

# **Einfluss der Enzyme Myeloperoxidase und Lipoproteinlipase auf die Progression der nicht- alkoholischen Steatohepatitis**

**Dissertation**

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

vorgelegt von

**Anja Christina Koop**

aus Hamburg

Hamburg, 2020



1. Gutachter: PD Dr. Johannes Kluwe

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

I. Medizinische Klinik

2. Gutachter: Prof. Dr. Wolfram Brune

Universität Hamburg - Institut für Biochemie und Molekularbiologie

Heinrich-Pette-Institut

Datum der Disputation und der Druckfreigabe: 12. Juni 2020



## I Inhaltsverzeichnis

I	Inhaltsverzeichnis.....	I
II	Abkürzungsverzeichnis.....	V
III	Abbildungsverzeichnis.....	VII
IV	Tabellenverzeichnis.....	IX
<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Aufbau der Leber.....	1
1.2	Die nicht-alkoholische Fettlebererkrankung.....	2
1.2.1	Definition und Diagnose.....	2
1.2.2	Verlauf und Prognose.....	4
1.2.3	Risikofaktoren und Prävalenz.....	5
1.3	Pathogenese der nicht-alkoholischen Steatohepatitis.....	6
1.3.1	<i>Multiple Hit</i> Hypothese.....	6
1.3.2	Entstehung der hepatischen Steatose.....	7
1.3.3	Lipotoxizität.....	9
1.3.4	Oxidativer Stress.....	11
1.3.5	Fibrogenese.....	12
1.3.6	Inflammation.....	13
1.4	NAFLD-Therapie.....	17
1.5	Die Myeloperoxidase.....	19
1.5.1	Allgemeines.....	19
1.5.2	Funktion.....	20
1.5.3	MPO-vermittelte Schädigung und assoziierte Erkrankungen.....	21
1.6	Die Lipoproteinlipase.....	23
1.6.1	Allgemeines.....	23
1.6.2	Regulation.....	23
1.6.3	Bedeutung.....	24
1.6.4	Vorkommen in der Leber.....	25
1.7	Zielsetzung.....	27
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>28</b>
2.1	Materialien.....	28

2.1.1	Geräte und Instrumente .....	28
2.1.2	Material und Chemikalien.....	29
2.1.3	Allgemeine Lösungen und Puffer.....	29
2.1.4	Materialien für Tierexperimente.....	29
2.1.5	Versuchstiere .....	30
2.1.6	Lösungen, Enzyme und Kits für die Genexpressionsanalyse.....	31
2.1.7	Antikörper.....	32
2.1.8	Assays .....	33
2.1.9	Software .....	33
2.2	Methoden.....	34
2.2.1	Humane Studien .....	34
2.2.1.1	Bestimmung der MPO-Konzentration im humanen Plasma .....	34
2.2.1.2	Bestimmung der hepatischen <i>LPL</i> -Expression .....	34
2.2.2	Mausexperimente .....	34
2.2.2.1	Murine NASH-Modelle.....	34
2.2.2.2	Sakrifizierung der Versuchstiere.....	35
2.2.3	Paraffin-basierte Histologie.....	36
2.2.3.1	Probenvorbereitung, Anfertigung und Prozession der Schnitte.....	36
2.2.3.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	36
2.2.3.3	Siriusrot-Färbung .....	37
2.2.3.4	Immunhistochemie .....	37
2.2.4	Kryostat-basierte Histologie.....	38
2.2.4.1	Anfertigung von Kryostatschnitten.....	38
2.2.4.2	<i>Oil Red O</i> -Färbung.....	39
2.2.5	Auswertung der Histologie .....	39
2.2.6	Analyse von Serum- und Plasmaprobe.....	40
2.2.6.1	Transaminasenmessung im Serum.....	40
2.2.6.2	Bestimmung der MPO-Konzentration im murinen Serum.....	40
2.2.6.3	Insulin-ELISA/Berechnung des HOMA-IR .....	40
2.2.6.4	Triglyzerid- und Cholesterinbestimmung im Serum.....	41
2.2.7	Analyse von Leberproben.....	41
2.2.7.1	RNA-Isolation und -Messung .....	41
2.2.7.2	cDNA-Synthese .....	41

2.2.7.3	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion.....	42
2.2.7.4	<i>Microarray</i> .....	43
2.2.7.5	Protein- und Lipidisolation.....	43
2.2.7.6	Bestimmung des hepatischen TG- und Proteingehalts .....	44
2.2.7.7	Bestimmung des hepatischen Cholesteringehalts.....	45
2.2.7.8	Hydroxynonenal-ELISA .....	45
2.2.8	<i>Lpl</i> -Expressionsanalysen .....	46
2.2.8.1	Isolation der Kupfferzellen.....	46
2.2.8.2	Bestimmung der <i>Lpl</i> -Expression einzelner hepatischer Zellpopulationen .....	48
2.2.8.3	Überprüfung der LPL-Deletion in LPL <sup>ΔLysM</sup> -Mäusen .....	48
2.2.9	Mikrobiomanalyse .....	48
2.2.10	Nomenklatur .....	50
2.2.11	Statistische Auswertung.....	50
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>51</b>
3.1	MPO und LPL sind in NASH-Patienten hochreguliert.....	51
3.2	MPO ist im Mausmodell der NASH hochreguliert .....	52
3.3	MPO hat im NASH-Mausmodell keinen Einfluss auf metabolische Parameter und das Mikrobiom.....	54
3.4	MPO ist im Mausmodell funktionell relevant für die NASH-Progression hinsichtlich der Fibrogenese und des Leberschadens.....	59
3.5	Das murine NASH-Modell führt zu einer Induktion der hepatischen <i>Lpl</i> -Expression.....	71
3.6	Identifikation von KC und HSC als <i>Lpl</i> -exprimierende Zellpopulationen in der gesunden Leber.....	72
3.7	Eine Hepatozyten-spezifische LPL-Deletion hat keinen Einfluss auf die NASH- Progression .....	73
3.8	Eine LPL-Defizienz in myeloiden Zellen verringert die NASH-induzierte hepatische <i>Lpl</i> -Expression.....	81
3.9	Eine LPL-Defizienz in myeloiden Zellen fördert die NASH-Progression .....	84
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>95</b>
4.1	Das angewandte diätische Mausmodell bildet die humane NASH-Erkrankung korrekt ab.....	95
4.2	MPO fördert die NASH-Progression.....	99

4.3	MPO als mögliches Zielmolekül einer NASH-spezifischen Therapie .....	103
4.4	Myeloide Zellen sind vorrangig für die NASH-assoziierte Induktion der hepatischen <i>LpL</i> -Expression verantwortlich.....	105
4.5	Die LPL-Defizienz in myeloiden Zellen führt zu einer verstärkten NASH-Progression .....	107
4.6	Eine LPL-Defizienz könnte zu einer verstärkten NASH-assoziierten proinflammatorischen und profibrotischen Aktivität der Makrophagen führen	109
4.7	LPL als mögliches Zielmolekül einer NASH-spezifischen Therapie.....	112
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung/Abstract.....</b>	<b>116</b>
5.1	Zusammenfassung .....	116
5.2	Abstract .....	118
<b>6</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>120</b>
6.1	Sicherheit.....	120
6.2	Literaturverzeichnis.....	122
6.3	Publikationsliste.....	139
6.3.1	Publikationen .....	139
6.3.2	Kongresse .....	139
6.4	Danksagung.....	141
6.5	Eidesstattliche Versicherung.....	143

## II Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$ SMA	<i>alpha-smooth muscle actin</i>
Abb.	Abbildung
ALT	Alanin-Aminotransferase
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
Apo	Apolipoprotein
AST	Aspartat-Aminotransferase
BMDM	<i>bone marrow-derived monocytes</i>
BMI	Body-Mass-Index
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	<i>control diet</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
COL1 $\alpha$ 1	Kollagen Typ I, alpha 1
DAMPs	<i>damage-associated molecular patterns</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DNL	<i>de novo</i> Lipogenese
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EZM	extrazelluläre Matrix
F4/80	<i>EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor like</i>
FASL	<i>first apoptosis signal receptor ligand</i>
GBSS/B	<i>Gey's balanced salt solution B</i>
GFAP	Saures Gliafaserprotein
HCC	<i>hepatocellular carcinoma</i>
HDL	<i>high density lipoprotein</i>
HE	Hämatoxylin-Eosin
HNE	4-Hydroxynonenal
HOMA-IR	<i>homeostatic model assessment for insulin resistance</i>
HSC	<i>hepatic stellate cells</i>
HTGL	hepatische TG-Lipase
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
IR	Insulinresistenz
KC	<i>Kupffer cells</i>
KD	<i>knockdown</i>
KO	<i>knockout</i>
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LDLR	<i>low density lipoprotein receptor</i>
LPL	Lipoproteinlipase
LPS	Lipopolysaccharid

LSEC	<i>liver sinusoidal endothelial cells</i>
LysM	Lysozym 2
MACS	<i>magnetic-activated cell sorting</i>
MCD	Methionin und Cholin-defizient
MCP1	Monozyten chemotaktisches Protein 1
MMP2	Matrixmetalloproteinase 2
MPO	Myeloperoxidase
MtS	Metabolisches Syndrom
NAFL	nicht-alkoholische Fettleber
NAFLD	<i>non-alcoholic fatty liver disease</i>
NAS	NAFLD <i>activity score</i>
NASH	nicht-alkoholische Steatohepatitis
NLRP3	<i>Nod-like receptor protein 3</i>
ns	nicht signifikant
OrO	<i>Oil Red O</i>
PAMPs	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBS-T	<i>phosphate buffered saline + 0,05% Tween20</i>
PCoA	<i>principal coordinate analysis</i>
PPAR	<i>peroxisome proliferation-activated receptor</i>
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
qPCR	<i>quantitative polymerase chain reaction</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SR	Siriusrot
Tab.	Tabelle
TG	Triglyzerid(e)
TGFβ	<i>transforming growth factor beta</i>
TIMP	<i>tissue inhibitor of metalloproteinases</i>
TNFα	Tumornekrosefaktor alpha
TLR	<i>toll-like</i> Rezeptor
TZD	Thiazolidinedione
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
VE-H <sub>2</sub> O	vollentmineralisiertes Wasser
VLDL	<i>very low density lipoprotein</i>
WT	Wildtyp

### III Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Schematische Übersicht eines Lobulus der Leber; erstellt nach Vorlage [3] .....	2
Abb. 1.2: Histologie der gesunden, NAFL- und NASH-Leber .....	3
Abb. 1.3: Vereinfachte, schematische Darstellung des Lipidstoffwechsels; erstellt nach Vorlage [33] .....	7
Abb. 1.4: Lipotoxizität-Modell bei der NASH; erstellt nach Vorlage [49] .....	11
Abb. 1.5: Darstellung der Vorgänge bei der Inflammation im Zusammenhang der NASH; erstellt nach Vorlage [60].....	16
Abb. 3.1: Plasma MPO-Konzentration in gesunden Probanden und NAFLD-Patienten..	51
Abb. 3.2: Hepatische <i>LPL</i> -Expression in Kontroll- und NASH-Patienten .....	52
Abb. 3.3: Serum MPO-Konzentration und Anzahl MPO-positiver Zellen in der Leber in CD- und NASH-Diät- gefütterten MPO WT-Mäusen .....	53
Abb. 3.4: Metabolische Parameter von CD- und NASH-Diät-gefütterten MPO WT- und MPO KO-Mäusen .....	55
Abb. 3.5: Analyse der Steatose in CD- und NASH-Diät-gefütterten MPO WT- und MPO KO-Mäusen .....	56
Abb. 3.6: Analyse der Serumlipide in CD- und NASH-Diät-gefütterten MPO WT- und MPO KO-Mäusen .....	57
Abb. 3.7: Mikrobiomanalyse von CD- und NASH-Diät-gefütterten MPO WT- und MPO KO-Mäusen .....	58
Abb. 3.8: Analyse des Leberschadens in CD- und NASH-Diät-gefütterten MPO WT- und MPO KO-Mäusen .....	60
Abb. 3.9: Expression von proapoptotischen Genen in CD- und NASH-Diät-gefütterten MPO WT- und MPO KO-Mäusen.....	62
Abb. 3.10: Expression von proinflammatorischen Genen in CD- und NASH-Diät-gefütterten MPO WT- und MPO KO-Mäusen.....	63
Abb. 3.11: Evaluation der Fibrose in CD- und NASH-Diät-gefütterten MPO WT- und MPO KO-Mäusen .....	65
Abb. 3.12: Einfluss der Diät bzw. des Genotyps auf das Expressionsmuster bei CD- und NASH-Diät-gefütterten MPO WT- und MPO KO-Mäusen.....	67
Abb. 3.13: Übersicht der MPO-abhängigen Signalwege in NASH.....	68
Abb. 3.14: <i>Heatmaps</i> von EZM-assozierten Genen.....	69

Abb. 3.15: <i>Heatmaps</i> von Entzündungs- und Apoptose-assoziierten Genen .....	70
Abb. 3.16: Expression von <i>Lpl</i> und <i>Ldlr</i> in CD- und NASH-Diät-gefütterten MPO WT- und MPO KO-Mäusen .....	72
Abb. 3.17: <i>Lpl</i> -Expression in der Leber .....	73
Abb. 3.18: Makroskopische Aufnahmen der Leber von CD und NASH-Diät-gefütterten LPL <sup>fl/fl</sup> - und LPL <sup>ΔHep</sup> -Mäusen .....	74
Abb. 3.19: Metabolische Parameter von CD- und NASH-Diät-gefütterten LPL <sup>fl/fl</sup> - und LPL <sup>ΔHep</sup> -Mäusen .....	75
Abb. 3.20: Expression von <i>Lpl</i> und <i>Lipc</i> sowie Quantifizierung von LPL in CD- und NASH-Diät-gefütterten LPL <sup>fl/fl</sup> - und LPL <sup>ΔHep</sup> -Mäusen .....	77
Abb. 3.21: Analyse des Leberschadens von CD- und NASH-Diät-gefütterten LPL <sup>fl/fl</sup> - und LPL <sup>ΔHep</sup> -Mäusen .....	78
Abb. 3.22: Expression von proinflammatorischen Genen in CD- und NASH-Diät- gefütterten LPL <sup>fl/fl</sup> - und LPL <sup>ΔHep</sup> -Mäusen .....	79
Abb. 3.23: Evaluation der Fibrose in CD- und NASH-Diät-gefütterten LPL <sup>fl/fl</sup> - und LPL <sup>ΔHep</sup> -Mäusen .....	80
Abb. 3.24: Überprüfung der LPL-Deletion in LPL <sup>ΔLysM</sup> -Mäusen .....	82
Abb. 3.25: Expression von Lipidstoffwechsel-assoziierten Genen in CD- und NASH- Diät-gefütterten LPL <sup>fl/fl</sup> - und LPL <sup>ΔLysM</sup> -Mäusen .....	83
Abb. 3.26: Metabolische Parameter von CD- und NASH-Diät-gefütterten LPL <sup>fl/fl</sup> - und LPL <sup>ΔLysM</sup> -Mäusen .....	84
Abb. 3.27: Analyse des Leberschadens in CD- und NASH-Diät-gefütterten LPL <sup>fl/fl</sup> - und LPL <sup>ΔLysM</sup> -Mäusen .....	86
Abb. 3.28: Expression von proapoptischen Genen in CD- und NASH-Diät- gefütterten LPL <sup>fl/fl</sup> - und LPL <sup>ΔLysM</sup> -Mäusen .....	87
Abb. 3.29: Expression von proinflammatorischen Genen in CD- und NASH-Diät- gefütterten LPL <sup>fl/fl</sup> - und LPL <sup>ΔLysM</sup> -Mäusen .....	89
Abb. 3.30: Quantifizierung der F4/80-positiven Zellen in CD- und NASH-Diät- gefütterten LPL <sup>fl/fl</sup> - und LPL <sup>ΔLysM</sup> -Mäusen .....	91
Abb. 3.31: Evaluation der Fibrose in CD- und NASH-Diät-gefütterten LPL <sup>fl/fl</sup> - und LPL <sup>ΔLysM</sup> -Mäusen .....	93

---

**IV Tabellenverzeichnis**

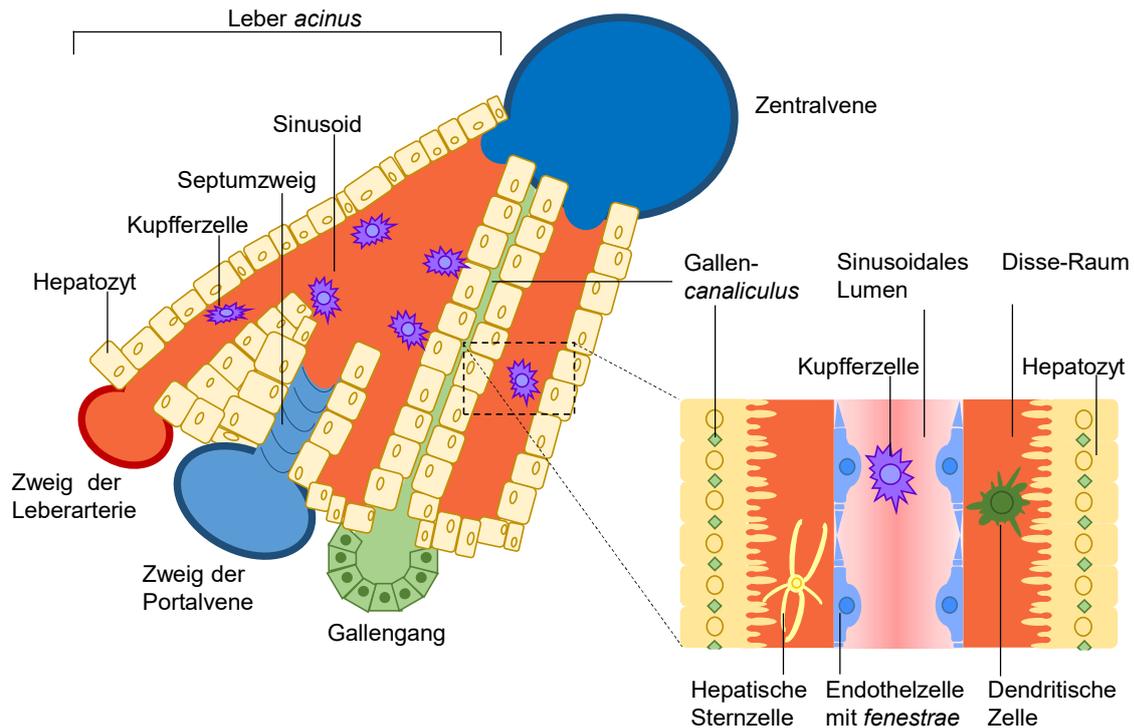
Tab. 2.1: Liste der verwendeten Geräte und Instrumente.....	28
Tab. 2.2: Auflistung der verwendeten Tierfutter .....	29
Tab. 2.3: Auflistung aller verwendeten Mauslinien.....	30
Tab. 2.4: Auflistung der verwendeten qPCR-Sonden.....	32
Tab. 2.5: Auflistung der für die Immunhistochemie verwendeten Antikörper .....	32
Tab. 2.6: Auflistung der weiteren verwendeten Kits .....	33
Tab. 2.7: Auflistung der verwendeten Software .....	33
Tab. 2.8: Entwässerungsprotokoll der Pathologie.....	36
Tab. 2.9: Übersicht der Details der einzelnen IHC-Färbungen .....	38
Tab. 2.10: qPCR-Programm.....	42
Tab. 6.1: Übersicht der GHS-Hinweise, H- und P-Sätze aller gefährdenden verwendeten Chemikalien .....	120
Tab. 6.2: Übersicht der verwendeten KMR-Substanz.....	121



# 1 Einleitung

## 1.1 Aufbau der Leber

Die Leber teilt sich in mehrere Lappen mit unterschiedlicher Größe auf. Die Leberarterie zur Versorgung mit sauerstoffreichem Blut, die Pfortader zur Versorgung mit Nährstoffen aus dem Darm sowie die untere Hohlvene zur Rückführung des Blutes in den Blutkreislauf durchziehen neben den Gallengängen das Organ. Leberarterie, Pfortader und Gallengang liegen auf der Unterseite der Leber dabei in unmittelbarer räumlicher Nähe, sodass sie die sogenannte Leberpforte bilden. Die feinen Verästelungen und Ausläufer dieser Gefäße bilden innerhalb der Leber das periportale Feld – auch Glisson-Dreieck genannt. Sechs Portalfelder bilden im Sechseck angeordnet einen Lobulus, durch dessen Mitte eine Zentralvene verläuft. Zwischen den Hepatozyten, die als Epithelzellen den Großteil der Leber-residenten Zellen stellen, verlaufen die Lebersinusoide. Diese feinen Gefäße befördern das Blut aus Pfortader und Leberarterie zur Zentralvene, wobei zwischen den *liver sinusoidal endothelial cells* (LSEC) und den Hepatozyten der Disse-Raum lokalisiert ist, der als Nische für Immunzellen und *hepatic stellate cells* (HSC) fungiert. In den Sinusoiden befinden sich zur Abwehr von Pathogenen die Leber-residierenden Makrophagen, die als *Kupffer cells* (KC) bezeichnet werden (zusammengefasst in [1, 2]). In Abbildung (Abb.) 1.1 ist eine schematische Struktur des Lobulus dargestellt.



**Abb. 1.1: Schematische Übersicht eines Lobulus der Leber; erstellt nach Vorlage [3]**

Hauptsächlich wird die Leber über die Portalvene mit Blut versorgt. Nur 25% der Blutversorgung wird durch die Leberarterie gewährleistet. Das Blut gelangt von der Leberpforte durch die Sinusoide im periportalen Feld in die Zentralvene. Die Sinusoide zeichnen sich durch die phänotypisch und morphologisch einzigartigen LSECs aus, für die das Fehlen von *tight junctions* sowie einer sichtbaren Basalmembran und die Existenz so genannter *fenestrae* charakteristisch sind. Zwischen dem sinusoidalen Endothelium, auf dem sich die KC befinden, und den Hepatozyten befindet sich der Disse-Raum. In diesem befinden sich die HSC, Proteine der extrazellulären Matrix sowie dendritische Zellen, die, aus dem Parenchym kommend, die Leber über den Disse-Raum verlassen (zusammengefasst in [3]).

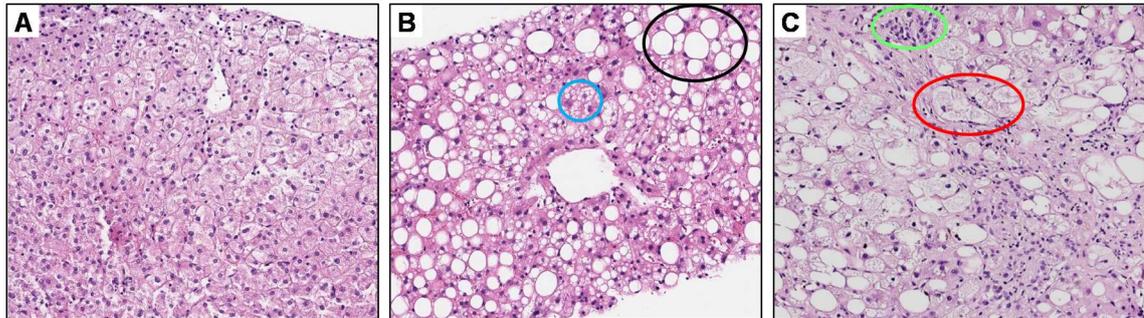
## 1.2 Die nicht-alkoholische Fettlebererkrankung

### 1.2.1 Definition und Diagnose

Die *non-alcoholic fatty liver disease* (NAFLD) beschreibt eine chronische Erkrankung der Leber, deren zentrales Merkmal die sichtbare, ektope Akkumulation von Lipiden in den Hepatozyten ist. Die Ursache ist dabei weder in einer Virusinfektion noch in einem exzessiven Alkoholkonsum sondern in einem gestörten Metabolismus zu finden. Dabei beschreibt nicht-alkoholisch einen Alkoholkonsum von weniger als 20 g reinem Alkohol bei Männern und 10 g bei Frauen pro Tag [4].

Die NAFLD wurde erstmals 1980 beschrieben und umfasst verschiedene Stadien der Fettlebererkrankung. Neben der einfachen nicht-alkoholischen Fettleber (NAFL) handelt es sich auch bei der nicht-alkoholischen Fettleberentzündung, die als nicht-alkoholische

Steatohepatitis (NASH) bezeichnet wird, um eine Form der NAFLD. Definitionsgemäß enthalten bei der NAFLD mind. 5% der Hepatozyten in der histologischen Beurteilung Lipidvakuolen und sind somit steatotisch. Während bei der NAFL höchstens eine milde, unspezifische Inflammation vorliegt, ist die NASH durch eine ausgeprägtere Inflammation und hepatozelluläre Schädigungen definiert [5] (s. Abb 1.2).



**Abb. 1.2: Histologie der gesunden, NAFL- und NASH-Leber**

Während eine gesunde Leber (A) keine Fettakkumulation in den Hepatozyten aufweist, sind univakuoläre (schwarzer Kreis) und multivakuoläre (blauer Kreis) Lipidtropfen das charakteristische Kennzeichen der Leber eines NAFL-Patienten (B). Eine NASH-Leber (C) zeichnet neben der Steatose die Infiltration von Immunzellen (grüner Kreis) sowie der Hepatozytenuntergang (roter Kreis) aus. Die Bilder wurden netterweise von Sören Weidemann (Zentrum für Diagnostik; Institut für Pathologie mit den Sektionen Molekularbiologie und Zytopathologie; UKE) aufgenommen und zur Verfügung gestellt.

Die Schweregradeinteilung der NAFLD erfolgt durch die histologische Bestimmung des Grades der Steatose, der Inflammation und des Leberzellschadens. Dafür werden Patienten mit auffälligen Laborwerten und einer per Ultraschall diagnostizierten Fettleber biopsiert. Der Pathologe bestimmt daraufhin die genannten histologischen Auffälligkeiten und ermittelt den NAFLD *activity score* (NAS). Ein NAS von 4 kennzeichnet dabei die Grenze zwischen NAFL und NASH. Ab einem Wert von 5 wird die Diagnose NASH eindeutig gestellt [6].

Als Folge der chronischen Leberschädigung im Rahmen der NAFLD/NASH kann sich eine Leberfibrose entwickeln. Die Fibrose wird histologisch mit einem Wert zwischen 0 und 4 beschrieben, geht aber nicht in die Berechnung des NAS ein. Trotzdem können aufgrund des Fibrosegrads Rückschlüsse auf das Stadium der NAFLD gezogen werden. So hatten in einer Studie nur 11% der Patienten einer diagnostizierten NASH einen Fibrosegrad von 0 [5].

### 1.2.2 Verlauf und Prognose

Die NAFLD ist eine prognostisch relevante Erkrankung. So zeigte eine schwedische Studie eine um 55% erhöhte Mortalität bei NAFL-Patienten im Vergleich zur Normalbevölkerung. Bei NASH-Patienten war die Sterberate sogar um 86% erhöht. Dabei liegt bei ca. 20% der NAFLD-Todesfälle eine Leber-assoziierte Todesursache als Folge der fortschreitenden NAFLD vor [7]. Leber-assoziierte Todesursachen können eine Zirrhose, die das Endstadium einer fortschreitenden Fibrose darstellt, oder ein *hepatocellular carcinoma* (HCC) sein, die im Verlauf bei einer NAFLD entstehen können [7, 8]. Das Auftreten der Fibrose wird dabei als der wichtigste histologische Prädiktor für den Verlauf der NASH angesehen. So steigt der Anteil an NAFLD-Patienten, die eine schwere Lebererkrankung wie z.B. eine Zirrhose oder ein HCC entwickeln, von 7,4% bei Patienten ohne Fibrose auf 25,9% bei Patienten mit einem Fibrosegrad 3 [9].

Das Auftreten einer Zirrhose in NAFLD-Patienten erhöht das Risiko für die Entwicklung eines HCC [10]. Allerdings gibt es ebenfalls nicht-zirrhotische NAFLD-abhängige Fälle des HCC. Die NAFLD ist neben der viralen Hepatitis, wenigen Erbkrankheiten sowie genotoxischen Substanzen ein Risikofaktor für die Entstehung eines nicht-zirrhotischen HCC [11]. Insgesamt konnten Ertle *et al.* zeigen, dass in 150 untersuchten HCC-Fällen in Deutschland 36, also 24%, mit einer NAFLD assoziiert waren [12].

Der beste Prädiktor für die NAFLD-assoziierte Mortalität ist die Fibrose. Eine Studie zeigte, dass NAFLD-Patienten mit einer schwach ausgeprägten Fibrose keine signifikant erhöhte Mortalitätsrate aufweisen, während NAFLD-Patienten mit einer stark fibrotischen Leber in dem Studienzeitraum von 33 Jahren mehr als dreimal so häufig starben als Menschen aus der Normalbevölkerung [13]. Dabei korreliert die Sterberate mit dem Grad der Fibrose. Während die Rate an Todesfällen aufgrund der Leber bei Fibrosegrad 0 0,30 beträgt, steigt sie kontinuierlich an (Grad 1: 0,64; Grad 2: 4,28; Grad 3: 7,92) bis die Rate bei Fibrosegrad 4 bei 23,3 pro 1000 *patient years of follow-up* liegt [14]. Aus diesem Grund wird der Rückgang der Fibrose als Surrogatparameter für die Prognosebesserung bei NAFLD-Patienten unter Therapie akzeptiert und als möglicher Endpunkt klinischer Studien angesehen [15].

### 1.2.3 Risikofaktoren und Prävalenz

Viele NAFLD-Risikofaktoren sind bekannt. Dazu zählen neben dem Alter (höheres Risiko mit steigendem Alter) die ethnische Herkunft (hispanische Herkunft mit erhöhtem Risiko) und genetische Faktoren wie eine Variation im *Patatin-like phospholipase domain containing 3*-Gen [16]. Den größten Einfluss auf die Entwicklung dieser Erkrankung hat allerdings die Lebensweise. Die NAFLD-Inzidenz nimmt mit steigendem Body-Mass-Index (BMI) als Kennzeichen von Übergewicht und Adipositas zu. Während ca. 15% der Personen mit einem BMI von unter 30 eine NAFL und ca. 3% eine NASH haben, sind es bei Übergewichtigen mit einem BMI von 30-39,9 bereits ca. 65% bzw. 20% und ca. 85% der stark adipösen Personen (BMI >40) haben eine NAFL und ca. 40% eine NASH [17]. Eine andere Übersichtsarbeit beschreibt sogar eine Erkrankungshäufigkeit der NAFLD bei etwa 70% der Übergewichtigen (BMI 25-29,9) und 95% der adipösen Personen (BMI >30) [18]. Dazu passend liegt die Prävalenz von Übergewicht bei NAFL-Patienten mit ca. 51% deutlich niedriger als bei NASH-Patienten mit ca. 81% [19].

Auch eine Ernährung reich an Cholesterin und gesättigten Fettsäuren sowie ein hoher Konsum an Fruktose sind Risikofaktoren für die NAFLD [20, 21]. Eine Studie zeigte, dass ca. 60% der NASH-Patienten eine Dyslipidämie aufweisen [22]. Einer der wichtigsten Prädiktoren für die NAFLD ist allerdings die Insulinresistenz (IR). Auch in normalgewichtigen Patienten ist die NAFLD in hohem Maße mit einer IR assoziiert [23].

Übergewicht, Dyslipidämie und IR können zwar unabhängig voneinander auftreten, definieren aber, wenn sie zusammen vorliegen, die Diagnose des Metabolischen Syndroms (MtS). Die NAFLD wird oft als hepatische Manifestation des MtS bezeichnet. Marchesini *et al.* zeigten, dass bei der untersuchten Patientenkohorte 67% der NAFL-Patienten und 88% der NASH-Patienten ebenfalls an dem MtS erkrankt waren [24].

Übergewicht und Diabetes gelten dabei nicht nur als Risikofaktoren für das Auftreten der NAFLD, sondern fördern vermutlich auch die Progression der Erkrankung. So waren der NAS und der Fibrosegrad in übergewichtigen NASH-Patienten in einer Studie höher als in normalgewichtigen NASH-Patienten. Außerdem erhöht Übergewicht das Zirrhose- und HCC-Risiko (zusammengefasst in [25]). Hinsichtlich der IR konnte eine Studie zeigen, dass der Anteil der NAFL-Patienten mit einem Diabetes kleiner ist als der Anteil bei NASH-

Patienten. Außerdem tritt bei NAFLD-Patienten mit einer fortgeschrittenen Fibrose bzw. einer Zirrhose Diabetes häufiger auf als bei NAFLD-Patienten ohne oder nur einer schwach ausgeprägten Fibrose (zusammengefasst in [26]).

Die NAFLD-Prävalenz nahm in den letzten Jahrzehnten dramatisch zu. Eine Meta-Analyse aus dem Jahre 2016 ergab, dass die aktuelle weltweite Prävalenz ca. 25% beträgt, während sie 2005 noch bei ca. 15% lag [19]. Parallel dazu hat sich in den USA die Anzahl an Patienten, die aufgrund einer NASH-Erkrankung eine Lebertransplantation benötigen, verdreifacht. Mittlerweile ist die NASH in den USA die zweithäufigste Ursache für eine Lebertransplantation und hat die alkoholische Lebererkrankung überholt [27].

Der TG-Gehalt der Leber steigt direkt proportional mit der Schwere jedes Kennzeichens des MtS an [28] und somit nimmt die NAFLD-Prävalenz parallel mit der Adipositas- und MtS-Epidemie zu. Laut der Weltgesundheitsorganisation WHO hat sich die Anzahl der Adipösen seit 1975 nahezu verdreifacht. 2016 waren 1,9 Mrd. Erwachsene, dies entspricht einem Anteil von 39%, übergewichtig – über 650 Mio. davon adipös. Die Prävalenz von Übergewicht bei Kindern und Jugendlichen (Alter: 5-19) hat von 4% im Jahre 1975 auf heute über 18% dramatisch zugenommen. 124 Mio. Jugendliche sind heutzutage adipös [29]. Somit steigt auch die NAFLD-Prävalenz bei Jugendlichen stark an. Eine Analyse von klinischen Studien mit adipösen Kindern ergab, dass 35,3% der adipösen Jungen und 21,8% der adipösen Mädchen unter einer NAFLD leiden [30].

### **1.3 Pathogenese der nicht-alkoholischen Steatohepatitis**

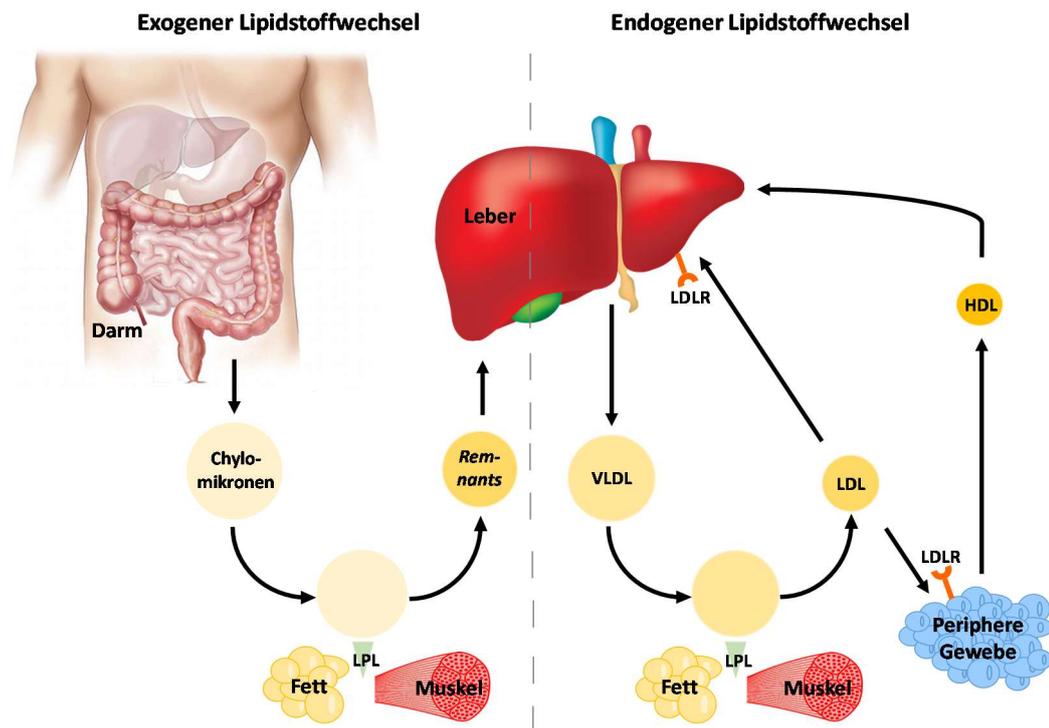
#### **1.3.1 *Multiple Hit* Hypothese**

Der Grund, warum in ca. 25% der NAFLD-Patienten pathogene Veränderungen der Leber und somit eine NASH auftreten, ist unklar. Am weitesten verbreitet ist die so genannte *Multiple Hit*-Hypothese. 1998 wurde die *Two Hit*-Hypothese postuliert, die besagt, dass das Vorkommen der Steatose die Leber für einen zweiten „Schlag“ sensibilisiert, der eine Kaskade aktiviert, die zu Inflammation, Hepatozytenschädigung und Fibrose führt [31]. Mittlerweile gilt diese Hypothese zur NASH-Pathogenese als zu stark vereinfachend. Sie wurde durch das komplexere Modell der *Multiple Hit*-Hypothese ersetzt. Diese besagt, dass verschiedene Prozesse, die parallel voneinander ablaufen, zur Entwicklung der Inflammation und

Leberschädigung führen [32]. In den folgenden Unterkapiteln soll auf die Entwicklung der Steatose und auf die einzelnen Prozesse, die zu einer NASH führen, eingegangen werden.

### 1.3.2 Entstehung der hepatischen Steatose

Der Lipidstoffwechsel ist ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Organe und Faktoren. Eine zentrale Rolle spielt dabei die Leber, da sie z. B. die Schnittstelle zwischen dem exogenen und dem endogenen Lipidstoffwechsel darstellt (s. Abb. 1.3).



**Abb. 1.3: Vereinfachte, schematische Darstellung des Lipidstoffwechsels; erstellt nach Vorlage [33]**

Lipide gelangen nach der Resorption im Darm in Chylomikronen in die Lymphe und von dort aus in den Blutkreislauf. Die Lipoproteinlipase (LPL) hydrolysiert TG aus den Chylomikronen. Die entstandenen freien Fettsäuren und das Glycerol werden vom peripheren Gewebe, hauptsächlich Fettgewebe und Muskeln, aufgenommen. Die Überreste der Partikel (*Remnants*) gelangen in die Leber (Beschreibung des exogenen Lipidstoffwechsels) und werden dort in *very low density lipoproteins* (VLDL) organisiert. Nach der VLDL-Hydrolyse in der Peripherie entstehen *low density lipoproteins* (LDL), die durch eine hohe Cholesterinkonzentration gekennzeichnet sind. Diese Lipoproteine werden über den *low density lipoprotein receptor* (LDLR) von der Leber und dem peripheren Gewebe aufgenommen. Über *high density lipoproteins* (HDL) erfolgt ein Rücktransport des Cholesterins zur Leber (Beschreibung des endogenen Lipidstoffwechsels) (zusammengefasst in [34]).

Die Leber ist für den Lipidstoffwechsel und die Energiehomöostase von entscheidender Bedeutung. So versorgt die Leber im nüchternen Zustand durch den Abbau des Glykogenspeichers, der Glukoneogenese und der Bildung von Ketonkörpern das Gehirn und andere Organe mit Glukose. Beim Lipidstoffwechsel kann die Leber als zentrales Organ

bezeichnet werden, da in der Leber Lipide aufgenommen, synthetisiert, verpackt und sekretiert werden [35]: In die Leber gelangen alle Bestandteile der Chylomikronen, die sich nach der Hydrolyse durch die Lipoproteinlipase (LPL) noch in den Partikeln befinden. In der Leber werden TG und Cholesterin in *very low density lipoproteins* (VLDL) verpackt und sekretiert. Durch die Aufnahme der Lipoproteine *low density lipoprotein* (LDL) und *high density lipoprotein* (HDL) gelangt Cholesterin wieder in die Leber, wo es über die Galle ausgeschieden werden kann (zusammengefasst in [34]).

Ein weiterer Bestandteil des Lipidstoffwechsels stellt der Fettsäurestoffwechsel dar. Im nüchternen Zustand wird die Energieversorgung der Organe und Gewebe durch Lipolyse der im Fettgewebe gespeicherten TG sichergestellt, indem die freigesetzten unveresterten Fettsäuren von den Zellen aufgenommen und verstoffwechselt werden [36]. Die Leber nimmt konzentrationsabhängig diese freigesetzten freien Fettsäuren auf und nutzt diese entweder über  $\beta$ -Oxidation zur Energiegewinnung oder verestert sie wieder zu TG, die in intrazellulären Lipidtropfen gespeichert bzw. innerhalb von VLDL sekretiert werden. Eine weitere Quelle für Fettsäuren und TG ist die *de novo* Lipogenese (DNL), wobei es sich bei der Leber um das Hauptorgan handelt, in dem Kohlenhydrate in Fettsäuren umgewandelt werden und diese DNL stattfindet (zusammengefasst in [37]). Bei den Kohlenhydraten muss dabei zwischen Fruktose und Glukose differenziert werden. So unterscheidet sich der Anteil einer oral verabreichten Menge in der Leber zwischen Glukose (15% bis 30%) und Fruktose (bis zu 70%) erheblich. Zusätzlich werden bei der Glukose die enzymatischen Schritte, die zum Abbau des Zuckers durch die Glykolyse führen, durch den Energie- und Stoffwechselzustand der Zelle reguliert, während die Fruktose unabhängig von einem Regulationsmechanismus abgebaut wird. Der daraus resultierende Konzentrationsunterschied von Fruktose zwischen den Hepatozyten und dem Blut führt zur weiteren Aufnahme dieses Zuckers. Die Abbauprodukte der Fruktose können in der Glykolyse verstoffwechselt werden, in Glukose umgewandelt der Glykogensynthese und der Glukoneogenese dienen oder zum Aufbau von TG verwendet werden. Unterschiede im Metabolismus von Glukose und Fruktose führen allerdings dazu, dass eine höhere Anzahl von Fruktoseabbauprodukte durch die DNL in Lipide konvertiert wird, die entweder in der Leber gespeichert oder als VLDL sekretiert werden (zusammengefasst in [38, 39]).

Bei der NAFLD ist eine Akkumulation von Lipiden in der Leber eine Folge einer gestörten Homöostase des Lipidstoffwechsels. Dazu können (A) eine vermehrte Aufnahme von freien Fettsäuren, deren Ursprung auf eine verstärkte Lipolyse im Fettgewebe oder eine erhöhte Aufnahme von Nahrungsfetten zurückzuführen ist, (B) eine vermehrte DNL, (C) eine reduzierte  $\beta$ -Oxidation und (D) eine verminderte VLDL-Sekretion gehören [40]. So weist das Serum von NASH-Patienten eine erhöhte Konzentration von freien Fettsäuren auf [41]. Da die Aufnahme von freien Fettsäuren bei Hepatozyten einzig konzentrationsabhängig ist [42], gelangen bei der NASH mehr freie Fettsäuren in die Leber.

Die NAFLD-Risikofaktoren Dyslipidämie, Übergewicht und IR haben dabei direkten Einfluss auf die genannten Parameter. So führen Übergewicht und Diabetes zu einer gesteigerten Konzentration an freien Fettsäuren. Bei einer IR kommt es zu einer Verminderung der insulinvermittelten Herunterregulierung der Lipolyse im Fettgewebe und somit zu einer Freisetzung von freien Fettsäuren auch im postprandialen Zustand [43]. Neben der Konzentration an freien Fettsäuren im Blut verändert eine IR außerdem den Glukosemetabolismus. Bei einer IR nimmt die Leber durch ihren insulinunabhängigen Glukosetransporter 2 vermehrt Glukose auf, die bei einer verminderten Glykogensynthese besonders durch die DNL verstoffwechselt wird [44].

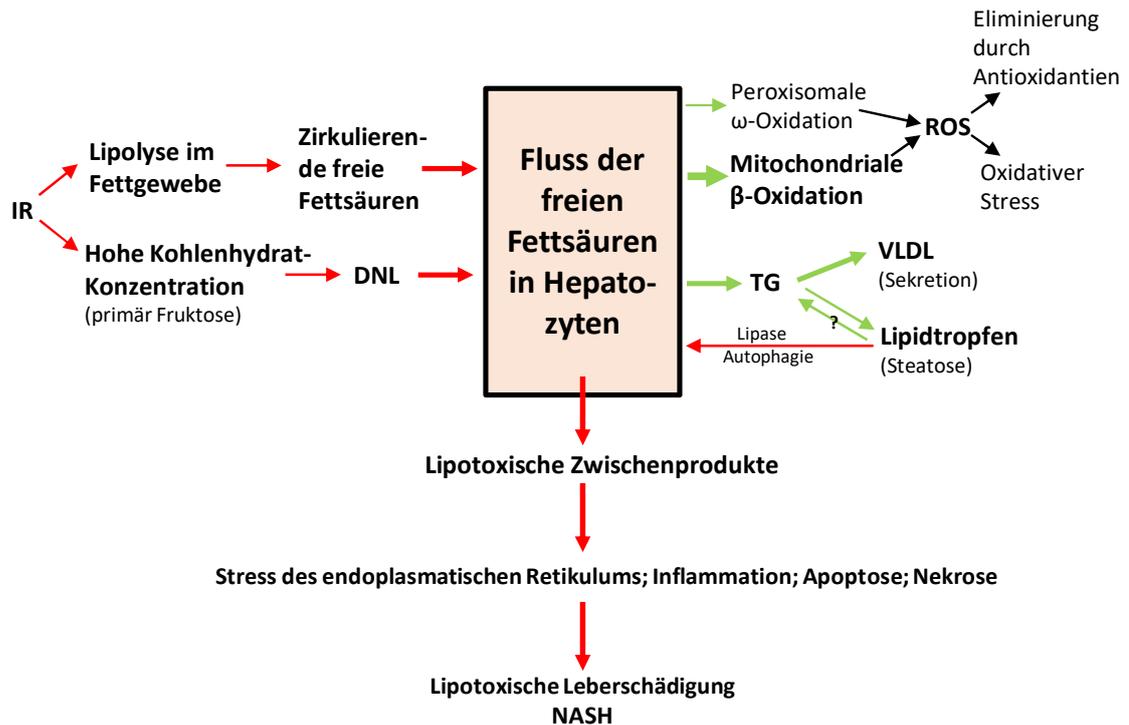
Zudem hat die Aufnahme von Fruktose durch den erhöhten Konsum von Produkten mit Fruktose-basierten Süßungsmitteln zugenommen [45]. Bei einer chronischen Aufnahme von viel Fruktose über die Nahrung kommt es zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die Enzyme für eine vermehrte DNL und Lipidsynthese induzieren. Zudem unterdrückt Fruktose die Fettsäureoxidation, sodass es zu einer vermehrten TG-Akkumulation in der Leber kommt [39].

### **1.3.3 Lipotoxizität**

Bei der NAFLD wird ein Großteil der Lipide in Form von TG in der Leber gespeichert. Daneben akkumulieren andere Lipidmetabolite wie freie Fettsäuren, Diacylglycerol, freies und verestertes Cholesterin sowie Ceramide und Phospholipide [46]. Listenberger *et al.* konnten zeigen, dass die Veresterung von freien Fettsäuren zu TG die Zellen schützt [47], sodass davon ausgegangen wird, dass die Akkumulation von TG in der Leber *per se* nicht

schädlich ist und die TG-Ansammlung in großen monovakuolären oder kleinen multivakuolären Lipidtropfen ein Schutzmechanismus vor Lipotoxizität darstellt. Unger definierte diesen Begriff vor über 20 Jahren als Lipid-induzierte Dysfunktion im Nicht-Fettgewebe [48].

Welche der einzelnen Lipidspezies lipotoxische Effekte haben, ist immer noch teilweise unklar. Es wird vermutet, dass z.B. eher die Stoffwechselprodukte als die eigentlichen freien Fettsäuren für die Lipotoxizität verantwortlich sind [49]. Auch der Einfluss der Akkumulation von freiem Cholesterin ist noch nicht vollständig bekannt. Eine Studie konnte zeigen, dass eine mitochondriale Akkumulation von freiem Cholesterin zu einer Depletion des mitochondrialen Glutathion führte, sodass die Hepatozyten sensitiv auf die zytotoxische Wirkung des Tumornekrosefaktors alpha ( $TNF\alpha$ ) reagierten und vermehrt apoptotischer und nekrotischer Zelltod auftraten [50]. Nicht nur in Bezug auf freies Cholesterin sind Mitochondrien von Bedeutung für die Vorgänge bei der NAFLD, wie Fromenty in seinem Übersichtsartikel zusammenfasst: Die  $\beta$ -Oxidation der Fettsäuren findet überwiegend in den Mitochondrien statt, wobei auch teilweise reaktive Sauerstoffspezies (ROS) während der Atmungskette entstehen. Durch verschiedene Detoxifizierungsmechanismen kann die geringe Menge an ROS in der gesunden Zelle unschädlich gemacht werden. Tritt eine Schädigung der Mitochondrien auf, entstehen mehr ROS, die die Zelle schädigen können. Verschiedene Studien zeigen Veränderungen der Mitochondrien und der Expression mitochondrialer Gene bei NASH-Patienten, die eine Schädigung des Zellorganells implizieren. Hinzu kommt, dass die hepatische *TNFA*-Expression bei NASH-Patienten erhöht ist, wodurch vermehrt Cytochrom c aus der Atmungskette freigesetzt wird. Dies führt ebenfalls zu einer Erhöhung der ROS-Entstehung im Zuge der  $\beta$ -Oxidation. Da bei der NASH eine erhöhte Konzentration an freien Fettsäuren in der Leber vorliegt, dient die  $\beta$ -Oxidation als Kompensationsmechanismus. Studien konnten eine höhere  $\beta$ -Oxidations-Rate bei NASH-Patienten nachweisen, sodass aufgrund der höheren  $\beta$ -Oxidations-Rate auch mehr ROS entstehen können. All dies lässt vermuten, dass die hepatischen Mitochondrien eine entscheidende ROS-Quelle bei der NASH sind (zusammengefasst in [51]). In Abb. 1.4 ist ein Modell zur Lipotoxizität bei der NASH dargestellt.



**Abb. 1.4: Lipotoxizität-Modell bei der NASH; erstellt nach Vorlage [49]**

Bei der NASH führt eine vermehrte Lipolyse im Fettgewebe und die hohe Kohlenhydratkonzentration im Blut, deren Ursache in einer bestehenden IR liegen kann, zu einer Erhöhung der Anzahl zirkulierender freier Fettsäuren im Blut, die von den Hepatozyten aufgenommen werden, bzw. zu einer vermehrten DNL in der Leber. Ein Großteil der freien Fettsäuren wird mittels  $\beta$ -Oxidation oder durch Bildung von TG, die über VLDL die Leber verlassen oder die in Lipidtropfen in der Zelle verweilen, unschädlich gemacht. Bei der  $\beta$ -Oxidation entstehen ROS, die teilweise durch Antioxidantien eliminiert werden oder zu oxidativen Stress führen. Durch die Verstoffwechslung der freien Fettsäuren können lipotoxische Zwischenprodukte entstehen, die z.B. Inflammation und Apoptose und somit eine lipotoxische Leberschädigung als Konsequenz haben. Die roten Pfeile kennzeichnen Prozesse, die zur Lipotoxizität führen, während die grünen Pfeile kompensatorische Vorgänge darstellen, die die Entstehung von lipotoxischen Produkte verhindern [49].

Abb. 1.4 zeigt, wie metabolische Vorgänge wie eine hepatische Lipidakkumulation und eine IR bei der NAFLD mit inflammatorischen Prozessen, der Schädigung des Gewebes und dem Absterben von Zellen zusammenhängen. In folgenden Kapiteln wird auf diese Zusammenhänge näher eingegangen.

### 1.3.4 Oxidativer Stress

Fromenty geht in seinem Übersichtsartikel ebenfalls auf die Konsequenzen des oxidativen Stress' bei der NAFLD ein: Ein ROS-Zielmolekül sind Lipide, die durch die Radikale peroxidiert werden können. Die dabei entstehenden Aldehyde sorgen ebenso wie ROS zu einer Verschlechterung der Mitochondrienfunktion, wodurch immer mehr ROS gebildet werden und ein Teufelskreis entsteht. Bei NASH-Patienten konnte eine gesteigerte Lipidperoxidation nachgewiesen werden. Zu den reaktiven Aldehyden, die durch die

Peroxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren entstehen und die zahlreiche Komponenten wie z.B. die Atmungskette der Mitochondrien schädigen, zählen 4-Hydroxynonenal (HNE) und Malondialdehyd. Ebenfalls sehr anfällig für die Produkte der Lipidperoxidation und der Sauerstoffradikale ist das mitochondriale Genom, wodurch es zu Brüchen der *deoxyribonucleic acid* (DNA) oder sogar zu dessen Depletion kommen kann (zusammengefasst in [51]). Ein Ungleichgewicht von freien Radikalen und Antioxidantien beeinflusst zudem den Lipidstoffwechsel. Die vermehrte Peroxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren kann zu einem Abbau von Apolipoproteinen führen, die entscheidend für die VLDL-Sekretion sind [52], sodass eine weitere hepatische Lipidakkumulation auftreten kann.

Des Weiteren wird mit der Fibrogenese ein weiterer wichtiger Aspekt der NASH-Erkrankung durch die Entstehung von ROS und peroxidierten Lipiden gefördert. Eine Studie konnte zeigen, dass ROS HSC aktivieren [53]. Außerdem induziert HNE die Expression des profibrotischen Zytokins *transforming growth factor  $\beta$*  (TGF $\beta$ ) in Makrophagen [54] sowie die Expression und Synthese von Kollagen Typ I, alpha 1 (COL1 $\alpha$ 1) in aktivierten HSC [55] und vermittelt somit über zwei verschiedene Arten direkt die Fibrogenese.

### 1.3.5 Fibrogenese

Die Fibrogenese resultiert aus der Interaktion verschiedener Zellen, wobei HSC das Zentrum dieses Vorgangs bilden. Lee und Friedman fassen in ihrem Übersichtsartikel die Aspekte der Fibrogenese wie folgt zusammen: Bei der Fibrose handelt es sich grundsätzlich um einen reversiblen Prozess zur Wundheilung bei akutem oder chronischem Zellschaden. Bei einer akuten Verletzung werden die Veränderungen schnell wieder rückgängig gemacht, sobald der Schaden repariert wurde. Bei chronischen Erkrankungen wie z.B. der NASH kommt es zu einer fortschreitenden Substitution des Leberparenchyms durch Narbengewebe, da das Gleichgewicht aus Auf- und Abbau der extrazellulären Matrix (EZM) zugunsten des Aufbaus verschoben ist. Die Haupteffektorzellen bei der hepatischen Fibrogenese sind HSC, da sie verantwortlich für die EZM-Deposition in der gesunden und fibrotischen Leber sind. HSC sind, wie in der Abb. 1.1 gezeigt, im Disse-Raum zwischen LSEC und Hepatozyten lokalisiert, sodass sie gut mit den verschiedenen Zellen interagieren können. Bei der

Fibrogenese kommt es zu einer HSC-Aktivierung, sodass die Zellen zu Myofibroblasten transdifferenzieren. Das wichtigste profibrotische Zytokin ist dabei TGF $\beta$ , das quieszente HSC aktiviert, sodass sie EZM bilden. Zu den Merkmalen von aktivierten HSC gehört der Verlust der Lipidtropfen, in denen Retinoide gespeichert werden, und die Expression der Gene, die für die Proteine TGF $\beta$ , TGF $\beta$ -Rezeptor, Matrixmetalloproteinase 2 (MMP2), Typ I Kollagen (alpha 1 und alpha 2 Kette), *alpha-smooth muscle actin* ( $\alpha$ SMA) und *tissue inhibitor of metalloproteinases* (TIMP) 1 und 2 kodieren. Die Proteine TIMP1, MMP2 und COL1 $\alpha$ 1 sind dabei mitverantwortlich für die EZM-Veränderung und -Akkumulation bei der Fibrose. Während in der gesunden Leber die basale Membran-ähnliche Matrix im Disse-Raum vorwiegend aus Kollagen IV und VI besteht, wird diese bei der Fibrogenese sukzessive durch eine Matrix aus Kollagen I und III sowie zellulärem Fibronectin ersetzt. Die vermehrte EZM-Produktion ist dabei sowohl auf eine erhöhte HSC-Anzahl als auch auf eine gesteigerte EZM-Bildung der einzelnen Zelle zurückzuführen (zusammengefasst in [56]).

