von Fibrose-Markern (Abbildung E- 17), was die histologischen Befunde bestätigt. Gemäß den Ergebnissen, dass Chylomikronen-*Remnants* am stärksten mit bakteriellem Endotoxin beladen sind (Ghoshal et al. 2009) und die TRL-Partikel in den *ApoE^{-/-}Trem2^{-/-}* Tieren leicht erhöht sind, könnte die Bindung dieser pro-inflammatorischen Partikel die Aktivierung von Kupferzellen verursachen und letztendlich zu der verstärkten Fibrose führen. Sowohl in dieser Studie als auch in der Studie auf *chow*-Diät sollte zudem evaluiert werden, ob bedingt durch den Verlust von *Trem2* mehr hepatische Sternzellen in der Leber zu finden sind, die die Fibrose vermitteln. In Anbetracht der beschriebenen Rolle von TREM2 bei der Wundheilung (Seno et al. 2009) wäre es auch vorstellbar, dass *Trem2^{-/-}*-Kupferzellen oder auch infiltrierende Makrophagen das Abklingen einer Entzündung negativ beeinflussen. Wie auch schon auf der *chow*-Diät, kam es nach Fütterung der CDHFD auch wieder zu verstärkter Akkumulation von Cholesterin in den Lebern der Tiere mit *Trem2*- Defizienz (Abbildung E- 1). Zahlreiche Studien schlagen eine Beteiligung von Cholesterin an der NASH- Progression vor (Wouters et al. 2008; Wouters et al. 2010; Ioannou 2016) und auch in dieser Arbeit konnte diese Annahme beobachtet werden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine übermäßige Energiezufuhr durch jegliche Art von Hochfett-Diät bei gleichbleibendem Energieverbrauch zur Induktion von Steatose und NASH führt. Während TREM1 diesen Prozess nicht zu beeinflussen scheint, verdichten sich die Hinweise auf eine protektive Funktion von TREM2. Dennoch sind die Ergebnisse nicht eindeutig und sollten validiert werden. Insbesondere da auch ApoE als TREM2-Ligand beschrieben wurde (Atagi et al. 2015; Bailey et al. 2015), sollte die Validierung in Mäusen durchgeführt werden, die lediglich eine *Trem2*-Defizienz aufweisen. Denkbar wäre die Fütterung der CDHFD, da sich diese Diät als sinnvolles NASH-Modell erwiesen hat.

2 Auswirkungen von gesteigerter Energieaufnahme durch Adaption an einen Kälte-Reiz

2.1 Systemische Änderungen des Cholesterin-Stoffwechsels nach BAT Aktivierung

Eine gesteigerte Energiezufuhr erfolgt nicht nur im Kontext von Adipositas und Insulinresistenz, auch die Aktivierung des braunen Fettgewebes durch einen Kältereiz resultiert in gesteigerter Nahrungs- und damit Energieaufnahme (Cannon and Nedergaard 2004). Dieser gesteigerten Nahrungsaufnahme folgt aber nicht die Entwicklung von Übergewicht und damit assoziierten negativen metabolischen Konsequenzen. Vielmehr korrigiert aktives braunes Fettgewebe eine Dyslipidämie und Insulinresistenz (Bartelt et al. 2011; Stanford et al. 2013). Ursache dieser beobachteten Effekte, ist die verstärkte Aufnahme von Lipiden und Glucose aus dem Plasma in das aktive braune Fettgewebe (Bartelt et al. 2011), die dann in der Folge nach deren Oxidation zur Wärmeproduktion herangezogen werden. Neben Glucose und Triglyzeriden enthält die sogenannte westliche Diät, insbesondere durch den hohen Anteil tierischer Produkte, auch einen hohen Anteil an Cholesterin. Überschüssiges Cholesterin kann einerseits lipotoxisch wirken und zelluläre Stressreaktionen und NASH auslösen (Wouters et al. 2008). Andererseits kann es in den Gefäßwänden von Arterien akkumulieren und Atherosklerose verursachen. Obwohl mit der Nahrung vermehrt aufgenommenes Cholesterin nicht metabolisiert werden kann, wurden in WTD gefütterten Mäusen mit humanem Lipoproteinprofil nach BAT Aktivierung sogar reduzierte Atherosklerose sowie verminderte Plasmacholesterin-Konzentrationen beobachtet. Diese Prozesse scheinen abhängig von der Leber zu sein. Wurde nämlich durch den Verlust von APOE oder LDLR die Aufnahme von Cholesterin-reichen Lipoprotein Partikeln in die Leber unterbunden, kam es zur Akkumulation von Lipiden und verstärkter Atherosklerose (Dong et al. 2013; Berbee et al. 2015). Der zugrundeliegende Mechanismus war zu Beginn dieser Arbeit noch nicht bekannt und somit sollte untersucht werden, wie sich eine Kälte-stimulierte BAT Aktivierung auf den Cholesterin-Stoffwechsel auswirkt. Hierzu wurden C57BL/6J Wild-Typ-Mäuse (WT) 10 Tage mit einer 0,2% Cholesterin angereicherten WTD gefüttert und zur Aktivierung des BAT sieben Tage bei 6 °C gehalten. Analog zu der in der Literatur

beschriebenen Reduktion von Cholesterin in APOE3L-CETP Mäusen (Berbee et al. 2015), resultierte auch hier die BAT Aktivierung in einer deutlichen Reduktion des Plasmacholesterins (Abbildung E- 18A). Um genauer zu untersuchen, wie das mit der Nahrung aufgenommene Cholesterin nach Kälte Stimulation im Organismus verteilt wird, wurde eine orale Cholesterin-Aufnahme Studie durchgeführt, bei der die Mäuse radioaktiv-markiertes Cholesterin erhielten. Die Aktivierung des braunen Fettgewebes durch Kälte bewirkte eine verstärkte Aufnahme von Cholesterin in die braunen Fettdepots, bei gleichzeitiger Reduktion der Plasma-Spiegel (Abbildung E- 18B). Nach TRL-Hydrolyse kann Kälte- aktiviertes BAT nicht nur Fettsäuren, sondern auch, LPL- und CD36-abhängig, TRL-*Remnant*- Partikel als Ganzes aufnehmen (Bartelt et al. 2011). Da das per *Gavage* verabreichte Cholesterin in Chylomikronen verpackt in die Zirkulation freigesetzt wird, könnte die verstärkte Aufnahme in die aktiven BAT-Depots über diesen Mechanismus erfolgt sein. Die Studie von Berbee et al. liefert Hinweise dafür, dass im Zusammenhang mit BAT-Aktivierung auch die Leber für die Senkung des Plasmacholesterins eine zentrale Rolle einnimmt. So resultierte ein Verlust des LDLR oder von APOE in einer Akkumulation der *Remnants* und erhöhten Plasmacholesterin-Konzentrationen. Mechanistisch soll die verstärkte Aufnahme von Fettsäuren ins BAT die Beseitigung der *Remnants* seitens der Leber beschleunigen (Berbee et al. 2015). Passend zu diesem Mechanismus ist auch in dieser Studie eine verstärkte Aufnahme des Cholesterins in die Leber zu beobachten (Abbildung E- 18C). Da Cholesterin nicht zur Energiegewinnung herangezogen und auf diesem Wege metabolisiert werden kann, deutet die beobachtete Reduktion des Plasmacholesterins nach Kälte darauf hin, dass dieses ausgeschieden wird. Den wichtigsten Beitrag zur Exkretion liefert die Leber. Überschüssiges Cholesterin wird hier entweder direkt oder nach Umwandlung in Gallensäuren in die Galle sekretiert (Calkin and Tontonoz 2012). Nach Messung der hepatischen Genexpression der für die Gallensäuresynthese verantwortlichen Enzyme zeigte sich nur eine tendenziell wenig gesteigerte Expression von *Cyp7a1*. Dies ist das für die Gallensäuresynthese Geschwindigkeits-bestimmende Enzym (Russell 2003) und wird in einer negativen Rückkopplung über Aktivierung des nukleären Rezeptors FXR entweder direkt oder durch intestinale FGF15/19 Sekretion inhibiert (Goodwin et al. 2000; Lu et al. 2000; Inagaki et al. 2005). Interessanterweise ist nach Kälte allerdings die Expression von *Cyp7b1*, dem wichtigsten Enzym des alternativen Gallensäuresyntheseweges, deutlich gesteigert. Ebenso konnte auch eine gesteigerte Expression des für die Synthese von Cholsäure verantwortlichen Enzyms CYP8B1 gemessen werden. Auch die Expression des für die Konjugation von Gallensäuren verantwortlichen Enzyms BAAT sowie des Gallensäureexportproteins BSEP (codiert durch *Abcb11*) wird durch Kälte-Aktivierung tendenziell induziert, während die Expression des direkten FXR-Zielgens *Nr0b2* (codiert für SHP) nicht verändert ist (Abbildung E- 19). Diese Ergebnisse deuten auf eine vermehrte hepatische Gallensäuresynthese hin, die

durch Kälte aktiviert wird. Auch Gallensäuremessungen im Lebergewebe der Tiere bestärkte die Vermutung, dass nach Aktivierung des BAT durch Kälte eine erhöhte Gallensäuresynthese erfolgt (Abbildung E- 20). Die Lebern von Kälte-exponierten Tiere haben sowohl vermehrte Konzentrationen von UBA und CBA, wobei die Kälte das Vorhandensein mancher UBA Spezies nahezu 50-fach vermehrt hat (Abbildung E- 19C). Insgesamt machen die CBA aber einen deutlich größeren Anteil an Gallensäuren in der Leber aus und sind zudem diejenigen, die wegen ihrer Hydrophilie auch aktiv von BSEP in die Galle sezerniert werden (Gerloff et al. 1998). Da sowohl die CBA T- α/β - MCA als FXR-Antagonisten (Sayin et al. 2013) als auch die FXR-Agonisten gleichermaßen nach Kälte induziert sind, findet vermutlich keine Kälte-induzierte FXR-abhängige Regulation der Gallensäuresynthese statt, was auch durch die unveränderte Expression von SHP bestätigt wird (Abbildung E- 19). Eine Zunahme an hydrophilen Gallensäuren, wie sie nach Kälte beobachtet wird (β -MCA ist stärker induziert als CA; Abbildung E- 20B) stimuliert den Gallefluss (Thomas et al. 2008). Außerdem ist eine verminderte Konzentration von Cholesterin vermutlich auf eine vermehrte Exkretion von Gallensäuren zurück zu führen und deswegen wurden die Gallensäurespiegel im Fäzes bestimmt. Ähnlich wie in der Leber resultiert die Kälte-Behandlung auch in einer drastisch erhöhten fäkalen Gallensäure-Konzentration, wobei hier insbesondere der Anteil der CBA um ein Vielfaches gesteigert ist (Abbildung E- 21). Da der Anteil an Gallensäuren, die mit den Fäzes ausgeschieden werden, der Menge entspricht, die täglich neu aus Cholesterin synthetisiert wird, ist davon auszugehen, dass die gesteigerte diätetische Cholesterinaufnahme auf diese Weise kompensiert wird. Es lässt sich also festhalten, dass in der Tat ein Mechanismus existiert, um mit der Nahrung aufgenommenes überschüssiges Cholesterin auszuscheiden und so der Entstehung von NASH und Atherosklerose vorzubeugen, wenn es nach BAT-Aktivität zu gesteigerter Energiezufuhr kommt. Die hier beobachtete, verstärkte Gallensäuresynthese ist vermutlich der Grund für die schon beschriebene, erhöhte Konzentration von Gallensäuren im Plasma nach Kälte-Exposition (Zietak et al. 2016). Neben der Cholesterinausscheidung können die hohen Gallensäurespiegel über Bindung an TGR5 zudem die Glucose-Sensitivität, entzündliche Prozesse und die BAT-Aktivität regulieren (Katsuma et al. 2005; Watanabe et al. 2006; Pols et al. 2011). Ferner stellt sich die Frage, warum insbesondere CBA ausgeschieden werden. Denkbar wären hier mehrere Ansätze. Unter normalen Bedingungen kommt es zur Dekonjugation und Hydroxylierung von CBA durch intestinale Bakterien. Mit Hilfe ihrer BSH kommt es zu Abspaltung von Taurin bzw. Glycin und anschließend zur Herstellung von sekundären Gallensäuren (Joyce et al. 2014; Wahlstrom et al. 2016). Nach Kälte wurden Änderungen in der Darmmikrobiota detektiert (Chevalier et al. 2015; Zietak et al. 2016). Denkbar wäre nun, dass diese veränderten Darmmikrobiota eine veränderte BSH-Aktivität aufweisen und somit die Dekonjugation der CBA reduziert ist. Die Wiederaufnahme von CBA im Ileum erfolgt aktiv über ASBT (Wong et al. 1994). Ein weiterer

Mechanismus für die vermehrte Ausscheidung von CBA ist also auch eine reduzierte ASBT-vermittelte Wiederaufnahme. Möglich wäre hier, dass die Synthese des Transporters vermindert ist. Aufgrund der dramatisch gesteigerten Konzentration an CBA ist aber auch denkbar und wahrscheinlicher, dass die Kapazität von ABST erschöpft ist. Klarheit könnte hier die Messung der BSH-Aktivität sowie die Messung der ASBT mRNA- und Proteinkonzentration im Ileum bringen. In Anbetracht der schon beschriebenen Kälte-induzierten Änderungen der Darmmikrobiota und deren bedeutender Rolle im Energiestoffwechsel (Backhed et al. 2004; Turnbaugh et al. 2006; Ridaura et al. 2013), ist eine Mikrobiom-Analyse sehr interessant und wird in Teil F2.3 diskutiert.

2.2 Änderungen des Gallensäure-Stoffwechsels sind abhängig von Cyp7b1 und diätetischer Cholesterinzufuhr

Der Mechanismus der Kälte-induzierten Gallensäuresynthese sollte im Folgenden näher beleuchtet werden. Wie in Teil F2.1 diskutiert, ist nach Kälte eine starke hepatische Induktion von *Cyp7b1* zu beobachten. Um die Relevanz dieser Beobachtung näher zu untersuchen, wurden WTD gefütterte *Cyp7b1*^{-/-} Mäuse und WT-Kontrollen Kälte exponiert. *Cyp7b1*^{-/-} Mäuse zeigen keine Auffälligkeiten im Gallensäure-Stoffwechsel und ihre Plasmacholesterin- und Triglyzerid-Konzentrationen sind normal. *Cyp7b1*^{-/-} Mäuse haben allerdings eine gesteigerte Plasmakonzentration an Hydroxysterolen (Li-Hawkins et al. 2000). Insbesondere die Konzentration an 27-Hydroxycholesterin ist im Plasma dieser Tiere erhöht. Dieser Metabolit scheint über die Bindung an den Östrogen-Rezeptor- α die Progression von Atherosklerose zu beschleunigen (Umetani et al. 2007; Umetani et al. 2014). Verglichen mit den WT-Tieren resultierte die Aktivierung des BAT durch Kälte in *Cyp7b1*^{-/-}-Mäusen weder in verändertem Körpergewicht, noch in geänderten Plasma- oder Leberlipiden. Sowohl in WT- als auch in den *Cyp7b1*^{-/-}-Tieren zeigte sich nach Kälte eine Reduzierung des Körpergewichts, des Plasmacholesterins, der Plasmatriglyzeride und der Leberlipide, die allerdings wegen der geringen Gruppengröße keine Signifikanz erreichte (Abbildung E- 22). Während die WT-Mäuse nach Kälte in der Leber, wie schon vorher beobachtet, erhöhte Konzentrationen von Gallensäuren aufweisen, ist dieser Effekt in der *Cyp7b1*^{-/-} Tieren nicht mehr zu beobachten. Vielmehr zeigte sich hier nach Kälte für β -MCA, T- α/β -MCA, TCA) sogar eine Reduktion verglichen mit den warmen Tieren (Abbildung E- 23A). Bei Betrachtung der fäkalen Gallensäureexkretion zeigt sich erneut ein Unterschied zwischen WT- und den *Cyp7b1*^{-/-} Tieren. Ähnlich wie in der Leber ist die in den WT-Mäusen beobachtete, vermehrte fäkale Ausscheidung der Gallensäuren in den Tieren mit *Cyp7b1*-Defizienz größtenteils verloren. Einzig TCA und GCA werden vermehrt ausgeschieden (Abbildung E- 23B). Diese Ergebnisse unterstreichen eindrucksvoll die Bedeutung von CYP7B1 für die Kälte-induzierte Gallensäuresynthese. Wie bereits oben angesprochen, scheint eine Regulation dieser über FXR unwahrscheinlich. Erstens ist SHP in der Leber nicht induziert (*Nr0b2*, siehe Abbildung E-

19) und zweitens ist *Cyp7b1* kein bekanntes Zielgen von FXR (Russell 2003). In Kontext von erhöhter Cholesterinzufuhr, wie sie nach BAT Aktivierung vorliegt, wäre eine FXR-vermittelte negative Rückkopplungsregulation der Gallensäuresynthese auch wenig sinnvoll, da es anschließend zur Akkumulation von Cholesterin kommen würde. Über die CYP7B1-vermittelte Induktion der Gallensäuresynthese wird sichergestellt, dass keine FXR-vermittelte Inhibition erfolgt und somit die Exkretion des Cholesterins erfolgen kann. Die Spekulation liegt nahe, dass der Verlust dieses Mechanismus neben der Bindung von 27-Hydroxycholesterin an den Östrogen-Rezeptor- α auch zum Voranschreiten der Atherosklerose in *Cyp7b1*^{-/-}-Mäusen beiträgt (Umetani et al. 2007; Umetani et al. 2014). Zu untersuchen wäre also, ob die *Cyp7b1*^{-/-}-Tiere bei längerer Kälte-Exposition vermehrt Atherosklerose entwickeln. Weiterhin zu klären wäre die Frage, wie die Induktion von CYP7B1 auf molekularer Ebene abläuft. Hier ist denkbar, dass ein Cholesterin-Metabolit aus dem braunen Fettgewebe, möglicherweise 27-Hydroxycholesterin, in die Leber gelangt und dort die gesteigerte Expression von *Cyp7b1* vermittelt. Ein ähnlicher Mechanismus wurde schon auch schon für den Wachstumsfaktor Ngr4 beschrieben, der nach Aktivierung des BAT die *de novo* Lipogenese in der Leber stimuliert (Wang et al. 2014).

