



**Untersuchung der Rolle des Protease-aktivierten
Rezeptors 4 in der Entwicklung einer
Nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung und
Insulinresistenz in einem *in vivo* Mausmodell**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Sonja Kleeschulte geb. Kaglin
aus Neuss

Düsseldorf, März 2019

Aus der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie
des Universitätsklinikums der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent:

Prof. Dr. med. Johannes G. Bode

Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie

Universitätsklinikum Düsseldorf

Koreferent:

Prof. Dr. rer. nat. Lutz Schmitt

Institut für Biochemie I

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Tag der mündlichen Prüfung: 15.05.2019

Auszüge aus dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

In Originalarbeiten:

Kleeschulte S, Jerrentrup J, Gorski D, Schmitt J, Fender AC. *Evidence for functional PAR₄-thrombin receptor expression in cardiac fibroblasts and its regulation by high glucose*, International Journal of Cardiology, 252C (2018), pp. 163-166

In Abstracts:

Kaglin S, Jerrentrup J, Schmitt J, Fender AC. *Evidence for functional PAR₄ thrombin receptor expression in cardiac fibroblasts*. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol (2017) 390 (Suppl 1):S1–S101

Kaglin S, Maier JK, Fender AC. *Deletion of thrombin receptor PAR₄ reduces weight gain and improves metabolic status in mice fed a diabetogenic diet*. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol (2017) 390 (Suppl 1):S1–S101

Kaglin S, Fischinger V, Maier JK, Fender AC. *Anti-adipogenic effects of the PAR-4 thrombin receptor in 3T3L1 adipocytes*, Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol (2016) 389 (Suppl 1):S1–S104

Als Vortrag:

Leineweber K, **Kleeschulte S**, Stolte S, Dobrev D, Fender A. *Regional characterisation of the NLRP3 inflammasome in the diabetic mouse heart*. 85. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Februar 2019, Stuttgart.

Kleeschulte S, Häussinger D, Bode JG. *Analysis of macrophage population in the liver of HFD treated mice and characterization of the role of neutrophils during ACLF*. 2. LiSyM retreat meeting, Hünfeld, November 2018.

Kleeschulte S, Bode JG. *Model based evaluation of the role of neutrophils and macrophage polarization for progression of fatty liver disease and ACLF*. Extraordinary Pillar III Meeting, Januar 2018, Heidelberg.

Kleeschulte S, Wolf S, Häussinger D, Bode JG. *Analysis of macrophage population in the liver of HFD-treated mice and characterization of the role of neutrophils during ACLF*. 1. LiSyM retreat meeting, Hünfeld, November 2017.

Kleeschulte S, Bode JG. *Model based evaluation of the role of neutrophils and macrophage polarization for progression of fatty liver disease and ACLF* .

Extraordinary Pillar II Meeting, Oktober 2017, Mannheim.

Kaglin S, Jerrentrup J, Schmitt J, Fender AC. *Evidence for functional PAR₄ thrombin receptor expression in cardiac fibroblasts*. 83. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, März 2017, Heidelberg.

Kaglin S, Maier JK, Fender AC. *Deletion of thrombin receptor PAR₄ reduces weight gain and improves metabolic status in mice fed a diabetogenic diet*. 83. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, März 2017, Heidelberg.

Kaglin S, Maier JK, Fender AC. *PAR₄-Deletion reduziert metabolische Störungen durch diabetogene Diät in Mäusen*. 22. Kardiologisch-Hämostaseologischer Workshop, Langenfeld, November 2016.

Fischinger V, **Kaglin S**, Maier JK, Fender AC. *Thrombin receptor PAR₄ suppresses adipogenesis in an in vitro model*. 60th Annual Meeting of the Society of Thrombosis and Haemostasis Research (GTH), Münster, 17-20. Februar 2016

Als Posterbeitrag:

Kleeschulte S, Häussinger D, Bode JG. *Deletion of thrombin receptor PAR₄ attenuates the development of insulin resistance and NAFLD in mouse fed high-fat diet*, 35. Annual Meeting of the German Association for the Study of the Liver, Februar 2019, Heidelberg.

Kleeschulte S, Fender AC, Häussinger D, Bode JG. *Thrombin signal inhibition via PAR₄-Deletion improves metabolic status and reduces NAFLD in mice fed high-fat diet*, 7th conference on systems biology of Mammalian Cells, Juli 2018, Bremen.

Kleeschulte S Häussinger D, Bode JG. *Poster 19:LiSyM Midterm Evaluation 2018, Bode Group (Düsseldorf)* , Midterm Evaluation LiSyM, Mai 2018, Mannheim.

Kleeschulte S, Fender AC, Häussinger D, Bode JG. *Deletion of thrombin receptor PAR₄ improves metabolic status and shows less severe NAFLD in mice fed high-fat diet*, 34. Annual Meeting of the German Association for the Study of the Liver, Januar 2018, Hamburg.

Bartell AL, Gauhar A, Elvers M, **Kleeschulte S**, Kordes C, Bock H. *Regulation verschiedener Gene in der Leber durch Reelin*. medRSD Symposium, Düsseldorf, Oktober 2017.

Kleeschulte S, Fender AC, Bode JG. *Deletion of thrombin receptor PAR₄ improves metabolic status and shows less severe NAFLD in mice fed high-fat diet*. deliver Symposium, Düsseldorf, September 2017.

Kaglin S, Fischinger V, Maier JK, Fender AC. *Anti-adipogenic effects of the PAR-4 thrombin receptor in murine 3T3L1 cells*. 82. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Berlin, 29. Februar-3. März 2016

“Our deepest fear is not that we are inadequate. Our deepest fear is that we are powerful beyond measure. It is our light, not our darkness that most frightens us. We ask ourselves, 'Who am I to be brilliant, gorgeous, talented, fabulous?' Actually, who are you not to be? [...] Your playing small does not serve the world. There is nothing enlightened about shrinking so that other people won't feel insecure around you. We are all meant to shine, as children do. [...] It's not just in some of us; it's in everyone. And as we let our own light shine, we unconsciously give other people permission to do the same. As we are liberated from our own fear, our presence automatically liberates others.”

- A Return to Love: Reflections on the Principles of “A Course in Miracles“
by Marianne Williamson -

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
1 Einleitung	1
1.1 Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLE) und Nicht-alkoholische Fettleberhepatitis (NASH)	1
1.1.1 Zelltypen, die zur Entwicklung einer NAFLE/NASH beitragen	2
1.2 Diabetes und Insulinresistenz	6
1.2.1 Bestimmung des T2DM und des metabolischen Syndroms	8
1.2.2 Übergewicht und Fettleibigkeit	8
1.2.3 Fettgewebe	9
1.2.4 Insulinresistenz	10
1.2.5 Gegenseitige Beeinflussung von Leber und Fettgewebe	12
1.3 Protease-aktivierte Rezeptoren	13
1.3.1 Struktur und Funktion der PARs	13
1.3.2 Protease-aktivierter Rezeptor 4	14
1.4 Ziel dieser Arbeit	19
2 Material und Methoden	21
2.1 Material	21
2.1.1 Versuchstiere	21
2.1.2 Chemikalien	21
2.1.3 Antikörper	23
2.1.4 Kits	23
2.1.5 Verbrauchsmaterial	24
2.1.6 Oligonukleotide für Genotypisierung	24
2.1.7 Oligonukleotide	25
2.1.8 Puffer und Färbelösungen	25
2.1.9 Geräte	27
2.2 Methoden	28
2.2.1 Tierexperimente	28
2.2.2 PAR4-Genotypisierung	30
2.2.3 Organisolierung	31
2.2.4 Gewinnung von Serum	32
2.2.5 RNA-Isolierung aus Lebergewebe	32
2.2.6 RNA-Isolierung aus Fettgewebe	33
2.2.7 cDNA-Synthese durch Reverse Transkription der RNA	33
2.2.8 Quantitative Echtzeit-PCR	34
2.2.9 Histologie	35
2.2.10 Identifikation von Zellpopulationen mittels FACS	38
2.2.11 Klinische Chemie	39
2.2.12 Multiplex	40
2.2.13 Insulin-ELISA	40
2.2.14 Statistische Auswertung	40

3	Ergebnisse	43
3.1	Wird die PAR4-Transkription durch eine hochkalorische Fettfütterung beeinflusst?	43
3.2	Beeinflusst PAR4 die Gewichtszunahme während einer hochkalorischen Fettfütterung?	46
3.3	Beeinflusst PAR4 das Gewicht von Leber und Fettgewebe im Verlauf einer hochkalorischen Fettfütterung?	49
3.4	Beeinflusst PAR4 die Glukosetoleranz und Insulinsensitivität im Laufe einer hochkalorischen Fettfütterung?	51
3.5	Beeinflusst PAR4 klinische Parameter der Leber während einer hochkalorischen Fettfütterung?	55
3.6	Beeinflusst PAR4 die Zytokinexpression im Serum während einer hochkalorischen Fettfütterung?	58
3.7	Beeinflusst PAR4 die transkriptionelle Regulation verschiedener Zytokine und Chemokine im weißen oder braunen Fett- bzw. im Lebergewebe?	62
3.8	Beeinflusst PAR4 die Immunzellpopulationen der Leber während einer hochkalorischen Fettfütterung?	72
3.9	Beeinflusst PAR4 die Einwanderung von Mac2 ⁺ -Zellen in die Leber?	79
3.10	Hat PAR4 einen Einfluss auf die Lipidakkumulation in der Leber?	81
3.11	Beeinflusst PAR4 die Kollageneinlagerung und damit die Fibrosebildung in der Leber?	84
3.12	Beeinflusst PAR4 die Homöostase des Fettgewebes während einer hochkalorischen Fettfütterung?	86
4	Diskussion	89
4.1	Einfluss des PAR4 auf die Entwicklung von Übergewicht	90
4.2	Einfluss des PAR4 auf die Entwicklung einer Insulinresistenz	90
4.3	Einfluss von PAR4 im Serum	91
4.4	Transkriptionelle Beeinflussung der Leber und des weißen und braunen Fettgewebes durch PAR4	94
4.5	Veränderung der Immunzellpopulation	100
4.6	Histologische Veränderungen durch NAFLE-Induktion	102
4.7	Beeinflussung des Fettgewebes durch PAR4	104
	Zusammenfassung	107
	Summary	109
	Literatur	111
	Abbildungsverzeichnis	III
	Tabellenverzeichnis	IV
	Anhang	V
	Danksagung	XVIII

Abkürzungsverzeichnis

ALE	Alkoholische Lebererkrankung
APP	Akut-Phase-Protein
ATM	”adipose tissue macrophages”
PAR-4^{+/+}	Wildtyp Mäuse
PAR-4^{-/-}	PAR4-defiziente Mäuse
AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
Bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw	beziehungsweise
CCL	CC-Motiv-Chemokin
CLS	”crown-like structures”
CVD	”Cardiovascular disease” kardiovaskuläre Erkrankung
CXC	CXC-Motiv-Chemokin
CD	”Cluster of differentiation”
cDNA	komplementäre DNA
Cy3	Cyanin-Farbstoff 3
DMEM	”Dulbeccos modified Eagle medium”
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	”fluorescence activated cell sorting”
FCS	Fötales Kälberserum (”fetal calf serum”)
FFA	”Free fatty acids” Freie Fettsäuren
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht
GPCR	”G-Protein-coupled receptor” G-Protein gekoppelter Rezeptor

HBSS	”Hank’s Balanced Salt Solution”
HCC	Hepatozelluläres Karzinom, ”Hepatocellular carcinoma”
HFF	hochkalorisches Fettfutter
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HRP	Meerrettichperoxidase (”horseradish peroxidase”)
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IFN	Interferon
IR	Insulinrezeptor
LSM	Laser Scanning Mikroskop
mRNA	”messenger” RNA
NAFLE	Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung
NASH	Nicht-alkoholische Steatohepatitis
PAR	Protease-aktivierter Rezeptor
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	”Real time”-PCR
SDHA	Succinat-Dehydrogenase-Komplex, Untereinheit A
Sek	Sekundär-Antikörper
SF	Standardfutter
SMC	glatte Muskelzelle ”smooth muscle cell”
SSC	Seitwärtsstreulicht
T1DM	Typ-1-Diabetes mellitus
T2DM	Typ-2-Diabetes mellitus
TNF	Tumornekrosefaktor
w	Wochen

1 Einleitung

1.1 Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLE) und Nicht-alkoholische Fettleberhepatitis (NASH)

Die nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLE) ist aufgrund der rapiden Zunahme der Prävalenz von Adipositas häufiger als eine alkoholbedingte Lebererkrankung und sie ist die häufigste Ursache für abnormale Leberfunktionstests [1]. Sie ist weltweit verbreitet und liegt bei ungefähr 20 % in der allgemeinen Bevölkerung, bis zu 70 % der Patienten mit Typ-2-Diabetes mellitus sind betroffen [2]. Das erste erkennbare Stadium der NAFLE ist die Lebersteatose, wenn der Fettgehalt 5 % des Lebervolumens übersteigt. Eine einfache Steatose ist in der Regel gutartig hinsichtlich des Risikos einer Progression zu einer fortgeschrittenen Lebererkrankung. Angesichts ihrer hohen Prävalenz stellt sie trotzdem eine wichtige Ursache für Zirrhose dar [3].

Vor allem ist die NAFLE stark mit Insulinresistenz und Hyperglykämie assoziiert und daher eng mit dem Auftreten eines Typ-2-Diabetes verbunden. Die nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH), das nächste Stadium der NAFLE, entwickelt sich, wenn eine hepatische Entzündung auftritt. Ihre Prävalenz in der Allgemeinbevölkerung wird auf 3-5 % geschätzt [2]. Patienten mit NASH besitzen ein viel höheres Risiko für klinisch signifikante und fortschreitende Leberfibrose, Zirrhose und hepatozelluläres Karzinom (HCC, "Hepatocellular carcinoma") [3, 4]. So entwickeln etwa 10 % bis 29 % der Patienten mit NASH innerhalb von 10 Jahren nach Erstdiagnose eine Zirrhose. Etwa 4 % bis 27 % dieser Patienten mit NASH bedingter Zirrhose entwickeln im Verlauf ein HCC [5]. Es wird angenommen, dass die NASH aufgrund ihrer hohen Prävalenz die chronische Hepatitis C als Hauptindikation für eine Lebertransplantation bis zum Jahr 2020 übertreffen wird.

Die Progression von NAFLE/NASH folgt einem Muster, das für alle Arten von Lebererkrankungen charakteristisch ist, unabhängig von dem verursachenden Agens. Diese Progression ist durch das Auftreten von Fettleber, Hepatozytennekrose und Apoptose, Entzündung, regenerierenden Knötchen, Fibrose und Zirrhose gekennzeichnet [6]. Die Entwicklung von Steatose, Inflammation, Fibrose und Zirrhose ist ein komplexer Prozess, an dem sowohl parenchymale als auch nicht-parenchymale Zellen in der Leber beteiligt sind. Auch die Rekrutierung anderer Zelltypen in die Leber ist eine Reaktion auf Schäden und Entzündungen [7].

1.1.1 Zelltypen, die zur Entwicklung einer NAFLE/NASH beitragen

Die Leber besteht aus zwei Hauptgruppen von Leberzellen, aus Parenchymzellen und Nicht-Parenchymzellen. 70-85 % des Lebervolumens werden von parenchymalen Hepatozyten eingenommen. Nicht-parenchymale Zellen machen bis zu 40 % der Gesamtzahl der Leberzellen aus, aber nur 6,5 % ihres Volumens [8]. Die Lebersinusoiden sind mit sinusoidalen Endothelzellen ausgekleidet [9]. Kupfferzellen sind nicht-parenchymale Zellen, die im Lumen des Sinusoids gefunden werden [8].

Die fett-speichernden hepatischen Sternzellen befinden sich im Disse'schen Raum und sorgen unter anderem für die Synthese der extrazellulären Matrix [10]. Neben den Kupfferzellen lassen sich in der Leber noch andere Immunzellpopulationen nachweisen, darunter neutrophile Granulozyten, Lymphozyten und T-Zellen, die den verschiedenen Untergruppen (NK-Zellen, regulatorische T-Zellen) zuzuordnen sind. Die für diese Arbeit wichtigen Aspekte der Hepatozyten, Kupfferzellen und neutrophilen Granulozyten werden im folgenden Abschnitt aufgeführt.

1.1.1.1 Hepatozyten

Hepatozyten bilden mit 70-85 % den größten parenchymalen Anteil der Leber und sind verantwortlich für die Verdauungs- und Stoffwechselleistung der Leber. Bei der systemischen Immunität spielen Hepatozyten eine zentrale Rolle in der Akute-Phase-Reaktion, die bei verschiedenen Stressfaktoren wie Ischämie, physischem Trauma und Sepsis den Blutkreislauf mit Abwehrproteinen überfluten [11]. Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass Hepatozyten zentrale Regulatoren einer systemischen Entzündungsreaktion darstellen [12]. Hepatozyten reagieren auf Stimulation durch IL-6, IL-1 β und andere Zytokine im Serum und produzieren eine große Menge von Akut-Phase-Proteinen, die Bakterien töten und die Immunantwort regulieren [12]. Neben den APPs produzieren Hepatozyten verschiedene Chemokine (z.B. CCL2 und CXCL1), um Immunzellen (z.B. Makrophagen und neutrophile Granulozyten) als Reaktion auf Leberschäden und Infektionen anzulocken [13–15].

CCL2 ist ein Chemokin, welches für die Rekrutierung von Monozyten/Makrophagen eine wichtige Rolle spielt. Sowohl bei der alkoholischen Fettleber- als auch bei der nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung exprimieren unter anderen Hepatozyten CCL2 und rekrutieren Monozyten/Makrophagen in die Leber. Dieser Effekt verschlimmert die Steatose, die Leberschädigung und die Entzündung [16, 17]. Darüber hinaus sekretieren Hepatozyten in bestimmten Situationen eine große Menge an CXCL1, das die hepatische Neutrophileninfiltration induziert und hierdurch zu einer Aggravierung der Leberschädigung führen kann. [18]. Ein weiteres Chemokin, das CXCL2, sorgt ebenfalls für eine Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in die Leber.

1.1.1.2 Relevanz von Kupfferzellen bei der Entwicklung einer NAFLE/NASH

In der Leber befinden sich 80-90 % aller gewebsständigen Makrophagen des Körpers [19, 20]. Dabei lassen sich nicht zuletzt im Hinblick auf ihren Ursprung in der Leber verschiedene Makrophagenpopulationen voneinander abgrenzen. "Lineage Tracing"-Experimente konnten nachweisen, dass es sich bei Kupfferzellen um eine Zellpopulation handelt, die sich selbst erneuern kann und von fetalen Lebermakrophagen abstammt [21]. Letztere stammen wiederum von Makrophagenpopulationen ab, die aus dem Dottersack in die Leber einwandern [22]. Hiervon abzugrenzen sind Makrophagenpopulationen die im Rahmen von Leberschädigung und Regenerationsprozessen aus der Zirkulation in die Leber rekrutiert werden [23]. Wobei jüngere Daten darauf hinweisen, dass auch rekrutierte Zellpopulationen in der Lage sind Kupfferzellpopulationen zu ersetzen [24].

Im Hinblick auf die Funktion geht man nach derzeitigem Kenntnisstand davon aus, dass Kupfferzellen eher "Hausmeister"- bzw. Wächterfunktionen wahrnehmen und eine wesentliche Rolle für den Erhalt der Homöostase spielen, während aus der Zirkulation in die Leber rekrutierte Makrophagenpopulationen für die Entstehung von Entzündungsreaktionen relevant sind und damit in der Vermittlung von Schädigungs- und Regenerationsprozessen von Bedeutung sind [25]. Lebermakrophagen sind ein Bestandteil des mononukleären-phagozytischen Systems und sind sowohl für die hepatische als auch für die systemische Reaktion auf Pathogene von zentraler Bedeutung. Dabei treten sie immer wieder als kritische Mediatoren von Leberschäden und -reparaturen auf [26].

Die verschiedenen Makrophagenpopulationen der Leber weisen eine enorme Plastizität auf. In Abhängigkeit von der lokalen metabolischen und immunologischen Umgebung können unterschiedliche Phänotypen exprimiert werden, vom proinflammatorischen M1-Phänotyp bis zum alternativen M2-Phänotyp [27]. Damit spielen sie eine entscheidende Rolle bei der angeborenen Immunantwort. Das bis heute bestehende Problem vorliegender Fachliteratur ist die Einteilung der Lebermakrophagen in verschiedene Subpopulationen. Die Literatur verwendet zur Einteilung der Lebermakrophagen unter anderem Oberflächenmarker wie F4/80, CD14 oder CD11b in unterschiedlicher Weise. Beim Vergleich verschiedener Quellen wird oft nicht klar, welche Population der Lebermakrophagen momentan betrachtet wird. Daher hat sich der Terminus "Lebermakrophage" etabliert.

Da Kupfferzellen im Lebersinusoid lokalisiert sind, sind sie die erste Verteidigungslinie gegen Pathogene und immunreaktive Substanzen, die aus dem Gastrointestinaltrakt über die Pfortaderzirkulation in die Leber transportiert werden. Kupfferzellen spielen somit eine wichtige entzündungshemmende Rolle, indem sie die Bewegung der aus dem Darm stammenden immunreaktiven Substanzen daran hindern, sich an der Lebersinusoide vorbeizubewegen. Eine Veränderung der funktionellen Aktivität von Kupfferzellen ist mit einer Vielzahl von Krankheitszuständen verbunden. Während Kupfferzellen im Krankheitsbild einer Arzneimittel-induzierten Leberschädigung [28] und einer Toxin-induzierten Fibrose [29] eine eher schützende Wirkung aufweisen, trägt eine Dysregulation der Kupfferzellen in der NAFLE/NASH-Entwicklung zu einer chronischen Entzündung der Leber bei [30, 31].

Neue Studien weisen darauf hin, dass der Phänotyp reifer Gewebsmakrophagen sehr variabel sein kann. Die funktionelle Aktivität kann dabei ganz verschieden sein, je nach lokaler metabolischer und immunologischer Umgebung, die während der Makrophagenentwicklung vorlag. Dabei ist das intrinsische Differenzierungsprogramm des Makrophagen zweitrangig [32]. In der Leber resultiert die Plastizität aus einer Änderung der Aktivierung von residenten Makrophagen und/oder der Rekrutierung von peripheren Monozyten/Makrophagen in die Leber. Ein großer Teil unseres Verständnisses der Makrophagenplastizität stammt von residenten Makrophagen im Fettgewebe und Nicht-Gewebemakrophagen [33, 34]. Jüngste Daten bestätigen jedoch, dass die Regulation des funktionellen Phänotyps hepatischer Makrophagen mit der Progression verschiedener Lebererkrankungen einhergeht, einschließlich ALE, NASH, Fibrose und hepatozellulärem Karzinom [35–41].

Die phänotypische Aktivität von Makrophagen wird vom metabolischen Zustand des Makrophagen beeinflusst. Besonders die Wahl zwischen Glukose und Fettsäuren als primäre Energiequelle scheint einen Einfluss auf den Phänotyp des Makrophagen zu haben [33]. Tatsächlich sind Regulatoren des Lipidstoffwechsels, wie die Mitglieder der PPAR-Familie [42, 43] und Adiponektin [39], wichtige Moderatoren der Makrophagenpolarisation. Mehrere Mitglieder der PPAR-Familie leisten unterschiedliche Beiträge zur M2-Polarisation, wobei PPAR γ die oxidative Phosphorylierung erhöht und PPAR δ die Expression von Mustererkennungsrezeptoren und kostimulatorischen Molekülen reguliert [43]. In ähnlicher Weise reguliert Adiponektin die Expression von PPAR γ und PPAR δ [39].

Diese doppelte Regulierung des Lipidstoffwechsels und der Makrophagenpolarisation ist besonders interessant bei der Betrachtung der Beteiligung von Kupfferzellen und anderen hepatischen Makrophagen zur Progression metabolischer Lebererkrankungen wie ALE und NASH, die anfänglich durch eine Dysregulation im hepatischen Fettstoffwechsel gekennzeichnet sind. Weitere Hinweise deuten darauf hin, dass Kupfferzellen auch an der Entwicklung von Insulinresistenz und der NAFLE bei Fettleibigkeit sowie dem Auftreten des metabolischen Syndroms beteiligt sind [27].

Während frühe Arbeiten auf dem Gebiet der Adipositas eine kritische Rolle für residente Makrophagen im Fettgewebe bei der Entwicklung des metabolischen Syndroms charakterisierten, haben neuere Studien auch Kupfferzellen als kritische Mediatoren von NAFLE/NASH identifiziert [43–46]. In einem fettreichen Diätmodell der Lebersteatose bei Mäusen führte die Depletion von Kupfferzellen mit Clodronat zur Umkehrung der hepatischen Steatose [47]. Während mehrere Komponenten der angeborenen Immunantwort an der Initiierung und Progression von NAFLE/NASH beteiligt sind, sind Kupfferzellen besonders kritisch für den Beginn und die Chronifizierung von Leberschäden [48, 49]. Neuere Studien haben belegt, dass fettreiche Diäten die Kupfferzellaktivierung in einem zeitabhängigen Mechanismus erhöhen, was zu einer erhöhten Expression von inflammatorischen Zytokinen führt [50].

Obstfeld *et al.* beschrieben, dass die CCR2/CCL2/-vermittelte Rekrutierung von myeloiden Zellen in die Leber in Mausmodellen von NAFLE/NASH zur Steatose beiträgt [17]. Diese CCR2/CCL2/-Achse ist auch an der Fettgewebeentzündung in Modellen diätetischer Adipositas beteiligt [51, 52], was die wichtigen Parallelen in der angeborenen Immunaktivität in Fettgewebe und Leber bei der Progression metabolischer Leberschädigung verdeutlicht. Interessanterweise berichteten kürzlich durchgeführte Studien, dass, während hepatische Makrophagen in den frühen Stadien einer fettreichen Ernährung nach vielen Wochen eine nachteilige Wirkung hatten, die hepatische Makrophagen-Depletion nicht länger vor der Entwicklung von Insulinresistenz oder hepatischer Steatose schützt [46, 53]. Diese Unterschiede in der Kurzzeit- und Langzeitdepletion von hepatischen Makrophagen auf die Entwicklung einer durch eine Fettfütterung induzierten Insulinresistenz können Änderungen im phänotypischen Profil von Lebermakrophagen in verschiedenen Stadien der Progression des metabolischen Syndroms und NAFLE/NASH widerspiegeln.

1.1.1.3 Relevanz von neutrophilen Granulozyten bei der Entwicklung einer NAFLE/NASH

Neutrophile Granulozyten entwickeln sich im Knochenmark über einen Zeitraum von 14 Tagen und zirkulieren im peripheren Blut. Sie überleben anschließend nur für kurze Zeit mit einer Halbwertszeit von 12 bis 18 Stunden [54]. Der Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (G-CSF) und der Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) sind Zytokine, die dazu führen, dass neutrophile Granulozyten aus dem Knochenmark freigesetzt werden. Beide Zytokine erhöhen die Anzahl zirkulierender neutrophiler Granulozyten, fördern deren Reifung und Aktivierung und verlängern ihre Lebensdauer [54].

Die aberrante Aktivierung und eine verlängerte Lebensdauer von Gewebe-infiltrierenden neutrophilen Granulozyten können die Wahrscheinlichkeit einer extrazellulären Schädigung erhöhen [55]. Obwohl eine Dysregulation der Lipidakkumulation im Spektrum der nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung auftritt, zeigen sich Merkmale der Leberzellschädigung, wie ein Anschwellen von Hepatozyten, Zytoskelettveränderungen und Hepatozytenapoptose, vorwiegend bei NASH und unterscheiden diese von einer einfachen Steatose [56].

Ein markantes Merkmal der in NASH beobachteten Entzündung ist die Akkumulation von neutrophilen Granulozyten. Myeloperoxidase aus diesen Zellen kann die Makrophagen-Zytotoxizität verstärken und die Neutrophilenaktivierung in einem NASH-Mausmodell induzieren [57]. Die Neutrophilen-Dysfunktion war bei NASH mit Leberfibrose und Zirrhose assoziiert. In der Tat haben humane neutrophile Peptide die Fähigkeit, die hepatische Fibrose bei Fettlebererkrankungen zu verstärken, indem sie die Proliferation hepatischer Sternzellen induzieren [58]. Darüber hinaus war das Verhältnis von neutrophilen Granulozyten zu Lymphozyten bei Patienten mit NASH und fortgeschrittener Fibrose höher. Dieses Verhältnis kann als neuer, nicht-invasiver Marker zur Vorhersage fortgeschrittener Erkrankungen eingesetzt werden [59].

1.2 Diabetes und Insulinresistenz

Die Entwicklung von NAFLE/NASH ist stark mit Fettleibigkeit und dem metabolischen Syndrom assoziiert. Das metabolische Syndrom ist durch ein erhöhtes Risiko für chronische Erkrankungen wie Insulinresistenz und Typ-2-Diabetes, Dyslipidämie und kardiovaskuläre Erkrankungen sowie NAFLE/NASH gekennzeichnet [60]. Nicht alle fettleibigen Personen weisen ein metabolisches Syndrom und/oder NAFLE/NASH auf, was auf eine Rolle der Umwelteinflüsse und/oder genetische Beiträge zur Progression

einer Leberschädigung hindeutet [5]. Diabetes gilt heutzutage als eines der größten Gesundheitsrisiken weltweit. 422 Millionen Menschen erkrankten 2014 im Vergleich zu 108 Millionen Patienten im Jahr 1980 [61]. Im gleichen Zeitraum hat sich die weltweite Prävalenz von 4,7 % auf 8,5 % fast verdoppelt.

Gemäß der Weltgesundheitsorganisation starben im Jahr 2015 1,6 Millionen Menschen an Diabetes mellitus (DM) [61]. Diese Zahl hat sich seit dem Jahr 2000 fast verdoppelt. Der Anstieg der DM-Inzidenz begründet sich hauptsächlich auf einer Zunahme von Typ 2 Diabetes mellitus (T2DM). Alarmierend ist, dass sich die Prävalenz jüngerer Diabetiker (44-65 Jahre) in den letzten 20 Jahren verdreifacht hat. In Kombination mit der Tatsache, dass sich die Anzahl der Menschen (20 Jahre und älter) mit Prädiabetes um etwa 8 % zwischen 2010 und 2012 (in den USA) erhöht hat, zeigt dies, dass sich der Ausbruch der Krankheit mehr auf jüngere Menschen verlagert [62].

Diabetes mellitus ist eine heterogene Erkrankung, die durch gemeinsame Elemente der Hyperglykämie und Glukoseintoleranz aufgrund von Defekten der Insulinwirkung und/oder Insulinsekretion gekennzeichnet ist. Langfristige Folgen dieser Krankheit sind Organschäden, Funktionsstörungen und das Versagen verschiedener Organe. Die Erkrankung wird in Typ-1- und Typ-2-Diabetes eingeteilt. Typ-2-Diabetes (T2D) stellt die vorherrschende Diabetesform dar, da diese mindestens 90 % aller Fälle ausmacht und mit Fettleibigkeit, Überernährung und körperlicher Inaktivität verbunden ist. Die Krankheit ist durch eine Stoffwechselstörung der Energiehomöostase gekennzeichnet. Neben Hyperglykämie und Dyslipidämie können erhöhte endogene Glukoseproduktion, Insulinresistenz und β -Zell-Dysfunktion auftreten [63].

Im insulinresistenten Zustand reagieren die β -Zellen der Langerhanschen Inseln des Pankreas auf einen Energieüberschuss mit erhöhter Insulinproduktion und -sekretion, die zur Erschöpfung der β -Zellen und schließlich zum Verlust der β -Zellmasse führen [64]. Die Manifestation eines Typ-2-Diabetes erfolgt schleichend und beginnt zunächst mit einem sog. Prädiabetes. Er charakterisiert sich durch einen beeinträchtigten Nüchternglukosespiegel im Blut und eine gestörte Glukosetoleranz. Dieser Zustand kann über Jahre oder sogar Jahrzehnte ohne klinische Symptome auftreten und ist mit der Inzidenz von T2D- und kardiovaskulären Erkrankungen (CVD) assoziiert [65, 66]. Die möglichen langfristigen Komplikationen von Typ-2-Diabetes sind eine Retinopathie, Nephropathie, periphere Neuropathie sowie atherosklerotische kardiovaskuläre Erkrankungen [66].

1.2.1 Bestimmung des T2DM und des metabolischen Syndroms

Auf den ersten Blick scheinen T1DM, T2DM und das metabolische Syndrom ähnliche Symptome zu zeigen, wobei Hyperglykämie als eines der ersten Symptome messbar ist. Ein Nüchternblutzucker von mehr als 126 mg/dl (7 mmol/l) klassifiziert die Patienten als diabetisch. Dieser Parameter allein ist veraltet und wird mit der Bestimmung von Hämoglobin A1c (HbA1c) untermauert. Dabei ist die Langzeit-Blutzuckerbestimmung der Goldstandard für die Diagnose eines Typ-2-Diabetes und wird ebenfalls zur Therapiekontrolle verwendet [67].

Der Begriff des metabolischen Syndroms wird sehr häufig unter prädiabetischen Bedingungen verwendet. Übersteigt der Nüchternblutzucker 100 mg/dl, weist dies auf eine gestörte Glukosetoleranz hin, die sich als prädiabetisch klassifiziert. Weiterhin müssen zusätzliche Symptome vorhanden sein, um die Diagnose "Metabolisches Syndrom" zu bestätigen. Dazu gehören ein vergrößerter Bauchumfang, niedriges HDL-Cholesterin, erhöhtes LDL-Cholesterin, erhöhte Plasmatriacylglyceride und Hypertonie [68, 69]. In den frühen Stadien der Erkrankung zeigen T2-Diabetiker Hyperinsulinämie und hohe C-Peptidspiegel. Langzeit-Plasmaglukose-Messungen sind jedoch der beste Beweis für T2DM in Kombination mit dem allgemeinen Gesundheitszustand. Im Gegensatz zu T1DM sind T2-Diabetiker überwiegend fettleibig, meist bevor sich der T2DM manifestiert. Aus diesem Grund ist die Fettleibigkeit der Hauptrisikofaktor für die Entwicklung von T2DM.

1.2.2 Übergewicht und Fettleibigkeit

Übergewicht und Adipositas sind die Hauptrisikofaktoren für Stoffwechselstörungen. Viszerale Fettakkumulation ist mit einer Anzahl metabolischer Anomalien wie Glukoseintoleranz, niedrigerem HDL-Cholesterin, erhöhten Triacylglyceriden und Bluthochdruck assoziiert. Adipositas gilt als Hauptrisikofaktor für viele Krankheiten wie Herz-Kreislauf-Erkrankungen (CVD), Diabetes mellitus und Muskelskelett-Erkrankungen sowie für bestimmte Krebsarten wie Brust- oder Dickdarmkrebs [70–74]. Im Jahr 2014 waren 39 % der Erwachsenen weltweit übergewichtig und 13 % per Definition fettleibig. Diese Zahlen sind in den letzten Jahrzehnten gestiegen und haben sich sogar zwischen 1980 und 2014 (WHO) verdoppelt. Im Allgemeinen wird Fettleibigkeit als Ergebnis einer komplexen Interaktion von Umweltfaktoren und Genen vermutet [75].

Neben dem modernen Lebensstil, der durch verminderte körperliche Aktivität und erhöhte Energieaufnahme gekennzeichnet ist, ist eine Reihe von Genen beteiligt, die die Speicherung von Fett begünstigen [75]. Fettleibigkeit ist mit einem Zustand chro-

nischer, niedrig-gradiger Entzündung verbunden. Erste Untersuchungen belegen, dass Entzündungen eine Verbindung zwischen Adipositas-induzierter Insulinresistenz und den damit verbundenen Störungen darstellen [76, 77]. Eine Vielzahl von bioaktiven Substanzen, zusammenfassend Adipokine genannt, wird durch das Fettgewebe freigesetzt. Diese Adipokine bewirken unterschiedliche systemische Reaktionen, die sowohl pro- als auch antiinflammatorisch sein können [78]. Viszerales Fett ist das aktive Fettdepot, welches die Adipokine freisetzt, denen eine wichtige Rolle bei den mit Fettleibigkeit assoziierten Störungen zugesprochen wird [79].

1.2.3 Fettgewebe

Fettgewebe kann in zwei verschiedene Gewebearten eingeteilt werden. Braunes Fettgewebe ist ein hochaktives Gewebe, das Wärme durch kälteinduzierte Thermogenese erzeugt [80]. Bis vor kurzem wurde angenommen, dass braunes Fettgewebe hauptsächlich in Neugeborenen in signifikanten Mengen vorhanden ist und dass in den ersten Lebensjahren ein schneller Schwund dieses Gewebes stattfindet und so nur geringe Mengen an braunem Fettgewebe bei gesunden menschlichen Erwachsenen vorkommen [81]. Allerdings zeigen aktuelle Studien aktives braunes Fettgewebe in 7,3 % der erwachsenen Frauen und 3,1 % der erwachsenen Männer [82–84].

Die Aktivität des braunen Fettgewebes scheint nicht nur geschlechtsabhängig zu sein, sondern auch BMI-abhängig. Die Guppe von Ruth *et al.* zeigte eine reduzierte Aktivität dieses Gewebes bei übergewichtigen und adipösen Männern [84]. Im Gegensatz zu braunem Fettgewebe ist weißes Fettgewebe ein hocheffizienter Speicher für Energie in Form von Triacylglyceriden und kann mehr als 45 % des Körpergewichts bei adipösen Personen ausmachen [85]. Das Fettgewebe besteht aus einer Anzahl von heterogenen Zellen, einschließlich reifer Adipozyten, Präadipozyten, Fibroblasten, Endothelzellen, Stromazellen sowie verschiedenen Immunzellen, wie Makrophagen, Killerzellen oder B- und T-Lymphozyten [86–89].

Um die Energiehomöostase aufrecht zu erhalten, reagiert das Fettgewebe auf Veränderungen des Energiebedarfs und der Energiezufuhr mit Adipozytenhypertrophie und -hyperplasie. Dabei erfolgt ein relativ rascher und dynamischer Umbau des Gewebes [90]. Adipozytenhypertrophie ist durch eine Zunahme der Adipozytengröße aufgrund einer erhöhten Triacylglyceridakkumulation gekennzeichnet. In Situationen wie genetischer Fettleibigkeit oder einer fettreichen Ernährung haben Adipozyten die Fähigkeit, ihr Volumen auf das 6-7fache zu erhöhen [91]. Dagegen wird die Adipozytenhyperplasie durch eine höhere Anzahl an Adipozyten beschrieben.

Bekannt ist, dass die Adipozytengröße sowohl mit der Insulinresistenz als auch mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von T2DM positiv korreliert [92–94]. Durch Untersuchungen des viszeralen Fettgewebes konnte gezeigt werden, dass dieses Gewebe schädliche Wirkungen im Bezug auf die Insulinresistenz, Glukosetoleranz, Dyslipidämie, Hypertonie und koronare Herzkrankheit aufweist [95–98]. Heutzutage wird Fettgewebe als ein wichtiges endokrines Organ anerkannt, da 1987 Adipsin und später im Jahr 1994 Leptin als Faktoren identifiziert wurden, die vom Fettgewebe exprimiert und in ihre Umgebung sezerniert werden [99, 100].

Bis heute wurden zahlreiche Adipokine gefunden, die vom Fettgewebe freigesetzt werden. Dabei werden nur Substanzen als Adipokine bezeichnet, welche von Adipozyten freigesetzt werden und nicht von anderen Zelltypen des Fettgewebes [78]. Adipozyten setzen erhebliche Mengen an Adipokinen frei, die entweder lokal auf autokrine oder parakrine Weise auf Adipozyten selbst wirken oder auf andere im Fettgewebe lokalisierte Zelltypen wirken. Ein systemischer Effekt erfolgt, indem Adipokine in den Kreislauf eintreten und Zellen des peripheren Gewebes beeinflussen [101]. Verschiedene Adipokine üben unterschiedliche physiologische Funktionen aus, da sie an der Regulation des Immunsystems, des Blutdrucks, der vaskulären Hämostase, des Lipidstoffwechsels, der Glukosehomöostase und der Angiogenese beteiligt sind [102].

1.2.4 Insulinresistenz

Die Insulin-Signalkaskade kann auf verschiedene Arten gestört werden. Hauptverursacher sind Entzündungsmediatoren, wie CCL2, IL-1, IL-6 und TNF- α , die von Immunzellen und Adipozyten freigesetzt werden [103]. Wie im Fettgewebe unter Fettleibigkeit beobachtet, sind NF- κ B-abhängige Mechanismen unter chronischer Entzündung fehlreguliert. Hier können Zytokine, die aus lokalen Zellen freigesetzt werden, wie Adipozyten und Makrophagen, zur systemischen Rekrutierung und Aktivierung von Immunzellen führen, die den Zustand einer chronischen unaufgelösten Entzündung fördern [104]. Weiterhin ist die Lipolyse im viszeralen Fettgewebe erhöht. Dies trägt zu hohen zirkulierenden Mengen an freien Fettsäuren (FFA) bei.

Darüber hinaus ist die antilipolytische Aktivität von Insulin im viszeralen Fettgewebe beeinträchtigt, was darauf hindeutet, dass dieses Gewebe insulinresistenter ist als andere Gewebe. Fettgewebe wird mit Immunzellen wie Makrophagen infiltriert. Die Menge dieser Fettgewebs-infiltrierenden Makrophagen (ATM, "adipose tissue macrophages") nimmt mit der Entwicklung einer Adipositas zu [105–107]. Die Fettgewebsinfiltration von ATMs wird vermutlich durch verschiedene Mechanismen, einschließlich der Über-

produktion von Chemokinen, wie dem CCL-2, gefördert. Ebenso erfolgen die Mobilisierung von Makrophagen und die Aktivierung von Entzündungswegen als Reaktionen auf eine erhöhte Konzentration freier Fettsäuren [108, 109].

Ebenso induziert vermehrter Zelltod von Adipozyten eine Makrophagenrekrutierung, da Makrophagen tote Adipozyten umgeben, die als sog. "kronenartige Strukturen" (CLS) vermehrt im hypertrophen Fettgewebe gefunden werden [110]. Diese CLS wurden im Fettgewebe von mageren und adipösen Mäusen und Menschen beobachtet, aber die Anzahl von CLS war im Fettgewebe von adipösen Individuen 30 mal höher als im Fettgewebe von schlanken Individuen [91, 111, 112]. CLS sind nicht exklusiv im Fettgewebe vertreten, sondern bilden sich im Laufe der Entwicklung einer NAFLE/NASH in der Leber [113].

Adipositas induziert einen phänotypischen Wechsel der Makrophagenpolarisation. Makrophagen des Fettgewebes treten als alternativ aktivierter M2-Phänotyp auf, der entzündungshemmende Zytokine wie IL-10 und IL-1R α produziert. Im Gegensatz dazu werden rekrutierte Makrophagen durch den klassisch aktivierten M1-Phänotyp repräsentiert, der mit der Produktion proinflammatorischer Zytokine, einschließlich TNF- α und IL-6, assoziiert ist [114, 115]. Erhöhte ATM-Akkumulation und Adipozytenhypertrophie sind mit einer Dysregulation der Fettgewebsssekretion assoziiert, die eine entzündliche Umgebung fördert. Eine Wechselwirkung zwischen Adipozyten und Makrophagen spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Insulinresistenz [101, 114]. Eine Dysregulation der überwiegenden Mehrheit der Adipokine findet sich bei Adipositas, T2DM und dem Metabolischen Syndrom, da Entzündungs- und Insulinresistenz-bezogene Adipokine hochreguliert sind, während entzündungshemmende und insulin-sensibilisierende Adipokine herabreguliert sind [77].

Neben der Beteiligung des NF- κ B-Signalwegs spielen weitere intrazelluläre Moleküle eine wichtige Rolle in der Entwicklung einer Insulinresistenz. Dazu gehört SOCS3, welches über eine negative Rückkopplung die Aktivierung verschiedener Rezeptoren reguliert, wozu auch der Insulinrezeptor zählt. SOCS3 ist dabei ein Schlüsselprotein zur Verringerung der Aktivität von inflammatorischen Zytokinen [116]. Einige Studien konnten bereits belegen, dass die SOCS3-Expression in verschiedenen Geweben von adipösen Mäusen erhöht ist [117–120]. Darüber hinaus deuten andere Ergebnisse darauf hin, dass SOCS3 auch die Wirkung wichtiger Hormone hemmt, die an der Homöostase des Energiestoffwechsels beteiligt sind, wie Leptin und Insulin [121–123].

1.2.5 Gegenseitige Beeinflussung von Leber und Fettgewebe

Während Studien über die Kupfferzellfunktion in der Leber Erkenntnisse über die Rolle von hepatischen Makrophagen bei der Entwicklung von NAFLE/NASH geliefert haben, tragen Gewebemakrophagen im Fettgewebe ursächliche Beiträge zu NAFLE/NASH bei [33]. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Regulierung des Stoffwechsels und der angeborenen Immunität. Veränderungen in den phänotypischen Eigenschaften von residenten Makrophagen im Fettgewebe bei Adipositas und Metabolischem Syndrom tragen eindeutig zur Progression von NAFLE/NASH bei [33, 43]. Die parallele Rolle von ATMs und Kupfferzellen bei der Entwicklung von NAFLE/NASH legt nahe, dass Gewebe-residente Makrophagen in ähnlicher Weise auf den metabolischen Stress reagieren, der bei metabolischen Lebererkrankungen hervorgerufen wird.

Trotz der differentiellen Anfangssignale, die Gewebemakrophagen in der Entwicklung einer NAFLE/NASH aktivieren, haben diese beiden Zelltypen gemeinsame Zwischenmechanismen für chronische Entzündungserkrankungen, die zur Aktivierung von Gewebemakrophagen sowohl im Leber- als auch im Fettgewebe führen [124, 125]. Eine fettselektive Reduktion von GLUT4 führt zu Insulinresistenz in Muskeln und Leber, obwohl GLUT4 in diesen Geweben erhalten bleibt [126]. Zusätzlich erfolgt eine spezifische Überexpression von GLUT4 im Fettgewebe, welche die insulinresistenten Effekte im Skelettmuskel kompensiert. Die NAFLE zeichnet sich durch eine pathologische Zelllipid-Akkumulation in der Leber aus. Klinische Studien assoziieren dieses Krankheitsbild mit einer Insulinresistenz [127].

Die NAFLE ist eine sehr heterogene Erkrankung mit einem breiten Spektrum von histologischen Indikationen und gilt als hepatische Manifestation des Metabolischen Syndroms. Nach jüngsten Schätzungen der WHO haben zwei Millionen Patienten ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer Leberzirrhose als Folge einer NAFLE/NASH [128]. In dieser Hinsicht werden Insulinresistenz, Adipositas und besonders Hypertriglyceridämie als Hauptrisikofaktoren genannt. Der Anstieg von zellulärem Leberfett kann auf Störungen der De-novo-Lipidsynthese beruhen. In diesem Zusammenhang ist die Lipidbeseitigung mit zunehmendem Lipidgehalt angezeigt, um Zellschäden zu verhindern. Darüber hinaus kann die Hyperglykämie die Insulinsensitivität verringern. Eine Hypertriglyceridämie kann die Leberfunktionsstörung und die Insulinsensitivität darüber hinaus in ihrer pathologischen Wirkung negativ verstärken.

1.3 Protease-aktivierte Rezeptoren

Protease-aktivierte Rezeptoren (PARs) gehören zu den G-Protein gekoppelten Rezeptoren, die in praktisch allen Geweben exprimiert werden. Pathophysiologische Mechanismen, einschließlich Gefäßverletzungen, akuter Entzündung oder Allergenexposition, verursachen die Freisetzung von Proteasen, die die Aktivierung von PARs vermitteln [129, 130]. PARs wurden in den 1990er Jahren identifiziert und vier PAR-Familienmitglieder, PAR1-4, bisher beschrieben. Alle PARs bestehen aus sieben transmembranen α -Helices und werden durch proteolytische Spaltung am N-Terminus durch Proteasen wie Thrombin, Trypsin und Cathepsin G (CatG) aktiviert [131–136]. Thrombin gehört in die Gruppe der Serinproteasen. Die Protease Cathepsin G, welche vor allem von neutrophilen Granulozyten sezerniert wird, spielt eine wichtige Rolle bei Entzündungsreaktionen, reguliert über die Aktivierung von Protease-aktivierten Rezeptoren die Homöostase und ist Bestandteil pathophysiologischer Mechanismen [137].

1.3.1 Struktur und Funktion der PARs

PAR1 (FR2), PAR2 (F2RL1) und PAR3 (F2RL2) werden von Genen kodiert, die zusammen auf Chromosom 5q13 liegen, während die Expression des bemerkenswert kleineren PAR4 (F2RL3) auf Chromosom 19p12 kodiert ist [134, 135]. Im Vergleich zu den anderen Mitgliedern der PAR-Familie sind die Sequenzen der intra- und extrazellulären Domänen von PAR4 nur geringfügig vergleichbar mit denen anderer PARs. Die gebundene Ligandenbindungsstelle von PAR4 enthält nur drei Aminosäuren (ITTCHDV) der Konsensussequenz, die in allen anderen bekannten PARs konserviert ist [135]. Darüber hinaus weisen alle Rezeptoren drei intra- und drei extrazelluläre Schleifen auf [138]. PARs werden durch proteolytische Spaltung an einer bestimmten Stelle der Sequenz der extrazellulären Domäne aktiviert. Dies führt zu einer irreversiblen Eliminierung der ursprünglichen aminoterminalen Domäne und zu einer Demaskierung einer neuen aminoterminalen Domäne, die als gebundener Ligand bezeichnet wird (siehe Abbildung 3) [131, 138, 139].

Die gebundene Ligandensequenz interagiert intramolekular mit einer Bindungsstelle, die sich auf der zweiten extrazellulären Schleife befindet und eine Rezeptoraktivierung verursacht. Die intrazelluläre Signalübertragung erfolgt durch die Dissoziation des gekoppelten G-Proteins und induziert physiologische Reaktionen, einschließlich Apoptose, Zellwachstum, Differenzierung und Entzündung [130, 138]. Für die Bindung des Thrombins und der darauf folgenden Proteolyse enthalten PAR1 und PAR3 eine Hirudin-ähnliche Bindungsdomäne innerhalb des Aminoterminus. Aufgrund des Fehlens einer Hirudin-ähnlichen Bindungsdomäne innerhalb des Aminoterminus hat

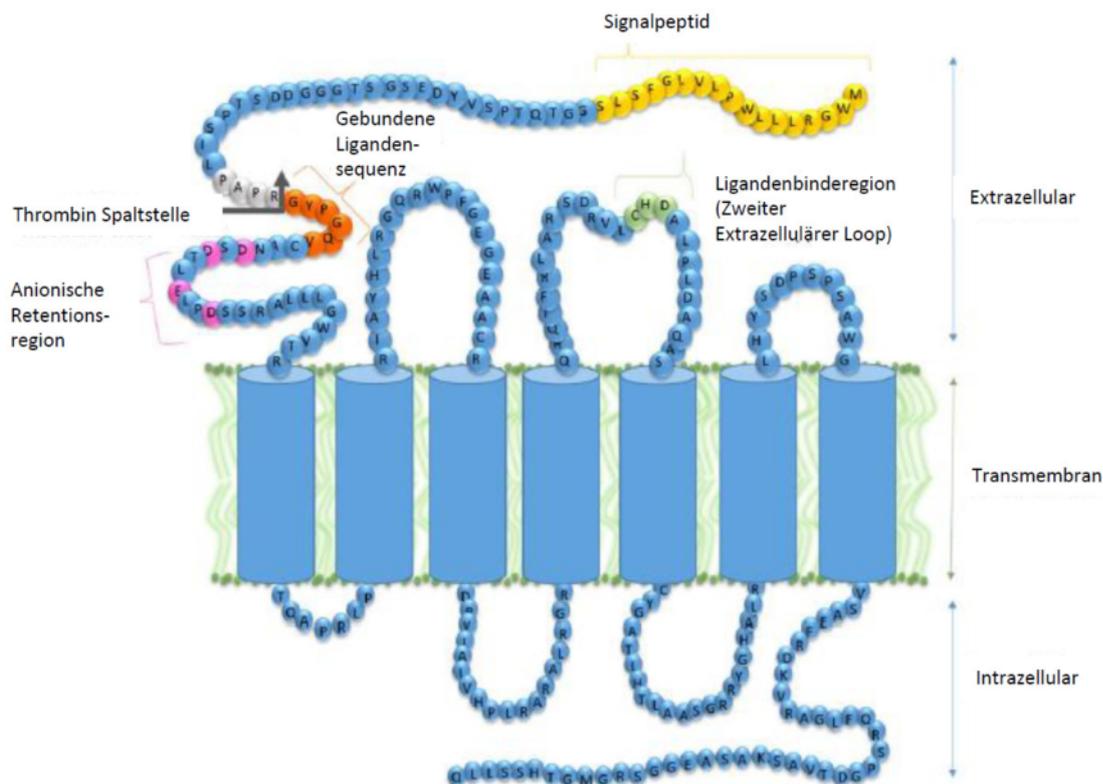


Abbildung 1: Protease-aktivierter Rezeptor 4: Struktur. Die vorgeschlagene Struktur des GPCR mit 300 Aminosäuren, humanes PAR4. Ortsspezifische proteolytische Spaltung des Rezeptor-Amino-Terminus (Thrombin-Spaltstelle, Arg47/Gly48; schwarzer Pfeil) weist einen Neo-Amino-Terminus auf (gebundene Ligandenregion; G48YPGQV; orange), der intramolekular an die zweite extrazelluläre Schleife des Rezeptors bindet (gebundene Ligandenbindungsregion (grün)). PAR4 enthält zwei Regionen für eine verstärkte Thrombin-Interaktion: die anionische Retentionsregion (pink), die mit Thrombin interagiert, und die PAPR-Sequenz (grau), die an der aktiven Stelle des Thrombins mit hoher Affinität bindet, modifiziert nach [139].

PAR4 hat nur eine geringe Affinität für die Bindung von Thrombin. Stattdessen enthält die extrazelluläre Domäne von PAR4 ein duales Prolin-Motiv, das P45APR genannt wird, und ein Motiv bestimmter anionischer Reste (D57, D59, E62 und D65), das für die langsame Dissoziation durch Thrombin benötigt wird [140, 141].

1.3.2 Protease-aktivierter Rezeptor 4

PAR4 wurde 1998 sequenziert. Über seine physiologische Rolle ist nur wenig bekannt [134, 135]. Die Expression von PAR4 wurde in verschiedenen Zelltypen nachgewiesen. Die Zelltypen, welche PAR4 exprimieren, sind Thrombozyten [134, 135, 142], Leukozyten [143], Endothelzellen [144], Adipozyten [145], glatte Muskelzellen (SM-Cs) [146] und Spinalganglien (DRG) [147]. Unter bestimmten Bedingungen wurde eine erhöhte Expression des Rezeptors in diesen Zellen nachgewiesen. Hochregulierte PAR4-

Expression und erhöhte Rezeptor-Sensitivität auf Thrombin wurden in SMCs unter hyperglykämischen Bedingungen beobachtet. Dies führte im Rahmen eines Diabetes zu einem Fortschreiten der vaskulären Schäden [148].

In *in-vitro*-Studien wurden humane Monozyten mit dem Chemotaxismediator Sphingosin1-phosphat behandelt, was zu einer erhöhten Expression von PAR4 führte. Dies wiederum erhöhte die Thrombinantwort der Monozyten und erleichterte ihre Migration an den Ort der Entzündung [148]. Durch Stimulation der humanen Koronararterie mit den proinflammatorischen Zytokinen IL-1 α und TNF- α wurde ebenfalls erhöhte PAR4-Expression beobachtet [146]. Dies wurde in einer Studie von Pavic *et al.* bestätigt, die erhöhte PAR4-Expression in Gefäßen von Patienten mit Typ-2-Diabetes mellitus nachwies [149]. Die Expression von PAR4 wurde ebenfalls in Geweben von Herz, Lunge, Skelettmuskel, Niere, Pankreas, Schilddrüse, Hoden und Dünndarm analysiert [134, 135]. In diesen Organen weist eine Änderung im PAR4-Expressionsprofil auf pathologische Mechanismen hin. Aggressives Lungenadenokarzinom und Ösophagus-Plattenepithelkarzinom sind mit verminderter Expression von PAR4 assoziiert [150, 151].

