

Regulation des Lipidmetabolismus in Hepatozyten

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

(Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Kira Laura Piotrowitz

aus

Lingen (Ems)

Bonn 2016

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter:

Herr Prof. Dr. Christoph Thiele

2. Gutachter:

Frau Prof. Dr. Irmgard Förster

Tag der Promotion: 04.07.2016

Erscheinungsjahr: 2016

Erklärung

Teile dieser Arbeit wurden bereits vorab veröffentlicht:

Veröffentlichungen:

Wolf MJ, Adili A, **Piotrowitz K**, Abdullah Z, Boege Y, Stemmer K, Ringelhan M, Simonavicius N, Egger M, Wohlleber D, Lorentzen A, Einer C, Schulz S, Clavel T, Protzer U, Thiele C, Zischka H, Moch H, Tschöp M, Tumanov AV, Haller D, Unger K, Karin M, Kopf M, Knolle P, Weber A and Heikenwälder M (2014). Metabolic Activation of Intrahepatic CD8⁺ T cells and NKT cells Causes Nonalcoholic Steatohepatitis and Liver Cancer via Cross-Talk with Hepatocytes. *Cancer Cell*.13,26(4):549-64

Poster:

Kira Piotrowitz, Monika Wolf, Julia Vorac, Mario Lauterbach, Iris Unterweger, Lars Kürschner, Irmgard Förster, Mathias Heikenwälder und Christoph Thiele. Inflammation and metabolism: Is there a link? „Cluster Science Day“ des Exzellenzclusters „ImmunoSensation“, 03-04.11.2014, Bonn, Deutschland

Kira Piotrowitz, Julia Vorac, Iris Unterweger, Heike Weighardt, Irmgard Förster und Christoph Thiele. Click-based method to trace lipid metabolism in primary hepatocytes under various metabolic conditions. 11th Congress of the International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids (ISSFAL), 28.06-02.07.2014, Stockholm, Schweden

Kira Piotrowitz, Lars Kürschner and Christoph Thiele. Hepatic Lipid Metabolism in Health and Steatosis. 3rd Virtual Liver Network Retreat, 28.10-30.10.2013, St. Bonifatiuskloster, Hünfeld, Deutschland

Kira Piotrowitz, Lars Kürschner and Christoph Thiele. Hepatic Lipid Metabolism in Health and Steatosis. Jahrestreffen Bonner Forum Biomedizin, 31.01-01.02.2013, Hennef, Deutschland

Kira Piotrowitz, Lars Kürschner and Christoph Thiele. Hepatic Lipid Metabolism in Health and Steatosis. 2nd Virtual Liver Network Retreat, 26.11-28.11.2011, St. Bonifatiuskloster, Hünfeld, Deutschland

Vortrag:

How inflammation affects liver lipid metabolism. „Cluster Science Day“ des Exzellenzclusters „ImmunoSensation“, 22.10.2013, Research Center Caesar - Center of Advanced European Studies and Research, Bonn, Deutschland

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abkürzungsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
1.1 Die Leber als zentrales Organ des Stoffwechsels	2
1.2 Die nichtalkoholische Fettlebererkrankung	4
1.3 Die Rolle einer gestörten Lipidhomöostase auf die Entstehung einer Steatose 6	
1.3.1 Fettsäuren aus dem Fettgewebe	7
1.3.2 Fettsäuren aus der Nahrung	8
1.3.3 Fettsäuren aus der <i>de novo</i> -Lipogenese	8
1.3.4 VLDL-Export und β -Oxidation	9
1.3.5 TAG-Biosynthese und -Speicherung	9
1.4 Entzündung des Fettgewebes und der Leber bei Übergewicht	12
1.4.1 Entzündung im Fettgewebe	12
1.4.2 Entzündung in der Leber aufgrund einer metabolischen Endotoxämie	12
1.4.2.1 Verschiedene Quellen für erhöhte LPS-Konzentrationen.....	13
1.4.2.2 Aktivierung der Kupferzellen durch LPS.....	14
1.5 Click-Markierung von zellulären Lipiden	16
2 Zielsetzung	18
3 Materialien	19
3.1 Material und Chemikalien	19
3.1.1 Geräte	19
3.1.2 Verbrauchsmaterialien	20
3.1.3 Reagenziensysteme	21
3.1.4 Allgemeine Chemikalien und Lösungen.....	22
3.1.5 Stammlösungen, Puffer und Medien.....	25
3.1.5.1 Stammlösungen und Puffer	25
3.1.5.2 Sonstige Puffer und Lösungen	26
3.1.5.3 Medien.....	27
3.1.6 Antibiotika	28
3.1.7 Enzyme	28

3.1.8	Verwendete Fettsäuren.....	28
3.1.9	<i>Primer</i>	29
3.1.10	Antikörper.....	30
3.1.11	Zytokine	30
3.1.12	Computerprogramme	31
4	Methoden	32
4.1	Tierexperimente	32
4.1.1	Fütterungsexperimente	32
4.1.1.1	HFD-Mausmodell.....	32
4.1.1.2	Cholinderfizientes HFD-Mausmodell	33
4.1.2	Einleitung der Narkose.....	33
4.1.3	Blutglukose-Messungen.....	33
4.1.3.1	Glukose-Toleranztest	34
4.1.3.2	Insulin-Toleranztest	34
4.1.4	Analyse metabolischer Parameter im Blut.....	35
4.1.4.1	Gewinnung von Blutserum	35
4.1.4.2	FFS-Bestimmung im Serum	35
4.1.4.3	Bestimmung von ALT, AST, Cholesterol und TAG.....	35
4.1.5	Induktion einer <i>in vivo</i> LPS-Stimulation	37
4.1.6	Bestimmung des Lipidgehalts der Leber.....	38
4.1.7	<i>In vivo</i> Analyse der hepatischen Fettsäureaufnahme nach intravenöser oder oraler Applikation von Alkin-Fettsäuren	38
4.2	Primärzellkultur	39
4.2.1	Isolation primärer Leberzellen.....	39
4.2.1.1	Kollagenisieren der Zellkulturschalen.....	39
4.2.1.2	Perfusion der Leber	39
4.2.1.3	Hepatozytenisolation	40
4.2.1.4	Magnetische Zellisolation von Kupfferzellen	41
4.2.2	Isolation primärer Splenozyten	41
4.2.3	Zellzahlbestimmung	42
4.2.4	Kultivierung der Primärzellen	42
4.2.5	Kokultur- und Überstandsexperimente	42
4.2.5.1	Hepatozyten mit Kupfferzellen.....	42
4.2.5.2	Hepatozyten mit Splenozyten.....	43
4.2.6	<i>In vitro</i> Stimulation der Leberzellen.....	43
4.2.7	<i>In vitro</i> Analyse der hepatischen Fettsäureaufnahme und VLDL-Sekretion	44
4.2.8	Einfluss diverser Milz-Zellsubpopulationen auf die Fettsäureaufnahme <i>in vitro</i>	44

4.3	Metabolische Markierung von Lipiden	45
4.3.1	<i>Pulse-Chase</i> -Analyse	45
4.3.2	Lipidextraktion	46
4.3.3	Click-Reaktion	46
4.3.4	Dünnschichtchromatographie	47
4.3.5	Färbung und Mikroskopie	48
4.4	Molekularbiologische Methoden.....	49
4.4.1	RNA-Isolation aus primären Hepatozyten.....	49
4.4.2	cDNA-Synthese	50
4.4.3	PCR und RT-qPCR.....	50
4.5	Immunologische Methoden	52
4.5.1	Durchflusszytometrie	52
4.5.2	ELISA.....	53
4.6	Statistik.....	54
5	Ergebnisse.....	55
5.1	Analyse des hepatischen Lipidstoffwechsels unter wechselnden metabolischen Bedingungen	55
5.1.1	Etablierung der Methoden <i>Pulse-Chase</i> -Analyse und Lipidextraktion in primären Hepatozyten.....	55
5.1.2	Einfluss verschiedener Insulin- und Glukosekonzentrationen auf den Lipidmetabolismus primärer Hepatozyten.....	56
5.1.3	Metabolismus der Fettsäuren Ölsäure und Palmitinsäure in primären Hepatozyten	58
5.1.4	Einfluss eines künstlichen Fettsäureüberschusses auf den Lipidmetabolismus primärer Hepatozyten	61
5.2	HFD-Mäuse zeigten Tendenzen eines metabolischen Syndroms.....	62
5.2.1	Steatotische Leberveränderungen in HFD-Mäusen.....	66
5.2.2	Analyse des Lipidmetabolismus in Hepatozyten von ND- und HFD-Mäusen	68
5.2.3	Einfluss Kupfferzell-sezernierter Faktoren	71
5.2.4	Einfluss des Kupfferzellüberstandes auf eine Steatose in Hepatozyten.....	72
5.2.5	TNF als Stimulus für die Entstehung einer Steatose in HFD-Mäusen	73
5.3	Effekt einer kurzzeitigen <i>in vivo</i> LPS-Stimulation auf den hepatischen Lipidmetabolismus.....	74
5.3.1	LPS-Einfluss auf die Fettsäureaufnahme und TAG-Sekretion in Hepatozyten.....	76
5.3.2	LPS-Einfluss auf den Lipidmetabolismus.....	76
5.3.3	Einfluss LPS-aktivierter Kupfferzellen auf den hepatischen Fettstoffwechsel	79

5.3.4 LPS-abhängige Sekretion pro- und antiinflammatorischer Zytokine in Kupfferzellen	80
5.3.5 Effekt der Faktoren von LPS-behandelten Kupfferzellen auf die Lipidakkumulierung in Hepatozyten	81
5.3.6 Analyse der Genexpression in Hepatozyten nach <i>in vivo</i> LPS-Stimulation	82
5.3.7 Untersuchung der TNF-abhängigen TAG-Einlagerung in Hepatozyten	83
5.4 Einfluss von Splenozyten auf die Entwicklung einer Steatose in der Leber	84
5.4.1 Vergleich der hepatischen Fettsäureaufnahme in Rag1 ^{-/-} - und C57BL/6J ND-Mäusen <i>in vivo</i>	85
5.4.1.3 Vergleich der hepatischen Fettsäureaufnahme in Rag1 ^{-/-} - und C57BL/6J ND-Mäusen nach intravenöser Applikation	85
5.4.1.4 Vergleich der hepatischen Fettsäureaufnahme in Rag1 ^{-/-} - und C57BL/6J ND-Mäusen nach oraler Applikation	87
5.4.2 Vergleich der hepatischen Fettsäureaufnahme in Rag1 ^{-/-} - und ND-Mäusen <i>in vitro</i>	89
5.4.3 Analyse der hepatischen Fettsäureaufnahme nach Kokultur mit Splenozyten aus ND-Mäusen und CD-HFD-Mäusen	90
5.4.4 Einfluss der Fettsäuredosierung und des Verhältnisses von Splenozyten zu Hepatozyten auf den Steatose-Effekt	92
5.4.5 Analyse der hepatischen Fettsäureaufnahme in unstimulierten Hepatozyten nach Zugabe von Splenozytenüberstand aus ND-Mäusen und CD-HFD-Mäusen	93
5.4.6 Untersuchung des LIGHT-Einflusses auf die hepatische Lipidanlagerung	94
5.4.7 Analyse des Einflusses einzelner Splenozytensubpopulationen auf die Fettsäureaufnahme in Hepatozyten	96
6 Diskussion	99
6.1 Einfluss von Fettsäuren, Insulin und Glukose auf den Lipidmetabolismus	99
6.2 Auswirkung einer HFD auf die Entstehung einer Steatose in der Leber	101
6.3 Effekt von LPS auf die Entwicklung einer Steatose	103
6.4 TNF als bekannter Regulator des Lipidmetabolismus	105
6.4.1 Der Einfluss von TNF auf die Leber	105
6.4.2 Der Einfluss von TNF auf das Fettgewebe	106
6.5 Effekt von Splenozyten auf die Entstehung einer Steatose	107
7 Schlussfolgerung	109
8 Ausblick	110
9 Referenzen	113

Danksagung 123

Zusammenfassung

Übergewicht, die pathologische Expansion des Fettgewebes, entsteht durch einen metabolischen Energieüberschuss. Ein konstanter Energieüberschuss führt zur Ausbildung einer komplexen Pathologie, die als metabolisches Syndrom bekannt ist und zu Typ 2 Diabetes führen kann, sowie mit schwachen Entzündungsreaktionen im Körper assoziiert ist. Durch ihre zentrale Stellung im Metabolismus verstoffwechselt die Leber große Mengen von Neutrallipiden, von denen unter gesunden Bedingungen nur geringe Mengen gespeichert werden. Unter pathologischen Bedingungen sammeln sich Neutrallipide in den Lipidtröpfchen der Hepatozyten an, was in der klinischen Manifestation der nichtalkoholischen Fettleber (engl.: *non alcoholic fatty liver disease* (NAFLD)) resultieren kann. Die NAFLD ist die am häufigsten vorkommende Lebererkrankung in den Industrieländern und ist eng mit dem Auftreten von Übergewicht und Insulinresistenz verbunden. Sie wird daher auch als hepatische Manifestation des metabolischen Syndroms bezeichnet. NAFLD setzt sich aus einem Spektrum verschiedener pathologischer Stufen zusammen und reicht von einer Steatose, der reversiblen Akkumulation von Fett in Hepatozyten, bis hin zu einer Steatohepatitis, welche sich durch einen inflammatorischen Zustand und Narbenbildung (Fibrose) auszeichnet. Letztlich führt die Krankheit zu einer Zirrhose und Leberkrebs, in denen die Leberzellen ihre Funktionen nicht mehr ausführen können.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss verschiedener Faktoren und Zelltypen auf die Entwicklung einer hepatischen Steatose untersucht. Die Rolle von Lipopolysacchariden (LPS), Kupferzellen und Splenozyten auf diesen Prozess war hierbei von besonderem Interesse.

Dies wurde durch Verwendung frisch isolierter Hepatozyten, Kupferzellen oder Splenozyten aus normalen Mäusen oder Mäusen, welche mit einer Hochfettdiät (HFD), einer Cholindefizienten HFD (CD-HFD) oder bakteriellen LPS behandelt wurden, analysiert.

Clickchemiebasierte *Pulse-Chase* Experimente konnten nachweisen, dass Hepatozyten aus HFD-Mäusen im Vergleich zu Normaldiät (ND)-Mäusen kaum Veränderungen im Fettstoffwechsel aufweisen. Anschließende Kokultur- und Überstandsexperimente zeigten, dass das primäre Ereignis in der Entwicklung einer Steatose nicht der metabolische Energieüberschuss, sondern die direkte Stimulation der Kupferzellen durch erhöhte Fettsäure- und LPS-Spiegel ist. So konnte gezeigt werden, dass Hepatozyten aus ND-Mäusen bei normalen Fettsäure-Spiegeln aber in Anwesenheit von Kupferzellüberstand einer HFD-Maus eine Steatose entwickeln. Diese Steatose konnte durch die Zugabe eines Tumornekrosefaktor (TNF)-Antikörpers blockiert werden. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass Kupferzellen TNF freisetzen, wenn sie erhöhten Fettsäure- oder LPS-Konzentrationen ausgesetzt sind. TNF war ausreichend um die vermehrte Bildung von Lipidtröpfchen in Hepatozyten zu

stimulieren. Auch aktivierte Splenozyten aus der Milz spielen in der Entwicklung einer Steatose eine wichtige Rolle, wie in Kokultur- und Überstandsexperimenten mit Hepatozyten aus ND-Mäusen und Splenozyten aus CD-HFD-Mäusen herausgefunden wurde. LIGHT, ebenfalls Mitglied der TNF-Superfamilie, konnte in diesem Prozess als wichtiges Zytokin identifiziert werden, welches die vermehrte Lipidtröpfchenakkumulation in An- und Abwesenheit von Fettsäuren anregt.

Insgesamt zeigt die Arbeit daher den direkten Einfluss der Zytokine TNF und LIGHT auf den Lipidmetabolismus in Hepatozyten und die Entstehung einer pathologischen Steatose in der Leber. Ebenfalls verdeutlicht dies die enge Verbindung zwischen immunologischen Prozessen und dem Fettstoffwechsel. Der mögliche Einsatz von anti-LIGHT oder anti-TNF Antikörpern als Therapieansatz gegen NAFLD sollte daher in zukünftigen Studien in Betracht gezogen werden.

Abkürzungsverzeichnis

<i>ad libitum</i>	lat.: nach Belieben
AGPAT	1-Acylglycerol-3-Phosphat-Acyltransferasen
Alkin-Ölsäure	Nonadec-(9Z)-en-18-insäure
Alkin-Palmitinsäure	Heptadec-16-insäure
ALT	Alanin-Aminotransferase
APC	Allophycocyanin
AST	Aspartat-Aminotransferase
ATGL	Adipozyten-Triglycerid-Lipase
BSA	Rinderserumalbumin (engl.: <i>bovine serum albumin</i>)
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CD	engl.: <i>cluster of differentiation</i>
CD-HFD	Cholindefiziente Hochfettdiät
cDNA	komplementäre DNA (engl.: <i>copy DNA</i>)
CDP	Cytidindiphosphat
CE	Cholesterinester
<i>Chase</i>	Verfolgung
CoA	Coenzym-A
CT	Zyklusschwellenwert (engl.: <i>cycle threshold</i>)
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4',6-Diamin-2-Phenylindol
DC	Dünnschichtchromatographie
<i>de novo</i>	lat.: neu
DGAT	Diacylglycerol-Acyltransferase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EGTA	Ethylenglycol-bis-(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ELISA	engl.: <i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
et al.	lat.: et altera = und andere
FABP1	engl.: <i>Fatty acid-binding protein 1</i>
FAS	Fettsäuresynthase
FATP	Fettsäuretransporterprotein
FCS	Fötale Kälberserum (engl.: <i>fetal calf serum</i>)

FFS	Freie Fettsäuren
× g	Erdbeschleunigung
GPAT	Glycerol-3-phosphat-Acyltransferasen
HBSS	Hanks balancierte Salzlösung (engl.: <i>Hank's balanced salt solution</i>)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettichperoxidase (engl.: <i>horseradish peroxidase</i>)
I.E.	Internationale Einheit
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
<i>in vitro</i>	lat.: im Glas
<i>in vivo</i>	lat.: im Lebendigen
LD540	4,4-Difluoro-2.3,5.6-bis-tetramethylene-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene
LPA	Lysophosphatidsäure
LPCAT1	Lysophosphatidylcholin-Acyltransferase
LPS	Lipopolysaccharid(e)
MACS	magnetische Zellsortierung (engl.: <i>magnetic cell sorting</i>)
MAG	Monoacylglycerol
MCP-1	Monozyten-chemotaktisches Protein 1
MGAT	Monoacylglycerol-Acyltransferasen
mRNA	Boten-RNA (engl.: <i>messenger RNA</i>)
n	Anzahl der Versuche oder Tiere (engl.: <i>numbers</i>)
NAFLD	Nichtalkoholische Fettlebererkrankung
NASH	Nichtalkoholische Steatohepatitis
NF-κB	engl.: <i>nuclear factor kappa B</i>
NKT-Zellen	Natürliche Killer T-Zellen
PA	Phosphatidsäure
PAP	Phosphatidsäuren-Phosphohydrolasen
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl.: <i>phosphate buffered saline</i>)
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PE	Phycoerythrin
PEMT	Phosphatidylethanolamin-N-Methyltransferasen
POD	Pyruvat-Oxidase

Ppap2a	Phosphatidsäure Phosphatase Type 2A
<i>Pulse</i>	Impuls-Signal
qRT-PCR	quantitative Realtime Polymerase Kettenreaktion (engl.: <i>quantitative realtime polymerase chain reaction</i>)
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezien
RT	Raumtemperatur
TAG	Triacylglycerol
TGF β	Transformierender Wachstumsfaktor β
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor (engl.: <i>toll-like receptor</i>)
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor α
U	Enzymeinheit (engl.: <i>unit</i>)
VLDL	<i>very-low-density lipoprotein</i>
WT	Wildtyp

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematischer Aufbau der Leber.	3
Abb. 2: Krankheitsspektrum der NAFLD.	5
Abb. 3: Metabolische Veränderungen einer hepatischen Steatose.	6
Abb. 4 : Schematischer Überblick des Glycerophospholipidweges und Kennedy-Stoffwechselweges.	10
Abb. 5: Entwicklung einer Steatose in der Leber durch LPS und FFS.	15
Abb. 6: Reaktionsschema der Click-Reaktion.	17
Abb. 7: Verwendete Alkin-Lipide und azidmarkierter Farbstoff.	29
Abb. 8: Darstellung der zugrundeliegenden chemischen Nachweisprinzipien für die Bestimmung verschiedener Serumparameter mittels eines Reflotron Plus Analyse-Systems.	37
Abb. 9: Quantitative Analyse des Alkin-Fettsäureeinbaus in die verschiedenen zellulären Lipidklassen primärer Hepatozyten unter variierenden Glukose- und Insulinkonzentrationen.	57
Abb. 10: Quantitative Analyse des Einbaus von Alkin-Ölsäure und Alkin-Palmitinsäure in die verschiedenen Lipidklassen primärer Hepatozyten.	60
Abb. 11: Quantitative Analyse des Einbaus markierter Fettsäuren in verschiedene Lipidklassen primärer Hepatozyten nach vorheriger <i>in vivo</i> Fettsäurefütterung.	62
Abb. 12: Vergleich der Futtermenge und Kalorienaufnahme, des Gewichtsverlaufs und Fettgehalts bei ND- und HFD-Mäusen.	63
Abb. 13: Vergleich des Glukosespiegels in ND- und HFD-Mäusen während eines Insulin-Toleranztests und eines Glukose-Toleranztests.	64
Abb. 14: Vergleich diverser metabolischer Serumparameter unbehandelter und 1,5 h <i>in vivo</i> mit LPS behandelte ND- und HFD-Mäuse.	65
Abb. 15: Analysen der Lebern von ND- und HFD-Mäusen.	66
Abb. 16: Vergleich der Gesamtlipidmenge in Lebern sowie der Lipidakkumulierung in primären Hepatozyten und Leberschnitten von ND- und HFD-Mäusen.	67
Abb. 17: Gesamtanzahl und Reinheit isolierter Hepatozyten und Kupfferzellen.	68
Abb. 18: Der Lipidmetabolismus in Hepatozyten von ND- und HFD-Mäusen zeigt Unterschiede im DAG-Metabolismus und in der Gesamtalkinlipidmenge.	70
Abb. 19: Vergleich der Zytokinsekretion isolierter Kupfferzellen in unbehandelten und mit LPS behandelten ND- und HFD-Mäusen.	71
Abb. 20: Der Kupfferzellüberstand von HFD-Mäusen erzeugt einen steatotischen Phänotyp in ND-Hepatozyten <i>via</i> TNF.	72

Abb. 21: Der Einfluss von TNF auf die Menge und Größe der Lipidtröpfchen in ND-Hepatozyten.....	73
Abb. 22: Einfluss einer <i>in vivo</i> LPS-Behandlung auf die Gesamtlipidmenge und hepatische Lipidtröpfchenakkumulation.	74
Abb. 23: Altersabhängige Lipidtröpfchenakkumulation in Hepatozyten.....	75
Abb. 24: Gesamteinbau der Alkin-Fettsäuren und Sekretion von markiertem TAG in Hepatozyten nach <i>in vivo</i> LPS-Stimulation.	76
Abb. 25: Der hepatische Fettstoffwechsel wurde durch eine <i>in vivo</i> LPS-Stimulation, jedoch nicht durch eine <i>in vitro</i> LPS-Stimulation, in Richtung einer Steatose verändert.....	78
Abb. 26: Untersuchung des Einflusses von Kupfferzellen auf die intrazelluläre Lipidtröpfchenspeicherung in Hepatozyten nach einer <i>in vitro</i> LPS-Behandlung.	79
Abb. 27: Pro- und antiinflammatorische Zytokinsekretion von unbehandelten und <i>in vitro</i> mit LPS stimulierten Kupfferzellen.....	80
Abb. 28: Sekretiertes TNF von LPS-stimulierten Kupfferzellen induziert einen steatotischen Phänotyp in Hepatozyten.....	81
Abb. 29: Vergleich der Expression verschiedener Gene des Lipidmetabolismus und der Entzündungsreaktion nach <i>in vivo</i> LPS-Stimulation in primären Hepatozyten.	83
Abb. 30: DC zur Etablierung der optimalen Bedingungen für die Click-Reaktion nach intravenöser Applikation von Fettsäuren.....	86
Abb. 31: Vergleich der Fettsäureaufnahme in die Lebern von C57BL/6J ND- oder Rag1 ^{-/-} -Mäusen nach intravenöser Injektion von Alkin-Fettsäuren.	87
Abb. 32: Analyse der Aufnahme von Alkin-Fettsäuren aus dem Blut in die Leber nach oraler Fettsäureapplikation.....	88
Abb. 33: Analyse isolierter Fettsäuren aus den Lebern von C57BL/6J ND- oder Rag1 ^{-/-} -Mäusen nach oraler Fettsäure-Applikation für unterschiedliche Zeitdauern.....	89
Abb. 34: Extrahierte Lipide aus primären Hepatozyten von ND- und Rag1 ^{-/-} -Mäusen nach zehnminütiger Fütterung mit Alkin-Fettsäuren.....	90
Abb. 35: Einfluss von Splenozyten aus ND-/HFD-Mäusen auf die Fettsäureaufnahme in Hepatozyten.....	91
Abb. 36: Einfluss von Fettsäuren und Splenozyten aus HFD-Mäusen auf die Neutrallipidanreicherung in ND-Hepatozyten.....	91
Abb. 37: Einfluss verschiedener Fettsäurekonzentrationen sowie der An- und Abwesenheit von Splenozyten auf die Lipidakkumulation in Hepatozyten.....	92
Abb. 38: Einfluss verschiedener Splenozyten-/Hepatozytenverhältnisse auf die Lipidakkumulation in Hepatozyten.	93

Abb. 39: Analyse der Lipidakkumulation in ND-Hepatozyten in An- oder Abwesenheit von Fettsäuren und/oder CD-HFD-Splenozytenüberstand.....	94
Abb. 40: Analyse der Lipidakkumulation in ND-Hepatozyten in An- oder Abwesenheit von Fettsäuren und/oder rekombinatem LIGHT.....	95
Abb. 41: Einfluss des LT β R-Signalweges auf die Fettsäureaufnahme in Hepatozyten.....	96
Abb. 42: Einfluss einzelner Splenozytensubpopulationen auf die Fettsäureaufnahme in Hepatozyten.....	98
Abb. 43: Die Rolle von Immunzellen in der Entwicklung einer Steatose in Hepatozyten.....	109

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Auflistung der in dieser Arbeit eingesetzten Geräte.....	19
Tab. 2: Zusammenstellung der verwendeten Verbrauchsmaterialien.....	20
Tab. 3: Verwendete Chemikalien und Lösungen.	22
Tab. 4: Eingesetzte Stammlösungen.	25
Tab. 5: Verwendete Puffer und Lösungen.	26
Tab. 6: Auflistung der verwendeten Medien.....	27
Tab. 7: Eingesetzte Enzyme.	28
Tab. 8: Verwendete <i>Primer</i> für die RT-qPCR.....	29
Tab. 9: Eingesetzte Antikörper.....	30
Tab. 10: Zusammenfassung verwendeter Computerprogramme.	31
Tab. 12: Pipettieransatz für die cDNA-Synthese.....	50
Tab. 13: Pipettierschema für die RT-qPCR.....	51
Tab. 14: Standard-PCR-Programm für die RT-PCR.	51
Tab. 15: Messung der freien, unveresterten Fettsäuren im normalen und delipidierten Rinderserum.	84
Tab. 16: Mithilfe eines Durchflusszytometers isolierte Mengen sortierter Splenozyten.	97

1 Einleitung

Der menschliche Körper braucht für die Ausübung seiner hochkomplexen Funktionen Energie, welche durch Stoffwechsel bereitgestellt wird. Veränderungen in der Verfügbarkeit von Energie stellen eine große Herausforderung für den Körper dar (Wilfling et al., 2013). Daher kann er überschüssige Energie in Form von Fettdepots speichern und bei Bedarf in Zeiten von Energieknappheit wieder freisetzen (Shoelson, Herrero und Naaz 2007; Wilfling et al., 2013). Übergewicht (Adipositas) – eine typische Zivilisationskrankheit der heutigen Gesellschaft – entsteht durch eine Verschiebung in Richtung einer erhöhten Energiezufuhr und eines verringerten Energieverbrauchs (Hurt et al., 2010). Ab einem Body-Mass-Index (BMI) über 30, welcher das Verhältnis von Körpergröße zu Körpergewicht beschreibt, wird von einer Obesitas gesprochen (Weltgesundheitsorganisation 2015). Die Prävalenz für Adipositas und Obesitas ist in den Industrieländern in den letzten Jahren dramatisch angestiegen und stellt ein großes Problem des öffentlichen Gesundheitssystems dar (Kopelman, 2000). Insbesondere Veränderungen in den Lebensumständen, wie eine erhöhte Nahrungszufuhr, ein Mangel an Bewegung und eine veränderte Zusammensetzung der Nahrung mit einem höheren Fett- und Kohlenhydratanteil führen dazu, dass die Fettdepots im Körper durch den konstanten Überschuss an Energie größer werden (Spiegelman und Flier, 2001). Überschüssige Energie wird in Form von Triacylglycerol (TAG) in Lipidtröpfchen gespeichert und in Zeiten des Nährstoffmangels als freie Fettsäuren (FFS) von der Zelle wieder freigesetzt. Alle humanen Zelltypen können Fettsäuren als TAG in intrazellulären Lipidtröpfchen speichern. Weiße Fettzellen hingegen sind auf die Speicherung von TAG spezialisiert und geben im Falle von Hunger oder eines erhöhten Energiebedarfs des Organismus Fettsäuren ins Blut frei, damit sie in anderen peripheren Organen als Energiequelle genutzt werden können (Loeffler, 2007).

Übergewicht fördert zudem schwache, chronische Entzündungsprozesse (engl.: *low-grade inflammation*) im Fettgewebe und in der Leber, die wiederum eine Insulinresistenz sowie eine Disregulation des Fettstoffwechsels (Dyslipidämie) auslösen und unter Umständen zu Diabetes Typ 2 führen können (Jung und Choi, 2014). Insulin ist für die Glukosehomöostase im Körper verantwortlich. Eine Insulinresistenz liegt vor, wenn Insulin seine Aufgabe, Glukose aus den Körperzellen aufzunehmen, nicht mehr adequat ausführen kann (Fraulob et al., 2010). Wie bereits erwähnt, stellen weiße Fettzellen im Fettgewebe der Säugetiere unter homöostatischen Bedingungen das wichtigste Organ für die Energiespeicherung dar. Bei einer anhaltenden Verschiebung des Stoffwechsels kommt es allerdings auch zu einer TAG-Speicherung in der Leber, ein Prozess, der als Steatose bezeichnet wird und zu der Krankheit der nichtalkoholischen Fettleber (engl.: *non alcoholic fatty liver disease* (NAFLD))

führen kann (Anstee und Day, 2013). Abnormalitäten im hepatischen Lipidmetabolismus bilden dabei einen wesentlichen Bestandteil der Entwicklung einer NAFLD (Dowman, Tomlinson und Newsome, 2010). Die Entwicklung einer hepatischen Steatose bei einer Alkoholaufnahme von weniger als 20 g pro Tag wird als NAFLD definiert. Damit unterscheidet sich die NAFLD von der pathologisch sehr ähnlich ablaufenden Krankheit der alkoholischen Fettlebererkrankung (engl.: *alcoholic fatty liver disease* (ALD)), welche durch übermäßigen Alkoholverzehr verursacht wird.

1.1 Die Leber als zentrales Organ des Stoffwechsels

Die Leber ist mit einem Gewicht von 1500 g nicht nur die größte Drüse im Körper, sondern hat durch ihre Fähigkeit Lipide, Kohlenhydrate und Proteine zu verstoffwechseln auch eine zentrale Stellung im Stoffwechsel (Rui, 2014).

Die Aufgaben der Leber sind sehr vielfältig und reichen von der Entgiftung körpereigener und körperfremder Stoffe bis hin zur Regulation der Glukosehomöostase, der Produktion von Galle und der Synthese verschiedener Stoffe wie z.B. Lipoproteine, Serumproteine, Hormone oder Gerinnungsfaktoren (Luellmann-Rauch, 2009). Zudem spielt die Leber bei der Immunantwort eine wichtige Rolle, indem sie an der Akute-Phase-Reaktion des angeborenen Immunsystems, der unspezifischen Entzündungsreaktion des Körpers zur Aufrechterhaltung oder Wiederherstellung der Homöostase, beteiligt ist (Luellmann-Rauch, 2009; Gruys et al., 2005). Die Leber nimmt auch eine zentrale Stellung im Lipidstoffwechsel ein. So ist die menschliche Leber nicht nur der Mittelpunkt der Fettsäuresynthese, sondern durch die Synthese von Lipoproteinen des gesamten Lipidkreislaufs (Nguyen et al., 2008). Die Leber besteht aus parenchymalen Zellen, den Hepatozyten, und einer Reihe nicht-parenchymaler Zellen, welche sich aus Endothelzellen, Sternzellen und Immunzellen wie Kupfferzellen und Lymphozyten zusammensetzen und in den Sinusoiden – den Blutgefäßen der Leber lokalisiert sind (Racanelli und Rehermann, 2006; Kmiec, 2001; siehe Abb. 1).

Hepatozyten stellen mit 60-80 % des Lebergewichts die größte Zellpopulation der Leber dar (Racanelli und Rehermann, 2006; Kmiec, 2001). Als parenchymale Zellen sind sie für die meisten oben beschriebenen Funktionen in der Leber zuständig (Luellmann-Rauch, 2009). Hepatozyten üben wichtige metabolische, endokrine und sekretorische Funktionen aus, wie beispielsweise die Synthese von Galle, Proteinen, Kohlenhydraten, Phospholipiden, Fettsäuren und TAG (Kmiec, 2001). In den Hepatozyten werden FFS zu TAG verestert oder zur Energiegewinnung in der β -Oxidation verwendet (Nagle, Klett und Coleman, 2009).

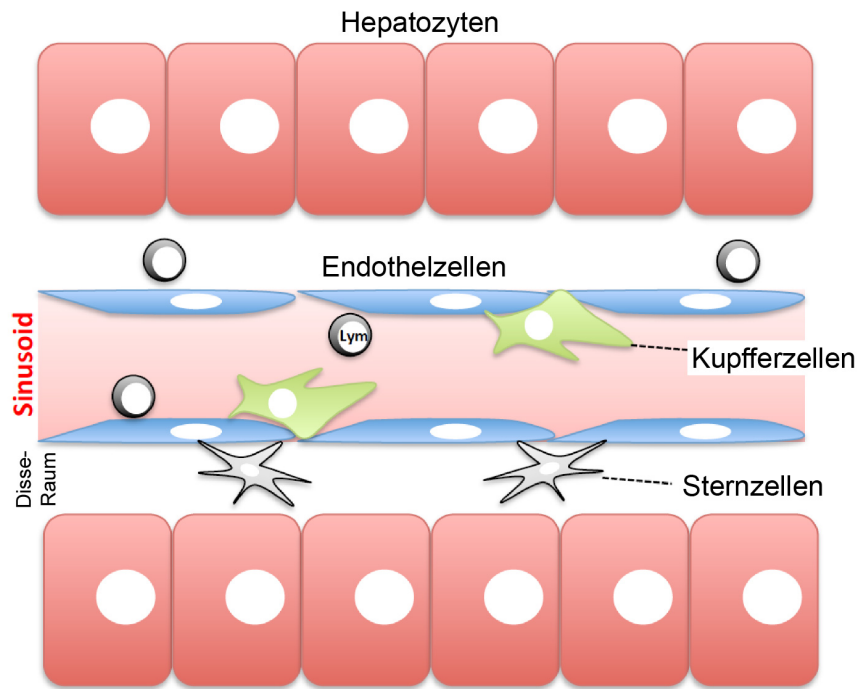


Abb. 1: Schematischer Aufbau der Leber.

Die hepatischen Sinusoide, die Blutgefäße der Leber, werden durch fenestrierte Endothelzellen ausgekleidet. In den Sinusoiden sind auch die Kupferzellen, die residenten Makrophagen der Leber, lokalisiert. Sternzellen, welche bei einer NAFLD extrazelluläre Matrix produzieren, liegen im Disse-Raum zwischen den Endothelzellen und den Hepatozyten. Hepatozyten sind die hepatischen parenchymalen Zellen der Leber. Immunzellen wie Lymphozyten (Lym) sind ebenfalls reichlich in der Leber vorzufinden. Abgeändert nach Tsutsui und Nishiguchi, 2014.

Sternzellen, welche gerade einmal 1 % der nicht-parenchymalen Leberzellen ausmachen, sind unter homöostatischen Bedingungen für die Speicherung von Vitamin A im Inneren ihrer Lipidtröpfchen verantwortlich. Wird die Leber geschädigt, proliferieren Sternzellen und produzieren viel überschüssige extrazelluläre Matrix, was zur Narbenbildung des Lebergewebes und somit zu einer Fibrose führt (Racanelli und Rehermann, 2006; Kmiec, 2001; Luelmann-Rauch, 2009; Zhan und An, 2010).

Kupferzellen sind leberspezifische residente Makrophagen und besitzen einen Anteil von 20 % an den nicht-parenchymalen Zellen (Racanelli und Rehermann, 2006; Kmiec, 2001). Sie sind zusammen mit anderen Immunzellen für die Unterdrückung und Beseitigung von exogenen immunreaktiven Stoffen und damit für die hepatische Immunregulation verantwortlich (Zhan und An, 2010). Kupferzellen können über Zytokine, Chemokine oder reaktive Sauerstoffradikale (engl.: *reactive oxygen species* (ROS)) mit Hepatozyten oder anderen Leberzellen interagieren und Immunzellen aus dem Blut rekrutieren. Mehrere Studien zeigen, dass Kupferzellen eine entscheidende Rolle in der Pathogenese von NAFLD spielen (Baffy, 2009).

1.2 Die nichtalkoholische Fettlebererkrankung

Die nichtalkoholische Fettlebererkrankung (engl.: *non alcoholic fatty liver disease* (NAFLD)) ist die meist verbreiteste Lebererkrankung in allen Industrieländern und ihre Prävalenz steigt proportional mit der aktuellen Übergewicht-Epidemie (Dowman, Tomlinson und Newsome, 2010; Clark, Brancati und Diehl, 2002). Während die Prävalenz in der allgemeinen Bevölkerung derzeit bei etwa 20-30 % liegt, sind Individuen mit Obesitas bis zu 90 % von der Krankheit betroffen (Dowman, Tomlinson und Newsome 2010; Clark, Brancati und Diehl, 2002). Aus diesem Grund wird NAFLD auch als hepatische Manifestation des metabolischen Syndroms beschrieben (Dowman, Tomlinson und Newsome, 2010). Das metabolische Syndrom besteht aus einer Reihe klinischer Auffälligkeiten wie Insulinresistenz, Übergewicht, Bluthochdruck sowie Dyslipidämie und ist mit einer erheblichen kardiovaskulären Morbidität und Mortalität verbunden (Bonora und Targher, 2012; Dowman, Tomlinson und Newsome, 2010).

NAFLD umfasst ein breites Spektrum unterschiedlicher pathologischer Stufen (Anstee und Day, 2013) und reicht von einer hepatozellulären Steatose über eine nichtalkoholische Steatohepatitis (engl.: *non alcoholic steatohepatitis* (NASH)) mit Fibrose bis hin zu einer irreversiblen Zirrhose und einem hepatozellulären Karzinom (Abb. 2).

Das „Zwei-Stufen-Modell“ war das früheste etablierte Modell, um die Pathogenese der NAFLD zu beschreiben (Day und James, 1998). In der ersten Stufe kommt es aufgrund des großen Überschusses an FFS in der Zirkulation zu einer unnatürlichen TAG-Ansammlung und damit zu einer Steatose (Leberverfettung) in der Leber. Diese Stufe der Krankheit wird als relativ gutartige Krankheitsform aufgefasst. Allerdings erhöht diese die Sensibilität der Leber für weitere Schäden (Day, 2005).

Bei der zweiten Stufe – der NASH – kommt es neben der Steatose zu einer Entzündung durch eine vermehrte Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen und ROS, die auch zu einer Narbenbildung (Fibrose) führen kann (Schweitzer, 2014). Die zweite Stufe ist schwerwiegender und im Gegensatz zur Steatose klinisch bedeutsam (Schweitzer, 2014). Die Prävalenz für die Entwicklung einer NASH ist geringer und liegt in der allgemeinen Bevölkerung bei 2-3 %, bei Personen mit Obesitas bei 19 % (Neuschwander-Tetri et al., 2003; Clark, Brancati und Diehl, 2002). NASH kann sich zu einer Zirrhose oder einem hepatozellulären Karzinom weiterentwickeln, das letzte Stadium der Krankheit, bei der viele Leberzellen ihre ursprüngliche Funktion nicht mehr ausüben können oder gar absterben (Cohen, Horton und Hobbs, 2011).

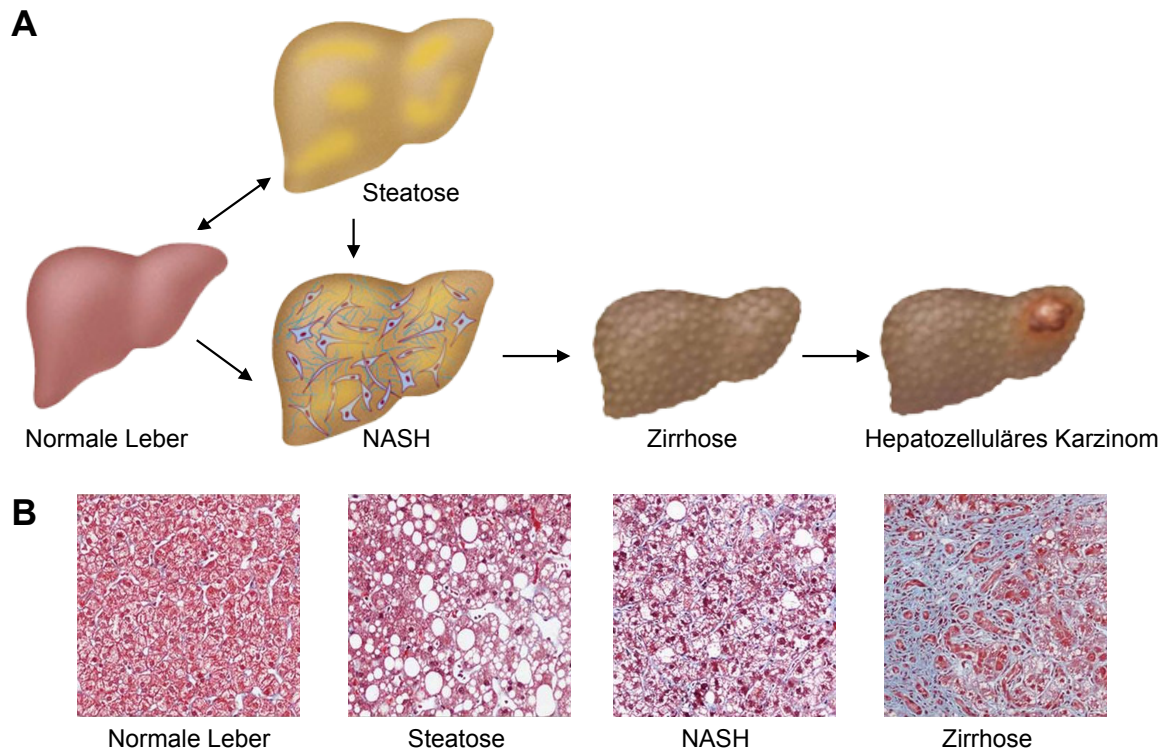


Abb. 2: Krankheitsspektrum der NAFLD.

A) Eine vermehrte Akkumulation von Lipidtröpfchen in der Leber führt zu einer Steatose. Eine Steatose mit Entzündung, Zelltod und Fibrose (Narbenbildung) wird als NASH bezeichnet. NASH kann sich zu einer Zirrhose und letztendlich zu einem hepatozellulären Karzinom weiterentwickeln.

B) Histologische Schnitte einer normalen Leber, einer Leber mit Steatose, NASH oder Zirrhose. Kollagenfasern wurden in blau mithilfe einer Masson-Trichrom-Färbung angefärbt. Abgeändert nach Cohen, Horton und Hobbs, 2011.

In den letzten Jahren wurden Modifikationen dieses Zwei-Stufen-Modells beschrieben. Es konnte nachgewiesen werden, dass eine Entzündung auch parallel oder bereits vor dem Auftreten einer Steatose entstehen kann – ein Resultat, welches dem lang postulierten Zwei-Stufen-Modell widerspricht (Tilg und Moschen, 2010). Neueste Studien zeigen, dass FFS direkt eine Leberschädigung provozieren können, indem sie einerseits den oxidativen Stress erhöhen und andererseits inflammatorische Signalwege aktivieren (Feldstein et al., 2004). Seit Neuestem steht auch die Milz im Verdacht, beim Auftreten einer NAFLD eine Rolle zu spielen, da in NAFLD-Patienten eine vergrößerte Milz nachgewiesen wurde (Tarantino, Scalera und Finelli, 2013).

Während Übergewicht und eine Steatose durch eine Veränderung der Lebensumstände (Ernährung, Bewegung) wieder behoben werden kann, wird das Organ ab der Ausbildung einer Fibrose irreversibel geschädigt. Bisher gibt es keine bekannte pharmakologische Behandlung für NASH, und auch die Therapiemöglichkeiten für das hepatozelluläre Karzinom sind beschränkt (Wolf et al., 2014). Eine Lebertransplantation stellt hier meist die einzige Option dar (Dowman, Tomlinson und Newsome, 2010). Um die Krankheit in ihrem

reversiblen Anfangsstadium rechtzeitig aufhalten zu können, ist es wichtig, die zellulären Prozesse, welche dem Auftreten einer Steatose, Fibrose oder eines hepatozellulären Karzinoms zu Grunde liegen, auf molekularem Niveau besser zu verstehen. Im Folgenden sollen die verschiedenen Mechanismen, welche zu einer Leberverfettung führen, näher erläutert werden.

1.3 Die Rolle einer gestörten Lipidhomöostase auf die Entstehung einer Steatose

Eine Steatose entsteht aufgrund eines Ungleichgewichts im Lipidstoffwechsel durch ein länger anhaltendes Überangebot an Lipiden. Hierdurch können diese nicht mehr als Energiequelle verwendet werden und müssen daher als TAG in Lipidtröpfchen gespeichert werden (Cohen, Horton und Hobbs, 2011).

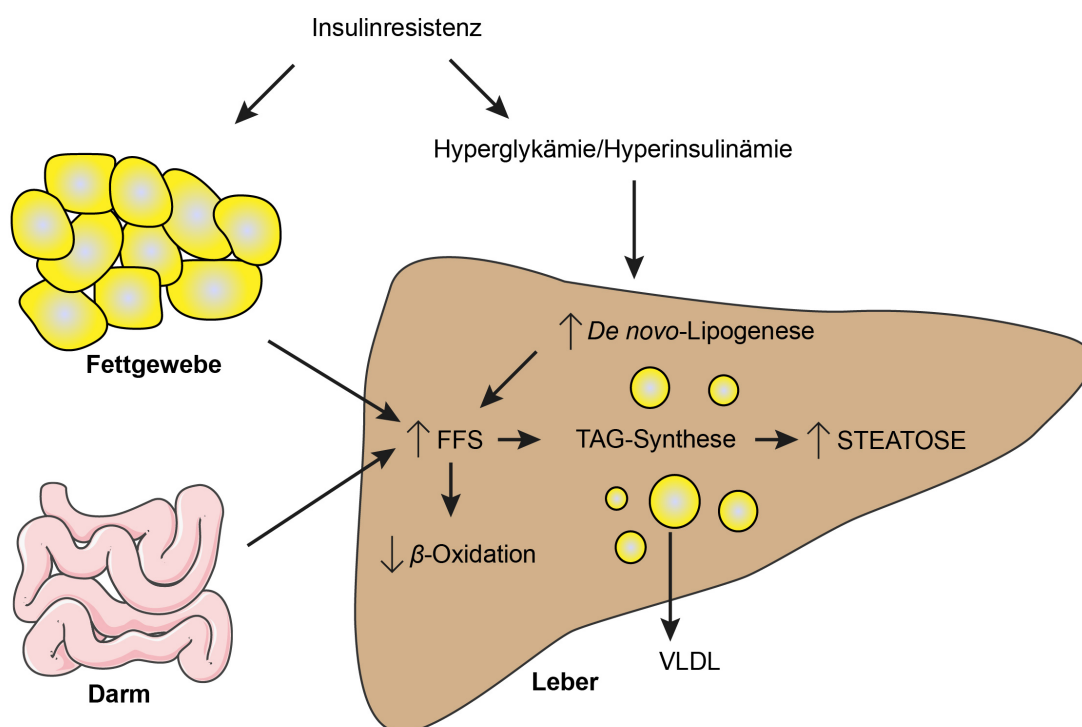


Abb. 3: Metabolische Veränderungen einer hepatischen Steatose.

Fettsäurequellen tragen zu der Entstehung einer Fettleber bei. Durch eine Insulinresistenz wird die Lipolyse im Fettgewebe nicht mehr genügend inhibiert und es werden vermehrt freie Fettsäuren (FFS) vom Fettgewebe freigesetzt, die zur Leber gelangen. Die Kombination gesteigerter Glukose- (Hyperglykämie) und Insulinkonzentrationen (Hyperinsulinämie) im Blut erhöhen die hepatische *de novo*-Fettsäuresynthese (Lipogenese) und mindern die hepatische β -Oxidation. Nach der Veresterung der Fettsäuren zu TAG können diese entweder als "very-low density Lipoproteine" (VLDL) ins Blut abgegeben und im Fettgewebe erneut gespeichert werden oder in der Leber akkumulieren und so zur Entwicklung einer Steatose beitragen. Abgeändert von Dowman, Tomlinson und Newsome, 2010; Postic und Girard, 2008. Abbildung des Darms von <http://www.servier.com/slidekit/>.

Der TAG-Gehalt in Hepatozyten wird durch die Balance zwischen hepatischer Fettsäureaufnahme, Fettsäuresynthese, Veresterung zu TAG, sowie der hepatischen Fettsäureoxidation und des TAG-Exports bestimmt (Nguyen et al., 2008; Abb. 3). FFS aus verschiedenen Quellen können dabei zur Entwicklung einer Steatose beitragen. Sie können aus der Lipolyse (Hydrolyse FFS und Glycerol von TAG) im Fettgewebe, der Nahrung oder der *de novo*-Lipogenese stammen. Eine Studie mit NAFLD-Patienten konnte zeigen, dass 60 % der hepatisch gespeicherten Lipide aus dem Fettgewebe, 25 % aus der *de novo*-Lipogenese und 15 % aus Nahrungslipiden kommen (Donnelly et al., 2005).

Eine hepatische Lipidakkumulierung, wie bei der Krankheit NAFLD üblich, kann daher als Resultat einer gestiegenen FFS-Zufuhr, einer erhöhten Fettsäuresynthese, eines verminderten Fettsäureexports und/oder einer gesunkenen Fettsäureoxidation auftreten (Dowman, Tomlinson und Newsome, 2010; Abb. 3).

Die verschiedenen Schritte des hepatischen Fettsäurestoffwechsels werden zudem durch das Zusammenspiel von Insulin und Glukose bestimmt. Dies unterstreicht die enge Verbindung zwischen dem Fett- und Glukosestoffwechsel (Bechmann et al., 2012).

1.3.1 Fettsäuren aus dem Fettgewebe

Adipozyten im Fettgewebe sind für eine langfristige Lipidspeicherung bei einem Überschuss an Fettsäuren verantwortlich indem sie Fettsäuren mit Glycerol verestern und hierdurch TAG bilden (Yu und Ginsberg, 2005). Diese gespeicherten Fettsäuren können sie bei Bedarf, z.B. bei mehrstündigem Fasten, durch Lipolyse wieder ins Blut freisetzen und so andere periphere Organe mit FFS als Energiequelle versorgen. Bei einem langfristigen Energieüberschuss vergrößern sich die Fettzellen (Hypertrophie) und damit das entsprechende Fettdepot des Organismus (Yu und Ginsberg, 2005). Wird ein bestimmter Schwellenwert erreicht, kommt es zu intrazellulären Stressreaktionen wie einer vermehrten Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen (engl.: *reactive oxygen species* (ROS)), welche zu einer Insulinresistenz der Adipozyten führen können (Tiganis, 2011).

Insulinresistente Adipozyten können die Lipolyse nicht mehr effektiv unterdrücken, sodass es zur vermehrten Freisetzung von Fettsäuren in die Zirkulation kommt. Erhöhte FFS-Konzentrationen im Blut sind toxisch für Zellen und stehen im Verdacht, Insulinresistenzen, Hyperlipidämien, Entzündungsprozesse und die Entwicklung einer Steatose zu fördern (Anderson und Borlak, 2008). Zudem begünstigt eine chronisch erhöhte Konzentration an FFS im Blut die Aufnahme und Speicherung der Fette in Geweben, welche normalerweise nicht auf die Fettsäurespeicherung spezialisiert sind (Anderson und Borlak, 2008).

1.3.2 Fettsäuren aus der Nahrung

Lipide aus der Nahrung werden über den exogenen Lipidstoffwechsel aufgenommen (Cox, 2008). Nachdem Lipasen in Magen und Darm Fettsäuren unterschiedlicher Länge von TAG der aufgenommenen Nahrung abgespalten haben, erfolgt die Resorption der freigesetzten Fettsäuren, des Glycerins sowie der Mono- und Diglyceride durch den Dünndarm (Cox, 2008). Während kurz- und mittelkettige Fettsäuren direkt über die Pfortader zur Leber gelangen, werden aus längererkettigen Fettsäuren und Glycerin wieder TAG gebildet, die zusammen mit Cholesterol in Chylomikronen aufgenommen werden (Klinke, 2009). Chylomikrone gelangen zunächst über die Lymphe in die Zirkulation. Erreichen die Chylomikronen das Fettgewebe oder die Muskulatur, werden Fettsäuren durch Lipoproteinlipasen abgespalten und von den Organen zur Gewinnung oder Speicherung von Energie absorbiert. Anschließend werden die entstandenen cholesterolreichen Chylomikronen-*Remnants* von Hepatozyten aufgenommen. Der Verzehr an zucker- und fettreicher Nahrung wurde in vielen Mausmodellen bereits mit der Entwicklung einer NAFLD in Verbindung gebracht (Nakamura und Terauchi, 2013). Insbesondere die Fütterung einer Hochfettdiät (HFD) führt in Mäusen neben der Einlagerung ins Fettgewebe zu einer Lipideinlagerung in der Leber (Anstee und Goldin, 2006). Auch in Menschen wurden direkte Zusammenhänge zwischen dem Lipidgehalt in der Nahrung und der Lipideinlagerung in der Leber bei gleicher Kalorienzufuhr entdeckt (Westerbacka et al., 2005). Dabei scheint nicht nur die Menge, sondern auch die Zusammensetzung der lipidreichen Nahrung eine wichtige Rolle zu spielen. So konnte in einem HFD-Mausmodell gezeigt werden, dass insbesondere cholesterolreiche Nahrung die Entwicklung von NASH begünstigt (Wouters et al., 2008).