Neben der Bedeutung von CYP7B1 sollte auch geklärt werden, welchen Beitrag das mit der Diät aufgenommene Cholesterin zur Kälte-induzierten Gallensäuresynthese leistet. Hierzu wurden die WT-Tiere parallel zu Kälte-Exposition einer Behandlung mit EZ unterzogen. EZ hemmt die NPC1L1-vermittelte Aufnahme von Cholesterin in die Enterozyten, indem es die Cholesterin-stimulierte Endozytose des beladenen Transporters verhindert (Ge et al. 2008). Unabhängig von der EZ-Behandlung resultierte die Aktivierung des BAT in gesteigerter Nahrungszufuhr aber dennoch reduziertem Körpergewicht (Abbildung E- 24A). Kälte-Exposition reduziert auch in diesem Modell die Plasmacholesterinspiegel sowie die Leberlipide (Abbildung E- 24B, C). Dass die EZ-Behandlung funktioniert, ist an den schon basal, also unter warmen Bedingungen, reduzierten Plasma- und Lebercholesterin-Konzentrationen zu erkennen. Der Cholesterin-senkenden Effekt von EZ wird durch Kälte-Exposition noch weiter verstärkt. Gleichermäßen sind die Lebertriglyzerid-Konzentrationen nach EZ-Gabe vermindert (Abbildung E- 22B,C), ein Ergebnis, das sich mit Befunden in der Literatur deckt (Zheng et al. 2008). Trotz dieser Differenzen zwischen WT- und EZ-behandelten Tieren zeigen sich bei Analyse der hepatischen Gallensäuren keine Unterschiede. In beiden Gruppen resultiert die Kälte-Exposition in gesteigerten Gallensäure-Konzentrationen. Abermals machen die CBA den Großteil der hepatischen Gallensäuren aus und die beobachtete Induktion ist vor allem in den UBA zu finden. In den Kälte-exponierten Tieren ist wiederum eine stärkere Induktion von β -MCA im Vergleich mit Cholsäure zu beobachten. Dennoch scheint in den kalten, EZ-behandelten Tieren auch Cholsäure leicht induziert (Abbildung E- 25). Hydrophobere Gallensäuren wie Cholsäure stimulieren die

intestinalen Cholesterinaufnahme (Thomas et al. 2008). Die Induktion von Cholsäure könnte also kompensatorisch erfolgen. Überraschenderweise ergab die Analyse der fäkalen Gallensäuren ein anderes Bild. Während Kälte-Behandlung allein wiederum in einer gesteigerten Exkretion von Gallensäuren resultierte und besonders die Ausscheidung von CBA massiv erhöht ist, ist der Kälte-Effekt in den EZ-behandelten Tieren verloren. Warmgehaltene sowie gleichzeitig Wärme- und EZ-behandelte Tiere weisen ein sehr ähnliches Gallensäureprofil auf. Aber auch gleichzeitig Kälte- und EZ-behandelte Tiere haben dieselbe Gallensäureausscheidung wie warmgehaltene Tiere und deswegen nur einen sehr geringen Anteil CBA in den Fäzes (Abbildung E- 26). Zusammen mit der noch immer erhöhten Konzentration von Gallensäuren in der Leber bei gleichzeitig Kälte und EZ-behandelten Tieren deutet dies darauf hin, dass es zwar immer noch zur Induktion der Gallensäuresynthese kommt, die Gallensäuren aber aufgrund der Substratknappheit im Ileum effizienter reabsorbiert werden. Mit großer Wahrscheinlichkeit ist Gallensäurepool insgesamt nicht so groß, wie in den Kälte-exponierten Tieren. Es wäre aber auch möglich, dass die bakterielle BSH-Aktivität nach EZ-Behandlung, anders als bei alleiniger Kälte-Behandlung, unverändert ist. Gesetzt den Fall, die veränderte BSH-Aktivität resultierte aus einer Änderung der Komposition der intestinalen Mikrobiota, wie sie nach Kälte beobachtet wird (Chevalier et al. 2015; Zietak et al. 2016), so sollte diese Änderung nach EZ-Behandlung nicht mehr vorhanden sein, was in Teil F2.3 diskutiert wird. Zusammenfassend machen diese Ergebnisse deutlich, dass neben der Aktivität von CYP7B1 auch die diätetische Cholesterin-Zufuhr für den Prozess der Kälte-induzierten Gallensäureausscheidung essentiell ist. In diesem Zusammenhang wäre es interessant zu untersuchen, ob Tiere mit gestörtem Gallefluss, wie zum Beispiel *Mdr2*-defiziente Tiere oder Tiere, die einer *bile duct ligation* unterzogen wurden, erstens in der Kälte-Adaption beeinträchtigt sind und zweitens bei Kälte-Exposition möglicherweise schneller Cholestasen entwickeln.

2.3 Gallensäuren modulieren das intestinale Mikrobiom nach Kälte

Die intestinalen Mikriobiota werden wegen ihrer Fülle an Genen, die die Zahl der menschlichen Gene um ein vielfaches übertrifft, zunehmend als metabolisches Organ betrachtet (Sommer and Backhed 2013). Es ist erweisen, dass die Darm-Mikrobiota eine wichtige Rolle im Energiemetabolismus spielen. So modulieren sie unter anderem die Entwicklung von Gewichtszunahme, Übergewicht und Glucoses-Toleranz (Backhed et al. 2004; Turnbaugh et al. 2006; Vrieze et al. 2014). Änderungen in der Komposition der Darmbakterien, sogenannte Dysbiosen, sind mit einer Vielzahl von Erkrankungen assoziiert (Turnbaugh et al. 2009; Qin et al. 2012; Karlsson et al. 2013; Ridaura et al. 2013). Mit Hilfe ihrer Enzyme können sie unter anderem Energie für den Wirt zugänglich machen und auch die mikrobiell produzierten Metabolite können als Signalmoleküle z.B. den Stoffwechsel des Wirtes regulieren (Shapiro et al. 2014). Die Zusammensetzung des Darmmikrobioms ist Lebensstil-abhängig und

insbesondere durch die Zusammensetzung der Diät bestimmt (Devkota et al. 2012; David et al. 2014). Auch die Aktivität des braunen Fettgewebes und insbesondere Kälte-Behandlungen sind mit Änderungen in der Mikrobiota-Komposition verbunden (Chevalier et al. 2015; Suarez-Zamorano et al. 2015; Zietak et al. 2016). Es konnte gezeigt werden, dass diese Änderungen einerseits mit verbesserter Glucose-Toleranz einherging und andererseits dem Wirt eine verbesserte Energieaufnahme ermöglichte (Chevalier et al. 2015). Zudem war es möglich, die metabolischen Konsequenzen durch Fäzestransfer in GF-Mäuse zu übertragen (Chevalier et al. 2015; Suarez-Zamorano et al. 2015; Zietak et al. 2016). Wie es allerdings mechanistisch zu diesen Änderungen kommt, wurde bisher nicht geklärt. Analog zu unseren Ergebnissen wurden auch in einer anderen Studie erhöhte Konzentrationen von Gallensäuren gemessen (Zietak et al. 2016). Da Gallensäuren und die Darm-Mikrobiota stark miteinander interagieren (Wahlstrom et al. 2016), haben wir angenommen, dass möglicherweise, die nach Kälte-Adaption drastisch erhöhten Gallensäuren die Änderungen des Mikrobioms forcieren, da auch in anderen Studien gezeigt werden konnte, dass eine Unterbrechung des Galleflusses zu Dysbiose führen kann (Deitch et al. 1990; Clements et al. 1996).

Zur Untersuchung dieser Hypothese wurde zunächst aus Fäzesproben Wärme- und Kälte-exponierter Mäuse eine Mikrobiom-Analyse durchgeführt. Wie der MDS-Plot und die Clusteranalyse zeigen, resultierte die Aktivierung des BAT durch Kälte auch in unserer Kohorte, ähnlich wie in den bereits oben beschriebenen Studien (Chevalier et al. 2015; Zietak et al. 2016), in einem deutlich veränderten Mikrobiom (Abbildung E- 27). Dies ist bemerkenswert, da die Änderungen nach deutlich längerer Kälte-Exposition und anderer Diät beobachtet wurden. So wird auf OTU-Ebene analog zu Chevalier et al. eine Reduktion von *Porphyronadacea* und ein Anstieg von *Deferribacteraceae* und *Lachnospiraceae* detektiert. Der Hypothese folgend, dass die erhöhten Gallensäuren für die Änderungen der Mikrobiota-Komposition verantwortlich sind, sollte in den gleichzeitig Kälte- und EZ-behandelten Tieren, die eine verminderte Gallensäureausscheidung haben und ähnliche fäkale Gallensäurespiegel wie die warmen Kontrolltiere aufweisen, keine Änderungen der Mikrobiota nach EZ-Gabe erfolgen. Die Ergebnisse der Mikrobiom-Analyse untermauern diese Hypothese. Die MDS-Analyse zeigte noch immer eine klare Separation der kalten Gruppe. Die Wärme-exponierten und die gleichzeitig Kälte- und EZ-behandelten Tiere unterscheiden sich aber nicht mehr deutlich. Auch in der Clusteranalyse bildet einzig die kalte-Gruppe einen Ast und die warme sowie die gleichzeitig Kälte- und EZ-behandelte Gruppe entspringen demselben Ast (Abbildung E- 28). Diese Studie liefert also erstmalig Hinweise dafür, wie die nach Kälte-beobachteten Änderungen der Darm-Mikrobiota mechanistisch ablaufen. Es kann gezeigt werden, dass die Konzentration der fäkalen Gallensäuren für dieses *remodeling* mitverantwortlich ist. Gallensäuren könnten einerseits durch ihre bakteriostatische Wirkung selektiv das Wachstum einige Bakterienspezies fördern (Islam et al. 2011; Devkota et al.

2012). Zum anderen ist es aber auch denkbar, dass sie durch Änderung der lokalen Konzentration von Metaboliten auf die Bakterien einwirken. So wurde kürzlich gezeigt, dass Taurin in Darmzellen Inflammasom-abhängig die Produktion von Defensinen stimuliert, welche die Mikrobiota abtöten können (Levy et al. 2015). Einhergehend mit diesen Befunden kann spekuliert werden, dass auch die Komposition der intestinalen Mikrobiota der *Cyp7b1*^{-/-}-Mäuse nach Kälte unverändert ist. Zudem ist es interessant zu untersuchen, ob der Verlust der Mikrobiota-Änderungen von physiologischer Relevanz ist. Einerseits wäre vorstellbar, dass die Tiere aufgrund des Verlustes bei längerer Kälte-Exposition Schwierigkeiten in der Energieaufnahme bekommen und dadurch möglicherweise drastisch an Gewicht verlieren oder gar sterben. Da die Mikrobiota-Änderungen auch mit verstärkter Glucose-Toleranz einhergehen, wäre es zudem denkbar, dass das fehlende *remodeling* in verminderter Glucose-Toleranz resultiert. Die Ergebnisse dieser Arbeit sind somit nicht nur für das grundlegende Verständnis der Organ-übergreifenden Cholesterin-Homöostase, sondern vermutlich auch für die Metaboliten-abhängige Regulation des systemischen Energiestoffwechsels von hoher Relevanz.

Teil G Material und Methoden

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien, Chemikalien, Kits und Reagenzien, Lösungen und Puffer, Arbeitsgeräte sowie die verwendete Software sind in Teil L tabellarisch aufgelistet.

1 Mausmodelle, Diäten und Interventionen

1.1 Tierhaltung und Mausmodelle

Alle Tierexperimente wurden mit Genehmigung des Tierschutzkomitees des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf sowie der Behörde für Gesundheit und Verbraucherschutz der Stadt Hamburg durchgeführt. Sofern nicht anders erwähnt, wurden die Studien in männlichen Tieren durchgeführt. Die Tiere wurden bei Raumtemperatur in einem 12 Stunden Tag /Nacht Rhythmus gehalten und hatten *ad libitum* Zugang zu Futter und Wasser.

Folgende Mauslinien wurden in dieser Arbeit verwendet:

- C57BL/6J Wild-Typ-Mäuse (Charles River) im Alter zwischen 12-14 Wochen
- *Trem1*^{-/-}- Mäuse (Kozik et al. 2016)
- *Trem2*^{-/-}- Mäuse (Turnbull et al. 2006)
- *ApoE*^{-/-}- Mäuse (Piedrahita et al. 1992)
- *ApoE*^{-/-} *Trem1*^{-/-}- Mäuse
- *ApoE*^{-/-} *Trem2*^{-/-}- Mäuse
- *Cyp7b1*^{-/-}- Mäuse (Li-Hawkins et al. 2000)

Die *Trem1*^{-/-}- und *Trem2*^{-/-}- sowie die *ApoE*^{-/-}- Mäuse waren bereits im Labor etabliert, sodass hier auf deren Erstbeschreibung verwiesen wird.

Die *ApoE*^{-/-} *Trem1*^{-/-}- und die *ApoE*^{-/-} *Trem2*^{-/-}- Mäuse wurden im Rahmen dieser Arbeit etabliert. Hierzu wurden *Trem1/2* defiziente Tiere mit *ApoE* defizienten Tieren gekreuzt. Zur Ermittlung des korrekten Genotyps der Nachkommen erfolgte eine spezifische PCR aus Schwanzbiopsie-Lysaten.

Organ- und Blutentnahmen erfolgten nach 4 stündigem Fasten. Zur Organentnahme wurden die Tiere mit einer letalen Dosis (15 µl/g) aus Ketamin (10 mg/ml)/Xylaxin (2%) in 0,9% NaCl anästhesiert. Zur Plasmagewinnung wurde mit Hilfe von EDTA enthaltenden Spritzen (5 µl 0,5M EDTA) transkardial Blut entnommen. Die Tiere wurden mit 5 ml eiskaltem PBS (unter Zusatz von 10 U/ml Heparin) perfundiert und anschließend erfolgte die Organentnahme. Die Organe wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren oder in TRIfast konserviert und bis zum weiteren Prozessieren bei -80 °C gelagert.

1.2 Diäten

Bevor die Tiere im Rahmen von Studien spezielle Diäten enthielten, bekamen sie eine Standard-*chow*-Diät (Lasvendi, Rod16R). Die *chow*-Diät wurde zudem auch als Kontrolldiät in einigen Fütterungsstudien verwendet. Zur NASH Induktion wurden verschiedene Diäten verwendet. Allen Studien gemein war hingegen der Fütterungsbeginn. Die Tiere erhielten die Spezialdiäten im Alter von 6 Wochen. Folgende Diäten wurden zur NASH-Induktion verwendet:

- Hochfett-, Cholesterin-, Sucrose-Diät (HFCS) (SSniff EF D12331-Suwit + 0,2% Cholesterin: 33,5%, Kokosnussöl, 0,2% Cholesterin, 17% Sucrose) wobei die Tiere zudem mit Zucker angereichertes Trinkwasser erhielten (55% Fructose und 45% Glucose). Die Fütterung erfolgte über einen Zeitraum von 16 Wochen.
- Western Type-Diät (WTD) (Ssniff EF R/M acc. TD88137 mod: Gesamtfettgehalt 21% aus Butter, 0,2% Cholesterin). Die Fütterung erfolgte über einen Zeitraum von 16 Wochen.
- Cholin-defiziente Hochfett-Diät (CDHFD) (Research Diets D05010402: Gesamtfettgehalt 45% (5% Sojaöl und 45% *Lard*), 17% Sucrose, 0% Cholin). Die Fütterung erfolgte über einen Zeitraum von 26 Wochen.

Die Studien zum hepatischen Cholesterin- und Gallensäure-Stoffwechsel erfolgten in Mäusen, die über einen Zeitraum von 10 Tagen die oben beschriebene WTD erhielten.

1.3 Interventionen

1.3.1 *Oraler Glucose-Toleranztest*

Zur Bestimmung der Glucose-Toleranz wurde ein oraler Glucose-Toleranztest durchgeführt. Hierzu wurde den Tieren nach vierstündiger Nahrungskarenz oral per *Gavage* eine Glucoselösung (1,5 g Glucose/kg Körpergewicht in 0,9% NaCl) verabreicht. Vor der *Gavage* sowie 15, 30, 60 und 120 Minuten danach wurde den Tieren durch Anritzen der Schwanzvene Blut entnommen und Glucose bestimmt.

1.3.2 *BAT Aktivierung durch Kälte*

Zur Aktivierung des braunen Fettgewebes wurden die Tiere über einen Zeitraum von 7 Tagen bei 6 °C in Einzelkäfigen gehalten. Die entsprechende Kontrollgruppe wurde ebenfalls in Einzelkäfigen bei 28 °C gehalten.

1.3.3 *Postprandiale Cholesterin-Aufnahme*

Zur Untersuchung der postprandialen Cholesterinaufnahme wurden zunächst rekombinant hergestellte, mit ³H-Cholesterin angereicherte Triglyzerid-reiche Lipoproteine (TRL) hergestellt. Hierzu wurden TRL aus humanem hyperlipidämischen Plasma isoliert, indem sie zunächst mit einer Kaliumbromid-Lösung auf eine Dichte von $\rho=1,21$ g/ml eingestellt, unter

eine Dichtelösung ($\rho = 1,006 \text{ g/mL}$, KBr in 0,9% NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,6) geschichtet und dann in der Ultrazentrifuge bei 38.000rpm über Nacht zentrifugiert (SW 40 Rotor, Beckmann) wurden. Die nun an der Oberfläche angereicherten TRL-Partikel wurden abgenommen und deren Lipide angelehnt an die Methode von Folch extrahiert (Folch et al. 1957). Im Anschluss wurden die Lipide mit einer Tracer-Menge an ^3H -Cholesterin vermischt und es folgte eine erneute Folch-Extraktion, nach der die Lipide mittels N_2 getrocknet wurden. Die Lipide wurden dann mit 0.9% NaCl-Lösung gemischt und durch Sonifizieren zu Mizellen assembliert. Die radioaktiven rekombinanten TRL wurden den Tieren nach vierstündiger Nahrungskarenz oral per *Gavage* verabreicht und weitere vier Stunden zirkulieren gelassen, bevor die Organentnahme wie unter 1.1 beschrieben erfolgte. Um die Aufnahme des ^3H -markierten Cholesterins in die verschiedenen Organe zu untersuchen, wurden diese mit Solvable-Lösung (0,1 ml/10 mg Organ) bei 60 °C für 12 Stunden lysiert. Das Lysat wurde im Anschluss mit Szintillationslösung versetzt (1/5 v/v) und im β -Szintillationscounter gemessen.