Aktivierte HSC interagieren zudem mit Immunzellen, da sie verschiedene proinflammatorische Chemokine sekretieren, Adhäsionsmoleküle exprimieren und Antigene präsentieren. Der Fibrose und somit der HSC-Aktivierung geht nahezu in jedem Fall eine bestehende Inflammation voraus. So werden HSC durch Lipopolysaccharide (LPS) und andere *toll-like* Rezeptor (TLR) 4-Liganden aktiviert. Allerdings wird eine HSC-Konvertierung primär durch die Interaktion mit KC induziert. Aktivierte KC sekretieren proinflammatorische Zytokine wie TNF $\alpha$  und Monozyten chemotaktisches Protein 1 (MCP1), die aktivierend auf HSC wirken, wodurch sie neben Fibrose-induzierenden Proteinen auch proinflammatorische Zytokine wie MCP1 und Interleukin (IL) 6 exprimieren. Somit besteht zwischen inflammatorischen und fibrotischen Zellen ein positiver *Feedback*-Kreislauf, bei dem sich die Zellen gegenseitig stimulieren und somit die Fibrose steigern (zusammengefasst in [56]).

### 1.3.6 Inflammation

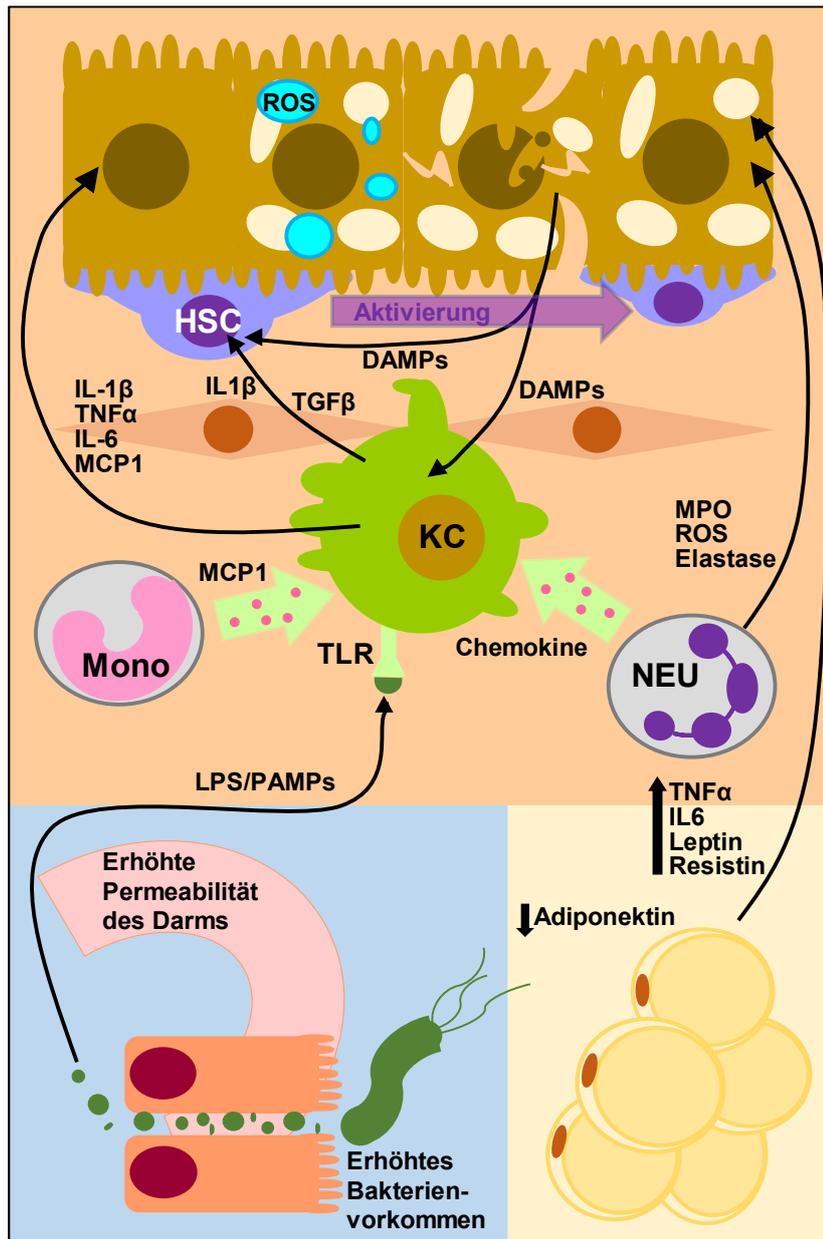
Zusätzlich zu der hepatozellulären Lipidakkumulation kann in der NAFLD Inflammation auftreten. Der Nachweis eines gemischzelligen Entzündungsinfiltrats in der Leberbiopsie ist

dabei ein definierendes Merkmal der NASH [57], wobei dieses Infiltrat aus Lymphozyten, Neutrophilen Granulozyten und aus Monozyten-abstammenden Makrophagen besteht [58]. Die Hauptpopulation an ansässigen Immunzellen in der Leber bilden KC. Bei der chronisch entzündeten Fettleber sind KC die Hauptquelle für proinflammatorische Zytokine und Chemokine wie TNF, IL-6 und IL-1 $\beta$ . Studien konnten die Bedeutung von KC bei der NASH durch die Depletion dieser Zellpopulation zeigen: Die Depletion verhinderte die Entstehung der Steatose und der hepatischen IR im Tiermodell. KC beinhalten zwei verschiedene Populationen: Neben sessilen KC, die durch die Differenzierung von intrahepatischen Vorläuferzellen entstehen, bilden KC differenziert aus *bone marrow-derived monocytes* (BMDM) die Gesamtheit dieser Immunzellpopulation. Bei der NASH scheinen hauptsächlich die rekrutierten Monozyten und Makrophagen für die Progression verantwortlich zu sein, wobei der Prozess der Differenzierung in der NASH-Leber noch nicht ausreichend beschrieben und charakterisiert ist. Neben der Wirkung der KC auf die NASH-Progression aufgrund der proinflammatorischen Eigenschaften, beeinflussen diese Zellen aufgrund ihrer (metabolischen) Wechselwirkungen mit Hepatozyten das Fortschreiten der Erkrankung. Die Expression von *TNF* und *IL1B* fördert die Lipidakkumulation in den Hepatozyten, da diese Zytokine die Fettsäureoxidation, die TG-Akkumulation und die Insulinsensitivität beeinflussen. So unterdrückt IL-1 $\beta$  die PPAR $\alpha$ -Genexpression und -Aktivität in den Hepatozyten, wodurch die für die Fettsäureoxidation relevanten Gene herunterreguliert werden (zusammengefasst in [59]). Zudem kann ein inflammatorischer Teufelskreis zwischen aktivierten KC und Hepatozyten entstehen.

Makrophagen treten in unterschiedlichen Polarisierungen auf, wobei sie in zwei Hauptphänotypen klassifiziert werden: Die M1-Makrophagen gelten dabei als die klassisch aktivierten proinflammatorischen Makrophagen während dem alternativen M2-Phänotyp immunregulatorische Eigenschaften zugeschrieben werden. Durch die Bindung von *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) wie LPS an die TLR der KC werden M1-KC aktiviert, sodass sie proinflammatorische Zytokine und Chemokine wie TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und MCP1 produzieren. Neben der dadurch entstehenden lokalen Inflammation kommt es zudem zu einer Schädigung der Hepatozyten, die aufgrund dessen *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) sekretieren. Durch die Bindung der DAMPs an TLR kommt es

zu einer erneuten und vermehrten Aktivierung der KC, sodass weiterhin proinflammatorische Zytokine und Chemokine freigesetzt werden (zusammengefasst in [60]). Bei NASH-Patienten kann es aufgrund einer nachgewiesenen erhöhten Permeabilität des Darms [61] zu einer verstärkten Exposition von bakteriellen Bestandteilen im Blut kommen (Endotoxämie). Über die Pfortader gelangen diese in die Leber, PAMPS wie LPS werden von TLR gebunden und setzen somit den beschriebenen Teufelskreis in Gang. Die Konzentration des LPS-Bindeproteins ist in NASH-Patienten im Vergleich zu Personen mit einer NAFL signifikant erhöht [62]. Neben dem Darm hat auch das Fettgewebe Einfluss auf die NASH-Progression. So beeinflussen die durch Lipolyse im Fettgewebe freigesetzten freien Fettsäuren nicht nur die Steatose und den oxidativen Stress in der Leber sondern auch die KC-Aktivität. Gesättigte Fettsäuren induzieren in BMDM den proinflammatorischen M1-Phänotyp und Palmitinsäure sorgt *in vitro* für eine Aktivierung des Inflammasoms in Makrophagen [63]. Bei einem Inflammasom handelt es sich um einen Multiproteinkomplex, der zur Aktivierung von proinflammatorischen Caspasen führt [64].

Außerdem beeinflussen Adipokine (Zytokine, die hauptsächlich im Fettgewebe gebildet werden) die Pathogenese der NASH. So ist die Adiponektin-Konzentration bei der NASH reduziert. Adiponektin wirkt antiinflammatorisch, indem es z.B. TNF $\alpha$  inhibiert oder die Funktion von Makrophagen unterdrückt. Außerdem mildert dieses Adipokin sowohl den oxidativen Stress als auch die Fibrogenese. Dagegen stimuliert Leptin, dessen Konzentration bei NASH-Patienten erhöht ist, verschiedene proinflammatorische Zellen, darunter auch Makrophagen. NASH-Patienten weisen zudem einen erhöhten Resistinspiegel auf. Dieses Adipokin ist durch die Einwirkungen auf HSC profibrotisch und hat zudem proinflammatorische Eigenschaften, da es z.B. die Sekretion von TNF $\alpha$  in Makrophagen stimuliert (zusammengefasst in [65]). In Abb. 1.5 werden die vielfältigen Vorgänge und die verschiedenen Bestandteile der Immun- und Inflammationsantwort bei NASH zusammengefasst.



**Abb. 1.5: Darstellung der Vorgänge bei der Inflammation im Zusammenhang der NASH; erstellt nach Vorlage [60]**

Die Hauptmediatoren der hepatischen Inflammation bei der NASH sind Bestandteile des angeborenen Immunsystems. Durch die Lipidakkumulation in Hepatozyten tritt vermehrt Lipotoxizität auf, wodurch es zu einer Schädigung der Hepatozyten kommt. Die anschließende DAMPs-Freisetzung aktiviert KC und HSC und fördert somit die Inflammation bzw. Fibrose. Aktivierte KC produzieren proinflammatorische Zytokine wie IL-1β, TNFα, IL-6 und MCP1, die den Zellschaden der Hepatozyten steigern und zur Inflammation-assoziierten Nekrose führen können. Unter anderem durch die Freisetzung von TGFβ werden HSC weiterhin aktiviert und zur Proliferation stimuliert, wodurch eine verstärkte Fibrogenese auftritt. MCP1 bewirkt eine Infiltration von BMDM und eine Rekrutierung von Makrophagen. Aufgrund der erhöhten Permeabilität des Darms kommt es zu einer vermehrten Exposition bakterieller Bestandteile wie LPS. PAMPs aktivieren durch die Bindung an verschiedene TLR KC. Durch die Infiltration von Neutrophilen (Abkürzung in der Abb.: NEU) kommt es zu einer Verstärkung des Entzündungsprozesses. Neutrophile sekretieren Chemokine, die zur Rekrutierung von Makrophagen führen, und setzen ROS sowie die Enzyme Elastase und Myeloperoxidase (MPO) frei, die den Grad der Zellschädigung steigern. Die verminderte Sekretion des Adipokins Adiponektin und die gleichzeitig auftretende Erhöhung des Leptin- und Resistinspiegels sorgen zusammen mit der Produktion von TNFα und IL-6 im Fettgewebe zu einer Stimulation der hepatischen Inflammation [60].

Die Genexpression der Zytokine TNF $\alpha$ , MCP1 und IL-6 korreliert mit dem NAFLD-Schweregrad. Im Gegensatz zur NAFL zeigen Patienten mit einer fortgeschrittenen NASH eine höhere hepatische Expression dieser Gene (*TNFA* [66] und *Il6* [67]) bzw. eine höhere Serumkonzentration (MCP1 und TNF $\alpha$  [68]). Auch eine erhöhte Genexpression des proinflammatorischen Zytokins IL-1 $\beta$  kann bei NASH-Patienten sowohl in Relation zu gesunden als auch zu NAFL-Probanden beobachtet werden [69]. IL-1 $\beta$  fördert dabei die NASH-Progression als Mediator für Lipidakkumulation und Zelltod sowie der Fibrogenese durch HSC-Aktivierung, sodass diese vermehrt TIMP1 produzieren [70]. Zur Aktivierung des Zytokins IL-1 $\beta$  ist das bereits erwähnte Inflammasom von Bedeutung. IL-1 $\beta$  wird als Pro-*IL1B* exprimiert und anschließend im Zytosol durch die Caspase 1 in seine aktive Form gespalten. Ihre enzymatische Aktivität erlangt die Caspase 1 durch die Bildung eines Komplexes mit den Proteinen *PYD and CARD domain containing protein* und *Nod-like receptor protein 3* (NLRP3). Dieser Komplex wird als NLRP3-Inflammasom bezeichnet. Dabei kann das zytosolische NLRP3 durch verschiedene PAMPs (wie LPS) und DAMPs (wie Nukleinsäuren) über TLR-Signalwege sowie durch ROS aktiviert werden (zusammengefasst in [71]). Bei NASH-Patienten wurde sowohl eine erhöhte hepatische Expression von *NLRP3* als auch von Pro-*IL1B* im Vergleich zu NAFL-Probanden gemessen [72]. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass Cholesterinkristalle als Aktivierungssignal für NLRP3 in myeloiden Zellen dienen kann. Eine pharmakologische Inhibierung von NLRP3 sorgte für eine schwächere NASH-Ausprägung in Bezug auf Inflammation und Fibrose [73].

#### **1.4 NAFLD-Therapie**

Kapitel 1.3 verdeutlicht die Komplexität der NASH. Zahlreiche Prozesse, die auf verschiedene Weisen zusammenhängen und sich gegenseitig begünstigen, sind in an der Entstehung und Progression beteiligt. So führt eine vermehrte Leberzellschädigung zu einer verstärkten Inflammation und somit zur Induktion bzw. zum Voranschreiten der Fibrogenese. Warum nur in einigen Patienten mit einer Steatose die Lipidakkumulation zur Schädigung der Hepatozyten bzw. der Aktivierung der anderen Vorgänge führt, ist trotz der Kenntnisse über die Zusammenhänge der einzelnen Vorgänge weiterhin unklar. Die Komplexität der NASH und weiterhin unbekannte Mechanismen könnten ein Grund dafür

sein, dass es bis zum jetzigen Zeitpunkt keine zugelassene medikamentöse NASH-Therapie gibt. Validiert ist bislang einzig die Veränderung der Lebensgewohnheiten der Patienten. Eine Gewichtsabnahme von 3-5% führt dabei in der Regel nur zur Verringerung der Steatose. Zur Verminderung der Inflammation und des NAS ist dagegen eine Reduktion von mindestens 7% nötig [74]. Für eine Verbesserung bezüglich der Fibrose scheint einer Studie zur Folge eine Gewichtsabnahme von mindestens 10% erforderlich zu sein. Bei 45% der NASH-Patienten, die diesen Wert erreicht hatten, konnte eine Regression der Fibrose festgestellt werden [75]. Allerdings erreichen nur wenige Patienten eine solche Gewichtsreduktion dauerhaft. Aus diesem Grund ist die Entwicklung eines Ansatzes für eine medikamentöse Therapie von entscheidender Bedeutung. Dazu kommt, dass die NAFLD mittlerweile als globales Gesundheitsproblem eingeschätzt wird, da die Anzahl der NAFLD-Patienten weltweit immer weiter zunimmt und der Anteil der Lebererkrankungen, die mit der NAFLD assoziiert sind, steigt (s. 1.2.3).

Klinische Studien zur Evaluierung von Medikamenten und Substanzen zur Anwendung bei der NASH sind momentan noch in verschiedenen Testphasen. Allerdings wird die Verwendung keines dieser Medikamente bislang zur NASH-Therapie empfohlen, da die bisherigen Ergebnisse nicht eindeutig waren. Als mögliche Therapie gilt die Verabreichung von Antioxidantien wie Vitamin E. Vitamin E verhindert eine Schädigung der Leber durch das Blockieren intrinsischer Apoptosewege und dem Schutz vor einer mitochondrialen Toxizität. Dadurch konnte histologisch eine Verbesserung der Steatose, der Inflammation, des Hepatozytenuntergangs und des NAS erreicht werden. Allerdings konnte keine Reduktion der Fibrose dokumentiert werden. Außerdem gibt es Zweifel bezüglich einer langanhaltenden Verabreichung von Vitamin E, da dies mit einer gesteigerten Mortalität sowie einem erhöhten Schlaganfall- und Krebsrisiko assoziiert ist. Ebenfalls negative Nebeneffekte könnte die Medikation mit Obeticholsäure, die alle histologischen Charakteristika der NASH inkl. Fibrose verbessert, verursachen, da durch diese Substanz die LDL-Cholesterinwerte steigen, was das Risiko für Herz-Kreislauf-Erkrankungen erhöhen könnte. Eine Langzeitstudie hinsichtlich einer möglichen Korrelation steht allerdings noch aus. Zu weiteren Medikamenten in der Testphase wie Cenicriviroc, dem antiinflammatorische und antifibrotische Effekte zugeschrieben werden, gehören Glitazone.

Diese Medikamente erhöhen die Synthese und Aufnahme von Fettsäuren in Adipozyten, sodass Fetteinlagerungen in anderen Organen wie auch der Leber gemindert werden. Außerdem steigern sie die Adiponektinkonzentration und Insulinsensitivität. Die Gabe von Pioglitazon führte in einer Studie zu einer histologisch erkennbaren Verbesserung der Steatose, der Inflammation, des Hepatozytenuntergangs sowie des NAS und somit zum Verschwinden der NASH. Allerdings trat in einer anderen Studie drei Monate nach Beendigung der Pioglitazongabe eine histologisch erkennbare NASH wieder auf. Eine Langzeitgabe von Pioglitazon ist umstritten, da z.B. kardiovaskuläre und metabolische Nebenwirkungen wie eine Gewichtszunahme auftreten (zusammengefasst in [76]).

Zusammenfassend konnte bislang kein Medikament identifiziert werden, das ohne schwerwiegende Nebenwirkungen und dauerhaft alle Merkmale der NASH verbessert. Aufgrund dessen ist die Erforschung von neuen möglichen Zielmolekülen, die an der Entstehung und Progression der NASH beteiligt sind, von großer Bedeutung. In den folgenden Kapiteln wird auf zwei Enzyme eingegangen, die als Bestandteil von Entzündungsreaktionen bzw. des Lipidstoffwechsels an zwei unterschiedlichen Vorgängen bei der NASH beteiligt sind und somit neue Zielmoleküle für die NASH-Therapie darstellen könnten.

## **1.5 Die Myeloperoxidase**

### **1.5.1 Allgemeines**

Im Übersichtsartikel von van der Veen *et al.* werden einige allgemeine Informationen zum Enzym Myeloperoxidase (MPO) erwähnt: MPO wurde vor fast 80 Jahren entdeckt, als es aus dem Auswurf von Tuberkulose-Patienten von Agner isoliert wurde. In den darauffolgenden Jahren konnte gezeigt werden, dass nur myeloide Zellen dieses Enzym exprimieren, wodurch der Name Myeloperoxidase entstand, doch die funktionelle Rolle wurde erst beinahe 30 Jahre später durch Klebanoff festgestellt: Zusammen mit Wasserstoffperoxid und einem Halogenid bildet MPO einen wirksamen Mechanismus zur Abwehr von Mikroben. Somit stellt MPO die Schlüsselkomponente der Sauerstoff-abhängigen antimikrobiellen Aktivität der Phagozyten und vor allen Dingen der Neutrophilen dar. Dabei gehört MPO zur Superfamilie der Hämperoxidasen, die auch die

Eosinophile Peroxidase und die Laktoperoxidase umfasst. Da MPO stark kationisch ist, ist ihre Bindungsaffinität zu negativ geladenen Molekülen, zu denen bakterielle Oberflächen, Bestandteile der EZM und Zellmembranen gehören, sehr hoch (zusammengefasst in [77]).

Die MPO-Synthese ist auf die nicht ausdifferenzierten Vorläuferzellen der myeloiden Zellen limitiert. Während der Differenzierung der Myeloblasten zu Neutrophilen oder Monozyten nimmt die *Mpo*-Expression stetig ab, sodass sie in den ausdifferenzierten Zellen nicht mehr nachweisbar ist. Allerdings speichern die Zellen das synthetisierte Protein (zusammengefasst in [77]). Dabei weisen Neutrophile deutlich höhere MPO-Konzentrationen im Vergleich zu Monozyten auf, da sie dreimal so viel MPO wie Monozyten enthalten [78]. Das Vorkommen von MPO in Makrophagen ist nicht einheitlich und teilweise nicht zweifelsfrei geklärt. Während Studien mit humanen Proben MPO auf Proteinebene auch in Lebermakrophagen detektierten [79, 80], konnte eine andere Studie sowohl in humanen als auch in murinen Leberproben MPO nur in Neutrophilen nachweisen [81]. In Mikroglia dagegen kann die *MPO*-Expression induziert und MPO auf Proteinebene gemessen werden [82] und auch in atherosklerotischen Plaques wurden MPO-positive Zellen gefunden [83]. Dies deutet darauf hin, dass die Expression von *MPO* abhängig von Gewebe und Kondition in Makrophagen reinitiiert werden kann.

### 1.5.2 Funktion

Neutrophile machen ca. 40-60% der Population an zirkulierenden weißen Blutkörperchen aus. Sie sind bei der Abwehr von eindringenden Pathogenen wie Bakterien die erste Reaktion des Immunsystems. Im Normalzustand zirkulieren die Neutrophilen Granulozyten in einem Ruhezustand im Blut. Dies bedeutet, dass toxische Moleküle wie auch MPO in den für die Neutrophilen charakteristischen Granula in der Zelle vorliegen und nicht freigesetzt werden. Durch Bindung von PAMPs, DAMPs, Chemokinen oder Zytokinen wie  $\text{TNF}\alpha$  werden Neutrophile voraktiviert, sodass sie zum Inflammations- bzw. Infektionsherd wandern und dort nach Bindung weiterer Aktivierungssignale Prozesse induzieren, die zur Abtötung der Pathogene führen (zusammengefasst in [84]). Dabei können Neutrophile durch Ausbildung extrazellulärer Strukturen, so genannter *neutrophil extracellular traps*, oder durch Phagozytose Bakterien abtöten [85]. Bei der Phagozytose fusionieren die Granula mit dem prozessierenden Phagosom. Dieser Vorgang wird auch als Degranulierung der Neutrophilen

bezeichnet. Die Granula enthalten dabei verschiedene Peroxidasen, Hydrolasen und antimikrobielle Proteine zum Abtöten und Abbau der Erreger. Ein Bestandteil der Granula ist MPO, die zudem beim Vorgang der Membranfusion oder als Reaktion auf das Vorkommen von Erregern, die zu groß zur Phagozytose sind, auch in den extrazellulären Bereich freigesetzt werden kann. Dort kann MPO entweder inaktiviert oder durch die Aufnahme durch Makrophagen beseitigt werden (zusammengefasst in [86]).

Charakteristisch für die Phagozytose bei Neutrophilen ist der respiratorische *Burst*, der durch einen vielfach erhöhten Sauerstoffverbrauch der Immunzellen gekennzeichnet ist. Die Neutrophilen benötigen den Sauerstoff zur Bildung von Sauerstoffradikalen durch den Nicotinamidadenindinukleotidphosphat-Oxidase-Komplex. Die Disproportionierung des Hyperoxids führt zur Generierung von Wasserstoffperoxid in den Phagosomen. Diese Reaktion kann sowohl durch Dismutasen als auch durch MPO katalysiert werden. MPO nutzt das Wasserstoffperoxid zur Oxidierung von Halogenen, sodass hypohalogenige Säuren entstehen. Dabei wird bevorzugt Chlorid durch MPO bei Vorhandensein von Wasserstoffperoxid in hypochlorige Säure oxidiert. Dies ist nötig, da Wasserstoffperoxid nur eine schwache mikrobizide Wirkung besitzt, während hypochlorige Säure sehr effektiv zur Tötung der Mikroorganismen beitragen kann. Somit wird durch MPO die Mikrobizidität der Phagosomen in den Neutrophilen potenziert (zusammengefasst in [87]).

### **1.5.3 MPO-vermittelte Schädigung und assoziierte Erkrankungen**

Die durch MPO katalysierten Reaktionen dienen der Abtötung von Pathogenen. Allerdings können die zytotoxischen Wirkungen auch eigene Zellen und Gewebe betreffen. Während der Pathogenabwehr gelangen rund 8% der MPO in den extrazellulären Raum [88]. Freigesetzte MPO kann im Blut zur Hämolyse von Erythrozyten führen [89]. Auf die Auswirkungen von ROS, wozu Wasserstoffperoxid und hypochlorige Säure gehören, auf intrazelluläre Moleküle und Prozesse wurde bereits in den Kapiteln 1.3.3 und 1.3.4 eingegangen. Allerdings stellt die MPO-Aktivität nicht nur eine ROS-Quelle dar. MPO interagiert auch mit anderen Zellpopulationen. So erhöht MPO die Produktion von Zytokinen wie  $\text{TNF}\alpha$  und IL-1 in Makrophagen. Außerdem verstärkt MPO die Zytotoxizität von Makrophagen und erhöht die ROS-Produktion in diesen Zellen. Dies geschieht z.B. durch die Aufnahme von MPO in Makrophagen durch die Phagozytose von

aktivierten Neutrophilen. Die Interaktion von MPO mit Lymphozyten führt zu einer Suppression der Aktivität von Natürliche Killer-Lymphozyten und einer Veränderung der Proliferation, Antikörperproduktion und Zytolyse von B-, T- und Natürliche Killer-Zellen (zusammengefasst in [90]).

Die Rolle von MPO wurde in verschiedenen Erkrankungen untersucht. Zu den Erkrankungen, bei denen MPO (vermutlich) eine Rolle spielt, gehören neurodegenerative Erkrankungen wie Parkinson und Alzheimer, Autoimmunkrankheiten wie Multiple Sklerose und rheumatoide Arthritis, Krebs und Atherosklerose. Eine MPO-Aktivität kann durch Schädigung der DNA zu einer vermehrten Mutagenese und somit Kanzerogenese führen. Aufgrund dessen wird eine erhöhte MPO-Konzentration mittlerweile als Marker für Entzündung und oxidativen Stress bei unterschiedlichen Krankheiten angesehen. Bei der akuten myeloiden Leukämie gilt ein erhöhter MPO-Plasmaspiegel als Kennzeichen der Erkrankung (zusammengefasst in [91]). Im Zusammenhang mit der NAFLD konnten Rensen *et al.* zeigen, dass morbide adipöse NASH-Patienten im Vergleich zu NAFL-Patienten erhöhte MPO-Plasmaspiegel und mehr MPO-positive Zellen in der Leber aufweisen. Dabei korrelierte die Anzahl sowohl mit dem Schweregrad der Steatose als auch der portalen Inflammation [80]. Bei Hepatitis C Virus-Patienten weisen Infizierte mit einem HCC höhere MPO-Plasmakonzentrationen als Infizierte mit einer chronischen Hepatitis oder mit schwerer Fibrose auf [92]. Ein Polymorphismus in der Promotorregion von *MPO*, der zu einer höheren *MPO*-Expression führt, korreliert sowohl in Hämatochromatose-Patienten mit dem Auftreten einer Zirrhose als auch in Alkoholzirrhose-Patienten mit der HCC- und Mortalitätsrate [93, 94].

Die Hauptursache für kardiovaskuläre Erkrankungen ist die Atherosklerose. Diese entsteht unter anderem durch die Oxidierung von Lipoproteinen und die Formation von so genannten Schaumzellen. Aktive MPO konnte in den Extrakten von humanen atherosklerotischen Arterien nachgewiesen werden und aus den Läsionen isoliertes LDL wies mehr 3-Chlorotyrosin, eine MPO-spezifische Aminosäuremodifikation, als zirkulierendes LDL auf. Die LDL-Modifikationen durch MPO führen zu einer vermehrten Aufnahme der Partikel und fördern somit die Entstehung von Schaumzellen. MPO wirkt allerdings nicht nur durch die Oxidation von LDL proatherosklerotisch sondern auch durch die

Modifikation des HDL-Bestandteils Apolipoprotein (Apo) AI, wodurch die HDL-Funktionalität und somit der Rücktransport des Cholesterols zur Leber inhibiert wird (zusammengefasst in [77]).

## **1.6 Die Lipoproteinlipase**

### **1.6.1 Allgemeines**

LPL hydrolysiert TG-reiche Lipoproteine, sodass die entstandenen Fettsäuren und Glycerol vom peripheren Gewebe aufgenommen werden können. Die Existenz eines lipolytischen Enzyms wurde erstmals 1943 beobachtet [95]. 1966 wurde entdeckt, dass das Enzym Apolipoproteine als essenzielle Kofaktoren und Aktivatoren der Enzymaktivität benötigen [96]. Aus diesem Grund erfolgte die Benennung des Enzyms in Lipoproteinlipase.

*LPL* wird primär im Fettgewebe sowie in der Herz- und Skelettmuskulatur exprimiert. Es konnte gezeigt werden, dass die nachgewiesene Aktivität und Existenz von LPL im Endothel nicht auf eine *LPL*-Expression der Endothelzellen sondern der parenchymalen Zellen wie Adipozyten zurückzuführen ist [97]. Ein Transport der synthetisierten LPL zum Endothel ist notwendig, damit das Enzym in Kontakt mit seinem Substrat kommt. Durch einen bis heute unbekanntem Mechanismus findet die Translokation des synthetisierten Enzyms von der Plasmamembran der Parenchymzellen zu funktionellen Heparansulfatproteoglykane-Bindungsdomänen, die sich auf der luminalen Oberfläche des Kapillaren-Endothels befinden, statt [98]. Damit LPL dort ihre vollständige katalytische Aktivität zur Hydrolyse der Chylomikronen und VLDL erreichen kann, benötigt das Enzym ApoCII als spezifischen Kofaktor. Bei ApoCII handelt es sich um einen Bestandteil von Chylomikronen, VLDL und HDL [99].

### **1.6.2 Regulation**

LPL kann auf verschiedenen Ebenen reguliert werden. Ein Beispiel für die transkriptionale Regulation stellen PPAR dar. Eine PPAR-Aktivierung führt zur Induktion der *LPL*-Expression, wobei PPAR $\alpha$  primär mit einer Expression in der Leber und PPAR $\gamma$  mit einer Expression im Fettgewebe assoziiert ist [100]. Posttranslational kann LPL z.B. durch eine Degradierung in Lysosomen reguliert werden. Auch eine Interaktion mit mikro *ribonucleic acids* (RNA) kann LPL inhibieren. So ist die Expression von mikro RNA-467b in der Leber

mit einer niedrigen LPL *messenger* RNA Konzentration in diesem Organ assoziiert [101]. Gegenstand zahlreicher Forschungen war die Regulation von LPL durch die Interaktion mit anderen Proteinen. Ein Beispiel dafür ist das Angiopoietin-ähnliche Protein 4, das LPL in inaktive Monomere konvertiert und somit die katalytische Fähigkeit des Enzyms unterbindet [102]. Eine Regulation der LPL über einen der beschriebenen Wege oder andere Mechanismen kann als Reaktion auf Hormone und den metabolischen Zustand erfolgen. So bewirkt chronischer Stress eine Erhöhung der LPL-Aktivität im muskulären Gewebe und eine Verringerung der LPL-Aktivität im Fettgewebe [103]. Ein vergleichbarer Effekt kann im präprandialen Zustand beobachtet werden. Im Vergleich zum postprandialen Zustand ist die LPL-Aktivität durch ein Fasten im Fettgewebe deutlich verringert und im Herzen gesteigert [104]. Eine erhöhte LPL-Aktivität im Fettgewebe nach der Nahrungsaufnahme kann auf die Wirkung von Insulin und Glukose zurückzuführen sein. Sowohl Insulin als auch Glukose erhöhen die LPL-Aktivität im Fettgewebe, wobei Glukose vermutlich als Quelle für die nötigen Glykolisierungen des katalytisch aktiven Enzyms von Bedeutung ist [105, 106].

### 1.6.3 Bedeutung

LPL spielt nicht nur für den Metabolismus der zirkulierenden TG-reichen Lipoproteine eine entscheidende Rolle. Das Glykoprotein übernimmt durch unterschiedliche Interaktionen mit Lipoproteinen weitere Funktionen. Ein Beispiel ist die Regulation von ApoB-enthaltenden Lipoproteinen, da LPL gerade gebildete ApoB-enthaltende Lipoproteine modifiziert, sodass sie leichter und schneller wieder aufgenommen werden. Dies führt zu einer Verminderung der Sekretion der Partikel. Außerdem kann LPL auch an der Oberfläche von Lipoproteinen gebunden sein und als Ligand für die Rezeptoren dienen, die für die Aufnahme z.B. der Chylomikron-*Remnant*-Partikel in die Leber verantwortlich sind. LPL kann zudem die Aufnahme von modifizierten Lipoproteinen in atherosklerotische Plaques erhöhen, da das Enzym durch die Bindung von VLDL und LDL die Partikel an den Gefäßwänden festhält und sie so für Konvertierungen wie Oxidation anfälliger macht (zusammengefasst in [107]).

Aufgrund der wichtigen Funktion von LPL für den Metabolismus von Lipoproteinen und somit den Fettstoffwechsel, können Polymorphismen des Gens große Auswirkungen haben.

Im humanen *LPL*-Gen konnten verschiedene Mutationen nachgewiesen werden, die unterschiedlich häufig in den verschiedenen Bevölkerungsgruppen auftreten und überwiegend zu einer verminderten LPL-Aktivität führen. Nur durch eine bekannte Mutation wird LPL vermehrt synthetisiert, sodass diese Genträger reduzierte TG- und erhöhte HDL-Konzentrationen aufweisen und ein etwas geringeres Risiko für koronare Herzerkrankungen haben (zusammengefasst in [108]). Eine eingeschränkte LPL-Funktion hat dagegen negative Konsequenzen. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass in Alzheimer-Patienten häufiger eine Genmutation auftrat, die mit einer reduzierten LPL-Aktivität assoziiert ist, während in der gesunden Kontrollgruppe der Polymorphismus häufiger vertreten war, der zu einer gesteigerten LPL-Synthese führt [109]. Bei der autosomal rezessiven Erkrankung Hyperlipoproteinämie Typ I, die eine Prävalenz von 1/1.000.000 aufweist, treten Mutationen des *LPL*-Gens homozygot auf, die zu einer verringerten Expression oder Aktivität des Enzyms führen. Patienten leiden an einer schweren Hypertriglyzeridämie, Lipidablagerungen unter der Haut und in einigen Fällen an einer Pankreatitis [110]. Bei Mäusen führt eine komplette LPL-Defizienz wenige Stunden nach der Geburt sogar zum Tod [111]. Die meisten Patienten mit einer LPL-Defizienz tragen die Mutation nur auf einem Allel. Die Ausprägung einer Hypertriglyzeridämie und die Minderung der LPL-Aktivität unterscheiden sich bei dieser heterozygoten Variante stark von Patient zu Patient [112].

#### **1.6.4 Vorkommen in der Leber**

Bei LPL handelt es sich eigentlich um ein extrahepatisches Protein. In Ratten konnte gezeigt werden, dass *Lpl* nur in der neonatalen Entwicklung und in den ersten Wochen nach der Geburt in hohem Maße in der Leber exprimiert wird [113]. Dafür wird in der Leber ein anderes Mitglied der Lipasen-Superfamilie produziert: die hepatische TG-Lipase (HTGL). Diese Lipase hydrolisiert neben TG auch Phospholipide. Es wird vermutet, dass HTGL eine Rolle in der Aufnahme von Phospholipiden aus Chylomikronen und HDL in der Leber spielt. Zudem ist HTGL für die finalen Prozesse bei der lipolytischen Konversion von VLDL zu LDL von Bedeutung [114]. Neben der Aktivität der HTGL kann auch eine sehr geringe LPL-Aktivität in der Leber gemessen werden. Diese lässt sich auf zwei Ursachen

zurückführen. Zum einen kann die im Blut zirkulierende LPL an das Endothel in den Lebersinusoiden binden und zum anderen exprimieren KC LPL [115, 116].

Eine hepatische *LPL*-Expression kann durch eine Induktion von PPAR hervorgerufen werden. Wenn *Lpl* durch genetische Modifikationen in der Leber in einem Mausmodell überexprimiert wird, führt dies zu einem erhöhten TG-Gehalt in der Leber und zu einer verstärkten IR [117]. Neben einer Induktion von PPAR und genetischen Modifikationen führt ein gestörter Stoffwechsel ebenfalls zu einer hepatischen *LPL*-Expression.

Eine Studie konnte zeigen, dass in fettleibigen Patienten sowohl die hepatische *LPL*-Expression als auch die hepatische LPL-Aktivität im Vergleich zu gesunden Probanden signifikant erhöht ist [118]. Auch in einem MtS-Tiermodell konnte in den erkrankten Mäusen eine gesteigerte *Lpl*-Expression in der Leber nachgewiesen werden [119]. Eine weitere Studie befasste sich mit der hepatischen *LPL*-Expression in NAFLD-Patienten. Teratani *et al.* zeigten eine signifikant erhöhte *LPL*-Expression in NASH-Patienten verglichen mit der Kontrollgruppe sowie der NAFL-Kohorte. Außerdem wurde bereits in den NAFL-Patienten eine Induktion der hepatischen *LPL*-Expression gegenüber den Kontrollprobanden nachgewiesen [120]. Aufgrund dieser Erkenntnisse ist anzunehmen, dass die induzierte hepatische *LPL*-Expression einen Einfluss auf die NASH-Progression hat. Dabei ist allerdings unklar, welche Zellpopulation für den Anstieg der Expression verantwortlich ist und ob es sich bei der hepatischen *LPL*-Expression um einen protektiven oder progressiven Mechanismus handelt. Teratani *et al.* untersuchten bereits die Auswirkungen eines LPL *knockout* (KO) in HSC auf die NASH-Progression und wiesen eine verminderte Fibrose bei den Mäusen mit LPL-defizienten HSC nach [120]. Ob andere hepatische Zellpopulationen wie KC und Hepatozyten ebenfalls an der gesteigerten hepatischen *LPL*-Expression beteiligt sind und somit die NASH-Progression beeinflussen, ist allerdings weiterhin nicht bekannt.

## 1.7 Zielsetzung

Für die NASH gibt es trotz der weltweit zunehmenden Prävalenz keine validierte pharmakologische Therapie. Viele Vorgänge der komplexen NAFLD-Pathogenese sind noch nicht eindeutig erforscht und verstanden. Die vorliegende Arbeit untersucht die funktionelle Bedeutung der Enzyme MPO und LPL für die Entstehung und Entwicklung der NASH. In der Fachliteratur wird für beide Proteine eine Assoziation mit der NASH beschrieben, wobei die funktionelle Relevanz weiterhin unklar ist.

Im Einzelnen überprüft die vorliegende Arbeit die folgenden Hypothesen:

1. MPO ist funktionell relevant für die Progression der NASH, indem sie Inflammation, Zellschaden und in der Folge auch die Leberfibrogenese fördert.

Dies soll anhand verschiedener Analysen untersucht werden:

- Quantifizierung systemischer MPO-Spiegel bei NAFL-, NASH- und gesunden Probanden
- Auswirkungen einer MPO-Defizienz im Mausmodell der NASH hinsichtlich Steatose, Inflammation, Zellschaden und Fibrose

2. LPL wird auch in Mausmodellen der NASH hochreguliert und beeinflusst funktionell den Verlauf der Erkrankung. Dabei sind Hepatozyten oder Makrophagen für die Induktion der NASH-abhängigen hepatischen *Lpl*-Expression verantwortlich.

Zur Beantwortung dieser Hypothese erfolgen mehrere Analysen:

- Bestätigung der Hochregulierung der *LPL*-Expression in der humanen NASH-Leber im Vergleich zu Lebern ohne NASH in einer 2. Kohorte
- Auswirkungen einer Hepatozyten-spezifischen LPL-Defizienz im Mausmodell der NASH hinsichtlich metabolischer Parameter, Inflammation, Zellschaden und Fibrose
- Auswirkungen einer LPL-Defizienz in myeloiden Zellen im Mausmodell der NASH hinsichtlich metabolischer Parameter, Inflammation, Zellschaden und Fibrose

Es lässt sich zusammenfassen, dass mithilfe der Ergebnisse dieser Arbeit die Vorgänge bei der NASH-Progression besser verstanden werden sollen. Basierend auf diesen Erkenntnissen kann anschließend eine Aussage über die Bedeutung der Enzyme MPO und LPL für eine mögliche zukünftige NASH-Therapie getroffen werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Geräte und Instrumente

Tab. 2.1: Liste der verwendeten Geräte und Instrumente

Funktionaler Name	Herstellername	Hersteller
Extinktionsmessgerät	Infinite F50	TECAN (Männedorf, Schweiz)
Extinktionsmessgerät (fluorimetrisch)	Ultra Evolution	TECAN (Männedorf, Schweiz)
Glukosemessgerät	Accu-Check Aviva	Roche (Basel, Schweiz)
Glukosemesssticks	Teststreifen Accu-Check Aviva	Roche (Basel, Schweiz)
Kryotom	Microm HM550 Cryostat	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Kryotomklingen	Microtome Blades C53	Feather (Osaka, Japan)
Kühlplatte	Tissue Cool Plate COP 20	MEDITE (Burgdorf, Deutschland)
Magnet	MACS Multi Stand	Miltenyi (Bergisch Gladbach, Deutschland)
Mikroskop	BZ-9000 (Biorevo)	Keyence (Osaka, Japan)
Mikrotom	CUT 5062	SLEE medical (Mainz, Deutschland))
Mikrotomklingen	Microtome Blades S35	Feather (Osaka, Japan)
Multistep Pipette	Multipette Xstream	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Nanodrop	NanoDrop 2000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Objektträger	Superfrost Plus	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Paraffin-Streckbad	Paraffinstreckbad 1052	GFL (Burgwedel, Deutschland)
Perfusionspumpe	ISM596D	Ismatec (Wertheim, Deutschland)
pH-Meter	ProfiLab pH/mV-Meter pH 597	WTW (Weilheim, Deutschland)
Plattenzentrifuge	PlateFuge MicroCentrifuge	Benchmark Scientific (Edison, NJ, USA)
qPCR Instrument	ViiA7 Real-Time PCR System	Applied Biosystems (Waltham, MA, USA)
Thermocycler	T3 Thermocycler	Biometra (Göttingen, Deutschland)
Thermomixer	ThermoMixer Comfort	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
<i>Tissue Lyser</i>	Qiagen Retsch Tissue Lyser	Qiagen (Germantown, MD, USA)
Transaminasenmessgerät	Cobas INTEGRA 400 Plus	Roche (Basel, Schweiz)
Wärmeplatte	Präzitherm	Harry Gestigkeit (Düsseldorf)
Wärmeschrank	Techne Hybridiser HB-1D	Cole-Parmer (Staffordshire, UK)
Zentrifuge	Centrifuge 5427 R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Zentrifuge	Centrifuge 5810 R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

### 2.1.2 Material und Chemikalien

Alle gängigen Chemikalien wurden von den folgenden Firmen bezogen: Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland), J. T. Baker (München, Deutschland), Merck AG (Darmstadt, Deutschland), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) und Chemsolute/Th. Geyer (Renningen, Deutschland).

Zudem wurden Einwegplastikartikel von Eppendorf (Hamburg, Deutschland) und Sarstedt (Nürnbrecht, Deutschland) verwendet. Eine Ausnahme bilden die Spritzen (Omnifix) und Kanülen (Sterican, Gr. 18) von Braun (Melsungen, Deutschland).

### 2.1.3 Allgemeine Lösungen und Puffer

Untenstehend ist die Zusammensetzung der phosphatgepufferten Salzlösung *phosphate buffered saline* (PBS) aufgeführt. Alle anderen Lösungen und Puffer werden in den dazugehörigen Methodenkapiteln beschrieben. Falls es nicht anders spezifiziert wird, wurden die Lösungen mit vollentmineralisiertem Wasser (VE-H<sub>2</sub>O) angesetzt.

PBS

137 mM NaCl  
2,7 mM KCl  
99 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
14,7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
ad VE-H<sub>2</sub>O, pH 7,4

### 2.1.4 Materialien für Tierexperimente

Die Narkose wurde mit Rompun Vet. 20 mg/ml von Bayer (Leverkusen, Deutschland), Ketamin 10% von WDT (Garbsen, Deutschland) und der isotonen Natriumchloridlösung 0,9% Braun von Braun (Melsungen, Deutschland) angesetzt. In Tabelle (Tab.) 2.2 sind die für die verschiedenen tierexperimentellen Versuche verwendeten Tierfutter aufgelistet.

**Tab. 2.2: Auflistung der verwendeten Tierfutter**

Funktionaler Name	Offizieller Name	Zusammensetzung/Funktion	Hersteller
Standardfutter	1320 P	Standardhaltungsfutter; Kontrollfutter	Altromin Spezialfutter (Lage, Deutschland)
NASH-Diät	D09100301	Hoher Anteil an Fruktose, (Trans-) Fetten und Cholesterin; NASH- induzierend	Research Diets, Inc (New Brunswick, NJ, USA)

In dieser Arbeit wird für das Kontrollfutter die Abkürzung CD für *control diet* und für die NASH-induzierende Diät der Begriff NASH-Diät verwendet.

### 2.1.5 Versuchstiere

Die Tiere wurden in den Anlagen der Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE) gezüchtet und gehalten, wobei sie *ad libitum* Zugang zu Wasser und Futter hatten und ein Tag-Nacht-Zyklus von 12 Stunden eingehalten wurde. Sobald die Tiere mit dem Beginn der Fütterung des Sonderfutters in einem Alter von 8 bis 12 Wochen in den Versuch eintraten, wurde das Gewicht der Mäuse wöchentlich für die gesamte Fütterungsdauer kontrolliert. Alle hier beschriebenen Tierversuche wurden in den Tierversuchsvorhaben ORG 759, G50/15 und G50/16 durch die Hamburger Behörde „Amt für Verbraucherschutz, Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen“ genehmigt.

**Tab. 2.3: Auflistung aller verwendeten Mauslinien**

Name	Offizieller Name	Eigenschaft
C57BL/6J	C57BL/6J	Wildtyp (WT), nur für Zellisolationen verwendet
MPO WT	-	Stammen aus der gleichen Linie wie MPO KO, WT-Kontrolle für die Mäuse MPO KO
MPO KO	B6.129X1-Mpo <sup>tm1Lus</sup> /J	Keine Expression von MPO
LPL <sup>fl/fl</sup>	B6.129S4-Lpl <sup>tm1ljg</sup> /J	Promotor und Exon 1 des <i>Lpl</i> -Gens ist LoxP-flankiert; dient als WT-Kontrolle für die Mäuse LPL <sup>ΔLysM</sup> und LPL <sup>ΔHep</sup>
LPL <sup>ΔLysM</sup>	B6.129S4-Lpl <sup>tm1ljg</sup> /J x B6.129P2-Lyz2 <sup>tm1(cre)lfo</sup> /J	<i>Lpl</i> -Gen ist LoxP-flankiert, Expression der Cre-Rekombinase ist Lysozym 2-Promotor-abhängig = Spezifische Deletion des <i>Lpl</i> -Gens in myeloiden Zellen
LPL <sup>ΔHep</sup>	B6.129S4-Lpl <sup>tm1ljg</sup> /J x B6.Cg-Tg(Alb-Cre)21Mgn/J	<i>Lpl</i> -Gen ist LoxP-flankiert, Expression der Cre-Rekombinase ist Albumin-Promotor-abhängig = Spezifische Deletion des <i>Lpl</i> -Gens in Hepatozyten

Alle verwendeten Mauslinien hatten einen C57BL/6J Hintergrund. Zur Generierung der MPO WT- bzw. MPO KO-Mäuse [121] wurden heterozygote Tiere verpaart, sodass Wurfgeschwister für den Versuch verwendet werden konnten. Diese stammen somit aus der gleichen Inzuchtlinie und weisen abgesehen von dem KO die höchstmögliche Analogie auf. Zur Hepatozyten-spezifischen Deletion von LPL wurde die Linie B6.129S4-Lpl<sup>tm1ljg</sup>/J [122] mit der Linie B6.Cg-Tg(Alb-Cre)21Mgn/J [123] gekreuzt. Anschließend wurden Cre-positive mit Cre-negativen Tieren verpaart, sodass alle Nachkommen homozygot für das gefloxtete *Lpl*-Gen und ca. 50% heterozygot Cre-positiv (LPL<sup>ΔHep</sup>) und ca. 50% Cre-negativ (LPL<sup>fl/fl</sup>) waren. Diese Art der Verpaarung ermöglichte die Verwendung von Wurfgeschwistern in dem

Versuch. Für die LPL-Deletion in myeloiden Zellen, die durch einen aktiven Lysozym 2 Gen-Promotor (in dieser Arbeit als LysM bezeichnet) charakterisiert werden, wurde die Linie B6.129S4-Lpl<sup>tm1l1g</sup>/J mit der Linie B6.129P2-Lyz2<sup>tm1(cre)lfo</sup>/J [124] gekreuzt. Die weitere Verpaarungsstrategie war identisch zur Generierung der LPL<sup>ΔHep</sup>-Mäuse. Daraus ergibt sich, dass es sich bei den LPL<sup>fl/fl</sup>-Tieren trotz der identischen Bezeichnung um Mäuse handelte, die aus zwei unterschiedlichen Inzuchtlinien stammen. Somit konnte gewährleistet werden, dass für die Versuche mit den Tieren LPL<sup>ΔHep</sup> bzw. LPL<sup>ΔLysM</sup> jeweils Wurfgeschwister verwendet wurden.

### **2.1.6 Lösungen, Enzyme und Kits für die Genexpressionsanalyse**

Für die RNA-Extraktion wurde das NucleoSpin RNA Kit von Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) verwendet. Das beiliegende Wasser wurde als Nuklease-freies Wasser verwendet.

Die *complementary* DNA (cDNA)-Synthese wurde mit dem „High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits for 200 and 1000 Reactions“-Kit von Applied Biosystems (Carlsbad, CA, USA) durchgeführt. Für die anschließende quantitative *polymerase chain reaction* (qPCR) wurden Sonden von Applied Biosystems verwendet, die in Tab. 2.4 aufgelistet sind.

**Tab. 2.4: Auflistung der verwendeten qPCR-Sonden**

Gen - kodiertes Protein	Sondennummer
18S ribosomale RNA; <i>Housekeeper</i> murin	4319413E
<i>Acta2</i> - $\alpha$ SMA	Mm01546133_m
<i>Adgre1</i> - <i>EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1</i> (F4/80)	Mm00802530_m1
<i>Bax</i> - Bcl-2-assoziiertes X Protein	Mm00432051_m1
<i>Bbc3</i> - <i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>	Mm00519268_m1
<i>Bcl2l11</i> - <i>Bcl-2-like protein 11</i>	Mm00437796_m1
<i>Casp8</i> - Caspase 8	Mm01255716_m1
<i>Ccl2</i> - MCP1	Mm00441242_m1
<i>Col1a1</i> - COL1 $\alpha$ 1	Mm00801666_g1
<i>Cre</i> - Cre Rekombinase	Mr00635245_cn
<i>Fas</i> - <i>first apoptosis signal receptor</i>	Mm01204974_m1
<i>Faslg</i> - <i>first apoptosis signal receptor ligand</i> (FASL)	Mm00438864_m1
<i>HPRT</i> - Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase; <i>Housekeeper</i> human	Hs02800695_m1
<i>Il1b</i> - IL-1 $\beta$	Mm00434228_m1
<i>Il6</i> - IL-6	Mm00446190_m1
<i>Ldlr</i> - <i>low density lipoprotein receptor</i> (LDLR)	Mm01177349_m1
<i>Lipc</i> - HTGL	Mm01171487_m1
<i>LPL</i> - LPL; human	Hs00173425_m1
<i>Lpl</i> - LPL; murin	Mm01345523_m1
<i>Nlrp3</i> - NLRP3	Mm00840904_m1
<i>Nos2</i> - iNOS	Mm00440502_m1
<i>Ppara</i> - PPAR $\alpha$	Mm00440939_m1
<i>Pparg</i> - PPAR $\gamma$	Mm01184322_m1
<i>Pycard</i> - <i>PYD and CARD domain containing protein</i>	Mm00445747_g1
<i>Tgfb1</i> - TGF $\beta$	Mm03024053_m1
<i>Timp1</i> - TIMP1	Mm01341361_m1
<i>Tnfa</i> - TNF $\alpha$	Mm00443260_g1

Die qPCR wurde mit dem Mastermix „TaqMan Universal PCR Master Mix“ ebenfalls von Applied Biosystems durchgeführt.

### 2.1.7 Antikörper

**Tab. 2.5: Auflistung der für die Immunhistochemie verwendeten Antikörper**

Antikörper	Hersteller	Ursprung	Konzentration	Verdünnung
F4/80 (CI:A3-1) 122602	BioLegend (San Diego, CA, USA)	Ratte, monoklonal	500 $\mu$ g/ml	1:200
LPL (H-53) sc-32885	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)	Kaninchen, polyklonal	200 $\mu$ g/ml	1:250
MPO Ab-1	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)	Kaninchen, polyklonal	unbekannt	1:100
P0450 (Sekundärantikörper)	Dako (Glostrup, Dänemark)	Kaninchen, polyklonal	unbekannt	1:200

### 2.1.8 Assays

**Tab. 2.6: Auflistung der weiteren verwendeten Kits**

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Bestimmung von</b>
Amplex Red Cholesterol Assay Kit	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)	Cholesterin; Leber
Human Myeloperoxidase Quantikine ELISA Kit DMYE00B	R&D Systems (McKinley Place NE, MN, USA)	Humanes MPO; Plasma
MPO, Mouse, ELISA Kit HK210	Hycult Biotech Inc. (Plymouth Meeting, PA, USA)	Murines MPO; Serum
OxiSelect HNE Adduct Competitive ELISA Kit	Cell Biolabs, Inc. (San Diego, CA, USA)	HNE; Leber
Ultra Sensitive Rat Insulin ELISA Kit	Crystal Chem (Elk Grove Village, IL, USA)	Insulin; Plasma

### 2.1.9 Software

**Tab. 2.7: Auflistung der verwendeten Software**

<b>Softwarebezeichnung</b>	<b>Hersteller/Entwickler</b>
BZ-II Analyzer	Keyence (Osaka, Japan)
BZ-II Viewer	Keyence (Osaka, Japan)
Endnote x8	Thomson Reuters (New York, NY, USA)
GraphPad Prism 6.01	GraphPad Software Inc. (La Jolla, CA, USA)
ImageJ	Wayne Rasband, National Institutes of Health (Bethesda, MD, USA)
Microsoft Office 2013	Microsoft Corporation (Redmond, WA, USA)
Photoshop CS5	Adobe Systems (San José, CA, USA)
QIIME™	Primär: die Labore von Knight und Caporaso [125]
TierBase TBv610b42	Abase, P. Nielsen (Gundelfingen, Deutschland)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Humane Studien

#### 2.2.1.1 Bestimmung der MPO-Konzentration im humanen Plasma

Die MPO-Konzentration sollte im präprandialen Plasma von gesunden Probanden und Patienten mit einer diagnostizierten NAFL (NAS<4) bzw. NASH (NAS≥4) gemessen werden. Die Probenentnahme war von der Ethikkommission im Rahmen der Studie PV5036 genehmigt.