1.3.3 Fettsäuren aus der *de novo*-Lipogenese

Wird Glukose nicht direkt energetisch genutzt, kann sie nur zum geringen Teil gespeichert werden. Die Leber kann neben den Muskeln überschüssige Kohlenhydrate in Glykogen, der speicherbaren Form von Glukose, umwandeln (Klinke, 2009). Ein weiterer Überschuss an Glukose, wie beispielsweise bei einer durch Insulinresistenz hervorgerufenen Hyperglykämie, wird zur Produktion neuer Lipide durch die *de novo*-Lipogenese verwendet (Schweitzer, 2014). Auch eine Hyperinsulinämie kann zu einer Erhöhung der hepatischen *de novo*-Lipogenese führen, wodurch eine weitere hepatische Lipidakkumulation begünstigt wird. Sowohl humane Studien als auch Tierstudien fanden heraus, dass die *de novo*-Lipogenese bei Übergewicht erhöht ist und so zur NAFLD und vermutlich zur Insulinresistenz beiträgt (Schweitzer, 2014).

1.3.4 VLDL-Export und β -Oxidation

Die Leber sekretiert TAG in Form von VLDL-Partikeln in die Zirkulation. Dafür wird das hydrophobe TAG durch das mikrosomale Transferprotein (MTP) in das Apolipoprotein B verpackt. In einer Humanstudie konnte gezeigt werden, dass die Synthese von Apolipoprotein B in NASH-Patienten verringert ist (Charlton et al., 2002). Zudem wurden genetische Veränderungen im Gen, welches für MTP kodiert, in NASH-Patienten gefunden, welche zu einer geringen MTP-Transkription, einem verminderten MTP-Export sowie einer erhöhten hepatischen TAG-Ablagerung führen (Namikawa et al., 2004).

Die β -Oxidation wird einerseits zur Energiegewinnung genutzt und ist andererseits im intermediären Metabolismus der Leber wichtig, da Acetyl-CoA als Produkt der β -Oxidation für die Synthese von Ketonkörpern verwendet wird. Diese können wiederum als alternative Energiequellen für extrahepatische Organe wie dem Gehirn genutzt werden, wenn die Glukosekonzentration niedrig ist (Wei et al., 2008). Durch eine Hyperinsulinämie, wie bei dem Vorhandensein einer Obesitas üblich, wird die β -Oxidation inhibiert, und damit die Entstehung einer NAFLD begünstigt (Schweitzer, 2014).

1.3.5 TAG-Biosynthese und -Speicherung

TAG und Glycerophospholipide werden über den Glycerophospholipidweg synthetisiert. Dabei wird Glycerol-3-Phosphat aus der Glykolyse durch eine schrittweise Anlagerung von Fettsäuregruppen acyliert, wobei jede Acylierung durch unterschiedliche Enzyme ausgeführt wird (Takeuchi und Reue, 2009; Abb. 4, links). Im ersten Schritt katalysieren Glycerol-3-Phosphat-Acyltransferasen (GPAT) die Acylierung von Glycerol-3-Phosphat zu Lysophosphatidsäure (LPA). Da die GPATs eine niedrige spezifische Aktivität aufweisen, ist die Bildung von LPA der geschwindigkeitsbestimmende Schritt im Glycerophospholipidweg. In Säugetieren wurden vier Isoformen von GPATs identifiziert (GPAT1, GPAT2, GPAT3, GPAT4). Alle GPATs sind integrale Membranproteine, die sich in ihrer Lokalisierung unterscheiden. Während GPAT1 und GPAT2 mitochondriale Proteine sind, kommen GPAT3 und GPAT4 im endoplasmatischen Retikulum (ER) vor (Wendel et al., 2009). GPAT1 und GPAT4 scheinen hauptsächlich für die hepatische Glycerolipidsynthese verantwortlich zu sein (Neschen et al., 2005; Nagle et al., 2008). GPAT3 wird hingegen nur schwach in der Leber exprimiert und GPAT2 ist ebenfalls kaum in diesem Prozess involviert (Schweitzer, 2014).

Im zweiten Schritt des Stoffwechselweges wird eine weitere Fettsäure durch Einsatz der im ER lokalisierten Familie der 1-Acylglycerol-3-Phosphat Acyltransferasen (AGPAT) an LPA übertragen, wodurch Phosphatidsäure (PA) gebildet wird (Takeuchi und Reue, 2008). Die

AGPAT Familie besteht aus zehn Isoformen, von denen viele allerdings noch nicht ausreichend charakterisiert wurden (Schweitzer, 2014).

PA kann entweder zu Phospholipiden umgewandelt werden (Loeffler, 2007) oder mithilfe der Phosphatidsäuren-Phosphohydrolasen (PAPs) zu Diacylglycerol (DAG) dephosphoryliert werden.

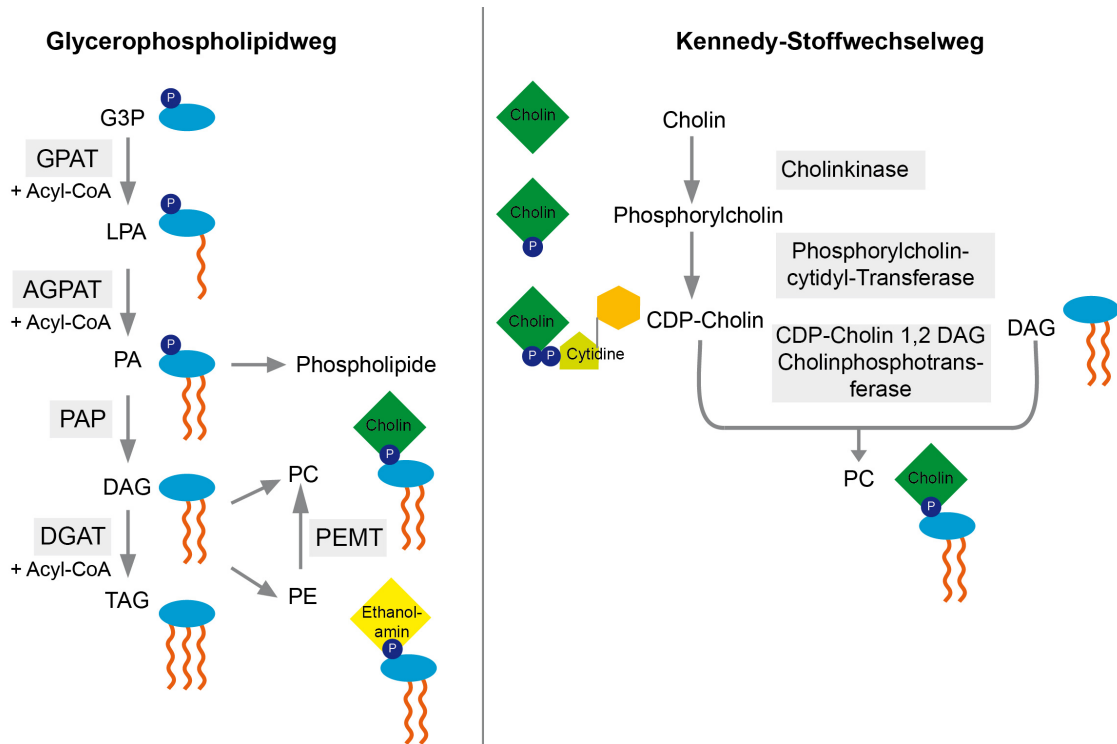


Abb. 4 : Schematischer Überblick des Glycerophospholipidweges und Kennedy-Stoffwechselweges.

Links: Glycerophospholipidweg. Glycerol-3-Phosphat (G3P) wird in 2 Schritten zu PA acyliert. Die Reaktionen werden durch GPAT und AGPAT durchgeführt. PA wird für die Phospholipidsynthese verwendet oder durch die PAP zu DAG dephosphoryliert. DAG wird wiederum durch die DGAT zu TAG acyliert oder wird im Kennedy-Stoffwechselweg weiter zu Phospholipiden umgebaut. PE kann in der Leber durch die PEMT in PC umgewandelt werden.

Rechts: Kennedy-Stoffwechselweg am Beispiel von PC. Die PC-Synthese erfordert drei Schritte:

1.: Cholin wird durch die Cholin kinase zu Phosphorylcholin aktiviert. 2.: Phosphorylcholin wird durch die Phosphorylcholin-cytidyl-Transferase zu CDP-Cholin umgewandelt. 3.: Die CDP-Cholin 1,2 DAG Cholinphosphotransferase katalysiert die Reaktion von DAG und CDP-Cholin zu PC. Die Abbildungen sind abgeändert nach Yen et al., 2008; Loeffler, 2007; Schweitzer, 2014.

PAPs, auch bekannt als Lipine, mit drei Isoformen (Lipin 1, 2 und 3), sind normalerweise zytosolische Proteine, welche aber auch zum ER wandern können (Takeuchi und Reue, 2009; Ren et al., 2010). Speziell Lipin 1 und 2 scheinen bei der Ausbildung einer NAFLD beteiligt zu sein (Chen et al., 2008; Ryu et al., 2011). Obwohl die Dephosphorylierung von PA der Hauptsyntheseweg zur Bildung von DAG ist, gibt es auch alternative Wege. So kann auch Monoacylglycerol (MAG) durch die Monoacylglycerol-Acyltransferasen (MGAT), welche am ER lokalisiert sind, acyliert werden, um DAG zu bilden (Stone et al., 2009) (nicht in Abb.

4 gezeigt). In murinen Obesitasmodellen sowie in Humanstudien mit NAFLD-Patienten war die Aktivität sowie Expression der MGAT Enzyme erhöht (Hall et al., 2012).

DAG kann über den Kennedy-Stoffwechselweg in die Phospholipide Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylethanolamin (PE) oder durch eine weitere Acylierung zu TAG umgewandelt werden (Loeffler, 2007).

Die PC- und PE-Synthese im Kennedy-Stoffwechselweg verläuft analog und unterscheidet sich ausschließlich durch den Einsatz der unterschiedlichen Kopfgruppen Cholin oder Ethanolamin (Abb. 4, rechts). Im Fall von PC wird Cholin durch die Cholin kinase phosphoryliert um Phosphorylcholin zu bilden. Aus Phosphorylcholin und Cytidintriphosphat entsteht durch Einsatz der Phosphorylcholincytidyl-Transferase und Abspaltung von Pyrophosphat Cytidindiphosphat(CDP)-Cholin. Dieses wird durch die CDP-Cholin-1,2 DAG Cholinphosphotransferase auf DAG übertragen, wodurch PC und als Beiprodukt Cytidinmonophosphat gebildet werden. In der Leber kann PC auch durch die Methylierung von PE über die PE-Methyltransferase (PEMT) gebildet werden (Abb. 4, links).

Die Acylierung von DAG zu TAG wird durch die DAG-Acyltransferase (DGAT) Enzyme katalysiert (Loeffler, 2007). Es gibt zwei DGAT-Isoformen in Säugetieren, DGAT1 und DGAT2 (Yen et al., 2008). DGAT1 ist ein ER-residentes Protein (Wurie, Buckett und Zammit, 2011), während DGAT2 im ER und auf den Lipidtröpfchen gefunden wird (Kuerschner, Moessinger und Thiele, 2008). DGAT1-*Knockout*-Mäuse, bei denen DGAT1 leberspezifisch ausgeschaltet ist, sind gegen eine durch HFD verursachte hepatische Lipidakkumulierung geschützt und eine Runterregulierung (engl.: *Knockdown*) von DGAT2 steigert die Insulinsensitivität und verringert die Ausbildung einer Steatose (Choi et al., 2007).

Das entstandene TAG wird entweder aus der Leber über VLDL-Partikel exportiert, um als TAG im Fettgewebe gespeichert zu werden oder kann in Lipidtröpfchen in den Hepatozyten gespeichert werden. Lipidtröpfchen setzen sich aus einem TAG- oder Cholesterinester (CE)-reichen Kern zusammen, welcher durch eine einzelne Schicht aus Phospholipiden von dem wässrigen Zytosol getrennt wird. Während Lipidtröpfchen früher lediglich als Reservoir für die Speicherung von Neutrallipiden, also von TAG und CE, gesehen wurden, sind sie heute als Organellen anerkannt, welche wichtige Rollen in der Regulation der Lipidspeicherung, dem Transport und der Lipolyse einnehmen (Schweitzer, 2014; Beller et al., 2010).

Die Menge an Lipidtröpfchen wird durch das Gleichgewicht an Neutrallipidspeicherung und Abbau bestimmt. Der Abbau von TAG, d.h. die Hydrolyse von TAG zu DAG, wird im Fettgewebe hauptsächlich von der Lipase Adipozyten-Triglycerid-Lipase (ATGL) katalysiert (Zechner et al., 2009).

1.4 Entzündung des Fettgewebes und der Leber bei Übergewicht

Bei Übergewicht wird nicht nur der Lipidmetabolismus verändert, sondern es kommt auch zu einer Entzündungsreaktion im Fettgewebe und in der Leber.

1.4.1 Entzündung im Fettgewebe

Wird im Fettgewebe die Speicherkapazität für Neutrallipide überschritten, entsteht ER-Stress, wodurch proinflammatorische Zytokine wie Tumornekrosefaktor (TNF) oder Interleukin-6 (IL-6) und Chemokine produziert werden (Nishimura, Manabe und Nagai, 2009; Greenberg und Obin, 2006). Zusätzlich migrieren zu den auch im gesunden Fettgewebe schon vorhandenen Makrophagen noch weitere Makrophagen in das Fettgewebe und verändern sich zu einem proinflammatorischen Phänotyp (Nishimura, Manabe und Nagai, 2009). Dies führt zu der Ausbildung eines inflammatorischen Milieus, wodurch eine lokale Insulinresistenz stimuliert wird – ein Prozess, der auch als sterile Entzündung bezeichnet wird (Weisberg et al., 2003). Entzündetes Fettgewebe kann auch durch eine erhöhte Freisetzung von FFS aufgrund einer gestiegenen Lipolyse eine Entzündung in der Leber auslösen (Greenberg und Obin, 2006). So wurde bereits beschrieben, dass FFS Makrophagen aktivieren können, um TNF oder andere Zytokine wie IL-6 zu produzieren (Suganami et al., 2007).

1.4.2 Entzündung in der Leber aufgrund einer metabolischen Endotoxämie

Neben einer intrinsischen Entzündung des Fettgewebes ist die Erkenntnis, dass der Darm bei Übergewicht und NAFLD eine wichtige Rolle spielt, stetig gewachsen (Neves et al., 2013). Lipopolysaccharid (LPS), auch bekannt als Endotoxin, ist ein wichtiger Bestandteil der äußeren Zellwand von gramnegativen Bakterien, welche als Teil der Mikrobiota im Darm angesiedelt sind (Jack et al., 1997). Gelangt LPS in die Zirkulation, kann dies eine starke Immunantwort sowohl in Menschen als auch Tieren hervorrufen (Heumann und Roger, 2002). Mehrere Studien zeigen, dass der Verzehr von Fett und Zucker zu einem erhöhten Übergang von LPS aus dem Darm in die Blutzirkulation führt und dies mit der Entstehung einer Steatose zusammenhängt. So stieg die LPS-Konzentration im Blutplasma von Mäusen nach Fütterung einer HFD um das zwei- bis dreifache und erreicht damit einen Schwellenwert, welcher die sogenannte metabolische Endotoxämie definiert (Neves et al., 2013). Die

metabolische Endotoxämie wird daher von einigen Forschern auch als entscheidender Grund für das Auftreten einer schwachen Entzündung bei Übergewicht eingeordnet (Cani et al., 2007). Mäuse, die anstatt einer HFD-Fütterung chronisch eine geringe Dosis LPS injiziert bekamen, entwickelten einen HFD-Phänotyp mit Übergewicht, Steatose und hepatischer Insulinresistenz (Cani et al., 2007).

1.4.2.1 Verschiedene Quellen für erhöhte LPS-Konzentrationen

LPS wird normalerweise aufgrund seines lipophilen Charakters im Blut in Chylomikronen, welche während der Fettverdauung gebildet werden, transportiert und erreicht nach dem Transport durch den peripheren Blutkreislauf auf Chylomikronen-*Remnants* die Leber (Klinke, 2009). Der übermäßige Konsum von fettreichem Essen führt zu einer vermehrten Bildung von Chylomikronen, wodurch auch mehr LPS in die Zirkulation gelangt (Harris et al., 2012; Erridge et al., 2007). Am Mausmodell konnte gezeigt werden, dass der Anteil an LPS und Lipoproteinen im Blutplasma anstieg, wenn Mäusen Lipide per Schlundsonde verabreicht wurden (Ghoshal et al., 2009).

Unter physiologischen Bedingungen stellt das Darmepithel eine durchgehende Barriere dar, um den Eintritt von LPS in die Blutzirkulation zu vermeiden. Allerdings können verschiedene Faktoren diese schützende Funktion verändern (Cani et al., 2008). Übermäßiger Konsum von fettreichem Essen ist mit strukturellen Veränderungen der Darmwand und einer erhöhten Darmpermeabilität (engl.: *leaky gut*) verbunden, wodurch ein erhöhter parazellulärer Transport von LPS stattfindet und die LPS-Konzentration in der Zirkulation ansteigt (Harris et al., 2012; Cani et al., 2007). In Studien mit übergewichtigen Mäusen wurde eine Korrelation zwischen den gemessenen erhöhten Konzentrationen von LPS in der Pfortader, inflammatorischen Zytokinen im Blut und einer gesteigerten Darmpermeabilität der Tiere nachgewiesen (Brun et al., 2007). Diese Daten werden von früheren Studien untermauert, welche zeigen konnten, dass die Integrität der Darmwand durch hohe Konzentrationen an Fettsäuren gestört wurde (Levels et al., 2001; Velasquez et al., 1993). Auch bei Patienten mit NAFLD wurde eine erhöhte Darmpermeabilität festgestellt (Miele et al., 2009).

Zum anderen bewirkt fett- und kohlenhydrathaltiges Essen eine Veränderung der Besiedelung mit Darmbakterien, der sogenannten Mikrobiota (Miura und Ohnishi, 2014). Dabei wurde gefunden, dass eine fett- und kohlenhydratreiche Ernährung den Anteil an gramnegativen Bakterien in der Mikrobiota steigerte und damit eine Erhöhung der verfügbaren LPS im Darm bewirkte. Sowohl in Tierstudien als auch in Patienten mit dem metabolischen Syndrom und NASH konnte eine Veränderung in der Mikrobiota nachgewiesen werden (Turnbaugh et al., 2008; Mouzaki et al., 2013; Harte et al., 2010). Zusätzlich zur veränderten Mikrobiota wiesen NAFLD-Patienten auch erhöhte LPS-Konzentrationen im

Blut auf (Harte et al., 2010). So korrelierte der Schweregrad der Leberentzündung in NASH-Patienten mit der Konzentration an endogenen Antikörpern gegen LPS im Blut (Verdam et al., 2011).

1.4.2.2 Aktivierung der Kupfferzellen durch LPS

Wenn erhöhte LPS-Konzentrationen bei metabolischer Endotoxämie die Leber erreichen, wird LPS über den Toll-ähnlichen Rezeptor (engl.: *toll-like receptor* (TLR)) 4 auf der Membran von Kupfferzellen erkannt (Baffy, 2009; Kolios, Valatas und Kouroumalis, 2006). Die wichtige Rolle der TLR4-abhängigen Aktivierung von Kupfferzellen in NAFLD wurde bereits in mehreren Studien belegt. So entwickelten TLR4-defiziente Mäuse nach einer HFD keine Entzündung oder Insulinresistenz (Jia et al., 2014). Zudem verringerte ein *in vivo* Abbau von Kupfferzellen das Auftreten einer Steatose sowie eines Leberschadens in Mäusen (Tosello-Tramont et al., 2012).

TLR sind hochstrukturkonservierte Mustererkennungsrezeptoren, die als Pathogensensoren fungieren und eine kritische Rolle im angeborenen Immunsystem spielen (Meli, Mattace Raso und Calignano, 2014). Die Bindung von LPS an TLR4 sorgt für die Translokation des Transkriptionsfaktors „*Nuclear Factor kappa B* (NF- κ B)“ in den Zellkern, wo dieser die vermehrte Expression von Zytokinen (TNF, IL-1 β , IL-6 oder Transformierender Wachstumsfaktor β (TGF β)) und Chemokinen (Monozyten-chemotaktisches Protein 1 (MCP-1)) stimuliert (Meli, Mattace Raso und Calignano, 2014, Abb. 5).

TNF stellt in Menschen und Tieren einen Schlüsselfaktor in der Entwicklung einer NAFLD und NASH dar (Braunersreuther et al., 2012). So zeigten Mäuse, die mit dem anti-TNF Medikament Thalidomid behandelt wurden, eine geringere hepatische Steatose sowie Insulinresistenz nach einer HFD (Pinto Lde et al., 2010). Eine erhöhte TNF-Expression konnte in NASH-Patienten sowohl in der Leber als auch im Fettgewebe nachgewiesen werden (Crespo et al., 2001). Zudem korrelierte der Grad der Leberfibrose in NASH-Patienten mit den TNF-Konzentrationen im Blut (Lesmana et al., 2009).

ROS verursachen eine Lipidperoxidation, wodurch Hepatozyten geschädigt werden und begünstigen zusammen mit TNF eine Insulinresistenz über die Phosphorylierung von Insulinrezeptorsubstrat 1 (Zhan und An, 2010; Makki, Froguel und Wolowczuk, 2013; Videla et al., 2006). IL-1 β unterdrückt die Expression und Aktivität des Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptors α , was eine verminderte Fettoxidation zur Folge hat (Stienstra et al., 2010).

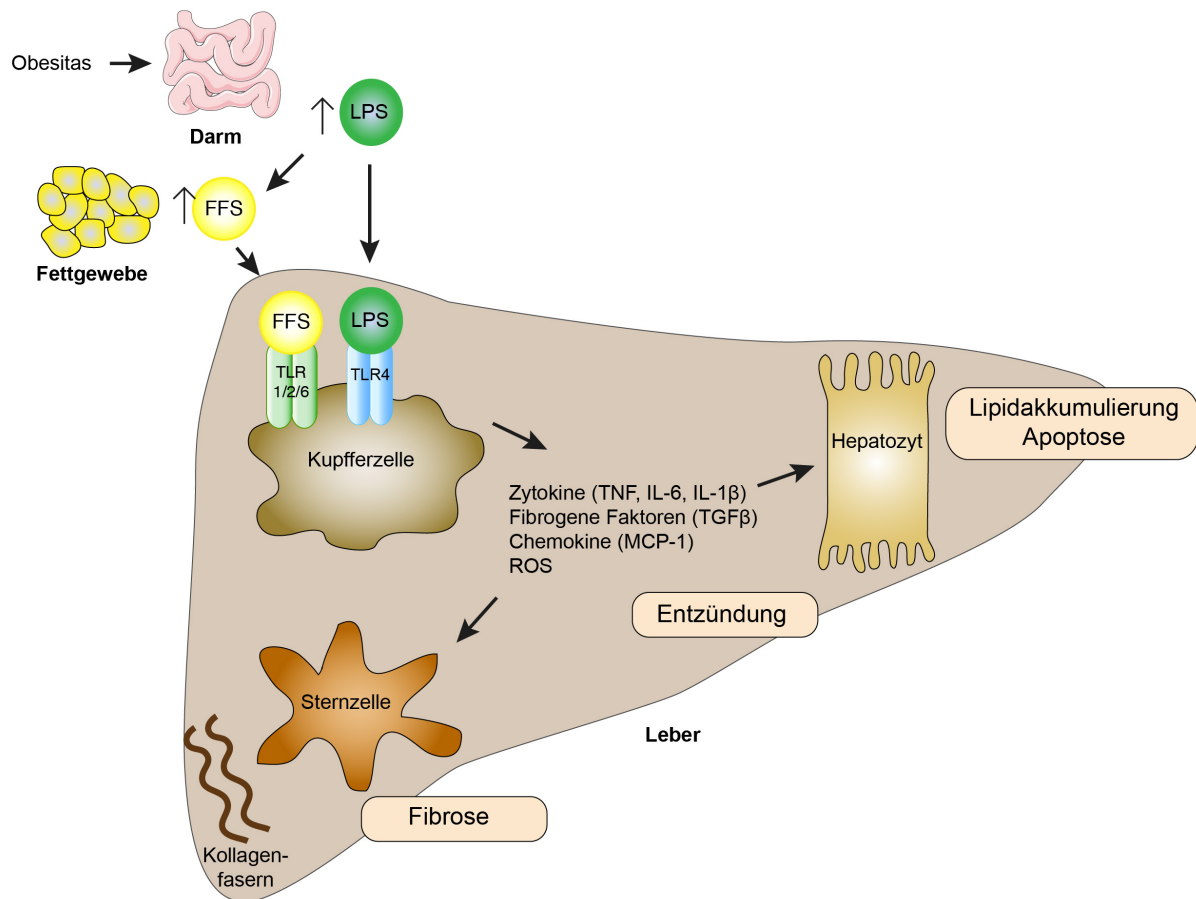


Abb. 5: Entwicklung einer Steatose in der Leber durch LPS und FFS.

Obesitas bewirkt eine Veränderung der Mikrobiota und erhöht die Permeabilität des Darms, wodurch mehr LPS in die Zirkulation gelangt. In der Leber bindet LPS an den TLR4 auf Kupferzellen und sorgt damit für eine erhöhte Ausschüttung von Zytokinen, fibrogenen Faktoren, Chemokinen und reaktiven ROS. Diese inflammatorische Reaktion kann auch durch Fettsäuren aus dem Fettgewebe durch die Bindung an den TLR1/2/6 ausgelöst werden. Dies führt zu einer Steigerung der Kollagenproduktion in Sternzellen, wodurch eine Fibrose stimuliert wird, und zu einer Erhöhung der Lipidakkumulation und Apoptose in Hepatozyten. Abgeändert nach Roh und Seki, 2013. Abbildung des Darms von: <http://www.servier.com/slidekit/>.

Erhöhte IL-6-Konzentrationen wurden in NAFLD- und NASH-Patienten gemessen und sind mit einer Insulinresistenz sowie der Induktion einer Apoptose in Hepatozyten verbunden (Braunersreuther et al., 2012). TGF β aktiviert Sternzellen, welche dadurch große Mengen an extrazellulärer Matrix produzieren und zur Ausbildung einer Fibrose führen (Luedde und Schwabe, 2011). Das Chemokin MCP-1 ist für die Rekrutierung weiterer inflammatorischer Zellen in die Leber zuständig, kann allerdings auch direkt zu einer hepatischen Lipidakkumulation und Insulinresistenz führen (Kassel et al., 2010).

Erhöhte LPS-Konzentrationen können über die Ausschüttung einiger Zytokine allgemein die Insulinsensitivität beeinträchtigen und dadurch die Lipolyse im Fettgewebe steigern, wodurch die FFS in der Zirkulation erhöht werden (Zu et al., 2009; Abb. 5). Freigesetzte FFS-Konzentrationen können wiederum auch direkt den NF- κ B-Signalweg stimulieren (Dowman,

Tomlinson und Newsome, 2010). Insbesondere für Palmitinsäure konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass es Kupferzellen aktiviert und damit eine NAFLD stimuliert (Shi et al., 2006).

1.5 Click-Markierung von zellulären Lipiden

Um in der Biochemie oder Molekularbiologie bestimmte Moleküle detektierbar und damit deren Lokalisierung und Metabolismus verfolgbar zu machen, werden sie mit speziellen Markierungen (engl.: *tags*) versehen. Die Markierung von Lipiden ist schwierig, da Lipide im Vergleich zu Proteinen sehr klein sind und nicht direkt genetisch kodiert werden. Hierdurch kann die bei Proteinen ebenfalls äußerst beliebte „*green fluorescent protein (GFP)*“-Technologie nicht angewendet werden (Southward und Surette, 2002). Es gibt allerdings verschiedene Methoden, um Lipide in der Zelle zu markieren: So werden zur Markierung fluoreszente Farbstoffe wie Boron-dipyrrromethen (BODIPY) oder Nitro-2-1,3-benzoxa-diazol-4-yl (NBD) eingesetzt (Maier, Oberle und Hoekstra, 2002; Sezgin und Schwille, 2011). Die gebundenen Fluorophore sind im Verhältnis zu den relativ kleinen Lipiden allerdings sehr groß und können so das Verhalten der Lipide verändern oder gar dominieren. Ebenso können radioaktive Isotope wie beispielsweise [^{14}C] eingesetzt werden, um den Einbau von Fettsäuren in Lipide zu verfolgen (Retterstol et al., 2000; Morton et al., 1982). Radioaktive Isotope haben den Vorteil, dass sie in jedes biologisch relevante Molekül eingebaut werden können ohne dabei das biochemische oder biophysikalische Verhalten des Moleküls zu verändern. Zudem weisen die radioaktiven Detektionsmethoden eine hohe Sensitivität auf. Die radioaktive Markierung birgt allerdings den Nachteil von hohen Kosten für eine spezielle Ausstattung, der Notwendigkeit von strikten Schutzmaßnahmen für den Experimentator und die Umwelt und ist allgemein mit einem sehr hohen organisatorischen Aufwand verbunden.

Ein weitere Methode für die Verfolgung von Lipiden ist die bioorthogonale Markierung („Click-Markierung“), welche auch im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt wurde. In dieser Methode werden kleine chemische Markierungsmarker eingesetzt, wodurch Lipide in ihrer Struktur oder ihren Eigenschaften nur wenig verändert werden. Die Click-Markierung hat im Vergleich zur Radioaktivität den Vorteil eine besonders schnelle, kostengünstige und sensitive Markierungsmethode zu sein, für welche keine speziellen Sicherheitsvorkehrungen benötigt werden.

Bei der Click-Chemie werden kleine chemisch funktionelle Gruppen eingesetzt, welche hochspezifisch mit anderen chemischen funktionellen Gruppen reagieren und damit detektierbar werden. Dabei ist wichtig, dass beide funktionellen Gruppen in biologischen Strukturen keine Reaktivität zeigen und stabil sind (Boyce und Bertozzi, 2011; Kolb, Finn, und Sharpless, 2001).

Eine Gruppe von Markierungsmarkern, die in der Click-Chemie eingesetzt werden, ist die Alkin-Gruppe ($-C\equiv C-H$) und die Azid-Gruppe ($-N_3$). Im Rahmen dieser Arbeit werden Alkin-Fettsäuren eingesetzt (Thiele et al., 2012), die mit der Azidogruppe des 3-Azido-Hydroxy-Coumarins in der sogenannten Kupfer(I)-katalysierten Azid-Alkin-Cycloaddition, auch oft Click-Reaktion genannt, reagieren können und so einen stabilen 1, 2, 3-Triazolyl-Ring bilden (Abb. 6).

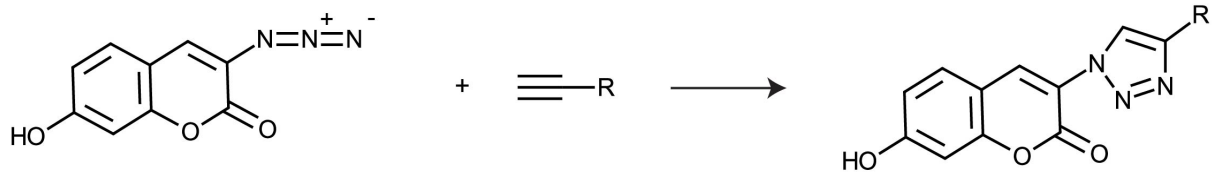


Abb. 6: Reaktionsschema der Click-Reaktion.

Die Azid-Gruppe des 3-Azido-7-Hydroxy-Coumarin reagiert in Anwesenheit von Kupfer(I)sulfat mit der Alkin-Gruppe des Lipids. Dabei wird ein kovalenter 1,2,3-Triazolyl-Ring zwischen den beiden Molekülen gebildet. Erst mit dem Ringschluss erhält der Farbstoff seine fluoreszenten Eigenschaften. Abgeändert aus Thiele et al., 2012.

Diese Reaktion stellt die Kupfer(I)-katalysierte Variante der klassischen Azid-Alkin-Cycloaddition von der Huisgen-Cycloaddition dar (Nwe und Brechbiel, 2009). Erst durch den Ringschluss wird das 3-Azido-Hydroxy-Coumarin fluoreszent, wodurch Hintergrundsignale bei einem Überschuss des Farbstoffes gering gehalten werden (Thiele et al., 2012). In dieser Arbeit wurden synthetisch hergestellte „clickbare“ Alkin-Lipide verwendet, um den Lipidmetabolismus zu untersuchen.

2 Zielsetzung

Obwohl in den letzten Jahren viel über die Pathogenese der Krankheit NAFLD herausgefunden wurde, sind einige Mechanismen – speziell im Bereich des Lipidmetabolismus und in der Interaktion der einzelnen Leberzelltypen untereinander sowie mit den Immunzellen – in der Entwicklung der NAFLD noch nicht vollständig geklärt. In dieser Doktorarbeit und im Rahmen des “Virtual Liver Network (VLN)” Projekts wurden durch Einsatz der Clickchemie-basierten Lipidanalyse und mittels mikroskopischer Färbungen und Zytokinmessungen folgende Fragestellungen behandelt:

- Welche Auswirkungen haben veränderte metabolische Bedingungen (unterschiedliche Sättigungsgrade der Fettsäuren, Fettsäurekonzentrationen oder der Insulin- und Glukosespiegel) auf den Lipidstoffwechsel in primären Hepatozyten?
- Welche individuelle Rolle besitzen Kupferzellen und Hepatozyten in der Entstehung einer Steatose und wie verläuft die Interaktion untereinander?
- Welchen Einfluss haben eine zehnwöchige HFD oder eine *in vivo* LPS-Stimulation auf die Entwicklung einer Steatose?

In einem weiteren Kooperationsprojekt mit Dr. Monika Wolf und Prof. Dr. Mathias Heikenwälder sollte der Einfluss von Splenozyten, welche immunologische Zellen in der Milz darstellen, auf die Entstehung einer NAFLD näher untersucht werden. Hier lautete die Fragestellung:

- Können Splenozyten die Lipidablagerung in der Leber beeinflussen und wenn ja, welche sekretorischen Faktoren spielen dabei eine Rolle?

3 Materialien

3.1 Material und Chemikalien

3.1.1 Geräte

Tab. 1: Auflistung der in dieser Arbeit eingesetzten Geräte.

Gerät	Herstellerfirma
BD Durchflusszytometer FACS Canto II	Becton-Dickinson AG, Franklin Lakes, USA
Binokular Eclipse TS100	Nikon Corp., Tokio, Japan
C1000 Touch Thermocycler	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Feinwaage	Mettler-Toledo LLC., Columbus, USA
Fluoreszenzmikroskop Axio Observer.Z1	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Glukometer (AccuCheck®)	Roche Diagnostics AG, Rotkreuz, Schweiz
Infinite M200	Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz
Magnetrührer C-MAG M57	IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
NanoDrop 2000	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Peristaltikpumpe PUMPdrive PD5001	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
pH-Meter CMG MS7	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland
Pipetten Eppendorf Research®	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Plattenlesegerät ELx800™	BioTek Instruments Inc., Winooski, USA
Reflotron® Plus Analyse-System	Roche Diagnostics AG, Rotkreuz, Schweiz
Safe-Loc Autoklav 2540 EL	Systeme GmbH, Wetzlar, Deutschland
Schaukelinkubator Duomax 1030	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Schwenkzentrifuge	Beckman Coulter, Brea, USA
Sterilwerkbank	BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland
Thermocycler	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Vakuumentrifuge Concentrator plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Vakuumpumpe	INTEGRA Biosciences AG, Fernwald, Deutschland
Vibratom VT 1200	Leica Camera AG, Wetzlar, Deutschland
Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc., Bohemia, USA
Waage	Kern und Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
Wasserbad	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Zeiss Axio Observer Z1 Epifluoreszenz Mikroskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Zellinkubator	BINDER GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge (5435, 5430R)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tab. 2: Zusammenstellung der verwendeten Verbrauchsmaterialien.

Produkt	Herstellerfirma
AccuCheck® Glukoseteststreifen	Roche Diagnostics AG, Rotkreuz, Schweiz
Adhäsive Verschlussfolie	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
DC-Entwicklungskammer	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
DC-Platten Silikagel 60 (20 × 20 cm)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Deckgläschen (ø 12 mm)	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Einwegkanüle (BD Microlance 3) (0,6 mm × 25 mm; 0,3 mm × 13 mm)	Becton-Dickinson AG, Franklin Lakes, USA
Einwegspritze Luer-Lock (1ml)	Becton-Dickinson AG, Franklin Lakes, USA
ELISA 96 Well-Mikrotiterplatte (Half Area Plate)	Corning®, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Glas-Pasteurpipette (230 mm)	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Glaskapillare	Hilgenberg GmbH, Malsberg, Deutschland
Glaspotter (5 ml)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
LS MACS Säule	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Neubauer Zählkammer	LaborOptik Ltd, Lancing, Großbritannien
Nylon Einwegzellsieb (10 µm, 100 µm)	Becton-Dickinson AG, Franklin Lakes, USA
Objektträger Super Frost® Green	Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
Pipettenspitze	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland

Pipettenspitze mit Sterilfilter	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Präparationsbesteck	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Quadro MACS™ Separator	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Reaktionsgefäß (1,5 ml/ 2 ml)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Rührfisch	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Safe-Lock Reaktionsgefäße (1,5 ml/ 2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Schmetterlingskanüle (0,3 mm × 13 mm)	Becton-Dickinson AG, Franklin Lakes, USA
Serologische Einwegpipette (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Spritzenvorsatzfilter (0,2 µm)	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Sterilfilter (500 ml, 0,2 µm)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Verschlussfolie Parafilm® M	Pechinery Plastic Packaging Inc., Chicago, USA
Vortexaufsetzer für 1,5 ml Gefäße	Scientific Industries Inc., Bohemia, USA
Zählkammer	Hycor BioMedical Inc., Indianapolis, Deutschland
Zellkulturplatte (24-Well, 6-Well)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturplatte (96-Well)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturschale (ø 10 cm)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturschale (ø 6 cm)	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Zellschaber (25 cm)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Becton-Dickinson AG, Franklin Lakes, USA

3.1.3 Reagenziensysteme

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Reagenziensätze, auch als *Kits* bezeichnet, eingesetzt. Die Zusammensetzung der entsprechenden Reagenzien kann in den Merkblättern der entsprechenden Hersteller nachgelesen werden.

ELISA für Zytokinmessung

Murine ELISA DuoSet *Kits* für
IL-1β, IL-10, IL-6 und TNF

R&D Systems Inc., Minneapolis, USA

ELISA für Proteohormonmessung

Murine ELISA DuoSet *Kit* für Leptin R&D Systems Inc., Minneapolis, USA

Ribonukleinsäure (RNA)-Isolierung

RNeasy Mini *Kit* Macherey-Nagel GmbH & Co. KG,
Düren, Deutschland

FFS-Bestimmung im Serum

Free Fatty Acid Quantification *Kit* Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA

Blutwertemessung im Serum

Reflotron Teststreifen Roche Diagnostics AG, Rotkreuz,
Schweiz

qPCR-Analyse

SYBR-Green Master Thermo Scientific Inc., Waltham, USA

3.1.4 Allgemeine Chemikalien und Lösungen

Die Chemikalien und Lösungen wurden entsprechend der Empfehlungen der Herstellerfirmen verwendet und gelagert. Das eingesetzte Reinstwasser wurde mit einem UV/UF-System (TKA X-CAD, Thermo Electron LED GmbH, Niederelbert) aufgereinigt und autoklaviert.

Tab. 3: Verwendete Chemikalien und Lösungen.

Produkt	Herstellerfirma
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
3-Azido-7-Hydroxy-Coumarin	Thiele et al., 2012
5-Eicosa(ethylenglycol)oxy-1-dodecyl-sorbitan (Tween 20)	Merck, Darmstadt, Deutschland
4',6-Diamin-2-phenylindol (DAPI)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
5-Eicosa(ethylenglycol)oxy-1-dodecyl-sorbitan (Tween 20)	Merck, Darmstadt, Deutschland
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Corp., Mannheim, Deutschland

Absolute SYBR Green Rox Mix	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Acetonitril	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Acrylamid 30 %	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Chem Solute®/ Th. Geyer GmbH & Co KG, Renningen, Deutschland
Chloroform	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
D-Glukose	Sigma-Aldrich Corp., Mannheim, Deutschland
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Dexamethason	Sigma-Aldrich Corp., Mannheim, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Sigma-Aldrich Corp., Mannheim, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Promega Corp., Madison, USA
Eisen(III)Nitrat	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ethylacetat	Chemlogistic, Düren, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Fluorescence Mounting Medium	DAKO/Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA
Fötale Kälber Serum (engl.: <i>fetal calf serum</i> (FCS))	Gibco®/Invitrogen AG, Carlsbad, USA, Katalognr.: 10270-106
Glukose	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Glutathion, reduziert	Sigma-Aldrich Corp., Mannheim, Deutschland
Hanks ausgeglichene Salzlösung (engl.: Hank's balanced salts (HBSS))	Sigma-Aldrich Corp., Mannheim, Deutschland, Katalognr.: H4891
Heparin-Natrium (4350 I.E.(Internationale Einheit)/ml)	Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland
Hexan	Sigma-Aldrich Corp., Mannheim, Deutschland
Insulin, humanes	Sigma-Aldrich Corp., Mannheim, Deutschland, Katalognr.: I9278
Kaliumchlorid	Grüssing GmbH, Filsum, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Sigma-Aldrich Corp., Mannheim, Deutschland
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

Kollagen Typ I vom Rattenschwanz	Sigma-Aldrich Corp., Mannheim, Deutschland
Kupfer(II)-sulfat	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Kupfer(II)-tetrafluoroborat	Sigma-Aldrich Corp., Mannheim, Deutschland
L-Glutamin	Sigma-Aldrich Corp., Mannheim, Deutschland
LD540	Spandl et al., 2009
LPS aus <i>E.coli</i> Serotyp 011-B4	Sigma-Aldrich Corp., Mannheim, Deutschland, Katalognr.: L4391
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Mangan(II)-chlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Sigma-Aldrich Corp., Mannheim, Deutschland
Methyllinölsäure	Sigma-Aldrich Corp., Mannheim, Deutschland
N,N-Diisopropylethylamin (Hünig-Base)	Sigma-Aldrich Corp., Mannheim, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Chem Solute [®] / Th. Geyer GmbH & Co KG, Renningen, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid	Fluka/ Sigma-Aldrich Corp., Mannheim, Deutschland
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich Corp., Mannheim, Deutschland
Oligo(dT) ₁₈ <i>Primer</i>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Penicillin/Streptomycin	Gibco [®] /Invitrogen AG, Karlsruhe, Deutschland
RiboLock RNase Inhibitor (40 I.E./µl)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Rinderserumalbumin, Fraktion V (engl.: bovine serum albumin (BSA))	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Rinderserumalbumin, H2, lipidfrei	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Salzsäure	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Schwefelsäure 25%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Streptavidin-HRP (engl.: <i>horseradish peroxidase</i>)	R&D Systems Inc., Minneapolis, Kanada
Tetrakis(Acetonitril)Kupfer(I)- tetrafluoroborat (Cu(I)TFB)	Sigma-Aldrich Corp., Mannheim, Deutschland, Katalognr.: 677892
Thermo 5x Reaktionspuffer für komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA)-Synthese	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Trypan Blau	Sigma-Aldrich Corp., Mannheim, Deutschland

3.1.5 Stammlösungen, Puffer und Medien

3.1.5.1 Stammlösungen und Puffer

Die pH-Werte der Stammlösungen und Puffer wurden mit 1 M Natriumhydroxid und 1 M Salzsäure eingestellt. Falls nicht gesondert vermerkt, wurden die Puffer mit Reinstwasser angesetzt. Je nach Bedarf wurden die Puffer autoklaviert oder steril filtriert.

Tab. 4: Eingesetzte Stammlösungen.

Stammlösung	Konzentration	Lagerung
3-Azido-7-Hydroxy-Coumarin	2 mg/ml in Ethanol	-80 °C
Alkin-Ölsäure und Alkin-Palmitinsäure	20 mM in 80 % Ethanol	-20 °C
CaCl ₂	2,5 M	RT
Cu(Kupfer)(I)TFB	10 mM in Acetonitril	-20 °C
DAPI	5 mg/ml	-20 °C
Dexamethason	1 mM	-20 °C
EDTA pH 8,0	0,5 M	RT
EGTA pH 7,4	100 mM	RT
Humanes Insulin pH 8,2	10 mg/ml in 25 mM HEPES	RT
Hünig-Base	4 % in Hexan	RT
Kollagenase NB46	50 mg/ml	-20 °C
LD540	1 mg/ml in Ethanol	-20 °C
LPS	1 mg/ml	-20 °C
TNF	20 µg/ml in PBS, 0,1 % BSA (w/v)	-20 °C
unmarkierte Ölsäure und Palmitinsäure	20 mM in 80 % Ethanol	-20 °C

3.1.5.2 Sonstige Puffer und Lösungen

Tab. 5: Verwendete Puffer und Lösungen.

Puffername	Konzentration	Lagerung
10 x Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	1,54 M NaCl 15 mM KH ₂ PO ₄ 27 mM Na ₂ HPO ₄	RT
1 x PBS	100 ml 10 x PBS 900 ml H ₂ O	RT
HBSS pH 7,4	Reinstwasser 1 x Packung HBSS-Pulver 0,35 g NaHCO ₃	4 °C
Prä-Perfusionslösung	HBSS 5 mM EGTA 4,34 I.E./ml Heparin	Immer frisch angesetzt
Kollagenase-Lösung	William's Medium E 0,125 mM CaCl ₂ 0,5 mg Kollagenase NB46	Immer frisch angesetzt
Waschpuffer (<i>Pulse-Chase</i> -Analyse)	1 % lipidfreies BSA (w/v) in PBS	Immer frisch angesetzt
MACS-Puffer	PBS 0,5 % (w/v) BSA 2 mM EDTA pH-Wert 7,2	4 °C
ACT-Lyse-Puffer	Reinstwasser 17 mM Tris 160 mM NH ₄ Cl pH-Wert 7,2	RT
3-Azido-7-Hydroxy-Coumarin-Markierungslösung ("Click-Mix")	10 µl 3-Azido-7-Hydroxy-Coumarin (2 mg/ml) 850 µl Ethanol 250 µl Cu(I)-TFB (10 mM in Acetonitril)	Immer frisch angesetzt
Blockierungspuffer (ELISA)	1 % BSA (w/v) in PBS	4 °C
Waschlösung (ELISA)	0,05 % Tween 20 (v/v) in PBS	RT

3.1.5.3 Medien

Als kommerzielles Medium für die Hepatozyten-Kultur (mit 11 mM Glukose) wurde William's Medium E (PANTM Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland, Katalognr.: P04-29510) verwendet. Für Studien mit unterschiedlichen Konzentrationen an Glukose wurde William's Medium E ohne Zusatz von Glukose benötigt. Da dieses Medium nicht kommerziell erhältlich ist, wurde es selbst hergestellt. Hierzu wurde die genaue Zusammensetzung gemäß Herstellerangaben strikt beachtet. Die verwendeten Aminosäuren und Vitamine wurden von der Firma AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

Für die Splenozyten-Kultur wurde ebenfalls kommerzielles Medium (RPMI 1640 von Gibco[®]/Life Technologies AG, Carlsbad, USA) eingesetzt. In Tab. 6 sind die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Medien wiedergegeben.

Tab. 6: Auflistung der verwendeten Medien.

Adhäsionsmedium	500 ml William's Medium E 10 % (v/v) FCS 2 mM L-Glutamin 100 I.E./ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 100 nM Dexamethason	4 °C
Splenozyten-Medium	500 ml RPMI 1640 10 % (v/v) FCS 2 mM L-Glutamin 100 I.E./ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin	4 °C
<i>Pulse</i> -Medium	50 ml Adhäsionsmedium 66 µM Alkin-Ölsäure 33 µM Alkin-Palmitinsäure 1 % (w/v) BSA, lipidfrei 100 nM Dexamethason	Immer frisch angesetzt
<i>Chase</i> -Medium	50 ml Adhäsionsmedium 66 µM Ölsäure 33 µM Palmitinsäure 1 % (w/v) BSA, lipidfrei 100 nM Dexamethason	Immer frisch angesetzt

3.1.6 Antibiotika

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Antibiotika in der Primärzellkultur eingesetzt:

Penicillin (10.000 I.E./ml)	Gibco®/Life Technologies AG, Carlsbad, USA
Streptomycin (10.000 µg/ml)	Gibco®/Life Technologies AG, Carlsbad, USA

3.1.7 Enzyme

Für die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme wurden vom Hersteller optimierte Reaktionspuffer zur Verfügung gestellt. In den Merkblättern der entsprechenden Hersteller kann deren genaue Zusammensetzung nachgelesen werden.

Tab. 7: Eingesetzte Enzyme.

Enzym	Hersteller
Kollagenase NB46	Serva Electrophoresis, Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA, Katalognr.: 17465
RevertAid Reverse Transkriptase	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA

3.1.8 Verwendete Fettsäuren

Für Fettsäureaufnahme-Experimente und *Pulse-Chase*-Analysen wurden die synthetischen Fettsäureanaloge Alkin-Ölsäure und Alkin-Palmitinsäure verwendet, die mit dem Azidomarkierten Farbstoff Coumarin in einer bioorthogonalen Reaktion reagieren können (siehe Kapitel 1.5 und Kapitel 4.3.3). Alle in dieser Arbeit eingesetzten Alkin-Fettsäuren sowie Alkin-Standards wurden nach den Protokollen in Thiele et al., 2012 synthetisiert. Die Struktur beider Alkin-Fettsäuren ist in Abb. 7 dargestellt.

Als unmarkierte Fettsäuren wurden Ölsäure und Palmitinsäure von Sigma-Aldrich Corp. (Mannheim, Deutschland) verwendet. Alkin-Lipidstandards (hergestellt in der AG Thiele) wurden in einer Konzentration von 50 µM in Chloroform gelöst.

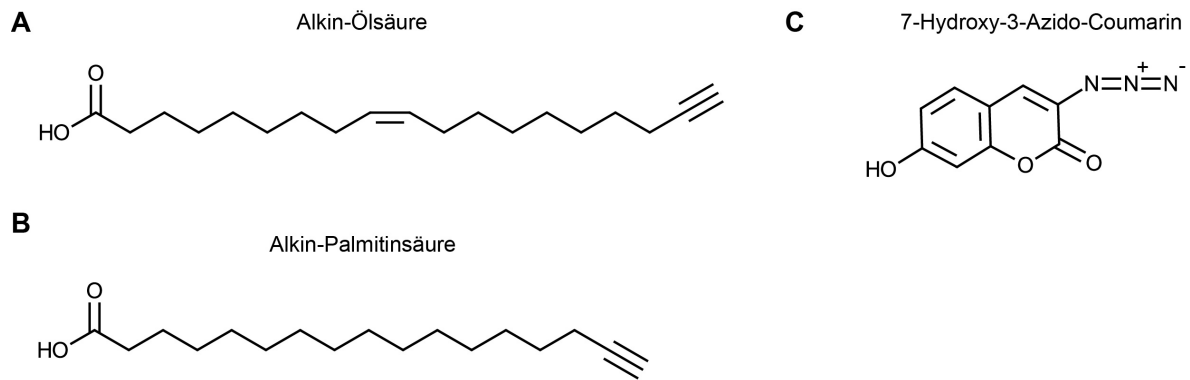


Abb. 7: Verwendete Alkin-Lipide und azidmarkierter Farbstoff.

Dargestellt ist die Struktur der verwendeten Alkin-Lipide **(A)** Alkin-Ölsäure (Nonadec-(9Z)-en-18-insäure) und **(B)** Alkin-Palmitinsäure (Heptadec-16-insäure) sowie des verwendeten Azido-markierten Farbstoffes **(C)** 3-Azido-7-Hydroxy-Coumarin.

3.1.9 Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten *Primer* wurden bei BioSpring GmbH (Frankfurt, Deutschland) synthetisiert. Die Sequenzen stammen aus folgender *Primerdatenbank*: <http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank> (Wang et al., 2012).

Tab. 8: Verwendete *Primer* für die RT-qPCR.

<i>Primer</i>	Forward	Reverse
GPAT	5'-CTT GGC CGA TGT AAA CAC ACC-3'	5'-CTT CCG GCT CAT AAG GCT CTC-3'
LPCAT1	5'-TGG TGC TAC GCT ACC CAA AC-3'	5'-CAC AGG ATT TTC AAC GCT CCA-3'
Ppap2a	5'-CAG GTT GTC TTT CTA CTC GGG A-3'	5'-ATG GGT CGT AAG AGT CTT GCC-3'
DGAT2	5'-TTC CTG GCA TAA GGC CCT ATT-3'	5'-CCT CCA GAC ATC AGG TAC TCG-3'
PEMT	5'-ATC ACC ATT GTG TTC AAC CCA C-3'	5'-CCA GGG AAT AGC AGG CTA GG-3'
FAS	5'-AGA GAT CCC GAG ACG CTT CT-3'	5'-GCT TGG TCC TTT GAA GTC GAA GA-3'
CD36	5'-CCT TGG CTA GAT AAC GAA CTC TG-3'	5'-AGA TGA CGT GGC AAA GAA CAG-3'
FATP	5'-ACT GTT CTC CAA GCT AGT GCT-3'	5'-GAT GAA GAC CCG GAT GAA ACG-3'
FABP1	5'-ATG AAC TTC CCC GGC AAG TAC C-3'	5'-CTG ACA CCC CCT TGA TGT CC-3'
CD14	5'-CTC TGT CCT TAA AGC GGC TTAC-3'	5'-GTT GCG GAG GTT CAA GAT GTT-3'
NF-κB	5'-AGG CTT CTG GGC CTT ATG TG-3'	5'-TGC TTC TCT CGC CAG GAA TAC-3'
Ubiquitin	5'-AGG CAA GAC CAT CAC CTT GGA CG-3'	5'-CCA TCA CAC CCA AGA ACA AGC ACA- 3'

3.1.10 Antikörper

In Tab. 9 sind die eingesetzten Antikörper für die Durchflusszytometrie und Zellkulturexperimente aufgeführt.

Tab. 9: Eingesetzte Antikörper.

Antigen	Fluorophor	Reaktivität	Verdünnung	Herstellerfirma
CD11b	Phycoerythrin (PE)	Maus	1:150	eBioscience Inc., San Diego, USA, Katalognr.: 12-0112
F4/80	Allophycocyanin (APC)	Maus	1:150	eBioscience Inc., San Diego, USA, Katalognr.: 17-4801-80
CD45RB	PE	Maus	1:150	Becton-Dickinson AG, Franklin Lakes, USA, Katalognr.: 553101
CD95	APC	Maus	1:150	eBioscience Inc., San Diego, USA, Katalognr.: 170951
Anti-TNF		Maus	100 ng/ml	PeprTech GmbH, Rocky Hill, USA, Katalognr.: 500-P64
CD11b		Maus/Mensch		Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland, Katalognr.: 130-049-601
Lymphotoxin-β Rezeptor (LTβR)				Biogen Idec, Ismaning, Deutschland

3.1.11 Zytokine

Folgende rekombinante, murine Zytokine wurden verwendet:

TNF

Immuno Tools GmbH, Friesoythe,
Deutschland

LIGHT

R&D Systems Inc., Minneapolis, USA,
Katalognr.: 1794-LT

3.1.12 Computerprogramme

Tab. 10: Zusammenfassung verwendeter Computerprogramme.