1.3.4 Ezetimib-Behandlung

Um die diätische Cholesterinaufnahme im Darm zu inhibieren, wurde den Tieren der Wirkstoff Ezetimib (EZ) verabreicht. EZ unterbindet die Resorption von Cholesterin, indem es die Clathrin-AP2 medierte Endozytose von Cholesterin-gebundenem Niemann-Pick C1-like1 (NPC1L1) und somit dessen Internalisierung blockiert (Ge et al. 2008) Die tägliche Verabreichung von (6 mg/kg Körpergewicht) EZ (Handelname Ezetrol®) erfolgte oral über das Futter. Hierfür wurden 2 Ezetrol® Tabletten (20 mg EZ) gemörsert und in 10 ml reinem EtOH gelöst. 334 g WTD wurden dann mit der EZ-Lösung benetzt und das Futter wurde geschüttelt, bis der EtOH verdampft war.

2 Genotypisierung

2.1 DNA Reinigung

Zur Isolation von DNA aus Schwanzbiopsien wurden diese zunächst über Nacht (ÜN) bei 37 °C mit Hilfe von 700 μl STE-Puffer, dem 10 μl Proteinase K zugesetzt war, verdaut. Nach Zugabe von 70 μl 10% SDS und 270 μl 5 M NaCl zum Lysat wurden die so präzipitierten Proteine durch 10-minütige Zentrifugation bei RT 13.000g sedimentiert. 450 μl des DNA-haltigen Überstands wurden in 900 μl 70% EtOH gewaschen und die DNA anschließend durch 30-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 13.000 g pelletiert. Der überschüssige EtOH wurde entfernt und das DNA-Pellet wurde für 2 Stunden bei 42 °C und 300 rpm getrocknet. Die DNA wurde in 40 μl H_2O a.i. aufgenommen.

2.2 PCR Reaktionen

Je PCR Ansatz wurde jeweils vermengt:

Tabelle G- 1: Vorschrift TREM PCR

Material	Menge (µl)
H ₂ O a.i.	13,75
10x PCR Puffer	2,5
DMSO	1
10mM dNTPs	0,5
Primer 1-3 (10pmol/µl)	Je Primer 0,5
MgCl ₂ (25mM)	0,5
Taq-Polymerase	0,25
DNA	5
Total	25

Tabelle G- 2: Vorschrift ApoE-PCR

Material	Menge (µl)
H ₂ O a.i.	13,75
10x PCR Puffer	2,5
10mM dNTPs	1
Primer 1-3 (20pmol/µl)	Je Primer 1
MgCl ₂ (25mM)	1
Taq-Polymerase	0,25
DNA	5µl
Total	25µl

Tabelle G- 3: PCR Primersequenzen von 5' nach 3'

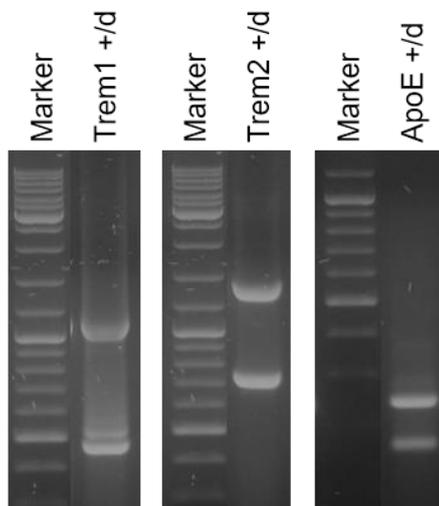
Primer	Sequenz
F-Trem1WT	<i>CCCTCATGCAGTTGGAAATTCTGC</i>
R-Trem1-WT	<i>GTACCATCCAGGAGAAGGACAAG</i>
F-Trem1-neo-mut	<i>GCAGCCTCTGTTCCACATACAC</i>
F-Trem2 WT	<i>CTTAGACCCCCTGGCAGTGACT</i>
R-Trem2 WT	<i>CAGGTTTATCATTGTCCTCAGCCTGC</i>
F-Trem2-neo-mut	<i>GCAGCCTCTGTTCCACATACTTCA</i>
ApoE180	<i>GCCTAGCCGAGGGAGAGCCG</i>
ApoE181	<i>TGTGACTTGGG GCTCTGCAG C</i>
ApoE182	<i>GCCGCCCGACTGCATCT</i>

Die PCR Ansätze wurden kurz in der Tischzentrifuge runter zentrifugiert und die PCRs wurden nach folgenden Programmen durchgeführt:

Tabelle G- 4: PCR Programme

	<i>Trem1</i>		<i>Trem2</i>		<i>ApoE</i>	
Schritt	<i>Temperatur</i>	<i>Zeit</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Zeit</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Zeit</i>
1	95°C	120sec	95°C	120sec	94°C	180sec
2	95°C	30sec	95°C	30sec	94°C	25sec
3	59°C	30sec	62°C	30sec	61°C	40sec
4	72°C	90sec	72°C	90sec	72°C	40sec
	WDH Schritt 2-4 45 x		WDH Schritt 2-4 45 x		WDH Schritt 2-4 37 x	
5	72°C	300sec	72°C	300sec	72°C	300sec
6	4°C	∞	4°C	∞	4°C	∞

Die Trennung der PCR Produkte erfolgte in 1,5- (*Trem1* und *Trem2*) bzw. 2%-igen (*ApoE*) Agarose Gelen (1,5 g bzw. 2 g Agarose, 100 ml TBE-Puffer, 5 µl Roti®-GelStain) mittels



Gelelektrophorese bei einer Stromstärke von 120 mA. Als Marker wurden 5 µl GeneRuler™ DNA Ladder Mix aufgetragen. Unter UV Licht wurden die Banden sichtbar gemacht und fotografiert. Für die *Trem1* PCR war die Wildtyp (WT) (+/+) Bande 1137 bp und die ko (d/d) Bande 506 bp groß. Die WT (+/+) Bande der *Trem2* PCR war 1417 bp und die ko (d/d) Bande 752 bp groß. Als Ergebnis der *ApoE* PCR wurde ein 155 bp großes (WT (+/+) Bande) und ein 245 bp großes (ko (d/d) Bande) PCR Produkt erhalten.

Abbildung G- 1 Exemplarische PCR Ergebnisse von *Trem1*, *Trem2* und *ApoE* PCR

Neben dem Marker zeigen die Bilder jeweils die PCR Produkte von heterozygote Proben (+/d), sodass sowohl die WT als auch die ko Bande auf dem Gel zu sehen ist.

3 Blut und Plasmaanalyse

3.1 Blutglucosemessung

Mit Hilfe von Accu-Check Aviva Teststreifen und des zugehörigen Testgerätes wurde in einem Tropfen Schwanzblut der Tiere Glucose bestimmt.

3.2 Plasma-Gewinnung

Zur Gewinnung von Blutplasma aus Vollblut wurde entweder mit Hilfe von EDTA überzogenen Microvetten® Blut aus der Schwanzvene oder wie unter 1.1 beschrieben aus dem Herzen entnommen. Nachdem das Herzblut in ein Reaktionsgefäß überführt wurde, wurden

sowohl Schwanz- als auch Herzblut bis zum weiteren Prozessieren auf Eis gelagert. Zur Abtrennung der zellulären Blutbestandteile wurde das Vollblut bei 4 °C für 10 min bei 10.000 g zentrifugiert. Das Plasma wurde im Anschluss in ein neues Reaktionsgefäß überführt und sofern es nicht direkt analysiert wurde bei -80 °C gelagert.

3.3 Bestimmung von Cholesterin und Triglyzeriden im Plasma

Mit Hilfe kommerziell verfügbarer Kits (Cholesterol CHOD-PAP, Triglyceride GPO-PAP) wurde die Konzentration von Cholesterin und Triglyzeriden im Plasma enzymatisch bestimmt. Precipath® diente hierbei als Standard. Jeweils 100 µl Precipath oder mit PBS verdünnte Probe wurden in einer Mikrotiterplatte mit 200 µl Reagenz versetzt und für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Bei 540 nm wurde die Extinktion des entstandenen Reaktionsproduktes photometrisch bestimmt. Über lineare Regression der Extinktionen verschiedener Verdünnungen der Standardreihe wurde die Lipidkonzentrationen der Proben berechnet.

3.4 Erstellung des Lipoproteinprofils mittels FPCL

Je experimentelle Gruppe wurde das Plasma zu gleichen Teilen vereinigt. Um die einzelnen Lipoproteinklassen voneinander zu trennen, wurden 200 µl des Plasmapools mittels *fast-performance liquid chromatography* (FPLC) auf einer Superose 6 Increase 10/300 GL bei einer Flussrate von 0,4ml/ min getrennt. Als Laufmittel wurde FPLC-Puffer verwendet. Mit Hilfe eines Fraktionssammlers wurden in einer MegaBlock® Platte 40 Fraktionen mit einem Volumen von 0,5 ml gesammelt und von jeder Fraktion wurde, wie unter 3.3 beschrieben, der Cholesterin- und Triglyzeridgehalt bestimmt.

3.5 Insulinbestimmung

Für die Bestimmung der Insulinkonzentration im Plasma wurde ein kommerziell verfügbares Kit (Ultra Sensitive Rat Insulin ELISA Kit) nach Herstellerangaben verwendet.

3.6 Bestimmung der Transaminasen

Die Bestimmung der Transaminasen erfolgte entweder am Institut für Experimentelle Hepatologie in der AG Tiegs mit einem Cobas Mira-Gerät (Roche) nach Herstellerangaben oder unter Verwendung eines kommerziell verfügbaren Kits (ALT Activity Assay) ebenfalls nach Herstellerangaben.

4 Enzymatische Bestimmung des Gesamtlipidgehalts in Lebergewebe

Mit Hilfe einer Kugelmühle wurden ca. 100 mg Lebergewebe in PBS (10 µl/mg) homogenisiert. Das Lysat wurde nach Verdünnung direkt zur Messung der Triglyzeridkonzentration, wie unter 3.3 beschrieben, herangezogen. Zur Bestimmung der Cholesterinkonzentration wurden 50 µl des Lysats mit einer Lösung aus Chloroform/Methanol (8/5, v/v) extrahiert. Hierzu wurden Lysat und Lösungsmittel zunächst kräftig gemischt und anschließend erfolgte die Abtrennung präzipitierter Proteine durch 5-minütige Zentrifugation

bei 13.000 g. 200 µl der Überstandes wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei 80 °C bis zur Trockene eingengt. Der Lipidfilm wurde in 200 µl PBS aufgenommen und für 20 min bei 50 °C und 600 rpm homogenisiert. 50 µl des Homogenisats sowie des Precipath® wurden mit dem Amplex Red Reaktionsgemisch (Amplex Red: 1/67, Horseradish Peroxidase:1/100, Cholesteroxidase:1/100, Cholesterolesterase: 1/100 in PBS) versetzt und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Fluoreszenz wurde bei einer Anregungswellenlänge von 515 nm und einer Emission von 570 nm gemessen. Die erhaltenen Lipidkonzentrationen wurden auf den Proteingehalt der jeweiligen Leber normiert. Die Proteinkonzentration in der Leber wurde nach der Methode von Lowry durchgeführt. Hierzu wurden der Protein-Standard (verschiedene Verdünnungen einer BSA-Lösung) und 10 µl des oben hergestellten Lysats (1/25 verdünnt mit PBS) in einer MegaBlock® Platte mit 40 µl 0,1 M NaOH und 500 µl eines Gemisches aus Lowry Lösung A und Lowry Lösung B (49/1, v/v) versetzt, gemischt und 10 Minuten im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden jeweils 50 µl Folin-Reagenz zugegeben und es wurde erneut für 20-30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Bei einer Wellenlänge von 750 nm wurde die Extinktion des entstandenen Reaktionsproduktes gemessen und die Proteinkonzentration über lineare Regression der Standard Kurve bestimmt.

5 Histologie

Für die histologische Analyse von Lebergewebe wurde dieses nach Perfusion zunächst in 3,7% Formaldehydlösung fixiert, anschließend unter fließendem Wasser gewaschen und dann in Paraffin eingebettet. Es wurden Schnitte mit einer Dicke von 5µm angefertigt. Sowohl die Hämatoxylin-Eosin als auch die *Sirius-Red* Färbung wurden freundlicherweise von Dr. Markus Heine (Institut für Biochemie und Molekulare Zellbiologie, UKE Hamburg) durchgeführt. Kurz dargestellt ging beiden Färbungen eine Deparaffinierung der Schnitte mittels Alkoholreihe voraus. Zur Übersichtsbildgebung wurden die Schnitte zunächst mit Hämatoxylin und dann mit Eosin gefärbt. Zur Bestimmung von Fibrose wurden die Schnitte mit Sirius-Red gefärbt.

6 Genexpressionsanalyse

6.1 RNA-Isolation und cDNA-Synthese

Zur Isolation von RNA aus Lebergewebe wurde ein Stück Leber zunächst mit peqGOLD TriFast™ versetzt und dann in der Kugelmühle homogenisiert. Dem Lysat wurde Chloroform im Verhältnis 5:1 zugesetzt und anschließend wurde erneut homogenisiert. Zur Phasentrennung erfolgte im Anschluss eine 15-minütige Zentrifugation bei 13.000 g. Die in der oberen Phase enthaltene RNA wurde vorsichtig abgenommen und in einem frischen Reaktionsgefäß mit 70% EtOH präzipitiert. Mit Hilfe des kommerziell verfügbaren NucleoSpin® RNA II Kits wurde die RNA nach Herstellerangaben gereinigt und final in H₂O

a.i. aufgenommen. Die Konzentration und die Reinheit der RNA wurden am *NanoDrop*[®] *Spectrophotometer* bei 260/208 nm überprüft.

Mit Hilfe des *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* wurden 400 ng RNA nach Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben.

6.2 Quantitative *real time* PCR

Zur Quantifizierung der Genexpression wurde eine quantitative *real time* PCR (qPCR) durchgeführt. Hierzu wurden *TaqMan Assay-on-Demand*[™]-*Primer Sets* und Universal PCR *MasterMix* (beides Applied Biosystems) mit der zu untersuchenden cDNA vermengt. Die qPCR Reaktion sowie die Quantifizierung des Reaktionsproduktes erfolgten mittels des *ABI Prism 7900HT Sequence Detection System*. Folgende Primersets wurden verwendet:

Tabelle G- 5: Verwendete TaqMan Assays

Genname	<i>Assay-on-Demand</i> [™]
<i>Abcb11</i> :	Mm00445168_m1
<i>Baat</i> :	Mm00476075_m1
<i>Ccl2</i>	Mm00441242_m1
<i>Col1a1</i>	Mm00801666_g1
<i>Cxcl10</i>	Mm00445235_m1
<i>Cyp27a1</i> :	Mm00470430_m1
<i>Cyp7a1</i> :	Mm00484150_m1
<i>Cyp7b1</i> :	Mm00484157_m1
<i>Cyp8b1</i> :	Mm00501637_s1
<i>Emr1</i>	Mm00802530_m1
<i>Il1b</i>	Mm00434228_m1
<i>Il6</i>	Mm00446190_m1
<i>Nr0b2</i> :	Mm00442278_m1
<i>Tbp</i>	Mm00446973_m1
<i>tbp</i>	Mm00446973_m1
<i>Tgfb</i>	Mm00441724_m1
<i>Timp1</i>	Mm00441818_m1
<i>Tnf</i>	Mm00443258_m1
<i>Trem2</i>	Mm00451744_m1

Die Berechnung der Genexpression erfolgte nach der $\Delta\Delta$ -C_T – Methode. Die erhaltene Kopienzahl wurde anschließend auf das Referenzgen, das *TATA-box binding protein (Tbp)* normiert.

7 Semiquantitative Methode zur Bestimmung von Lipidpezies der Hauptlipidklassen via UPLC-ESI-QqTOF

7.1 Extraktion

In Anlehnung an die Methode von Folch (Zitat) erfolgte die Extraktion von Lipiden aus Lebergewebe.

In ein zuvor mit einer Metallkugel bestücktes 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden ca. 20 mg eines Leberstückes exakt ($\pm 0,005$ mg) eingewogen. Zur Analytik von unpolaren Lipiden wurde für die Extraktion eine mit BHT versetzte Extraktionslösung (FolchBHT) verwendet. Neben einem Mix aus internen Standards (IS), IS1 (10 μ l/mg Einwaage), wurde dem Leberstück zudem noch FolchBHT (50 μ l/mg Einwaage) zugesetzt. Sollten unpolare Lipide analysiert werden, erfolgte die Extraktion mit Methanol, welches mit BHT angereichert war (MeOHBHT). Hierbei wurde das Leberstück mit MeOHBHT (20 μ l/mg Einwaage) und IS1 (0,4 μ l/mg Einwaage) versetzt. Nach Homogenisieren im Tissue Lyser (2x 2 min bei 20 s⁻¹) wurde das Lysat 15 Minuten bei 13.000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Glasvial überführt. Vor der Messung wurden die Extrakte nochmals 1/50 (Folch-Extrakt) bzw. 1/20 (MeOH-Extrakt) mit Eluent B1 verdünnt.

7.2 UPLC-MS Methode

Die Analyse der Extrakte erfolgte apparativ mittels UPLC (*ultra high-performance liquid chromatography*) ESI-UHR-QqTOF (*electro spray-ultra high resolution quadrupole-quadrupole-time-of-flight*). Eine Dionex3000 UPLC war mit einem maXis3G Massenspektrometer gekoppelt. Die Aufnahme der Daten erfolgte im *high-resolution, full scan* Modus mit *collisional induced dissociation fragmentation* (CID). In den nachfolgenden Tabellen sind die Geräteparameter der LC- sowie der MS Methode aufgelistet.