Für die Koagulation ist die Aktivierung von PAR4 durch Thrombin von entscheidender Bedeutung. In den letzten Jahren ist allerdings die gerinnungsunabhängige Wirkung von Thrombin über PAR4 in unterschiedlichen pathologischen Geschehen in den Vordergrund gerückt. Brummel *et al.* konnten feststellen, dass ein Großteil des Thrombins erst nach erfolgter Koagulation aktiviert wird [152]. Daher wird vermutet, dass Thrombin weitere physiologische Funktionen erfüllt, die über das Koagulationssystem hinausgehen. Mihara *et al.* beobachteten, dass die Inhibition von Thrombin zu einer verbesserten Insulinresistenz in diabetischen Mäusen führte [153]. Weiterführende Studien wiesen eine Beteiligung von PAR4 in der Entwicklung eines Diät-induzierten Übergewichts und Fettgewebsentzündung nach [145].

PAR4 wird durch Gerinnungsfaktoren und Entzündungsregulatoren, wie Thrombin und Cathepsin G, aktiviert. Wie oben erwähnt, spielt PAR4 eine Rolle in der Gerinnungskaskade. Bei Stimulation mit hohem Thrombinspiegel induziert es die Thrombozytenaggregation [134, 151]. Darüber hinaus induzierte die Aktivierung von PAR4 durch Thrombin die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten an die Stelle der vaskulären Verletzung in einem Mausmodell, bei dem das Endothel geschädigt wurde. Diese Beobachtung weist auf eine wichtige Rolle des PAR4 bei vaskulärer Entzündung hin [154].

Aus Mastzellen sezerniertes Trypsin und von neutrophilen Granulozyten abgegebenes Cathepsin G können PAR4 neben Thrombin ebenfalls aktivieren. In einer humanen leukämischen Mastzelllinie wurde durch eine Trypsin-Stimulation eine TNF- α -Sekretion hervorgerufen [134, 155]. Cathepsin G-Stimulation von PAR4 löst eine Kalzium-Mobilisierung in PAR4-transfizierten Fibroblasten, in PAR4-exprimierenden *Xenopus*-Oozyten und in humanen Thrombozyten aus [136].

Neben physiologischen Mediatoren kann PAR4 auch durch Amidierung aktiviert werden. Aktivierende Peptide (APs), die auf der nativen angebundenen Ligandensequenz des Rezeptors basieren, können synthetisch hergestellt werden und den Rezeptor ohne proteolytische Spaltung durch eine Protease aktivieren. Bisher gibt es zwei PAR4-APs, GYPGKF-NH₂ und AYPGKF-NH₂, von denen AYPGKF-NH₂ eine höhere Spezifität zur Induktion der Plättchenaggregation aufweist [134, 156].

1.3.2.1 Phänotyp der PAR4-defizienten Maus

Zur Untersuchung der physiologischen Schlüsselfunktion von PAR4 wurde eine transgene Knockout-Maus 2001 von Sambrano *et al.* generiert [157]. Thrombozyten dieser Mäuse weisen keine Wirkung auf die Stimulation mit PAR4-AP auf. Im Gegensatz zu humanen Thrombozyten, die PAR1 und PAR4 exprimieren, besitzen Mausplättchen PAR3 anstelle von PAR1. Daher reagieren Thrombozyten von PAR4^{-/-}-Mäusen nicht auf Thrombin und zeigen keine Veränderungen der Plättchenform, der Kalzium-Mobilisierung, der ATP-Sekretion oder der Thrombozytenaggregation nach Stimulation mit variierenden Konzentrationen der Koagulationsprotease [157].

Für die Bestimmung der Blutungszeit wird ein Teil der Schwanzspitze amputiert und die Blutungszeit als Maß für das Gerinnungsvermögen bewertet. In der Tat ist die Blutungszeit von PAR4^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen verlängert [157]. Weiterhin wurden Mäuse mit einem PAR4-Antagonisten, dem Pepducin, behandelt [134, 156]. Diese Mäuse zeigten ebenfalls eine verlängerte Blutungszeit und waren vor einer Thrombozytenaggregation geschützt, ähnlich zu dem Phänotyp, den die PAR4-defizienten Mäuse aufwiesen [158].

Zusammenfassend bestätigen diese Ergebnisse, dass PAR3 alleine nicht ausreicht, um die Thrombozyten zu aktivieren, sondern dass PAR4 für die Aufrechterhaltung der normalen Thrombozyten-Homöostase notwendig ist. Darüber hinaus scheint der PAR4^{-/-}-Phänotyp gegen Thromboseereignisse geschützt zu sein, da eine Verletzung der mesenterialen Arteriolen der Maus durch Exposition mit Eisenchlorid für einen Gefäßver-

schluss länger erfolgen muss als bei Wildtyp-Mäusen [157]. Zusätzliche Beweise für den Schutz vor Thrombose bei PAR4-Mangel wurden von Hamilton *et al.* berichtet, der eine erhöhte Überlebensrate nach Thromboplastin-induzierter Lungenembolie in PAR4^{-/-}-Mäusen, verglichen mit Wildtyp-Mäusen, beobachtete [159]. Außerdem sind PAR4-defiziente Mäuse vor Bildung von stabilen, thrombozytenreichen, okklusiven Thromben nach elektrolytisch induzierter vaskulärer Verletzung der Halsschlagader geschützt [160].

Eine Studie bewies eine schützende Wirkung des PAR4-defizienten Phänotyps im Rahmen eines Acetoaminophen-induzierten Leberschadens [161]. In einem Streptozotocin-induzierten Mausmodell des Typ-1-Diabetes mellitus waren PAR4-defiziente Mäuse gegen eine verstärkte neointimale Hyperplasie nach Ligatur der *Arteria carotis* geschützt [149]. Eigene Arbeiten konnten belegen, dass die PAR4-Expression in Gegenwart einer hohen Glukosekonzentration erhöht ist. Dies wurde in kardialen Fibroblasten, welche in niedrigen und hohen Glukosekonzentrationen gehalten wurden, und in Mäusen festgestellt, welche mit einer hochkalorischen Diät gefüttert wurden. In beiden Fällen wiesen die Zellen eine erhöhte PAR4-Expression unter hoher Glukosekonzentration auf [162]. Dies lässt vermuten, dass PAR4 eine Rolle in der Glukosehomöostase spielt. Wird diese wie bei einer Insulinresistenz, einer Fettgewebsentzündung oder einer NAFLD gestört, könnte eine Deregulation der PAR4-Expression weitere Hinweise auf das Zusammenspiel zwischen Entzündung und der Kommunikation zwischen Leber und Fettgewebe geben.

Aufgrund der beschriebenen Beteiligung des PAR4 an physiologischen und pathophysiologischen Geschehen, steht der PAR4 aktuell im Fokus der pharmakologischen Intervention. In erster Linie sollen Substanzen, die eine Hemmung von PAR4 bewirken, als neue Antikoagulanzen bei thrombotischen Ereignissen eingesetzt werden. Die dadurch gehemmten gerinnungsunabhängigen Effekte von PAR4 werden dadurch beeinflusst und werden neben der Beeinflussung der Gerinnung sowohl in Mausmodellen als auch bereits in klinischen Studien im Patienten untersucht [163, 164].

1.4 Ziel dieser Arbeit

Wie zuvor erwähnt, nehmen die Prävalenzen der Fettlebererkrankung und Insulinresistenz in den nächsten Jahren zu. Die Folgeerkrankungen wie Zirrhose, Leberzellkarzinom und die eingangs beschriebenen Folgen einer Insulinresistenz treten vermehrt auf. Diese Arbeit beschäftigt sich daher mit der Kommunikation zwischen Leber- und Fettgewebe in der Entwicklung einer NAFLE und Insulinresistenz und dem Einfluss des PAR4 in dieser Entwicklung. Dieser Rezeptor wird von Thrombin und Cathepsin G aktiviert. Thrombin ist hauptsächlich verantwortlich für die Gerinnungsaktivierung, wobei sich diese Arbeit vor allem mit der gerinnungsunabhängigen Aktivierung von PAR4 befasst. Maßgeblich für diese Arbeit war die Entdeckung, dass der PAR4 als eine Art Sensor für eine Umgebung beschrieben wurde, die eine hohe Glukosekonzentration aufweist [162]. Darüber hinaus wiesen diabetische Probanden im Gegensatz zu Nicht-diabetischen Probanden eine erhöhte PAR4-Expression auf [149]. Daher wird vermutet, dass PAR4 eine besondere Rolle in der Entwicklung einer Insulinresistenz und Fettgewebesentzündung spielt und so auch einen Einfluss in der Entwicklung einer Fettlebererkrankung hat.

Mit der vorliegenden Arbeit sollen der Einfluss des PAR4 auf die Entwicklung einer NAFLE und einer Insulinresistenz in einem Mausmodell untersucht werden. Im Zuge dessen stehen die davon besonders betroffenen Organe, wie Leber, weißes und braunes Fettgewebe und Serum, im Fokus der Untersuchung. Ebenso werden mit dieser Arbeit mögliche Nebenwirkungen einer pharmakologischen PAR4-Inhibierung aufgedeckt, die für den Einsatz neuer Antikoagulantien von Bedeutung sind.

Folgende Fragestellungen sollen mit der vorliegenden Arbeit beantwortet werden:

- Einfluss des PAR4 auf die fütterungsinduzierte Gewichtsentwicklung des Körpergewichts und betroffener Organe sowie auf die Entwicklung einer Insulinresistenz.

- Einfluss des PAR4 auf die Veränderung der Serumparameter der Leber sowie von Chemokinen und Zytokinen während einer hochkalorischen Fettfütterung.

- Einfluss des PAR4 auf die Zusammensetzung der Immunzellpopulation der Leber, auf die Leberlipideinlagerung sowie auf die Fibroseentwicklung der Leber im Laufe einer hochkalorischen Fettfütterung.

- Einfluss des PAR4 auf die Makrophagenrekrutierung in das weiße und braune Fettgewebe während einer hochkalorischen Fettfütterung.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Versuchstiere

wt C57Bl/6J	Wildtyp-Mäuse, männlich, 8 Wochen alt (Janvier Labs, Le Genest St. Isle, Frankreich)
PAR4 ^{-/-} C57Bl/6J	PAR4-defiziente Mäuse, männlich, 8 Wochen alt (zur Verfügung gestellt von Prof. Rauch, Universitätsklinikum Greifswald)

In der zentralen Einrichtung für Tierforschung und Tierschutzaufgaben der Universität Düsseldorf (ZETT) erfolgte die Zucht der Versuchstiere unter spezifisch-pathogen freien Bedingungen, der Versuch wurde in offener Haltung durchgeführt. Die Mäuse bekamen Standardfutter (SF) oder hochkalorisches Fettfutter (HFF) (beides ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) und Trinkwasser *ad libitum*. Der Tag-Nacht-Rhythmus betrug 12h/12h, die Temperatur 22 °C und die relative Luftfeuchtigkeit 50 %. Alle tierexperimentellen Arbeiten wurden durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV) genehmigt und entsprechend des Tierschutzgesetzes unter folgenden Aktenzeichen durchgeführt: Az.84-02.04.2012.A366 und Az.81-02.04.2017.A406.

2.1.2 Chemikalien

Agarose Biozym LE	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Dtld.
Calciumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Dtld.
Chloroform	Merck KGaA, Darmstadt, Dtld.
D(+)-Glucose	Merck KGaA, Darmstadt, Dtld.
Dulbecco's MEM FG 0415	Merck KGaA, Darmstadt, Dtld.
Ethanol absolut	VWR, Darmstadt, Dtld.
FCS	Gibco Life Technology, Karlsruhe, Dtld.
Roti-Histofix 4 % Formaldehyd	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Dtld.
Glycerol	Merck KGaA, Darmstadt, Dtld.
GoTaq [®] qPCR Master Mix, 2x	Promega, Madison, WI, USA

Material und Methoden

Hämatoxylin nach Mayer	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Dtld.
Hämatoxylin nach Weigert, Lösung A und B	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Dtld.
Insuman [®] Rapid, humanes Insulin 40 IE/ml	Sanofi, Paris, Frankreich
Isopropanol	VWR, Darmstadt, Dtld.
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Dtld.
Ketavet [®] 100 mg/ml	Pfizer, New York, USA
Kollagenase CLSII	Biochrom, Berlin, Dtld.
Leucoperm [®]	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Dtld.
Natriumchlorid	VWR, Darmstadt, Dtld.
Rompun [®] 2 %	Bayer Healthcare, Leverkusen, Dtld.
Mowiol 40-88	Merck KGaA, Darmstadt, Dtld.
0,9 % NaCl-Lösung	Braun, Melsungen, Dtld.
Natriumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt, Dtld.
Nuklease-freies Wasser	Promega, Madison, WI, USA
Ölrot O	Merck KGaA, Darmstadt, Dtld.
PBS (w/o Ca ²⁺ , w/o Mg ²⁺)	Biochrom, Berlin, Dtld.
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Invitrogen, Carlsbad, Dtld.
Qiazol Lysis Reagent	Qiagen, Hilden, Dtld.
Tissue-tek O.C.T. Compound	Sakura, Japan, Dtld.
Xylol	Merck KGaA, Darmstadt, Dtld.

2.1.3 Antikörper

Tabelle 2: Verwendete Antikörper

Antigen (Methode)	Konjugat	Klon	Hersteller
CD11b (FACS)	PE	M1/70	eBioscience
CD11c (FACS)	PE	N418	eBioscience
CD14 (FACS)	PE	Sa2-8	eBioscience
CD163 (FACS)	unmarkiert	2F8	Dianova
CD206 (FACS)	FITC	MR5D3	AbD Serotec
CD68 (FACS)	FITC	FA-11	Thermo Scientific
F4-80 (FACS)	APC	BM8	eBioscience
Ly6G (FACS)	APC	RB6-8C5	eBioscience
MHCII (FACS)	PE	M5/114.15.2	eBioscience
TLR4 (FACS)	FITC	76B357.1	Abcam
Mac2 (Galectin-3) (IHC)	unmarkiert	M3/38	cedarlane
Ziege anti-Ratte Sek AK	HRP	polyklonal	Novus Biologicals
Esel anti-Ziege Sek AK	Cy3	polyklonal	R&D Systems

2.1.4 Kits

QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden, Dtl.
RedExtract-N-Amp TM Tissue PCR-Kit	Merck KGaA, Darmstadt, Dtl.
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Dtl.
Ultra Sensitive Mouse Insulin ELISA Kit	Crystal Chem
Procarta 10-Plex, Multiplex	Thermo Fisher
Procarta 2-Plex, Multiplex	Thermo Fisher
Teststreifen Klinische Chemie Liver I	arkay, Japan
Teststreifen Klinische Chemie Kenshin	arkay, Japan

2.1.5 Verbrauchsmaterial

Abboath	Venisystems Hospira, München, Dtld.
Feather Disposable Scalpel	Feather Safety Razor Co, Osaka, Japan
Kryo-Reaktionsgefäße	Thermo Scientific, Roskilde, Denmark
Kulturschalen, 10 cm	Corning, Durham, USA
Objektträger Engelbrecht	Engelbrecht Medizin- & Labortechnik, Edermünde, Dtld.
Objektträger Marienfeld	Paul Marienfeld GmbH & Co KG, Lauda-Königshofen, Dtld.
Parafilm	Bemis, Neenah, WI, USA
Reaktionsgefäße 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Dtld.
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf, Hamburg, Dtld.
0,2 ml 8-Streifen PCR-Reaktionsgefäß	Starlab International GmbH, Hamburg, Dtld.
Schlauchpumpe	Ismatec Laboratoriumstechnik GmbH, Wertheim-Mondfeld, Dtld.
Spritzen für Kanülen	B. Braun. Melsungen , Dtld.
Sterican-Kanüle 23G	B. Braun, Melsungen, Dtld.
Sterilfilter (0,2 µm)	Sarstedt, Nürnberg, Dtld.
Stripetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	Corning, Durham, USA
Zellkulturflasche 75 cm ²	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Dtld.
Zellsieb (70 µm)	Greiner, Frickenhausen, Dtld.

2.1.6 Oligonukleotide für Genotypisierung

Tabelle 5: Verwendete Primer für die PAR4-Genotypisierung

Gen	Orientierung	Sequenz [5'-3']
GT mPAR4 r	Reverse	AGCACATGCTGCCAGGATCAG
GT mPAR4 f	Forward	GGGGATGTTGTGGAGATTTG
GT mPAR4 lacZ r	Reverse	ATTCAGGCTGCGCAACTGTTGG

2.1.7 Oligonukleotide

Die unten aufgeführten Oligonukleotide zur Expressionsanalyse mittels quantitativer real time-PCR wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Dtl.) generiert.

Tabelle 6: Eingesetzte Primer für die quantitative PCR

Gen	Orientierung	Sequenz [5'-3']
SDHA	Forward Reverse	TGGGGAGTGCCGTGGTGTCA GTGCCGTCCCCTGTGCTGGT
Interleukin-6 (IL-6)	Forward Reverse	GTTGCCTTCTTGGGACTGAT CAGGTCTGTTGGGAGTGGTA
Interleukin-10 (IL-10)	Forward Reverse	CCAAGCCTTATCGGAAATGA TCCTGAGGGTCTTCAGCTTC
Tumornekrosefaktor- α (TNF- α)	Forward Reverse	GCTGAGCTCAAACCCTGGTA CGGACTCCGCAAAGTCTAAG
Interferon- β (IFN- β)	Forward Reverse	CCCTATGGAGATGACGGAGA ACCCAGTGCTGGAGAAATTG
CXCL2 (MIP-2 α)	Forward Reverse	GCCAAGGGTTGACTTCAAGA GCCCTTGAGAGTGGCTATGA
CCL2 (MCP-1)	Forward Reverse	GGCTGGAGAGCTACAAGAGG ATGTCTGGACCCATTCCTTC
SOCS3	Forward Reverse	GCTCCAAAAGCGAGTACCAGC AGTAGAATCCGCTCTCCTGCAG
PAR4	Forward Reverse	GTACGCGCTATGTTGTGTCTG CCAGTCACAGAAGTGTAGAG

2.1.8 Puffer und Färbelösungen

Blockierungslösung für Immunhistochemie	10 % 10x TBS-Puffer 10 % FCS 1 % BSA
FACS-Puffer	PBS (w/o Ca ²⁺ , w/o Mg ²⁺) 2 % FCS
Hanks-Puffer	137 mM NaCl 5 mM KCl 15 mM Hepes 0,34 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O 0,44 mM KH ₂ PO ₄ <i>Ad aqua bidest</i> auf 1 L pH-Wert auf 7,4 einstellen,

	autoklavieren
1 % HCl-Lösung	96,3 ml 70 % Ethanolösung 3,7 ml 37 % Salzsäurelösung
Ölrot O Stocklösung	0,5 g Ölrot O 100 ml Isopropanol ca. 30 min bei 120 °C lösen
Ölrot O Gebrauchslösung	30 ml Stocklösung 20 ml destilliertes Wasser 10 min stehen lassen Filtrieren durch Faltenfilter
Perfusionspuffer	HANKS-Puffer 0,3 mg/ml Kollagenase 5 mM CaCl ₂
phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	140 mM NaCl 2,7 mM KCl 6,5 mM Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O 1,5 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4 mit NaOH
Reagent G (wässriges Eindeckmedium)	6 g Glycerol 2,4 g Mowiol 40-88 für 1 Stunde bei Raumtemperatur mischen 6 ml destilliertes Wasser hinzufügen für 2 Stunden bei Raumtemperatur mischen 12 ml 0,2M Tris/HCl pH 8,5 Inkubation über Nacht bei 4 °C Inkubation für 30 Minuten bei 50 °C Zentrifugieren bei 4000 rpm für 30 Minuten Überstand aliquotieren

	bei -20 °C lagern
Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer)	40 mM TRIS 0,001 % (v/v) Eisessig 1 mM EDTA pH 8,0
TB-Puffer	0,05 M Tris, pH 7,6
TBS-Puffer (10x)	200 mM Tris 1,37 M NaCl pH bei 7,6 einstellen

2.1.9 Geräte

Accu Chek mobile Glukosemessgerät	Roche
FACS Canto II	BD Bioscience, San Diego, USA
Gelkammer	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Dtld.
Kolbenhubpipetten 1000 µl, 100 µl, 10 µl	Eppendorf, Hamburg, Dtld.
Kryotom Cryostat Leica CM 3050S,	Leica ,Wetzlar, Dtld.
Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg, Dtld.
Mikroskop Zeiss Axio	Carl Zeiss, Jena, Dtld.
Mikrotom Leica Jung RM 2055	Leica, Wetzlar, Dtld.
Mikrowelle	Bosch, Stuttgart, Dtld.
Multiplex	Luminex 200, USA
NanoDrop 1000	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Dtld.
pH-Meter	WTW, Weilheim
Spotchem Messgerät	akray, Japan
Sterilbank Hera Safe KS	Thermo Scientific, Schwerte, Dtld.
UV-Kammer Vilber Lourmat	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Dtld.
ViiA7 real time-PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt, Dtld.
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Waage 440-49N	Kern, Balingen, Dtld.
Wasserbad TW 20	Julabo, Seelbach

Zentrifuge GS-15 R	Beckman Coulter, Krefeld
Zentrifuge 5424 R	Eppendorf, Hamburg, Dtl.
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg, Dtl.

2.2 Methoden

2.2.1 Tierexperimente

2.2.1.1 Fütterungsschema der Mäuse

Den zu untersuchenden Mäusen wurde bis zu einem Maximum von 30 Wochen hochkalorisches Fettfutter (HFF) verabreicht (Fütterungsschema siehe Abbildung 2), bei der 60 % der Kalorien aus Fett bestehen (Zusammensetzung siehe Tabelle 9). Gleich alten Kontrollmäusen wurde das Standardhaltungsfutter der ZETT (SF) angeboten (Zusammensetzung siehe Tabelle 9). Für die Überwachung der hochkalorischen Fettfütterung wurden die Mäuse wöchentlich gewogen und der prozentuale Anteil der Mager- und Fettmasse durch eine nukleare Magnetresonanz-Analyse (NMR) überprüft. Metabolische Veränderungen wurden durch orale Glukosetoleranz- und intraperitoneale Insulin-Sensitivitätstests analysiert.

Tabelle 9: Zusammensetzung des hochkalorischen Fettfutters und des Kontrollfutters

Hochkalorisches Fettfutter (HFF)		Standardfutter (SF)	
Inhaltsstoff	Gramm [%]	Inhaltsstoff	Gramm [%]
Casein	22,8	Trockensubstanz	87,7
Maltodextrin	12	Rohprotein	19
Saccharose	24,02	Rohfett	3,3
Schweineschmalz	35,85	Rohfaser	4,9
Mineralien-Mix	4	Rohasche	6,4
Vitamin-Mix	1	N-freie Extraktstoffe	54,1
Cholinchlorid	0,13	Stärke	36,5
DL-Methionin	0,2	Zucker	4,7
	kcal [%]		kcal [%]
Kohlenhydrate	26		58
Protein	15		33
Fett	59		9

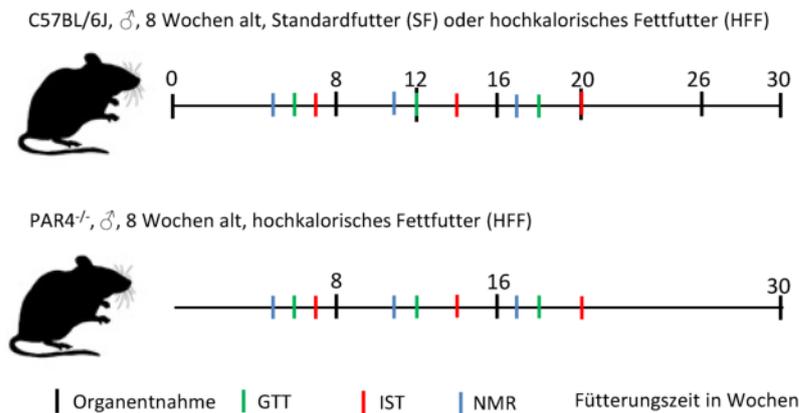


Abbildung 2: Fütterungsschema mit hochkalorischem Fettfutter (HFF) und Standardfutter (SF)

Männliche Wildtyp-Mäuse des Stammes C57Bl/6J erhielten über einen Zeitraum von bis zu 30 Wochen Standardfutter oder hochkalorisches Fettfutter. Nach 0, 8, 12, 16, 20, 26 und 30 Wochen wurden Proben entnommen. Männliche PAR4-defiziente Mäuse wurde über einen Zeitraum von bis zu 30 Wochen mit hochkalorischem Fettfutter gefüttert. Nach 8, 16 und 30 Wochen wurden Proben entnommen. Nach 6, 12 und 18 Wochen nach Fütterungsbeginn wurden orale Glukosetoleranztests durchgeführt, nach 7, 14 und 20 Wochen nach Fütterungsbeginn wurden Insulinsensitivitätstest durchgeführt. Nach 5, 11 und 17 Wochen nach Fütterungsbeginn wurde die Fettmasse mittels NMR-Messung analysiert.

2.2.1.2 NMR-Messung

Die Zunahme der Fettmasse während der Fütterung wurde mit Hilfe des minispec NMR analyzer (Bruker Corporation, Billerica, MA, USA) zu den Zeitpunkten 5, 11 und 17 Wochen nach Fütterungsbeginn überwacht. Die Ermittlung des Körperfettanteils wurde durch Division der Fettgewebsmasse durch das Gesamtgewicht berechnet.

2.2.1.3 Glukose- und Insulintoleranztest

Zur Überwachung des Glukosestoffwechsels wurden Glukosetoleranz- (GTT) und Insulinsensitivitätstest (IST) zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt. Zu Beginn des Tests wurde den Mäusen für 6 Stunden das Futter entzogen und anschließend die basale Blutglukosekonzentration gemessen. Danach erhielten die Mäuse eine Dosis von 1 g/kg KG Glukose *per os* oder 0,75 U/kg KG Insulin intraperitoneal. Nach 5 (nur poGTT), 15, 30, 60 und 120 Minuten wurde erneut die Blutglukosekonzentration gemessen. Der Blutstropfen für die Messung wurde durch einmaliges Anschneiden der Schwanzspitze gewonnen. Für die Messung wurde das Accu-Chek Mobile Blutzuckermessgerät (Roche Diagnostics, Mannheim) in Einfachbestimmung verwendet. Für die Quantifizierung der metabolischen Toleranz wurden die absoluten Werte nach der Zeit aufgetragen und die AUC ("area under the curve") als Maß der Elimination des Wirkstoffes aus dem Blut berechnet.

2.2.2 PAR4-Genotypisierung

Die Genotypisierung der PAR4-defizienten Mäuse erfolgte mit Schwanzspitzen-Biopsien und dem RedExtract-N-Amp Tissue PCR-Kit. Zunächst wurde die genomische DNA isoliert. Dafür wurden pro Biopsie 100 µl Extraction solution mit 25 µl Tissue Preparation Solution gemischt und zur Biopsie pipettiert. Die Lösung wurde gemischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zwischendurch wurde noch zweimal gemischt. Der Verdau wurde bei 95 °C für 3 Minuten gestoppt und 100 µl Neutralization Solution B zu jeder Probe gegeben. Die Volumina der Reaktionsbestandteile sind in Tabelle 10 aufgeführt. Die Proben wurden gemischt und 2 Minuten bei 16360 xg bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für die nachfolgende PCR eingesetzt. Das PCR-Programm ist in Tabelle 11 beschrieben.

Die fertigen PCR-Produkte wurden anschließend auf ein 1,5 % Agarose-TAE-Gel aufgetragen und mit 120 Volt für 50 Minuten aufgetrennt. Die Wildtyp-Bande besitzt eine Größe von 350 bp, während das veränderte PAR4-Gen eine Größe von 510 bp aufweist.

Tabelle 10: PCR-Reaktionsansatz

Reagenz	Volumen [µl]
H ₂ O	3
RedExtract-N-Amp PCR Reaction Mix	10
GT mPar4 r [10 µM]	1
GT mPar4 f [10 µM]	1
GT mPar4 lacZ r [10 µM]	1
genomische DNA	4

Tabelle 11: PCR-Programm

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	120	1
Denaturierung	95	90	40
Primerbindung	60	45	
Elongation	72	30	
Finale Elongation	72	300	1

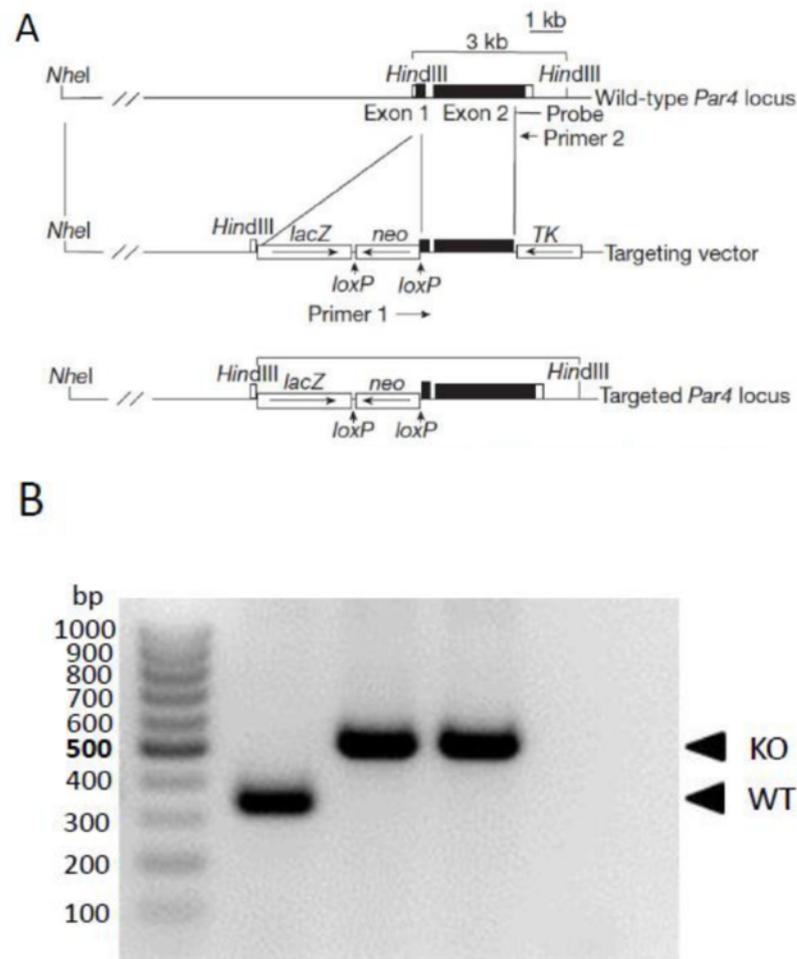


Abbildung 3: **A** Nachweis des Einsatzes des lacZ-Gens in das Par4-Gen, modifiziert nach [157]. **B** Gelelektrophorese des PCR-Produkts der PAR4-Genotypisierung.

2.2.3 Organisierung

Den zu untersuchenden Mäusen wurde für 6 Stunden das Futter entzogen, da neben den Organen auch Serumparameter untersucht wurden. Die Mäuse wurden mit 10 mg/100 g KG Ketamin (Ketavet[®]) und 0,5 mg/100 g KG Xylazin (Rompun[®]) in 0,9 % Natriumchlorid-Lösung narkotisiert. Sobald der Zwischenzehenreflex ausgeschaltet war, wurden die Mäuse fixiert, das Abdomen geöffnet und die Leber, die Pfortader und die *Vena cava inferior* freigelegt. Mit einer Kanüle wurden über die *Vena cava inferior* mindestens 500 µl Blut entnommen. Nachdem die Pfortader angeschnitten worden war, wurde eine Kanüle eingeführt, die an ein Schlauchsystem angeschlossen war. Über dieses Schlauchsystem wurde kalte PBS-Lösung durch die Leber gepumpt (8 ml/min), um das Blut über die geöffnete *Vena cava inferior* abfließen zu lassen. Nach ca. einer Minute wurde die Perfusion gestoppt und die Leber entnommen. Überschüssiges Ge-

webe wurde entfernt und die gewogene Leber in vier Lappen geteilt. Ein Teil des linken Leberlappens wurde in 4 % Formaldehyd und anschließend in Paraffin fixiert. Die anderen Leberlappen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Das epididymale Fettgewebe wurde ebenfalls zum Teil in flüssigem Stickstoff eingefroren oder in 4 % Formaldehyd fixiert. Das interskapuläre braune Fettgewebe wurde ebenfalls herauspräpariert, von weißem Fettgewebe befreit und in flüssigem Stickstoff eingefroren oder in 4 % Formaldehyd fixiert.

2.2.4 Gewinnung von Serum

Das entnommene Blut wurde bei Raumtemperatur für 30 Minuten koaguliert und anschließend für 10 Minuten bei 9390 xg bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Serum wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und nochmals zentrifugiert. Das Serum wurde wiederum in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingefroren.

2.2.5 RNA-Isolierung aus Lebergewebe

Die RNA-Isolierung erfolgte nach Herstellerangaben mit dem QIAGEN *RNeasy Mini Kit*. Dafür wurde ein kleines Stück des bei -80 °C gefrorenen rechten Leberlappens verwendet. Dieses wurde in 600 µl RLT-Puffer mithilfe eines Stößels homogenisiert. Die Probe wurde anschließend bei 16360 xg für 2 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, in welchem 600 µl 70 % Ethanol vorgelegt wurde. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren wurden die Lösungen vermischt und direkt ein Teil auf eine Säule des Herstellers gegeben. Die Säule wurde bei 16360 xg für mindestens 15 Sekunden zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und der 2. Teil des Homogenats wurde auf die Säule pipettiert, wonach eine weitere Zentrifugation analog zur Ersten erfolgte. Die Säule wurde mit 700 µl RW1-Puffer gewaschen (Zentrifugation bei 16360 xg für mindestens 15 Sekunden) und der Durchfluss verworfen. Anschließend erfolgten zwei weitere Waschschrte mit RPE-Puffer (je 500 µl). Beim zweiten Mal wurde 2 Minuten zentrifugiert. Die Säule wurde in ein sauberes Auffangröhrchen gesetzt und erneut 1 Minute bei 16360 xg trocken zentrifugiert. Die RNA wurde mit 40 µl RNase-freiem Wasser von der Säule in ein neues Reaktionsgefäß eluiert (16360 xg für 1 min). Alle Schritte erfolgten bei Raumtemperatur. Die isolierte RNA wurde anschließend mittels NanoDrop 1000 spektralphotometrisch auf Reinheit und Konzentration untersucht.

2.2.6 RNA-Isolierung aus Fettgewebe

Die Isolierung der RNA aus epididymalem weißem Fettgewebe und interskapulärem braunem Fettgewebe erfolgte mit der Trizol-Methode. Dazu wurde ein Teil des mit flüssigem Stickstoff eingefrorenen Organs in 1 ml *Qiazol Reagent* gelegt und mit einem Stößel homogenisiert, bis keine Gewebestücke mehr sichtbar waren. Nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben bei 12000 xg für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, in dem 200 µl Chloroform vorgelegt waren. Beide Phasen wurden gut gemischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Phasentrennung erfolgte anschließend bei 16360 xg für 15 Minuten bei 4 °C. Die obere wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen und mit 400 µl Isopropanol in einem neuen Reaktionsgefäß gemischt. Die RNA-Fällung erfolgte über Nacht bei 4 °C. Die Proben wurden bei 16360 xg für 45 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Das Isopropanol wurde vorsichtig abgenommen und die RNA mit 1 ml 75 % Ethanol gewaschen. Anschließend erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 16360 xg für 30 Minuten bei 4 °C. Das Ethanol wurde vorsichtig abgenommen und die RNA im offenen Reaktionsgefäß für 5 Minuten bei 37 °C getrocknet. Die RNA wurde in 20 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen und bei 65 °C für 5 Minuten gelöst. Die Konzentration der RNA wurde mit Hilfe des NanoDrop 1000 gemessen und für die cDNA-Synthese eingesetzt.

2.2.7 cDNA-Synthese durch Reverse Transkription der RNA

Für die quantitative PCR-Analyse muss die, wie unter Punkt 2.2.5 bzw. unter Punkt 2.2.6 beschrieben, isolierte RNA in cDNA umgeschrieben werden. Dies erfolgte mit Hilfe des *QuantiTect Reverse Transcription Kits* von Qiagen nach Angaben des Herstellers. Pro Probe wurden 1000 ng RNA in cDNA umgeschrieben. Die in 12 µl RNase-freiem Wasser verdünnte RNA wurde mit 2 µl des gDNA wipeout Reagent für 2 Minuten bei 42 °C inkubiert. Anschließend wurden pro Probe 4 µl RT-Puffer, 1 µl Primer Mix und 1 µl Reverse Transkriptase hinzu pipettiert. Die cDNA-Synthese erfolgte bei 42 °C für 30 Minuten. Die Reaktion wurde gestoppt, indem die Proben für 3 Minuten bei 95 °C erhitzt wurden. Die so gewonnene cDNA wurde mit dem fünffachen Volumen des RNase-freien Wassers verdünnt und in der nachfolgenden quantitativen PCR eingesetzt.

2.2.8 Quantitative Echtzeit-PCR

Mit Hilfe der Real-Time PCR-Technik kann die RNA-Expression von Genen zu verschiedenen Zeitpunkten quantitativ analysiert werden. Damit ist es möglich, die Regulierung von Genen während eines Experiments zu verfolgen. Dies ermöglicht der Einbau eines interkalierenden Farbstoffes während der PCR, in diesem Fall wurde SYBR Green verwendet. Durch die Amplifikation des PCR-Produktes kommt es zu einer Zunahme des Fluoreszenzsignals während der PCR, das direkt verfolgt werden kann. Ab einem bestimmten Wert, dem Ct-Wert, steigt das Fluoreszenzsignal exponentiell an. Dieser Wert wird anschließend zum Vergleich der Proben herangezogen. Für den Ansatz einer quantitativen PCR (qPCR) wurden 1,2 µl cDNA (10 ng/l), 12,5 µl SYBR Green PCR Mastermix (Promega), 9,3 µl Nuklease-freies Wasser und je 1 µl des entsprechenden Forward- und Reverse-Primers (10 pmol/l) eingesetzt. Die Analyse erfolgte am ViiA7 Real Time System in 96-Loch-Mikrotiterplatten. Folgendes Programm wurde für die qPCR verwendet:

Tabelle 12: qPCR-Programm

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Zyklen
	50	120	1
Initiale Denaturierung	95	600	1
Denaturierung	95	15	
Primerbindung und Elongation	60	60	40

Anschließend wurde über eine Schmelzkurven-Analyse überprüft, ob das richtige PCR-Produkt gebildet wurde. Dafür wurden die Proben 15 Sekunden bei 95 °C denaturiert, dann auf 60 °C für eine Minute für die Primerbindung und Elongation erhitzt. Anschließend erfolgte eine Temperaturerhöhung bis 95 °C für 15 Sekunden in 0,05 °C/sec-Schritten. Bei jedem Temperaturschritt wurde das Fluoreszenzsignal analysiert. Bei einer spezifischen Temperatur fällt das Fluoreszenzsignal rapide ab, da der Farbstoff nicht mehr binden kann, da das PCR-Produkt getrennt wird. Diese Temperatur ist dann die spezifische Schmelztemperatur des PCR-Produkts. Die Temperatur ist dabei abhängig von der Länge des PCR-Produktes und somit spezifisch für jedes analysierte Gen. Für die Auswertung wurden die Ct-Werte der einzelnen gemessenen Gene von dem Ct-Wert eines Referenzgens abgezogen. In diesem Fall wurden als Referenzgen SDHA (Succinat-Dehydrogenase-Komplex, Untereinheit A) verwendet. Die relative Expression wurde aus dem potenzierten negativen Δ Ct-Wert berechnet (Δ Ct-Methode nach [165]).

2.2.9 Histologie

Die in 4 % Formaldehyd fixierten Leberproben wurden über Nacht entwässert und in Paraffin eingebettet. Am Mikrotom wurden 5 µm dicke Schnitte angefertigt (Leica Jung RM 2055). Anschließend wurden die Schnitte über Nacht bei 37 °C fixiert und bei Raumtemperatur bis zur Färbung gelagert. Die Deparaffinisierung erfolgte kurz vor der Färbung. Dazu wurden die Schnitte dreimal für je 15 Minuten in Xylol getaucht. Anschließend erfolgte die Wässerung mit einer absteigenden Alkoholreihe: 2 Minuten 100 % Ethanol, 2 Minuten 95 % Ethanol, 2 Minuten 70 % Ethanol. Die Schnitte wurden vollständig mit destilliertem Wasser 2 Minuten gewässert und anschließend mit H&E, Pikro-Sirius Red oder mit Mac2-Antikörpern gefärbt bzw. markiert.

Das epididymale weiße Fettgewebe wurde analog zu den Leberproben in Paraffin eingebettet. Die Anfertigung der Schnitte erfolgte nach folgendem Schema: Die Proben des weißen Fettgewebes wurden so angeschnitten, dass ein vollständiger 5 µm dicker Schnitt aufgenommen werden konnte. Danach wurde 300 µm tiefer der nächste Gewebeschnitt vorgenommen. Anschließend erfolgte der letzte Schnitt weitere 300 µm tiefer im Gewebe. Als Ergebnis wurden Objektträger generiert, die jeweils drei Tiefen eines Organs einschlossen. Bei einigen Proben waren drei Schnitte nebeneinander zu breit für einen Objektträger. Von diesen Proben wurden 2 Schnitte in einem Abstand von 500 µm auf Objektträger aufgezogen. Das braune Fettgewebe wurde wie die Leberproben so angeschnitten, dass das komplette Organ freigelegt wurde und davon Schnitte auf Objektträger aufgezogen werden konnten.

Für die Ölrot O Färbung wurde ein Teil des rechten Leberlappens als Gefrierschnitt am Kryotom geschnitten. Dazu wurden die Gewebestücke im Kryotom bei -20 °C mit O.C.T. Medium auf den Objekthalter geklebt. Nachdem das O.C.T. Medium ausgehärtet war, wurden 8 µm dicke Schnitte auf Objektträger aufgezogen. Die Schnitte wurden für 30 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und entweder bei -20 °C gelagert oder direkt für die Ölrot O Färbung verwendet.

2.2.9.1 Mac2-Färbung

Nach der Wässerung wurden die Schnitte dreimal je 5 Minuten mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Blockierung unspezifischer Bindestellen für 1 Stunde mit TBS-Puffer, der 10 % FCS und 1 % BSA enthielt. Der Primärantikörper Mac-2 wurde 1:600 in PBS, welches 1 % BSA enthielt, verdünnt. Die Flüssigkeit rund um den Gewebeschnitt wurde entfernt und der Bereich mit einem Fettstift markiert. Je Gewebeschnitt wurden je nach Größe 35-40 µl der Antikörperverdünnung aufgetragen. Die

Inkubation erfolgte im Dunkeln über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer. Der Primärantikörper wurde dreimal je 5 Minuten mit PBS entfernt.

Um eine endogene Peroxidase-Reaktion zu verhindern, wurden die Schnitte mit Wasserstoffperoxid-Lösung behandelt. Dafür wurde eine 3 % H₂O₂-Lösung in PBS hergestellt und die Schnitte 5 Minuten inkubiert. Anschließend wurde das Wasserstoffperoxid dreimal je 5 Minuten mit PBS gewaschen. Der Sekundärantikörper (anti-rat IgG2a HRP) wurde 1:600 in PBS verdünnt und analog zum Primärantikörper auf die Gewebeschnitte aufgetragen. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln bei Raumtemperatur für 1 Stunde in einer feuchten Kammer. Der Sekundärantikörper wurde dreimal je 5 Minuten mit PBS entfernt. Die Detektion erfolgte mit DAB-Reagenz, welches durch die am Sekundärantikörper gebundene HRP zu einem braunen unlöslichen Farbstoff umgesetzt wurde.

Dazu wurden die Schnitte zunächst 10 Minuten mit TB-Lösung behandelt, bevor für exakt 120 Sekunden das DAB-Reagenz aufgetragen wurde. Nach erfolgter Reaktion wurden die Schnitte für 5 Minuten mit TB-Lösung und anschließend 1 Minute mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Kernfärbung erfolgte mit Hämatoxylin-Lösung nach Mayer für 1 Minute. Überschüssiger Farbstoff wurde mit Leitungswasser abgewaschen, bevor die Färbung mit 1 % HCl-Lösung in 70 % Ethanol für 10 Sekunden differenziert wurde. Zum Bläuen wurden die Schnitte für 10 Minuten unter fließendes Leitungswasser gestellt. Danach wurden die Schnitte 1 Minute mit destilliertem Wasser gewaschen. Für die Konservierung wurden die Schnitte mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (2 Minuten 70 % Ethanol, 2 Minuten 95 % Ethanol, 2 Minuten 100 % Ethanol) und Xylol für 5 Minuten behandelt. Die Schnitte wurden mit Deckgläsern und dem VectaMount Permanent Mounting Medium versiegelt.

Für die Auswertung des epididymalen weißen Fettgewebes wurden aus 6 zufällig ausgewählten Bildausschnitten die Anzahl der CLS ("Crown-like structure") bestimmt und auf die Anzahl der Adipozyten bezogen. Die Anzahl der Adipozyten wurde bestimmt, indem pro Bild die Fläche von 10 Adipozyten gemessen und für jedes Tier ein mittlerer Wert für die durchschnittliche Adipozytenfläche ermittelt wurde. Dieser Wert wurde auf die Gesamtfläche bezogen und so die Anzahl der Adipozyten bestimmt. Analog erfolgte die Auswertung für die Leberschnitte, allerdings wurde hier die Anzahl der Mac2⁺-Zellen auf die mittlere Hepatozytenanzahl normiert.

2.2.9.2 Ölrot O Färbung

Die getrockneten Gefrierschnitte wurden eine Stunde in 4 % Formaldehyd fixiert und danach 10 Minuten mit fließendem Leitungswasser gewaschen. Die Schnitte wurden für 15 Sekunden mit 60 % Isopropanol gespült und anschließend für 15 Minuten mit der Ölrot-O-Gebrauchslösung gefärbt. Überschüssiger Farbstoff wurde mit 60 % Isopropanol entfernt. Die Kernfärbung erfolgte für 1 Minute mit Hämatoxylin-Lösung nach Mayer und dem abschließenden Abspülen mit destilliertem Wasser. Da eine aufsteigende Alkoholreihe das gefärbte Fett herauslösen würde, wurden die Schnitte mit wässrigem Reagent G und Deckgläsern versiegelt.

2.2.9.3 HE-Färbung

Die in destilliertem Wasser vollständig gewässerten Schnitte wurden 1 Minute in der Hämatoxylin-Färbelösung nach Mayer gefärbt. Überschüssiger Farbstoff wurde mit Leitungswasser abgespült. Anschließend wurden die Schnitte mit 1 % HCl-Lösung für 10 Sekunden differenziert. Danach erfolgte das Bläuen für 10 Minuten mit fließendem Leitungswasser. Die Gegenfärbung erfolgte für eine Minute mit Eosin-Lösung (1 %). Danach wurden die Schnitte entwässert, zunächst für 2 Minuten mit 70 % Ethanol. Danach wurden die Schnitte für 2 Minuten mit 96 % Ethanol und 1 Minuten mit absolutem Ethanol behandelt, bevor sie für 5 Minuten mit Xylol vollständig entwässert wurden. Anschließend wurden die Schnitte mit VectaMount Permanent Mounting Medium und Deckgläsern verschlossen.

2.2.9.4 Pikro-Sirius Red Färbung

Für die Pikro-Sirius Red Färbung wurden zunächst die Kerne der Gewebeschnitte nach der Wässerung mit Hämatoxylin-Lösung nach Weigert gefärbt. Für die Gebrauchslösung wurden Lösung A und Lösung B in einem Verhältnis von 1:1 vermischt. Die Kerne wurden mit Hilfe der Gebrauchslösung 8 Minuten gefärbt. Anschließend wurde der Farbstoff mit destilliertem Wasser für 10 Minuten entfernt. Nach 5 Minuten wurde das destillierte Wasser einmal gewechselt. Danach erfolgte der erste Schritt der Pikro-Sirius Red Färbung, indem die Schnitte für 2 Minuten mit Lösung A (0,2 % Phosphomolybdänsäure) behandelt wurden. Anschließend wurden die Schnitte mit destilliertem Wasser für 1-3 Minuten zweimal gewaschen. Der zweite Schritt der Färbung erfolgte in Lösung B (Pikro-Sirius Red Lösung) für 60 Minuten, an die sich die Differenzierung mit Lösung C (0,4 % HCl-Lösung) für 2 Minuten direkt anschloss. Die Schnitte wurden mit einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert (1 Minute 70 % Ethanol, 5 Minuten 90 % Ethanol, 5 Minuten 100 % Ethanol). Vollständig entwässert wurden die Schnitte für 5-10 Minuten mit Xylol und anschließend in VectaMount Permanent Mounting Medium und Deckgläsern verschlossen.

2.2.10 Identifikation von Zellpopulationen mittels FACS

Für die Analyse der unterschiedlichen Makrophagen-Populationen und zur Untersuchung von Veränderungen der neutrophilen Granulozyten wurden die nicht-parenchymalen Zellen von den parenchymalen Zellen der Leber getrennt und mit Hilfe der FACS-Technik untersucht. Die Gewinnung der nicht-parenchymalen Zellen erfolgte zum Ende des jeweiligen Fütterungszeitraums. Das verwendete Protokoll war angelehnt an die von Allen *et al.* beschriebene Vorgehensweise [166]. Die Mäuse wurden wie unter 2.2.3 angegeben, narkotisiert. Nach Ausbleiben des Zwischenzehenreflexes wurden die Mäuse auf dem Rücken fixiert und das Abdomen geöffnet. Durch zur Seite schieben des Darms wurden die Pfortader und die *Vena cava inferior* freigelegt.

Durch einen kleinen Einschnitt wurde die Pfortader geöffnet und eine Kanüle eingeführt. Die Kanüle war an ein Pumpensystem angeschlossen, welches Perfusionspuffer I mit 8 ml/min durch die Leber pumpte. Eine erfolgreiche Perfusion war an der sofortigen Farbveränderung der Leber zu erkennen. Um den Perfusionsdruck zu mindern, wurde anschließend die *Vena cava inferior* durchtrennt, so dass Blut und Puffer abfließen konnten. Nachdem ca. 45 ml Perfusionspuffer durch die Leber gelaufen waren, wurde über einen Dreiwegehahn Perfusionspuffer II in die Leber geleitet. Dieser enthielt Kollagenase, welche den Zellverband löste und die Gewinnung einer Einzelzellsuspension ermöglichte. Von dem Perfusionspuffer II wurden ca. 45 ml durch die Leber geleitet und die Perfusion beendet.

Die Leber wurde ohne Verletzung der Kapsel entfernt und in 10 ml kaltem DME-Medium bis zur weiteren Bearbeitung auf Eis gelagert. Die verdaute Leber wurde in 10 cm Schalen samt Medium überführt und mit zwei spitzen Pinzetten dissoziiert. Dabei wurden die Gewebestücke so weit verkleinert, dass sie mit einer 10 ml-Stripette aufgenommen werden konnten. Die nun gewonnene Zellsuspension wurde über ein 70 µm-Zellsieb in ein 50 ml-Reaktionsgefäß überführt. Dabei wurden noch vorhandene Gewebereste mehrmals mit frischem DME-Medium gemischt und durch mehrmaliges Pipettieren weiter zerkleinert, bis die Zellsuspension ein Volumen von ca. 50 ml aufwies. Das Reaktionsgefäß wurde vorsichtig invertiert und anschließend bei 54 xg und 4 °C für 2 Minuten zentrifugiert.

Der Überstand wurde vorsichtig in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und nochmals bei gleichen Bedingungen zentrifugiert. Dieser Schritt wurde noch zweimal wiederholt. Der Überstand wurde erneut in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und bei 300 xg und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Die oben schwimmende Fettschicht wur-

de zunächst abgesaugt, bevor der Überstand komplett bis zum Zellpellet abgesaugt wurde. Die Zellen wurden mit 50 ml DME-Medium resuspendiert und erneut dreimal bei 54 xg und 4 °C für 2 Minuten zentrifugiert, wobei jedes Mal der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt wurde. Anschließend wurde der Überstand bei 300 xg und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen wurden in 5 ml FACS-Puffer resuspendiert.

In FACS-Röhrchen wurde 1 ml FACS-Puffer vorgelegt und die Zellsuspension auf die zu messenden FACS-Röhrchen verteilt. Die Zellen wurden bei 405 xg und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die vorbereiteten, in FACS-Puffer verdünnten Antikörper wurden zu den Zellen gegeben und auf Eis im Dunkeln inkubiert. Die mit einem Fluorophor markierten Antikörper wurden für eine Stunde inkubiert. Für die Markierung von CD68 und CD206 mussten die Zellen vor der Färbung permeabilisiert werden. Dafür wurden die Zellen in 100 µl FACS-Puffer und 100 µl Reagent A des Leucoperm-Kits resuspendiert und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden je 3 ml FACS-Puffer hinzugegeben und erneut, wie oben beschrieben, zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Antikörper für CD68 und CD206 wurden in Reagent B des Leucoperm-Kits verdünnt und auf die zu färbenden Zellen gegeben. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur im Dunkeln für 30 Minuten.

Zellen, die mit einem nicht-markierten Antikörper gefärbt worden waren, wurden zunächst mit dem Primärantikörper für 30 Minuten inkubiert, mit 3 ml FACS-Puffer gewaschen und anschließend für 30 Minuten mit dem Sekundärantikörper gefärbt. Die Inkubation erfolgte dabei im Dunkeln auf Eis. Nach der Inkubation wurden die Zellen zweimal mit 2 ml FACS-Puffer gewaschen und in 200 µl FACS-Puffer resuspendiert. Die Messung erfolgte am FACS Canto II von der Firma BD. Pro Probe wurden 50.000 Zellen erfasst. Dabei wurde die zu untersuchende Population durch die Verwendung von Vorwärtslichtstreuung (Zellgröße) und Seitwärtslichtstreuung (Zellgranularität) sowie die Expression des Pan-Leukozytenmarkers CD45 eingegrenzt. Durch die Verwendung von PE-, APC- und FITC-markierten Antikörpern konnten verschiedener Differenzierungsmarker für Makrophagen-Subpopulationen und neutrophile Granulozyten identifiziert werden. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der FlowJo-Software.

2.2.11 Klinische Chemie

Für die Analyse von Leberwerten aus dem Serum wurden die Teststreifen Liver I und Kenshin II der Firma akay verwendet und im zugehörigen Messgerät (Spotchem, akay,

Japan) gemessen. Es wurden folgende Parameter untersucht: GPT (ALT), GOT (AST), totales Bilirubin, totales Protein, Albumin, Triacylglyceride, HDL-Cholesterin, totales Cholesterin, LDH. Die Daten wurden in Einfachbestimmung erhoben.

2.2.12 Multiplex

Für die Analyse von Zytokinen und Chemokinen in Mäuseserum wurde die Multiplex-Technik angewendet. Mit Hilfe dieser Technik war es möglich, aus einem geringen Serumvolumen mehrere Analyte gleichzeitig quantitativ zu erfassen. Dies erfolgte durch den Einsatz magnetischer Beads, welche zwei unterschiedliche Fluoreszenz-Farbstoffe in verschiedenen Mischungsverhältnissen enthalten. So konnten die Beads durchflusszytometrisch eindeutig identifiziert werden. Beads mit dem gleichen Farbstoff-Mischungsverhältnis waren mit spezifischen Antikörpern gekoppelt, die den jeweiligen Serumanalyten banden. Während der Inkubation des Serums und der magnetischen Beads kam es zu Antigen-Antikörperbindung. Die Detektion erfolgte mit biotinylierten Detektionsantikörpern und der Zugabe von Streptavidin. Der verwendete Multiplex wurde nach Anwenderangaben zusammengestellt. Dabei wurden folgende Analyten in einem Procarta-Plex untersucht: IL-6, IL-10, IL-17/IL-25, Leptin, MCP-1 (CCL2), MIP-1 α (CCL3), MIP-1 β (CCL4), MIP-2 α (CXCL2). In einem weiteren Procarta-Plex wurden Adiponectin und CRP ebenfalls analysiert. Die Anwendung des Kits erfolgte nach Herstellerangaben.