Programm	Herstellerfirma
Adobe Illustrator CS5	Adobe Systems Corp., San Jose, USA
Adobe Photoshop CS5	Adobe Systems Corp., San Jose, USA
AxioVision Zeiss 4.6	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Bio-Rad CFX Manager Version 3.0	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
ChemDoodle 7	iChemLabs LLC., Somerset, England
Endnote X7.3.1	Thomson Reuters Corp., Toronto, Kanada
Fiji (ImageJ 1.47b)	ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, USA
FlowJow 7.5	TreeStar Inc., Ashland, USA
Gel-Pro Analyzer 6.0	Media Cybernetics Inc., Rockville, USA
Gen5	BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall, Deutschland
GraphPad Prism 6	Graphpad Software Inc., La Jolla, USA
Microsoft-Office Paket 2011	Microsoft Corp., Redmond, USA
Rotor-Gene 6	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
ZEN 2012	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland

4 Methoden

4.1 Tierexperimente

C57BL/6NCrI Wildtyp (WT) Mäuse, ursprünglich von Jackson Laboratories, Sulzfeld, Deutschland erworben, wurden unter spezifischen pathogenfreien Bedingungen in Ventilationskäfigen bei 21 ± 2 °C Raumtemperatur (RT), 55 ± 15 % Luftfeuchtigkeit und einem Tag-/Nachtrhythmus von 12 h bei künstlichem Licht in behördlich genehmigten Barrierehaltungen gehalten. Als Nahrung erhielten die Mäuse eine Standarddiät für Zucht und Haltung (LASQCdiet[®] Rod16, LASvendi GmbH, Soest, Deutschland). Das Futter setzte sich aus folgenden Hauptnährstoffen zusammen: 4,3 kcal% Fett, 16,9 kcal% Protein und 55,5 kcal% Kohlenhydraten. Futter und autoklaviertes Leitungswasser standen *ad libitum* (lat.: „nach Belieben“) zur Verfügung. Für Experimente wurden ausschließlich männliche C57BL/6NCrI Mäuse im Alter von 6-18 Wochen verwendet. Alle Tierversuche wurden gemäß den Vorgaben des geltenden deutschen Tierschutzgesetzes vom 04.07.2013, der Tierschutz-Versuchstierordnung vom 12.08.2013, sowie der Leitlinien zum Wohlergehen von Versuchstieren der europäischen Union (2010/63/EU) durchgeführt. Für das Kooperationsprojekt mit Dr. Monika Wolf (AG Weber, Universitätsspital Zürich) und Prof. Dr. Mathias Heikenwälder (TU München) wurden C57BL/6J Mäuse (ursprünglich von Harlan Laboratories B.V., Horst, Niederlande) und Rag1^{-/-}-Mäuse (ursprünglich von Jackson Laboratories, Sulzfeld, Deutschland, (Mombaerts et al., 1992)) verwendet, die in Tierhaltungen der Kooperationspartner gehalten wurden. Alle Kooperationsexperimente wurden unter Zustimmung des Schweizer Tierschutzgesetzes durchgeführt und vom Veterinäramt Zürich genehmigt.

4.1.1 Fütterungsexperimente

4.1.1.1 HFD-Mausmodell

Die Fütterungsexperimente sowie die nachfolgenden Charakterisierungen der Mäuse wurden in Zusammenarbeit mit Kristina Hofmann (AG Thiele, LIMES-Institut) durchgeführt. Für das HFD-Mausmodell wurden männliche C57BL/6NCrI WT-Mäuse für 10 Wochen mit einer speziellen HFD (Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, Deutschland, Katalognr.: C1090-60) und Normaldiät (ND, gleiche Firma, Katalognr.: C1090-10) gefüttert. Die HFD setzt sich aus 60 kcal% Fett, 17 kcal% Protein und 23 kcal% Kohlenhydraten zusammen, während die ND aus 10 kcal% Fett, 24 kcal% Protein und 66 kcal% Kohlenhydraten bestand. Im Alter von 6 Wochen wurden beide Versuchstiergruppen (ND und HFD) für 2 Wochen zur

Gewöhnung mit dem ND-Futter gefüttert. Nach dieser Zeit wurden die Mäuse im Alter von 8 Wochen für 10 Wochen auf ND- und HFD-Futter gesetzt. Autoklaviertes Wasser und Futter standen den Tieren *ad libitum* zur Verfügung. Das Körpergewicht wurde wöchentlich dokumentiert.

4.1.1.2 Cholindefizientes HFD-Mausmodell

Für das Kooperationsprojekt mit Dr. Monika Wolf (AG Weber, Universitätsspital Zürich) und Prof. Dr. Heikenwälder (TU München) wurden C57BL/6J und Rag1^{-/-} Mäuse im Alter von 4-5 Wochen auf die folgenden Fütterungsdiäten von den Kooperationspartnern umgestellt: ND-Futter (Provimi Kliba AG, Kaiseraugst, Schweiz, Katalognr.: AIN-93G) bestehend aus 7,0 kcal% Fett, 18,0 kcal% Protein und 58,5 kcal% Kohlenhydraten, HFD-Futter (Research Diets Inc., New Brunswick, USA; Katalognr.: D12451) bestehend aus 44,9 kcal% Fett, 20,0 kcal% Protein und 35,1 kcal% Kohlenhydraten oder Cholindefizientes HFD Futter (CD-HFD, Research Diets Inc., New Brunswick, USA; Katalognr.: D05010402) bestehend aus 44,9 kcal% Fett, 20 kcal% Protein und 35,1 kcal% Kohlenhydraten. Falls nicht anders angegeben, wurden sowohl die C57BL/6J als auch die Rag1^{-/-}-Mäuse einer Langzeitfütterung für 6-12 Monate mit den entsprechenden Fütterungsformen unterzogen, bevor die Mäuse für weitere Experimente verwendet wurden.

4.1.2 Einleitung der Narkose

Den Mäusen wurde das Narkosemittel, bestehend aus Ketanest und Rompun, entsprechend ihres Gewichtes intraperitoneal (i.p.) injiziert (90 mg/kg Körpergewicht Ketanest (Pfizer Inc., New York, USA) und 9,4 mg/kg Körpergewicht Rompun ((Bayer AG, Leverkusen, Deutschland), beides verdünnt in 0,9%iger NaCl-Lösung). Das Erreichen der vollständigen Anästhesie wurde durch Überprüfung der Reflexe mithilfe eines Drucktests an der Hinterpfote bestimmt.

4.1.3 Blutglukose-Messungen

Im Rahmen des Glukose-Toleranztests und Insulin-Toleranztests wurde der Glukosegehalt im Vollblut der Mäuse mithilfe eines Glukometers bestimmt. Zur Blutentnahme wurde den Mäusen 1 mm der Schwanzspitze mit einer sterilen Schere abgeschnitten. Ein Tropfen Schwanzblut wurde vor sowie 10, 20, 30, 60 und 90 min nach der Glukose- bzw. Insulininjektion entnommen und der Glukosespiegel mit einem Glukometer gemessen. Für die Bestimmung des Glukosespiegels wurde das Blut auf den Teststreifen des Glukometers

gegeben. Die in dem Teststreifen enthaltene Glukose-Oxidase katalysiert eine sauerstoffabhängige Oxidation von Glukose, wodurch Wasserstoffperoxid (H_2O_2) gebildet wird. Die Menge an H_2O_2 kann mit dem Glukometer elektrochemisch gemessen werden und ermöglicht eine indirekte Quantifizierung der im Blut enthaltenen Glukose. Für die Bestimmung der späteren Zeitpunkte wurde die Blutkruste wieder entfernt und erneut ein Tropfen Blut für die Messung mit dem Glukometer gesammelt. Wenn kein Blutstropfen erschien, wurde der Mausschwanz vorsichtig vom Schwanzanfang bis zur Spitze massiert bis sich erneut ein Blutstropfen bildete.

4.1.3.1 Glukose-Toleranztest

Der Glukose-Toleranztest wird bei Verdacht auf Diabetes mellitus Typ 2 durchgeführt und gibt Aufschluss über die körpereigene Insulinsekretion sowie dessen Wirkung auf den Glukosespiegel (Fraulob et al., 2010). Im gesunden Zustand wird ein erhöhter Glukosespiegel vom Körper erkannt und durch die entsprechende Ausschüttung von Insulin wieder gesenkt. Wird ein verzögertes Absinken des Glukosespiegels beobachtet, deutet dies auf eine gestörte Glukoseverwertung im Körper hin.

Die Bestimmung der Glukosetoleranz wurde nach dem Protokoll von Andrikopoulos und Kollegen modifiziert und mit ND- und HFD-Mäusen nach Fütterung des HFD-Modells durchgeführt (Andrikopoulos et al., 2008). Hierzu wurden die Mäuse in einzelne Käfige gesetzt und für 16 h über Nacht gefastet (Wasser *ad libitum*). Die Glukoselösung wurde einen Tag vor dem Test angesetzt, da die kristalline Form von Glukose in der α -Form vorliegt. Um die β -Form zu erhalten, die sich im Blut besser transportieren lässt, wurde die Lösung über Nacht bei RT inkubiert. Am nächsten Tag wurde den Mäusen 2 mg Glukose pro g Körpergewicht i.p. injiziert, Blutproben entnommen und der Glukosespiegel mit einem Glukometer gemessen.

4.1.3.2 Insulin-Toleranztest

Bei einem Insulin-Toleranztest wird der Glukosespiegel über die Zeit nach einer Insulininjektion gemessen. Der Insulin-Toleranztest gilt als Maß für die Insulinsensitivität der Organe. Der Insulin-Toleranztest basiert auf dem Protokoll von Bruning und Kollegen (Bruning et al., 1997). Dafür wurden die Mäuse in separate Käfige mit Futter gesetzt. Nach 24 h wurde den Mäusen humanes Insulin abhängig vom eigenen Körpergewicht (0,75 I.E./kg Körpergewicht, Insulin wurde in 0,9% NaCl gelöst) i.p. injiziert, wodurch der Blutzuckerspiegel gesenkt wird. Die Insulinlösung wurde frisch angesetzt. Durch die Blutabnahme zu unterschiedlichen Zeitpunkten konnte die Reaktion auf das Insulin analysiert werden.

4.1.4 Analyse metabolischer Parameter im Blut

4.1.4.1 Gewinnung von Blutserum

Der narkotisierten Maus wurden etwa 600 µl Blut durch kardiale Punktion entnommen. Um eine vollständige Gerinnung der Erythrozyten zu gewährleisten, wurde das Blut 12 h bei RT aufbewahrt. Am darauffolgenden Tag wurde das koagulierte Blut bei 200 × g für 20 min abzentrifugiert, der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß transferiert und erneut 10 min bei 20.238 × g abzentrifugiert. Der Überstand (Serum) wurde überführt und bei -20 °C bis zum weiteren Gebrauch gelagert.

4.1.4.2 FFS-Bestimmung im Serum

FFS im Mause serum wurden mit dem "Free Fatty Acid Quantification Kit" nach Angaben des Herstellers in Mäusen des HFD-Mausmodells mit und ohne vorheriger LPS-Injektion gemessen. Zur Messung der FFS wurde das Mause serum zuvor 1:10 mit Reinstwasser verdünnt.

4.1.4.3 Bestimmung von ALT, AST, Cholesterol und TAG

Im Serum der Mäuse vom HFD-Mausmodell mit und ohne vorheriger LPS-Injektion wurden die Werte für Alanin-Aminotransferase (ALT), Aspartat-Aminotransferase (AST), Cholesterol und TAG mit dem trockenchemischen Reflotron® Plus Analyse-System entsprechend der Angaben vom Hersteller bestimmt. Für die Messung wurden 32 µl des 1:10 mit Reinstwasser verdünnten oder unverdünnten Serums auf ein Testfeld des Reagenzstreifens pipettiert. Dieses Testfeld enthält für jeden Blutparameter ein spezifisches Substrat und Enzym, die abhängig von der Konzentration des Blutparameters eine Farbreaktion auslösen. Der Farbumschlag wird anschließend photospektrometrisch gemessen. Im nachfolgenden Text werden die gemessenen Parameter sowie die zugrundeliegenden Nachweisverfahren näher erläutert:

ALT und AST

ALT, auch bekannt als Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT), setzt α-Ketoglutarat und Alanin zu Glutamat und Pyruvat um (Abb. 8a). Das entstandene Pyruvat wird dann wiederum von der Pyruvat-Oxidase (POD) in Acetylphosphat, Kohlendioxid (CO₂) und H₂O₂ gespalten. H₂O₂ bewirkt zusammen mit POD die Oxidation eines Indikators, was zu einem blauen Farbumschlag des Indikators führt. Die Messung von AST, nach alter Nomenklatur Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT), unterscheidet sich von der ALT-Messung nur im ersten

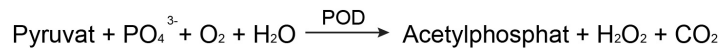
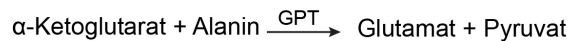
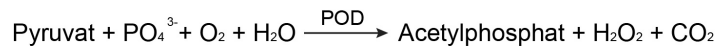
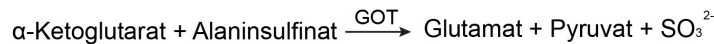
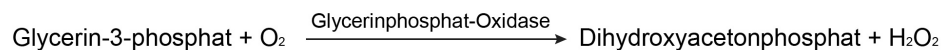
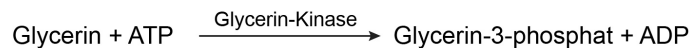
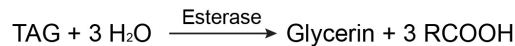
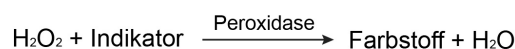
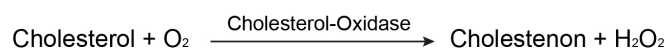
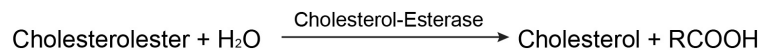
Reaktionsschritt: Hier wird gemessen, wieviel α -Ketoglutarat und Alaninsulfinat GOT zu Pyruvat und Glutamat umsetzt (Abb. 8b).

TAG

TAG werden zunächst enzymatisch gespalten (Abb. 8c). Anschließend wird nach verschiedenen Reaktionen H_2O_2 gebildet, welches einen Redoxindikator unter der katalytischen Wirkung der Peroxidase zu einem blauen Farbstoff reagieren lässt.

Cholesterol

Zunächst erfolgt über die Cholesterol-Esterase eine Spaltung der Cholesterolester in Cholesterol und die entsprechende Fettsäure (Abb. 8d). Cholesterol wird von der Cholesterol-Oxidase in Anwesenheit von Sauerstoff (O_2) oxidiert und es entsteht Cholestenon und H_2O_2 . Mithilfe der Peroxidase oxidiert H_2O_2 wiederum einen Redox-Indikator, wodurch ein blauer Farbstoff entsteht. Dieser ist direkt proportional zu der Cholesterolkonzentration in der entsprechenden Serumprobe.

a) ALT (GPT)**b) AST (GOT)****c) TAG****d) Cholesterol****Abb. 8: Darstellung der zugrundeliegenden chemischen Nachweisprinzipien für die Bestimmung verschiedener Serumparameter mittels eines Reflotron Plus Analyse-Systems.**

Veranschaulicht werden die Nachweisverfahren für die Messung der Serumkonzentrationen von ALT, AST, TAG und Cholesterol. Abk.: ox.: oxidiert, red.: reduziert.

4.1.5 Induktion einer *in vivo* LPS-Stimulation

Für die Induktion einer *in vivo* LPS-Stimulation, die in Kooperation mit Dr. Julia Vorac (AG Förster, LIMES-Institut) durchgeführt wurde, wurden die 8-10 Wochen alten C57BL6/NCrl WT-Mäuse oder ND- oder HFD-Mäuse gewogen und entsprechend ihres Gewichts i.p. mit 15 mg/kg LPS injiziert. Während der LPS-Inkubationszeit erhielten die Tiere Futter und Wasser *ad libitum*. Nach 1,5 h wurden primäre Hepatozyten isoliert und die Hepatozyten

($3,5 \times 10^5$) wurden für 2 h in Adhäsionsmedium in 6 cm Kollagen-beschichteten Zellkulturschalen kultiviert. Um die Entzündungsreaktion nicht zu beeinflussen, wurde dem Adhäsionsmedium kein entzündungshemmendes Dexamethason zugefügt. Anschließend wurden weitergehende Analysen, Färbungen oder Fütterungsexperimente durchgeführt.

4.1.6 Bestimmung des Lipidgehalts der Leber

Für die Bestimmung des hepatischen Lipidgehalts wurde zunächst das Gewicht der Maus ermittelt. Anschließend wurde die Leber aus der narkotisierten Maus herauspräpariert, auf einer Feinwaage gewogen und in einem Glashomogenisator mit 4 ml Methanol/Chloroform (5:1, v/v) aufgeschlossen. Die Lösungen bewirken die Extraktion der Lipide aus der Leber. Das resultierende Gemisch wurde in ein neues Reaktionsgefäß (15 ml) überführt und 5 min bei $20.238 \times g$ abzentrifugiert, um Lebergewebsreste zu entfernen. Der Überstand wurde in ein neues 15 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Durch Zugabe von 3,2 ml Reinstwasser, 0,8 ml Chloroform und erneuter Zentrifugation für 5 min bei $20.238 \times g$ entstand ein Zweiphasengemisch aus einer oberen, wässrigen Phase und einer unteren, organischen Phase. Mit diesem Schritt wurden die ebenfalls extrahierten, unpolaren Proteine entfernt, die sich im Zweiphasengemisch zwischen den beiden Phasen befinden und wie die obere Phase verworfen.

Die untere, organische Chloroform-Phase, welche die Lipide enthält, wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und in der Vakuumzentrifuge für circa 2 h getrocknet. Das Gewicht des resultierenden Pellets, welches dem Lipidgehalt der Leber entspricht, wurde mithilfe einer Feinwaage bestimmt.

4.1.7 *In vivo* Analyse der hepatischen Fettsäureaufnahme nach intravenöser oder oraler Applikation von Alkin-Fettsäuren

Im Rahmen des Kooperationsprojekts mit Dr. Monika Wolf (AG Weber, Universitätsspital Zürich) und Prof. Dr. Heikenwälder (TU München) sollte die Aufnahme von Fettsäuren aus dem Blut oder der Nahrung in die Leber ermittelt werden. Hierzu wurde C57BL/6J ND- und Rag1^{-/-}-Mäusen ein Mix aus Fettsäuren (2 mM Alkin-Ölsäure, 1 mM Alkin-Palmitinsäure und 1 mM delipidiertes BSA in 0,5 % NaCl (w/v)) oral (150 µl) oder intravenös (100 µl) injiziert. Die Mäuse wurden zu verschiedenen Zeitpunkten euthanasiert, die Lebern mit PBS perfundiert und das Gewebe entnommen. Anschließend wurden die Lebern gewogen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20 °C gelagert.

Die gefrorenen Lebergewebsstücke wurden anschließend in 4 ml Methanol:Chloroform (1:1) homogenisiert und das Einphasengemisch bei $20.238 \times g$ für 1 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches 15 ml Reaktionsgefäß überführt, um präzipitierte Protein- und Gewebereste zu entfernen. Nach Zugabe von 4 ml Reinstwasser und erneuter Zentrifugation bei $20.238 \times g$ für 5 min bildete sich ein Zweiphasengemisch aus. Die Chloroform-Phase wurde abgenommen, das Lipidextrakt von 5 mg/ml Leberfeuchtgewicht in einem 2 ml Reaktionsgefäß verdünnt und in der Vakuumzentrifuge aufkonzentriert. Die anschließende Click-Reaktion und Dünnschichtchromatographie (DC) wurde wie in Abschnitt 4.3.3 und 4.3.4 beschrieben durchgeführt.

4.2 Primärzellkultur

In der vorliegenden Arbeit wurden primäre Splenozyten aus der Milz sowie Hepatozyten und Kupfferzellen aus der Leber isoliert und kultiviert.

4.2.1 Isolation primärer Leberzellen

Die aus zwei Schritten bestehende Kollagenase-Perfusion der Leber wird verwendet, um Hepatozyten und Kupfferzellen zu isolieren (Severgnini et al., 2012; Li et al., 2014). Mithilfe dieser Technik können möglichst reine und funktionell intakte Hepatozyten und Kupfferzellen erhalten werden, bei denen möglichst die natürlichen physiologischen Eigenschaften wie in der *in vivo* Situation vorhanden sind.

4.2.1.1 Kollagenisieren der Zellkulturschalen

Damit primäre Hepatozyten und Kupfferzellen sich auf Plastikzellkulturschalen absetzen konnten, mussten die Zellkulturschalen mit Kollagen vorbehandelt werden. Kollagen ist Teil der extrazellulären Matrix und agiert somit für Zellen als Ankermöglichkeit. Zum Kollagenisieren wurden jeweils 2 ml einer Kollagenlösung (0,3 mg/ml Kollagen) auf eine 6 cm Zellkulturschale gegeben und für 30 min unter sterilen Bedingungen inkubiert. Zur Sterilisation wurden die Zellkulturschalen danach für 20 min zusätzlich noch mit UV-Licht bestrahlt. Die kollagenisierten Zellkulturschalen wurden anschließend abgepackt gelagert und innerhalb von 2 Wochen aufgebraucht.

4.2.1.2 Perfusion der Leber

In den ersten Schritten verläuft die Isolation primärer Hepatozyten und Kupfferzellen identisch: Der Maus wurden zunächst 150 μ l Heparin i.p. injiziert, um einer möglichen

Blutgerinnung in den feinen Lebergefäßen vorzubeugen.

Nach einer Inkubationszeit von 15 min wurde die Maus narkotisiert und fixiert. Der Bauchraum wurde mit 70% Ethanol desinfiziert und anschließend vorsichtig mit einem V-Schnitt geöffnet. Für die Perfusion wurde eine Schmetterlingskanüle in die Pfortader eingeführt, die Vena Cava für den Blutabfluß durchtrennt und die Leber mit 37 °C vorgewärmter Prä-Perfusionslösung mithilfe einer peristaltischen Pumpe und einer Geschwindigkeit von 4 ml/min für insgesamt 5 min durchspült. Die Prä-Perfusionslösung hat als primäre Aufgabe Blutzellen aus der Leber zu waschen. Gleichzeitig versorgt die Prä-Perfusionslösung durch das enthaltene HBSS die Leberzellen mit Nährstoffen und einer physiologischen Salzkonzentration. Enthaltene Heparin und EGTA wirken einer möglichen Blutgerinnung in den feinen Leberkapillaren entgegen. Heparin bildet hierzu mit Antithrombin III einen Inhibitor-komplex für die Gerinnungskaskade, während EGTA Kalziumionen bindet, die ebenfalls für die Blutgerinnung benötigt werden.

Im zweiten Schritt wurde die Leber mit dem ebenfalls auf 37 °C vorgewärmten, frisch angesetzten Kollagenase-Puffer nach demselben Prinzip für 10 min perfundiert. Die Kollagenase spaltet die Peptidbindungen zwischen Hydroxyprolin und anderen Aminosäuren, wodurch das Kollagen in der Leber abgebaut wird und das Bindegewebe sich lockert. Hierdurch löst die Kollagenase die Leberzellen aus dem Bindegewebe. Das enthaltene Kalziumchlorid stabilisiert die Phosphatgruppen und damit die Zellmembran der Hepatozyten. Außerdem unterstützen die Kalziumionen die katalytische Aktivität der Kollagenase durch Bindung an das aktive Zentrum. Anschließend wurde die Leber herausgeschnitten und die Leberzellen in 50 ml eines auf 37 °C vorgewärmten Adhäsionsmediums durch kräftiges Schütteln aus der zersetzten Leber gelöst. Die Zellsuspension wurde anschließend für 5 min bei $14 \times g$ abzentrifugiert.

Ab diesem Schritt unterscheidet sich die Hepatozytenisolation von der Kupfferzellenisolation. Während die Hepatozyten nach diesem Zentrifugationsschritt im Pellet vorliegen, enthält der Überstand neben anderen nicht-parenchymalen Zellen die Kupfferzellen.

4.2.1.3 Hepatozytenisolation

Für die Hepatozytenisolation wurde das entstandene Hepatozytenpellet in 30 ml frischem, auf 37 °C vorgewärmten Adhäsionsmedium aufgenommen und durch ein Nylon-Zellsieb mit einer Porengröße von 100 µm gefiltert. Die Lebendzellzahl wurde bestimmt und die Zellen in mit Kollagen-beschichteten Zellkulturschalen ausplattiert. Da die Hepatozyten sehr empfindlich sind, müssen diese Schritte zügig und möglichst ohne größere Scherkräfte während des Pipettiervorgangs durchgeführt werden.

4.2.1.4 Magnetische Zellisolation von Kupferzellen

Kupferzellen wurden als CD (engl.: *cluster of differentiation molecule*) 11b-positive Zellen mithilfe von magnetischen Antikörpern (engl.: *magnetic cell sorting* (MACS)) aufgereinigt (Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland). Für die Kupferzellenisolation wurde der Überstand mit den Kupferzellen der $14 \times g$ Zentrifugation in ein neues 50 ml Reaktionsgefäß gegeben und erneut bei $600 \times g$ und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ für 10 min abzentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 1 ml ACT-Lyse-Puffer für die Erythrozytenlyse resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert.

Um die Reaktion abzustoppen, wurden 10 ml PBS hinzugefügt und das Gemisch erneut für 10 min bei $600 \times g$ abzentrifugiert. Die Kupferzellen wurden dann entsprechend der Herstellerangaben mit MACS CD11b magnetischen Antikörpern aufgereinigt. Die Lebendzellzahl wurde ermittelt und die Zellen ausplattiert, um sie für weitere Versuche zu verwenden.

4.2.2 Isolation primärer Splenozyten

Für die Aufreinigung primärer Splenozyten wurde das Protokoll von Fantini und Kollegen modifiziert und wie beschrieben durchgeführt (Fantini et al., 2007). Um aus der Milz primäre Splenozyten zu isolieren, wurde die Maus narkotisiert, mit den Füßen auf der Operationsplatte fixiert und der Bauchraum mit 70% Ethanol desinfiziert. Nachdem der Bauchraum in V-Form geöffnet worden war, wurde die intakte Milz vorsichtig herauspräpariert. In einer 6 cm Zellkulturschale wurde ca. 1 ml Splenozyten-Medium vorgelegt und die Milz auf das beschichtete Beschriftungsfeld eines Objektträgers gelegt. Anschließend wurde etwas Splenozyten-Medium dazugegeben und die Milz vorsichtig zwischen zwei Objektträgern über der 6 cm Zellkulturschale zerrieben bis nur noch die weißliche Hülle der Milz übrig blieb. Die Zellsuspension wurde anschließend durch ein Zellsieb mit $40 \text{ }\mu\text{m}$ Porengröße in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt, die Zellen bei $800 \times g$ und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ für 5 min pelletiert und das Medium abgenommen. Für die Lyse der Erythrozyten wurde 1 ml ACT-Lyse-Puffer hinzugegeben und die Lösung 5 min bei RT stehen gelassen. Um die toten Zellen zu entfernen, wurde das Zellpellet nochmals in Splenozyten-Medium aufgenommen, durch ein neues Zellsieb mit $40 \text{ }\mu\text{m}$ Porengröße gegeben und die Suspension erneut bei $800 \times g$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ und 10 min abzentrifugiert. Anschließend wurde die Lebendzellzahl bestimmt und die Splenozyten in Kultur genommen.

4.2.3 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Anzahl lebender Primärzellen wurde eine Neubauer Zählkammer verwendet. Die Zellen wurden mit Trypan Blau 1:1 verdünnt. Trypan Blau ist ein Farbstoff, der selektiv alle toten Zellen dunkelblau färbt. Alle weißen Zellen wurden als intakte Zellen gezählt.

4.2.4 Kultivierung der Primärzellen

Primäre Hepatozyten, Kupfferzellen und Splenozyten wurden auf Kollagen-beschichteten Zellschalen in Adhäsionsmedium bzw. Splenozytenmedium ausplattiert und bei 37 °C und 5 % (v/v) CO₂ in einem wasserdampfgesättigten Brutschrank inkubiert. Nach 2 h wurde das Medium gewechselt um nicht adhärenzte Zellen abzuwaschen. Die Kultivierung primärer Hepatozyten erfolgte nicht länger als 16 h, da primäre Hepatozyten bei längeren Inkubationszeiten anfangen zu dedifferenzieren (Godoy et al., 2009).

4.2.5 Kokultur- und Überstandsexperimente

Um die Fettsäureaufnahme in Hepatozyten in An- und Abwesenheit von Kupfferzellen oder Splenozyten zu analysieren, wurden Kokultur- und Überstandsexperimente durchgeführt.

4.2.5.1 Hepatozyten mit Kupfferzellen

Primäre Hepatozyten und Kupfferzellen wurden aus 18 Wochen alten C57BL/6NCrl WT-Mäusen nach Fütterung des HFD-Mausmodells isoliert. Für Kokulturexperimente mit anschließender Mikroskopie wurden $2,5 \times 10^5$ Hepatozyten zusammen mit 7×10^4 Kupfferzellen in Kollagen beschichtete Deckgläschen in 6-Well Platten ausplattiert. Die Angaben von Lopez und Sunman wurden für die Kokultur entsprechend modifiziert (Lopez et al., 2011; Sunman et al., 2004).

Für Überstandsexperimente wurde ein anderes Verhältnis der Zellzahlen verwendet als in Yerkovich (Yerkovich et al., 2004). 1×10^6 Kupfferzellen und $2,5 \times 10^5$ Hepatozyten wurden getrennt voneinander auf Kollagen-beschichteten Deckgläschen in 6-Well Platten ausplattiert. Nach 2 h wurde das Medium der Hepatozyten abgenommen, der Kupfferzellüberstand auf die Hepatozytenkultur transferriert und über Nacht im Zellinkubator inkubiert. Anschließend wurden die Proben für die Mikroskopie oder die Analyse der Fettsäureaufnahme verwendet. Um die Entzündungsreaktion nicht von außen zu beeinflussen, wurde kein entzündungshemmendes Dexamethason in diesen Experimenten verwendet.

4.2.5.2 Hepatozyten mit Splenozyten

Für Kokulturrexperimente mit Hepatozyten und Splenozyten wurden 3×10^5 primäre Hepatozyten aus 8-10 Wochen alten C57BL/6J ND Mäusen in An- und Abwesenheit von 6×10^4 frisch isolierten Splenozyten aus 6 Monate alten ND- oder CD-HFD-Mäusen (CD-HFD-Mausmodell) im Verhältnis 5:1 kultiviert. Die Kultivierung erfolgte auf Kollagen-beschichteten Deckgläschen in 6 cm Zellkulturplatten über Nacht. Die Zellen wurden anschließend fixiert und gefärbt.

Für Überstandsexperimente einer Splenozyten/Hepatozyten-Kokultur mit anschließender Mikroskopie wurden zunächst 3×10^6 Splenozyten aus 6-Monate alten CD-HFD-gefütterten Mäusen auf kollagenisierten und mit Deckgläschen versehenen 6 cm Zellkulturplatten ausplattiert und für 16 h in 1,5 ml Splenozyten-Medium in An- oder Abwesenheit von Fettsäuren kultiviert. Am nächsten Tag wurden primäre Hepatozyten aus 8-10 Wochen alten C57BL/6J ND-Mäusen isoliert und jeweils 3×10^5 Zellen pro 6 cm Zellkulturplatte ausplattiert. Das Splenozytenmedium wurde von allen Zellkulturplatten abgenommen, in einem 15 ml Reaktionsgefäß vereint und bei $250 \times g$ für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß gegeben. Nachdem die frisch isolierten Hepatozyten 2 h kultiviert wurden, wurde das konditionierte Medium der Splenozyten für weitere 2 h in einer 1:1 Verdünnung mit frischer Adhäsionslösung auf die Hepatozytenkultur gegeben und die Zellen anschließend für die Mikroskopie oder Analyse der Fettsäureaufnahme verwendet. Die Experimente wurden im Rahmen der Kooperation mit Dr. Monika Wolf (AG Weber, Universitätsspital Zürich) und Prof. Dr. Mathias Heikenwälder (TU München) durchgeführt. Um eine mögliche Entzündungsreaktion nicht zu beeinflussen, wurde in allen Stimulationsexperimenten kein entzündungshemmendes Dexamethason verwendet.

4.2.6 *In vitro* Stimulation der Leberzellen

Primäre Hepatozyten und/oder Kupfferzellen wurden in Kollagen-beschichteten, mit Deckgläschen versehenen 6-Well Platten ausplattiert. Anschließend wurden sie über Nacht in An- oder Abwesenheit von 100 ng/ml LPS oder 10-50 ng/ml rekombinantes murines TNF stimuliert und/oder 100 ng/ml eines rekombinanten murinen anti-TNF Antikörper inkubiert.

Für die Kooperation wurden zusätzlich Experimente mit rekombinantem LIGHT (auch bekannt als TNF-Superfamilien Mitglied 14 (TNFSF14)) durchgeführt. Hepatozyten aus 8-10 Wochen alten C57BL/6J ND-Mäusen (CD-HFD Mausmodell) wurden isoliert und jeweils 3×10^5 Zellen pro 6 cm Schale ausplattiert. Nach 2 h Zellkultur wurde 500 ng/ml LIGHT in das Adhäsionsmedium der Hepatozytenkultur hinzugefügt und für 16 h inkubiert.

Nach einer *in vitro* Inkubation mit LIGHT für 16 h wurden für die Analyse der Fettsäureaufnahme Alkin-Fettsäuren für 2 h hinzugefügt (66 μM Ölsäure und 33 μM Palmitinsäure). Mit allen behandelten Zellen wurden weitergehende *Pulse-Chase*- oder Fettsäureaufnahme-Analysen, Kokultur- oder Überstandsexperimente mit anschließender Mikroskopie oder DC-Analyse durchgeführt.

4.2.7 *In vitro* Analyse der hepatischen Fettsäureaufnahme und VLDL-Sekretion

Für die Analyse der Fettsäureaufnahme wurden Alkin-Fettsäuren (66 μM Alkin-Ölsäure und 33 μM Alkin-Palmitinsäure) für 10 min hinzugefügt. Die Zellkulturschalen wurden anschließend mit Waschpuffer gewaschen, die Lipide mit Methanol:Chloroform extrahiert und mit der clickchemiebasierten Lipidanalyse untersucht. Für die VLDL-Abgabe wurde das Medium nach 2 min *Pulse*-Zeit und 120 min *Chase*-Zeit abgenommen, die Lipide aus dem Medium extrahiert, geclickt und mittels DC analysiert.

4.2.8 Einfluss diverser Milz-Zellsubpopulationen auf die Fettsäureaufnahme *in vitro*

Im Rahmen der Kooperation mit Dr. Monika Wolf und Prof. Dr. Mathias Heikenwälder wurde der Einfluss verschiedener Zellpopulationen der Milz auf die Fettsäureaufnahme analysiert. Die Milzen aus 6-Monate alten C57BL/6J CD-HFD-Mäusen wurden hierzu von Zeinab Abdullah (AG Knolle, Universitätsklinikum Bonn) isoliert und die Immunzellen nach Natürlichen Killer T-Zellen (NKT-Zellen), CD4^+ -T-Zellen, CD8^+ -T-Zellen und CD19^+ -B-Zellen mithilfe eines Durchflusszytometers (FACSCanto II oder BD LSR FortessaX-20, Becton-Dickinson AG, Franklin Lakes, USA) in 1 ml Splenozytenmedium sortiert. Gleichzeitig wurden primäre Hepatozyten aus 8-10 Wochen alten ND-Mäusen isoliert. Nach 2 h Zellkultur wurden jeweils 900 μl der isolierten Milz-Zellpopulationen zu den ausplattierten Hepatozyten gegeben und für weitere 2 h inkubiert.

Die verbleibenden 100 μl jeder Milz-Zellsubpopulation wurden vermischt und als Gesamtsplenozytenansatz ebenfalls für 2 h zu den Hepatozyten gegeben. Anschließend wurde die hepatische Fettsäureaufnahme analysiert.

4.3 Metabolische Markierung von Lipiden

Um den Lipidmetabolismus der Leber unter verschiedenen Bedingungen näher zu analysieren, wurde in primären Hepatozyten eine *Pulse-Chase*-Analyse mit Alkin-Fettsäuren durchgeführt. Die Lipide wurden anschließend extrahiert und die Alkin-Lipide mithilfe der Click-Reaktion und Dünnschichtchromatographie sichtbar gemacht. Im Folgenden werden die verschiedenen Methoden näher beschrieben.

4.3.1 *Pulse-Chase*-Analyse

Mithilfe einer *Pulse-Chase*-Analyse kann ein zellulärer Prozess in seinem zeitlichen Ablauf untersucht werden. Hierzu werden Zellen für eine kurze, definierte Zeit einem markierten Stoff ausgesetzt (dem sogenannten „*Pulse*“) (Hou et al., 2013). Dieser markierte Stoff wird in ein Molekül oder System, welches untersucht wird, während der Synthese diverser Produkte eingebaut und durchläuft so bestimmte metabolische Signalwege. Anschließend werden die Zellen dem gleichen unmarkierten Stoff für verschiedene Zeitintervalle ausgesetzt (dem sogenannten „*Chase*“). Hierdurch kann der während der *Pulse*-Zeit eingebaute Stoff zeitlich und räumlich verfolgt werden. In dieser Arbeit wurde die *Pulse-Chase*-Analyse eingesetzt, um quantitativ den Einbau alkinmarkierter Fettsäuren in den Glycerophospholipidweg von primären Hepatozyten unter verschiedenen metabolischen und immunologischen Bedingungen zu verfolgen.

Hierzu wurden $3,5 \times 10^5$ Hepatozyten in zuvor kollagenisierten 6 cm Zellkulturschalen für 2 h kultiviert, das Adhäsionsmedium entfernt und das *Pulse-Chase*-Experiment mit dem Zufügen von 3 ml auf 37 °C vorgewärmten *Pulse*-Medium gestartet. Das *Pulse*-Medium enthielt 66 µM Alkin-Ölsäure und 33 µM Alkin-Palmitinsäure.

Nach einer 2-minütigen *Pulse*-Zeit wurden die Zellen mit 3 ml vorgewärmtem Waschpuffer zügig gewaschen. Das lipidfreie BSA in dem Waschpuffer besitzt freie Bindungsstellen, an die die Fettsäuren binden können und sich so im wässrigen Milieu lösen.

Anschließend wurde das auf 37 °C vorgewärmte *Chase*-Medium für unterschiedlich lange Zeitdauern hinzugefügt, bevor der Lipidmetabolismus durch die Lipidextraktion gestoppt wurde. Im *Chase*-Medium wurde die gleiche Konzentration an Fettsäuren wie im *Pulse*-Medium verwendet, allerdings in unmarkierter Form. Für eine zelluläre Autofluoreszenz- und allgemeine Hintergrundkontrolle wurden Hepatozyten zudem ausschließlich mit dem Waschpuffer und ohne *Chase* behandelt, bevor die Lipide extrahiert wurden.

4.3.2 Lipidextraktion

Aufgrund des hydrophoben bzw. amphiphilen Charakters von Lipiden wurden für die Lipidextraktion organische Lösungsmittel verwendet. Die Lipide wurden entweder direkt aus den an der Schale anheftenden Zellen oder aus dem Medium extrahiert. Für die Lipidextraktion aus der Zellkulturschale wurden die Zellen zunächst mit 3 ml eiskaltem Waschpuffer und 5 ml eiskaltem PBS gewaschen, um ungebundene Fettsäuren von der *Pulse-Chase*-Analyse oder Fettsäurefütterung zu entfernen. Um die Lipide zu extrahieren, wurden pro 6 cm Zellkulturschale 1 ml Methanol/Chloroform (5:1, v/v) zugegeben. Die Zellkulturschale wurde 30 s geschwenkt und das Lipidextrakt jeweils in ein neues 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß transferiert. Zu jeder Lösung wurden 200 µl Chloroform gegeben, das Gemisch gut vermischt und bei $20.238 \times g$ für 1 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäß pipettiert, mit 800 µl Reinstwasser versetzt und erneut für 1 min bei $20.238 \times g$ abzentrifugiert. Dieser Schritt ist notwendig, da bei der Extraktion auch Proteine hydrophoben Charakters wie beispielsweise Transmembranproteine extrahiert werden. Durch diesen Schritt entsteht ein Zweiphasengemisch aus einer oberen, wässrigen Phase und einer unteren, organischen Phase, die von einer Proteinschicht getrennt wird. Die organische Phase des entstandenen Zweiphasengemisches, welche die Lipide enthält, wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß transferiert, während die wässrige Phase und die Proteinphase verworfen wurden.

Für die Extraktion von Lipiden aus dem Medium wurde 1 ml Medium zusammen mit 4 ml Methanol/Chloroform 3:1 (v/v) in ein 15 ml Reaktionsgefäß pipettiert, bei $20.238 \times g$ für 5 min abzentrifugiert und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß transferiert. Zur Bildung des Zweiphasengemisches wurden 800 µl Chloroform und 3,2 ml Reinstwasser hinzugefügt, das Gemisch erneut abzentrifugiert und die organische Phase in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß pipettiert.

Um die Lipidproben weiter aufzukonzentrieren, wurde die organische Phase in einer Vakuumzentrifuge bei 45 °C (Programm V-AL) evaporiert. Die Lipide wurden anschließend in 7 µl Chloroform pro Reaktionsgefäß für die anschließende Click-Reaktion gelöst. Um die Lipide wieder in Lösung zu bringen, wurden die Proben insgesamt dreimal für 10 min auf dem Vortexer geschüttelt, wobei sie dazwischen und danach bei $20.238 \times g$ dreimal für 1 min abzentrifugiert wurden.

4.3.3 Click-Reaktion

Für eine spätere Detektion wurden die Alkin-Lipide mithilfe der sogenannten Click-Reaktion an 3-Azido-7-Hydroxy-Coumarin gekoppelt (siehe Kapitel 1.5). Dafür wurden zu 7 µl

Lipidlösung (siehe voriges Kapitel) 30 µl der 3-Azido-7-Hydroxy-Coumarin-Markierungslösung hinzugegeben und das Gemisch bei 43 °C für 3 oder 16 h inkubiert. Danach wurden die Proben kurz abzentrifugiert. Um alle Lipide wieder zu lösen, wurden weitere 30 µl Chloroform dazugegeben, für 10 min im Ultraschallbad behandelt und dreimal für jeweils 5 min bei RT maschinell geschüttelt. Anschließend wurde der gesamte Lipidextrakt für die Detektion mithilfe der Dünnschichtchromatographie verwendet oder bei -20 °C gelagert.

Die Lipide wurden auf der Dünnschichtchromatographie mittels komigrierender Alkinlipidstandards identifiziert. Hierzu wurden mehrere Click-Standards (jeweils 1 µl einer 50 µM Stocklösung) in 30 µl 3-Azido-7-Hydroxy-Coumarin gelöst und ebenfalls für mindestens 3 h bei 43 °C inkubiert. Diese wurden anschließend kurz abzentrifugiert und direkt auf eine Dünnschichtchromatographie-Platte aufgetragen oder bei -20 °C gelagert.

4.3.4 Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie (DC) ist ein Trennverfahren, bei dem die Zusammensetzung verschiedener Probengemische analysiert werden kann (Fuchs et al., 2011). Bei dieser Methode wird ein Probengemisch mit einem Lösungsmittelgemisch (mobile Phase) aufgrund von Kapillarkräften entlang eines festen, feinporigen Trägermaterials (stationäre Phase, z.B. ein Kieselgel) transportiert und dadurch in seine Bestandteile aufgetrennt. Die in dem Lösungsmittelgemisch enthaltenen organischen Stoffe wandern ebenfalls mit dem Laufmittel aufwärts. Die Wandergeschwindigkeit der einzelnen Stoffe ist allerdings von deren Wechselwirkung mit der stationären Phase und der mobilen Phase abhängig. Diese Wechselwirkung wird wiederum durch das Vorhandensein verschiedener funktioneller Gruppen in den organischen Substanzen bestimmt. Da das Kieselgel aufgrund der freien Hydroxygruppen polar ist, gilt: je stärker der polare Charakter einer Stoffes ist, desto höher ist die Wechselwirkung mit dem Kieselgel und umso kürzer ist die eigentliche Laufstrecke in dem Laufmittel dieser Stoffe. Je unpolarer ein Lösungsmittel ist, desto weniger läuft der polare Stoff mit der Laufmittelfront mit.

In dieser Arbeit wurden die nach der Lipidextraktion erhaltenen Lipide nach Lipidklassen getrennt. Hierzu wurden die Lipidproben und die entsprechenden Click-Standards mithilfe von Glaskapillaren strichförmig auf eine mit Silicagel beschichtete Glasplatte aufgetragen. Anschließend wurde die DC-Platte senkrecht in eine geschlossene und zuvor mit Laufmittel abgesättigte Chromatographiekammer mit Filterpapieren gestellt. Zuerst wurde die DC-Platte in einem Laufmittel bestehend aus Chloroform/Methanol/H₂O/Essigsäure (65:25:4:1, v/v/v/v) 12 cm ab Auftragungslinie entwickelt, mit dem vor allem polare und mittelpolare Lipide (z.B. Phospholipide) aufgetrennt wurden. Die Platte wurde dann mit einem warmen Luftstrom

getrocknet und in einem zweiten Laufmittel, bestehend aus Hexan/Ethylacetat (1:1, v/v), bis zur Oberkante der DC-Platte laufen gelassen. Mit diesem Laufmittel werden vor allem die unpolaren Lipide voneinander getrennt. Anschließend wurde die DC-Platte erneut in einem warmen Luftstrom getrocknet und kurz vor der Detektion in Hünig-Base getränkt. Damit das überschüssige Lösungsmittel verdampfen konnte, wurde die Platte für ca. 1 min getrocknet. Die Hünig-Base bewirkt, dass der zuvor niedrige pH-Wert basisch wird. Dies sorgt für eine drastische Zunahme der Fluoreszenz von Coumarin.

Das Coumarinsignal wurde mithilfe einer EMCCD („Electron-Multiplying Charge-Coupled Device“)-Kamera bei 494 nm und bei 572 nm aufgenommen, um ein gutes Abbild der Signalstärke zu bekommen. Eine densitometrische Analyse der Lipidbanden wurde mithilfe der Gel-Pro[®] Analyzer Version 6.0 Software durchgeführt. Die Bilder wurden hierzu mit Fiji bearbeitet, indem das 572 nm Bild (unspezifisches Signal der Coumarin-Markierungslösung) von dem 494 nm Bild (spezifisches Coumarin-Signal) einer gleichen Belichtungszeit subtrahiert wurde. Für die Quantifizierung wurde der Prozentanteil einer Lipidklasse im Vergleich zu den anderen pro aufgetragener Spur auf der DC für jede experimentelle Bedingung bestimmt.

Unmarkierte Lipide konnten durch Besprühen der DC-Platte mit 20% Schwefelsäure (v/v) und nachfolgender Verkohlung durch die oxidierende Wirkung der Schwefelsäure in einem Ofen bei 160 °C detektiert werden.

4.3.5 Färbung und Mikroskopie

Die Bildung von Lipidtröpfchen wurde in primären Hepatozyten und Lebergewebsschnitten durch Fixierung, Färbung und anschließender mikroskopischer Bildanalyse verfolgt.

Färbung primärer Hepatozyten

$2,5 \times 10^5$ Hepatozyten wurden zusammen mit 7×10^4 Kupferzellen isoliert und auf Kollagenbeschichteten 6-Well-Platten über Nacht kultiviert. Das Medium wurde entfernt und die Zellen anschließend für 5 min mit PBS gewaschen. Die Fixierung erfolgte mithilfe von 4 % Formaldehyd (v/v) in PBS für 30 min bei RT, gefolgt von zweimaligem Waschen mit PBS für 5 min bei RT. Um die Zellkerne und die Lipidtröpfchen anzufärben, wurden die Zellen mit 1 µg/ml DAPI und 0,1 µg/ml LD540 in PBS (Spandl et al., 2009) für 30 min bei RT und in Dunkelheit inkubiert. Danach wurden die Zellen nochmals dreimal 5 min mit PBS und einmal mit Reinstwasser gewaschen, bevor sie in 15 µl Eindeckmittel auf einem Objektträger mit Deckgläschen eingedeckelt und mikroskopiert oder bei 4 °C gelagert wurden.

Färbung von Gewebeschnitten

Für eine LD540-Färbung in Leberschnitten wurde die Maus narkotisiert und auf einer Operationsplatte fixiert. Der Bauchraum wurde mithilfe einer Schere geöffnet. Die Leber wurde vorsichtig aus der Maus herauspräpariert und in ihre einzelnen Leberlappen getrennt. Die Leberlappen wurden dann in einer mit PBS gefüllten 6 Well-Platte gewaschen und 48 h in 4 % Formaldehyd in PBS (v/v) bei 4 °C fixiert. Anschließend wurden mithilfe eines Vibratoms frei schwimmende Leberschnitte mit einer Schnittstärke von 30 µm hergestellt. Es folgte eine Nachfixierung über Nacht in 4 % Formaldehyd in PBS (v/v) bei 4 °C. Die Schnitte wurden erneut mit PBS dreimal für 5 min gewaschen und mit 1 µg/ml DAPI und 0,1 µg/ml LD540 in PBS 1 h bei RT in Dunkelheit inkubiert. Nachdem die Schnitte dreimal 5 min mit PBS und abschließend mit Reinstwasser gewaschen wurden, wurden sie in 15 µl DAKO auf einem Objektträger mit Deckgläschen eingedeckelt, gelagert oder mikroskopiert.

Mikroskopie

Die Mikroskopie der gefärbten Zellen und Gewebeschnitte erfolgte an einem Zeiss Axio Observer Z1 Epifluoreszenz Mikroskop im Apotom-Modus mit einem 63x/NA1.4 Objektiv und einer Photometrix Coolsnap K4 Kamera. Als Lichtquelle wurde eine Polychrome V 150 W Xenon Lampe (Till Photonics GmbH, Gräfelfing, Deutschland) verwendet.

Die mikroskopischen Bilder wurden anschließend mithilfe der AxioVision Zeiss 4.6 Software oder der ZEN 2012 Software sowie Adobe Photoshop CS5 bearbeitet. Die nachfolgende Quantifizierung der Lipidtröpfchen erfolgte mit Fiji. Die Daten wurden auf die Gesamtzahl der Zellen und Verwendung der gleichen Intensität normalisiert.

4.4 Molekularbiologische Methoden

Nachfolgend werden die molekularbiologischen Methoden, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, näher erläutert.

4.4.1 RNA-Isolation aus primären Hepatozyten

Die Isolation von RNA aus primären Hepatozyten erfolgte mit dem RNeasy Mini *Kit* und den dazugehörigen Puffern nach Angaben des Herstellers. Hierzu wurden 1×10^6 Hepatozyten für 2 h in einer 10 cm kollagenisierten Kulturschale kultiviert, mit eiskaltem PBS für 5 min gewaschen und die Zellen anschließend in 500 µl PBS mit einem Zellschaber von der Kulturschale gelöst. Die Zellsuspension wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und kurz bei $3000 \times g$ und RT für 10 min abzentrifugiert, bevor die RNA mithilfe des *Kits* isoliert wurde. Für eine kurze Lagerung wurde die RNA bei -20 °C eingefroren. Eine langfristige

Lagerung erfolgte bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Die Konzentration der RNA wurde photometrisch mit einem Nanodrop bei 260 nm gemessen.

4.4.2 cDNA-Synthese

Aus der gewonnenen RNA wurde im nächsten Schritt mithilfe einer reversen Transkriptase cDNA gewonnen. Für die cDNA-Synthese wurden $1\text{ }\mu\text{g}$ Gesamt-RNA eingesetzt und zusammen mit $3\text{ }\mu\text{l}$ Oligo(dT)₁₈-*Primern* ($1\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$) für 10 min bei $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Thermocycler inkubiert, um die RNA zu denaturieren. Danach wurde der Ansatz 10 min in Eiswasser gestellt. In dieser Zeit können die Oligo-dT *Primer* an den Poly-A-Schwanz der RNA binden. Anschließend wurden die Komponenten wie nach Herstellerangaben zugefügt (siehe Tab. 11).

Tab. 11: Pipettieransatz für die cDNA-Synthese.

Komponente	Hinzugefügte Menge (1 Ansatz)
dNTP (10 mM)	4 μl
DTT (100 mM)	4 μl
Thermo 5xReaktionspuffer für cDNA-Synthese	8 μl
RiboLock RNase Inhibitor	2 μl
RevertAid Reverse Transkriptase (200 I.E./ μl)	1 μl

Die reverse Transkription erfolgte nach Angaben des Herstellers und wurde bei $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 60 min im Thermocycler durchgeführt. Das im Ansatz enthaltene DTT stabilisiert die Transkriptase. Anschließend wird der Reaktionsansatz bei $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 10 min inkubiert. Der in dem *Kit* enthaltene RiboLock RNase Inhibitor verhindert eine Degradation der RNA über $55\text{ }^{\circ}\text{C}$. Für eine langfristige Aufbewahrung wurde die cDNA bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

4.4.3 PCR und RT-qPCR

Das entsprechende Standard PCR-Programm sowie das verwendete Pipettierschema des Reaktionsansatzes, welcher im 96-Well Format angesetzt wurde, sind in Tab. 12 und 13 wiedergegeben. Die quantitative Realtime PCR (RT-qPCR) ermöglicht die Echtzeitquantifizierung der amplifizierten DNA und erlaubt damit Rückschlüsse auf die ursprüngliche, vorherige Menge. Diese Quantifizierung beruht auf der Messung der Fluoreszenzstärke, die durch den Einbau des fluoreszierenden Farbstoffes SYBR Green in die zu synthetisierende

DNA in jedem PCR-Zyklus entsprechend der Ausgangs-DNA Menge zunimmt (Arya et al., 2005).

Tab. 12: Pipettierschema für die RT-qPCR.

Bestandteil	Hinzugefügte Menge (1 Ansatz)
Absolut SYBR Green Rox Mix	5 μ l
Forward <i>Primer</i> (10 nM/ml)	0,2 μ l
Reverse <i>Primer</i> (10 nM/ml)	0,2 μ l
1:5 verdünnte cDNA	1 μ l
Aqua dest.	3,6 μ l

Tab. 13: Standard-PCR-Programm für die RT-PCR.