Tabelle G- 6: Geräteparameter der LC-Methode1

Pumpenparameter			
Dauer	25min		
Mobile Phase	A: Wasser + 5 mM NH ₄ Ac B: IPA/MeOH (6/4, v/v) + 5Mm NH ₄ Ac		
Flussrate	0,3 ml/min		
Gradient	Zeit (min)	Eluent A (%)	Eluent B (%)
	0	20	80
	2	13	87
	8	13	87
	10	5	95
	20	1	99
	21	1	99
	22	20	80
	25	20	80
Autosamplerparameter			
Injektionsvolumen	2 μ l (MeOH-Extrakt), 3 μ l (Folch-Extrakt)		
Temperatur	6 °C		
Säulenofenparameter			
Säule	Kinetex C18, Phenomenex (150 x 2.1 mm; 1.7 μ m)		
Temperatur	55 °C		

Tabelle G- 7: Geräteparameter der MS-Methode1

Parameter des Massenspektrometers		
Scan Modus	Auto MS/MS	
Massenbereich	50-1250 m/z	
Spectra rate	3 s^{-1}	
Rolling average	off	
Ionisationsmodus	positiv	
Segmente	3	
	<u>Segment 1:</u> 24,6 min, Messsegment (Ventil so geöffnet, dass LC-Fluss direkt zur Quelle geleitet wird) <u>Segment 2:</u> 0,25 min, Kalibrationssegment (Externe Kalibration mit ESI-L-Tuning-Mix, der über Spritzenpumpe (0,04 ml/h) läuft und in der Waste-Schleife gesammelt wird) <u>Segment 3:</u> Ventil so geöffnet, dass LC-Fluss direkt zur Quelle geleitet wird	
Ionenquelle	Typ	ESI
	End Plate Offset	500 V
	Capillary	4500 V
	Nebulizer	2 bar
	Dry Gas	9 l/min
	Dry Temperatur	200 °C
Transfer	Funnel 1 RF	200Vpp
	isCID	0 eV
	Multipole RF	200 Vpp
Quadrupole	Ion Energy	0 eV
	Low Mass	200 m/z
Collision Cell	Collision Energy	8 eV
	Collision RF	400Vpp
	Transfer Time	75 μs
	Pre Pulse Storage	10 μs
MS/MS	MS/MS (Auo)	on
	Precursor Ions:	
	Threshold:	
	Smart exclusion:	
	Active exclusion:	
	Precursor ion list:	
	Fragmentation:	
Kalibration (vor jeder Messung)	TOF calibration mode	Enhanced Quadratic
	Reference list	ESI-L Tuning-Mix
	Zooming	
	MS/MS	off
	Rolling averga	off
Software		
Chromeleon®, 6.80 Hystar 3.2 MicrOTOF Control SR2 DataAnalysis 4.2 TargetAnalysis 1.3		

7.3 Auswertung

Die erhaltenen Rohdaten wurden mit der von Bruker erworbenen Software Data-Analysis 4.2. (DA) und Target Analysis 1.3 (TA) ausgewertet. Es erfolgte zunächst eine Rekalibrierung der Daten in TA. Einerseits wurde extern auf den ESI-L-Tuning Mix kalibriert, der während des 2. Segments gemessen wurde. Andererseits wurde intern über die Lockmasse Hexakis(1H, 1H, 2H-perfluoroethoxy)phosphazene kalibriert, die über die gesamte Messdauer mitlief, aber nur in Segment 2 nicht von der Messung ausgeschlossen und damit gemessen wurde. Die Identifikation der einzelnen Lipidspezies erfolgte über Referenzsubstanzen, MS/MS Spektren und mit Hilfe der *Lipid-Maps* Datenbank. Lagen die Intergrale der identifizierten Peaks im Bereich der Kalibriergeradenintegrale der Standardsubstanzen wurde die Konzentration anhand der Konzentration des zugesetzten IS1 berechnet.

8 Quantitative Methode zur Bestimmung von Sterol-Derivaten mittels HPLC-ESI-QqQ

8.1 Extraktion

Für die Extraktion von Sterolen aus Lebergewebe oder Fäzes wurde eine methanolische Flüssig-Flüssig-Extraktion durchgeführt. 50-100 mg Lebergewebe bzw. lyophilisiertes Fäzes wurden exakt ($\pm 0,005$ mg) in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß eingewogen und mit 5 μ l IS2 sowie 1 ml MeOH versetzt. Nach Homogenisieren im Tissue Lyser (2x 2 min bei 20 s⁻¹) wurde das Lysat 10 Minuten bei 13.000 g zentrifugiert. Mittels einer Spritze wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und durch einen Membranfilter (Chromafil O-20/3, PTFE, Pore ϕ 0,2 μ l, Filter 3 mm) in ein neues Reaktionsgefäß überführt, bevor er in einer Vakuumzentrifuge bei zur Trockene eingengt wurde. Der zurückgebliebene Lipidfilm wurde in 50 μ l Eluent B2 rekonstituiert.

8.2 HPLC-MS Methode

Die Analyse der Extrakte erfolgte apparativ mittels HPLC (*high-performance liquid chromatography*) ESI-QqQ-MS (*electro spray-Tripel-Quadrupol-Massenspektrometrie*). Ein Agilent 1200 Infinity Quaternary LC-System war mit einer API4000Q trap gekoppelt. Da es sich um eine quantitative Methode handelte, wurde im *multiple reaction monitoring* (MRM) Modus gemessen. Die Massenübergänge der Analyten sowie die jeweiligen Quell- und Fragmentierungsparameter sind der im Verkauf der Promotion entstandenen Publikation zu entnehmen (John et al. 2014). Zur Verbesserung der Empfindlichkeit sowie zur Messung von mindestens 10 Datenpunkten pro Analyt, wurde die Messung in 3 Perioden eingeteilt. Die Gesamtdauer von Periode 1 betrug 5 min, die von Periode 2 10 min und die Gesamtdauer von Periode 3 betrug 15 min. In den nachfolgenden Tabellen sind die Geräteparameter der LC- sowie der MS Methode aufgelistet.

Tabelle G- 8:Geräteparameter der LC-Methode2

Pumpenparameter			
Dauer	66min		
Mobile Phase	A: Wasser + 5 mM NH ₄ Ac + 0,1% FA B: MeOH + 5Mm NH ₄ Ac + 0,1% FA		
Flussrate	0,3 ml/min		
Gradient	Zeit (min)	Eluent A (%)	Eluent B (%)
	0	40	60
	2	40	60
	20	0	100
	50	0	100
	53	40	60
	66	40	60
Autosamplerparameter			
Injektionsvolumen	5 µl		
Temperatur	6 °C		
Säulenofenparameter			
Säule	Accucore™ Polar Premium HPLC Column, Thermo Fisher Scientific (150 x 2,1 mm, 2,6 µm, Porengröße: 140 Å)		
Temperatur	20 °C		

Tabelle G- 9: Geräteparameter der MS-Methode2

Parameter des Massenspektrometers				
Ionenquelle	Typ	ESI		
	Ionisierungsmodus	positiv		
	Ion Spray Voltage	4500 V		
	Curtain Gas	30 psi		
	Ion Source Heater	550 °C		
	Ion Source Gas 1	40 psi		
	Ion Source Gas 2	50 psi		
	Interface Heater	on		
Modus	MRM			
Massenübergänge (Ergänzungen zu John et al. 2015)	Substanz	Quantifier	Qualifier1	Qualifier2
	D4-CA	430,062→ 377,2	430,062→ 359,2	430,062→ 358,7
Software	Analyst 1.6.1.			

8.3 Auswertung

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Analyst 1.6.1 Software. Zur Peak-Identifizierung wurde neben den spezifischen Massenübergängen auch die Retentionszeit des entsprechenden Einzelstandards herangezogen. Wie in (John et al. 2014) beschrieben, wurde die Konzentration

durch lineare Regression einer Neun-Punkt-Kalibrierkurve der entsprechenden Standardsubstanz ermittelt. Wie jede Probe enthielt auch jeder Punkt der Kalibrierkurve den internen Standard Mix IS2 in derselben Konzentration (10 μM d4-GCDCA, 10 μM d4-CA, 10 μM d6-25-OH-Cholesterin und 100 μM d7-Cholesterin). Die Berechnung der UBAs basierte auf d4-CA und die Berechnung der CBAs auf d4-GCDCA.

9 Mikrobiomanalytik

Für die Analyse des Darmmikrobioms wurde frischer Fäzes gesammelt und direkt schockgefroren. Die Extraktion der 16S rDNA sowie deren Sequenzierung und Auswertung erfolgte in Kooperation mit dem Institut für Klinische Molekular Biologie (IKMB) der Universität Kiel wie beschrieben (Ruhleemann et al. 2016)

10 Statistik

Die in dieser Arbeit präsentierten Daten sind als Mittelwerte + Standardfehler (SEM = *standard error of the mean*) dargestellt. Die Überprüfung der statistischen Signifikanz erfolgte bei zwei Vergleichsgruppen mit Hilfe des zweiseitigen, ungepaarten *Student's T-test*. Wurde der Einfluss nur einer Gruppierungsvariablen auf mehr als zwei Versuchsgruppen untersucht, so wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (*One-Way ANOVA (analysis of variance)*) mit anschließendem *Tukey-Post-hoc-Test* durchgeführt. Wurde hingegen der Einfluss mehrerer Gruppierungsvariablen untersucht, wurde eine *two-way ANOVA (analysis of variance)* mit *Tukey-Post-hoc-Test* durchgeführt. Beide Berechnungen erfolgten unter Zuhilfenahme der Software GraphPad Prism. Eine statistische Signifikanz wurde ab einem $P < 0,05$ angenommen.

Teil H Literaturliste

(2016). "Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants." Lancet **387**(10026): 1377-1396.

Aad, G., T. Abajyan, et al. (2013). "Observation of associated near-side and away-side long-range correlations in $\sqrt{s(NN)}=5.02$ TeV proton-lead collisions with the ATLAS detector." Phys Rev Lett **110**(18): 182302.

Acton, S., A. Rigotti, et al. (1996). "Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor." Science **271**(5248): 518-520.

Altmann, S. W., H. R. Davis, Jr., et al. (2004). "Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption." Science **303**(5661): 1201-1204.

Amar, J., R. Burcelin, et al. (2008). "Energy intake is associated with endotoxemia in apparently healthy men." Am J Clin Nutr **87**(5): 1219-1223.

Ananthanarayanan, M., N. Balasubramanian, et al. (2001). "Human bile salt export pump promoter is transactivated by the farnesoid X receptor/bile acid receptor." J Biol Chem **276**(31): 28857-28865.

Ananthanarayanan, M., O. C. Ng, et al. (1994). "Characterization of cloned rat liver Na(+)-bile acid cotransporter using peptide and fusion protein antibodies." Am J Physiol **267**(4 Pt 1): G637-643.

Angelin, B., I. Bjorkhem, et al. (1982). "Hepatic uptake of bile acids in man. Fasting and postprandial concentrations of individual bile acids in portal venous and systemic blood serum." J Clin Invest **70**(4): 724-731.

Arendt, B. M., D. W. Ma, et al. (2013). "Nonalcoholic fatty liver disease is associated with lower hepatic and erythrocyte ratios of phosphatidylcholine to phosphatidylethanolamine." Appl Physiol Nutr Metab **38**(3): 334-340.

Atagi, Y., C. C. Liu, et al. (2015). "Apolipoprotein E Is a Ligand for Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 2 (TREM2)." J Biol Chem **290**(43): 26043-26050.

Backhed, F., H. Ding, et al. (2004). "The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(44): 15718-15723.

Bailey, C. C., L. B. DeVaux, et al. (2015). "The Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 2 Binds Apolipoprotein E." J Biol Chem **290**(43): 26033-26042.

Barbatelli, G., I. Murano, et al. (2010). "The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation." Am J Physiol Endocrinol Metab **298**(6): E1244-1253.

Bartelt, A., O. T. Bruns, et al. (2011). "Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance." Nat Med **17**(2): 200-205.

Bartelt, A. and J. Heeren (2014). "Adipose tissue browning and metabolic health." Nat Rev Endocrinol **10**(1): 24-36.

Bartelt, A., P. Orlando, et al. (2011). "Altered endocannabinoid signalling after a high-fat diet in Apoe(-/-) mice: relevance to adipose tissue inflammation, hepatic steatosis and insulin resistance." Diabetologia **54**(11): 2900-2910.

Barton, G. M. and R. Medzhitov (2003). "Toll-like receptor signaling pathways." Science **300**(5625): 1524-1525.

Beisiegel, U., W. Weber, et al. (1989). "The LDL-receptor-related protein, LRP, is an apolipoprotein E-binding protein." Nature **341**(6238): 162-164.

Benhamed, F., P. D. Denechaud, et al. (2012). "The lipogenic transcription factor ChREBP dissociates hepatic steatosis from insulin resistance in mice and humans." J Clin Invest **122**(6): 2176-2194.

Berbee, J. F., M. R. Boon, et al. (2015). "Brown fat activation reduces hypercholesterolaemia and protects from atherosclerosis development." Nat Commun **6**: 6356.

Bilzer, M., F. Roggel, et al. (2006). "Role of Kupffer cells in host defense and liver disease." Liver Int **26**(10): 1175-1186.

Bjorkhem, I., V. Leoni, et al. (2010). "Genetic connections between neurological disorders and cholesterol metabolism." J Lipid Res **51**(9): 2489-2503.

Bleharski, J. R., V. Kiessler, et al. (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**(7): 3812-3818.

Boone, D. L., E. E. Turer, et al. (2004). "The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses." Nat Immunol **5**(10): 1052-1060.

Bostrom, P., J. Wu, et al. (2012). "A PGC1-alpha-dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis." Nature **481**(7382): 463-468.

Bouchon, A., J. Dietrich, et al. (2000). "Cutting edge: inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes." J Immunol **164**(10): 4991-4995.

Bouchon, A., F. Facchetti, et al. (2001). "TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock." Nature **410**(6832): 1103-1107.

Broeders, E. P., E. B. Nascimento, et al. (2015). "The Bile Acid Chenodeoxycholic Acid Increases Human Brown Adipose Tissue Activity." Cell Metab **22**(3): 418-426.

Brown, M. S. and J. L. Goldstein (1986). "A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis." Science **232**(4746): 34-47.

Brown, M. S., P. T. Kovanen, et al. (1981). "Regulation of plasma cholesterol by lipoprotein receptors." Science **212**(4495): 628-635.

Brun, P., I. Castagliuolo, et al. (2007). "Increased intestinal permeability in obese mice: new evidence in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **292**(2): G518-525.

Bugianesi, E., S. Moscatiello, et al. (2010). "Insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease." Curr Pharm Des **16**(17): 1941-1951.

Calkin, A. C. and P. Tontonoz (2012). "Transcriptional integration of metabolism by the nuclear sterol-activated receptors LXR and FXR." Nat Rev Mol Cell Biol **13**(4): 213-224.

Cani, P. D., J. Amar, et al. (2007). "Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance." Diabetes **56**(7): 1761-1772.

Cani, P. D., S. Possemiers, et al. (2009). "Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability." Gut **58**(8): 1091-1103.

Cannon, B. and J. Nedergaard (2004). "Brown adipose tissue: function and physiological significance." Physiol Rev **84**(1): 277-359.

Cannon, J. P., M. O'Driscoll, et al. (2012). "Specific lipid recognition is a general feature of CD300 and TREM molecules." Immunogenetics **64**(1): 39-47.

Cao, W., K. W. Daniel, et al. (2004). "p38 mitogen-activated protein kinase is the central regulator of cyclic AMP-dependent transcription of the brown fat uncoupling protein 1 gene." Mol Cell Biol **24**(7): 3057-3067.

Chen, L. C., J. D. Laskin, et al. (2008). "Regulation of TREM expression in hepatic macrophages and endothelial cells during acute endotoxemia." Exp Mol Pathol **84**(2): 145-155.

Chevalier, C., O. Stojanovic, et al. (2015). "Gut Microbiota Orchestrates Energy Homeostasis during Cold." Cell **163**(6): 1360-1374.

Choi, S. H. and H. N. Ginsberg (2011). "Increased very low density lipoprotein (VLDL) secretion, hepatic steatosis, and insulin resistance." Trends Endocrinol Metab **22**(9): 353-363.

Clements, W. D., R. Parks, et al. (1996). "Role of the gut in the pathophysiology of extrahepatic biliary obstruction." Gut **39**(4): 587-593.

Cohen, J. C., J. D. Horton, et al. (2011). "Human fatty liver disease: old questions and new insights." Science **332**(6037): 1519-1523.

Colonna, M. (2003). "TREM2 in the immune system and beyond." Nat Rev Immunol **3**(6): 445-453.

Corbin, K. D. and S. H. Zeisel (2012). "Choline metabolism provides novel insights into nonalcoholic fatty liver disease and its progression." Curr Opin Gastroenterol **28**(2): 159-165.

Correale, C., M. Genua, et al. (2013). "Bacterial sensor triggering receptor expressed on myeloid cells-2 regulates the mucosal inflammatory response." Gastroenterology **144**(2): 346-356 e343.

Crespo, J., A. Cayon, et al. (2001). "Gene expression of tumor necrosis factor alpha and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients." Hepatology **34**(6): 1158-1163.

Csak, T., A. Velayudham, 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**(3): G433-441.

Cypess, A. M., S. Lehman, et al. (2009). "Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans." N Engl J Med **360**(15): 1509-1517.

Cypess, A. M., L. S. Weiner, et al. (2015). "Activation of human brown adipose tissue by a beta3-adrenergic receptor agonist." Cell Metab **21**(1): 33-38.

David, L. A., C. F. Maurice, et al. (2014). "Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome." Nature **505**(7484): 559-563.

Davis, H. R., Jr., L. J. Zhu, et al. (2004). "Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) is the intestinal phytosterol and cholesterol transporter and a key modulator of whole-body cholesterol homeostasis." J Biol Chem **279**(32): 33586-33592.

Daws, M. R., P. M. Sullam, et al. (2003). "Pattern recognition by TREM-2: binding of anionic ligands." J Immunol **171**(2): 594-599.

Dawson, P. A., J. Haywood, et al. (2003). "Targeted deletion of the ileal bile acid transporter eliminates enterohepatic cycling of bile acids in mice." J Biol Chem **278**(36): 33920-33927.

Day, C. P. and O. F. James (1998). "Steatohepatitis: a tale of two "hits"?" Gastroenterology **114**(4): 842-845.

de Aguiar Vallim, T. Q., E. J. Tarling, et al. (2013). "Pleiotropic roles of bile acids in metabolism." Cell Metab **17**(5): 657-669.

Debosch, B. J., Z. Chen, et al. (2014). "Glucose transporter 8 (GLUT8) mediates fructose-induced de novo lipogenesis and macrosteatosis." J Biol Chem **289**(16): 10989-10998.

Deitch, E. A., K. Sittig, et al. (1990). "Obstructive jaundice promotes bacterial translocation from the gut." Am J Surg **159**(1): 79-84.

Delzenne, N. M., A. M. Neyrinck, et al. (2011). "Targeting gut microbiota in obesity: effects of prebiotics and probiotics." Nat Rev Endocrinol **7**(11): 639-646.

Dentin, R., F. Benhamed, et al. (2006). "Liver-specific inhibition of ChREBP improves hepatic steatosis and insulin resistance in ob/ob mice." Diabetes **55**(8): 2159-2170.

Devkota, S., Y. Wang, et al. (2012). "Dietary-fat-induced taurocholic acid promotes pathobiont expansion and colitis in Il10^{-/-} mice." Nature **487**(7405): 104-108.

Dietschy, J. M. (1968). "Mechanisms for the intestinal absorption of bile acids." J Lipid Res **9**(3): 297-309.