2.2.13 Insulin-ELISA

Zur Analyse der Insulin-Konzentration im Mäuseserum wurde das Ultra Sensitive Mouse Insulin ELISA Kit der Firma Crystal Chem verwendet. Die Anwendung erfolgte nach Herstellerangaben, die hier kurz beschrieben wird. Die Serumproben wurden verdünnt und auf die mitgelieferte Platte pipettiert. Die daran konjugierten Antikörper banden das Insulin aus dem Serum. Danach wurde das Serum durch Waschen entfernt und das gebundene Insulin mit einem zweiten löslichen Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper war an ein Enzym gebunden. Dieses Enzym wandelte ein zugegebenes Molekül in einen Farbstoff um. Die Intensität des Farbstoffs wurde photometrisch gemessen und war proportional zur Insulinkonzentration.

2.2.14 Statistische Auswertung

Für die Darstellung der erhobenen Daten wurde jedes Replikat aufgeführt sowie der jeweilige Median einer Gruppe bestimmt. Identische oder ähnliche Werte wurden übereinander bzw. überlappend dargestellt. Für die statistische Auswertung wurde das

Programm Graph Pad Prism in der Version 6.01 (La Jolla, USA) verwendet. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) der PAR4^{+/+} HFF-Gruppe zur PAR4^{+/+} Standardfutter-Gruppe wurden mit * markiert. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) der PAR4^{-/-} HFF-Gruppe zur PAR4^{+/+} HFF-Gruppe wurden mit # markiert. Ermittelt wurden die Unterschiede durch Verwendung der einfacher Varianzanalyse (one-way ANOVA) mit Tukey post hoc Test.

3 Ergebnisse

Zur Untersuchung der Bedeutung von PAR4 für die Entwicklung einer Fettlebererkrankung und einer Insulinresistenz wurden Mäuse mit hochkalorischem Fettfutter gefüttert. Im Laufe der Fütterung wurde zur Charakterisierung der Entwicklung der Krankheitsbilder Körper- und Organdaten erfasst, um den Verlauf und Schweregrad zu beurteilen. Dazu wurde die HFF-Wildtyp-Gruppe mit der Kontrollfutter-Gruppe verglichen. Für die Untersuchung der Rolle des PAR4 wurde eine Gruppe PAR4-defizienter Mäuse mit HF-Futter gefüttert und analog zur HFF-Wildtyp-Gruppe vergleichbare Daten erfasst. Durch den Vergleich der Daten soll ein Beitrag des PAR4 zur Entwicklung einer nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung (NAFLE) und einer durch Fütterung induzierten Insulinresistenz aufgedeckt werden.

3.1 Wird die PAR4-Transkription durch eine hochkalorische Fettfütterung beeinflusst?

Um den Einfluss des PAR4 auf die Entwicklung einer NAFLE und einer fütterungsinduzierten Insulinresistenz näher zu charakterisieren, wurde zunächst die PAR4-Expression in der Leber, im epididymalen weißen Fettgewebe und im interskapulären braunen Fettgewebe mittels qPCR untersucht. Dazu wurden Wildtyp-Mäuse bis zu 30 Wochen mit einem hochkalorischen Fettfutter gefüttert und die zu untersuchenden Organe zu Beginn, nach 8, 16 und 30 Wochen analysiert. Zur Kontrolle der hochkalorischen Fettfütterung wurden Wildtyp-Mäuse mit Standardfutter behandelt.

Die PAR4-Expression in der Leber der fettgefütterten Mäuse wies keinen Unterschied im Vergleich zur Standardfutter-Gruppe auf, bis auf eine signifikante Herunterregulation in Fütterungswoche 30. Im epididymalen weißen Fettgewebe führte eine hochkalorische Fettfütterung zu einem signifikanten Anstieg der relativen PAR4-Expression nach 8 und nach 30 Wochen Fütterung. Im interskapulären braunen Fettgewebe konnte kein signifikanter Anstieg der relativen RNA-Expression von PAR4 festgestellt werden (siehe Abbildung 4). Eine hochkalorische Fettfütterung scheint demnach nur zu einem späten Zeitpunkt der Fettfütterung einen Einfluss auf die PAR4-Expression in der Leber zu haben.

Im epididymalen weißen Fettgewebe kam es zu einer systematischen Hochregulation der PAR4-Expression unter einer hochkalorischen Fettfütterung. Die PAR4-Expression im interskapulären braunen Fettgewebe wird durch die hochkalorische Fettfütterung nur tendenziell beeinflusst. Interessanterweise war die relative PAR4-Expression in der

Leber deutlich niedriger als im Fettgewebe. Der Grund hierfür liegt vermutlich in den unterschiedlich großen Zellpopulation von Leber und Fettgewebe, die PAR4 exprimieren können. Aus diesem Grund sind die Schwankungen der Messwerte in der Leber deutlich größer als die Schwankungen der Messwerte im Fettgewebe.

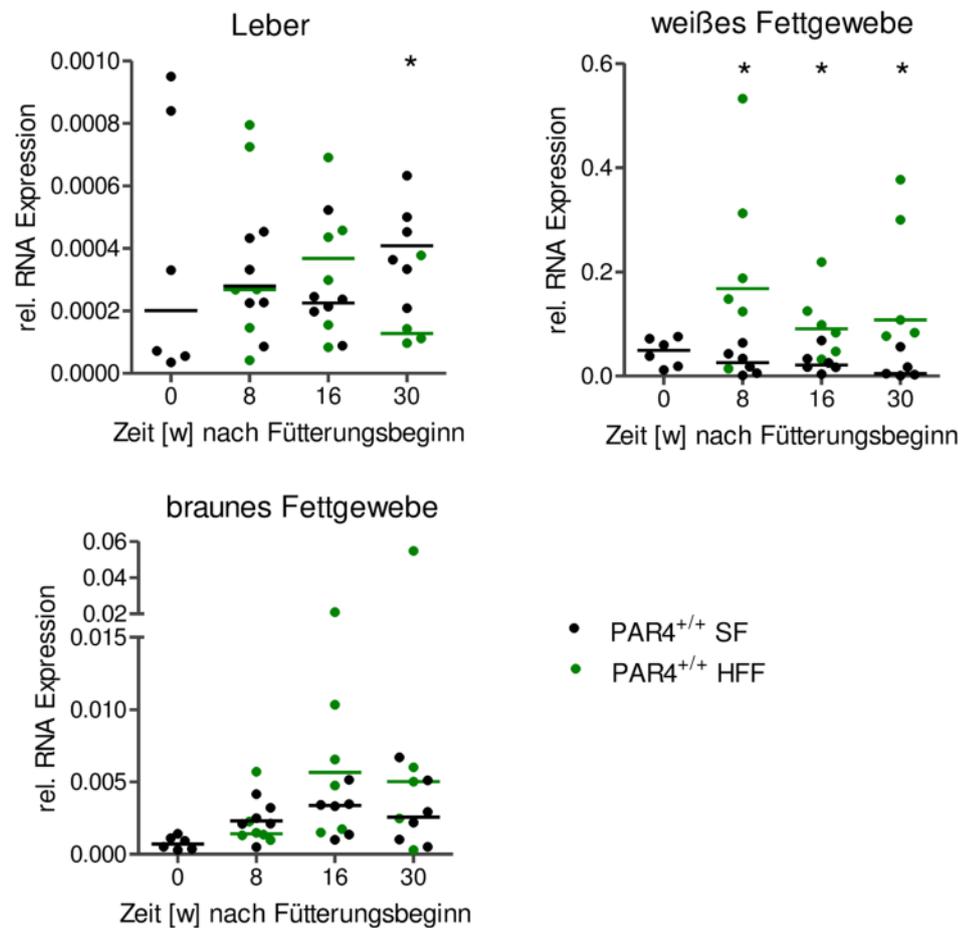


Abbildung 4: PAR4-Expression wird in der Leber und im weißen Fettgewebe durch eine hochkalorische Fettfütterung beeinflusst.

Wildtyp-Mäuse wurden bis zu 30 Wochen mit hochkalorischem Fettfutter (HFF) gefüttert, eine Wildtyp-Gruppe wurde mit Standardtierfutter gefüttert (SF). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Leber, das epididymale weiße und das interskapuläre braune Fettgewebe, wie unter 2.2.3 beschrieben, entnommen. Die RNA wurde, wie unter 2.2.5 und 2.2.6 beschrieben, isoliert, in cDNA umgeschrieben (siehe 2.2.7) und die relative RNA-Expression von PAR4 in der qPCR gemessen (siehe 2.2.8). Als Kontrollgen wurde SDHA verwendet. Die relative Expression wurde aus dem negativen potenzierten Ct-Wert berechnet, nachdem der Ct-Wert des Kontrollgens vom Ct-Wert des zu untersuchenden Gens abgezogen wurde. Dargestellt ist jedes Replikat mit Median ($n = 4-7$). Signifikante Unterschiede wurden durch einfaktorische Varianzanalyse (One-way ANOVA) mit Tukey post-Test ermittelt. Signifikanzniveaus: *: $p < 0,05$ für PAR4^{+/+} SF zu PAR4^{+/+} HFF.

3.2 Beeinflusst PAR4 die Gewichtszunahme während einer hochkalorischen Fettfütterung?

Für die Analyse der Entwicklung einer nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung und einer Insulinresistenz wurden Wildtyp-Mäuse bis zu 30 Wochen mit hochkalorischem Fettfutter (HFF) gefüttert. Als Kontrollgruppe wurden Wildtyp-Mäuse mit Standardhaltungsfutter (SF) gefüttert. Zur Untersuchung des Einflusses von PAR4 wurden PAR4-defiziente Mäuse ebenfalls mit hochkalorischem Fettfutter gefüttert.

Sowohl PAR4-kompetente als auch PAR4-defiziente Mäuse nahmen während der gesamten Fütterungszeit kontinuierlich an Gewicht zu, wohingegen die Mäuse, die Kontrollfutter enthielten, nur gering zu Beginn zunahmten und dieses Gewicht im weiteren Beobachtungszeitraum hielten. Auffällig war, dass die PAR4-defizienten Mäuse bis zur Fütterungswoche 16 signifikant weniger an Gewicht zugenommen hatten als die HFF-Wildtyp-Mäuse. Ab Fütterungswoche 16 nahmen die PAR4-defizienten Mäuse deutlich mehr an Gewicht zu als die HFF-Wildtyp-Mäuse, so dass beide Gruppen nach Fütterungswoche 16 keinen signifikanten Unterschied mehr aufwiesen.

Zusätzlich zum Gewicht wurde die Zunahme der Fettmasse untersucht. Dazu wurden die Mäuse in einem NMR-Gerät analysiert. Alle drei Gruppen wiesen im Versuchszeitraum eine Zunahme der Fettmasse auf. Die Kontrollmäuse nahmen lediglich aufgrund von physiologischem Wachstum etwas an Fettmasse zu. Die Zunahme der Fettmasse der PAR4-defizienten Mäuse war nach 5 und 11 Wochen einer hochkalorischen Fettfütterung signifikant niedriger als jene der HFF-Wildtyp-Mäuse. In Fütterungswoche 17 unterschieden sich die Fettmassen der fettgefütterten Gruppe nicht mehr signifikant voneinander. Spätere Zeitpunkte der Fütterung konnten aufgrund der ausgeprägten Adipositas der Mäuse und der baulichen Enge des NMR-Geräts nicht ohne Gefahr für die Mäuse analysiert werden.

Zur Überprüfung der Diabetesentwicklung wurde zu verschiedenen Zeitpunkten die Nüchternblutglukosekonzentration bestimmt. Die hochkalorische Fettfütterung führte ab Fütterungswoche 12 zu einem signifikanten Anstieg der Nüchternblutglukosekonzentration (siehe Abbildung 5 und 23). Dabei konnte kein Unterschied zwischen den PAR4-defizienten und PAR4-kompetenten Mäusen festgestellt werden. Die hier zusammengefassten Daten lassen somit annehmen, dass eine PAR4-Defizienz keinen signifikanten Einfluss auf die Nüchternblutglukosekonzentration und somit auf die Entwicklung eines Diabetes hat.

Die Untersuchungen belegten, dass eine hochkalorische Fettfütterung zu einer signifikanten Gewichtsteigerung führte. Dies ging mit einer erhöhten Fettmasse sowie einem erhöhten Nüchtern-glukosespiegel im Vergleich zur Kontrollfutter-Gruppe einher. Auffällig war, dass der PAR4-Einfluss eher zu Beginn der Fütterung auftrat und es dadurch unter PAR4-Defizienz zu einer Verzögerung der Gewichts- und Fettmassenzunahme kam. Daraus lässt sich schließen, dass PAR4 zu Beginn einer hochkalorischen Fettfütterung die Entwicklung eines Übergewichts, das den Hauptrisikofaktor für die nicht-alkoholische Fettlebererkrankung und der fütterungs-induzierten Insulinresistenz darstellt, beeinflusst. Dieser Einfluss nahm aber im weiteren Verlauf der Fütterung ab.

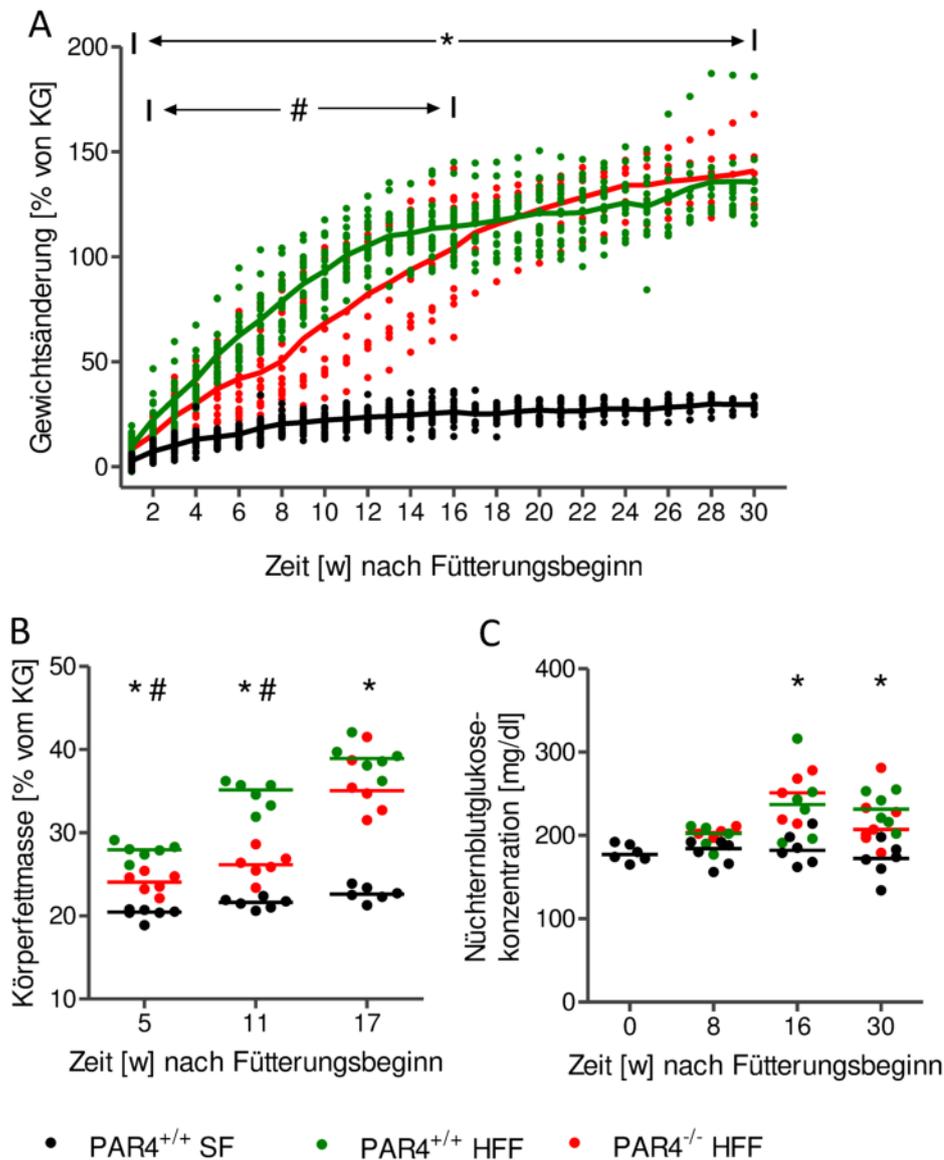


Abbildung 5: PAR4 beeinflusst die Gewichtszunahme im frühen Verlauf einer hochkalorischen Fettfütterung und reguliert die Zunahme des Fettgewebes.

Wildtyp- und PAR4-defiziente Mäuse wurden bis zu 30 Wochen mit hochkalorischem Fettfutter (HFF) gefüttert, eine Wildtyp-Gruppe wurde mit Standardtierfutter gefüttert (SF). (A) Die Mäuse wurden während der Fütterung einmal wöchentlich gewogen (n = 5-26). (B) Die Fettmasse der behandelten Mäuse wurde zu den Zeitpunkten 5, 11 und 17 Wochen nach Fütterungsbeginn in einem NMR-Gerät untersucht (n = 6). (C) Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde den Mäusen für 6 Stunden das Futter entzogen und die Nüchternblutglukosekonzentration mit einem Glukosemessgerät (*accu Chek mobile*, Roche) analysiert. Dafür wurde einmalig die Schwanzspitze mit einem Skalpell angeritzt und ein Blutstropfen auf das Messfeld gegeben (n = 6-7). Dargestellt ist jedes Replikat mit Median. KG = Körpergewicht. Signifikante Unterschiede wurden durch einfaktoruelle Varianzanalyse (One-way ANOVA) mit Tukey post-Test ermittelt. Signifikantsniveaus: *p < 0,05 für PAR4^{+/+} SF zu PAR4^{+/+} HFF und #p < 0,05 für PAR4^{-/-} HFF zu PAR4^{+/+} HFF.

3.3 Beeinflusst PAR4 das Gewicht von Leber und Fettgewebe im Verlauf einer hochkalorischen Fettfütterung?

Zur näheren Untersuchung der Auswirkung einer hochkalorischen Fettfütterung auf das Gewicht von Leber und epididymalen weißen Fettgewebes sowie des braunen Fettgewebes wurden diese im Verlauf bestimmt. Ergänzend wurden diese Untersuchungen auch in PAR4-defizienten Mäusen durchgeführt, um den Einfluss von PAR4 auf den Verlauf dieser Parameter zu erfassen. Das Lebergewicht stieg aufgrund der Fettakkumulation in den Hepatozyten im Laufe der Fütterung in den HFF-Gruppen an (siehe Abbildung 6 und 23) und war nach 12 Wochen Fettfütterung signifikant unterschiedlich zur Standardfutter-Gruppe. Beim Vergleich der absoluten Lebergewichte zwischen PAR4-defizienten Mäusen und HFF-Wildtyp-Mäusen konnte kein Einfluss von PAR4 festgestellt werden. Wird das Lebergewicht auf das jeweilige Körpergewicht bezogen, ergaben sich jedoch signifikante Unterschiede zwischen PAR4-defizienten und -kompetenten Lebern in Fütterungswoche 16 (siehe Abbildung 6).

Ähnlich zum Lebergewicht reagierten das epididymale weiße Fettgewebe und das interskapuläre braune Fettgewebe auf die hochkalorische Fettfütterung. Eine signifikante Zunahme des Gewichtes beider Organe konnte bereits ab der 8. Fütterungswoche festgestellt werden. Interessanterweise beeinflusste eine PAR4-Defizienz eine Gewichtszunahme beider Organe bis zur 16. Fütterungswoche, indem bis zu diesem Zeitpunkt das Organgewicht weniger zunahm. Zum Zeitpunkt der 30. Fütterungswoche konnte kein Unterschied zwischen den HFF-Gruppen beobachtet werden (siehe Abbildung 6).

Um auszuschließen, dass die PAR4-defizienten Mäuse möglicherweise eine veränderte Körpergröße oder eine veränderte Futteraufnahme im Vergleich zu den HFF-Wildtyp-Mäusen besaßen, wurden die Futteraufnahme und die Körpergröße der Mäuse im Laufe der Fütterung überprüft (siehe Abbildung 22). Sowohl Körpergröße als auch Futteraufnahme waren in beiden Gruppen über den gesamten Versuchszeitraum gleich groß.

Die vorangehend ausgeführten Ergebnisse der Untersuchungen lassen annehmen, dass PAR4 insbesondere während früherer Zeitpunkte für die vermehrte Akkumulation von weißem wie auch braunem Fettgewebe im Rahmen einer hochkalorischen Fettfütterung von Bedeutung ist. Im Hinblick auf die Zunahme des Lebergewichtes scheint PAR4 hingegen weniger relevant zu sein.

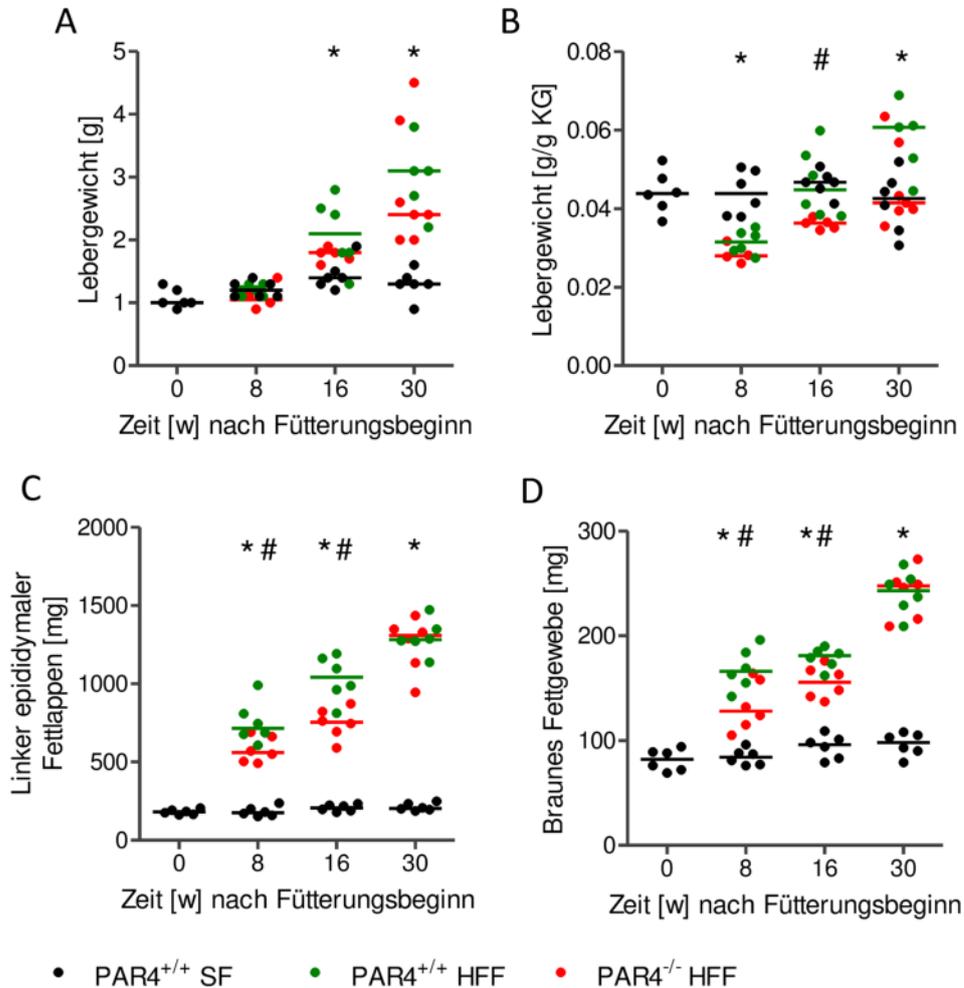


Abbildung 6: PAR4 beeinflusst die Gewichtszunahme der Leber und des Fettgewebes

(A-D) Wildtyp- und PAR4-defiziente Mäuse wurden bis zu 30 Wochen mit hochkalorischem Fettfutter (HFF) gefüttert, eine Wildtyp-Gruppe wurde mit Standardtierfutter gefüttert (SF). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Leber, das epididymale weiße Fettgewebe und das interskapuläre braune Fettgewebe, wie unter Punkt 2.2.3 beschrieben, isoliert und gewogen. Zusätzlich wurde das Lebergewicht auf das zum Zeitpunkt der Organentnahme gemessene Körpergewicht bezogen (B). Dargestellt ist jedes Replikat mit Median (A-B: n = 4-7, C-D: n = 6). KG = Körpergewicht. Signifikante Unterschiede wurden durch einfaktorische Varianzanalyse (One-way ANOVA) mit Tukey post-Test ermittelt. Signifikanzniveaus: *p < 0,05 für PAR4^{+/+} SF zu PAR4^{+/+} HFF und #p < 0,05 für PAR4^{-/-} HFF zu PAR4^{+/+} HFF.

3.4 Beeinflusst PAR4 die Glukosetoleranz und Insulinsensitivität im Laufe einer hochkalorischen Fettfütterung?

Die Expression von PAR4 wird in verschiedenen Zellen in einer Umgebung, in der eine hohe Glukosekonzentration vorliegt, hoch reguliert. Bisher wurde dies für murine kardiale Fibroblasten und humane Adipozyten belegt ([145, 162]). Eine hochkalorische Fettfütterung beeinflusst unter anderem auch den Glukosemetabolismus. Wie in Abbildung 5 dargestellt, kommt es im Verlauf einer hochkalorischen Fettfütterung zu einer erhöhten Glukosekonzentration im Blut.

Um eine genaue Charakterisierung der Glukosetoleranz während einer hochkalorischen Fettfütterung und eine Beteiligung von PAR4 festzustellen, wurde zu verschiedenen Zeitpunkten der Fettfütterung ein Glukosetoleranztest durchgeführt. Dazu wurden Wildtyp-Mäusen und PAR4-defizienten Mäusen für 6 Stunden das Futter entzogen und die Glukosekonzentration im Blut gemessen. Durch Gabe einer gewichtsbezogenen Menge Glukoselösung und der wiederholten Messung der Blutglukosekonzentration nach einer vorgegebenen Zeit wurde die Reaktion auf den Glukosebolus beobachtet.

Eine hochkalorische Fettfütterung führte bei Wildtyp-Mäusen nach 6, 12 und 18 Wochen zu einer verminderten Glukosetoleranz. Nach Glukosegabe stieg der Blutglukosespiegel sprunghaft an und der Organismus der fettgefütterten Wildtyp-Mäuse benötigte mehr Zeit, um den Blutglukosespiegel wieder auf Normalniveau zu senken. Die zugehörigen AUC-Werte beschreiben wie schnell der Metabolit, in diesem Fall die Glukose, aus dem Serum wieder entfernt wird. Ein hoher AUC-Wert spricht für eine verminderte Glukosetoleranz.

Ein Einfluss von PAR4 wurde beobachtet, wenn der Glukosetoleranztest nach 6 und 12 Wochen durchgeführt wurde. Unter PAR4-Defizienz war die Glukosetoleranz zu Beginn einer hochkalorischen Fettfütterung im Gegensatz zu den HFF-Wildtyp-Mäusen verbessert, wohingegen zum späteren Zeitpunkt (18 Wochen Fütterung) kein Einfluss von PAR4 mehr detektiert wurde (siehe Abbildung 7). Das heißt, dass PAR4 zu Beginn einer hochkalorischen Fettfütterung dazu beitrug, die Toleranz gegenüber Glukose zu vermindern, dessen Wirkung aber im weiteren Versuchsverlauf abnahm.

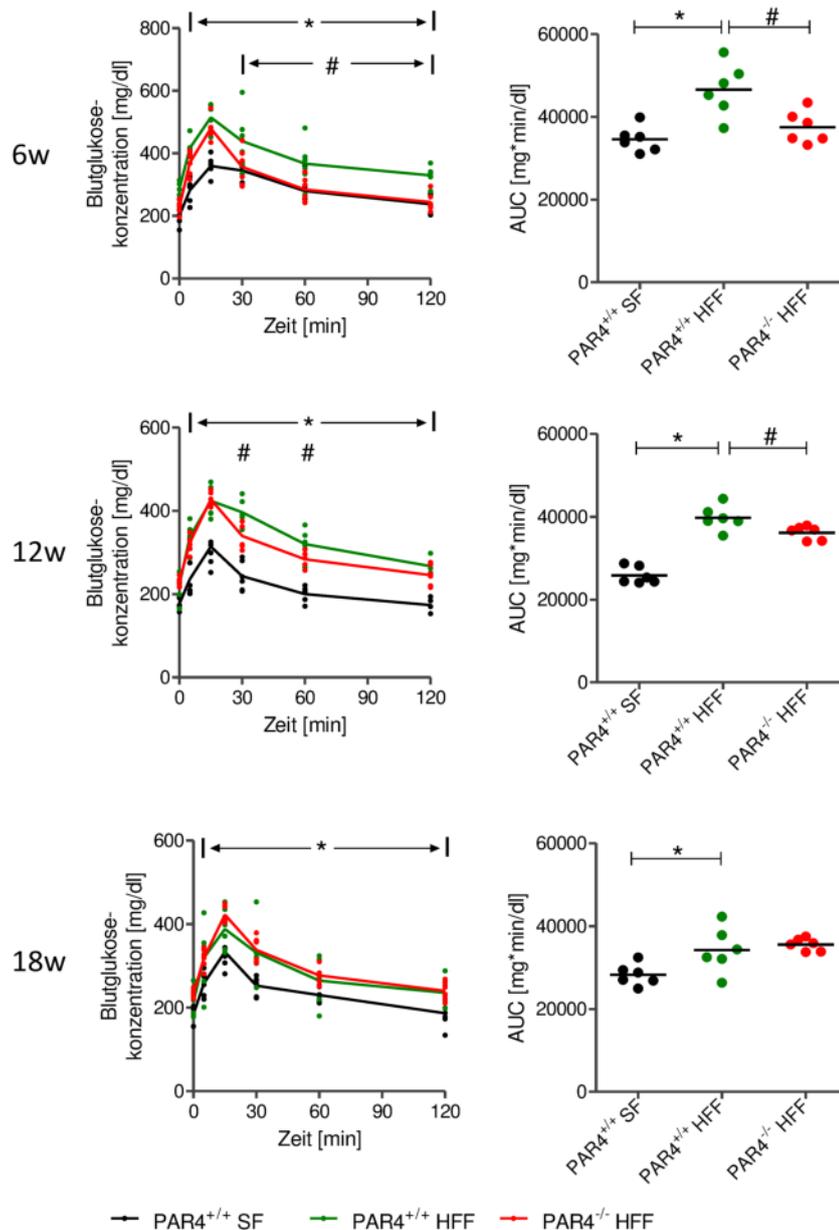


Abbildung 7: Zu einem frühen Zeitpunkt einer hochkalorischen Fettfütterung beeinflusst PAR4 die Glukosetoleranz.

Wildtyp- und PAR4-defiziente Mäuse wurden bis zu 30 Wochen mit hochkalorischem Fettfutter (HFF) gefüttert, eine Wildtyp-Gruppe wurde mit Standardtierfutter gefüttert (SF). Zum angegebenen Zeitpunkt wurde den Mäusen für 6 Stunden das Futter entzogen. Die Nüchternblutglukosekonzentration wurde durch Anritzen der Schwanzspitze und durch Aufnahme eines Blutropfens mit einem Glukosemessgerät (*accu Chek mobile*, Roche) analysiert. Anschließend wurde den Mäusen 1 g/kg Körpergewicht Glukoselösung *per os* gegeben und die Blutglukosekonzentration nach 5, 15, 30, 60 und 120 Minuten gemessen. Als Maß für die Glukosetoleranz wurde die Fläche unter der Konzentration-Zeit-Kurve, welche als *area under the curve* (AUC) angegeben wird, berechnet. Dieser Wert beschreibt, wie schnell der Metabolit aus dem System eliminiert wird. Dargestellt ist jedes Replikat mit Median (n = 6). Signifikante Unterschiede wurden durch einfaktorische Varianzanalyse (One-way ANOVA) mit Tukey post-Test ermittelt. Signifikanzniveaus: *p < 0,05 für PAR4^{+/+} SF zu PAR4^{+/+} HFF und #p < 0,05 für PAR4^{-/-} HFF zu PAR4^{+/+} HFF.

Analog zur Glukosetoleranz sollte festgestellt werden, wie sich eine hochkalorische Fettfütterung auf die Insulinsensitivität auswirkt und ob PAR4 auch in diesem Kontext einen Einfluss hat. Dazu wurden Wildtyp-Mäusen und PAR4-defizienten Mäusen für 6 Stunden das Futter entzogen und die Blutglukosekonzentration bestimmt. Anschließend erhielten die Mäuse eine gewichtsabhängige Gabe einer Insulinlösung intraperitoneal. Deren Wirkung wurde durch Messung der Blutglukosekonzentration über 2 Stunden verfolgt. Wie in Abbildung 8 zu sehen, kommt es im Rahmen einer hochkalorischen Fettfütterung zu einer Verringerung der Insulinsensitivität und damit zu einer Zunahme der Insulinresistenz. Ein hoher AUC-Wert spricht in diesem Test für eine zunehmende Insulinresistenz.

Bereits nach 7 Wochen einer hochkalorischen Fettfütterung wiesen die HFF-Wildtyp-Mäuse eine beeinträchtigte Insulinsensitivität auf, die über den gesamten Versuchszeitraum erhalten blieb. Ähnlich zum Ergebnis der Glukosetoleranz hatte PAR4 nur zu Beginn der hochkalorischen Fettfütterung einen Einfluss auf die Insulinsensitivität. Dabei wirkte sich eine PAR4-Defizienz zunächst schützend auf die Entwicklung einer Insulinresistenz aus. Wie zu Woche 7 und 14 der hochkalorischen Fettfütterung zu sehen, verhielt sich zu diesen Zeitpunkten bei PAR4-defizienten Mäusen die Reaktion auf die Insulingabe ähnlich zur Wildtypgruppe, die Kontrollfutter erhielt. Dieser Effekt lies sich nach 20 Wochen Fettfütterung nicht mehr nachweisen (siehe Abbildung 8).

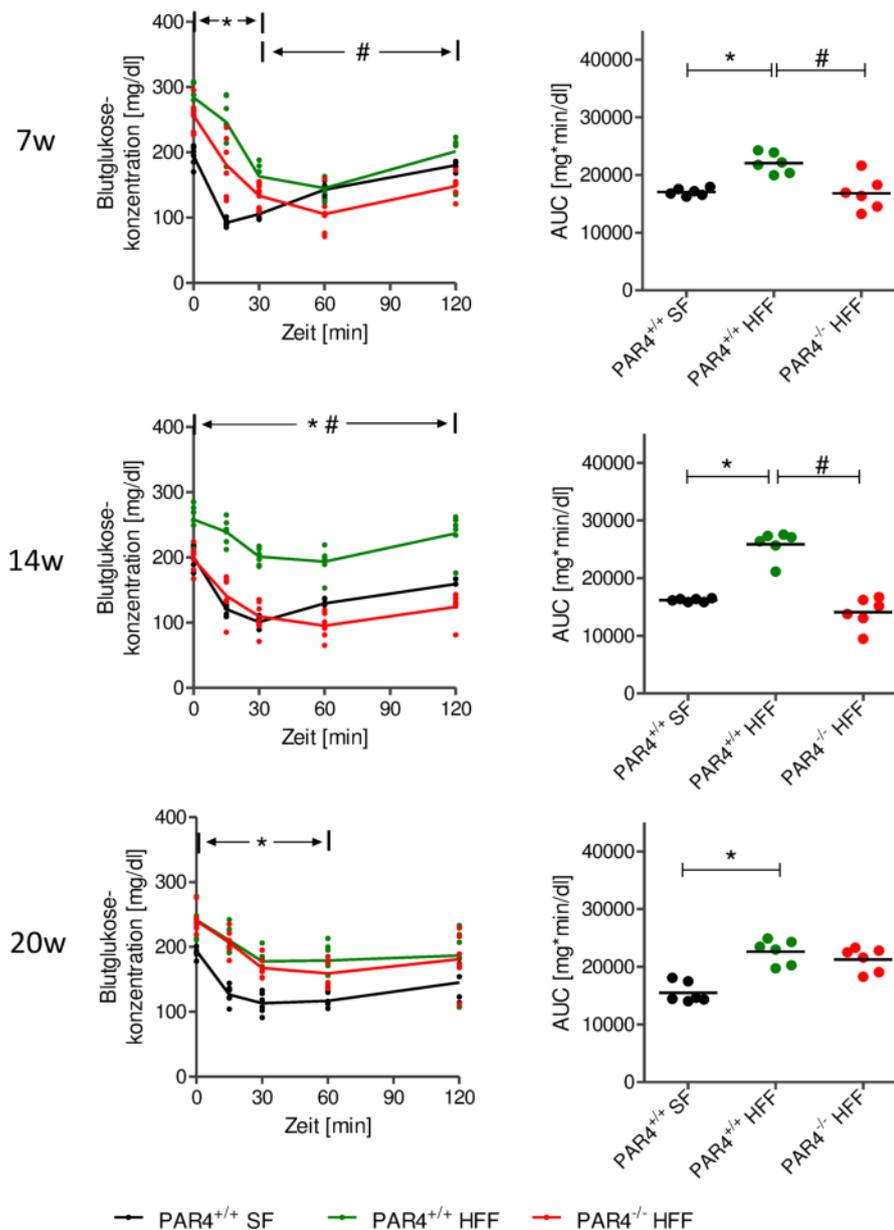


Abbildung 8: Zu einem frühen Zeitpunkt einer hochkalorischen Fettfütterung beeinflusst PAR4 die Insulinsensitivität

Wildtyp- und PAR4-defiziente Mäuse wurden bis zu 30 Wochen mit hochkalorischem Fettfutter (HFF) gefüttert, eine Wildtyp-Gruppe wurde mit Standardtierfutter gefüttert (SF). Zum angegebenen Zeitpunkt wurde den Mäusen für 6 Stunden das Futter entzogen. Die Nüchternblutglukosekonzentration wurde durch Anritzen der Schwanzspitze und durch Aufnahme eines Blutropfens mit einem Glukosemessgerät analysiert. Anschließend wurde den Mäusen 0,75 U/kg Körpergewicht Insulinlösung intraperitoneal gespritzt und die Blutglukosekonzentration nach 15, 30, 60 und 120 Minuten gemessen. Als Maß für die Insulinsensitivität wurde die Fläche unter der Konzentration-Zeit-Kurve, welche als *area under the curve* (AUC) angegeben wird, berechnet. Dieser Wert beschreibt, wie schnell der Metabolit aus dem System eliminiert wird. Dargestellt ist jedes Replikat mit Median (n = 6). Signifikante Unterschiede wurden durch einfaktorische Varianzanalyse (One-way ANOVA) mit Tukey post-Test ermittelt. Signifikanzniveaus: *p < 0,05 für PAR4^{+/+} SF zu PAR4^{+/+} HFF und #p < 0,05 für PAR4^{-/-} HFF zu PAR4^{+/+} HFF.

3.5 Beeinflusst PAR4 klinische Parameter der Leber während einer hochkalorischen Fettfütterung?

Eine hochkalorische Fettfütterung beeinflusst die Organfunktion der Leber in zunehmendem Maße. Durch die Einlagerung der übermäßig aufgenommenen Lipide in Hepatozyten wird die Funktion dieser Zellen beeinträchtigt. Darüber hinaus kommt es im späteren Verlauf der hochkalorischen Fütterung zu einer Zellschädigung der Hepatozyten [167]. Dabei werden Zellbestandteile ins Blut abgegeben, die analysiert werden können und einen Hinweis auf das Maß der Leberschädigung geben. Zu diesen Parametern gehören die Enzyme GOT, GPT und LDH. Eine weitere Funktion der Leber, die vor allem durch eine hochkalorische Fettfütterung beeinflusst wird, ist die Cholesterinverwertung. Dafür wurde sowohl das totale Cholesterin als auch das arterioprotektive HDL-Cholesterin sowie die Triacylglycerole im Serum bestimmt. Die Bestimmung der Protein- und Albuminkonzentration im Serum kann Hinweise auf eine Funktionsstörung der Syntheseleistung der Leber geben, wobei bei diesen Parametern auch eine Maldigestion bzw. Malabsorption zu erniedrigten Serumspiegeln führt.

Die hochkalorische Fettfütterung führte zu einer signifikanten Erhöhung der totalen Cholesterinkonzentration im Blut. Dabei lag auch das HDL-Cholesterin zum Teil tendenziell erhöht vor. Interessanterweise wurde eine erniedrigte Albuminkonzentration im Serum nach 8 Wochen Fütterung gemessen, welche zu späteren Zeitpunkten nicht mehr beobachtet werden konnte. Die Serumparameter GPT und GOT wiesen im Verlauf der hochkalorischen Fettfütterung einen tendenziellen Anstieg auf, wobei die Zunahme der GPT-Konzentration erst nach 16 Wochen Fettfütterung signifikant war. Dies weist darauf hin, dass im Laufe einer hochkalorischen Fettfütterung Hepatozyten geschädigt wurden und daher vermehrt GPT im Serum gemessen wurde. Alle anderen gemessenen Parameter wurden durch die hochkalorische Fettfütterung nicht signifikant beeinflusst.

Wie in Abbildung 9 dargestellt, waren die medianen GPT-Konzentrationen im Serum PAR4-defizienter Mäuse zu allen Zeitpunkten tendenziell niedriger als in entsprechenden Kontrollmäusen, die mit hochkalorischem fettreichen Futter behandelt wurden. Statistische Signifikanz erreichte dieser Effekt jedoch nur zu Woche 8 des Versuches. Diese Befunde legen nahe, dass PAR4 für die Entstehung eines Leberschadens in Folge einer hochkalorischen Fettfütterung eine gewisse Rolle spielt. Hiermit übereinstimmend ist die Serumkonzentration der GOT nach 30 Wochen Fettfütterung tendenziell auch in Mäusen niedriger, die über den PAR4 nicht mehr verfügen.

Darüber hinaus bewirkte PAR4, dass der totale Cholesterinspiegel nach 8 Wochen Fettfütterung signifikant geringer war als ohne PAR4 (siehe Abbildung 9). Die Serumparameter totales Bilirubin, LDH und Triacylglycerol wurden nicht von der hochkalorischen Fettfütterung beeinflusst, und auch die PAR4-Defizienz spielte keine Rolle bei der Regulation dieser Parameter (siehe Abbildung 24).

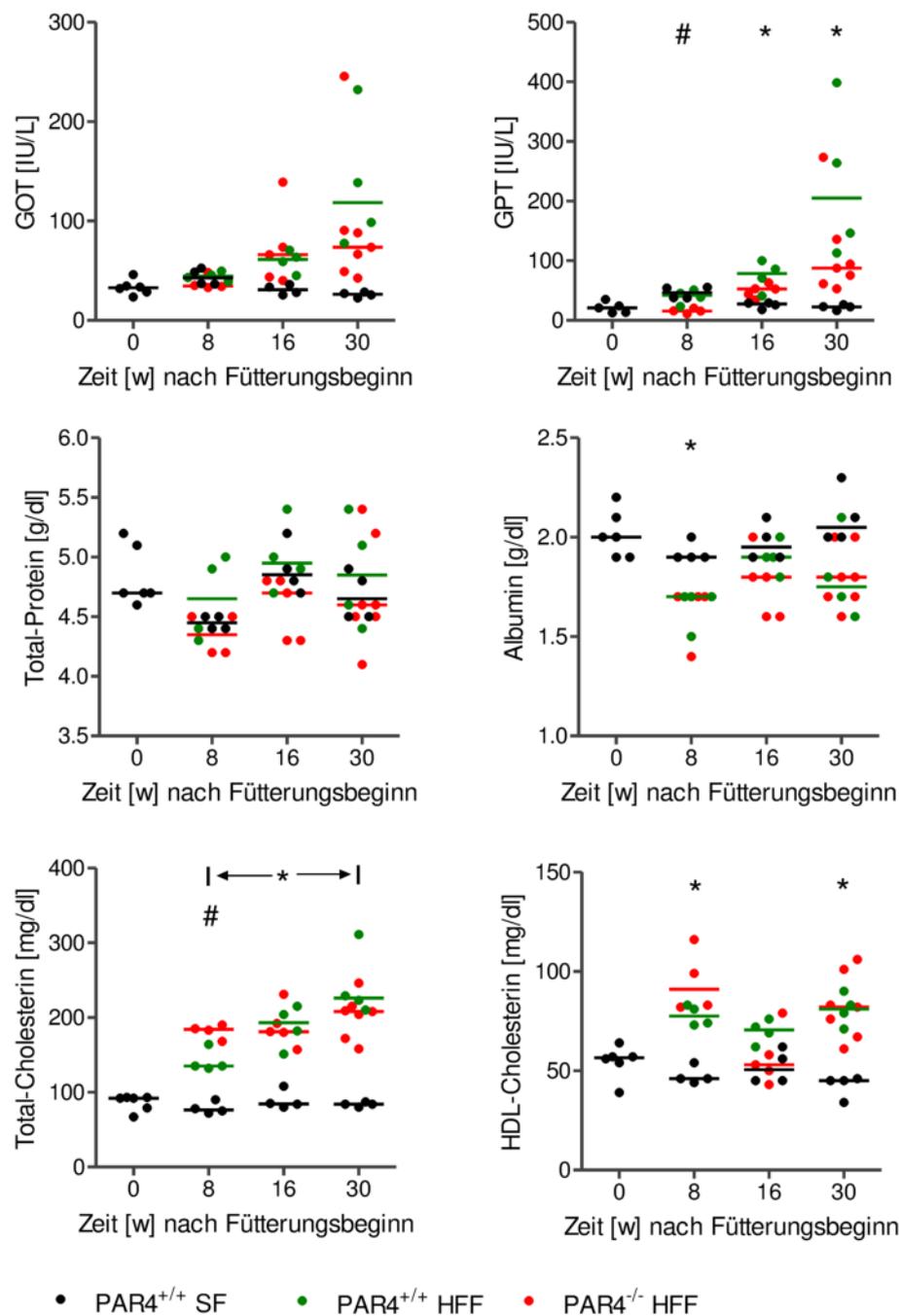


Abbildung 9: PAR4 führt zu einer Erhöhung von GPT und senkt Gesamtcholesterin im Serum nach 8 Wochen einer hochkalorischen Fettfütterung.

Wildtyp- und PAR4-defiziente Mäuse wurden bis zu 30 Wochen mit hochkalorischem Fettfutter (HFF) gefüttert, eine Wildtyp-Gruppe wurde mit Standardtierfutter gefüttert (SF). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Mäuse, wie unter 2.2.3 beschrieben, narkotisiert. Durch Punktion der *Vena cava inferior* wurden mit einer Kanüle mindestens 500 µl Blut entnommen. Das Serum wurde, wie unter 2.2.4 beschrieben, gewonnen. Die Serumkonzentration der dargestellten Analyte wurde mit Hilfe von Teststreifen und der anschließenden Auslesung im Messgerät (*Spotchem*, akray) analysiert. Dargestellt ist jedes Replikat mit Median (n = 4-7). Signifikante Unterschiede wurden durch einfaktorische Varianzanalyse (One-way ANOVA) mit Tukey post-Test ermittelt. Signifikanzniveaus: *p < 0,05 für PAR4^{+/+} SF zu PAR4^{+/+} HFF und #p < 0,05 für PAR4^{-/-} HFF zu PAR4^{+/+} HFF.

3.6 Beeinflusst PAR4 die Zytokinexpression im Serum während einer hochkalorischen Fettfütterung?

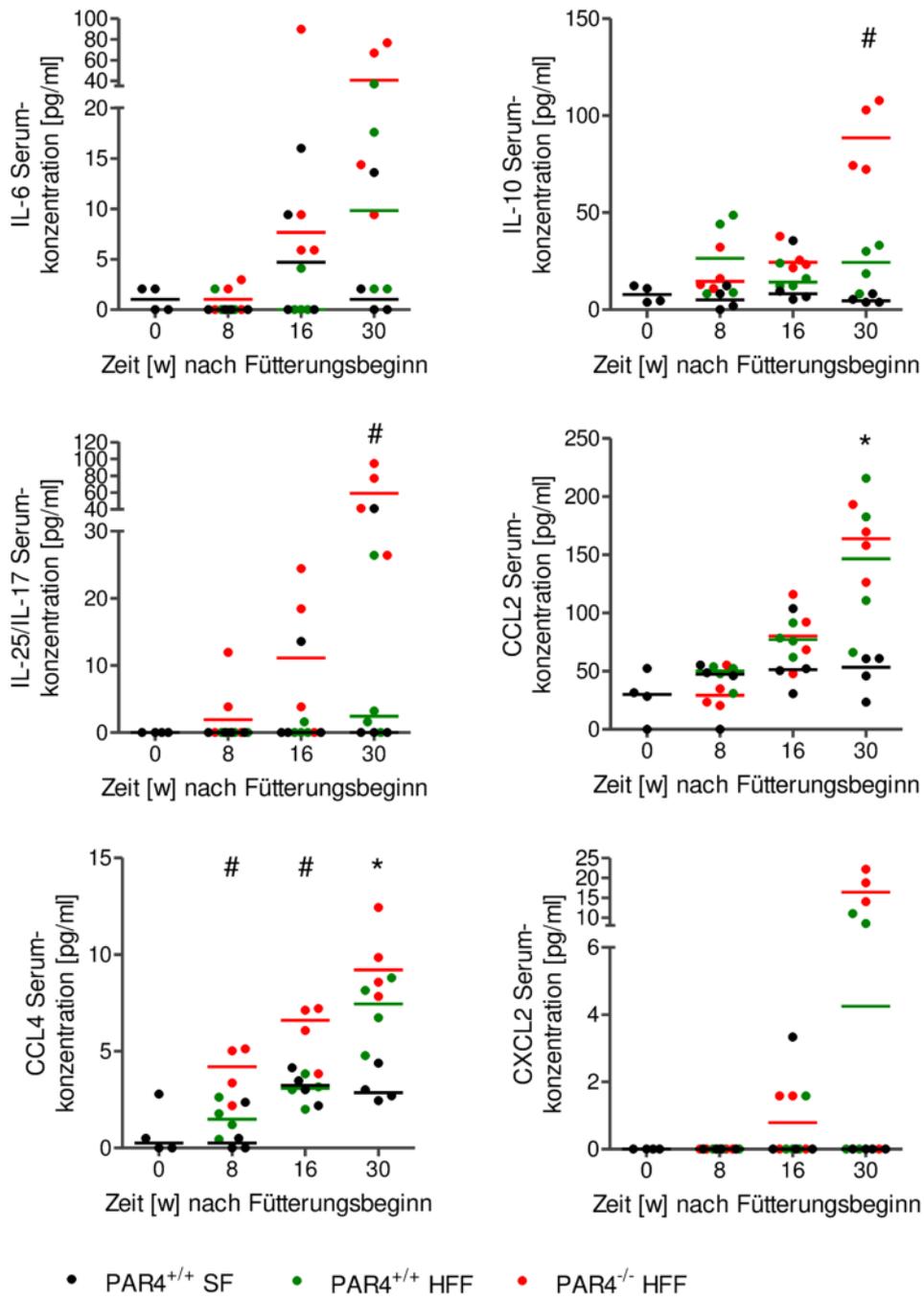
Ähnlich wie die Serumparameter der Leber werden Botenstoffe wie Chemokine und Zytokine von Zellen ins Serum abgegeben. Die Analyse dieser Botenstoffe kann Aufschluss über den Verlauf einer Entzündungsreaktion im Rahmen von Schädigungs- und Regenerations- bzw. Reparaturprozessen geben, die systemisch den gesamten Organismus betreffen. Für die Analyse der Chemokine und Zytokine im Serum wurden Wildtyp-Mäuse und PAR4-defiziente Mäuse bis zu 30 Wochen mit hochkalorischem Fettfutter gefüttert und das Serum, wie unter 2.2.4 beschrieben, gewonnen. Mit Hilfe der Luminex-Methode wurden die in Abbildung 10 aufgeführten Chemokine und Zytokine gemessen.

Die hochkalorische Fütterung bewirkte insbesondere zu späten Zeitpunkten einen Anstieg verschiedener Chemokine und Zytokine im Serum. So kam es unter hochkalorischer fettreicher Fütterung in Wildtyp-Mäusen mit zunehmender Dauer zu einem Anstieg von Insulin und tendenziell auch von Leptin. Parallel hierzu lies sich eine Zunahme der Serumkonzentrationen für die Chemokine CCL2, CCL4 und tendenziell CXCL2 verzeichnen. Im Gegensatz hierzu kam es in Wildtyp-Mäusen im Verlauf einer hochkalorischen Fettfütterung allenfalls zu einer marginalen Änderung der Serumkonzentrationen von IL-6, IL-10, IL-25/IL-17, Adiponektin oder CRP. Interessanterweise kam es im Vergleich zu Kontrollmäusen in Mäusen, bei denen das PAR4-Gen deletiert ist, im Verlauf einer hochkalorischen Fettfütterung zu einem zusätzlichen Anstieg der Serumkonzentrationen für die Zytokine IL-6, IL-10, IL-25/IL-17 und das Chemokin CXCL2.

Diese Veränderungen waren am eindrucksvollsten zu späten Zeitpunkten und insbesondere zu Woche 30 nachweisbar und zu diesem Zeitpunkt für IL-10 und IL-25/IL-17 auch signifikant. Wie oben bereits beschrieben, erfolgte der Anstieg der Insulin-Konzentration im Serum von PAR4-defizienten Mäusen hingegen verzögert und lag zu Woche 8 noch signifikant niedriger unter dem Wert der entsprechenden Kontrollmäuse. Eine weitere interessante Beobachtung war, dass es in PAR4-defizienten Mäusen unter hochkalorischer Fettfütterung im Verlauf zu einem transienten Abfall der Serumkonzentration von Adponectin kam (siehe Abbildung 10).

In fettgefütterten Wildtyp-Mäusen wurde ein tendenzieller Anstieg der CRP-Serumkonzentration beobachtet. Dieser Trend wurde in einem etwas geringeren Ausmaß auch in den PAR4-defizienten Mäusen beobachtet, wobei in diesen Mäusen die CRP-Serumkonzentration von Fütterungswoche 16 zu Fütterungswoche 30 stagnierte.

Die Ergebnisse der Untersuchung weisen darauf hin, dass im Verlauf einer hochkalorischen Fettfütterung PAR4 die Sezernierung verschiedener Chemokine und Zytokine ins Serum dämpft bzw. gänzlich verhindert. Weder IL-6 noch IL-25/IL-17 stiegen im Laufe einer hochkalorischen Fütterung unter PAR4-Einfluss an. Lediglich die Serumkonzentration von IL-10 wies eine tendenzielle Erhöhung unter PAR4-Einfluss auf. Fehlt der Einfluss von PAR4, ist die Sezernierung dieser Moleküle deutlich erhöht und stieg kontinuierlich im Laufe des Fütterungszeitraumes an. Überraschenderweise waren die meisten der untersuchten Adipokine, zu denen Insulin und Adiponectin zählen, nur wenig durch die hochkalorische Fettfütterung beeinflusst. Leptin schien im Laufe der hochkalorischen Fettfütterung tendenziell weiter anzusteigen, wobei nach 30 Wochen Fettfütterung der Unterschied noch nicht signifikant war (siehe Abbildung 10).