Temperatur	Zeit
95 °C	15 min (Initiale Denaturierung)
95 °C	20 s (Denaturierung)
60 °C	20 s (Annealing)
72 °C	30 s (Elongation)

} 45 x

Der relative Unterschied der Expression eines bestimmten Zielgens zwischen Kontrolle und der behandelten Probe wurde mithilfe der Livak-Methode, auch $\Delta\Delta C_T$ Methode bezeichnet, bestimmt, bei der folgende Rechnungsschritte durchgeführt werden (Livak und Schmittgen, 2001):

1. C_T Wert (Zielgen) zum C_T Wert (Referenzgen) normalisieren:

$$\Delta C_T = C_T(\text{Zielgen}) - C_T(\text{Referenzgen})$$

2. ΔC_T der behandelten Probe mit ΔC_T der Kontrolle normalisieren:

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T(\text{Testprobe}) - \Delta C_T(\text{Kontrolle})$$

3. Das Expressionsverhältnis (engl.: *foldchange*) berechnen:

$$2^{-\Delta\Delta C_T} = \text{normalisiertes Expressionsverhältnis}$$

4.5 Immunologische Methoden

4.5.1 Durchflusszytometrie

Die Reinheit von Kupfferzellen und Hepatozyten wurde mithilfe eines Durchflusszytometers bestimmt. Bei der Methode der Durchflusszytometrie werden Zellen einer Suspension einzeln in einem dünnen Flüssigkeitsstrom durch einen fokussierten Laserstrahl geleitet, wodurch ganze Zellpopulationen nach ihrer Größe oder Struktur aufgrund von Streulicht analysiert werden können (Picot et al., 2012).

Passiert eine einzelne Zelle das Laserlicht, wird auf der einen Seite das Vorwärtsstreulicht (auch FSC (engl.: *forward scatter*) genannt) gemessen, welches ein Maß für die Lichtbrechung im flachen Winkel ist und über das Volumen einer Zelle Aufschluß gibt. Auf der anderen Seite wird das Seitwärtsstreulicht (auch SSC (engl.: *side scatter*) genannt) detektiert, welches ein Maß für die Lichtbeugung im rechten Winkel ist und von der Beschaffenheit der intrazellulären Bestandteile einer Zelle abhängt (z.B. von der Anzahl an Vesikeln oder von der Granularität, Form oder Struktur des Zellkerns).

Durch Einsatz fluoreszenzgekoppelter Antikörper können Zellen auch über ihre Oberflächenproteine aufgrund von unterschiedlichen Emissionsspektren analysiert werden. PE und APC sind Fluorophore, die natürlicherweise in Algen vorkommen. PE besitzt ein Absorptionsmaximum bei 490 nm und besitzt ein Emissionsmaximum im Bereich des orangenen Lichts (580 nm). APC wird bei 650 nm angeregt und emittiert maximal bei 660 nm dunkelrotes Fluoreszenzlicht (Telford et al., 2001).

Um die Reinheit der Kupfferzellen- und Hepatozytenpopulationen zu bestimmen, wurden Kupfferzellen mit CD11b-PE und F4/80-APC Antikörpern angefärbt, während Hepatozyten mit CD95-APC- und CD45RB-PE-Antikörpern inkubiert wurden. Hierzu wurden $3,5 \times 10^5$ Hepatozyten in kollagenisierten 6 cm Zellkulturschalen und $3,5 \times 10^5$ Kupfferzellen in kollagenisierten 12-Well Schalen ausplattiert und 12 h im Zellinkubator kultiviert. Danach wurden die Zellen mithilfe eines Zellschabers von der Zellkulturschale geerntet. Die Hepatozyten wurden 5 min bei $11 \times g$ und RT pelletiert, die Kupfferzellen wurden für 10 min bei $600 \times g$ und $4^\circ C$ abzentrifugiert. Dann wurden die Zellen zunächst für 5 min bei $4^\circ C$ in einer Fc-Blockierlösung (anti-Maus TruStain fcX™, Klon 93, BioLegend GmbH, Fell, Deutschland) 1:100 verdünnt, um unspezifische Färbungen zu vermeiden. Nach Zentrifugation wurden die resultierenden Pellets beider Zellpopulationen in 200 µl PBS aufgenommen und die fluoreszierenden Antikörper CD45RB-PE, CD95-APC, CD11b-PE und F4/80-APC entsprechend der Herstellerangaben hinzugefügt. Primäre Hepatozyten wurden als CD45-negative/CD95-positive Zellen definiert (Goncalves, Vigarrio und Penha-Goncalves, 2007). Kupfferzellen wurden als CD11b-positive/F4/80-positive Zellen nachgewiesen (Tosello-

Tramont et al., 2012). Nach einer Inkubation für 20 min auf Eis in Dunkelheit wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Die Fluoreszenz der Zellen wurde mit dem BD FACS Canto II Durchflusszytometer gemessen und die Daten mit dem Programm FlowJow ausgewertet.

4.5.2 ELISA

Die Sekretion von Zytokinen unter verschiedenen Bedingungen wurde mit einem Sandwich ELISA (engl.: *enzyme linked immunosorbent assay*) gemessen. Diese Methode basiert auf der Verwendung spezifischer Antikörper und einer enzymatischen Farbumschlagsreaktion (Cox et al., 2004).

Für den ELISA wurden die Zellüberstände von Kupferzellen oder Hepatozyten verwendet. Hierzu wurden 7×10^4 Kupferzellen aus unbehandelten sowie 1,5 h *in vivo* mit LPS behandelten Mäusen oder $3,5 \times 10^5$ Kupferzellen aus ND- und HFD-Mäusen in 200 μ l Adhäsionslösung einer kollagenisierten 96-Well Platte für 16 h ausplattiert. Hepatozyten unbehandelter oder 1,5 h *in vivo* LPS-behandelter Versuchstiere wurden hingegen in einer Konzentration von 2×10^5 für 12 h in 200 μ l Adhäsionslösung in eine kollagenisierte 96-Well Platte ausplattiert. Nach 2 h Kultivierung wurde bei beiden Zelltypen das Medium gewechselt. Anschließend wurden die Zellen in An- oder Abwesenheit von 100 ng/ml LPS für 16 h weiter kultiviert.

Die Überstände wurden nach 16 h Inkubation abgenommen und direkt weiterverwendet oder bei -20 °C gelagert bis die Zytokinkonzentration gemessen wurde. Die Zytokine TNF, IL-10, IL-6 und IL-1 β wurden in Kupferzellen- und Hepatozyten-Überständen mit den entsprechenden ELISA-Kits nach Angaben des Herstellers analysiert.

Für den ELISA wurden die ELISA-Mikrotiterplatten über Nacht oder für 2 h bei 37 °C mit den primären Antikörpern, auch *capture*- oder *coating*-Antikörper genannt, beschichtet, die gegen das zu detektierende Zytokin gerichtet sind. Anschließend wurden die Platten dreimal bei RT mit Waschlösung kurz gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen.

Unspezifische Bindungsstellen wurden durch die Inkubation mit Blockierungspuffer für 1 h bei RT auf einem Schüttler abgedeckt und erneut einmal mit Waschlösung bei RT kurz gewaschen.

In einem zweiten Schritt wurden 50 μ l der Zellüberstände auf die ELISA-Platte gegeben, damit das gewünschte Zytokin (Antigen) an die primären Antikörper binden konnte. Die Hepatozytenüberstände wurden hierzu unverdünnt eingesetzt, während die Kupferzellüberstände 1:5 in Blockierungspuffer verdünnt wurden. In diesem Schritt wurde auch eine Verdünnungsreihe des entsprechenden Standards auf die ELISA-Platte aufgetragen, um

später die Konzentration des entsprechenden Antigens im Zellüberstand bestimmen zu können. Die Zellüberstände und der Standard wurden 2 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C auf der ELISA-Platte inkubiert. Nach dreimaligem erneutem Waschen mit Waschlösung wurde an das Antigen im dritten Schritt wiederum ein zweiter biotinkoppelter Antikörper, der sogenannte Detektionsantikörper, für 1,5 h gebunden. Danach folgten drei weitere Waschschritte mit Waschlösung. Im nächsten Schritt wurden jeweils 50 µl eines (HRP)-gekoppelten Streptavidins (1:200 in Blockierungspuffer verdünnt) auf die Platten gegeben. Das HRP-gekoppelte Streptavidin interagiert mit dem Biotin des Detektionsantikörpers. Nach dreimaligem Waschen mit Waschlösung wurden 50 µl des Substratchromogens TMB zugegeben. HRP katalysiert die Hydrolyse von H₂O₂, wodurch Sauerstoffradikale freigesetzt werden. Durch Oxidation von TMB kommt es zu einem blauen Farbumschlag. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl Schwefelsäure abgestoppt, sobald mindestens 4-5 Standardproben sichtbar waren. Hierdurch fand nochmals ein Farbumschlag des TMB Substrats in gelb statt (450 nm). Die Konzentration der Zytokine wurde photometrisch mit einem Spektrophotometer bei 450 nm/540 nm gemessen und mit dem Programm Gen5 berechnet.

4.6 Statistik

Alle in dieser Arbeit ermittelten Daten werden als Mittelwert mit Standardfehler des arithmetischen Mittels (engl.: *standard error of the mean* (SEM)) dargestellt. Für die Berechnung von Unterschieden wurde ein ungepaarter t-Test angewendet. Bei größeren Gruppen wurde eine Varianzanalyse (engl.: *analysis of variance* (ANOVA)) eingesetzt. Falls nicht anders vermerkt, bezog sich die Gruppengröße n auf die Anzahl an Versuchstieren oder die Anzahl an unabhängig durchgeführten Experimenten. Für die Berechnung der Werte wurde das Programm GraphPad Prism 6 eingesetzt. Statistische Signifikanz wurde wie folgt gekennzeichnet: ns, nicht signifikant, * p≤0,05, ** p≤0,01, *** p≤0,001.

5 Ergebnisse

5.1 Analyse des hepatischen Lipidstoffwechsels unter wechselnden metabolischen Bedingungen

5.1.1 Etablierung der Methoden *Pulse-Chase-Analyse* und Lipidextraktion in primären Hepatozyten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zunächst die Methoden der *Pulse-Chase-Analyse* und Lipidextraktion für primäre Hepatozyten etabliert. Als Startprotokoll wurde das allgemeine Protokoll aus Thiele et al., 2012 verwendet und dementsprechend modifiziert. Da man in der *Pulse-Chase-Analyse* trotz des schnellen Metabolismus in der Leber möglichst den kompletten Glycerophospholipidweg untersuchen möchte, wurde eine kurze *Pulse*-Zeit gewählt. Längere *Pulse*-Zeiten würden beispielsweise den Einbau der Fettsäuren in PA oder DAG, die ganz zu Beginn des Glycerophospholipidweges eine Rolle spielen, nicht abdecken, da der Stoffwechsel zum Zeitpunkt der Lipidextraktion schon zu weit fortgeschritten wäre. Eine *Pulse*-Zeit von 2 min ermöglichte eine Verfolgung dieser beiden Lipidklassen und war gleichzeitig labortechnisch gut durchführbar. Außerdem waren sowohl die Zellen als auch die Click-Reaktion zu diesem kurzen Zeitpunkt noch nicht mit Alkin-Lipiden übersättigt (Daten nicht gezeigt).

Aufgrund des schnellen Leberstoffwechsels wurden ebenfalls viele kurze *Chase*-Zeitpunkte verwendet (gewählte *Chase*-Zeitpunkte in allen Versuchen: 0; 0,5; 1; 2; 3; 5; 10; 20; 30; 60 und 120 min).

Im Standardprotokoll für die Click-Reaktion war lediglich ein kurzer Vortexschritt vor dem Beginn der eigentlichen Reaktion vorgesehen (Thiele et al., 2012). Für eine gute Lipidextraktion aller Lipidklassen war es nach der *Pulse-Chase-Analyse* jedoch von enormer Wichtigkeit, die extrahierten Lipide in der organischen Chloroform-Phase vor dem Ansetzen der Click-Reaktion dreimal 5 min zu vortexen, um die im Plastik adsorbierten Neutrallipide wieder zu lösen. Die Lipidausbeute wurde nach der Click-Reaktion verbessert, wenn zusätzlich 30 µl Chloroform zum Lösungsansatz hinzupipettiert wurden und die Proben zweimal 10 min maschinell geschüttelt, 10 min ins Ultraschallbad gestellt und erneut einmal 10 min maschinell geschüttelt wurden.

5.1.2 Einfluss verschiedener Insulin- und Glukosekonzentrationen auf den Lipidmetabolismus primärer Hepatozyten

Um den kurzzeitigen Einfluss variierender Insulin- und Glukosekonzentrationen auf den Einbau alkinmarkierter Fettsäuren in die Hauptlipidklassen entlang des Glycerophospholipidweges zu untersuchen, wurden primäre Hepatozyten für 2 h in An- und Abwesenheit von 11 mM Glukose und/oder 100 nM Insulin kultiviert. Anschließend wurde eine *Pulse-Chase*-Analyse mit einem Gemisch aus Alkin-Ölsäure und Alkin-Palmitinsäure im Verhältnis 2:1 (100 μ M) durchgeführt. Die langkettigen Fettsäuren Palmitinsäure (C16:0) und Ölsäure (C18:1) wurden bereits in früheren Steatose-Zellkulturmodellen als exogene Fettsäuren eingesetzt, da sie die übliche Fettsäuremischung darstellen, die über die Nahrung durch die Portalvene zur Leber aufgenommen wird. Zudem sind es die Fettsäuren, die am häufigsten in der Leber von sowohl normalen Testpersonen als auch NAFLD-Patienten vorkommen (Vergani, 2014). Die 2:1-Mischung aus Ölsäure und Palmitinsäure mit einer Konzentration von 100 μ M wurde bereits in anderen Studien eingesetzt, um ein benignes Steatosemodell analysieren zu können (Li et al., 2009).

Nach der *Pulse-Chase*-Analyse wurden die Gesamtlipide extrahiert, die Click-Reaktion durchgeführt und die eingebauten Alkin-Fettsäuren mithilfe einer DC aufgetrennt und sichtbar gemacht. Eine quantitative Analyse des Einbaus der Alkin-Fettsäuren in die verschiedenen Lipidklassen ist in Abb. 9 zu sehen. Durch die Verfolgung der alkinmarkierten Fettsäuren in der *Pulse-Chase*-Analyse sollte herausgefunden werden, welche verschiedenen Stoffwechselwege im Glycerophospholipidweg die Fettsäuren unter variierenden Insulin- und Glukosekonzentrationen einschlagen (Abb. 9A). Die Quantifizierungen in Abb. 9B zeigen dabei jeweils den prozentualen Anteil der alkinmarkierten Fettsäuren in eine bestimmte Lipidklasse im Vergleich zu den anderen pro *Chase*-Zeitpunkt und Spur. Die Alkin-Fettsäuren wurden in primären Hepatozyten sowohl in Neutrallipide als auch Membranlipide eingebaut (Abb. 9B). Hepatozyten, die in glukosereichem Medium (11 mM Glc) in An- oder Abwesenheit von Insulin gehalten wurden, zeigten einen schnellen anfänglichen Einbau der markierten Fettsäuren in DAG, gefolgt von TAG und PC.

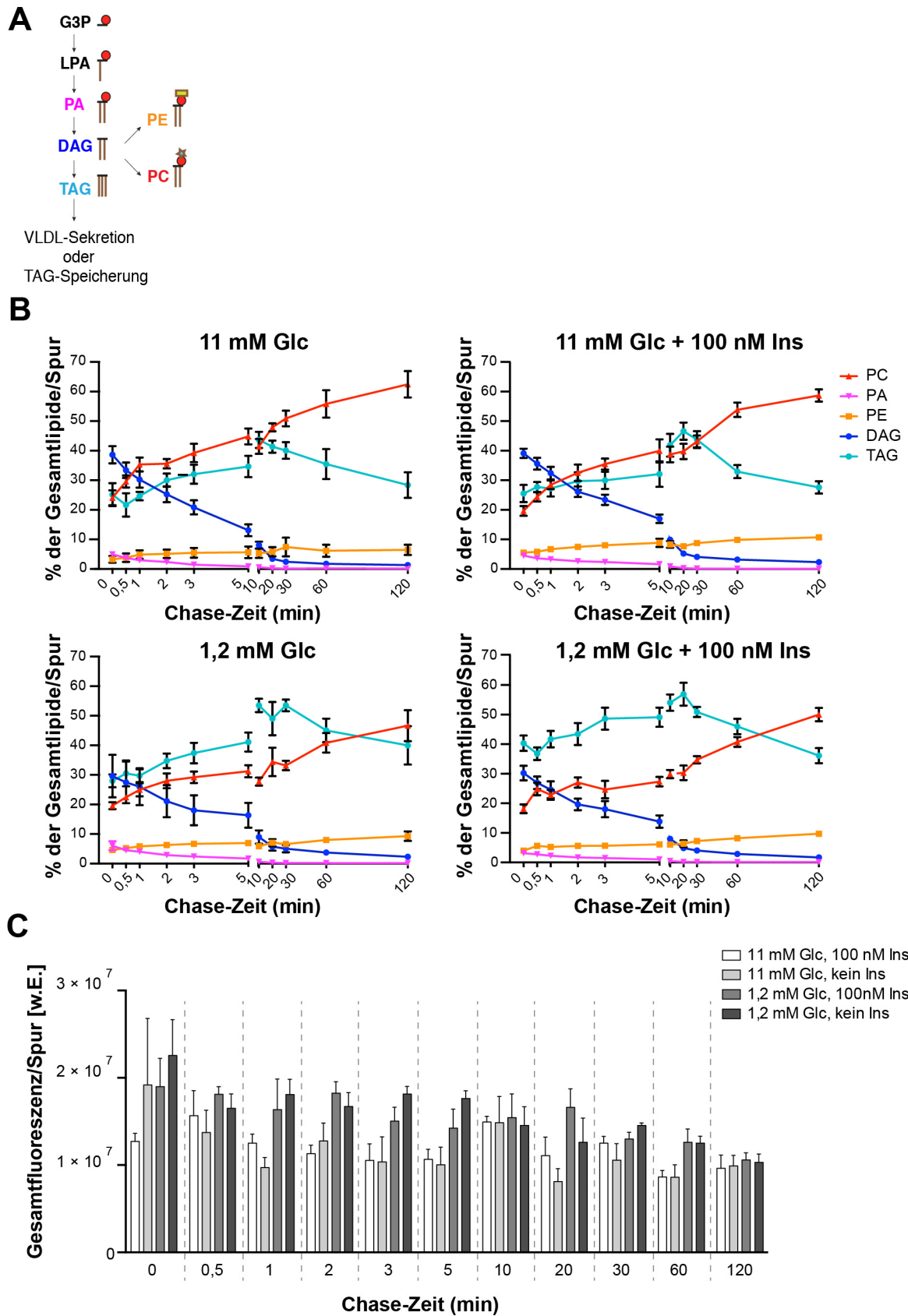


Abb. 9: Quantitative Analyse des Alkin-Fettsäureeinbaus in die verschiedenen zellulären Lipidklassen primärer Hepatozyten unter variierenden Glukose- und Insulinkonzentrationen. Fortsetzung Legende auf nächster Seite.

(Fortsetzung):

Hepatozyten aus 8 Wochen alten C57BL/6NCrl WT-Mäusen wurden für 2 h in glukosereichem (11 mM Glukose (Glc)) und glukosearmem (1,2 mM Glc) Medium in An- oder Abwesenheit von 100 nM Insulin (Ins) kultiviert und anschließend für *Pulse-Chase*-Experimente verwendet. Die Lipide wurden extrahiert und in der Click-Reaktion umgesetzt. Anschließend wurden sie auf einer DC-Platte separiert und mittels Fluoreszenz detektiert. **A)** Schema des Glycerophospholipidweges. **B)** Relative Prozentangaben der Gesamtlipidmenge für TAG, DAG, PE, PA und PC pro aufgetragener Spur nach Durchführung der *Pulse-Chase*-Analyse ($n \geq 5$). **C)** Quantifizierung der Gesamtmenge an aufgenommenen Alkin-Fettsäuren pro *Chase*-Zeitpunkt und Bedingung in willkürlichen Einheiten [w.E.] ($n=3$). Die Gesamtlipidmenge ist zwischen den unterschiedlichen *Chase*-Zeiten ($p \leq 0,001$) signifikant unterschiedlich (ANOVA-Analyse). Daten werden als Mittelwerte mit SEM gezeigt.

Während der *Chase*-Zeit wurde das markierte DAG vor allem in PC und TAG eingebaut, welche die Hauptendprodukte der zugegebenen Fettsäuren darstellen. Generell war der Einbau der Alkin-Fettsäuren in das Membranlipid PC und das Neutrallipid TAG am höchsten. Der Einbau in TAG nahm zunächst bis zu einer *Chase*-Zeit von 20 min auf bis zu 50 % der markierten Gesamtlipide zu und sank anschließend auf 25 % bei *Chase*-Zeit 120 min. Dagegen erhöhte sich der Einbau in PC über die Zeit von 20 % bei *Chase*-Zeitpunkt 0 min bis zu 60 % bei *Chase*-Zeitpunkt 120 min konstant. Hepatozyten, die in glukosearmem Medium (1,2 mM Glc) mit und ohne Insulin gehalten wurden, zeigten ein ähnliches Ergebnis. Auffällig war allerdings, dass bei den Bedingungen mit wenig Glukose von Anfang an mehr Fettsäuren in TAG eingebaut wurden verglichen mit den glukosereichen Bedingungen (Abb. 9B). Gleichzeitig war der Einbau in die Lipidklassen DAG und PC geringer. Die Gesamtfluoreszenz der aufgenommenen Alkin-Lipide war bei den glukosereichen Bedingungen etwas schwächer, allerdings insgesamt mit den glukosearmen Bedingungen vergleichbar (Abb. 9C).

5.1.3 Metabolismus der Fettsäuren Ölsäure und Palmitinsäure in primären Hepatozyten

Im Folgenden wurde analysiert welchen individuellen Einfluss die beiden Fettsäuren Ölsäure und Palmitinsäure auf den Glycerophospholipidweg ausüben und ob sich die Aufnahme der ungesättigten Ölsäure von dem der gesättigten Palmitinsäure unterscheidet. Daher wurde analysiert, ob sich der Einbau der Fettsäuren in die Lipidklassen im *Pulse-Chase*-Experiment ändert, wenn man anstelle einer Fettsäuremischung aus Ölsäure und Palmitinsäure die beiden Fettsäuren separat in der gleichen Konzentration (100 μ M) im *Pulse-Chase*-Experiment einsetzt (Abb. 10). Als Medium wurde das normale Adhäsionsmedium mit 11 mM Glukose ohne Insulin verwendet. Abb. 10A zeigt, dass beide Fettsäuren sowohl in Neutrallipide (DAG und TAG) als auch in Phospholipide (PE, PA und PC) eingebaut wurden.

Auch bei diesem Experiment wurden die alkinmarkierten Fettsäuren vor allem in das Neutrallipid TAG und das Phospholipid PC eingebaut. Auffällig war der enorme TAG-Anstieg zusammen mit einem verminderten PC-Einbau nach ausschließlicher Ölsäurefütterung. Der prozentuale TAG-Wert lag ohne *Chase* bei 45 % und stieg auf bis zu 65 % nach einer 20-minütigen *Chase*-Zeit. Damit war der TAG-Wert ohne *Chase* 10 % höher und nach 20 min *Chase*-Zeit 20 % höher im Vergleich zu dem bei der Zugabe der Fettsäuremischung in der experimentellen Bedingung mit 11 mM Glukose in Abb. 9B. Dagegen wurden anfangs lediglich 12 % der Alkin-Ölsäure in PC eingebaut und der prozentuale Anteil stieg nicht über 30 %. Damit war der Einbau in PC entsprechend 10 % bzw. 35% geringer als nach Zugabe der Fettsäuremischung unter der experimentellen Bedingung mit 11 mM Glukose (Abb. 9A-C). Bei der ausschließlichen Fütterung von Palmitinsäure war der Einbau in PC während der frühen *Chase*-Zeitpunkte leicht erhöht (maximaler Unterschied 10 % zu TAG). Ab *Chase*-Zeitpunkt 20 min war der Einbau von Palmitinsäure in die beiden Lipidklassen TAG und PC nahezu ausgeglichen und lag bei etwa 45 %. Im Vergleich zur Fütterung von ausschließlich Ölsäure und der Fütterung der Fettsäuremischung führte die Gabe von Palmitinsäure zu wesentlich geringeren Unterschieden im Einbau der Palmitinsäure in die beiden Lipidklassen TAG und PC. Beim Vergleich der Gesamtfluoreszenz zeigten beide Fettsäuren keine signifikanten Unterschiede (Abb. 10B). Insgesamt konnte mit dem Experiment gezeigt werden, dass Ölsäure und Palmitinsäure den Phospholipid- bzw. TAG-Stoffwechselweg unterschiedlich stark einschlagen, wobei Ölsäure primär für die TAG-Bildung verwendet wird, während Palmitinsäure sowohl in TAG als auch PC eingebaut wird.

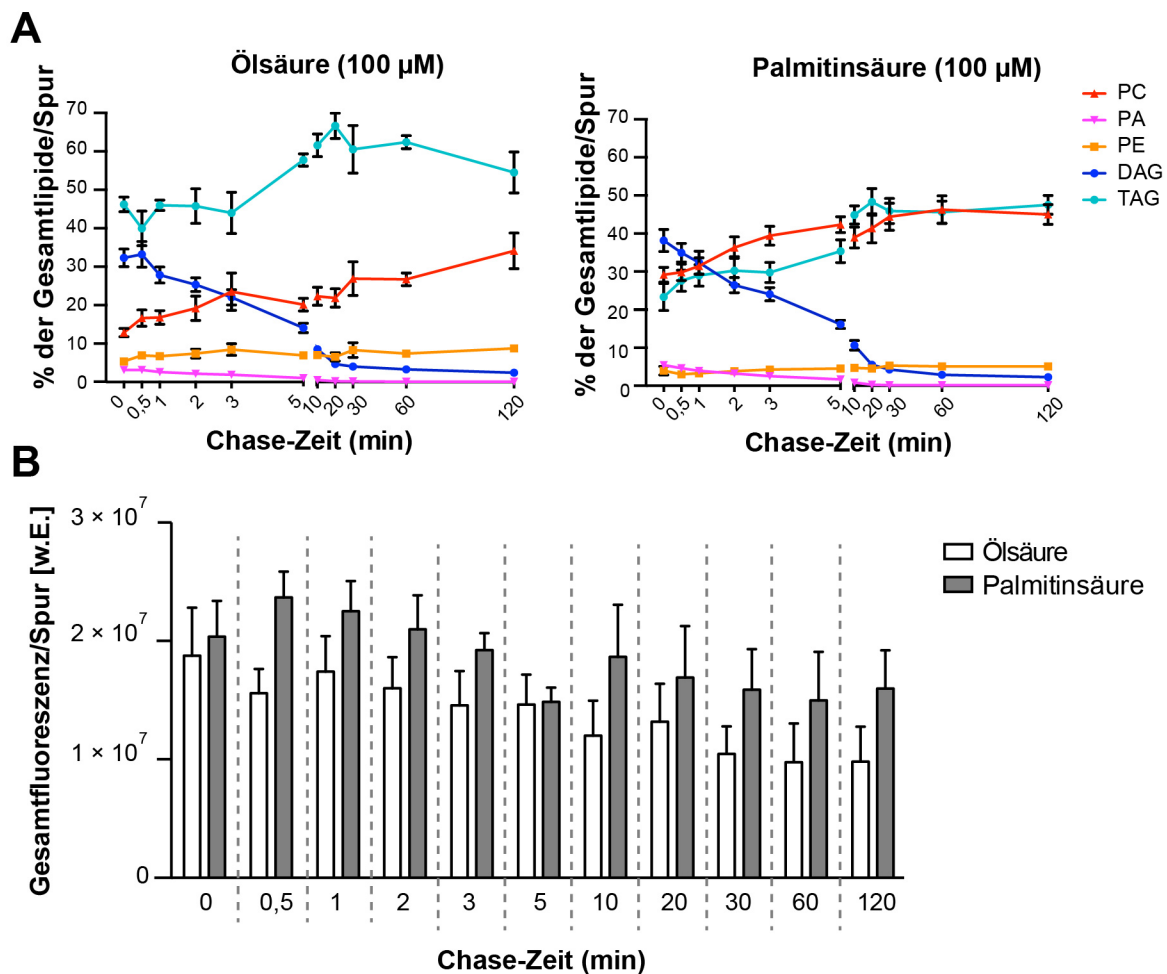


Abb. 10: Quantitative Analyse des Einbaus von Alkin-Ölsäure und Alkin-Palmitinsäure in die verschiedenen Lipidklassen primärer Hepatozyten.

Hepatozyten aus 8 Wochen alten C57BL/6NCrI WT-Mäusen wurden für 2 h in Adhäsionsmedium kultiviert und anschließend für *Pulse-Chase*-Experimente verwendet. Die Lipide wurden extrahiert, für die Click-Reaktion eingesetzt, auf einer DC-Platte getrennt und mittels Fluoreszenz detektiert. Die Lipidklassen wurden durch Verwendung entsprechender Standards bestimmt. **A)** Die Werte werden als relative Prozentangaben der Gesamtlipidmenge für TAG, DAG, PE, PA und PC pro aufgetragener Spur gezeigt ($n=4$). **B)** Quantifizierung der Gesamtmenge an aufgenommenen Alkin-Fettsäuren pro *Chase*-Zeitpunkt und experimenteller Bedingung in willkürlichen Einheiten [w.E.] ($n=4$). Daten werden als Mittelwerte mit SEM gezeigt. Die Differenz der Gesamtlipidmengen war zwischen Ölsäure und Palmitinsäure nicht signifikant unterschiedlich, während sie über die Zeit signifikant unterschiedlich war ($p \leq 0,001$).

5.1.4 Einfluss eines künstlichen Fettsäureüberschusses auf den Lipidmetabolismus primärer Hepatozyten

Da hohe Fettsäurekonzentrationen bei übergewichtigen Menschen gemessen werden (Boden, 2008), sollte im nächsten Versuch ein *in vitro* Modell für den Einfluss hoher Fettsäurekonzentrationen auf den hepatischen Metabolismus eingesetzt werden. Um herauszufinden, ob eine vorherige Fütterung hoher Mengen an Fettsäuren einen Einfluss auf den Einbau von Alkin-Fettsäuren in die verschiedenen Lipidklassen von primären Hepatozyten hat, wurden Hepatozyten aus der Leber isoliert und für 16 h mit 100 μ M bzw. 600 μ M Fettsäuren (unmarkierte Ölsäure und Palmitinsäure im Verhältnis 2:1) gefüttert.

Nach der Fütterung wurde eine *Pulse-Chase*-Analyse mit der Alkin-Fettsäuremischung durchgeführt, die zellulären Lipide extrahiert und die Alkin-Lipide in der nachfolgenden Click-Reaktion an 3-Azido-7-Hydroxy-Coumarin gebunden. Die markierten Lipide wurden mithilfe der Fluoreszenzdetektion sichtbar gemacht und ausgewertet. Wie in Abb. 11A zu erkennen, gibt es beim Vergleich der beiden experimentellen Bedingungen (100 μ M Fettsäure-Vorfütterung gegen 600 μ M Fettsäure-Vorfütterung) keinen wesentlichen Unterschied im Einbau der Alkin-Fettsäuren in die Lipidklassen DAG, PA und PE. Der Einbau in DAG war allerdings mit 50 % bei *Chase*-Zeitpunkt 0 min in beiden experimentellen Bedingungen im Vergleich zu den vorher gezeigten *Pulse-Chase*-Experimente ohne Vorfütterung relativ hoch (10-20 % höher als in Abb. 9 und Abb. 10). In beiden Bedingungen wurden mehr markierte Fettsäuren in TAG als in PC eingebaut. Der Einbau von TAG war in beiden experimentellen Bedingungen nach 10 min *Chase*-Zeit am deutlichsten (ca. 50 %). Dieser TAG-Einbau nahm bis 120 min *Chase*-Zeit auf bis zu 40 % ab, während der Einbau in PC über die Zeit in beiden Bedingungen von ca. 15 % bei *Chase*-Zeitpunkt 0 min auf 55-65 % bei *Chase*-Zeitpunkt 120 min prozentual zunahm. Die Gesamtfluoreszenz war bei 600 μ M Fettsäure-Vorfütterung etwas geringer, dennoch gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Vorfütterungsbedingungen (Abb. 11B). Lediglich über die *Chase*-Zeit veränderte sich die Gesamtfluoreszenz signifikant unterschiedlich. Bis auf den minimalen Anstieg des Einbaus in DAG und TAG war der Einbau der Fettsäuren in die Neutrallipide zu gering um ihn als Steatosemodell verwenden zu können. Um den Effekt erhöhter Fettsäuren im Blut auch *in vivo* zu untersuchen und um ein geeignetes Steatosemodell zu benutzen, wurde in folgenden Experimenten mit einem HFD-Mausmodell weitergearbeitet.

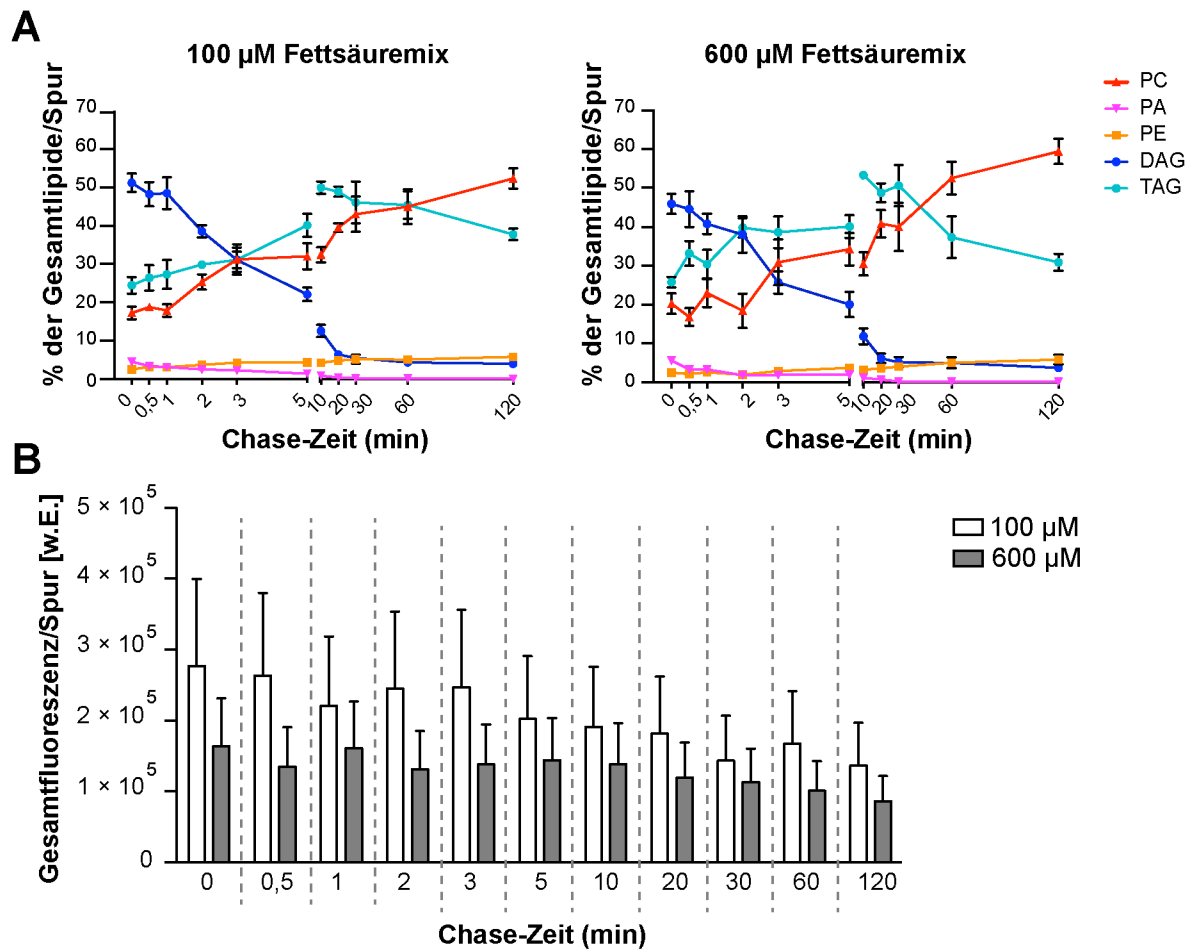


Abb. 11: Quantitative Analyse des Einbaus markierter Fettsäuren in verschiedene Lipidklassen primärer Hepatozyten nach vorheriger *in vivo* Fettsäurefütterung.

Hepatozyten aus 8 Wochen alten WT-Mäusen wurden 16 h mit einer 100 μM bzw. 600 μM unmarkierten Fettsäuremischung (2:1 Öläure:Palmitinsäure) in Adhäsionsmedium kultiviert und anschließend in *Pulse-Chase*-Experimenten wie bereits vorher beschrieben eingesetzt. **A)** Die Werte werden als relative Prozentangaben zur Gesamtlipidmenge für TAG, DAG, PE, PA und PC pro aufgetragener Spur gezeigt ($n=5$). **B)** Quantifizierung der Gesamtmenge an aufgenommenen Alkin-Fettsäuren pro *Chase*-Zeitpunkt und experimenteller Bedingung in w.E.(willkürliche Einheiten) ($n=5$). Daten werden als Mittelwerte mit SEM gezeigt. Die Gesamtfluoreszenz ist zwischen den beiden Fettsäure-Vorfütterungen nicht signifikant, während sich die Gesamtfluoreszenz über die *Chase*-Zeit signifikant verändert ($p \leq 0,001$).

5.2 HFD-Mäuse zeigten Tendenzen eines metabolischen Syndroms

Für das HFD-Modell wurden männliche, 8 Wochen alte WT-Mäuse für 10 Wochen mit einer HFD oder einer ND gefüttert. Die Gesamtmenge an konsumiertem Futter war zwischen beiden Gruppen vergleichbar (Abb. 12A), während die Kalorienaufnahme der HFD-Mäuse signifikant erhöht war (Abb. 12B). Dies spiegelt sich auch im zeitlichen Gewichtsverlauf der

Mäuse während der Fütterung wider. Die HFD-Tiere legten über die Zeit deutlich mehr an Gewicht zu (Abb. 12C). Bereits ab der fünften Fütterungswoche war das Gewicht der HFD-Tiere – im Vergleich zu dem der ND-Tiere – signifikant erhöht und lag am Ende der Fütterungszeit gemittelt 4g über dem Gewicht der entsprechenden ND-Gruppe. Hiermit übereinstimmend wiesen HFD-Tiere annähernd dreimal soviel abdominales und subkutanes Fett wie die ND-Tiere auf (Abb. 12D).

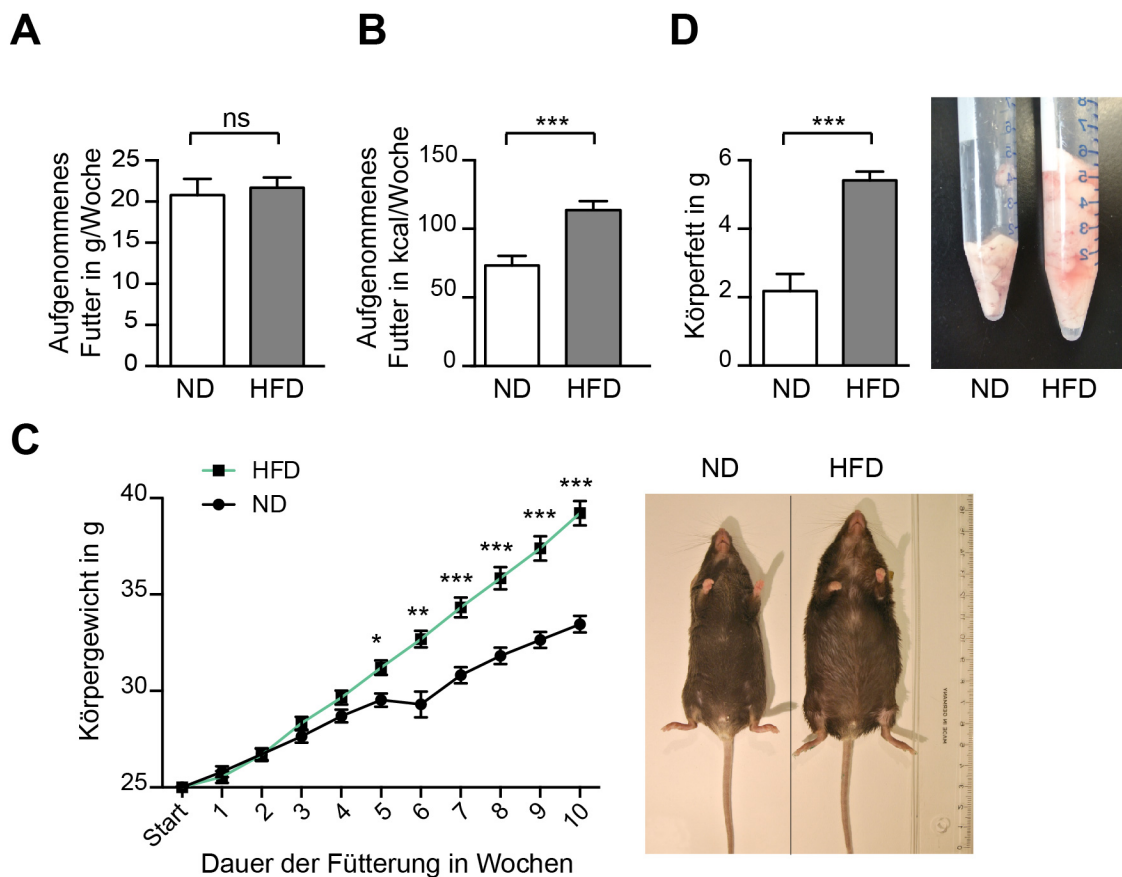


Abb. 12: Vergleich der Futtermenge und Kalorienaufnahme, des Gewichtsverlaufs und Fettgehalts bei ND- und HFD-Mäusen.

Männliche C57BL/6NCrI WT-Mäuse wurden mit einer HFD (60 % Fett) oder einer ND (10 % Fett) für 10 Wochen gefüttert. Aufnahme des Futters **A**) in g und **B**) in kcal von ND- und HFD-Mäusen pro Woche ($n \geq 4$). **C**) Links: Gewichtsentwicklung jeder Gruppe vom Fütterungsbeginn bis zur Fütterungswoche 10. Die Mäuse waren bei Fütterungsbeginn 8 Wochen alt (Start) und beide Gruppen wurden zuvor bereits 2 Wochen mit dem ND-Futter konditioniert ($n=30$ pro Gruppe). Rechts: Repräsentative ND- und HFD-Maus nach zehnwöchiger Fütterung. **D**) Links: Darstellung des gemittelten Körperfettgehalts in g von ND- und HFD-Mäusen nach zehnwöchiger Fütterung ($n=4$). Rechts: Gesamtmenge des abdominalen und subkutanen Fetts einer repräsentativen ND- und HFD-Maus. Daten werden als Mittelwerte mit SEM gezeigt. * p -Wert $\leq 0,05$; ** p -Wert $\leq 0,01$; *** p -Wert $\leq 0,001$.

Zur weiteren Charakterisierung des HFD-Mausmodells sollte analysiert werden, ob die HFD-Mäuse eine Insulinresistenz oder gestörte Glukosetoleranz aufweisen. Die Auswertung des

Insulin-Toleranztests zeigte im Vergleich zu den ND-Mäusen keine Unterschiede (Abb. 13A). Nach Durchführung des intraperitonealen Glukose-Toleranztests sank der Glukosespiegel nach Glukose-Applikation bei den HFD-Mäusen signifikant langsamer ab als bei den ND-Tieren (Abb. 13B). Daher war eine gestörte Glukoseantwort in den HFD-Mäusen verglichen zu den ND-Mäusen erkennbar.

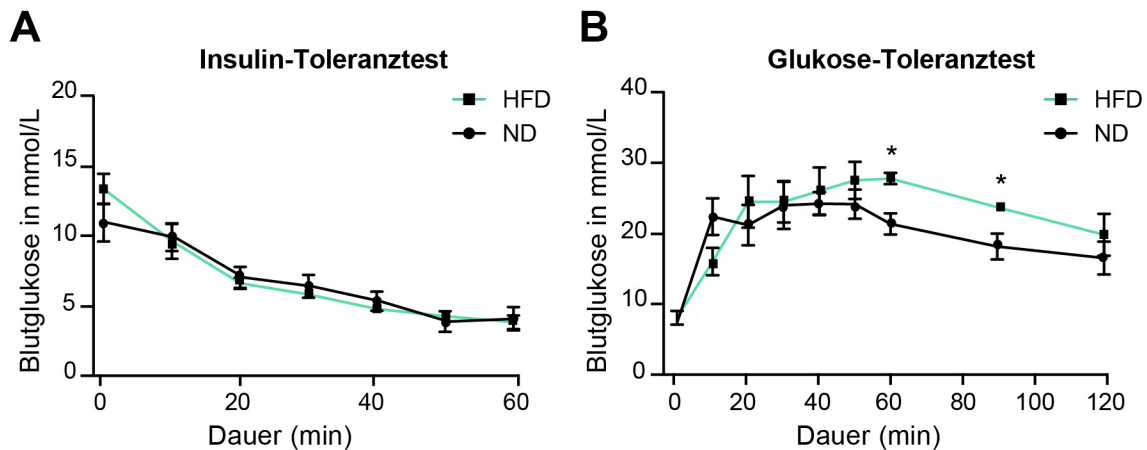


Abb. 13: Vergleich des Glukosespiegels in ND- und HFD-Mäusen während eines Insulin-Toleranztests und eines Glukose-Toleranztests.

A) Gemessene Glukosewerte im Blut von ND- und HFD-Mäusen nach intraperitonealer (i.p.) Applikation von 0,75 I.E. Insulin/kg Körpergewicht ($n \geq 4$) **B)** Gemessene Glukosewerte im Blutserum nach i.p. Glukoseinjektion von 2 mg/g Körpergewicht ($n \geq 3$). Messungen erfolgten nach den aufgezeigten Zeitpunkten. Daten werden als Mittelwerte mit SEM gezeigt. * p -Wert $\leq 0,05$.

Ferner wurden die metabolischen Parameter Cholesterol, FFS, ALT, AST, Leptin und TAG im Serum der ND- und HFD-Mäuse gemessen, um mögliche Unterschiede zwischen beiden Fütterungsgruppen zu analysieren. Die Konzentration von Cholesterol und FFS war in den HFD-Mäusen signifikant erhöht (Abb. 14A, 14B).

ALT, ein Marker für Leberschäden, war in der HFD-Bedingung gegenüber der ND-Bedingung signifikant erhöht (Abb. 14C). Die AST Werte waren ebenfalls erhöht, die Unterschiede erreichten jedoch keine statistische Relevanz (Abb. 14D). Die Leptinwerte waren in beiden Fütterungsgruppen vergleichbar (Abb. 14F). Die Werte für TAG zeigten zwischen beiden Fütterungsgruppen keine Unterschiede (Abb. 14E).

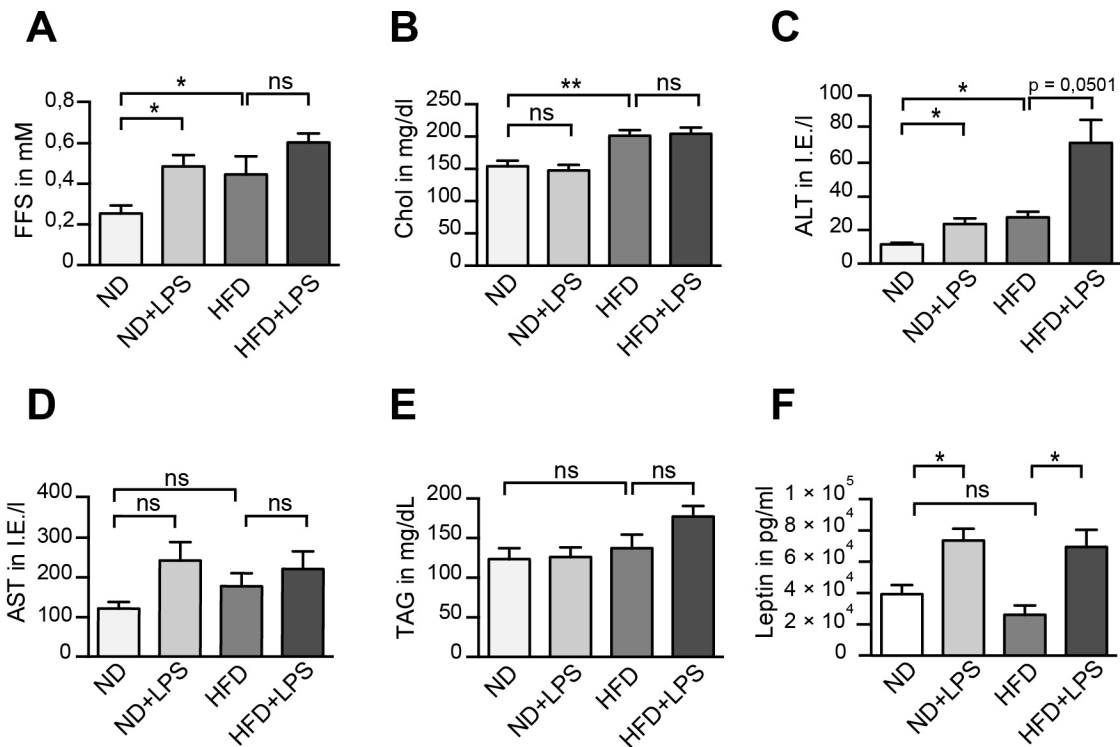


Abb. 14: Vergleich diverser metabolischer Serumparameter un behandelter und 1,5 h *in vivo* mit LPS behandelter ND- und HFD-Mäuse.

Es wurden folgende Parameter im Serum gemessen: **A)** Freie Fettsäuren (FFS) in mM ($n \geq 4$); **B)** Cholesterin (Chol) in mg/dl ($n \geq 3$); **C)** Alanin Transaminase (ALT) in I.E./l ($n \geq 3$); **D)** Aspartat Transaminase (AST) in I.E./l ($n \geq 3$); **E)** TAG in mg/dl; **F)** Leptin in pg/ml ($n \geq 2$). Daten werden als Mittelwerte mit SEM gezeigt. * p-Wert $\leq 0,05$; ** p-Wert $\leq 0,01$; ns: nicht signifikant.

Die Freisetzung von bakteriellem LPS in die Blutzirkulation als Konsequenz einer metabolischen Überladung wird oft als wichtiger Faktor für die Weiterentwicklung einer Steatose zu einer Steatohepatitis diskutiert (Seki und Schnabl, 2012). Aus diesem Grund wurden zusätzlich zum Vergleich von ND- und HFD-Mäusen noch Mäuse einbezogen, die *in vivo* 1,5 h i.p. mit LPS (15 mg/kg) stimuliert wurden. In der Tat zeigte die *in vivo* LPS-Stimulation zusätzlich erhöhte FFS-Werte in beiden Fütterungsgruppen, gestiegene Werte beider Leberschadenmarker, insbesondere ALT, und gestiegene Leptinwerte (Abb. 14A, 14C, 14D, 14F). Die Cholesterinwerte blieben unverändert (Abb. 14B). Triglyceride zeigten nach Behandlung der HFD-Mäuse mit LPS eine nicht signifikante leichte Erhöhung (Abb. 14E).

Zusammengefasst zeigten die Analysen der metabolischen Werte des HFD-Mausmodells, dass die HFD-Mäuse erste Anzeichen eines metabolischen Syndroms aufwiesen. Dies spiegelte sich in dem Vorhandensein von erhöhtem Körperfett, einer gestörten Glukoseantwort und gestiegenen Parametern im Blut wie z.B. FFS, ALT und Cholesterin wider. Eine *in vivo* LPS-Injektion erhöhte die Werte einiger metabolischen Parameter wie FFS, ALT, AST

und Leptin zusätzlich, was die bereits bekannte Rolle von LPS in der Entwicklung einer Steatose bzw. eines metabolischen Syndroms unterstreicht (Seki und Schnabl, 2012; Boutagy et al., 2016).

5.2.1 Steatotische Leberveränderungen in HFD-Mäusen

Im Folgenden sollte das Vorhandensein einer Steatose in den HFD-Mäusen genauer untersucht werden. Eine erste Analyse der Lebern zeigte zunächst keinen auffälligen Befund in Richtung einer steatotischen Leber. Das Lebergewicht der ND- und HFD-Mäuse war vergleichbar (Abb. 15A) und auch das prozentuale Verhältnis von Lebergewicht zu Körpergewicht war zwischen beiden Fütterungsgruppen nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 15B). Ebenso waren die Lebern der HFD-Mäuse vom makroskopischen Erscheinungsbild her zwar dem Körpergewicht entsprechend größer, aber ansonsten pathologisch unauffällig (Abb. 15C).

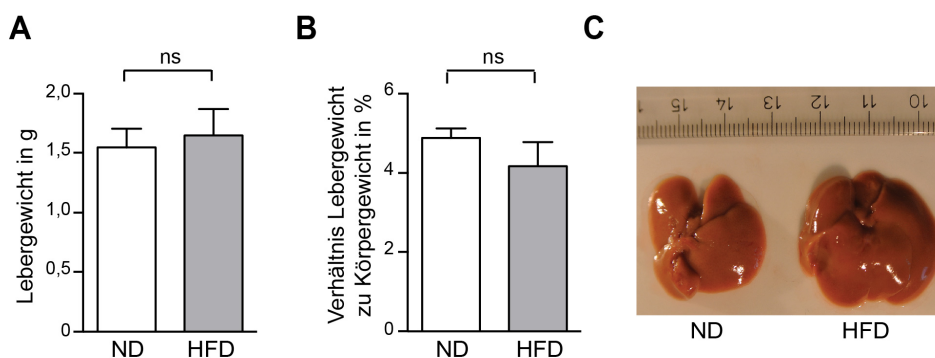


Abb. 15: Analysen der Lebern von ND- und HFD-Mäusen.

A) Vergleich des Lebergewichts in ND- und HFD-Mäusen ($n \geq 4$). **B)** Prozentualer Unterschied des Lebergewicht- zu Körpergewicht-Verhältnisses zwischen beiden Gruppen ($n \geq 4$). **C)** Repräsentative Leber einer ND- und einer HFD-Maus nach 10 Wochen Fütterung. Daten werden als Mittelwerte mit SEM gezeigt. ns: nicht signifikant.

Eine detaillierte Analyse der Lebern beider Fütterungsgruppen zeigte bei den HFD-Mäusen erste Anzeichen einer Steatose. So war die prozentuale Gesamtlipidmenge, die größtenteils aus TAG bestand, in den Lebern von HFD-Mäusen um das 1,8-fache gestiegen (Abb. 16A). Um zu untersuchen, ob auch auf zellulärem Niveau Unterschiede feststellbar sind, wurden hepatische Zellen aus der Leber isoliert. Die Reinheit wie auch Anzahl der Hepatozyten und CD11b-positiven Kupfferzellen lag nach der Isolation im Normalbereich (Fig. 17A, 17B). Nach Anfärbung der Lipidtröpfchen in isolierten Hepatozyten konnte eine deutliche Lipidakkumulierung in HFD-Mäusen im Vergleich zu ND-Mäusen gezeigt werden (Abb. 16B). Wurde den ND- und HFD-Mäusen zusätzlich für 1,5 h *in vivo* LPS i.p. (15 mg/kg) injiziert, stieg die Gesamtlipidmenge in beiden Gruppen erneut an, der Unterschied erreichte

allerdings nur bei der ND-Bedingung statistische Signifikanz (Abb. 16A). Eine hepatische Lipidakkumulierung war auch in Leberschnitten von ND- und HFD-Mäusen erkennbar und war bei den ND-Mäusen ausgeprägter, wenn diese zuvor *in vivo* mit LPS stimuliert wurden (Abb. 16C). Bei den HFD-Schnitten war kein Unterschied zwischen den unstimulierten und *in vivo* mit LPS stimulierten zu erkennen.