Dong, M., X. Yang, et al. (2013). "Cold exposure promotes atherosclerotic plaque growth and instability via UCP1-dependent lipolysis." Cell Metab **18**(1): 118-129.

Donnelly, K. L., C. I. Smith, et al. (2005). "Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease." J Clin Invest **115**(5): 1343-1351.

Eisenberg, S. and T. Olivecrona (1979). "Very low density lipoprotein. Fate of phospholipids, cholesterol, and apolipoprotein C during lipolysis in vitro." J Lipid Res **20**(5): 614-623.

Eissing, L. (2013). "Mechanismen und Regulation der Lipid-vermittelten Leberentzündung."

Eissing, L., T. Scherer, et al. (2013). "De novo lipogenesis in human fat and liver is linked to ChREBP-beta and metabolic health." Nat Commun **4**: 1528.

El Mezayen, R., M. El Gazzar, et al. (2007). "Endogenous signals released from necrotic cells augment inflammatory responses to bacterial endotoxin." Immunol Lett **111**(1): 36-44.

Erridge, C., T. Attina, et al. (2007). "A high-fat meal induces low-grade endotoxemia: evidence of a novel mechanism of postprandial inflammation." Am J Clin Nutr **86**(5): 1286-1292.

Fang, S., J. M. Suh, et al. (2015). "Intestinal FXR agonism promotes adipose tissue browning and reduces obesity and insulin resistance." Nat Med **21**(2): 159-165.

Feldmann, H. M., V. Golozoubova, et al. (2009). "UCP1 ablation induces obesity and abolishes diet-induced thermogenesis in mice exempt from thermal stress by living at thermoneutrality." Cell Metab **9**(2): 203-209.

Feldstein, A. E., N. W. Werneburg, et al. (2004). "Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF-alpha expression via a lysosomal pathway." Hepatology **40**(1): 185-194.

Ferre, N., M. Martinez-Clemente, et al. (2009). "Increased susceptibility to exacerbated liver injury in hypercholesterolemic ApoE-deficient mice: potential involvement of oxysterols." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **296**(3): G553-562.

Folch, J., M. Lees, et al. (1957). "A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues." J Biol Chem **226**(1): 497-509.

Foretz, M., C. Guichard, et al. (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**(22): 12737-12742.

Garcia-Martinez, I., N. Santoro, et al. (2016). "Hepatocyte mitochondrial DNA drives nonalcoholic steatohepatitis by activation of TLR9." J Clin Invest **126**(3): 859-864.

Ge, L., J. Wang, et al. (2008). "The cholesterol absorption inhibitor ezetimibe acts by blocking the sterol-induced internalization of NPC1L1." Cell Metab **7**(6): 508-519.

Gerloff, T., B. Stieger, et al. (1998). "The sister of P-glycoprotein represents the canalicular bile salt export pump of mammalian liver." J Biol Chem **273**(16): 10046-10050.

Ghoshal, S., J. Witta, et al. (2009). "Chylomicrons promote intestinal absorption of lipopolysaccharides." J Lipid Res **50**(1): 90-97.

Gibot, S., F. Massin, et al. (2007). "TREM-1 promotes survival during septic shock in mice." Eur J Immunol **37**(2): 456-466.

Goldstein, J. L., R. A. DeBose-Boyd, et al. (2006). "Protein sensors for membrane sterols." Cell **124**(1): 35-46.

Gong, Y. Z., E. T. Everett, et al. (1994). "Molecular cloning, tissue distribution, and expression of a 14-kDa bile acid-binding protein from rat ileal cytosol." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(11): 4741-4745.

Goodwin, B., S. A. Jones, et al. (2000). "A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 represses bile acid biosynthesis." Mol Cell **6**(3): 517-526.

Guerreiro, R., B. Bilgic, et al. (2013). "Novel compound heterozygous mutation in TREM2 found in a Turkish frontotemporal dementia-like family." Neurobiol Aging **34**(12): 2890 e2891-2895.

Gusarova, V., J. Seo, et al. (2007). "Golgi-associated maturation of very low density lipoproteins involves conformational changes in apolipoprotein B, but is not dependent on apolipoprotein E." J Biol Chem **282**(27): 19453-19462.

Halilbasic, E., T. Claudel, et al. (2013). "Bile acid transporters and regulatory nuclear receptors in the liver and beyond." J Hepatol **58**(1): 155-168.

Hamady, M. and R. Knight (2009). "Microbial community profiling for human microbiome projects: Tools, techniques, and challenges." Genome Res **19**(7): 1141-1152.

Hamerman, J. A., J. R. Jarjoura, et al. (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**(4): 2051-2055.

Harte, A. L., N. F. da Silva, et al. (2010). "Elevated endotoxin levels in non-alcoholic fatty liver disease." J Inflamm (Lond) **7**: 15.

Haselmayer, P., L. Grosse-Hovest, et al. (2007). "TREM-1 ligand expression on platelets enhances neutrophil activation." Blood **110**(3): 1029-1035.

Hebbard, L. and J. George (2011). "Animal models of nonalcoholic fatty liver disease." Nat Rev Gastroenterol Hepatol **8**(1): 35-44.

Heeren, J. and H. Munzberg (2013). "Novel aspects of brown adipose tissue biology." Endocrinol Metab Clin North Am **42**(1): 89-107.

Hofmann, A. F. (2009). "The enterohepatic circulation of bile acids in mammals: form and functions." Front Biosci (Landmark Ed) **14**: 2584-2598.

Hoshino, K., O. Takeuchi, et al. (1999). "Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product." J Immunol **162**(7): 3749-3752.

Hotamisligil, G. S. (2006). "Inflammation and metabolic disorders." Nature **444**(7121): 860-867.

Hotamisligil, G. S., N. S. Shargill, et al. (1993). "Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance." Science **259**(5091): 87-91.

Inagaki, T., M. Choi, et al. (2005). "Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis." Cell Metab **2**(4): 217-225.

Inagaki, T., A. Moschetta, et al. (2006). "Regulation of antibacterial defense in the small intestine by the nuclear bile acid receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(10): 3920-3925.

Ioannou, G. N. (2016). "The Role of Cholesterol in the Pathogenesis of NASH." Trends Endocrinol Metab **27**(2): 84-95.

Ishibashi, S., M. Schwarz, et al. (1996). "Disruption of cholesterol 7 α -hydroxylase gene in mice. I. Postnatal lethality reversed by bile acid and vitamin supplementation." J Biol Chem **271**(30): 18017-18023.

Islam, K. B., S. Fukiya, et al. (2011). "Bile acid is a host factor that regulates the composition of the cecal microbiota in rats." Gastroenterology **141**(5): 1773-1781.

Jacobs, R. L., C. Devlin, et al. (2004). "Targeted deletion of hepatic CTP:phosphocholine cytidyltransferase alpha in mice decreases plasma high density and very low density lipoproteins." J Biol Chem **279**(45): 47402-47410.

Jacobs, R. L., S. Lingrell, et al. (2008). "Hepatic CTP:phosphocholine cytidyltransferase-alpha is a critical predictor of plasma high density lipoprotein and very low density lipoprotein." J Biol Chem **283**(4): 2147-2155.

Jacquemin, E., B. Hagenbuch, et al. (1994). "Expression cloning of a rat liver Na(+)-independent organic anion transporter." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(1): 133-137.

Jakulj, L., J. Besseling, et al. (2013). "Intestinal cholesterol secretion: future clinical implications." Neth J Med **71**(9): 459-465.

Jiang, C., C. Xie, et al. (2015). "Intestinal farnesoid X receptor signaling promotes nonalcoholic fatty liver disease." J Clin Invest **125**(1): 386-402.

John, C., P. Werner, et al. (2014). "A liquid chromatography-tandem mass spectrometry-based method for the simultaneous determination of hydroxy sterols and bile acids." J Chromatogr A **1371**: 184-195.

Jonsson, T., H. Stefansson, et al. (2013). "Variant of TREM2 associated with the risk of Alzheimer's disease." N Engl J Med **368**(2): 107-116.

Joyce, S. A., J. MacSharry, et al. (2014). "Regulation of host weight gain and lipid metabolism by bacterial bile acid modification in the gut." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(20): 7421-7426.

Kanda, H., S. Tateya, et al. (2006). "MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity." J Clin Invest **116**(6): 1494-1505.

Karlsson, F. H., V. Tremaroli, et al. (2013). "Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control." Nature **498**(7452): 99-103.

Kast, H. R., B. Goodwin, et al. (2002). "Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) by the nuclear receptors pregnane X receptor, farnesoid X-activated receptor, and constitutive androstane receptor." J Biol Chem **277**(4): 2908-2915.

Kast, H. R., C. M. Nguyen, et al. (2001). "Farnesoid X-activated receptor induces apolipoprotein C-II transcription: a molecular mechanism linking plasma triglyceride levels to bile acids." Mol Endocrinol **15**(10): 1720-1728.

Katsuma, S., A. Hirasawa, et al. (2005). "Bile acids promote glucagon-like peptide-1 secretion through TGR5 in a murine enteroendocrine cell line STC-1." Biochem Biophys Res Commun **329**(1): 386-390.

Kawamata, Y., R. Fujii, et al. (2003). "A G protein-coupled receptor responsive to bile acids." J Biol Chem **278**(11): 9435-9440.

Kazak, L., E. T. Chouchani, et al. (2015). "A creatine-driven substrate cycle enhances energy expenditure and thermogenesis in beige fat." Cell **163**(3): 643-655.

Kir, S., S. A. Beddow, et al. (2011). "FGF19 as a postprandial, insulin-independent activator of hepatic protein and glycogen synthesis." Science **331**(6024): 1621-1624.

Klesney-Tait, J., I. R. Turnbull, et al. (2006). "The TREM receptor family and signal integration." Nat Immunol **7**(12): 1266-1273.

Kohli, R., M. Kirby, 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**(3): 934-944.

Kozik, J. H., T. Trautmann, et al. (2016). "Attenuated viral hepatitis in Trem1^{-/-} mice is associated with reduced inflammatory activity of neutrophils." Sci Rep **6**: 28556.

Kuipers, F., V. W. Bloks, et al. (2014). "Beyond intestinal soap--bile acids in metabolic control." Nat Rev Endocrinol **10**(8): 488-498.

Lade, A., L. A. Noon, et al. (2014). "Contributions of metabolic dysregulation and inflammation to nonalcoholic steatohepatitis, hepatic fibrosis, and cancer." Curr Opin Oncol **26**(1): 100-107.

Laugerette, F., C. Vors, et al. (2011). "Emulsified lipids increase endotoxemia: possible role in early postprandial low-grade inflammation." J Nutr Biochem **22**(1): 53-59.

Lazo, M., R. Hernaez, et al. (2013). "Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in the United States: the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994." Am J Epidemiol **178**(1): 38-45.

Lee, Y. H., A. P. Petkova, et al. (2012). "In vivo identification of bipotential adipocyte progenitors recruited by beta3-adrenoceptor activation and high-fat feeding." Cell Metab **15**(4): 480-491.

Levene, A. P. and R. D. Goldin (2012). "The epidemiology, pathogenesis and histopathology of fatty liver disease." Histopathology **61**(2): 141-152.

Levy, M., C. A. Thaiss, et al. (2015). "Microbiota-Modulated Metabolites Shape the Intestinal Microenvironment by Regulating NLRP6 Inflammasome Signaling." Cell **163**(6): 1428-1443.

Li-Hawkins, J., M. Gafvels, et al. (2002). "Cholic acid mediates negative feedback regulation of bile acid synthesis in mice." J Clin Invest **110**(8): 1191-1200.

Li-Hawkins, J., E. G. Lund, et al. (2000). "Disruption of the oxysterol 7 α -hydroxylase gene in mice." J Biol Chem **275**(22): 16536-16542.

Li, F., C. Jiang, et al. (2013). "Microbiome remodelling leads to inhibition of intestinal farnesoid X receptor signalling and decreased obesity." Nat Commun **4**: 2384.

Li, Z., L. B. Agellon, et al. (2006). "The ratio of phosphatidylcholine to phosphatidylethanolamine influences membrane integrity and steatohepatitis." Cell Metab **3**(5): 321-331.

Li, Z., S. Yang, et al. (2003). "Probiotics and antibodies to TNF inhibit inflammatory activity and improve nonalcoholic fatty liver disease." Hepatology **37**(2): 343-350.

Liew, F. Y., D. Xu, et al. (2005). "Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses." Nat Rev Immunol **5**(6): 446-458.

Long, J. Z., K. J. Svensson, et al. (2016). "The Secreted Enzyme PM20D1 Regulates Lipidated Amino Acid Uncouplers of Mitochondria." Cell.

Love, M. W. and P. A. Dawson (1998). "New insights into bile acid transport." Curr Opin Lipidol **9**(3): 225-229.

Lowell, B. B., S. S. V, et al. (1993). "Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation of brown adipose tissue." Nature **366**(6457): 740-742.

Lu, T. T., M. Makishima, et al. (2000). "Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors." Mol Cell **6**(3): 507-515.

Ma, K., P. K. Saha, et al. (2006). "Farnesoid X receptor is essential for normal glucose homeostasis." J Clin Invest **116**(4): 1102-1109.

Makishima, M., A. Y. Okamoto, et al. (1999). "Identification of a nuclear receptor for bile acids." Science **284**(5418): 1362-1365.

Malhi, H. and R. J. Kaufman (2011). "Endoplasmic reticulum stress in liver disease." J Hepatol **54**(4): 795-809.

Marchesini, G., R. Marzocchi, et al. (2005). "Nonalcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome." Curr Opin Lipidol **16**(4): 421-427.

Maruyama, T., Y. Miyamoto, et al. (2002). "Identification of membrane-type receptor for bile acids (M-BAR)." Biochem Biophys Res Commun **298**(5): 714-719.

Matsubara, T., F. Li, et al. (2013). "FXR signaling in the enterohepatic system." Mol Cell Endocrinol **368**(1-2): 17-29.

Maxfield, F. R. and I. Tabas (2005). "Role of cholesterol and lipid organization in disease." Nature **438**(7068): 612-621.

Mensenkamp, A. R., L. M. Havekes, et al. (2001). "Hepatic steatosis and very low density lipoprotein secretion: the involvement of apolipoprotein E." J Hepatol **35**(6): 816-822.

Merkel, M., B. Loeffler, et al. (2005). "Apolipoprotein AV accelerates plasma hydrolysis of triglyceride-rich lipoproteins by interaction with proteoglycan-bound lipoprotein lipase." J Biol Chem **280**(22): 21553-21560.

Michelotti, G. A., M. V. Machado, et al. (2013). "NAFLD, NASH and liver cancer." Nat Rev Gastroenterol Hepatol **10**(11): 656-665.

Miele, L., V. Valenza, et al. (2009). "Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease." Hepatology **49**(6): 1877-1887.

Moschen, A. R., S. Kaser, et al. (2013). "Non-alcoholic steatohepatitis: a microbiota-driven disease." Trends Endocrinol Metab **24**(11): 537-545.

N'Diaye, E. N., C. S. Branda, et al. (2009). "TREM-2 (triggering receptor expressed on myeloid cells 2) is a phagocytic receptor for bacteria." J Cell Biol **184**(2): 215-223.

Nedergaard, J. and B. Cannon (2014). "The browning of white adipose tissue: some burning issues." Cell Metab **20**(3): 396-407.

Neuschwander-Tetri, B. A. (2010). "Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: the central role of nontriglyceride fatty acid metabolites." Hepatology **52**(2): 774-788.

Nilsson, S. K., F. Anderson, et al. (2012). "Triacylglycerol-rich lipoproteins protect lipoprotein lipase from inactivation by ANGPTL3 and ANGPTL4." Biochim Biophys Acta **1821**(10): 1370-1378.

Nilsson, S. K., J. Heeren, et al. (2011). "Apolipoprotein A-V; a potent triglyceride reducer." Atherosclerosis **219**(1): 15-21.

Noga, A. A., Y. Zhao, et al. (2002). "An unexpected requirement for phosphatidylethanolamine N-methyltransferase in the secretion of very low density lipoproteins." J Biol Chem **277**(44): 42358-42365.

Olefsky, J. M. and C. K. Glass (2010). "Macrophages, inflammation, and insulin resistance." Annu Rev Physiol **72**: 219-246.

Paloneva, J., J. Mandelin, et al. (2003). "DAP12/TREM2 deficiency results in impaired osteoclast differentiation and osteoporotic features." J Exp Med **198**(4): 669-675.

Paloneva, J., T. Manninen, 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**(3): 656-662.

Pandak, W. M., P. Bohdan, et al. (2001). "Expression of sterol 12alpha-hydroxylase alters bile acid pool composition in primary rat hepatocytes and in vivo." Gastroenterology **120**(7): 1801-1809.

Park, E. J., J. H. Lee, et al. (2010). "Dietary and genetic obesity promote liver inflammation and tumorigenesis by enhancing IL-6 and TNF expression." Cell **140**(2): 197-208.

Park, M., J. W. Yi, et al. (2015). "Triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM2) promotes adipogenesis and diet-induced obesity." Diabetes **64**(1): 117-127.

Parks, D. J., S. G. Blanchard, et al. (1999). "Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor." Science **284**(5418): 1365-1368.

Pellicoro, A., P. Ramachandran, et al. (2014). "Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ." Nat Rev Immunol **14**(3): 181-194.

Pfannenberger, C., M. K. Werner, et al. (2010). "Impact of age on the relationships of brown adipose tissue with sex and adiposity in humans." Diabetes **59**(7): 1789-1793.

Piedrahita, J. A., S. H. Zhang, et al. (1992). "Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(10): 4471-4475.

Pircher, P. C., J. L. Kitto, et al. (2003). "Farnesoid X receptor regulates bile acid-amino acid conjugation." J Biol Chem **278**(30): 27703-27711.

Plump, A. S., J. D. Smith, et al. (1992). "Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells." Cell **71**(2): 343-353.

Poliani, P. L., Y. Wang, et al. (2015). "TREM2 sustains microglial expansion during aging and response to demyelination." J Clin Invest **125**(5): 2161-2170.

Pols, T. W., M. Nomura, et al. (2011). "TGR5 activation inhibits atherosclerosis by reducing macrophage inflammation and lipid loading." Cell Metab **14**(6): 747-757.

Poltorak, A., X. He, et al. (1998). "Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene." Science **282**(5396): 2085-2088.

Possamai, L. A., C. G. Antoniadis, et al. (2010). "Role of monocytes and macrophages in experimental and human acute liver failure." World J Gastroenterol **16**(15): 1811-1819.

