

Aus dem Institut für Pathologie
der Universitätsmedizin der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Einfluss des Fehlens von Perilipin 2 auf die ernährungsbedingte Entstehung von
Steatose und Steatohepatitis

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

David Leonard Sauerbeck
aus Nürnberg

Mainz, 2023

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. med. U. Förstermann

Tag der Promotion: 17.07.2023

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Tabellen- und Abbildungsverzeichnis.....	IV
1 Einleitung	1
1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren der nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung (NAFLD) und Steatohepatitis (NASH).....	1
2 Literaturdiskussion	2
2.1 Histopathologie von NAFLD, NASH und Fibrose	2
2.2 NASH und oxidativer Stress.....	2
2.3 Lipidtropfen	4
2.4 Systematik der Lipidtropfen-assoziierten Proteine.	4
2.4.1 Perilipin 1	6
2.4.2 Perilipin 2.....	7
2.4.3 Perilipin 3.....	8
2.4.4 Perilipin 4.....	9
2.4.5 Perilipin 5.....	9
2.5 Lipasen.....	10
2.5.1 ATGL	10
2.5.2 HSL.....	10
2.5.3 PNPLA3.....	11
2.6 Bisherige Perilipin 2 Knock-Out-Strategien im Mausmodell	12
3 Material und Methoden.....	14
3.1 Material	14
3.1.1 Geräte und Laborausstattung	14
3.1.2 Allgemeine Verbrauchsmaterialien	16
3.1.3 Chemikalien, Lösungen und Reagenzien	17
3.1.4 Standards und Größenmarker	20
3.1.5 Lösungen und Puffer	20
3.1.6 Kits.....	22
3.1.7 Histochemische Färbungen	22
3.1.8 Antikörper	23
3.1.9 Software	24
3.2 Methoden	25
3.2.1 Mäuse.....	25

3.2.2	gDNA-Isolierung und Genotyping	26
3.2.3	RNA-Isolierung und cDNA-Synthese	28
3.2.4	Bestimmung der leberspezifischen Laborparameter.....	29
3.2.5	Organpräparation und Probenentnahme	29
3.2.6	Histologische Färbungen	30
3.2.7	Immunhistochemie.....	31
3.2.8	Quantitative mRNA-Analyse durch Realtime-PCR	32
3.2.9	Proteinanalyse durch Immunblot	35
3.2.10	Proteinbestimmung nach Bradford	35
3.2.11	SDS-PAGE	35
3.2.12	Ponceaufärbung	37
3.2.13	Entwickeln von Immunblots	37
3.2.14	Diäten	38
3.2.15	Statistische Auswertung	39
3.2.16	Tierschutz und Ethik.....	39
4	Ergebnisse	40
4.1	Verifizierung der hepatozyten-spezifischen Perilipin-2-Deletion	40
4.2	Auswirkungen von Diät und Genotyp auf das Körpergewicht.....	42
4.3	Veränderung der Serum-Parameter im Versuchszeitraum.....	43
4.4	Steatose, Aktivierungsgrad, Immuninfiltration und Zelluntergänge in <i>Plin2^{fl/fl}</i> und <i>Plin2^{-/-}</i> Mäusen.....	45
4.4.1	Histologische Analyse.....	45
4.4.2	mRNA-Expression der proapoptotischen und profibrotischen Marker <i>Chop</i> und <i>Perk</i>	49
4.4.3	Unterschiede in <i>Plin2^{-/-}</i> und <i>Plin2^{fl/fl}</i> Mäusen hinsichtlich Entzündung und Fibrose	50
4.5	mRNA- und Protein-Expression Lipidtröpfchen-assoziiierter Proteine.....	54
4.5.1	mRNA-Expression von Perilipin 2, 3, 4 und 5.....	54
4.5.2	Protein-Expression von Perilipin 2,3,4 und 5 im Immunblot und Immunhistochemie	56
4.6	mRNA-Expression übergeordneter Transkriptionsfaktoren des Lipidstoffwechsels.....	63
5	Diskussion.....	66
5.1	Hepatozelluläre Perilipin 2 Deletion in der Maus schützt nicht komplett vor diätinduzierter Leberparenchymverfettung.....	67

5.2	Tnf- α wird via hepatischem Perilipin 2 durch CDAA-Diät stärker beeinflusst als durch WD.....	71
5.3	Antientzündlicher Effekt und Verminderung von Zelltod durch hepatozelluläre Perilipin 2-Deletion.....	71
5.4	Verwertbarkeit der GPT- und GOT-Werte	72
5.5	Verhindert Perilipin 2 die Lokalisation von Perilipin 5 an Lipidtropfen über UPR-Stress?.....	73
5.6	Geschlechtsspezifische Unterschiede bei der Genese Diät-induzierter Steatohepatitis	75
5.7	Klinischer Ausblick	76
6	Zusammenfassung.....	79
Anhang	IV
7	Literaturverzeichnis	VI