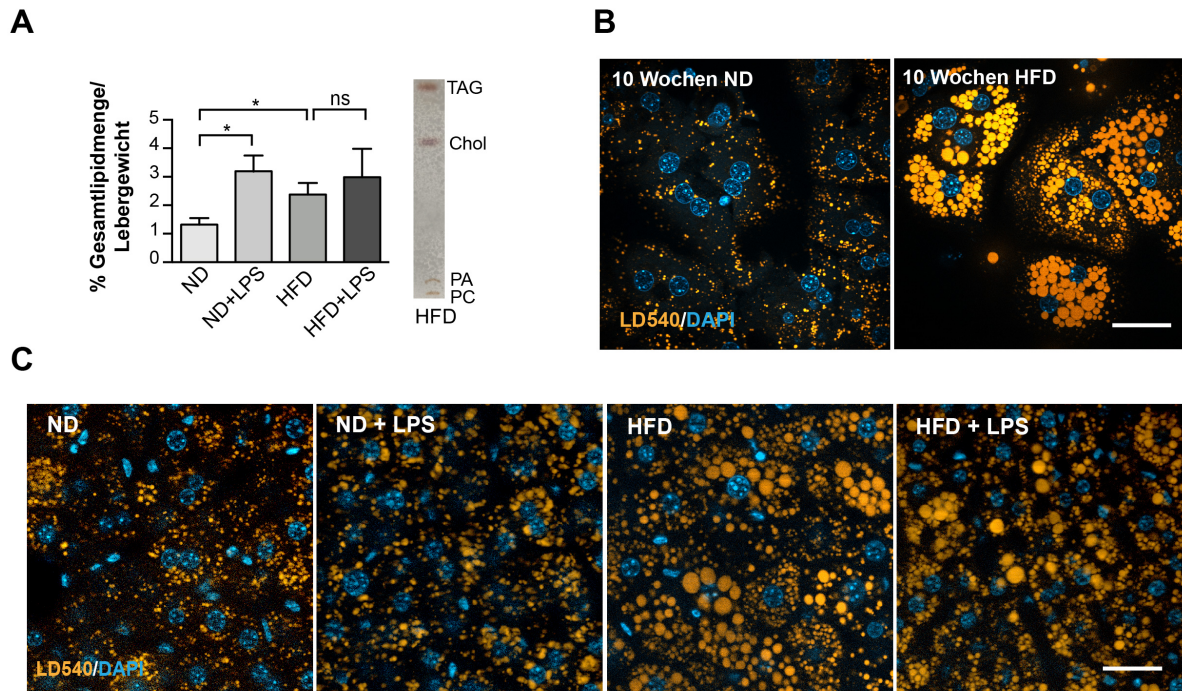


Abb. 16: Vergleich der Gesamtlipidmenge in Lebern sowie der Lipidakkumulierung in primären Hepatozyten und Leberschnitten von ND- und HFD-Mäusen.

A) Gemittelte Prozentzahlen der Gesamtlipidmenge pro Lebergewicht für unbehandelte und 1,5 h *in vivo* mit LPS behandelte ND- und HFD-Mäuse (links, $n \geq 3$). Rechts: Der Anteil an TAG im Verhältnis zum Gesamtlipidextrakt wurde festgestellt, indem die gewogenen Lipide auf einer DC-Platte aufgetrennt und anschließend mit Schwefelsäure oxidiert wurden. **B)** Färbung der Lipidtröpfchen mit dem Farbstoff LD540 (orange) und der Zellkerne mit DAPI (blau) in primären Hepatozyten nach 10 Wochen Fütterung. Maßstab: 50 μm . **C)** 50 μm Leberschnitte von unbehandelten und 1,5 h *in vivo* LPS behandelten ND- und HFD-Mäusen, die mit LD540 (orange) und DAPI (blau) angefärbt wurden. Daten werden als Mittelwerte mit SEM gezeigt. ns: nicht signifikant, * p-Wert $\leq 0,05$.

Die Lebern der HFD-Mäuse können aufgrund der gemessenen erhöhten Gesamtlipidmengen und Lipidtröpfchenanlagerungen in Hepatozyten bereits als steatotisch betrachtet werden. Die Steatose war auch in Leberschnitten von LPS-behandelten ND-Mäusen zu erkennen. Dies deutet darauf hin, dass LPS auch einen Einfluss auf die Entwicklung einer Steatose hat. Wurden HFD-Mäuse *in vivo* mit LPS behandelt, wurde die Steatose in den Leberschnitten nicht verstärkt. Diese Veränderungen waren allerdings noch nicht auf makroskopischer Ebene beispielsweise durch eine hellere Farbe der Leber erkennbar.

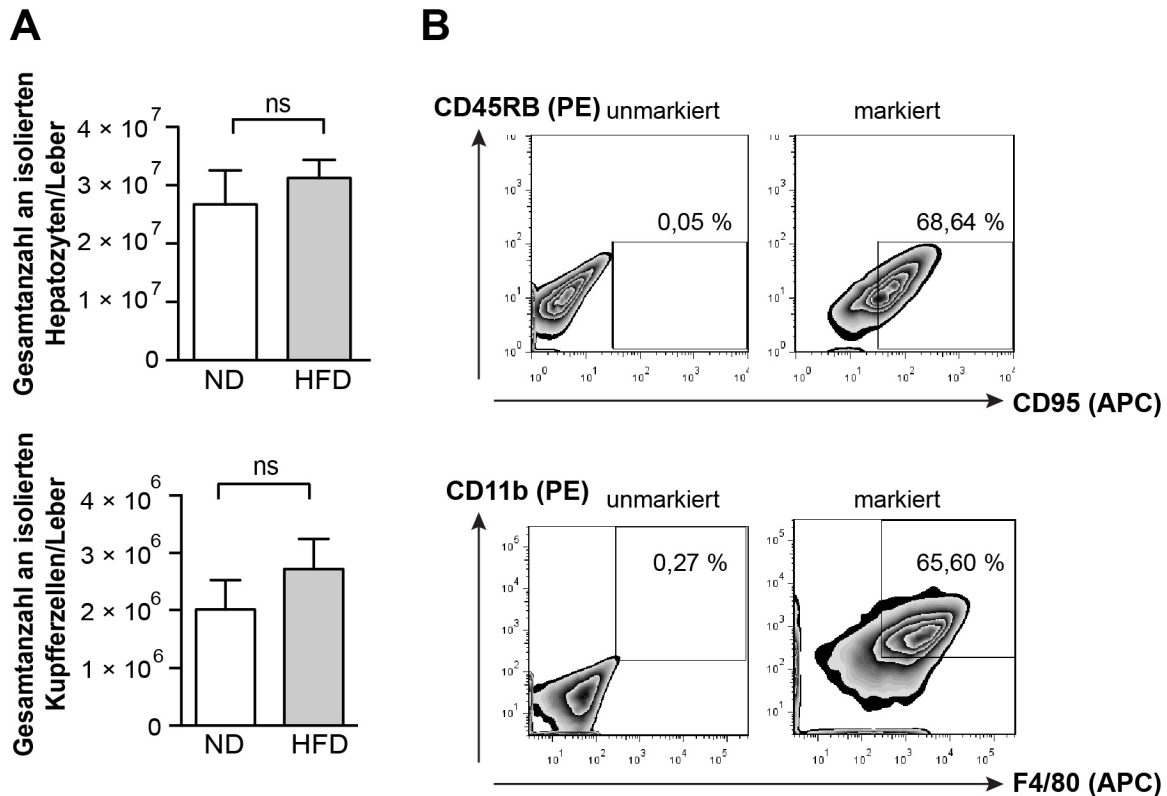


Abb. 17: Gesamtanzahl und Reinheit isolierter Hepatozyten und Kupferzellen.

Die Reinheit von Hepatozyten und Kupferzellen wurde mittels FACS-Analyse bestimmt. **A)** Gesamtanzahl an Kupferzellen und Hepatozyten nach der Isolation ($n \geq 3$). **B)** Primäre Hepatozyten wurden als CD45-negative/CD95-positive Zellen definiert (entsprechend dem Protokoll von Goncalves et al., 2007). Nach einer CD11b MACS-Isolation wurden residente Kupferzellen als CD11b/F4/80 positive Zellen definiert. Daten werden als Mittelwerte mit SEM gezeigt. ns: nicht signifikant.

5.2.2 Analyse des Lipidmetabolismus in Hepatozyten von ND- und HFD-Mäusen

Um den Fettsäuremetabolismus auf zellulärem Niveau zu charakterisieren, wurde eine *Pulse-Chase*-Analyse mit primären Hepatozyten durchgeführt. Wie bereits in vorigen Versuchen sollte der Fettsäureeinbau in die Hauptlipidklassen des Glycerophospholipidweges durch Verwendung von alkinmarkierten Fettsäuren und einer fluoreszenzbasierten Detektion visualisiert werden. Nach den zuvor durchgeführten Versuchen, die eine Steatose in den HFD-Mäusen zeigten, würde man einen gesteigerten Einbau von Alkin-Fettsäuren in TAG in der HFD-Bedingung erwarten. Hepatozyten der ND-Mäuse zeigten einen initialen Einbau der markierten Fettsäuren vor allem in DAG, PC und TAG (Abb. 18A, 18B). Im Laufe der *Chase*-Zeit wurde das markierte DAG vor allem in PC und TAG umgewandelt, welches die Hauptendprodukte des Glycerophospholipidweges nach Zugabe einer Fettsäure

darstellen. Die Hepatozyten der HFD-Mäuse zeigten entgegen der Erwartung ein sehr ähnliches Bild (Abb. 18A, 18B). Die größten Unterschiede wurden im DAG Metabolismus gefunden. Die Anfangsmenge an markiertem DAG sowie das Verhältnis 1,3-DAG zu 1,2-DAG war in den HFD-Hepatozyten verglichen zu den Hepatozyten der ND-Bedingung größer. Während 1,2-DAG ein anabolisch biosynthetisiertes DAG darstellt und von PA durch Dephosphorylierung abstammt, ist 1,3-DAG ein Produkt der katabolischen Tätigkeit von ATGL auf TAG. Aus diesem Grund zeigt ein verändertes Verhältnis dieser beiden DAGs einen erhöhten Umsatz an TAG in HFD-Hepatozyten. Der Metabolismus von PA und PE wie auch die finalen Mengen an markiertem PC und TAG waren in beiden Fütterungsbedingungen sehr ähnlich. Interessanterweise war die Gesamtmenge an aufgenommenen Alkin-Lipiden in der ND-Bedingung etwa dreimal so hoch wie in der HFD-Bedingung, jedoch mit hoher Streuung (Abb. 18C). Insgesamt konnte das *Pulse-Chase*-Experiment mit den isolierten Hepatozyten allerdings nicht den steatotischen Phänotyp der HFD-Mäuse erklären, da kein erhöhter Einbau in die Neutrallipide zu beobachten war.

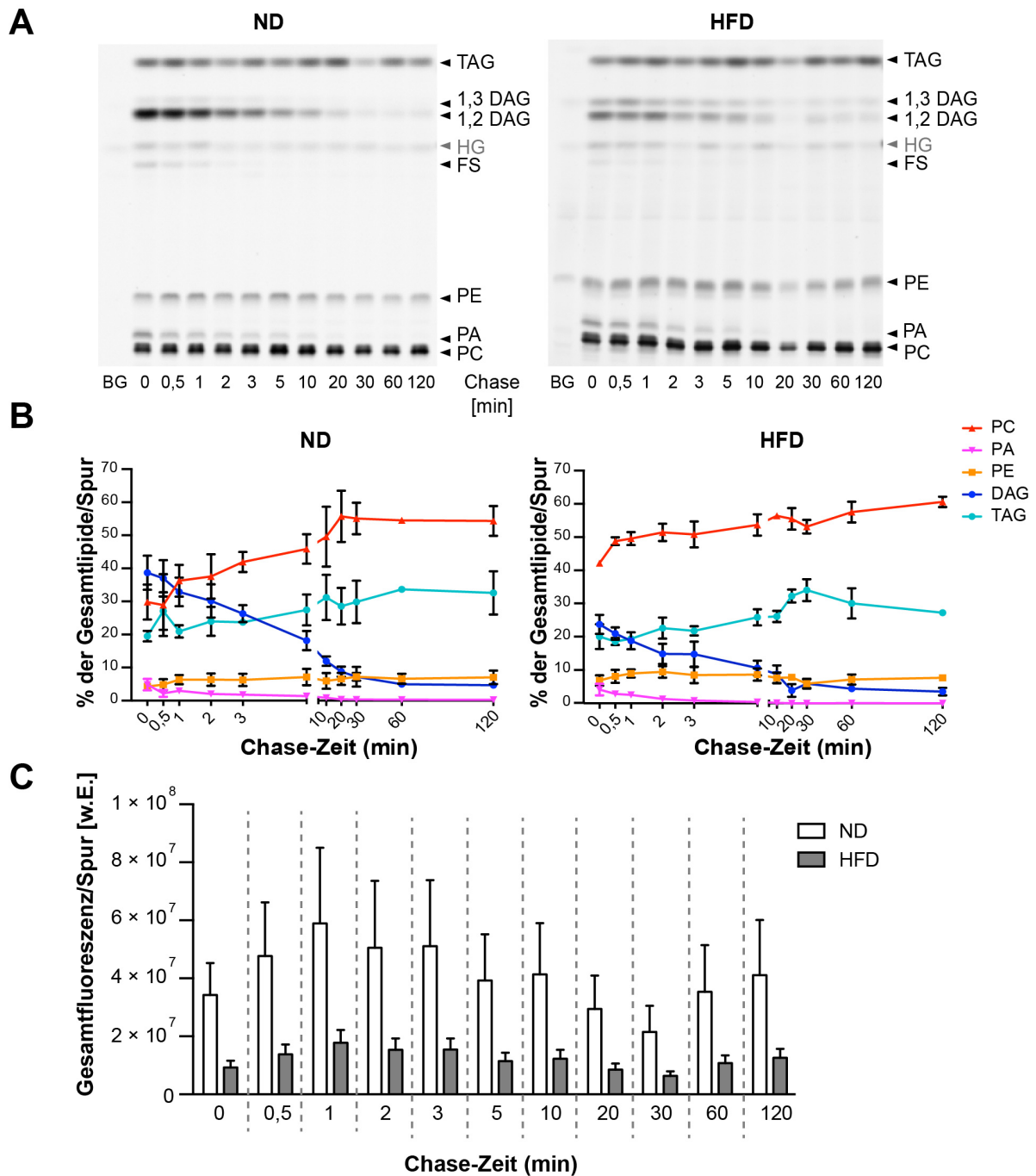


Abb. 18: Der Lipidmetabolismus in Hepatozyten von ND- und HFD-Mäusen zeigt Unterschiede im DAG-Metabolismus und in der Gesamtlipidmenge.

A) DC-Platten nach *Pulse-Chase*-Experimenten mit Hepatozyten von ND- oder HFD-Mäusen. **B)** Quantifizierung der DC-Platten durch Bestimmung des prozentualen Anteils einer Lipidklasse am Gesamtlipid pro Spur ($n \geq 3$). **C)** Quantifizierung der Gesamtmenge an aufgenommenen Alkin-Fettsäuren pro *Chase*-Zeitpunkt und Bedingung in w.E. (willkürliche Einheiten) ($n=3$). Die Gesamtfluoreszenz/Spur ist zwischen ND und HFD nicht signifikant ($p \leq 0,05$), während die *Chase*-Zeit einen signifikanten Einfluss auf die Gesamtfluoreszenz ausübt ($p \leq 0,001$). Dargestellt sind die Mittelwerte mit SEM.

5.2.3 Einfluss Kupfferzell-sezernerter Faktoren

Eine mögliche Erklärung für den vergleichbaren Metabolismus in Hepatozyten von ND- und HFD-Mäusen in der *Pulse-Chase*-Analyse könnte die in den bisherigen beschriebenen Experimenten nicht einbezogene Beteiligung von anderen Zelltypen in der Leber sein. Es wurde in der Literatur beschrieben, dass besonders Kupfferzellen über sezernierte Faktoren mit Hepatozyten kommunizieren (Bilzer, Roggel und Gerbes, 2006). Aus diesem Grund wurden Kupfferzellen aus ND- und HFD-Mäusen isoliert (Abb. 19) und die Sekretion von ausgewählten Zytokine analysiert. TNF, IL-1 β und IL-6 wurden als proinflammatorische Zytokine und IL-10 als antiinflammatorisches Zytokin untersucht. IL-10 konnte bereits in mehreren Studien gezeigt werden der Entwicklung einer Steatose entgegenzuwirken (Braunersreuther et al., 2012). Die proinflammatorischen Zytokine TNF, IL-1 β und IL-6 sind auch bekannt dafür, den Lipidmetabolismus als Adipokine regulieren können (Feingold und Grunfeld, 1992; Vettor et al., 2005).

Ebenfalls wurde die Zytokinsekretion von Kupfferzellen aus 1,5 h *in vivo* LPS-stimulierten ND- und HFD-Mäusen untersucht, um den Effekt einer akuten Entzündung auf Kupfferzellen zu analysieren. Während die Sekretion der Zytokine IL-1 β , IL-6 und IL-10 durch Kupfferzellen aus ND- und HFD-Mäusen unverändert war, zeigten HFD-Kupfferzellen eine erhöhte signifikante TNF-Sekretion (Abb. 19). Wurden ND-Mäuse zusätzlich mit LPS *in vivo* behandelt, stieg die TNF-Sekretion an. Bei HFD-Mäusen war nach LPS-Stimulation jedoch kein weiterer Anstieg der TNF-Sekretion zu beobachten. Für IL-1 β , IL-6 und IL-10 konnte in Kupfferzellen aus sowohl ND- als auch HFD-Mäusen nach *in vivo* LPS-Stimulation eine erhöhte, wenn auch nicht signifikant erhöhte Sekretion gezeigt werden (Abb. 19). Insgesamt ergaben die Messungen, dass die Sekretion von proinflammatorischem TNF von Kupfferzellen aus HFD-Mäusen im Vergleich zu Kupfferzellen aus ND-Mäusen signifikant erhöht war.

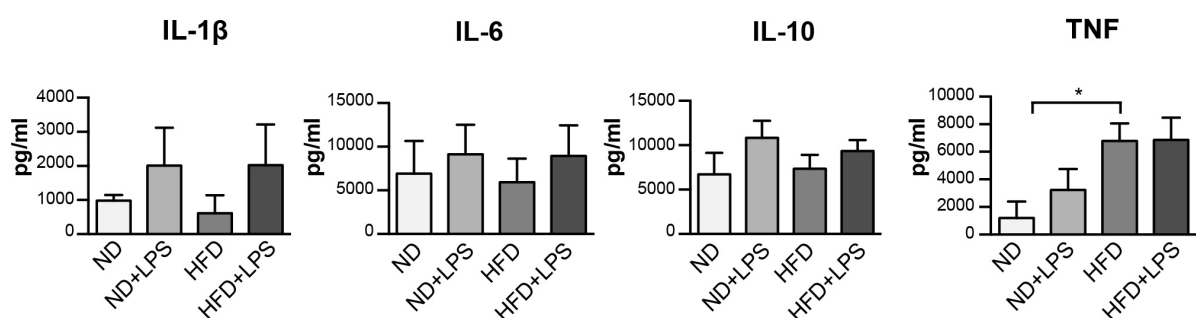


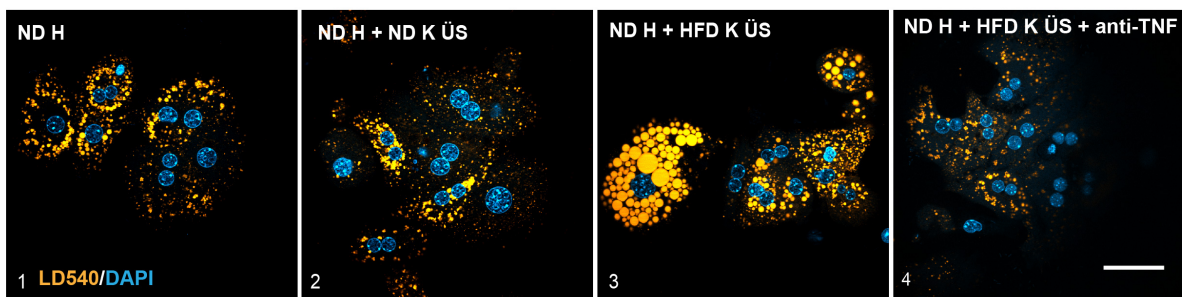
Abb. 19: Vergleich der Zytokinsekretion isolierter Kupfferzellen in unbehandelten und mit LPS-behandelten ND- und HFD-Mäusen.

Kupfferzellen wurden aus unbehandelten oder 1,5 h *in vivo* mit LPS behandelten Mäusen isoliert und für 16 h kultiviert. Die Zytokinsekretion wurde mithilfe eines ELISA im Überstand gemessen (IL-1 β n \geq 3, IL-6 n \geq 4, IL-10 n \geq 2, TNF n \geq 3). Die Daten werden als Mittelwerte mit SEM angegeben. * p-Wert \leq 0,05.

5.2.4 Einfluss des Kupferzellüberstandes auf eine Steatose in Hepatozyten

Im Folgenden sollte getestet werden, ob freigesetzte Zytokine der Kupferzellen für die detektierte Steatose in HFD-Hepatozyten verantwortlich sind. Hierzu wurden primäre Hepatozyten aus ND-Mäusen isoliert und mit dem Überstand von Kupferzellen entweder aus ND- oder HFD-Mäusen inkubiert. Interessanterweise induzierte nur der HFD-Kupferzellüberstand eine erhöhte Lipidtröpfchengröße und -menge pro Zelle (Abb. 20A, Bild 3; 20B).

A



B

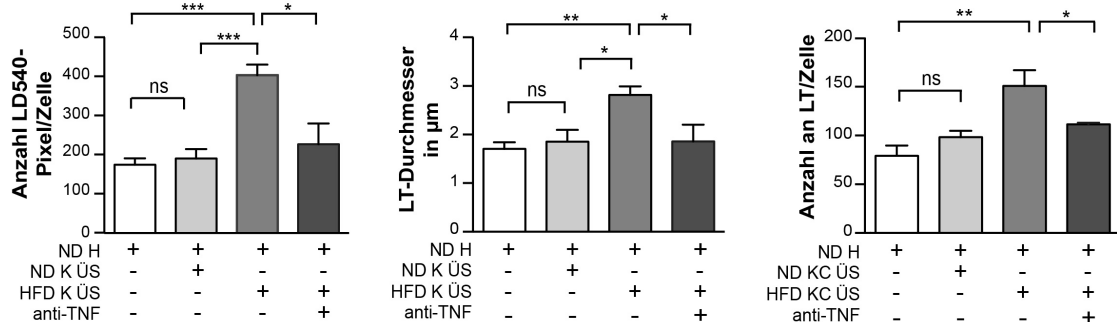


Abb. 20: Der Kupferzellüberstand von HFD-Mäusen erzeugt einen steatotischen Phänotyp in ND-Hepatozyten *via* TNF.

A) Frisch isolierte Hepatozyten (H) aus ND-Mäusen wurden separat (1) oder mit dem Überstand (ÜS) von Kupferzellen (K) aus ND-(2) oder HFD-(3) Mäusen kultiviert. In (4) wurde zusätzlich zu dem ÜS von HFD K noch ein neutralisierender TNF-Antikörper dazugegeben. Zellen wurden mit LD540 für die Lipidtröpfchen (LT) und DAPI für die Nuklei angefärbt. Maßstab: 50 µm. **B)** Quantifizierung des gefärbten LD540-Bereichs/Zelle, des LT-Durchmessers in µm und der LT-Anzahl/Zelle bei verschiedenen Bedingungen (n≥3). Mittelwerte mit SEM werden gezeigt. ns: nicht signifikant; * p-Wert≤0,05; ** p-Wert≤0,01; *** p-Wert≤0,001.

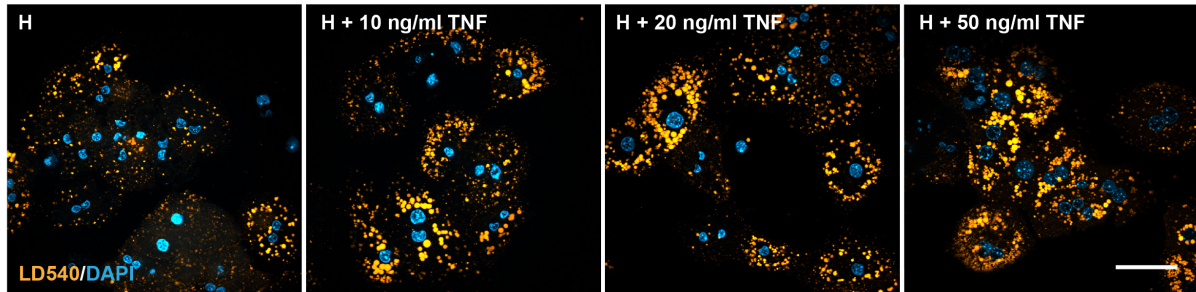
Diese Lipidakkumulierung war nicht erkennbar, wenn Hepatozyten mit Kupferzellüberstand aus ND-Mäusen inkubiert wurden (Abb. 20A, Bild 2; 20B) oder zusätzlich ein neutralisierender anti-TNF-Antikörper in den HFD-Kupferzellen Überstand für 16 h dazugegeben wurde (Abb. 20A, Bild 4; 20B). Dieses Ergebnis zeigt, dass von Kupferzellen sezernierte lösliche

Faktoren von HFD-Mäusen eine Steatose in Hepatozyten auslösen können, die zuvor keine Steatose aufwiesen, und dass TNF hierbei eine entscheidende Rolle spielt.

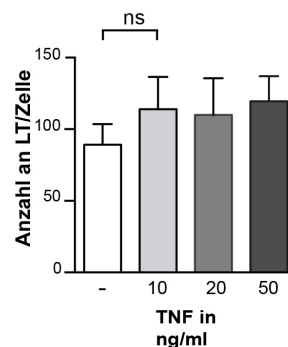
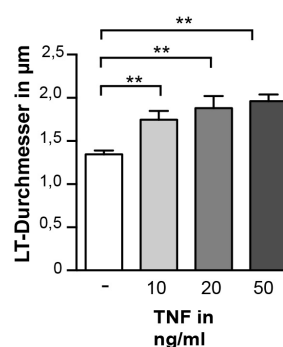
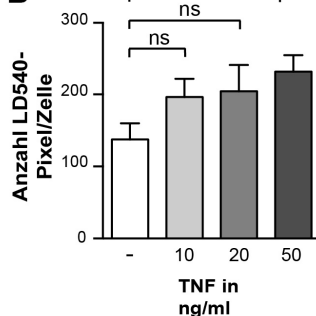
5.2.5 TNF als Stimulus für die Entstehung einer Steatose in HFD-Mäusen

Um herauszufinden, ob die TNF-Sekretion allein ausreichend ist, um eine Steatose in Hepatozyten von ND-Mäusen zu induzieren, wurden primäre Hepatozyten mit verschiedenen TNF-Konzentrationen behandelt. Es konnte eine dosisabhängige Zunahme der Lipidtröpfchen in Größe und Fläche detektiert werden (Abb. 21A; 21B). Dies zeigt zusammen mit den *Pulse-Chase*-Experimenten, dass eher aus Kupfferzellen stammendes TNF anstelle einer metabolischen Überlastung der Hepatozyten der Schlüsselfaktor in der Entwicklung einer Steatose darstellt. Gleichzeitig wirft es die Frage auf, wie die Fettsäureüberlastung der HFD in der Lage ist, Kupfferzellen zu aktivieren, sodass diese verstärkt TNF sekretieren. Um diese Frage zu klären, wurden isolierte Kupfferzellen mit 0,5 mM der Fettsäuremischung (2:1 Ölsäure:Palmitinsäure) behandelt, ähnlich der Plasmakonzentrationen der Fettsäuren unter HFD (Abb. 14A).

A



B



C

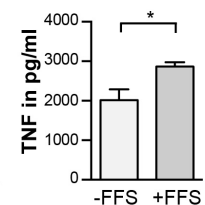


Abb. 21: Der Einfluss von TNF auf die Menge und Größe der Lipidtröpfchen in ND-Hepatozyten. Primäre Hepatozyten wurden aus ND-Mäusen isoliert und entweder unbehandelt gelassen oder für 1,5 h mit den jeweils angegebenen TNF-Konzentrationen behandelt. **A)** Mikroskopiebilder nach Anfärbung der Lipidtröpfchen (LT) mit LD540 und der Zellkerne mit DAPI. Maßstabsbalken: 50 µm.

B) Quantifizierung der Anzahl an LD540-Pixeln pro Zelle, des LT-Durchmessers in µm und der **Fortsetzung Legende auf nächster Seite.**

(Fortsetzung):

Anzahl an LT (n=6). **C)** TNF-Sekretion isolierter Kupfferzellen nach 16 h Behandlung mit 0,5 mM FFS. Daten werden als Mittelwerte mit SEM dargestellt. ns: nicht signifikant; *p-Wert \leq 0,05; **p-Wert \leq 0,01.

Tatsächlich resultierte dies in einer signifikanten Erhöhung von freigegebenen TNF (Abb. 21C) – ein Befund, der darauf hindeutet, dass Kupfferzellen bei erhöhten Fettsäurekonzentrationen TNF sekretieren.

5.3 Effekt einer kurzzeitigen *in vivo* LPS-Stimulation auf den hepatischen Lipidmetabolismus

Erhöhte TNF-Konzentrationen kommen nicht nur durch eine HFD-Gabe zustande. So ist bekannt, dass auch verschiedene andere inflammatorische Stimuli wie das bakterielle Oberflächenantigen LPS für die Ausschüttung von TNF sorgen (Yee, Ganey und Roth, 2003; Yang et al., 2016). Wie bereits in Kapitel 5.2 beschrieben, wiesen insbesondere die mit LPS behandelten ND-Mäuse erhöhte Serumparameter und Lebergesamtlipidmengen auf (Abb. 14; 16). Um dieses Phänomen mechanistisch zu untersuchen, wurden in einem nächsten Experiment 8 Wochen alte C57BL/6NCrl WT-Mäuse mit LPS für 1,5 h *in vivo* nach i.p. LPS-Injektion stimuliert.

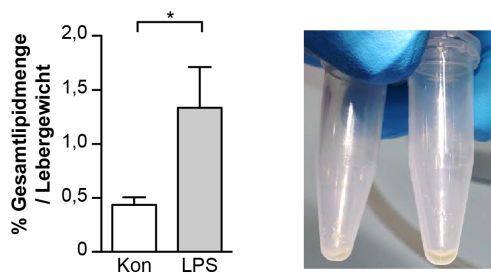
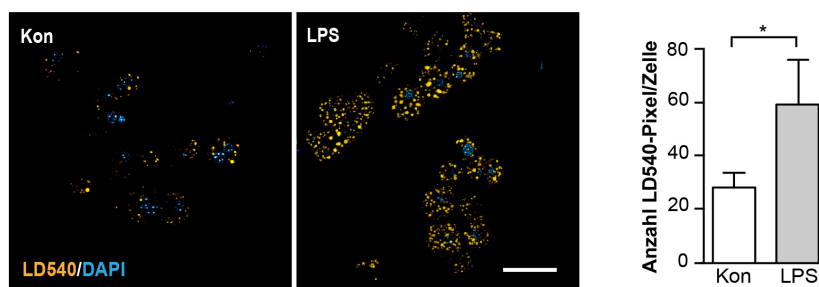
A**B**

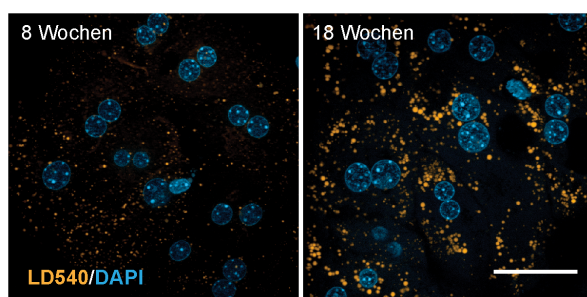
Abb. 22: Einfluss einer *in vivo* LPS-Behandlung auf die Gesamtlipidmenge und hepatische Lipidtröpfchenakkumulation.

Fortsetzung Legende auf nächster Seite.

(Fortsetzung):

A) Zur Bestimmung der Gesamtlipidmenge wurden die Lebern aus einer unbehandelten und 1,5 h *in vivo* mit LPS behandelten Maus entnommen, in Methanol:Chloroform (5:1) homogenisiert, die Lipide extrahiert, in einer Vakuumzentrifuge aufkonzentriert und zum Schluß gewogen ($n \geq 4$). Links: Prozentualer Anteil der Gesamtlipidmenge/Lebergewicht, Rechts: Foto der mit dem Gesamtlipid gefüllten Reaktionsgefäße nach Aufkonzentrieren in der Vakuumzentrifuge. **B)** Links: Primäre Hepatozyten wurden aus einer unbehandelten und einer 1,5 h *in vivo* mit LPS behandelten Maus isoliert, nach 2 h Zellkultur fixiert und mit LD540 (orange) und DAPI (blau) angefärbt, um die Bildung von Lipidtröpfchen nach LPS-Behandlung darzustellen. Maßstab: 50 μm . Rechts: Quantifizierung der mit LD540 gefärbten Fläche ($n=3$). Daten werden als Mittelwerte mit SEM gezeigt. ns: nicht signifikant, * $p\text{-Wert} \leq 0,05$.

Wie bei den HFD-Tieren (Abb. 16B) war die Gesamtlipidmenge nach LPS-Injektion im Vergleich zu der in unstimulierten Kontrolltieren erhöht (Abb. 22A). Ebenso waren nach LPS-Injektion größere und mehr Lipidtröpfchen in den Hepatozyten erkennbar (siehe Abb. 22B). Aus diesem Resultat und den vorherigen Ergebnissen aus Kapitel 5.2 wird deutlich, dass auch eine *in vivo* LPS-Stimulation unabhängig von einer HFD-Fütterung eine Steatose in Hepatozyten auslösen kann. Es gilt zu beachten, dass die absoluten Werte der Quantifizierung nicht vergleichbar mit denen in Abb. 16B sind, da die Tiere in Abb. 22 nicht mit ND oder HFD für weitere 10 Wochen gefüttert wurden. Die geringere LD540-Gesamtfläche in diesem Experiment, verglichen zu den davor gezeigten ND/HFD-Experimenten, wird dadurch verursacht, dass ND- und HFD-Mäuse 10 Wochen älter als die WT-Mäuse waren und zusätzlich eine spezielle Fütterung erhalten haben. Die jüngeren Tiere hatten daher geringere basale TAG-Spiegel (Abb. 23). Das bedeutet, dass die Lipidakkumulation altersabhängig ist – eine Tatsache, die bereits auch durch andere Arbeitsgruppen gezeigt werden konnte (Petersen et al., 2003; Ibdah et al., 2005).

**Abb. 23: Altersabhängige Lipidtröpfchenakkumulation in Hepatozyten.**

Hepatozyten wurden aus 8 und 18 Wochen alten C57BL/6NCrI WT-Mäusen isoliert und mit LD540 (orange) und DAPI (blau) 2 h nach Ausplattierung gefärbt. Maßstab: 50 μm .

5.3.1 LPS-Einfluss auf die Fettsäureaufnahme und TAG-Sekretion in Hepatozyten

Um herauszufinden, warum Hepatozyten aus *in vivo* LPS-behandelten Mäusen mehr Lipide speichern, wurde in einem nächsten Experiment der Fettsäureeinbau und die VLDL-Sekretion in Hepatozyten genauer untersucht.

Tatsächlich war der Gesamteinbau an markierten Alkin-Fettsäuren in Hepatozyten aus *in vivo* mit LPS behandelten Mäusen erhöht, während die TAG-Sekretion geringer war (siehe Abb. 24A; 24B) – ein Befund, der sich mit der erhöhten Lipidansammlung in primären *in vitro* mit LPS behandelten Hepatozyten deckt (Abb. 22B).

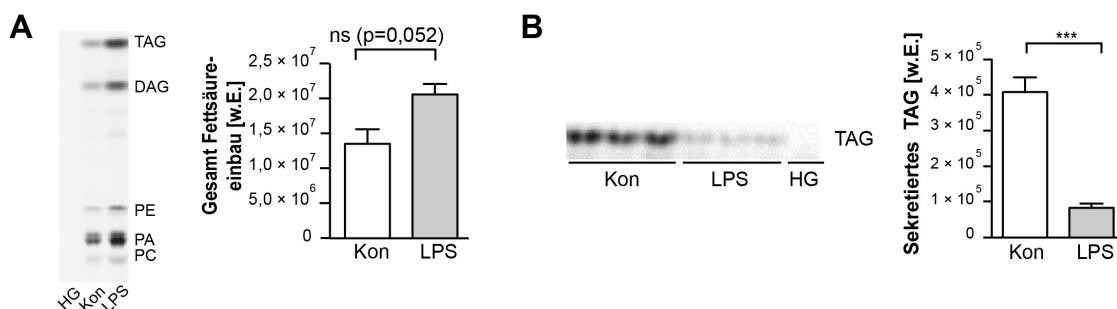


Abb. 24: Gesamteinbau der Alkin-Fettsäuren und Sekretion von markiertem TAG in Hepatozyten nach *in vivo* LPS-Stimulation.

A) Links: Zur Bestimmung des Fettsäureeinbaus wurden primäre Hepatozyten von unbehandelten und 1,5 h *in vivo* mit LPS behandelten Mäusen isoliert und für 10 min mit Alkin-Fettsäuren (66 μ M Alkin-Ölsäure und 33 μ M Alkin-Palmitinsäure) inkubiert. Rechts: Quantifizierung des Gesamteinbaus markierter Fettsäuren (n=3). **B)** Um das von den Hepatozyten abgegebene VLDL nachzuweisen, wurde das *Chase*-Medium nach 2 min *Pulse* und 120 min *Chase* abgenommen, aus dem Medium die Lipide extrahiert und in der Click-Reaktion eingesetzt. Nach dem Laufen der DC-Platte wurde die Menge an VLDL durch das detektierte TAG-Signal bestimmt. Gezeigt ist die Quantifizierung der Gesamtmenge an sekretiertem TAG (n=3). Daten werden als Mittelwerte mit SEM dargestellt (n=3). ns: nicht signifikant; *** p-Wert $\leq 0,001$. w.E.: willkürliche Einheiten.

5.3.2 LPS-Einfluss auf den Lipidmetabolismus

Um einen möglichen veränderten Metabolismus in den *in vivo* mit LPS behandelten Mäusen im Vergleich zu unbehandelten Mäusen zu verfolgen, wurde der Einbau von Fettsäuren in verschiedene Lipidklassen über die Zeit mithilfe eines *Pulse-Chase*-Experiments betrachtet. Interessanterweise konnte bei diesem Experiment ein erhöhter Fettsäureeinbau in TAG und ein verminderter Einbau in PC nach LPS-Stimulation im Vergleich zu den Kontrollmäusen ohne LPS beobachtet werden (Abb. 25, unbehandelt zu *in vivo* LPS). Wurden im Gegensatz dazu Hepatozyten unbehandelter Kontrollmäuse *in vitro* mit 100 ng/ml LPS für 1,5 h durch Zugabe in das Zellkulturmedium stimuliert, konnte diese Beobachtung der veränderten TAG-

und PC-Synthese nicht reproduziert werden. Der Fettsäuremetabolismus war im Vergleich zu den Kontrollmäusen unverändert (siehe Abb. 25, unbehandelt zu *in vitro* LPS). Wurde der Gesamtfettsäureeinbau zwischen den einzelnen Gruppen verglichen, war der Einbau in die Lipidklassen der *in vitro* Behandlung etwas geringer als in der *in vivo* Behandlung oder der Kontrollbedingung (Abb. 25C). Der größte Unterschied zwischen den Bedingungen bestand allerdings in dem Einbau der Fettsäuren in die verschiedenen Lipidklassen.

Insgesamt zeigten die Resultate, dass eine *in vivo* LPS-Behandlung den Lipidmetabolismus in Richtung einer Steatose verändern konnte, während eine *in vitro* LPS-Behandlung keinen Einfluss hatte.

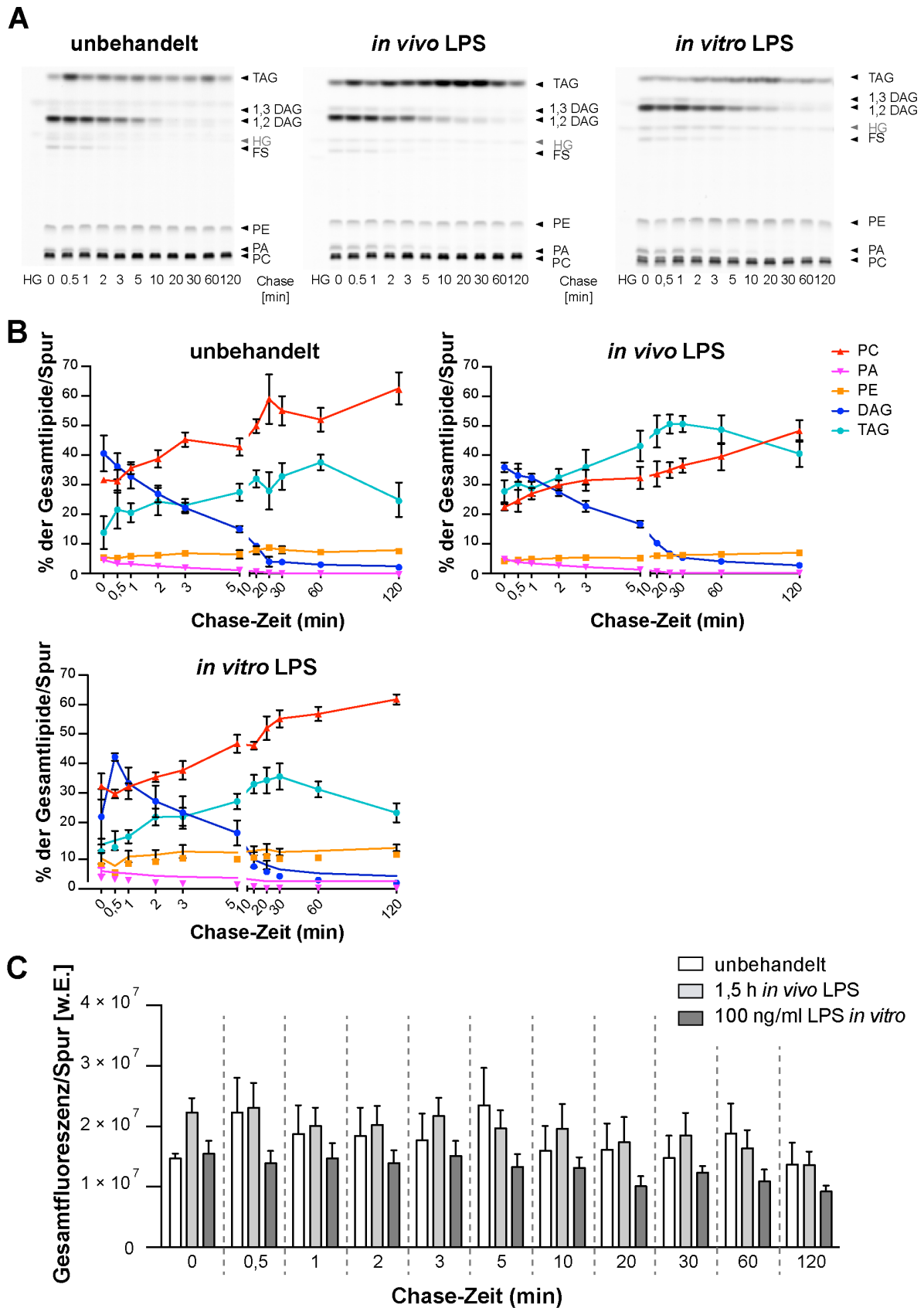


Abb. 25: Der hepatische Fettstoffwechsel wurde durch eine *in vivo* LPS-Stimulation, jedoch nicht durch eine *in vitro* LPS-Stimulation, in Richtung einer Steatose verändert.
Fortsetzung Legende auf nächster Seite.

(Fortsetzung):

A) DC-Platten der Lipidextrakte von Hepatozyten unbehandelter oder 1,5 h *in vivo* mit LPS behandelter Mäuse wurden für 2 h ausplattiert und dann für *Pulse-Chase*-Analysen verwendet. Für die *in vitro* LPS-Behandlung wurden die Hepatozyten unbehandelter Mäuse zusätzlich mit LPS *in vitro* stimuliert. **B)** Darstellung des Prozentanteils einer Lipidklasse zu dem Gesamtlipid pro aufgetragener Spur ($n \geq 3$). **C)** Quantifizierung der Gesamtmenge an aufgenommenen Alkin-Fettsäuren pro *Chase*-Zeitpunkt und Bedingung in willkürlichen Einheiten [w.E.] ($n=3$). Daten werden als Mittelwerte mit SEM gezeigt. HG: Hintergrund.

5.3.3 Einfluss LPS-aktivierter Kupfferzellen auf den hepatischen Fettstoffwechsel

In vorherigen Versuchen mit den HFD-Mäusen gab es bereits Hinweise auf eine Funktion von Kupfferzellen in der Lipidakkumulierung. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass nur eine *in vivo* LPS-Behandlung und nicht eine *in vitro* LPS-Behandlung den Lipidmetabolismus veränderte. Im nächsten Experiment sollte daher analysiert werden, ob der *in vivo* LPS-Effekt auf den hepatischen Metabolismus durch Kupfferzellen vermittelt wird, die ihrerseits von LPS aktiviert werden. Hierzu wurden Kokultur-Experimente mit isolierten Kupfferzellen und Hepatozyten aus 8 Wochen alten C57BL/6NCrI WT-Mäusen durchgeführt, die zusätzlich *in vitro* mit LPS behandelt wurden.

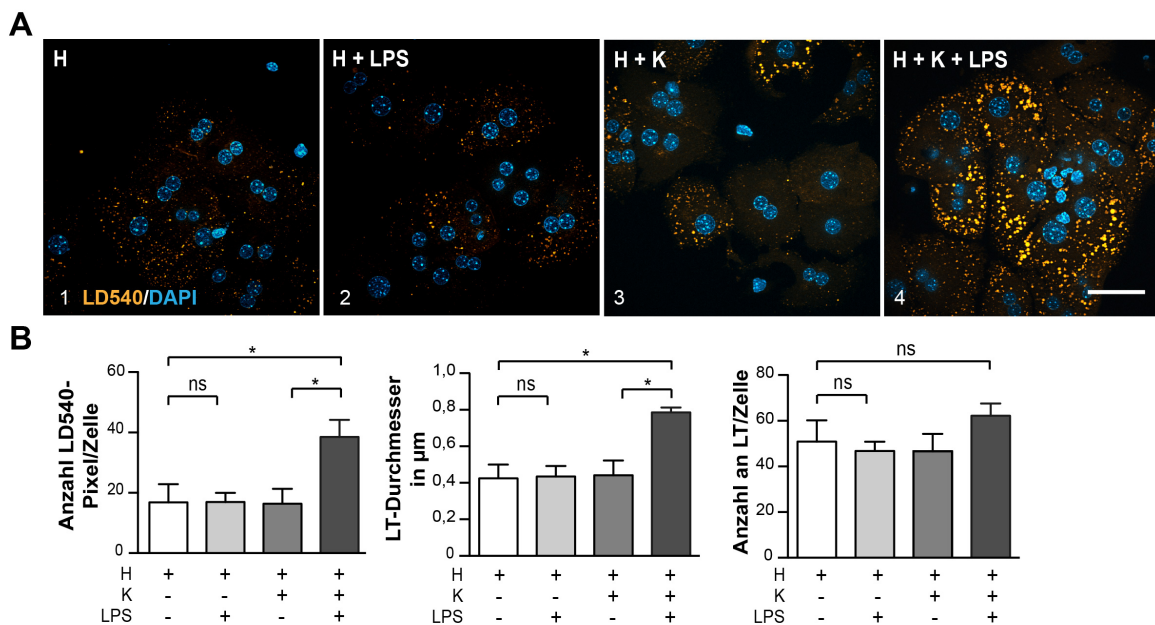


Abb. 26: Untersuchung des Einflusses von Kupfferzellen auf die intrazelluläre Lipidtröpfchenspeicherung in Hepatozyten nach einer *in vitro* LPS-Behandlung.

A) Hepatozyten (H) aus 8 Wochen alten C57BL/6NCrI WT-Mäusen wurden für 16 h alleine (1), mit LPS *in vitro* (2), in Kokultur mit primären, ebenfalls aus 8 Wochen alten C57BL/6NCrI WT-Mäusen isolierten Kupfferzellen (K) (3) oder in Kokultur mit
Fortsetzung Legende auf nächster Seite.

(Fortsetzung):

Kupferzellen und LPS *in vitro* (4) kultiviert. Die Lipidtröpfchenansammlung wurde durch Anfärbung mit LD540 (orange) und DAPI (blau) visualisiert. Maßstab: 50 μm .

B) Quantifizierung der mit LD540 gefärbten Fläche, des Lipidtröpfchen (LT)-Durchmessers in μm und der Menge an LT/pro Zelle ($n=3$). Daten werden als Mittelwerte mit SEM gezeigt. ns: nicht signifikant; * $p\text{-Wert}\leq 0,05$

In Übereinstimmung mit den *Pulse-Chase*-Experimenten zeigten die mikroskopische Analysen keine Lipidansammlung in isolierten Hepatozyten nach einer 1,5 h *in vitro* LPS-Behandlung (Abb. 26A, Bilder 1, 2). Wurden isolierte Hepatozyten allerdings zusätzlich mit isolierten Kupferzellen kokultiviert und mit LPS *in vitro* behandelt, konnte eine vermehrte Lipidtröpfchenspeicherung der Hepatozyten beobachtet werden (Abb. 26A, Bild 4). Diese Beobachtung spiegelte sich auch in der Quantifizierung der Lipidtröpfchengröße sowie in der mit LD540 gefärbten Fläche wieder (Abb. 26B). Die Daten deuten darauf hin, dass der *in vivo* LPS-Effekt von Kupferzellen ausgelöst wird, die durch LPS aktiviert werden.

5.3.4 LPS-abhängige Sekretion pro- und antiinflammatorischer Zytokine in Kupferzellen

Um zu analysieren, ob der Effekt von LPS *in vivo* von Kupferzellen sekretierten Zytokinen abhängt, wurden Kupferzellen aus 8 Wochen alten C57BL/6NCrI WT-Mäusen isoliert, mit LPS *in vitro* für 16 h stimuliert und die Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-10 und TNF im Überstand mithilfe eines ELISAs analysiert.

Es wurden signifikant höhere Mengen an TNF, erhöhte Werte an IL-1 β sowie leicht erhöhte Werte für IL-10 gemessen, während die IL-6 Sekretion keine Veränderung zeigte (Abb. 27).

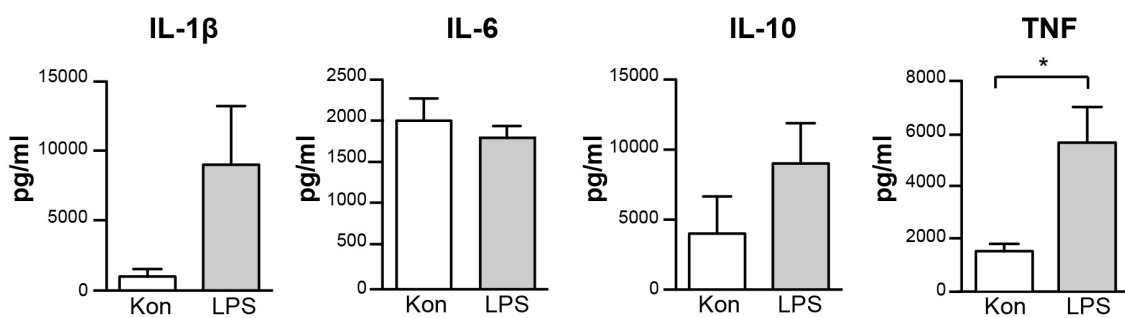


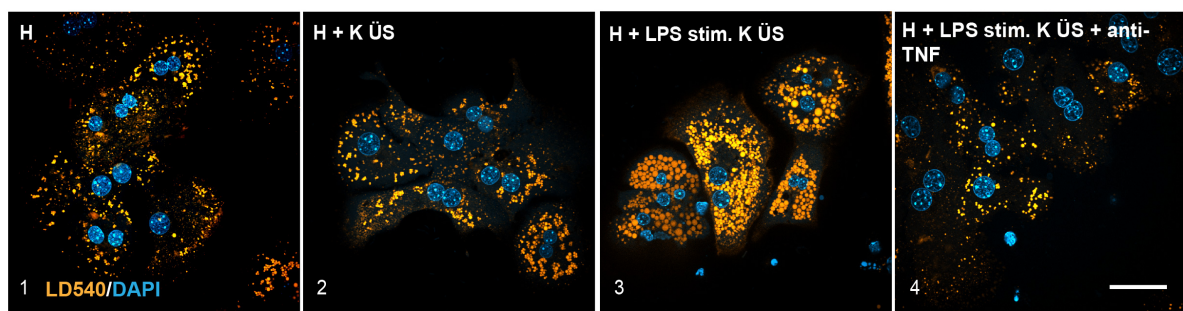
Abb. 27: Pro- und antiinflammatorische Zytokinsekretion von unbehandelten und *in vitro* mit LPS stimulierten Kupferzellen.

Kupferzellen wurden aus 8 Wochen alten C57BL/6NCrI WT-Mäusen isoliert und für 16 h in An- oder Abwesenheit von 100 ng/ml LPS kultiviert. Die Zytokinkonzentrationen von TNF, IL-1 β , IL-6 und IL-10 wurden im Zellüberstand mithilfe eines ELISAs bestimmt. TNF $n=4$, IL-1 β $n=3$, IL-6 $n=6$; IL-10 $n=3$. Die Daten werden als Mittelwerte mit SEM gezeigt. * $p\text{-Wert}\leq 0,05$.

5.3.5 Effekt der Faktoren von LPS-behandelten Kupferzellen auf die Lipidakkumulierung in Hepatozyten

Um herauszufinden, ob bei dem *in vitro* LPS Kokultur-Experiment TNF den erhöhten TAG-Einbau in Hepatozyten vermittelt hat, wurden Kupferzellen aus einer 8 Wochen alten C57BL/6NCrI WT-Maus isoliert und zuvor mit LPS *in vitro* vorbehandelt, bevor der Überstand auf unbehandelte Hepatozyten gegeben wurde. Hepatozyten aus ebenfalls 8 Wochen alten C57BL/6NCrI WT-Mäusen wurden in Abwesenheit (Abb. 28A, Bild 1) oder Anwesenheit von Überstand unstimulierter Kupferzellen (Abb. 28A, Bild 2) oder *in vitro* mit LPS stimulierter Kupferzellen inkubiert (Abb. 28A, Bild 3).