Die Messung der MPO-Konzentration erfolgte mit dem Assay „Human Myeloperoxidase Quantikine ELISA Kit“ DMYE00B von R&D Systems (McKinley Place NE, MN, USA) und der *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Da für die Bestimmung humanes Citrat-Plasma verwendet wurde, wurden die Proben, wie im Herstellerprotokoll angegeben, 1:10 verdünnt eingesetzt.

#### 2.2.1.2 Bestimmung der hepatischen LPL-Expression

Die hepatische *LPL*-Expression sollte in Proben von Probanden ohne eine Steatohepatitis und diagnostizierten NASH-Patienten gemessen werden. Dazu wurde Gewebe aus der Leber benötigt, deren Verwendung in der Forschung durch die Ethik der Livernet-Studie des UKE ermöglicht wurde. Während bei der NASH-Kohorte aufgrund der Biopsierung zur Diagnostik Gewebe zur Verfügung stand, diente Gewebe aus dem Resektionsrand von Adenomektomien als Kontrolle. Es besteht eine Assoziation zwischen hepatischen Adenomen und Steatose [126], sodass die Kontrollgruppe auch Patienten mit einer NAFL beinhaltete. Die Bestimmung der hepatischen *LPL*-Expression erfolgte mittels qPCR (s. 2.2.7.3). Die dafür benötigte cDNA der humanen Proben wurde netterweise von Pamela Filpe zur Verfügung gestellt.

### 2.2.2 Mausexperimente

#### 2.2.2.1 Murine NASH-Modelle

Zur Induktion einer NASH im Mausmodell wurden die Tiere für einen bestimmten Zeitraum mit einer hochkalorischen, fettreichen Diät gefüttert, wodurch neben den pathologischen Veränderungen in der Leber auch andere Symptome, die mit der humanen

NASH assoziiert sind, hervorgerufen werden können. Dazu gehören z.B. eine starke Gewichtszunahme und eine Verschlechterung des Lipidstoffwechsels.

Für die Charakterisierung der LPL<sup>Δ<sub>LysM</sub></sup>-, LPL<sup>Δ<sub>Hep</sub></sup>- sowie der MPO KO-Mäuse wurde die Cholesterin-reiche, hochkalorische Diät D09100301 von Research Diets, Inc (New Brunswick, NJ, USA) verwendet. Zur Evaluation der NASH-Induktion wurden jeweils die MPO KO bzw. LPL-deletierten Tiere und die dazugehörigen WT/ LPL<sup>fl/fl</sup>-Kontrollen mit dem Standardfutter weitergefüttert (CD), während der NASH-Gruppe die Cholesterin-reiche Diät für 24 Wochen verabreicht wurde. Somit ergaben sich bei diesen Experimenten jeweils vier Versuchsgruppen.

#### 2.2.2.2 Sakrifizierung der Versuchstiere

Am Ende des Versuchs wurden die Versuchstiere für vier Stunden gefastet, anschließend gewogen und durch eine intraperitoneale Injektion von 10 µl Narkose (Verhältnis Ketamin zu Rompun zur 0,9%igen Natriumchloridlösung: 1 zu 0,8 zu 1) je Gramm Körpergewicht anästhetisiert. Nachdem der Zwischenzehenreflex ausgesetzt hatte, wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und der Bauchraum geöffnet. Über die *Vena Cava* wurde Blut einmal mit einer Spritze zur Gewinnung von Serum sowie mit einer Lithium-Heparin benetzten Microvette zur Gewinnung von Plasma abgenommen. Zudem erfolgte mit einem Tropfen Vollblut die Bestimmung der Blutglukose.

Die Leber wurde mit PBS über die Pfortader perfundiert, vorsichtig entnommen, gewogen und immer nach dem gleichen Muster für die einzelnen Analysen zerteilt. Mit Ausnahme des *Lobus hepatis sinister lateralis* und des *Lobus hepatis sinister medialis* wurden die Proben mithilfe von flüssigem Stickstoff schockgefroren und daraufhin bei -80 °C gelagert. Ebenfalls schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert wurden das entnommene Caecum sowie Stuhlproben, die vor Beginn der 24-wöchigen Spezialdiätfütterung und somit im Alter von 8 bis 12 Wochen genommen worden sind.

Das Serum wurde nach Zentrifugation des Blutes (3000 g für 10 min) vorsichtig abgenommen und bei -20 °C gelagert.

Die Microvetten wurden bis zur Zentrifugation (3000 g für 10 min bei 4 °C) auf Eis gestellt und das abgenommene Plasma bei -20 °C gelagert.

### 2.2.3 Paraffin-basierte Histologie

#### 2.2.3.1 Probenvorbereitung, Anfertigung und Prozeption der Schnitte

Für die paraffinbasierten histologischen Analysen wurde der entnommene Leberlappen *Lobus hepatis sinister lateralis* über Nacht bei 4 °C in Roti-Histofix 4 % (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) fixiert und anschließend im Institut der Pathologie des UKE entwässert (s. Tab. 2.8) und in Paraffin eingebettet.

**Tab. 2.8: Entwässerungsprotokoll der Pathologie**

	Formalin	Ethanol						Xylol		Paraffin				
		80%		96%		100%			I	II	A	B	C	D
Zeit [min]	60	30	40	30	40	30	40	50	40	60	20	30	40	60

Zur Anfertigung von 4 µm starken Schnitten mithilfe des Mikrotoms wurden die eingebetteten Lebern auf einer Kühlplatte auf -8 °C heruntergekühlt, für 10 min auf Eis gelegt und anschließend geschnitten. Nach der Streckung des Gewebes und Paraffins im 37 °C warmen Wasserbad wurden die Schnitte über Nacht zum Trocknen auf eine 37 °C-Wärmeplatte gelegt.

Vor Beginn der histologischen Färbungen mussten die Schnitte mithilfe einer dreiteiligen Xylolreihe (je Xylolbad 4 min) und einer absteigenden Ethanolreihe (100%ig, 90%ig, 70%ig, 50%ig für je 4 min) entparaffinisiert werden. Nachdem die Schnitte 5 min in VE-H<sub>2</sub>O inkubiert wurden, wurde mit den spezifischen Färbeprotokollen fortgeführt. Sofern nicht anders aufgeführt, wurden die Färbungen mit einer ansteigenden Ethanolreihe (30 s 50%ig, 1 min 70%ig, 1 min 90%ig, 2 min 100%ig (2x)), einer dreiteiligen Xylolreihe (je Xylolbad 4 min) und dem anschließenden Eindecken mit Entellan (Merck, Darmstadt, Deutschland) abgeschlossen.

#### 2.2.3.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung dient der Visualisierung verschiedener Strukturen im feingeweblichen Schnitt durch die Kombination zweier Einzelfärbungen. Zuerst wurden die entparaffinisierten Schnitte (s. 2.2.3.1) für 10 min in einem Hämatoxylin-Bad (Hämalaunlösung sauer nach Mayer, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) gefärbt und anschließend für 15 min unter fließendem Leitungswasser gebläut. Durch das so entstandene Alaunhämatoxylin werden alle basophilen Strukturen und somit die Zellkerne

angefärbt. Zur Färbung der eosinophilen Strukturen wie Zellplasmaproteine, Kollagen und Mitochondrien wurden die Schnitte daraufhin für 1-2 min in ein Eosinbad (Eosin-G-Lösung 0,5% wässrig, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) gestellt. Nach kurzem Waschen der Schnitte mit VE-H<sub>2</sub>O wurde die Färbung wie unter Punkt 2.2.3.1 beschrieben abgeschlossen.

#### 2.2.3.3 Siriusrot-Färbung

Eine Färbung von Kollagenfasern und somit eine Visualisierung der Fibrose kann mithilfe einer Siriusrot (SR)-Färbung erreicht werden. Dafür wurden die entparaffinisierten Schnitte (s. 2.2.3.1) für 90 min lichtgeschützt in der SR-Färbelösung (100 mg Fast Green FCF; 100 mg Direkt red 80; 100 ml gesättigte Pikrinsäure (alles Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)) inkubiert, anschließend zweimal für 1 min in 100%igen Ethanol gewaschen und daraufhin in die Xylobäder überführt und eingedeckt (s. 2.2.3.1).

#### 2.2.3.4 Immunhistochemie

Zur spezifischen Färbung von Proteinen wurde eine Immunhistochemie (IHC) durchgeführt. Bei einigen Proteinen war dazu eine Freilegung der Strukturen durch zwanzigminütiges Kochen in einem Citratpuffer (10 mM Trinatriumcitrat-Dihydrat; 0,05% Tween20, pH 6) oder in einem Tris-Ethylendiamintetraacetat-Puffer (10 mM Tris-Base; 1 mM Ethylendiamintetraacetat; 0,05% Tween20, pH 9) (s. Tab. 2.9) mit anschließendem einmaligen Waschen in PBS versetzt mit 0,05% Tween20 (PBS-T) nötig. Ansonsten wurden die entparaffinisierten Schnitte (s. 2.2.3.1) direkt für 10 min in eine 3%ige Wasserstoffperoxidlösung angesetzt mit Methanol zum Blockieren der endogenen Peroxidase gestellt. Nachdem die Schnitte mit PBS-T dreimal für 2 min gewaschen wurden, wurden die Lebern mit einem Dako Pen (Dako, Glostrup, Dänemark) umrundet und für 60 min mit „Dako Protein Block Serum-Free Ready-To-Use“ in einer feuchten Kammer blockiert. Nach einmaligem Waschen mit PBS-T wurden die Schnitte mit dem mit „Dako Antibody Diluent“ angesetzten primären Antikörper in einer feuchten Kammer für 1 h inkubiert (s. Tab. 2.5 und 2.9) und anschließend dreimal für 2 min mit PBS-T gewaschen. Vor der halbstündigen Inkubation mit dem zweiten Antikörper „Dako REAL™ EnVision™ HRP Rabbit/Mouse“ in einer feuchten Kammer wurden die Schnitte für 10 min mit 2%igen Ziegen Serum (Dako Goat Serum) angesetzt mit PBS ein zweites Mal blockiert. Eine

Ausnahme bildete dabei die F4/80-IHC. Da der Primärantikörper aus der Ratte stammte, musste ein weiterer Antikörper aus dem Kaninchen, der gegen Ratte gerichtet war, verwendet werden. Aus diesem Grund wurden vor dem Blockieren mit Ziegenerum die Schnitte für eine Stunde mit dem Antikörper P0450 in einer feuchten Kammer inkubiert und anschließend dreimal für 2 min mit PBS-T gewaschen. Die Inkubation mit dem „Dako REAL™ EnVision™ HRP Rabbit/Mouse“-Antikörper erfolgte daraufhin für 30 min.

Nach dreimaligen Waschen für je 2 min mit PBS-T wurden die Schnitte mit der DAB-Lösung „Dako Liquid DAB+Substrate Chromogen System“ benetzt bis sie eine bräunliche Färbung aufwiesen (maximal 90 s) und die Reaktion durch VE-H<sub>2</sub>O abgestoppt. Die Schnitte wurden dreimal 2 min in VE-H<sub>2</sub>O gewaschen. Daraufhin erfolgte eine kurze Gegenfärbung zur Visualisierung der Kerne mit Hämatoxylin. Dafür wurden die Schnitte für 60 s in Hämatoxylin (Hämalaunlösung sauer nach Mayer, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) gestellt und 60 s mit Leitungswasser gebläut. Nach kurzem Waschen der Schnitte mit VE-H<sub>2</sub>O wurde die Färbung wie unter Punkt 2.2.3.1 beschrieben abgeschlossen.

**Tab. 2.9: Übersicht der Details der einzelnen IHC-Färbungen**

<b>Protein</b>	<b>Antikörper</b>	<b>Antigen-Freilegung</b>
F4/80	122602	Nein
LPL	sc-32885	Citratpuffer
MPO	Ab-1	Tris-Ethylendiamintetraacetat-Puffer

### **2.2.4 Kryostat-basierte Histologie**

#### **2.2.4.1 Anfertigung von Kryostatschnitten**

Der entnommene Leberlappen *Lobus hepatis sinister medialis* wurde in Tissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen, Deutschland) auf Trockeneis eingebettet und das gefrorene Gewebe bei -80 °C gelagert.

Zur Anfertigung der 8 µm starken Kryostatschnitte wurde sowohl die Kammer des Kryotoms als auch die Objektkühlung auf -15 °C eingestellt und das Präparat daraufhin angefertigt. Nachdem die Schnitte für ca. 5 min bei Raumtemperatur getrocknet wurden, wurden sie bis zur Färbung bei -20 °C gelagert.

#### 2.2.4.2 *Oil Red O*-Färbung

Zur Anfärbung der TG in Kryostatschnitte wurde der fettlösliche Azofarbstoff *Oil Red O* (OrO) verwendet. Nachdem die Kryostatschnitte 10 min bei Raumtemperatur aufgetaut wurden, wurden sie für 60 s mit 60%igem Triethylphosphat gewaschen und anschließend für 15 bis 20 min in der OrO-Färbelösung (0,5 g OrO (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) pro 100 ml 60% Triethylphosphat) auf einem Schüttler lichtgeschützt inkubiert. Daraufhin wurden die Schnitte zweimal 2 min in VE-H<sub>2</sub>O gewaschen, die Kerne mittels je 45 s dauernder Hämaunfärbung (Hämaunlösung sauer nach Mayer, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) und Bläuung mit Leitungswasser gegengefärbt und die Schnitte in VE-H<sub>2</sub>O überführt. Abschließend wurden die Schnitte mit Aquatex (Merck AG, Darmstadt, Deutschland) eingedeckt.

#### 2.2.5 Auswertung der Histologie

Da eine Quantifizierung der SR- und OrO-Färbung sowie der LPL- und F4/80-IHC nicht mittels Auszählung einzelner positiver Zellen erfolgen konnte, wurden diese Färbungen durch die Bestimmung des Anteils der gefärbten Fläche an dem gesamten Bild quantifiziert. Von den Proben wurden 5 bis 10 (Kontrolllebern) bzw. 15-20 (NASH-Lebern) Fotos in der 10x Vergrößerung gemacht, wobei darauf geachtet wurde, dass immer zuerst ein Weißabgleich durchgeführt wurde und die Belichtungszeit innerhalb eines Experiments bei jeder Leber identisch war. Nachdem die Aufnahmen mithilfe des Programms Photoshop in ein Schwarzweißbild umgewandelt worden sind, wurden die Fotos in das Programm ImageJ geladen. Der Schwellenwert für die Bilder wurde so gewählt, dass ausschließlich die positiven Signale in schwarz erschienen. Der Anteil der schwarzen Fläche wurde daraufhin von dem Programm für jedes Bild errechnet. Der Gesamtwert für eine Leber ergab sich aus den Mittelwerten der einzelnen Bilder.

Die MPO-IHC wurden dagegen numerisch quantifiziert. Dafür wurden von jeder Leber 8 bis 12 Gesichtsfelder in einer 20x Vergrößerung aufgenommen, in jedem Gesichtsfeld die Anzahl an positiven Zellen gezählt und der resultierende Mittelwert aufgetragen.

## 2.2.6 Analyse von Serum- und Plasmaproben

### 2.2.6.1 Transaminasenmessung im Serum

Ein Marker für eine Schädigung der Hepatozyten ist die Konzentration der Alanin-Aminotransferase (ALT) und der Aspartat-Aminotransferase (AST) im Serum. Beide Enzyme transferieren eine Aminogruppe zu  $\alpha$ -Ketoglutarat und sind somit Bestandteil des Aminosäurestoffwechsels. ALT ist vor allen Dingen im Zytosol der Hepatozyten lokalisiert. Eine erhöhte Konzentration dieses Enzyms lässt somit spezifisch auf eine Schädigung der Hepatozyten mit einer ALT-Freisetzung ins Blut schließen. AST hingegen ist sowohl im Zytosol als auch in den Mitochondrien von Leber, Herz und Muskel vorhanden, sodass ein Anstieg dieses Enzyms im Serum nur in Verbindung mit einem Anstieg der ALT-Serumkonzentration auf eine Leberzellschädigung hinweist.

Für die Bestimmung der Konzentration der Transaminasen ALT und AST wurde das auf Eis aufgetaute murine Serum 1 zu 5 verdünnt (25  $\mu$ l Serum plus 100  $\mu$ l VE-H<sub>2</sub>O) und anschließend von Carsten Rothkegel oder Elena Tasika (Arbeitsgruppe Tiegs, Institut für Experimentelle Hepatologie und Immunologie, UKE) gemessen.

### 2.2.6.2 Bestimmung der MPO-Konzentration im murinen Serum

Für die Bestimmung der MPO-Konzentration im murinen Serum, das 1:20 verdünnt eingesetzt wurde, wurde das Kit „MPO, Mouse, ELISA Kit #HK210“ (Hycult Biotech Inc., Plymouth Meeting, PA, USA) verwendet. Der ELISA wurde wie im Herstellerprotokoll angegeben durchgeführt.

### 2.2.6.3 Insulin-ELISA/Berechnung des HOMA-IR

Zur Beurteilung der IR wurde der *homeostatic model assessment for insulin resistance* (HOMA-IR) Index berechnet. In diesem mathematischen Modell wird die Interaktion von Insulin und Glukose in der Homöostase des Glukosestoffwechsels berücksichtigt [127]. Die Homöostase wird mit folgender Formel beschrieben:

$$\text{HOMA-IR} = \text{Blutglukosespiegel [mg/dl]} \times \text{Plasmainsulin [mU/l]} / 405$$

Während der Blutglukosespiegel bereits im Zuge der Sakrifizierung bestimmt werden konnte (s. 2.2.2.2), wurde die Insulinkonzentration im Plasma mithilfe des „Ultra Sensitive Rat

Insulin ELISA Kit“ von Crystal Chem (Elk Grove Village, IL, USA) gemessen, wobei das Protokoll den Herstellerangaben zu entnehmen ist.

#### 2.2.6.4 Triglyzerid- und Cholesterinbestimmung im Serum

Zur Bestimmung der TG- und Cholesterinkonzentration im Serum wurde das Analysesystem von Roche/Hitachi (Roche, Basel, Schweiz) verwendet. Sowohl die Proben als auch der Standard wurden in Doppelbestimmung gemessen.

Als Standard diente Precipath, das mit PBS so verdünnt wurde, dass eine Standardreihe von 0,47 bis 15 mg Cholesterin/dl entstand. Die Charge des verwendeten Precipath wurde für den höchsten Standard 1:19,66 verdünnt, sodass die entsprechende TG-Standardreihe eine Konzentration von 0,53 bis 16,9 mg TG/dl aufwies.

100 µl der 6 verschiedenen Standardproben sowie 100 µl PBS für den Nullwert wurden in eine transparente 96 *well* Flachbodenplatte pipettiert. Für die Serumproben wurden 97,5 µl PBS in die Vertiefungen vorgelegt und 2,5 µl Serum hinzupipettiert, sodass eine 1:40 Verdünnung der Proben entstand. Nach der Zugabe von 200 µl der TG- bzw. Cholesterinreaktionslösung wurden die Platten für 10 min bei 37 °C inkubiert und die Extinktion daraufhin bei 540 nm gemessen.

### 2.2.7 **Analyse von Leberproben**

#### 2.2.7.1 RNA-Isolation und -Messung

Die RNA wurde aus einem ca. 30 mg schweren Teil des *Lobus hepatis dexter lateralis*, der bei der Organentnahme bereits separat weggefroren wurde, bzw. den isolierten KC (s. 2.2.8) mithilfe des NucleoSpin RNA Kit von Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) isoliert. Die Extraktion erfolgte nach Herstellerangaben. Anschließend wurde die Konzentration und Qualität der isolierten RNA durch die Messung von 1,25 µl des Eluats am NanoDrop ermittelt und die Proben bei -20 °C gelagert.

#### 2.2.7.2 cDNA-Synthese

Für die Umschreibung der RNA in cDNA wurde das „High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits for 200 and 1000 Reactions“-Kit von Applied Biosystems (Carlsbad, CA,

USA) verwendet. 2 µg RNA wurden in einem 20 µl Ansatz umgeschrieben. Die genaue Durchführung ist der Herstellerbeschreibung zu entnehmen.

### 2.2.7.3 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion

Für die qPCR wurde das TaqMan-System von Applied Biosystems (Carlsbad, CA, USA) verwendet, deren Sonden neben den PCR-spezifischen Primern auch eine FAM oder VIC-Fluorophor gekoppelte Sonde beinhaltet, wodurch eine Quantifizierung der entstehenden doppelsträngigen DNA ermöglicht wird.

Die umgeschriebene cDNA wurde 1:3 mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt und anschließend in einer 384 *well* Platte pro Ansatz 0,5 µl cDNA, 0,5 µl Sonde, 4 µl Nuklease-freies Wasser und 5 µl „TaqMan Universal PCR Master Mix“ (Applied Biosystems) pipettiert. Die qPCR wurde in einer Doppelbestimmung durchgeführt.

Nachdem die Platte mit einer adhäsiven qPCR-Folie von Sarstedt (Nürnbrecht, Deutschland) abgedeckt wurde, wurde die Platte kurz zentrifugiert und anschließend gemessen. Das qPCR-Programm ist in Tab. 2.10 dargestellt.

**Tab. 2.10: qPCR-Programm**

Schritt	Zeit	Temperatur
Initiierung	10 min	95 °C
Denaturierung	15 s	95 °C
<i>Annealing</i> und Elongation	60 s	60 °C

Zur Quantifizierung der cDNA und somit zur Evaluierung der Genexpression wurde zuerst die Differenz des Zyklusschwellenwerts der jeweiligen Sonde und des Werts des *Housekeepers* gebildet ( $\Delta C_t$ ). Die relative Expression der Probe wurde mithilfe folgender Formel berechnet:

$$\frac{1}{2^{\Delta C_t}}$$

Abschließend wurde die zu der Kontrollgruppe (murin: WT/LPL<sup>fl/fl</sup> CD; human: Resektionsrand von Adenompatienten) normalisierte Expression durch folgende Formel bestimmt:

$$\frac{1}{\text{Ø rel. Expression Kontrollgruppe}} \times \text{rel. Expression (Probe)}$$

#### 2.2.7.4 Microarray

Zur Expressionsanalyse des gesamten Genoms wurde ein *Microarray* von der Firma Atlas Biolabs GmbH (Berlin, Deutschland) mit dem „Clariom S Mouse Array“ innerhalb des „ThermoFisher/Affymetrix WT Expression Profiling Standard Service“ durchgeführt. Die verwendete RNA wurde ebenfalls für die cDNA-Synthese und somit für die qPCR eingesetzt (s. 2.2.7.2 und 2.2.7.3) und wie unter Punkt 2.2.7.1 beschrieben isoliert. Die RNA wies dabei die geforderte und notwendige Reinheit und Qualität für die Analyse auf. Für die Analyse wurden je Gruppe drei Proben gemessen.

Dr. Babett Steglich übernahm freundlicherweise die bioinformatische Auswertung und die genauen Analysen des *Microarrays*: Zuerst wurden die Rohdaten mittels „Robust Multiarray Averaging“ (R package „oligo“ [128]) normalisiert. Zur Identifizierung von unterschiedlich exprimierten Genen wurden die Funktionen „lmFit“, „makeContrast“, „contrasts.fit“, „eBayes“ und „decideTests“ des „limma R package“ [129] mit Standardparametern verwendet. Gene mit einem p-Wert < 0,05 wurde als unterschiedlich exprimiert charakterisiert, wobei vorher eine „Multiple Testing Correction“ durch die Benjamini-Hochberg-Methode durchgeführt wurde. Zur Bestimmung der Signalwege, an denen zahlreiche dieser Gene beteiligt sind, wurde das „EnrichR R package“ [130] auf Grundlage der „GO\_Biological\_Process\_2018“ Datenbank verwendet. Dabei wurden nur Ergebnisse angezeigt, die einen p-Wert < 0,05 aufwiesen. Abschließend wurden die *Heatmaps* mithilfe des „ggplot2 R package“ erstellt. Die Rohdaten sowie die prozessierten *Microarray*-Daten wurden in die Datenbank „Gene Expression Omnibus“ eingepflegt.

#### 2.2.7.5 Protein- und Lipidisololation

Zu einem ca. 100 mg schweren Teil des *Lobus hepatis dexter lateralis*, der bei der Organentnahme bereits separat weggefroren und dessen genaues Gewicht dokumentiert wurde, wurde das zehnfache Volumen *Radioimmunoprecipitation assay*-Puffer versetzt mit Protease-Inhibitoren (1 M Tris-HCl, pH 7,4; 105 mM NaCl; 1 mM Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat; 1 mM Ethylendiamintetraacetat; 1% Triton-X; 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>; 10 mM NaF; 1 µg/ml Leupeptin; 1 Tablette cOmplete, Mini Protease Inhibitor Cocktail (Roche, Basel, Schweiz) je 10 ml Puffer) pipettiert. Nach der Zugabe einer kleinen Stahlkugel wurde das Gewebe für zweimal 3 min im *Tissue Lyser* bei einer Frequenz

von 20 Hz/s homogenisiert. Nach zehnmütiger Zentrifugation bei 10 000 g und 4 °C wurde das Proteinlysate inklusive des Fetts abgenommen und in ein neues Gefäß pipettiert. Nachdem 30 µl des Proteinlysats in ein anderes Gefäß zur Bestimmung des hepatischen Cholesteringehalts und weitere 30 µl in eine MegaBlock 96 *well* Platte zur Bestimmung des hepatischen TG-Gehalts sowie zur Proteinbestimmung abgenommen worden sind, wurde das Lysat bei -20 °C zur Lagerung weggefroren. Die Proben für die Konzentrationsbestimmungen wurden bei 4 °C über Nacht gelagert.

### 2.2.7.6 Bestimmung des hepatischen TG- und Proteingehalts

Beide Konzentrationsmessungen wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt.

Zu den unter Punkt 2.2.7.5 beschriebenen 30 µl Leberextrakt wurden 720 µl PBS pipettiert. Von den so 1:25 verdünnten Proben wurden 10 µl in eine transparente 96 *well* Flachbodenplatte transferiert und 90 µl PBS hinzupipettiert, sodass ein Gesamtvolumen von 100 µl je *well* vorlag. Anschließend wurden je 100 µl der Proben der Standardreihe auf die Platte gegeben und die TG-Konzentration bestimmt (s. 2.2.6.4). Die ermittelte hepatische TG-Konzentration wurde auf die anschließend bestimmte Proteinkonzentration bezogen.

Für die Proteinbestimmung wurden 10 µl des 1:25 verdünnten Leberextrakts sowie je 10 µl des *bovine serum albumin* Standards mit einer Konzentration von 0,0625 bis 2 mg/ml (gelöst in PBS) in eine neue MegaBlock 96 *well* Platte transferiert. Nachdem 40 µl 0,1 N Natronlauge sowie 500 µl Lowry Lösung zu den Proben und dem Standard pipettiert wurden, wurde die Platte für 10 min im Dunkeln inkubiert. Die Platte wurde nach der Zugabe von 40 µl Folin-Ciocalteu's Phenolreagenz gut geschüttelt und für 20 min im Dunkeln inkubiert. Zur Extinktionsmessung bei 760 nm wurden 200 µl der entwickelten Lösung in eine transparente 96 *well* Flachbodenplatte transferiert.

Die Lowry Lösung wurde vor der Anwendung aus 49 Teilen Lowry A Lösung (0,02% Kaliumnatriumtartrat; 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; ad 0,1 M NaOH) und einem Teil Lowry B Reagenz (0,5% CuCO<sub>4</sub>; 5% Natriumlaurylsulfat; ad 0,1 M NaOH) frisch angesetzt. Die Lowry B Lösung ist lichtsensitiv und musste daher lichtgeschützt aufbewahrt werden.

#### 2.2.7.7 Bestimmung des hepatischen Cholesteringehalts

Zu den unter Punkt 2.2.7.5 beschriebenen 30 µl Leberextrakt wurden 600 µl Folch Reagenz (8:5 w/w Chloroform/Methanol) pipettiert und die Lösung anschließend durch Vortexen gemischt. Nach der fünfminütigen Zentrifugation bei 10 000 g wurden 200 µl des gut durchmischten Überstands abgenommen und die Flüssigkeit bei 60 °C und 600 rpm innerhalb von 2 h abgedampft. Der so entstandene Lipidfilm wurde in 200 µl Amplex-Reaktionspuffer aus dem „Amplex Red Cholesterol Assay Kit“ von Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) durch starkes Vortexen gelöst und anschließend für 20 min bei 60 °C und 600 rpm geschüttelt. Währenddessen wurde der auch für die anderen Lipidbestimmungen verwendete Standard Precipath (Roche, Basel, Schweiz) mit Amplex-Reaktionspuffer verdünnt und eine Standardreihe mit einer Cholesterinkonzentration von 0,5 bis 32 µg/ml angesetzt. 50 µl des Amplex-Reaktionspuffers als Nullwert sowie 50 µl der sieben anderen Standardproben bzw. der zu bestimmenden Leberproben wurden in eine schwarze 96 *well* Flachbodenplatte pipettiert und 50 µl des Amplexreaktionsgemisches zu jeder Probe hinzugegeben. Nach einer dreißigminütigen Inkubation bei 37 °C wurde fluorimetrisch die Extinktion bei einer Wellenlänge von 540 nm und die Emission bei 565 nm bestimmt. Die Messung erfolgte in Einfachbestimmung. Die ermittelte hepatische Cholesterinkonzentration wurde zuletzt auf die Proteinkonzentration bezogen.

Für das Amplexreaktionsgemisch, dessen Komponenten aus „Amplex™ Red Cholesterol Assay Kit“ stammen, wurden die Bestandteile wie folgt in Amplex-Reaktionspuffer verdünnt:

- *Amplex® Red Reagent* 1:67
- *Horse Radish Peroxidase* 1:100
- *Cholesterol oxidase* 1:100
- *Cholesterol esterase* 1:1000

#### 2.2.7.8 Hydroxynonenal-ELISA

Bei HNE handelt es sich um ein Aldehyd, das ein Sekundärprodukt der Lipidoxidation ist. Im Gegensatz zu den instabilen, schlecht nachweisbaren peroxidierten Lipiden, kann HNE aufgrund seiner Bindung an Proteinen und somit der Bildung eines stabilen Komplexes mithilfe eines kompetitiven ELISA gemessen werden. Für den ELISA „OxiSelect HNE Adduct Competitive ELISA Kit“ von Cell Biolabs, Inc. (San Diego, CA, USA) wurden die Leberproteinlysate, die für die Bestimmung des hepatischen TG und Cholesteringehalts

isoliert wurden (s. 2.2.7.5), mit einer Konzentration von 2 mg/ml eingesetzt. Den Herstellerangaben ist zu entnehmen, mit welchem Puffer die Konzentration eingestellt wurde und wie der ELISA durchgeführt wurde.

### 2.2.8 *Lpl*-Expressionsanalysen

#### 2.2.8.1 Isolation der Kupfferzellen

Die Mäuse, aus deren Lebern die KC isoliert werden sollten, wurden nach der Tötung (s. 2.2.2.2) geöffnet und ein Zugang (BD Venflon Pro Safety; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) in die *Vena Cava* gelegt. Durch das Abbinden des Zugangs oberhalb der *Vena Renalis* und das Abklemmen der *Vena Cava* oberhalb des Diaphragmas wurde bei der anschließenden Perfusion ein geschlossenes System in der Leber erreicht. Über die geöffnete *Vena Portae* konnten die Flüssigkeiten die Leber wieder verlassen. Nachdem die Leber durch die Perfusion der 37 °C warmen Lösung A (140 mM NaCl; 5,4 mM KCl; 740 nM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 850 nM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O; 10 mM 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure; 4,2 mM NaHCO<sub>3</sub>; 500 µM Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat; 5 mM Glukose; pH 7,4) gewaschen wurde, erfolgte für 5 min ein enzymatischer Vorverdau durch die Perfusion von 50 ml einer 37 °C warmen Kollagenase-Lösung. In dieser Lösung lag die Kollagenase (Collagenase D; Roche, Basel, Schweiz) in einer Konzentration von 0,057 U/ml in einem Enzympuffer (140 mM NaCl; 5,4 mM KCl; 740 nM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 850 nM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O; 10 mM 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure; 4,2 mM NaHCO<sub>3</sub>; 3,8 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O; pH 7,4) vor. Die Leber wurde vorsichtig entnommen, die Gallenblase entfernt und die Leber in einem kleinen Volumen von Lösung A ausgestrichen und zerkleinert. Für den anschließenden Pronase-Verdau wurde die Gewebelösung in einen mit 100 ml Pronase-Lösung (2000 PU/ml Pronase E (Merck, Darmstadt, Deutschland) gelöst in Enzympuffer) befüllten, auf 37 °C vorgewärmten Erlenmeyerkolben überführt und für 25 min in einem 37 °C warmen Wasserbad unter Rühren inkubiert. Die Zellsuspension wurde durch einen 70 µm Zellfilter (EasyStrainer 70 µm; Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich) auf drei 50 ml Röhrchen verteilt und die Proben für 5 min bei 580 g zentrifugiert. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 4 °C. Der Überstand wurde bis auf 5 ml abgenommen und jedes Zellpellet in 5 ml *Gey's balanced salt solution* B (GBSS/B; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) und 120 µl

DNase I (2 mg/ml in H<sub>2</sub>O; Roche) resuspendiert. Alle drei Zellsuspensionen wurden in einem Röhrchen gesammelt und das Volumen mit GBSS/B auf 50 ml aufgefüllt. Nach der erneuten Zentrifugation und der Aufnahme des Pellets in GBSS/B inkl. DNase I wurde ein Gradient zur Auftrennung der einzelnen Zellpopulationen pipettiert. Dazu wurden 14 ml einer Histodenz-Lösung (5 mM KCl; 1 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O; 285 µM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 420 nM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 220 µM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 5 mM Glukose; 2,7 mM NaHCO<sub>3</sub>; 1,5 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O; 300 mM Histodenz (Sigma-Aldrich); pH 7,35) zu der Zellsuspension pipettiert, die gut durchmischte Lösung auf zwei 15 ml Röhrchen verteilt und mit 1,5 ml GBSS/B vorsichtig überschichtet. Nach einer Zentrifugation ohne Bremse und der niedrigsten Beschleunigung für 15 min bei 1380 g wurde die trübe Bande, die die nicht-parenchymalen Zellen enthielt, vorsichtig abgenommen und in ein 50 ml Röhrchen überführt. Das Volumen wurde mit GBSS/B auf 50 ml aufgefüllt und die Lösung für 2 min bei 45 g zentrifugiert, sodass eventuell noch vorhandene Hepatozyten pelletiert wurden. Der Überstand wurde daraufhin für 5 min bei 700 g zentrifugiert und das Pellet in 12,5 ml *magnetic-activated cell sorting* (MACS) Puffer (0,5% Bovines Serumalbumin; 2,5 mM Ethylendiamintetraacetat in PBS) resuspendiert. Nachdem die Zellen mithilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt wurden, wurde das Pellet, das nach der Zentrifugation bei 300 g für 10 min entstand, in 100 µl je 10<sup>7</sup> Zellen MACS Puffer resuspendiert und 2 µl Maus Immunglobulin G 1 mg/ml (IgG from mouse serum; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) dazugegeben. Nach einer zehnmütigen Inkubation bei 4 °C wurde 1 ml MACS Puffer dazugegeben, die Probe bei 400 g für 7 min zentrifugiert und das Pellet wiederum in 100 µl je 10<sup>7</sup> Zellen MACS Puffer aufgenommen. Nach der Zugabe von 1 ml Fc-Rezeptor-Block (EasySep Mouse FcR Blocker; StemCell Technologies, Vancouver, Kanada) erfolgte erneut eine zehnmütige Inkubation mit anschließender Zentrifugation. Das Pellet wurde im gleichen Volumen MACS-Puffer resuspendiert und 2,5 µl je 10<sup>7</sup> Zellen Biotin Anti-mouse F4/80 Antikörper Klon BM8 (BioLegend, San Diego, CA, USA) dazupipettiert. Nach der zehnmütigen Inkubation bei 4 °C und der Zugabe von 3,5 ml MACS Puffer wurde die Probe zentrifugiert und das Pellet erneut in 100 µl je 10<sup>7</sup> Zellen MACS Puffer gelöst. Durch die Zugabe von 10 µl je 10<sup>7</sup> Zellen Anti-Biotin *Microbeads* (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) mit anschließender Inkubation, Zentrifugation und Resuspension

des Pellets in 500 µl MACS Puffer war die Lösung für die Zellseparation mittels der MACS-Methode vorbereitet. Nachdem die in den Magneten eingespannte LS Säule (Miltenyi Biotec) mit 3 ml und der Prä-Separationsfilter (30 µm, Miltenyi Biotec) mit 500 µl MACS Puffer aktiviert wurden, wurde die vorbereitete Probe über den Prä-Separationsfilter auf die Säule gegeben. Die Säule wurde viermal mit 3 ml Puffer MACS Puffer gewaschen, von dem Magneten abgenommen und die Zellen nach der Zugabe von 5 ml MACS Puffer durch einen Stempel von der Säule eluiert. Zu dem Eluat wurden 10 ml MACS Puffer pipettiert, die Probe für 7 min bei 400 g zentrifugiert und das entstandene Pellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die isolierten KC wurden bei -80 °C bis zur RNA-Isolation (s. 2.2.7.1) gelagert.

### 2.2.8.2 Bestimmung der *Lpl*-Expression einzelner hepatischer Zellpopulationen

Zum Vergleich der *Lpl*-Expression in unterschiedlichen Zellpopulationen mussten die Zellen aus der Leber isoliert werden, anschließend die RNA isoliert und diese in cDNA umgeschrieben werden (s. 2.2.7.1 und 2.2.7.2). Während die cDNA von isolierten LSEC und Hepatozyten netterweise von Daria Krzikalla zur Verfügung gestellt wurde und die HSC von David Steins isoliert wurden, wurden die KC wie im vorigen Kapitel beschrieben gewonnen. Dazu wurden vier C57BL/6J-Mäuse verwendet.

Die mithilfe einer qPCR ermittelte relative Expression wurde nicht wie in Kapitel 2.2.7.3 beschrieben auf eine Versuchsgruppe normalisiert, da in diesem Fall keine einheitliche Kontrollgruppe vorhanden war.

### 2.2.8.3 Überprüfung der LPL-Deletion in $LPL^{\Delta LysM}$ -Mäusen

Zur Überprüfung der Deletion von LPL in myeloiden Zellen in  $LPL^{\Delta LysM}$ -Mäusen wurden KC aus zwei  $LPL^{fl/fl}$ - und zwei  $LPL^{\Delta LysM}$ -Mäusen isoliert (s. 2.2.8.1). Nach der Isolation der RNA (s. 2.2.7.1) und der Umschreibung in cDNA (s.2.2.7.2) konnte die *Lpl*-Expression in den Zellen mittels qPCR (s. 2.2.7.3) bestimmt werden. Dabei wurde die Expression auf die Werte der  $LPL^{fl/fl}$ -KC normalisiert.

## **2.2.9 Mikrobiomanalyse**

Zur Untersuchung der Zusammensetzung der Bakterien im Darm der Versuchstiere wurde eine 16S-ribosomale RNA-Sequenzierung durchgeführt. Das Mikrobiom wurde aus den

Stuhlproben, die vor Beginn der Fütterung und somit im Alter von 8 bis 12 Wochen gesammelt worden sind, sowie aus dem Caecum der sakrifzierten Versuchstiere analysiert. Die Probenverarbeitung, Analyse und Auswertung erfolgte im Institut für medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene des UKE durch das Team von Prof. Dr. Nicole Fischer. Zuerst wurden V3-V4-Region ribosomale RNA-Amplifikate mithilfe von degenerierten Primern hergestellt, die eine Illumina Adapter Konsensussequenz beinhalten (*forward*: 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCAGCAG-3'; *reverse*: 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATC-C-3') [131]. Die detaillierte Beschreibung des Protokolls wurde von Illumina veröffentlicht [132]. Anschließend wurden aus den Proben mittels Multiplexverfahren *Barcode*-Bibliotheken gebildet. Diese Bibliotheken wurden durch 2x 500 Basenpaar-PE-Sequenzierung mit der MiSeq-Plattform analysiert. Durch Verwendung von FastQC (Babraham Bioinformatics, Babrahan Institut, UK) wurde der durchschnittliche Qualitätswert für jede Probe vor und nach der paarweisen Auslesung bestimmt. Alle gepaarte Enden in jeder Probe wurden zusammengefügt und alle Sequenzen mit einer Größe unter 250 Basenpaaren und/oder mit einem Phredwert kleiner als 33 wurden für die weitere Analyse ausgeschlossen. Das *Quality filtering* wurde mittels QIIME 53 (bei Phred größer oder gleich Q20) durchgeführt. Für das Clustering der Ergebnisse in *operational taxonomic units* und für die anschließende alpha- und beta-Diversitätsanalyse wurde die QIIME [125] Version 1.7 verwendet. USEARCH8.1 wurde als Chimärenfilter eingesetzt und alle Sequenzen daraufhin basierend auf einer 97%igen Übereinstimmung mit Referenzsequenzen geclustert. Alle Abschnitte, die diesen Grad der Übereinstimmung nicht erreichten, wurden neu geclustert. Die Taxonomieebenen von repräsentativen Sequenzen der *operational taxonomic units* wurden auf Grundlage einer 95%igen Übereinstimmung mithilfe der SILVA-Datenbank erstellt.

Die alpha-Diversität wurde mithilfe des *Shannon diversity index* berechnet. Je diverser das Mikrobiom dabei innerhalb einer Probe ist, umso höher ist der Shannon-Index. Durch die UniFrac-Methode wurde zudem die beta-Diversität kalkuliert. Dabei wurde die gewichtete Analyse durchgeführt, wodurch nur berücksichtigt wurde, ob ein Taxom in der Probe vorkommt während die Quantität nicht in die Berechnung einbezogen wird. Bei der

UniFrac-Methode beschreibt der Abstand zwischen den einzelnen Punkten die phylogenetische Distanz zwischen den einzelnen Proben [133]. Mittels eines *principal coordinate analysis* (PCoA)-Plot können diese Abstände anschaulich dargestellt werden.

### 2.2.10 Nomenklatur

In der vorliegenden Arbeit wurden alle Gene kursiv geschrieben. Während murine Gene durch einen Majuskel als Anfangsbuchstaben gekennzeichnet sind, wurden humane Gene in Versalschrift geschrieben. Sowohl humane als auch murine Proteine wurden in einer nicht-kursiven Versalschrift verfasst. Diese Nomenklatur richtete sich nach gängigen internationalen Richtlinien, die 2014 in „*Guidelines for Formatting Gene and Protein Names*“ von A. Katherine bei BioScience Writers veröffentlicht wurden.

### 2.2.11 Statistische Auswertung

Für die korrekte Validierung der Ergebnisse wurden statistische Analysen durchgeführt. Wenn nicht anders vermerkt, wurde eine einfache *analysis of variance* (ANOVA) mit einer anschließenden Sidak-Korrelation als Post hoc Test mithilfe der GraphPad Prism Software zur Berechnung der Signifikanz verwendet. Dieser statistische Test ermöglicht die parallele Beurteilung der Induktion der NASH durch die Diät (Vergleich der beiden WT/LPL<sup>fl/fl</sup>-Gruppen) und der Auswirkungen des Genotyps bei den jeweiligen Behandlungen (CD und NASH).

Bei allen statistischen Analysen wurde das Ergebnis als signifikant bewertet, wenn galt:

p-Wert < 0,05: \* (p < 0,01: \*\*; p < 0,001: \*\*\*; p < 0,0001: \*\*\*\*).

Ergebnisse mit einem p-Wert > 0,05 wurden mit einem ns für nicht signifikant bezeichnet.

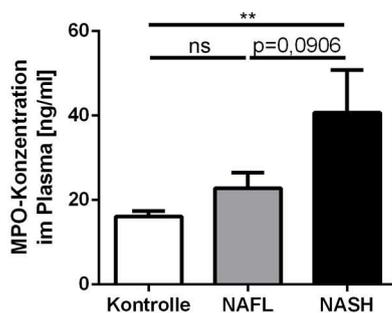
In den graphischen Darstellungen der Ergebnisse wurde der Standardfehler des Mittelwerts gezeigt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 MPO und LPL sind in NASH-Patienten hochreguliert

Aus der Literatur wurden Hinweise für eine funktionelle Rolle jeweils von MPO und LPL in der NASH-Progression identifiziert. Diese Hinweise sollten in eigenen Patientenmaterialien bestätigt werden, um die Rationale für eine tierexperimentell-translationale Studie zu erhärten.

Eine erhöhte MPO-Konzentration wurde bislang nur in NASH-Patienten im Vergleich zu morbid Adipösen gezeigt [80]. Aus diesem Grund wurde die MPO-Konzentration im Plasma von nüchternen, gesunden Probanden und Patienten mit bioptisch gesicherter NAFL (NAS<4) bzw. NASH (NAS≥4) gemessen. Bei den gesunden Studienteilnehmern wurde anhand von normalen Leberwerten (ALT und AST) sowie der Messung des Leberfettgehalts und der Lebersteifigkeit mithilfe der nicht invasiven transienten Elastografie eine NAFLD ausgeschlossen.



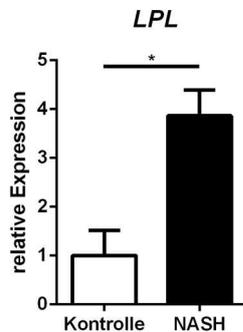
**Abb. 3.1: Plasma MPO-Konzentration in gesunden Probanden und NAFLD-Patienten**

MPO-Konzentration im Plasma von nüchternen Probanden ohne NAFLD (Kontrolle), NAFL- und NASH-Patienten ( $n_{\text{Kontrolle}} = 17$ ;  $n_{\text{NAFL}} = 9$ ;  $n_{\text{NASH}} = 10$ ). Es wurde eine ANOVA mit einem anschließenden Tukey's Post hoc Test zur statistischen Analyse durchgeführt.

NASH-Patienten haben im Gegensatz zu NAFL-Patienten eine signifikant höhere MPO-Plasmakonzentration als gesunde Probanden (Kontrolle = 16,1 ng/ml; NAFL = 22,8 ng/ml; NASH = 40,7 ng/ml;  $p = 0,0044$ ). Zudem ist ein tendenzieller Anstieg des MPO-Plasmaspiegels in der NASH-Kohorte im Vergleich zu den NAFL-Patienten erkennbar ( $p = 0,0906$ ) (s. Abb. 3.1). Somit bestätigen die erhobenen Daten die publizierten Ergebnisse und zeigen zusätzlich, dass MPO bei der NASH im Vergleich zu Gesunden hochreguliert ist.

Verschiedene Studien konnten bereits zeigen, dass in fettleibigen Probanden und in Mäusen mit einem MtS die hepatische *LPL*-Expression erhöht ist [118, 119]. Außerdem zeigen in einer Studie von Teratani *et al.* sowohl NAFL- als auch NASH-Patienten eine signifikant höhere hepatische *LPL*-Expression als eine Kontrollgruppe [120]. In dieser Arbeit sollte die

Induktion der hepatischen *LPL*-Expression in NASH-Patienten bestätigt werden, wobei als Kontrolle der Resektionsrand von Adenomektomien und nicht wie bei Teratani *et al.* der Resektionsrand von Lebermetastasen verwendet wurde.

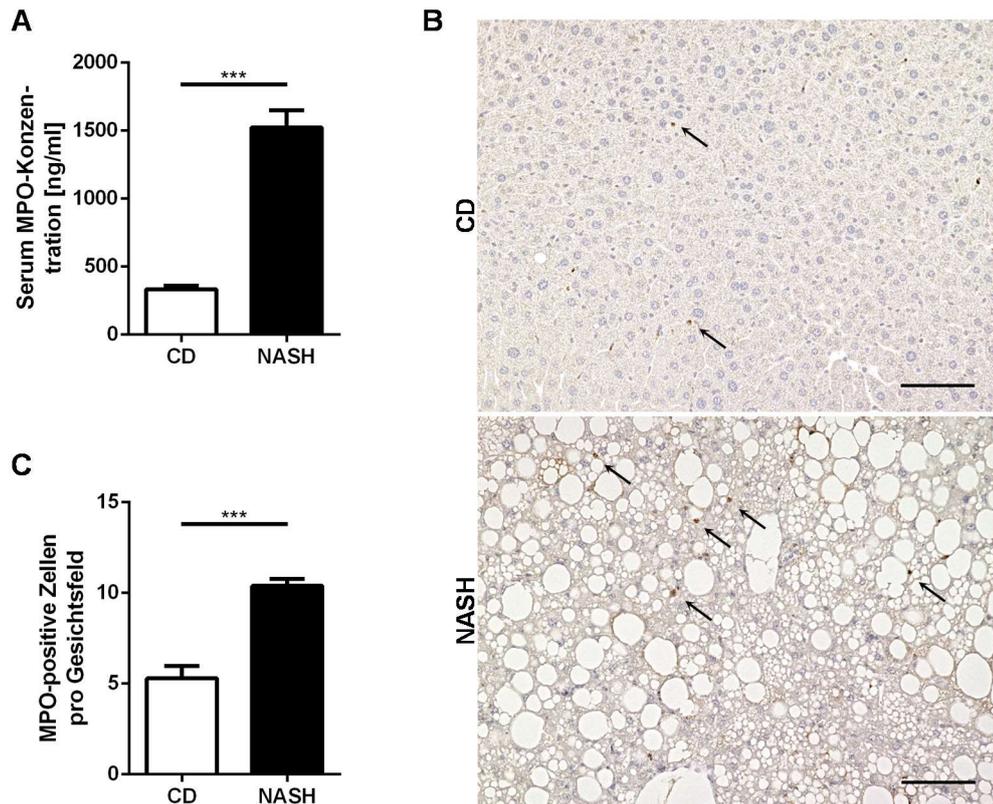


**Abb. 3.2: Hepatische *LPL*-Expression in Kontroll- und NASH-Patienten**  
Relative *LPL*-Expression im Lebergewebe vom Resektionsrand von Adenompatienten (Kontrolle) und von Biopsien von NASH-Patienten ( $n_{\text{Kontrolle}} = 7$ ;  $n_{\text{NASH}} = 6$ ). Es wurde ein Mann-Whitney-Test zur statistischen Analyse durchgeführt.

Die hepatische *LPL*-Expression ist in NASH-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe um das Vierfache erhöht ( $p = 0,0140$ ) (s. Abb. 3.2). Somit konnten die Ergebnisse von Teratani *et al.* bestätigt werden.

### 3.2 MPO ist im Mausmodell der NASH hochreguliert

In Abschnitt 3.1 konnte ein Anstieg der MPO-Plasmakonzentration in NASH-Patienten gezeigt werden. Inwieweit MPO funktionell für die Entstehung und den Verlauf der NASH von Bedeutung ist, muss allerdings im Tiermodell untersucht werden. Voraussetzung ist die Bestätigung der humanen Befunde in dem verwendeten NASH-Mausmodell. Zu diesem Zweck wurde die MPO-Konzentration im Serum sowie die Anzahl an MPO-positiven Zellen in den Lebern von MPO WT-Tieren, die auf Standardfutter gehalten wurden, und MPO WT-Mäusen mit einer Diät-induzierten NASH ermittelt (s. Abb. 3.3.)



**Abb. 3.3: Serum MPO-Konzentration und Anzahl MPO-positiver Zellen in der Leber in CD- und NASH-Diät- gefütterten MPO WT-Mäusen**

A) MPO-Konzentration im Serum sowie B) repräsentative Bilder der MPO-IHC (20x Vergrößerung, Maßstab: 100  $\mu$ m) und C) deren numerische Quantifizierung von MPO WT-C57BL/6J-Mäusen nach einer 24-wöchigen Fütterung mit einer CD bzw. NASH-Diät ( $n_{CD} = 4$ ;  $n_{NASH} = 13-14$ ). Die Signifikanz wurde mit einem Mann-Whitney-Test berechnet.

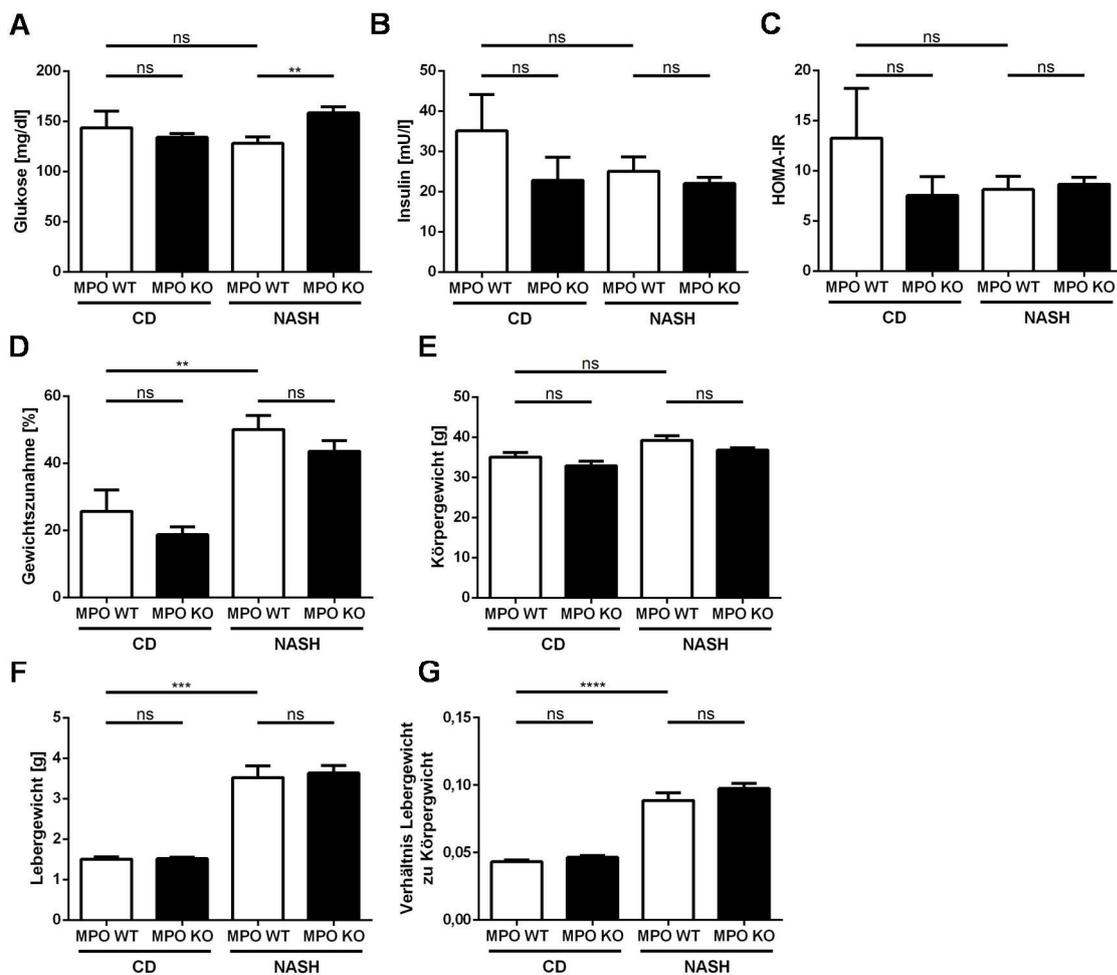
Abb. 3.3A zeigt, dass die im Plasma von NASH-Patienten nachgewiesene Erhöhung des MPO-Spiegels im Serum der NASH-Mäuse reproduziert werden konnte. Während die MPO-Serumkonzentration der Kontrolltiere ca. 335 ng/ml beträgt, steigt diese bei der NASH signifikant auf ca. 1524 ng/ml ( $p = 0,0007$ ) (s. Abb. 3.3A). Nachdem die MPO-Erhöhung bei der NASH somit in der Peripherie nachgewiesen wurde, sollte die Situation in der Leber betrachtet werden. Die Auszählung der MPO-positiven Zellen in den Lebern von CD- bzw. NASH-Diät-gefütterten WT-Tieren ergab, dass in den Lebern von Mäusen mit einer induzierten NASH mit 10 Zellen doppelt so viele MPO-positive Zellen pro Gesichtsfeld nachgewiesen werden können als in den Lebern von CD-gefütterten Tieren (s. Abb. 3.3C). Somit ist nicht nur im Blut sondern auch in dem erkrankten Organ MPO signifikant erhöht ( $p = 0,004$ ). Das Mausmodell der NASH bildet somit die Situation im Patienten korrekt ab und ist geeignet für weitere funktionelle Untersuchungen. Dabei soll

der NASH-Phänotyp im Vergleich von WT-Mäusen und MPO KO-Mäusen zur Prüfung der funktionellen Bedeutung von MPO für die NASH-Progression charakterisiert werden.