Postic, C. and J. Girard (2008). "Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice." J Clin Invest **118**(3): 829-838.

Prawitt, J., M. Abdelkarim, et al. (2011). "Farnesoid X receptor deficiency improves glucose homeostasis in mouse models of obesity." Diabetes **60**(7): 1861-1871.

Puigserver, P., Z. Wu, et al. (1998). "A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis." Cell **92**(6): 829-839.

Qin, J., R. Li, et al. (2010). "A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing." Nature **464**(7285): 59-65.

Qin, J., Y. Li, et al. (2012). "A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes." Nature **490**(7418): 55-60.

Ratziu, V., Z. Goodman, et al. (2015). "Current efforts and trends in the treatment of NASH." J Hepatol **62**(1 Suppl): S65-75.

Read, C. B., J. L. Kuijper, et al. (2015). "Cutting Edge: identification of neutrophil PGLYRP1 as a ligand for TREM-1." J Immunol **194**(4): 1417-1421.

Ridaura, V. K., J. J. Faith, et al. (2013). "Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice." Science **341**(6150): 1241-1244.

Ridlon, J. M., D. J. Kang, et al. (2006). "Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria." J Lipid Res **47**(2): 241-259.

Rivera, C. A., P. Adegboyega, et al. (2007). "Toll-like receptor-4 signaling and Kupffer cells play pivotal roles in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis." J Hepatol **47**(4): 571-579.

Rohlmann, A., M. Gotthardt, et al. (1998). "Inducible inactivation of hepatic LRP gene by cre-mediated recombination confirms role of LRP in clearance of chylomicron remnants." J Clin Invest **101**(3): 689-695.

Rosen, E. D. and B. M. Spiegelman (2014). "What we talk about when we talk about fat." Cell **156**(1-2): 20-44.

Rosenwald, M., A. Perdikari, et al. (2013). "Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes." Nat Cell Biol **15**(6): 659-667.

Ruhlemann, M. C., F. A. Heinsen, et al. (2016). "Faecal microbiota profiles as diagnostic biomarkers in primary sclerosing cholangitis." Gut.

Russell, D. W. (2003). "The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis." Annu Rev Biochem **72**: 137-174.

Ryan, K. K., V. Tremaroli, et al. (2014). "FXR is a molecular target for the effects of vertical sleeve gastrectomy." Nature **509**(7499): 183-188.

Sabio, G., M. Das, et al. (2008). "A stress signaling pathway in adipose tissue regulates hepatic insulin resistance." Science **322**(5907): 1539-1543.

Saito, M., Y. Okamatsu-Ogura, et al. (2009). "High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity." Diabetes **58**(7): 1526-1531.

Sanyal, A. J., C. Campbell-Sargent, et al. (2001). "Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities." Gastroenterology **120**(5): 1183-1192.

Sayin, S. I., A. Wahlstrom, et al. (2013). "Gut microbiota regulates bile acid metabolism by reducing the levels of tauro-beta-muricholic acid, a naturally occurring FXR antagonist." Cell Metab **17**(2): 225-235.

Schaap, F. G., P. C. Rensen, et al. (2004). "ApoAV reduces plasma triglycerides by inhibiting very low density lipoprotein-triglyceride (VLDL-TG) production and stimulating lipoprotein lipase-mediated VLDL-TG hydrolysis." J Biol Chem **279**(27): 27941-27947.

Schenk, M., A. Bouchon, et al. (2007). "TREM-1--expressing intestinal macrophages crucially amplify chronic inflammation in experimental colitis and inflammatory bowel diseases." J Clin Invest **117**(10): 3097-3106.

Schierwagen, R., L. Maybuchen, et al. (2015). "Seven weeks of Western diet in apolipoprotein-E-deficient mice induce metabolic syndrome and non-alcoholic steatohepatitis with liver fibrosis." Sci Rep **5**: 12931.

Schmid, C. D., L. N. Sautkulis, et al. (2002). "Heterogeneous expression of the triggering receptor expressed on myeloid cells-2 on adult murine microglia." J Neurochem **83**(6): 1309-1320.

Schulz, T. J., T. L. Huang, et al. (2011). "Identification of inducible brown adipocyte progenitors residing in skeletal muscle and white fat." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(1): 143-148.

Schwarz, M., E. G. Lund, et al. (1996). "Disruption of cholesterol 7alpha-hydroxylase gene in mice. II. Bile acid deficiency is overcome by induction of oxysterol 7alpha-hydroxylase." J Biol Chem **271**(30): 18024-18031.

Seno, H., H. Miyoshi, et al. (2009). "Efficient colonic mucosal wound repair requires Trem2 signaling." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(1): 256-261.

Shanab, A. A., P. Scully, et al. (2011). "Small intestinal bacterial overgrowth in nonalcoholic steatohepatitis: association with toll-like receptor 4 expression and plasma levels of interleukin 8." Dig Dis Sci **56**(5): 1524-1534.

Shapiro, H., C. A. Thaiss, et al. (2014). "The cross talk between microbiota and the immune system: metabolites take center stage." Curr Opin Immunol **30**: 54-62.

Shonsey, E. M., M. Sfakianos, et al. (2005). "Bile acid coenzyme A: amino acid N-acyltransferase in the amino acid conjugation of bile acids." Methods Enzymol **400**: 374-394.

Sommer, F. and F. Backhed (2013). "The gut microbiota--masters of host development and physiology." Nat Rev Microbiol **11**(4): 227-238.

Song, J., K. A. da Costa, et al. (2005). "Polymorphism of the PEMT gene and susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD)." FASEB J **19**(10): 1266-1271.

Soon, R. K., Jr., J. S. Yan, et al. (2010). "Stress signaling in the methionine-choline-deficient model of murine fatty liver disease." Gastroenterology **139**(5): 1730-1739, 1739 e1731.

Stanford, K. I., R. J. Middelbeek, et al. (2013). "Brown adipose tissue regulates glucose homeostasis and insulin sensitivity." J Clin Invest **123**(1): 215-223.

Suarez-Zamorano, N., S. Fabbiano, et al. (2015). "Microbiota depletion promotes browning of white adipose tissue and reduces obesity." Nat Med **21**(12): 1497-1501.

Sundaram, M. and Z. Yao (2010). "Recent progress in understanding protein and lipid factors affecting hepatic VLDL assembly and secretion." Nutr Metab (Lond) **7**: 35.

Swann, J. R., E. J. Want, et al. (2011). "Systemic gut microbial modulation of bile acid metabolism in host tissue compartments." Proc Natl Acad Sci U S A **108** Suppl 1: 4523-4530.

Szabo, G., A. Velayudham, et al. (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**(11 Suppl): 140S-145S.

Takahashi, K., M. Prinz, et al. (2007). "TREM2-transduced myeloid precursors mediate nervous tissue debris clearance and facilitate recovery in an animal model of multiple sclerosis." PLoS Med **4**(4): e124.

Takahashi, K., C. D. Rochford, et al. (2005). "Clearance of apoptotic neurons without inflammation by microglial triggering receptor expressed on myeloid cells-2." J Exp Med **201**(4): 647-657.

Takeda, K. and S. Akira (2007). "Toll-like receptors." Curr Protoc Immunol **Chapter 14**: Unit 14 12.

Thomas, C., R. Pellicciari, et al. (2008). "Targeting bile-acid signalling for metabolic diseases." Nat Rev Drug Discov **7**(8): 678-693.

Tilg, H. and A. R. Moschen (2010). "Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis." Hepatology **52**(5): 1836-1846.

Tolba, R., T. Kraus, et al. (2015). "Diethylnitrosamine (DEN)-induced carcinogenic liver injury in mice." Lab Anim **49**(1 Suppl): 59-69.

Trauner, M. and J. L. Boyer (2003). "Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation." Physiol Rev **83**(2): 633-671.

Tremaroli, V. and F. Backhed (2012). "Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism." Nature **489**(7415): 242-249.

Turer, E. E., R. M. Tavares, et al. (2008). "Homeostatic MyD88-dependent signals cause lethal inflammation in the absence of A20." J Exp Med **205**(2): 451-464.

Turnbaugh, P. J., M. Hamady, et al. (2009). "A core gut microbiome in obese and lean twins." Nature **457**(7228): 480-484.

Turnbaugh, P. J., R. E. Ley, et al. (2006). "An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest." Nature **444**(7122): 1027-1031.

Turnbull, I. R., S. Gilfillan, et al. (2006). "Cutting edge: TREM-2 attenuates macrophage activation." J Immunol **177**(6): 3520-3524.

Umetani, M., H. Domoto, et al. (2007). "27-Hydroxycholesterol is an endogenous SERM that inhibits the cardiovascular effects of estrogen." Nat Med **13**(10): 1185-1192.

Umetani, M., P. Ghosh, et al. (2014). "The cholesterol metabolite 27-hydroxycholesterol promotes atherosclerosis via proinflammatory processes mediated by estrogen receptor alpha." Cell Metab **20**(1): 172-182.

Uyeda, K. and J. J. Repa (2006). "Carbohydrate response element binding protein, ChREBP, a transcription factor coupling hepatic glucose utilization and lipid synthesis." Cell Metab **4**(2): 107-110.

van der Lans, A. A., J. Hoeks, et al. (2013). "Cold acclimation recruits human brown fat and increases nonshivering thermogenesis." J Clin Invest **123**(8): 3395-3403.

van der Veen, J. N., T. H. van Dijk, et al. (2009). "Activation of the liver X receptor stimulates trans-intestinal excretion of plasma cholesterol." J Biol Chem **284**(29): 19211-19219.

van der Velde, A. E., C. L. Vrans, et al. (2007). "Direct intestinal cholesterol secretion contributes significantly to total fecal neutral sterol excretion in mice." Gastroenterology **133**(3): 967-975.

van der Velde, A. E., C. L. Vrans, et al. (2008). "Regulation of direct transintestinal cholesterol excretion in mice." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **295**(1): G203-G208.

van Marken Lichtenbelt, W. D., J. W. Vanhommel, et al. (2009). "Cold-activated brown adipose tissue in healthy men." N Engl J Med **360**(15): 1500-1508.

Verdam, F. J., S. S. Rensen, et al. (2011). "Novel evidence for chronic exposure to endotoxin in human nonalcoholic steatohepatitis." J Clin Gastroenterol **45**(2): 149-152.

Virtanen, K. A., M. E. Lidell, et al. (2009). "Functional brown adipose tissue in healthy adults." N Engl J Med **360**(15): 1518-1525.

Vrieze, A., C. Out, et al. (2014). "Impact of oral vancomycin on gut microbiota, bile acid metabolism, and insulin sensitivity." J Hepatol **60**(4): 824-831.

Vrieze, A., E. Van Nood, et al. (2012). "Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome." Gastroenterology **143**(4): 913-916 e917.

Wagner, T., A. Bartelt, et al. (2015). "Genetic Dissection of Tissue-Specific Apolipoprotein E Function for Hypercholesterolemia and Diet-Induced Obesity." PLoS One **10**(12): e0145102.

Wahlstrom, A., S. I. Sayin, et al. (2016). "Intestinal Crosstalk between Bile Acids and Microbiota and Its Impact on Host Metabolism." Cell Metab.

Wang, F., S. Liu, et al. (2012). "Blocking TREM-1 signaling prolongs survival of mice with Pseudomonas aeruginosa induced sepsis." Cell Immunol **272**(2): 251-258.

Wang, G. X., X. Y. Zhao, et al. (2014). "The brown fat-enriched secreted factor Nrg4 preserves metabolic homeostasis through attenuation of hepatic lipogenesis." Nat Med **20**(12): 1436-1443.

Wang, H., J. Chen, et al. (1999). "Endogenous bile acids are ligands for the nuclear receptor FXR/BAR." Mol Cell **3**(5): 543-553.

Wang, N. and A. R. Tall (2003). "Regulation and mechanisms of ATP-binding cassette transporter A1-mediated cellular cholesterol efflux." Arterioscler Thromb Vasc Biol **23**(7): 1178-1184.

Wang, Y., M. Cella, et al. (2015). "TREM2 lipid sensing sustains the microglial response in an Alzheimer's disease model." Cell **160**(6): 1061-1071.

Wang, Y. D., W. D. Chen, et al. (2011). "The G-protein-coupled bile acid receptor, Gpbar1 (TGR5), negatively regulates hepatic inflammatory response through antagonizing nuclear factor kappa light-chain enhancer of activated B cells (NF-kappaB) in mice." Hepatology **54**(4): 1421-1432.

Watanabe, M., S. M. Houten, et al. (2006). "Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation." Nature **439**(7075): 484-489.

Watanabe, M., S. M. Houten, et al. (2004). "Bile acids lower triglyceride levels via a pathway involving FXR, SHP, and SREBP-1c." J Clin Invest **113**(10): 1408-1418.

Wigg, A. J., I. C. Roberts-Thomson, et al. (2001). "The role of small intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability, endotoxaemia, and tumour necrosis factor alpha in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis." Gut **48**(2): 206-211.

Wolf, M. J., A. Adili, et al. (2014). "Metabolic activation of intrahepatic CD8+ T cells and NKT cells causes nonalcoholic steatohepatitis and liver cancer via cross-talk with hepatocytes." Cancer Cell **26**(4): 549-564.

Wong, M. H., P. Oelkers, et al. (1994). "Expression cloning and characterization of the hamster ileal sodium-dependent bile acid transporter." J Biol Chem **269**(2): 1340-1347.

Woodruff, P. G., A. Ellwanger, et al. (2009). "Alveolar macrophage recruitment and activation by chronic second hand smoke exposure in mice." COPD **6**(2): 86-94.

Wostmann, B. S. (1973). "Intestinal bile acids and cholesterol absorption in the germfree rat." J Nutr **103**(7): 982-990.

Wouters, K., M. van Bilsen, et al. (2010). "Intrahepatic cholesterol influences progression, inhibition and reversal of non-alcoholic steatohepatitis in hyperlipidemic mice." FEBS Lett **584**(5): 1001-1005.

Wouters, K., P. J. van Gorp, et al. (2008). "Dietary cholesterol, rather than liver steatosis, leads to hepatic inflammation in hyperlipidemic mouse models of nonalcoholic steatohepatitis." Hepatology **48**(2): 474-486.

Wu, J., P. Bostrom, et al. (2012). "Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human." Cell **150**(2): 366-376.

Wu, J., J. Li, et al. (2012). "The proinflammatory myeloid cell receptor TREM-1 controls Kupffer cell activation and development of hepatocellular carcinoma." Cancer Res **72**(16): 3977-3986.

Yamaguchi, K., L. Yang, et al. (2007). "Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis." Hepatology **45**(6): 1366-1374.

Yamashita, H., M. Takenoshita, et al. (2001). "A glucose-responsive transcription factor that regulates carbohydrate metabolism in the liver." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(16): 9116-9121.

Yoneshiro, T., S. Aita, et al. (2013). "Recruited brown adipose tissue as an antiobesity agent in humans." J Clin Invest **123**(8): 3404-3408.

Yu, Z. H., H. C. Huang, et al. (2010). "[Study on the natural ligand(s) of triggering receptor expressed on myeloid cell-1 on bacteria cell wall]." Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue **22**(6): 335-339.

Zamara, E., S. Galastri, et al. (2007). "Prevention of severe toxic liver injury and oxidative stress in MCP-1-deficient mice." J Hepatol **46**(2): 230-238.

Zhang, M. and J. Y. Chiang (2001). "Transcriptional regulation of the human sterol 12alpha-hydroxylase gene (CYP8B1): roles of hepatocyte nuclear factor 4alpha in mediating bile acid repression." J Biol Chem **276**(45): 41690-41699.

Zhang, S. H., R. L. Reddick, et al. (1992). "Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E." Science **258**(5081): 468-471.

Zheng, S., L. Hoos, et al. (2008). "Ezetimibe improves high fat and cholesterol diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in mice." Eur J Pharmacol **584**(1): 118-124.

Zhou, J., F. Chai, et al. (2013). "TREM-1 inhibition attenuates inflammation and tumor within the colon." Int Immunopharmacol **17**(2): 155-161.

Zietak, M., P. Kovatcheva-Datchary, et al. (2016). "Altered Microbiota Contributes to Reduced Diet-Induced Obesity upon Cold Exposure." Cell Metab **23**(6): 1216-1223.

Zingaretti, M. C., F. Crosta, et al. (2009). "The presence of UCP1 demonstrates that metabolically active adipose tissue in the neck of adult humans truly represents brown adipose tissue." FASEB J **23**(9): 3113-3120.