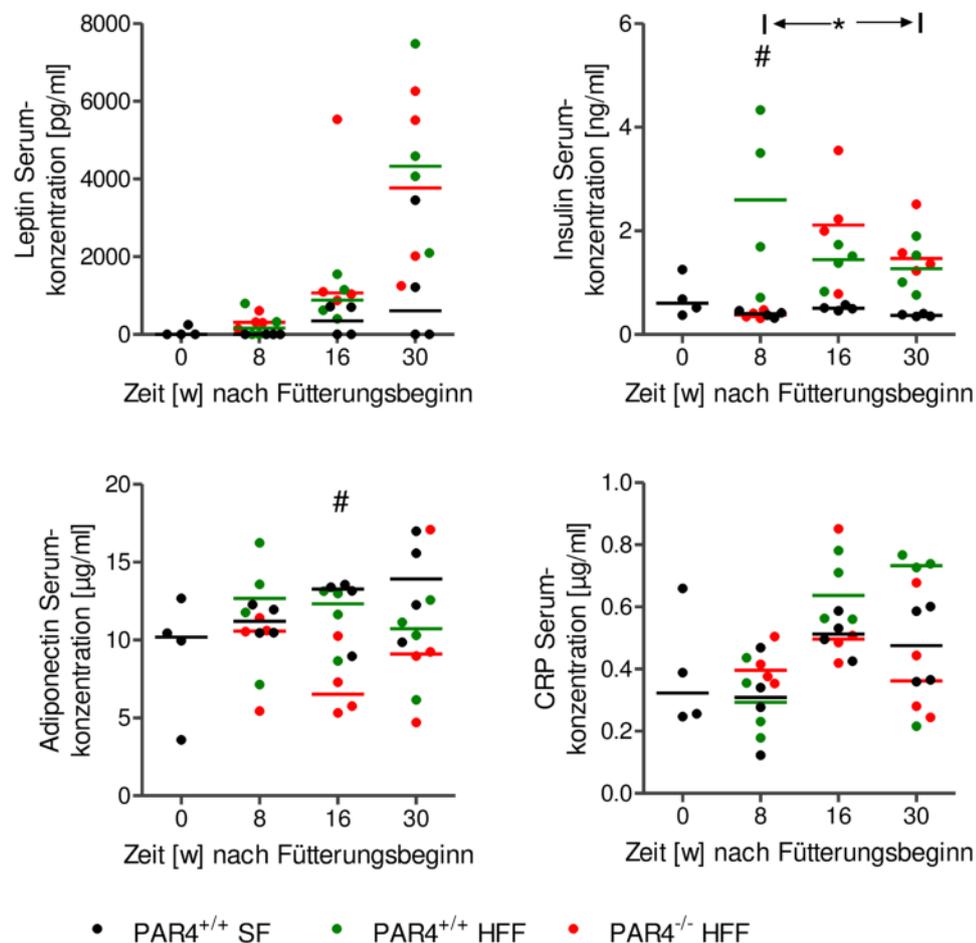


Abbildung 10: PAR4 beeinflusst während einer hochkalorischen Fettfütterung die Serumkonzentration von IL-10, IL-25/IL-17, CCL4 und Insulin.

Wildtyp- und PAR4-defiziente Mäuse wurden bis zu 30 Wochen mit einem hochkalorischen Fettfutter (HFF) gefüttert, eine Wildtyp-Gruppe wurde mit Standardtierfutter gefüttert (SF). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Mäuse wie unter 2.2.3 beschrieben narkotisiert. Durch Punktion der *Vena cava inferior* wurden mit einer Kanüle mindestens 500 μ l Blut entnommen. Das Serum wurde, wie unter 2.2.4 beschrieben, gewonnen. Die Konzentration der Analyten wurde, wie unter 2.2.12 beschrieben, mit Hilfe einer Multiplex-Platte (*Procarta Plex*, Thermo Fisher) gemessen. Dargestellt ist jedes Replikat mit Median ($n = 4$). Signifikante Unterschiede wurden durch einfaktorische Varianzanalyse (One-way ANOVA) mit Tukey post-Test ermittelt. Signifikanzniveaus: * $p < 0,05$ für PAR4^{+/+} SF zu PAR4^{+/+} HFF und # $p < 0,05$ für PAR4^{-/-} HFF zu PAR4^{+/+} HFF.

3.7 Beeinflusst PAR4 die transkriptionelle Regulation verschiedener Zytokine und Chemokine im weißen oder braunen Fett- bzw. im Lebergewebe?

Eine hochkalorische Fettfütterung bewirkt eine Änderung im Gleichgewicht der Zytokin- und Chemokinproduktion in verschiedener Ausprägung in unterschiedlichen Organen. Die davon betroffenen Organe sind hierbei unter anderem die Leber, das epididymale weiße und das interskapuläre braune Fettgewebe [168]. In der Leber kommt es durch Einlagerung von Lipiden zu einer Störung der Kommunikation zwischen Hepatozyten und Nicht-parenchymalen Zellen. Dabei werden Zytokine und Chemokine sezerniert, die an der entstehenden Entzündung beteiligt sind.

In den nachfolgend ausgeführten Untersuchungen wurde die relative RNA-Expression unterschiedlicher Zytokine und Chemokine in Leber und Fettgewebe untersucht, um festzustellen, inwieweit es unter einer hochkalorischen Fettfütterung in den verschiedenen Geweben zu einer Veränderung der transkriptionellen Expression derselben kommt. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob PAR4 in Abhängigkeit vom untersuchten Gewebe einen Einfluss auf die Expression dieser Zytokine und Chemokine hat.

Zu diesem Zweck wurden Wildtyp-Mäuse und PAR4-defiziente Mäuse bis zu 30 Wochen mit hochkalorischem Fettfutter gefüttert und die RNA aus der Leber, dem epididymalen weißen und interskapulären braunen Fettgewebe, wie unter 2.2.5 und 2.2.6 beschrieben, isoliert. Die quantitative Analyse erfolgte mit Hilfe der qPCR-Methode.

Eine hochkalorische Fettfütterung wirkte sich nicht ausgeprägt auf die IL-6-Expression in den drei beobachteten Organen aus. Sowohl die IL-6- als auch die IL-10-Expression wurden in der Leber und in beiden Fettgeweben nur marginal induziert. Im weißen und braunen Fettgewebe konnte lediglich ein Trend für die IL-10-Expression beobachtet werden, der eine Zunahme im Verlauf der hochkalorischen Fütterung beschreibt.

PAR4 schien in der Leber und im braunen Fettgewebe die Expression von IL-10 zu fördern, wohingegen in der Leber die IL-6-Expression durch PAR4 eher gehemmt wurde (siehe Abbildung 11). Bemerkenswert ist, dass weder die hochkalorische Fettfütterung noch eine PAR4-Defizienz einen Einfluss auf die IL-6- und IL-10-Expression im epididymalen weißen Fettgewebe im gesamten Versuchszeitraum hatte.

Zusammenfassend führte sowohl die hochkalorische Fettfütterung als auch die PAR4-Defizienz nur zu einer marginalen Induktion der IL-6 und IL-10-Expression. PAR4 scheint daher in diesem Kontext keinen systematischen Einfluss auf die Zytokinexpression in den analysierten Geweben zu haben. Bei der Beurteilung der Daten ist allerdings zu beachten, dass das Gewebe als Ganzes untersucht wurde und nicht einzelne Zellpopulationen.

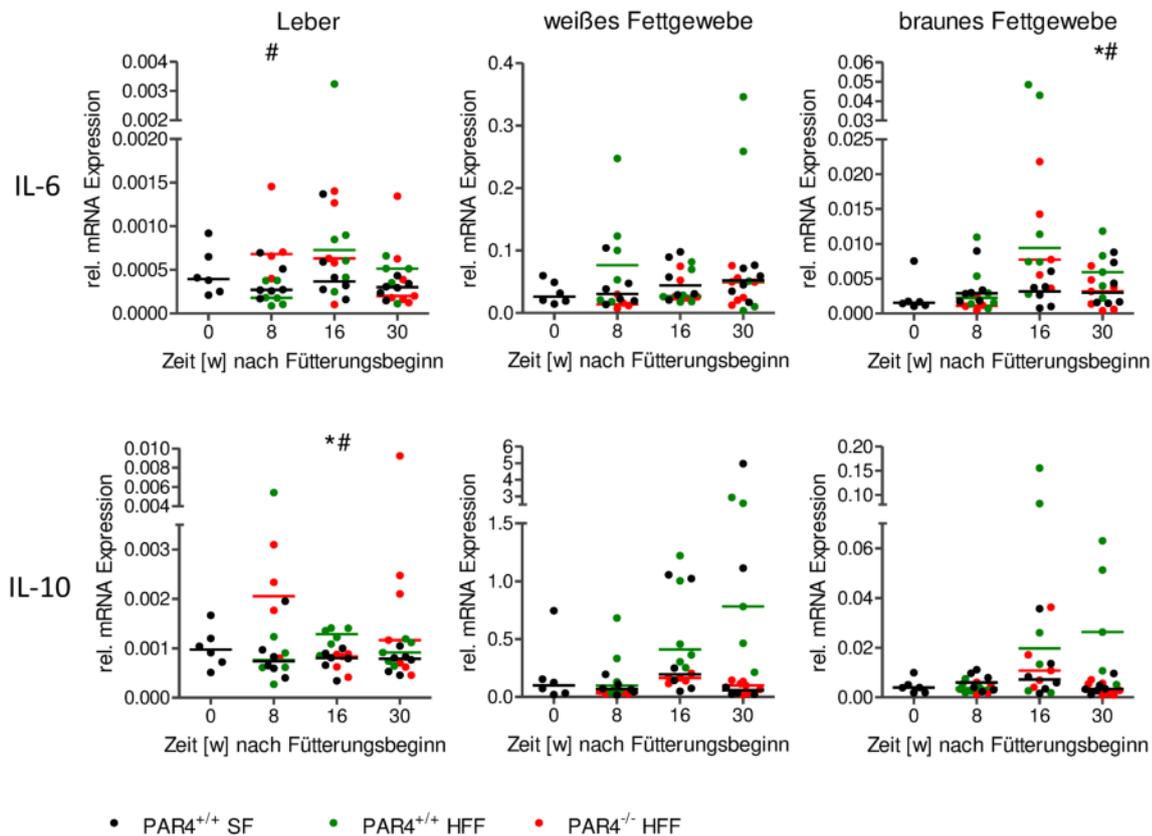


Abbildung 11: PAR4 beeinflusst die Expression von IL-6 und IL-10 in der Leber und im Fettgewebe.

Wildtyp-Mäuse und PAR4-defiziente Mäuse wurden bis zu 30 Wochen mit einer hochkalorischen Fettfütterung (HFF) gefüttert, eine Wildtyp-Gruppe wurde mit Standardtierfutter gefüttert (SF). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Leber, das epididymale weiße Fettgewebe und das interskapuläre braune Fettgewebe, wie unter 2.2.3 beschrieben, entnommen. Die RNA wurde, wie unter 2.2.5 und 2.2.6 beschrieben, isoliert, in cDNA umgeschrieben (siehe 2.2.7) und die relative RNA-Expression von IL-6 und IL-10 wurde in der qPCR gemessen (siehe 2.2.8). Als Kontrollgen wurde SDHA verwendet. Die relative Expression wurde aus dem potenzierten negativen Ct-Wert berechnet, nachdem der Ct-Wert des Kontrollgens vom Ct-Wert des zu untersuchenden Gens abgezogen wurde. Dargestellt ist jedes Replikat mit Median (n = 4-7). Signifikante Unterschiede wurden durch einfaktorische Varianzanalyse (One-way ANOVA) mit Tukey post-Test ermittelt. Signifikanzniveaus: *p < 0,05 für PAR4^{+/+} SF zu PAR4^{+/+} HFF und #p < 0,05 für PAR4^{-/-} HFF zu PAR4^{+/+} HFF.

Die Chemokine CCL2 und CXCL2 sind besonders für die Rekrutierung von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten von zentraler Bedeutung [13–15]. Die Untersuchung der relativen RNA-Expression dieser Chemokine kann Aufschluss darüber geben, wann und in welchen Organen es während einer hochkalorischen Fütterung zu einem Rekrutierungssignal kommt und ob PAR4 diesen Entzündungsmechanismus beeinflusst. Die hochkalorische Fettfütterung führte nach 16 Wochen Fettfütterung zu einem Anstieg der CCL2-Expression sowohl in der Leber und im epididymalen weißen Fettgewebe als auch im interskapulären braunen Fettgewebe.

In der Leber konnte die erhöhte CCL2-Expression bereits ab der 12. Woche bis zur 20. Woche der Fettfütterung festgestellt werden (siehe Abbildung 25). Die erhöhte CCL2-Expression konnte auch noch nach 30 Wochen Fettfütterung im epididymalen weißen Fettgewebe beobachtet werden und wies einen tendenziell ansteigenden Verlauf auf. PAR4 beeinflusste im besonderen Maße die CCL2-Expression im epididymalen weißen Fettgewebe von Fütterungswoche 8 an bis zur 30. Woche. Dabei führte eine PAR4-Defizienz zunächst nach 8 Wochen Fettfütterung zu einer erhöhten CCL2-Expression, wohingegen nach 16 und 30 Wochen Fettfütterung eine signifikant niedrigere CCL2-Expression im Vergleich zur HFF-Wildtypgruppe beobachtet wurde. In Fütterungswoche 16 führte PAR4 zu einer Hochregulation von CCL2 in der Leber.

Die CXCL2-Expression wurde vor allem in der Leber durch die hochkalorische Fettfütterung bereits nach 8 Fütterungswochen hochreguliert. Diese blieb über den gesamten Versuchszeitraum erhöht. Im interskapulären braunen Fettgewebe konnte nur nach 16 Wochen Fettfütterung ein signifikanter Anstieg der CXCL2-Expression beobachtet werden. Eine PAR4-Defizienz wirkte sich nur in der Leber zu einem frühen Zeitpunkt der Fettfütterung (8 Wochen) aus. Zu diesem Zeitpunkt lag die CXCL2-Expression in der Leber signifikant niedriger vor als in der HFF-Wildtyp-Gruppe (siehe Abbildung 12). Die hier aufgeführten Daten legen nahe, dass die CCL2-Expression im epididymalen weißen Fettgewebe unter hochkalorischer Fettfütterung PAR4-abhängig erfolgt. Zusätzlich wiesen die CCL2- und CXCL2-Expression in allen drei untersuchten Organen unter einer hochkalorischen Fütterung einen tendenziellen Anstieg auf, der zum Teil signifikant war.

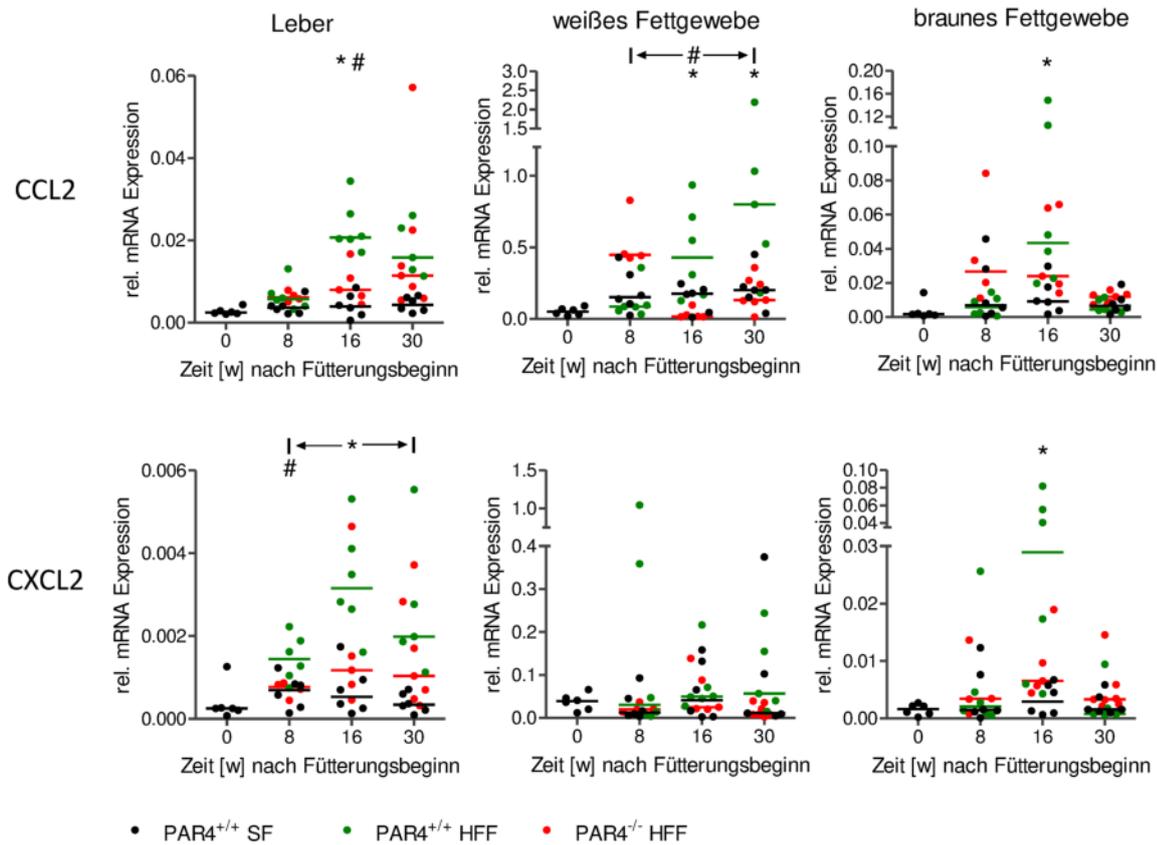


Abbildung 12: PAR4 beeinflusst die Expression von CCL2 und CXCL2 zu in der Leber und im Fettgewebe.

Wildtyp-Mäuse und PAR4-defiziente Mäuse wurden bis zu 30 Wochen mit einer hochkalorischen Fettfütterung (HFF) gefüttert, eine Wildtyp-Gruppe wurde mit Standardtierfutter gefüttert (SF). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Leber, das epididymale weiße Fettgewebe und das interskapuläre braune Fettgewebe, wie unter 2.2.3 beschrieben, entnommen. Die RNA wurde, wie unter 2.2.5 und 2.2.6 beschrieben, isoliert, in cDNA umgeschrieben (siehe 2.2.7) und die relative RNA-Expression von CCL2 und CXCL2 wurde in der qPCR gemessen (siehe 2.2.8). Als Kontrollgen wurde SDHA verwendet. Die relative Expression wurde aus dem potenzierten negativen Ct-Wert berechnet, nachdem der Ct-Wert des Kontrollgens vom Ct-Wert des zu untersuchenden Gens abgezogen wurde. Dargestellt ist jedes Replikat mit Median ($n = 4-7$). Signifikante Unterschiede wurden durch einfaktorische Varianzanalyse (One-way ANOVA) mit Tukey post-Test ermittelt. Signifikanzniveaus: * $p < 0,05$ für PAR4^{+/+} SF zu PAR4^{+/+} HFF und # $p < 0,05$ für PAR4^{-/-} HFF zu PAR4^{+/+} HFF.

Die Zytokine TNF- α und IFN- β werden im Rahmen von Entzündungsgeschehen vor allem durch Makrophagen sezerniert [114, 115]. Daher wurden sie auch im Kontext der Entstehung einer nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung und einer Insulinresistenz in davon betroffenen Organen untersucht. Die TNF- α -Expression wurde durch die hochkalorische Fettfütterung nach 16 Wochen Fütterung in der Leber und nach 30 Wochen im epididymalen weißen Fettgewebe hochreguliert. PAR4 beeinflusste die TNF- α -Expression nach 8 Wochen Fettfütterung in der Leber und führt zu einer TNF- α -Expression, die ähnlich zur Standardfutter-Gruppe ist. Im interskapulären braunen Fettgewebe wies die TNF- α -Expression durch die hochkalorischen Fettfütterung eine tendenziell steigende Expression auf, wobei diese aber zu keinem Zeitpunkt signifikant war. Die PAR4-defizienten Mäuse wiesen diese tendenzielle Induktion der TNF- α -Expression nicht auf (siehe Abbildung 13).

In der Leber wurde eine tendenziell gesteigerte Induktion der IFN- β -Expression festgestellt. Gleichzeitig konnte beobachtet werden, dass eine PAR4-Defizienz zu diesem Zeitpunkt zu einer ähnlichen IFN- β -Expression führte, welche die Wildtypkontrollmäuse aufwiesen, die mit Standardfutter gefüttert wurden. Das gleiche Phänomen betraf das epididymale weiße Fettgewebe zur Fütterungswoche 16, bei dem eine hochkalorische Fettfütterung und ein PAR4-Einfluss zu einer gesteigerten IFN- β -Expression führten. Besonders in diesem Organ scheint PAR4 einen systematischen Einfluss zu haben, da im gesamten Versuchsverlauf die PAR4-defizienten Mäuse auf dem Niveau der Standardfutter-Mäuse blieben. Die IFN- β -Expression im interskapulären braunen Fettgewebe wurde durch die hochkalorische Fütterung oder durch PAR4 nicht beeinflusst (siehe Abbildung 13).

Beim Vergleich der Zytokin- und Chemokin-Expressionen in den unterschiedlichen Organen fiel auf, dass der Unterschied der relativen RNA-Expression zwischen den Organen sehr groß war. Während in der Leber relativ wenig RNA vorlag, war die relative RNA-Expression der untersuchten Zytokine und Chemokine im epididymalen weißen Fettgewebe und im interskapulären braunen Fettgewebe deutlich höher.

Im Hinblick auf letzteres muss berücksichtigt werden, dass Hepatozyten etwa 70 % der Zellpopulationen in der Leber ausmachen. Unter anderem, noch unveröffentlichte, Untersuchungen der Arbeitsgruppe belegen, dass hoch aufgereinigte murine Hepatozyten in Abhängigkeit vom Stimulus zwar Chemokine exprimieren können, jedoch keine Zytokine wie TNF- α , IFN- β , IL-6 oder IL-10. Entsprechend ist die relativ niedrige Transkriptexpression für Zytokine in der Leber darauf zurückzuführen, dass Immun-

zellpopulationen in der Leber im Hinblick auf die Gesamtzellmasse nur einen vergleichsweise geringen Anteil ausmachen. Entsprechend sind Transkripte, die aus diesen Zellpopulationen stammen, relativ gering.

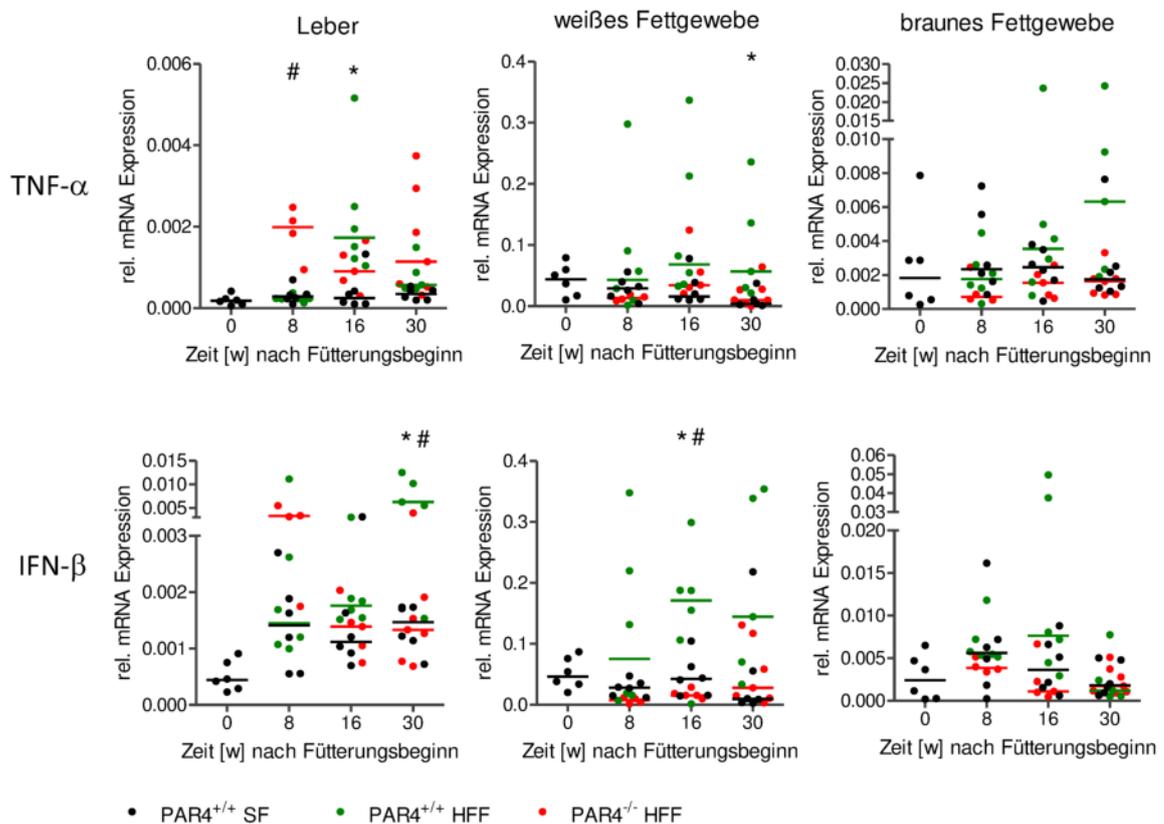


Abbildung 13: PAR4 beeinflusst die Expression von TNF- α und IFN- β in der Leber und im Fettgewebe.

Wildtyp-Mäuse und PAR4-defiziente Mäuse wurden bis zu 30 Wochen mit einer hochkalorischen Fettfütterung (HFF) gefüttert, eine Wildtyp-Gruppe wurde mit Standardfutter gefüttert (SF). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Leber, das epididymale weiße Fettgewebe und das interskapuläre braune Fettgewebe, wie unter 2.2.3 beschrieben, entnommen. Die RNA wurde, wie unter 2.2.5 und 2.2.6 beschrieben, isoliert, in cDNA umgeschrieben (siehe 2.2.7) und die relative RNA-Expression von TNF- α und IFN- β wurde in der qPCR gemessen (siehe 2.2.8). Als Kontrollgen wurde SDHA verwendet. Die relative Expression wurde aus dem potenzierten negativen Ct-Wert berechnet, nachdem der Ct-Wert des Kontrollgens vom Ct-Wert des zu untersuchenden Gens abgezogen wurde. Dargestellt ist jedes Replikat mit Median ($n = 4-7$). Signifikante Unterschiede wurden durch einfaktorische Varianzanalyse (One-way ANOVA) mit Tukey post-Test ermittelt. Signifikanzniveaus: * $p < 0,05$ für PAR4^{+/+} SF zu PAR4^{+/+} HFF und # $p < 0,05$ für PAR4^{-/-} HFF zu PAR4^{+/+} HFF.

Wie eingangs erwähnt, reguliert SOCS3 über eine negative Rückkopplung die Aktivierung des Insulinrezeptors (IR), d.h. eine Hochregulation der Expression von SOCS3 führt zu einer Inhibition des Insulinrezeptors [122, 169]. Daher sollte überprüft werden, ob es im Fettgewebe zu einer verstärkten Expression von SOCS3 durch die hochkalorische Fettfütterung kommt und ob PAR4 einen Einfluss darauf hat. Dazu wurden Wildtyp-Mäuse und PAR4-defiziente Mäuse bis zu 30 Wochen mit hochkalorischem Fettfutter gefüttert und die relative RNA-Expression von SOCS3 aus dem epididymalen weißen und interskapulären braunen Fettgewebe gemessen.

In beiden Fettgewebsarten wurde durch die hochkalorische Fettfütterung ein tendenzieller Anstieg der SOCS3-Expression beobachtet. Lediglich im braunen Fettgewebe führte eine hochkalorische Fettfütterung nach 30 Wochen zu einem signifikanten Anstieg der SOCS3-Expression. Interessanterweise schützte eine PAR4-Defizienz vor einer Hochregulation der SOCS3-Expression im gesamten Versuchsverlauf. Die Ergebnisse legen nahe, dass eine hochkalorische Fettfütterung in Abhängigkeit von der Zeit mit einer Zunahme der Expression von SOCS3 im weißen wie auch im braunen Fettgewebe einhergeht. Interessanter Weise scheint diese Hochregulation nur im braunen Fettgewebe PAR4-abhängig zu erfolgen.

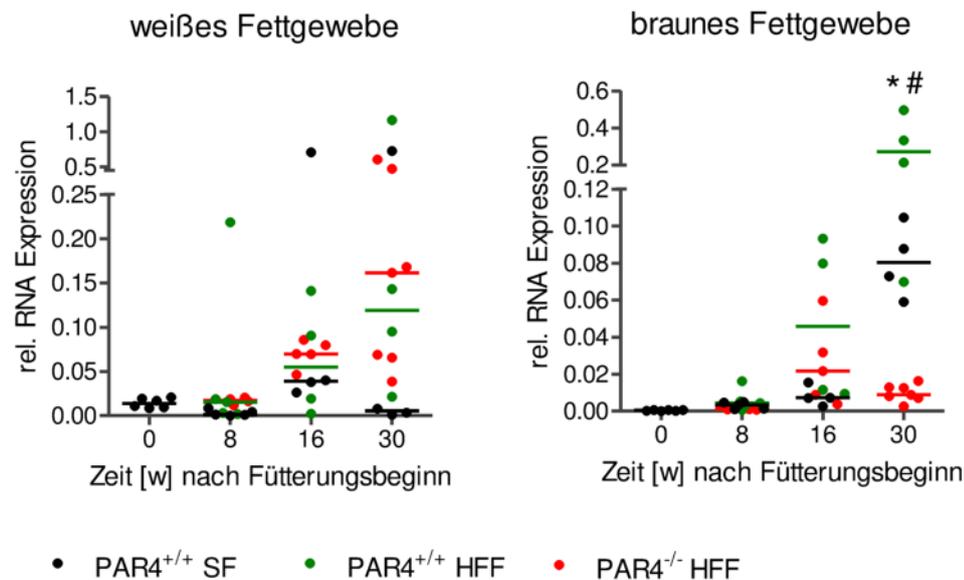


Abbildung 14: Die Hochregulation der Expression von SOCS3 wird im braunen, nicht jedoch im weißen Fettgewebe über PAR4 vermittelt.

Wildtyp-Mäuse wurden bis zu 30 Wochen mit hochkalorischem Fettfutter (HFF) gefüttert, eine Wildtyp-Gruppe wurde mit Standardfutter gefüttert (SF). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde das epididymale weiße und das interskapuläre braune Fettgewebe, wie unter 2.2.3 beschrieben, entnommen. Die RNA wurde, wie unter 2.2.6 beschrieben, isoliert, in cDNA umgeschrieben (siehe 2.2.7) und die relative RNA-Expression von SOCS3 wurde in der qPCR gemessen (siehe 2.2.8). Als Kontrollgen wurde SDHA verwendet. Die relative Expression wurde aus dem negativen potenzierten Ct-Wert berechnet, nachdem der Ct-Wert des Kontrollgens vom Ct-Wert des zu untersuchenden Gens abgezogen wurde. Dargestellt ist jedes Replikat mit Median (n = 4-6). Signifikante Unterschiede wurden durch einfaktorische Varianzanalyse (One-way ANOVA) mit Tukey post-Test ermittelt. Signifikanzniveaus: *p < 0,05 für PAR4^{+/+} SF zu PAR4^{+/+} HFF und #p < 0,05 für PAR4^{-/-} HFF zu PAR4^{+/+} HFF.

3.8 Beeinflusst PAR4 die Immunzellpopulationen der Leber während einer hochkalorischen Fettfütterung?

Eine hochkalorische Fettfütterung führt dem Organismus in einem Übermaß überschüssige Energie in Form von Lipiden zu. Durch verschiedene Regulationsmechanismen versucht der Organismus, dieser Flut von Nährstoffen gerecht zu werden, und lagert unter anderem Lipide in den Hepatozyten ein, um die Lipide aus dem Kreislauf zu entfernen. Dabei kommt es zu einem veränderten interzellulären Kommunikationsverhalten der Zellen in der Leber, welche zeitabhängig erfolgen, und es werden unter anderem Signalstoffe sezerniert, die dafür sorgen, dass Zellen von außerhalb der Leber in die Leber einwandern und so zum Entzündungsgeschehen beitragen [170].

Die nachfolgend ausgeführten Untersuchungen sollen klären, ob es im Verlauf einer hochkalorischen Fettfütterung in Abhängigkeit von der Zeit zu einer Veränderung der Immunzell-Population der Leber, besonders der Makrophagen und neutrophilen Granulozyten, kommt und ob PAR4 diese Veränderung maßgeblich beeinflusst. Neutrophile Granulozyten exprimieren Ly6G auf ihrer Oberfläche und können so mit einem passenden Antikörper markiert und gemessen werden [171]. Nahezu alle Makrophagen exprimieren F4/80 [172]. Dazu gehören sowohl die sessilen Gewebsmakrophagen als auch die aus der systemischen Zirkulation bzw. dem Knochenmark eingewanderten Monozyten/Makrophagen.

Weitere Makrophagenmarker sind Ly6C, CD68 und CD11b, wobei diese Moleküle nicht ausschließlich auf Makrophagen exprimiert werden [171, 173–175]. Kupfferzellen exprimieren beispielsweise im Gegensatz zu anderen Makrophagen nahezu kein CD11b [176]. CD11c charakterisiert führend dendritische Zellen, wurde aber auch auf Makrophagen nachgewiesen [177]. Ly6C gilt als Marker, der vorrangig auf rekrutierten Makrophagen und von Monozyten verstärkt exprimiert wird [171]. Daher wurde für die meisten untersuchten Marker F4/80 ko-gefärbt, damit sichergestellt war, dass nur Makrophagen analysiert wurden.

CD163 ist ein selektives Markermolekül, welches von sessilen Gewebsmakrophagen exprimiert wird [178]. Sowohl der Mannose-Rezeptor CD206 als auch der MHCII wird von sessilen Makrophagen gebildet. Diese Moleküle werden vermehrt von Kupfferzellen in der Leber exprimiert [178]. CD14 wird vermehrt von Makrophagen exprimiert, welche aus dem Knochenmark stammen [179]. Daher tragen sessile Lebermakrophagen dieses Molekül in geringerem Maße auf ihrer Oberfläche als Makrophagen, die aus der systemischen Zirkulation bzw. dem Knochenmark in die Leber eingewandert sind.

Zur Beantwortung der oben gestellten Frage, wurden Wildtyp-Mäuse und PAR4-defiziente Mäuse bis zu 30 Wochen mit hochkalorischem Fettfutter gefüttert. Aus der blutleeren und verdauten Leber wurde anschließend eine Einzelzellsuspension hergestellt, mit spezifischen Antikörpern gefärbt und im FACS-Messgerät analysiert.

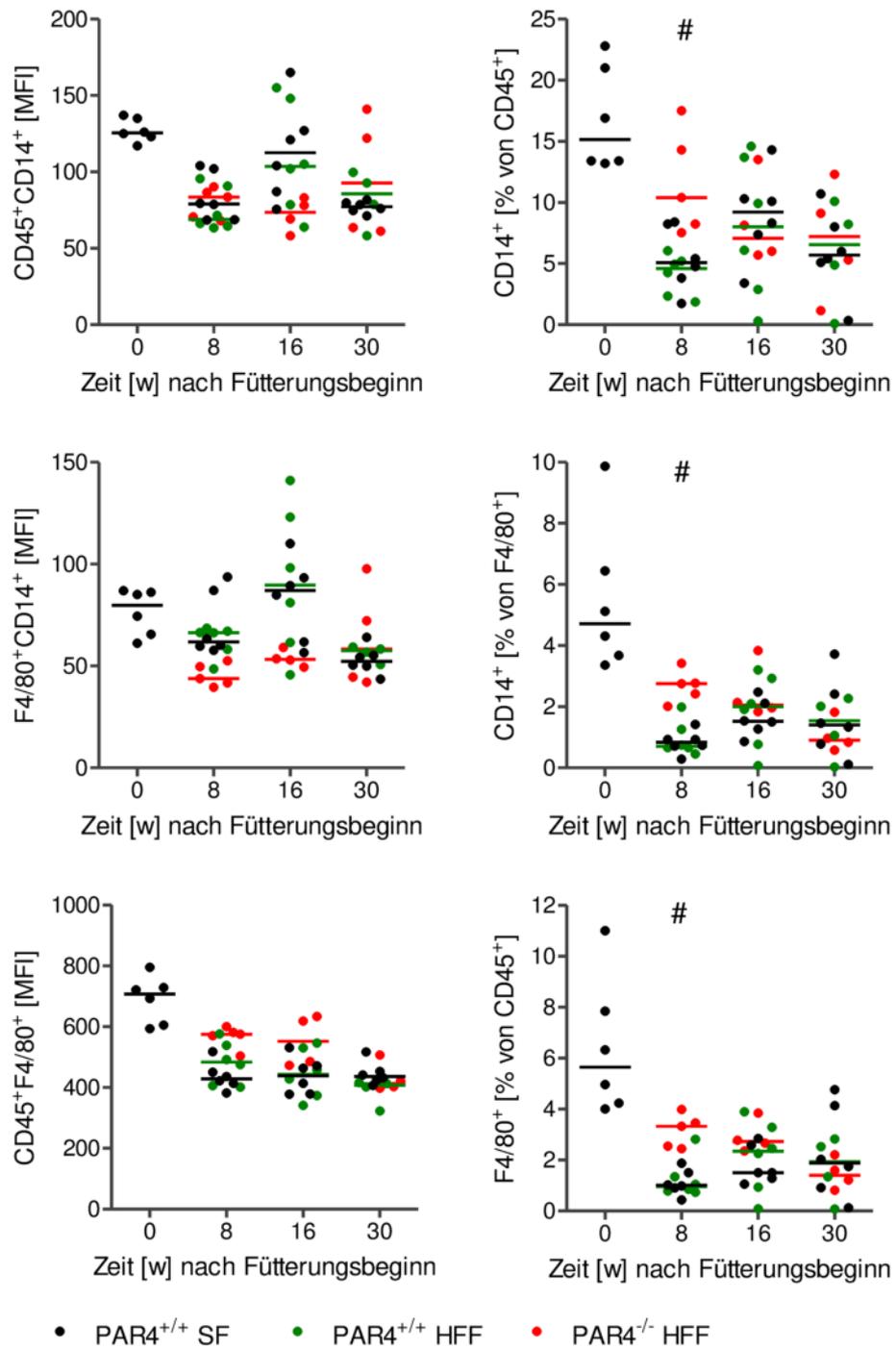
Eine hochkalorische Fettfütterung führt zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensität der CD45⁺Ly6G⁺-Population nach 16 Wochen Fütterung. Die Fluoreszenzintensität der F4/80⁺CD11b⁺-Population wurde durch die hochkalorische Fettfütterung ab der 20. Woche erhöht und behielt diesen signifikanten Unterschied bis zum Ende des Versuchszeitraumes bei. Die hochkalorische Fettfütterung führte aber auch zu einer Verringerung des Fluoreszenzsignals von Zellpopulationen im Vergleich zur Standardfutter-Gruppe. Dazu gehörten die F4/80⁺MHCII⁺-Population, welche in den Wochen 12 und 16 verringert vorlag, und die F4/80⁺TLR4⁺-Population, welche zu den Zeitpunkten 12 und 26 Wochen signifikant verringert vorlag.

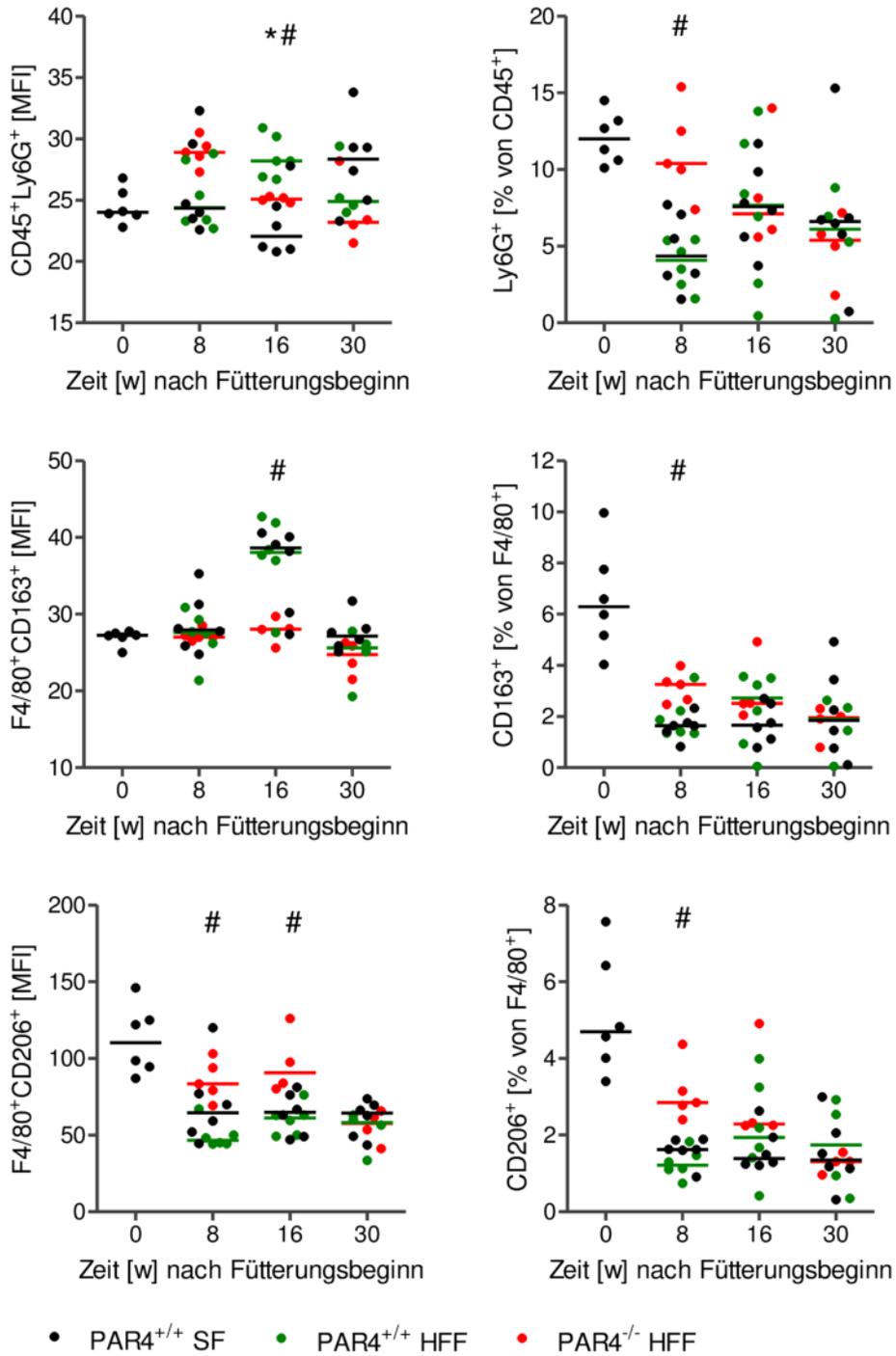
Der Einfluss von PAR4 betraf die meisten untersuchten Zellpopulationen. Eine PAR4-Defizienz bewirkte dabei stets eine Verringerung der Fluoreszenzintensitäten der Zellpopulation im Vergleich zur HFF-Wildtypgruppe. Die CD45⁺Ly6G⁺-, die F4/80⁺CD163⁺- und die F4/80⁺CD11c⁺-Population wiesen bei 16 Wochen Fettfütterung eine signifikant verringerte Fluoreszenzintensität auf. Die F4/80⁺CD11b⁺-Population war in Woche 8 der Fettfütterung unter PAR4-Defizienz signifikant verringert. Die F4/80⁺CD68⁺- und die F4/80⁺CD206⁺-Population wiesen in den Wochen 8 und 16 des Versuchs ein signifikant verringertes Fluoreszenzsignal auf.

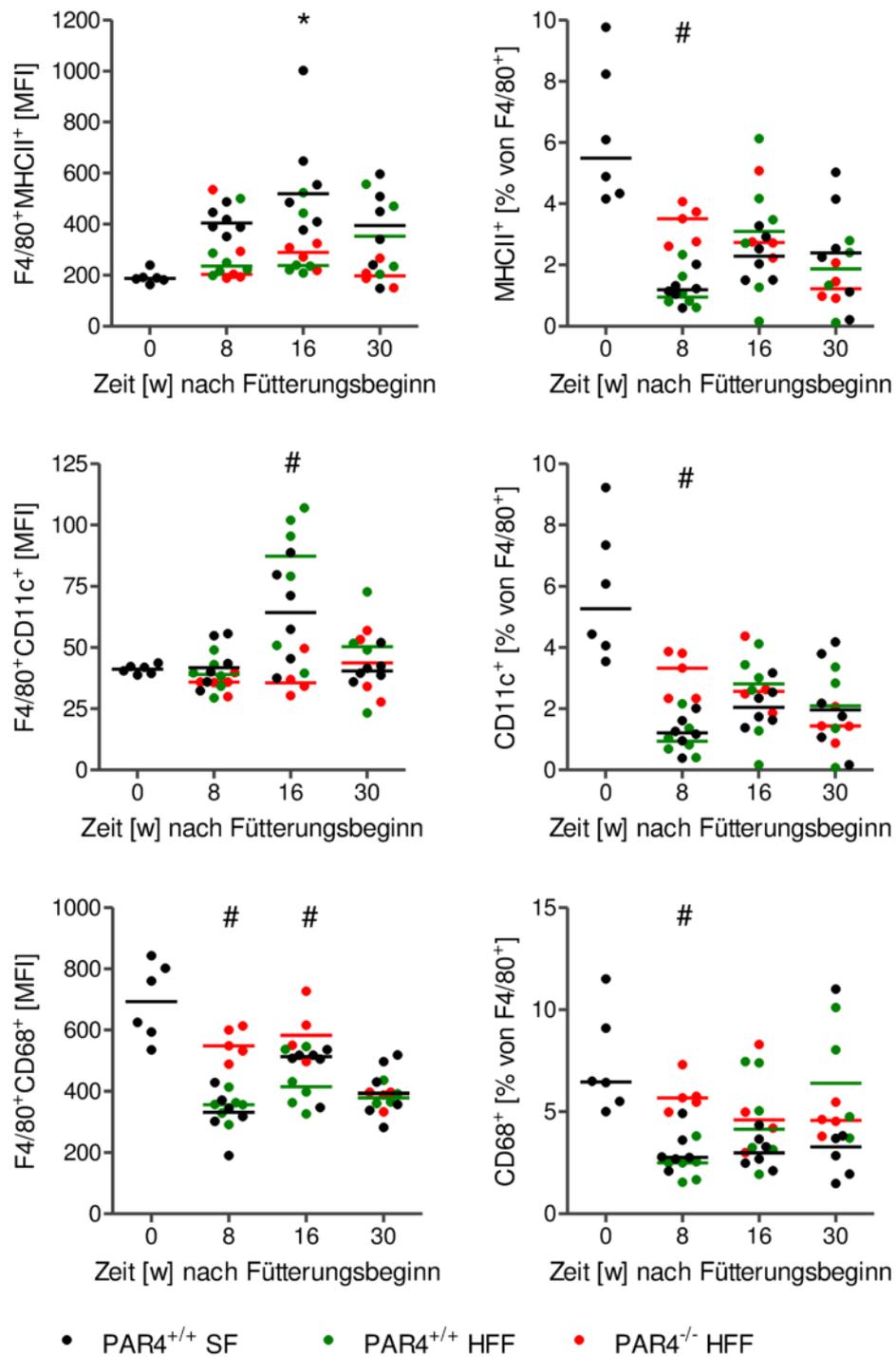
Die F4/80⁺CD14⁺-Population wies zwar keinen signifikanten Unterschied zwischen den Versuchsgruppen auf, jedoch konnte beobachtet werden, dass eine hochkalorische Fettfütterung zu tendenziell höheren Fluoreszenzsignalen dieser Population führte. Bei den PAR4-defizienten Tieren konnte diese Erhöhung der F4/80⁺CD14⁺-Population nicht beobachtet werden.

Interessanterweise wurden alle Unterschiede nach 8 bzw. 16 Wochen Fettfütterung festgestellt. Im späten Versuchszeitpunkt von 30 Wochen konnte kein PAR4-Einfluss auf die Immunzell-Populationen festgestellt werden. Zudem fiel auf, dass die Fluoreszenzintensitäten der verschiedenen Oberflächenmarker der Standardfutter-Gruppe über den Versuchszeitraum ebenfalls mitunter erheblich variierte. Dies weist darauf hin, dass auch das Alter der Mäuse einen, zum Teil erheblichen, Einfluss auf die Zusammensetzung bzw. Polarisierung der untersuchten Zellpopulationen in der Leber hatte.

Zur weiteren Beurteilung der Immunzellpopulationen wurde der relative Anteil der Subpopulation an der Gesamtpopulation bestimmt. Auffällig war, dass die Standardfuttermäuse zum Zeitpunkt von 0 Wochen höhere relative Anteile in allen untersuchten Populationen aufwiesen. Interessanterweise folgten alle analysierten Subpopulation während der hochkalorischen Fettfütterung dem gleichen Trend. In den PAR4-defizienten Mäusen waren die relativen Anteile der Subpopulationen nach Fütterungswoche 8 am größten und unterschieden sich signifikant von den relativen Anteilen der Subpopulationen der HFF-Wildtyp-Mäuse. Im weiteren Fütterungsverlauf wiesen die relativen Anteile der Subpopulationen der PAR4-defizienten Mäuse einen tendenziell sinkenden Verlauf auf. Der relative Anteil der Subpopulationen der HFF-Wildtyp-Mäuse war zu Beginn der Fettfütterung in Woche 8 am kleinsten, wurde größer (Fütterungswoche 16) und wurde danach wieder kleiner bzw. stagnierte.







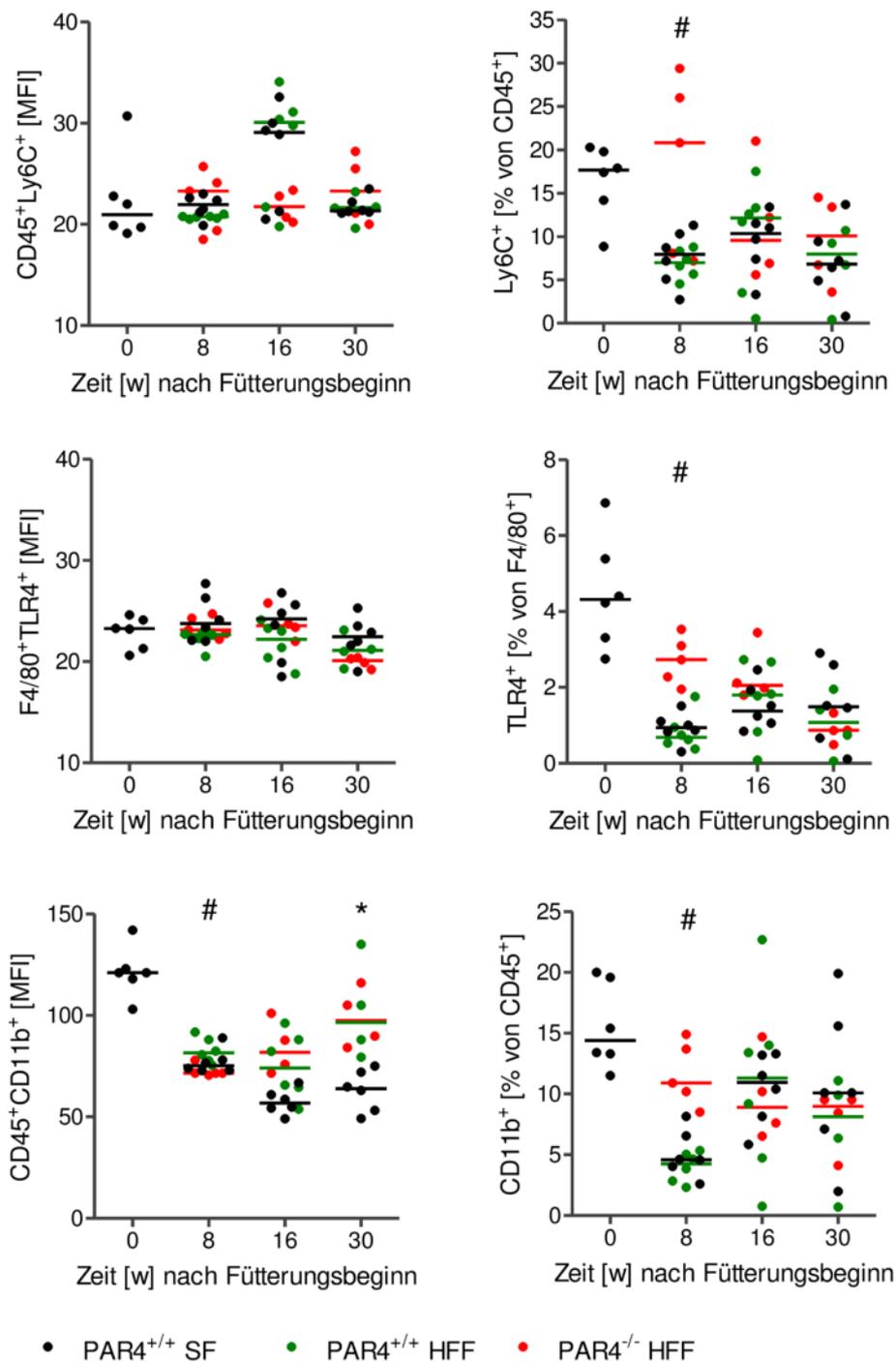


Abbildung 15: PAR4 beeinflusst verschiedene Immunzellpopulationen in der Leber.

Wildtyp- und PAR4-defiziente Mäuse wurden bis zu 30 Wochen mit hochkalorischem Fettfutter (HFF) gefüttert, eine Wildtyp-Gruppe wurde mit Standardfutter gefüttert (SF). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen, wie unter 2.2.10 beschrieben, isoliert und ihre mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) und der relative Anteil der Subpopulation an der Gesamtpopulation im FACS Canto II der Firma BD gemessen. Dargestellt ist jedes Replikat mit Median (n = 4-6). Signifikante Unterschiede wurden durch einfaktorische Varianzanalyse (One-way ANOVA) mit Tukey post-Test ermittelt. Signifikanzniveaus: *p < 0,05 für PAR4^{+/+} SF zu PAR4^{+/+} HFF und #p < 0,05 für PAR4^{-/-} HFF zu PAR4^{+/+} HFF.

3.9 Beeinflusst PAR4 die Einwanderung von Mac2⁺-Zellen in die Leber?

Wie vorangehend ausgeführt, beeinflusst eine hochkalorische Fettfütterung die Zusammensetzung bzw. Polarisierung der Makrophagenpopulationen der Leber mitunter erheblich. Um näher zu klären, ob PAR4 einen Einfluss auf die Größe der Makrophagenpopulationen hat, wurde in diesem Teil untersucht, ob PAR4 einen Einfluss auf die Einwanderung von Makrophagen hat.

Für die Beantwortung der Frage wurden Wildtyp-Mäuse und PAR4-defiziente Mäuse bis zu 30 Wochen mit hochkalorischem Fettfutter gefüttert. Zu Beginn sowie nach 8, 16 und 30 Wochen wurden die Lebern immunhistochemisch mit einem Mac2-Antikörper untersucht. Mac2 ist ein Synonym für Galectin-3, ein Molekül, welches vor allem in Makrophagen synthetisiert wird. Eine hochkalorische Fettfütterung führte ab 16 Wochen Fütterung zu einer signifikanten Zunahme Mac2⁺-Zellen in der Leber (vgl. Abbildungen 16 und 28).

Wie den in Abbildung 16 dargestellten Daten zu entnehmen ist, ist die Makrophagenpopulation in PAR4-defizienten Mäusen zu Woche 8 einer hochkalorischen Fettfütterung signifikant geringer als in entsprechenden Wildtyp-Mäusen. Diese Differenz verschwindet im Verlauf der späteren Zeitpunkte. Interessanterweise konnte im Versuchsverlauf ferner beobachtet werden, dass die Mac2⁺-Zellen eine andere Organisation aufwiesen. Lagen sie zu Beginn vereinzelt zwischen den Hepatozyten vor, lagerten sie sich vor allem zu späteren Versuchszeitpunkten zu sogenannten kronenartigen Strukturen ("crown-like structures", CLS) zusammen. PAR4 scheint auf dieses Phänomen keinen Einfluss zu haben, da diese Strukturen auch in PAR4-defizienten Lebern beobachtet werden konnten.

Zusammenfassend führt PAR4 zu Beginn einer hochkalorischen Fettfütterung zu einer Zunahme von Mac2⁺-Zellen, hat aber im weiteren Verlauf keinen Einfluss auf die Zunahme dieser Zellen.