### 3.3 MPO hat im NASH-Mausmodell keinen Einfluss auf metabolische Parameter und das Mikrobiom

Im folgenden Abschnitt soll die Relevanz von MPO auf verschiedene metabolische Parameter inklusive der Steatose und das Mikrobiom untersucht werden. Somit können Aussagen nicht nur über den Einfluss von MPO auf Leber-spezifische sondern auch systemische Merkmale der NASH getroffen werden. Die Analyse des Mikrobioms ist dabei von Bedeutung, da Veränderungen des Mikrobioms sowohl mit der Entstehung als auch mit der Progression der NAFLD assoziiert sind [134].

Zuerst wurden verschiedene metabolische Parameter bei den Versuchstieren analysiert, da es sich bei Übergewicht und IR um NAFLD-Risikofaktoren handelt [135] (s. Abb. 3.4).

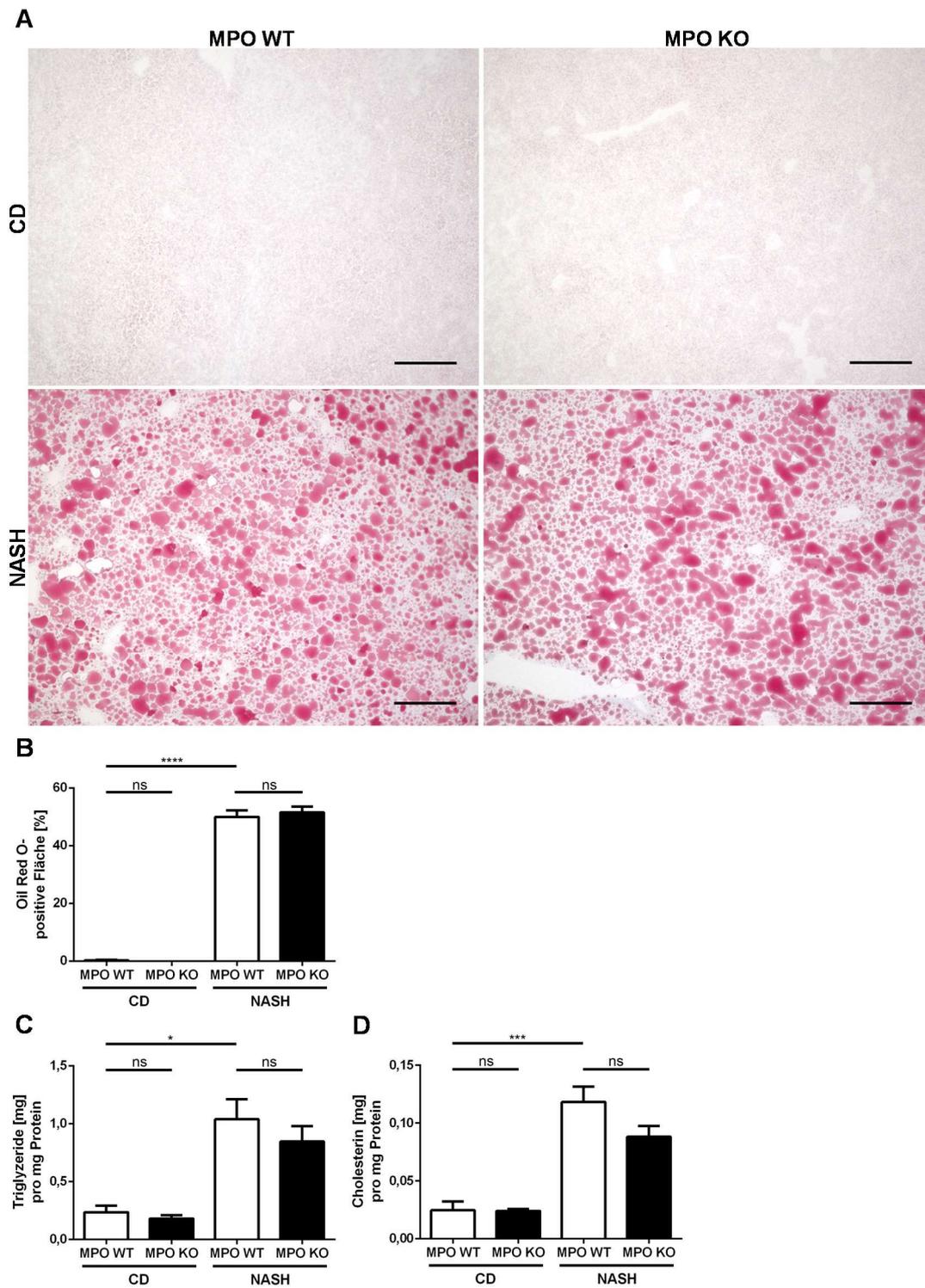


**Abb. 3.4: Metabolische Parameter von CD- und NASH-Diät-gefütterten MPO WT- und MPO KO-Mäusen**

A) Glukose- und B) Insulinkonzentration im Plasma sowie C) der daraus resultierende HOMA-IR Index, D) prozentuale Gewichtszunahme, E) Körper-, F) Lebergewichte und G) Verhältnis von Leber- zu Körpergewicht bei MPO WT- und MPO KO-C57BL/6J-Mäusen nach einer 24-wöchigen Fütterung mit einer CD- bzw. NASH-Diät ( $n_{\text{MPO WT CD}} = 4$ ;  $n_{\text{MPO KO CD}} = 6$ ;  $n_{\text{MPO WT NASH}} = 13-14$ ;  $n_{\text{MPO KO NASH}} = 16-17$ ).

In Abb. 3.4 ist erkennbar, dass die verwendete hochkalorische Diät zur Induktion der NASH weder einen Einfluss auf den Glukosestoffwechsel noch auf das Körpergewicht hat. Allerdings führte die NASH-Diät zu einer verstärkten prozentualen Gewichtszunahme, zu einem erhöhten Lebergewicht und Lebergewicht-zu-Körpergewicht-Verhältnis. Bezüglich drei der insgesamt sieben gemessenen Parameter konnte somit ein NASH-Phänotyp in diesem Mausmodell generiert werden. Dabei weisen MPO-defiziente Tiere weder unter Standard- noch unter NASH-Bedingungen hinsichtlich der untersuchten metabolischen Parameter Unterschiede verglichen mit MPO WT-Mäusen auf. Einzige Ausnahme bildet die Blutglukose, die in NASH MPO KO-Mäusen mit 158 mg/dl im Vergleich zu den MPO WT NASH-Mäusen (128 mg/dl) signifikant erhöht ist ( $p = 0,0037$ ) (Abb. 3.4A).

Durch eine Färbung der Lipidtröpfchen in der Leber und deren Quantifizierung sollte geprüft werden, ob das erhöhte Lebergewicht in den beiden NASH-Gruppen auf eine vermehrte Lipidakkumulation in der Leber zurückzuführen ist und ob ein MPO KO die Steatose beeinflusst. Mithilfe einer Lipidextraktion und der biochemischen Bestimmung des hepatischen TG- und Cholesteringehalts sollte dieses Ergebnis verifiziert werden (s. Abb. 3.5).

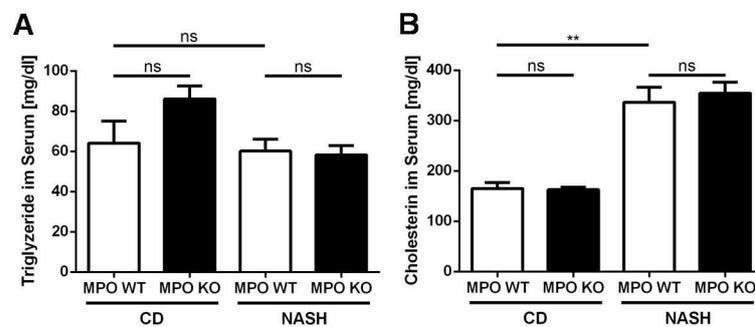


**Abb. 3.5: Analyse der Steatose in CD- und NASH-Diät-gefütterten MPO WT- und MPO KO-Mäusen**  
 A) Repräsentative Bilder der OrO-Färbung (10x Vergrößerung, Maßstab: 200  $\mu$ m), B) deren densitometrische Quantifizierung zur Steatose-Bestimmung sowie der biochemisch bestimmte C) TG- und D) Cholesteringehalt im Gesamtlebergewebe von MPO WT- und MPO KO-C57BL/6J-Mäusen nach einer 24-wöchigen Fütterung mit einer CD bzw. NASH-Diät ( $n_{\text{MPO WT CD}} = 4$ ;  $n_{\text{MPO KO CD}} = 6$ ;  $n_{\text{MPO WT NASH}} = 13-14$ ;  $n_{\text{MPO KO NASH}} = 17$ ).

Sowohl die histologische als auch die biochemische Quantifizierung zeigt eine massive Verfettung der Leber aufgrund der NASH-induzierenden Diät, wobei ein signifikanter

Einfluss des MPO KO nicht nachgewiesen werden kann (s. Abb. 3.5). Die Auswertung der OrO-Färbung ergibt für die NASH-Gruppen einen Lipidanteil von jeweils ca. 50% während bei beiden Kontrollgruppen weniger als 1% der Bildfläche OrO-gefärbt ist (s. Abb. 3.5A&B). Die biochemische Bestimmung des Lipidgehalts bestätigt dieses Ergebnis. Die Verabreichung der hochkalorischen Diät sorgt in WT-Mäusen für einen signifikanten Anstieg sowohl des hepatischen TG- als auch des hepatischen Cholesteringehalts im Vergleich zu Tieren, die über den gesamten Zeitraum das Standardfutter bekommen haben ( $p_{TG} = 0,0316$ ;  $p_{Cholesterin} = 0,0005$ ).

Zur Vervollständigung der Analyse der metabolischen Parameter wurde die TG- und die Cholesterinkonzentration im Serum bestimmt (s. Abb. 3.6).

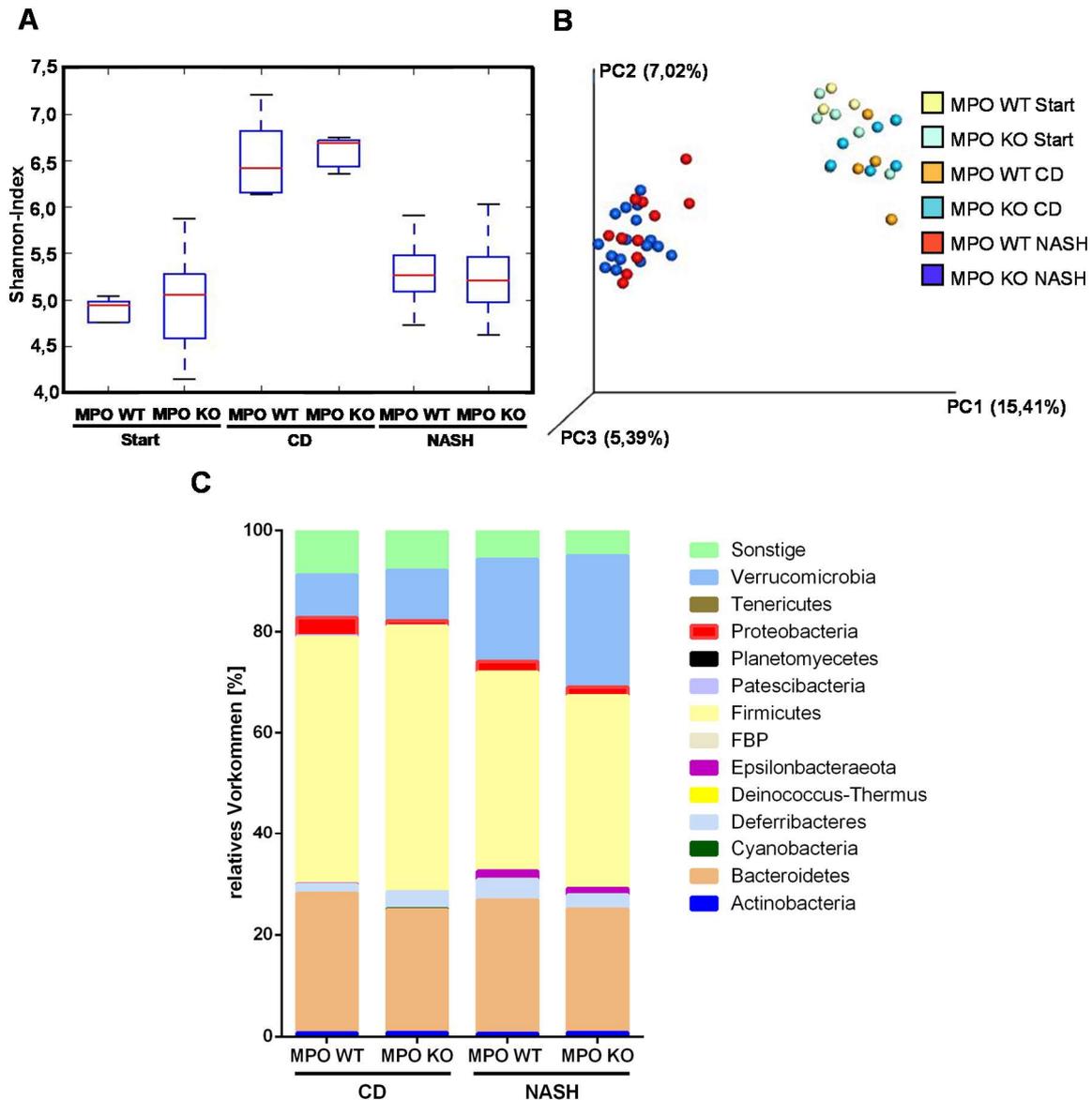


**Abb. 3.6: Analyse der Serumlipide in CD- und NASH-Diät-gefütterten MPO WT- und MPO KO-Mäusen**  
Die biochemisch bestimmte Konzentration A) der TG und B) des Cholesterins im Serum von MPO WT- und MPO-KO- C57BL/6J Mäusen nach einer 24-wöchigen Fütterung mit einer CD bzw. NASH-Diät ( $n_{MPO\ WT\ CD} = 4$ ;  $n_{MPO\ KO\ CD} = 6$ ;  $n_{MPO\ WT\ NASH} = 14$ ;  $n_{MPO\ KO\ NASH} = 17$ ).

Während hinsichtlich der TG-Serumkonzentration keine signifikanten Unterschiede auftreten, sind die NASH-Tiere durch einen erhöhten Cholesterinserumspiegel gekennzeichnet (s. Abb. 3.6). Die Konzentration steigt signifikant von ca. 165 mg/dl in den WT-Kontrolltieren auf das Zweifache aufgrund der Verabreichung der NASH-induzierenden Diät in den MPO WT-Mäusen ( $p = 0,0052$ ). Die MPO KO NASH-Tiere weisen mit einer Serum-Cholesterinkonzentration von durchschnittlich ca. 355 mg/dl einen vergleichbaren Wert auf (s. Abb. 3.6B).

Die bisherigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass MPO bei der NASH-Progression in diesem Mausmodell weder für die Ausprägung der Steatose noch für andere Leber-unspezifische Merkmale relevant ist. Zusätzlich soll der Einfluss des MPO KO auf das Mikrobiom als weiteres Leber-unspezifisches Merkmal der NASH untersucht werden, dessen

Diversität und Komposition in NAFLD-Patienten verglichen mit Kontroll-Probanden  
Veränderungen aufzeigt [136, 137].



**Abb. 3.7: Mikrobiomanalyse von CD- und NASH-Diät-gefütterten MPO WT- und MPO KO-Mäusen**

Analyse des Mikrobioms aus Stuhlproben von MPO WT- und MPO KO-C57BL/6J-Mäusen im Alter von 8 bis 12 Wochen („Start“) und aus dem Caecum der Mäuse nach einer 24-wöchigen Fütterung mit einer CD bzw. NASH-Diät ( $n_{\text{MPO WT Start}} = 4$ ;  $n_{\text{MPO KO Start}} = 5$ ;  $n_{\text{MPO WT CD}} = 4$ ;  $n_{\text{MPO KO CD}} = 6$ ;  $n_{\text{MPO WT NASH}} = 12$ ;  $n_{\text{MPO KO NASH}} = 16$ ). A) Shannon-Index im *Box-Whisker-Plot*. B) Darstellung der beta-Diversität durch einen PCoA-Plot. C) Kompositionsprofil des Mikrobioms auf Phylumebene. Es wurden keine statistischen Tests durchgeführt.

Die alpha-Diversität und somit die Anzahl verschiedener Taxa in jeder einzelnen Probe ist bei jedem Zeitpunkt und bei allen Bedingungen zwischen MPO WT und MPO KO vergleichbar. Allerdings zeigen beide CD-Gruppen mit einem Shannon-Index von ca. 6,5 eine höhere alpha-Diversität sowohl im Vergleich zu den Stuhlproben bei Versuchsstart

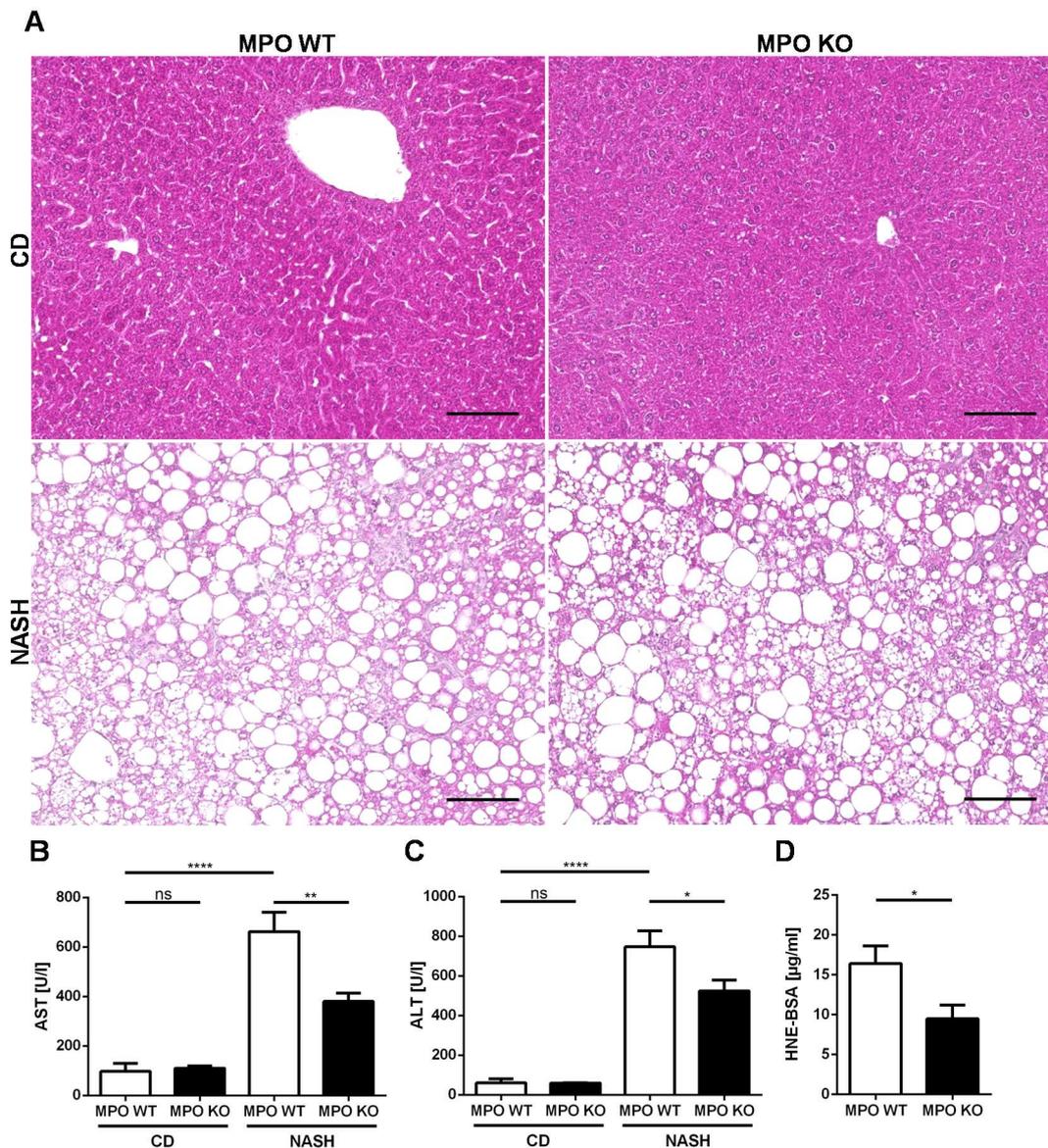
(Shannon-Index beträgt ca. 5) als auch verglichen mit den beiden NASH-Gruppen (Shannon-Index von ca. 5,2) (s. Abb. 3.7A). Anhand Abb. 3.7B wird deutlich, dass eine MPO-Defizienz bei jeder Bedingung bzw. zu jedem Zeitpunkt keine gravierenden Auswirkungen auf die beta-Diversität hat. Somit weisen MPO WT und MPO KO ein ähnliches Mikrobenspektrum auf. Allerdings wird die beta-Diversität durch die Fütterung der hochkalorischen, Cholesterin-angereicherten Fettdiät beeinflusst, wodurch sich in dem gezeigten PCoA-Plot eine abgegrenzte NASH-Population abzeichnet. Die beta-Diversität des Mikrobioms zu Beginn des Experiments und nach der 24-wöchigen CD-Fütterung weist dagegen höchstens geringfügige Unterschiede auf und eine klare Trennung der Gruppen ist nicht möglich. Aufgrund des Kompositionsprofils des Mikrobioms auf Phylumebene wird erkennbar, dass sich das relative Vorkommen der Phyla zwischen den beiden CD- und den beiden NASH-Gruppen nur unwesentlich ändert (s. Abb. 3.7B).

Die Analyse des Mikrobioms lässt darauf schließen, dass durch die hochkalorische, Cholesterin-angereicherte Fettdiät die beta-Diversität beeinflusst wird, ein Unterschied zwischen MPO WT und MPO KO allerdings weder hinsichtlich der beta-Diversität noch der Phylakomposition existiert.

#### **3.4 MPO ist im Mausmodell funktionell relevant für die NASH-Progression hinsichtlich der Fibrogenese und des Leberschadens**

Nachdem die bisherigen Analysen darauf hindeuten, dass eine MPO-Defizienz keine Auswirkungen auf die Leber-unspezifischen NASH-Merkmale sowie die Steatose hat, soll in diesem Abschnitt die Relevanz des MPO KO auf die Fibrogenese und den Leberschaden untersucht werden.

Neben einer HE-Färbung zur Visualisierung verschiedener NASH-Merkmale wie Lipidakkumulation und Infiltration von Immunzellen wurden zur Einschätzung der Leberzellschädigung und der Lipidperoxidation in der Leber die Serumtransaminasen und der HNE-Gehalt gemessen (s. Abb. 3.8).



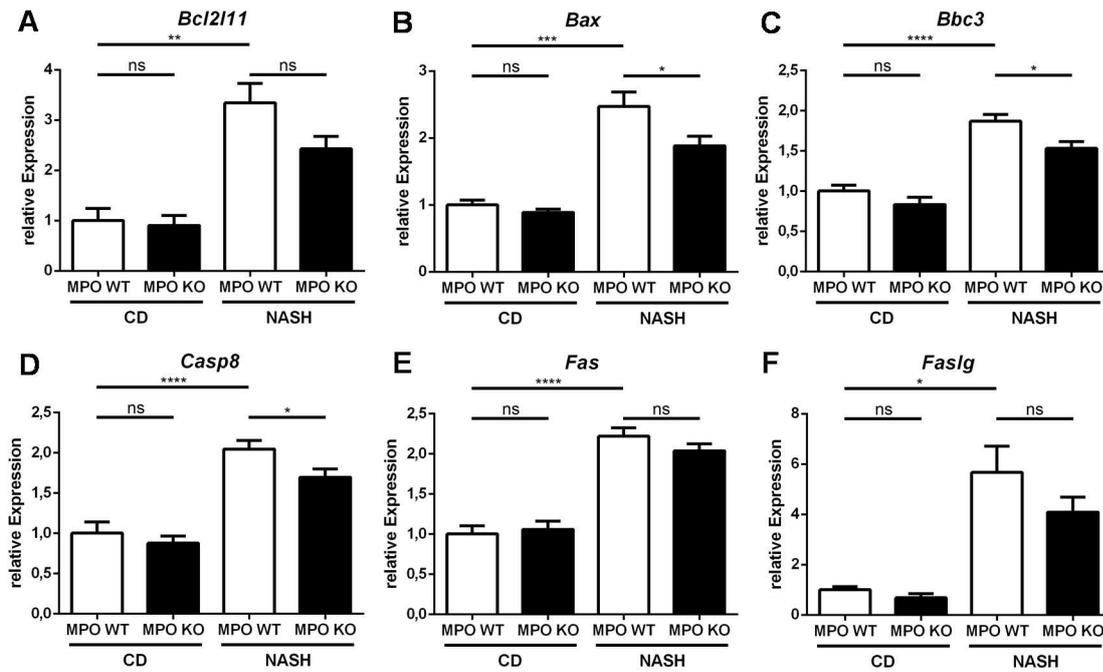
**Abb. 3.8: Analyse des Leberschadens in CD- und NASH-Diät-gefütterten MPO WT- und MPO KO-Mäusen**

A) Repräsentative Bilder einer HE-Färbung der Leber (20x Vergrößerung, Maßstab: 100  $\mu$ m) sowie B) AST- und C) ALT-Konzentration im Serum von MPO WT- und MPO-KO-C57BL/6J-Mäusen nach einer 24-wöchigen Fütterung mit einer CD bzw. NASH-Diät ( $n_{\text{MPO WT CD}} = 4$ ;  $n_{\text{MPO KO CD}} = 6$ ;  $n_{\text{MPO WT NASH}} = 13-14$ ;  $n_{\text{MPO KO NASH}} = 16$ ). D) Konzentration von HNE-Bovines Serumalbumin (BSA) in Leberlysaten der NASH-Kohorte ( $n_{\text{MPO WT}} = 14$ ;  $n_{\text{MPO KO}} = 16$ ). Hierbei diente ein ungepaarter t-Test zur Berechnung der Signifikanz.

Die HE-Färbung visualisiert neben der Steatose zusätzlich die Infiltration von Immunzellen sowie eine Schädigung des Lebergewebes in den Lebern der NASH-Diät-gefütterten Tiere. Im Gegensatz dazu zeigen die Lebern der Kontrolltiere wie erwartet keine Auffälligkeiten wie Immunzellinfiltrate oder pathologisch veränderte Hepatozyten (s. Abb. 3.8A). Der Vergleich der beiden WT-Gruppen hinsichtlich der Serumtransaminasen zeigt ebenfalls die massive Schädigung der Leber durch die NASH-induzierende Diät, da die ALT-Konzentration mehr

als das Zwölfwache ( $p < 0,0001$ ) und die AST-Konzentration mehr als das Sechsfache ( $p < 0,0001$ ) im Vergleich zur WT CD-Kohorte beträgt. Während ein MPO KO unter Standardbedingungen keinen signifikanten Einfluss auf die Transaminasenkonzentration hat, weisen in den NASH-Kohorten MPO-defiziente Tiere signifikant niedrigere AST- und ALT-Konzentrationen als die WT-Mäuse auf (AST: 662 U/l bei MPO WT NASH zu 381 U/l bei MPO KO NASH;  $p = 0,0012$ ; ALT: 747 U/l zu 525 U/l;  $p = 0,0364$ ) (s. Abb. 3.8B&C). Dies deutet auf einen schwächer ausgeprägten Leberschaden in der MPO KO-Gruppe hin. Eine vergleichbare Aussage kann bezüglich der Lipidperoxidation, die mittels der Messung des an Bovines Serumalbumin (BSA) gebundenen HNE analysiert wurde, getroffen werden. Die Bestimmung des HNE-BSA in Leberlysaten von MPO WT NASH- und MPO KO NASH-Mäusen ergab, dass die HNE-BSA-Konzentration in der KO-Gruppe mit 9,5  $\mu\text{g/ml}$  signifikant geringer als in der WT-Gruppe (16,4  $\mu\text{g/ml}$ ) ist ( $p = 0,0185$ ) (s. Abb. 3.8D). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der MPO KO die NASH-abhängige Leberschädigung, die mit einer gesteigerten Lipidperoxidation assoziiert ist, signifikant verringert.

Eine Schädigung der Hepatozyten und vermehrt auftretende Lipotoxizität aufgrund von Lipidperoxidation führen mitunter auch zum Zelltod. Bei der Apoptose handelt es sich somit um ein Kennzeichen der NASH. Zwei Studien konnten zeigen, dass die Anzahl an apoptotischen Hepatozyten bei der NASH im Vergleich zu der NAFL deutlich erhöht ist und mit der Ausprägung der Erkrankung korreliert [138, 139]. Aus diesem Grund wurde die Expression von Genen untersucht, die für proapoptische Faktoren kodieren. Dabei kann zwischen Mediatoren des intrinsischen, Mitochondrien-vermittelten und des extrinsischen, Todesrezeptor-vermittelten Apoptosesignalwegs unterschieden werden. Während die untersuchten Gene *Bax*, *Bcl2l11* und *Bbc3* zur intrinsischen Signalkaskade gehören, wurde die Induktion der extrinsischen Signalkaskade durch die Expressionsanalyse der Gene *Casp8*, *Fas* und *Faslg* überprüft (s. Abb. 3.9) [140].

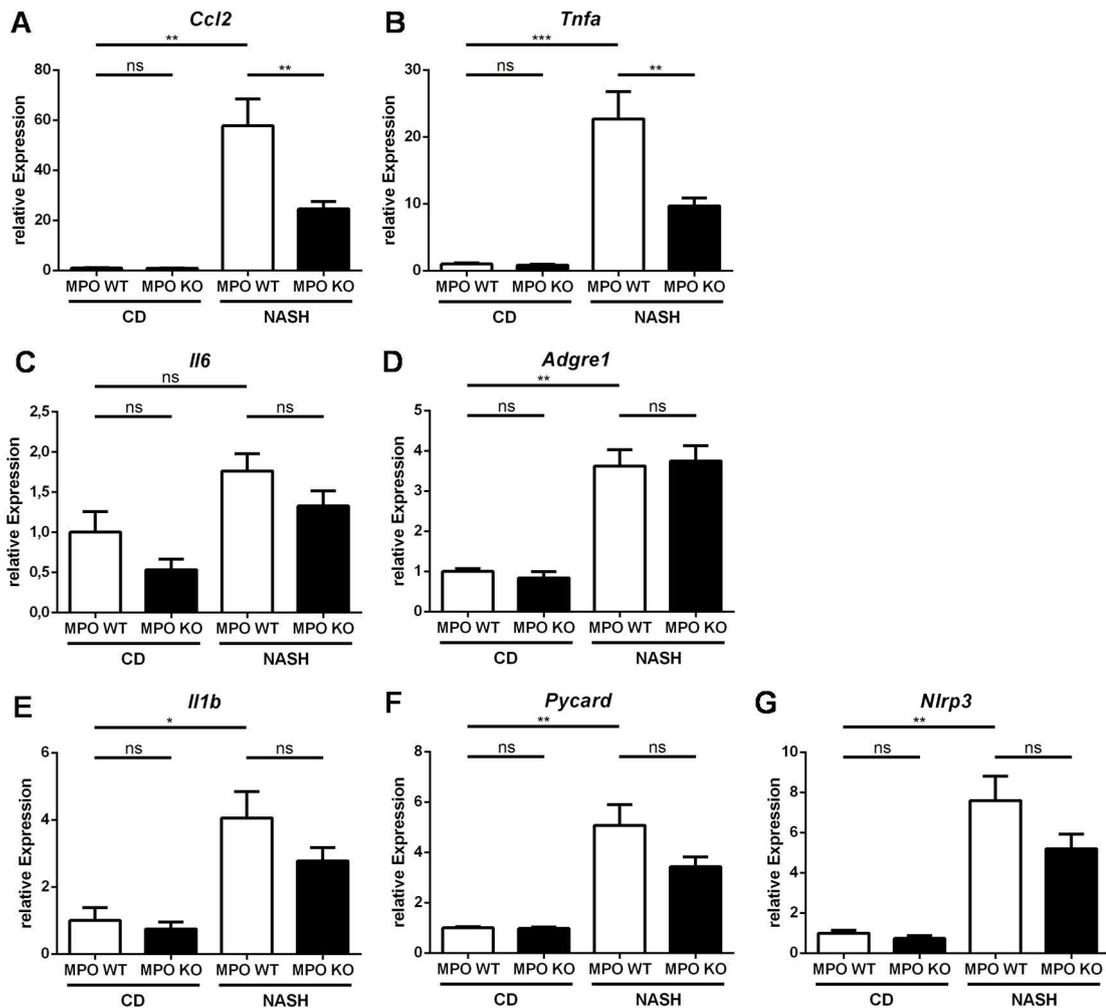


**Abb. 3.9: Expression von proapoptotischen Genen in CD- und NASH-Diät-gefütterten MPO WT- und MPO KO-Mäusen**

Die relative Expression der proapoptotischen Gene A) *Bcl2l11*, B) *Bax*, C) *Bbc3*, D) *Casp8*, E) *Fas* und F) *Faslg* im Gesamtlebergewebe von MPO WT- und MPO KO-C57BL/6J-Mäusen nach einer 24-wöchigen Fütterung mit einer CD bzw. NASH-Diät ( $n_{\text{MPO WT CD}} = 4$ ;  $n_{\text{MPO KO CD}} = 6$ ;  $n_{\text{MPO WT NASH}} = 14$ ;  $n_{\text{MPO KO NASH}} = 17$ ).

Die Fütterung mit der hochkalorischen, Cholesterin-angereicherten Fettdiät sorgt generell für eine Induktion der Expression aller untersuchten proapoptotischen Gene in der Leber (s. Abb. 3.9). Im Vergleich zu den WT CD-gefütterten Kontrolltieren zeigen die MPO WT NASH-Mäuse eine 1,9- bis 5,8-fache erhöhte Expression ( $p_{Bcl2l11} = 0,0021$ ;  $p_{Bax} = 0,0005$ ;  $p_{Bbc3} < 0,0001$ ;  $p_{Casp8} < 0,0001$ ;  $p_{Fas} < 0,0001$ ;  $p_{Faslg} = 0,0174$ ). Während bei den unbehandelten Kontrolltieren kein Einfluss des MPO-Genotyps festgestellt werden konnte, führt ein MPO KO bei den Tieren mit einer induzierten NASH zu einer signifikanten Reduktion der Expression bei drei der sechs untersuchten proapoptotischen Gene. Dabei sind mit *Bax* ( $p = 0,0381$ ) und *Bbc3* ( $p = 0,0134$ ) zwei Gene involviert, die für Faktoren des intrinsischen Apoptosesignalwegs kodieren, und mit *Casp8* ( $p = 0,0472$ ) ein Mitglied des extrinsischen. Allerdings ist anzumerken, dass mit *Bcl2l11* auch beim dritten untersuchten Gen, das für einen Bestandteil des intrinsischen Signalwegs kodiert, eine schwächere Expression bei den MPO KO NASH-Tieren vorliegt ( $p = 0,0853$ ) (s. Abb. 3.9A). Die in Abb. 3.9 gezeigten Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Verstärkung der proapoptotischen Signale im Zusammenhang der NASH aufgrund des MPO KO abgeschwächt wird.

Ein weiteres Merkmal der NASH ist die Inflammation. Diese zeichnet sich durch die Expression verschiedener proinflammatorischer Zytokine und Chemokine aus. In Abb. 3.10 ist die hepatische Genexpression von Zytokinen und Chemokinen, die für die NASH-Progression relevant sind, dargestellt. Zudem kann aufgrund der Genexpressionsanalyse von *Adgre1*, das für den KC-Marker F4/80 kodiert, auf die KC-Frequenz in der Leber geschlossen werden.



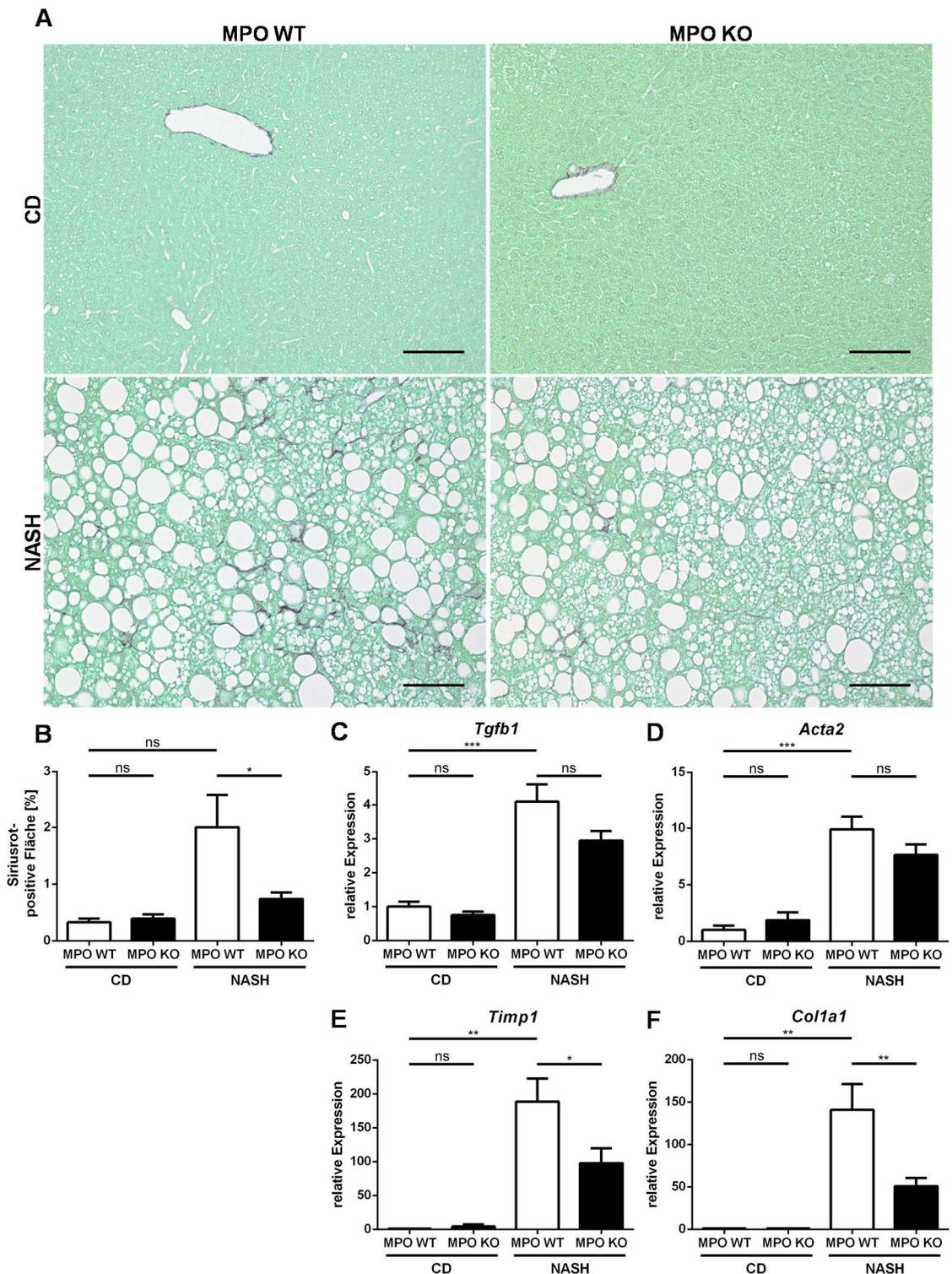
**Abb. 3.10: Expression von proinflammatorischen Genen in CD- und NASH-Diät-gefütterten MPO WT- und MPO KO-Mäusen**

Die relative Expression der proinflammatorischen Gene A) *Ccl2*, B) *Tnfa* und C) *Il6* sowie D) des KC- und Makrophagenmarkers *Adgre1* und der Inflammasom-assoziierten Gene E) *Il1b*, F) *Pycard* und G) *Nlrp3* im Gesamtlebergewebe von MPO WT- und MPO KO-C57BL/6J-Mäusen nach einer 24-wöchigen Fütterung mit einer CD bzw. NASH-Diät ( $n_{\text{MPO WT CD}} = 4$ ;  $n_{\text{MPO KO CD}} = 6$ ;  $n_{\text{MPO WT NASH}} = 11-14$ ;  $n_{\text{MPO KO NASH}} = 15-17$ ).

Bei keinem Gen konnte ein signifikanter Einfluss des MPO KO auf die Expressionsstärke unter Normalbedingungen nachgewiesen werden. Dagegen kann ein Einfluss der Fütterung dokumentiert werden: Mit Ausnahme von *Il6* wird die Expression aller anderen untersuchten

proinflammatorischen Gene durch die NASH-Diät signifikant induziert ( $p_{Ccl2} = 0,0011$ ;  $p_{Tnfa} = 0,0007$ ;  $p_{Adgre1} = 0,0050$ ;  $p_{Il1b} = 0,0312$ ;  $p_{Pycard} = 0,0035$ ;  $p_{Nlrp3} = 0,0038$ ) (s. Abb. 3.10). Bezüglich der *Tnfa*- und *Ccl2*-Expression wird dieses Merkmal durch einen MPO KO deutlich abgeschwächt, da MPO-defiziente Tiere weniger als die Hälfte dieser proinflammatorischen Mediatoren exprimieren (*Tnfa*: 22,7 bei MPO WT NASH zu 9,7 bei MPO KO NASH;  $p = 0,0022$ ; *Ccl2*: 57,8 zu 24,6;  $p = 0,0037$ ) (s. Abb. 3.10A&B). Hinsichtlich der anderen gemessenen Gene konnte kein signifikanter Unterschied zwischen WT-Mäusen und MPO-defizienten Tieren, die mit der NASH-induzierenden Diät gefüttert wurden, gemessen werden. Somit scheint ein MPO KO das proinflammatorische Milieu bei der NASH abzuschwächen, wobei die Komponenten des Inflammasoms davon ausgenommen sind. Außerdem lässt die vergleichbare Expression von *Adgre1* bei MPO WT und MPO KO NASH-Mäusen darauf schließen, dass die hepatische KC-Frequenz nicht von MPO beeinflusst wird (s. Abb. 3.10D).

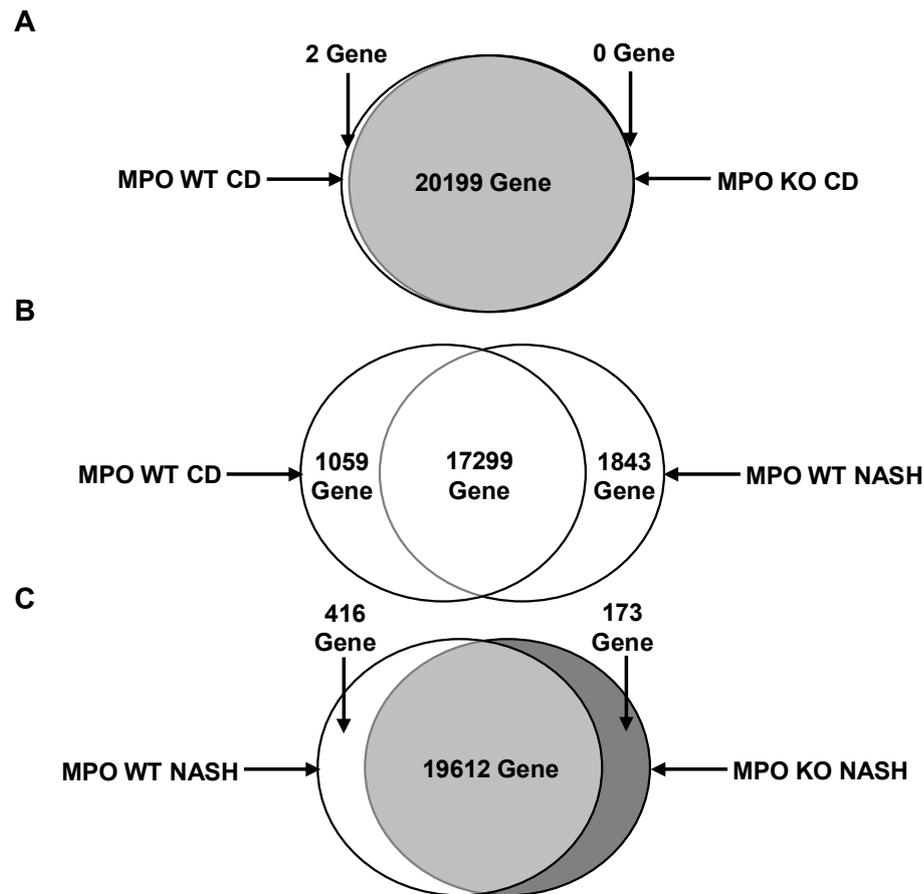
Zur finalen Charakterisierung des NASH-Phänotyps in MPO WT- und MPO KO-Mäusen soll der Fortschritt der Fibrogenese untersucht werden. Die Analyse der Auswirkungen des MPO KO auf die Fibrose ist dabei von zentraler Bedeutung, da die Fibrose als wichtiges Indiz für die Prognose der Erkrankung gilt [9]. Aus diesem Grund wurde die Fibrose sowohl auf Protein- als auch auf Genebene charakterisiert (s. Abb. 3.11).



**Abb. 3.11: Evaluation der Fibrose in CD- und NASH-Diät-gefütterten MPO WT- und MPO KO-Mäusen**  
 A) Repräsentative Bilder der SR-Färbung (20x Vergrößerung, Maßstab: 100  $\mu$ m), B) die densitometrische Quantifizierung der SR-Färbung zur Bestimmung der Fibrose auf Proteinebene sowie die relative Expression der profibrotischen Gene C) *Tgfb1*, D) *Acta2*, E) *Timp1* und F) *Col1a1* im Gesamtlebergewebe von MPO WT- und MPO KO-C57BL/6J-Mäusen nach einer 24-wöchigen Fütterung mit einer CD bzw. NASH-Diät ( $n_{\text{MPO WT CD}} = 3-4$ ;  $n_{\text{MPO KO CD}} = 6$ ;  $n_{\text{MPO WT NASH}} = 13-14$ ;  $n_{\text{MPO KO NASH}} = 17$ ).

Abb. 3.11A&B verdeutlicht, dass die auf die NASH-Diät zurückzuführende vermehrte Bildung von Kollagenfasern durch einen MPO KO signifikant vermindert wird. Die Quantifizierung der SR-gefärbten Fläche ergibt eine um mehr als die Hälfte reduzierte Kollagendeposition in den Lebern der MPO KO NASH-Mäuse im Vergleich zu WT NASH-Mäusen ( $p = 0,0277$ ) (s. Abb. 3.11B). Die repräsentativen Aufnahmen der SR-Färbung zeigen, dass die Kontrolltiere lediglich um die Gefäße Kollagen aufweisen, während in den Lebern von MPO WT NASH-Mäusen Kollagenfasern detektiert werden, die zwischen den Portalfeldern verlaufen (s. Abb. 3.11A). Neben der Evaluation der bereits existierenden Fibrose auf Proteinebene sollte ebenfalls die Expression verschiedener profibrotischer Gene in der Leber analysiert werden. Bei allen untersuchten Genen ist eine signifikante Induktion aufgrund der Verabreichung der NASH-induzierenden Diät bei MPO WT-Mäusen gemessen worden (*Tgfb1*: 4,1-fach;  $p = 0,0010$ ; *Acta2*: 9,9-fach;  $p = 0,0003$ ; *Colla1*: 140,8-fach;  $p = 0,0046$ ; *Timp1*: 188,7-fach;  $p = 0,0041$ ) (s. Abb. 3.11C-F). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass das verwendete NASH-Modell ebenfalls hinsichtlich des wichtigen Parameters Fibrose einen verlässlichen Phänotyp generiert. Die Ausbildung der Fibrose wird dabei durch einen MPO KO sowohl auf Protein- als auch auf Expressionsebene deutlich gemildert. Die MPO-Defizienz führt in den NASH-Lebern zu einer ca. 50%igen bzw. mehr als 60%igen Reduktion der Expression der profibrotischen Gene *Timp1* und *Colla1* ( $p_{Timp1} = 0,0366$ ;  $p_{Colla1} = 0,0042$ ; (s. Abb. 3.11E&F).

Zur Identifikation von weiteren Genen und Signalwegen, die durch einen MPO KO beeinflusst werden, wurde ein *Microarray* durchgeführt, wodurch die relative Expression von über 20 000 Genen bestimmt werden konnte. Zuerst wurde analysiert, wie viele Gene sich signifikant zwischen den einzelnen Gruppen unterscheiden. Das Ergebnis ist in Abb. 3.12 mithilfe von Venn-Diagrammen dargestellt.

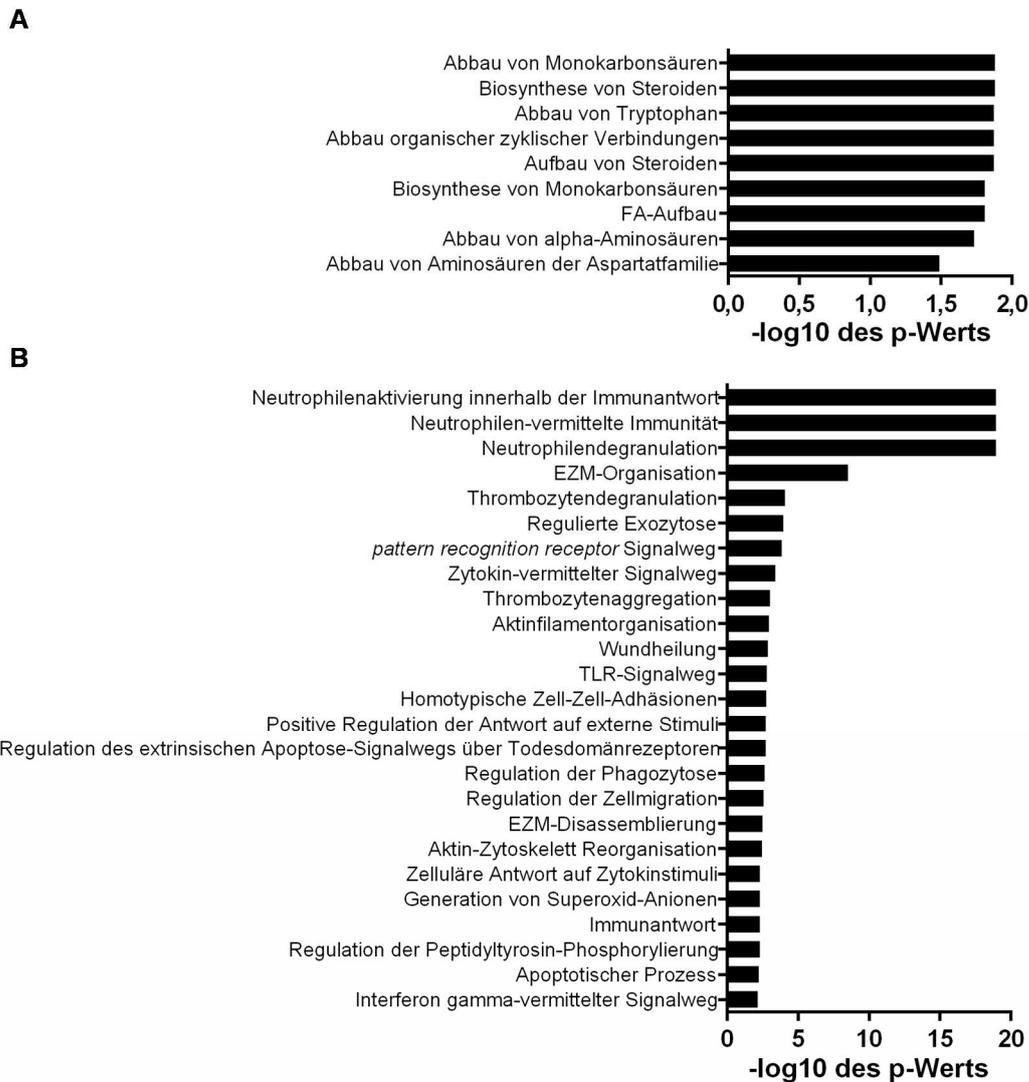


**Abb. 3.12: Einfluss der Diät bzw. des Genotyps auf das Expressionsmuster bei CD- und NASH-Diät-gefütterten MPO WT- und MPO KO-Mäusen**

Auf Grundlage der Ergebnisse des *Microarrays* erstellte Venn-Diagramme der Lebern von MPO WT- und MPO KO-C57BL/6J-Mäusen nach einer 24-wöchigen Fütterung mit einer CD bzw. NASH-Diät ( $n = 3$ ). Links und rechts: Anzahl der Gene, deren Expression im Vergleich zur anderen Gruppe signifikant erhöht ist ( $p < 0,05$ ). Mitte: Anzahl der nicht signifikant veränderten Expression beider Gruppen. Folgende Gruppen wurden miteinander verglichen: A) MPO WT CD vs. MPO KO CD; B) MPO WT CD vs. MPO WT NASH; C) MPO WT NASH vs. MPO KO NASH.

Der Genotyp wirkt sich unter Standardbedingungen signifikant nur auf die Expression von zwei Genen aus (s. Abb. 3.12A), sodass unter Kontrollbedingungen der MPO-Genotyp kaum einen Einfluss auf die hepatische Genexpression hat. Anders verhält es sich unter NASH-Bedingungen: Eine MPO-Defizienz sorgt in der geschädigten Leber für eine signifikant reduzierte Expression von 416 Genen während die Expression von 173 Genen induziert wird (s. Abb. 3.12C). Diese Ergebnisse zeigen, dass Unterschiede hinsichtlich der hepatischen Genexpression zwischen MPO KO und MPO WT im Zusammenhang mit NASH auftreten. Außerdem wird durch Abb. 3.12B ein entscheidender Einfluss der NASH-induzierenden Diät auf das Expressionsprofil der Leber dokumentiert, da sich die Expression von 2902 der 20201 gemessenen Gene signifikant zwischen MPO WT CD und MPO WT

NASH unterscheidet. Diese 2902 Gene wurden zur Identifizierung von Signalwegen, auf die sich eine MPO-Defizienz unter NASH-Bedingungen auswirkt, verwendet. Somit kann die Bedeutung eines MPO KO auf NASH-relevante Signalwege analysiert werden (s. Abb. 3.13).