A



B

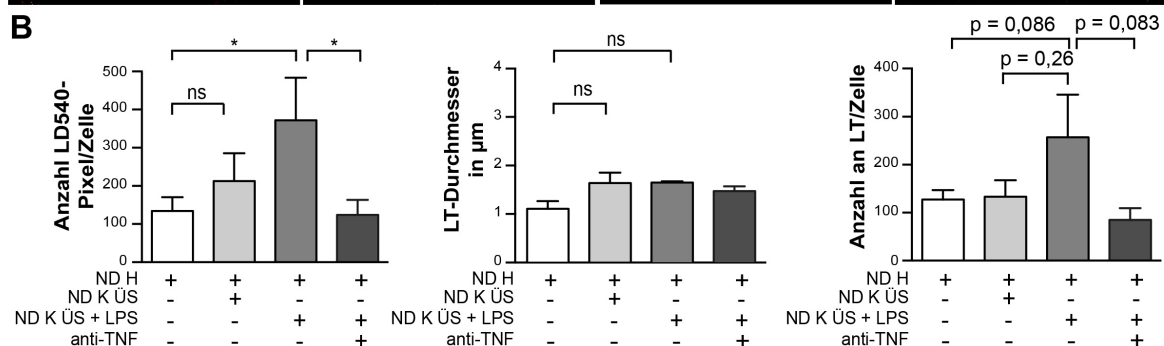


Abb. 28: Sekretiertes TNF von LPS-stimulierten Kupferzellen induziert einen steatotischen Phänotyp in Hepatozyten.

A) Hepatozyten (H) aus ND-Mäusen wurden entweder in Abwesenheit (1) oder Anwesenheit (2, 3, 4) von Kupferzellüberstand kultiviert (K ÜS), die entweder unstimuliert (2) oder zuvor *in vitro* für 16 h mit LPS stimuliert waren (3, 4). Zusätzlich wurde ein neutralisierender TNF-Antikörper zugegeben (4). Lipidtröpfchen (LT) wurden mit LD540 (orange) und Zellkerne mit DAPI (blau) angefärbt. Maßstabsbalken: 50 μm . **B)** Quantifizierung der gefärbten LD540-Fläche pro Zelle, des LT-Durchmessers sowie der LT-Anzahl der verschiedenen Bedingungen pro Zelle ($n \geq 3$). Daten werden als Mittelwerte mit SEM gezeigt. ns: nicht signifikant; * p -Wert $\leq 0,05$.

In Bild 4 wurde zusätzlich in den Überstand der LPS-stimulierten Kupferzellen noch ein neutralisierender TNF-Antikörper zugegeben. In der Tat induziert der Überstand von LPS-stimulierten Kupferzellen eine Lipidtröpfchenakkumulierung in Hepatozyten (Abb. 28 A, Bild 3). Diese Lipidtröpfchenakkumulierung wurde nicht in der Anwesenheit unstimulierter Kupferzellen oder eines TNF-Antikörpers beobachtet (Abb. 28A, Bild 2 und 4). Die

Quantifizierung der Daten zeigte, dass diese Akkumulation durch eine erhöhte Anzahl an Lipidtröpfchen zustande kam, da nur die Fläche an LD540-Fluoreszenz zunahm, die Größe der Lipidtröpfchen allerdings unverändert blieb (Abb. 28B). Abschließend zeigte das Experiment, dass auch mit LPS aktivierte Kupfferzellen über TNF eine Steatose in Hepatozyten stimulieren.

5.3.6 Analyse der Genexpression in Hepatozyten nach *in vivo* LPS-Stimulation

Um auf Genexpressionsniveau Veränderungen im Lipidmetabolismus zu analysieren, wurde mit der RNA aus primären Hepatozyten von unbehandelten und *in vivo* LPS-stimulierten Mäusen RT-qPCR Analysen durchgeführt. Hierzu wurden 8 Wochen alte C57BL/6NC1r WT-Mäuse mit LPS (15 mg/kg) injiziert. Die primären Hepatozyten wurden nach 1,5 h Inkubation aus diesen Mäusen und aus unbehandelten Kontrollmäusen isoliert und für 2 h in Zellkultur gehalten. Die RNA wurde aus den Hepatozyten isoliert und von dieser wurde cDNA hergestellt, die wiederum in der RT-qPCR eingesetzt wurde. In Abb. 29 ist das Ergebnis der RT-qPCR für die untersuchten Gene dargestellt.

Die meisten untersuchten Gene der Fettsäureaufnahme wie auch der Fettsäurebiosynthese wurden in der Tendenz weniger stark exprimiert, ohne dass die Unterschiede statistische Signifikanz erreichen (Abb. 29A-C). Die Enzyme des hepatischen Glycerophospholipidweges zeigten bis auf Ppap2a, welches bei LPS-Stimulation herunterreguliert wurde, keine signifikanten Veränderungen in ihrer Expression (Abb. 29A).

Nur CD14 und NF- κ B waren in ihrer Expression nach *in vivo* LPS-Injektion in den Hepatozyten hochreguliert, wobei nur die NF- κ B Expression signifikant erhöht war (Abb. 29D).

Insgesamt zeigten die RT-qPCR Daten, dass die Entzündungsreaktion in den Hepatozyten durch LPS aktiviert war. Allerdings konnte das Experiment nicht die erhöhte Lipideinlagerung in Hepatozyten nach LPS-Stimulation erklären.

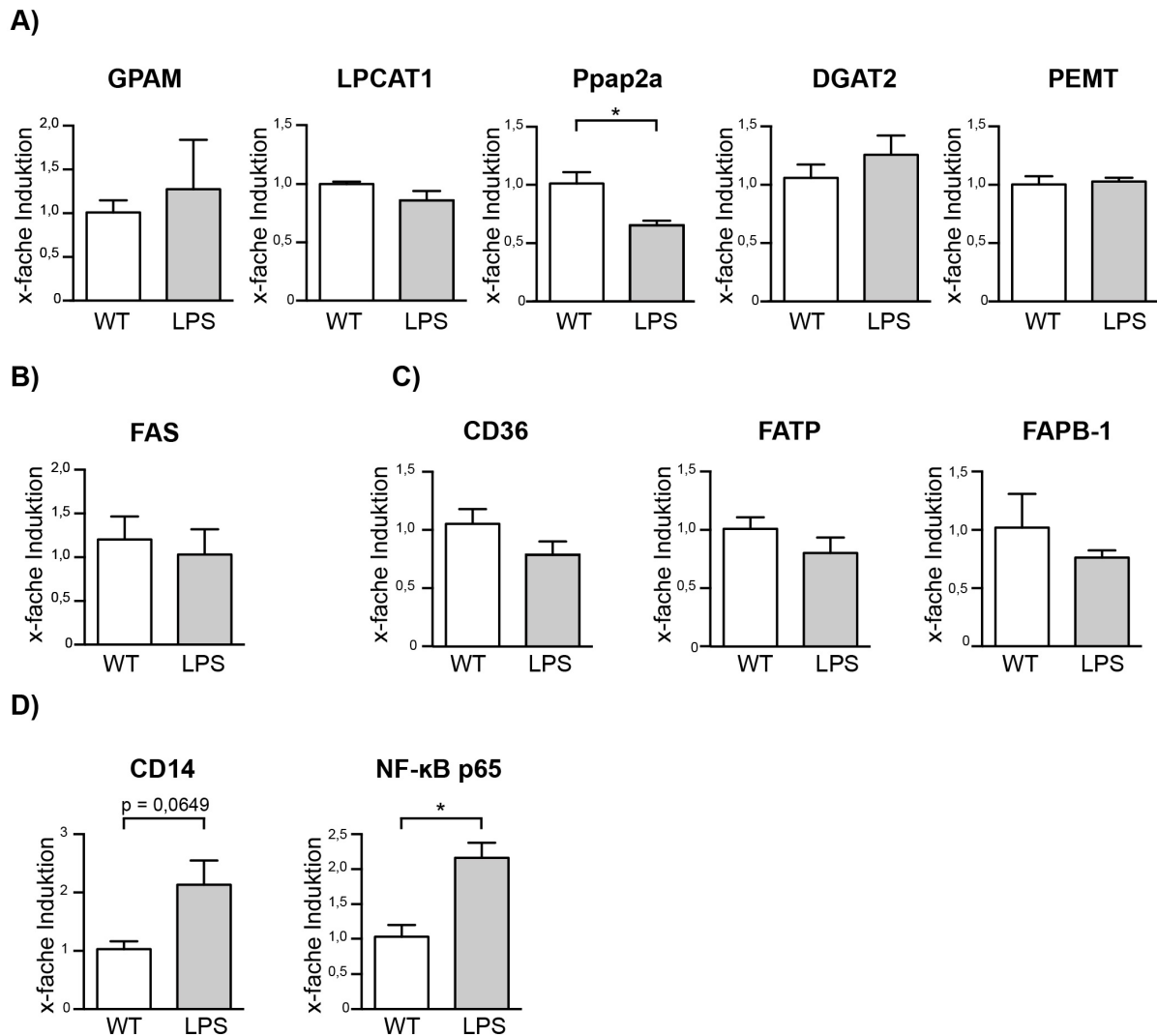


Abb. 29: Vergleich der Expression verschiedener Gene des Lipidmetabolismus und der Entzündungsreaktion nach *in vivo* LPS-Stimulation in primären Hepatozyten.

Dargestellt ist die x-fache Induktion der untersuchten Gene in Hepatozyten aus *in vivo* mit LPS stimulierten Mäusen im Vergleich zu unbehandelten 8 Wochen alten C57BL/6NCrI WT-Mäusen. Einzelne Expressionen sind auf Ubiquitin normalisiert. Es wurden Gene des hepatischen Glycerophospholipidweges (A), der Fettsäurebiosynthese (B), der Fettsäureaufnahme (C) und der Entzündungsreaktion (D) untersucht. Daten werden als Mittelwerte mit SEM gezeigt (n=3).

* p-Wert \leq 0,05.

5.3.7 Untersuchung der TNF-abhängigen TAG-Einlagerung in Hepatozyten

In einem folgenden Experiment sollte überprüft werden, ob Hepatozyten für die erhöhte TAG-Einlagerung Fettsäuren aus dem Medium verwenden. Aus diesem Grund wurde die Konzentration an freien Fettsäuren im Rinderserum, welches dem Zellkulturmedium zugesetzt wird, von dem Labor Dr. Limbach in Heidelberg bestimmt. Zum Vergleich wurde

ebenfalls delipidiertes Rinderserum bestimmt. Die Analyse ergab, dass im normalen Rinderserum 0,08 mmol/L FFS vorhanden sind und im delipidierten Medium 0,02 mmol/L FFS (siehe Tab. 14). Dies entsprach in der Zellkultur 8 $\mu\text{mol/L}$ und 2 $\mu\text{mol/L}$, da 10 % Rinderserum im Zellkulturmedium eingesetzt wurden.

Tab. 14: Messung der freien, unveresterten Fettsäuren im normalen und delipidierten Rinderserum.

Serumprobe	FFS in mmol/L
Normales Rinderserum	0,08 (Dreifachbestimmung)
Delipidiertes Rinderserum	0,02 (Dreifachbestimmung)

5.4 Einfluss von Splenozyten auf die Entwicklung einer Steatose in der Leber

Neben Kupfferzellen sollte in dem Kooperationsprojekt mit Dr. Monika Wolf und Dr. Mathias Heikenwälder der Einfluss von Splenozyten auf den Lipidmetabolismus untersucht werden. Splenozyten bestehen aus einer Vielzahl von Immunzellen wie T- und B- Lymphozyten, dendritischen Zellen und Makrophagen, die sich in der Milz befinden (Van der Laan et al., 2007). Hierzu wurde ein Mausmodell mit einer Cholindefizienten HFD (CD-HFD) verwendet. Diese Fütterung verursacht eine Kombination aus einer erhöhten Lipidakkumulierung (aufgrund der HFD) sowie einem toxischem Leberschaden (aufgrund der Cholindefizienz).

Vorversuche der Kooperationspartner ergaben, dass eine Langzeitfütterung mit dieser CD-HFD in den Mäusen zu einer starken Steatose und der Ausbildung einer milden Fibrose führte. Ebenso stieg die Inzidenz eines hepatozellulären Leberkarzinoms bei 12 Monate alten Mäusen von 2,5 % bei HFD-Tieren auf 25 % bei CD-HFD-Tieren an. In CD-HFD-Tieren wurde ferner eine systemische Aktivierung von Immunzellen sowohl in der Leber wie auch in der Milz festgestellt. So wurde ein starker Anstieg von CD4^+ - und CD8^+ -T Zellen in CD-HFD-Mäusen im Vergleich zu ND-Mäusen beobachtet (Wolf et al., 2014).

Um mechanistisch die Rolle von einmigrierenden Immunzellen in der Entstehung eines Leberkarzinoms zu analysieren, wurde die CD-HFD an $\text{Rag1}^{-/-}$ -Mäuse gefüttert. $\text{Rag1}^{-/-}$ -Mäuse sind genetisch veränderte Mäuse, die keine reifen B-, T- und NKT-Zellen besitzen und daher unfähig sind eine adaptive Immunantwort auszulösen (Andrews und Smyth, 2010; Mombaerts et al., 1992).

Voruntersuchungen der Kooperationspartner ergaben, dass diese $\text{Rag1}^{-/-}$ -Mäuse nach einer 12-monatigen Langzeitfütterung der CD-HFD keine Steatose in Form von Lipid-

akkumulierungen und keinen Leberschaden oder Anzeichen von NASH wie Fibrose aufwiesen. Interessanterweise wurde in allen Rag1^{-/-}-Mäusen ebenfalls kein hepatozelluläres Karzinom gefunden. Auch die Serumwerte von Cholesterol, ALT und AST und die hepatischen Werte für TAG lagen im normalen Bereich.

5.4.1 Vergleich der hepatischen Fettsäureaufnahme in Rag1^{-/-}- und C57BL/6J ND-Mäusen *in vivo*

Im Weiteren wurde analysiert, ob Veränderungen im Lipidmetabolismus oder in der Fettsäureaufnahme ein Grund für die Abwesenheit einer Steatose in Lebern der Rag1^{-/-}-Mäuse sein können. Insbesondere sollte untersucht werden, ob Rag1^{-/-}-Mäuse eine reduzierte Kapazität aufweisen, Fettsäuren aus dem Blutkreislauf aufzunehmen.

5.4.1.3 Vergleich der hepatischen Fettsäureaufnahme in Rag1^{-/-}- und C57BL/6J ND-Mäusen nach intravenöser Applikation

Um Veränderungen in der Fettsäureaufnahme zwischen Rag1^{-/-}- und C57BL/6J WT-Mäusen feststellen zu können, wurden den Mäusen Alkin-Lipide intravenös über die Schwanzvene injiziert. Hierzu musste allerdings zunächst untersucht werden, wie lange es dauert, bis die intravenös injizierten Alkin-Fettsäuren über die Zirkulation zur Leber gelangen und dort metabolisiert werden und welche Konzentration an Lipidextrakt aus der Leber am effizientesten für die Click-Reaktion ist. Dazu wurden in einem Vorversuch zwei unterschiedliche Inkubationszeiten nach Applikation (10 min und 1 h) benutzt sowie eine Verdünnungsreihe von den aus der Leber extrahierten Lipiden aufgestellt. Wie in Abb. 30 zu erkennen ist, resultierte die Verwendung von zu viel Lipidextrakt in einer Unterdrückung der Click-Reaktion. Das stärkste Click-Signal ohne Lipidüberladung der Click-Reaktion wurde bei Verwendung des Lipidextrakts von 1,25 mg Feuchtgewicht der Leber und einer 1-stündigen Inkubationszeit nach intravenöser Applikation der Fettsäuren erreicht. Auch nach 10-minütiger Inkubationszeit war das Signal nach Einsatz des Lipidextrakts von 1,25 mg Feuchtgewicht der Leber am Stärksten, wenn gleich das Signal sehr viel schwächer war.

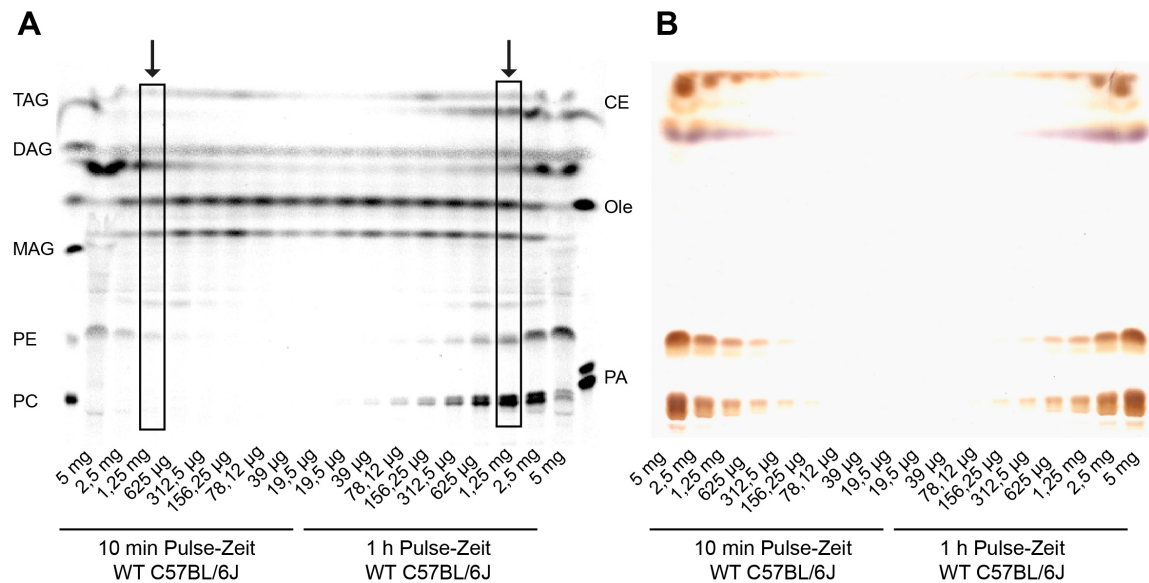


Abb. 30: DC zur Etablierung der optimalen Bedingungen für die Click-Reaktion nach intravenöser Applikation von Fettsäuren.

C57BL/6J WT-Mäusen wurde intravenös jeweils 100 µl einer Fettsäuremischung (2 mM Alkin-Ölsäure, 1 mM Alkin-Palmitinsäure und 1 mM delipidiertes BSA in 0,5 % NaCl) injiziert, bevor sie nach 10 min und 1 h Inkubationszeit euthanasiert wurden. Die Lebern wurden entnommen und die Lipide mit Methanol:Chloroform extrahiert. Aus den Lipidextrakten wurde eine 1:1 Verdünnungsreihe (Lipidextrakt von 5 mg bis 19,5 µg Feuchtwicht der Leber) erstellt, die anschließend für die Click-Reaktion verwendet und auf einer DC-Platte aufgetragen wurde (A). Die Pfeile zeigen das Lipidextrakt mit dem optimal eingesetzten Feuchtwicht der Leber für die Click-Reaktion. Die DC-Platte wurde anschließend mit Schwefelsäure behandelt (B).

Nachdem die optimalen Bedingungen für die Detektion etabliert worden waren, sollte die Fettsäureaufnahme in Rag1^{-/-}-Mäusen mit C57BL/6J ND-Mäusen verglichen werden. Hierzu wurde den Mäusen dieselbe Fettsäuremischung wie im Vorversuch intravenös injiziert (2 mM Alkin-Ölsäure, 1 mM Alkin-Palmitinsäure und 1 mM delipidiertes BSA in 0,5 % NaCl). Da bei 1 h Inkubationszeit kein Unterschied in der Aufnahme zu sehen war (Daten nicht gezeigt), wurden die Mäuse nach 10 min Inkubationszeit euthanasiert. Die gesamte Leber wurde in Methanol:Chloroform homogenisiert und der Lipidextrakt von einem 1,25 mg Leberfeuchtwicht verdünnt, bevor die Lipide für die anschließende Lipidextraktion und Click-Reaktion verwendet wurden. In Abb. 31 sind die Lipidklassen PC, PE und TAG und in zwei Proben auch das kurzlebige Zwischenprodukt PA erkennbar. Wie bei der 1-stündigen Inkubation war allerdings kein Unterschied in der Fettsäureaufnahme der Lebern von Rag1^{-/-}- und C57BL/6J ND-Kontrollmäusen nach 10-minütiger Inkubation mit den Alkin-Fettsäuren feststellbar. Auch das Verhältnis der Neutrallipide zu den Phospholipiden war kaum unterschiedlich. Insgesamt war das Signal der Click-Lipide sehr schwach.

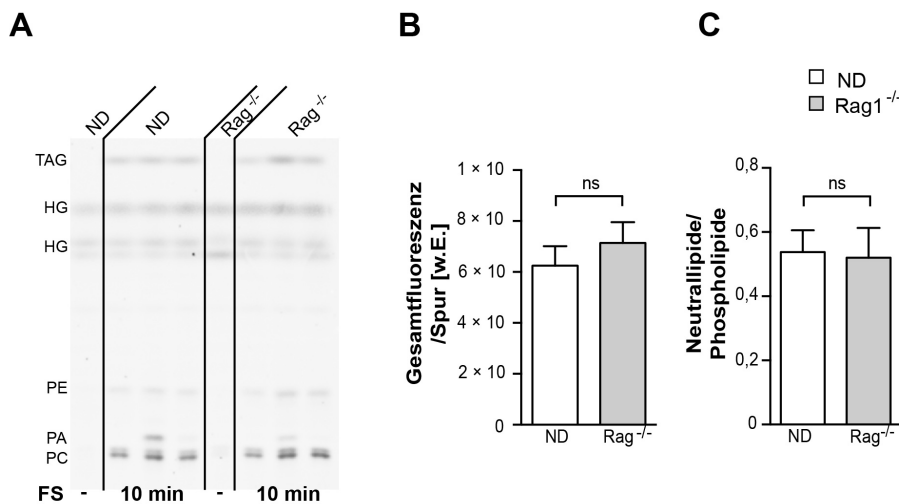


Abb. 31: Vergleich der Fettsäureaufnahme in die Lebern von C57BL/6J ND- oder Rag1^{-/-}-Mäusen nach intravenöser Injektion von Alkin-Fettsäuren.

A) C57BL/6J ND-Mäusen und Rag1^{-/-}-Mäusen wurden 100 µl Alkin-Fettsäurelösung intravenös injiziert (2 mM Alkin-Ölsäure, 1 mM Alkin-Palmitinsäure und 1 mM delipidiertes BSA in 0,5 % NaCl). Nach 10 min Inkubationszeit wurden die Lebern entnommen, die Lipide extrahiert, in der Click-Reaktion eingesetzt und mittels Fluoreszenzdetektion analysiert (n=3). Als negative Kontrolle wurden Lebern aus unbehandelten Mäusen verwendet (-). **B)** Quantifizierung der Gesamtfluoreszenz/Spur in willkürlichen Einheiten [w.E.] und **C)** des Neutrallipid:Phospholipid-Verhältnisses von Fettsäuren, die in die Leber nach der intravenösen Injektion aufgenommen wurden. HG: Hintergrund. ns: nicht signifikant.

5.4.1.4 Vergleich der hepatischen Fettsäureaufnahme in Rag1^{-/-}- und C57BL/6J ND-Mäusen nach oraler Applikation

Da nach intravenöser Applikation der Alkin-Fettsäuren zu wenig Signal in der Leber zu detektieren war, sollte im Folgenden analysiert werden, ob die Leber mehr alkinmarkierte Fettsäuren aufnimmt, wenn die Mäuse die Alkin-Fettsäuren oral per Schlundsonde verabreicht bekommen. Nach der oralen Aufnahme gelangen die Lipide über die Verdauung durch die Bildung von Chylomikronen in die Leber.

Da der Zeitpunkt der Fettsäureaufnahme in die Leber durch die Verdauung später als bei der intravenösen Injektion stattfinden sollte, wurde zunächst in einem Vorversuch getestet, wann die Alkin-Fettsäuren vom Blut in die Leber gelangen. Hierzu wurde den Mäusen 150 µl einer Alkin-Fettsäuremischung oral per Schlundsonde verabreicht. Die komplette Leber wurde nach 60, 90 und 120 min herausgenommen und jedem Tier wurde zusätzlich Blut abgenommen. Die Lipide wurden anschließend erneut aus der gesamten Leber isoliert und anschließend das Lipidextrakt auf jeweils 1,25 mg Leberfeuchtgewicht verdünnt, für die Click-Reaktion verwendet und auf eine DC-Platte aufgetragen.

In Abb. 32 ist gezeigt, dass der Übertritt der Fettsäuren vom Blut ins Lebergewebe zwischen 60 und 90 min stattfindet und dass 100 µl eingesetztes Blutserum ein stärkeres Signal als

50 μ l eingesetztes Blutserum erzeugt. Im Gegensatz dazu wurde bei 50 μ l Lipidextrakt eines 1,25 mg Leberfeuchtgewichts ein starkes Signal erzeugt, während 100 μ l von 2,5 mg Leberfeuchtgewicht kein ausreichendes Click-Signal ergab. Aus eigenen Arbeiten und Arbeiten anderer Mitglieder der AG Thiele ist bekannt, dass eine zu hohe Konzentration an Alkin-Lipiden und nicht markierten Gesamtlipiden in der Click-Reaktion deren Ausbeute negativ beeinflusst bzw. einige Lipidklassen bevorzugt reagieren (Daten nicht gezeigt) – eine Tatsache, die auch hier zu beobachten war. Abschließend konnte durch diesen Versuch gezeigt werden, dass durch die orale Applikation mehr Alkin-Fettsäuren in die Leber aufgenommen werden.

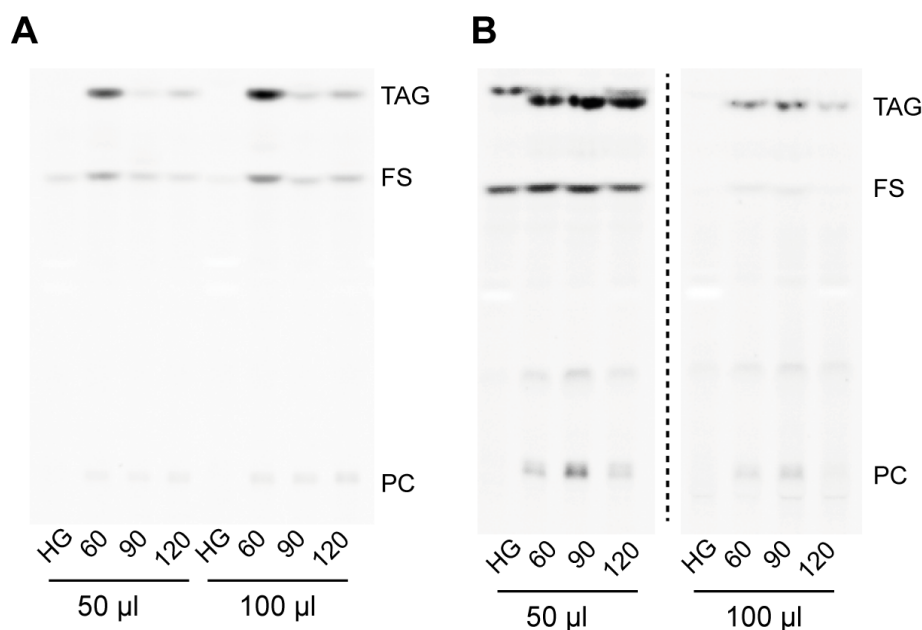


Abb. 32: Analyse der Aufnahme von Alkin-Fettsäuren aus dem Blut in die Leber nach oraler Fettsäureapplikation.

C57BL/6J WT-Mäusen wurden oral 150 μ l Click-Lipide (2 mM Alkin-Ölsäure, 1 mM Alkin-Palmitinsäure und 1 mM delipidiertes BSA in 0,5 % NaCl) verabreicht und die Mäuse nach 60, 90 und 120 min euthanasiert. Die Lebern wurden herausgenommen und den Tieren wurde Blut abgenommen. Für die anschließende Click-Reaktion wurden 50 bzw. 100 μ l Blutserum (**A**), bzw. 50 und 100 μ l Lipidextrakt (entspricht 1,25 bzw. 2,5 mg Leberfeuchtgewicht) (**B**) des Lipidextrakts der gesamten Leber eingesetzt und auf einer DC-Platte aufgetrennt. **B**) Die Abb. wurde aus zwei Experimenten (siehe gestrichelte Linie) erstellt. HG: Hintergrund.

In Abb. 33 ist der Vergleich der Fettsäureaufnahme in Rag1^{-/-}-Mäusen und C57BL/6J ND-Mäusen nach oraler Gabe der Fettsäuren mit unterschiedlichen Inkubationszeiten gezeigt. Allerdings wurde auch hier kein Unterschied in der Fettsäureaufnahme zwischen ND- und Rag1^{-/-}-Mäusen festgestellt. Die Menge an aufgenommenen Fettsäuren sowie das Neutrallipid/Phospholipid-Verhältnis war zudem großen Schwankungen ausgesetzt.

Insgesamt war die Fettsäureaufnahme der Rag1^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu den ND-Tieren nicht unterschiedlich. Die Ursache für den Phänotyp der Rag1^{-/-}-Mäuse muss daher eine andere sein.

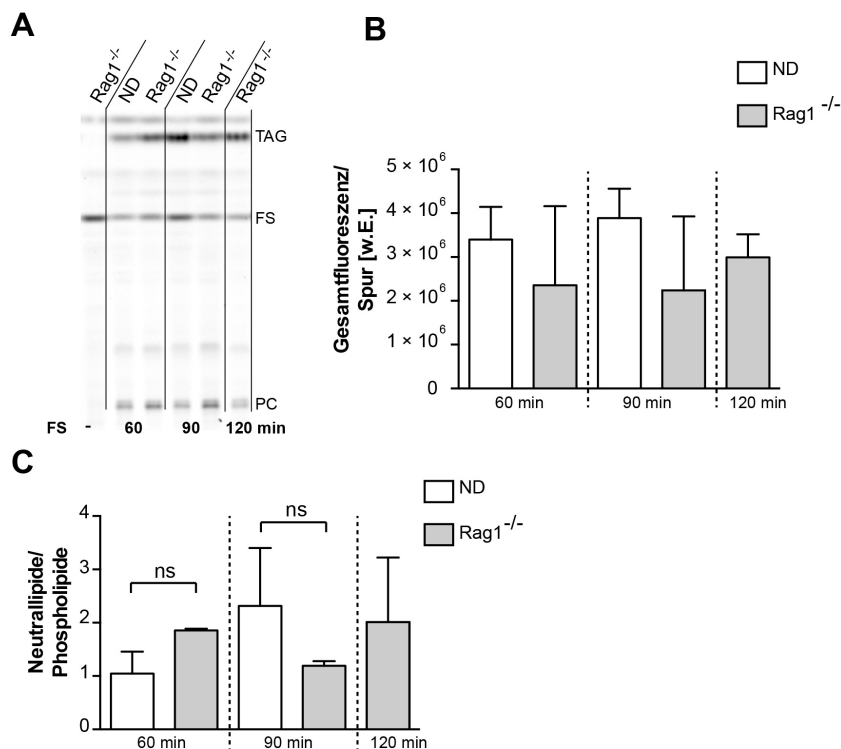


Abb. 33: Analyse isolierter Fettsäuren aus den Lebern von C57BL/6J ND- oder Rag1^{-/-}-Mäusen nach oraler Fettsäure-Applikation für unterschiedliche Zeitdauern.

C57BL/6J ND-Mäuse wurden oral per Schlundsonde mit 150 µl Alkin-Fettsäuren gefüttert. Die Lebern wurden nach 60, 90 und 120 min entfernt und die Lipide aus der gesamten Leber mit Methanol:Chloroform extrahiert. Für die Click-Reaktion wurde das Lipidextrakt verdünnt, sodass 1,25 mg des Leberfeuchtgewichts eingesetzt wurde und die Lipide anschließend auf einer DC-Platte voneinander getrennt wurden (A). Die Gesamtfluoreszenz pro Spur (B), sowie das Neutrallipid/Phospholipid Verhältnis (C) wurden quantifiziert. Die Daten werden als Mittelwerte mit SEM gezeigt (n=3). ns: nicht signifikant.

5.4.2 Vergleich der hepatischen Fettsäureaufnahme in Rag1^{-/-}- und ND-Mäusen *in vitro*

Da die FS-Aufnahme nach *in vivo* Applikation stark schwankte und sich weder intravenös noch oral Unterschiede in der Fettsäureaufnahme zwischen Rag1^{-/-}- und ND-Mäusen zeigten wurde der Versuch *in vitro* wiederholt. Hierzu wurden primäre Hepatozyten aus Rag1^{-/-}- und ND-Mäusen isoliert und für 10 min mit einer Alkin-Fettsäuremischung (66 µM Alkin-Ölsäure, 33 µM Alkin-Palmitinsäure) inkubiert. Allerdings zeigten die isolierten Hepatozyten aus

Rag1^{-/-}-Mäusen und ND-Mäusen auch keinen Unterschied in ihrer Kapazität, Fettsäuren *in vitro* aufzunehmen (siehe Abb. 34A und 34B). Auch das Neutrallipid/Phospholipidverhältnis war ähnlich (Abb. 34C).

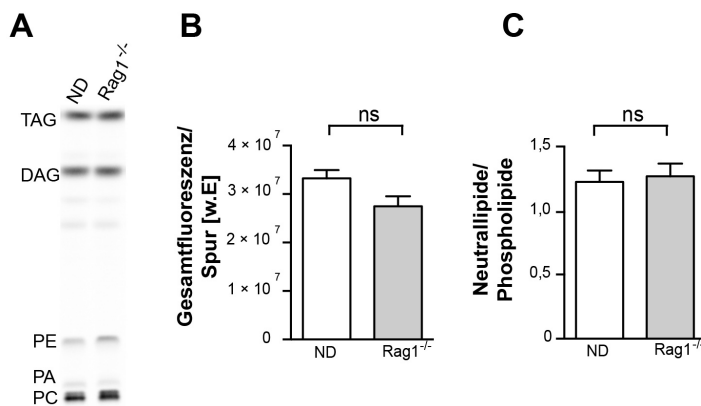


Abb. 34: Extrahierte Lipide aus primären Hepatozyten von ND- und Rag1^{-/-}-Mäusen nach zehnmütiger Fütterung mit Alkin-Fettsäuren.

A) Hepatozyten wurden aus ND- oder Rag1^{-/-}-Mäusen isoliert und nach 2 h Zellkultur für 10 min mit einer Alkin-Fettsäuremischung (66 μ M Alkin-Ölsäure und 33 μ M Alkin-Palmitinsäure) inkubiert. Die Lipide wurden extrahiert und mithilfe der anschließenden Click-Reaktion und DC sichtbar gemacht. Hier dargestellt sind die Quantifizierung der Gesamtfluoreszenz/Spur in willkürlichen Einheiten [w.E.] (**B**) sowie das Neutrallipid:Phospholipidverhältnis (**C**) (n=3). Die Daten werden als Mittelwerte mit SEM gezeigt. ns: nicht signifikant.

Dies zeigt, dass der Phänotyp der Rag1^{-/-}-Mäuse nicht durch eine veränderte Fettsäureaufnahme entsteht, sondern möglicherweise eher auf das Fehlen der Lymphozyten zurückzuführen ist.

5.4.3 Analyse der hepatischen Fettsäureaufnahme nach Kokultur mit Splenozyten aus ND-Mäusen und CD-HFD-Mäusen

Als nächstes wurde daher überprüft, ob Splenozyten eine gesteigerte Fettsäureaufnahme in Hepatozyten auslösen können. Zu diesem Zweck wurden Hepatozyten mit Splenozyten aus ND-Mäusen kokultiviert. Bei der Kokultur mit Splenozyten aus ND-Mäusen wurden keine Unterschiede in der Fettsäureaufnahme (Abb. 35A-C) oder im Neutrallipid/Phospholipidverhältnis beobachtet (Abb. 35C). Eine Kokultivierung mit Splenozyten aus CD-HFD-Mäusen führte allerdings zu einem signifikant erhöhten Einbau von Alkin-Fettsäuren in Neutrallipide zusammen mit einer leicht erhöhten Fettsäureaufnahme (Abb. 35A-C).

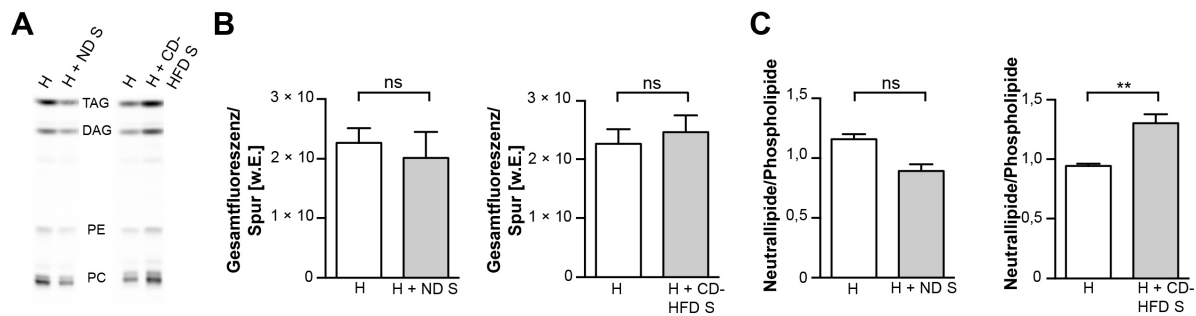


Abb. 35: Einfluss von Splenozyten aus ND-/HFD-Mäusen auf die Fettsäureaufnahme in Hepatozyten.

Hepatozyten (H) wurden in An- oder Abwesenheit von Splenozyten (S) aus 6-Monate alten ND- (links (n=7)) oder CD-HFD-Mäusen (rechts (n=5)) für 16 h kultiviert. Anschließend wurden Alkin-Fettsäuren (66 μ M Alkin-Ölsäure, 33 μ M Alkin-Palmitinsäure) für 10 min dazugegeben, die Lipide extrahiert, eine Click-Reaktion durchgeführt und die Lipide auf eine DC-Platte aufgetragen. **A)** Quantifizierung der DC-Platten nach Gesamtfluoreszenz/Spur in willkürlichen Einheiten [w.E.] **(B)** und dem Neutrallipid/Phospholipidverhältnis **(C)**. Daten werden als Mittelwerte mit SEM gezeigt. ns: nicht signifikant, ** p-Wert $\leq 0,01$.

Mittels Färbungen mit anschließender Mikroskopie konnte ebenfalls eine erhöhte Lipidakkumulierung und Steatose bei einer Kokultur von Hepatozyten aus ND-Mäusen mit Splenozyten aus CD-HFD-Mäusen gezeigt werden (Abb. 36A, 36B).

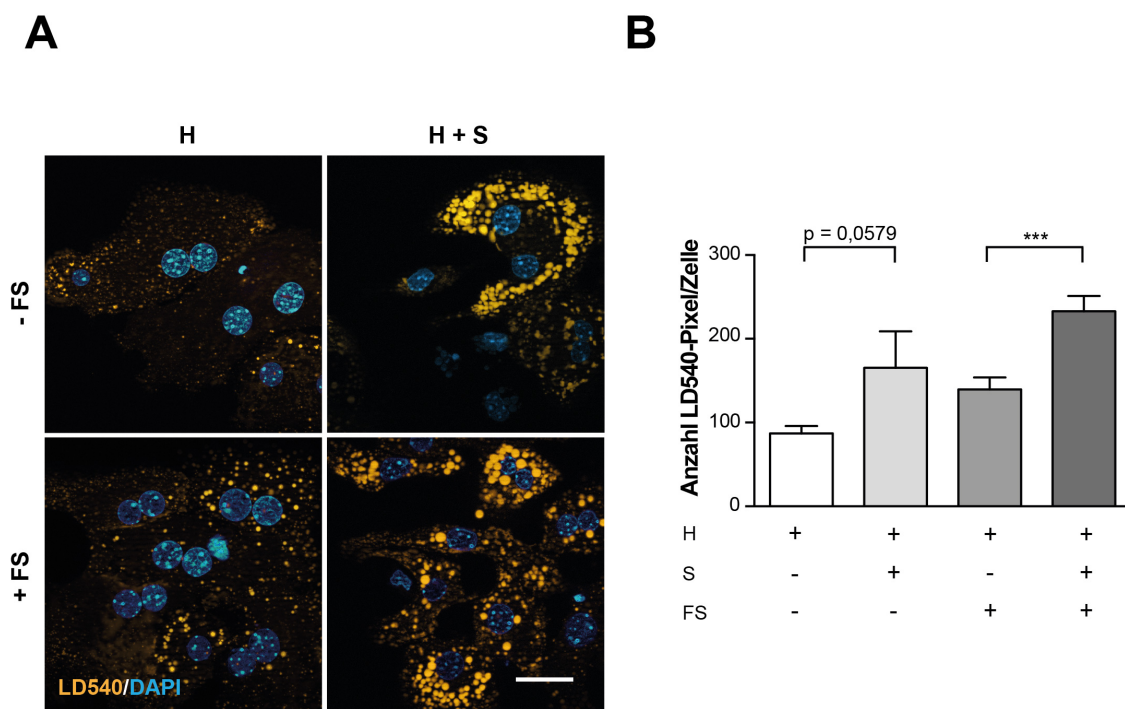


Abb. 36: Einfluss von Fettsäuren und Splenozyten aus HFD-Mäusen auf die Neutrallipidanreicherung in ND-Hepatozyten.

A) Primäre Hepatozyten wurden aus ND-Mäusen isoliert und in An- oder Abwesenheit einer Fettsäuremischung (66 μ M Ölsäure und 33 μ M Palmitinsäure) und Splenozyten aus einer CD-HFD-Maus im Verhältnis 5:1 auf kollagenisierten 6-Well Platten kultiviert. Nach 2 h Zellkultur wurde bei

Fortsetzung Legende auf nächster Seite.

(Fortsetzung):

einigen Bedingungen eine Fettsäuremischung für 16 h dazugegeben (66 μ M Ölsäure, 33 μ M Palmitinsäure (2:1)). Die Zellen wurden fixiert und die Lipidtröpfchen mit LD540 (orange) und die Zellkerne mit DAPI (blau) angefärbt. Maßstab: 20 μ m. **B)** Quantifizierung der gefärbten LD540 Fläche pro Zelle. H: Hepatozyten, S: Splenozyten, FS: Fettsäuremischung. ns: nicht signifikant, * p-Wert \leq 0,05; ** p-Wert \leq 0,01; *** p-Wert \leq 0,001.

Die Resultate weisen somit nach, dass Splenozyten aus CD-HFD-Mäusen in An- und Abwesenheit von Fettsäuren tatsächlich einen steatotischen Phänotyp hervorrufen können.

5.4.4 Einfluss der Fettsäuredosierung und des Verhältnisses von Splenozyten zu Hepatozyten auf den Steatose-Effekt

Durch Mikroskopie der Lipidtröpfchen sollte getestet werden, ob der steatotische Effekt durch eine unterschiedliche Konzentration von Fettsäuren im Medium oder durch eine unterschiedliche Anzahl an Splenozyten entsteht. Wie in Abb. 37 ersichtlich, stieg die Neutrallipidanreicherung parallel zu einer erhöhten Fettsäurekonzentration und war in Anwesenheit von Splenozyten immer stärker erhöht als wenn keine Splenozyten zugegeben worden waren. Die erhöhte Lipidanreicherung in Anwesenheit von Splenozyten war unabhängig von dem Verhältnis der Splenozyten zu den Hepatozyten (Abb. 38).

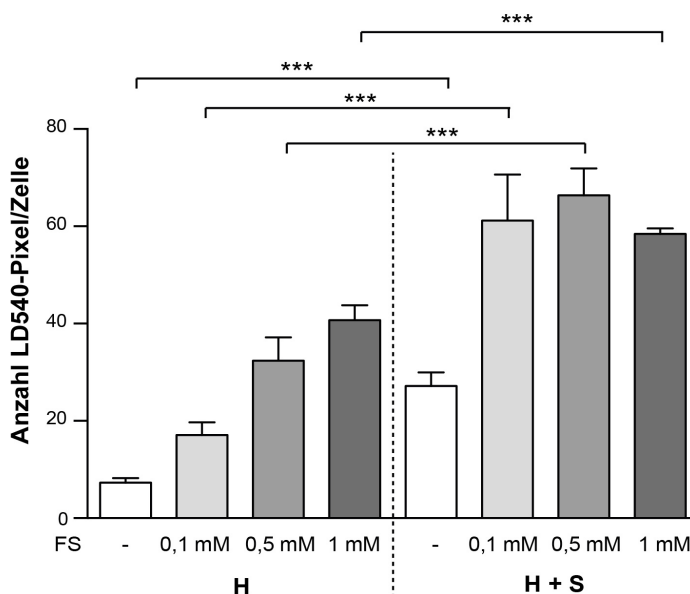


Abb. 37: Einfluss verschiedener Fettsäurekonzentrationen sowie der An- und Abwesenheit von Splenozyten auf die Lipidakkumulation in Hepatozyten.

Primäre Hepatozyten wurden aus einer 8 Wochen alten WT-Maus isoliert und in Ab- oder Anwesenheit von Splenozyten aus einer HFD-Maus im Verhältnis 5:1 auf

Fortsetzung Legende auf nächster Seite.

(Fortsetzung):

kollagenisierten 6-Well Platten kultiviert. Nach 2 h Kultivierung wurden unterschiedliche Konzentrationen einer Fettsäuremischung für 6 h dazugegeben (0,1 mM; 0,5 mM; 1 mM Ölsäure/Palmitinsäure 2:1). Die Zellen wurden fixiert und mit LD540 und DAPI angefärbt. Die Daten werden als Mittelwerte mit SEM dargestellt (n=3). H: Hepatozyten, S: Splenozyten, FS: Fettsäuren. * p-Wert \leq 0,05; ** p-Wert \leq 0,01; *** p-Wert \leq 0,001.

Ebenso scheint der steatotische Effekt der Splenozyten auf Hepatozyten auch in einer bereits bestehenden Steatose relevant zu sein und kann diese womöglich noch verschlimmern, da die Neutrallipidanreicherung, die schon durch die hohen Fettsäurekonzentrationen über Nacht stimuliert wurde (Abb.37, nur Hepatozyten mit 1 mM Fettsäuren), durch die Anwesenheit von Splenozyten noch erhöht wurde (Abb. 37, Hepatozyten und Splenozyten mit 1 mM Fettsäuren).

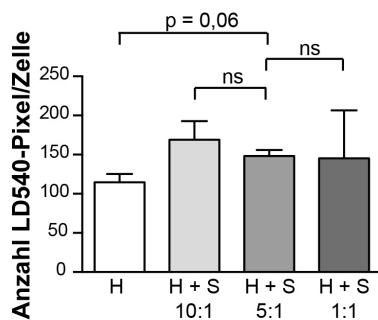


Abb. 38: Einfluss verschiedener Splenozyten-/Hepatozytenverhältnisse auf die Lipidakkumulation in Hepatozyten.

Primäre Hepatozyten wurden aus ND-Mäusen isoliert und mit frisch isolierten Splenozyten aus HFD-Mäusen in Anwesenheit von 100 μ M Fettsäuren (66 μ M Ölsäure und 33 μ M Palmitinsäure) für 16 h in verschiedenen Verhältnissen zueinander kokultiviert. Dargestellt ist die Quantifizierung der gesamten LD540-positiven Fläche pro Zelle. H: Hepatozyten, S: Splenozyten, ns: nicht signifikant. Die Daten werden als Mittelwerte mit SEM angezeigt (n=3). ns: nicht signifikant.

5.4.5 Analyse der hepatischen Fettsäureaufnahme in unstimulierten Hepatozyten nach Zugabe von Splenozytenüberstand aus ND-Mäusen und CD-HFD-Mäusen

Anschließend wurde untersucht, ob für den steatotischen Effekt der HFD-Splenozyten auf die ND-Hepatozyten der direkte Zellkontakt notwendig ist oder ob lösliche Faktoren, welche von den Splenozyten abgegeben werden, die gesteigerte hepatische Lipidaufnahme und Lipidanlagerung vermitteln. Um diese Fragestellung zu überprüfen, wurden CD-HFD-Splenozyten für 16 h kultiviert und anschließend der Überstand für 2 h in An- oder Abwesenheit von Fettsäuren zu den Hepatozyten dazugegeben. Danach wurden die Zellen

fixiert und gefärbt. Wie in Abb. 39 zu erkennen, war konditioniertes Medium von CD-HFD-Splenozyten ausreichend um die Lipidaufnahme in Hepatozyten zu vermitteln. Das bedeutet, dass lösliche Faktoren der Splenozyten für eine Neutrallipidanreicherung verantwortlich sind.

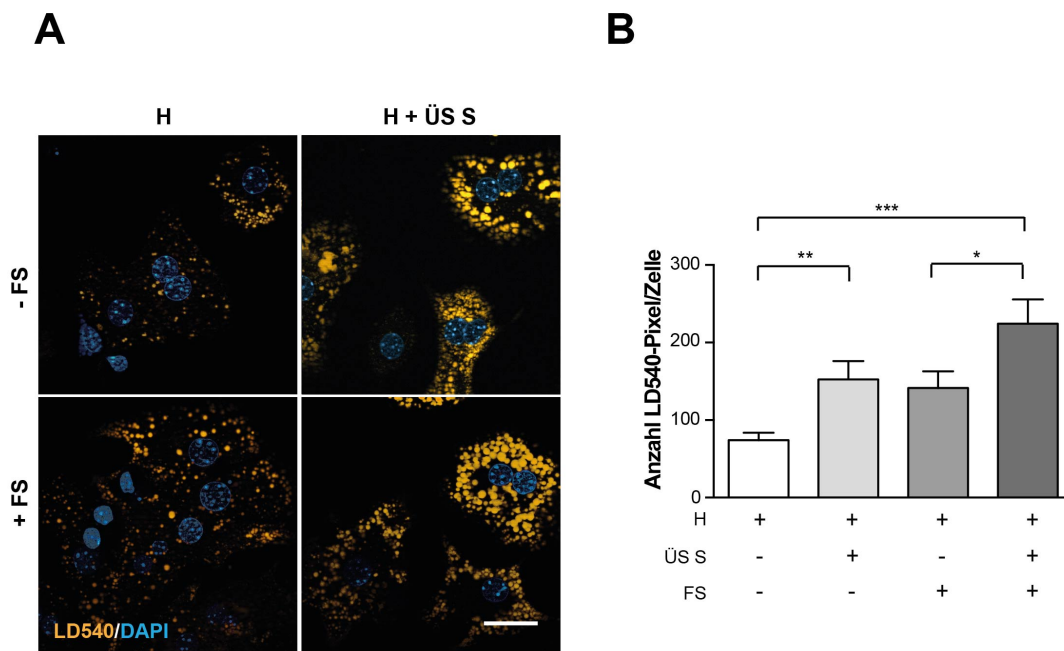


Abb. 39: Analyse der Lipidakkumulation in ND-Hepatozyten in An- oder Abwesenheit von Fettsäuren und/oder CD-HFD-Splenozytenüberstand.

A) Für den Versuch wurden 3×10^6 Splenozyten aus 6 Monate alten CD-HFD-Mäusen isoliert und für 16 h in 6 cm Zellkulturplatten kultiviert. Anschließend wurde das konditionierte Medium der Splenozyten für weitere 2 h zu frisch isolierten primären Hepatozyten (3×10^5) in An- oder Abwesenheit einer Fettsäuremischung (66 μ M Ölsäure und 33 μ M Palmitinsäure) in 6 cm Zellkulturplatten gegeben, bevor die Zellen fixiert und die Lipidtröpfchen mit LD540 (orange) und Zellkerne mit DAPI (blau) angefärbt wurden. Maßstab: 20 μ m. **B)** Quantifizierung der gefärbten LD540-Fläche pro Zelle. Die Daten sind als Mittelwerte mit SEM angegeben (n=3). H: Hepatozyten, ÜS S: Überstand Splenozyten, FS: Fettsäuren. * p-Wert \leq 0,05; ** p-Wert \leq 0,01; *** p-Wert \leq 0,001.

5.4.6 Untersuchung des LIGHT-Einflusses auf die hepatische Lipidanlagerung

Von Dr. Monika Wolf wurden als nächstes Proteinanalysen des Splenozytenüberstandes durchgeführt um herauszufinden, welche Faktoren von HFD-Splenozyten sezerniert werden, die eine steatotische Lipidanlagerung in ND-Hepatozyten auslösen könnten. ELISA-Untersuchungen des Lymphozytenüberstandes aus der Milz von C57BL/6J CD-HFD-Mäusen ergaben, dass vor allem Mitglieder der TNF-Superfamilie hochreguliert waren. Besonders die Sekretion des Zytokins LIGHT (auch bekannt als TNF-Superfamilien Mitglied 14 (TNFSF14)),

eines Liganden des Lymphotoxin- β Rezeptors (LT β R-Rezeptors) und Mitglied der TNF-Superfamilie, war stark erhöht (Wolf et al., 2014).

LIGHT ist bekannt dafür die Lipidhomöostase zu regulieren und die Fettsäureaufnahme in Hepatozyten *in vitro* zu kontrollieren (Lo et al., 2007). Zudem zeigten von Dr. Monika Wolf durchgeführte Vorversuche mit CD-HFD-Light^{-/-}-Mäusen, dass diese im Gegensatz zu den CD-HFD-Mäusen kein Leberzellkarzinom ausbildeten sowie keine Erhöhung der intrahepatischen NKT-Zellen aufwiesen (Daten nicht gezeigt).

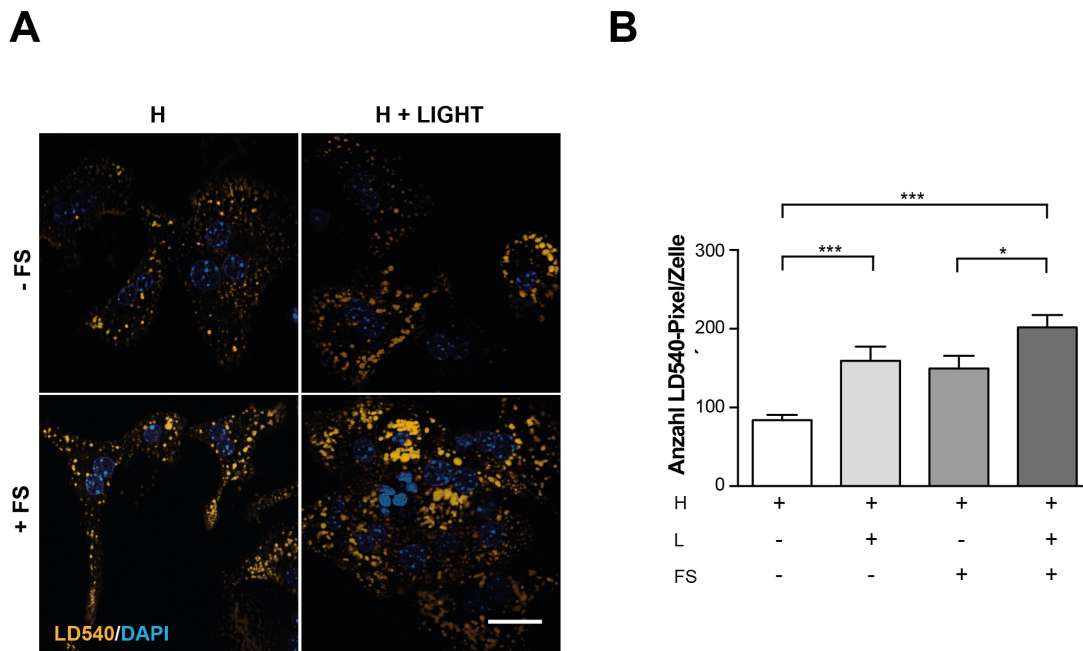


Abb. 40: Analyse der Lipidakkumulation in ND-Hepatozyten in An- oder Abwesenheit von Fettsäuren und/oder rekombinantem LIGHT.