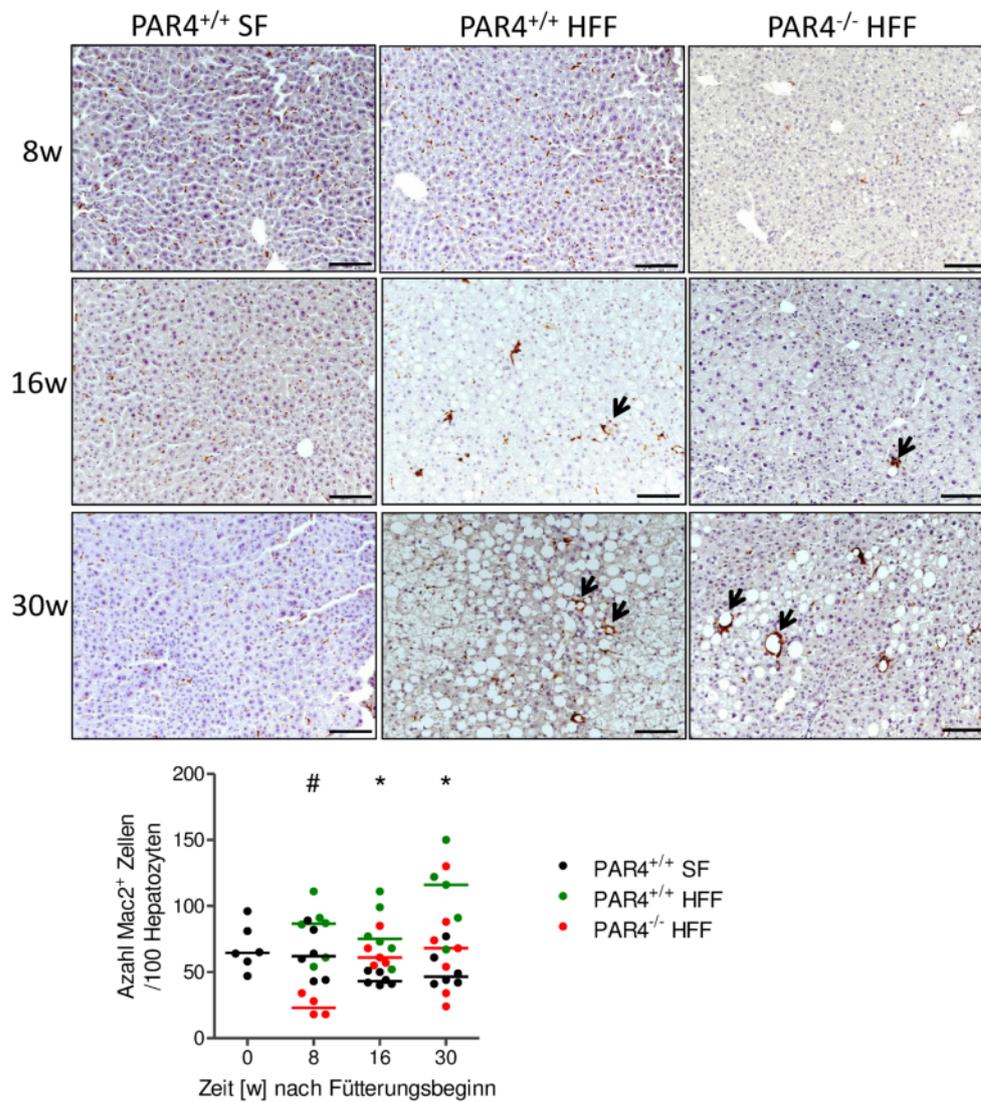


Abbildung 16: PAR4 beeinflusst die Akkumulation von Mac2⁺-Zellen im frühen Verlauf einer hochkalorischen Fettfütterung.

Wildtyp- und PAR4-defiziente Mäuse wurden bis zu 30 Wochen mit hochkalorischem Fettfutter (HFF) gefüttert, eine Wildtyp-Gruppe wurde mit Standardfutter gefüttert (SF). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die Leber, wie unter 2.2.3 beschrieben, entnommen und Paraffinschnitte, wie unter 2.2.9 beschrieben, angefertigt. Die Leberschnitte wurden dann, wie unter 2.2.9.1 beschrieben, mit einem Mac2-spezifischen Antikörper gefärbt und im Durchlichtmikroskop aufgenommen. Die Abbildung zeigt zu jedem Zeitpunkt ein repräsentatives Bild. Die quantitative Auswertung Mac2⁺-Zellen stellt jedes Replikat mit Median dar (n = 4-7). Der Maßstab entspricht 100 µm. Pfeile zeigen auf ausgewählte CLS. Signifikante Unterschiede wurden durch einfaktoruelle Varianzanalyse (One-way ANOVA) mit Tukey post-Test ermittelt. Signifikanzniveaus: *p < 0,05 für PAR4^{+/+} SF zu PAR4^{+/+} HFF und #p < 0,05 für PAR4^{-/-} HFF zu PAR4^{+/+} HFF.

3.10 Hat PAR4 einen Einfluss auf die Lipidakkumulation in der Leber?

Während einer hochkalorischen Fettfütterung kommt es zu einer sogenannten ektopen Lipidakkumulation in Geweben, die nicht dem Fettgewebe zuzuordnen sind. Das Organ, in dem zuerst Lipide eingelagert werden, ist die Leber. Die Leber sorgt somit dafür, dass überschüssige Lipide aus dem Kreislauf entfernt werden. Die Lipide werden in der Leber in Hepatozyten in Form von Vakuolen eingelagert. Da PAR4 einen Einfluss auf den Glukosemetabolismus und auf das Gleichgewicht im Fettgewebe hat, wurde untersucht, ob PAR4 die Lipidakkumulation in der Leber beeinflusst.

Für die Untersuchung wurden Wildtyp-Mäuse und PAR4-defiziente Mäuse bis zu 30 Wochen mit hochkalorischem Fettfutter gefüttert. Zu Beginn und nach 8, 16 und 30 Wochen wurde die Leber histologisch mit Hilfe der Ölrot O-Färbung auf eine Lipidanreicherung im Hepatozyten untersucht. Eine hochkalorische Fettfütterung führte ab 8 Wochen zu einer verstärkten Lipideinlagerung in den Hepatozyten (siehe Abbildungen 17 und 29). Eine PAR4-Defizienz sorgte dafür, dass nach 8 und 16 Wochen signifikant weniger Lipide eingelagert wurden. Die Ergebnisse legen nahe, dass PAR4 zu Beginn und im mittleren Verlauf einer hochkalorischen Fettfütterung dafür sorgt, dass vermehrt Lipide aus dem Kreislauf in die Leber eingelagert werden.

Nach 30 Wochen Fettfütterung ließ sich auf Basis der verwendeten Methodik zur Quantifizierung der Fetteinlagerung im Lebergewebe kein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp-Mäusen und Mäusen mit PAR4-Defizienz unter hochkalorischer Fettfütterung nachweisen. Die Auswertung der histologischen Schnitte und hierbei insbesondere der H&E Färbung (Abbildung 18) legen jedoch nahe, dass in Mäusen, in denen das PAR4-Gen deletiert ist, auch zu Woche 30 im Vergleich zu entsprechenden Wildtyp-Mäusen noch deutliche Unterschiede bestehen. So lässt sich bei PAR4-defizienten Mäusen auch nach 30 Wochen Fettfütterung ein zu Woche 16 vergleichbares histologisches Bild nachweisen, in welchem, anders als in Wildtyp-Mäusen, die Fetteinlagerung zunächst überwiegend in den periportalen Hepatozyten zu erfolgen scheint, während perizentrale Hepatozyten in den meisten Leberläppchen kaum Fetteinlagerungen aufweisen.

Im Gegensatz hierzu scheint in den Wildtyp-Mäusen die Fettleinlagerung hingegen von perizentral nach periportal fortzuschreiten, so dass im Lebergewebe von Wildtyp-Mäusen, die über 30 Wochen hochkalorisches Fettfutter erhielten, keine eindeutigen regionalen Unterschiede mehr nachweisbar waren. Darüber hinaus wiesen die Hepatozyten der PAR4-defizienten Mäuse eine kleinere Größe auf und enthielten feintröpfigere Lipidvakuolen als die Hepatozyten der HFF-Wildtyp-Mäuse.

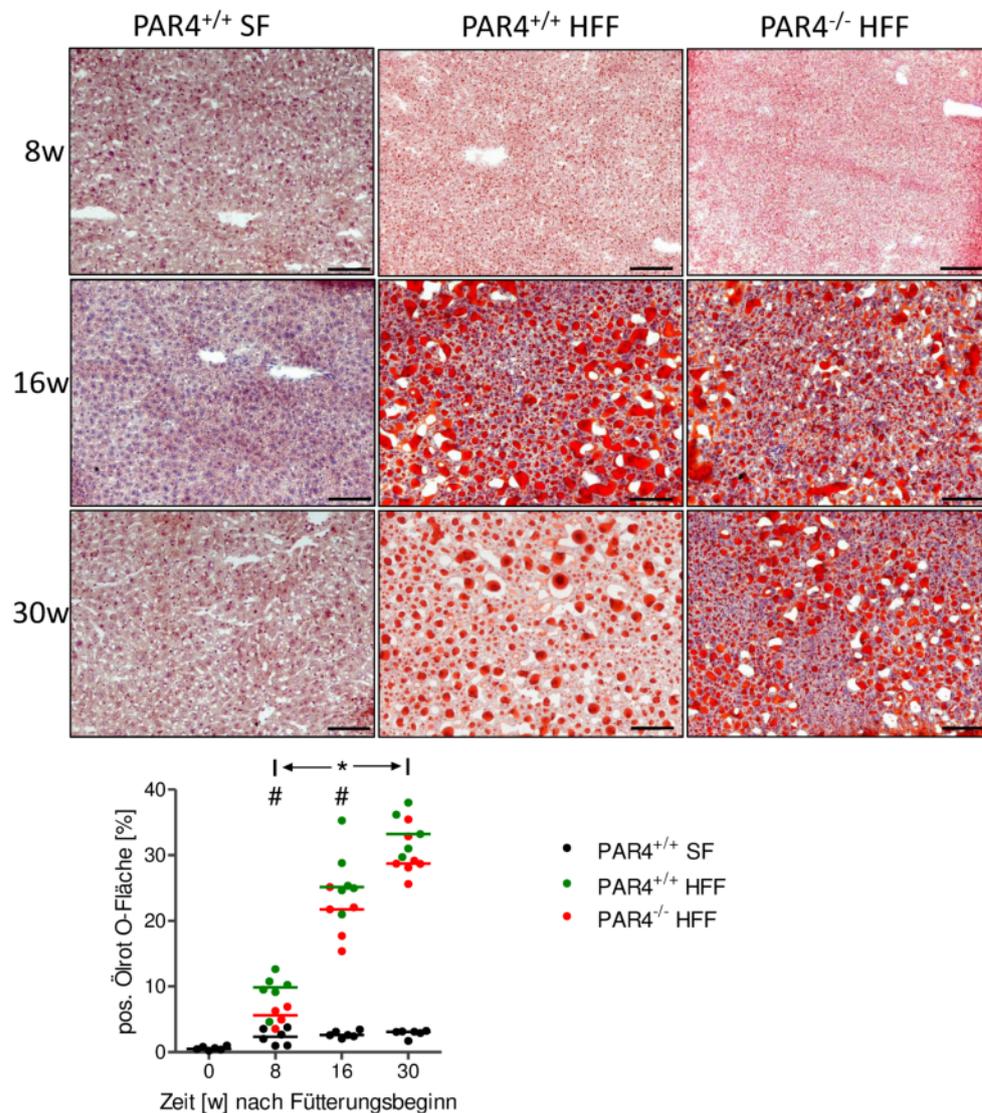


Abbildung 17: PAR4 beeinflusst die Fettakkumulation in der Leber nach 8 und 16 Wochen einer hochkalorischen Fettfütterung.

Wildtyp- und PAR4-defiziente Mäuse wurden bis zu 30 Wochen mit hochkalorischem Fettfutter (HFF) gefüttert, eine Wildtyp-Gruppe wurde mit Standardfutter gefüttert (SF). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die Leber, wie unter 2.2.3 beschrieben, entnommen und Paraffinschnitte, wie unter 2.2.9 beschrieben, angefertigt. Die Leberschnitte wurden dann, wie unter 2.2.9.2 beschrieben, gefärbt und im Durchlichtmikroskop aufgenommen. Die Abbildung zeigt zu jedem Zeitpunkt ein repräsentatives Bild. Die quantitative Auswertung der Ölot O-positiven Fläche stellt jedes Replikat mit Median dar (n = 4-7). Der Maßstab entspricht 100 µm. Signifikante Unterschiede wurden durch einfaktorielle Varianzanalyse (One-way ANOVA) mit Tukey post-Test ermittelt. Signifikanzniveaus: *p < 0,05 für PAR4^{+/+} SF zu PAR4^{+/+} HFF und #p < 0,05 für PAR4^{-/-} HFF zu PAR4^{+/+} HFF.

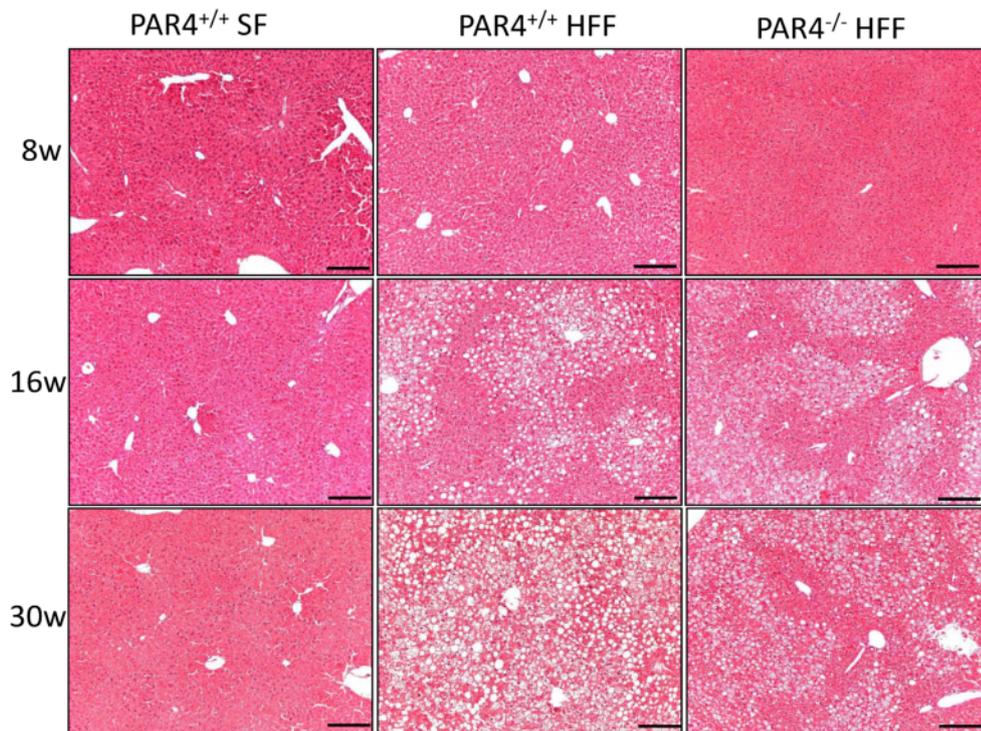


Abbildung 18: Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Leberschnitten zu verschiedenen Zeitpunkten einer hochkalorischen Fettfütterung.

Wildtyp- und PAR4-defiziente Mäusen wurden bis zu 30 Wochen mit hochkalorischem Fettfutter (HFF) gefüttert, eine Wildtyp-Gruppe wurde mit Standardfutter gefüttert (SF). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die Leber, wie unter 2.2.3 beschrieben, entnommen und Paraffinschnitte, wie unter 2.2.9 beschrieben, angefertigt. Die Leberschnitte wurden dann, wie unter 2.2.9.3 beschrieben, gefärbt und im Durchlichtmikroskop aufgenommen. Die Abbildung zeigt zu jedem Zeitpunkt ein repräsentatives Bild. Der Maßstab entspricht 100 μm .

3.11 Beeinflusst PAR4 die Kollageneinlagerung und damit die Fibrosebildung in der Leber?

Durch die erhöhte Aufnahme von Lipiden im Rahmen einer hochkalorischen Fettfütterung kommt es zu einer Schädigung der Leber. Die dafür verantwortlichen Noxen sind die eingelagerten Lipide in den Hepatozyten. Erfolgt diese Schädigung über einen längeren Zeitraum, sind mehr und mehr Hepatozyten betroffen und es kommt zu einer niedrig-gradigen Entzündung, bei der der Gewebeverband zum Teil zerstört wird. Bei dieser Entzündung spielen eine große Anzahl unterschiedlicher Signalstoffe und Zelltypen eine Rolle. Unter anderem kommt es zur Aktivierung von Fibroblasten und hepatischen Sternzellen, die vermehrt interstitielles Bindegewebe produzieren, um den geschädigten Gewebeverband zu reparieren. Dieses neue Gewebe kann aber die Organfunktion nicht erfüllen und ist ein Maß für die zunehmende Schädigung und Funktionseinschränkung des betroffenen Organs [180].

Da PAR4 nach 8 und 16 Wochen einer hochkalorischen Fettfütterung einen Einfluss auf die Lipidakkumulation aufwies, wurde vermutet, dass PAR4 ebenso Reparaturvorgänge, wie die Bildung von Bindegewebe und die Entstehung von Fibrose, beeinflussen könnte. Für diese Untersuchung wurden Wildtyp-Mäuse und PAR4-defiziente Mäuse bis zu 30 Wochen lang mit hochkalorischem Fettfutter gefüttert und die Lebern zu Beginn sowie nach 8, 16 und 30 Wochen histologisch mit einer Picro-Siriusrot-Färbung behandelt.

Wie in Abbildung 19 zu sehen ist, führte eine hochkalorische Fettfütterung ab 8 Wochen zu einem Anstieg des Kollagengehaltes in der Leber (vgl. hierzu die Abbildungen 19 und 30). PAR4 wirkte sich dabei nicht auf das Ausmaß des Kollagengehaltes aus, da kein Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden konnte, die mit der hochkalorischen Fettfütterung behandelt wurden. PAR4 scheint daher keinen Einfluss auf Signale oder Zellen zu haben, die mit einer vermehrten Kollagenbildung assoziiert sind.

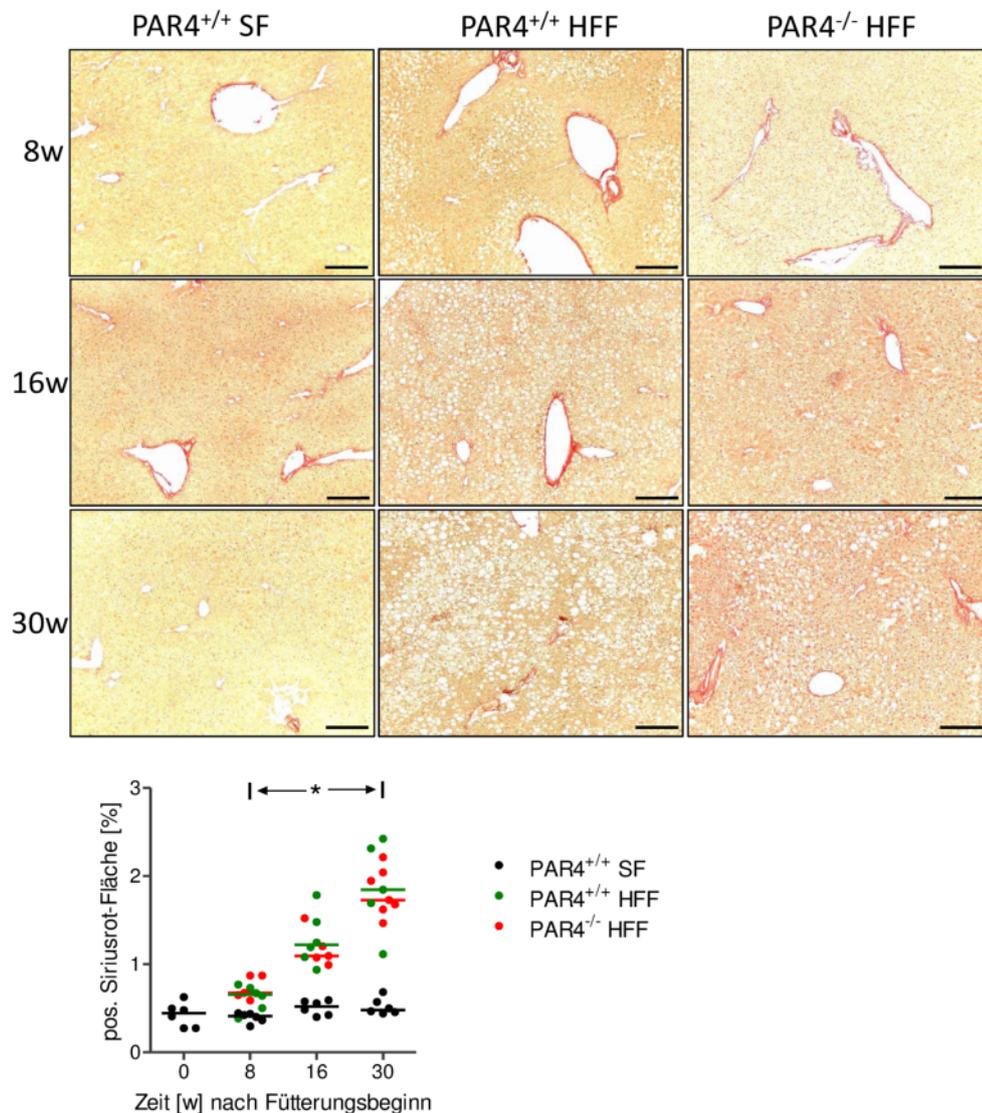


Abbildung 19: PAR4 hat keinen Einfluss auf die Fibrosebildung während einer hochkalorischen Fettfütterung.

Wildtyp- und PAR4-defiziente Mäuse wurden bis zu 30 Wochen mit hochkalorischem Fettfutter (HFF) gefüttert, eine Wildtyp-Gruppe wurde mit Standardfutter gefüttert (SF). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die Leber, wie unter 2.2.3 beschrieben, entnommen und Paraffinschnitte, wie unter 2.2.9 beschrieben, angefertigt. Die Leberschnitte wurden dann, wie unter 2.2.9.4 beschrieben, gefärbt und im Durchlichtmikroskop aufgenommen. Die Abbildung zeigt zu jedem Zeitpunkt ein repräsentatives Bild. Die quantitative Auswertung der Piko-Siriusrot-positiven Fläche stellt jedes Replikat mit Median dar (n = 4-7). Der Maßstab entspricht 100 µm. Signifikante Unterschiede wurden durch einfaktorische Varianzanalyse (One-way ANOVA) mit Tukey post-Test ermittelt. Signifikanzniveaus: *p < 0,05 für PAR4^{+/+} SF zu PAR4^{+/+} HFF und #p < 0,05 für PAR4^{-/-} HFF zu PAR4^{+/+} HFF.

3.12 Beeinflusst PAR4 die Homöostase des Fettgewebes während einer hochkalorischen Fettfütterung?

Während einer hochkalorischen Fettfütterung wird dem Organismus vermehrt Fett zugeführt. Dieses wird im Fettgewebe und in ektopen Lipidspeichern wie der Leber angereichert [181]. Wie in vorangegangenen Ergebnissen gezeigt, beeinflusst PAR4 den Glukosemetabolismus im Verlauf der hochkalorischen Fettfütterung. In diesem Abschnitt wurde der Einfluss von PAR4 auf das Fettgewebe untersucht, da besonders das Fettgewebe empfindlich auf eine Störung des Glukose- und Lipidhaushalts reagiert.

Für die Untersuchung des Fettgewebes wurden Wildtyp-Mäuse und PAR4-defiziente Mäuse bis zu 30 Wochen mit hochkalorischem Fettfutter gefüttert. Zu Beginn und nach 8, 16 und 30 Wochen wurden das epididymale weiße und das interskapuläre braune Fettgewebe immunhistochemisch mit einem spezifischen Antikörper für Mac2, einem Makrophagenmarker, untersucht.

Eine hochkalorische Fettfütterung bewirkte eine Vergrößerung der mittleren Adipozytengröße im epididymalen weißen Fettgewebe im gesamten Versuchszeitraum, wobei eine PAR4-Defizienz zunächst eine Vergrößerung verzögerte (8 Wochen in Abbildung 20), aber nach 16 und 30 Wochen Fütterung keinen Einfluss auf die mittlere Adipozytengröße hatte. Die Mac2⁺-Zellen, welche in Braun dargestellt sind, fanden sich vermehrt im epididymalen weißen Fettgewebe im Rahmen einer hochkalorischen Fettfütterung in Form von kronenartigen Strukturen ("crown-like structures", CLS). Eine PAR4-Defizienz führte allerdings dazu, dass die Akkumulierung dieser Zellen ins epididymale weiße Fettgewebe geringer war und weniger CLS vorlagen als in der fettgefütterten Wildtyp-Gruppe.

Der Einfluss von PAR4 im interskapulären braunen Fettgewebe führte zu einer Vergrößerung der mittleren Adipozytengröße ab 8 Wochen Fettfütterung. Fehlte dieser Einfluss, war diese Vergrößerung im gesamten Fütterungszeitraum signifikant kleiner. Ähnlich wie im epididymalen weißen Fettgewebe bewirkte PAR4 eine Zunahme Mac2⁺-Zellen, welche auch in diesem Fettgewebe als CLS angeordnet vorlagen. Fehlte PAR4, fanden sich deutlich weniger CLS im braunen Fettgewebe.

Zusammenfassend weisen die Beobachtungen darauf hin, dass PAR4 Einfluss darauf nimmt, in welchem Maße die Adipozyten Lipide aufnehmen. Auch die Einwanderung von Mac2⁺-Zellen sowohl im epididymalen weißen als auch im interskapulären braunen Fettgewebe werden von PAR4 maßgeblich beeinflusst.

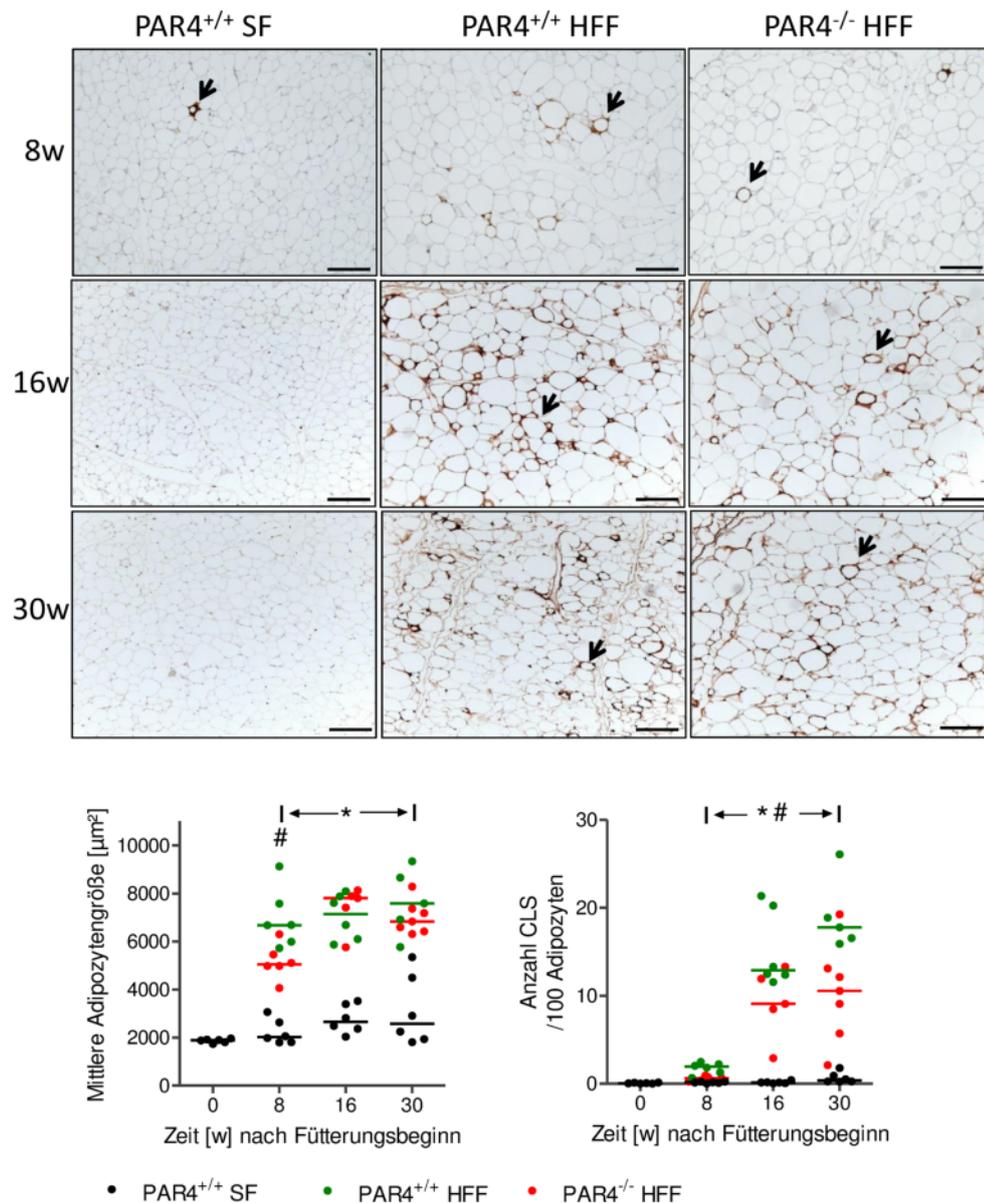


Abbildung 20: PAR4 beeinflusst anfangs die Adipozytengröße im epididymalen weißen Fettgewebe und bewirkt eine Akkumulation von Mac2⁺-Zellen im Verlauf einer hochkalorischen Fettfütterung.

Wildtyp- und PAR4-defiziente Mäuse wurden bis zu 30 Wochen mit hochkalorischem Fettfutter (HFF) gefüttert, eine Wildtyp-Gruppe wurde mit Standardfutter gefüttert (SF). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde das epididymale weiße Fettgewebe, wie unter 2.2.3 beschrieben, entnommen und Paraffinschnitte, wie unter 2.2.9 beschrieben, angefertigt. Die Schnitte wurden dann, wie unter 2.2.9.1 beschrieben, mit einem Mac2-spezifischen Antikörper gefärbt und im Durchlichtmikroskop aufgenommen. Die Abbildung zeigt zu jedem Zeitpunkt ein repräsentatives Bild. Die quantitative Auswertung der CLS stellt jedes Replikat mit Median dar ($n = 4-7$). Der Maßstab entspricht 200 μm . Pfeile zeigen auf ausgewählte CLS. Signifikante Unterschiede wurden durch einfaktorische Varianzanalyse (One-way ANOVA) mit Tukey post-Test ermittelt. Signifikanzniveaus: * $p < 0,05$ für PAR4^{+/+} SF zu PAR4^{+/+} HFF und # $p < 0,05$ für PAR4^{-/-} HFF zu PAR4^{+/+} HFF.

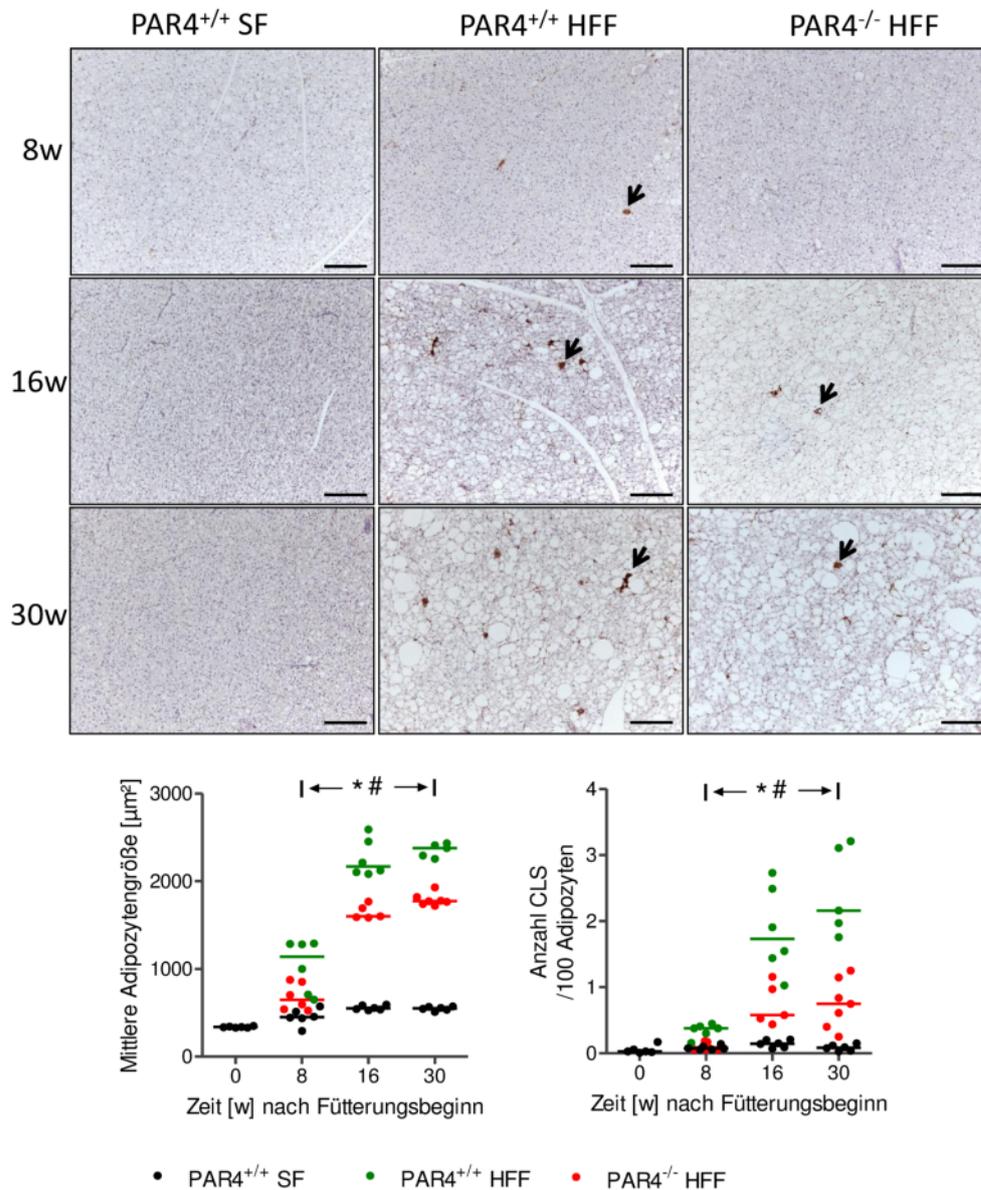


Abbildung 21: PAR4 beeinflusst die Adipozytengröße im interskapulären braunen Fettgewebe und bewirkt eine Akkumulation von Mac2⁺-Zellen im Verlauf einer hochkalorischen Fettfütterung.

Wildtyp- und PAR4-defiziente Mäusen wurden bis zu 30 Wochen mit hochkalorischem Fettfutter (HFF) gefüttert, eine Wildtyp-Gruppe wurde mit Standardtierfutter gefüttert (SF). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde das interskapuläre braune Fettgewebe, wie unter 2.2.3 beschrieben, entnommen und Paraffinschnitte, wie unter 2.2.9 beschrieben, angefertigt. Die Schnitte wurden dann, wie unter 2.2.9.1 beschrieben, mit einem Mac2-spezifischen Antikörper gefärbt und im Durchlichtmikroskop aufgenommen. Die Abbildung zeigt zu jedem Zeitpunkt ein repräsentatives Bild. Die quantitative Auswertung der CLS stellt jedes Replikat mit Median dar (n = 4-7). Der Maßstab entspricht 200 µm. Pfeile zeigen auf ausgewählte CLS. Signifikante Unterschiede wurden durch einfaktorische Varianzanalyse (One-way ANOVA) mit Tukey post-Test ermittelt. Signifikantsniveaus: *p < 0,05 für PAR4^{+/+} SF zu PAR4^{+/+} HFF und #p < 0,05 für PAR4^{-/-} HFF zu PAR4^{+/+} HFF.

4 Diskussion

Übergewicht, Insulinresistenz und das Auftreten einer Fettleber können entstehen, wenn der Organismus über einen längeren Zeitraum hinweg zu viel Energie über die Ernährung erhält. Dabei kommt es zu einem Ungleichgewicht verschiedener Systeme, die sich über die Organgrenzen hinweg gegenseitig beeinflussen. Dazu gehören unter anderem die beteiligten Zellen und Moleküle, die für eine Entzündung verantwortlich sind, sowie die Glukose-, Fett- und Insulinsignalwege und das Gerinnungssystem. In klinischen und epidemiologischen Studien wurde bereits beschrieben, dass eine Verbindung zwischen Übergewicht und thromboembolischen Ereignissen besteht [182]. Ebenso steht die nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLE) in Verbindung mit einem erhöhten Risiko für Herz-Kreislauf-Erkrankungen [183].

Verschiedene Untersuchungen deuten darauf hin, dass die höhere Inzidenz von Morbidität und Mortalität bei Herz-Kreislauf-Erkrankungen bei Patienten mit NAFLE unabhängig von herkömmlichen kardiometabolischen Risikofaktoren (z. B. Adipositas, Insulinresistenz und Diabetes mellitus) ist [184–186]. Die genauen Mechanismen sind nicht vollständig verstanden und spiegeln wahrscheinlich mehrere koexistierende Signalwege wider [186].

Jüngste Studien lassen annehmen, dass ein hyperkoagulierbarer Zustand für das erhöhte Risiko von Thrombose bei Patienten mit NAFLE verantwortlich ist. Erhöhte Plasmaspiegel von verschiedenen pro-thrombotischen Faktoren (z. B. Fibrinogen, Faktor VIII und PAI-1) wurden bei Patienten mit NAFLE beschrieben [187–190]. Ebenso wird vermutet, dass die Hyperaktivität der Thrombozyten einen Beitrag zum erhöhten Risiko für Herz-Kreislauf-Erkrankungen bei Patienten mit metabolischem Syndrom leistet [191–193]. Dessen Rolle im Rahmen einer NAFLE bleibt aber weiterhin unklar.

Die hier vorliegende Arbeit untersuchte den Einfluss von PAR4 im Rahmen einer nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung im Zusammenhang mit einem fütterungsinduzierten Übergewicht und dem Einhergehen einer Insulinresistenz. Die PAR4-Expression wurde bisher für Thrombozyten, Adipozyten und einer Subpopulation von Makrophagen nachgewiesen [142, 145, 148, 194]. Als thrombinsensitiver Rezeptor ist dieser Rezeptor vor allem in die Regulation der Gerinnung involviert, aber er ist auch, wie eingangs beschrieben, an der Regulation anderen physiologischer und pathophysiologischer Vorgänge involviert. Über die Beteiligung des PAR4 an der Entwicklung einer nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung und Insulinresistenz liegen bis dato keine Daten vor. Die hier vorliegende Arbeit liefert erstmals einen Beleg dafür, dass PAR4 in

der Entwicklung einer nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung sowie der Entstehung einer Insulinresistenz involviert ist.

4.1 Einfluss des PAR4 auf die Entwicklung von Übergewicht

Für die Untersuchung wurden Wildtyp- und PAR4-defiziente Mäuse bis zu 30 Wochen mit hochkalorischem Fettfutter gefüttert und verschiedene Parameter beobachtet, um einen Einfluss von PAR4 aufzuzeigen. Die Körpergewichtszunahme, die Gewichtszunahme des Fettgewebes und der Leber durch die hochkalorische Fettfütterung wurden durch eine PAR4-Defizienz nicht aufgehoben. Allerdings wurde während der frühen Zeitpunkte eine deutlich verzögerte Zunahme des Körpergewichts in PAR4-defizienten Mäusen beobachtet. Ein Unterschied, der sich im weiteren Verlauf der Fütterungsversuche jedoch ausglich, und zu Woche 30 nicht mehr nachweisbar war.

Die Gewichtszunahmen der oben angesprochenen Parameter sind vergleichbar mit den Beobachtungen einer vorangegangenen Studie [195]. Kopec *et al.* fütterten Wildtyp-Mäuse mit einem hochkalorischen Fettfutter und einem Kontrollfutter über 20 Wochen und konnten eine Zunahme des Gewichts, der Fettmasse und des Lebergewichts verzeichnen. Ein Vergleich mit der vorliegenden Arbeit kann gezogen werden, da in dieser Publikation ein vergleichbares hochkalorisches Fettfutter verwendet wurde, bei dem, wie in der vorliegenden Arbeit, 60 % der Kalorien Fett ausmacht. Einzig das Kontrollfutter der Publikation enthielt mit 13 % Fettkalorien einen höheren Anteil im Vergleich zu 9 % des Standardfutters, welches in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde. Ein Vergleich der Gewichtsdaten der PAR4-defizienten Gruppe mit der Literatur kann nicht erfolgen, da hierzu bislang keine Daten erhoben wurden.

4.2 Einfluss des PAR4 auf die Entwicklung einer Insulinresistenz

Wie eingangs erwähnt, konnte bereits in einer vorangegangenen Studie festgestellt werden, dass die PAR4-Expression vom Glukosegehalt der Umgebung der exprimierenden Zelle abhängig ist [162]. Dabei induziert eine hohe Glukosekonzentration eine höhere PAR4-Expression. Dies wurde bislang allerdings nur in kardialen Fibroblasten und humanen vaskulären glatten Muskelzellen untersucht [149, 162, 196]. Die Frage, ob PAR4 einen Einfluss auf die Entwicklung einer Insulinresistenz im Verlauf einer hochkalorischen Fettfütterung hat, wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals untersucht. Bei der alleinigen Betrachtung der Nüchternblutglukosekonzentration scheint PAR4 keinen Einfluss auf den Glukosemetabolismus zu haben. Wird der Organismus allerdings ent-

weder mit einem Glukose- oder Insulinbolus belastet, konnte belegt werden, dass PAR4 insbesondere während früherer Zeitpunkte für die Entstehung einer verminderten Glukosetoleranz und übereinstimmend damit zu einer reduzierten Insulinsensitivität von Bedeutung ist. Dieser Einfluss ist während späterer Zeitpunkte nicht mehr nachweisbar, so dass anzunehmen ist, dass PAR4 nur im Rahmen kurzzeitiger metabolischer Belastungen von pathogenetischer Bedeutung für die Entstehung einer Insulinresistenz ist, während im Rahmen chronischer, lang anhaltender Belastungssituationen andere PAR4-unabhängige Mechanismen für den weiteren Progress und die Entwicklung eines Diabetes mellitus relevant sind.

Der Verlauf der Glukosetoleranz- und Insulinsensitivitätstests der Wildtyp-Gruppen ist vergleichbar mit schon veröffentlichten Daten [195]. Kopec *et al.* wiesen für die fettgefütterten Wildtyp-Mäuse ebenfalls eine verminderten Glukosetoleranz und Insulinsensitivität im Vergleich zu den Standardfutter-Mäusen nach. Auch wurden hier vergleichbare Versuchsbedingungen wie in der vorliegenden Arbeit gewählt. Der Unterschied bestand lediglich in der Durchführung des Glukosetoleranztests, in welchem Dextrose anstatt Glukose verwendet wurde und eine anderes Glukosemessgerät verwendet wurde. Dies könnte auch ein Grund sein, warum die Nüchternblutglukosekonzentrationen stärker von jenen in der Literatur genannten Daten abweichen. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Messgerät misst alle Zuckerarten im Blut, was die im Vergleich zur Literatur gemessenen höheren Werte der vorliegenden Arbeit erklären könnte.

4.3 Einfluss von PAR4 im Serum

Die Messung der Serumparameter der Leber und im Serum zirkulierender Zytokine und Chemokine kann Hinweise über den Grad der Entzündung geben, welche mit der hochkalorischen Fettfütterung induziert wurde. Die übermäßige Zufuhr von Energie und freien Fettsäuren führt zu einer veränderten Kommunikation zwischen den Organen und ihren unterschiedlichen Zelltypen [170]. Dabei kommt es zur Sezernierung veränderter Zytokin- und Chemokinprofile aus den Organen, welche im Serum analysiert werden können.

Die gemessenen Serumparameter deuten auf eine Beeinflussung der Leber durch die hochkalorische Fettfütterung hin. Die Leberparameter GPT und GOT deuten dabei auf eine Schädigung der Leber hin, während Cholesterin und HDL-Cholesterin ein Ausdruck der metabolischen Entgleisung darstellen. GPT wird ins Serum freigesetzt, wenn die Membranintegrität der Hepatozyten geschädigt wird. Der Serumparameter Albu-

min wurde ebenfalls durch die hochkalorische Fettfütterung beeinflusst. Eine sinkende Albuminserumkonzentration weist auf eine Funktionsminderung der Leber hin. Reduzierte Albuminspiegel können allerdings auch auf einer Maldigestion bzw. -absorption oder auf einer Mangelerkrankung beruhen. Diese Parameter werden vermutlich durch die zunehmende Einlagerung von Lipiden in Hepatozyten verursacht. Die Erhöhung des HDL-Cholesterins scheint hierbei eine Begleiterscheinung der Erhöhung des Gesamtcholesterins zu sein.

Zwei Studien sind bekannt, die ein ähnliches Modell zur Induktion einer Fettleibigkeit verwenden [195, 197]. Zu beachten sind hierbei der gleiche Mausstamm, vergleichbares hochkalorisches Fettfutter und vergleichbare Methoden, mit denen die Daten erhoben wurden. Zhao *et al.* wiesen für die HFF-Wildtyp-Gruppe nach 14 Wochen eine etwas höhere Triacylglycerol-Serumkonzentration nach als in der vorliegenden Arbeit gemessen wurde. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wurde kein Einfluss der hochkalorischen Fettfütterung auf die Serumparameter GPT und GOT beobachtet [197].

Der Einfluss von PAR4 auf die Serumparameter während einer hochkalorischen Fettfütterung wurde in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal untersucht. Im zeitlichen Verlauf kam es zu einem tendenziellen Anstieg von GOT und GPT unter Fettfütterung. Vor allem bei der GPT unterschieden sich die PAR4-defizienten Mäuse hier tendenziell von den HFF-Wildtyp-Mäusen deutlich. Interessanterweise führte PAR4 zum Zeitpunkt von 8 Wochen dazu, dass die totale Cholesterinserumkonzentration noch nahe am Normbereich liegt und erst im weiteren Versuchsverlauf anstieg.

Analog zu den Leberserumparametern wurden zirkulierende Zytokine und Chemokine im Serum gemessen. Zwei Studien wiesen vergleichbare CCL2-Serumkonzentrationen nach [195, 197], die die eigenen Beobachtungen unterstützen. Zhao *et al.* führen zu den Daten der vorliegenden Arbeit vergleichbare IL-6-Serumkonzentrationen auf [197]. Dem gegenüber gestellt wurden sowohl in anderen Tiermodellen als auch in Patienten mit einer nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung erhöhte IL-6-Serumkonzentrationen festgestellt [198–200]. Die Zunahme der von Kopec *et al.* aufgeführten IL-17 Serumkonzentration konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden [195], obwohl vergleichbares Fettfutter und der gleiche Mausstamm (C57Bl/6J) verwendet wurde. Ein möglicher Grund für den Unterschied der IL-17 Serumkonzentration könnte ein anderes Testsystem sein, mit dem die Moleküle im Serum gemessen wurden.

Die IL-10-Serumkonzentration wurde durch die hochkalorische Fettfütterung nicht beeinflusst. Dies widerspricht der Untersuchung von Kondo *et al.*, die eine wesentlich niedrigere IL-10-Serumkonzentration in fettgefütterten Mäusen beobachtet hat [201]. In der vorliegenden Arbeit scheint interessanterweise der PAR4-Einfluss dazu zu führen, dass die IL-10-Serumkonzentration über den Versuchszeitraum konstant bleibt und nicht ansteigt. Offen ist noch die Frage, welches Organ bzw. welche Zellen für die erhöhte IL-10-Expression in den PAR4-defizienten Mäusen verantwortlich sind. Leber, epididymales weißes und interskapuläres braunes Fettgewebe scheinen nicht dafür verantwortlich zu sein, da die Analyse der IL-10-Expression in diesen Geweben zu den analysierten Zeitpunkten nur marginale Unterschiede zwischen den verschiedenen untersuchten HFF-Gruppen ergab. (siehe Abbildung 11).

Mit fortgeschrittenem Versuchsverlauf stiegen die Serumkonzentrationen von CCL2, CCL4 und CXCL2 unabhängig vom Genotyp an. Diese Chemokine sind an der Rekrutierung von Immunzellen beteiligt [202–204]. Dabei sind Liganden des Chemokinrezeptors CCR2 wie CCL2 und CCL4 führend an der Rekrutierung monozytärer Zellpopulationen beteiligt. Hingegen sind Liganden des CXCR2 wie CXCL2 insbesondere in die chemotaktische Regulation der Migration neutrophiler Granulozyten involviert. Ein Anstieg dieser Chemokine kann Ausdruck eines zunehmenden Entzündungsgeschehens sein.

Die Umbildung des Fettgewebes ist ein kontinuierlicher Prozess, der bei Fettleibigkeit pathologisch beschleunigt wird [205]. Dabei sekretieren Adipozyten sogenannte Adipokine, die im Serum auftreten und auf die Gesundheit des Fettgewebes schließen lassen [206]. Im Laufe der hochkalorischen Fettfütterung kommt es zu einem Anstieg der Leptin- und Insulinsерumkonzentration. In einer vergleichbaren Studie von Kopec *et al.* wurde für die Insulinsерumkonzentration ein ähnlicher Insulinspiegel in den Wildtyp-Gruppen gemessen wie in der vorliegenden Arbeit. Die Leptinsерumkonzentration stimmt ebenfalls mit der von Kopec *et al.* beschriebenen Kontrollgruppe überein, allerdings wies die fettgefütterte Wildtyp-Gruppe in der vorliegenden Arbeit einen deutlich geringeren Leptinspiegel auf [195].

Der in der vorliegenden Arbeit beobachtete tendenzielle Anstieg der CRP-Serumkonzentration in den HFF-Wildtyp-Mäusen wird durch die Daten von Gierman *et al.* unterstützt [207]. Diese Gruppe behandelte allerdings genetisch veränderte Mäuse, die humanes CRP exprimieren, mit einem hochkalorischen Fettfutter, so dass die Daten nur bedingt miteinander vergleichbar sind. Die CRP-Serumkonzentrationen der PAR4-

defizienten Mäuse wurden in der Literatur bislang nicht beschrieben. Die hochkalorische Fettfütterung hat keinen Einfluss auf die Adiponectinserumkonzentration. PAR4 beeinflusst den Insulinspiegel zu Beginn einer hochkalorischen Fettfütterung. Die Streuung der einzelnen Messwerte ist allerdings groß, so dass eine biologische Relevanz dieser Beobachtung fraglich ist. Ebenso verhält es sich mit der Beobachtung, dass PAR4 einen Einfluss auf die Adiponectinserumkonzentration nach 16 Wochen Fettfütterung hat. Auch hier führte PAR4 zu einer Erhöhung der Adiponectinserumkonzentration, die sich allerdings auf demselben Niveau befindet wie der Serumspiegel der Standardfutter-Gruppe.

Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu der Literatur, in der in mehreren Studien beschrieben wurde, dass eine Zunahme des Fettgewebes zu einer Senkung des Adiponectinserumlevels führt. So legen Untersuchungen von Bugianesi *et al.* nahe, dass die Adiponectin-Serumspiegel bei Patienten mit erhöhtem BMI wie auch bei Patienten mit einer NAFLE niedriger liegen als bei der gesunden Kontrollgruppe [208]. Hui *et al.* und Shimada *et al.* wiesen vergleichbare Ergebnisse zur Bugianesi-Studie nach [209, 210]. Auffällig ist allerdings, dass Kopec *et al.*, welche ein ähnliches Modell, wie in der vorliegenden Arbeit beschrieben, verwendeten, ebenfalls keinen Unterschied zwischen der fettgefütterten und kontrollgefütterten Wildtyp-Gruppe feststellen konnten [195].

4.4 Transkriptionelle Beeinflussung der Leber und des weißen und braunen Fettgewebes durch PAR4

Durch die Fütterung eines hochkalorischen Fettfutters kommt es sowohl zu Störungen des Lipid- als auch des Glukosemetabolismus'. Das epididymale weiße Fettgewebe reagiert mit Wachstum und einer verstärkten PAR4-Expression. Strande *et al.* belegten, dass PAR4 auf humanen Adipozyten exprimiert wird [145]. Eine verstärkte PAR4-Expression wurde bereits in diabetischen Atherektomien und Venen von Maus und Mensch nachgewiesen [149]. Ebenfalls wurde in dieser Studie beobachtet, dass kultivierte humane glatte Muskelzellen (SMC) bei erhöhter Glukosekonzentration verstärkt PAR4 exprimierten.

In einem ähnlichen Versuch wurde eine verstärkte PAR4-Expression auf murinen kardialen Fibroblasten beobachtet [162]. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass PAR4 gerinnungsunabhängig unter normalglykämischen Bedingungen eher eine untergeordnete Bedeutung hat und erst beim Vorliegen einer erhöhten Glukosekonzentration von unterschiedlichen Zelltypen verstärkt exprimiert wird. Die in Abbildung 4 dargestellte relative PAR4-Expression wies einen deutlichen Unterschied zwischen Leber und Fett-

gewebe auf. Eine mögliche Erklärung ist, dass ein Großteil der Zellen des Fettgewebes, die Adipozyten, PAR4 exprimieren, wohingegen in der Leber nur ein kleiner Teil der Zellen PAR4 exprimiert.

In der vorliegenden Arbeit spielte die IL-6-Expression in Leber sowie im weißen und braunen Fettgewebe eher eine untergeordnete Rolle, da die hochkalorische Fettfütterung kaum Einfluss auf die IL-6-Expression hat. Die Rolle von IL-6 in der Leberhomöostase und -pathologie ist sehr komplex und seine Beteiligung an der Entwicklung von NAFLE noch weitgehend unklar. IL-6 wurde anfangs als schützender Faktor bei Lebersteatose betrachtet, der in der Lage ist, oxidativen Stress zu reduzieren und eine mitochondriale Dysfunktion zu verhindern [211]. Bei durch Fütterung induzierten fettleibigen Mäusen erfolgte eine Behandlung mit IL-6-Antikörpern, welche die Insulinsensitivität verbesserten [212].

Die Beeinflussung der IL-6-Expression durch PAR4 ist bisher im Kontext der NAFLE und der Insulinresistenz nicht beschrieben worden. Einzig Strande *et al.* wiesen für humanes Fettgewebe und humane Adipozyten nach, dass Thrombin über PAR4-Aktivierung die Expression von IL-6, IL-1 β , CCL2 und TNF- α erhöht [145]. Asokanathan *et al.* postulieren, dass die Aktivierung von PAR4 zu einer Stimulation von IL-6 im Rahmen einer Entzündung der Lunge führt [213].

Die PAR4-Abhängigkeit der IL-10-Expression im Rahmen einer hochkalorischen Fettfütterung wurde in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal untersucht. Die Wirkung von Thrombin auf die IL-10-Expression in humanen Adipozyten oder im humanen weißen Fettgewebe wurde von Strande *et al.* beschrieben [145]. Die beschriebene IL-10-Expression war allerdings unterhalb der Nachweisgrenze. Die Gruppe von den Boer behandelte IL-10-defiziente Mäuse mit Fettfutter und fanden heraus, dass endogenes IL-10 schützend für hepatische Steatose, aber die gleichzeitig auftretende Insulinresistenz nicht beeinflusst [214].

Cintra *et al.* beobachteten, dass die Inhibierung von IL-10 entweder unter Verwendung von einem Anti-IL-10-Antikörper oder einem IL-10-Antisense-Oligonukleotid zu einer erhöhten Expression proinflammatorischer Marker (TNF- α , IL-6, IL-1 β und F4/80) führte und die Insulinsignaltransduktion beeinträchtigte sowie die Entstehung einer Steatose begünstigte [215]. Vor diesem Hintergrund wäre denkbar, dass die hier beschriebenen erhöhten IL-10-Serumkonzentrationen, die in PAR4-defizienten Mäusen unter hochkalorischer Fettfütterung zu beobachten waren, mit für die verzögerte Entwicklung einer NAFLE in PAR4-defizienten Mäusen von Bedeutung sind.

Eine mögliche Ursache für die beobachtete nur marginale Induktion der IL-6- und IL-10-Expression könnte ebenfalls in den gemessenen Zeitpunkten liegen. Das bedeutet, dass es möglicherweise schon früher im Versuchszeitraum zu einer Induktion der IL-6- und IL-10-Expression gekommen ist, diese in der vorliegenden Arbeit aber nicht beobachtet werden konnte. Einer weitere Erklärung liegt möglicherweise darin begründet, dass in diesem Teil der vorliegenden Arbeit RNA-Expression analysiert wurde, aber eine mögliche Regulation auf translationaler oder posttranskriptioneller Ebene nicht beobachtet wurde.