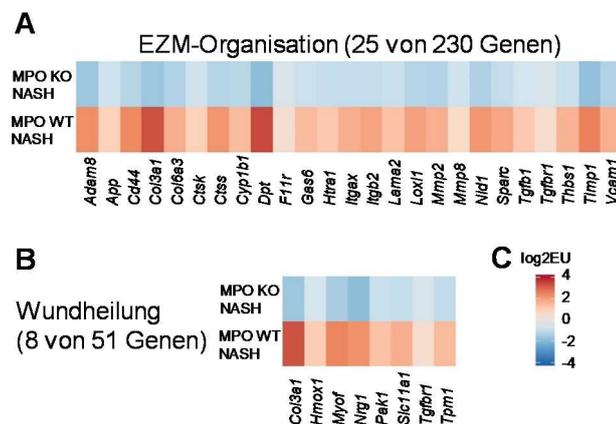


### Abb. 3.13: Übersicht der MPO-abhängigen Signalwege in NASH

Anhand der *Microarray*-Analyse identifizierte Signalwege, die durch einen MPO-KO bei NASH in den Lebern von MPO WT- und MPO KO-C57BL/6J-Mäusen nach einer 24-wöchigen Fütterung mit einer CD bzw. NASH-Diät ( $n = 3$ ) signifikant reguliert werden. Dargestellt ist der negative Zehnerlogarithmus des p-Wertes, der sich durch die an dem jeweiligen Signalweg beteiligten Gene ergibt. Für die Kalkulation wurden Gene berücksichtigt, die signifikant unterschiedlich ( $p < 0,05$ ) zwischen MPO WT CD und MPO WT NASH und anschließend zwischen MPO WT NASH und MPO KO NASH exprimiert sind. A) Alle Signalwege, die bei NASH in MPO WT-Lebern herunterreguliert sind. B) Die 25 wichtigsten Signalwege, die bei NASH in MPO WT-Lebern hochreguliert sind.

Es konnten neun Signalwege detektiert werden, bei denen beteiligte Gene aufgrund der MPO-Defizienz unter NASH-Bedingungen signifikant stärker exprimiert werden als im WT. Dabei werden aufgrund des MPO KO nur Signalwege, die metabolische Prozesse

regulieren, aktiviert (s. Abb. 3.13A). Dagegen bewirkt ein MPO KO bei der NASH eine signifikant reduzierte Expression von Genen, die an insgesamt 75 verschiedenen Signalwegen beteiligt sind. Von diesen 75 Signalwegen sind die 25 bedeutendsten in Abb. 3.13B dargestellt. Einige dieser Signalwege sind mit einer erhöhten Bildung der EZM, einer verstärkten Aktivität von Neutrophilen oder mit immunologischen Prozessen assoziiert. Von einigen Signalwegen wurden *Heatmaps* mit den an den jeweiligen Signalwegen beteiligten Genen angefertigt. Abb. 3.14 zeigt Signalwege, die mit der EZM assoziiert sind.



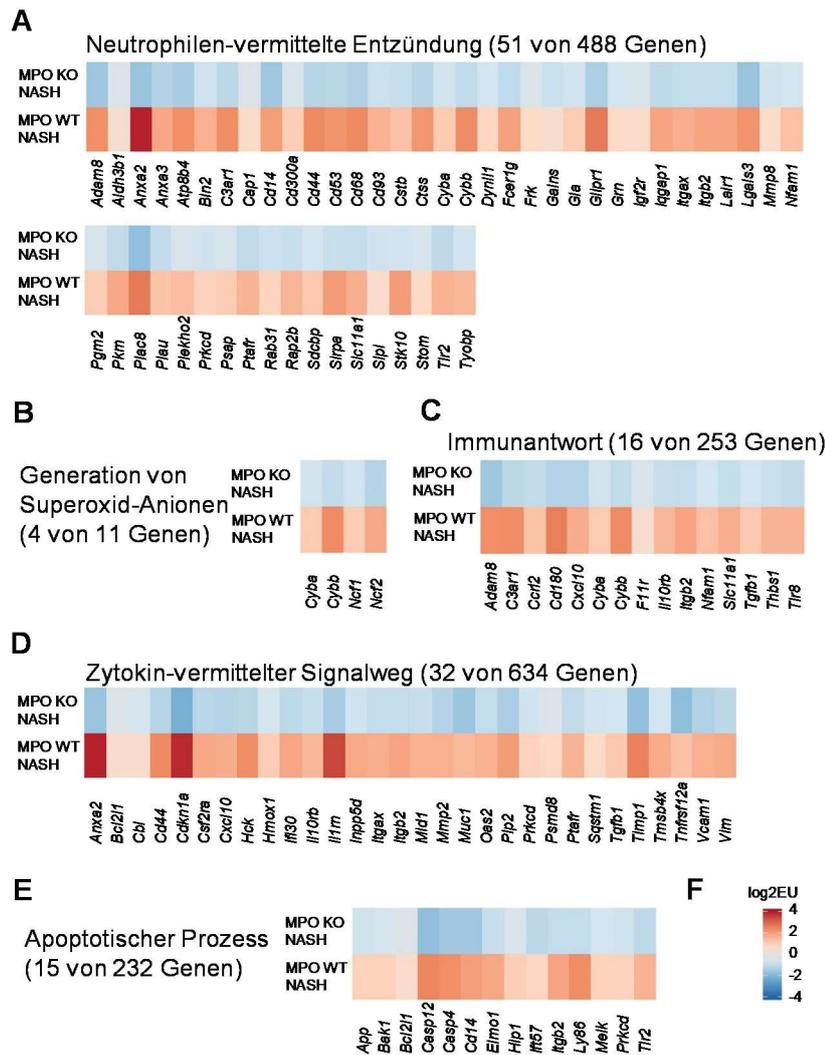
**Abb. 3.14: Heatmaps von EZM-assoziierten Genen**

*Heatmaps* basierend auf der *Microarray*-Analyse, die den Log<sub>2</sub> des Expressionsunterschied zwischen MPO WT NASH und MPO WT CD (untere Reihe) bzw. zwischen MPO KO NASH und MPO WT NASH (obere Reihe) zeigen. Die Gene sind an den Signalwegen A) zur EZM-Organisation und B) zur Wundheilung beteiligt. Der *Microarray* erfolgte mit RNA aus Gesamtlebergewebe von MPO WT- und MPO KO-C57BL/6J-Mäusen nach einer 24-wöchigen Fütterung mit einer CD bzw. NASH-Diät (n=3). C) Farbskala zur Visualisierung des Expressionsunterschieds (EU).

Von den insgesamt 230 Genen, die an der EZM-Organisation beteiligt sind, ist die Expression von 25 Genen bei der MPO KO NASH-Gruppe im Vergleich zur MPO WT NASH-Gruppe signifikant reduziert (s. Abb. 3.14A). *Tgfb1* und *Col3a1* sind sowohl an dem Signalweg zur EZM-Organisation als auch an der Wundheilung beteiligt, wobei es bei der Wundheilung ebenfalls zur vermehrten Bildung von EZM kommt. Eine chronische Aktivierung des Wundheilungsprozesses gilt als bedeutender Mechanismus bei der hepatischen Fibrogenese [141]. Zum Signalweg der Wundheilung gehören insgesamt 51 Gene von denen acht von der MPO WT NASH-Gruppe signifikant stärker als von der MPO KO NASH-Kohorte exprimiert werden (s. Abb. 3.14B). Die Ergebnisse dieser *Microarray*-Analyse bestätigen die Messungen einzelner profibrotischer Gene (s. Abb. 3.11): die NASH-

Diät induziert die Expression von Genen, die zur vermehrten EZM-Bildung führen. Durch eine MPO-Defizienz wird diese Induktion signifikant reduziert.

Die Ergebnisse der qPCR deuten darauf hin, dass durch den MPO KO die NASH-assoziierte Immunantwort, Inflammation und Apoptose abgeschwächt wird (s. Abb. 3.9 und 3.10). In Abb. 3.15 sind die *Heatmaps* von Signalwegen, die mit Entzündung und Zelltod assoziiert sind, dargestellt.



**Abb. 3.15: Heatmaps von Entzündungs- und Apoptose-assoziierten Genen**

*Heatmaps* basierend auf der *Microarray*-Analyse, die den Log<sub>2</sub> des Expressionsunterschieds zwischen MPO WT NASH und MPO WT CD (untere Reihe) bzw. zwischen MPO KO NASH und MPO WT NASH (obere Reihe) zeigen. Die Gene sind an den Signalwegen A) zur Neutrophilen-vermittelten Entzündung, B) zur Generation von Superoxid-Anionen, C) zur Immunantwort, D) des Zytokin-vermittelten Signalwegs sowie E) zum apoptotischen Prozess beteiligt. Der *Microarray* erfolgte mit RNA aus Gesamtlebergewebe von MPO WT- und MPO KO-C57BL/6J-Mäusen nach einer 24-wöchigen Fütterung mit einer CD bzw. NASH-Diät (n=3). F) Farbskala zur Visualisierung des Expressionsunterschieds (EU).

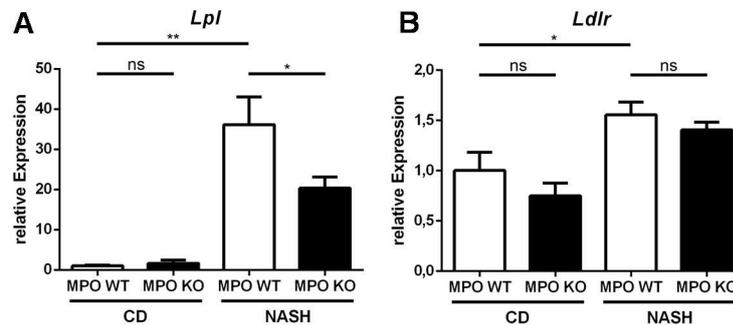
Bei der NASH erfolgt eine Infiltration der Leber mit Neutrophilen Granulozyten (s. Abb. 3.3B&C). In Abb. 3.15A&B sind die Neutrophilen-assoziierten Signalwege dargestellt. Die Verabreichung der Cholesterin-angereicherten Fettdiät führt zur Induktion der Expression von Genen in MPO WT-Tieren, die an der Neutrophilen-vermittelten Entzündung beteiligt sind. 51 von 488 Genen dieses Signalwegs sind in der MPO KO NASH-Kohorte verglichen mit der MPO WT-Gruppe signifikant reduziert (s. Abb. 3.15A). Bei dem Signalweg zur Generation von Superoxid-Anionen, die ein Ausgangsprodukt von MPO sind, sind dies vier von insgesamt elf Genen (s. Abb. 3.15B). Eines dieser vier Gene ist *Cybb*, das ebenfalls Bestandteil der generellen Immunantwort ist. Es gehört bei den 16 von 253 Genen dieses Signalwegs zu den am stärksten regulierten Genen (s. Abb. 3.15C). Einen entscheidenden Einfluss hat der MPO KO unter NASH-Bedingungen ebenfalls auf den Zytokin-vermittelten Signalweg, bei dem 32 von 634 Genen durch die MPO-Defizienz signifikant schwächer exprimiert werden (s. Abb. 3.15D), und auf den Signalweg zum apoptotischen Prozess. Dabei sind 15 der insgesamt 232 Gene bei MPO WT NASH signifikant stärker exprimiert als bei MPO KO NASH (s. Abb. 3.15E). Die *Microarray*-Analyse verdeutlicht somit, dass MPO einen relevanten Einfluss auf NASH-induzierte Genexpressionsmuster in der Leber hat, während der MPO-Genotyp die hepatische Genexpression unter Kontrollbedingungen kaum beeinflusst.

Abschließend kann zusammengefasst werden, dass das verwendete Diät-basierte, murine NASH-Modell einen charakteristischen NASH-Phänotyp in Hinblick auf Steatose, Leberschädigung, Inflammation und Fibrose erzeugt. Mit Ausnahme der Steatose sorgt ein MPO KO für eine signifikante Abschwächung dieser Symptome. Eine Aussage zum Einfluss der *Mpo*-Expression auf den Glukosestoffwechsel kann nicht getätigt werden, da die verwendete Diät keine Insulinresistenz hervorruft. Zudem scheint der MPO KO keinen Einfluss auf den Lipidmetabolismus zu haben.

### **3.5 Das murine NASH-Modell führt zu einer Induktion der hepatischen *Lpl*-Expression**

Nachdem in NASH-Patienten eine gesteigerte hepatische *LPL*-Expression verglichen mit Kontrollpatienten dokumentiert wurde (s. Abb. 3.2), sollte überprüft werden, ob in dem

verwendeten, diätischen murinen NASH-Modell ebenfalls eine verstärkte hepatische *Lpl*-Expression auftritt (s. Abb. 3.16).



**Abb. 3.16: Expression von *Lpl* und *Ldlr* in CD- und NASH-Diät-gefütterten MPO WT- und MPO KO-Mäusen**

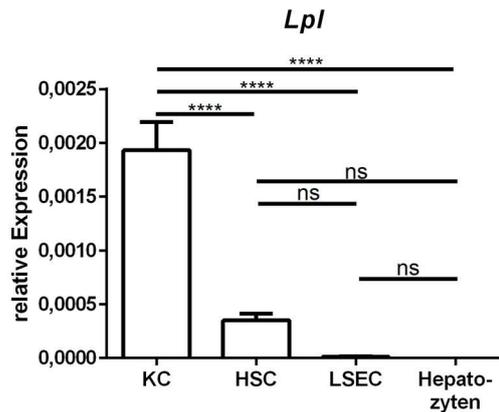
Die relative Expression der Lipidstoffwechsel-assoziierten Gene A) *Lpl* und B) *Ldlr* im Gesamtlebergewebe von MPO WT- und MPO KO-C57BL/6J-Mäusen nach einer 24-wöchigen Fütterung mit einer CD bzw. NASH-Diät ( $n_{\text{MPO WT CD}} = 4$ ;  $n_{\text{MPO KO CD}} = 6$ ;  $n_{\text{MPO WT NASH}} = 12-13$ ;  $n_{\text{MPO KO NASH}} = 17$ ).

Die Fütterung mit der NASH-Diät bewirkt eine 36,1-fach-erhöhte *Lpl*-Expression in MPO WT NASH-Mäusen in Relation zur WT-Kontrollgruppe ( $p = 0,0017$ ; s. Abb. 3.16A). Interessanterweise weist die MPO KO NASH-Kohorte nur eine 20,3-fache Expression auf. Somit reduziert der MPO KO die NASH-abhängige hepatische *Lpl*-Expression signifikant ( $p = 0,0360$ ). Da die verwendete NASH-induzierende Diät einen erhöhten Cholesteringehalt aufweist, sollte untersucht werden, ob die hepatische *Ldlr*-Expression beeinflusst wird. Tatsächlich führt die Verabreichung der NASH-Diät zu einem signifikanten Anstieg der *Ldlr*-Expression von 60% in den MPO WT-Tieren ( $p = 0,0394$ ). Ein Einfluss des MPO KO konnte nicht detektiert werden.

Nachdem die Induktion der hepatischen *Lpl*-Expression im murinen NASH-Modell nachgewiesen wurde, sollten im zweiten Teil dieser Arbeit die Auswirkungen von zellspezifischen LPL-Deletionen auf die NASH-Progression untersucht werden.

### 3.6 Identifikation von KC und HSC als *Lpl*-exprimierende Zellpopulationen in der gesunden Leber

In der Literatur ist bereits beschrieben, dass Hepatozyten bei gesunden Probanden kein *LPL* exprimieren, während Makrophagen und somit auch KC *LPL* produzieren (s. 1.6.4). Zur Überprüfung, welche hepatischen Zellpopulationen in der gesunden murinen Leber *Lpl* exprimieren, wurde das *Lpl*-Expressionsniveau von Hepatozyten, KC, nicht-aktivierten HSC und LSEC mittels qPCR bestimmt (s. Abb. 3.17).



**Abb. 3.17: *Lpl*-Expression in der Leber**

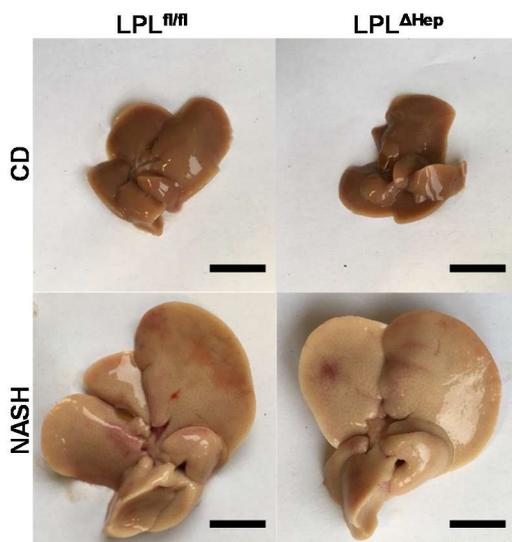
Die relative *Lpl*-Expression in KC, HSC, LSEC und Hepatozyten isoliert aus CD-gefütterten gesunden C57BL/6J-Mäusen ( $n_{\text{Hepatozyten}} = 4$ ;  $n_{\text{KC}} = 4$ ;  $n_{\text{HSC}} = 3$ ;  $n_{\text{LSEC}} = 4$ ). Es wurde eine ANOVA mit anschließendem Tukey's Post hoc Test zur statistischen Validierung durchgeführt, wodurch alle Gruppen miteinander verglichen wurden.

Anhand Abb. 3.17 wird ersichtlich, dass KC die höchste relative *Lpl*-Expression mit 0,0019 aufweisen. Außerdem kann in nicht-aktivierten HSC mit einer zum *Housekeeper*-relativierten Expression von 0,00035 eine *Lpl*-Expression gemessen werden. Diese ist allerdings signifikant schwächer als die Expression in KC ( $p < 0,0001$ ). In den isolierten Hepatozyten und LSEC kann keine *Lpl*-Expression nachgewiesen werden.

### 3.7 Eine Hepatozyten-spezifische LPL-Deletion hat keinen Einfluss auf die NASH-Progression

In dieser Arbeit und in vorherigen Studien konnte die Induktion der *LPL*-Expression in der Leber bei der NASH gezeigt werden. Bislang wurde nur der Einfluss der *Lpl*-Expression in HSC in einem NASH-Mausmodell untersucht [120]. Inwieweit andere Zellpopulationen an der induzierten hepatischen *LPL*-Expression bei der NASH beteiligt sind und welche Folgen diese Expression für die Progression der Erkrankung hat, sind allerdings unbekannt. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit sowohl die Konsequenzen einer Hepatozyten-spezifischen LPL-Deletion als auch die eines LPL KO, der die myeloiden Zellen und somit auch KC umfasst, auf die NASH-Progression und die hepatische *Lpl*-Expression untersucht. Dieses Kapitel beschreibt den NASH-Phänotyp von Mäusen mit einem Hepatozyten-spezifischen LPL KO. Zur Induktion der NASH im Mausmodell wurde die gleiche Diät wie in den Kapiteln 3.2 bis 3.5 verwendet. Da in diesen Abschnitten bereits die Unterschiede der NASH-Kohorte zur Kontrollgruppe beschrieben wurden und somit auf den generierten NASH-Phänotyp bei WT-Mäusen eingegangen worden ist, liegt der Fokus bei den folgenden Daten auf den Unterschieden zwischen  $LPL^{\Delta/\Delta}$  NASH- und  $LPL^{\Delta^{\text{Hep}}}$  NASH-Mäusen.

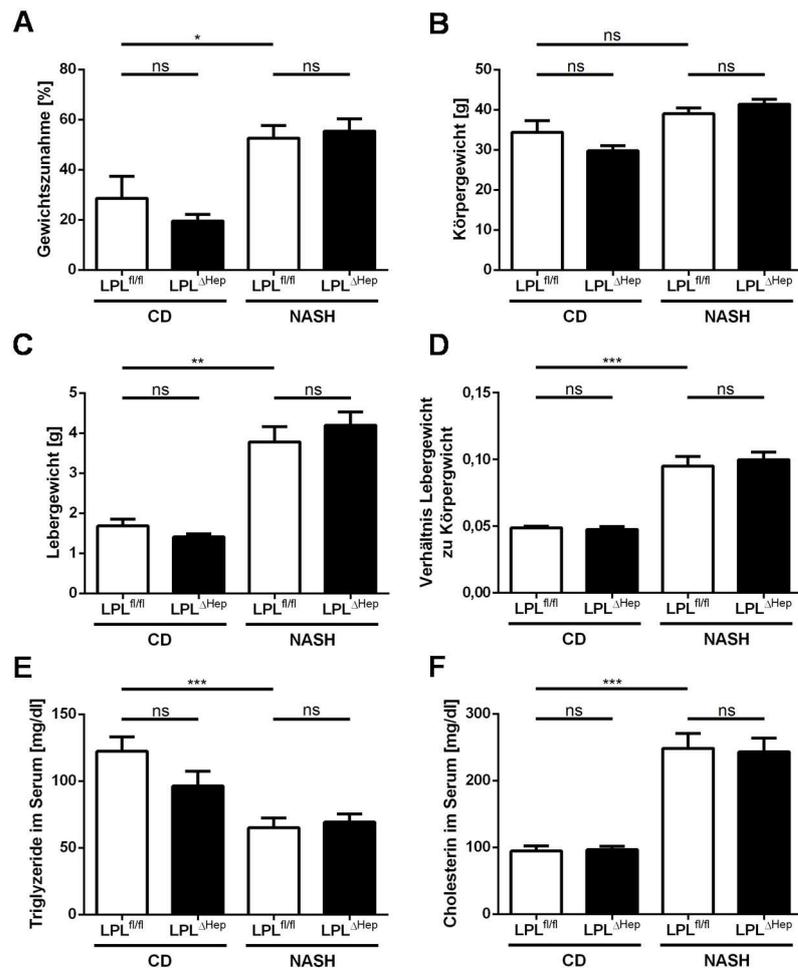
Abb. 3.18 zeigt die makroskopischen Veränderungen der Leber aufgrund der NASH-induzierenden Diät bei  $LPL^{fl/fl}$ - und  $LPL^{\Delta Hep}$ -Mäusen.



**Abb. 3.18: Makroskopische Aufnahmen der Leber von CD und NASH-Diät-gefütterten  $LPL^{fl/fl}$ - und  $LPL^{\Delta Hep}$ -Mäusen**

Repräsentative Bilder der Leber von  $LPL^{fl/fl}$ - und  $LPL^{\Delta Hep}$ -C57BL/6J-Mäusen nach einer 24-wöchigen Fütterung mit einer CD bzw. NASH-Diät (Maßstab 1 cm).

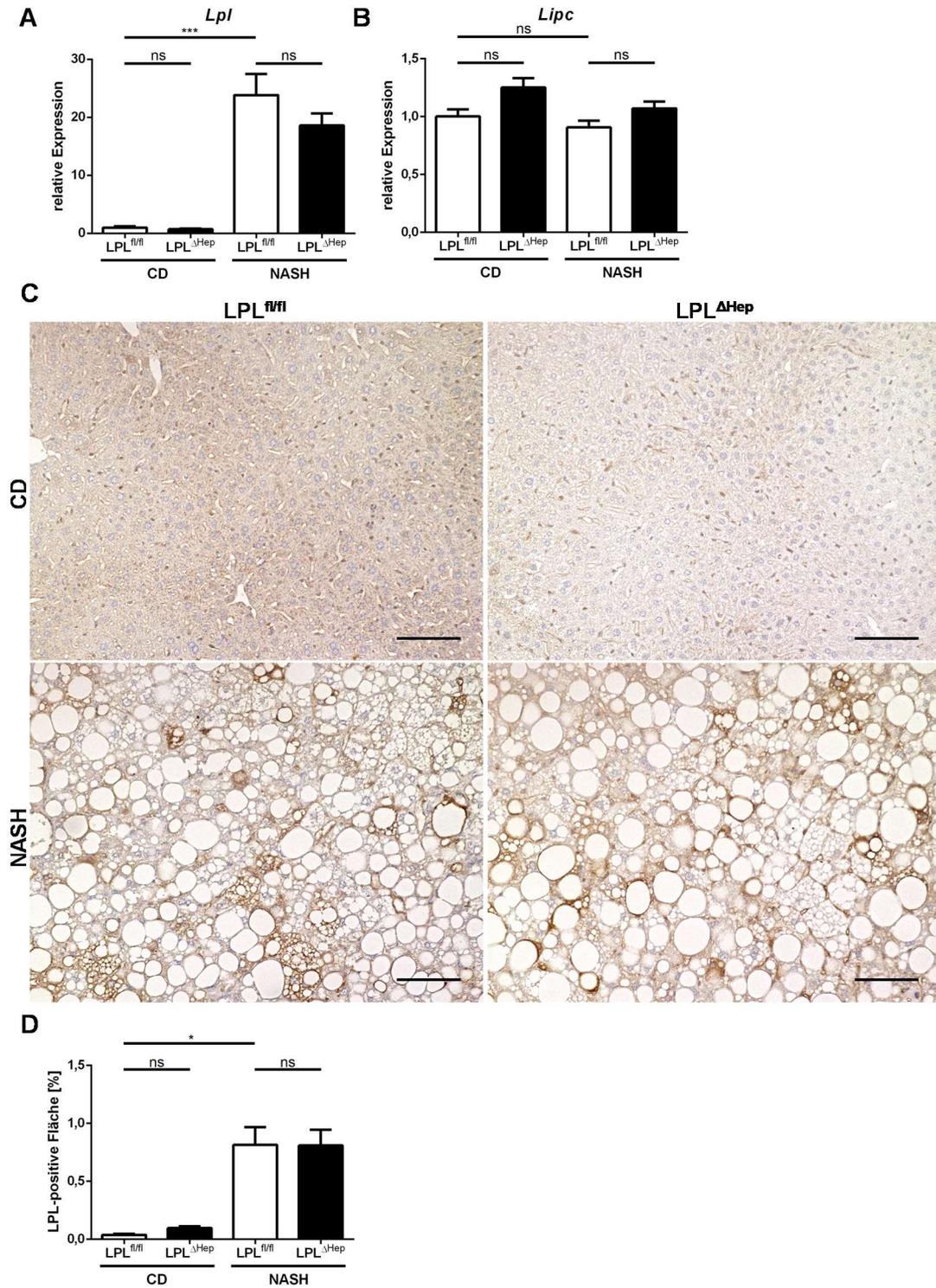
Die makroskopischen Aufnahmen der gesamten Leber nach einer 24-wöchigen Fütterung einer NASH-Diät oder eines Kontrollfutters zeigen die deutliche Vergrößerung der Leber aufgrund der hochkalorischen Diät. Zudem sorgt die vermehrte Fetteinlagerung für eine Aufhellung der Leber, sodass die NASH-Lebern beige-braun sind, während die CD-Lebern eher eine rot-braune Farbe aufweisen (s. Abb. 3.18). Ein Unterschied hinsichtlich der Größe und des Aussehens zwischen Cre-negativen und Cre-positiven Mäusen konnte nicht festgestellt werden. Dieses Ergebnis wird auch durch die Dokumentation der Lebergewichte bestätigt. In Abb. 3.19 sind neben den Lebergewichten auch andere metabolische Parameter aufgeführt.



**Abb. 3.19: Metabolische Parameter von CD- und NASH-Diät-gefütterten LPL<sup>fl/fl</sup>- und LPL<sup>ΔHep</sup>-Mäusen**  
 Die A) prozentuale Gewichtszunahme, B) Körper-, C) Lebergewichte und D) das Verhältnis von Leber- zu Körpergewicht sowie die biochemisch bestimmte Konzentration E) der TG und F) des Cholesterins im Serum von LPL<sup>fl/fl</sup>- und LPL<sup>ΔHep</sup>- C57BL/6J Mäusen nach einer 24-wöchigen Fütterung mit einer CD bzw. NASH-Diät ( $n_{LPL^{fl/fl} CD} = 5$ ;  $n_{LPL^{\Delta Hep} CD} = 4$ ;  $n_{LPL^{fl/fl} NASH} = 12-13$ ;  $n_{LPL^{\Delta Hep} NASH} = 14$ ).

Eine Hepatozyten-spezifische LPL-Deletion hat weder unter Standard- noch unter NASH-Bedingungen einen Einfluss auf die metabolischen Parameter hinsichtlich der Körper- und Lebergewichte sowie der Serumlipide (s. Abb. 3.19). Der generelle NASH-Phänotyp bezüglich der metabolischen Parameter, der bereits in Kapitel 3.3 beschrieben wurde, konnte in diesem Versuch reproduziert werden. Die einzige Ausnahme bildet der TG-Serumspiegel. Während LPL<sup>fl/fl</sup> CD-Mäuse eine Konzentration von ca. 122 mg/dl aufweisen, reduziert sich diese in den LPL<sup>fl/fl</sup> NASH-Mäusen um fast die Hälfte auf ca. 65 mg/dl ( $p = 0,0002$ ). Da die verwendete Diät keine Insulinresistenz induziert (s. Abb. 3.4A-C), wurde auf die Messung der Glukose- und Insulinkonzentration und somit auf die Berechnung des HOMA-IR-Index verzichtet.

Zur Überprüfung, welchen Einfluss der Hepatozyten-spezifische LPL KO auf die NASH-induzierte *Lpl*-Expression hat, wurde die *Lpl*-Expression im Lebergewebe gemessen. Zudem sollte durch eine IHC LPL auf Proteinebene nachgewiesen werden. (s. Abb. 3.20).

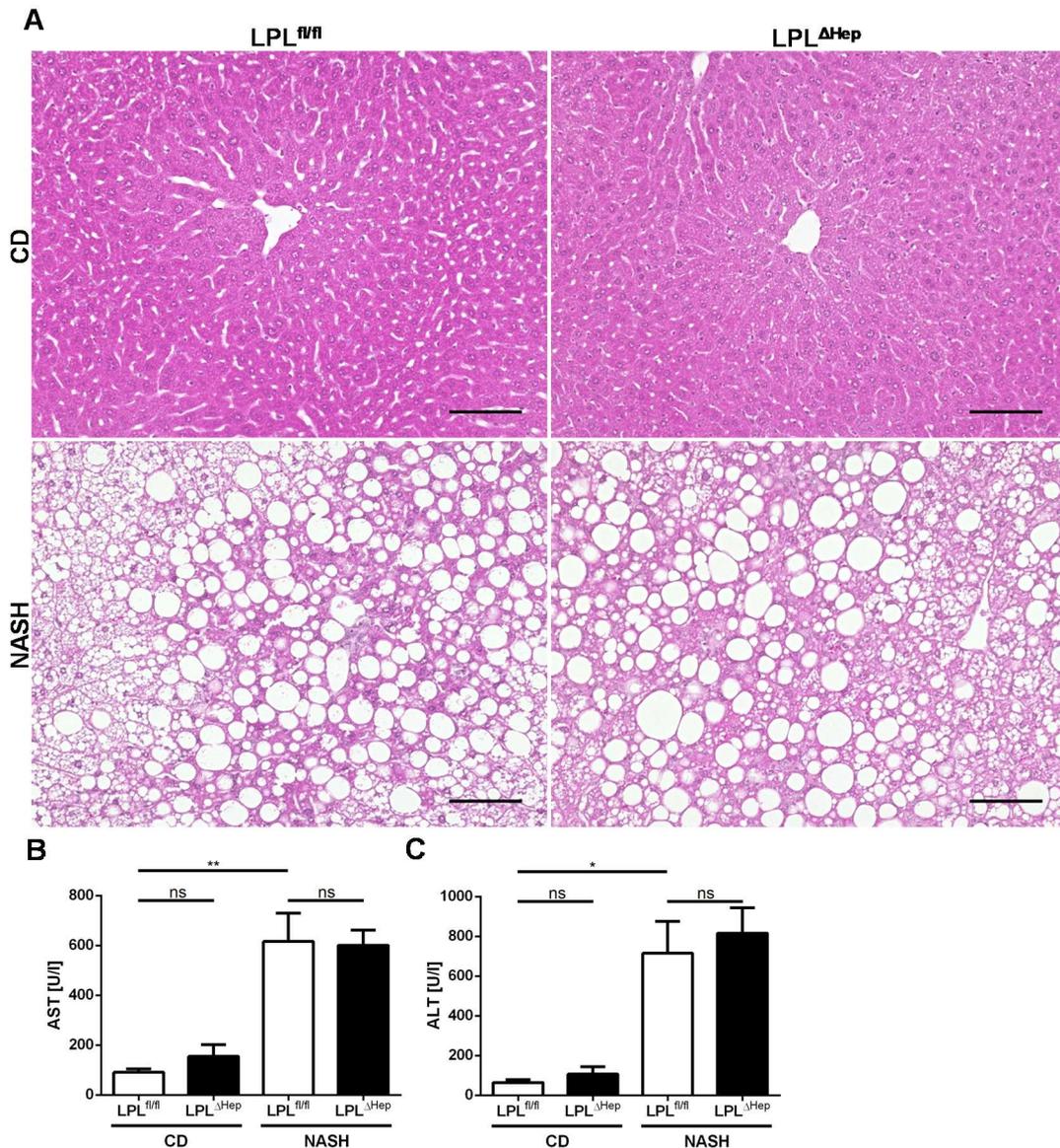


**Abb. 3.20: Expression von *Lpl* und *Lipc* sowie Quantifizierung von LPL in CD- und NASH-Diät-gefütterten LPL<sup>fl/fl</sup>- und LPL<sup>ΔHep</sup>-Mäusen**

Die relative Expression der Lipidstoffwechsel-assoziierten Gene A) *Lpl* und B) *Lipc* im Gesamtlebergewebe sowie C) repräsentative Bilder der LPL-IHC (10x Vergrößerung, Maßstab: 200  $\mu$ m) und D) deren densitometrische Quantifizierung von LPL<sup>fl/fl</sup>- und LPL<sup>ΔHep</sup>-C57BL/6J-Mäusen nach einer 24-wöchigen Fütterung mit einer CD bzw. NASH-Diät ( $n_{LPL^{fl/fl} CD} = 4-5$ ;  $n_{LPL^{\Delta Hep} CD} = 3-4$ ;  $n_{LPL^{fl/fl} NASH} = 11-13$ ;  $n_{LPL^{\Delta Hep} NASH} = 12-14$ ).

Die verwendete NASH-Diät führt zur Induktion von LPL in der Leber – sowohl auf Gen- als auch auf Proteinebene (s. Abb. 3.20). Eine veränderte Expression des Gens *Lipc*, das für die hepatische Lipase kodiert, konnte dagegen nicht detektiert werden. Die *Lipc*-Expression wird weder durch die Verabreichung der NASH-induzierenden Diät noch durch die Hepatozyten-spezifische LPL-Deletion beeinflusst (s. Abb. 3.20B). Die hepatische *Lpl*-Expression wird ebenfalls nicht maßgeblich durch die Hepatozyten-spezifische LPL-Deletion reduziert. Die Lebern der LPL<sup>ΔHep</sup> NASH-Mäuse weisen zwar mit einer 18,6-fachen Expression im Vergleich zur LPL<sup>fl/fl</sup>-Kontrollgruppe eine schwächere *Lpl*-Expression als die LPL<sup>fl/fl</sup> NASH-Tiere mit einer 23,6-fach induzierten Expression auf, allerdings ist dieser Unterschied nicht signifikant ( $p = 0,4108$ ) (s. Abb. 3.20A). Diese Tendenz spiegelt sich zudem nicht auf Proteinebene wieder. Die Quantifizierung der LPL-IHC ergab, dass der Anteil der LPL-positiven Fläche in beiden NASH-Gruppen mit durchschnittlich 0,8% identisch ist (s. Abb. 3.20C&D). Obwohl die Reduktion der *Lpl*-Expression bei LPL<sup>ΔHep</sup> NASH verglichen mit LPL<sup>fl/fl</sup> NASH keine statistische Signifikanz erreicht, sollte analysiert werden, ob die schwächere *Lpl*-Expression in den LPL<sup>ΔHep</sup> NASH-Mäusen trotzdem Auswirkungen auf die wichtigsten NASH-Parameter hat.

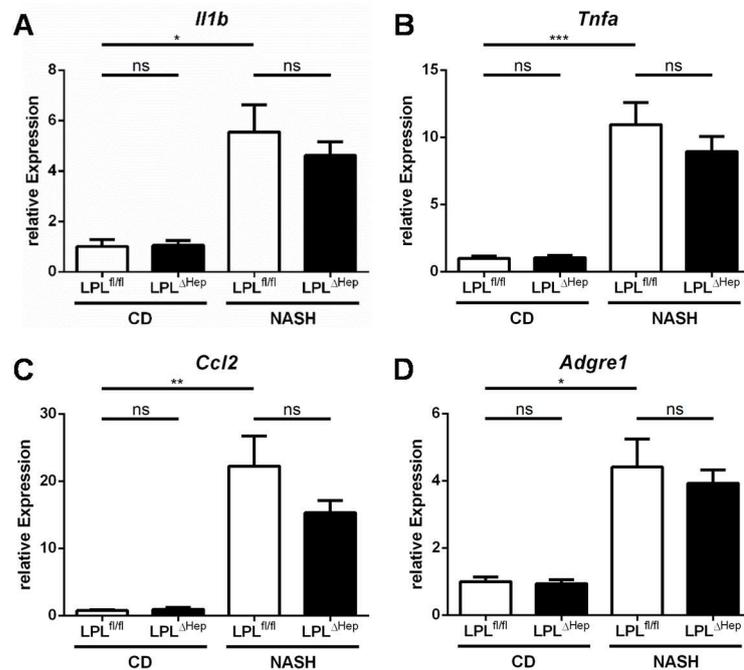
Die nähere Untersuchung der Leberlipide mittels Quantifizierung einer OrO-Färbung und einer biochemischen Bestimmung des hepatischen TG- und Cholesteringehalts entfällt für diesen Versuch, da die Betrachtung der HE-Färbung (s. Abb. 3.21) sowie die nahezu identischen Lebergewichte bei LPL<sup>fl/fl</sup> NASH- und LPL<sup>ΔHep</sup> NASH-Mäusen auf einen ähnlichen Steatosegrad hindeuten. In Abb. 3.21 sind neben der HE-Färbung zur Visualisierung des Leberschadens auch die Serumtransaminasenspiegel dargestellt.



**Abb. 3.21: Analyse des Leberschadens von CD- und NASH-Diät-gefütterten LPL<sup>fl/fl</sup>- und LPL<sup>ΔHep</sup>-Mäusen**  
 A) Repräsentative Bilder einer HE-Färbung der Leber (20x Vergrößerung, Maßstab: 100 μm) sowie die B) AST- und C) ALT-Konzentration im Serum von LPL<sup>fl/fl</sup>- und LPL<sup>ΔHep</sup>-C57BL/6J-Mäusen nach einer 24-wöchigen Fütterung mit einer CD bzw. NASH-Diät ( $n_{LPL^{fl/fl} CD} = 5$ ;  $n_{LPL^{\Delta Hep} CD} = 4$ ;  $n_{LPL^{fl/fl} NASH} = 12$ ;  $n_{LPL^{\Delta Hep} NASH} = 14$ ).

Mithilfe der HE-Färbung werden die durch die NASH-Diät induzierten pathologischen Veränderungen sichtbar. Unabhängig vom Genotyp zeigen die NASH-Lebern eine hochgradige Verfettung der Leber mit großen und kleinen Lipidtropfen in den Hepatozyten sowie eine Infiltration von Immunzellen (s. Abb. 3.21A). Ein Unterschied hinsichtlich der Schädigung der Leber zwischen LPL<sup>fl/fl</sup> NASH und LPL<sup>ΔHep</sup> NASH konnte durch die Messung der Serumkonzentration von AST und ALT nicht dokumentiert werden. Bei beiden Transaminasen ist die Serumkonzentration nahezu identisch (s. Abb. 3.21B&C).

Nachdem keine Auswirkungen auf die NASH-Progression in Hinblick auf die untersuchten metabolischen Parameter sowie den Grad der Leberschädigung nachgewiesen werden konnte, sollte nun der Einfluss auf die Expression proinflammatorischer Gene untersucht werden (s. Abb. 3.22).

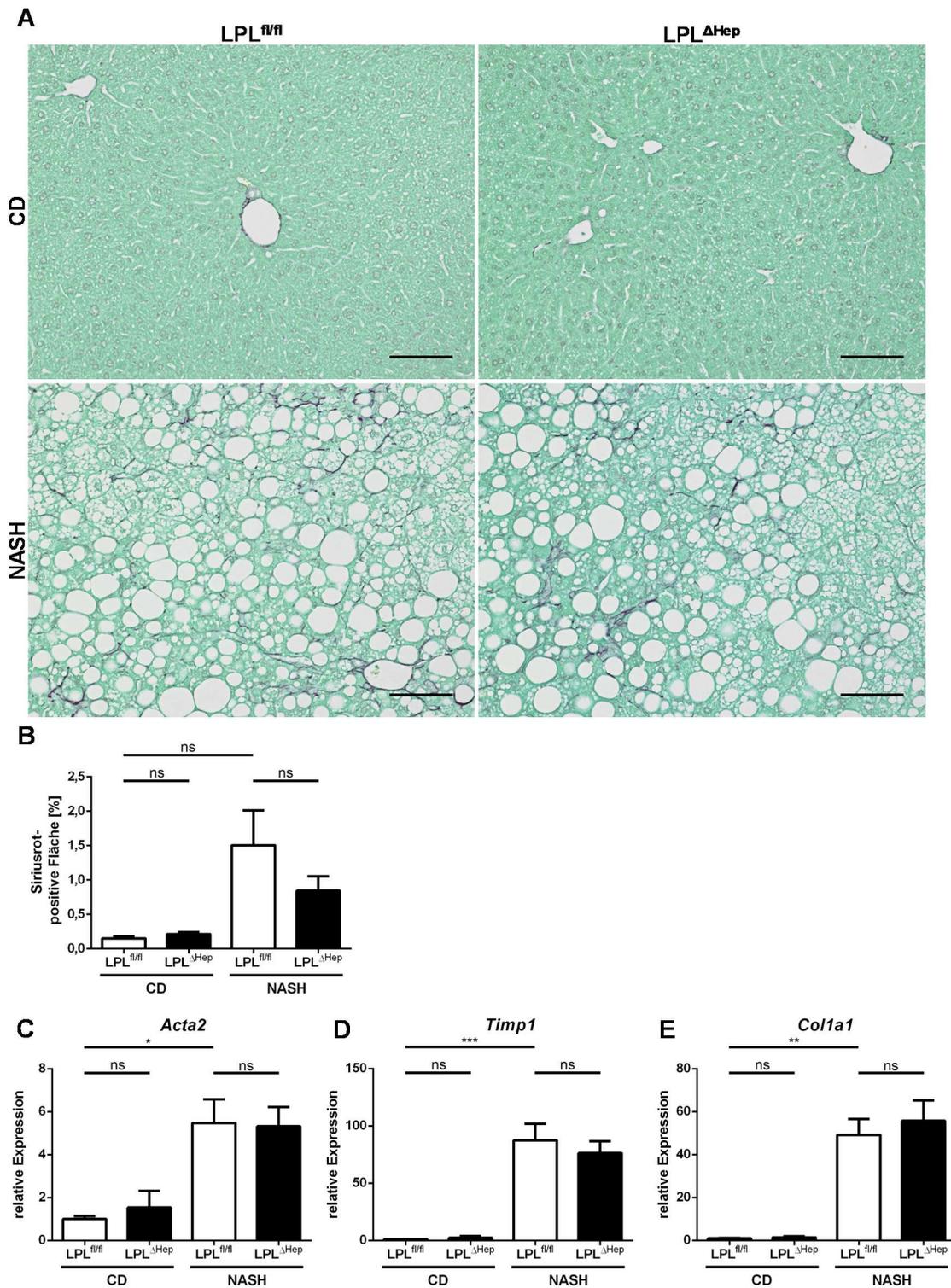


**Abb. 3.22: Expression von proinflammatorischen Genen in CD- und NASH-Diät-gefütterten LPL<sup>fl/fl</sup>- und LPL<sup>ΔHep</sup>-Mäusen**

Die relative Expression der proinflammatorischen Gene A) *Il1b*, B) *Tnfa*, C) *Ccl2* sowie des KC- und Makrophagenmarkers *Adgre1* im Gesamtlebergewebe von LPL<sup>fl/fl</sup>- und LPL<sup>ΔHep</sup>-C57BL/6J- Mäusen nach einer 24-wöchigen Fütterung mit einer CD bzw. NASH-Diät ( $n_{LPL^{fl/fl} CD} = 5$ ;  $n_{LPL^{\Delta Hep} CD} = 4$ ;  $n_{LPL^{fl/fl} NASH} = 12-13$ ;  $n_{LPL^{\Delta Hep} NASH} = 14$ ).

Die Auswertung der qPCR zeigt analog zum vorherigen MPO-Versuch, dass aufgrund der NASH-induzierenden Diät die Expression der proinflammatorischen Gene *Il1b*, *Tnfa* und *Ccl2* sowie *Adgre1*, das für den KC-Marker F4/80 kodiert, signifikant erhöht ist (s. Abb. 3.22). Bei keinem Gen kann allerdings eine signifikante Reduktion der Expression bei den Lebern der LPL<sup>ΔHep</sup> NASH-Gruppe im Vergleich zur LPL<sup>fl/fl</sup> NASH-Kohorte beobachtet werden. Somit scheint eine LPL-Deletion in Hepatozyten keine Auswirkungen auf die Inflammation bei der NASH oder die Frequenz an Lebermakrophagen zu haben.

Abschließend sollte untersucht werden, ob ein Unterschied zwischen LPL<sup>fl/fl</sup> und LPL<sup>ΔHep</sup> hinsichtlich der Fibrogenese besteht. Aus diesem Grund wurden die Lebern der CD- und NASH-Versuchsgruppen SR gefärbt und die Expression von profibrotischen Genen analysiert (s. Abb. 3.23).



**Abb. 3.23: Evaluation der Fibrose in CD- und NASH-Diät-gefütterten LPL<sup>fl/fl</sup>- und LPL<sup>ΔHep</sup>-Mäusen**  
 A) Repräsentative Bilder der SR-Färbung (20x Vergrößerung, Maßstab: 100 μm), B) die densitometrische Quantifizierung der SR-Färbung zur Bestimmung der Fibrose auf Proteinebene sowie eine die relative Expression der profibrotischen Gene C) *Acta2*, D) *Timp1* und E) *Col1a1* im Gesamtlebergewebe von LPL<sup>fl/fl</sup>- und LPL<sup>ΔHep</sup>- C57BL/6J-Mäusen nach einer 24-wöchigen Fütterung mit einer CD bzw. NASH-Diät (n<sub>LPL<sup>fl/fl</sup> CD</sub> = 5; n<sub>LPL<sup>ΔHep</sup> CD</sub> = 4; n<sub>LPL<sup>fl/fl</sup> NASH</sub> = 12-13; n<sub>LPL<sup>ΔHep</sup> NASH</sub> = 13-14).

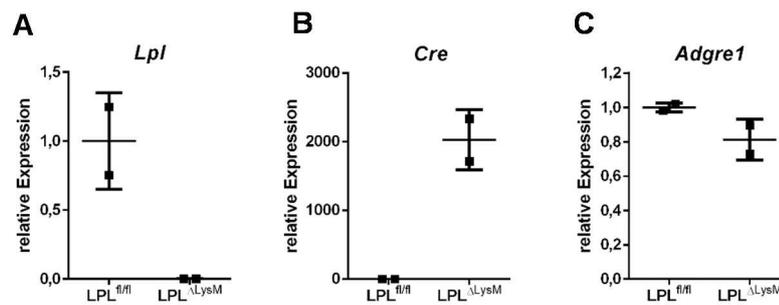
Während die in Abb. 3.23 gezeigten Analysen sowohl auf Proteinebene (SR-Färbung und -Quantifizierung; Abb. 3.23A&B) als auch auf Genebene (qPCR profibrotischer Gene; Abb. 3.23C-E) eine Induktion der hepatischen Fibrose aufgrund der Verabreichung der NASH-Diät zeigen, kann ein Einfluss der Hepatozyten-spezifischen LPL-Defizienz nicht dokumentiert werden. Der Vergleich der Expression der profibrotischen Gene *Acta2*, *Timp1* und *Col1a1* verdeutlicht, dass keine Unterschiede zwischen LPL<sup>fl/fl</sup> und LPL<sup>Δ<sup>Hep</sup></sup> bestehen (s. Abb. 3.23C-E). Die Quantifizierung der SR-Färbung zur Visualisierung des Kollagens in der Leber weist auch auf Proteinebene weder bei CD- noch bei NASH-Diät-gefütterten Mäusen einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Genotypen nach ( $p_{CD} = 0,9998$ ;  $p_{NASH} = 0,4510$  (s. Abb. 3.23A&B).

Somit zeigen sich in keinem der untersuchten Merkmale der NASH Unterschiede zwischen den LPL<sup>fl/fl</sup>-Tieren und den Mäusen mit LPL-defizienten Hepatozyten. Auch der NASH-induzierte Anstieg der *Lpl*-Expression in der Leber wird nicht durch die Hepatozyten-spezifische Deletion beeinflusst. Es ist also schlüssig, dass die Hepatozyten-spezifische Deletion, wie in diesem Kapitel gezeigt, keine Auswirkungen auf die NASH-Progression hat.

### **3.8 Eine LPL-Defizienz in myeloiden Zellen verringert die NASH-induzierte hepatische *Lpl*-Expression**

Wie in Kapitel 3.6 gezeigt, sind KC die Hauptpopulation an *Lpl*-exprimierenden Zellen in der gesunden Leber. Die Induktion der hepatischen *Lpl*-Expression als mutmaßlicher Bestandteil der NASH-Progression könnte auf einen Anstieg der *Lpl*-Expression in den Makrophagen zurückzuführen sein. Aus diesem Grund sollten die Auswirkungen einer LPL-Deletion in Makrophagen auf wichtige NASH-Merkmale untersucht werden. Das verwendete genetische Mausmodell bewirkt dabei durch die Abhängigkeit vom Lysozym2-Promotor eine LPL-Deletion in allen myeloiden Zellen, wozu neben Monozyten und Makrophagen z.B. auch Neutrophile gehören.

Vor der Charakterisierung des NASH-Phänotyps in LPL<sup>fl/fl</sup>- und LPL<sup>Δ<sup>LysM</sup></sup>-Tieren sollte die LPL-Deletion in den Makrophagen überprüft werden, da der Lysozym2-Promotor nicht kontinuierlich in KC aktiviert wird. Dafür wurden KC aus gesunden LPL<sup>fl/fl</sup>- und LPL<sup>Δ<sup>LysM</sup></sup>-Mäusen isoliert und mittels qPCR die Expression der Gene *Lpl*, *Cre* und *Adgre1* gemessen (s. Abb. 3.24).



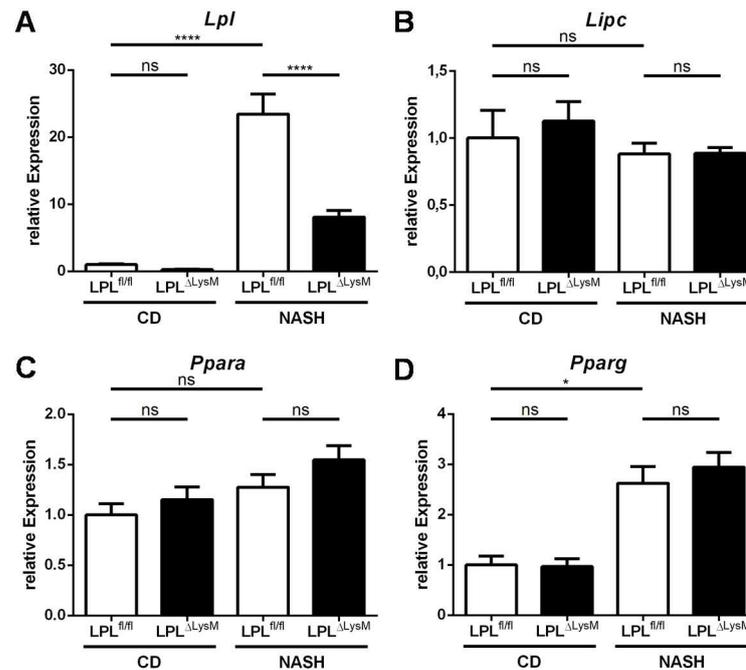
**Abb. 3.24: Überprüfung der LPL-Deletion in LPL<sup>ΔLysM</sup>-Mäusen**

KC wurden aus jeweils zwei LPL<sup>fl/fl</sup>- und LPL<sup>ΔLysM</sup>-Mäusen isoliert und die Expression der Gene A) *Lpl*, B) *Cre* und C) *Adgre1* gemessen. Gezeigt ist anstelle des Standardfehlers des Mittelwerts in diesem Fall die Standardabweichung. Eine statistische Auswertung war aufgrund der kleinen Gruppengröße nicht möglich.

Aufgrund Abb. 3.24 kann davon ausgegangen werden, dass die LPL-Deletion in KC mithilfe des verwendeten genetischen Mausmodells erfolgreich war, da in den LPL<sup>ΔLysM</sup>-KC keine verlässliche *Lpl*-Expression nachweisbar ist (s. Abb. 3.24A). Die parallele Expression der Cre-Rekombinase zeigt die Induktion des Lysozym2-Promotors an (s. Abb. 3.24B). Außerdem exprimieren die KC aus den LPL<sup>ΔLysM</sup>-Mäusen etwas weniger *Adgre1* (s. Abb. 3.24C). Ob dieser Unterschied eine biologische Relevanz besitzt, kann aufgrund der geringen Probenanzahl nicht beurteilt werden.

Nachdem die Wirksamkeit der LPL-Deletion in KC aus LPL<sup>ΔLysM</sup>-Mäusen überprüft wurde, wurde ein NASH-Phänotyp durch die bereits in den beiden anderen Mausmodellen verwendete hochkalorische, Cholesterin-angereicherte Fettdiät in LPL<sup>fl/fl</sup>- und LPL<sup>ΔLysM</sup>-Mäusen induziert. Wie bei den vorherigen Experimenten wurden einige Tiere weiterhin mit der Standarddiät gefüttert, sodass die Auswirkungen der LPL-Deletion in myeloiden Zellen auf die Parameter in der gesunden Leber untersucht werden konnten.

Der Einfluss der Deletion von LPL in myeloiden Zellen auf die NASH-induzierte *Lpl*-Expression im Gesamtlebergewebe wurde mittels qPCR untersucht (s. Abb. 3.25).



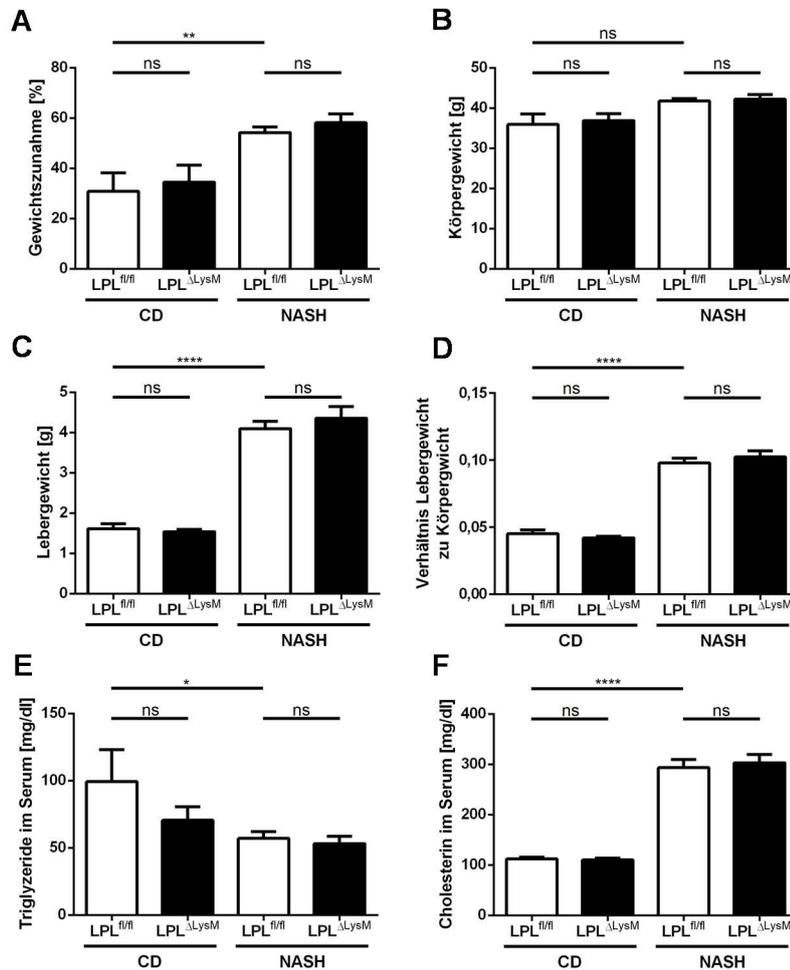
**Abb. 3.25: Expression von Lipidstoffwechsel-assoziierten Genen in CD- und NASH-Diät-gefütterten LPL<sup>fl/fl</sup>- und LPL<sup>ΔLysM</sup>-Mäusen**

Die relative Expression der Lipidstoffwechsel-assoziierten Gene A) *Lpl*, B) *Lipc*, C) *Ppara* und D) *Pparg* im Gesamtlebergewebe von LPL<sup>fl/fl</sup>- und LPL<sup>ΔLysM</sup>-C57BL/6J-Mäusen nach einer 24-wöchigen Fütterung mit einer CD bzw. NASH-Diät ( $n_{LPL^{fl/fl} CD} = 4$ ;  $n_{LPL^{\Delta LysM} CD} = 6$ ;  $n_{LPL^{fl/fl} NASH} = 15-16$ ;  $n_{LPL^{\Delta LysM} NASH} = 11-13$ ).