A) Für den Versuch wurden primäre Hepatozyten aus 8-10 Wochen alten ND-Mäusen isoliert und pro 6 cm Platte 3×10^5 Zellen ausplattiert. Nach 2 h Zellkultur wurden 500 ng/ml LIGHT (L)-Protein und/oder eine Fettsäuremischung (66 μ M Ölsäure und 33 μ M Palmitinsäure) für 16 h hinzugefügt. Die Zellen wurden fixiert und die Lipidtröpfchen mit LD540 (orange) und die Zellkerne mit DAPI (blau) angefärbt. Maßstab 20 μ m. **B)** Quantifizierung der gefärbten LD540-Fläche pro Zelle. Die Daten werden als Mittelwerte mit SEM angezeigt (n=3). H: Hepatozyten, FS: Fettsäuremischung aus 66 μ M Ölsäure und 33 μ M Palmitinsäure. *p-Wert \leq 0,05; **p-Wert \leq 0,01; ***p-Wert \leq 0,001.

Um zu bestätigen, dass das LIGHT-Protein für die Lipidaufnahme in der Leber eine entscheidende Rolle spielt, wurden Hepatozyten für 16 h in An- und Abwesenheit von LIGHT und/oder 66 μ M Ölsäure und 33 μ M Palmitinsäure kultiviert. Wie in Abb. 40 zu erkennen, konnte LIGHT sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Fettsäuren die Neutrallipidanreicherung in Hepatozyten erhöhen. Zusätzlich wurde der LT β R-Signalweg *in vitro* in einer Hepatozyten-Splenozyten Kokultur blockiert. Hierzu wurden primäre Hepatozyten isoliert und mit 10 mg/ml des LIGHT-Antagonisten LT β R-Ig für 16 h inkubiert, der ebenfalls an den

LT β R-Rezeptor binden kann. Anschließend wurde 10 min die Alkin-Fettsäuremischung (Ölsäure:Palmitinsäure 2:1, 100 μ M) zu den Zellen gegeben, die Lipide extrahiert und auf eine DC-Platte aufgetragen. Wie in Abb. 41 zu sehen, reduziert LT β R-Ig die Splenozyten-vermittelte Fähigkeit die Fettsäureaufnahme zu steigern ohne statistisch signifikant zu sein. Hieraus konnte geschlussfolgert werden, dass der hepatische LT β R-Signalweg über das LIGHT-Zytokin die Lipidaufnahme sowie Lipidanlagerung erhöht.

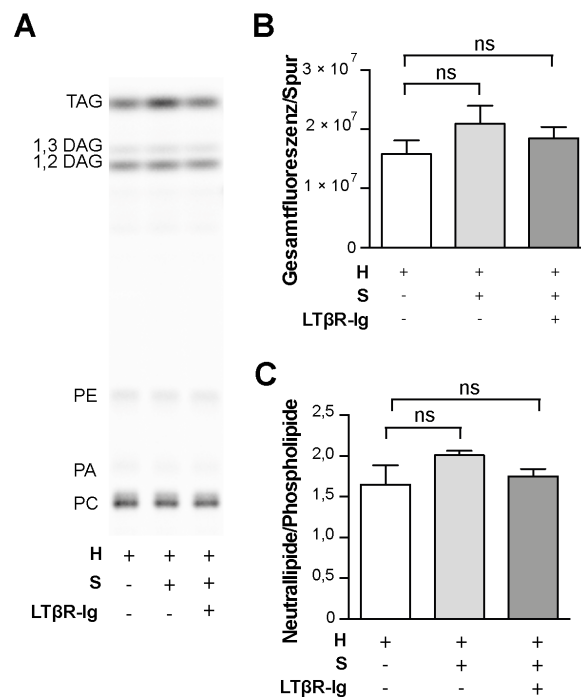


Abb. 41: Einfluss des LT β R-Signalweges auf die Fettsäureaufnahme in Hepatozyten.

A) Primäre Hepatozyten aus 8-10 Wochen alten ND-Mäusen wurden mit frisch isolierten Splenozyten aus der Milz von 6-Monate alten CD-HFD-Mäusen für 16 h in An- oder Abwesenheit von 10 mg/ml LT β R-Ig kokultiviert. Zur Visualisierung der Fettsäureaufnahme wurden die Hepatozyten am nächsten Tag 10 min lang mit einer Alkin-Fettsäuremischung, bestehend aus 66 μ M Alkin-Ölsäure und 33 μ M Alkin-Palmitinsäure inkubiert, bevor die Lipide extrahiert und die eingebauten Alkin-Fettsäuren mithilfe einer Click-Reaktion und anschließenden DC detektiert wurden. Quantifizierung der Gesamtfluoreszenz pro aufgetragener Spur (**B**) sowie des Neutrallipid/Phospholipid-Verhältnisses (**C**). Die Daten werden als Mittelwerte mit SEM angezeigt. H: Hepatozyten, S: Überstand Splenozyten, LT β R-Ig: Lymphotoxin- β Rezeptor. ns: nicht signifikant.

5.4.7 Analyse des Einflusses einzelner Splenozytenpopulationen auf die Fettsäureaufnahme in Hepatozyten

In Voruntersuchungen hat die AG Heikenwälder in CD-HFD-Mäusen erhöhte Mengen sowie eine gesteigerte Aktivierung der CD8⁺-T- und NKT-Zellen in der Milz beobachtet. Um den Einfluss dieser beiden Splenozytenpopulationen auf die hepatische Fettsäureaufnahme genauer zu untersuchen, wurden CD19⁺-B-, CD4⁺-T-, CD8⁺-T- oder NKT-Zellen aus

C57BL/6J CD-HFD-Milzen mithilfe eines Durchflusszytometers von Zeinab Abdullah aus der AG Knolle sortiert. In Tab. 16 sind hierzu die isolierten Mengen der verschiedenen Splenozytenpopulationen wiedergegeben.

Tab. 16: Mithilfe eines Durchflusszytometers isolierte Mengen sortierter Splenozyten.

Die Immunzellen aus der isolierten Milz wurden in Zellpopulationen aus NKT-Zellen, CD4⁺-T-Zellen, CD8⁺-T-Zellen und CD19⁺-B-Zellen sortiert. Die Ergebnisse der Zellzahlen von 4 Milzen aus CD-HFD C57BL/6J Mäusen sind veranschaulicht. Die Zellzahlen wurden in 1 ml Splenozyten-Medium bestimmt.

	NKT-Zellen	CD4 ⁺ -T-Zellen	CD8 ⁺ -T-Zellen	CD19 ⁺ -B-Zellen
CD-HFD Probe 1	$6,0 \times 10^4$	$9,0 \times 10^5$	$5,0 \times 10^5$	$3,5 \times 10^6$
CD-HFD Probe 2	$6,0 \times 10^4$	$5,0 \times 10^5$	$4,0 \times 10^5$	$3,0 \times 10^6$
CD-HFD Probe 3	$6,0 \times 10^4$	$4,4 \times 10^5$	$3,0 \times 10^5$	$2,7 \times 10^6$
CD-HFD Probe 4	$5,0 \times 10^4$	$5,0 \times 10^5$	$3,0 \times 10^5$	$3,0 \times 10^6$

Nach 2 h Zellkultur wurden jeweils 900 µl der isolierten Milz-Subpopulationen mit isolierten Hepatozyten kokultiviert und für weitere 2 h inkubiert. Das verbleibende Medium der Milz-Subpopulationen wurde als Gesamtsplenozytenansatz ebenfalls für 2 h zu den Hepatozyten gegeben. Um herauszufinden, ob sich die Kapazität von Hepatozyten zur Fettsäureaufnahme bei Anwesenheit bestimmter Immunzellgruppen verändert, wurden die Hepatozyten nach der Kokultur für 10 min mit einer Alkin-Fettsäuremischung aus 66 µM Alkin-Ölsäure und 33 µM Alkin-Palmitinsäure gefüttert. Die Lipide wurden dann extrahiert, in der Click-Reaktion eingesetzt und auf einer DC-Platte aufgetrennt. Die Ergebnisse zeigen, dass die Fettsäureaufnahme nicht von CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen und B-Zellen beeinflusst wird. Interessanterweise war in Anwesenheit von NKT-Zellen bei den Hepatozyten eine gesteigerte Fettsäureaufnahme zu erkennen (Abb. 42). Diese war ähnlich effektiv wie die nach der Inkubation von Hepatozyten mit den Gesamtsplenozyten aus CD-HFD-Mäusen. Dies deutet darauf hin, dass NKT-Zellen eine gesteigerte Neutrallipidanreicherung in Hepatozyten stimulieren können.

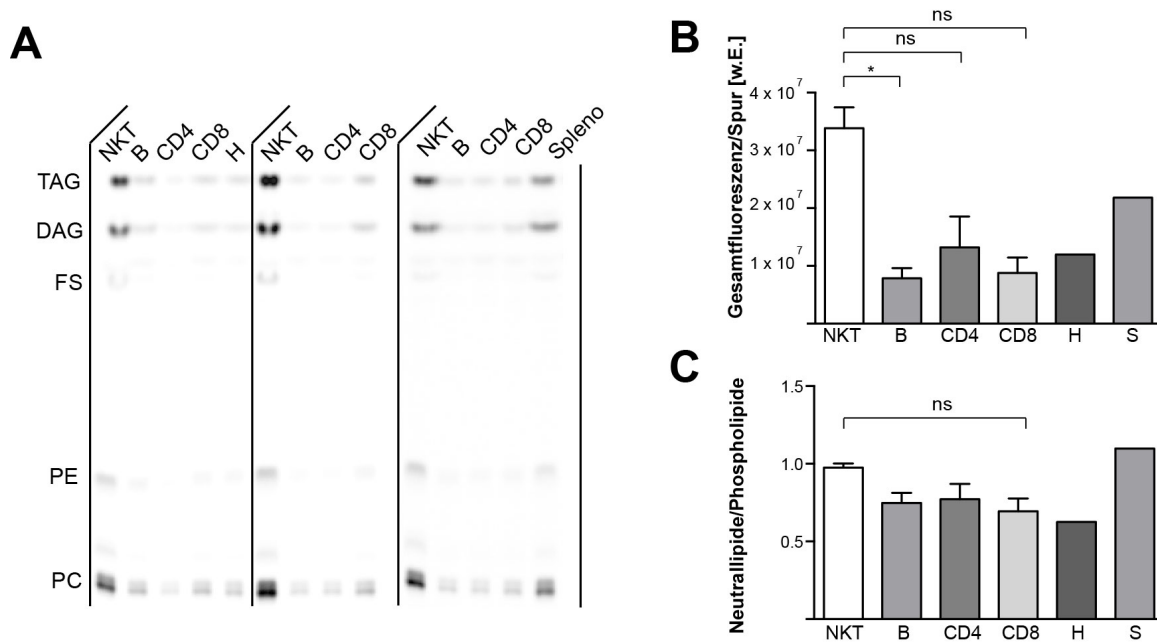


Abb. 42: Einfluss einzelner Splenozytensubpopulationen auf die Fettsäureaufnahme in Hepatozyten.

Die verschiedenen Splenozytensubpopulationen (NKT-, B-, CD4⁺- oder CD8⁺-T-Zellen) wurden aus den Milzen von 6-Monate alten CD-HFD-Mäusen mithilfe der Durchflusszytometrie isoliert. Primäre Hepatozyten wurden aus 8-10 Wochen alten ND-Mäusen sortiert, für 2 h kultiviert und anschließend 16 h mit einer variablen Anzahl an Splenozytensubpopulationen kokultiviert und auf eine DC-Platte aufgetragen (**A**). Quantifizierung der Gesamtfluoreszenz (**B**) sowie des Neutrallipid/Phospholipid-Verhältnisses (**C**) von isolierten Lipiden aus Hepatozyten nach Kokultivierung mit isolierten NKT-, CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen sowie B-Zellen (Splenozyten und Hepatozyten n=1, alle anderen Werte n≥3). Die Daten werden als Mittelwerte mit SEM gezeigt. ns: nicht signifikant; * p-Wert≤0,05.

6 Diskussion

Als hepatische Manifestation des metabolischen Syndroms ist die Krankheit NAFLD eng mit dem Auftreten einer Obesitas verbunden. Die chronischen Entzündungen im Körper sowie die übermäßige Lipidablagerung in der Leber während einer NAFLD können verschiedene Ursachen haben und es ist eine Herausforderung den jeweiligen Anteil an der Ausprägung der NAFLD zu bestimmen und diesen Ursachen entgegenwirken zu können.

In der vorliegenden Arbeit sollten Faktoren identifiziert werden, die für die Entwicklung einer frühen pathologischen Steatose in der Leber verantwortlich sind und um Fortschritt der Ausbildung von NAFLD in naher Zukunft verhindern zu können. Um die molekularen Mechanismen aufzuklären, welche an der Entstehung dieser Krankheit beteiligt sind, wurden *in vitro* Zellkulturmodelle mit primären Leber- und Immunzellen verwendet.

6.1 Einfluss von Fettsäuren, Insulin und Glukose auf den Lipidmetabolismus

Mithilfe einer primären Hepatozytenzellkultur wurde im Rahmen dieser Arbeit der kurzfristige Einfluss variierender Glukose- und Insulinkonzentrationen auf den Einbau von Alkin-Fettsäuren in den Glycerophospholipidweg der Hepatozyten analysiert. Unter allen experimentellen Bedingungen wurden die Fettsäuren vor allem in TAG und PC eingebaut (Abb. 9). Der hohe Bedarf an PC der Hepatozyten/Zelle resultiert aus der Tatsache, dass PC mit einem Anteil von 40-50% den Hauptbestandteil der Zellmembranen darstellt (Gibellini und Smith, 2010) und mit anderen Phospholipiden und Proteinen die äußere Hülle der Lipidtröpfchen bildet (Fujimoto und Parton, 2011).

Die Fettsäuremischung aus Ölsäure und Palmitinsäure wurde in allen experimentellen Bedingungen am Höchsten in TAG nach 10-20 min *Chase* eingebaut. Dies deckt sich mit früheren Daten der AG Thiele, die zeigen konnten, dass die Bildung von Lipidtröpfchen bereits nach 5-15 min in der Nierenzelllinie COS-7 nachweisbar ist (Kuerschner und Moessinger, 2008). In Hepatozyten wurde der Einbau von Fettsäuren in TAG bereits nach 2 min gezeigt (Stein und Stein, 1967). Die Abnahme von TAG nach 30 min *Chase* deckt sich mit dem Export von TAG in VLDL-Partikeln, welche nach etwa 20-30 min gebildet werden (Vance und Vance, 1990).

Die Gesamtfluoreszenz der aufgenommenen Alkin-Lipide nahm über die *Chase*-Zeit in allen experimentellen Bedingungen kontinuierlich ab. Diese Abnahme kann ebenfalls durch die Sekretion des Hauptlipids TAG in Form von VLDL erklärt werden.

Aus den Daten ist erkennbar, dass eine veränderte Glukosekonzentration einen größeren Einfluss auf den Lipidmetabolismus im Glycerophospholipidweg ausübt als Insulin (Abb. 9). Bei einer ausreichenden Glukosekonzentration im Medium (11 mM Glc) wird Glukose zunächst über die Glykolyse abgebaut. Anschließend wird sie über die oxidative Phosphorylierung zur Energiegewinnung genutzt oder zur Bildung von Fettsäuren verwendet (Rui, 2014). Werden die bei der Glykolyse anfallenden Acetyl-CoAs nicht anderweitig verbraucht, können damit auch Fettreserven angelegt werden. Dies geschieht über die Bildung von TAG, welches entweder in Lipidtröpfchen in der Leber gespeichert oder in Form von VLDL-Partikeln zu anderen peripheren Geweben wie dem Fettgewebe exportiert wird. Überschüssige Glukose wird in der Leber vor allem in Form von Glykogen gespeichert (Rui, 2014).

Im *Pulse-Chase*-Experiment bauten Hepatozyten unter glukosearmen Bedingungen mehr Fettsäuren in TAG und weniger in PC ein. Unter glukosereichen Bedingungen wurde das Gegenteil beobachtet, der Einbau in TAG war geringer und der Einbau in PC erhöht (Abb. 9). Es wäre denkbar, dass die in der Glykolyse gewonnenen Acetyl-CoAs bereits vor dem *Pulse-Chase*-Experiment in den Glycerophospholipidweg gelangt sind, sodass weniger der gefütterten markierten Fettsäuren in TAG eingebaut werden. Für diese Theorie spricht, dass die Gesamtmenge der aufgenommenen Alkin-Fettsäuren pro *Chase*-Zeitpunkt in den glukosereichen experimentellen Bedingungen etwas geringer war.

Entgegen der Erwartung wurden unter glukosearmen Bedingungen Alkin-Fettsäuren bevorzugt in TAG eingebaut. Eine mögliche Erklärung wäre, dass während des Glukosemangels die Hepatozyten Fettsäuren aus den TAG-Speichern hydrolysieren, um diese für die β -Oxidation zur Energiedeckung zu nutzen. Die β -Oxidation ist während einer Fastenperiode erhöht, während die *de novo*-Fettsäurebildung reduziert wird (Rui, 2014). Ebenso könnte Glukose aus den Glykogenspeichern freigesetzt worden sein, um das niedrige Glukoseniveau auszugleichen. Obwohl die gesunde Leber wenig TAG speichert und es vielmehr als VLDL sekretiert, ist es möglich, dass nur eine geringe Grundenergiespeicherung in TAG in der Leber stattfindet. So war auch in Hepatozyten aus ND-Mäusen eine relativ geringe TAG-Speicherung in Lipidtröpfchen nachweisbar (Abb. 16). Werden nun Fettsäuren durch die *Pulse-Chase*-Analyse zugefügt, werden diese direkt genutzt um die TAG-Speicher wieder aufzufüllen.

Insulin hatte in den durchgeführten Experimenten nur einen minimalen Einfluss auf den Einbau von Fettsäuren in den Glycerophospholipidweg (Abb. 9). Insulin ist vor allem für die Absorption und Speicherung der Glukose verantwortlich (Rui, 2014). So induziert Insulin die Aufnahme von Glukose über GLUT4 und stimuliert die Bildung von Glukose-6-Phosphat, eines Zwischenprodukts in der Glykogensynthese. Ebenfalls aktiviert es die Pyruvatdehydro-

genase, wodurch Pyruvat, das Endprodukt der Glykolyse, in Acetyl-CoA umgewandelt wird (Bechmann et al., 2012). Acetyl-CoA kann wiederum für die Energiegewinnung, Fettsäuresynthese oder TAG-Biosynthese verwendet werden. Ein veränderter Einbau von Fettsäuren durch Insulin konnte allerdings nicht beobachtet werden.

Insgesamt hatten unterschiedliche Insulin- und Glukosespiegel nur einen minimalen Einfluss auf den hepatischen Lipidmetabolismus.

Beim Vergleich des Einbaus der ungesättigten Ölsäure und der gesättigten Palmitinsäure in die verschiedenen Lipidklassen zeigte sich ein primärer Einbau von Ölsäure in TAG (Abb. 10). Der Einbau von Palmitinsäure in TAG und PC war hingegen ausgeglichen. Es wird vermutet, dass Enzyme der TAG-Synthese eine Präferenz für ungesättigte Fettsäuresubstrate besitzen und dass die Veresterung von ungesättigten Fettsäuren in TAG durch eine erhöhte Löslichkeit in Lipidtröpfchen entsteht (Listenberger et al., 2003). Eine andere Studie konnte einen ähnlichen Effekt auf den Lipidmetabolismus beobachten (Li et al., 2009). So führte auch hier die Behandlung von primären Hepatozyten mit Ölsäure zu einer TAG-Akkumulation, während Palmitinsäure nur einen geringfügigen Anstieg des TAG-Gehalts bewirkte. Gleichzeitig konnte die Studie zeigen, dass Palmitinsäure dafür einen Einfluss auf die Apoptoseinduktion in den Hepatozyten hat. Dieser proapoptotische und anti-TAG-akkumulierende Effekt von Palmitinsäure wurde aufgehoben, wenn die Zellen einer Mischung aus Ölsäure und Palmitinsäure ausgesetzt worden waren. Auch in der hier vorliegenden Arbeit führte die Zugabe von Ölsäure und Palmitinsäure als Fettsäuremischung zu einem verstärkten Einbau der Alkin-Fettsäuren in TAG als Palmitinsäure alleine (Abb. 11). Die Gesamtkonzentration des Fettsäuregemischs hatte dabei keinen großen Effekt auf den Einbau in die verschiedenen Lipidklassen. Sowohl nach der Zugabe von 100 μM und 600 μM Fettsäuren wurden die Alkin-Fettsäuren vermehrt zu einem ähnlichen Prozentsatz in TAG eingebaut und der Einbau war wie erwartet höher in TAG höher als in PC.

6.2 Auswirkung einer HFD auf die Entstehung einer Steatose in der Leber

Um Veränderungen im hepatischen Lipidstoffwechsel sowie eine Steatose zu induzieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein HFD-Mausmodell eingesetzt. HFD-Mausmodelle wurden auch in anderen Studien bevorzugt verwendet, um eine Obesitas, Dyslipidämie, gestörte Glukosetoleranz und erhöhte Expression von Regulatoren der Lipogenese und proinflammatorischen Zytokinen hervorzurufen (Takahashi, Soejima und Fukusato, 2012; Buettner, Scholmerich und Bollheimer, 2007).

Die Mäuse zeigten in der vorliegenden Arbeit nach der HFD-Fütterung neben einer sichtbaren makroskopischen Fettleibigkeit deutliche Symptome einer hepatischen Steatose, jedoch ohne größere Anzeichen einer inflammatorischen Steatohepatitis (Abb. 12, 15). Zusätzlich wurden in diesen HFD-Mäusen geringfügig gestiegene Serum-Transaminasen und eine erhöhte hepatische TAG-Speicherung nachgewiesen (Abb. 14, 16).

Bei *Pulse-Chase*-Experimenten in den HFD-Hepatozyten konnten entgegen der Erwartungen keine großen Veränderungen im Fettsäuremetabolismus wie ein erhöhter Einbau in TAG gegenüber den ND-Hepatozyten beobachtet werden, welche die Ausbildung der Steatose in den HFD-Hepatozyten erklären würden (Abb. 18). Vielmehr war die Gesamtlipidaufnahme der Alkin-Fettsäuren in den HFD-Mäusen sogar geringer als in den ND-Mäusen. Dies könnte damit zusammenhängen, dass die Lebern der HFD-Mäuse bereits sehr viele Lipidtröpfchen vor der Fütterung mit Alkin-Fettsäuren aufweisen und daher keinen Bedarf mehr haben vermehrt Fettsäuren aufzunehmen. Der einzige signifikant gemessene Unterschied zwischen der ND- und HFD-Bedingung war eine erhöhte Sekretion von TNF durch Kupfferzellen, der die Entwicklung einer Steatose in den HFD Tieren begründen könnte (Abb. 21). Es konnte bereits früher gezeigt werden, dass die Sekretion von TNF über Makrophagen bei einer HFD-induzierten Obesitas für die Ausbildung einer Steatose verantwortlich ist (De Taeye et al., 2007).

Interessanterweise konnte in dieser Arbeit mithilfe eines Kupfferzellüberstandes aus HFD-Mäusen die erhöhte Akkumulation von Lipidtröpfchen in gesunden Hepatozyten erzeugt werden (Abb. 20). Das bedeutet, Kupfferzellen haben einen direkten, stimulierenden Effekt auf die Steatose-Entwicklung in gesunden Hepatozyten *in vitro*. Dabei wurde TNF als wichtige Komponente in diesem Prozess identifiziert, die für eine hepatische Steatose verantwortlich sein könnte (Abb. 19, Abb. 20). Auch in der Literatur wird die Sekretion von TNF für die Entstehung einer Steatose beschrieben (Huang et al., 2010).

Die Frage war, was die erhöhte TNF-Ausschüttung in dem verwendeten HFD-Modell dieser Arbeit induzierte. Die Behandlung von isolierten Kupfferzellen mit 0,5 mM FFS einer Konzentration, die im Serum nach der Behandlung mit HFD oder LPS gemessen wurde (Abb. 14), führte zu einer erhöhten TNF-Sekretion (Abb. 21). Dies wurde durch eine andere Studie bestätigt, die eine gesteigerte mRNA-Expression von TNF in Kupfferzellen nach der Behandlung mit FFS nachwies (Tang et al., 2013). FFS sind sowohl in übergewichtigen als auch in NASH-Patienten erhöht, können eine Insulinresistenz auslösen und führen zu einer Aktivierung des proinflammatorischen NF- κ B-Signalweges (Sharifnia et al., 2015; Chen et al., 2009). FFS können auch den TLR4-Signalweg in der Makrophagen-Zelllinie RAW264.7 und die Expression von TLR4 in Kupfferzellen induzieren (Tang et al., 2013; Shi et al., 2006),

was wiederum die Rolle einer metabolischen Überladung und die Rolle von Kupfferzellen in der Entwicklung einer NAFLD unterstreicht.

6.3 Effekt von LPS auf die Entwicklung einer Steatose

LPS ist neben FFS ein weiterer Faktor, der in der Literatur mit der Entwicklung einer HFD-induzierten Steatose in Verbindung gebracht wird (Meli, Mattace Raso und Calignano, 2014). So sind LPS-Konzentrationen in NAFLD-Patienten signifikant erhöht und nur ein *Knockout* des TLR4-Signalweges, über den LPS Kupfferzellen in der Leber aktiviert, schützt Mäuse gegen eine HFD-induzierte NAFLD (Harte et al., 2010; Jia et al., 2014; Kim et al., 2012).

In der vorliegenden Arbeit führte eine *in vivo* Behandlung mit LPS von C57BL/6NCrI WT-Mäusen zu einer phänotypisch ähnlichen hepatischen Steatose wie nach einer 10 Wochen HFD Fütterung (Abb. 22). Auch in ND-Mäusen stimulierte eine akute *in vivo* LPS-Behandlung in der Leber eine Steatose (Abb. 16A- 16C). Kupfferzellen sind für die Entwicklung der Steatose essentiell, da die LPS-Zugabe zu einer reinen Hepatozytenkultur nicht zur Ausprägung einer Steatose führte. Aus der Literatur ist bekannt, dass Kupfferzellen über die Aktivierung des TLR4-Signalweges durch LPS an der Entwicklung einer NAFLD maßgeblich beteiligt sind (Baffy, 2009).

Das Zytokinprofil von *in vitro* behandelten Kupfferzellen zeigte eine breite Aktivierung der inflammatorischen Antwort, wobei auch hier wie nach der HFD-Behandlung nur die TNF-Sekretion zwischen unbehandelten und LPS-behandelten Kupfferzellen signifikant unterschiedlich war (Abb. 19, 27). Diese inflammatorische Antwort deckt sich mit der verstärkten Genexpression der Entzündungsmarker CD14 und NF- κ B, von denen bereits bekannt ist, dass diese nach LPS-Stimulation verstärkt exprimiert werden (Soares et al., 2010; Abb. 29). Eine breite proinflammatorische Zytokinantwort wurde auch in Kupfferzellen von Menschen, Ratten und Mäusen nach *in vitro* LPS-Stimulation beobachtet (Roland et al., 1994; Decker, 1990).

Zudem waren die Serumtransaminasen nach der *in vivo* LPS-Stimulation stärker erhöht als nach einer HFD-Behandlung (Abb. 14). Auf biochemischem Niveau wird die Steatose durch ein verändertes Fettsäure *Pulse-Chase*-Profil widerspiegelt, welches nicht in HFD-Hepatozyten beobachtet werden konnte (Abb. 18, 25). Der modifizierte Stoffwechsel konnte nicht auf eine erhöhte Genexpression von Enzymen des Glycerophospholipidweges in den Hepatozyten zurückgeführt werden (Soares et al., 2010; Abb. 29). Die Aktivität und Regulation der beteiligten Enzyme wurden jedoch bislang nicht näher analysiert, sodass ein Einfluss nicht ausgeschlossen werden kann.

Die VLDL-Sekretion war hingegen nach *in vivo* LPS-Stimulation verringert. Grund hierfür kann eine reduzierte Apolipoprotein B-Synthese oder -Sekretion sein, wie es bereits in NAFLD-Mausmodellen und NASH-Patienten gezeigt wurde (Charlton et al., 2002; Letteron et al., 2003). Apolipoprotein B ist essentiell für die Bildung von VLDL-Partikeln und den anschließenden Export von TAG aus der Leber. Andere Studien hingegen zeigten eine erhöhte VLDL-Sekretion während einer NAFLD (Fon Tacer und Rozman, 2011). Grund hierfür könnte die Verwendung variierender Mausstämme sein, sowie andere LPS-Konzentrationen oder unterschiedliche LPS-Stimulationszeiten (Imajo et al., 2012; Wiegman et al., 2003).

Neben diesen Veränderungen zeigten unsere Daten, dass die LPS-induzierte Steatose ebenfalls von einem Faktor abhängig ist, der offensichtlich von Kupfferzellen sekretiert wird (Abb. 26). Auch hier wurde die Aktivierung von Kupfferzellen über LPS und die Sekretion von TNF in Kokultorexperimenten als der ausschlaggebende Faktor identifiziert (Abb. 27, 28). Dies wird von einer anderen Studie untermauert, die zeigt, dass LPS-resistente Mäuse kein TNF produzieren und dass ein TNF-Antikörper den Effekt von LPS, erhöhte TAG und Cholesterolspiegel im Serum zu stimulieren, blockiert (Memon et al., 1993).

Ein großer Vorteil des in dieser Arbeit verwendeten Versuchsmodells mit primären Zellen ist, dass man zwischen einem metabolischen Überladungsstress in Hepatozyten und sekretierten Faktoren von Kupfferzellen als Verursacher für eine Steatose in Hepatozyten unterscheiden kann. Die Resultate zeigen eindeutig, dass in der frühen Phase einer Obesitas Kupfferzellen einen starken Einfluss auf die Entstehung einer Steatose haben. Die Daten schließen allerdings nicht die Beteiligung von Zellen außerhalb der Leber aus, insbesondere von Faktoren, die aus dem Fettgewebe freigesetzt werden, wie beispielsweise proinflammatorische Zytokine oder Fettsäuren.

Dennoch ist es laut der Ergebnisse dieser Arbeit sehr wahrscheinlich, dass Kupfferzellen die Hauptquelle der inflammatorischen Signale darstellen, die auf die Hepatozyten einwirken – eine Tatsache, die auch bereits in *in vivo* Studien über die Entwicklung einer Steatohepatitis nach einer Cholin/Methionin-freien Fütterung gezeigt werden konnte (Tosello-Tramont et al., 2012).

Der Vergleich zwischen einer HFD- und einer LPS-Behandlung deutet darauf hin, dass TNF der bestimmende Faktor der hepatischen Steatose ist – unabhängig von der ursächlichen Quelle. Ebenfalls zeigen die Daten, dass Kupfferzellen als Sensor fungieren, die auf erhöhte Fettsäuren- oder LPS-Konzentrationen mit der Ausschüttung von TNF reagieren. Dies passiert, wenn der TLR4-Signalweg über die Bindung von LPS oder Fettsäuren aktiviert wird (Soares et al., 2010).

6.4 TNF als bekannter Regulator des Lipidmetabolismus

Unabhängig davon, ob Kupfferzellen durch Fettsäuren oder LPS aktiviert werden, wurde TNF in dieser Arbeit als wichtiger Mediator identifiziert, um eine Steatose in Hepatozyten zu stimulieren. Die Hypothese einer Rolle von TNF als Regulator des Lipidmetabolismus wird durch verschiedene Studien unterstützt (Chen et al., 2009; Feingold und Grunfeld, 1987; Grunfeld et al., 1988; Grunfeld et al., 1990)

Der Einfluss von TNF auf den Lipidmetabolismus ist allerdings sehr komplex, da seine Wirkung auf verschiedenen Ebenen stattfindet und je nach Zelltyp oder Organ unterschiedlich sein kann (Chen et al., 2009). Im Folgenden werden die bisher bekannten Mechanismen beschrieben wie TNF eine Steatose in der Leber stimulieren kann.

6.4.1 Der Einfluss von TNF auf die Leber

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass TNF einen lipidakkumulierenden Effekt ausübt (Abb. 21). Andere Studien konnten auch eine erhöhte hepatische TAG-Synthese, gestiegene VLDL-Produktion und Cholesterolderstellung sowie eine reduzierte Fettsäureoxidation durch TNF nachweisen (Feingold und Grunfeld, 1987; Nachiappan et al., 1994). TNF steigert die Citratkonzentrationen und damit die hepatische *de novo*-Fettsäuresynthese in Ratten (Feingold and Grunfeld, 1987) und Mäusen (Grunfeld et al., 1990 ; Grunfeld et al., 1988). Citrat aktiviert das Enzym Acetyl-CoA Carboxylase, welches die Bildung von Malonyl-CoA aus Acetyl-CoA und Kohlenstoffdioxid katalysiert und für die Fettsäuresynthese verwendet wird (Loeffler, 2007).

Eine andere Studie bestätigte ebenfalls die TAG-akkumulierende Wirkung von TNF durch die vermehrte Transkription von metabolischen Genen, die im Lipidmetabolismus eine Rolle spielen, mit der Tendenz zu einer vermehrten Lipogenese und einer verminderten Lipidoxidation (Fon Tacer et al., 2007). Aber auch die verringerte Expression von ATGL, welches den ersten Schritt in der TAG-Hydrolyse katalysiert, würde die auch in dieser Arbeit verstärkte Akkumulation von Lipidtröpfchen erklären (Kim et al., 2006). So führte ein adenoviraler ATGL-Knockdown in der Leber zu einer Steatose in Mäusen und reduzierte die Hydrolyse von TAG in primären Hepatozyten (Ong et al., 2011). Wieder andere Studien führen den steatotischen Effekt von TNF auf eine gesteigerte Sekretion von TAG zurück, was zu einer Dyslipidämie beiträgt (Chen et al., 2009). Ein vermehrte Sekretion von Triglyceriden wurde in dieser Arbeit allerdings nicht festgestellt (Abb. 14).

6.4.2 Der Einfluss von TNF auf das Fettgewebe

TNF kann nicht nur in der Leber diverse metabolische Prozesse regulieren und damit direkt eine Steatose begünstigen, sondern den Lipidmetabolismus auch im Fettgewebe verändern. Im Fettgewebe wird TNF von proinflammatorischen Makrophagen, die während einer Obesitas vermehrt ins Fettgewebe einwandern, gebildet (Weisberg et al., 2003).

TNF inhibiert im Fettgewebe die Expression verschiedener Fettsäuretransportproteine und steigert die Lipolyserate (Cawthorn und Sethi, 2008). Beides führt zu erhöhten Fettsäurekonzentrationen im Serum, die von anderen peripheren Organen wie der Leber aufgenommen werden müssen – ein Prozess, der die Entstehung einer Steatose begünstigt. So können Kupferzellen, welche als Sensor auf die erhöhten Fettsäuren reagieren, in der Leber aktiviert werden und TNF freisetzen. Während der 1,5 h *in vivo* LPS-Stimulation könnte TNF im Fettgewebe daher zu einer erhöhten Freisetzung von FFS geführt haben, welche die Bildung der hepatischen Steatose induziert haben könnten. Das würde bedeuten, dass es neben der direkten Einwirkung von TNF aus der Leber über Kupferzellen auch eine indirekte zusätzliche Einwirkung von TNF aus dem Fettgewebe auf die Entwicklung einer Steatose geben könnte, die in dieser Arbeit jedoch nicht weiter betrachtet wurde.

TNF beeinflusst den Lipidmetabolismus im Körper ebenfalls durch eine veränderte Expression oder Sekretion von Adipokinen wie Adiponektin und Leptin im Fettgewebe. So wird die Expression und Sekretion von Adiponektin durch TNF herunterreguliert (Hector et al., 2007; He et al., 2016). Bei einer NAFLD verringert sich die Adiponektinkonzentration in Korrelation zum Schweregrad der Krankheit (Finelli und Tarantino, 2013). Adiponektin schützt normalerweise vor einer NAFLD, indem es die Fettsäureoxidation in der Leber steigert und die hepatische TAG-Synthese reduziert. Inwieweit TNF das Adipokin Leptin reguliert, ist noch nicht eindeutig geklärt (Chen et al., 2009).

Zudem inhibiert TNF im Fettgewebe die Expression vieler Proteine, welche in der Gluconeogenese, *de novo*-Fettsäuresynthese und der TAG-Synthese eingebunden sind (Chen et al., 2009), was zu einer veränderten TAG-Speicherung in Fettgewebe führt und wiederum die Fettsäurekonzentrationen in der Zirkulation erhöht. Da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass erhöhte Fettsäurekonzentrationen im Blut die TNF-Sekretion in Kupferzellen steigert (Abb. 21C) und dadurch die Lipidtröpfchenakkumulierung erhöht wird (Abb.20, 21 A+B), unterstreicht dies ebenfalls die wichtige Rolle des Fettgewebes in der Entstehung einer Steatose.

Imajo und Kollegen konnten zeigen, dass auch HFD-gefütterte Mäuse nach Stimulation mit geringen Dosen LPS eine stärkere TNF-Expression aufweisen (Imajo et al., 2012). Dies steht in Kontrast zu unseren Daten, da die LPS-behandelten HFD-Mäuse im Vergleich zu den unbehandelten Mäusen keine signifikante Erhöhung der TNF-Sekretion oder TAG-

Akkumulation zeigten (Abb. 16, 19). Diese gegensätzlichen Resultate können auch durch die Verwendung eines anderen Maushintergrunds, unterschiedlicher LPS-Konzentrationen und Stimulationszeiten entstanden sein (Imajo et al., 2012).

6.5 Effekt von Splenozyten auf die Entstehung einer Steatose

Neben dem Effekt von Kupferzellen auf die Entwicklung der Steatose, sollte in einem Kooperationsprojekt mit Dr. Monika Wolf und Prof. Dr. Heikenwälder auch der Einfluss weiterer Immunzellen auf eine Lipidakkumulation in Hepatozyten analysiert werden. Das verwendete CD-HFD-Modell – eine Kombination aus dem HFD-Fütterungsmodell und einem cholindefizientem Fütterungsmodell – benötigte wesentlich kürzere Fütterungszeiten, um einen schweren Leberschaden zu verursachen (Wolf et al., 2014).

Cholin ist ein essentieller Nährstoff, der in der Leber verstoffwechselt wird (Corbin und Zeisel, 2012). Menschen, die über die Nahrung zu wenig Cholin aufnehmen, entwickeln über die Zeit eine Steatose und Leberschaden. Cholindefizienz führt zu einer gestörten PC-Synthese, was wiederum die Bildung und den Export von VLDL-Lipoproteinen verringert, wodurch es zu einer Steatose kommt. Auch bei der Entstehung einer mitochondrialen Dysfunktion kann Cholin als wichtiger Teil der mitochondrialen Membran beteiligt sein (Corbin und Zeisel, 2012).

So führte die CD-HFD Fütterung in den Mäusen zu oxidativem und mitochondrialem Schaden, metabolischen Veränderungen und NASH (Wolf et al., 2014).

Da in vorangegangenen Experimenten der Kooperationspartner eine verstärkte Aktivierung von Immunzellen in den CD-HFD Tieren beobachtet wurde, sollte die Rolle der Immunzellen mithilfe von Rag1^{-/-}-Mäusen, welche keine B-, T- und NKT-Zellen besitzen (Andrews und Smyth, 2010; Mombaerts et al., 1992), näher untersucht werden. Interessanterweise zeigten die Rag1^{-/-}-Mäuse in biochemischen Untersuchungen *in vivo* und *in vitro* keine gesteigerte Fettsäureaufnahme. Dies deckte sich mit den Resultaten der Kooperationspartner, da Rag1^{-/-}-Mäuse keine Steatose nach einer Langzeitfütterung mit CD-HFD entwickelten (Abb. 31, 33, 34). Die anschließende Kokultur primärer Hepatozyten mit Splenozyten aus CD-HFD-Mäusen zeigt, dass CD-HFD-Splenozyten in Ab- und Anwesenheit von Fettsäuren eine Lipidakkumulation in den Hepatozyten induzieren können (Abb. 36). Eine Verbindung zwischen der Milz und NAFLD konnte bereits in mehreren Studien nachgewiesen werden. So haben NAFLD-Patienten, die sich in einer frühen Phase der NASH-Entwicklung befinden, eine vergrößerte Milz (Tarantino, Scalera und Finelli, 2013). Milzzellen von NAFLD-Mäusen produzieren zudem signifikant höhere Konzentrationen an inflammatorischen Zytokinen und

T-Zellen und haben eine verminderte Antigenverarbeitung und -präsentation dendritischer Zellen (Miyake et al., 2010).

Weitere Untersuchungen ergaben, dass NKT-Zellen in dieser Splenozytenpopulation für die gesteigerte Fettsäureaufnahme in Hepatozyten verantwortlich sind und dass lösliche Faktoren diese erhöhte Lipidakkumulation stimulieren (Abb. 42). Zunächst war das Ergebnis entgegen der Erwartungen, da andere Mausstudien zeigen konnten, dass hepatische NKT-Zellen während einer Fettleber reduziert vorliegen (Tajiri und Shimizu, 2012). So konnte eine Studie mit Leptin-resistenten ob/ob-Mäusen eine erhöhte Apoptose von hepatischen NKT-Zellen und damit einen Mangel an NKT-Zellen nachweisen (Guebre-Xabier et al., 2000). Ebenso zeigten mehrere Studien mit Mäusen, dass aktivierte Kupfferzellen über IL-12 einen selektiven Abbau von NKT-Zellen in der Leber während einer NAFLD hervorrufen (Kremer et al., 2010). Kupfferzellen sind als antigenpräsentierende Zellen bekannt, die über exogene Liganden NKT-Zellen aktivieren können (Tang et al., 2013). Allerdings zeigte diese Studie auch, dass die Aktivierung von Kupfferzellen zwar zu einem Abbau von NKT-Zellen in der Leber geführt hat, aber die Anzahl an NKT-Zellen in der Milz nicht betroffen war. Das könnte darauf hindeuten, dass NKT-Zellen aus Milz und Leber unterschiedliche Aufgaben in der Pathogenese einer NAFLD einnehmen. Außerdem wurden in Humanstudien vor allem erhöhte NKT-Konzentrationen in NAFLD-Patienten nachgewiesen (Tajiri et al., 2009).

Der Unterschied zwischen der in dieser Arbeit verwendeten Mausstudie und den anderen Mausstudien könnte auch daran liegen, dass das CD-HFD-Mausmodell der NAFLD-Pathogenese und NASH-Entwicklung im Menschen ähnlicher ist.

LIGHT (TNFSF14), ein Zytokin, welches in Splenozyten und intrahepatischen Lymphozyten von CD-HFD Mäusen am Stärksten erhöht ist und zur TNF-Superfamilie gehört, war ausreichend um eine starke Lipidaufnahme in der An- und Abwesenheit von Fettsäuren zu stimulieren (Wolf et al., 2014). Da in CD-HFD-Light^{-/-}-Mäusen keine verstärkte Aktivierung intrahepatischer NKT-Zellen wie in den CD-HFD-Mäusen gesehen werden konnte, scheinen NKT-Zellen über LIGHT die Fettsäureaufnahme zu regulieren (Wolf et al., 2014).

LIGHT kann an den LT β R Rezeptor binden und über den LT β R Signalweg den NF κ B-Signalweg aktivieren (Schneider, Potter und Ware, 2004). Indem LT β R, ein Antagonist von LIGHT, die Lipidaufnahme durch primäre Hepatozyten blockiert, scheint es sehr wahrscheinlich, dass LIGHT über den LT β R-Signalweg die Fettsäureaufnahme regulieren kann.

7 Schlussfolgerung

Diese Doktorarbeit hat den Einfluss verschiedener Faktoren auf die Entstehung einer hepatischen Steatose im *in vivo* und *in vitro* Modell betrachtet. Erhöhte Fettsäurekonzentrationen, ein höherer Anteil Ölsäure in der Fettsäuremischung, und gestiegene LPS- und TNF-Konzentrationen führten zu einem prosteatotischen Lipidmetabolismus in Hepatozyten.

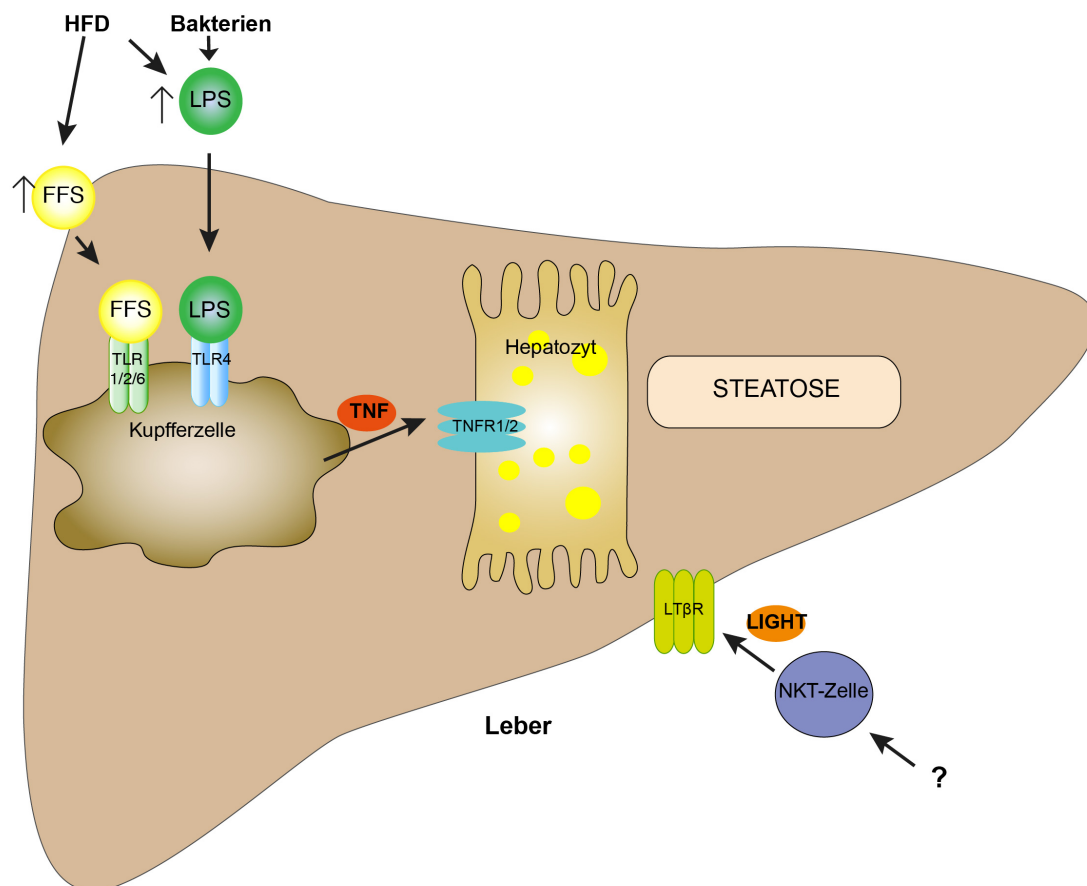


Abb. 43: Die Rolle von Immunzellen in der Entwicklung einer Steatose in Hepatozyten.

Erhöhte Fettsäurekonzentrationen entstehen durch einen metabolischen Überschuss wie bei einer HFD. Gestiegene LPS-Konzentrationen werden durch Bakterien oder einer erhöhten Nahrungsaufnahme von Lipiden wie bei einer HFD hervorgerufen. Sowohl FFS und LPS können an die *toll-like* Rezeptoren (TLR) auf der Oberfläche von Kupferzellen binden und dadurch die Sekretion diverser Zytokine wie TNF auslösen. TNF bindet über die TNFR1 oder -2 Rezeptoren an Hepatozyten (Berlanga et al., 2014; Feldstein et al., 2004). Dies führt zu einer erhöhten Lipidakkumulation und damit zur Steatose in Hepatozyten. NKT-Zellen werden durch einen bisher unbekanntem Mechanismus aktiviert und sekretieren LIGHT, ein weiteres Mitglied der TNF-Superfamilie. LIGHT bindet an den LTβR und stimuliert damit auch eine Steatose in Hepatozyten.

Kupferzellen konnten als Auslöser des veränderten Lipidmetabolismus und damit Verursacher der Steatose in Hepatozyten identifiziert werden. So agieren sie als hepatische Sensoren und können durch erhöhte FFS-Konzentrationen und LPS-Konzentrationen

aktiviert werden. Aktivierte Kupfferzellen reagieren mit der Ausschüttung von Zytokinen und stimulieren über die Sekretion von TNF die Akkumulation von Lipidtröpfchen in Hepatozyten. Das primäre Ereignis in der Entwicklung einer Steatose ist daher nicht eine metabolische Überladung des Hepatozyten, sondern vielmehr die direkte Stimulierung von Kupfferzellen durch erhöhte FFS und LPS. Eine hepatische Steatose konnte auch über aktivierte NKT-Zellen durch die Sekretion von LIGHT, ebenfalls Mitglied der TNF-Superfamilie, über den LT β R-Signalweg ausgelöst werden. Basierend auf den erlangten Daten konnte daher ein Modell erstellt werden, welches die frühen Mechanismen der Entwicklung einer Steatose zeigt, welches in Abb. 43 und der dazugehörigen Legende beschrieben wird. Insgesamt zeigen die Daten, dass die Interaktion zwischen Immunzellen und Hepatozyten für eine beginnende Entstehung einer Steatose eine essentielle Rolle spielt.

8 Ausblick

Mit der eingesetzten *Pulse-Chase*-Analyse konnten Veränderungen im Lipidmetabolismus bezüglich des Einbaus von markierten Fettsäuren in den Glycerophospholipidweg leicht verfolgt werden. Um ein möglichst vollständiges Abbild des hepatischen Stoffwechsels zu bekommen, sollte in zukünftigen Studien noch die β -Oxidation sowie die hepatische Lipogenese unter dem Einfluss der verschiedenen Faktoren wie Glukose, Fettsäuren oder LPS analysiert werden. Die β -Oxidation könnte beispielsweise mithilfe von radioaktiv markierter Palmitinsäure und die Lipogenese mithilfe von radioaktivem Acetyl-CoA in primären Hepatozyten untersucht werden (Huynh et al., 2014; Wakil, 1961).

Bei den Studien mit Hepatozyten aus ND- und HFD-Hepatozyten sowie bei den Fettsäure-, Insulin- und Glukoseversuchen sollte zusätzlich wie bei den LPS-Studien die VLDL-Sekretion gemessen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden sehr hohe LPS-Konzentrationen eingesetzt, um den kurzfristigen direkten Effekt von LPS auf den Lipidmetabolismus zu untersuchen. So war die eingesetzte LPS-Konzentration mit 500 EU/ml 4-5fach so hoch wie in NAFLD-Patienten, bei denen der Wert zwischen 0,3-14,8 EU/ml liegt (Kanuri und Bergheim, 2013). Allerdings muss hierbei auch bedacht werden, dass Mäuse auf LPS weniger sensibel als Menschen reagieren. Es müssen daher generell höhere Dosen an LPS verwendet werden, um einen ähnlichen Effekt wie in Menschen auslösen zu können (Copeland et al., 2005).

Um einen langfristigen Effekt von LPS auf den Stoffwechsel zu analysieren, sollten den Mäusen geringere LPS-Dosen über einen längeren Zeitraum *in vivo* verabreicht werden.

Ebenso muss in weiteren Studien geklärt werden, wie die TAG-Speicherung in Hepatozyten nach Behandlung mit dem Kupfferzellüberstand aus HFD-Mäusen oder TNF im Mikros-

kopieexperiment zustande kommt (Abb. 20), da keine zusätzlichen Fettsäuren in das Zellkulturmedium hinzugegeben wurden und der Fettsäureanteil im Zellkulturmedium verglichen zu der freien Fettsäurekonzentration im Serum sehr gering war (unverdünntes FCS enthält etwa 0,08 mM). So kann eine gesteigerte Umwandlung des Membranlipids PC in TAG für die Lipidspeicherung verantwortlich sein (van der Veen, Lingrell und Vance 2012). Andererseits kann die TNF-abhängige hepatische Lipidakkumulation durch eine vermehrte Fettsäuresynthese entstehen. Dies deckt sich mit der Studie von Mahony und Kollegen, die gezeigt hat, dass 2 h nach TNF-Injektion die hepatische Glukoseaufnahme in Mäusen verdoppelt wurde. Diese aufgenommene Glukose wurde nicht für die Oxidation, sondern für die Lipogenese verwendet und führte zu einem Anstieg der FFS und TAG im Blut (Mahony und Tisdale, 1990). Ebenso kann TNF die Glukosekonzentration im Blut erhöhen, wie eine *in vivo* Mausstudie von Feingold und Kollegen zeigte (Feingold et al., 1989). Um diese Frage zu klären werden momentan massenspektrometrische Analysen mit Isotopenmarkierter Glukose sowie Palmitinsäure und Acetat in Kooperation mit Dr. Katharina vom Dorp und Prof. Dr. Peter Dörmann (IMBIO, Universität Bonn) durchgeführt. Zudem würden sich auch hier Radioaktivitätsassays anbieten.

Diese Arbeit konnte einen wichtigen Einfluss von NKT-Zellen und Kupfferzellen auf die Entwicklung einer Steatose in der Leber nachweisen. Während gezeigt werden konnte, dass Kupfferzellen über LPS und Fettsäuren aktiviert werden, ist die ursächliche NKT-Aktivierung im CD-HFD-Mausmodell nicht näher untersucht worden. Es ist beschrieben, dass NKT-Zellen als Antigen-reaktive Immunzellen, durch CD1d-präsentierte exogene, mikrobielle Glykolipid-Antigene oder endogene Lipidantigene wie verschiedene Glykosphingolipide oder Phospholipide aktiviert werden (Godfrey und Rossjohn, 2011). Auch LPS kann NKT-Zellen stimulieren (Nagarajan und Kronenberg, 2007).

Um zu untersuchen, ob NKT-Zellen in dem CD-HFD-Mausmodell über LPS oder Fettsäuren aktiviert werden, könnten NKT-Zellen beispielsweise aus ND-Mäusen isoliert und mit LPS oder Fettsäuren *in vitro* behandelt werden. Anschließend kann die Aktivierung entweder per FACS-Analyse oder ELISA ermittelt werden. Interessant wäre auch eine Kokultur dieser LPS- oder Fettsäure-aktivierten NKT-Zellen mit Hepatozyten aus ND-Mäusen.