CCL2 wird im Fettgewebe und im Blut von fettleibigen Mäusen exprimiert bzw. in erhöhten Konzentrationen nachgewiesen [216]. Diese Beobachtungen werden auch durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit gestützt. Monozyten/Makrophagen-Infiltration im Fettgewebe wurde in Tiermodellen und beim Menschen beobachtet [105]. Monozyten-/Makrophagenakkumulation in der steatotischen Leber erfolgte bei jenen Mäusen reduziert, die mit einer fettreichen Diät gefüttert wurden und gleichzeitig eine CCL2-Defizienz aufwiesen [52]. Darüber hinaus führte eine CCL2-Defizienz während einer fettreichen Fütterung zu einer verringerten Insulinresistenz und zu einer geringeren hepatischen Steatose [108].

Andererseits wiesen Mäuse, die CCL2 im Fettgewebe überexprimierten, eine erhöhte Insulinresistenz und einen höheren Triacylglycerolspiegel in der Leber auf [108]. Dieser pathophysiologische Effekt von CCL2 trägt direkt zur Lipidakkumulation bei [217]. Die Autoren beobachteten, dass Fettleibigkeit die CCL2-Expression in Hepatozyten hochreguliert, was zur Rekrutierung von CCR2-positiven myeloiden Zellen führt und dadurch die Hepatosteatose fördert [17]. Die erhöhte CCL2-Expression in Leber und weißem Fettgewebe durch eine hochkalorische Fettfütterung konnte in der vorliegenden Arbeit ebenfalls beobachtet werden.

Pharmakologische Behandlungen zur Hemmung des CCL2/CCR2-Wegs verbesserten in mehreren Mausmodellen für Stoffwechselkrankheiten signifikant die Fettleibigkeit, Insulinresistenz, Lebersteatose und Entzündungen im Fettgewebe [218–220]. Vor diesem Hintergrund wäre denkbar, dass die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Beobachtung, dass PAR4 für die Regulation der Expression von CCL2 vor allem im weißen Fettgewebe von Bedeutung ist und möglicherweise an der Entwicklung von Insulinresistenz und NAFLD beteiligt ist. Mit dieser Überlegung übereinstimmend belegen Untersuchungen von Strande *et al.*, dass eine Stimulation von humanen Adipozyten und humanem weißem Fettgewebe mit Thrombin zu einer erhöhten CCL2-Expression führte

[145]. Die gesunkene CCL2-Expression im weißen Fettgewebe unter PAR4-Defizienz legt nahe, dass diese Thrombinwirkung über PAR4 vermittelt wird.

CXCL2 wird von aktivierten Monozyten, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten, aber auch von epithelialen Zellpopulationen wie Hepatozyten, im Rahmen eines entzündlichen Geschehens exprimiert und besitzt vor allem auf neutrophile Granulozyten eine chemoattraktive Wirkung [221, 222]. Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete verstärkte CXCL2-Expression in der Leber von Mäusen, die mit hochkalorischem Fettfutter behandelt wurden, stimmt mit den Ergebnissen anderer Untersuchungen überein, die ebenfalls nahelegen, dass es im Rahmen der Steatose zu einer verstärkten Expression von CXCL2 im Lebergewebe kommt [223]. Darüber hinaus könnte die gesteigerte CXCL2-Expression in der Leber die erhöhte CXCL2-Konzentration im Serum erklären.

Interessanterweise wird PAR4 nicht nur von Thrombin aktiviert, sondern auch von anderen Proteasen, zu denen das Cathepsin G gehört. Cathepsin G wird hauptsächlich von neutrophilen Granulozyten exprimiert. Damit stellt der Cathepsin G/PAR4-Signalweg eine weitere immunmodulatorische Komponente dar [224]. In einer Studie von Shah *et al.* konnte nachgewiesen werden, dass neutrophile Granulozyten in diabetisches Gewebe akkumulieren [225]. Zusammen mit der Beobachtung, dass PAR4 im diabetischen Fettgewebe hochreguliert wird, könnte dies ein Hinweis auf eine verstärkte PAR4-Beteiligung im Kontext der metabolischen Entzündung sein.

Hotamisligil *et al.* belegten erstmals einen Zusammenhang zwischen TNF- α -Expression und Insulinresistenz in NASH [226]. Die Autoren gaben an, dass dieses Fettgewebe ein wichtiger Induktor für Adipositas-induzierte Entzündung, insbesondere durch die Expression von TNF- α ist und eine Insulinresistenz induziert. In der Tat lagen in mehreren Adipositas-Nagetiermodellen die TNF- α -Expression im Fettgewebe erhöht vor im Vergleich zu Kontrollen [226]. Dies unterstützen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, in der ebenfalls ein Trend einer verstärkten TNF- α -Expression im Fettgewebe beobachtet wurde (siehe Abbildung 13).

Uysal *et al.* beobachteten bei adipösen Mäusen, denen TNF- α fehlte, eine verbesserte Insulinsensitivität [227]. Beim Menschen bleibt die Rolle dieses Zytokins umstritten. Bei Patienten konnte beobachtet werden, dass der TNF- α -Spiegel höher in adipösen Patienten war als in schlanken Individuen und dass diese Beobachtung mit der Insulinresistenz korrelierte [228, 229]. Darüber hinaus wurde eine positive Korrelation

zwischen dem Grad der Leberfibrose und dem zirkulierenden TNF- α -Spiegel bei Patienten mit NASH beobachtet [230]. Crespo *et al.* wies eine erhöhte TNF- α -Expression im Leber- und im Fettgewebe von NASH-Patienten mit signifikanter Fibrose im Vergleich zu denen mit leichter oder nicht vorhandener Fibrose nach [231]. In jüngerer Zeit haben Hui *et al.* diese Ergebnisse bestätigt und eine erhöhte TNF- α -Expression bei Probanden mit Steatohepatitis im Vergleich zu Kontrollen nachgewiesen [209].

Dennoch ist die Beteiligung von TNF- α an der Insulinresistenz und an der Entwicklung einer NAFLE weiterhin fraglich. Zwei Studien konnten keine Korrelation zwischen Insulinresistenz und TNF- α -Spiegel beobachten [232, 233]. Wie schon für IL-6 und CCL2 weiter oben angeführt, konnten Strande *et al.* die Thrombin-vermittelte Aktivierung von PAR4 auch für eine erhöhte TNF- α -Expression in humanen Adipozyten und humanem weißen Fettgewebe feststellen [145]. Die Daten der vorliegenden Arbeit wiesen im Fettgewebe unter PAR4-Defizienz zwar keine signifikanten Änderungen der TNF- α -Expression vor allem im weißen Fettgewebe auf, aber dennoch ist ein Trend erkennbar, der eine mögliche PAR4-Beteiligung nicht ganz ausschließt.

Über die Beteiligung von IFN- β an der Entwicklung einer NAFLE ist bisher nur wenig bekannt. Shimozono *et al.* fanden heraus, dass die IFN- β -Expression in einem NASH-Model einen antifibrotischen Effekt auf die Leber hat und dass dieser Effekt über fibrogenetische Gene vermittelt wird [234]. In der vorliegenden Arbeit konnte beobachtet werden, dass während einer hochkalorischen Fettfütterung die IFN- β -Expression sowohl in der Leber als auch im epididymalen weißen Fettgewebe hochreguliert wird. Interessanterweise erfolgte diese Hochregulation der IFN- β -Expression PAR4-abhängig.

Die Wirkung von PAR4 auf die IFN- β -Expression wurde bisher wenig erforscht. Ein Hinweis auf eine mögliche Beteiligung gibt die Beobachtung in der Regulation CVB3-induzierter Myokarditis. Weithauser *et al.* postulierten, dass der Thrombinrezeptor PAR1 über p38 die IFN- β -Expression reguliert wird [235]. Da PAR4 eine ähnliche Struktur und Funktion aufweist, könnte vermutet werden, dass auch PAR4 über p38 an der IFN- β -Expression beteiligt ist.

Über die Beteiligung von SOCS3 in Krankheitsgeschehen wie Übergewicht und Insulinresistenz sind bereits einige Publikationen erschienen [121, 236]. Ueki *et al.* wiesen nach, dass die SOCS3-Überexpression in der Leber die Tyrosinphosphorylierung des Insulinrezeptorsubstrats-1 und -2 (IRS-1 und IRS-2) verringert [237]. Darüber hinaus kann SOCS3 die Insulinsignalisierung durch den Abbau der IRS-Proteine reduzieren

[238]. Adipositas fördert die erhöhte SOCS3-Expression im Fettgewebe [122] und in der Leber [169].

In der Tat ist die Zytokin-induzierte SOCS3-Expression ein wichtiger molekularer Mediator der Insulinresistenz in Adipozyten [239]. Die Haploinsuffizienz von SOCS3 verbessert die Insulinsensitivität bei Mäusen, die entweder einer Standardfütterung oder einer hochkalorischen Fettfütterung unterzogen werden [121]. Eine verringerte SOCS3-Expression im Fettgewebe von adipösen Individuen verbessert wirksam die Glukosetoleranz und die Insulinempfindlichkeit des gesamten Körpers [117]. Obwohl die SOCS3-Deletion in der Leber die Insulinsensitivität kurzfristig erhöht, entwickeln mutierte Mäuse metabolische Störungen, wie Fettleibigkeit, Hyperglykämie und systemische Insulinresistenz bei Alterung [236].

In dem Fütterungsmodell der vorliegenden Arbeit scheint die SOCS3-Expression nur im braunen Fettgewebe im Verlauf der Fütterung anzusteigen. Interessanterweise war diese Hochregulation der SOCS3-Expression PAR4-abhängig, da bei Vorliegen einer PAR4-Defizienz kein Anstieg der SOCS3-Expression beobachtet wurde. Die tendenziell gesteigerte SOCS3-Expression im weißen und braunen Fettgewebe liefert möglicherweise die Erklärung, warum einige der analysierten Zytokine und Chemokine erst induziert werden und im späteren Verlauf der hochkalorischen Fütterung wieder abnehmen, da SOCS3 eine regulatorische Wirkung auf einige dieser Zytokine und Chemokine ausübt [240].

Beim Vergleich der RNA-Expressionslevel der unterschiedlichen Zytokine und Chemokine fiel auf, dass die Expression im Fettgewebe deutlich höher war als in der Leber. Die Erklärung dafür liegt vermutlich in der Zellzusammensetzung der Organe. Während die Leber vorwiegend aus Hepatozyten besteht, beinhaltet das Fettgewebe zu einem großen Teil Adipozyten. Bereits bekannt ist, dass Adipozyten endokrin sehr aktiv sind. Dabei sezernieren sie neben Adipokinen wie Leptin und Adiponectin auch eine Reihe von Zytokinen und Chemokinen, die sowohl parakrin als auch systemisch wirken können [226, 241–246].

In einem tierexperimentellen Modell der Entzündung konnte die Expression von CCL2 und CXCL2 im Adipozyten nachgewiesen werden [247]. Über die Expression von IFN- β und IL-10 in Adipozyten ist bislang wenig bekannt. Dagegen werden in Hepatozyten kein IL-6, TNF- α und IFN- β exprimiert [248]. Wolf *et al.* konnten nachweisen, dass Hepatozyten in der Lage sind unter LPS-Stimulation CCL2 und CXCL2 zu exprimieren

[249]. Die IL-10-Expression in der Leber wird durch die sessilen Makrophagen verursacht. Dies bedeutet, dass die niedrige RNA-Expression durch den geringen Anteil der Makrophagen im Lebergewebe verursacht wird, wohingegen im Fettgewebe vor allem Adipozyten für die Expression der Chemokine und Zytokine verantwortlich sind.

4.5 Veränderung der Immunzellpopulation

Mit Hilfe der FACS-Analyse sollte zu verschiedenen Zeitpunkten der hochkalorischen Fettfütterung eine Veränderung ausgewählter Immunzellpopulationen untersucht und festgestellt werden, ob PAR4 einen Einfluss auf diese Änderung im Zeitraum des Versuchs hat. Zusammenfassend führte eine hochkalorische Fettfütterung zu einem verstärkten mittleren Fluoreszenzsignal von Ly6G und CD11b und zu einem geringeren mittleren Fluoreszenzsignal von CD206, MHCII und TLR4. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass im Rahmen einer hochkalorischen Fettfütterung neutrophile Granulozyten (CD45⁺Ly6G⁺-Zellen), die ebenfalls CD11b exprimieren, vermehrt in der Leber vorhanden sind und die Lebermakrophagen, welche dem M2-Typ entsprechen, (F4/80⁺CD206⁺MHCII⁺TLR4⁺-Zellen) weniger vorkommen als in gleich alten Kontroll-Mäusen.

Die Veränderung der Population scheint PAR4-abhängig zu sein, da eine PAR4-Defizienz nicht zu einem Anstieg der Ly6G- und CD11b-Populationen führte. Das erhöhte Ly6G-Signal erscheint bei Betrachtung der CXCL2-Expressionsdaten der Leber plausibel, da CXCL2 ein Rekrutierungssignal für Ly6G⁺-Zellen (neutrophile Granulozyten) ist [204].

Die PAR4-defizienten Mäuse wiesen sowohl weniger CCL2- und CXCL2-Expression als auch Ly6G- und CD14-Signal in der Leber auf. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass diese Mäuse weniger Rekrutierungssignal für Makrophagen und neutrophile Granulozyten in der Leber bilden und eine mögliche Erklärung für die geringere Anzahl Mac2⁺-Zellen in den Lebern dieser Mäuse liefern (siehe Abbildung 16).

Darüber hinaus konnte eine Zunahme des CD206-Signal detektiert werden. Diese Beobachtung könnte die beobachtete erhöhte IL-10-Expression im Serum der PAR4-defizienten Mäusen erklären, da M2-Makrophagen vermehrt IL-10 sezernieren [250]. Auffällig war, dass sich das Signal von CD163, welcher ein weitere Differenzierungsmarker für M2-Makrophagen ist [178], umgekehrt zum Signal von CD206 verhielt. Anscheinend wird durch die hochkalorische Fettfütterung und der PAR4-Einfluss die Expression dieser Differenzierungsmarker in unterschiedlicher Weise beeinflusst.

In der Literatur ist wenig darüber beschrieben, welche Auswirkungen eine hochkalorische Fettfütterung auf die Immunzellpopulation in der Leber hat. Morinaga *et al.* beschrieben einen Anstieg des CD11b-Signals in HFF-gefütterten Mäusen, welcher auch in der vorliegenden Arbeit beobachtet wurde. Zusätzlich stellten sie eine gesteigerte Expression von CD11c und Ly6C fest, die in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet wurde, obwohl ein vergleichbares Fütterungsmodell verwendet wurde [251].

Der Einfluss von PAR4 auf die Veränderung der Immunzellpopulation in der Leber während einer hochkalorischen Fettfütterung wurde bis dato nicht untersucht. Dennoch scheinen einige Veränderungen der Immunzellpopulationen PAR4-abhängig zu sein. Ba Le *et al.* beschrieben, dass die Aktivierung von PAR4 zu einer Erhöhung der neutrophilen Granulozyten im Rahmen eines Entzündungsmodells der Lunge führt. Ebenfalls führte eine Hemmung der PAR4-Aktivität zu einer Verringerung dieser Zellen [252].

In den HFF-Wildtyp-Mäusen wurde ein erhöhtes Fluoreszenzsignal der F4/80⁺CD14⁺-Population beobachtet. Dies könnte möglicherweise im Zusammenhang mit der beobachteten gesteigerten CCL2-Expression in der Leber stehen. In den PAR4-defizienten Mäusen wurde ein niedrigeres Fluoreszenzsignal der F4/80⁺CD14⁺-Population als in den HFF-Kontroll-Mäusen beobachtet. Dies könnte ebenfalls mit der beobachteten geringeren CCL2-Expression in der Leber zusammenhängen.

Slofstra *et al.* beschrieben, dass PAR4 zu einer Erhöhung der neutrophilen Granulozyten in Leber, Lunge und Niere führt, wenn diese von einer systemischen Entzündung betroffen sind [253]. Diese Beobachtung wird durch die Daten der vorliegenden Arbeit gestützt, da unter PAR4-Defizienz das Fluoreszenzsignal der neutrophilen Granulozyten verringert war.

Die hochkalorische Fettfütterung scheint wenig den relativen Anteil der Subpopulationen der Immunzellen zu beeinflussen. Es wurde lediglich ein leicht steigender Trend von Fütterungswoche 8 zu Woche 16 beobachtet. Im weiteren Versuchsverlauf erfolgte keine Änderung des relativen Anteils der Subpopulationen. Dem gegenüber beeinflusste PAR4 den relativen Anteil der Subpopulationen in Fütterungswoche 8 am stärksten. Zu diesem Zeitpunkt führte eine PAR4-Defizienz zu einer signifikanten Erhöhung des relativen Anteils der Subpopulationen. Diese Beobachtungen zum relativen Anteil der Subpopulationen der Immunzellen der Leber wurden bisher in der Literatur nicht beschrieben.

4.6 Histologische Veränderungen durch NAFLE-Induktion

Im Gegensatz zur FACS-basierten Zelldifferenzierung konnte mit Hilfe der immunhistochemischen Färbung von Mac2 (Galectin-3) in der Leber eine Zunahme von Mac2⁺-Zellen während der hochkalorischen Fettfütterung festgestellt werden. Mac2 wird vor allem von Makrophagen exprimiert und gilt als Makrophagenmarker in zahlreichen Geweben [254]. Zu Beginn der Fettfütterung scheint die Akkumulierung der Mac2⁺-Zellen in der Leber PAR4-abhängig zu sein, wobei diese Abhängigkeit im weiteren Verlauf abnimmt.

In einer Studie von Kassel *et al.* mit LDLr-defizienten Mäusen, welche 40 % Fettfutter erhielten, konnte mit den Makrophagen-Markern F4/80 und CD68 ebenfalls eine erhöhte Makrophagenanzahl in den Lebern festgestellt werden [255]. Interessanterweise wurde in der Studie zusätzlich der Effekt eines direkten Thrombininhibitors, dem Argatroban, in Mäusen untersucht. Analog zu den PAR4-defizienten Mäusen, wurden in den fettgefütterten Mäusen, die mit Argatroban behandelt wurden, weniger F4/80- und CD68-Makrophagen in der Leber gefunden. Dies unterstützt die Beobachtungen der vorliegenden Arbeit.

Besonders auffällig in diesem Kontext war die beobachtete Umverteilung der positiv gefärbten Zellen im Organ. Während zu Beginn der Fettfütterung die Zellen einzeln im Gewebe vorlagen, lagerten sie sich im mittleren und späten Versuchsverlauf zu sog. CLS ("crown-line structures") um Hepatozyten herum an. Diese hepatischen CLS wurden in der Literatur bereits in einem Mausmodell und in Leberbiopsien von NAFLE/NASH-Patienten beschrieben [113]. Die Autoren postulieren, dass die CLS-Makrophagen apoptotische Hepatozyten, die mit Lipid-gefüllten Vakuolen beladen sind, abbauen und daher vermehrt in einem späteren Verlauf einer Fettfütterung beobachtet werden können. Die Formation von CLS in der Leber in Verbindung mit PAR4 wurde bisher nicht beschrieben. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals beobachtet werden, dass die Formation von CLS in der Leber PAR4-unabhängig ist, da auch die PAR4-defizienten Lebern diese CLS aufwiesen.

Ein weiteres Merkmal für die Beurteilung einer sich entwickelnden NAFLE ist das Maß der Einlagerung von Lipiden in den Hepatozyten. Mit Hilfe der Ölrot-O-Färbung in Gefrierschnitten konnte eine Zunahme der Lipidmenge in den Hepatozyten während der hochkalorischen Fettfütterung beobachtet werden. Zu Beginn der hochkalorischen Fütterung ist die vermehrte Einlagerung von Lipiden PAR4-abhängig, wobei diese Abhängigkeit im weiteren Versuchsverlauf abnimmt. Die Einlagerung von Lipiden in

den Hepatozyten während einer hochkalorischen Fettfütterung wurde bereits von Kassel *et al.* und Miura *et al.* beschrieben [255, 256]. Im Gegensatz zu dem verwendeten Modell der PAR4-Defizienz, welches in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, führte die Verwendung eines Thrombininhibitors in der Studie von Miura *et al.* zu keiner Änderung der Lipideinlagerung. Ebenfalls wurde ein anderes Mausmodell und eine andere Diät verwendet, was dazu geführt haben könnte, dass die Ergebnisse der Lipideinlagerung unterschiedlich waren.

Besonders interessant war in diesem Kontext die unterschiedliche Zonierung der Lipideinlagerung in der Leber der HFF-Mäuse. Bereits beschrieben wurde eine Zonierung des Glukose- und Fettsäuremetabolismus' in den Hepatozyten entlang der perizentralen-periportal Achse. Dabei sind die Hepatozyten, die der Portalvene am nächsten stehen, besonders an der Glukoneogenese und der β -Oxidation der Fettsäuren beteiligt. Im Gegensatz dazu treten in Hepatozyten, die der Zentralvene am nächsten sind, die Glykolyse und die Lipogenese in höheren Raten auf [257, 258].

Lackner *et al.* beschrieben bereits, dass Steatose vermehrt in perizentralen Bereichen der Leber lokalisiert ist [259]. Dies unterstützt die Beobachtung der vorliegenden Arbeit, in der in den HFF-Wildtyp-Mäusen die Lipideinlagerung perizentrale Hepatozyten am stärksten betrifft. Hall *et al.* belegten weiterhin, dass mit zunehmender Steatose die Unterschiede zwischen den Zonen der Leber kleiner werden oder gänzlich verschwinden [260]. Dieser Zustand konnte ebenfalls in der vorliegenden Arbeit in HFF-Wildtyp-Mäusen zu Fütterungswoche 30 beobachtet werden. Die scheinbar umgekehrte Progression der Lipideinlagerung in den PAR4-defizienten Mäusen wurde in der Literatur noch nicht beschrieben. Einschränkend muss erwähnt werden, dass nur mit Einsatz einer zusätzlichen Färbung, wie beispielsweise einer Glutaminsynthetase-Färbung, festgestellt werden kann, welche Gefäße Portalvenen und welche Gefäße Zentralvenen sind, da die Glutaminsynthetase vermehrt in perizentralen Hepatozyten exprimiert wird [261].

Zur weiteren Beurteilung der NAFLE-Entwicklung wurde der Fibrosestatus mit Hilfe der Pikro-Siriusrot-Färbung der Lebern ermittelt. Im Rahmen der Lipideinlagerung der Hepatozyten kann es zu einem Umbau des Mikromilieus der Leber kommen. Itoh *et al.* stellten fest, dass neben Makrophagen Myofibroblasten verstärkt rekrutiert werden, die α -SMA und Kollagen für den Umbau der extrazellulären Matrix produzieren [113]. Die Pikro-Siriusrot-gefärbten Areale zeigen Bereiche, in denen verstärkt Kollagen gebildet wird. Das Ergebnis der vorliegenden Arbeit unterstützt die Studien, die beobachteten, dass es während der Entwicklung einer NAFLE/NASH zu einer verstärkten

Kollagenbildung kommt [256, 262, 263]. PAR4 scheint in der Fibrose-Entwicklung und der zunehmenden Kollagenbildung während einer hochkalorischen Fettfütterung keinen Einfluss zu haben. In der Literatur wurde PAR4 in diesem Kontext bis dato noch nicht untersucht.

4.7 Beeinflussung des Fettgewebes durch PAR4

Durch die Behandlung mit hochkalorischem Fettfutter kommt es zu einer Hypertrophie des Fettgewebes, wobei sich bestehende Adipozyten vergrößern. Die Angiogenese und ein adäquater Umbau der extrazellulären Matrix treten nicht in ausreichender Weise auf, um eine ausreichende Blutperfusion sicherzustellen, was zu einer Hypoxie führt, die zu entzündlichen und fibrotischen Veränderungen im Fettgewebe führt [78, 90, 105, 264]. Entzündetes weißes Fettgewebe ist durch Makrophageninfiltration charakterisiert [90, 105, 265]. Makrophagen im Fettgewebe produzieren mehrere entzündungsfördernde Zytokine, die zur Veränderung der Produktion von Adipokinen und zur Pathogenese der durch Adipositas induzierten Insulinresistenz und NASH beitragen [265]. Cinti *et al.* unterstützen die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Veränderungen des Fettgewebes, auch wenn sie einen anderen genetisch veränderten Mausstamm verwendet haben. Sie verwendeten db/db-Mäuse, denen der Leptin-Rezeptor fehlte, daher entwickeln diese Mäuse unter Standardfütterung einen Adipositas-ähnlichen Phänotyp [111]. Ebenso wiesen Patsouris *et al.* vergleichbare Ergebnisse wie in der vorliegenden Arbeit im Bezug auf die Hypertrophie und die Makrophagenakkumulation im weißen Fettgewebe nach. Sie verwendeten den gleichen Mausstamm und ein vergleichbares hochkalorisches Fettfutter [266].

Wie in der Leber beobachtet, kam es auch in beiden Fettgewebesarten zu einer Umverteilung der Makrophagen. Wie in der Leber beobachtet, lagern sich auch im weißen Fettgewebe Makrophagen um apoptotische Adipozyten, und bilden dabei CLS. Im weißen Fettgewebe scheint PAR4 einen größeren Einfluss auf die Makrophagenakkumulation und die Bildung von CLS zu haben als in der Leber. Eine mögliche Erklärung könnte die deutlich stärkere PAR4-Expression auf Adipozyten liefern, so dass PAR4 hier einen größeren Einfluss hat als in der Leber [145].

Im braunen Fettgewebe kam es ebenfalls während einer hochkalorischen Fütterung zu einer Makrophagenrekrutierung und zur Bildung von CLS. Diese sind aber morphologisch kleiner, da braune Adipozyten mehrere kleine Lipidvakuolen enthalten und auch nicht drastisch an Größe zunehmen wie die Adipozyten des weißen Fettgewebes. Die Beobachtungen zum braunen Fettgewebe werden von den Daten von Herrero *et al.*

unterstützt. Diese Gruppe wies ebenfalls in C57Bl/6J-Mäusen eine Adipozytenhypertrophie und eine Makrophagenakkumulation im braunen Fettgewebe nach. Dabei verwendeten sie ein Fettfutter, welches 40 % der Kalorien aus Fett enthielt [267]. Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten zum braunen Fettgewebe werden zusätzlich von Dinh *et al.* bestätigt. Diese Gruppe verwendete ebenfalls C57Bl/6J-Mäuse und ein vergleichbares Fettfutter. Diese Gruppe beschrieb ebenfalls eine Adipozytenhypertrophie und eine Makrophagenakkumulation im braunen Fettgewebe unter dieser Behandlung [268]. Die Beteiligung von PAR4 ist in diesem Kontext erstmals untersucht worden und legt nahe, dass sowohl die Adipozytenhypertrophie als auch die Makrophagenakkumulation in beiden Fettgewebesarten PAR4-abhängig sind.

Zusammenfassung

Die Inzidenzen der nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung (NAFLE) und der Insulinresistenz haben in den letzten Jahrzehnten zugenommen und werden in naher Zukunft voraussichtlich weiter zunehmen. Die Entwicklung der NAFLE wird durch ein Überangebot an Fett in der Ernährung verursacht. Der erhöhte Bedarf der Energiespeicherung führt zu einer Hypertrophie des Fettgewebes sowie zu einer erhöhten Speicherung ektopischer Lipide in Organen wie der Leber, die während einer hochkalorischen Fettfütterung mehr Lipide in den Hepatozyten speichert. Dies führt zu einer Veränderung der intrazellulären und extrazellulären Kommunikation in der Leber. Die chronisch niedrig-gradige Entzündung des Fettgewebes führt unterdessen zu einer Insulinresistenz und einer gestörten Glukosehomöostase.

Der Protease-aktivierte Rezeptor 4 (PAR4) ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor, der eine wichtige Rolle in der Aktivierung von Thrombozyten spielt. PAR4 wird durch Thrombin sowie durch andere Proteasen aus der Gerinnungskaskade oder von Proteasen, die aus Entzündungszellen freigesetzt werden, aktiviert. Interessanterweise wird der größte Teil des Thrombins, welches während der Koagulation aktiviert wird, erst aktiviert, nachdem die Koagulation abgeschlossen ist. Es wird daher angenommen, dass es eine gerinnungsunabhängige physiologische Funktion von aktiviertem Thrombin und der gleichzeitigen Aktivierung von PAR4 gibt. In der Tat wurde die Beteiligung von PAR4 an verschiedenen Pathologien in den letzten Jahren beschrieben. Die Grundlage dieser Arbeit basiert auf der Beobachtung, dass PAR4 unter hohen Glukosekonzentrationen in verschiedenen Zellen hochreguliert wird. Daher untersuchte diese Arbeit, ob PAR4 die Entwicklung von NAFLE und Insulinresistenz beeinflusst.

In dieser Studie wurde erstmals die Beteiligung von PAR4 an der Entwicklung von NAFLE und Insulinresistenz gezeigt. PAR4 trägt zu einer Gewichtszunahme und zur Ansammlung von Körperfett zu Beginn einer hochkalorischen Fettfütterung bei und fördert die Gewichtszunahme der Leber und des epididymalen weißen und interskapulären braunen Fettgewebes. Dies wird gefördert durch die PAR4-vermittelte Adipozytenhypertrophie. Demnach ist PAR4 an der Entwicklung von Insulinresistenz und einer gestörten Glukosetoleranz beteiligt. Interessanterweise nehmen diese PAR4-abhängigen Wirkungen im Verlauf der hochkalorischen Fettfütterung ab und werden zu späteren Zeitpunkten nicht mehr beobachtet. Die in der vorliegenden Arbeit ausgeführten Daten belegen ferner, dass PAR4 für die Regulation der Chemokin- und Zytokinantwort, die in Reaktion auf eine hochkalorische Fettfütterung induziert wird, von Bedeutung ist. Dies gilt sowohl im Hinblick auf die Expression auf Transkrip-

tebene im Leber-, sowie im braunen und weißen Fettgewebe als auch hinsichtlich der Serumkonzentration entsprechender Mediatoren. Darüber hinaus beeinflusst PAR4 die Rekrutierung von Makrophagen in Leber und Fettgewebe.

Diese Arbeit liefert erste Hinweise auf die Beteiligung von PAR4 an der Entwicklung von NAFLD und Insulinresistenz. Diese Ergebnisse sind besonders interessant, um mögliche vorteilhafte Nebenwirkungen von PAR4-Inhibitoren zu untersuchen. Selektive PAR4-Blocker befinden sich bereits in der klinischen Entwicklung als sichere Antithrombotika. Die vorliegenden Befunde legen nahe, dass diese neuen Wirkstoffe zusätzlich zu ihrer hämostatischen Wirkung, insbesondere auf der Ebene des Leber- und Fettgewebes, zusätzliche Vorteile haben können. Die PAR4-Hemmung könnte die durch das Fettgewebe bedingte chronisch niedrig-gradige Entzündung einschränken, um die Insulinresistenz zu verbessern und die Entwicklung einer Fettlebererkrankung zu unterdrücken.

Summary

The incidence of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and of insulin resistance have increased in recent decades and are expected to rise further in the near future. The development of NAFLD is caused by an oversupply of fat in the diet. The increased requirement for energy storage leads to hypertrophy of the adipose tissue as well as an increased ectopic lipid storage in organs, such as the liver, which stores more lipids in hepatocytes during a high-caloric-high-fat diet. This leads to a change in intracellular and extracellular communication in the liver. The chronic low-grade inflammation of adipose tissue meanwhile drives insulin resistance and impaired glucose homeostasis.

The protease-activated receptor 4 (PAR4) is a G protein-coupled receptor with a key role in platelet activation. PAR4 is activated by thrombin, as well as by other proteases from the coagulation cascade or released from inflammatory cells. Interestingly, most of the thrombin generated during coagulation is actually formed after clotting is complete. Therefore, it is supposed that there is a coagulation-independent physiological function of activated thrombin and the concomitant activation of PAR4. Indeed, PAR4 involvement in different pathologies has been described in recent years. The foundation of this work is based on the observation that PAR4 is upregulated expressed in different cells under high glucose concentrations. Therefore, this study investigated whether PAR4 has an influence on the development of NAFLD and insulin resistance.

In this study, the involvement of PAR4 in the development of NAFLD and insulin resistance was first demonstrated. PAR4 contributes to accelerated weight gain and body fat accumulation at the beginning of high-caloric-high-fat feeding, and promotes higher liver weights and epididymal white and interscapular brown adipose tissue weights, due to PAR4-driven adipocyte hypertrophy. Accordingly, PAR4 is involved in the development of insulin resistance and impaired glucose tolerance. Interestingly, these PAR4-dependent effects decrease during the course of high-caloric-high-fat feeding and are no longer observed at later time points. PAR4 moreover affects cytokine and chemokine secretion from liver and both white and brown adipose tissues. This change in cytokine and chemokine profile could also be observed in serum. Furthermore, PAR4 affects the composition of the immune cell population in the liver during high-caloric-high-fat feeding, especially the recruitment of macrophages to liver and adipose tissue.

This study provides first evidence for the involvement of PAR4 in the development of NAFLD and insulin resistance. These results are particularly interesting for exploring possible beneficial side effects of PAR4 inhibitors. Selective PAR4 blockers are

already in clinical development as safer antiplatelet agents. The present findings suggest these new agents may also have additional benefits beyond their hemostatic action, particularly at the level of the liver and adipose tissues. Potentially PAR4 inhibition could limit adipose tissue-driven chronic low-grade inflammation to improve insulin resistance and suppress development of fatty liver disease.

Literatur

- [1] CLARK, JM ; BRANCATI, FL ; DIEHL, AME: Nonalcoholic fatty liver disease: the most common cause of abnormal liver enzymes in the US population. In: *Gastroenterology* 120 (2011), Nr. 5, Suppl. 1, S. A65
- [2] CHALASANI, N ; YOUNOSSE, Z ; LAVINE, JE ; DIEHL, AM ; BRUNT, EM ; CUSI, K ; CHARLTON, M ; SANYAL, AJ: The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. In: *Hepatology* 55 (2012), Nr. 6, S. 2005–2023
- [3] VERNON, G ; BARANOVA, A ; YOUNOSSE, ZM: Systematic review: The epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. In: *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 34 (2011), Nr. 3, S. 274–285
- [4] MUSSO, G ; GAMBINO, R ; CASSADER, M ; PAGANO, G: Meta-analysis: Natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and diagnostic accuracy of non-invasive tests for liver disease severity. In: *Annals of Medicine* 43 (2011), Nr. 8, S. 617–649
- [5] COHEN, JC ; HORTON, JD ; HOBBS, HH: Human Fatty Liver Disease: Old Questions and New Insights. In: *Science* 332 (2011), Nr. 6037, S. 1519–1523
- [6] MARTINEZ-HERNANDEZ, A ; AMENTA, PS: The hepatic extracellular matrix - II. Ontogenesis, regeneration and cirrhosis. In: *Virchows Archiv A Pathological Anatomy and Histopathology* 423 (1993), Nr. 2, S. 77–84
- [7] GRESSNER, AM ; BACHEM, MG: Molecular mechanisms of liver fibrogenesis - A homage to the role of activated fat-storing cells. In: *Digestion* 56 (1995), Nr. 5, S. 335–346
- [8] KMIEC, Z: Cooperation of liver cells in health and disease. In: *Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology* III-XIII (2001), Nr. 161, S. 1–151
- [9] POCOCK, G ; RICHARDS, CD: *Human Physiology - the Basis of Medicine*. 3. Edition. Oxford University Press, 2006. – 404 S.
- [10] HERNANDEZ-GEA, V ; FRIEDMAN, SL: Pathogenesis of liver fibrosis. In: *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 6 (2011), S. 425–456
- [11] CRISPE, IN: Hepatocytes as Immunological Agents. In: *The Journal of Immunology* 196 (2016), Nr. 1, S. 17–21
- [12] BODE, JG ; ALBRECHT, U ; HÄUSSINGER, D ; HEINRICH, PC ; SCHAPER, F: Hepatic acute phase proteins - Regulation by IL-6- and IL-1-type cytokines involving STAT3 and its crosstalk with NF- κ B-dependent signaling. In: *European Journal of Cell Biology* 91 (2012), Nr. 6-7, S. 496–505
- [13] JANEWAY, CA: The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. In: *Immunology Today* 13 (1992), Nr. 1, S. 11–16
- [14] KUBES, P ; MEHAL, WZ: Sterile inflammation in the liver. In: *Gastroenterology* 143 (2012), Nr. 5, S. 1158–1172

- [15] TAKEUCHI, O ; AKIRA, S: Pattern Recognition Receptors and Inflammation. In: *Cell* 140 (2010), Nr. 6, S. 805–820
- [16] MANDREKAR, P ; AMBADE, A ; LIM, A ; SZABO, G ; CATALANO, D: An essential role for monocyte chemoattractant protein-1 in alcoholic liver injury: Regulation of proinflammatory cytokines and hepatic steatosis in mice. In: *Hepatology* 54 (2011), Nr. 6, S. 2185–2197
- [17] OBSTFELD, AE ; SUGARU, E ; THEARLE, M ; FRANCISCO, AM ; GAYET, C ; GINSBERG, HN ; ABLES, EV ; FERRANTE, AW J.: C-C Chemokine Receptor 2 (CCR2) Regulates the Hepatic Recruitment of Myeloid Cells That Promote Obesity-Induced Hepatic Steatosis. In: *Diabetes* 59 (2010), S. 916–925
- [18] CHANG, B ; XU, MJ ; ZHOU, Z ; CAI, Y ; LI, M ; WANG, W ; FENG, D ; BERTOLA, A ; WANG, H ; KUNOS, G ; GAO, B: Short- or long-term high-fat diet feeding plus acute ethanol binge synergistically induce acute liver injury in mice: An important role for CXCL1. In: *Hepatology* 62 (2015), Nr. 4, S. 1070–1085
- [19] ARII, S ; IMAMURA, M: Physiological role of sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells and their implication in the pathogenesis of liver injury. In: *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 7 (2000), Nr. 1, S. 40–48
- [20] ISHIBASHI, H ; NAKAMURA, M ; KOMORI, A ; MIGITA, K ; SHIMODA, S: Liver architecture, cell function, and disease. In: *Seminars in Immunopathology* 31 (2009), Nr. 3, S. 399–409
- [21] GOMEZ PERDIGUERO, E ; KLAPPROTH, K ; SCHULZ, C ; BUSCH, K ; AZZONI, E ; CROZET, L ; GARNER, H ; TROUILLET, C ; DE BRUIJN, MF ; GEISSMANN, F ; RODEWALD, HR: Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythromyeloid progenitors. In: *Nature* 518 (2015), S. 547–551
- [22] KIM, KW ; ZHANG, N ; CHOI, K ; RANDOLPH, GJ: Homegrown Macrophages. In: *Immunity* 45 (2016), Nr. 3, S. 468–470
- [23] TACKE, F ; ZIMMERMANN, HW: Macrophage heterogeneity in liver injury and fibrosis. In: *Journal of Hepatology* 60 (2014), Nr. 5, S. 1090–1096
- [24] SCOTT, CL ; ZHENG, F ; DE BAETSELIER, P ; MARTENS, L ; SAEYS, Y ; S, De Prijck ; LIPPENS, S ; ABELS, C ; SCHOONOOGHE, S ; RAES, G ; DEVOOGDT, N ; LAMBRECHT, BN ; BESCHIN, A ; GUILLIAMS, M: Bone marrow-derived monocytes give rise to self-renewing and fully differentiated Kupffer cells. In: *Nature Communications* 7 (2016), S. 1–10
- [25] KRENKEL, O ; TACKE, F: Liver macrophages in tissue homeostasis and disease. In: *Nature Reviews Immunology* 17 (2017), Nr. 5, S. 306–321
- [26] CHA, JY ; KIM, DH ; CHUN, KH: The role of hepatic macrophages in nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. In: *Nature Reviews Immunology* 34 (2018), Nr. 4, S. 133–139
- [27] DIXON, LJ ; BARNES, M ; TANG, H ; PRITCHARD, MT ; NAGY, LE: Kupffer Cells in the Liver. In: *Comprehensive Physiology* 3 (2013), Nr. 2, S. 785–797

- [28] JU, C ; REILLY, TP ; BOURDI, M ; RADONOVICH, MF ; BRADY, JN ; GEORGE, JW ; POHL, LR: Protective role of kupffer cells in acetaminophen-induced hepatic injury in mice. In: *Chemical Research in Toxicology* 15 (2002), Nr. 12, S. 1504–1513
- [29] RAMACHANDRAN, P ; IREDALE, JP: Macrophages: Central regulators of hepatic fibrogenesis and fibrosis resolution. In: *Journal of Hepatology* 56 (2012), Nr. 6, S. 1417–1419
- [30] NAGY, LE: The Role of Innate Immunity in Alcoholic Liver Disease. In: *Alcohol research: current reviews* 37 (2015), Nr. 2, S. 237–50
- [31] CHIANG, DJ ; PRITCHARD, MT ; NAGY, LE: Obesity, diabetes mellitus, and liver fibrosis. In: *American Journal of Physiology: Gastrointestinal & Liver Physiology* 63 (2011), Nr. 5, S. G697–G702
- [32] GORDON, Siamon ; PLÜDDEMANN, Annette: Tissue macrophages: heterogeneity and functions. In: *BMC Biology* 15 (2017), Nr. 53, S. 1–18
- [33] CHAWLA, A ; NGUYEN, DK ; GOH, YPS: Macrophage-Mediated Inflammation in Metabolic Disease. In: *Nature reviews. Immunology* 11 (2012), Nr. 11, S. 738–749
- [34] STOUT, RD: Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. In: *Journal of Leukocyte Biology* 76 (2004), Nr. 3, S. 509–513
- [35] FUKUSHIMA, J ; KAMADA, Y ; MATSUMOTO, H ; YOSHIDA, Y ; EZAKI, H ; TAKEMURA, T ; SAJI, Y ; IGURA, T ; TSUTSUI, S ; KIHARA, S ; FUNAHASHI, T ; SHIMOMURA, I ; TAMURA, S ; KISO, S ; HAYASHI, N: Adiponectin prevents progression of steatohepatitis in mice by regulating oxidative stress and Kupffer cell phenotype polarization. In: *Hepatology Research* 39 (2009), Nr. 7, S. 724–738
- [36] HEYMANN, F ; HAMMERICH, L ; STORCH, D ; BARTNECK, M ; HUSS, S ; RÜSSELER, V ; GASSLER, N ; LIRA, SA ; LUEDDE, T ; TRAUTWEIN, C ; TACKE, F: Hepatic macrophage migration and differentiation critical for liver fibrosis is mediated by the chemokine receptor C-C motif chemokine receptor 8 in mice. In: *Hepatology* 55 (2012), Nr. 3, S. 898–909
- [37] LOUVET, A ; TEIXEIRA-CLERC, F ; CHOBERT, MN ; DEVEAUX, V ; PAVOINE, C ; ZIMMER, A ; PECKER, F ; MALLAT, A ; S, Lotersztajn: Cannabinoid CB2 receptors protect against alcoholic liver disease by regulating Kupffer cell polarization in mice. In: *Hepatology* 54 (2011), Nr. 4, S. 1217–1226
- [38] MAINA, V ; SUTTI, S ; LOCATELLI, I ; VIDALI, M ; MOMBELLO, C ; BOZZOLA, C ; E, Albano: Bias in macrophage activation pattern influences non-alcoholic steatohepatitis (NASH) in mice. In: *Clinical Science* 122 (2012), Nr. 11, S. 545–554
- [39] MANDAL, P ; PRATT, BT ; BARNES, M ; MCMULLEN, MR ; NAGY, LE: Molecular mechanism for adiponectin-dependent m2 macrophage polarization link between the metabolic and innate immune activity of full-length adiponectin. In: *Journal of Biological Chemistry* 286 (2011), Nr. 15, S. 13460–13469
- [40] PAPACKOVA, Z ; PALENICKOVA, E ; DANKOVA, H ; ZDYCHOVA, J ; SKOP, V ; KAZDOVA, L ; CAHOVA, M: Kupffer cells ameliorate hepatic insulin resistance induced by high-fat diet rich in monounsaturated fatty acids: the evidence for the involvement of alternatively activated macrophages. In: *Nutr Metab (Lond)* 9 (2012), S. 22

- [41] SHIRABE, K ; MANO, Y ; MUTO, J ; MATONO, R ; MOTOMURA, T ; TOSHIMA, T ; TAKEISHI, K ; UCHIYAMA, H ; YOSHIZUMI, T ; TAKETOMI, A ; MORITA, M ; TSUJITANI, S ; SAKAGUCHI, Y ; MAEHARA, Y: Role of tumor-associated macrophages in the progression of hepatocellular carcinoma. In: *Surgery Today* 42 (2012), Nr. 1, S. 1–7
- [42] ODEGAARD, JI ; CHAWLA, A: Mechanisms of macrophage activation in obesity-induced insulin resistance. In: *Nature Clinical Practice Endocrinology and Metabolism* 4 (2008), Nr. 11, S. 619–626
- [43] ODEGAARD, JI ; RICARDO-GONZALEZ, RR ; GOFORTH, MH ; MOREL, CR ; SUBRAMANIAN, V ; MUKUNDAN, L ; RED EAGLE, A ; VATS, D ; BROMBACHER, F ; FERRANTE, AW ; CHAWLA, A: Macrophage-specific PPAR γ controls alternative activation and improves insulin resistance. In: *Nature* 447 (2007), Nr. 7148, S. 1116–1120
- [44] ANTOINE, DJ ; WILLIAMS, DP ; PARK, BK: Understanding the role of reactive metabolites in drug-induced hepatotoxicity: state of the science. In: *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 4 (2008), Nr. 11, S. 1415–1427
- [45] HUANG, W ; METLAKUNTA, A ; DEDOUSIS, N ; ZHANG, P ; SIPULA, I ; DUBE, JJ ; SCOTT, DK ; O'DOHERTY, RM: Depletion of Liver Kupffer Cells Prevents the. 26 (2014), S. 347–357
- [46] LANTHIER, N ; MOLENDI-COSTE, O ; CANI, PD ; ROOIJEN, N van ; HORSMANS, Y ; LECLERCQ, IA: Kupffer cell depletion prevents but has no therapeutic effect on metabolic and inflammatory changes induced by a high-fat diet. In: *The FASEB Journal* 25 (2011), Nr. 12, S. 4301–4311
- [47] STIENSTRA, R ; SAUDALE, F ; DUVAL, C ; KESHTKAR, S ; GROENER, JE ; ROOIJEN, N van ; STAELS, B ; KERSTEN, S ; MÜLLER, M: Kupffer cells promote hepatic steatosis via interleukin-1 β -dependent suppression of peroxisome proliferator-activated receptor α activity. In: *Hepatology* 51 (2010), Nr. 2, S. 511–522
- [48] BAFFY, G: Kupffer cells in non-alcoholic fatty liver disease: The emerging view. In: *Journal of Hepatology* 51 (2009), Nr. 1, S. 212–223
- [49] LE, N: Recent insights into the role of the innate immune system in the development of alcoholic liver disease. In: *Exp Biol Med (Maywood)* 228 (2003), Nr. 8, S. 882–90
- [50] TATEYA, S ; RIZZO, NO ; HANDA, P ; CHENG, AM ; MORGAN-STEVENSON, V ; DAUM, G ; CLOWES, AW ; MORTON, GJ ; SCHWARTZ, MW ; F, Kim: Endothelial NO/cGMP/VASP signaling attenuates kupffer cell activation and hepatic insulin resistance induced by high-fat feeding. In: *Diabetes* 60 (2011), Nr. 11, S. 2792–2801
- [51] LUMENG, Carey N. ; BODZIN, Jennifer L. ; SALTIEL, Alan R. ; LUMENG, Carey N. ; BODZIN, Jennifer L. ; SALTIEL, Alan R.: Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization Find the latest version : Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. 117 (2007), Nr. 1, S. 175–184
- [52] WEISBERG, SP ; HUNTER, D ; HUBER, R ; LEMIEUX, J ; SLAYMAKER, S ; VADDI, K ; CHARO, I ; LEIBEL, RL ; FERRANTE, AW J.: CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. In: *Journal of Clinical Investigation* 116 (2006), Nr. 1, S. 115

- [53] CLEMENTI, AH ; GAUDY, AM ; ROOIJEN, N van ; PIERCE, RH ; MOONEY, RA: Loss of Kupffer cells in diet-induced obesity is associated with increased hepatic steatosis, STAT3 signaling, and further decreases in insulin signaling. In: *Biochimica et Biophysica Acta Molecular Basis of Disease* 1792 (2009), Nr. 11, S. 1062–1072
- [54] CHERETAKIS, C ; LEUNG, R ; CHUN, XS ; DROR, Y ; GLOGAUER, M: Timing of neutrophil tissue repopulation predicts restoration of innate immune protection in a murine bone marrow transplantation model. In: *Blood* 108 (2006), Nr. 8, S. 2821–2826
- [55] ULICH, TR ; CASTILLO, J del ; SOUZA, L: Kinetics and mechanisms of recombinant human granulocyte-colony stimulating factor-induced neutrophilia. In: *The American Journal of Pathology* 133 (1988), Nr. 3, S. 630–638
- [56] KOO, S: Nonalcoholic fatty liver disease: molecular mechanisms for the hepatic steatosis. In: *Clinical and Molecular Hepatology* 19 (2013), Nr. 3, S. 210
- [57] RENSEN, SS ; BIEGHS, V ; XANTHOULEA, S ; ARFIANTI, E ; BAKKER, JA ; SHIRI-SVERDLOV, R ; HOFKER, MH ; GREVE, JW ; BUURMAN, WA: Neutrophil-Derived Myeloperoxidase Aggravates Non-Alcoholic Steatohepatitis in Low-Density Lipoprotein Receptor-Deficient Mice. In: *PLoS ONE* 7 (2012), Nr. 12
- [58] IBUSUKI, R ; UTO, H ; ARIMA, S ; MAWATARI, S ; SETOGUCHI, Y ; IWASHITA, Y ; HASHIMOTO, S ; MAEDA, T ; TANOUE, S ; KANMURA, S ; OKETANI, M ; IDO, A ; TSUBOUCHI, H: Transgenic expression of human neutrophil peptide-1 enhances hepatic fibrosis in mice fed a choline-deficient, L-amino acid-defined diet. In: *Liver International* 33 (2013), Nr. 10, S. 1549–1556
- [59] ALKHOURI, N ; MORRIS-STIFF, G ; CAMPBELL, C ; LOPEZ, R ; TAMIMI, TA ; YERIAN, L ; ZEIN, NN ; FELDSTEIN, AE: Neutrophil to lymphocyte ratio: A new marker for predicting steatohepatitis and fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *32* (2012), Nr. 2, S. 297–302
- [60] KHASHAB, MA ; LIANGPUNSAKUL, S ; CHALASANI, N: Nonalcoholic fatty liver disease as a component of the metabolic syndrome. In: *Current Gastroenterology Reports* 10 (2008), Nr. 1, S. 73–80
- [61] MATHERS, CD ; LONCAR, D: Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. In: *PLoS Medicine* 3 (2006), Nr. 11, S. 2011–2030
- [62] KIRKMAN, MS ; BRISCOE, VJ ; CLARK, N ; FLOREZ, H ; HAAS, LB ; HALTER, JB ; HUANG, ES ; KORYTKOWSKI, MT ; MUNSHI, MN ; ODEGARD, PS ; PRATLEY, RE ; CS, Swift: Diabetes in older adults. In: *Diabetes Care* 35 (2012), Nr. 12, S. 2650–2664
- [63] NOLAN, CJ ; DAMM, P ; PRENTKI, M: Type 2 diabetes across generations: From pathophysiology to prevention and management. In: *The Lancet* 378 (2011), Nr. 9786, S. 169–181
- [64] PRENTKI, M ; NOLAN, CJ: Islet β -cell failure in type 2 diabetes. In: *The Journal of Clinical Investigation* 116 (2006), Nr. 7, S. 1802–1812
- [65] ACKERMANN, RT ; CHENG, YJ ; WILLIAMSON, DF ; GREGG, EW: Identifying adults at high risk for diabetes and cardiovascular disease using hemoglobin A1c: National Health and Nutrition Examination Survey 2005–2006. In: *American Journal of Preventive Medicine* 40 (2011), Nr. 1, S. 11–17

- [66] DESCRIPTION, Diabetes: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. In: *Diabetes Care* 34 (2011), Nr. Suppl.1
- [67] BRYŚKIEWICZ, ME ; MAJKOWSKA, L: Glycated hemoglobin (HbA1c) as a standard diagnostic criterium for diabetes? In: *Journal: Pol Merkur Lekarski* 30 (2011), Nr. 176, S. 150–154
- [68] INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION: The IDF consensus worldwide definition of the Metabolic Syndrome. (2006), S. 1–24
- [69] LANDGRAF, R ; NAUCK, M ; FRECKMANN, G ; MÜLLER, UA ; HEINEMANN, L ; KELLERER, M ; MÜLLER-WIELAND, D: *Pitfalls in the diagnosis of diabetes: Are we too lax with laboratory parameters?* 2018. – 553–563 S.
- [70] MANDVIWALA, T ; KHALID, U ; DESWAL, A: Obesity and Cardiovascular Disease: a Risk Factor or a Risk Marker? In: *Current Atherosclerosis Reports* 18 (2016), Nr. 5
- [71] MARION, AW ; BAKER, AJ ; DHAWAN, A: Fatty liver disease in children. In: *Archives of disease in childhood* 333 (2004), S. 648–652
- [72] WEARING, SC ; HENNIG, EM ; BYRNE, NM ; STEELE, JR ; HILLS, AP: Musculoskeletal disorders associated with obesity: a biomechanical perspective. In: *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity* 7 (2006), Nr. 3, S. 239–250
- [73] FIELD, AE ; COAKLEY, EH ; MUST, A ; SPADANO, JL ; LAIRD, N ; DIETZ, WH ; RIMM, E ; COLDITZ, GA: Impact of overweight on the risk of developing common chronic conditions during a 10-year period. In: *Archives of Internal Medicine* 161 (2001), Nr. 13, S. 1581–1586
- [74] SUNG, MK ; YEON, JY ; PARK, SY ; PARK, JH ; CHOI, MS: Obesity-induced metabolic stresses in breast and colon cancer. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1229 (2011), Nr. 1, S. 61–68
- [75] CHUNG, WK ; LEIBEL, RL: Considerations regarding the genetics of obesity. In: *Obesity* 16 (2008), Nr. Suppl. 3, S. 33–39
- [76] HOTAMISLIGIL, GS: Inflammation and metabolic disorders. In: *Nature* 444 (2006), Nr. 7121, S. 860–867
- [77] MAURY, E ; BRICHARD, SM: Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. In: *Molecular and Cellular Endocrinology* 314 (2010), Nr. 1, S. 1–16
- [78] TRAYHURN, P ; WOOD, IS: Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. In: *British Journal of Nutrition* 92 (2004), Nr. 3, S. 347
- [79] WAJCHENBERG, BL: Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue .: In: *Endocrine Reviews* 21 (2000), Nr. 6, S. 697–738
- [80] KLINGENSPOR, M: Cold-induced recruitment of brown adipose tissue thermogenesis. In: *Experimental Physiology* 88 (2003), Nr. 1, S. 141–148