Die Verabreichung der NASH-induzierenden Diät führt auch in diesem Experiment zu einer vermehrten hepatischen *Lpl*-Expression. Die Expression in den LPL<sup>fl/fl</sup> NASH-Tieren ist 23,4-fach höher als in der LPL<sup>fl/fl</sup> CD-Kohorte ( $p < 0,0001$ ). Dagegen ist die relative Expression der LPL<sup>ΔLysM</sup> NASH-Gruppe lediglich um das Achtfache erhöht, sodass die hepatische *Lpl*-Expression aufgrund der LPL-Deletion in myeloiden Zellen signifikant reduziert ist ( $p < 0,0001$ ). Unter Standardbedingungen ist die Expression in den LPL<sup>ΔLysM</sup>-Lebern viermal so niedrig wie in der LPL<sup>fl/fl</sup>-Kohorte. Im Gegensatz zu den NASH-Lebern ist dieser Unterschied allerdings nicht signifikant ( $p = 0,9985$ ) (s. Abb. 3.25A). Die verminderte *Lpl*-Expression führt dabei nicht zu einer Veränderung der *Lipc*-Expression (s. Abb. 3.25B). Ebenfalls auf einem vergleichbaren Niveau in allen vier Gruppen ist die *Ppara*-Expression (s. Abb. 3.25C). Dagegen wird aufgrund der Cholesterin-angereicherten Fettdiät die hepatische *Pparg*-Expression induziert. Die LPL<sup>fl/fl</sup> NASH-Tiere exprimieren ca. 2,5 Mal mehr *Pparg* als die LPL<sup>fl/fl</sup> CD-Mäuse ( $p = 0,0282$ ) und weisen somit eine vergleichbare Expression wie die LPL<sup>ΔLysM</sup> NASH-Kohorte auf (s. Abb. 3.25D).

### 3.9 Eine LPL-Defizienz in myeloiden Zellen fördert die NASH-Progression

Nachdem gezeigt werden konnte, dass eine LPL-Defizienz in myeloiden Zellen unter NASH-Bedingungen die hepatische *Lpl*-Expression signifikant reduziert, wurden die Auswirkungen auf die NASH-Progression hinsichtlich verschiedener Merkmale untersucht.

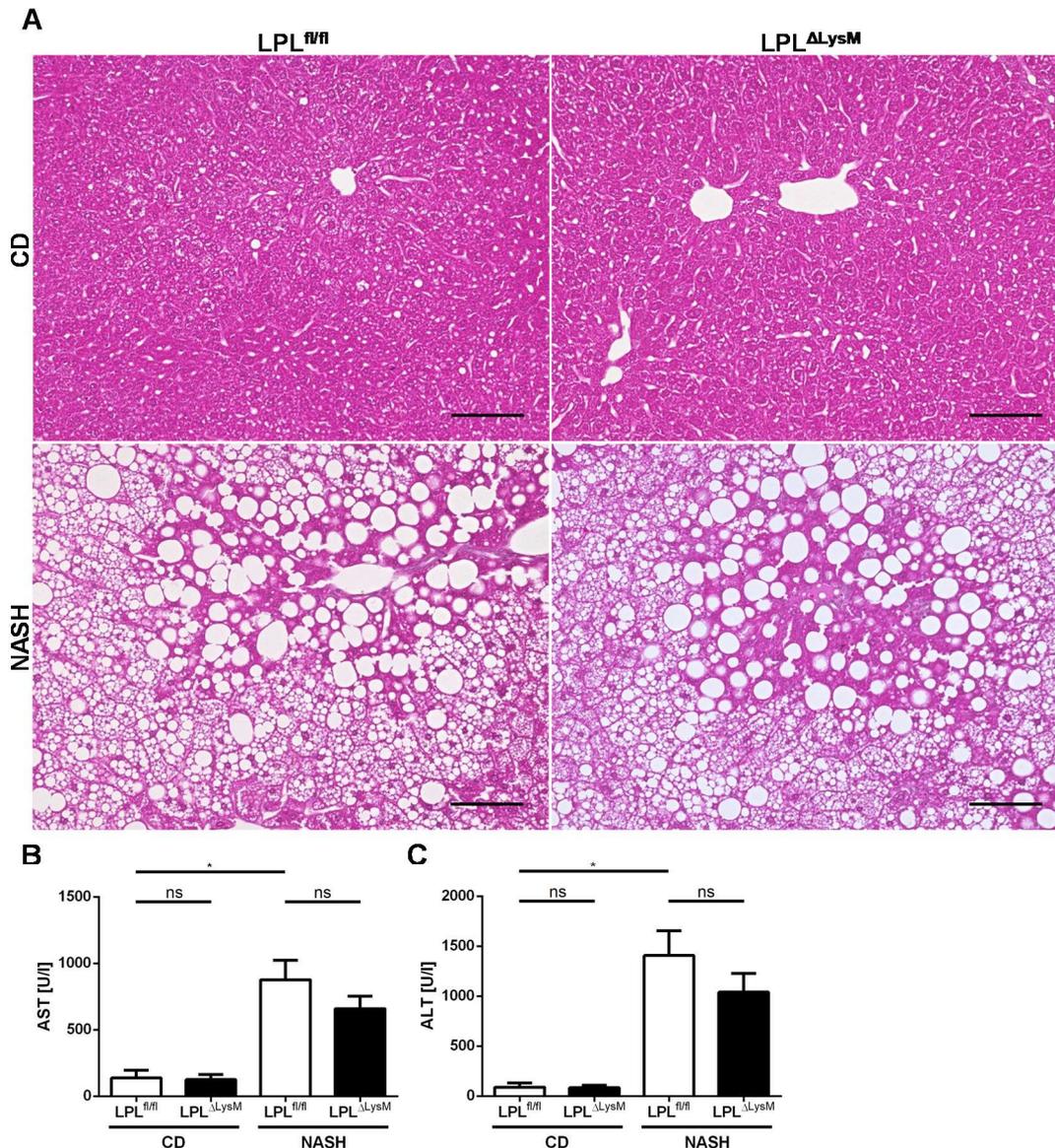


**Abb. 3.26: Metabolische Parameter von CD- und NASH-Diät-gefütterten LPL<sup>fl/fl</sup>- und LPL<sup>ΔLysM</sup>-Mäusen**  
 Die A) prozentuale Gewichtszunahme, B) Körper-, C) Lebergewichte und D) das Verhältnis von Leber- zu Körpergewicht sowie die biochemisch bestimmte Konzentration E) der TG und F) des Cholesterins im Serum von LPL<sup>fl/fl</sup>- und LPL<sup>ΔLysM</sup>-C57BL/6J-Mäusen nach einer 24-wöchigen Fütterung mit einer CD- bzw. NASH-Diät ( $n_{LPL^{fl/fl} CD} = 4$ ;  $n_{LPL^{\Delta LysM} CD} = 6$ ;  $n_{LPL^{fl/fl} NASH} = 16$ ;  $n_{LPL^{\Delta LysM} NASH} = 13$ ).

Eine LPL-Defizienz in myeloiden Zellen scheint keinen Einfluss auf die Zunahme bezüglich des Körper- und Lebergewichts im Zusammenhang einer NASH zu haben. Die beiden Genotypen zeigen ebenfalls nahezu identische Gewichtsparameter unter Standardbedingungen. Insgesamt weisen die Kontrolltiere niedrigere Lebergewichte, ein geringeres Lebergewicht-zu-Körpergewicht-Verhältnis sowie eine verminderte Gewichtszunahme innerhalb des 24-wöchigen Versuchs im Vergleich zu NASH auf (s. Abb.

3.26A-D). Somit wurde der NASH-Phänotyp der anderen beiden beschriebenen Experimente (s. Kapitel 3.3 und 3.7) reproduziert. Die Fütterung einer NASH-induzierenden Diät erhöht außerdem den Cholesterinspiegel im Serum. Während die durchschnittliche Konzentration von LPL<sup>fl/fl</sup> CD-Tieren 112 mg/dl beträgt, steigt sie in der LPL<sup>fl/fl</sup> NASH-Gruppe auf 293 mg/dl signifikant an ( $p < 0,0001$ ). Ein Unterschied zwischen den beiden Genotypen ist bei beiden Bedingungen wiederum nicht auszumachen (s. Abb. 3.26F). Zudem wird die Serum-TG-Konzentration nicht von der *Lpl*-Expression in myeloiden Zellen beeinflusst.

Die Auswirkungen einer auf die myeloiden Zellen beschränkten LPL-Deletion auf den Leberschaden und somit einem wichtigen Indiz der NASH wurde histologisch mithilfe einer HE-Färbung und durch die Messung der Serumtransaminasen untersucht (s. Abb. 3.27).

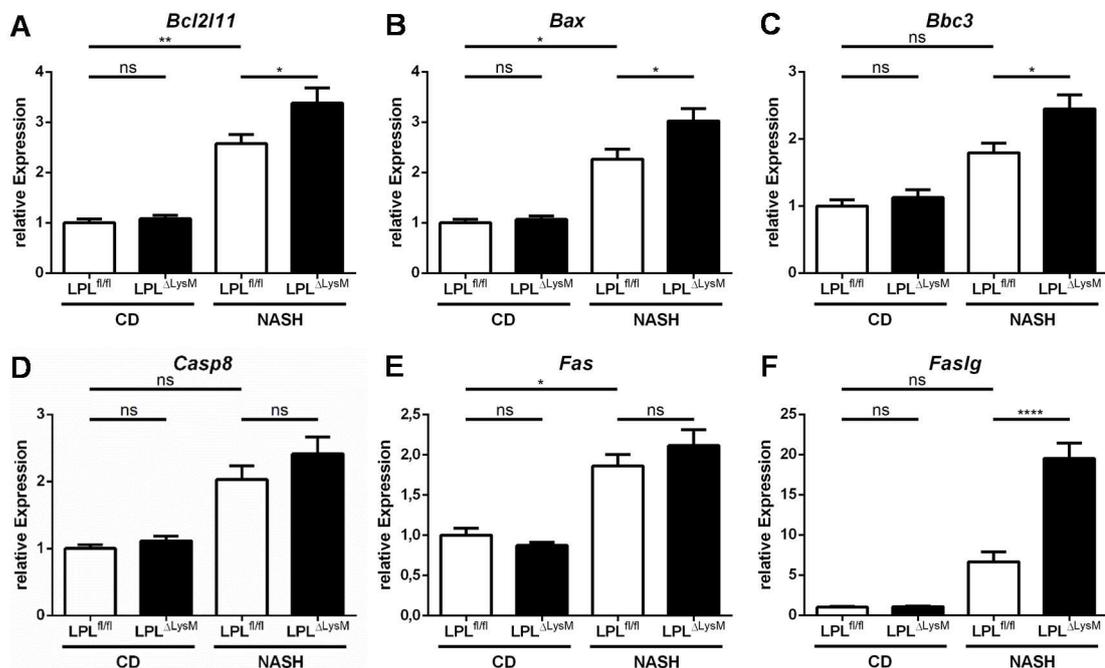


**Abb. 3.27: Analyse des Leberschadens in CD- und NASH-Diät-gefütterten LPL<sup>fl/fl</sup>- und LPL<sup>ΔLysM</sup>-Mäusen**  
 A) Repräsentative Bilder einer HE-Färbung der Leber (20x Vergrößerung, Maßstab: 100 μm) sowie die B) AST- und C) ALT-Konzentration im Serum von LPL<sup>fl/fl</sup>- und LPL<sup>ΔLysM</sup>-C57BL/6J-Mäusen nach einer 24-wöchigen Fütterung mit einer CD bzw. NASH-Diät (n<sub>LPL<sup>fl/fl</sup> CD</sub> = 4; n<sub>LPL<sup>ΔLysM</sup> CD</sub> = 6; n<sub>LPL<sup>fl/fl</sup> NASH</sub> = 16; n<sub>LPL<sup>ΔLysM</sup> NASH</sub> = 13).

Die Lebern von CD-gefütterten LPL<sup>fl/fl</sup>- und LPL<sup>ΔLysM</sup>-Mäusen zeigen außer kleinen Fettanreicherungen keine histologisch erkennbaren, pathologischen Veränderungen. Dagegen induziert die Fütterung einer Fettdiät sowohl die Speicherung von Fett in den Hepatozyten als auch die Infiltration von Immunzellen. Ein Unterschied zwischen den beiden Genotypen ist dabei nicht erkennbar (s. Abb. 3.27A). Aufgrund der Durchsicht der HE-Färbungen ist davon auszugehen, dass die Steatose in den Lebern von LPL<sup>fl/fl</sup> NASH- und LPL<sup>ΔLysM</sup> NASH-Mäusen in vergleichbarem Maße ausgeprägt ist und die LPL-Defizienz

in myeloiden Zellen die hepatische Lipidakkumulation nicht beeinflusst. Die Schädigung der Leber aufgrund der NASH-induzierenden Diät wird ebenfalls durch die Erhöhung der Serumtransaminasen abgebildet. In  $LPL^{fl/fl}$ -Mäusen steigt der AST-Serumspiegel von 138 U/l in der CD-Gruppe auf 877 U/l in der NASH-Kohorte und die ALT-Konzentration von 89 U/l auf 1407 U/l signifikant an ( $p_{AST} = 0,0132$ ;  $p_{ALT} = 0,0116$ ). Zwischen den beiden Genotypen gibt es dagegen weder unter Kontroll- noch unter NASH-induzierenden Bedingungen signifikante Unterschiede. Die Seren von  $LPL^{\Delta LysM}$  NASH-Mäusen weisen mit 660 U/l (AST) bzw. 1042 U/l (ALT) zwar niedrigere Transaminasenspiegel als die  $LPL^{fl/fl}$  NASH-Tiere auf, doch ist dieser Unterschied jeweils nicht signifikant ( $p_{AST} = 0,4675$ ;  $p_{ALT} = 0,5029$ ) (s. Abb. 3.27B&C). Die Einschätzung der HE-Färbung sowie die AST- und ALT-Serumkonzentrationen deuten darauf hin, dass die LPL-Defizienz in myeloiden Zellen den NASH-assoziierten Leberschaden nicht entscheidend beeinflusst.

Als weiterer Bestandteil des Leberschadens sollte die Expression von proapoptotischen Genen untersucht werden (s. Abb. 3.28). Diese Analyse gibt Aufschluss über die Induktion des programmierten Zelltods im gesamten Lebergewebe.

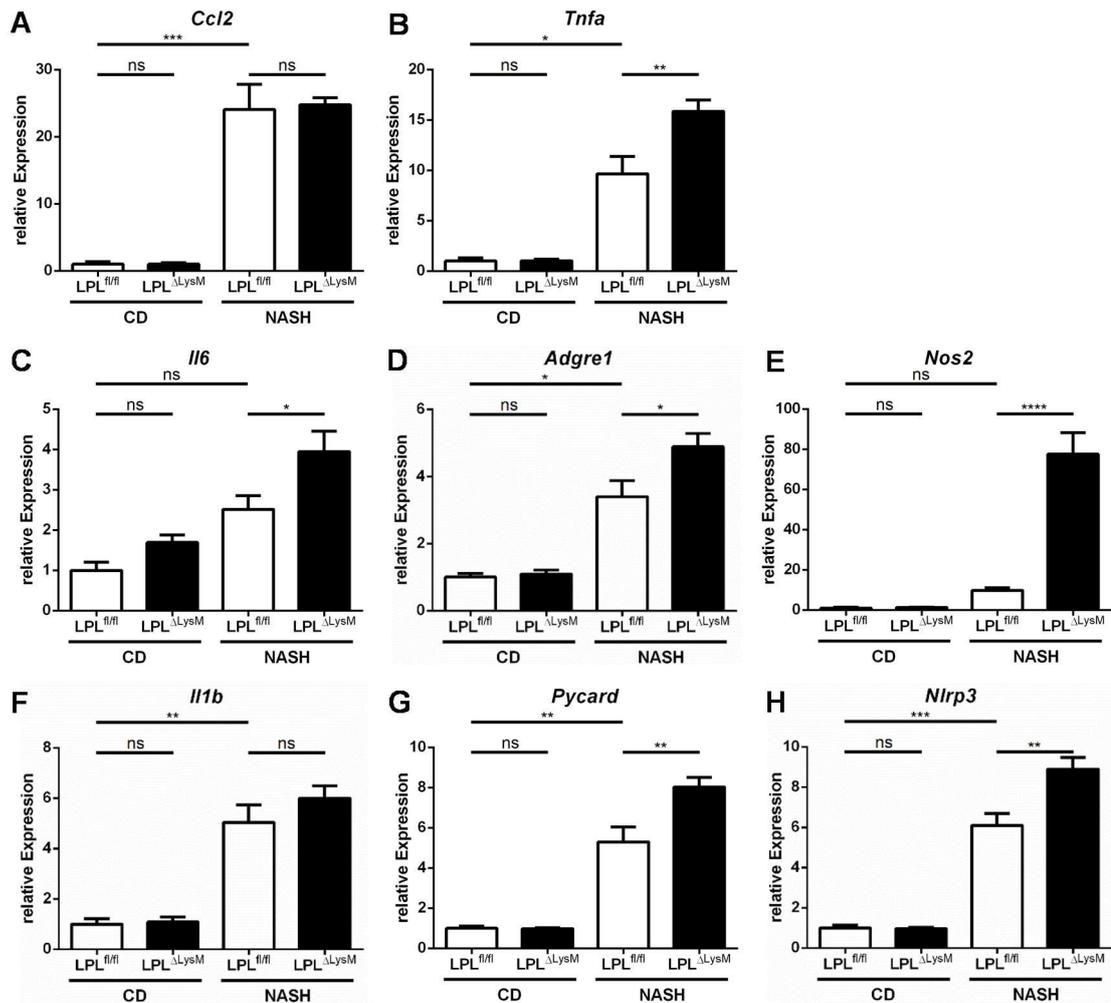


**Abb. 3.28: Expression von proapoptotischen Genen in CD- und NASH-Diät-gefütterten  $LPL^{fl/fl}$ - und  $LPL^{\Delta LysM}$ -Mäusen**

Die relative Expression der proapoptotischen Gene A) *Bcl2l11*, B) *Bax*, C) *Bbc3*, D) *Casp8*, E) *Fas* und F) *Faslg* im Gesamtlebergewebe von  $LPL^{fl/fl}$ - und  $LPL^{\Delta LysM}$ - C57BL/6J Mäusen nach einer 24-wöchigen Fütterung mit einer CD bzw. NASH-Diät ( $n_{LPL^{fl/fl} CD} = 4$ ;  $n_{LPL^{\Delta LysM} CD} = 6$ ;  $n_{LPL^{fl/fl} NASH} = 16$ ;  $n_{LPL^{\Delta LysM} NASH} = 12-13$ ).

Aufgrund der hochkalorischen, Cholesterin-angereicherten Fettdiät ist die Expression aller untersuchten proapoptotischen Gene erhöht. Allerdings ist diese Induktion bei der LPL<sup>fl/fl</sup> NASH-Kohorte im Vergleich zu den LPL<sup>fl/fl</sup>-Kontrolltieren nur bei *Bcl2l11*, *Bax* und *Fas* statistisch signifikant (s. Abb. 3.28). Im Gesamtlebergewebe von NASH-Tieren weist die LPL<sup>ALysM</sup>-Kohorte eine signifikant stärkere Induktion der Expression aller Gene des intrinsischen Signalwegs (*Bcl2l11*, *Bax* und *Bbc3*) als die LPL<sup>fl/fl</sup>-Gruppe auf ( $p_{Bcl2l11} = 0,0291$ ;  $p_{Bax} = 0,0252$ ;  $p_{Bbc3} = 0,0154$ ) (s. Abb. 3.28A-C). Bei den Genen des extrinsischen Signalwegs scheint die LPL-Defizienz in myeloiden Zellen in NASH-Lebern nur die Expression von *Faslg* zu beeinflussen. Während die Unterschiede der relativen *Fas*- und *Casp8*-Expression keine statistische Signifikanz aufweisen (s. Abb. 3.28D&E), ist die *Faslg*-Expression in LPL<sup>ALysM</sup> NASH-Mäusen fast dreimal so hoch wie in LPL<sup>fl/fl</sup> NASH-Tieren ( $p < 0,0001$ ) (s. Abb. 3.28F). In den gesunden Lebern der Kontrolltiere hat die LPL-Defizienz in myeloiden Zellen keinen Einfluss auf die Expression aller sechs Gene (s. Abb. 3.28).

Nachdem gezeigt werden konnte, dass LPL-defiziente myeloide Zellen im Zusammenhang der NASH die Expression von proapoptotischen Genen steigern, sollte untersucht werden, ob dies ebenfalls auf die Expression proinflammatorischer Gene zutrifft (s. Abb. 3.29). Das Ausmaß der hepatischen Inflammation dient als wichtiges Indiz bei der NASH. Außerdem sind von der LPL-Defizienz mit den myeloiden Zellen Immunzellen wie Monozyten/Makrophagen sowie Granulozyten von dem LPL KO betroffen. Somit war von Interesse, inwieweit die LPL-Defizienz in diesen Zellen das proinflammatorische Milieu im Kontext der NASH verändert.



**Abb. 3.29: Expression von proinflammatorischen Genen in CD- und NASH-Diät-gefütterten LPL<sup>fl/fl</sup>- und LPL<sup>ΔLysM</sup>-Mäusen**

Die relative Expression der proinflammatorischen Gene A) *Ccl2*, B) *Tnfa* und C) *Il6* sowie D) des KC- und Makrophagenmarkers *Adgre1*, E) des M1-Makrophagenmarkers *Nos2* und der Inflammasom-assoziierten Gene F) *Il1b*, G) *Pycard* und H) *Nlrp3* im Gesamtlebergewebe von LPL<sup>fl/fl</sup>- und LPL<sup>ΔLysM</sup>-C57BL/6J-Mäusen nach einer 24-wöchigen Fütterung mit einer CD bzw. NASH-Diät ( $n_{LPL^{fl/fl} CD} = 4$ ;  $n_{LPL^{\Delta LysM} CD} = 6$ ;  $n_{LPL^{fl/fl} NASH} = 15$ ;  $n_{LPL^{\Delta LysM} NASH} = 11$ -13).

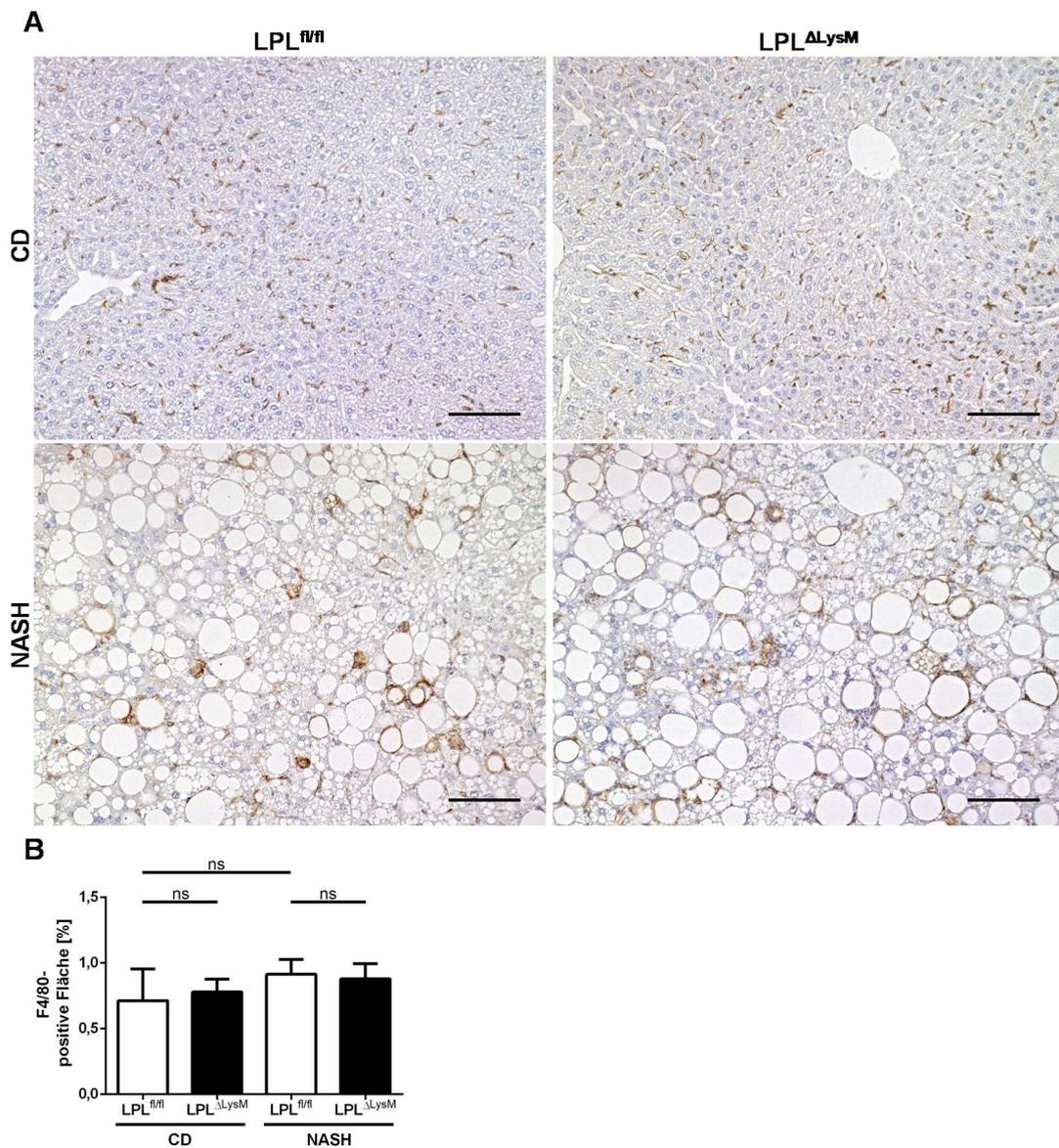
Mit Ausnahme von *Il6* und *Nos2* ist die Expression aller gemessenen Inflammations- und Immunzell-assoziierten Gene in den LPL<sup>fl/fl</sup> NASH-Tieren im Vergleich zur LPL<sup>fl/fl</sup>-Kontrollgruppe signifikant erhöht (s. Abb. 3.29). Somit führt die 24-wöchige Fütterung mit einer hochkalorischen, Cholesterin-angereicherten Fettdiät zu einer Induktion der Expression proinflammatorischer Gene und folglich wahrscheinlich auch zu einer Entzündungsreaktion in der Leber.

Ein Einfluss des LPL KO spezifisch in myeloiden Zellen auf die Expression der untersuchten Gene in den Kontrollgruppen und somit in der gesunden Leber kann nicht dokumentiert werden. Mit Ausnahme von *Ccl2* und *Il1b* bewirkt eine LPL-Defizienz in myeloiden Zellen

dagegen unter NASH-Bedingungen einen signifikanten Anstieg der Expression der untersuchten proinflammatorischen Gene, wobei die Induktion bei der *Nos2*-Expression mit einem Anstieg der relativen Expressionsrate von 9,8 in der LPL<sup>fl/fl</sup> NASH-Kohorte auf 77,5 in der LPL<sup>ΔLysM</sup> NASH-Gruppe am stärksten ausfällt ( $p_{Nos2} < 0,0001$ ;  $p_{Tnfa} = 0,0082$ ;  $p_{Il6} = 0,0276$ ;  $p_{Pycard} = 0,0075$ ;  $p_{Nlrp3} = 0,0019$ ) (s. Abb. 3.29).

Neben der Expression proinflammatorischer Gene wurde ebenfalls die Expression von *Adgre1* gemessen. Während in der gesunden Leber *Adgre1* in vergleichbarem Maße exprimiert wird, ist sie bei LPL<sup>ΔLysM</sup> NASH-Mäusen mit einer 4,9-fachen Expression ausgeprägter als bei LPL<sup>fl/fl</sup> NASH-Tieren mit einer 3,4-fachen Expression in Relation zur LPL<sup>fl/fl</sup> CD-Kohorte ( $p = 0,0367$ ) (s. Abb. 3.29D). Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass eine LPL-Deletion in myeloiden Zellen zu einer erhöhten Anzahl an Makrophagen in der Leber und aufgrund dessen zu einer erhöhten *Adgre1*-Expression führt.

Damit eine verlässliche Aussage über die KC-Frequenz in der Leber getroffen werden kann, wurde eine F4/80-IHC durchgeführt und quantifiziert (s. Abb. 3.30).



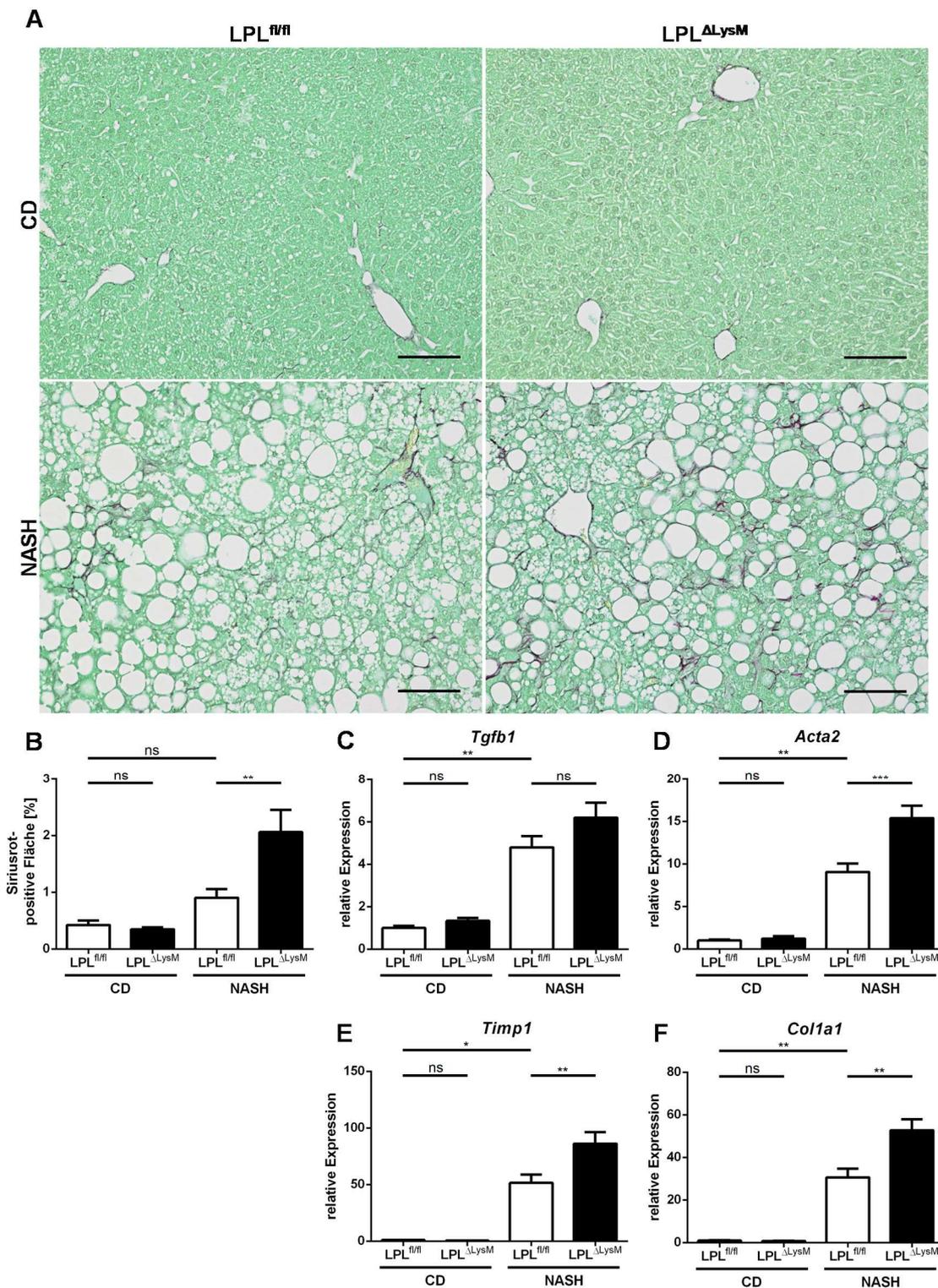
**Abb. 3.30: Quantifizierung der F4/80-positiven Zellen in CD- und NASH-Diät-gefütterten LPL<sup>fl/fl</sup>- und LPL<sup>ΔLysM</sup>-Mäusen**

A) Repräsentative Bilder der F4/80-IHC (20x Vergrößerung, Maßstab: 100  $\mu$ m) sowie B) die densitometrische Quantifizierung der IHC von LPL<sup>fl/fl</sup>- und LPL<sup>ΔLysM</sup>-C57BL/6J-Mäusen nach einer 24-wöchigen Fütterung mit einer CD bzw. NASH-Diät ( $n_{LPL^{fl/fl} CD} = 4$ ;  $n_{LPL^{\Delta LysM} CD} = 6$ ;  $n_{LPL^{fl/fl} NASH} = 14$ ;  $n_{LPL^{\Delta LysM} NASH} = 12$ ).

Auf Proteinebene konnte die Induktion der Expression von *Adgre1* sowohl aufgrund der Verabreichung der NASH-Diät als auch aufgrund der LPL-Defizienz in myeloiden Zellen im Vergleich der beiden NASH-Kohorten nicht reproduziert werden. Die Quantifizierung der F4/80-positiven Fläche und somit der Anteil der Lebermakrophagen am Gesamtgewebe ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Mit einem Anteil zwischen ca. 0,7% und ca. 0,9% ist die histologisch bestimmte Frequenz an F4/80-positiven Zellen vergleichbar (s. Abb. 3.30B). Einzig auf die Morphologie der KC wirkt sich die

Fütterung mit einer NASH-induzierenden Diät aufgrund des eingelagerten Fetts aus (s. Abb. 3.30A). Somit konnte auf Proteinebene weder ein Einfluss der NASH noch ein Einfluss der LPL-Defizienz in myeloiden Zellen auf den Anteil der KC nachgewiesen werden.

Abschließend sollte die Fibrogenese in den Tieren analysiert und der Einfluss des Zell-spezifischen LPL KO auf die Expression profibrotischer Gene und die Bildung von Kollagenfasern in der Leber dokumentiert werden (s. Abb. 3.31).



**Abb. 3.31: Evaluation der Fibrose in CD- und NASH-Diät-gefütterten LPL<sup>fl/fl</sup>- und LPL<sup>ΔLysM</sup>-Mäusen**

A) Repräsentative Bilder der SR-Färbung (20x Vergrößerung, Maßstab: 100 μm), B) die densitometrische Quantifizierung der SR-Färbung zur Bestimmung der Fibrose auf Proteinebene sowie die relative Expression der profibrotischen Gene C) *Tgfb1*, D) *Acta2*, E) *Timp1* und F) *Col1a1* im Gesamtlebergewebe von LPL<sup>fl/fl</sup>- und LPL<sup>ΔLysM</sup>-C57BL/6J-Mäusen nach einer 24-wöchigen Fütterung mit einer CD bzw. NASH-Diät (n<sub>LPL<sup>fl/fl</sup></sub><sub>CD</sub> = 4; n<sub>LPL<sup>ΔLysM</sup></sub><sub>CD</sub> = 6; n<sub>LPL<sup>fl/fl</sup></sub><sub>NASH</sub> = 16; n<sub>LPL<sup>ΔLysM</sup></sub><sub>NASH</sub> = 12-13).

Anhand Abb. 3.31A ist die Ausbildung von Kollagenfasern aufgrund der 24-wöchigen Fütterung mit einer hochkalorischen, Cholesterin-angereicherten Fettdiät gut zu erkennen. Dabei zeigen sich Unterschiede zwischen den Lebern von Cre-negativen und Cre-positiven NASH-Mäusen. In LPL<sup>Δ<sub>LysM</sub></sup>-Tieren haben sich deutlich mehr Septen gebildet. Diese visuelle Einschätzung wird durch die Quantifizierung der rot-gefärbten Fläche und somit des Kollagens bestätigt. Während bei der LPL<sup>fl/fl</sup> NASH-Gruppe im Durchschnitt 0,9% der Fläche SR-positiv gefärbt ist, ist der Anteil an Kollagen in der LPL<sup>Δ<sub>LysM</sub></sup> NASH-Kohorte mit 2,06% mehr als doppelt so hoch ( $p = 0,0056$ ) (s. Abb. 3.31B). Die vermehrte Fibrogenese aufgrund einer LPL-Defizienz in myeloiden Zellen im Zusammenhang der NASH kann ebenfalls auf Genebene gezeigt werden. Die Expression aller vier untersuchten profibrotischen Gene ist bei LPL<sup>Δ<sub>LysM</sub></sup> NASH im Vergleich zu LPL<sup>fl/fl</sup> NASH erhöht (s. Abb. 3.31C-F). Mit Ausnahme von *Tgfb* ist dieser Anstieg jeweils signifikant ( $p_{Acta2} = 0,0006$ ;  $p_{Timp1} = 0,0082$ ;  $p_{Colla1} = 0,0013$ ). In NASH-Lebern von Cre-negativen Mäusen ist die *Tgfb*-Expression um das 4,8-fache und in NASH-Lebern von Cre-positiven Mäusen um das 6,8-fache im Vergleich zur LPL<sup>fl/fl</sup>-Kontrollgruppe erhöht ( $p = 0,2040$ ; s. Abb. 3.31C). Dies entspricht einer ca. 22% höheren Expressionsrate aufgrund der LPL-Defizienz in myeloiden Zellen. Hinsichtlich der Expression von *Acta2*, *Colla1* und *Timp1* beträgt die Induktion der Expressionsrate sogar ca. 70% (s. Abb. 3.31D-F). Somit scheint eine LPL-Defizienz in myeloiden Zellen die Fibrogenese im Zusammenhang der NASH-Progression zu forcieren. Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass ein LPL KO in myeloiden Zellen die NASH-Progression fördert. Neben der gesteigerten Fibrogenese konnte ebenfalls die vermehrte Expression proinflammatorischer und proapoptischer Gene gezeigt werden.

## 4 Diskussion

Die NAFLD ist eine komplexe Erkrankung, deren Pathogenese trotz der weltweit hohen Prävalenz noch nicht gänzlich verstanden ist und für die es bislang keine zugelassene pharmakologische Therapie gibt. Dabei gewinnt die NAFLD aufgrund der stark zunehmenden Anzahl an erkrankten Patienten immer weiter an Bedeutung. Schon heute ist eine vorliegende NASH-Erkrankung die zweithäufigste Ursache für eine Lebertransplantation in den USA [27]. Anhand eines mathematischen Modells gehen Estes *et al.* davon aus, dass der Anteil der NAFLD-Patienten an der amerikanischen Bevölkerung von 25,8% 2015 auf 28,4% 2030 ansteigt. Außerdem wird angenommen, dass 2030 von diesen 100,9 Mio. NAFLD-Patienten 27 Mio. an einer NASH erkrankt sind – ein Anstieg des Anteils an NASH-Patienten von 20% 2015 auf 27% 2030 [142]. Aus diesem Grund ist es von zentraler Bedeutung, die Mechanismen zu untersuchen, die für den Übergang der benignen steatotischen Leber zur NASH und somit für die NAFLD-Progression verantwortlich sind. In dieser Arbeit wurde die Bedeutung der Enzyme LPL und MPO für das Fortschreiten der Erkrankung analysiert. Damit sollte geklärt werden, inwieweit die Proteine neue Ansätze für eine pharmakologische NASH-Therapie bieten. Diese sollte neben der Spezifität zudem eine Verbesserung der NASH-Merkmale Fibrose, Inflammation und Leberzellschaden aufweisen. Die Umstellung der Lebensgewohnheiten mit einer einhergehenden Gewichtsreduktion und erhöhten körperlichen Aktivität kann zwar in vielen Fällen eine Reduktion der NASH-Parameter Fibrose, Inflammation und Steatose bewirken, allerdings ist hierfür in den meisten Fällen eine Gewichtsabnahme von mindestens 7% erforderlich [75]. Da aber die therapeutische Lebensstilintervention bei einem großen Teil der NASH-Patienten nicht erfolgreich ist [75], ist zusätzlich die Entwicklung einer medikamentösen Therapie notwendig.

### 4.1 Das angewandte diätische Mausmodell bildet die humane NASH-Erkrankung korrekt ab

Die Voraussetzung zur Evaluation der Bedeutung von MPO und LPL für die NASH-Progression war die Generierung eines NASH-Phänotyps in den Mäusen, der der menschlichen Erkrankung ähnelt. Die Anforderung an ein murines NASH-Modell war die Abbildung der Erkrankung hinsichtlich der verschiedenen Charakteristika und Merkmale,

wozu primär Steatose, Hepatozytenschädigung, Inflammation und im weiteren Verlauf Fibrose zählten. Außerdem sollte ein realitätsnahes Modell die mit einer NASH assoziierten metabolischen Merkmale Dyslipidämie, IR und Übergewicht aufweisen. Somit kann der Einfluss des MPO KO bzw. der Zell-spezifischen LPL-Deletion auf möglichst alle Aspekte der Erkrankung untersucht werden.

Studien konnten zeigen, dass NAFLD-Patienten verglichen mit Kontrollkohorten sowohl mehr Cholesterin als auch mehr Fruktose über die Nahrung aufnehmen [20, 21]. Neben Cholesterin und Fruktose sind ebenfalls Transfette mit einer NASH-Progression assoziiert, da sie z.B. eine Dyslipidämie begünstigen und evtl. die Entstehung einer IR und Übergewicht fördern. Außerdem scheinen Transfette proinflammatorische Zytokine zu induzieren (zusammengefasst in [143]). Aus diesem Grund weist die verwendete Diät hohe Anteile an Cholesterin (2%), Fruktose (20% der Gesamtkalorienmenge) und Transfetten (22,6% der Fette) auf. Eine Studie mit Ratten zeigte, dass eine Fruktose-angereicherte Diät in Kombination mit einem hohen Fettgehalt zwar immer zu einer Steatose und somit zur NAFL führt, dass aber nur in Kombination mit Transfetten eine Fibrose und ein NASH-ähnlicher Phänotyp generiert werden konnten [144]. Cholesterin begünstigt zusätzlich die NASH-Progression. Eine Studie mit Mäusen konnte zeigen, dass durch die Ergänzung mit Cholesterin eine fettreiche Diät einen verstärkten NASH-Phänotyp inklusive Fibrose hervorruft [145]. Studien weisen darauf hin, dass sowohl bei murinen Fibrosemodellen als auch bei der Fibrose im Zusammenhang mit NASH die Verabreichung einer Cholesterin-angereicherten (Fett-)Diät zu einer vermehrten HSC-Aktivierung und somit einer stärker ausgeprägten Fibrose führt. Dabei wiesen die HSC eine erhöhte Cholesterinakkumulation auf [146, 147]. Eine Cholesterin-reiche Ernährung scheint darüber hinaus das Zirrhose- und Leberkrebsrisiko zu erhöhen, wie eine Studie aus dem Jahre 2009 mit über 9000 Teilnehmern zeigte [148]. Die Diät weist zudem mit ca. 17% aller Fettsäuren einen hohen Anteil an der gesättigten Fettsäure Palmitin auf. Studien deuten darauf hin, dass Palmitinsäure sowohl in KC als auch in HSC das Inflammasom aktiviert und somit die Expression proinflammatorischer Zytokine induziert bzw. HSC aktiviert, wodurch die NASH-Progression hinsichtlich der Fibrose gefördert wird [149, 150].

Aufgrund der Fütterung dieser Spezialdiät entwickelten die Versuchstiere leberspezifische NASH-Merkmale, wodurch die Auswirkungen einer MPO- bzw. LPL-Defizienz auf diese Parameter analysiert werden konnte: Neben einer ausgeprägten Steatose (s. Abb. 3.5) zeigten die NASH-Mäuse ebenfalls einen verstärkten Leberschaden, nachgewiesen durch erhöhte Serumtransaminasen (s. Abb. 3.8B&C, 3.21B&C und 3.27B&C) sowie die Induktion der Expression proapoptotischer Gene (s. Abb. 3.9 und 3.28). Somit reproduziert das Mausmodell den apoptotischen Hepatozytentod als Pathomechanismus der NASH, da auch im Menschen die *Bbc3*-Expression als NASH-definierendes Merkmal im Vergleich zur NAFL identifiziert wurde [151]. In einer Tiermodell-basierenden Studie konnte zudem die Induktion der NASH-assoziierten Gene *Fas*, *Faslg*, *Casp8* sowie *Bax* gemessen werden [152]. Die HE-Färbung visualisierte die für eine vorliegende NASH-Erkrankung charakteristischen Merkmale Steatose und Schädigung der Leber, wie z.B. den Leberzellschaden (s. Abb. 3.8A, 3.21A und 3.27A). Zusätzlich waren auf dieser histologischen Färbung die infiltrierenden Immunzellen in den NASH-Lebern erkennbar. Die Induktion der hepatischen Inflammation als weiteres Merkmal der Erkrankung wurde zudem durch eine signifikant erhöhte Expression proinflammatorischer Gene validiert (s. Abb. 3.10, 3.22 und 3.29). Die Manifestation einer Fibrose als wichtiger Indikator für den Verlauf der NASH und für die NASH-assoziierte Mortalität war von besonderer Bedeutung. Die Lebern von Mäusen, die die hochkalorische, Cholesterin-angereicherte Fettdiät verabreicht bekommen haben, wiesen sowohl einen höheren Anteil an Kollagenfasern als auch eine verstärkte Expression profibrotischer Gene auf (s. Abb. 3.11, 3.23 und 3.31).

Ob eine MPO- oder LPL-Defizienz die Ausprägung NASH-assoziiierter metabolischer Merkmale und Risiko-/Progressionsfaktoren und somit die NASH-Progression beeinflusst, kann durch das verwendete Mausmodell nicht analysiert werden, da nicht alle metabolischen Kennzeichen einer humanen NASH reproduziert werden konnten. So traten zwar signifikant höhere Lebergewichte und Cholesterinserumspiegel im Vergleich zu Kontrolltieren auf, aber eine IR oder ein signifikant erhöhtes Körpergewicht konnte durch die Diät nicht hervorgerufen werden (s. Abb. 3.4, 3.6, 3.19 und 3.26). Ein Grund für die fehlende IR und das verhältnismäßig niedrige Körpergewicht könnte darin bestehen, dass die Diät primär in der Leber zu pathologischen Veränderungen führte. Das Körpergewicht stieg in der NASH-

Kohorte in allen drei untersuchten Experimenten zwar stärker an als in den Kontrolltieren, doch war dieser Effekt gerade im Vergleich zur Gewichtszunahme der Leber gering ausgeprägt. Eine deutliche Zunahme des peripheren Fettgewebes war zudem nicht erkennbar. Dies könnte die fehlende IR in den NASH-Tieren begründen. Zwei andere Studien, die die hochkalorische, Cholesterin-angereicherte Diät ebenfalls verwendet haben, zeigten unterschiedliche Ergebnisse, die darauf hindeuten, dass die Fütterungsdauer von entscheidender Bedeutung ist. Während in der einen Studie die Mäuse für 30 Wochen mit der speziellen Diät gefüttert worden sind und daraufhin signifikant höhere Körpergewichte sowie HOMA-IR Werte aufwiesen, wurden in einer anderen Studie durch 16 Wochen Futterapplikation weder das Körpergewicht noch der Blutglukosespiegel signifikant beeinflusst [153, 154]. Somit könnte eine Erklärung für die unveränderte Insulinsensitivität in den beschriebenen Modellen eine zu kurze Fütterungsdauer sein. Unabhängig von der Fütterungsdauer scheint allerdings die signifikante Erhöhung des Cholesterinserumspiegels zu sein, die in allen betrachteten Experimenten auftritt und die auf die hohe Cholesterinkonzentration in der Diät zurückzuführen ist.

Veränderungen des Mikrobioms sind ebenfalls charakteristisch für eine NAFLD. So weisen NAFLD-Patienten eine geringere alpha-Diversität und abweichende beta-Diversitäten auf [136]. Zudem haben Übergewichtige einen höheren Anteil an Firmicutes und eine niedrigere Frequenz der Bacteroidetes als Normalgewichtige [137]. Im Mausmodell konnte durch die Verabreichung einer fettreichen Diät diese Verschiebung bei den Phyla ebenfalls dokumentiert werden [155, 156]. Während die hier verwendete NASH-induzierende Diät die Abnahme der alpha-Diversität und die Verschiebung der beta-Diversität des Mikrobioms reproduzierte (s. Abb. 3.7A&B), wurden interessanterweise keine Unterschiede auf Phylumebene detektiert (s. Abb. 3.7C). Eventuell ist dies auf die Zusammensetzung der hier verwendeten Hochfettdiät mit einer erhöhten Cholesterinkonzentration zurückzuführen. Eine Studie, die für die NASH-Induktion in Mäusen ebenfalls eine Cholesterin-angereicherte Diät verwendet hat, konnte nur eine Abnahme der Bacteroidetes aber keine Zunahme der Firmicutes nachweisen [157]. Somit konnte mithilfe des verwendeten Mausmodells primär der Einfluss der MPO-Defizienz auf die alpha- und beta-Diversität des Mikrobioms analysiert werden. Eine Veränderung der Zusammensetzung des Mikrobioms

auf Phylumebene, wie sie bei NAFLD-Patienten dokumentiert wurde, war hingegen nicht möglich.

Zusammenfassend bewirkten die Komponenten der Spezialdiät pathologische Veränderungen der Leber wie Inflammation, Leberzellschaden und Fibrogenese, die charakteristisch für die humane NASH sind. Das Modell war also dazu geeignet, den Einfluss von MPO und LPL auf die NASH-Progression zu untersuchen.

#### **4.2 MPO fördert die NASH-Progression**

Es wurde bereits gezeigt, dass NASH-Patienten im Vergleich zu NAFL-Probanden sowohl eine erhöhte MPO-Konzentration im Blut als auch vermehrt MPO-positive Zellen in der Leber aufweisen [80]. In dieser Arbeit konnte nun im Vergleich zu gesunden Probanden bei Patienten mit einer histologisch gesicherten NASH, aber nicht bei Patienten mit einer NAFL eine signifikant höhere MPO-Plasmakonzentration gemessen werden (s. Abb. 3.1). Das verwendete diätetische Mausmodell zur Generierung einer NASH zeichnete sich durch einen Anstieg der MPO-Serumkonzentration sowie einer erhöhten Anzahl an MPO-positiven Zellen in den Lebern von Mäusen, die mit der Cholesterin-angereicherten Fettdiät gefüttert worden sind, aus (s. Abb. 3.3) und konnte somit den NASH-Phänotyp hinsichtlich MPO reproduzieren. In beiden MPO KO-Gruppen konnte dabei das Enzym im Serum nicht detektiert werden, sodass die Effektivität des verwendeten globalen MPO KO nachgewiesen wurde (Daten nicht gezeigt).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen einer MPO-Defizienz auf die NASH-Progression in einem Mausmodell untersucht, das durch die Zusammensetzung der Diät und die lange Fütterungsdauer die Prozesse der humanen NAFLD sehr gut abbildet (s. Kapitel 4.1). Es existieren zwar bereits zwei Publikationen, die die Rolle von MPO für die Entstehung und Entwicklung der NASH thematisieren, doch wurde in beiden Studien die NASH nicht wie bei der vorliegenden Arbeit in einem langsamen, physiologischen Prozess generiert, der ausschließlich auf einer Diät basiert, die einer ungesunden „westlichen“ Diät nachempfunden ist. Eine Studie verwendete LDLR KO-Mäuse, die durch die Verabreichung einer fettreichen Diät innerhalb kurzer Zeit einen NASH-Phänotyp ausbilden [158]. Es finden sich allerdings keine Arbeiten zu einem Zusammenhang eines Polymorphismus im LDLR-Gen und der NAFLD bei Menschen, sodass es sich um ein eher artifizielles Mausmodell handelt, das durch

eine schnelle NASH-Progression (achtwöchige Fütterung einer fettreichen Diät) ebenfalls unphysiologisch ist. Zudem nimmt die LDLR-Defizienz bei diesem NASH-Modell bereits Einfluss auf die Pathogenese, sodass keine unvoreingenommenen Aussagen zu Pathomechanismen abgeleitet werden können. Ähnlich verhält es sich mit der Methionin und Cholin-defizienten (MCD)-Diät als NASH-Modell, das in der anderen Studie verwendet wurde [159] und das mit vier Wochen ebenfalls in kürzester Zeit einen NASH-Phänotyp generiert. Die Verabreichung einer MCD-Diät stellt zwar ein vielfach verwendetes und bekanntes NASH-Modell dar, das allerdings einige Nachteile aufweist. So führt die Verabreichung der MCD-Diät zur Unterversorgung und zu einem Hyperkatabolismus, sodass die Tiere 20 bis 40% ihres Gewichts sowie proportional dazu Lebermasse verlieren [160]. Dadurch weist dieses murine NASH-Modell keine der Adipositas-assoziierten NAFLD-Merkmale auf. Außerdem werden die Versuchstiere teilweise Insulin-sensitiver anstatt eine IR zu entwickeln. Aufgrund des veränderten Stoffwechsels und der unphysiologischen Entstehung der NASH ist die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die humane Erkrankung limitiert.

Neben der Verwendung eines physiologischen Mausmodells ist ein weiterer Vorteil dieser Arbeit die Verwendung von Wurfgeschwistern. Pulli *et al.* verwendeten als WT-Kontrollen C57Bl/6J-Mäuse und keine Wurfgeschwister der MPO KO-Tiere [159]. Durch die Verwendung von zwei getrennten Inzuchtlinien könnten sich Unterschiede hinsichtlich der NASH-Progression ergeben haben, die nicht nur auf dem MPO KO sondern auf andere genetische Abweichungen basieren. Zudem könnte sich das Mikrobiom der beiden Genotypen unterscheiden haben, da es sich nicht um Wurfgeschwister handelte. Das Mikrobiom hat dabei Einfluss auf Merkmale der NASH wie die Steatose und die Inflammation [134] und könnte somit ebenfalls für Abweichungen verantwortlich sein.

In der vorliegenden Arbeit konnten genetisch verursachte Unterschiede zwischen MPO WT- und MPO KO-Mäusen durch die Verwendung von Wurfgeschwistern ausgeschlossen werden. Somit konnte ebenfalls ein vergleichbares Mikrobiom zu Beginn des Versuchs sichergestellt werden. Das einheitliche Mikrobiom zu Beginn sowie am Ende des Fütterungsversuchs wurde durch die Mikrobiomanalyse nachgewiesen (s. Abb. 3.7).