Teil I Anhang

1 Material

1.1 Verzeichnis der verwendeten Chemikalien inklusive verwendeter Gefahrstoffe nach GHS

In der nachfolgenden Tabelle sind alle verwendeten Chemikalien und Gefahrstoffe nach GHS aufgelistet:

Tabelle I- 1: Verwendete Chemikalien und Gefahrstoffe nach GHS

Chemikalie	Hersteller	Reinheit (%)	GHS Symbol	Hazard Statement H	Precaution Statement P
(Ethylenedinitrilo)tetraessigsäure EDTA	Sigma-Aldrich®, München	≥ 99 %	GHS07	H319	P305 + P351 + P338
1,2-diheptadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin, PE(17:0/17:0)	avanti polar lipids, Alabaster, USA	≥ 99 %	-	-	-
1,2-di-O-tridecyl-sn-glycero-3-phosphocholin	avanti polar lipids, Alabaster, USA	≥ 99 %	-	-	-
1,2-dipentadecanoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholin, PC(15:0/15:0)	Sigma-Aldrich®, München	≥ 99 %	-	-	-
1,2-ditetradecanoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serin (Natriumsalz), PS(14:0/14:0)	avanti polar lipids, Alabaster, USA	≥ 99 %	-	-	-
1,3(d5)-dipentadecanoyl-glycerol, 1,3(d5)DG(15:0/15:0)	avanti polar lipids, Alabaster, USA	≥ 99 %	-	-	-
1-heptadecanoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphocholin, LysoPC(17:0)	avanti polar lipids, Alabaster, USA	≥ 99 %	-	-	-
1-o-pentadecanyl-3-(9Z-octadecenoyl)-sn-glycerol	avanti polar lipids, Alabaster, USA	≥ 99 %	-	-	-
2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methylphenol, BHT	Sigma-Aldrich®, München	≥ 99 %	GHS09	H410	
22-S-Hydroxycholesterin, 22-OH-Chol	avanti polar lipids, Alabaster, USA	≥ 99 %	-	-	-
24-S-Hydroxycholesterin, 24-OH-Chol	avanti polar lipids, Alabaster, USA	≥ 99 %	-	-	-
25-Hydroxycholesterin, 25-OH-Chol	avanti polar lipids, Alabaster, USA	≥ 99 %	-	-	-
27-Hydroxycholesterin, 27-OH-Chol	avanti polar lipids, Alabaster, USA	≥ 99 %	-	-	-

Tabelle I- 1: Verwendete Chemikalien und Gefahrstoffe nach GHS

Chemikalie	Hersteller	Reinheit (%)	GHS Symbol	Hazard Statement H	Precaution Statement P
2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol Tris	Sigma-Aldrich®, München	≥ 99,9 %	-	-	-
2-Propanol, LC-MS-Grade	Carl Roth	≥ 99,5 %	GHS02, GHS07	H225-H319-H336	P210-P261-P305 + P351 + P338
³ H-Cholesterin	Perkin-Elmer, USA	40-60Ci (1.48-2.22TBq) /mmol, 1mCi/mL			
7-Hydroxycholesterol, 7-OH-Chol	avanti polar lipids, Alabaster, USA	≥ 99 %	-	-	-
Agarose	Axon Labor-technik				P264-P270-P281
Ameisensäure	Sigma-Aldrich® München	≥ 98 %	GHS0, GHS05	H226-H314	P280-P305 + P351 + P338-P310
Ammoniumacetat, NH ₄ Ac	Sigma-Aldrich®, München	≥ 99,99 % trace metals basis	-	-	-
Borsäure	Merck, Darmstadt	≥ 99 %	GHS08	H360FD	P201-P308+P313
Bovine Serum Albumin, BSA	Serva, Heidelberg	≥ 99 %	-	-	-
Calciumchlorid, CaCl ₂	Merck, Darmstadt	≥ 99 %	GHS07	H319	P305 + P351 + P338
Chenodeoxycholsäure, CDCA	Steraloids, Newport, UK	≥ 99 %	-	-	-
Chloroform, Rotisolv, HPLC-Grade	Carl Roth	≥ 99,9 %	GHS06, GHS08	H302-H315-H319-H331-H336-H351-H361d-H372	P261-P281-P305 + P351 + P338-P311
Cholest-5-en-3β-yl heptadecanoat CE(17:0)	avanti polar lipids, Alabaster, USA	≥ 99 %	-	-	-
Cholesterin	Sigma-Aldrich® München	≥ 99 %	-	-	-
Cholsäure, CA	Sigma-Aldrich® München	≥ 99 %	-	-	-
d4-CA	Steraloids, Newport, UK	≥ 99 %			
d4-GCDCA	Steraloids, Newport, UK	≥ 99 %	-	-	-
d6- 25-OH-Cholesterin	avanti polar lipids	≥ 99,9 %	-	-	-

Tabelle I- 1: Verwendete Chemikalien und Gefahrstoffe nach GHS

Chemikalie	Hersteller	Reinheit (%)	GHS Symbol	Hazard Statement H	Precaution Statement P
d7-Cholesterin	avanti polar lipids,	≥ 99,9 %	-	-	-
Deoxycholsäure, DCA	Sigma-Aldrich® München	≥ 99 %	-	-	-
Desmosterol	avanti polar lipids, Alabaster, USA	≥ 99 %	-	-	-
Desoxycorticosteron, DOC	Steraloids, Newport, UK	≥ 99 %	-	-	-
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich®, München	≥ 99 %	GHS07	H227-H315-H319	P264-P280-P305+P351+P338-P332+PP313-P337+P313-P362
Essigsäure	Sigma-Aldrich® München	≥ 99,7 %	GHS02, GHS05	H226-H314	P280-P305 + P351 + P338-P310
Ethanol	Merck, Darmstadt	96%	GHS02	H225	P210
Ezetrol	MSD, Haar		GHS07, GHS08	H332-H302-H312-H315-H319-H35	P261-P264-P280-P362+P364 - P304+P340 -P312- P301+P312 -P330- P302+P352 -P321- P332+313- P305+P351 +P338- P337+P313
Formaldehyd-Lösung (36,5-38% in H ₂ O)	Sigma-Aldrich®, München		GHS05, GHS06, GHS08	H301+H311+ H331- H314- H317- H335- H341- H350- H370	P201-P260-P280-P301 + P310 + P330-P303 + P361 + P353-P304 + P340 + P310-P305 + P351 + P338-P308 + P311- P403 + P233
Glucose	Sigma-Aldrich® München	≥ 99,5 %	-	-	-
Glyceryltridecanoat TG(10:0/10:0/10:0)	Sigma-Aldrich®, München	≥ 99 %			
Glyceryltridecanoat TG(13:0/13:0/13:0)	Sigma-Aldrich®, München	≥ 99 %	-	-	-

Tabelle I- 1: Verwendete Chemikalien und Gefahrstoffe nach GHS

Chemikalie	Hersteller	Reinheit (%)	GHS Symbol	Hazard Statement H	Precaution Statement P
Glycochenodeoxycholsäure, GCDCa	Steraloids, Newport, UK	≥ 99 %	-	-	-
Glycocholsäure, GCA	Steraloids, Newport, UK	≥ 99 %	-	-	-
Glycodeoxycholsäure, GDCA	Steraloids, Newport, UK	≥ 99 %	-	-	-
Glycolithocholsäure, GLCA	Steraloids, Newport, UK	≥ 99 %	-	-	-
Glycoursodeoxycholsäure, GUDCA	Steraloids, Newport, UK	≥ 99 %	-	-	-
Heptadecansäure, FA(17:0)	Sigma-Aldrich®, München	≥ 99 %	GHS07	H315-H319-H335	P261-P305+P351+P338
Hyodeoxycholsäure, HDCA	Steraloids, Newport, UK	≥ 99 %	-	-	-
Kaliumchlorid, KCl	Sigma-Aldrich® München	≥ 99 %	-	-	-
Ketamin	Albrecht, Aulendorf	10 mg/ml	GHS07	H301-H315-H319-H335	261 P306+P351+P338
Kupfersulfat Pentahydrat, CuSO ₄ x 5 H ₂ O	Sigma-Aldrich® München	≥ 98,0 %	GHS07, GHS09	H302-H315-H319-H410	P273-P305 + P351 + P338-P501
Methanol, Rotisol, Ultra LC-MS-Grade	Carl Roth	≥ 99,98 %	GHS02, GHS06, GHS08	H225-H301 + H311 + H331-H370	P210-P260-P280-P301 + P310-P311
Natriumcarbonat, Na ₂ CO ₃	Sigma-Aldrich® München	≥ 99,0 %	GHS07	H319	P305 + P351 + P338
Natriumchlorid, NaCl	Sigma-Aldrich®, München	≥ 99,5 %	-	-	-
Natriumkaliumtartrat, C ₄ H ₆ KNaO ₆	Sigma-Aldrich® München	≥ 99,0 %	-	-	-
Natronlauge, NaOH	Sigma-Aldrich® München	≥ 97 %	GHS05	H290-H314	P280-P303 + P361 + P353-P304 + P340 + P310-P305 + P351 + P338
N-heptadecanoyl-D-erythro-sphingosin, SM(17:0)	avanti polar lipids, Alabaster, USA	≥ 99 %	-	-	-
N-heptadecanoyl-D-erythro-sphingosylphosphorylcholine, SM(17:0)	avanti polar lipids, Alabaster, USA	≥ 99 %	-	-	-

Tabelle I- 1: Verwendete Chemikalien und Gefahrstoffe nach GHS

Chemikalie	Hersteller	Reinheit (%)	GHS Symbol	Hazard Statement H	Precaution Statement P
Polyethylene glycol mono [4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenyl] ether, Triton X-100	Sigma-Aldrich®, München		GHS07, GHS09	H302-H19-H411	P301+P312 + P330-P305+ P351+P338
Pregnanedion	Steraloids, Newport, UK	≥ 99 %	-	-	-
Pregnanolon	Steraloids, Newport, UK	≥ 99 %	-	-	-
Progesteron	Steraloids, Newport, UK	≥ 99 %	-	-	-
Rompun	Bayer, Leverkusen	2 %	GHS06	H301	P301+P310
Schwefelsäure	Sigma-Aldrich®, München	0,5 M	GHS05	H290-H314	P280-P303 + P361 + P353-P304 + P340 + P310-P305 + P351 + P338
Sodiumdodecylsulfat, SDS	Sigma-Aldrich® München	≥ 98,0 %	GHS02, GHS05, GHS07	H228-H302 + H332-H315-H318-H335-H412	P210-P261-P273-P280-P305 + P351 + P338
Stigmasterol	Sigma-Aldrich® München	≥ 99 %	-	-	-
Taurochenodeoxycholsäure, TCDCA	Steraloids, Newport, UK	≥ 99 %	-	-	-
Taurocholsäure, TCA	Sigma-Aldrich® München	≥ 99,8 %	-	-	-
Taurodeoxycholsäure, TDCA	Steraloids, Newport, UK	≥ 99 %	-	-	-
Taurohyodeoxycholsäure, THDCA	Steraloids, Newport, UK	≥ 99 %	-	-	-
Taurolithocholsäure, TLCA	Steraloids, Newport, UK	≥ 99 %	-	-	-
Tauroursodeoxycholsäure, TUDCA	Steraloids, Newport, UK	≥ 99 %	-	-	-
Tauro- α -muricholsäure, T- α -MCA	Steraloids, Newport, UK	≥ 99 %	-	-	-
Tauro- β -muricholsäure, T- β -MCA	Steraloids, Newport, UK	≥ 99 %	-	-	-
Tetrahydrodesoxycorticosterone, THDOC	Steraloids, Newport, UK	≥ 99 %	-	-	-
Ursodeoxycholsäure, UDCA	Sigma-Aldrich® München	≥ 99 %	-	-	-

Tabelle I- 1: Verwendete Chemikalien und Gefahrstoffe nach GHS

Chemikalie	Hersteller	Reinheit (%)	GHS Symbol	Hazard Statement H	Precaution Statement P
Wasser, LC-MS Ultra CHROMASOLV, tested for UHPLC-MS	Sigma-Aldrich®, München	≥ 99,98 %	-	-	-
α-Muricholsäure, α-MCA	Steraloids, Newport, UK	≥ 99 %	-	-	-
β-Muricholsäure, β-MCA	Steraloids, Newport, UK	≥ 99 %	-	-	-
ω-Muricholsäure, ω-MCA	Steraloids, Newport, UK	≥ 99 %	-	-	-

1.2 Verzeichnis der verwendeten Kits und Reagenzien

Die folgende Tabelle listet alle verwendete Kits und Reagenzien auf:

Tabelle I- 2: Verzeichnis der verwendeten Kits und Reagenzien

Produkt	Hersteller
ALT Activity Assay	Sigma-Aldrich, München
Amplex® Red Cholesterol Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Cholesterin-Bestimmungs Kit, Cholesterol CHOD-PAP®	Roche Diagnostics®, Mannheim
<i>High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit</i>	Applied Biosystems Inc., USA
Mastermix TaqMan	Eurogentec, Deutschland
NucleoSpin RNA II	Macherey & Nagel, Düren
Solvable™	Perkin Elmer, Waltham, USA
Szintillationslösung, Aquasafe 500 Plus	Zinsser Analytic, Frankfurt
Triglyzerid-Bestimmungs Kit, Triglycerides GPO-PAP®	Roche Diagnostics®, Mannheim
Ultra Sensitive Rat Insulin ELISA Kit	CrystalChem, Zaandam, Netherlands
Universal PCR MasterMix	Applied Biosystems Inc., USA

1.3 Verzeichnis der verwendeten Puffer und Lösungen

Die nachfolgende Tabelle zeigt eine Auflistung der verwendeten Lösungen und Puffer:

Tabelle I- 3: Auflistung verwendeter Puffer und Lösungen

Lösung/Puffer	Hersteller/Zusammensetzung
10 x PBS	<ul style="list-style-type: none"> • 400 g NaCl • 10 g KCl • 10 g KH₂PO₄ x 2H₂O ad 5 l H ₂ O dest., pH 6,9
EDTA, 0,5 M	GIBCO/BRL, Eggenstein
ESI-L, Low Concentration Tuning Mix, 100 mL	Agilent Technologies, Waldbronn
Folch-Lösung	Chloroform/Methanol, 2/1, v/v
FolchBHT	110 mg BHT in 200 ml Folch-Lösung
Folin's Reagenz	Merck, Darmstadt
FPLC-Puffer	<ul style="list-style-type: none"> • 100 mM Tris • 1,5 M NaCl • 100 mM EDTA in H ₂ O dest.
Heparin	Braun, Melsungen
Interner Standard 1 (IS1)	<ul style="list-style-type: none"> • 1,2-dipentadecanoyl-sn-glycero-3-hosphatidylcholin (118.85 µg/ml) • cholest-5-en-3β-yl heptadecanoat (593.27 µg/ml) • Glyceryltridecanoat (118.85 µg/ml) • N-heptadecanoyl-D-erythro-sphingosin (118.85 µg/ml) • 1-heptadecanoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphocholin (118.85 µg/ml) • 1,2-diheptadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin (118.85 µg/ml) • 1-o-pentadecanyl-3-(9Z-octadecenoyl) • sn-glycerol (118.85 µg/ml) • 1,3-diheptadecanoyl glycerol (118.85 µg/ml) • 1,2-di-O-tridecyl-sn-glycero-3-phosphocholin (118.85 µg/ml) • N-heptadecanoyl-D-erythro-sphingosylphosphorylcholin (118.85 µg/ml) • 1,2-ditetradecanoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serin Natriumsalz (118.85 µg/ml) • 1,2-diheptadecanoyl-sn-glycero-3-phosphate • Heptadecansäure (237.31 µg/ml) in Folch-Lösung
Interner Standard 2 (IS2)	<ul style="list-style-type: none"> • d4-GCDCA (100 µM) • d4-CA (100 µM) • d6- 25-OH-Cholesterin (100 µM) • d7-Cholesterin (1000 µM) In Folch-Lösung
Ketamin, 100 mg/ml	Albrecht, Aulendorf
Lockmasse	1,082 mg Hexakis (1H, 1H, 2H-Perfluoroethoxy)phosphazene/ml in 2-Propanol
Lowry Lösung A	<ul style="list-style-type: none"> • 2% Na₂CO₃ • 0,02% Natriumkaliumtartrat in 0,1 M NaOH

Tabelle I- 3:Auflistung verwendeter Puffer und Lösungen

Lösung/Puffer	Hersteller/Zusammensetzung
Lowry Lösung B	0,5% CuSO ₄ x 5 H ₂ O, 5% SDS in H ₂ O dest.
MeOHBHT	110 mg BHT in 200 ml Methanol
Na ₂ CO ₃ -Lösung	6 %ig in Wasser
NaCl, 0,9 w/v %	Braun [®] , Melsungen
Narkoselösung	Ketamin (100 mg/ml)/Xylazine (2 %)/NaCl (0.9 %); 2.3/1.0/6.7, v/v/v; 15 µL/g bodyweight
PBS	GIBCO/BRL, Eggenstein
Precipath [®]	Roche Diagnostics [®] , Mannheim
peqGOLD TriFast [™]	Peqlab, Erlangen
Xylazin, 2 %	Bayer, Leverkusen
10X DreamTaq Green Buffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
MgCl ₂ 25mM	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Roti [®] -GelStain	Carl Roth, Karlsruhe
STE-Puffer	<ul style="list-style-type: none"> • 20 mM Tris/HCl, pH 7,5 • 100 mM NaCl • 1 mM EDTA • 1 % SDS in H ₂ O dest.
5X TBE-Puffer	<ul style="list-style-type: none"> • 54 g Tris • 27,5 g Borsäure • 3,7 g EDTA ad 1l H ₂ O dest.,
Aqua ad iniectabilia	Braun [®] , Melsungen
Formaldehyd Lösung	3,7%ig in PBS
Eluent B1	<ul style="list-style-type: none"> • 600 ml Isopropanol • 400 ml Methanol • 5 mM NH₄Ac
Eluent B2	<ul style="list-style-type: none"> • Methanol • 5 mM NH₄Ac • 0,1% FA
Proteinase K, recombinant	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
GeneRuler [™] DNA Ladder Mixr	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Dream Taq Green DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

1.4 Verzeichnis der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Die nachfolgende Tabelle zeigt alle verwendeten Verbrauchsmaterialien:

Tabelle I- 4: Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Accu-Check Aviva Teststreifen	Roche, Basel
Bördelkappe, Teflon-beschichtet	CS-Chomatographie Service GmbH, Langerwehe
Chromafil O-20/3, PTFE, Pore \varnothing 0,2 μ l, Filter 3 mm	Machery-Nagel, Düren
Glasvials	Verex™ Vial, Crimp, μ Vial i3 (Qsert) Amber 51, Phenomenex, Aschaffenburg
HPLC Vorsäule	Accucore Polar Premium 10x2.1mm 2.6 μ m Solid Core Defender Vorsäulen/Guards and Holder, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
HPLC-Säule, Accucore™ Polar Premium	150 x 2,1 mm, 2,6 μ m, Porengröße: 140 Å, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Kanülen	Braun, Melsungen
Kryoröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
MegaBlock®	Sarstedt, Nümbrecht
Metallkugel	4 mm, Qiagen, Venlo, Niederlande
Microvette ® CB 300	Sarstedt, Nümbrecht
Mikrotiterplatten	Sarstedt, Nümbrecht
Pipetten	Greiner, Frickenhausen
Polyallomer-Röhrchen	Beckmann Counter GmbH, Krefeld
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäß, 1,5 ml, safe-lock	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäß, 15 ml	BD Falcon, Heidelberg
Reaktionsgefäß, 2 ml, safe-lock	Eppendorf, Hamburg
Spritzen	Braun, Melsungen
Stabpipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Superose™ 6 10/300 GL Säule	GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK
UPLC-Säule, Kinetex XB-C18	150 mm x 2.1 mm x 1.7 μ m, Phenomenex, Aschaffenburg
UPLC-Vorsäule	SecurityGuard ULTRA Holder für UPLC Säulen von 2,1 bis 4,6mm ID Phenomenex®, SecurityGuard ULTRA Cartridges UHPLC C18 für 2,1mm ID Säulen, Phenomenex, Aschaffenburg
β -Counter-Szintillations-Röhrchen	GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK

1.5 Verzeichnis der verwendeten Arbeitsgeräte

Die nachfolgende Tabelle listet die verwendeten Arbeitsgeräte auf:

Tabelle I- 5: Auflistung der verwendeten Arbeitsgeräte

Gerät	Hersteller
<i>ABI Prism 7900 HT Sequence Detection System</i>	Applied Biosystems, Santa Clara, USA
Accu Check Aviva Messgerät	Roche, Deutschland
ÄKTA, FPLC-System	GE Healthcare, München
Elektrophoresekammer	Bio-Rad München
HPLC, Agilent Technologies 1200 Series	(Degasser, Binary Pump, High Performance Autosampler SL, Thermostated Column Department SL), Agilent Technologies, Waldbronn
Kugelmühle	Tissue Lyser™, Qiagen manufactured by Retsch, Haan
Magnetrührer	KA, Labortechnik, Staufen i. Br.
Massenspektrometer, ESI-QqQ, API2000	AB SCIEX, Deutschland
Massenspektrometer, ESI-qToF, maXis® 3G	Serial Number: 10114, Bruker Daltonik GmbH, Bremen
Microzentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
<i>NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer</i>	PEQLAB, Deutschland
Nikon A1 Laser Scanning Mikroskop	Nikon, Japan
Operationsbesteck	Aesculap, Braun, Melsungen
pH-Meter	Mettler, Toledo, Schwerzenbach, Schweiz
Photometer Multiskan Go	Thermo Scientific, USA
Pipettierhilfe	AccuJet, Brand, Wertheim
Pipettierroboter	Tecan, Schweiz
Sonifier	
Spannungsquelle Agaorse-Gele	Bio-Rad München
Thermocycler	Biometra, Göttingen
Thermomixer comfort mit Thermoblocks für 2 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
<i>Tissue-Lyser</i>	Qiagen, Deutschland
Ultrazentrifuge ausgestattet mit SW41 Rotor	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
UPLC, Ultimate 3000 System	(Ultimate 3000 RS Pump , Ultimate 3000 RS Autosampler, Ultimate 3000 RS Column Compartment), Dionex GmbH, Idstein
UV Tisch	
Vakuum Zentrifuge	Hetovac, Pump: Vacuubrand
Vortex-Schüttler Typ REAX DR	Heidolph, Schwabach
Waage	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Zentrifuge	Fresco 21 Heraus, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
β -Szintillationscounter	Perkin Elmer, Waltham, USA

1.6 Verzeichnis der verwendeten Software

Das nachfolgende Verzeichnis zeigt eine Auflistung der verwendeten Software:

Tabelle I- 6: Softwareverzeichnis

Software	Hersteller
Analyst 1.6.1.	Applied Biosystems, Darmstadt
Chromeleon®, 6.80	Dionex, Idstein
DataAnalysis 4.2	Bruker Daltonik GmbH, Bremen
GraphPad Prism7	GraphPad Software, La Jolla, USA
Hystar 3.2	Bruker Daltonik GmbH, Bremen
Microsoft Office Standard Edition 2016	Microsoft, Redmond, USA
MicrOTOF Control SR2	Bruker Daltonik GmbH, Bremen
TargetAnalysis 1.3	Bruker Daltonik GmbH, Bremen

2 Ergänzungen zum Teil E – Ergebnisse

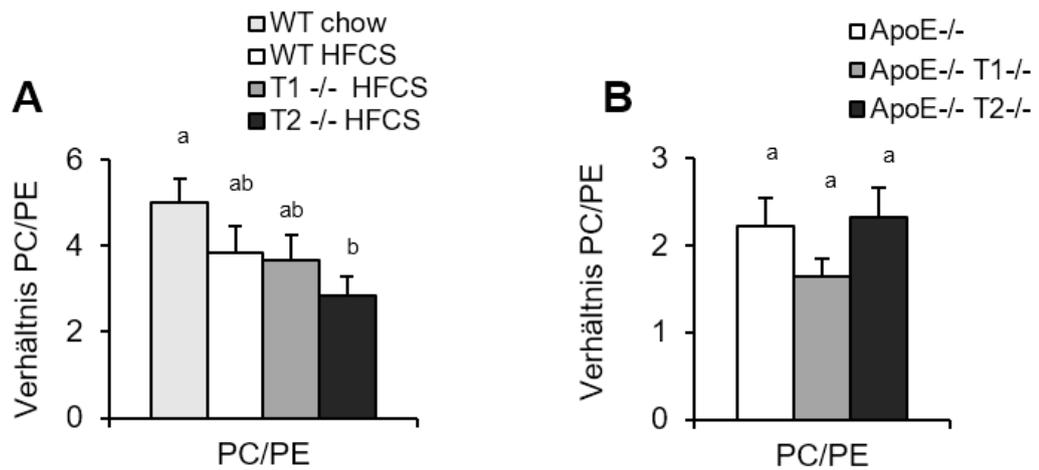


Abbildung I- 1: Verhältnis von PC/PE in der Leber von Trem1-/- (T1-/-) und Trem2-/- (T2-/-) und Wildtyp (WT) Mäusen nach 16-wöchiger Fütterung einer HFCS-Diät sowie chow-Kontrolldiät (A) sowie von ApoE-/-Trem1-/- (ApoE-/- T1-/-), ApoE-/-Trem2-/- (ApoE-/-T2-/-) sowie Kontrolltieren (ApoE-/-) auf chow-Diät (B)

Mittels LC-MS wurden die Leber Phosphatidyl (PC) und Phosphatidylethanolamine (PE) gemessen und das Verhältnis gebildet.

Teil J Abbildungsverzeichnis

Abbildung C- 1: Schematischer Aufbau eines Leber Sinusoids adaptiert nach Pellicoro et al. 2014	10
Abbildung C- 2: Gallensäuresynthesewege	14
Abbildung C- 3: Enterohepatische Zirkulation	16
Abbildung C- 4: TREM Rezeptoren als TLR Signalmodulatoren	27
Abbildung C- 5: Expression von TREM2 in Lebern einer humanen Adipositas kohorte	30
Abbildung E- 1: Zunahme sowie Endpunkt Körper- und Organgewichte nach Fütterung einer HFCS-bzw. <i>chow</i> -Diät in <i>Trem1</i> ^{-/-} (T1 ^{-/-}) und <i>Trem2</i> ^{-/-} (T2 ^{-/-}) Tieren sowie Wildtyp (WT)-Kontrollen	33
Abbildung E- 2: Oraler Glucose-Toleranztest und Plasmacholesterin- (Chol) und Plasmatriglyzerid-(TG) Konzentrationen in <i>Trem1</i> ^{-/-} (T1 ^{-/-}) und <i>Trem2</i> ^{-/-} (T2 ^{-/-}) und Wildtyp (WT) Mäusen nach Fütterung einer HFCS-Diät sowie <i>chow</i> -Kontrolldiät	34
Abbildung E- 3: Lipidakkumulation in der Leber in <i>Trem1</i> ^{-/-} (T1 ^{-/-}) und <i>Trem2</i> ^{-/-} (T2 ^{-/-}) und Wildtyp (WT)- Mäusen nach Fütterung mit HFCS- bzw. Kontrolldiät (<i>chow</i>).....	35
Abbildung E- 4: Lipidkomposition der Leber nach Fütterung einer HFCS- und Kontroll (<i>chow</i>)-Diät in <i>Trem1</i> ^{-/-} (T1 ^{-/-}) und <i>Trem2</i> ^{-/-} (T2 ^{-/-}) und Wildtyp (WT) Tieren	36
Abbildung E- 5: Genexpression inflammatorischer sowie fibrotischer Gene in Lebergewebe von HFCS- bzw. <i>chow</i> gefütterten <i>Trem1</i> ^{-/-} (T1 ^{-/-}) und <i>Trem2</i> ^{-/-} (T2 ^{-/-}) und Wildtyp (WT) Tieren	37
Abbildung E- 6: Körper- und Organgewichte sowie Plasmalipide von Kontrolltieren (<i>ApoE</i> ^{-/-}) sowie <i>Trem1</i> ^{-/-} (T1 ^{-/-}) und <i>Trem2</i> ^{-/-} (T2 ^{-/-}) -Tieren im genetischen Steatose-Modell (<i>ApoE</i> ^{-/-}) auf <i>chow</i> -Diät	38
Abbildung E- 7: Veränderung der Leberlipidkomposition in <i>ApoE</i> ^{-/-} <i>Trem1</i> ^{-/-} (<i>ApoE</i> ^{-/-} T1 ^{-/-}),	39
Abbildung E- 8: Hepatische Expression inflammatorischer Gene sowie Fibrose-Marker in <i>Trem1</i> - und <i>Trem2</i> - defizienten Tieren auf <i>ApoE</i> ^{-/-} -Hintergrund sowie deren Kontrollen (<i>ApoE</i> ^{-/-}) gefüttert mit <i>chow</i> -Diät	40
Abbildung E- 9: <i>Sirius-Red</i> gefärbte Leberschnitte von mit <i>chow</i> -gefütterten <i>ApoE</i> ^{-/-} <i>Trem1</i> ^{-/-} (<i>ApoE</i> ^{-/-} T1 ^{-/-}), <i>ApoE</i> ^{-/-} <i>Trem2</i> ^{-/-} (<i>ApoE</i> ^{-/-} -T2 ^{-/-}) sowie Kontrolltieren (<i>ApoE</i> ^{-/-}).....	40
Abbildung E- 10: Zunahme sowie Körper- und Organgewichte nach Fütterung einer WTD in <i>ApoE</i> ^{-/-} <i>Trem1</i> ^{-/-} (<i>ApoE</i> ^{-/-} -T1 ^{-/-}) und <i>ApoE</i> ^{-/-} <i>Trem2</i> ^{-/-} (<i>ApoE</i> ^{-/-} -T2 ^{-/-}) Tieren sowie <i>ApoE</i> ^{-/-}	41
Abbildung E- 11: Oraler Glucose-Toleranztest und Plasmainsulinlevel vor sowie 15 Minuten nach Glucose <i>Gavage</i> in <i>ApoE</i> ^{-/-} <i>Trem1</i> ^{-/-} (<i>ApoE</i> ^{-/-} -T1 ^{-/-}) und <i>ApoE</i> ^{-/-} <i>Trem2</i> ^{-/-} (<i>ApoE</i> ^{-/-} -T2 ^{-/-}). Tieren sowie Kontrollen (<i>ApoE</i> ^{-/-}) nach Fütterung einer WTD für 16 Wochen.....	42

Abbildung E- 12: Plasma und Leberlipidkonzentrationen von <i>ApoE^{-/-}Trem1^{-/-}</i> (<i>ApoE^{-/-}T1^{-/-}</i>) und <i>ApoE^{-/-}Trem2^{-/-}</i> (<i>ApoE^{-/-}T2^{-/-}</i>) Tieren sowie Kontrollen (<i>ApoE^{-/-}</i>) nach Fütterung einer WTD für 16 Wochen	43
Abbildung E- 13: Genexpression inflammatorischer sowie fibrotischer Gene in Lebergewebe von WTD-gefütterten <i>ApoE^{-/-}Trem1^{-/-}</i> (<i>ApoE^{-/-}T1^{-/-}</i>) und <i>ApoE^{-/-}Trem2^{-/-}</i> (<i>ApoE^{-/-}T2^{-/-}</i>) Tieren sowie Kontrollen (<i>ApoE^{-/-}</i>).....	44
Abbildung E- 14: Zunahme sowie Körper- und Organgewichte nach Fütterung einer CDHFD in <i>ApoE^{-/-}Trem1^{-/-}</i> (<i>ApoE^{-/-}T1^{-/-}</i>) und <i>ApoE^{-/-}Trem2^{-/-}</i> (<i>ApoE^{-/-}T2^{-/-}</i>) Tieren sowie Kontrollen (<i>ApoE^{-/-}</i>)	45
Abbildung E- 15: Plasmalipidkonzentrationen und Lipoproteinprofile von <i>ApoE^{-/-}chow-</i> , <i>ApoE^{-/-}CDHFD-</i> und <i>ApoE^{-/-}Trem2^{-/-}CDHFD</i> (<i>ApoE^{-/-}T2^{-/-} CDHFD</i>) -gefütterten Tieren	46
Abbildung E- 16: Lipidakkumulation und Schädigung in der Leber von <i>ApoE^{-/-}chow-</i> , <i>ApoE^{-/-}CDHFD-</i> und <i>ApoE^{-/-}Trem2^{-/-}CDHFD</i> (<i>ApoE^{-/-}T2^{-/-} CDHFD</i>) -gefütterten Tieren.....	47
Abbildung E- 17: Hepatische Expression inflammatorischer Gene und fibrotischer Marker in <i>ApoE^{-/-}chow-</i> , <i>ApoE^{-/-}CDHFD-</i> und <i>ApoE^{-/-}Trem2^{-/-}CDHFD</i> (<i>ApoE^{-/-}T2^{-/-} CDHFD</i>) -gefütterten Tieren.....	48
Abbildung E- 18: Plasmalipide und postprandiale Cholesterinaufnahme nach Aktivierung des braunen Fettgewebes durch Kälte	50
Abbildung E- 19: Hepatische Genexpression von Enzymen für Synthese und Transport von Gallensäuren nach Aktivierung des braunen Fettgewebes.....	51
Abbildung E- 20: Hepatische Gallensäure-Konzentrationen nach Aktivierung des braunen Fettgewebes durch Kälte	51
Abbildung E- 21: Gallensäure-Konzentrationen in den Fäzes nach Aktivierung des braunen Fettgewebes durch Kälte	52
Abbildung E- 22: Körpergewicht, Plasma- und Leberlipide von <i>Cyp7b1^{-/-}</i> und Kontrollmäusen (WT) nach Aktivierung des braunen Fettgewebes durch Kälte	53
Abbildung E- 23: Gallensäure-Profile in der Leber sowie in den Fäzes von <i>Cyp7b1^{-/-}</i> und Kontrolltieren nach 7-tägiger Kälte-Exposition.....	54
Abbildung E- 24: Futtermenge, Körpergewicht sowie Plasma- und Leberlipide in EZ-behandelten- und Kontrolltieren nach 7-tägiger Kälte-Exposition	55
Abbildung E- 25: Hepatische Gallensäureprofile in EZ-behandelten- und Kontrolltieren nach 7-tägiger Kälte-Exposition.....	56
Abbildung E- 26: Gallensäureprofile von Fäzesproben EZ-behandelter- und Kontrolltiere nach 7-tägiger Kälte-Exposition.....	57
Abbildung E- 27: Änderung des intestinalen Mikrobioms nach Kälte-Aktivierung des braunen Fettgewebes.....	59

Abbildung E- 28: Änderungen des intestinalen Mikrobioms von EZ-behandelten- und Kontrolltieren nach 7-tägiger Kälte-Exposition..... 60

Abbildung G- 1 Exemplarische PCR Ergebnisse von Trem1, Trem2 und ApoE PCR..... 80

Abbildung I- 1: Verhältnis von PC/PE in der Leber von Trem1^{-/-} (T1^{-/-}) und Trem2^{-/-} (T2^{-/-}) und Wildtyp (WT) Mäusen nach 16-wöchiger Fütterung einer HFCS-Diät sowie chow-Kontrolldiät (A) sowie von ApoE^{-/-}Trem1^{-/-} (ApoE^{-/-} T1^{-/-}), ApoE^{-/-}Trem2^{-/-} (ApoE^{-/-} T2^{-/-}) sowie Kontrolltieren (ApoE^{-/-}) auf *chow*-Diät (B) 120

Teil K **Tabellenverzeichnis**

Tabelle C- 1: Eigenschaften von Lipoproteinpartikeln	4
Tabelle G- 1: Vorschrift TREM PCR	79
Tabelle G- 2: Vorschrift ApoE-PCR.....	79
Tabelle G- 3: PCR Primersequenzen von 5' nach 3'	79
Tabelle G- 4: PCR Programme	80
Tabelle G- 5: Verwendete TaqMan Assays.....	83
Tabelle G- 6: Geräteparameter der LC-Methode1	84
Tabelle G- 7: Geräteparameter der MS-Methode1	85
Tabelle G- 8:Geräteparamerer der LC-Methode2	87
Tabelle G- 9: Geräteparameter der MS-Methode2	87
Tabelle I- 1:Verwendete Chemikalien und Gefahrstoffe nach GHS.....	108
Tabelle I- 2: Verzeichnis der verwendeten Kits und Reagenzien	114
Tabelle I- 3:Auflistung verwendeter Puffer und Lösungen	115
Tabelle I- 4: Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien.....	117
Tabelle I- 5: Auflistung der verwendeten Arbeitsgeräte.....	118
Tabelle I- 6: Softwareverzeichnis	119

Teil L Danksagung

Mein Dank gilt **Prof. Jörg Heeren** für das spannende Thema, seine exzellente Betreuung, Fachkompetenz und hilfreichen Ratschläge. Auch Herrn **Prof. Dr. Markus Fischer** möchte ich für die offizielle Betreuung und ihm sowie **Philipp Werner** und **Katrin Wegner** für die fabelhafte Kooperation danken.

Dr. Ludger Scheja danke ich für die unzähligen Denkanstöße und Diskussionen sowie die Einführung in die Statistik. Bei **Dr. Klaus Tödter** bedanke ich für sein immer offenes Ohr und seine Hilfsbereitschaft.

Dem gesamten Team des IBMZ danke ich für die herzliche, angenehme Arbeitsatmosphäre und die tolle Stimmung in unserer Arbeitsgruppe. Besonders **Christine** und **Svenja**, die den Laden immer zusammenhalten und **Sandra, Birgit, Evi, Meike** und **Walter**, die mich grandios unterstützt und für tolle Stimmung im Labor gesorgt haben, sage ich herzlich Danke.

Außerdem danke ich **Markus, Nils, Alfi, Kirstin, Krissi**, und **Brigitte** für die tolle Zeit auch außerhalb des Labors.

An dieser Stelle möchte ich außerdem ganz besonders meinem Schlauchteam in unterschiedlicher Besetzung danken. Danke an **Luci** und **Denisi** für die witzigen Momente und Ratschläge in allen Lebenslagen sowie den Start des Nuss Siegeszuges. Mein Mega-Dank geht an den aktuellen Schlauch. **Nico** und **Christian**: mit Euch zu arbeiten, feiern und sonstigen Quatsch zu machen ist einfach ein Geschenk, Ihr seid der Hammer!

Und natürlich danke ich ganz herzlich bei meinem Scheißeteam: **Miriam** und **Clara**. Ohne Euch wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Vielen Dank für die grandiose Zeit und dass ich immer auf Euch zählen kann.

Danke auch an meine **Familie** für Ihre immerwährende Unterstützung. Besonders danke ich **Mo**, dem Ruhepol in meinem Leben, für seine Geduld und sein Verständnis.

Teil M Eidesstattliche Versicherung

„Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt zu haben. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium. Ich versichere, dass diese Dissertation nicht in einem früheren Promotionsverfahren eingereicht wurde,“

Datum, Unterschrift