- [81] STEPHENS, M ; LUDGATE, M ; REES, DA: Brown fat and obesity: The next big thing? In: *Clinical Endocrinology* 74 (2011), Nr. 6, S. 661–670
- [82] CYPESS, AM ; LEHMAN, S ; WILLIAMS, G ; TAL, I ; RODMAN, D ; GOLDFINE, AB ; KUO, FC ; PALMER, EL ; TSENG, YH ; DORIA, A ; KOLODNY, GM ; KAHN, CR: Identification and Importance of Brown Adipose Tissue in Adult Humans. In: *The New England Journal of Medicine* 360 (2009), Nr. 15, S. 1509–1517
- [83] NEDERGAARD, J ; BENGTTSSON, T ; CANNON, B: Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. In: *American Journal of Physiology Endocrinology Metabolism* 293 (2007), S. 444–452
- [84] RUTH, M: Cold-Activated Brown Adipose Tissue in Healthy Men. In: *Yearbook of Endocrinology* 2010 (2010), S. 115–117
- [85] TRAYHURN, P ; WANG, B ; WOOD, IS: Hypoxia and the endocrine and signalling role of white adipose tissue. In: *Archives of Physiology and Biochemistry* 114 (2008), Nr. 4, S. 267–276
- [86] WILLIAMS, SK ; WANG, TF ; CASTRILLO, R ; JARRELL, BE: Liposuction-derived human fat used for vascular graft sodding contains endothelial cells and not mesothelial cells as the major cell type. In: *Journal of Vascular Surgery* 19 (1994), Nr. 5, S. 916–923
- [87] DUFFAUT, C ; GALITZKY, J ; LAFONTAN, M ; BOULOUMIÉ, A: Unexpected trafficking of immune cells within the adipose tissue during the onset of obesity. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 384 (2009), Nr. 4, S. 482–485
- [88] ZHU, M ; HEYDARKHAN-HAGVALL, S ; HEDRICK, M ; BENHAIM, P ; ZUK, P: Manual Isolation of Adipose-derived Stem Cells from Human Lipoaspirates. In: *Journal of Visualized Experiments* (2013), Nr. 79, S. 1–10
- [89] YE, J ; GIMBLE, JM: Regulation of stem cell differentiation in adipose tissue by chronic inflammation. In: *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 38 (2011), Nr. 12, S. 872–878
- [90] SUN, K ; KUSMINSKI, CM ; SCHERER, PE: Adipose tissue remodeling and obesity. In: *Journal of Clinical Investigation* 121 (2011), Nr. 6, S. 2094–2101
- [91] CINTI, S: Between brown and white: Novel aspects of adipocyte differentiation. In: *Annals of Medicine* 43 (2011), Nr. 2, S. 104–115
- [92] LUNDGREN, M ; SVENSSON, M ; LINDMARK, S ; RENSTRÖM, F ; RUGE, T ; ERIKSSON, JW: Fat cell enlargement is an independent marker of insulin resistance and hyperleptinaemia. In: *Diabetologia* 50 (2007), Nr. 3, S. 625–633
- [93] BJÖRNTORP, P ; SJÖSTRÖM, L: Number and size of adipose tissue fat cells in relation to metabolism in human obesity. In: *Metabolism* 20 (1971), Nr. 7, S. 703–713
- [94] WEYER, C ; FOLEY, JE ; BOGARDUS, C ; TATARANNI, PA ; PRATLEY, RE: Enlarged subcutaneous abdominal adipocyte size, but not obesity itself, predicts type II diabetes independent of insulin resistance. In: *Diabetologia* 43 (2000), Nr. 12, S. 1498–1506
- [95] GOLIA, E: Adipose tissue and vascular inflammation in coronary artery disease. In: *World Journal of Cardiology* 6 (2014), Nr. 7, S. 539

- [96] GUILHERME, A ; VIRBASIOUS, JV ; PURI, V ; CZECH, MP: Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9 (2008), Nr. 5, S. 367–377
- [97] ZHOU, J ; QIN, G: Adipocyte dysfunction and hypertension. In: *American Journal Of Cardiovascular Disease* 2 (2012), Nr. 2, S. 143–149
- [98] GRAUER, WO ; MOSS, AA ; CANN, CE ; GOLDBERG, HI: Quantification of body fat distribution in the abdomen using computed tomography. In: *The American Journal of Clinical Nutrition* 39 (1984), Nr. 4, S. 631–637
- [99] COOK, KS ; MIN, HY ; D, Johnson ; CHAPLINSKY, RJ ; FLIER, JS ; HUNT, CR ; SPIEGELMAN, BM: Adipsin: A Circulating Serine Protease Homolog. In: *Science (New York, N.Y.)* 237 (1987), Nr. 4813, S. 402–405
- [100] ZHANG, Y ; PROENCA, R ; MAFFEI, M ; BARONE, M ; LEOPOLD, L ; FRIEDMAN, JM: Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. In: *Nature* 372 (1994), S. 425–432
- [101] GOOSSENS, GH: The role of adipose tissue dysfunction in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance. In: *Physiology and Behavior* 94 (2008), Nr. 2, S. 206–218
- [102] TRAYHURN, P: Endocrine and signalling role of adipose tissue: New perspectives on fat. In: *Acta Physiologica Scandinavica* 184 (2005), Nr. 4, S. 285–293
- [103] TILG, H ; MOSCHEN, A: Inflammatory mechanisms in the regulation of insulin resistance. In: *Molecular Medicine* 14 (2008), Nr. 3-4, S. 1
- [104] BAKER, RG ; HAYDEN, MS ; GHOSH, S: NF- κ B, inflammation, and metabolic disease. In: *Cell Metabolism* 13 (2011), Nr. 1, S. 11–22
- [105] WEISBERG, SP ; MCCANN, D ; DESAI, M ; ROSENBAUM, M ; LEIBEL, RL ; FERRANTE, AW J.: Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. In: *Journal of Clinical Investigation* 112 (2003), Nr. 12, S. 1796–1808
- [106] COENEN, KR ; GRUEN, ML ; CHAIT, A ; HASTY, AH: Diet-induced increases in adiposity, but not plasma lipids, promote macrophage infiltration into white adipose tissue. In: *Diabetes* 56 (2007), Nr. 3, S. 564–573
- [107] HARMAN-BOEHM, I ; BLÜHER, M ; REDEL, H ; SION-VARDY, N ; OVADIA, S ; AVINOAACH, E ; SHAI, I ; KLÖTING, N ; STUMVOLL, M ; BASHAN, N ; RUDICH, A: Macrophage infiltration into omental versus subcutaneous fat across different populations: Effect of regional adiposity and the comorbidities of obesity. In: *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 92 (2007), Nr. 6, S. 2240–2247
- [108] KANDA, H ; TATEYA, S ; TAMORI, Y ; KOTANI, K ; HIASA, K ; KITAZAWA, R ; KITAZAWA, S ; MIYACHI, H ; MAEDA, S ; EGASHIRA, K ; KASUGA, M: MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. In: *Journal of Clinical Investigation* 116 (2006), Nr. 6, S. 1494–1505
- [109] SUGANAMI, T ; NISHIDA, J ; OGAWA, Y: A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: Role of free fatty acids and tumor necrosis factor?? In: *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 25 (2005), Nr. 10, S. 2062–2068

- [110] FENG, D ; TANG, Y ; KWON, H ; ZONG, H ; HAWKINS, M ; KITSIS, RN ; PESSIN, JE: High-fat diet-induced adipocyte cell death occurs through a cyclophilin D intrinsic signaling pathway independent of adipose tissue inflammation. In: *Diabetes* 60 (2011), Nr. 8, S. 2134–2143
- [111] CINTI, S ; MITCHELL, G ; BARBATELLI, G ; MURANO, I ; CERESI, E ; FALIOIA, E ; WANG, S ; FORTIER, M ; GREENBERG, AS ; OBIN, MS: Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. In: *Journal of Lipid Research* 46 (2005), Nr. 11, S. 2347–2355
- [112] STRISSEL, KJ ; STANCHEVA, Z ; MIYOSHI, H ; PERFIELD, JW ; DEFURIA, J ; JICK, Z ; GREENBERG, AS ; OBIN, MS: Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications. In: *Diabetes* 56 (2007), Nr. 12, S. 2910–2918
- [113] ITOH, M ; KATO, H ; SUGANAMI, T ; KONUMA, K4 ; MARUMOTO, Y ; TERAII, S ; SAKUGAWA, H ; KANAI, S ; HAMAGUCHI, M ; FUKAISHI, T ; AOE, S ; AKIYOSHI, K ; KOMOHARA, Y ; TAKEYA, M ; SAKAIDA, I ; OGAWA, Y: Hepatic crown-like structure: A unique histological feature in non-alcoholic steatohepatitis in mice and humans. In: *PLoS ONE* 8 (2013), Nr. 12
- [114] KLÖTING, N ; STUMVOLL, M ; BLÜHER, M: Biologie des viszeralen Fetts. In: *Internist* 48 (2007), Nr. 2, S. 126–133
- [115] GORDON, S: Macrophages heterogeneity and tissue lipids. In: *J Clin Invest.* 117 (2007), Nr. 1, S. 89–93
- [116] YIN, Y ; LIU, W ; DAI, Y: SOCS3 and its role in associated diseases. In: *Human Immunology* 75 (2015), Nr. 10, S. 775–780
- [117] PALANIVEL, R ; FULLERTON, MD ; GALIC, S ; HONEYMAN, J ; HEWITT, KA ; JORGENSEN, SB ; STEINBERG, GR: Reduced Socs3 expression in adipose tissue protects female mice against obesity-induced insulin resistance. In: *Diabetologia* 55 (2012), S. 3083–3093
- [118] PEDROSO, JAB ; BUONFIGLIO, DC ; CARDINALI, LI ; FURIGO, IC ; RAMOS-LOBO, AM ; TIRAPEGUI, J ; ELIAS, CF ; DONATO, J J.: Inactivation of SOCS3 in leptin receptor-expressing cells protects mice from diet-induced insulin resistance but does not prevent obesity. In: *Molecular Metabolism* 3 (2014), Nr. 6, S. 775–780
- [119] ZAMPIERI, TT ; OLIVEIRA DA SILVA, TE ; DE PAULA ROMEU, D ; TORRÃO, AS ; DONATO, J J.: SOCS3 expression within leptin receptor-expressing cells regulates food intake and leptin sensitivity but does not affect weight gain in pregnant mice consuming a high-fat diet. In: *Physiology & Behavior* 157 (2016), S. 109–115
- [120] BJØRBÆK, C ; ELMQUIST, JK ; FRANTZ, JD ; SHOELSON, SE ; FLIER, JS: Identification of SOCS-3 as a Potential Mediator of Central Leptin Resistance. In: *Molecular Cell* 1 (1998), S. 619–625
- [121] HOWARD, JK ; CAVE, BJ ; OKSANEN, LJ ; TZAMELI, I ; BJØRBÆK, C ; FLIER, JS: Enhanced leptin sensitivity and attenuation of diet-induced obesity in mice with haploinsufficiency of Socs3. In: *Nature Medicine* 10 (2004), Nr. 7, S. 734–738

- [122] EMANUELLI, B ; PERALDI, P ; FILLOUX, C ; CHAVEY, C ; FREIDINGER, K ; HILTON, DJ ; HOTAMISLIGIL, GS ; VAN OBBERGHEN, E: SOCS-3 Inhibits Insulin Signaling and Is Up-regulated in Response to Tumor Necrosis Factor- α in the Adipose Tissue of Obese Mice. In: *Journal of Biological Chemistry* 276 (2001), Nr. 51, S. 47944–47949
- [123] KLOK, MD ; JAKOBSDOTTIR, S ; DRENT, ML: The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: a review. In: *obesity* 8 (2006), S. 21–34
- [124] KANG, L ; SEBASTIAN, BM ; PRITCHARD, MT ; PRATT, BT ; PREVIS, SF ; NAGY, LE: Chronic ethanol-induced insulin resistance is associated with macrophage infiltration into adipose tissue and altered expression of adipocytokines. In: *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 31 (2007), Nr. 9, S. 1581–1588
- [125] SEBASTIAN, BM ; ROYCHOWDHURY, S ; TANG, H ; HILLIAN, AD ; FELDSTEIN, AE ; STAHL, GL ; TAKAHASHI, K ; NAGY, LE: Identification of a cytochrome P450E1/Bid/C1q-dependent axis mediating inflammation in adipose tissue after chronic ethanol feeding to mice. In: *Journal of Biological Chemistry* 286 (2011), Nr. 41, S. 35989–35997
- [126] ABEL, ED ; PERONI, O ; KIM, JK ; KIM, YB ; BOSS, O ; HADRO, E ; MINNEMANN, T ; SHULMAN, GI ; BB, Kahn: Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. In: *Nature* 409 (2001), Nr. 6821, S. 729–33
- [127] MARCHESINI, G ; BRIZI, M ; BIANCHI, G ; TOMASSETTI, S ; BUGIANESI, E ; LENZI, M ; MCCULLOUGH, AJ ; NATALE, S ; FORLANI, G ; MELCHIONDA, N: Nonalcoholic fatty liver disease: A feature of the metabolic syndrome. In: *Diabetes* 50 (2001), Nr. 8, S. 1844–1850
- [128] SCHREUDER, TC ; VERWER, BJ ; NIEUWKERK, CM van ; MULDER, CJ: Nonalcoholic fatty liver disease: an overview of current insights in pathogenesis, diagnosis and treatment. In: *World journal of gastroenterology* 14 (2008), Nr. 16, S. 2474–2486
- [129] ERIKSSON, EE ; XIE, X ; WERR, J ; THOREN, P ; LINDBOM, L: Importance of Primary Capture and L-Selectin-Dependent Secondary Capture in Leukocyte Accumulation in Inflammation and Atherosclerosis in Vivo. In: *The Journal of Experimental Medicine* 194 (2001), Nr. 2, S. 205–218
- [130] STEINHOFF, M ; BUDDENKOTTE, J ; SHPACOVITCH, V ; RATTENHOLL, A ; MOORMANN, C ; VERGNOLLE, N ; LUGER, TA ; HOLLENBERG, MD: Proteinase-activated receptors: Transducers of proteinase-mediated signaling in inflammation and immune response. In: *Endocrine Reviews* 26 (2005), Nr. 1, S. 1–43
- [131] VU, TKH ; HUNG, DT ; WHEATON, VI ; COUGHLIN, SR: Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. In: *Cell* 64 (1991), Nr. 6, S. 1057–1068
- [132] NYSTEDT, S ; EMILSSON, K ; WAHLESTEDT, C ; SUNDELIN, J: Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 91 (1994), Nr. 20, S. 9208–9212

- [133] ISHIHARA, H ; CONNOLLY, AJ ; ZENG, D ; KAHN, ML ; ZHENG, YW ; TIMMONS, C ; TRAM, T ; COUGHLIN, SR: *Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans*. 1997
- [134] KAHN, ML ; ZHENG, YW ; HUANG, W ; BIGORNIA, V ; ZENG, D ; MOFF, S ; FARESE, RV J. ; TAM, C ; COUGHLIN, SR: A dual thrombin receptor system for platelet activation. In: *Nature* 394 (1998), Nr. 6694, S. 690–694
- [135] XU, WF ; ANDERSEN, H ; WHITMORE, TE ; PRESNELL, SR ; YEE, DP ; CHING, A ; GILBERT, T ; DAVIE, EW ; FOSTER, DC: Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 95 (1998), Nr. 12, S. 6642–6646
- [136] SAMBRANO, GR ; HUANG, W ; FARUQI, T ; MAHRUS, S ; CRAIK, C ; COUGHLIN, SR: Cathepsin G Activates Protease-activated Receptor-4 in Human Platelets Cathepsin G Activates Protease-activated Receptor-4 in Human Platelets. In: *J Biol Chem* 275 (2000), Nr. 10, S. 6819–6823
- [137] KESSENBROCK, K ; DAU, T ; JENNE, DE: Tailor-made inflammation: How neutrophil serine proteases modulate the inflammatory response. In: *Journal of Molecular Medicine* 89 (2011), Nr. 1, S. 23–28
- [138] ADAMS, MN ; RAMACHANDRAN, R ; YAU, MK ; SUEN, JY ; FAIRLIE, DP ; HOLLENBERG, MD ; HOOPER, JD: Structure, function and pathophysiology of protease activated receptors. In: *Pharmacology and Therapeutics* 130 (2011), Nr. 3, S. 248–282
- [139] FRENCH, SL ; HAMILTON, JR: Protease-activated receptor 4: from structure to function and back again. In: *British Journal of Pharmacology* 173 (2016), Nr. 20, S. 2952–2965
- [140] JACQUES, SL ; KULIOPULOS, A: Protease-activated receptor-4 uses dual prolines and an anionic retention motif for thrombin recognition and cleavage. In: *The Biochemical journal* 376 (2003), Nr. 3, S. 733–740
- [141] NIEMAN, MT: Protease-activated receptor 4 uses anionic residues to interact with α -thrombin in the absence or presence of protease-activated receptor 1. In: *Biochemistry* 47 (2008), Nr. 50, S. 13279–13286
- [142] COUGHLIN, SR: Thrombin signalling and protease-activated receptors. In: *Nature* 407 (2000), Nr. 6801, S. 258–264
- [143] VERGNOLLE, N ; DERIAN, CK ; D’ANDREA, MR ; STEINHOFF, M ; ANDRADE-GORDON, P: Characterization of Thrombin-Induced Leukocyte Rolling and Adherence: A Potential Proinflammatory Role for Proteinase-Activated Receptor-4. In: *The Journal of Immunology* 169 (2002), Nr. 3, S. 1467–1473
- [144] KATAOKA, H ; HAMILTON, JR ; MCKEMY, DD ; CAMERER, E ; ZHENG, YW ; CHENG, A ; GRIFFIN, C ; COUGHLIN, SR: Protease-activated receptors 1 and 4 mediate thrombin signaling in endothelial cells. In: *Enzyme* 102 (2003), Nr. 9, S. 3224–3231
- [145] STRANDE, JL ; PHILLIPS, SA: Thrombin increases inflammatory cytokine and angiogenic growth factor secretion in human adipose cells in vitro. In: *Journal of Inflammation* 6 (2009), S. 1–10

- [146] HAMILTON, JR ; FRAUMAN, AG ; COCKS, TM: Increased Expression of Protease-Activated Receptor-2 (PAR2) and PAR4 in Human Coronary Artery by Inflammatory Stimuli Unveils Endothelium-Dependent Relaxations to PAR2 and PAR4 Agonists. In: *Circulation Research* 89 (2001), S. 92–98
- [147] CHEN, D ; WANG, Z ; ZHANG, Z ; ZHANG, R ; YU, L: Capsaicin up-regulates protease-activated receptor-4 mRNA and protein in primary cultured dorsal root ganglion neurons. In: *Cellular and Molecular Neurobiology* 33 (2013), Nr. 3, S. 337–346
- [148] MAHAJAN-THAKUR, S ; SOSTMANN, BD ; FENDER, AC ; BEHRENDT, D ; FELIX, SB ; SCHRÖR, K ; RAUCH, BH: Sphingosine-1-phosphate induces thrombin receptor PAR-4 expression to enhance cell migration and COX-2 formation in human monocytes. In: *Journal of Leukocyte Biology* 96 (2014), Nr. 4, S. 611–618
- [149] PAVIC, G ; GRANDOCH, M ; DANGWAL, S ; JOBI, K ; RAUCH, BH ; DOLLER, A ; OBERHUBER, A ; P, Akhyari ; SCHROR, K ; FISCHER, JW ; AC, Fender: Thrombin receptor protease-activated receptor 4 is a key regulator of exaggerated intimal thickening in diabetes mellitus. In: *Circulation* 130 (2014), Nr. 19, S. 1700–1711
- [150] JIANG, P ; YU, G ; ZHANG, Y ; XIANG, Y ; HUA, HR ; BIAN, L ; WANG, CY ; LEE, WH ; ZHANG, Y: Down-regulation of Protease-activated Receptor 4 in Lung Adenocarcinoma is Associated with a More Aggressive Phenotype. In: *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 14 (2013), Nr. 6, S. 3793–3798
- [151] COUGHLIN, SR: Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. In: *J Thromb Haemost* 3 (2005), Nr. 8, S. 1800–1814
- [152] BRUMMEL, KE ; PARADIS, SG ; BUTENAS, S ; MANN, KG: Thrombin functions during tissue factor-induced blood coagulation. In: *Hemostasis, Thrombosis and vascular biology* 100 (2002), Nr. 1, S. 148–152
- [153] MIHARA, M ; AIHARA, K ; IKEDA, Y ; YOSHIDA, S ; KINOCHI, M ; KURAHASHI, K ; FUJINAKA, Y ; AKAIKE, M ; MATSUMOTO, T: Inhibition of thrombin action ameliorates insulin resistance in type 2 diabetic db/db mice. In: *Endocrinology* 151 (2010), Nr. 2, S. 513–9
- [154] KAPLAN, ZS ; ZARPELLON, A ; ALWIS, I ; YUAN, Y ; MCFADYEN, J ; GHASEMZADEH, M ; SCHOENWAEELDER, SM ; RUGGERI, ZM ; JACKSON, SP: Thrombin-dependent intravascular leukocyte trafficking regulated by fibrin and the platelet receptors GPIb and PAR4. In: *Nature Communications* 6 (2015), S. 1–13
- [155] KANG, OH ; JEONG, HJ ; KIM, DK ; CHOI, SC ; KIM, TH ; NAH, YH ; KIM, HM ; LEE, YM: Trypsin induces tumour necrosis factor- α secretion from a human leukemic mast cell line. In: *Cell Biochem.Funct.* 21 (2003), Nr. 2, S. 161–167
- [156] FARUQI, TR ; WEISS, EJ ; SHAPIRO, MJ ; HUANG, W ; COUGHLIN, SR: Structure-function analysis of protease-activated receptor 4 tethered Ligand peptides. Determinants of specificity and utility in assays of receptor function. In: *Journal of Biological Chemistry* 275 (2000), Nr. 26, S. 19728–19734
- [157] SAMBRANO, GR ; WEISS, EJ ; ZHENG, YW ; HUANG, W ; COUGHLIN, SR: Role of thrombin signalling in platelets in haemostasis and thrombosis. In: *Nature* 413 (2001), Nr. 6851, S. 74–78

- [158] COVIC, L ; MISRA, M ; BADAR, J ; SINGH, C ; KULIOPULOS, A: Pepducin-based intervention of thrombin-receptor signaling and systemic platelet activation. In: *Nature Medicine* 8 (2002), Nr. 10, S. 1161–1165
- [159] HAMILTON, JR ; CORNELISSEN, I ; COUGHLIN, SR: Impaired hemostasis and protection against thrombosis in protease-activated receptor 4-deficient mice is due to lack of thrombin signaling in platelets. In: *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2 (2004), Nr. 8, S. 1429–1435
- [160] LEE, H ; STURGEON, SA ; MOUNTFORD, JK ; JACKSON, SP ; HAMILTON, JR: Safety and efficacy of targeting platelet proteinase-activated receptors in combination with existing anti-platelet drugs as antithrombotics in mice. In: *British Journal of Pharmacology* 166 (2012), Nr. 7, S. 2188–2197
- [161] MIYAKAWA, K ; JOSHI, N ; SULLIVAN, BP ; ALBEE, R ; BRANDENBERGER, C ; JAESCHKE, H ; MCGILL, MR ; SCOTT, MA ; GANEY, PE ; LUYENDYK, JP ; ROTH, RA: Platelets and protease-activated receptor-4 contribute to acetaminophen-induced liver injury in mice. In: *Blood* 126 (2015), Nr. 15, S. 1835–1845
- [162] KLEESCHULTE, S ; JERRENTROP, J ; GORSKI, D ; SCHMITT, J ; FENDER, AC: Evidence for functional PAR-4 thrombin receptor expression in cardiac fibroblasts and its regulation by high glucose: PAR-4 in cardiac fibroblasts. In: *International Journal of Cardiology* 252 (2018)
- [163] WONG, PC ; SEIFFERT, D ; BIRD, JE ; WATSON, CA ; BOSTWICK, JS ; GIANCARLI, M ; ALLEGRETTO, N ; HUA, J ; HARDEN, D ; GUAY, J ; CALLEJO, M ; MILLER, MM ; LAWRENCE, RM ; BANVILLE, J ; GUY, J ; MAXWELL, BD ; PRIESTLEY, ES ; MARI-NIER, A ; WEXLER, RR ; BOUVIER, M ; GORDON, DA ; SCHUMACHER, WA ; YANG, J: Blockade of protease-activated receptor-4 (PAR4) provides robust antithrombotic activity with low bleeding. In: *Coagulation* 9 (2017), Nr. 371, S. 1–11
- [164] U.S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE: *Safety and Efficacy Study of a Protease Activated Receptor-4 Antagonist Being Tested to Reduce the Chances of Having Additional Strokes or "Mini Strokes"*. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02671461>. Version: 2017, Abrufdatum: 20.02.2019
- [165] LANG, R ; HEEG, K: Semiquantitative determination of human cytokine mRNA expression using TaqMan RT-PCR. In: *Inflammopharmacology* 6 (1998), Nr. 4, S. 297–309
- [166] ALLEN, JN ; DEY, A ; NISSLY, R ; FRASER, J ; YU, S ; BALANDARAM, G ; PETERS, JM ; HANKEY-GIBLIN, PA: Isolation, Characterization, and Purification of Macrophages from Tissues Affected by Obesity-related Inflammation. In: *Journal of Visualized Experiments* (2017), Nr. 122, S. 1–13
- [167] LIU, Q ; BENGMARK, S ; QU, S: The role of hepatic fat accumulation in pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). In: *Lipids Health Disease* 9 (2010), Nr. 42, S. 1–9
- [168] XU, L ; KITADE, H ; NI, Y ; OTA, T: Roles of Chemokines and Chemokine Receptors in Obesity-Associated Insulin Resistance and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. In: *Biomolecules* 5 (2015), Nr. 3, S. 1563–1579

- [169] SENN, JJ ; KLOVER, PJ ; NOWAK, IA ; ZIMMERS, TA ; KONIARIS, LG ; FURLANETTO, RW ; MOONEY, RA: Suppressor of Cytokine Signaling-3 (SOCS-3), a Potential Mediator of Interleukin-6-dependent Insulin Resistance in Hepatocytes. In: *Journal of Biological Chemistry* 278 (2003), Nr. 16, S. 13740–13746
- [170] TANTI, JF ; CEPPO, F ; JAGER, J ; BERTHOU, F: Implication of inflammatory signaling pathways in obesity-induced insulin resistance. In: *Frontiers in Endocrinology* 3 (2019), Nr. 181, S. 1–15
- [171] LEE, PY ; WANG, JX ; PARISINI, E ; DASCHER, CC ; NIGROVIC, PA: Ly6 family proteins in neutrophil biology. In: *Journal of Leukocyte Biology* 94 (2013), S. 585–594
- [172] AUSTYN, JM ; GORDON, S: F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. In: *European Journal of Immunology* 11 (1981), S. 805
- [173] HOLNESS, CL ; SIMMONS, DL: Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. In: *Blood* 81 (1993), Nr. 6, S. 1607–1613
- [174] CHISTIAKOV, DA ; KILLINGSWORTH, MC ; MYASOEDOVA, VA ; OREKHOV, AN ; BOBRYSHCHEV, YV: CD68/macrosialin: not just a histochemical marker. In: *Laboratory investigation, a journal of technical methods and pathology* 97 (2017), Nr. 1, S. 4–13
- [175] SOLOVJOV, DA ; PLUSKOTA, E ; PLOW, EF: Distinct roles for the alpha and beta subunits in the functions of integrin alphaMbeta2. In: *The Journal of Biological Chemistry* 280 (2005), Nr. 2, S. 1336–1345
- [176] IKARASHI, M ; NAKASHIMA, H ; KINOSHITA, M ; SATO, A ; NAKASHIMA, M ; MIYAZAKI, H ; NISHIYAMA, K ; YAMAMOTO, J ; SEKI, S: Distinct development and functions of resident and recruited liver Kupffer cells/macrophages. In: *Journal of Leukocyte Biology* 94 (2013), Nr. 6, S. 1325–1336
- [177] BRADFORD, BM ; SESTER, DP ; HUME, DA ; MABBOTT, NA.: Defining the anatomical localisation of subsets of the murine mononuclear phagocyte system using integrin alpha X (Itgax, CD11c) and colony stimulating factor 1 receptor (Csflr, CD115) expression fails to discriminate dendritic cells from macrophages. In: *Immunobiology* 216 (2011), Nr. 11, S. 1228–1237
- [178] GORDON, S ; PLÜDDEMANN, A ; ESTRADA, FM: Macrophage heterogeneity in tissues: phenotypic diversity and functions. In: *Immunological Reviews* 262 (2014), Nr. 1, S. 36–55
- [179] TODD, RF ; BHAN, AK ; KABAWAT, SE ; SCHLOSSMAN, SE: *Human Myelomonocytic Differentiation Antigens Defined by Monoclonal Antibodies*. Springer, 1984. – 424–433 S.
- [180] ZHANG, CY ; YUAN, WG ; HE, P ; LEI, J ; WANG, CX: Liver fibrosis and hepatic stellate cells: Etiology, pathological hallmarks and therapeutic targets. In: *World Journal of Gastroenterology* 22 (2016), Nr. 48, S. 10512–10522
- [181] BORÉN, J ; TASKINEN, MR ; OLOFSSON, SO ; LEVIN, M: Ectopic lipid storage and insulin resistance: a harmful relationship. 274 (2013), Nr. 1, S. 25–40

- [182] STEIN, PD ; BEEMATH, A ; OLSON, RE: Obesity as a risk factor in venous thromboembolism. In: *The American journal of Medicine* 118 (2005), S. 978–980
- [183] HAGSTRØM, H ; NASR, P ; EKSTEDT, M ; HAMMAR, U ; STAL, P ; ASKLING, J ; HULTCRANTZ, R ; KECHAGIAS, S: Cardiovascular risk factors in non-alcoholic fatty liver disease. In: *Genetic and Metabolic Liver Disease* 39 (2019), Nr. 1, S. 197–204
- [184] TARGHER, G ; BERTOLINI, L ; PADOVANI, R ; RODELLA, S ; TESSARI, R ; ZENARI, L ; DAY, C ; ARCARO, G: Prevalence of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Its Association With Cardiovascular Disease Among Type 2. In: *Cardiovascular and Metabolic Risk* 30 (2007), Nr. 5, S. 1212–1218
- [185] TARGHER, G ; DAY, CP ; BONORA, E: Risk of Cardiovascular Disease in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. In: *New England Journal of Medicine* 363 (2010), S. 1341–1350
- [186] POTZE, W ; SIDDIQUI, MS ; SANYAL, AJ: Vascular Disease in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. In: *Seminars Thrombosis Hemostasis* 41 (2015), S. 488–493
- [187] TARGHER, G ; BERTOLINI, L ; RODELLA, S ; TESSARI, R ; ZENARI, L ; LIPPI, G ; ARCARO, G: Independently Associated With an Increased Incidence of Cardiovascular Events in Type 2 Diabetic Patients. In: *Cardiovascular and Metabolic Risk* 30 (2007), Nr. 8, S. 2119–2121
- [188] SOOKOIAN, S ; CASTANO, GO ; BURGUENO, AL ; ROSSELLI, MS ; GIANOTTI, TF ; MALLARDI, P ; MARTINO, JS ; PIROLA, CJ: Circulating levels and hepatic expression of molecular mediators of atherosclerosis in nonalcoholic fatty liver disease. In: *Atherosclerosis* 209 (2010), S. 585–591
- [189] KOTRONEN, A ; JOUTSI-KORHONEN, L ; SEVASTIANOVA, K ; BERGHOLM, R ; HAKKARAINEN, A ; PIETILÄINEN, KH ; LUNDBOM, N ; RISSANEN, A ; LASSILA, R ; YKIJÄRVINEN, H: Increased coagulation factor VIII , IX , XI and XII activities in non-alcoholic fatty liver disease. In: *Liver International* (2010), S. 176–183
- [190] VERRIJKEN, A ; FRANQUE, S ; MERTENS, I ; PRAWITT, J ; CARON, S ; HUBENS, G ; VAN MARCK, E ; STAELS, B ; MICHIELSEN, P ; VAN GAAL, L: Prothrombotic Factors in Histologically Proven Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis. In: *Hepatology* 59 (2014), S. 121–129
- [191] TAVIL, Y ; SEN, N ; YAZICI, HU ; HIZAL, F ; ABACI, A ; CENGEL, A: Mean platelet volume in patients with metabolic syndrome and its relationship with coronary artery disease. In: *Thrombosis Research* 120 (2007), S. 245–250
- [192] LEE, W ; LEE, W ; CHEN, Y ; LIU, TJ ; LIANG, KW ; TING, CT ; HUEY-HERNG SHEU, W: The presence of metabolic syndrome is independently associated with elevated serum CD40 ligand and disease severity in patients with symptomatic coronary artery disease. In: *Metabolism Clinical and Experimental* 55 (2006), S. 1029–1034
- [193] LI, Y ; XING, C ; COHEN, JC ; HOBBS, HH: Genetic variant in PNPLA3 is associated with nonalcoholic fatty liver disease in China. In: *Hepatology* 55 (2012), Nr. 1, S. 331

- [194] KAHN, ML ; NAKANISHI-MATSUI, M ; SHAPIRO, MJ ; ISHIHARA, H ; COUGHLIN, SR: Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin. In: *Journal of Clinical Investigation* 103 (1999), Nr. 6, S. 879–887
- [195] KOPEC, AK ; ABRAHAMS, SR ; THORNTON, S ; PALUMBO, JS ; MULLINS, ES ; DIVANOVIC, S ; WEILER, H ; OWENS, AP ; MACKMAN, N ; GOSS, A ; RYN, J van ; LUYENDYK, JP ; FLICK, MJ: Thrombin promotes diet-induced obesity through fibrin-driven inflammation. In: *Journal of Clinical Investigation* 127 (2017), Nr. 8, S. 3152–3166
- [196] DANGWAL, S ; RAUCH, BH ; GENSCHE, T ; DAI, L ; BRETSCHNEIDER, E ; VOGELAAR, CF ; SCHROR, K ; ROSENKRANZ, AC: High glucose enhances thrombin responses via protease-activated receptor-4 in human vascular smooth muscle cells. In: *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31 (2011), S. 624–633
- [197] ZHAO, L ; ZHONG, S ; QU, H ; XIE, Y ; CAO, Z ; LI, Q ; YANG, P ; VARGHESE, Z ; MOORHEAD, JF ; CHEN, Y ; RUAN, XZ: Chronic inflammation aggravates metabolic disorders of hepatic fatty acids in high-fat diet-induced obese mice. In: *Nature Scientific Reports* 5 (2015), Nr. 10222, S. 1–12
- [198] CAI, D ; YUAN, M ; FRANTZ, DF ; MELENDEZ, PA ; HANSEN, L ; LEE, J ; SHOELSON, SE: Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK- β and NF- κ B. In: *Nature Medicine* 11 (2005), Nr. 2, S. 183–190
- [199] KUGELMAS, M ; HILL, DB ; VIVIAN, B ; MARSANO, L ; MCCLAIN, CJ: Cytokines and NASH: A Pilot Study of the Effects of Lifestyle Modification and Vitamin E. In: *Hepatology* 38 (2003), Nr. 2, S. 413–419
- [200] HAUKELAND, JW ; DAMAS, JK ; KONOPSKI, Z ; LOBERG, EM ; HAALAND, T ; GOVERUD, I ; TORJESEN, PA ; BIRKELAND, K ; BJORO, K ; AUKRUST, P: Systemic inflammation in nonalcoholic fatty liver disease is characterized by elevated levels of CCL2. In: *Journal of Hepatology* 44 (2006), S. 1167–1174
- [201] KONDO, H: Interleukin 10 Treatment Ameliorates High-Fat Diet-Induced Inflammatory Atrial Remodeling and Fibrillation. In: *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology* 11 (2018), S. 1–14
- [202] BAKST, RL ; XIONG, H ; CHEN, CH ; DEBORDE, S ; LYUBCHIK, A ; ZHOU, Y ; HE, S ; MCNAMARA, W ; LEE, SY ; OLSON, OC ; LEINER, IM ; MARCADIS, AR ; KEITH, JW ; AL-AHMADIE, HA ; KATABI, N ; GIL, Z ; VAKIANI, E ; JOYCE, JA ; PAMER, E ; WONG, RJ: Inflammatory Monocytes Promote Perineural Invasion via CCL2-Mediated Recruitment and Cathepsin B Expression. In: *Cancer Research* 77 (2017), Nr. 22, S. 6400–6414
- [203] CASTELLINO, F ; HUANG, AY ; ALTAN-BONNET, G ; STOLL, S ; SCHEINECKER, C ; GERMAIN, RN: Chemokines enhance immunity by guiding naive CD8⁺ T cells to sites of CD4⁺ T cell-dendritic cell interaction. In: *Nature* 440 (2006), Nr. 7086, S. 890–895
- [204] ROUAULT, C ; PELLEGRINELLI, V ; SCHILCH, R ; COTILLARD, A ; POITOU, C ; TORDJMAN, J ; SELL, H ; CLÉMENT, K ; LACASA, D: Roles of Chemokine Ligand-2 (CXCL2) and Neutrophils in Influencing Endothelial Cell Function and Inflammation of Human Adipose Tissue. In: *Endocrinology* 154 (1999), Nr. 3, S. 1069–1079

- [205] MARRA, F ; BERTOLANI, C: Adipokines in Liver Diseases. In: *Hepatology* 50 (2009), Nr. 3, S. 957–969
- [206] CATALÁN, Gómez-Ambrosi J. V and a. V and ; RODRÍGUEZ, A ; SALVADOR, J ; FRÜHBECK, G: Adipokines in the treatment of diabetes mellitus and obesity. In: *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 10 (2009), Nr. 2, S. 239–254
- [207] GIEMAN, LM ; HAM, F van d. ; KOUDIJS, A ; WIELINGA, PY ; KLEEMANN, R ; KOOISTRA, T ; STOOP, R ; KLOPPENBURG, M ; OSCH, GJ van ; STOJANOVIC-SUSULIC, V ; HUIZINGA, TW ; ZUURMOND, AM: Metabolic stress-induced inflammation plays a major role in the development of osteoarthritis in mice. In: *Arthritis & Rheumatism* 64 (2012), Nr. 4, S. 1172–1181
- [208] BUGIANESI, E ; PAGOTTO, U ; MANINI, R ; VANNI, E ; GASTALDELLI, A ; IASIO, R de ; GENTILCORE, E ; NATALE, S ; CASSADER, M ; RIZZETTO, M ; PASQUALI, R ; MARCHESINI, G: Plasma Adiponectin in Nonalcoholic Fatty Liver Is Related to Hepatic Insulin Resistance and Hepatic Fat Content , Not to Liver Disease Severity. In: *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 90 (2005), Nr. 6, S. 3498–3504
- [209] HUI, JM ; HODGE, A ; FARRELL, GC ; KENCH, JG ; KRIKETOS, A ; GEORGE, J: Beyond Insulin Resistance in NASH: TNF- α or Adiponectin? In: *Hepatology* 40 (2004), Nr. 1, S. 46–54
- [210] SHIMADA, M ; KAWAHARA, H ; OZAKI, K ; FUKURA, M ; YANO, H ; TSUCHISHIMA, M ; TSUTSUMI, M ; TAKASE, S: Usefulness of a Combined Evaluation of the Serum Adiponectin Level , HOMA-IR , and Serum Type IV Collagen 7S Level to Predict the Early Stage of Nonalcoholic Steatohepatitis. In: *American Journal of Gastroenterology* 102 (2007), S. 1931–1938
- [211] EL-ASSAL, O ; HONG, F ; KIM, W ; RADAIEVA, S ; GAO, B: IL-6-deficient Mice Are Susceptible to Ethanol-induced Hepatic Steatosis: IL-6 Protects against Ethanol-induced Oxidative Stress and Mitochondrial Permeability Transition in the Liver. In: *Cellular & Molecular Immunology* 1 (2004), Nr. 3, S. 205–211
- [212] KLOVER, PJ ; CLEMENTI, AH ; MOONEY, RA: Interleukin-6 Depletion Selectively Improves Hepatic Insulin Action in Obesity. In: *Endocrinology* 146 (2005), Nr. 8, S. 3417–3427
- [213] ASOKANANTHAN, N ; GRAHAM, PT ; FINK, J ; KNIGHT, DA ; BAKKER, AJ ; MCWILLIAM, AS ; THOMPSON, PJ ; STEWART, GA: Activation of Protease-Activated Receptor (PAR)-1, PAR-2, and PAR-4 Stimulates IL-6, IL-8, and Prostaglandin E2 Release from Human Respiratory Epithelial Cells. In: *Journal of Immunology* 168 (2002), Nr. 7, S. 3577–3585
- [214] DEN BOER, MAM ; VOSHOL, PJ ; SCHRÖDER-VAN DER ELST, JP: Endogenous Interleukin-10 Protects against Hepatic Steatosis but Does Not Improve Insulin Sensitivity during High-Fat Feeding in Mice. In: *Endocrinology* 147 (2006), Nr. 10, S. 4553–4558
- [215] CINTRA, DE ; PAULI, JR ; ARAUJO, EP ; MORAES, JC ; SOUZA, CT de ; MILANSKI, M ; MORARI, J ; GAMBERO, A ; SAAD, MJ ; VELLOSO, LA: Interleukin-10 is a protective factor against diet-induced insulin resistance in liver q. In: *Journal of Hepatology* 48 (2008), S. 628–637

- [216] SARTIPY, P ; LOSKUTOFF, DJ: Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (2003), Nr. 12, S. 7265–7270
- [217] CALVO, N ; BELTRAN-DEBON, R ; RODRIGUEZ-GALLEGO, E ; HERNÁNDEZ-AGUILERA, A ; GUIRRO, M ; MARINÉ-CASADÓ, R ; MILLA, L ; ALEGRET, JM ; SABENCH, F ; CASTILLO, D del ; VINAIXA, M ; RODRÍGUEZ, MÀ ; CORREIG, X ; GARCÍA-ÁLVAREZ, R ; MENENDEZ, JA ; CAMPS, J ; JOVEN, J: Liver fat deposition and mitochondrial dysfunction in morbid obesity : An approach combining metabolomics with liver imaging and histology. In: *World Journal of Gastroenterology* 21 (2015), Nr. 24, S. 7529–7544
- [218] TAMURA, Y ; SUGIMOTO, M ; MURAYAMA, T ; UEDA, Y ; KANAMORI, H ; ONO, K ; ARIYASU, H ; AKAMIZU, T ; KITA, T ; YOKODE, M ; ARAI, H: Inhibition of CCR2 Ameliorates Insulin Resistance and Hepatic Steatosis in db/db Mice. In: *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 28 (2008), S. 2195–2201
- [219] YANG, SJ ; IGLAYREGER, HB ; KADOUH, HC ; BODARY, PF: Inhibition of the chemokine (C–C motif) ligand 2/chemokine (C–C motif) receptor 2 pathway attenuates hyperglycaemia and inflammation in a mouse model of hepatic steatosis and lipodystrophy. In: *Diabetologia* 52 (2009), S. 972–981
- [220] TAMURA, Y ; SUGIMOTO, M ; MURAYAMA, T ; MINAMI, M ; NISHIKAZE, Y ; ARIYASU, H ; AKAMIZU, T ; KITA, T ; YOKODE, M ; ARAI, H: C-C Chemokine Receptor 2 Inhibitor Improves Diet-Induced Development of Insulin Resistance and Hepatic Steatosis in Mice. In: *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* 17 (2010), Nr. 3, S. 219–228
- [221] WOLPE, SD ; SHERRY, B ; JUERST, D ; DAVATELIS, G ; YURT, RW ; CERAMI, A: Identification and characterization of macrophage inflammatory protein 2. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 (1989), S. 612–616
- [222] PELUS, LM ; FUKUDA, S: Peripheral blood stem cell mobilization : The CXCR2 ligand GRO b rapidly mobilizes hematopoietic stem cells with enhanced engraftment properties. In: *Experimental Hematology* 34 (2006), S. 1010–1020
- [223] VANSANUN, MN ; MENDONSA, AM ; GORDEN, DL: Hepatocellular Proliferation Correlates with Inflammatory Cell and Cytokine Changes in a Murine Model of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. In: *PLoS ONE* 8 (2013), Nr. 9, S. 1–12
- [224] SAMBRANO, GR ; HUANG, W ; FARUQI, T ; MAHRUS, S ; CRAIK, C ; COUGHLIN, SR: Cathepsin G Activates Protease-activated Receptor-4 in Human Platelets. In: *Journal of Biological Chemistry* 275 (2000), Nr. 10, S. 6819–6823
- [225] SHAH, PK: Inflammation, Neointimal Hyperplasia, and Restenosis. In: *Circulation* 107 (2003), S. 2175–2177
- [226] HOTAMISLIGIL, GS ; SHARGILL, NS ; SPIEGELMAN, BM: Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. In: *Science* 259 (1993), Nr. 5091, S. 87–91
- [227] UYSAL, KT ; WIESBROCK, SM ; MARINA, MW ; HOTAMISLIGIL, GS.: Protection from obesity- induced insulin resistance in mice lacking TNF- α function. In: *Nature* 389 (1997), S. 610–614

- [228] HOTAMISLIGIL, GS ; ARNER, P ; CARO, JF ; ATKINSON, RL ; SPIEGELMAN, BM: Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. In: *Journal of Clinical Investigation* 95 (1995), Nr. 5, S. 2409–2415
- [229] DANDONA, P ; WEINSTOCK, R ; THUSU, K ; ABDEL-RAHMAN, E ; ALJADA, A ; WADDEN, T: Tumor Necrosis Factor- α in Sera of Obese Patients: Fall with Weight Loss. In: *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 83 (1998), Nr. 8, S. 2907–2910
- [230] LESMANA, CR ; HASAN, I ; BUDIUSODO, U ; GANI, RA ; KRISNUHONI, E ; AKBAR, N ; LESMANA, LA: Diagnostic value of a group of biochemical markers of liver fibrosis in patients with non-alcoholic steatohepatitis. 10 (2009), S. 201–206
- [231] CRESPO, J ; CAYON, A ; FERNANDEZ-GIL, P ; HERNÁNDEZ-GUERRA, M ; MAYORGA, M ; DOMÍNGUEZ-DÍEZ, A ; FERNÁNDEZ-ESCALANTE, JC ; F, Pons-Romero: Gene Expression of Tumor Necrosis Factor α and TNF-Receptors, p55 and p75, in Nonalcoholic Steatohepatitis Patients. In: *Hepatology* 34 (2001), Nr. 6, S. 1158–1163
- [232] MÜLLER, S ; MARTIN, S ; KOENIG, W ; HANIFI-MOGHADDAM, P ; RATHMANN, W ; HAASTERT, B ; GIANI, G ; ILLIG, T ; THORAND, B ; KOLB, H: Impaired glucose tolerance is associated with increased serum concentrations of interleukin 6 and co-regulated acute-phase proteins but not TNF- α or its receptors. In: *Diabetologia* 45 (2002), S. 805–812
- [233] BRUUN, JM ; VERDICH, C ; TOUBRO, S ; ASTRUP, A ; RICHELSEN, B: Association between measures of insulin sensitivity and circulating levels of interleukin-8 , interleukin-6 and tumor necrosis factor- α . Effect of weight loss in obese men. In: *European Journal of Endocrinology* 148 (2003), S. 535–542
- [234] SHIMOZONO, R ; HISHIMURA, K ; AKIYAMA, H ; FUNAMOTO, S ; IZAWA, A ; SAI, T ; KUNITA, K ; KAINOH, M ; SUZUKI, T ; KAWADA, N: Interferon- β Mediates Signaling Pathways Uniquely Regulated in Hepatic Stellate Cells and Attenuates the Progression of Hepatic Fibrosis. In: *Journal of Interferon & Cytokine Research* 35 (2015), Nr. 6, S. 464–473
- [235] WEITHAUSER, A ; WITKOWSKI, M ; RAUCH, U: The Role of Protease-Activated Receptors for the Development of Myocarditis : Possible Therapeutic Implications. In: *Current Pharmaceutical Design* 22 (2016), S. 472–484
- [236] TORISU, T ; SATO, N ; YOSHIGA, D ; KOBAYASHI, T ; YOSHIOKA, T ; MORI, H ; IIDA, M ; YOSHIMURA, A: The dual function of hepatic SOCS3 in insulin resistance in vivo. In: *Genes Cells* 12 (2007), Nr. 2, S. 143–154
- [237] UEKI, K ; KONDO, T ; KAHN, CR: Suppressor of Cytokine Signaling 1 (SOCS-1) and SOCS-3 Cause Insulin Resistance through Inhibition of Tyrosine Phosphorylation of Insulin Receptor Substrate Proteins by Discrete Mechanisms. In: *Molecular and Cellular Biology* 24 (2004), Nr. 12, S. 5434–5446
- [238] RUI, L ; YUAN, M ; FRANTZ, D ; SHOELSON, S ; WHITE, MF: SOCS-1 and SOCS-3 Block Insulin Signaling by Ubiquitin-mediated Degradation of IRS1 and IRS2. 277 (2002), Nr. 44, S. 42394–42398

- [239] SHI, H ; TZAMELI, I ; BJØRBÆK, C ; FLIER, JS: Suppressor of Cytokine Signaling 3 Is a Physiological Regulator of Adipocyte Insulin Signaling. In: *Journal of Biological Chemistry* 279 (2004), Nr. 33, S. 34733–34740
- [240] NICHOLSON, SE ; WILLSON, TA ; FARLEY, A ; STARR, R ; ZHANG, JG ; BACA, M ; ALEXANDER, WS ; METCALF, D ; HILTON, DJ ; NICOLA, NA: Mutational analyses of the SOCS proteins suggest a dual domain requirement but distinct mechanisms for inhibition of LIF and IL-6 signal transduction. In: *The EMBO Journal* 18 (1999), Nr. 2, S. 375–385
- [241] KERN, PA ; SAGHIZADEH, M ; ONG, JM ; BOSCH, RJ ; DEEM, R ; SIMSOLO, RB: The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue . Regulation by obesity , weight loss , and relationship to lipoprotein lipase. In: *Journal of Clinical Investigation* 95 (1995), Nr. 5, S. 2111–2119
- [242] MONTAGUE, CT ; PRINS, JB ; SANDERS, L ; ZHANG, J ; SEWTER, CP ; DIGBY, J ; BYRNE, CD ; O'RAHILLY, S: Depot-related gene expression in human subcutaneous and omental adipocytes. In: *Diabetes* 47 (1998), Nr. 9, S. 1384–1391
- [243] STEPHENS, JM ; BUTTS, M ; STONE, R ; PEKALA, PH ; BERNLOHR, DA: Regulation of transcription factor mRNA accumulation during 3T3-L1 preadipocyte differentiation by antagonists of adipogenesis. In: *Molecular and Cellular Biochemistry* 123 (1998), Nr. 1-2, S. 63–71
- [244] PUROHIT, A ; GHILCHIK, MW ; DUNCAN, L ; WANG, DY ; SINGH, A ; WALKER, MM ; REED, MJ: Aromatase Activity and Interleukin-6 Production by Normal and Malignant Breast Tissues. In: *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 80 (1995), Nr. 10, S. 3052–3058
- [245] FRIED, SK ; BUNKIN, DA ; GREENBERG, AS: Omental and Subcutaneous Adipose Tissues of Obese Subjects Release Interleukin-6: Depot Difference and Regulation by Glucocorticoid. In: *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 83 (1998), Nr. 3, S. 30–33
- [246] BASTARD, J ; JARDEL, C ; BRUCKERT, E ; BLONDY, P ; CAPEAU, J ; LAVILLE, M ; VIDAL, H ; HAINQUE, B: Elevated Levels of Interleukin 6 Are Reduced in Serum and Subcutaneous Adipose Tissue of Obese Women after Weight Loss. 85 (2000), Nr. 9, S. 3338–3342
- [247] TOURNIAIRE, F ; ROMIER-CROUZET, B ; LEE, JH ; MARCOTORCHINO, J ; GOURANTON, E ; SALLES, J ; MALEZET, C ; ASTIER, J ; DARMON, P ; BLOUIN, E ; WALRAND, S ; YE, J ; LANDRIER, JF: Chemokine Expression in Inflamed Adipose Tissue Is Mainly Mediated by NF- κ B. In: *PLoS ONE* 8 (2013), Nr. 6, S. 1–9
- [248] KISHIMOTO, T: IL-6: from its discovery to clinical applications. In: *International Immunology* 22 (2010), Nr. 5, S. 347–352
- [249] WOLF, S: Identifikation differenziell regulierter Mediatoren im Rahmen der Leberregeneration und reziproke Beeinflussung der Zellfunktion von Makrophagen und Hepatozyten durch interzelluläre Kommunikationsprozesse. In: *Dissertation* (2015)

- [250] QI, L ; YU, H ; ZHANG, Y ; ZHAO, D ; LV, P ; ZHONG, Y ; XU, Y: IL-10 secreted by M2 macrophage promoted tumorigenesis through interaction with JAK2 in glioma. In: *Oncotarget* 4 (2016), Nr. 44, S. 71673–71685
- [251] MORINAGA, H ; MAYORAL, R ; HEINRICHSBORFF, J ; OSBORN, O ; FRANCK, N ; HAH, N ; WALENTA, E ; BANDYOPADHYAY, G ; PESSENTHEINER, AR ; CHI, TJ ; CHUNG, H ; BOGNER-STRAUSS, JG ; EVANS, RM ; OLEFSKY, JM ; OH, DY: Characterization of distinct subpopulations of hepatic macrophages in HFD/obese mice. In: *Diabetes* 64 (2015), Nr. 4, S. 1120–1130
- [252] BA LE, V ; SCHNEIDER, JG ; BOERGELING, Y ; BERRI, F ; DUCATEZ, M ; GUERIN, JL ; ADRIAN, I ; ERRAZURIZ-CERDA, E ; FRASQUILHO, S ; ANTUNES, L ; LINA, B ; BORDET, JC ; JANDROT-PERRUS, M ; LUDWIG, S ; RITEAU, B: Platelet Activation and Aggregation Promote Lung Inflammation and Influenza Virus Pathogenesis. In: *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine Volume* 191 (2015), Nr. 7, S. 804–819
- [253] SLOFSTRA, SH ; BIJLSMA, MF ; GROOT, AP ; REITSMA, PH ; LINDHOUT, TH ; TEN CATE, H ; SPEK, CA: Protease-activated receptor-4 inhibition protects from multi-organ failure in a murine model of systemic inflammation. In: *Blood* 2 (2007)
- [254] HO, MK ; SPRINGER, TA: Mac-2, a novel 32,000 Mr mouse macrophage subpopulation-specific antigen defined by monoclonal antibodies. In: *Journal of Immunology* 128 (1982), Nr. 3, S. 1221–1228
- [255] KASSEL, KM ; SULLIVAN, BP ; CUI, W ; COPPLE, BL ; LUYENDYK, JP: Therapeutic administration of the direct thrombin inhibitor argatroban reduces hepatic inflammation in mice with established fatty liver disease. In: *American Journal of Pathology* 181 (2012), Nr. 4, S. 1287–1295
- [256] MIURA, K ; YANG, L ; VAN ROOIJEN, N ; OHNISHI, H ; SEKI, E: Hepatic recruitment of macrophages promotes nonalcoholic steatohepatitis through CCR2. In: *AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology* 302 (2012), Nr. 11, S. G1310–G1321
- [257] GUZMAN, M ; CASTRO, J: Zonation of fatty-acid metabolism in rat-liver. In: *Biochemical Journal* 264 (1989), Nr. 1, S. 107–113
- [258] JUNGERMANN, K ; THURMAN, RG: Hepatocyte heterogeneity in the metabolism of carbohydrates. In: *Enzyme* 46 (1992), Nr. 1, S. 33–58
- [259] LACKNER, C ; GOGG-KAMERER, M ; ZATLOUKAL, K ; STUMPTNER, C ; BRUNT, EM ; DENK, H: Ballooned hepatocytes in steatohepatitis: The value of keratin immunohistochemistry for diagnosis. In: *Journal of Hepatology* 48 (2008), Nr. 5, S. 821–828
- [260] HALL, Z ; BOND, NJ ; ASHMORE, T ; SANDERS, F ; AMENT, Z ; WANG, X ; MURRAY, AJ ; BELLAFANTE, E ; VIRTUE, A S a. S and Vidal-Pluig ; ALLISON, M ; DAVIES, SE ; KOULMAN, A ; VACCA, M ; GRIFFIN, JL: Lipid zonation and phospholipid remodeling in nonalcoholic fatty liver disease. In: *Hepatology* 65 (2017), Nr. 4, S. 33–58
- [261] KRESS, Sigrid ; KATZ, N.: Discrimination Between Periportal and Pericentral Necrosis of Rat Liver by Determination of Glutamine Synthetase and Other Enzyme Activities in Serum. In: *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* (1993), S. 733–738

-
- [262] KRISTIENSEN, MN ; VEIDAL, SS ; RIGBOLT, KT ; TØLBØL, KS ; ROTH, JD ; JEL-SING, J ; VRANG, N ; FEIGH, M: Obese diet-induced mouse models of nonalcoholic steatohepatitis-tracking disease by liver biopsy. In: *World Journal of Hepatology* 8 (2016), Nr. 16, S. 673–684
- [263] ASGHARPOUR, A ; CAZANAVE, SC ; PACANA, T ; SENESHAW, M ; VINCENT, R ; BANINI, BA ; KUMAR, DP ; DAITA, K ; MIN, HK ; MIRSHAHI, F ; BEDOSSA, P ; SUN, X ; HOSHIDA, Y ; KODURU, SV ; CONTAIFER, D J. ; WARNCKE, UO ; WIJESINGHE, DS ; SANYAL, AJ: A diet-induced animal model of non-alcoholic fatty liver disease and hepatocellular cancer. In: *Journal of Hepatology* 65 (2016), Nr. 3, S. 579–588
- [264] HOSOGAI, N ; FUKUHARA, A ; OSHIMA, K ; MIYATA, Y ; TANAKA, S ; SEGAWA, K ; FURUKAWA, S ; TOCHINO, Y ; KOMURO, R ; MATSUDA, M ; SHIMOMURA, I: Adipose Tissue Hypoxia in Obesity and Its Impact on Adipocytokine Dysregulation. In: *Diabetes* 56 (2007), Nr. 4, S. 901–911
- [265] XU, H ; DEMBSKI, M ; YANG, Q ; YANG, D ; MORIATY, A ; TAYBER, O ; CHEN, H ; KAPELLER, R ; TARTAGLIA, LA: Dual Specificity Mitogen-activated Protein (MAP) Kinase Phosphatase-4 Plays a Potential Role in Insulin Resistance. In: *Journal of Biological Chemistry* 278 (2003), Nr. 32, S. 30187–30192
- [266] PATSOURIS, D ; LI, P ; THAPAR, D ; CHAPMAN, J ; OLEFSKY, JM ; NEELS, JG: Ablation of CD11c-Positive Cells Normalizes Insulin Sensitivity in Obese Insulin Resistant Animals. In: *Cell Metabolism* 8 (2008), Nr. 4, S. 301–309
- [267] HERRERO, L ; SHAPIRO, H ; NAYER, A ; LEE, J ; SHOELSON, SE: Inflammation and adipose tissue macrophages in lipodystrophic mice. In: *PNAS* 107 (2010), Nr. 1, S. 240–245
- [268] DINH, CH ; SZABO, A ; YU, Y ; CAMER, D ; ZHANG, Q ; WANG, H ; HUANG, XF: Bardoxolone Methyl Prevents Fat Deposition and Inflammation in Brown Adipose Tissue and Enhances Sympathetic Activity in Mice Fed a High-Fat Diet. In: *Nutrients* 7 (2015), S. 4705–4723

Abbildungsverzeichnis

1	PAR4-Struktur	14
2	Fütterungsschema	29
3	PAR4-Genotypisierung	31
4	PAR4 RNA-Expression in der Leber und im Fettgewebe	45
5	Einfluss des PAR4 auf Gewichtszunahme	48
6	PAR4-Einfluss auf Leber- und Fettgewicht	50
7	Glukosetoleranz	52
8	Insulinsensitivität	54
9	Zytokinexpression im Serum	57
10	Analytenexpression im Serum	61
11	RNA-Expression von IL-6 und IL-10	64
12	RNA-Expression von CCL2 und CXCL2	66
13	RNA-Expression von TNF- α und IFN- β	69
14	SOCS3 RNA-Expression im Fettgewebe	71
15	Immunzellpopulationen in der Leber	78
16	Makrophagenakkumulation in der Leber	80
17	Fettakkumulation in der Leber	82
18	HE-Färbung der Leber	83
19	Fibrosebildung in der Leber	85
20	Akkumulation von Mac2 ⁺ -Zellen im epididymalen Fettgewebe	87
21	Akkumulation von Mac2 ⁺ -Zellen im interskapulären braunen Fettgewebe	88
22	Weitere Versuchsbeobachtungen	V
23	Zusätzliche Analysezeitpunkte des Leber- und Fettgewichts	VI
24	Weitere Analyten der Serumanalyse	VII
25	Zusätzliche Analysezeitpunkte der RNA-Expression in der Leber	VIII
26	PAR4-Expression in der Leber	IX
27	Zusätzliche Zeitpunkte der FACS-Analyse der Immunzellpopulation	XIII
28	Zusätzliche Zeitpunkte für die Analyse von Mac2 ⁺ -Zellen in der Leber	XIV
29	Zusätzliche Analysezeitpunkte der Fettakkumulation in der Leber	XV
30	Zusätzliche Analysezeitpunkte der Fibrose in der Leber	XVI
31	HE-Färbung der Leber	XVII

Tabellenverzeichnis

2	Verwendete Antikörper	23
5	Verwendete Primer für die PAR4-Genotypisierung	24
6	Eingesetzte Primer für die quantitative PCR	25
9	Zusammensetzung des hochkalorischen Fettfutters und des Kontrollfutters	28
10	PCR-Reaktionsansatz	30
11	PCR-Programm	30
12	qPCR-Programm	34

Anhang

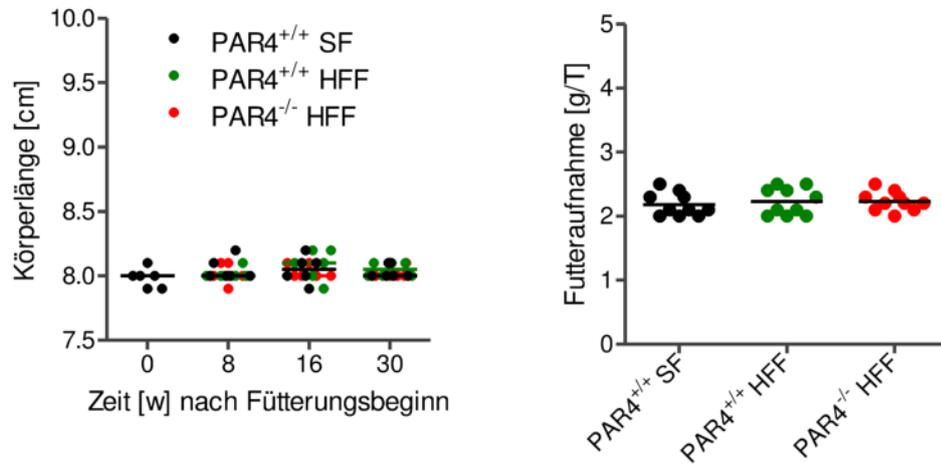


Abbildung 22: Eine PAR4-Defizienz führt während des Versuchszeitraums weder zu einer Änderung der Körpergröße noch zu einer veränderten Futteraufnahme. Wildtyp- und PAR4-defiziente Mäuse wurden bis zu 30 Wochen mit hochkalorischem Fettfutter (HFF) gefüttert, eine Wildtyp-Gruppe wurde mit Standardfutter (SF) gefüttert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde vor der Organisolierung die Körpergröße bestimmt. Diese Messung erfolgte von der Nasenspitze bis zum After. Über einen Verlauf von mehreren Wochen wurde stichprobenartig das gegebene Futter gewogen und nach Abzug der verbliebenen Futtermenge die Futteraufnahme pro Tag (g/T) bestimmt. Dargestellt ist jedes Replikat mit Median (n = 6 bzw. n = 10).