Dadurch wurden die Faktoren, die ebenfalls den NASH-Phänotyp beeinflussen und den abweichenden Phänotyp bei MPO WT NASH und MPO KO NASH verursachen könnten, minimiert bzw. ausgeschlossen.

Unabhängig von den Schwachpunkten hinsichtlich der Modelle deuten die beiden Publikationen hinsichtlich MPO in NASH darauf hin, dass Mäuse in Abwesenheit von MPO eine schwächere NASH-Progression aufweisen, da sie jeweils weniger Leberschaden, Fibrose und Inflammation entwickeln [158, 159]. Dieses Ergebnis konnte in der vorliegenden Arbeit reproduziert werden. Dabei zeigte sich außerdem, dass MPO spezifisch unter NASH-Bedingungen die untersuchten Merkmale beeinflusst, da der MPO KO in gesunden Mäusen bei Standardbedingungen keine Auswirkungen auf die untersuchten Parameter hatte (s. Abb. 3.4-3.11). Unter Standardbedingungen zeigte besonders die *Microarray*-Analyse die Vergleichbarkeit von MPO WT und MPO KO-Tieren, da diese lediglich für zwei Gene eine signifikant abweichende Expression zwischen MPO WT CD und MPO KO CD ergab (s. Abb. 3.12A). Dagegen beeinflusste ein MPO KO in Lebern von Mäusen mit einer vorliegenden NASH die Expression von 589 Genen signifikant (s. Abb. 3.12C). Es konnten insgesamt 84 Signalwege identifiziert werden, an denen diese Gene beteiligt sind. Diese Signalwege umfassten Prozesse unter anderem hinsichtlich des Metabolismus, der Inflammation und der EZM-Organisation (s. Abb. 3.13). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass MPO bei der NASH in die Regulation der Vorgänge zur Fibrogenese, zum Zelltod und zum Stoffwechsel involviert ist.

Für die genaue Bestimmung der NASH-Charakteristika Steatose, Inflammation, Apoptose und Fibrose wurden verschiedene Analysen durchgeführt (s. Abb. 3.5, 3.6, 3.8-3.11). Die Quantifizierung der Steatose in dieser Arbeit (s. Abb. 3.5) und in der Studie von Rensen *et al.* ergab ein vergleichbares Niveau der Lipidakkumulation bei MPO-defizienten und WT-Tieren. Allerdings zeigten sowohl Pulli *et al.* als auch unveröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe mit einer hochkalorischen und zuckerreichen Fettdiät eine geringere Lipidakkumulation in MPO KO-Mäusen. Ein möglicher Grund könnte sein, dass ROS die Sekretion von VLDL inhibieren [52]. Da MPO ROS generiert, wäre es möglich, dass aufgrund dieses Mechanismus der Steatosegrad in KO-Mäusen geringer als in WT-Tieren ist. Möglicherweise wird der Lipid- und Lipoproteinstoffwechsel durch eine Cholesterin-

angereicherte Diät allerdings so verändert, dass dieser Mechanismus in diesem Modell irrelevant ist und somit kein Unterschied in der Lipidakkumulation gemessen werden konnte.

Zur Klärung, ob durch den MPO KO weniger NASH-assoziierte ROS generiert wurden und somit weniger Lipidperoxidation auftrat, wurde die HNE-Konzentration in den NASH-Lebern ermittelt. HNE entsteht durch die Peroxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren und amplifiziert durch die längere Halbwertszeit den oxidativen Stress [161]. Die Lebern der MPO KO NASH-Kohorte wiesen signifikant geringere HNE-BSA-Konzentrationen als die MPO WT NASH-Gruppe auf (s. Abb. 3.7D), sodass von einer verminderten ROS-Produktion aufgrund der MPO-Defizienz ausgegangen werden kann. Dazu passend zeigte die *Microarray*-Analyse, dass aufgrund des MPO KO sowohl die Gene, die mit der Generation von Superoxid-Anionen als auch Gene, die mit der Apoptose assoziiert sind, bei NASH weniger exprimiert werden (s. Abb. 3.15B&E). Zudem konnte mittels qPCR in den Lebern der MPO KO NASH-Mäuse eine reduzierte Expressionsrate proapoptotischer Gene verglichen mit der MPO WT NASH-Gruppe nachgewiesen werden (s. Abb. 3.9). Eine Verminderung des oxidativen Stress‘ aufgrund des MPO KO kann eine Erklärung für die verminderte Apoptose sein, da ROS die Mitochondrien-vermittelte Apoptose induzieren [140]. Neben der Evaluation der Apoptose mithilfe der Expressionsanalyse wurde der Zellschaden durch die Messung der Transaminasen dokumentiert. Dabei zeigte sich, dass die NASH-abhängige Erhöhung sowohl der ALT- als auch der AST-Serumkonzentration durch eine MPO-Defizienz signifikant abgeschwächt wurde (s. Abb. 3.8B&C). Neben der Freisetzung der Transaminasen bei der Schädigung von Zellen, sodass die ALT- und AST-Konzentration im Blut ansteigt, kommt es ebenfalls zu einer Freisetzung von DAMPs, wozu die mitochondriale DNA, Adenosintriphosphat oder das Protein *high mobility group box-1* gehören [162]. DAMPs aktivieren die Signalwege der *pattern recognition receptors* (PRR) wozu z.B. TLR zählen, wodurch Immunzellen aktiviert werden. Dies führt zu einer Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF $\alpha$  [163]. In dieser Arbeit konnte aufgrund des MPO KO bei NASH sowohl eine Reduktion der PRR- und TLR-Signalwege (s. Abb. 3.13B) als auch eine geringere Expression einiger proinflammatorischer Gene (s. Abb. 3.10) nachgewiesen werden. Die Schädigung von

Hepatozyten und die Freisetzung von DAMPs begünstigen zusätzlich zu den proinflammatorischen Prozessen auch die Fibrogenese. Neben dem proinflammatorischen Zytokin  $TNF\alpha$  und dem Chemokin MCP1 aktiviert auch das DAMP Adenosintriphosphat HSC [56, 164]. Zusätzlich fördert der oxidative Stress die Fibrogenese, da ROS HSC direkt aktivieren [53] und HNE in Makrophagen die Expression von *Tgfb* und in aktivierten HSC die Expression von *Col1a1* induzieren [54, 55]. Eine schwächere Fibrogenese wurde in den MPO KO NASH-Mäusen verglichen mit den MPO WT NASH-Tieren sowohl auf Gen- als auch auf Proteinebene dokumentiert (s. Abb. 3.11&3.14).

Anhand der gezeigten Daten zeichnet sich folgendes Konzept ab: Bei einer NASH-Erkrankung peroxidiert MPO die eingelagerten Lipide der steatotischen Leber und führt somit zu vermehrtem oxidativen Stress. Dies hat eine Schädigung und Apoptose der Hepatozyten zur Folge, wodurch sowohl Immunzellen als auch HSC aktiviert und somit Inflammation und Fibrogenese verstärkt werden.

Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit konnte MPO als mögliches Zielmolekül für eine NASH-spezifische Therapie identifiziert werden, dessen Defizienz sich sowohl auf die Zellschädigung, die Inflammation als auch die Fibrogenese und somit auf die pathogenen Prozesse der NASH positiv auswirkt.

#### **4.3 MPO als mögliches Zielmolekül einer NASH-spezifischen Therapie**

MPO könnte ein vielversprechendes Zielmolekül für eine spezifische NAFLD-Therapie darstellen. Bei einer Inhibition des Enzyms wäre nicht mit gravierenden Nebenwirkungen zu rechnen, da Patienten mit einer angeborenen MPO-Defizienz nur wenige klinische Auffälligkeiten zeigen – 95% der Patienten gelten als asymptomatisch. Studien zeigen, dass MPO-defiziente Patienten z.B. anfälliger für *Candida*-Infektionen sind, doch scheinen Neutrophile das Fehlen von MPO kompensieren zu können. Dadurch können die Immunzellen ihr antimikrobielles Potential weitgehend aufrechterhalten [165]. Bei den Versuchstieren dieser Arbeit konnten keine Symptome hinsichtlich einer Infektion festgestellt werden, wobei anzumerken ist, dass die Tiere unter relativ Pathogen-freien Bedingungen gehalten worden sind.

Unveröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass Mäuse, die einen pharmakologischen MPO-Inhibitor in Kombination mit einer fett- und zuckerreichen hochkalorischen Spezialdiät oral verabreicht bekommen haben, keine offensichtlichen Symptome bezüglich einer geschwächten Immunabwehr aufweisen. Die Behandlung der Tiere, bei denen eine NAFLD durch eine vorherige Fütterung mit der Spezialdiät bereits induziert wurde, führte zu einer verminderten Steatose, Fibrose und Leberzellschädigung verglichen mit Tieren, die weiterhin mit der Fettdiät ohne den zugesetzten MPO-Inhibitor gefüttert wurden. Diese Daten zeigen, dass eine MPO-Inhibition ebenfalls vorteilhaft ist, wenn bereits eine NAFLD vorliegt.

Des Weiteren ist eine erhöhte MPO-Plasmakonzentration mit Bluthochdruck vor allen Dingen bei gleichzeitig auftretender Hyperglykämie sowie mit Übergewicht assoziiert [166, 167]. Übergewicht, Bluthochdruck und Hyperglykämie sind sowohl Merkmale des MtS als auch mutmaßliche Progressionsfaktoren der NAFLD [168, 169]. Außerdem handelt es sich dabei um Risikofaktoren für Herz-Kreislauf-Erkrankungen, die die Haupttodesursache von NAFLD-Patienten darstellen. Das Risiko für Herz-Kreislauf-Erkrankungen und insbesondere der Koronaren Herzerkrankung ist bei NAFLD-Patienten zusätzlich erhöht (zusammengefasst in [170]). Die Plasmakonzentration von MPO konnte als Prädiktor für eine Myokardinfarkt bei Patienten mit Brustschmerzen identifiziert werden [171]. Durch die Assoziation von MPO mit Atherosklerose, Koronarer Herzerkrankung und der Mortalität aufgrund von Herzkreislauferkrankungen [172], führte eine tierexperimentelle Studie mit einem MPO-Inhibitor zu einer Stabilisierung der atherosklerotischen Plaques [173]. Eine pharmakologische MPO-Inhibition könnte sich somit nicht nur positiv auf die leberspezifischen NASH-Merkmale und die Risikofaktoren der NAFLD auswirken, sondern ebenfalls das Risiko für Herz-Kreislauf-Erkrankungen und deren Progression und Mortalität reduzieren.

Zusammenfassend konnte MPO in einem tierexperimentellen genetischen Modell als vielversprechendes Zielmolekül für eine pharmakologische NASH-Therapie identifiziert werden, da es neben der Inflammation und Leberzellschädigung auch die Fibrose als Faktor für die Progression und Mortalität der Erkrankung verbessert. Außerdem könnten durch die

Assoziation von MPO mit der Atherosklerose und dem MtS Herz-Kreislauf-Erkrankungen und somit die Haupttodesursache von NAFLD-Patienten gemindert werden.

#### **4.4 Myeloide Zellen sind vorrangig für die NASH-assoziierte Induktion der hepatischen *Lpl*-Expression verantwortlich**

Tierexperimentelle Arbeiten und humane Studien zeigen, dass das Enzym LPL, das in der gesunden Leber kaum vorhanden ist, in der Fettleber hochreguliert wird [118, 119, 174]. Dabei korreliert die hepatische LPL-Aktivität mit dem Fibrosegrad bzw. die hepatische *LPL*-Expression mit dem Steatosegrad [118, 174]. Außerdem wurde nachgewiesen, dass die hepatische *LPL*-Expression in NASH-Patienten signifikant höher als in NAFL-Patienten ist [120]. Auch diese Arbeit zeigte eine verstärkte *LPL*-Expression in NASH-Patienten in Relation zu einer nicht-NASH-Kohorte (s. Abb. 3.2). Trotz dieser Kenntnisse war zu Beginn der vorliegenden Arbeit unklar, welche Zellpopulation hierfür verantwortlich ist und welche Relevanz die *LPL*-Induktion in der NAFLD hat. Während Hepatozyten in der gesunden Leber kein *Lpl* exprimieren, konnte in KC eine *Lpl*-Expression nachgewiesen werden (s. Abb. 3.17).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass unter NASH-Bedingungen eine *Lpl*-Expression nicht in Hepatozyten induziert wird. Vielmehr ist der Anstieg der *Lpl*-Expression in der Fettleber auf eine verstärkte Expression in myeloiden Zellen zurückzuführen. So hatte eine Hepatozyten-spezifische *LPL*-Deletion in Mäusen auf NASH-Diät keinen Einfluss auf den Anstieg der *Lpl*-Expression, der genauso wie im Lebergewebe von *LPL<sup>fl/fl</sup>*-Tieren beobachtet wurde (s. Abb. 3.20A). Außerdem unterschieden sich *LPL<sup>fl/fl</sup>*- und *LPL<sup>ΔHep</sup>*-Mäuse hinsichtlich keines der untersuchten NASH-Merkmale (s. Abb. 3.18 bis 3.23), so dass die hepatozelluläre *Lpl*-Expression offenbar bei der NASH nicht induziert wird und somit nicht relevant für die NASH-Progression ist. Anders verhielt es sich bei der Charakterisierung der Tiere mit einer *LPL*-Deletion spezifisch in myeloiden Zellen. In *LPL<sup>ΔLysM</sup>*-Mäusen exprimieren die myeloiden Zellen, zu denen neben Monozyten und Makrophagen auch Granulozyten zählen, kein *Lpl*. Diese Deletion hemmte signifikant den NASH-induzierten Anstieg der *Lpl*-Expression im Gesamtlebergewebe im Vergleich zu Mäusen mit intakter *Lpl*-Expression (Cre-negativ). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Expression von *Lpl* in myeloiden Zellen hauptverantwortlich für den Anstieg der *Lpl*-Expression in der Leber

während der NASH-Progression ist. Allerdings verhinderte die LPL-Deletion in myeloiden Zellen die Induktion der hepatischen *Lpl*-Expression nicht komplett. So betrug der hepatische LPL-Anstieg in der LPL<sup>ΔLysM</sup> NASH-Kohorte verglichen mit der LPL<sup>fl/fl</sup> CD-Gruppe weiterhin das Achtfache (s. Abb. 3.25A). Eine zusätzliche Erklärung für die NASH-assoziierte gesteigerte *Lpl*-Expression trotz der LPL-Defizienz spezifisch in myeloiden Zellen könnte die erhöhte Anzahl an HSC und deren Aktivierung aufgrund der NASH sein. Wie in Abb. 3.12 gezeigt, konnte eine *Lpl*-Expression in HSC nachgewiesen werden, sodass die erhöhte HSC-Anzahl in den Lebern von LPL<sup>ΔLysM</sup> NASH-Mäusen für die nachgewiesene *Lpl*-Expression verantwortlich sein kann. Außerdem konnten Mello *et al.* eine gesteigerte *Lpl*-Expression in aktivierten HSC gegenüber nicht-aktivierten HSC nachweisen, wobei das Expressionsniveau deutlich höher als bei den isolierten KC lag [175]. Eine unzureichende LPL-Deletion in den LysM-Cre-positiven Tieren als Erklärung für die dokumentierte induzierte hepatische *Lpl*-Expression in den LPL<sup>ΔLysM</sup> NASH-Mäusen kann weitgehend ausgeschlossen werden. Die Funktionalität des LPL KO basierend auf dem Cre-LoxP-System wurde mithilfe einer qPCR überprüft. In isolierten, aufgereinigten KC von gesunden LPL<sup>ΔLysM</sup>-Tieren konnte keine *Lpl*-Expression nachgewiesen werden (s. Abb. 3.24A).

Nach Beendigung der Experimente für diese Arbeit erschien eine Publikation von Teratani *et al.*, die sich mit der Bedeutung der *Lpl*-Expression von HSC für die NASH-Progression beschäftigte. Diese Studie zeigt eine deutlich reduzierte hepatische *Lpl*-Expression in NASH-Mäusen mit einer nach Autorenangaben HSC-spezifischen LPL-Defizienz. Das Niveau der hepatischen *Lpl*-Expression war dabei lediglich auf dem Niveau der WT-Kontrollgruppe [120]. Diese Ergebnisse würden dafür sprechen, dass lediglich HSC für die induzierte hepatische *Lpl*-Expression bei der NASH verantwortlich sind und somit den Erkenntnissen der vorliegenden Arbeit widersprechen. Allerdings ist fraglich, wie glaubwürdig das Ergebnis dieser Studie ist. Die LPL-Deletion erfolgte in der Studie von Teratani *et al.* mithilfe des Cre-LoxP-Systems, wobei die Cre-Rekombinase abhängig vom Promotor des Gens *Gfap*, das für das Saure Gliafaserprotein (GFAP) kodiert, exprimiert wurde [120]. Frühere Arbeiten beschreiben, dass *Gfap* von ruhenden HSC exprimiert wird und einen Marker für eine HSC-Aktivierung darstellt [176]. Allerdings ist die *Gfap*-Expression in HSC sehr zweifelhaft. Eine Arbeit von Mederacke *et al.* konnte fast gar keine *Gfap*-Expression in HSC nachweisen,

vielmehr wurden Cholangiozyten und – wie bekannt – Astrozyten als *Gfap*-exprimierende Zellpopulation identifiziert [177]. In einer Studie wurde LPL ebenfalls *Gfap*-Promotor-abhängig deletiert, um die Astrozyten-spezifischen Auswirkungen der LPL-Defizienz zu analysieren. Diese Studie konnte im Gegensatz zu Teratani *et al.* keine Unterschiede hinsichtlich der *Gfap*-Expression in der gesunden Leber nachweisen [178]. Dass HSC neben myeloiden Zellen einen Beitrag zur Induktion der hepatischen *Lpl*-Expression bei der NASH leisten, ist somit zwar denkbar, aber in *vivo* noch nicht gut belegt und auch ein Beitrag von Cholangiozyten muss in Betracht gezogen werden.

#### 4.5 Die LPL-Defizienz in myeloiden Zellen führt zu einer verstärkten NASH-Progression

Interessanterweise hatte die LPL-Defizienz in myeloiden Zellen weder Auswirkungen auf den Steatosegrad noch auf das Körper- und Lebergewicht oder die Serumlipidkonzentration (s. Abb. 3.26 und 3.27A), obwohl der Einfluss von KC auf diese Merkmale bekannt ist: eine Depletion von KC führte in Ratten bei einer Fütterung mit einer fett- bzw. sukrosereichen Diät zu einer weniger ausgeprägten Steatose und zu einer erhöhten TG-Plasmakonzentration [179]. Allerdings scheint der prosteatotische Einfluss der KC unabhängig von der *Lpl*-Expression zu sein.

Eine vermehrte TG-Anreicherung in den Lebern von LPL<sup>Δ<sub>LysM</sub></sup> NASH-Mäusen wäre plausibel gewesen, da diese Kohorte eine höhere *Tnfa*-Expression aufwies (s. Abb. 3.29B). Außerdem wurde eine vermehrte Expression der Gene *Pycard* und *Nlrp3* dokumentiert (s. Abb. 3.29G&H), die für Komponenten des Inflammasoms kodieren, und somit für die Aktivierung von IL-1β verantwortlich sind (s. Kapitel 1.3.6). Frühere Studien hatten gezeigt, dass die Zytokine TNFα und IL-1β mit einer gesteigerten TG-Akkumulation assoziiert sind [179, 180]. In LPL<sup>Δ<sub>LysM</sub></sup> NASH- und LPL<sup>fl/fl</sup> NASH-Tiere konnte allerdings kein Unterschied hinsichtlich des Lebergewichts, der Steatose oder der Serumlipidkonzentration dokumentiert werden (s. Abb. 3.26 und 3.27A).

Etwas uneinheitliche Ergebnisse traten bei der Evaluation des Leberschadens auf. Während die Serumkonzentration der Transaminasen AST und ALT auf ein vergleichbares Niveau der Hepatozytenschädigung bei LPL<sup>Δ<sub>LysM</sub></sup> NASH- und LPL<sup>fl/fl</sup> NASH-Tiere schließen ließ (s. Abb. 3.27B&C), deutete die Expressionsanalyse verschiedener proapoptotischer Gene auf

vermehrten Zelltod in der LPL<sup>ΔLysM</sup> NASH-Kohorte hin (s. Abb. 3.28). Allerdings wurde dabei Gesamtlebergewebe verwendet, sodass unklar ist, in welcher Zellpopulation die proapoptotischen Vorgänge induziert wurden, wohingegen die Serumtransaminasen (insbesondere ALT) Hepatozyten-spezifisch sind. Somit könnte eine Erklärung für die gegenläufigen Ergebnisse sein, dass andere Zellpopulationen wie z.B. KC primär bei LPL<sup>ΔLysM</sup> NASH-Lebern geschädigt sind. Zukünftige Untersuchungen müssen dies näher aufklären.

Die Expressionsanalyse der sechs untersuchten proapoptotischen Gene deutete darauf hin, dass eine LPL-Defizienz in myeloiden Zellen unter NASH-Bedingungen die Mitochondrien-vermittelte Apoptose beeinflusst, da die signifikant erhöhten Gene *Bcl2l1*, *Bax* und *Bbc3* (s. Abb. 3.28A-C) jeweils für Proteine kodieren, die über den intrinsischen Signalweg die Caspasen 3 und 7 aktivieren [181]. Dies könnte ein Anzeichen dafür sein, dass LPL-defiziente myeloide Zellen in der NASH mehr oxidativen Stress und damit einhergehend z.B. eine vermehrte Schädigung der mitochondrialen DNA induzierten, da ROS den Mitochondrien-vermittelten Apoptose-Signalweg aktivieren [140]. Die stärkste Induktion der Expression proapoptotischer Gene in der LPL<sup>ΔLysM</sup> NASH-Gruppe im Vergleich zur LPL<sup>fl/fl</sup> NASH-Kohorte wurde bei dem Gen, das für das Protein FASL kodiert, gemessen (s. Abb. 3.28F). Die dokumentierte Induktion der *Faslg*-Expression könnte auf eine verstärkte Expression in Makrophagen zurückzuführen sein. Eine Studie zeigte, dass die *Faslg*-Expression in KC durch die Phagozytose von Apoptosekörpern stimuliert wird [182]. Da die Expressionsanalyse der intrinsischen proapoptotischen Gene eine vermehrte Apoptose und somit eine größere Anzahl an Apoptosekörpern in den Cre-positiven NASH-Tieren vermuten lässt, könnte dies die erhöhte *Faslg*-Expression in der LPL<sup>ΔLysM</sup> NASH-Gruppe erklären.

Die Ergebnisse der Expressionsanalyse unterschiedlicher proinflammatorischer Gene deuten darauf hin, dass LPL-defiziente Makrophagen ein ausgeprägteres proinflammatorisches Milieu schaffen, da eine signifikant erhöhte Expression von *Tnfa*, *Il6*, *Pycard* und *Nlrp3* in den Lebern von LPL<sup>ΔLysM</sup> NASH-Mäusen im Vergleich zu Lebern von LPL<sup>fl/fl</sup> NASH-Tieren dokumentiert wurde (s. Abb. 3.29B,C,G&H). Gleiches galt für die Expressionsanalyse der profibrotischen Gene *Acta2*, *Colla1* und *Timp1*, die ebenfalls eine signifikant stärkere Induktion in den Cre-positiven NASH-Lebern nachwies (s. Abb. 3.31D-F). Dabei zeigte

sich die verstärkte Fibrogenese nicht nur auf Genebene sondern ebenfalls auf Proteinebene, da die Quantifizierung der SR-Färbung einen signifikant erhöhten Kollagenanteil am Lebergewebe ergab (s. Abb. 3.31A&B).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die verstärkte hepatische *Lpl*-Expression in myeloiden Zellen bei NASH als kompensatorischer, antiinflammatorischer Gegenregulationsmechanismus auftritt, wodurch das Ausmaß der Inflammation und Fibrose gemindert wird. Ein gegensätzliches Fazit lässt sich aus der Publikation von Teratani *et al.* hinsichtlich der GFAP-abhängigen *Lpl*-Expression – fraglich spezifisch in HSC – bei der NASH ableiten. In deren Studie führte die GFAP-spezifische LPL-Deletion unter NASH-Bedingungen sowohl im Gesamtlebergewebe als auch in isolierten HSC zu einer verringerten Expression der profibrotischen Gene *Acta2* und *Colla1* verglichen mit WT-Kontrollen. Allerdings traten keine Unterschiede hinsichtlich der Expression proinflammatorischer Gene, der ALT-Konzentration sowie metabolischer Parameter wie z.B. des Körpergewichts auf [120]. Somit scheint die GFAP-abhängige LPL-Deletion keine Auswirkungen auf die Entstehung einer NASH sondern nur auf die Fibrogenese zu haben. Eventuell führt eine LPL-Defizienz in *Gfap*-exprimierenden Zellen zu einer gestörten Aktivierung der Zellen und somit zu einer Verminderung der profibrotischen Eigenschaften der Zellen, was allerdings weder die Hepatozytenschädigung noch die Immunzellen und somit die Produktion proinflammatorischer Zytokine bei der NASH beeinflusst. Im Gegensatz dazu weisen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass die *Lpl*-Expression in myeloiden Zellen Auswirkungen auf unterschiedliche Vorgänge der NASH wie Inflammation, Apoptose und Fibrose hat und somit ein vielversprechendes Zielmolekül für eine NASH-Therapie darstellt.

#### **4.6 Eine LPL-Defizienz könnte zu einer verstärkten NASH-assoziierten proinflammatorischen und profibrotischen Aktivität der Makrophagen führen**

Die stärker induzierte hepatische Expression proinflammatorischer und profibrotischer Gene in LPL<sup>ΔLysM</sup> NASH-Proben deutet darauf hin, dass die LPL-Deletion in myeloiden Zellen die biologische Aktivität der Lebermakrophagen beeinflusst. KC, die als M1-Makrophagen proinflammatorische und als M2-Makrophagen immunregulatorische Eigenschaften aufweisen, spielen bei der Entstehung und Progression der NASH eine wichtige Rolle. Der Zusammenhang zwischen Makrophagenpolarisation und NASH war Inhalt einiger

wissenschaftlicher Studien. Wan *et al.* zeigten, dass Patienten mit einer simplen benignen Steatose eine größere hepatische M2-Population als NASH-Patienten aufweisen. Zudem konnten sie nachweisen, dass M2-KC die Apoptose von M1-Makrophagen fördern und somit im murinen NASH-Modell eine protektive Wirkung haben [183]. Das Absterben von M1-Makrophagen verlangsamt dabei die NASH-Progression, da diese Makrophagen-Population nicht nur mit der hepatischen Steatose sondern ebenfalls mit der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie  $TNF\alpha$  assoziiert ist [179, 184]. Die signifikant erhöhte Expression von *Tnfa* in den LysM-Cre-positiven Mäusen im Vergleich zu den  $LPL^{fl/fl}$ -Tieren unter NASH-Bedingungen (s. Abb. 3.29B) könnte darauf hindeuten, dass ein Wechsel des Polarisationszustands zugunsten von M1-Makrophagen in der Leber stattfindet. Neben den proinflammatorischen Eigenschaften von  $TNF\alpha$  begünstigt das Zytokin zudem das Überleben von aktivierten HSC und somit die Fibrogenese [185]. Dies könnte eine Erklärung für den erhöhten Kollagenanteil und die verstärkte Expression profibrotischer Gene in den  $LPL^{\Delta LysM}$  NASH-Mäusen im Vergleich zu Lebern von  $LPL^{fl/fl}$  NASH-Tieren sein (s. Abb. 3.31). Außerdem exprimieren LPS-stimulierte M1-polarisierte Makrophagen mehr *Nlrp3* als M2-polarisierte Makrophagen [186]. Eine höhere *Nlrp3*-Expression konnte in den Lebern der Cre-positiven NASH-Tiere im Vergleich zu den  $LPL^{fl/fl}$  NASH-Mäusen gemessen werden (s. Abb. 3.29H), wodurch die Hypothese einer Verschiebung der Makrophagenpolarisation hin zu einem verstärkt proinflammatorischen Phänotyp untermauert wird. Dafür spricht ebenfalls die nachgewiesene stärker induzierte Expression des M1-Markers *Il6* in den  $LPL^{\Delta LysM}$  NASH-Mäusen (s. Abb. 3.29C). Ein weiterer Hinweis auf ein vermehrtes Vorkommen von M1-Makrophagen in der Leber aufgrund einer LPL-Defizienz in myeloiden Zellen ist die signifikant erhöhte Expression von *Nos2* im Gesamtlebergewebe, das für den M1-Marker iNOS kodiert (s. Abb. 3.29E). Eine Studie zeigte, dass iNOS mit der Fibrogenese aufgrund der Verabreichung einer Cholesterin-reichen Diät in Mäusen assoziiert ist. Während die iNOS-Proteinkonzentration nach der Fütterung mit der Spezialdiät anstieg und die Tiere Inflammation und Fibrose in der Leber aufwiesen, führte ein iNOS KO zur Verbesserung des Phänotyps und die KO-Tiere exprimierten weniger profibrotische Gene und *Tnfa* [187]. Eine andere Gruppe konnte zeigen, dass Lebern von NASH-Patienten ein höheres *NOS2*-Expressionsniveau als Nicht-NASH-

Patienten hatten [188]. Eine Induktion der *Nos2*-Expression, die das Zehnfache in Bezug auf die LPL<sup>fl/fl</sup> CD-Gruppe betrug, konnte ebenfalls in dem hier verwendeten NASH-Modell dokumentiert werden (s. Abb. 3.29E).

Eine mögliche Verbindung zwischen der *Lpl*-Expression und der Makrophagenpolarisation könnten die unterschiedlichen Energiequellen der M1- und M2-Zellen sein. Während die proinflammatorischen M1-Makrophagen primär Glykolyse betreiben, decken die regenerativen M2-Makrophagen ihren Energiebedarf durch die Oxidation von Fettsäuren [189]. LPL katalysiert die Hydrolyse von TG und vermittelt zudem die Aufnahme von Lipoproteinen als Kofaktor für Mitglieder der LDLR-Familie. Somit wäre es möglich, dass eine LPL-Defizienz in Makrophagen dazu führt, dass die Versorgung der Zellen mit Fettsäuren ungenügend ist. Dadurch könnten die Makrophagen die Fettsäuren nicht mehr im notwendigen Umfang oxidieren, vermehrt Glykolyse betreiben und somit primär M1 polarisiert sein.

Diese Hypothese belegten Bruce *et al.* bei der Charakterisierung von Mikroglia, den neuronalen Makrophagen, und Mikroglia mit einem LPL *knockdown* (KD) *in vitro*. Die Zellen mit dem LPL KD exprimierten vermehrt Gene des Glukosestoffwechsels während in den WT Mikroglia primär Fettsäureoxidation nachgewiesen werden konnte. In den LPL KD Mikroglia wurde neben einer erhöhten *Nos2*-Expression und einer verminderten Expression des M2-assoziierten Gens *Arg1* Veränderungen des Metabolismus dokumentiert, die mit einer M1-Polarisation assoziiert sind [190]. Der Metabolismus der Makrophagen scheint dabei nicht nur die Konsequenz der Polarisierung der Zellen zu sein, sondern die inflammatorischen Eigenschaften der Zellen aktiv zu beeinflussen. So führt eine Überexpression des Glukosetransporters der Makrophagen und somit ein verstärkter Glukosestoffwechsel zu einem hyperinflammatorischen Zustand der Zellen mit einer gesteigerten Expression proinflammatorischer Gene [191]. Eine weitere Studie befasste sich ausführlich mit dem Einfluss der *Lpl*-Expression auf die Polarisierung und den Stoffwechsel in Makrophagen. Chang *et al.* zeigten durch *in vitro*-Experimente, dass LPL-defiziente BMDM kultiviert in einem Glukose-armen, VLDL-zugesetzten Medium eher einen proinflammatorischen Phänotyp verglichen mit WT-BMDM aufweisen, da sie mehr *Tnfa* und weniger *Arg1* exprimieren [192].

In dieser Arbeit führte die Verabreichung einer hochkalorischen, fettreichen Diät bei Mäusen mit einer LPL-Defizienz in myeloiden Zellen zu einer verstärkten NASH-Progression mit verstärkter Inflammation. Dagegen hatte bei Chang *et al.* die Fütterung von LPL<sup>ΔLysM</sup>-Mäusen mit einer anderen fettreichen Diät keinen Einfluss auf die Expression von M1- oder M2-assoziierten Genen in Makrophagen des Fettgewebes bzw. verschiedener pro- und antiinflammatorischer Gene in zirkulierenden Monozyten [192]. Die Ergebnisse der *in vivo*-Experimente von Chang *et al.* und der vorliegenden Arbeit deuten somit darauf hin, dass die LPL-abhängige Modulation des Makrophagenphänotyps Organ-spezifisch im Gewebemilieu der NASH auftritt.

Zur Analyse, ob LPL-defiziente myeloide Zellen nur unter NASH-Bedingungen in der Leber die Inflammation und Fibrose verstärken, könnten die Unterschiede zwischen LPL<sup>ΔLysM</sup>- und LPL<sup>fl/fl</sup>-Mäuse mit anderen Schädigungsmodellen untersucht werden. Dazu könnte die Injektion des Hepatotoxins Tetrachlormethan zählen, das unter anderem Entzündungsreaktionen, Zelltod und Fibrose hervorruft. Je nach Versuchsdauer können die Versuchstiere ebenfalls eine Zirrhose und ein HCC entwickeln [193]. Durch die Kombination einer NASH-induzierenden Diät und Tetrachlormethan-Injektionen könnten somit die Auswirkungen einer LPL-Defizienz in myeloiden Zellen auf die Entstehung des (letalen) Endstadiums der NASH untersucht werden.

Die vorliegende Arbeit sowie andere Publikationen identifizierten LPL als möglichen Regulator von pro- und antiinflammatorischen Prozessen und Eigenschaften von Makrophagen und somit als Schnittstelle zwischen Lipidstoffwechsel und Inflammationsniveau. Die gezielte Induktion der *Lpl*-Expression in Makrophagen zur Verringerung der entzündlichen Aktivität könnte ein möglicher Ansatz für eine NASH-Therapie sein.

#### **4.7 LPL als mögliches Zielmolekül einer NASH-spezifischen Therapie**

Eine Möglichkeit zur pharmakologischen Induktion der *Lpl*-Expression in myeloiden Zellen wäre die Verabreichung von PPAR $\alpha$ - oder PPAR $\gamma$ -Agonisten. So zeigten Li *et al.* *in vitro* eine gesteigerte *LPL*-Expression und LPL-Aktivität in humanen Makrophagen nach der Behandlung mit verschiedenen PPAR $\alpha$ - und PPAR $\gamma$ -Agonisten [194].

Ein Anstieg der hepatischen *Ppara*-Expression bei der NAFLD wurde bislang nicht beschrieben und auch nicht in dem in dieser Arbeit verwendeten NASH-Modell beobachtet (s. Abb. 3.25C). Dagegen ist eine Induktion der *PPARG*-Expression in der Leber bei NAFLD-Patienten nachgewiesen [195]. Da PPAR $\gamma$  ein LPL-Induktor ist, könnte dies die NAFLD-assoziierte erhöhte hepatische *LPL*-Expression erklären.

Während auch in unseren Experimenten ein NASH-induzierter, signifikanter Anstieg der *Pparg*-Expression in der Leber nachgewiesen werden konnte, hatte die LPL-Defizienz in myeloiden Zellen keinen Einfluss auf die *Pparg*-Expression (s. Abb. 3.25D). Somit kann eine mögliche Verschiebung der Makrophagenpolarisation zugunsten des M1-Phänotyps nicht mit einer niedrigeren *Ppparg*-Expression erklärt werden.

PPAR $\gamma$  wird als Induktor für M2-Makrophagen angesehen, da die Behandlung von isolierten murinen KC mit PPAR $\gamma$ -Agonisten zu einer vermehrten Expression von M2-Markern und zu einer Reduktion der Genexpression von klassischen M1-Markern wie z.B. *Tnfa* und *Nos2* führt [196]. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die Eigenschaft von PPAR $\gamma$  als M2-Induktor durch LPL vermittelt wird und dass womöglich eine durch PPAR $\gamma$ -Aktivierung gesteigerte *Lpl*-Expression in Makrophagen einen proinflammatorischeren und profibrotischeren Phänotyp der Zellen verhindert. Zur Bestätigung dieser Hypothese könnten in einem *in vitro*-Versuch LPL-kompetente und LPL-defiziente Makrophagen mit einem PPAR-Agonisten behandelt und anschließend das Expressionsprofil der Zellen analysiert werden.

Eine gezielte Steigerung der *Lpl*-Expression in Lebermakrophagen erscheint aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit als möglicher Ansatz zur pharmakologischen NASH-Therapie. PPAR $\gamma$ -Agonisten werden bereits zur Therapie von Typ 2 Diabetes eingesetzt und Fibrate (PPAR $\alpha$ -Agonisten) dienen der Behandlung von Dyslipidämie und Hypertriglyzeridämie [197]. Zum Einsatz der Agonisten bei der NASH gibt es bereits zahlreiche (prä-)klinische Studien. Der PPAR $\alpha/\delta$ -Agonist Elafibranor wird etwa derzeit in einer Phase III-Studie getestet (RESOLVE-IT-Studie; NCT02704403).

Während Arbeiten mit unterschiedlichen NAFLD-Tiermodellen einen protektiven Einfluss der Behandlung mit PPAR $\alpha$ -Agonisten auf Merkmale der Erkrankung nachwiesen, sind die Ergebnisse der klinischen Studien weniger einheitlich und nicht eindeutig. Zwar zeigten zwei

Studien eine Verringerung der ALT-Konzentration durch die Behandlung der NAFLD-Patienten mit Fibraten, aber keine histologische Verbesserung hinsichtlich Steatose, Inflammation oder Fibrose (zusammengefasst in [198]). Somit scheint eine Induktion der *Lpl*-Expression in der Leber durch Fibrate nicht den gewünschten Effekt zu haben.

Als PPAR $\gamma$ -Agonisten werden meist Rosiglitazon oder Pioglitazon verwendet, die zur Gruppe der Thiazolidinedione (TZD) gehören und die bereits zur Insulinsensibilisierung eingesetzt werden. Die Ergebnisse der Studien zu den Auswirkungen der TZD-Behandlung auf den NASH-Phänotyp waren im Tiermodell vielversprechend, da im Großteil der Studien neben der Steatose und der Inflammation ebenfalls der Fibrosegrad schwächer ausgeprägt war. TZD scheinen auch in klinischen Studien zur NASH-Therapie einen gewissen protektiven Effekt zu haben, wobei die Datenlage nicht eindeutig ist (zusammengefasst in [198]). Die *European Association for Study of the Liver* empfiehlt aufgrund dessen und aufgrund von zahlreichen Nebenwirkungen der TZD wie Gewichtszunahme und ein erhöhtes Osteoporoserisiko bei Frauen kein routinemäßiges Einsetzen von TZD als NASH-Therapie. Einzig als Medikament für einige wenige NASH-Patienten mit einem Diabetes könnten laut der Empfehlung der Organisation TZD als Therapie in Erwägung gezogen werden [199]. Falls die positiven Auswirkungen der PPAR $\gamma$ -Aktivierung durch die Induktion von LPL vermittelt werden, könnte die Entstehung und Progression der NASH durch den möglicherweise schwächer ausgeprägten proinflammatorischen und profibrotischen Phänotyp der Makrophagen verlangsamt werden.

Positive Auswirkungen auf den Krankheitsverlauf zeigt die Therapie mit PPAR-Agonisten im Zusammenhang mit Atherosklerose. In LDLR KO-Mäusen, die als Atherosklerose-Mausmodell dienen, führte die Behandlung mit PPAR $\gamma$ -Agonisten zu einer Reduktion der Läsionenanzahl in der Aorta [200]. Eine klinische Studie untersuchte die Auswirkungen der Behandlung mit einem Fibrat bei jungen männlichen Herzinfarktpatienten auf das Fortschreiten der fokalen Atherosklerose. Dabei zeigte sich, dass Fibrate diese Progression verlangsamen und zudem die Dyslipidämie abmildern [201]. In Bezug auf Atherosklerose ist es wahrscheinlich, dass die positiven Effekte der PPAR-Agonisten-Intervention auf eine Verbesserung der Blutfettwerte und nicht auf eine Beeinflussung der *Lpl*-Expression in Makrophagen zurückzuführen sind, da im Gegensatz zur NASH eine LPL-Defizienz in

Makrophagen vorteilhaft scheint: Drei Publikationen mit unterschiedlichen Atherosklerose-Mausmodellen konnten zeigen, dass Mäuse mit LPL-defizienten hämatopoetischen Zellen und somit LPL-defizienten Monozyten und Makrophagen weniger Läsionen aufweisen als WT-Tiere [202-204]. Van Eck *et al.* konnten zudem zeigen, dass die LPL-Defizienz zu einer signifikanten Abnahme des Serumcholesterinspiegels führt [204].

Somit könnte eine therapeutische, Makrophagen-spezifische Aktivierung der LPL-Expression zwar positive Auswirkungen auf die NASH-Progression haben, dabei müsste aber gleichzeitig ein womöglich erhöhtes Atheroskleroserisiko beachtet werden. Der Nettoeffekt einer systemischen therapeutischen LPL-Induktion ist aufgrund divergierender Wirkungen von LPL in verschiedenen Zellpopulationen [120] und unterschiedlicher Auswirkungen in verschiedenen Organsystemen noch unberechenbar. Trotzdem sind zukünftige Untersuchungen sinnvoll, um zu analysieren, ob LPL ein stereotyper Regulator der inflammatorischen Aktivität von Makrophagen in der geschädigten Leber ist. Mithilfe einer RNA-Sequenzierung von LPL-kompetenten und LPL-defizienten Lebermakrophagen könnten LPL-abhängige oder LPL-regulierende Signalwege identifiziert werden, die womöglich einfacher therapeutischer zu modulieren sind. Eine weitere Strategie könnte die Behandlung mit einem LPL-Induktor in Makrophagen-spezifischen Liposomen darstellen [205].

## 5 Zusammenfassung/Abstract

### 5.1 Zusammenfassung

Parallel mit der weltweit steigenden Prävalenz der Adipositas nimmt die Prävalenz der NAFLD zu, die mittlerweile laut Schätzungen bei etwa 25% liegt. Die Erkrankung umfasst sowohl die einfache Leberverfettung (NAFL) als auch die aggressivere Fettleberhepatitis (NASH), die neben der Steatose durch Inflammation, Leberzellschädigung und im weiteren Verlauf oft durch Fibrose gekennzeichnet ist. Das Krankheitsbild kann zu einer Leberzirrhose mit lebensbedrohlichen Komplikationen fortschreiten. Trotz der hohen Prävalenz und der intensiven Forschung existiert keine zugelassene medikamentöse Therapie. Aus diesem Grund ist die Identifikation von Molekülen, die die Progression der NASH beeinflussen und die somit ein Zielmolekül für eine NASH-spezifische Therapie darstellen, von immenser Bedeutung.

Diese Arbeit sollte mögliche Mechanismen der NASH-Progression hinsichtlich unterschiedlicher Ebenen der Pathophysiologie der Erkrankung untersuchen. Bei LPL handelt es sich um ein Schlüsselprotein des Lipidstoffwechsels. In einigen Publikationen sowie in der vorliegenden Arbeit konnte eine Hochregulierung der hepatischen *Lpl*-Expression, die in der gesunden Leber nur rudimentär ist, bei der NASH gezeigt werden. Das für Neutrophile charakteristische Enzym MPO ist bekannt als Mediator der Inflammation im Gewebe und hochreguliert in übergewichtigen Patienten. Außerdem kommt es zu einer Infiltration von MPO-positiven Zellen in die Leber bei der NASH. Aufgrund dieser Kenntnisse war das Ziel dieser Arbeit sowohl die Untersuchung der funktionellen Relevanz der *Lpl*-Expression in Hepatozyten und myeloiden Zellen für die NASH-Progression als auch die Beurteilung von MPO als möglicher proinflammatorischer Faktor der NASH-Entstehung und -Entwicklung.

In dieser Arbeit konnte mithilfe eines diätischen NASH-Mausmodells gezeigt werden, dass eine MPO-Defizienz die Expression proinflammatorischer, proapoptotischer und profibrotischer Gene sowie den Grad der Lipidperoxidation reduziert. Eine Erklärung könnte sein, dass durch MPO vermehrt ROS gebildet werden, die unter anderem die in den Hepatozyten akkumulierten Lipide peroxidieren, wodurch die Zellen geschädigt und ggf.

apoptotisch werden. Dies führt zur Aktivierung von Immunzellen und HSC und somit zur Inflammation und Fibrogenese.

Außerdem konnte in dieser Arbeit im murinen NASH-Modell nachgewiesen werden, dass die NASH-assoziierte erhöhte hepatische *Lpl*-Expression nicht durch eine Induktion in Hepatozyten sondern durch eine gesteigerte Expression in myeloiden Zellen – primär wahrscheinlich Monozyten und Makrophagen als Hauptzellpopulation der *Lpl*-Expression in der gesunden Leber – zurückzuführen ist. Aufgrund dessen wiesen Mäuse mit einem Hepatozyten-spezifischen LPL KO und LPL<sup>fl/fl</sup>-Tiere einen vergleichbaren NASH-Phänotyp auf, wohingegen die Lebern von Mäusen mit einer LPL-Defizienz spezifisch in myeloiden Zellen hinsichtlich der Parameter Inflammation, Apoptose sowie Fibrose einen weiter fortgeschrittenen Verlauf zeigten. Zudem konnte im Gesamtlebergewebe der KO-Tiere eine verstärkte Expression von Genen, die für Marker der proinflammatorischen M1-Makrophagen kodieren, dokumentiert werden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass LPL in Makrophagen als Schalter zwischen einem pro- und einem antiinflammatorischen Phänotyp fungiert, der bei der NASH-Progression eine überschießende Entzündung verhindert.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit eine hepatoprotektive, antiinflammatorische Wirkung der erhöhten hepatischen *Lpl*-Expression bei der NASH nachgewiesen und LPL als möglicher Lipid-sensitiver Regulator der Inflammation identifiziert. Die Ergebnisse der Arbeit verdeutlichen zudem, dass MPO die NASH-Progression fördert. Da MPO nur von myeloiden Zellen exprimiert wird und eine Defizienz keine schwerwiegende Schwächung in der Immunabwehr zur Folge zu haben scheint, könnte es sich bei diesem Enzym um ein vielversprechendes Zielmolekül für eine Therapie der NASH handeln.

## 5.2 Abstract

The global prevalence of obesity is increasing. This is paralleled by an increasing prevalence of NAFLD which is estimated at about 25%. NAFLD encompasses benign fatty liver, characterized by lipid accumulation in the liver (NAFL) as well as NASH, with the additional features inflammation, hepatocellular injury and progressive liver fibrosis. Especially NASH may progress to liver cirrhosis with its life-threatening complications. In spite of the high prevalence and ongoing research, no pharmacological therapy has been established against NASH so far.

This study was designed to evaluate potential mechanisms of NASH progression at different levels of disease pathophysiology. LPL is a key regulator of lipid metabolism. The expression of *LPL* has been shown in several publications and in this thesis to be negligible in healthy liver tissue but upregulated in NASH. The neutrophil enzyme MPO, a well-known mediator of tissue inflammation, has been shown to be upregulated in patients with obesity. Additionally, it is known that MPO-positive cells are infiltrating the liver in NASH. In this context, the aims of this thesis were the studying of the functional relevance of *Lpl* expression in hepatocytes and myeloid cells on NASH progression and the evaluation of the role of MPO as a potential proinflammatory driver of NASH.

A dietary murine NASH model was used to examine the role of MPO for the progression of NASH. In the livers of MPO KO mice the expression of proinflammatory, proapoptotic and profibrotic genes was decreased in comparison to MPO WT littermates. Additionally, less lipid peroxidation was observed. Our hypothesis is that MPO generates ROS, which leads to the peroxidation of the accumulated lipids in hepatocytes and causes cell damage and apoptosis. Thereby, immune cells and HSC get activated and as a consequence inflammation and fibrogenesis occur.

In the second part of the thesis, it was shown that myeloid cells rather than hepatocytes are responsible for the increased hepatic *Lpl* expression in NASH. Macrophages and monocytes are probably the source of LPL as they are the main *Lpl* expressing cells in the healthy liver. As expected from these findings, a hepatocyte-specific LPL KO had no effect on the NASH phenotype compared to LPL<sup>fl/fl</sup> littermates. In contrast, livers of animals with a myeloid cell-specific LPL KO had a more severe NASH phenotype regarding the parameters

inflammation, apoptosis and fibrosis in comparison to LPL<sup>fl/fl</sup> littermates. Additionally, a higher expression of M1 polarisation-associated genes was measured in livers of KO mice. A LPL deficiency in macrophages seems to lead to a M1 polarisation and to a more proinflammatory and profibrotic activity of these cells.

In conclusion, this thesis demonstrated a hepatoprotective, antiinflammatory role of the increased *Lpl* expression in NASH and identified LPL as a potential lipid-responsive regulator of inflammation. On the other hand, the data clearly establish that MPO promotes NASH progression making MPO a promising therapeutic target for NASH: MPO is only expressed in myeloid cells, a deficiency does not lead to serious impairment of the immune defence and MPO deficiency decreases inflammation, hepatocyte damage and fibrosis in NASH.

## 6 Anhang

### 6.1 Sicherheit

Die Durchführung der Experimente erfolgte in Laboratorien der Stufe 1 nach Gentechnikverordnung und der biologischen Schutzstufe 1 und 2. Die Handhabung und Entsorgung aller Chemikalien erfolgte gemäß der dazugehörigen Sicherheitsdatenblätter (s. Tab. 6.1).

**Tab. 6.1: Übersicht der GHS-Hinweise, H- und P-Sätze aller gefährdenden verwendeten Chemikalien**

Substanz	GHS-Hinweis	H-Sätze	P-Sätze
β-Mercaptoethanol	Gefahr	301+331-310-315-317-318-373-410	273-280-302+352-304+340-305+351+338-308+310
Calciumchlorid	Achtung	319	305+351+338
Chloroform	Gefahr	302-331-315-319-351-361d-336-372	261-281-305+351+338-311
Eosin	Achtung	319	260-305+351+338
Ethanol	Gefahr	225-319	210-240-305+351+338-403+233
Ethylendiamintetraacetat	Achtung	319	305+351+338
Formaldehyd	Gefahr	301+311+331-314-317-335-341-350-370	201-260-280-301+310-330-303+361+353-304+340-310-305+351+338-308+310-403+233
Hämatoxylin	Achtung	302-315-319-335	261-305+351+338
Ketamin	Achtung	302-315-319-335	261-305+351+338
Kollagenase	Gefahr	315-319-334-335	261-280-284-304+340+312-337+313-342+311
Methanol	Gefahr	225-331-311-301-370	210-233-280-302+352-304+340-308+310-403+235
Natriumcarbonat	Achtung	319	260-305+351+338
Natriumfluorid	Gefahr	301-315-319	302+352-305+351+338-308+310
Natriumlaurylsulfat	Gefahr	228-302+332-315-318-335-412	210-261-280-301+312+330-305+351+338+310-370+378
Natriumorthovanadat	Achtung	302-312-332	280
Natronlauge	Gefahr	290-314	280-301+330+331-305+351+338-
Pronase E	Gefahr	315-319-334-335	260-305+351+338-304+341-342+311-302+352
Pikrinsäure	Gefahr	201-301-311-331	210-280-301+310-312
Salzsäure	Gefahr	280-331-335	260-280-303+361+353-304+340+310-305+351+338
Triethylphosphat	Achtung	302	264-270-301+312-330-501
Tris	Achtung	315-319-335	261-305+351+338
Triton-X	Gefahr	302-318-411	273-280-305+351+338
Wasserstoffperoxid	Gefahr	271-305-314-332-335-412	280-305+351+338-310
Xylazin	Gefahr	301301+310	
Xylol	Achtung	226-304-312-315-332-319-335-412	210-280-305+351+338-301+330+331

Zusätzlich sind in Tab. 6.2 weitere Details zur KMR-Substanz Chloroform aufgelistet. Chloroform wurde gemäß der Sicherheitsbestimmungen verwendet.

**Tab. 6.2: Übersicht der verwendeten KMR-Substanz**

<b>CAS</b>	<b>IUPAC</b>	<b>Anwendung</b>	<b>Volumen</b>	<b>Kategorie</b>
67-66-3	Trichlormethan	Hepatische Cholesterinbestimmung	ca. 50 ml	1B, 2

**6.2 Literaturverzeichnis**

1. Munding, J. und Tannapfel, A., Anatomie der Leber. *Der Radiologe*, 2011. **51**(8): S. 655-660.
2. Manns, M.P. und Schneidewind, S., Praxis der Hepatologie. 2016.
3. Adams, D.H. und Eksteen, B., Aberrant homing of mucosal T cells and extra-intestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Nature Reviews Immunology*, 2006. **6**: S. 244-251.
4. Tiniakos, D.G., Vos, M.B. und Brunt, E.M., Nonalcoholic fatty liver disease: pathology and pathogenesis. *Annu Rev Pathol*, 2010. **5**: S. 145-171.
5. Kleiner, D.E., Brunt, E.M., Van Natta, M., Behling, C., Contos, M.J., Cummings, O.W., Ferrell, L.D., Liu, Y.C., Torbenson, M.S., Unalp-Arida, A., Yeh, M., McCullough, A.J. und Sanyal, A.J., für das Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network, Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 2005. **41**(6): S. 1313-1321.
6. Brunt, E.M., Kleiner, D.E., Wilson, L.A., Belt, P. und Neuschwander-Tetri, B.A. für das NASH NCR, Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) activity score and the histopathologic diagnosis in NAFLD: distinct clinicopathologic meanings. *Hepatology*, 2011. **53**(3): S. 810-820.
7. Soderberg, C., Stal, P., Askling, J., Glaumann, H., Lindberg, G., Marmur, J. und Hultcrantz, R., Decreased survival of subjects with elevated liver function tests during a 28-year follow-up. *Hepatology*, 2010. **51**(2): S. 595-602.
8. Saile, B. und Ramadori, G., Fibrogenese – Zirrhose. *Der Gastroenterologe*, 2007. **2**(4): S. 228-237.
9. Hagstrom, H., Nasr, P., Ekstedt, M., Hammar, U., Stal, P., Hultcrantz, R. und Kechagias, S., Fibrosis stage but not NASH predicts mortality and time to development of severe liver disease in biopsy-proven NAFLD. *J Hepatol*, 2017. **67**(6): S. 1265-1273.
10. Kanwal, F., Kramer, J.R., Mapakshi, S., Natarajan, Y., Chayanupatkul, M., Richardson, P.A., Li, L., Desiderio, R., Thrift, A.P., Asch, S.M., Chu, J. und El-Serag, H.B., Risk of Hepatocellular Cancer in Patients With Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*, 2018. **155**(6): S. 1828-1837.
11. Desai, A., Sandhu, S., Lai, J.P. und Sandhu, D.S., Hepatocellular carcinoma in non-cirrhotic liver: A comprehensive review. *World J Hepatol*, 2019. **11**(1): S. 1-18.
12. Ertle, J., Dechene, A., Sowa, J.P., Penndorf, V., Herzer, K., Kaiser, G., Schlaak, J.F., Gerken, G., Syn, W.K. und Canbay, A., Non-alcoholic fatty liver disease progresses to hepatocellular carcinoma in the absence of apparent cirrhosis. *Int J Cancer*, 2011. **128**(10): S. 2436-2443.
13. Ekstedt, M., Hagstrom, H., Nasr, P., Fredrikson, M., Stal, P., Kechagias, S. und Hultcrantz, R., Fibrosis stage is the strongest predictor for disease-specific mortality in NAFLD after up to 33 years of follow-up. *Hepatology*, 2015. **61**(5): S. 1547-1554.