Es wäre zudem interessant zu untersuchen, ob es mögliche Interaktionen zwischen NKT-Zellen und Kupfferzellen gibt. Werden beispielsweise die NKT-Zellen aus der Milz durch Kupfferzellen aktiviert? Hierzu könnten Kokulturexperimente mit NKT-Zellen und Kupfferzellen in Kokulturplatten durchgeführt werden, um die Zytokinkonzentrationen im Medium der NKT-Zellen zu bestimmen. Außerdem wäre interessant herauszufinden, welcher Zelltyp einen stärkeren Einfluss auf die Steatose hat.

In dieser Studie wurde der Effekt einer HFD oder CD-HFD auf die Entstehung einer Steatose

betrachtet. Jedes Tiermodell deckt allerdings nur einen Teilaspekt der zugrunde liegenden Mechanismen einer Krankheit ab und auch andere Faktoren wie diverse Stressfaktoren, andere Nahrungsbestandteile oder genetische Faktoren, welche das Tiermodell nicht berücksichtigt, können bei der Entwicklung einer NAFLD eine wichtige Rolle spielen. In zukünftigen Studien wäre es auch wissenswert herauszufinden, in wie weit andere Nahrungsbestandteile wie Fruktose oder allgemein Kohlenhydrate diesen Prozess beeinflussen können und ob der Effekt womöglich stärker oder schwächer ist. Fruktose ist beispielsweise ebenfalls bekannt dafür, eine metabolische Endotoxämie zu stimulieren (Kavanagh et al., 2013).

Um den steatotischen Einfluss von TNF und LIGHT *in vivo* zu bestätigen, könnten diese durch einen gezielten und steuerbaren *Knockdown* in der Leber bzw. in der Milz in HFD-Mäusen ausgeschaltet und die Kupferzellen bzw. NKT-Zellen anschließend isoliert werden. Haben die Zellen in einer anschließenden Kokultur mit Hepatozyten aus ND-Mäusen keinen Effekt, so zeigt dies den direkten *in vivo* Einfluss der beiden Zytokine auf die Steatose.

Es ist bekannt, dass die Lipidtröpfchen in den Hepatozyten eine Heterogenität aufweisen. Um herauszufinden, ob diese Heterogenität mit der Sensibilität gegenüber TNF zusammenhängt, können die Hepatozyten anhand ihrer Lipidtröpfchengröße mittels FACS sortiert und anschließend nach der Menge an TNFR1- und -2-Rezeptoren durch *Western Blot* analysiert werden. Korreliert die Lipidtröpfchengröße mit der Menge an TNFR-Rezeptoren, könnte TNF die Heterogenität in Lipidtröpfchen beeinflussen.

Aufgrund der gewonnenen Daten könnten monoklonale Antikörper gegen LIGHT oder TNF als Therapieansatz gegen die Krankheit NAFLD Einsatz finden. Mausstudien, welche sich mit der Wirkung von anti-TNF-Antikörpern auf die Pathogenese von NAFLD beschäftigten, zeigten bereits erste positive Ergebnisse (Federico et al., 2014).

Insgesamt ist für die Manifestation der NAFLD eine Kombination mehrerer Einflüsse verantwortlich. Die Sekretion der Zytokine LIGHT durch NKT-Zellen und TNF durch Kupferzellen wurde in dieser Arbeit als wichtiger Faktor in der Ausbildung einer Steatose identifiziert und verdeutlicht die enge Verbindung zwischen immunologischen Prozessen und dem Lipidmetabolismus in der Leber.

9 Referenzen

- Anderson, N., and J. Borlak. 2008. 'Molecular mechanisms and therapeutic targets in steatosis and steatohepatitis', *Pharmacol Rev*, 60: 311-57.
- Andrews, D. M., and M. J. Smyth. 2010. 'A potential role for RAG-1 in NK cell development revealed by analysis of NK cells during ontogeny', *Immunol Cell Biol*, 88: 107-16.
- Andrikopoulos, S., A. R. Blair, N. Deluca, B. C. Fam, and J. Proietto. 2008. 'Evaluating the glucose tolerance test in mice', *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 295: E1323-32.
- Anstee, Q. M., and C. P. Day. 2013. 'The genetics of NAFLD', *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 10: 645-55.
- Anstee, Q. M., and R. D. Goldin. 2006. 'Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research', *Int J Exp Pathol*, 87: 1-16.
- Arya, M., I. S. Shergill, M. Williamson, L. Gommersall, N. Arya, and H. R. Patel. 2005. 'Basic principles of real-time quantitative PCR', *Expert Rev Mol Diagn*, 5: 209-19.
- Baffy, G. 2009. 'Kupffer cells in non-alcoholic fatty liver disease: the emerging view', *J Hepatol*, 51: 212-23.
- Bechmann, L. P., R. A. Hannivoort, G. Gerken, G. S. Hotamisligil, M. Trauner, and A. Canbay. 2012. 'The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases', *J Hepatol*, 56: 952-64.
- Beller, M., K. Thiel, P. J. Thul, and H. Jackle. 2010. 'Lipid droplets: a dynamic organelle moves into focus', *FEBS Lett*, 584: 2176-82.
- Berlenga, A., E. Guiu-Jurado, J. A. Porrás, and T. Auguet. 2014. 'Molecular pathways in non-alcoholic fatty liver disease', *Clin Exp Gastroenterol*, 7: 221-39.
- Bilzer, M., F. Roggel, and A. L. Gerbes. 2006. 'Role of Kupffer cells in host defense and liver disease', *Liver Int*, 26: 1175-86.
- Boden, G. 2008. 'Obesity and free fatty acids', *Endocrinol Metab Clin North Am*, 37: 635-46, viii-ix.
- Bonora, E., and G. Targher. 2012. 'Increased risk of cardiovascular disease and chronic kidney disease in NAFLD', *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 9: 372-81.
- Boutagy, N. E., R. P. McMillan, M. I. Frisard, and M. W. Hulver. 2016. 'Metabolic endotoxemia with obesity: Is it real and is it relevant?', *Biochimie*, 124: 11-20.
- Boyce, M., and C. R. Bertozzi. 2011. 'Bringing chemistry to life', *Nat Methods*, 8: 638-42.
- Braunersreuther, V., G. L. Viviani, F. Mach, and F. Montecucco. 2012. 'Role of cytokines and chemokines in non-alcoholic fatty liver disease', *World J Gastroenterol*, 18: 727-35.
- Brun, P., I. Castagliuolo, V. Di Leo, A. Buda, M. Pinzani, G. Palu, and D. Martines. 2007. 'Increased intestinal permeability in obese mice: new evidence in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis', *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 292: G518-25.
- Bruning, J. C., J. Winnay, S. Bonner-Weir, S. I. Taylor, D. Accili, and C. R. Kahn. 1997. 'Development of a novel polygenic model of NIDDM in mice heterozygous for IR and IRS-1 null alleles', *Cell*, 88: 561-72.
- Buettner, R., J. Scholmerich, and L. C. Bollheimer. 2007. 'High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents', *Obesity (Silver Spring)*, 15: 798-808.
- Cani, P. D., J. Amar, M. A. Iglesias, M. Poggi, C. Knauf, D. Bastelica, A. M. Neyrinck, F. Fava, K. M. Tuohy, C. Chabo, A. Waget, E. Delmee, B. Cousin, T. Sulpice, B. Chamontin, J. Ferrieres, J. F. Tanti, G. R. Gibson, L. Casteilla, N. M. Delzenne, M. C. Alessi, and R. Burcelin. 2007. 'Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance', *Diabetes*, 56: 1761-72.
- Cani, P. D., R. Bibiloni, C. Knauf, A. Waget, A. M. Neyrinck, N. M. Delzenne, and R. Burcelin. 2008. 'Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice', *Diabetes*, 57: 1470-81.

- Cawthorn, W. P., and J. K. Sethi. 2008. 'TNF-alpha and adipocyte biology', *FEBS Lett*, 582: 117-31.
- Charlton, M., R. Sreekumar, D. Rasmussen, K. Lindor, and K. S. Nair. 2002. 'Apolipoprotein synthesis in nonalcoholic steatohepatitis', *Hepatology*, 35: 898-904.
- Chen, X., K. Xun, L. Chen, and Y. Wang. 2009. 'TNF-alpha, a potent lipid metabolism regulator', *Cell Biochem Funct*, 27: 407-16.
- Chen, Z., M. C. Gropler, J. Norris, J. C. Lawrence, Jr., T. E. Harris, and B. N. Finck. 2008. 'Alterations in hepatic metabolism in fld mice reveal a role for lipin 1 in regulating VLDL-triacylglyceride secretion', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28: 1738-44.
- Choi, C. S., D. B. Savage, A. Kulkarni, X. X. Yu, Z. X. Liu, K. Morino, S. Kim, A. Distefano, V. T. Samuel, S. Neschen, D. Zhang, A. Wang, X. M. Zhang, M. Kahn, G. W. Cline, S. K. Pandey, J. G. Geisler, S. Bhanot, B. P. Monia, and G. I. Shulman. 2007. 'Suppression of diacylglycerol acyltransferase-2 (DGAT2), but not DGAT1, with antisense oligonucleotides reverses diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance', *J Biol Chem*, 282: 22678-88.
- Clark, J. M., F. L. Brancati, and A. M. Diehl. 2002. 'Nonalcoholic fatty liver disease', *Gastroenterology*, 122: 1649-57.
- Cohen, J. C., J. D. Horton, and H. H. Hobbs. 2011. 'Human fatty liver disease: old questions and new insights', *Science*, 332: 1519-23.
- Copeland, S., H. S. Warren, S. F. Lowry, S. E. Calvano, D. Remick, Inflammation, and Investigators the Host Response to Injury. 2005. 'Acute inflammatory response to endotoxin in mice and humans', *Clin Diagn Lab Immunol*, 12: 60-7.
- Corbin, K. D., and S. H. Zeisel. 2012. 'Choline metabolism provides novel insights into nonalcoholic fatty liver disease and its progression', *Curr Opin Gastroenterol*, 28: 159-65.
- Cox, K. L., V. Devanarayan, A. Kriauciunas, J. Manetta, C. Montrose, and S. Sittampalam. 2004. 'Immunoassay Methods.' in G. S. Sittampalam, N. P. Coussens, H. Nelson, M. Arkin, D. Auld, C. Austin, B. Bejcek, M. Glicksman, J. Inglese, P. W. Iversen, Z. Li, J. McGee, O. McManus, L. Minor, A. Napper, J. M. Peltier, T. Riss, O. J. Trask, Jr. and J. Weidner (eds.), *Assay Guidance Manual* (Bethesda (MD)).
- Cox MM, Nelson DL. 2008. *Lehninger Prinzipien der Biochemie* (Spektrum).
- Crespo, J., A. Cayon, P. Fernandez-Gil, M. Hernandez-Guerra, M. Mayorga, A. Dominguez-Diez, J. C. Fernandez-Escalante, and F. Pons-Romero. 2001. 'Gene expression of tumor necrosis factor alpha and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients', *Hepatology*, 34: 1158-63.
- Day, C. P. 2005. 'Natural history of NAFLD: remarkably benign in the absence of cirrhosis', *Gastroenterology*, 129: 375-8.
- Day, C. P., and O. F. James. 1998. 'Steatohepatitis: a tale of two "hits"?'', *Gastroenterology*, 114: 842-5.
- De Taeye, B. M., T. Novitskaya, O. P. McGuinness, L. Gleaves, M. Medda, J. W. Covington, and D. E. Vaughan. 2007. 'Macrophage TNF-alpha contributes to insulin resistance and hepatic steatosis in diet-induced obesity', *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 293: E713-25.
- Decker, K. 1990. 'Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells)', *Eur J Biochem*, 192: 245-61.
- Donnelly, K. L., C. I. Smith, S. J. Schwarzenberg, J. Jessurun, M. D. Boldt, and E. J. Parks. 2005. 'Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease', *J Clin Invest*, 115: 1343-51.
- Dowman, J. K., J. W. Tomlinson, and P. N. Newsome. 2010. 'Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease', *QJM*, 103: 71-83.
- Erridge, C., T. Attina, C. M. Spickett, and D. J. Webb. 2007. 'A high-fat meal induces low-grade endotoxemia: evidence of a novel mechanism of postprandial inflammation', *Am J Clin Nutr*, 86: 1286-92.

- Fantini, M. C., S. Dominitzki, A. Rizzo, M. F. Neurath, and C. Becker. 2007. 'In vitro generation of CD4+ CD25+ regulatory cells from murine naive T cells', *Nat Protoc*, 2: 1789-94.
- Federico, A., C. Zulli, I. de Sio, A. Del Prete, M. Dallio, M. Masarone, and C. Loguercio. 2014. 'Focus on emerging drugs for the treatment of patients with non-alcoholic fatty liver disease', *World J Gastroenterol*, 20: 16841-57.
- Feingold, K. R., and C. Grunfeld. 1987. 'Tumor necrosis factor-alpha stimulates hepatic lipogenesis in the rat in vivo', *J Clin Invest*, 80: 184-90.
- Feingold. 1992. 'Role of cytokines in inducing hyperlipidemia', *Diabetes*, 41 Suppl 2: 97-101.
- Feingold, K. R., M. Soued, I. Staprans, L. A. Gavin, M. E. Donahue, B. J. Huang, A. H. Moser, R. Gulli, and C. Grunfeld. 1989. 'Effect of tumor necrosis factor (TNF) on lipid metabolism in the diabetic rat. Evidence that inhibition of adipose tissue lipoprotein lipase activity is not required for TNF-induced hyperlipidemia', *J Clin Invest*, 83: 1116-21.
- Feldstein, A. E., N. W. Werneburg, A. Canbay, M. E. Guicciardi, S. F. Bronk, R. Rydzewski, L. J. Burgart, and G. J. Gores. 2004. 'Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF-alpha expression via a lysosomal pathway', *Hepatology*, 40: 185-94.
- Finelli, C., and G. Tarantino. 2013. 'What is the role of adiponectin in obesity related non-alcoholic fatty liver disease?', *World J Gastroenterol*, 19: 802-12.
- Fon Tacer, K., D. Kuzman, M. Seliskar, D. Pompon, and D. Rozman. 2007. 'TNF-alpha interferes with lipid homeostasis and activates acute and proatherogenic processes', *Physiol Genomics*, 31: 216-27.
- Fon Tacer, K., and D. Rozman. 2011. 'Nonalcoholic Fatty liver disease: focus on lipoprotein and lipid deregulation', *J Lipids*, 2011: 783976.
- Fraulob, J. C., R. Ogg-Diamantino, C. Fernandes-Santos, M. B. Aguila, and C. A. Mandarim-de-Lacerda. 2010. 'A Mouse Model of Metabolic Syndrome: Insulin Resistance, Fatty Liver and Non-Alcoholic Fatty Pancreas Disease (NAFPD) in C57BL/6 Mice Fed a High Fat Diet', *J Clin Biochem Nutr*, 46: 212-23.
- Fuchs, B., R. Suss, K. Teuber, M. Eibisch, and J. Schiller. 2011. 'Lipid analysis by thin-layer chromatography--a review of the current state', *J Chromatogr A*, 1218: 2754-74.
- Fujimoto, T., and R. G. Parton. 2011. 'Not just fat: the structure and function of the lipid droplet', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3.
- Ghoshal, S., J. Witte, J. Zhong, W. de Villiers, and E. Eckhardt. 2009. 'Chylomicrons promote intestinal absorption of lipopolysaccharides', *J Lipid Res*, 50: 90-7.
- Giannini, E. G., R. Testa, and V. Savarino. 2005. 'Liver enzyme alteration: a guide for clinicians', *CMAJ*, 172: 367-79.
- Godfrey, D. I., and J. Rossjohn. 2011. 'New ways to turn on NKT cells', *J Exp Med*, 208: 1121-5.
- Godoy, P., J. G. Hengstler, I. Ilkavets, C. Meyer, A. Bachmann, A. Muller, G. Tuschl, S. O. Mueller, and S. Dooley. 2009. 'Extracellular matrix modulates sensitivity of hepatocytes to fibroblastoid dedifferentiation and transforming growth factor beta-induced apoptosis', *Hepatology*, 49: 2031-43.
- Goncalves, L. A., A. M. Vigario, and C. Penha-Goncalves. 2007. 'Improved isolation of murine hepatocytes for in vitro malaria liver stage studies', *Malar J*, 6: 169.
- Greenberg, A. S., and M. S. Obin. 2006. 'Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism', *Am J Clin Nutr*, 83: 461S-65S.
- Grunfeld, C., M. Soued, S. Adi, A. H. Moser, C. A. Dinarello, and K. R. Feingold. 1990. 'Evidence for two classes of cytokines that stimulate hepatic lipogenesis: relationships among tumor necrosis factor, interleukin-1 and interferon-alpha', *Endocrinology*, 127: 46-54.
- Grunfeld, C., J. A. Verdier, R. Neese, A. H. Moser, and K. R. Feingold. 1988. 'Mechanisms by which tumor necrosis factor stimulates hepatic fatty acid synthesis in vivo', *J Lipid Res*, 29: 1327-35.

- Gruys, E., M. J. Toussaint, T. A. Niewold, and S. J. Koopmans. 2005. 'Acute phase reaction and acute phase proteins', *J Zhejiang Univ Sci B*, 6: 1045-56.
- Guebre-Xabier, M., S. Yang, H. Z. Lin, R. Schwenk, U. Krzych, and A. M. Diehl. 2000. 'Altered hepatic lymphocyte subpopulations in obesity-related murine fatty livers: potential mechanism for sensitization to liver damage', *Hepatology*, 31: 633-40.
- Hall, A. M., K. Kou, Z. Chen, T. A. Pietka, M. Kumar, K. M. Korenblat, K. Lee, K. Ahn, E. Fabbrini, S. Klein, B. Goodwin, and B. N. Finck. 2012. 'Evidence for regulated monoacylglycerol acyltransferase expression and activity in human liver', *J Lipid Res*, 53: 990-9.
- Harris, K., A. Kassis, G. Major, and C. J. Chou. 2012. 'Is the gut microbiota a new factor contributing to obesity and its metabolic disorders?', *J Obes*, 2012: 879151.
- Harte, A. L., N. F. da Silva, S. J. Creely, K. C. McGee, T. Billyard, E. M. Youssef-Elabd, G. Tripathi, E. Ashour, M. S. Abdalla, H. M. Sharada, A. I. Amin, A. D. Burt, S. Kumar, C. P. Day, and P. G. McTernan. 2010. 'Elevated endotoxin levels in non-alcoholic fatty liver disease', *J Inflamm (Lond)*, 7: 15.
- He, Y., L. Lu, X. Wei, D. Jin, T. Qian, A. Yu, J. Sun, J. Cui, and Z. Yang. 2016. 'The multimerization and secretion of adiponectin are regulated by TNF-alpha', *Endocrine*, 51: 456-68.
- Hector, J., B. Schwarzloh, J. Goehring, T. G. Strate, U. F. Hess, G. Deuretzbacher, N. Hansen-Algenstaedt, F. U. Beil, and P. Algenstaedt. 2007. 'TNF-alpha alters visfatin and adiponectin levels in human fat', *Horm Metab Res*, 39: 250-5.
- Heumann, D., and T. Roger. 2002. 'Initial responses to endotoxins and Gram-negative bacteria', *Clin Chim Acta*, 323: 59-72.
- Hou, T., C. H. Rinderknecht, A. V. Hadjinicolaou, R. Busch, and E. Mellins. 2013. 'Pulse-chase analysis for studies of MHC class II biosynthesis, maturation, and peptide loading', *Methods Mol Biol*, 960: 411-32.
- Huang, W., A. Metlakunta, N. Dedousis, P. Zhang, I. Sipula, J. J. Dube, D. K. Scott, and R. M. O'Doherty. 2010. 'Depletion of liver Kupffer cells prevents the development of diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance', *Diabetes*, 59: 347-57.
- Hurt, R. T., C. Kulisek, L. A. Buchanan, and S. A. McClave. 2010. 'The obesity epidemic: challenges, health initiatives, and implications for gastroenterologists', *Gastroenterol Hepatol (N Y)*, 6: 780-92.
- Huynh, F. K., M. F. Green, T. R. Koves, and M. D. Hirschey. 2014. 'Measurement of fatty acid oxidation rates in animal tissues and cell lines', *Methods Enzymol*, 542: 391-405.
- Ibdah, J. A., P. Perlegas, Y. Zhao, J. Angdisen, H. Borgerink, M. K. Shadoan, J. D. Wagner, D. Matern, P. Rinaldo, and J. M. Cline. 2005. 'Mice heterozygous for a defect in mitochondrial trifunctional protein develop hepatic steatosis and insulin resistance', *Gastroenterology*, 128: 1381-90.
- Imajo, K., K. Fujita, M. Yoneda, Y. Nozaki, Y. Ogawa, Y. Shinohara, S. Kato, H. Mawatari, W. Shibata, H. Kitani, K. Ikejima, H. Kirikoshi, N. Nakajima, S. Saito, S. Maeyama, S. Watanabe, K. Wada, and A. Nakajima. 2012. 'Hyperresponsivity to low-dose endotoxin during progression to nonalcoholic steatohepatitis is regulated by leptin-mediated signaling', *Cell Metab*, 16: 44-54.
- Jack, R. S., X. Fan, M. Bernheiden, G. Rune, M. Ehlers, A. Weber, G. Kirsch, R. Mentel, B. Furl, M. Freudenberg, G. Schmitz, F. Stelter, and C. Schutt. 1997. 'Lipopolysaccharide-binding protein is required to combat a murine gram-negative bacterial infection', *Nature*, 389: 742-5.
- Jia, L., C. R. Vianna, M. Fukuda, E. D. Berglund, C. Liu, C. Tao, K. Sun, T. Liu, M. J. Harper, C. E. Lee, S. Lee, P. E. Scherer, and J. K. Elmquist. 2014. 'Hepatocyte Toll-like receptor 4 regulates obesity-induced inflammation and insulin resistance', *Nat Commun*, 5: 3878.
- Jung, U. J., and M. S. Choi. 2014. 'Obesity and its metabolic complications: the role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease', *Int J Mol Sci*, 15: 6184-223.

- Kanuri, G., and I. Bergheim. 2013. 'In vitro and in vivo models of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)', *Int J Mol Sci*, 14: 11963-80.
- Kassel, K. M., G. L. Guo, O. Tawfik, and J. P. Luyendyk. 2010. 'Monocyte chemoattractant protein-1 deficiency does not affect steatosis or inflammation in livers of mice fed a methionine-choline-deficient diet', *Lab Invest*, 90: 1794-804.
- Kavanagh, K., A. T. Wylie, K. L. Tucker, T. J. Hamp, R. Z. Gharaibeh, A. A. Fodor, and J. M. Cullen. 2013. 'Dietary fructose induces endotoxemia and hepatic injury in calorically controlled primates', *Am J Clin Nutr*, 98: 349-57.
- Kim, J. Y., K. Tillison, J. H. Lee, D. A. Rearick, and C. M. Smas. 2006. 'The adipose tissue triglyceride lipase ATGL/PNPLA2 is downregulated by insulin and TNF-alpha in 3T3-L1 adipocytes and is a target for transactivation by PPARgamma', *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 291: E115-27.
- Kim, K. A., W. Gu, I. A. Lee, E. H. Joh, and D. H. Kim. 2012. 'High fat diet-induced gut microbiota exacerbates inflammation and obesity in mice via the TLR4 signaling pathway', *PLoS One*, 7: e47713.
- Klinke R, Papa HC, Silbernagl S. 2009. *Physiologie* (Thieme).
- Kmiec, Z. 2001. 'Cooperation of liver cells in health and disease', *Adv Anat Embryol Cell Biol*, 161: III-XIII, 1-151.
- Kolb, H. C., M. G. Finn, and K. B. Sharpless. 2001. 'Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions', *Angew Chem Int Ed Engl*, 40: 2004-21.
- Kolios, G., V. Valatas, and E. Kouroumalis. 2006. 'Role of Kupffer cells in the pathogenesis of liver disease', *World J Gastroenterol*, 12: 7413-20.
- Kopelman, P. G. 2000. 'Obesity as a medical problem', *Nature*, 404: 635-43.
- Kremer, M., E. Thomas, R. J. Milton, A. W. Perry, N. van Rooijen, M. D. Wheeler, S. Zacks, M. Fried, R. A. Rippe, and I. N. Hines. 2010. 'Kupffer cell and interleukin-12-dependent loss of natural killer T cells in hepatosteatosis', *Hepatology*, 51: 130-41.
- Kuerschner, L., C. Moessinger, and C. Thiele. 2008. 'Imaging of lipid biosynthesis: how a neutral lipid enters lipid droplets', *Traffic*, 9: 338-52.
- Lesmana, C. R., I. Hasan, U. Budihusodo, R. A. Gani, E. Krisnuhoni, N. Akbar, and L. A. Lesmana. 2009. 'Diagnostic value of a group of biochemical markers of liver fibrosis in patients with non-alcoholic steatohepatitis', *J Dig Dis*, 10: 201-6.
- Letteron, P., A. Sutton, A. Mansouri, B. Fromenty, and D. Pessayre. 2003. 'Inhibition of microsomal triglyceride transfer protein: another mechanism for drug-induced steatosis in mice', *Hepatology*, 38: 133-40.
- Levels, J. H., P. R. Abraham, A. van den Ende, and S. J. van Deventer. 2001. 'Distribution and kinetics of lipoprotein-bound endotoxin', *Infect Immun*, 69: 2821-8.
- Li, P. Z., J. Z. Li, M. Li, J. P. Gong, and K. He. 2014. 'An efficient method to isolate and culture mouse Kupffer cells', *Immunol Lett*, 158: 52-6.
- Li, Z. Z., M. Berk, T. M. McIntyre, and A. E. Feldstein. 2009. 'Hepatic lipid partitioning and liver damage in nonalcoholic fatty liver disease: role of stearoyl-CoA desaturase', *J Biol Chem*, 284: 5637-44.
- Listenberger, L. L., X. Han, S. E. Lewis, S. Cases, R. V. Farese, Jr., D. S. Ory, and J. E. Schaffer. 2003. 'Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 3077-82.
- Livak, K. J., and T. D. Schmittgen. 2001. 'Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method', *Methods*, 25: 402-8.
- Science. 2007 Apr 13;316(5822):285-8.
- Lo, J.C., Wang Y., Tumanov A.V., Bamji M., Yao Z., Reardon C.A., Getz G.S., Fu Y.X. 2007. Lymphotoxin beta receptor-dependent control of lipid homeostasis. *Science*, 316(5822):285-8
- Loeffler G, Petrides PE, Heinrich PC. 2007. *Biochemie und Pathobiochemie* (Springer).
- Lopez, B. G., M. S. Tsai, J. L. Baratta, K. J. Longmuir, and R. T. Robertson. 2011. 'Characterization of Kupffer cells in livers of developing mice', *Comp Hepatol*, 10: 2.

- Luedde, T., and R. F. Schwabe. 2011. 'NF-kappaB in the liver--linking injury, fibrosis and hepatocellular carcinoma', *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 8: 108-18.
- Luellmann-Rauch, R. 2009. 'Taschenlehrbuch Histologie', *Thieme*, 3. Auflage.
- Mahony, S. M., and M. J. Tisdale. 1990. 'Metabolic effects of tumour necrosis factor alpha in NMRI mice', *Br J Cancer*, 61: 514-9.
- Maier, O., V. Oberle, and D. Hoekstra. 2002. 'Fluorescent lipid probes: some properties and applications (a review)', *Chem Phys Lipids*, 116: 3-18.
- Makki, K., P. Froguel, and I. Wolowczuk. 2013. 'Adipose tissue in obesity-related inflammation and insulin resistance: cells, cytokines, and chemokines', *ISRN Inflamm*, 2013: 139239.
- Meli, R., G. Mattace Raso, and A. Calignano. 2014. 'Role of innate immune response in non-alcoholic Fatty liver disease: metabolic complications and therapeutic tools', *Front Immunol*, 5: 177.
- Memon, R. A., C. Grunfeld, A. H. Moser, and K. R. Feingold. 1993. 'Tumor necrosis factor mediates the effects of endotoxin on cholesterol and triglyceride metabolism in mice', *Endocrinology*, 132: 2246-53.
- Miele, L., V. Valenza, G. La Torre, M. Montalto, G. Cammarota, R. Ricci, R. Masciana, A. Forgione, M. L. Gabrieli, G. Perotti, F. M. Vecchio, G. Rapaccini, G. Gasbarrini, C. P. Day, and A. Grieco. 2009. 'Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease', *Hepatology*, 49: 1877-87.
- Miura, K., and H. Ohnishi. 2014. 'Role of gut microbiota and Toll-like receptors in nonalcoholic fatty liver disease', *World J Gastroenterol*, 20: 7381-91.
- Miyake, T., S. M. Akbar, O. Yoshida, S. Chen, Y. Hiasa, B. Matsuura, M. Abe, and M. Onji. 2010. 'Impaired dendritic cell functions disrupt antigen-specific adaptive immune responses in mice with nonalcoholic fatty liver disease', *J Gastroenterol*, 45: 859-67.
- Mombaerts, P., J. Iacomini, R. S. Johnson, K. Herrup, S. Tonegawa, and V. E. Papaioannou. 1992. 'RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes', *Cell*, 68: 869-77.
- Morton, R. E., M. Waite, V. L. King, and H. P. Morris. 1982. 'Uptake and metabolism of free fatty acids by the Morris 7777 hepatoma and host rat liver', *Lipids*, 17: 529-37.
- Mouzaki, M., E. M. Comelli, B. M. Arendt, J. Bonengel, S. K. Fung, S. E. Fischer, I. D. McGilvray, and J. P. Allard. 2013. 'Intestinal microbiota in patients with nonalcoholic fatty liver disease', *Hepatology*, 58: 120-7.
- Nachiappan, V., D. Curtiss, B. E. Corkey, and L. Kilpatrick. 1994. 'Cytokines inhibit fatty acid oxidation in isolated rat hepatocytes: synergy among TNF, IL-6, and IL-1', *Shock*, 1: 123-9.
- Nagarajan, N. A., and M. Kronenberg. 2007. 'Invariant NKT cells amplify the innate immune response to lipopolysaccharide', *J Immunol*, 178: 2706-13.
- Nagle, C. A., E. L. Klett, and R. A. Coleman. 2009. 'Hepatic triacylglycerol accumulation and insulin resistance', *J Lipid Res*, 50 Suppl: S74-9.
- Nagle, C. A., L. Vergnes, H. Dejong, S. Wang, T. M. Lewin, K. Reue, and R. A. Coleman. 2008. 'Identification of a novel sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase isoform, GPAT4, as the enzyme deficient in *Agpat6*^{-/-} mice', *J Lipid Res*, 49: 823-31.
- Nakamura, A., and Y. Terauchi. 2013. 'Lessons from mouse models of high-fat diet-induced NAFLD', *Int J Mol Sci*, 14: 21240-57.
- Namikawa, C., Z. Shu-Ping, J. R. Vyselaar, Y. Nozaki, Y. Nemoto, M. Ono, N. Akisawa, T. Saibara, M. Hiroi, H. Enzan, and S. Onishi. 2004. 'Polymorphisms of microsomal triglyceride transfer protein gene and manganese superoxide dismutase gene in non-alcoholic steatohepatitis', *J Hepatol*, 40: 781-6.
- Neschen, S., K. Morino, L. E. Hammond, D. Zhang, Z. X. Liu, A. J. Romanelli, G. W. Cline, R. L. Pongratz, X. M. Zhang, C. S. Choi, R. A. Coleman, and G. I. Shulman. 2005. 'Prevention of hepatic steatosis and hepatic insulin resistance in mitochondrial acyl-CoA:glycerol-sn-3-phosphate acyltransferase 1 knockout mice', *Cell Metab*, 2: 55-65.

- Neuschwander-Tetri, B. A., E. M. Brunt, K. R. Wehmeier, D. Oliver, and B. R. Bacon. 2003. 'Improved nonalcoholic steatohepatitis after 48 weeks of treatment with the PPAR-gamma ligand rosiglitazone', *Hepatology*, 38: 1008-17.
- Neves, A. L., J. Coelho, L. Couto, A. Leite-Moreira, and R. Roncon-Albuquerque, Jr. 2013. 'Metabolic endotoxemia: a molecular link between obesity and cardiovascular risk', *J Mol Endocrinol*, 51: R51-64.
- Nguyen, P., V. Leray, M. Diez, S. Serisier, J. Le Bloc'h, B. Siliart, and H. Dumon. 2008. 'Liver lipid metabolism', *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*, 92: 272-83.
- Nishimura, S., I. Manabe, and R. Nagai. 2009. 'Adipose tissue inflammation in obesity and metabolic syndrome', *Discov Med*, 8: 55-60.
- Nwe, K., and M. W. Brechbiel. 2009. 'Growing applications of "click chemistry" for bioconjugation in contemporary biomedical research', *Cancer Biother Radiopharm*, 24: 289-302.
- Ong, K. T., M. T. Mashek, S. Y. Bu, A. S. Greenberg, and D. G. Mashek. 2011. 'Adipose triglyceride lipase is a major hepatic lipase that regulates triacylglycerol turnover and fatty acid signaling and partitioning', *Hepatology*, 53: 116-26.
- Petersen, K. F., D. Befroy, S. Dufour, J. Dziura, C. Ariyan, D. L. Rothman, L. DiPietro, G. W. Cline, and G. I. Shulman. 2003. 'Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance', *Science*, 300: 1140-2.
- Picot, J., C. L. Guerin, C. Le Van Kim, and C. M. Boulanger. 2012. 'Flow cytometry: retrospective, fundamentals and recent instrumentation', *Cytotechnology*, 64: 109-30.
- Pinto Lde, F., C. M. Compri, J. V. Fornari, W. Bartchewsky, D. E. Cintra, M. Trevisan, O. Carvalho Pde, M. L. Ribeiro, L. A. Velloso, M. J. Saad, J. Pedrazzoli, Jr., and A. Gambero. 2010. 'The immunosuppressant drug, thalidomide, improves hepatic alterations induced by a high-fat diet in mice', *Liver Int*, 30: 603-10.
- Postic, C., and J. Girard. 2008. 'The role of the lipogenic pathway in the development of hepatic steatosis', *Diabetes Metab*, 34: 643-8.
- Racanelli, V., and B. Rehermann. 2006. 'The liver as an immunological organ', *Hepatology*, 43: S54-62.
- Ren, H., L. Federico, H. Huang, M. Sunkara, T. Drennan, M. A. Frohman, S. S. Smyth, and A. J. Morris. 2010. 'A phosphatidic acid binding/nuclear localization motif determines lipin1 function in lipid metabolism and adipogenesis', *Mol Biol Cell*, 21: 3171-81.
- Retterstol, K., A. M. Lund, S. Tverdal, and B. O. Christophersen. 2000. 'Metabolism of some radiolabeled essential fatty acids in isolated rat hepatocytes is affected by dietary ethanol', *Alcohol*, 21: 19-26.
- Roh, Y. S., and E. Seki. 2013. 'Toll-like receptors in alcoholic liver disease, non-alcoholic steatohepatitis and carcinogenesis', *J Gastroenterol Hepatol*, 28 Suppl 1: 38-42.
- Roland, C. R., J. A. Goss, M. J. Mangino, D. Hafenrichter, and M. W. Flye. 1994. 'Autoregulation by eicosanoids of human Kupffer cell secretory products. A study of interleukin-1, interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha, transforming growth factor-beta, and nitric oxide', *Ann Surg*, 219: 389-99.
- Rui, L. 2014. 'Energy metabolism in the liver', *Compr Physiol*, 4: 177-97.
- Ryu, D., W. Y. Seo, Y. S. Yoon, Y. N. Kim, S. S. Kim, H. J. Kim, T. S. Park, C. S. Choi, and S. H. Koo. 2011. 'Endoplasmic reticulum stress promotes LIPIN2-dependent hepatic insulin resistance', *Diabetes*, 60: 1072-81.
- Schneider, K., K. G. Potter, and C. F. Ware. 2004. 'Lymphotoxin and LIGHT signaling pathways and target genes', *Immunol Rev*, 202: 49-66.
- Schweitzer GG, Finck BN. 2014. 'Targeting Hepatic Glycerolipid Synthesis and Turnover to Treat Fatty Liver Disease', *Advances in Hepatology*, 2014: 14.
- Seki, E., and B. Schnabl. 2012. 'Role of innate immunity and the microbiota in liver fibrosis: crosstalk between the liver and gut', *J Physiol*, 590: 447-58.
- Severgnini, M., J. Sherman, A. Sehgal, N. K. Jayaprakash, J. Aubin, G. Wang, L. Zhang, C. G. Peng, K. Yucius, J. Butler, and K. Fitzgerald. 2012. 'A rapid two-step method for

- isolation of functional primary mouse hepatocytes: cell characterization and asialoglycoprotein receptor based assay development', *Cytotechnology*, 64: 187-95.
- Sezgin, E., and P. Schwille. 2011. 'Fluorescence techniques to study lipid dynamics', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3: a009803.
- Sharifnia, T., J. Antoun, T. G. Verriere, G. Suarez, J. Wattacheril, K. T. Wilson, R. M. Peek, Jr., N. N. Abumrad, and C. R. Flynn. 2015. 'Hepatic TLR4 signaling in obese NAFLD', *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 309: G270-8.
- Shi, H., M. V. Kokoeva, K. Inouye, I. Tzameli, H. Yin, and J. S. Flier. 2006. 'TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance', *J Clin Invest*, 116: 3015-25.
- Shoelson, S. E., L. Herrero, and A. Naaz. 2007. 'Obesity, inflammation, and insulin resistance', *Gastroenterology*, 132: 2169-80.
- Soares, J. B., P. Pimentel-Nunes, R. Roncon-Albuquerque, and A. Leite-Moreira. 2010. 'The role of lipopolysaccharide/toll-like receptor 4 signaling in chronic liver diseases', *Hepatol Int*, 4: 659-72.
- Southward, C. M., and M. G. Surette. 2002. 'The dynamic microbe: green fluorescent protein brings bacteria to light', *Mol Microbiol*, 45: 1191-6.
- Spandl, J., D. J. White, J. Peychl, and C. Thiele. 2009. 'Live cell multicolor imaging of lipid droplets with a new dye, LD540', *Traffic*, 10: 1579-84.
- Spiegelman, B. M., and J. S. Flier. 2001. 'Obesity and the regulation of energy balance', *Cell*, 104: 531-43.
- Stein, O., and Y. Stein. 1967. 'Lipid synthesis, intracellular transport, storage, and secretion. I. Electron microscopic radioautographic study of liver after injection of tritiated palmitate or glycerol in fasted and ethanol-treated rats', *J Cell Biol*, 33: 319-39.
- Stienstra, R., F. Saudale, C. Duval, S. Keshtkar, J. E. Groener, N. van Rooijen, B. Staels, S. Kersten, and M. Muller. 2010. 'Kupffer cells promote hepatic steatosis via interleukin-1beta-dependent suppression of peroxisome proliferator-activated receptor alpha activity', *Hepatology*, 51: 511-22.
- Stone, S. J., M. C. Levin, P. Zhou, J. Han, T. C. Walther, and R. V. Farese, Jr. 2009. 'The endoplasmic reticulum enzyme DGAT2 is found in mitochondria-associated membranes and has a mitochondrial targeting signal that promotes its association with mitochondria', *J Biol Chem*, 284: 5352-61.
- Suganami, T., K. Tanimoto-Koyama, J. Nishida, M. Itoh, X. Yuan, S. Mizuarai, H. Kotani, S. Yamaoka, K. Miyake, S. Aoe, Y. Kamei, and Y. Ogawa. 2007. 'Role of the Toll-like receptor 4/NF-kappaB pathway in saturated fatty acid-induced inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27: 84-91.
- Sunman, J. A., R. L. Hawke, E. L. LeCluyse, and A. D. Kashuba. 2004. 'Kupffer cell-mediated IL-2 suppression of CYP3A activity in human hepatocytes', *Drug Metab Dispos*, 32: 359-63.
- Tajiri, K., and Y. Shimizu. 2012. 'Role of NKT Cells in the Pathogenesis of NAFLD', *Int J Hepatol*, 2012: 850836.
- Tajiri, K., Y. Shimizu, K. Tsuneyama, and T. Sugiyama. 2009. 'Role of liver-infiltrating CD3+CD56+ natural killer T cells in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease', *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 21: 673-80.
- Takahashi, Y., Y. Soejima, and T. Fukusato. 2012. 'Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis', *World J Gastroenterol*, 18: 2300-8.
- Takeuchi, K., and K. Reue. 2009. 'Biochemistry, physiology, and genetics of GPAT, AGPAT, and lipin enzymes in triglyceride synthesis', *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 296: E1195-209.
- Tang, T., Y. Sui, M. Lian, Z. Li, and J. Hua. 2013. 'Pro-inflammatory activated Kupffer cells by lipids induce hepatic NKT cells deficiency through activation-induced cell death', *PLoS One*, 8: e81949.
- Tarantino, G., A. Scalera, and C. Finelli. 2013. 'Liver-spleen axis: intersection between immunity, infections and metabolism', *World J Gastroenterol*, 19: 3534-42.

- Telford, W. G., M. W. Moss, J. P. Morseman, and F. C. Allnut. 2001. 'Cryptomonad algal phycobiliproteins as fluorochromes for extracellular and intracellular antigen detection by flow cytometry', *Cytometry*, 44: 16-23.
- Thiele, C., C. Papan, D. Hoelper, K. Kusserow, A. Gaebler, M. Schoene, K. Piotrowitz, D. Lohmann, J. Spandl, A. Stevanovic, A. Shevchenko, and L. Kuerschner. 2012. 'Tracing fatty acid metabolism by click chemistry', *ACS Chem Biol*, 7: 2004-11.
- Tiganis, T. 2011. 'Reactive oxygen species and insulin resistance: the good, the bad and the ugly', *Trends Pharmacol Sci*, 32: 82-9.
- Tilg, H., and A. R. Moschen. 2010. 'Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis', *Hepatology*, 52: 1836-46.
- Tosello-Tramont, A. C., S. G. Landes, V. Nguyen, T. I. Novobrantseva, and Y. S. Hahn. 2012. 'Kupffer cells trigger nonalcoholic steatohepatitis development in diet-induced mouse model through tumor necrosis factor-alpha production', *J Biol Chem*, 287: 40161-72.
- Tsutsui, H., and S. Nishiguchi. 2014. 'Importance of Kupffer cells in the development of acute liver injuries in mice', *Int J Mol Sci*, 15: 7711-30.
- Turnbaugh, P. J., F. Backhed, L. Fulton, and J. I. Gordon. 2008. 'Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome', *Cell Host Microbe*, 3: 213-23.
- van der Veen, J. N., S. Lingrell, and D. E. Vance. 2012. 'The membrane lipid phosphatidylcholine is an unexpected source of triacylglycerol in the liver', *J Biol Chem*, 287: 23418-26.
- Vance, J. E., and D. E. Vance. 1990. 'Lipoprotein assembly and secretion by hepatocytes', *Annu Rev Nutr*, 10: 337-56.
- VanderLaan, P. A., C. A. Reardon, Y. Sagiv, L. Blachowicz, J. Lukens, M. Nissenbaum, C. R. Wang, and G. S. Getz. 2007. 'Characterization of the natural killer T-cell response in an adoptive transfer model of atherosclerosis', *Am J Pathol*, 170: 1100-7.
- Velasquez, O. R., K. Henninger, M. Fowler, P. Tso, and K. D. Crissinger. 1993. 'Oleic acid-induced mucosal injury in developing piglet intestine', *Am J Physiol*, 264: G576-82.
- Verdam, F. J., S. S. Rensen, A. Driessen, J. W. Greve, and W. A. Buurman. 2011. 'Novel evidence for chronic exposure to endotoxin in human nonalcoholic steatohepatitis', *J Clin Gastroenterol*, 45: 149-52.
- Vergani, L. 2014. 'Lipid lowering effects of iodothyronines: In vivo and in vitro studies on rat liver', *World J Hepatol*, 6: 169-77.
- Vettor, R., G. Milan, M. Rossato, and G. Federspil. 2005. 'Review article: adipocytokines and insulin resistance', *Aliment Pharmacol Ther*, 22 Suppl 2: 3-10.
- Videla, L. A., R. Rodrigo, J. Araya, and J. Poniachik. 2006. 'Insulin resistance and oxidative stress interdependency in non-alcoholic fatty liver disease', *Trends Mol Med*, 12: 555-8.
- Wakil, S. W. 1961. 'Mechanism of fatty acid synthesis', *Journal of Lipid Research*, 2: 24.
- Wang, X., A. Spandidos, H. Wang, and B. Seed. 2012. 'PrimerBank: a PCR primer database for quantitative gene expression analysis, 2012 update', *Nucleic Acids Res*, 40: D1144-9.
- Wei, Y., R. S. Rector, J. P. Thyfault, and J. A. Ibdah. 2008. 'Nonalcoholic fatty liver disease and mitochondrial dysfunction', *World J Gastroenterol*, 14: 193-9.
- Weisberg, S. P., D. McCann, M. Desai, M. Rosenbaum, R. L. Leibel, and A. W. Ferrante, Jr. 2003. 'Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue', *J Clin Invest*, 112: 1796-808.
- Westerbacka, J., K. Lammi, A. M. Hakkinen, A. Rissanen, I. Salminen, A. Aro, and H. Yki-Jarvinen. 2005. 'Dietary fat content modifies liver fat in overweight nondiabetic subjects', *J Clin Endocrinol Metab*, 90: 2804-9.
- Wiegman, C. H., R. H. Bandsma, M. Ouwens, F. H. van der Sluijs, R. Havinga, T. Boer, D. J. Reijngoud, J. A. Romijn, and F. Kuipers. 2003. 'Hepatic VLDL production in ob/ob

- mice is not stimulated by massive de novo lipogenesis but is less sensitive to the suppressive effects of insulin', *Diabetes*, 52: 1081-9.
- Wilfling, F., H. Wang, J. T. Haas, N. Kraemer, T. J. Gould, A. Uchida, J. X. Cheng, M. Graham, R. Christiano, F. Frohlich, X. Liu, K. K. Buhman, R. A. Coleman, J. Bewersdorf, R. V. Farese, Jr., and T. C. Walther. 2013. 'Triacylglycerol synthesis enzymes mediate lipid droplet growth by relocating from the ER to lipid droplets', *Dev Cell*, 24: 384-99.
- Wolf, M. J., A. Adili, K. Piotrowitz, Z. Abdullah, Y. Boege, K. Stemmer, M. Ringelhan, N. Simonavicius, M. Egger, D. Wohlleber, A. Lorentzen, C. Einer, S. Schulz, T. Clavel, U. Protzer, C. Thiele, H. Zischka, H. Moch, M. Tschop, A. V. Tumanov, D. Haller, K. Unger, M. Karin, M. Kopf, P. Knolle, A. Weber, and M. Heikenwalder. 2014. 'Metabolic activation of intrahepatic CD8+ T cells and NKT cells causes nonalcoholic steatohepatitis and liver cancer via cross-talk with hepatocytes', *Cancer Cell*, 26: 549-64.
- Wouters, K., P. J. van Gorp, V. Bieghs, M. J. Gijbels, H. Duimel, D. Lutjohann, A. Kerksiek, R. van Kruchten, N. Maeda, B. Staels, M. van Bilsen, R. Shiri-Sverdlov, and M. H. Hofker. 2008. 'Dietary cholesterol, rather than liver steatosis, leads to hepatic inflammation in hyperlipidemic mouse models of nonalcoholic steatohepatitis', *Hepatology*, 48: 474-86.
- Wurie, H. R., L. Buckett, and V. A. Zammit. 2011. 'Evidence that diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1) has dual membrane topology in the endoplasmic reticulum of HepG2 cells', *J Biol Chem*, 286: 36238-47.
- Yang, P., W. Zhou, C. Li, M. Zhang, Y. Jiang, R. Jiang, H. Ba, C. Li, J. Wang, B. Yin, F. Gong, and Z. Li. 2016. 'Kupffer-cell-expressed transmembrane TNF-alpha is a major contributor to lipopolysaccharide and D-galactosamine-induced liver injury', *Cell Tissue Res*, 363: 371-83.
- Yee, S. B., P. E. Ganey, and R. A. Roth. 2003. 'The role of Kupffer cells and TNF-alpha in monocrotaline and bacterial lipopolysaccharide-induced liver injury', *Toxicol Sci*, 71: 124-32.
- Yen, C. L., S. J. Stone, S. Koliwad, C. Harris, and R. V. Farese, Jr. 2008. 'Thematic review series: glycerolipids. DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis', *J Lipid Res*, 49: 2283-301.
- Yerkovich, S. T., P. J. Rigby, P. A. Fournier, J. K. Olynyk, and G. C. Yeoh. 2004. 'Kupffer cell cytokines interleukin-1beta and interleukin-10 combine to inhibit phosphoenolpyruvate carboxykinase and gluconeogenesis in cultured hepatocytes', *Int J Biochem Cell Biol*, 36: 1462-72.
- Yu, Y. H., and H. N. Ginsberg. 2005. 'Adipocyte signaling and lipid homeostasis: sequelae of insulin-resistant adipose tissue', *Circ Res*, 96: 1042-52.
- Zechner, R., P. C. Kienesberger, G. Haemmerle, R. Zimmermann, and A. Lass. 2009. 'Adipose triglyceride lipase and the lipolytic catabolism of cellular fat stores', *J Lipid Res*, 50: 3-21.
- Zhan, Y. T., and W. An. 2010. 'Roles of liver innate immune cells in nonalcoholic fatty liver disease', *World J Gastroenterol*, 16: 4652-60.
- Zu, L., J. He, H. Jiang, C. Xu, S. Pu, and G. Xu. 2009. 'Bacterial endotoxin stimulates adipose lipolysis via toll-like receptor 4 and extracellular signal-regulated kinase pathway', *J Biol Chem*, 284: 5915-26.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Leuten Dankbarkeit aussprechen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Als Erstes danke ich Herr Prof. Dr. Christoph Thiele, der mir die Möglichkeit gab meine Doktorarbeit in seinem Labor durchzuführen. Für seine Unterstützung und sein stets offenes Ohr bin ich ihm sehr dankbar.

Frau Prof. Dr. Irmgard Förster möchte ich für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Ebenso geht mein Dank an Herrn Prof. Dr. Sven Burgdorf und Herrn Prof. Dr. Anton Bovier für Ihre Bereitschaft die Dritt- und Viertbegutachtung zu übernehmen.

Weiterhin möchte ich Frau Prof. Dr. Irmgard Förster, Frau Prof. Dr. Heike Weighardt und Frau Dr. Julia Vorac für die überaus fruchtbare Zusammenarbeit danken sowie die ein oder anderen hilfreichen Diskussionen über mein Projekt, welche das Projekt maßgeblich vorangetrieben haben.

Auch Prof. Dr. Mathias Heikenwälder und Dr. Monika Wolf danke ich für die gute Zusammenarbeit im Kooperationsprojekt.

Für die finanzielle Unterstützung danke ich dem Virtual Liver Network, welches vom Bundesministerium für Bildung und Forschung finanziert wurde. Der Graduiertenschule des Exzellenzclusters ImmunoSensation, welches von der Deutschen Forschungs-Gesellschaft (DFG) gefördert wird aber auch der Universität Bonn, danke ich für die vielen Seminare. Diese haben meinen wissenschaftlichen wie auch persönlichen Horizont sehr erweitert.

Ein herzlicher Dank geht natürlich auch an meine Korrekturleser, die Teile oder die ganze Arbeit gelesen haben: Kristina Hofmann, Julia Vorac, Anne Gäbler, Kristina Klizaitė, Christiane Kremser, Juliane Melzer und Anke Penno. Ich weiß, wie viel Arbeit das war und weiß das wirklich zu schätzen!

Meinen Hiwi-Studenten Philippa und Iris danke ich für die viele Unterstützung während der besonders anstrengenden Labortage. Auch meinen Studenten Heraldo, Lisa und Mario möchte ich für ihre Einsatzbereitschaft danken.

Mein Dank gilt auch allen ehemaligen und jetzigen Kollegen der AG Thiele. Ich habe die Atmosphäre im Laboralltag als sehr angenehm empfunden.

Lars danke ich für das Anlernen der Technik der Hepatozyten-Isolation und seine Hilfe am Anfang der Doktorarbeit. Allen, aber insbesondere Julia, Heike und Tina möchte ich für die

hilfreichen Diskussionen über mein Projekt danken. Allen Thiele-Mitgliedern, besonders Tina, Anke, Klaus und Kristina, danke ich für Ihre ständige Hilfsbereitschaft bei allen labortechnischen Fragen. Mein besonderer Dank gilt auch Tina für die Hilfe bei der anstrengenden Fütterung unserer ND/HFD Mäuse. Ihr möchte ich auch dafür danken, dass sie sowohl die guten als auch schlechten Zeiten der Doktorarbeitszeit mit mir als Büro- und Laborplatznachbarin komplett durchgestanden hat und für ihr stets offenes Ohr und ihre Freundschaft sowie die schöne Zeit auch außerhalb des Labors. Auch Anke danke ich für ihre fröhliche Art, die mich immer wieder aufgebaut hat, die vielen schönen Gespräche über außerlaborliche Themen sowie die entspannten Kino-, Cafe- und Restaurantabende. Klaus und Tina danke ich für die tolle Zeit im kleinen Labor. Die Battles um das Radio und den Youtube-Channel werde ich vermissen. Klaus möchte ich für die vielen Urlaubstipps, Einblicke in für mich unbekannte Musikwelten und die Kaffeepausen in der Sonne danken. Kristina danke ich für die guten Gespräche, ihr stets offenes Ohr und ihre interessanten Einblicke in Osteuropa. Auch die Litauischen Biscuits werde ich sehr vermissen. Anne danke ich für die schönen Wanderausflüge, Kino- und Spieleabende sowie Häkelnachmittage. Die Emergencyroom-Abende mit Tina und Anne bleiben ebenfalls unvergessen. Auch bei Julia möchte ich mich für die schöne und entspannte Zeit außerhalb des Labors sowie in die Einblicke des sonst für uns so unbekanntes zweiten Stockwerks des LIMES bedanken. Auch Dominic und Juliane, die in unserem kleinen Büro Asyl bekamen, danke ich herzlich für die schöne Zeit sowohl im als auch außerhalb des Labors und den ein oder anderen Rat aus der Sicht eines Postdocs. Alex, Klaus, Tina, Anne und Kristina, dem harten Kern der Kaffee-Connection, danke ich für die interessanten Diskussionen über Gott und die Welt.

Allen jetzigen und ehemaligen Thiele-Mitgliedern und dem gesamten dritten Stockwerk für die netten Mittags- und Kaffeestunden sowie für die Zeit außerhalb des Labors. Ich habe die Wander-, Grill-, Spiel-, Sport-, und Shoppingevents mit euch immer sehr genossen ;-).

Meinen Freunden danke ich für ihren Rückhalt, ihr Verständnis für meine wenige Zeit in den letzten 4,5 Jahren und die notwendige Ablenkung vom Mikrokosmos Labor.

Besonders danke ich meinen Eltern, die immer an mich geglaubt haben und mir den nötigen Halt und Unterstützung gaben. Auch dafür, dass sie mir beigebracht haben, was im Leben wirklich wichtig ist. Mein größter Dank geht an Thomas für seine Liebe, sein absolutes Verständnis für die schwierige Zeit in der Doktorarbeitsphase und dafür, dass er mir in den letzten Monaten immer den Rücken frei gehalten hat! Vor allem danke ich ihm dafür, dass er mich selbst in den schwierigen Zeiten immer wieder zum Lachen gebracht hat!