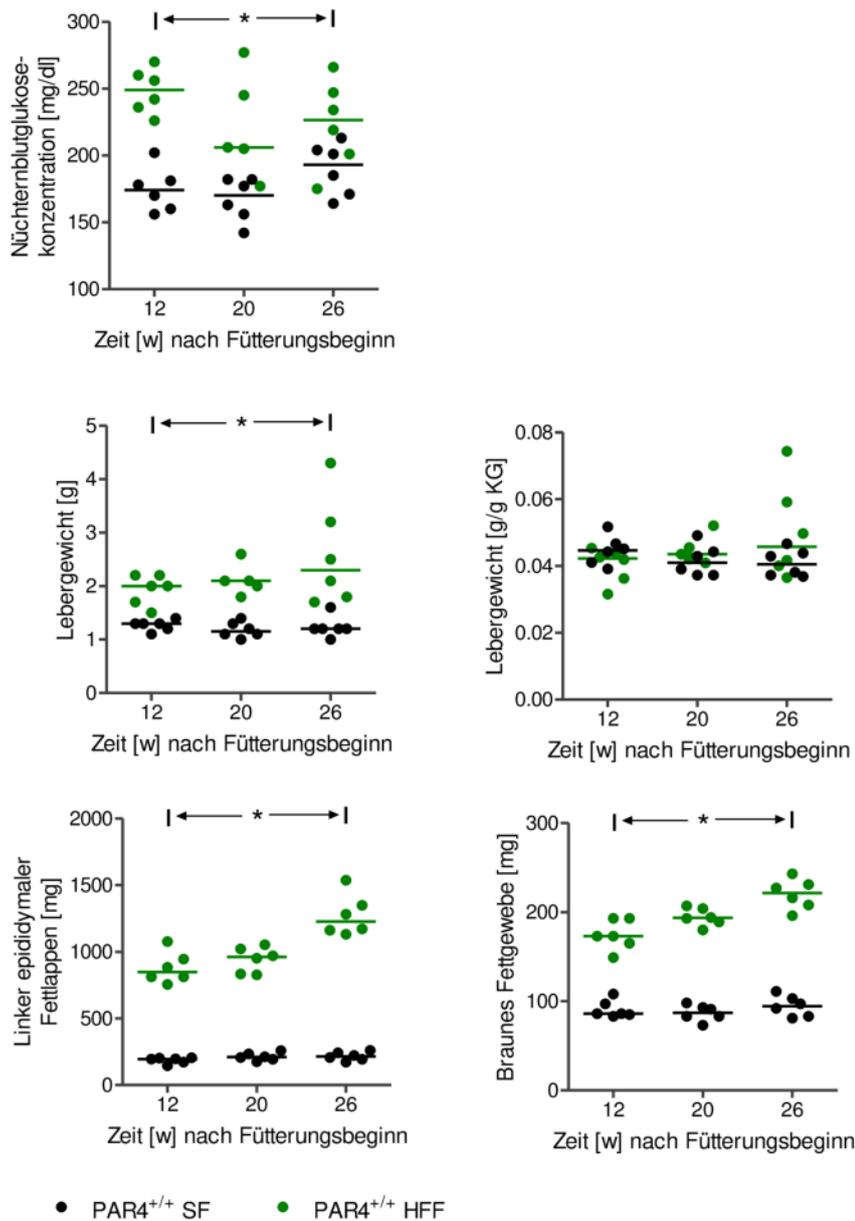


Abbildung 23: Eine hochkalorische Fettfütterung führt zu einer Zunahme des absoluten Lebergewichts, des Gewichts des epididymalen Fetttappens und des braunen Fettgewebes

Wildtyp-Mäuse wurden bis zu 30 Wochen mit hochkalorischem Fettfutter (HFF) gefüttert, eine Wildtyp-Gruppe wurde mit Standardfutter gefüttert (SF). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde den Mäusen für 6 Stunden das Futter entzogen und die Nüchternblutglukosekonzentration mit einem Glukosemessgerät (*accu Chek mobile*, Roche) analysiert. Dafür wurde einmalig die Schwanzspitze mit einem Skalpell angeritzt und ein Blutstropfen auf das Messfeld gegeben. Anschließend wurden die Leber, das epididymale Fettgewebe und das braune Fettgewebe, wie unter Punkt 2.2.3 beschrieben, isoliert und gewogen. Zusätzlich wurde das Lebergewicht auf das zum Zeitpunkt der Organentnahme gemessene Körpergewicht bezogen. Dargestellt ist jedes Replikat mit Median (n = 5-6). Signifikante Unterschiede wurden durch einfaktorische Varianzanalyse (One-way ANOVA) mit Tukey post-Test ermittelt. Signifikanzniveau: *p < 0,05 für PAR4^{+/+} SF zu PAR4^{+/+} HFF.

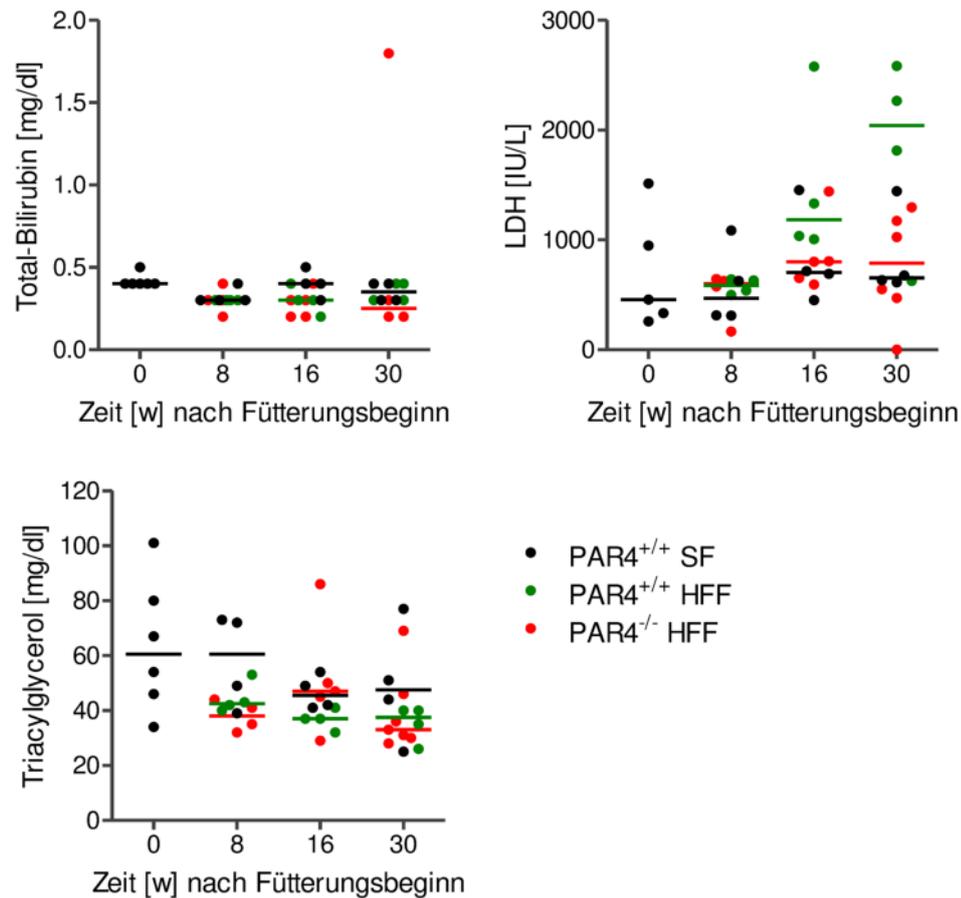


Abbildung 24: PAR4 hat während einer hochkalorischen Fettfütterung keinen Einfluss auf totales Bilirubin, LDH und Triacylglycerol im Serum

Wildtyp- und PAR4-defiziente Mäuse wurden bis zu 30 Wochen mit hochkalorischem Fettfutter (HFF) gefüttert, eine Wildtyp-Gruppe wurde mit Standardfutter gefüttert (SF). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Mäuse wie unter 2.2.3 beschrieben narkotisiert. Durch Punktion der *Vena cava inferior* wurden mit einer Kanüle mindestens 500 μ l Blut entnommen. Das Serum wurde, wie unter 2.2.4 beschrieben, gewonnen. Die Serumkonzentration der dargestellten Analyte wurde mit Hilfe von Teststreifen und der anschließenden Auslesung im Messgerät (*Spotchem*, akray) analysiert. Dargestellt ist jedes Replikate mit Median (n = 4-7). Signifikante Unterschiede wurden durch einfaktorische Varianzanalyse (One-way ANOVA) mit Tukey post-Test ermittelt. Signifikanzniveaus: *p < 0,05 für PAR4^{+/+} SF zu PAR4^{+/+} HFF und #p < 0,05 für PAR4^{-/-} HFF zu PAR4^{+/+} HFF.

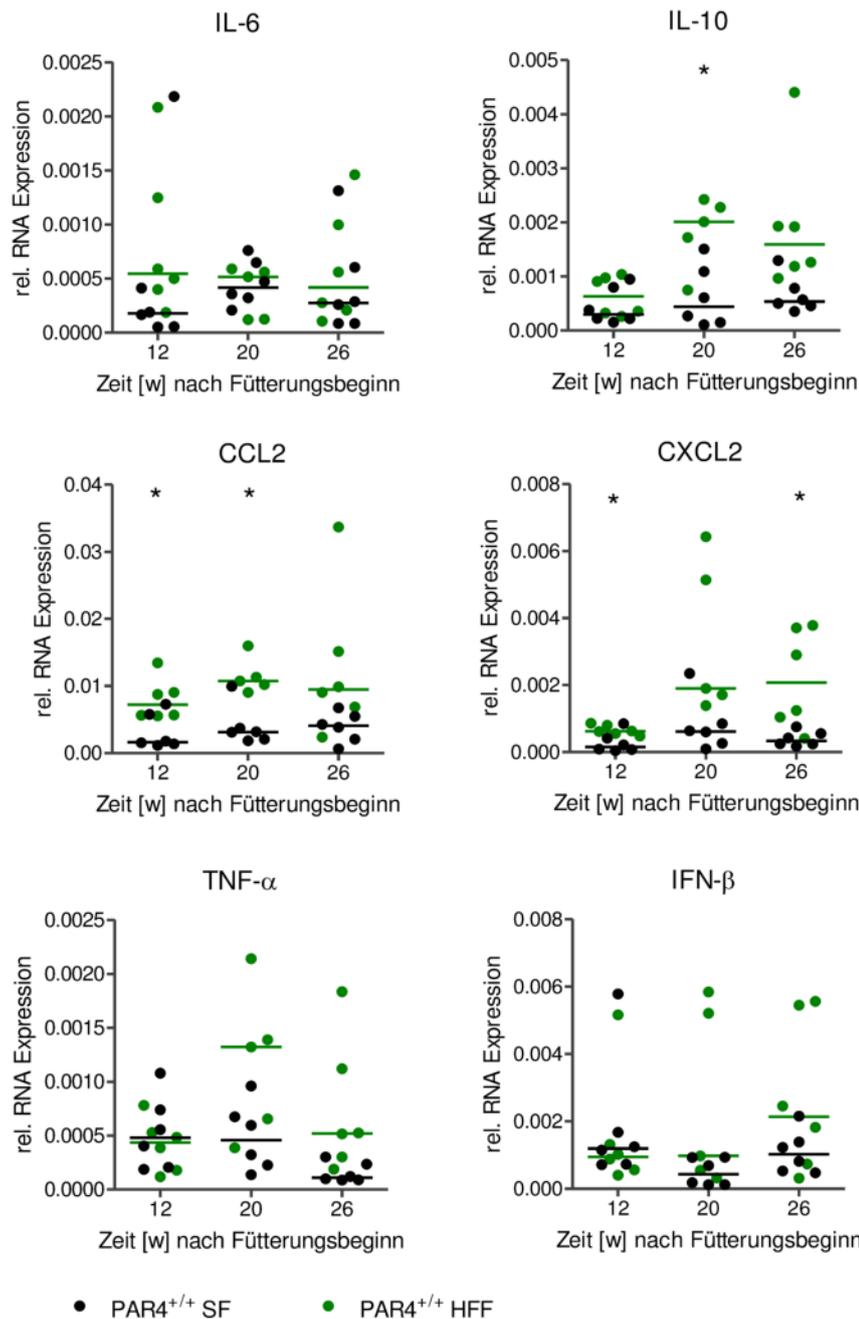


Abbildung 25: Eine hochkalorische Fettfütterung wirkt sich auf die Expression verschiedener Zytokine in der Leber aus

Wildtyp-Mäuse wurden bis zu 30 Wochen mit hochkalorischem Fettfutter (HFF) gefüttert, eine Wildtyp-Gruppe wurde mit Standardfutter gefüttert (SF). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Lebern der Mäuse, wie unter 2.2.3 beschrieben, entnommen. Die RNA wurde, wie unter 2.2.5 beschrieben, isoliert, in cDNA umgeschrieben (siehe 2.2.7) und die relative RNA-Expression der in der Abbildung angegebenen Zytokine und Chemokine wurde in der qPCR gemessen (siehe 2.2.8). Als Kontrollgen wurde SDHA verwendet. Die relative Expression wurde aus dem negativen potenzierten Ct-Wert berechnet, nachdem der Ct-Wert des Kontrollgens vom Ct-Wert des zu untersuchenden Gens abgezogen wurde. Dargestellt ist jedes Replikat mit Median (n = 5-6). Signifikante Unterschiede wurden durch einfaktorische Varianzanalyse (One-way ANOVA) mit Tukey post-Test ermittelt. Signifikanzniveau: *p < 0,05 für PAR4^{+/+} SF zu PAR4^{+/+} HFF.

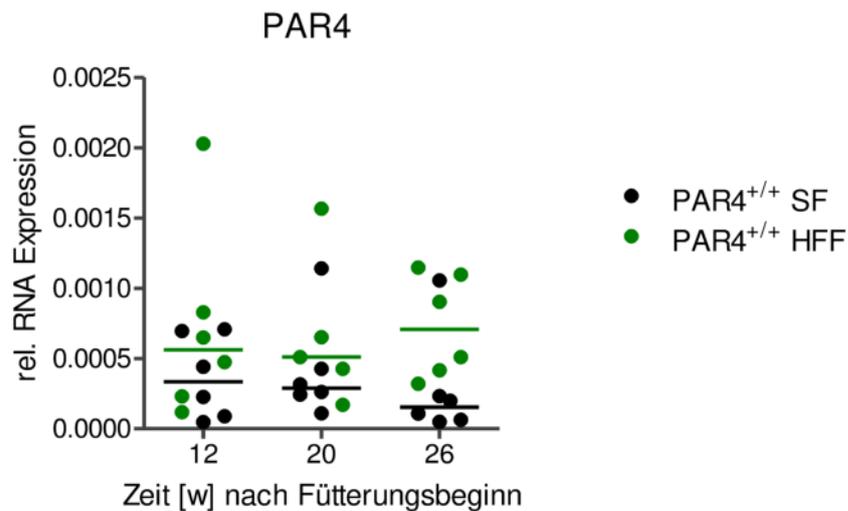
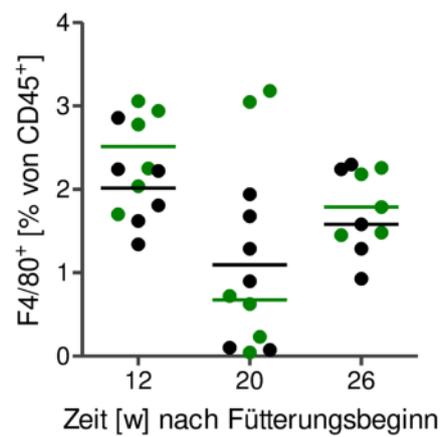
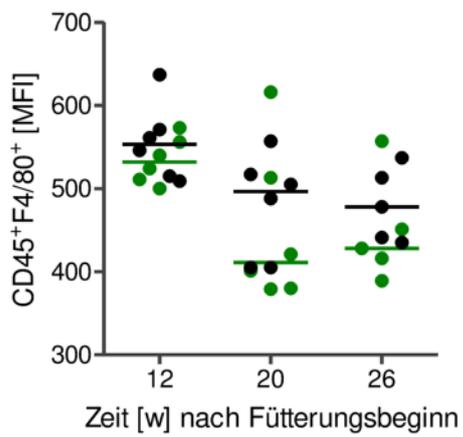
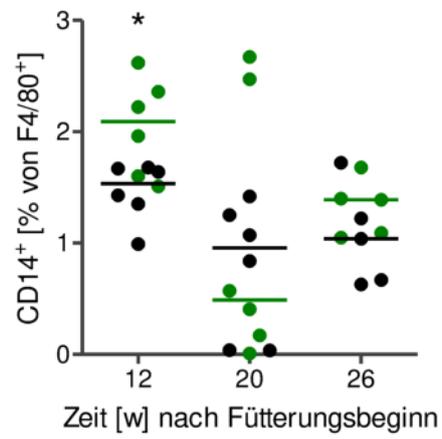
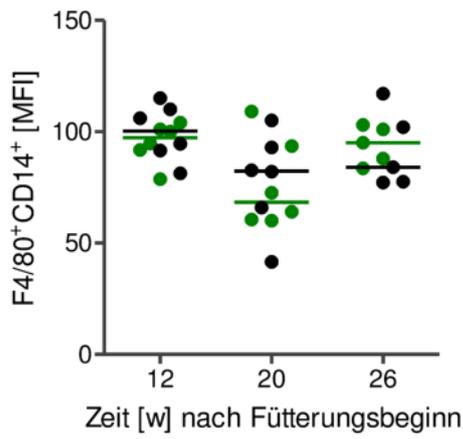
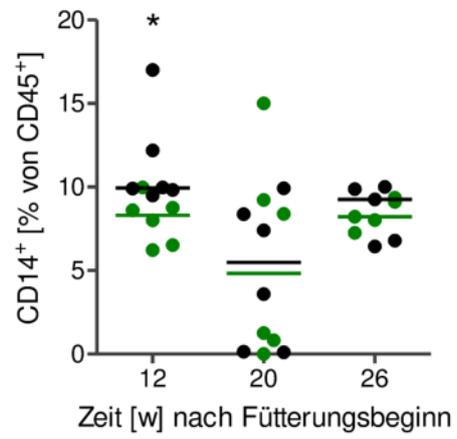
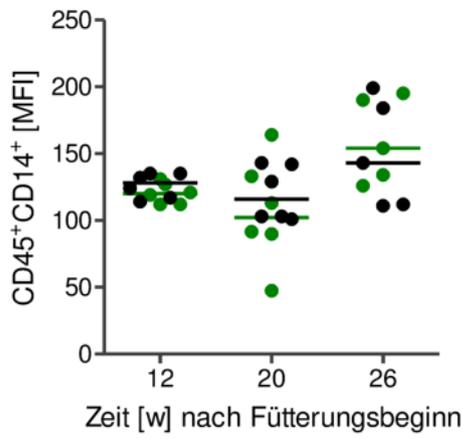
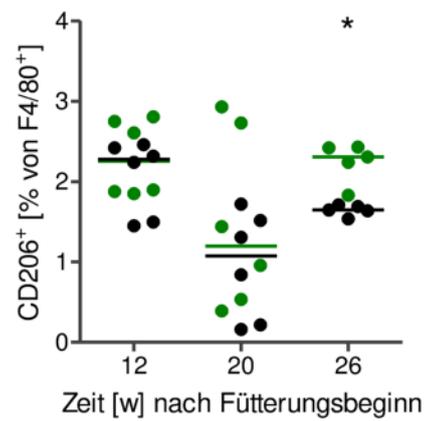
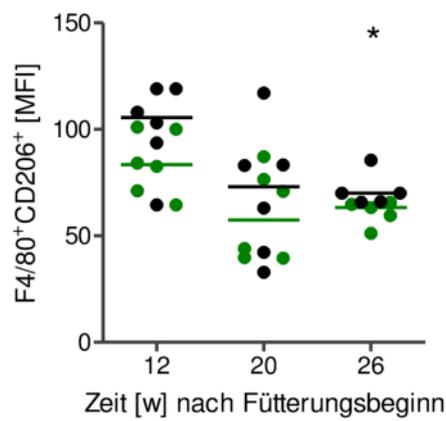
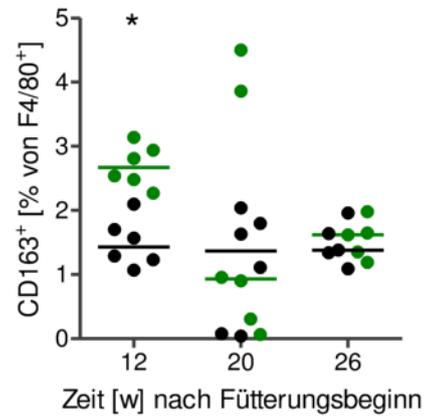
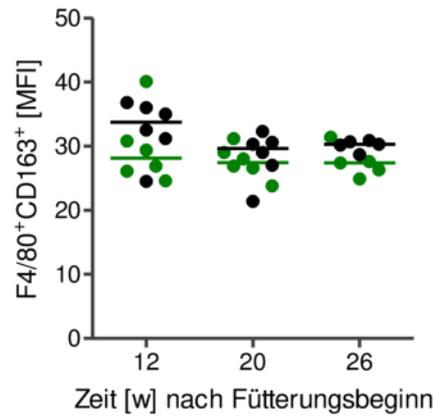
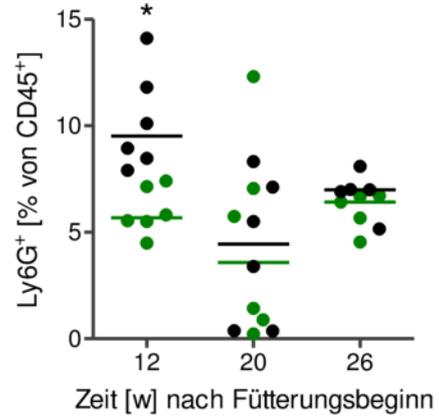
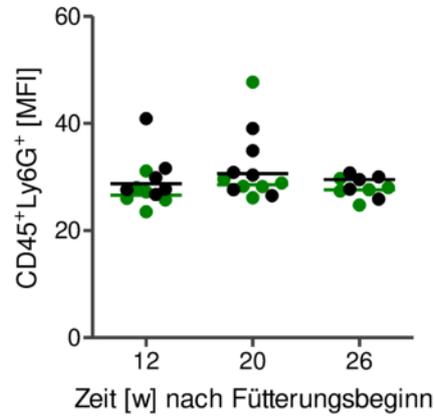


Abbildung 26: Eine hochkalorische Fettfütterung hat keinen Einfluss auf die PAR4-Expression in der Leber

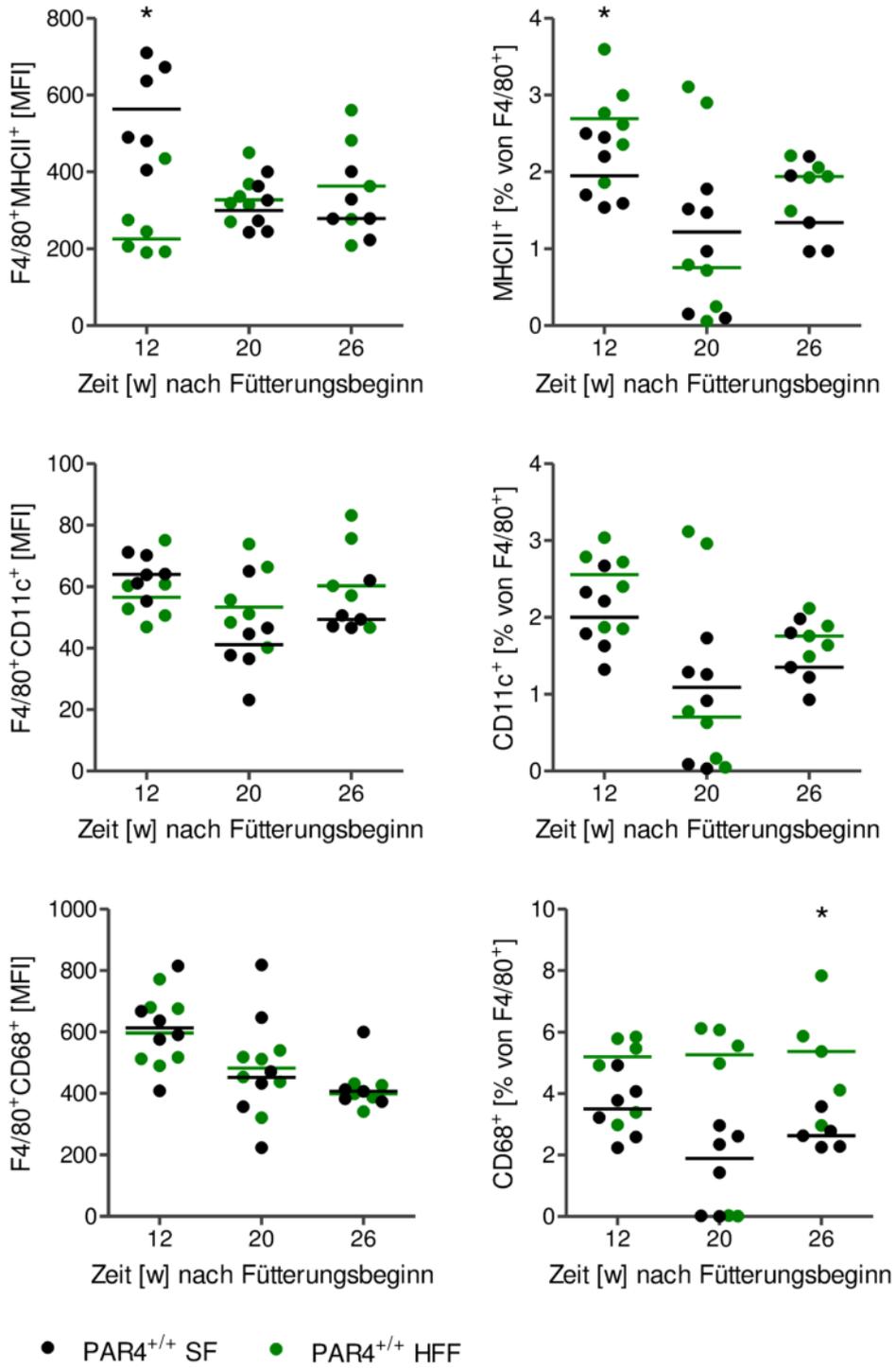
Wildtyp-Mäuse wurden bis zu 30 Wochen mit hochkalorischem Fettfutter (HFF) gefüttert, eine Wildtyp-Gruppe wurde mit Standardfutter gefüttert (SF). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Lebern der Mäuse, wie unter 2.2.3 beschrieben, entnommen. Die RNA wurde, wie unter 2.2.5 beschrieben, isoliert, in cDNA umgeschrieben (siehe 2.2.7) und die relative RNA-Expression von PAR4 wurde in der qPCR gemessen (siehe 2.2.8). Als Kontrollgen wurde SDHA verwendet. Die relative Expression wurde aus dem potenzierten Ct-Wert berechnet, nachdem der Ct-Wert des Kontrollgens vom Ct-Wert des zu untersuchenden Gens abgezogen wurde. Dargestellt ist jedes Replikat mit Median (n = 5-6). Signifikanzniveau: *p < 0,05 für PAR4^{+/+} SF zu PAR4^{+/+} HFF.



● PAR4^{+/+} SF ● PAR4^{+/+} HFF



● PAR4^{+/+} SF ● PAR4^{+/+} HFF



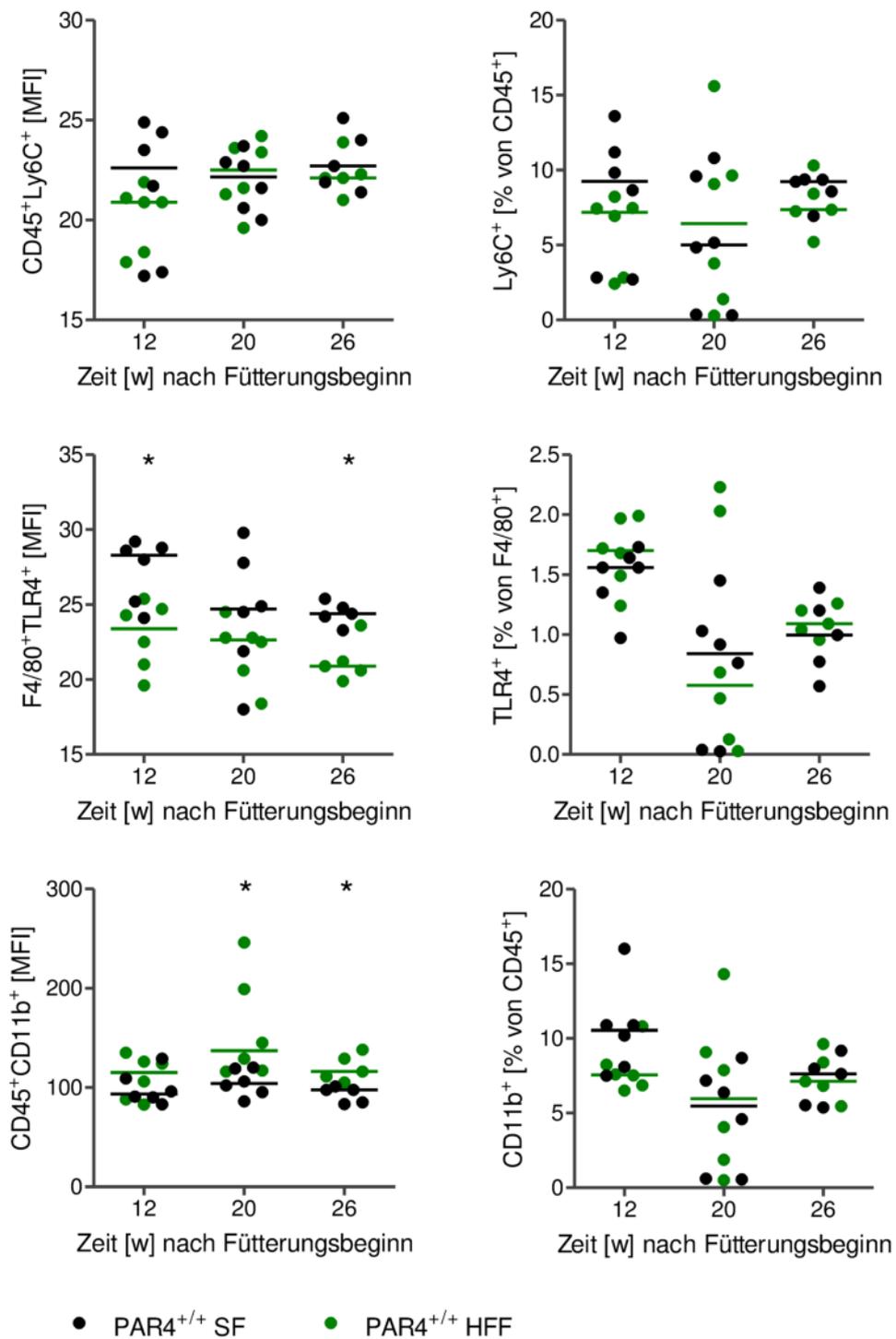


Abbildung 27: Eine hochkalorische Fettfütterung verändert verschiedene Immunzellpopulationen in der Leber

Wildtyp-Mäuse wurden bis zu 30 Wochen mit hochkalorischem Fetttfutter (HFF) gefüttert, eine Wildtyp-Gruppe wurde mit Standardfutter gefüttert (SF). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen, wie unter 2.2.10 beschrieben, isoliert und ihre mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) im FACS Canto II der Firma BD gemessen. Dargestellt ist jedes Replikat mit Median (n = 5-6). Signifikante Unterschiede wurden durch einfaktorische Varianzanalyse (One-way ANOVA) mit Tukey post-Test ermittelt. Signifikanzniveau: *p < 0,05 für PAR4^{+/+} SF zu PAR4^{+/+} HFF.

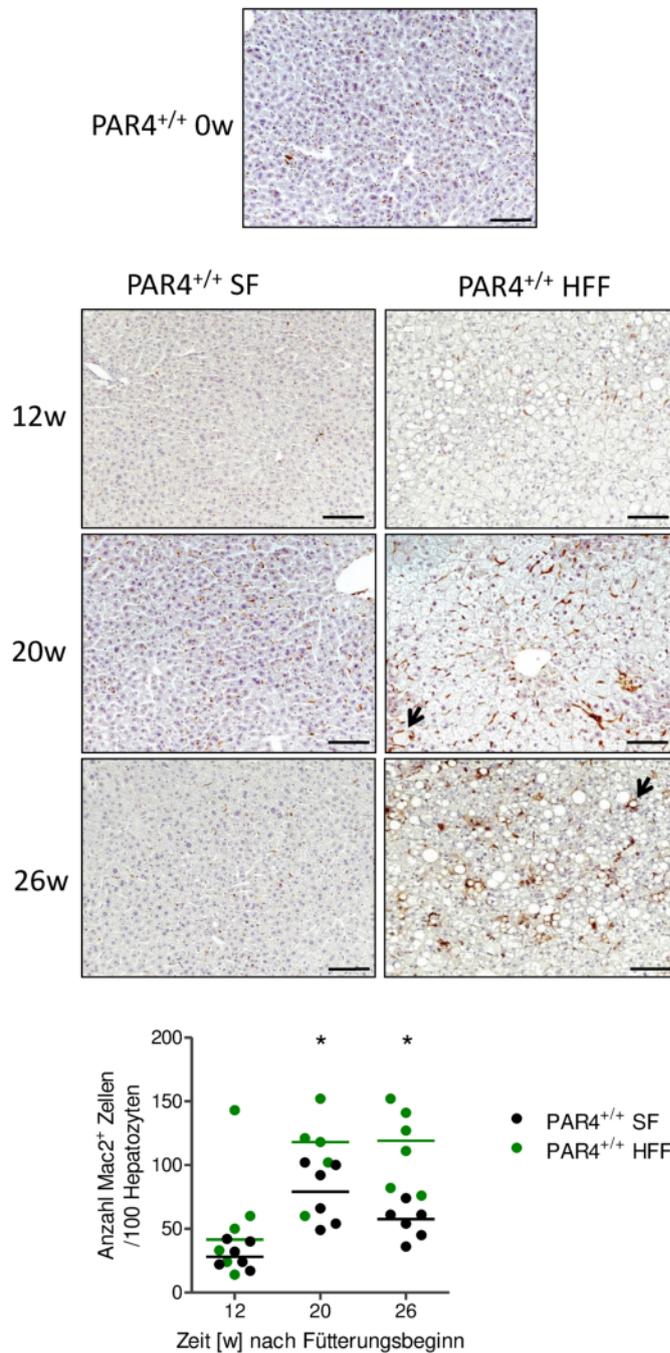


Abbildung 28: Eine hochkalorische Fettfütterung führt zur Akkumulation von Mac2⁺-Zellen in der Leber

Wildtyp-Mäuse wurden bis zu 30 Wochen mit hochkalorischem Fettfutter (HFF) gefüttert, eine Wildtyp-Gruppe wurde mit Standardfutter gefüttert (SF). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Lebern, wie unter 2.2.3 beschrieben, entnommen und Paraffinschnitte, wie unter 2.2.9 beschrieben, angefertigt. Die Leberschnitte wurden dann, wie unter 2.2.9.1 beschrieben, mit einem Mac2-spezifischen Antikörper gefärbt und im Durchlichtmikroskop aufgenommen. Die Abbildung zeigt zu jedem Zeitpunkt ein repräsentatives Bild. Die quantitative Auswertung der Mac2⁺-Zellen stellt jedes Replikat mit Median dar (n = 5-6). Der Maßstab entspricht 100 µm. Signifikante Unterschiede wurden durch einfaktorische Varianzanalyse (One-way ANOVA) mit Tukey post-Test ermittelt. Signifikanzniveau: *p < 0,05 für PAR4^{+/+} SF zu PAR4^{+/+} HFF.

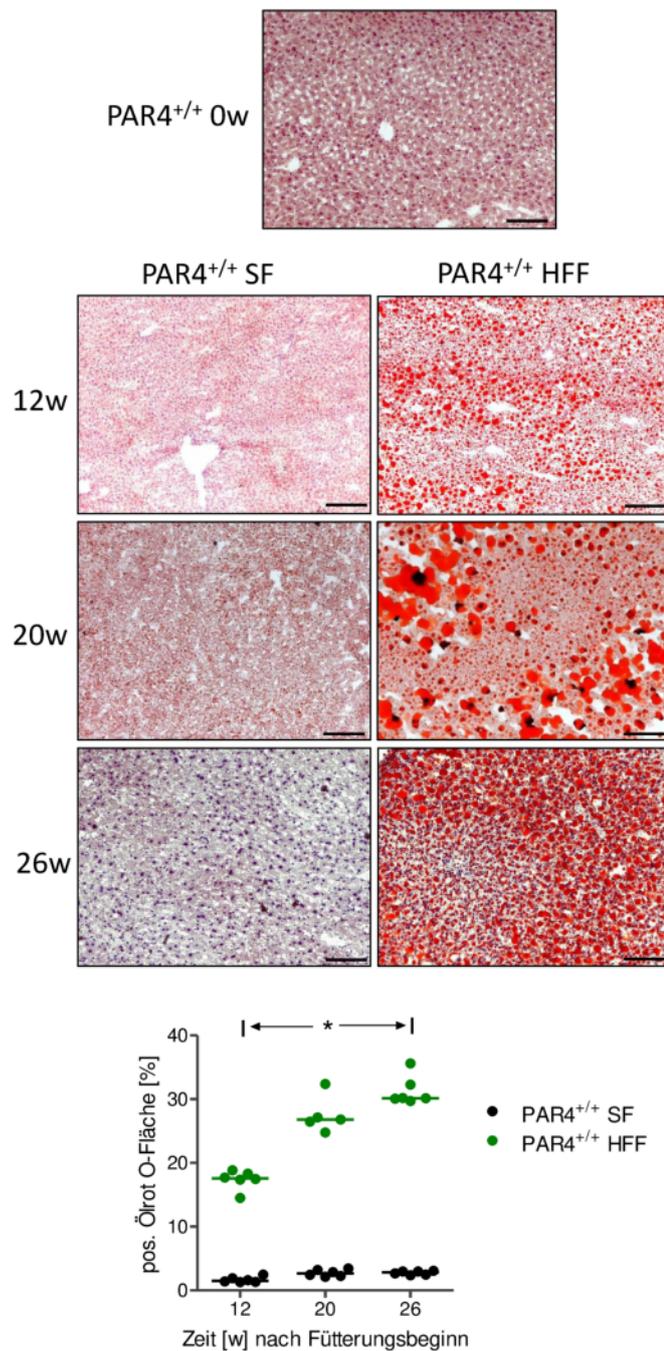


Abbildung 29: Eine hochkalorische Fettfütterung führt zu vermehrter Fetteinlagerung in der Leber

Wildtyp-Mäuse wurden bis zu 30 Wochen mit hochkalorischem Fettfutter (HFF) gefüttert, eine Wildtyp-Gruppe wurde mit Standardfutter gefüttert (SF). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Lebern, wie unter 2.2.3 beschrieben, entnommen und Paraffinschnitte, wie unter 2.2.9 beschrieben, angefertigt. Die Leberschnitte wurden dann, wie unter 2.2.9.2 beschrieben, gefärbt und im Durchlichtmikroskop aufgenommen. Die Abbildung zeigt zu jedem Zeitpunkt ein repräsentatives Bild. Die quantitative Auswertung der Ölot O-positiven Fläche stellt jedes Replikate mit Median dar (n = 5-6). Der Maßstab entspricht 100 µm. Signifikante Unterschiede wurden durch einfaktorische Varianzanalyse (One-way ANOVA) mit Tukey post-Test ermittelt. Signifikanzniveau: *p < 0,05 für PAR4^{+/+} SF zu PAR4^{+/+} HFF.

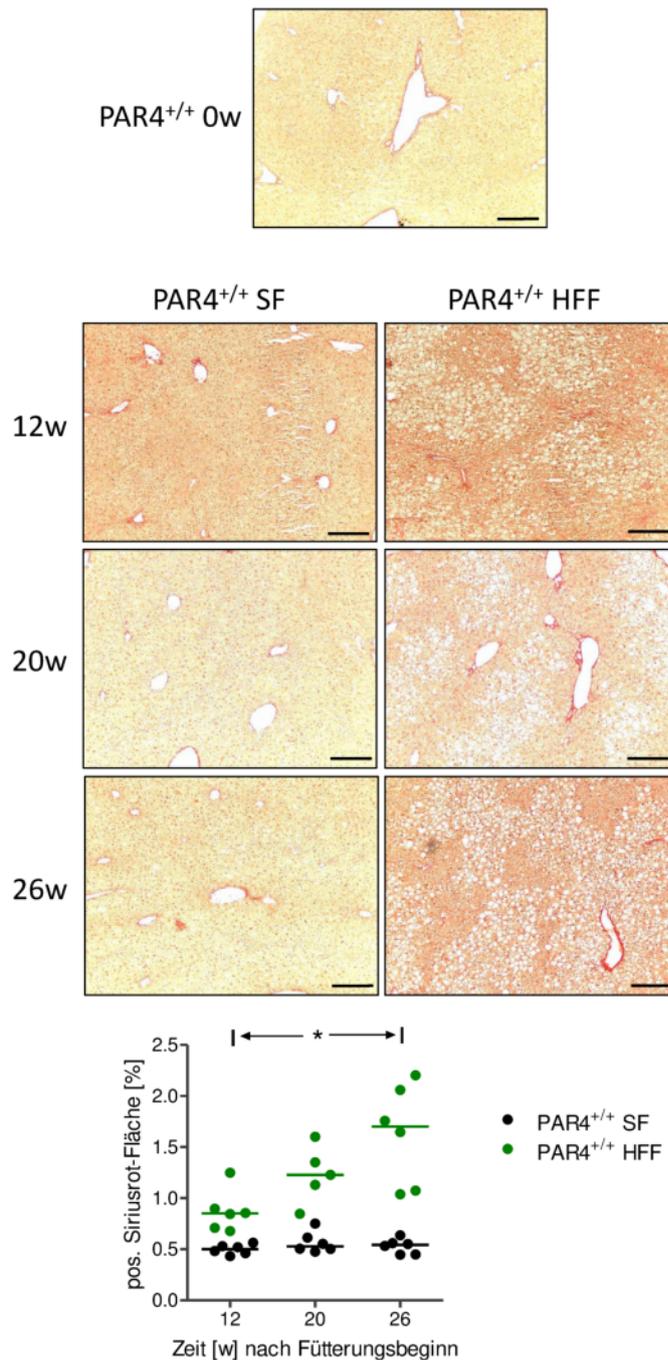


Abbildung 30: Eine hochkalorische Fettfütterung führt zu vermehrter Kollagen-einlagerung in der Leber

Wildtyp-Mäuse wurden bis zu 30 Wochen mit hochkalorischem Fettfutter (HFF) gefüttert, eine Wildtyp-Gruppe wurde mit Standardfutter gefüttert (SF). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Lebern, wie unter 2.2.3 beschrieben, entnommen und Paraffinschnitte, wie unter 2.2.9 beschrieben, angefertigt. Die Leberschnitte wurden dann, wie unter 2.2.9.4 beschrieben, gefärbt und im Durchlichtmikroskop aufgenommen. Die Abbildung zeigt zu jedem Zeitpunkt ein repräsentatives Bild. Die quantitative Auswertung der Sirius Rot-positiven Fläche stellt jedes Replikat mit Median dar (n = 4-7). Der Maßstab entspricht 100 μ m. Signifikante Unterschiede wurden durch einfaktorische Varianzanalyse (One-way ANOVA) mit Tukey post-Test ermittelt. Signifikantsniveaus: *p < 0,05 für PAR4^{+/+} SF zu PAR4^{+/+} HFF.

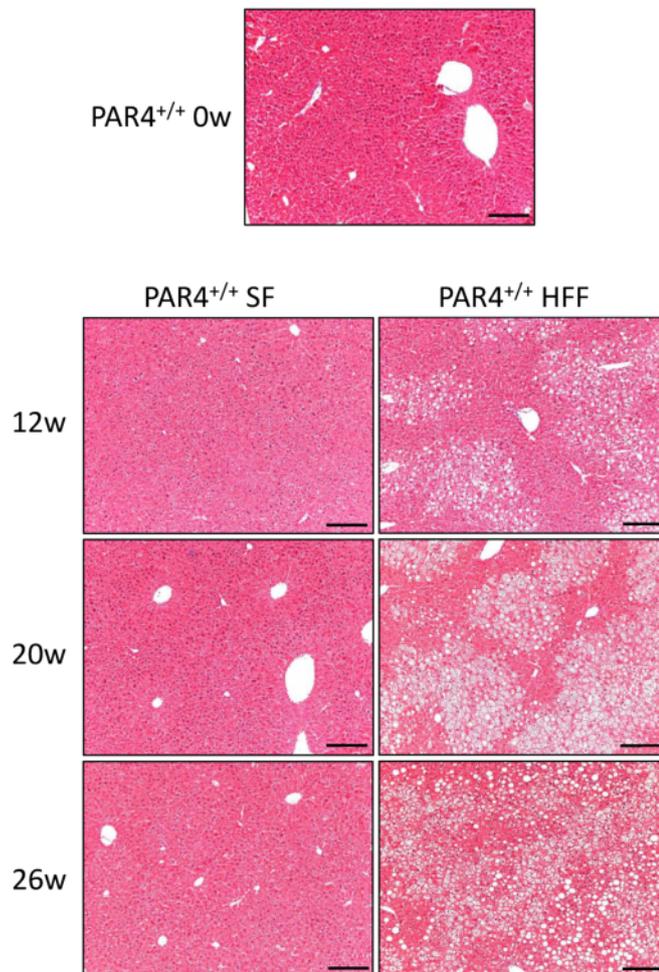


Abbildung 31: Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Leberschnitten zu verschiedenen Zeitpunkten einer hochkalorischen Fettfütterung.

Wildtyp-Mäuse wurden bis zu 30 Wochen mit hochkalorischem Fettfutter (HFF) gefüttert, eine Wildtyp-Gruppe wurde mit Standardfutter gefüttert (SF). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Lebern der Mäuse, wie unter 2.2.3 beschrieben, entnommen und Paraffinschnitte, wie unter 2.2.9 beschrieben, angefertigt. Die Leberschnitte wurden dann, wie unter 2.2.9.3 beschrieben, gefärbt und im Durchlichtmikroskop aufgenommen. Die Abbildung zeigt zu jedem Zeitpunkt ein repräsentatives Bild. Der Maßstab entspricht 100 µm.

Danksagung

Ich danke von Herzen meinem Doktorvater Professor Dr. Johannes Bode. Vielen Dank, Johannes, dass ich meine bereits begonnene Doktorarbeit unter deiner Obhut beenden durfte. Ich danke dir für deinen Input, deine stete Diskussionsbereitschaft und dass du jede Idee meinerseits ernst genommen hast. Auch geht mein Dank an deine Familie, die dich für unsere allabendlichen Besprechungen entbehren musste.

Ich danke Professor Dr. Lutz Schmitt für die sofortige Bereitschaft der Übernahme der Mentorenschaft und die Rolle als zweiter Gutachter, stellvertretend für die Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät. Auch werde ich ihre Vorlesung während des Masterstudiums der Biochemie in angenehmer Erinnerung behalten, da sie stets unterhaltsam und informativ war.

Professor Dr. Dieter Häussinger danke ich für die hervorragende Ausstattung des Forschungslabors und dass ich dieses zur Fertigstellung meiner Dissertation verwenden durfte.

Professor Dr. Anke Fender danke ich für die Überlassung des Themas und ihre fortwährende Unterstützung, auch noch über den Wechsel hinaus. Danke Anke, für deine stetige Diskussionsbereitschaft und für die Hilfe beim Einstieg ins Doktorandenleben.

Ebenfalls geht mein Dank an Dr. Julia Maier, die mir in meiner ersten Zeit als Doktorandin sehr viel ihrer wertvollen Zeit geopfert hat, um mich in sämtliche tierexperimentellen Methoden einzuarbeiten. Vielen Dank, Julia, dass du dir diese Zeit genommen hast.

Ich danke der AG Bode für ihre herzliche Aufnahme und für die stete Hilfsbereitschaft im Labor. Im Besonderen danke ich Dr. Stephanie Wolf, die mir wertvolle Tipps im Umgang mit Makrophagen und der FACS-Analyse an die Hand gab. Auch werde ich unseren gemeinsamen AG-Ausflüge in angenehmer Erinnerung behalten.

Mein Dank geht ebenfalls an alle Mitarbeiter des Forschungslabors der Experimentellen Hepatologie. Die stete Hilfsbereitschaft bei allen kleinen und großen Fragestellungen haben einen wesentlichen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet.

Mein größter Dank geht an meine Familie, die mich bedingungslos in all meinen Lebensentscheidungen unterstützt hat. Besonders meinem Mann Florian, der alle Tief-

und Höhenflüge in dieser Zeit miterlebt hat. Durch seine konstruktive, aber auch liebevolle Art hat er alles wieder ins rechte Licht gerückt und mich auf den Boden der Tatsachen zurückgeholt. Ich danke dir sehr, dass ich mich immer zu 100 % auf dich verlassen kann. Ich liebe dich.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides statt durch meine eigene Unterschrift, dass ich die vorstehende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt und alle Stellen, die wörtlich oder annähernd wörtlich aus Veröffentlichungen genommen sind, als solche kenntlich gemacht habe. Die Versicherung bezieht sich auch auf in der Arbeit gelieferte Zeichnungen, Skizzen, bildliche Darstellungen und dergleichen.

Neuss, der 15.03.2019

Unterschrift