14. Dulai, P.S., Singh, S., Patel, J., Soni, M., Prokop, L.J., Younossi, Z., Sebastiani, G., Ekstedt, M., Hagstrom, H., Nasr, P., Stal, P., Wong, V.W.-S., Kechagias, S., Hultcrantz, R. und Loomba, R., Increased Risk of Mortality by Fibrosis Stage in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Systematic Review and Meta-Analysis. *Hepatology*, 2017. **00**(00): S. 1-9.
15. Younossi, Z.M., Loomba, R., Rinella, M.E., Bugianesi, E., Marchesini, G., Neuschwander-Tetri, B.A., Serfaty, L., Negro, F., Caldwell, S.H., Ratziu, V., Corey, K.E., Friedman, S.L., Abdelmalek, M.F., Harrison, S.A., Sanyal, A.J., Lavine, J.E., Mathurin, P., Charlton, M.R., Chalasani, N.P., Anstee, Q.M., Kowdley, K.V., George, J., Goodman, Z.D. und Lindor, K., Current and future therapeutic regimens for nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, 2018. **68**(1): S. 361-371.
16. Romeo, S., Kozlitina, J., Xing, C., Pertsemlidis, A., Cox, D., Pennacchio, L.A., Boerwinkle, E., Cohen, J.C. und Hobbs, H.H., Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet*, 2008. **40**(12): S. 1461-1465.
17. Fabbrini, E., Sullivan, S. und Klein, S., Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications. *Hepatology*, 2010. **51**(2): S. 679-689.
18. Anstee, Q.M., Targher, G. und Day, C.P., Progression of NAFLD to diabetes mellitus, cardiovascular disease or cirrhosis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2013. **10**(6): S. 330-344.
19. Younossi, Z.M., Koenig, A.B., Abdelatif, D., Fazel, Y., Henry, L. und Wymer, M., Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*, 2016. **64**(1): S. 73-84.
20. Musso, G., Gambino, R., De Michieli, F., Cassader, M., Rizzetto, M., Durazzo, M., Faga, E., Silli, B. und Pagano, G., Dietary habits and their relations to insulin resistance and postprandial lipemia in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, 2003. **37**(4): S. 909-916.
21. Ouyang, X., Cirillo, P., Sautin, Y., McCall, S., J.L., B., Diehl, A.M., Johnson, R.J. und Abdelmalek, M.F., Fructose Consumption as a Risk Factor for Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *J Hepatol*, 2008. **48**(6): S. 993-999.
22. Powell, E.E., Cooksley, W.G.E., Hanson, R., Searle, J., Halliday, J.W. und Powell, L.W., The Natural History of Nonalcoholic Steatohepatitis: A Follow-Up Study of Forty-two Patients for Up to 21 Years. *Hepatology*, 1990. **11**(1): S. 74-80.
23. Marchesini, G., Brizi, M., Morselli-Labate, A.M., Bianchi, G., Bugianesi, E., McCullough, A.J., Forlani, G. und Melchionda, N., Association of Nonalcoholic Fatty Liver Disease with Insulin Resistance. *American Journal of Medicine*, 1999. **107**: S. 450-455.
24. Marchesini, G., Bugianesi, E., Forlani, G., Cerrelli, F., Lenzi, M., Manini, R., Natale, S., Vanni, E., Villanova, N., Melchionda, N. und Rizzetto, M., Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology*, 2003. **37**(4): S. 917-923.

25. Polyzos, S.A., Kountouras, J. und Mantzoros, C.S., Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: From pathophysiology to therapeutics. *Metabolism*, 2019. **92**: S. 82-97.
26. Hazlehurst, J.M., Woods, C., Marjot, T., Cobbold, J.F. und Tomlinson, J.W., Non-alcoholic fatty liver disease and diabetes. *Metabolism*, 2016. **65**(8): S. 1096-1108.
27. Wong, R.J., Aguilar, M., Cheung, R., Perumpail, R.B., Harrison, S.A., Younossi, Z.M. und Ahmed, A., Nonalcoholic Steatohepatitis Is the Second Leading Etiology of Liver Disease Among Adults Awaiting Liver Transplantation in the United States. *Gastroenterology*, 2015. **148**(3): S. 547-555.
28. Kotronen, A., Westerbacka, J., Bergholm, R., Pietiläinen, K.H. und Yki-Jarvinen, H., Liver fat in the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007. **92**(9): S. 3490-3497.
29. WHO. <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. 2018 [zitiert 2019].
30. Anderson, E.L., Howe, L.D., Jones, H.E., Higgins, J.P., Lawlor, D.A. und Fraser, A., The Prevalence of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Children and Adolescents: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*, 2015. **10**(10): S. e0140908.
31. Day, C.P. und James, O.F., Steatohepatitis: A Tale of Two "Hits"? *Gastroenterology*, 1998. **114**(4): S. 842-845.
32. Tilg, H. und Moschen, A.R., Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology*, 2010. **52**(5): S. 1836-1846.
33. vom Dahl, S., Lammert, F., Ullrich, K. und Wendel, U., Angeborene Stoffwechselkrankheiten bei Erwachsenen. 2014: Springer Medizin.
34. Wachtershauser, A. und Stein, J., Lipid- und Lipoproteinstoffwechsel. *Pharm Unserer Zeit*, 2007. **36**(2): S. 98-107.
35. Trefts, E., Gannon, M. und Wasserman, D.H., The liver. *Current Biology*, 2017. **27**(21): S. R1147-R1151.
36. Löffler, G., Basiswissen Biochemie. Vol. 7. 2008: Springer Medizin Verlag.
37. Rui, L., *Energy Metabolism in the Liver*, in *Comprehensive Physiology*. 2014. S. 177-197.
38. Geidl-Flueck, B. und Gerber, P.A., Insights into the Hexose Liver Metabolism-Glucose versus Fructose. *Nutrients*, 2017. **9**(9).
39. Hannou, S.A., Haslam, D.E., McKeown, N.M. und Herman, M.A., Fructose metabolism and metabolic disease. *J Clin Invest*, 2018. **128**(2): S. 545-555.
40. Donnelly, K.L., Smith, C.I., Schwarzenberg, S.J., Jessurun, J., Boldt, M.D. und Parks, E.J., Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of Clinical Investigation*, 2005. **115**(5): S. 1343-1351.
41. Nehra, V., Angulo, P., A.L., B. und Lindor, K.D., Nutritional and Metabolic Considerations in the Etiology of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Digestive Diseases and Sciences*, 2001. **46**(11): S. 2347-2352.

42. Bradbury, M.W., Lipid metabolism and liver inflammation. I. Hepatic fatty acid uptake: possible role in steatosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2006. **290**(2): S. G194-198.
43. Delarue, J. und Magnan, C., Free fatty acids and insulin resistance. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2007. **10**: S. 142-148.
44. Samuel, V.T. und Shulman, G.I., The pathogenesis of insulin resistance: integrating signaling pathways and substrate flux. *J Clin Invest*, 2016. **126**(1): p. 12-22.
45. Bray, G.A., Nielsen, S.J. und Popkin, B.J., Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. *Am J Clin Nutr*, 2004. **79**: S. 537-543.
46. Alkhoury, N., Dixon, L.J. und Feldstein, A.E., Lipotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease: not all lipids are created equal. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2009. **3**(4): S. 445-451.
47. Listenberger, L.L., Han, X., Lewis, S.E., Cases, S., Farese, R.V., Ory, D.S. und Schaffer, J.E., Triglycerid accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003. **100**(6): S. 3077-3082.
48. Lee, Y.K., Hirose, H., Ohneda, M., Johnson, J.H., McGarry, J.D. und Unger, R.H., Beta-Cell lipotoxicity in the pathogenesis of non-insulin-dependent diabetes mellitus of obese rats: Impairment in adipocyte-beta-cell relationship. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1994. **91**: S. 10878-10882.
49. Neuschwander-Tetri, B.A., Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: the central role of nontriglyceride fatty acid metabolites. *Hepatology*, 2010. **52**(2): S. 774-788.
50. Mari, M., Caballero, F., Colell, A., Morales, A., Caballeria, J., Fernandez, A., Enrich, C., Fernandez-Checa, J.C. und Garcia-Ruiz, C., Mitochondrial free cholesterol loading sensitizes to TNF- and Fas-mediated steatohepatitis. *Cell Metab*, 2006. **4**(3): S. 185-198.
51. Fromenty, B., Robin, M.A., Igoudjil, A., Mansouri, A. und Pessayre, D., The ins and outs of mitochondrial dysfunction in NASH. *Diabetes Metabolism*, 2004. **30**: S. 121-138.
52. Williams, K.J. und Fisher, E.A., Oxidation, lipoproteins, and atherosclerosis: which is wrong, the antioxidants or the theory? *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 2005. **2005**(8): S. 139-146.
53. Nieto, N., Friedman, S.L. und Cederbaum, A.I., Stimulation and proliferation of primary rat hepatic stellate cells by cytochrome P450 2E1-derived reactive oxygen species. *Hepatology*, 2002. **35**(1): S. 62-73.
54. Leonarduzzi, G., Scavazza, A., Biasi, F., Chiarpotto, E., Camandola, S., Vogl, S., Dargel, R. und Poli, G., The lipid peroxidation end product 4-hydroxy-2,3-nonenal up-regulates transforming growth factor beta1 expression in the macrophage lineage: a link between oxidative injury and fibrosclerosis. *The FASEB Journal*, 1997. **11**: S. 851-857.

55. Parola, M., Pinzani, M., Casini, A., Albano, E., Poli, G., Gentilini, A., Gentilini, P. und Dianzani, M.U., Stimulation of Lipid peroxidation or 4-hydroxynonenal treatment increases procollagen alpha1 gene expression in human liver fat-storing cells. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 1993. **194**(3): S. 1044-1050.
56. Lee, U.E. und Friedman, S.L., Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2011. **25**(2): S. 195-206.
57. Kleiner, D.E. und Makhlof, H.R., Histology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis in Adults and Children. *Clin Liver Dis*, 2016. **20**(2): S. 293-312.
58. Farrell, G.C., van Rooyen, D., Gan, L. und Chitturi, S., NASH is an Inflammatory Disorder: Pathogenic, Prognostic and Therapeutic Implications. *Gut Liver*, 2012. **6**(2): S. 149-171.
59. Nati, M., Haddad, D., Birkenfeld, A.L., Koch, C.A., Chavakis, T. und Chatzigeorgiou, A., The role of immune cells in metabolism-related liver inflammation and development of non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *Rev Endocr Metab Disord*, 2016. **17**(1): S. 29-39.
60. Arrese, M., Cabrera, D., Kalergis, A.M. und Feldstein, A.E., Innate Immunity and Inflammation in NAFLD/NASH. *Dig Dis Sci*, 2016. **61**(5): S. 1294-1303.
61. Miele, L., Valenza, V., La Torre, G., Montalto, M., Cammarota, G., Ricci, R., Masciana, R., Forgione, A., Gabrieli, M.L., Perotti, G., Vecchio, F.M., Rapaccini, G., Gasbarrini, G., Day, C.P. und Grieco, A., Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 2009. **49**(6): S. 1877-1887.
62. Kitabatake, H., Tanaka, N., Fujimori, N., Komatsu, M., Okubo, A., Kakegawa, K., Kimura, T., Sugiura, A., Yamazaki, T., Shibata, S., Ichikawa, Y., Joshita, S., Umemura, T., Matsumoto, A., Koinuma, M., Sano, K., Aoyama, T. und Tanaka, E., Association between endotoxemia and histological features of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*, 2017. **23**(4): S. 712-722.
63. Ramadori, P., Kroy, D. und Streetz, K.L., Immunoregulation by lipids during the development of non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatobiliary Surg Nutr*, 2015. **4**(1): S. 11-23.
64. Martinon, F., Burns, K. und Tschopp, J., The Inflammasome: A Molecular Platform Triggering Activation of Inflammatory Caspases and Processing of proIL-beta. *Molecular Cell*, 2002. **10**: S. 417-426.
65. Vonghia, L. und Francque, S., Cross talk of the immune system in the adipose tissue and the liver in non-alcoholic steatohepatitis: Pathology and beyond. *World J Hepatol*, 2015. **7**(15): S. 1905-1912.
66. Guerra Ruiz, A., Casafont, F., Crespo, J., Cayón, A., Mayorga, M., Estebanez, A., Fernandez-Escalante, J.C. und Pons-Romero, F., Lipopolysaccharide-Binding Protein Plasma Levels and Liver TNF-Alpha Gene Expression in Obese Patients: Evidence for the Potential Role of Endotoxin in the Pathogenesis of Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Obes Surg*, 2007. **17**: S. 1374-1380.

67. Wieckowska, A., Papouchado, B.G., Li, Z., Lopez, R., Zein, N.N. und Feldstein, A.E., Increased hepatic and circulating interleukin-6 levels in human nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol*, 2008. **103**(6): S. 1372-1379.
68. Haukeland, J.W., Damas, J.K., Konopski, Z., Loberg, E.M., Haaland, T., Goverud, I., Torjesen, P.A., Birkeland, K., Bjoro, K. und Aukrust, P., Systemic inflammation in nonalcoholic fatty liver disease is characterized by elevated levels of CCL2. *J Hepatol*, 2006. **44**(6): S. 1167-1174.
69. Bertola, A., Bonnafous, S., Anty, R., Patouraux, S., Saint-Paul, M.C., Iannelli, A., Gugenheim, J., Barr, J., Mato, J.M., Le Marchand-Brustel, Y., Tran, A. und Gual, P., Hepatic expression patterns of inflammatory and immune response genes associated with obesity and NASH in morbidly obese patients. *PLoS One*, 2010. **5**(10): S. e13577.
70. Miura, K., Kodama, Y., Inokuchi, S., Schnabl, B., Aoyama, T., Ohnishi, H., Olefsky, J.M., Brenner, D.A. und Seki, E., Toll-like receptor 9 promotes steatohepatitis by induction of interleukin-1beta in mice. *Gastroenterology*, 2010. **139**(1): S. 323-334.
71. Abderrazak, A., Syrovets, T., Couchie, D., El Hadri, K., Friguet, B., Simmet, T. und Rouis, M., NLRP3 inflammasome: from a danger signal sensor to a regulatory node of oxidative stress and inflammatory diseases. *Redox Biol*, 2015. **4**: S. 296-307.
72. Wree, A., McGeough, M.D., Pena, C.A., Schlattjan, M., Li, H., Inzaugarat, M.E., Messer, K., Canbay, A., Hoffman, H.M. und Feldstein, A.E., NLRP3 inflammasome activation is required for fibrosis development in NAFLD. *J Mol Med (Berl)*, 2014. **92**(10): S. 1069-1082.
73. Mridha, A.R., Wree, A., Robertson, A.A.B., Yeh, M.M., Johnson, C.D., Van Rooyen, D.M., Haczeyni, F., Teoh, N.C., Savard, C., Ioannou, G.N., Masters, S.L., Schroder, K., Cooper, M.A., Feldstein, A.E. und Farrell, G.C., NLRP3 inflammasome blockade reduces liver inflammation and fibrosis in experimental NASH in mice. *J Hepatol*, 2017. **66**(5): S. 1037-1046.
74. Chalasani, N., Younossi, Z., Lavine, J.E., Diehl, A.M., Brunt, E.M., Cusi, K., Charlton, M. and Sanyal, A.J., The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice guideline by the American Gastroenterological Association, American Association for the Study of Liver Diseases, and American College of Gastroenterology. *Gastroenterology*, 2012. **142**(7): S. 1592-1609.
75. Vilar-Gomez, E., Martinez-Perez, Y., Calzadilla-Bertot, L., Torres-Gonzalez, A., Gra-Oramas, B., Gonzalez-Fabian, L., Friedman, S.L., Diago, M. und Romero-Gomez, M., Weight Loss Through Lifestyle Modification Significantly Reduces Features of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology*, 2015. **149**(2): S. 367-378.
76. Munteanu, M.A., Nagy, G.A. und Mircea, P.A., Current Management of NAFLD. *Clujul Med*, 2016. **89**(1): S. 19-23.
77. Van der Veen, B.S., De Winther, M.P.J. und Heeringa, P., Myeloperoxidase: Molecular Mechanisms of Action and Theri Relevance to Human Health and Disease. *Antioxid Redox Signal*, 2009. **11**(11): S. 2899-2937.

78. Bos, A., Wever, R. und Roos, D., Characterization and quantification of the peroxidase in human monocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1978. **525**: S. 37-44.
79. Brown, K.E., Brunt, E.M. und Heinecke, J.W., Immunohistochemical Detection of Myeloperoxidase and Its Oxidation Products in Kupffer Cells of Human Liver. *American Journal of Pathology*, 2001. **159**(6): S. 2081-2088.
80. Rensen, S.S., Slaats, Y., Nijhuis, J., Jans, A., Bieghs, V., Driessen, A., Malle, E., Greve, J.W. und Buurman, W.A., Increased hepatic myeloperoxidase activity in obese subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Pathol*, 2009. **175**(4): S. 1473-1482.
81. Amanzada, A., Malik, I.A., Nischwitz, M., Sultan, S., Naz, N. und Ramadori, G., Myeloperoxidase and elastase are only expressed by neutrophils in normal and in inflamed liver. *Histochem Cell Biol*, 2011. **135**(3): S. 305-315.
82. Reynolds, W.F., Rhee, J., Maciejewski, D., Paladino, T., Sieburg, H., Maki, R.A. und Masliah, E., Myeloperoxidase Polymorphism Is Associated with Gender Specific Risk for Alzheimer's Disease. *Experimental Neurology*, 1999. **155**: S.31-41.
83. Sugiyama, S., Okada, Y., Sukhova, G.K., Virmani, R., Heinecke, J.W. und Libby, P., Macrophage Myeloperoxidase Regulation by Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor in Human Atherosclerosis and Implications in Acute Coronary Syndromes. *The American Journal of Pathology*, 2001. **158**(3): S. 879-891.
84. Wright, H.L., Moots, R.J., Bucknall, R.C. und Edwards, S.W., Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology (Oxford)*, 2010. **49**(9): S. 1618-1631.
85. Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D.S., Weinrauch, Y. und Zychlinsky, A., Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science* 2004. **303**(5663): S. 1532-1535.
86. Klebanoff, S.J., Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol*, 2005. **77**(5): S. 598-625.
87. Klebanoff, S.J., Kettle, A.J., Rosen, H., Winterbourn, C.C. und Nauseef, W.M., Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms. *J Leukoc Biol*, 2013. **93**(2): S. 185-198.
88. Bradley, P.P., Christensen, R.D. und Rothstein, G., Cellular and Extracellular Myeloperoxidase in Pyogenic Inflammation. *Blood*, 1982. **60**(3): S. 618-622.
89. Klebanoff, S.J. und Clark, R.A., Hemolysis and Iodination of Erythrocyte Components by a Myeloperoxidase-mediated System. *Blood*, 1975. **45**(5): S. 699-707.
90. Deby-Dupont, G., Deby, C. und Lamy, M., Neutrophil myeloperoxidase revisited: it's role in health and disease. *Intensivmedizin und Notfallmedizin*, 1999. **36**: S. 500-513.
91. Khan, A.A., Alsahli, M.A. und Rahmani, A.H., Myeloperoxidase as an Active Disease Biomarker: Recent Biochemical and Pathological Perspectives. *Med Sci (Basel)*, 2018. **6**(2).

92. do Carmo, R.F., de Almeida, D.B., Aroucha, D.C., Vasconcelos, L.R., de Moraes, A.C., de Mendonca Cavalcanti Mdo, S., de Morais, C.N., Pereira, L.M. und Moura, P., Plasma myeloperoxidase levels correlate with hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C. *Hum Immunol*, 2012. **73**(11): S. 1127-1131.
93. Osterreicher, C.H., Datz, C., Stickel, F., Hellerbrand, C., Penz, M., Hofer, H., Wrba, F., Penner, E., Schuppan, D. und Ferenci, P., Association of myeloperoxidase promotor polymorphism with cirrhosis in patients with hereditary hemochromatosis. *J Hepatol*, 2005. **42**(6): S. 914-919.
94. Nahon, P., Sutton, A., Rufat, P., Ziol, M., Akouche, H., Laguillier, C., Charnaux, N., Ganne-Carrie, N., Grando-Lemaire, V., N'Kontchou, G., Trinchet, J.C., Gattegno, L., Pessayre, D. und Beaugrand, M., Myeloperoxidase and superoxide dismutase 2 polymorphisms comodule the risk of hepatocellular carcinoma and death in alcoholic cirrhosis. *Hepatology*, 2009. **50**(5): S. 1484-1493.
95. Hahn, P.F., Abolishment of alimentary lipemia following injection of heparin. *Science*, 1983. **93**(2531): S. 19&20.
96. Scanu, A., Serum High-Density Lipoprotein: Effect of Change in Structure on Activity of Chicken Adipose Tissue Lipase *Science*, 1966. **153**: S. 640-641.
97. Camps, L., Reina, M., Llobera, M., Vilaro, S. und Olivecrona, T., Lipoprotein lipase: cellular origin and functional distribution. *Am J Physiol* 1990. **258**: S. C673-C681.
98. Braun, J.E.A. und Severson, D.L., Regulation of the synthesis, processing and translocation of lipoprotein lipase. *Biochem J*, 1992. **287**: S. 337-347.
99. Catapano, A.L., Apolipoprotein C-II and lipoprotein lipase activity. *Ric Clin Lab*, 1982. **12**(1): S. 35-40.
100. Schoonjans, K., Peinado-Onsurbe, J., Lefebvre, A.-M., Heyman, R.A., Briggs, M., Deeb, S., Staels, B. und Auwerx, J., PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *The EMBO Journal*, 1996. **15**(19): S. 5336-5348.
101. Ahn, J., Lee, H., Chung, C.H. und Ha, T., High fat diet induced downregulation of microRNA-467b increased lipoprotein lipase in hepatic steatosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011. **414**(4): S. 664-669.
102. Sukonina, V., Lookene, A., Olivecrona, T. und Olivecrona, G., Angiotensin-like protein 4 converts lipoprotein lipase to inactive monomers and modulates lipase activity in adipose tissue. *PNAS*, 2006. **103**(46): S. 17450-17455.
103. Ricart-Jane, D., Cejudo-Martin, P., Peinado-Onsurbe, J., Lopez-Tejero, M.D. und Llobera, M., Changes in lipoprotein lipase modulate tissue energy supply during stress. *J Appl Physiol (1985)*, 2005. **99**(4): S. 1343-1351.
104. Doolittle, M.H., Ben-Zeev, O., Elovson, J., Martin, D. und Kirchgessner, T.G., The Response of Lipoprotein Lipase to Feeding and Fasting. *The Journal of Biological Chemistry*, 1990. **265**(8): S. 4570-4577.
105. Garfinkel, A.S., Nilsson-Ehle, P. und Schotz, M.C., Regulation of lipoprotein lipase induction by insulin. *Biochim Biophys Acta*, 1976. **424**: S. 264-273.

106. Ong, J.M. und Kern, P.A., The Role of Glucose and Glycolisation in the Regulation of Lipoprotein Lipase Synthesis and Secretion in Rat Adipocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 1989. **264**(6): S. 3177-3182.
107. Auwerx, J., Leroy, P. und Schoonjans, K., Lipoprotein lipase: recent contributions from molecular biology. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 1992. **29**(3-4): S. 243-268.
108. Merkel, M., Eckel, R.H. und Goldberg, I.J., Lipoprotein lipase. *Journal of Lipid Research*, 2002. **43**(12): S. 1997-2006.
109. Baum, L., Chen, L., Masliah, E., Chan, Y.S., Ng, H.-K. und Pang, C.P., Lipoprotein Lipase Mutations and Alzheimer's Disease. *American Journal of Medical Genetics*, 1999. **88**: S. 136-139.
110. Pingitore, P., Lepore, S.M., Pirazzi, C., Mancina, R.M., Motta, B.M., Valenti, L., Berge, K.E., Retterstol, K., Leren, T.P., Wiklund, O. und Romeo, S., Identification and characterization of two novel mutations in the LPL gene causing type I hyperlipoproteinemia. *J Clin Lipidol*, 2016. **10**(4): S. 816-823.
111. Weinstock, P.H., Bisgaier, C.L., Aalto-Setälä, K., Radner, H., Ramakrishnan, R., Levak-Frank, S., Essenburg, A.D., Zechner, R. und Breslow, J.L., Severe Hypertriglyceridemia, Reduced High Density Lipoprotein, and Neonatal Death in Lipoprotein Lipase Knockout Mice. *J Clin Invest*, 1995. **96**: S. 2555-2568.
112. Murthy, V., Julien, P. und Gagné, C., Molecular Pathobiology of the Human Lipoprotein Lipase Gene. *Pharmacol Ther*, 1996. **70**(2): S. 101-135.
113. Staels, B. und Auwerx, J., Perturbation of development gene expression in rat liver by fibric acid derivates: lipoprotein lipase and alpha-fetoprotein as models. *Development* 1992. **115**: S. 1035-1043.
114. Connelly, P.W., The role of hepatic lipase in lipoprotein metabolism. *Clin Chim Acta*, 1999. **286**: S. 243-255.
115. Vilaro, S., Llobera, M., Bengtsson-Olivecrona, G. und Olivecrona, T., Lipoprotein lipase uptake by the liver: localization, turnover, and metabolic role. *Am j Physiol*, 1988. **254**: S. G711-G722.
116. Camps, L., Reina, M., Llobera, M., Bengtsson-Olivecrona, G., Olivecrona, T. und Vilaro, S., Lipoprotein lipase in lungs, spleen, and liver: synthesis and distribution. *Journal of Lipid Research*, 1991. **32**: S. 1877-1888.
117. Kim, J.K., Fillmore, J.J., Chen, Y., Yu, C., Moore, I.K., Pypaert, M., Lutz, E.P., Kako, Y., Velez-Carrasco, W., Goldberg, I.J., Breslow, J.L. und Shulman, G.I., Tissue-specific overexpression of lipoprotein lipase causes tissue-specific insulin resistance. *PNAS*, 2001. **98**(13): S. 7522-7527.
118. Pardina, E., Baena-Fustegueras, J.A., Llamas, R., Catalan, R., Galard, R., Lecube, A., Fort, J.M., Llobera, M., Allende, H., Vargas, V. und Peinado-Onsurbe, J., Lipoprotein lipase expression in livers of morbidly obese patients could be responsible for liver steatosis. *Obes Surg*, 2009. **19**(5): S. 608-616.
119. Yang, Z.H., Miyahara, H., Takeo, J. und Katayama, M., Diet high in fat and sucrose induces rapid onset of obesity-related metabolic syndrome partly through rapid

- response of genes involved in lipogenesis, insulin signalling and inflammation in mice. *Diabetology & Metabolic Syndrome*, 2012. **4**(32).
120. Teratani, T., Tomita, K., Furuhashi, H., Sugihara, N., Higashiyama, M., Nishikawa, M., Irie, R., Takajo, T., Wada, A., Horiuchi, K., Inaba, K., Hanawa, Y., Shibuya, N., Okada, Y., Kurihara, C., Nishii, S., Mizoguchi, A., Hozumi, H., Watanabe, C., Komoto, S., Nagao, S., Yamamoto, J., Miura, S., Hokari, R. und Kanai, T., Lipoprotein Lipase Up-regulation in Hepatic Stellate Cells Exacerbates Liver Fibrosis in Nonalcoholic Steatohepatitis in Mice. *Hepatol Commun*, 2019. **3**(8): S. 1098-1112.
  121. Brennan, M.L., Anderson, M.M., Shih, D.M., Qu, X.D., Wang, X., Mehta, A.C., Lim, L.L., Shi, W., Hazen, S.L., Jacob, J.S., Crowley, J.R., Heinecke, J.W. und Luscis, A.J., Increased atherosclerosis in myeloperoxidase-deficient mice. *J Clin Invest*, 2001. **107**(4): S. 419-430.
  122. Augustus, A., Yagyu, H., Haemmerle, G., Bensadoun, A., Vikramadithyan, R.K., Park, S.Y., Kim, J.K., Zechner, R. und Goldberg, I.J., Cardiac-specific knock-out of lipoprotein lipase alters plasma lipoprotein triglyceride metabolism and cardiac gene expression. *J Biol Chem*, 2004. **279**(24): S. 25050-25057.
  123. Postic, C., Shiota, M., Niswender, K.D., Jetton, T.L., Chen, Y., Moates, J.M., Shelton, K.D., Lindner, J., Cherrington, A.D. und Magnuson, M.A., Dual Role for Glucokinase in Glucose Homeostasis as Determined by Liver and Pancreatic  $\beta$  Cell-specific Gene Knock-outs Using Cre Recombinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 1998. **1**: S. 305-319.
  124. Clausen, B.E., Burkhardt, C., Reith, W., Renkawitz, R. und Förster, I., Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Research*, 1999. **8**: S. 265-277.
  125. Caporoso, J.G., Kuczinski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Gonzalez Pena, A., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., Huttenhower, G.A., Kelley, S.T., Knights, D., Koenig, J.E., Ley, R.E., Lozupone, C., McDonald, D., Muegge, B.D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J.R., Turnbaugh, P.J., Walters, W.A., Widmann, J., Yatsunenko, T., Zaneveld, J. und Knight, R., QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, 2010. **7**(5): S. 335-336.
  126. Furlan, A., van der Windt, D.J., Nalesnik, M.A., Sholosh, B., Ngan, K.K., Pealer, K.M., Ijzermans, J.N. und Federle, M.P., Multiple hepatic adenomas associated with liver steatosis at CT and MRI: a case-control study. *AJR Am J Roentgenol*, 2008. **191**(5): S. 1430-1435.
  127. Wallace, T.M., Levy, J.C. und Matthews, Use and Abuse of HOMA Modeling *Diabetes Care*, 2004. **27**: S. 1487-1495.
  128. Carvalho, B.S. und Irizarry, R.A., A framework for oligonucleotide microarray preprocessing. *Bioinformatics*, 2010. **26**(19): S. 2363-2367.
  129. Ritchie, M.E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C.W., Shi, W. und Smyth, G.K., limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res*, 2015. **43**(7): S. e47.

130. Chen, E.Y., Tan, C.M., Kou, Y., Duan, Q., Wang, Z., Vaz Meirelles, G., Clark, N.R. und Ma'ayan, A., Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinformatics*, 2013. **14**(128): S. 1-14.
131. Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M. und Glockner, F.O., Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res*, 2013. **41**(1): S. e1.
132. Illumina. *16S Metagenomic Sequencing Library Preparation*. [http://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry\\_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf](http://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf) 2013; S. 1-28.
133. Lozupone, C. und Knight, R., UniFrac: a New Phylogenetic Method for Comparing Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005. **71**(12): S. 8228-8235.
134. Kolodziejczyk, A.A., Zheng, D., Shibolet, O. und Elinav, E., The role of the microbiome in NAFLD and NASH. *EMBO Mol Med*, 2019. **11**(2).
135. Souza, M.R.A., Diniz, M.F.F.M., Medeiros-Filho, J.E.M. und Araújo, M.S.T., Metabolic syndrome and risk factors for non-alcoholic fatty liver disease. *Arg Gastroenterol*, 2012. **49**(1): S. 89-96.
136. Caussy, C., Tripathi, A., Humphrey, G., Bassirian, S., Singh, S., Faulkner, C., Bettencourt, R., Rizo, E., Richards, L., Xu, Z.Z., Downes, M.R., Evans, R.M., Brenner, D.A., Sirlin, C.B., Knight, R. und Loomba, R., A gut microbiome signature for cirrhosis due to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Commun*, 2019. **10**(1): S. 1406.
137. Ley, R.E., Turnbaugh, P.J., Klein, S. und Gordon, J.I., Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*, 2006. **444**(7122): S. 1022-1023.
138. Feldstein, A.E., Canbay, A., Angulo, P., Taniai, M., Burgart, L.J., Lindor, K.D. und Gores, G.J., Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology*, 2003. **125**(2): S. 437-443.
139. Wieckowska, A., Zein, N.N., Yerian, L.M., Lopez, A.R., McCullough, A.J. und Feldstein, A.E., In vivo assessment of liver cell apoptosis as a novel biomarker of disease severity in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 2006. **44**(1): S. 27-33.
140. Redza-Dutordoir, M. und Averill-Bates, D.A., Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta*, 2016. **1863**(12): S. 2977-2992.
141. Parola, M. und Pinzani, M., Hepatic wound repair. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 2009. **2**(1): S. 4.
142. Estes, C., Razavi, H., Loomba, R., Younossi, Z. und Sanyal, A.J., Modeling the epidemic of nonalcoholic fatty liver disease demonstrates an exponential increase in burden of disease. *Hepatology*, 2018. **67**(1): S. 123-133.
143. Wallace, S.K. und Mozaffarian, D., *Trans-Fatty Acids and Nonlipid Risk Factors*. *Current Atherosclerosis Reports*, 2009. **11**: S. 423-433.

144. Jeyapal, S., Putcha, U.K., Mullapudi, V.S., Ghosh, S., Sakamuri, A., Kona, S.R., Vadakattu, S.S., Madakasira, C. und Ibrahim, A., Chronic consumption of fructose in combination with trans fatty acids but not with saturated fatty acids induces nonalcoholic steatohepatitis with fibrosis in rats. *Eur J Nutr*, 2018. **57**(6): S. 2171-2187.
145. Savard, C., Tartaglione, E.V., Kuver, R., Haigh, W.G., Farrell, G.C., Subramanian, S., Chait, A., Yeh, M.M., Quinn, L.S. und Ioannou, G.N., Synergistic interaction of dietary cholesterol and dietary fat in inducing experimental steatohepatitis. *Hepatology*, 2013. **57**(1): S. 81-92.
146. Teratani, T., Tomita, K., Suzuki, T., Oshikawa, T., Yokoyama, H., Shimamura, K., Tominaga, S., Hiroi, S., Irie, R., Okada, Y., Kurihara, C., Ebinuma, H., Saito, H., Hokari, R., Sugiyama, K., Kanai, T., Miura, S. und Hibi, T., A high-cholesterol diet exacerbates liver fibrosis in mice via accumulation of free cholesterol in hepatic stellate cells. *Gastroenterology*, 2012. **142**(1): S. 152-164.
147. Tomita, K., Teratani, T., Suzuki, T., Shimizu, M., Sato, H., Narimatsu, K., Okada, Y., Kurihara, C., Irie, R., Yokoyama, H., Shimamura, K., Usui, S., Ebinuma, H., Saito, H., Watanabe, C., Komoto, S., Kawaguchi, A., Nagao, S., Sugiyama, K., Hokari, R., Kanai, T., Miura, S. und Hibi, T., Free cholesterol accumulation in hepatic stellate cells: mechanism of liver fibrosis aggravation in nonalcoholic steatohepatitis in mice. *Hepatology*, 2014. **59**(1): S. 154-169.
148. Ioannou, G.N., Morrow, O.B., Connoles, M.L. und Lee, S.P., Association between dietary nutrient composition and the incidence of cirrhosis or liver cancer in the United States population. *Hepatology*, 2009. **50**(1): S. 175-184.
149. Cai, C., Zhu, X., Li, P., Li, J., Gong, J., Shen, W. und He, K., NLRP3 Deletion Inhibits the Non-alcoholic Steatohepatitis Development and Inflammation in Kupffer Cells Induced by Palmitic Acid. *Inflammation*, 2017. **40**(6): S. 1875-1883.
150. Duan, N.N., Liu, X.J. und Wu, J., Palmitic acid elicits hepatic stellate cell activation through inflammasomes and hedgehog signaling. *Life Sci*, 2017. **176**: S. 42-53.
151. Cazanave, S.C., Mott, J.L., Elmi, N.A., Bronk, S.F., Werneburg, N.W., Akazawa, Y., Kahraman, A., Garrison, S.P., Zambetti, G.P., Charlton, M.R. und Gores, G.J., JNK1-dependent PUMA expression contributes to hepatocyte lipoapoptosis. *J Biol Chem*, 2009. **284**(39): S. 26591-26602.
152. Li, C.P., Li, J.H., He, S.Y., Li, P. und Zhong, X.L., Roles of Fas/FasL, Bcl-2/Bax, and Caspase-8 in rat nonalcoholic fatty liver disease pathogenesis. *Genet Mol Res*, 2014. **13**(2): S. 3991-3999.
153. Clapper, J.R., Hendricks, M.D., Gu, G., Wittmer, C., Dolman, C.S., Herich, J., Athanacio, J., Villescaz, C., Ghosh, S.S., Heilig, J.S., Lowe, C. und Roth, J.D., Diet-induced mouse model of fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis reflecting clinical disease progression and methods of assessment. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2013. **305**(7): S. G483-495.
154. Trevaskis, J.L., Griffin, P.S., Wittmer, C., Neuschwander-Tetri, B.A., Brunt, E.M., Dolman, C.S., Erickson, M.R., Napora, J., Parkes, D.G. und Roth, J.D., Glucagon-like peptide-1 receptor agonism improves metabolic, biochemical, and

- histopathological indices of nonalcoholic steatohepatitis in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2012. **302**(8): S. G762-772.
155. Murphy, E.F., Cotter, P.D., Healy, S., Marques, T.M., O'Sullivan, O., Fouhy, F., Clarke, S.F., O'Toole, P.W., Quigley, E.M., Stanton, C., Ross, P.R., O'Doherty, R.M. und Shanahan, F., Composition and energy harvesting capacity of the gut microbiota: relationship to diet, obesity and time in mouse models. *Gut*, 2010. **59**(12): S. 1635-1642.
156. Hildebrandt, M.A., Hoffmann, C., Sherrill-Mix, S.A., Keilbaugh, S.A., Hamady, M., Chen, Y.Y., Knight, R., Ahima, R.S., Bushman, F. und Wu, G.D., High-fat diet determines the composition of the murine gut microbiome independently of obesity. *Gastroenterology*, 2009. **137**(5): S. 1716-1724.
157. Krenkel, O., Hundertmark, J., Abdallah, A.T., Kohlhepp, M., Puengel, T., Roth, T., Branco, D.P.P., Mossanen, J.C., Luedde, T., Trautwein, C., Costa, I.G. und Tacke, F., Myeloid cells in liver and bone marrow acquire a functionally distinct inflammatory phenotype during obesity-related steatohepatitis. *Gut*, 2019. **0**: S.1-13
158. Rensen, S.S., Bieghs, V., Xanthoulea, S., Arfianti, E., Bakker, J.A., Shiri-Sverdlov, R., Hofker, M.H., Greve, J.W. und Buurman, W.A., Neutrophil-derived myeloperoxidase aggravates non-alcoholic steatohepatitis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *PLoS One*, 2012. **7**(12): S. e52411.
159. Pulli, B., Ali, M., Iwamoto, Y., Zeller, M.W., Schob, S., Linnoila, J.J. und Chen, J.W., Myeloperoxidase-Hepatocyte-Stellate Cell Cross Talk Promotes Hepatocyte Injury and Fibrosis in Experimental Nonalcoholic Steatohepatitis. *Antioxid Redox Signal*, 2015. **23**(16): S. 1255-1269.
160. Hansen, H.H., Feigh, M., Veidal, S.S., Rigbolt, K.T., Vrang, N. und Fosgerau, K., Mouse models of nonalcoholic steatohepatitis in preclinical drug development. *Drug Discov Today*, 2017. **22**(11): S. 1707-1718.
161. Rolo, A.P., Teodoro, J.S. und Palmeira, C.M., Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Free Radic Biol Med*, 2012. **52**(1): S. 59-69.
162. Mihm, S., Danger-Associated Molecular Patterns (DAMPs): Molecular Triggers for Sterile Inflammation in the Liver. *Int J Mol Sci*, 2018. **19**(10).
163. Ganz, M. und Szabo, G., Immune and inflammatory pathways in NASH. *Hepatol Int*, 2013. **7**(Suppl 2): S. S771-781.
164. Jiang, J.X. und Torok, N.J., Liver Injury and the Activation of the Hepatic Myofibroblasts. *Curr Pathobiol Rep*, 2013. **1**(3): S. 215-223.
165. Ren, R. und Fedoriw, Y., The Molecular Pathophysiology, Differential Diagnosis, and Treatment of MPO Deficiency. *Journal of Clinical & Experimental Pathology*, 2012. **02**(03).
166. Van der Zwan, L.P., Scheffer, P.G., Dekker, J.M., Stehouwer, C.D., Heine, R.J. und Teerlink, T., Hyperglycemia and oxidative stress strengthen the association between myeloperoxidase and blood pressure. *Hypertension*, 2010. **55**(6): S. 1366-1372.

167. Nijhuis, J., Rensen, S.S., Slaats, Y., van Dielen, F.M., Buurman, W.A. und Greve, J.W., Neutrophil activation in morbid obesity, chronic activation of acute inflammation. *Obesity (Silver Spring)*, 2009. **17**(11): S. 2014-2018.
168. Friedman, S.L., Neuschwander-Tetri, B.A., Rinella, M. und Sanyal, A.J., Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nat Med*, 2018. **24**(7): S. 908-922.
169. Patel, Y.A., Gifford, E.J., Glass, L.M., McNeil, R., Turner, M.J., Han, B., Provenzale, D., Choi, S.S., Moylan, C.A. und Hunt, C.M., Risk factors for biopsy-proven advanced non-alcoholic fatty liver disease in the Veterans Health Administration. *Aliment Pharmacol Ther*, 2018. **47**(2): S. 268-278.
170. Wong, C.R. und Lim, J.K., The Association Between Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Cardiovascular Disease Outcomes. *Clinical Liver Disease* 2018. **12**(2): S. 39-44.
171. Brennan, M.L., Penn, M.S., Van Lente, F., Nambi, V., Shishehbor, M.H., Aviles, R.J., Goormastic, M., Pepoy, M.L., McErlean, E.S., Topol, E.J., Nissen, S.E. und Hazen, S.L., Prognostic Value of Myeloperoxidase in Patients with Chest Pain. *N Engl J Med*, 2003. **349**(17): S. 1595-1604.
172. Teng, N., Maghzal, G.J., Talib, J., Rashid, I., Lau, A.K. und Stocker, R., The roles of myeloperoxidase in coronary artery disease and its potential implication in plaque rupture. *Redox Rep*, 2017. **22**(2): S. 51-73.
173. Rashid, I., Maghzal, G.J., Chen, Y.C., Cheng, D., Talib, J., Newington, D., Ren, M., Vajandar, S.K., Searle, A., Maluenda, A., Lindstedt, E.L., Jabbour, A., Kettle, A.J., Bongers, A., Power, C., Michaelsson, E., Peter, K. und Stocker, R., Myeloperoxidase is a potential molecular imaging and therapeutic target for the identification and stabilization of high-risk atherosclerotic plaque. *Eur Heart J*, 2018. **39**(35): S. 3301-3310.
174. Westerbacka, J., Kolak, M., Kiviluoto, T., Arkkila, P., Siren, J., Hamsten, A., Fisher, R.M. und Yki-Jarvinen, H., Genes involved in fatty acid partitioning and binding, lipolysis, monocyte/macrophage recruitment, and inflammation are overexpressed in the human fatty liver of insulin-resistant subjects. *Diabetes*, 2007. **56**(11): S. 2759-2765.
175. Mello, T., Nakatsuka, A., Fears, S., Davis, W., Tsukamoto, H., Bosron, W.F. und Sanghani, S.P., Expression of carboxylesterase and lipase genes in rat liver cell-types. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008. **374**(3): S. 460-464.
176. Salguero Palacios, R., Roderfeld, M., Hemmann, S., Rath, T., Atanasova, S., Tschuschner, A., Gressner, O.A., Weiskirchen, R., Graf, J. und Roeb, E., Activation of hepatic stellate cells is associated with cytokine expression in thioacetamide-induced hepatic fibrosis in mice. *Lab Invest*, 2008. **88**(11): S. 1192-1203.
177. Mederacke, I., Hsu, C.C., Troeger, J.S., Huebener, P., Mu, X., Dapito, D.H., Pradere, J.P. und Schwabe, R.F., Fate tracing reveals hepatic stellate cells as dominant contributors to liver fibrosis independent of its aetiology. *Nat Commun*, 2013. **4**: S. 2823.

178. Gao, Y., Layritz, C., Legutko, B., Eichmann, T.O., Laperrousaz, E., Moulle, V.S., Cruciani-Guglielmacci, C., Magnan, C., Luquet, S., Woods, S.C., Eckel, R.H., Yi, C.X., Garcia-Caceres, C. und Tschop, M.H., Disruption of Lipid Uptake in Astroglia Exacerbates Diet-Induced Obesity. *Diabetes*, 2017. **66**(10): S. 2555-2563.
179. Huang, W., Metlakunta, A., Dedousis, N., Zhang, P., Sipula, I., Dube, J.J., Scott, D.K. und O'Doherty, R.M., Depletion of liver Kupffer cells prevents the development of diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance. *Diabetes*, 2010. **59**(2): S. 347-357.
180. Negrin, K.A., Roth Flach, R.J., DiStefano, M.T., Matevossian, A., Friedline, R.H., Jung, D., Kim, J.K. und Czech, M.P., IL-1 signaling in obesity-induced hepatic lipogenesis and steatosis. *PLoS One*, 2014. **9**(9): S. e107265.
181. Xiong, S., Mu, T., Wang, G. und Jiang, X., Mitochondria-mediated apoptosis in mammals. *Protein Cell*, 2014. **5**(10): S. 737-749.
182. Canbay, A., Feldstein, A.E., Higuchi, H., Werneburg, N., Grambihler, A., Bronk, S.F. und Gores, G.J., Kupffer cell engulfment of apoptotic bodies stimulates death ligand and cytokine expression. *Hepatology*, 2003. **38**(5): S. 1188-1198.
183. Wan, J., Benkdane, M., Teixeira-Clerc, F., Bonnafous, S., Louvet, A., Lafdil, F., Pecker, F., Tran, A., Gual, P., Mallat, A., Lotersztajn, S. und Pavoine, C., M2 Kupffer cells promote M1 Kupffer cell apoptosis: a protective mechanism against alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 2014. **59**(1): S. 130-142.
184. Stienstra, R., Saudale, F., Duval, C., Keshtkar, S., Groener, J.E., van Rooijen, N., Staels, B., Kersten, S. und Muller, M., Kupffer cells promote hepatic steatosis via interleukin-1beta-dependent suppression of peroxisome proliferator-activated receptor alpha activity. *Hepatology*, 2010. **51**(2): S. 511-522.
185. Pradere, J.P., Kluwe, J., De Minicis, S., Jiao, J.J., Gwak, G.Y., Dapito, D.H., Jang, M.K., Guenther, N.D., Mederacke, I., Friedman, R., Dragomir, A.C., Aloman, C. und Schwabe, R.F., Hepatic macrophages but not dendritic cells contribute to liver fibrosis by promoting the survival of activated hepatic stellate cells in mice. *Hepatology*, 2013. **58**(4): S. 1461-1473.
186. Awad, F., Assrawi, E., Jumeau, C., Georgin-Lavialle, S., Cobret, L., Duquesnoy, P., Piterboth, W., Thomas, L., Stankovic-Stojanovic, K., Louvrier, C., Giurgea, I., Grateau, G., Amselem, S. und Karabina, S.A., Impact of human monocyte and macrophage polarization on NLR expression and NLRP3 inflammasome activation. *PLoS One*, 2017. **12**(4): S. e0175336.
187. Anavi, S., Eisenberg-Bord, M., Hahn-Obercyger, M., Genin, O., Pines, M. und Tirosh, O., The role of iNOS in cholesterol-induced liver fibrosis. *Lab Invest*, 2015. **95**(8): S. 914-924.
188. Carazo, A., Leon, J., Casado, J., Gila, A., Delgado, S., Martin, A., Sanjuan, L., Caballero, T., Munoz, J.A., Quiles, R., Ruiz-Extremera, A., Alcazar, L.M. und Salmeron, J., Hepatic expression of adiponectin receptors increases with non-alcoholic fatty liver disease progression in morbid obesity in correlation with glutathione peroxidase 1. *Obes Surg*, 2011. **21**(4): S. 492-500.

189. Ganeshan, K. und Chawla, A., Metabolic Regulation of Immune Responses. *Annual Review of Immunology*, 2014. **32**(1): S. 609-634.
190. Bruce, K.D., Gorkhali, S., Given, K., Coates, A.M., Boyle, K.E., Macklin, W.B. und Eckel, R.H., Lipoprotein Lipase Is a Feature of Alternatively-Activated Microglia and May Facilitate Lipid Uptake in the CNS During Demyelination. *Front Mol Neurosci*, 2018. **11**: 57.
191. Freemerman, A.J., Johnson, A.R., Sacks, G.N., Milner, J.J., Kirk, E.L., Troester, M.A., Macintyre, A.N., Goraksha-Hicks, P., Rathmell, J.C. und Makowski, L., Metabolic reprogramming of macrophages: glucose transporter 1 (GLUT1)-mediated glucose metabolism drives a proinflammatory phenotype. *J Biol Chem*, 2014. **289**(11): S. 7884-7896.
192. Chang, H.R., Josefs, T., Scerbo, D., Gumaste, N., Hu, Y., Huggins, L.A., Barrett, T.J., Chiang, S.S., Grossman, J., Bagdasarov, S., Fisher, E.A. und Goldberg, I.J., Role of LpL (Lipoprotein Lipase) in Macrophage Polarization In Vitro and In Vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2019. **39**(10): S. 1967-1985.
193. Scholten, D., Trebicka, J., Liedtke, C. und Weiskirchen, R., The carbon tetrachloride model in mice. *Lab Anim*, 2015. **49**(1 Suppl): S. 4-11.
194. Li, L., Beauchamp, M.-C. und Renier, G., Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  and  $\gamma$  agonists upregulate human macrophage lipoprotein lipase expression. *Atherosclerosis*, 2002. **165**: S. 101-110.
195. Pettinelli, P. und Videla, L.A., Up-regulation of PPAR-gamma mRNA expression in the liver of obese patients: an additional reinforcing lipogenic mechanism to SREBP-1c induction. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011. **96**(5): S. 1424-1430.
196. Luo, W., Xu, Q., Wang, Q., Wu, H. und Hua, J., Effect of modulation of PPAR-gamma activity on Kupffer cells M1/M2 polarization in the development of non-alcoholic fatty liver disease. *Sci Rep*, 2017. **7**: 44612.
197. Staels, B. und Fruchart, J.-C., Therapeutic Roles of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Agonists. *Diabetes*, 2005. **54**: S. 2460-2470.
198. Liss, K.H. und Finck, B.N., PPARs and nonalcoholic fatty liver disease. *Biochimie*, 2017. **136**: S. 65-74.
199. Marchesini, G., Roden, M. und Vettor, R., EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*, 2016. **64**(6): S. 1388-1402.
200. Li, A.C., Brown, K.K., Silvestre, M.J., Willson, T.M., Palinski, W. und Glass, C.K., Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest*, 2000. **106**(4): S. 523-531.
201. Ericsson, C.-G., Hamsten, A., Nilsson, J., Grip, L., Svane, B. und de Faire, U., Angiographic assessment of effects of bezafibrate on progression of coronary artery disease in young male postinfarction patients. *The Lancet*, 1996. **347**: S. 849-853.

202. Babaev, V.R., Fazio, S., Gleaves, L.A., Carter, K.J., Semenkovich, C.F. und Linton, M.F., Macrophage lipoprotein lipase promotes foam cell formation and atherosclerosis in vivo. *J. Clin. Invest.*, 1999. **103**: S. 1697-1705.
203. Babaev, V.R., Patel, M.B., Semenkovich, C.F., Fazio, S. und Linton, M.F., Macrophage lipoprotein lipase promotes foam cell formation and atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *J Biol Chem*, 2000. **275**(34): S. 26293-26299.
204. Van Eck, M., Zimmermann, R., Groot, P.H.E., Zechner, R. und Van Berkel, T.J.C., Role of Macrophage-Derived Lipoprotein Lipase in Lipoprotein Metabolism and Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000. **20**: S. e53-e62.
205. Ergen, C., Niemietz, P.M., Heymann, F., Baues, M., Gremse, F., Pola, R., van Bloois, L., Storm, G., Kiessling, F., Trautwein, C., Luedde, T., Lammers, T. und Tacke, F., Liver fibrosis affects the targeting properties of drug delivery systems to macrophage subsets in vivo. *Biomaterials*, 2019. **206**: S. 49-60.

## 6.3 Publikationsliste

### 6.3.1 Publikationen

Thiele, N.D., Wirth, J.W., Steins, D., **Koop, A.C.**, Ittrich, H., Lohse, A.W., Kluwe, J., TIMP-1 is upregulated, but not essential in hepatic fibrogenesis and carcinogenesis in mice. *Scientific Reports*, 2017. 7(1): 714.

### 6.3.2 Kongresse

Posterbeitrag bei dem Kongress der European Association for Study of the Liver „International Liver Congress“ 2018 in Paris

Titel: „Pharmacological inhibition of myeloperoxidase attenuates non-alcoholic steatohepatitis-induced liver fibrosis in mice“

Autoren: **Anja Koop**, Nina Thiele, David Steins, Tom Diedrich, Erik Michaëlsson, Julian Schulze zur Wiesch, Ansgar W. Lohse, Jörg Heeren und Johannes Kluwe

Posterbeitrag bei der 35. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber „GASL 2019“ 2019 in Heidelberg

Titel: „LPL-Defizienz in myeloiden Zellen verstärkt die Progression der nicht-alkoholischen Steatohepatitis“

Autoren: **Anja Koop**, Jörg Heeren, Ansgar W. Lohse und Johannes Kluwe

Posterbeitrag bei dem Kongress der European Association for Study of the Liver „International Liver Congress“ 2019 in Wien

Titel: „Lipoprotein lipase deficiency in myeloid cells aggravates progression of non-alcoholic steatohepatitis“

Autoren: **Anja Koop**, Jörg Heeren, Ansgar W. Lohse und Johannes Kluwe



## 6.4 Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei PD Dr. Johannes Kluwe für die Betreuung meiner Promotion sowie für die Bereitstellung des interessanten Themas und das mir entgegengebrachte Vertrauen bedanken. Mein Dank gilt zudem Herrn Prof. Dr. Wolfram Brune für das kurzfristige Einspringen als Zweitgutachter und Herrn Prof. Dr. Ansgar W. Lohse für die Möglichkeit, die Doktorarbeit in der I. Medizinischen Klinik des UKE anzufertigen.

Außerdem danke ich der AG Heeren besonders Anna und Sandra für die Unterstützung bei den Leberlipiden und der hilfreichen und schönen Zusammenarbeit. Mein Dank gilt außerdem Babett für die Auswertung des *Microarrays*. Für die nette Zusammenarbeit und Hilfe während der Fütterungsversuche danke ich Andrea und Ulli aus der Forschungstierhaltung. Für die Einarbeitung ins Labor, der AG-Organisation und für die Zusammenarbeit möchte ich ganz herzlich Nina danken. Bei David möchte ich mich für seine kurzzeitige Unterstützung im Labor bedanken. Mein Dank gilt zudem Martina für das harmonische Zusammenleben in unserer Labor-WG, die Hilfe bei allen Labor- und Bestellungenfragen sowie den ein oder anderen Plausch im Labor/Büro. Insgesamt möchte ich mich bei allen Post-Docs, Doktoranden und TAs aus O58 für die nette Arbeitsatmosphäre, ihre Hilfe und Unterstützung bedanken. Ohne euch wäre ich als Eine-Person-AG im zweiten Teil meiner Doktorandenzeit wirklich aufgeschmissen gewesen.

Des Weiteren danke ich Anna und Daria für das Lesen meiner Doktorarbeit, ihre Korrekturen, hilfreichen Kommentare und das Feedback zur Doktorarbeit.

Explizit möchte ich mich an dieser Stelle bei Annika, Daria, Jenny, Sabrina und Steffi bedanken. Es ist nicht selbstverständlich, dass man in dieser Zeit so gute Freunde wie euch findet. Vielen Dank für die unvergessliche Zeit im Labor und außerhalb, in der wir übereinander aber vor allen Dingen miteinander lachen konnten.

Abschließend geht mein größter Dank an meine Familie für ihre Unterstützung, Geduld und noch vieles mehr.



## 6.5 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.“*

---

Ort, Datum

---

Unterschrift