Abkürzungsverzeichnis

Abhd5	<i>"Abhydrolase domain containing 5"</i>
Acta2	<i>"Alpha smooth muscle actin"</i>
ADRP	Perilipin 2, Adipophilin
APRI	Aspartat-Aminotransferase/Thrombozyten-Index
APS	Ammoniumpersulfat
ATGL	Adipozyten-Triglycerid-Lipase
ATP	Adenosintriphosphat
BIL	Gesamtbilirubin
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
CDAA	Cholin Defiziente L-Amino Säure-definierte Diät
cDNA	Komplementäre DNA
CHOP	C/EBP homologes Protein-10
CLD	Chronische Lebererkrankung
cPAT	Konstitutives PAT-Protein
CT	Computertomographie
C-Terminus	Carboxy-Ende einer Polypeptidkette
CV	Zentralvene
DAG	Diacylglycerid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DGAT	Diacylglycerol-O-Acyltransferase
DNL	<i>de-novo-Lipogenese</i>
ECL	Elektrochemolumineszenz
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-Tetra-Acetat
ePAT	Austauschbares PAT-Protein
ER	Endoplasmatisches Retikulum
eWAT	<i>"Epididymal white adipose tissue"</i>
FA	Fettsäure
FC	<i>"Fold change"</i>
FLI	<i>"Fatty Liver Index"</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

GGT	γ -Glutamyltransferase
GI	Gastrointestinal
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HDL	<i>"High Density Lipoprotein"</i>
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HFD	Hoch-Fett-Diät
HRP	Meerrettich-Peroxidase
HSC	Hepatische Sternzellen/ <i>"Hepatic Stellate Cells"</i>
HSL	Hormon-sensitive Lipase
IHC	immunhistochemische Färbungen
IL	Interleukin
k.A.	keine Angabe
kb	Kilobase
kDA	Kilodalton
LDL	<i>„Low Density Lipoprotein“</i>
LT	Lipidtropfen
MCD	Methionin/Cholin defizient
MDB	Mallory-Denk-Körperchen
MGLL	Monoglyceride Lipase
mRNA	<i>„messenger“</i> RNA
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie
MS	Metabolisches Syndrom
NAFLD	Nicht alkoholische Fettlebererkrankung
NASH	Nicht alkoholische Steatohepatitis
NCD	Normal-Diät
NEDD8	<i>"Neural-precursor-cell-expressed developmentally down-regulated 8"</i>
N-Terminus	Amino-Ende einer Polypeptidkette
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAT	<i>"Perilipin-Adipocyte-Tail"</i>
PAT-Familie	Perilipin-, Adipophilin-, TIP47-Proteinfamilie
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion

PERK	<i>"PRKR-like endoplasmic reticulum kinase"</i>
PKA	Proteinkinase A
PNPLA3	<i>"Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3"</i>
PPAR	<i>„Peroxisome Proliferator-Activated Receptor“</i>
PT	Portalfeld/ <i>"Portaltract"</i>
PTGS2	Prostaglandinsynthetase-2
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	<i>"small interfering" RNA</i>
SN	<i>"stereochemical numbering"</i>
SNP	Einzelnukleotidpolymorphismus
SREBP	<i>"Sterol regulatory element-binding protein"</i>
β Geo	β-Galactosidase und Neomycin Resistenz-Gen
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TAG	Triacylglycerid
TBS	<i>"Tris-Buffered Saline"</i> -Puffer
TBST	<i>"Tris-buffered saline with Tween20"</i>
TEMED	N-N-N'-N'-Tetramethylethyldiamin
Tip47	<i>"Tail-interacting Protein of 47"</i>
TNF-α	Tumor-Nekrose-Faktor-α
Tris	Trishydroxymethylaminoethan
Triton X-100	Polyethylenglycol-[4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenyl]-ether
Tween 20	Polyethylensorbitanmonolaurat
U	Enzymeinheit <i>"Unit"</i>
ü.N.	über Nacht
UPR	<i>"Unfolded protein response"</i>
UV	Ultraviolett
VE	Vollentsalzt
WD	<i>"Western Diet"</i>
WT	Wild Typ

Anmerkung zur Abkürzungs-Systematik von Genen und Proteinen, sofern nicht anders angegeben: Durchgehend großgeschriebene Proteine und Gene beziehen sich auf Untersuchungen an menschlichem Gewebe (z.B. PLIN2/*PLIN2*), während sich kleingeschriebene auf Modellorganismen beziehen (z.B. Plin2/*Plin2*). Die kursive Schreibweise bezieht sich auf das Gen bzw. die RNA, während sich die gerade Schreibweise das Protein bezieht.

Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Abbildungen:

Abbildung 1: Pathophysiologie der Fettleber-assoziierten Erkrankungen in der Dysplasie-Karzinom-Sequenz.	3
Abbildung 2: Sequenz-Übersicht der Perilipin Familie.....	6
Abbildung 3: Sequenzielle Expression der Perilipine im Prozess der Lipidtropfen-Reifung.....	7
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Plin2-Allels.	25
Abbildung 5: Exemplarische Gelelektrophorese der Genotypisierungs-PCR	28
Abbildung 6: Validierung des Plin2 Knock-Outs im Mausmodell.	41
Abbildung 7: Genotyp- und Diät-abhängige Gewichtsänderung.....	43
Abbildung 8: Stärkere Gewichtszunahme in Plin2 ^{-/-} Mäusen.	43
Abbildung 9: Geringe Zunahme der GOT- und GPT-Werte in Plin2 ^{-/-} Mäusen	45
Abbildung 10: Geringere Immunzellinfiltration und Leberparenchymverfettung in Plin2 ^{-/-} Mäusen	47
Abbildung 11: Reduzierter histologischer Leberschaden in Plin2 ^{-/-} Mäusen.	48
Abbildung 12: Geringere Anzahl an Zelluntergängen in Plin2 ^{-/-} Mäusen.	48
Abbildung 13: Reduktion der proapoptotischen und profibrotischen Faktoren Chop und Perk bei Plin2 ^{-/-} Mäusen.....	50
Abbildung 14: Herabregulation proinflammatorischer Faktoren in Plin2 ^{-/-} Mäusen....	51
Abbildung 15: Geringere Fibrose in Plin2 ^{-/-} Mäusen.....	52
Abbildung 16: Geringere Fibrose in weiblichen Plin2 ^{-/-} Mäusen gegenüber Wildtyp-Mäusen.	53
Abbildung 17: Steigerung der Acta2 mRNA-Expression durch HFD und CDAA-Diät.	54
Abbildung 18: Verminderte Plin5-mRNA-Expression in Plin2 ^{-/-} Mäusen.	55
Abbildung 19: Gesteigerte Perilipin 5-Expression in Plin2 ^{-/-} Mäusen.....	57
Abbildung 20: Höhere Expression von Perilipin 3 und Perilipin 5 in Plin2 ^{-/-} Mäusen..	59
Abbildung 21: Verminderte mRNA-Expression von Atgl und Abhd5 in Plin2 ^{-/-} Mäusen	60
Abbildung 22: Verminderte mRNA-Expression von Hsl, Mgl1 und Pnpla3 in Plin2 ^{-/-} Mäusen.	62
Abbildung 23: Repräsentative Darstellung der Protein-Expression von Atgl und dessen Ko-Aktivatoren Abhd5	63

Abbildung 24: Verminderte mRNA-Expression von Ppara, Ppar γ und Srebf1 in Plin2 ^{-/-} Mäusen.	65
Abbildung 25: Effekte der Perilipin 5 vermittelten Kompensation des hepatischen Perilipin 2 Verlusts.....	75

Tabellen

Tabelle 1: Übersicht über die PAT-Proteine.	5
Tabelle 2: Zusammensetzung für 250 mL Stammlösung Proteinase-K Puffers	26
Tabelle 3: Reaktionsansatz der Genotypisierungs-PCR	26
Tabelle 4: Primersequenzen zur Bestimmung des Genotyps mittels PC.....	27
Tabelle 5: PCR-Programm zur Bestimmung des Plin2-Genotyps	27
Tabelle 6: Reaktionsansatz der cDNA-Synthese.....	29
Tabelle 7: Protokoll der HE-Färbung	30
Tabelle 8: Protokoll der Gömöri-Versilberung.....	31
Tabelle 9: Mastermix RT-PCR.....	33
Tabelle 10: Real-Time PCR Primer zur quantitativen Bestimmung des mRNA-Gehalts	34
Tabelle 11: Zusammensetzung der Acrylamid-Gele für Immunblot.....	36
Tabelle 12: Zusammensetzung der ECL-Entwicklerlösung.	38
Tabelle 13: Literatur-Übersicht vergleichbarer Experimente	68
Tabelle 14: Quantitative Bestimmung des GOT-Werts in [U/l] im venösen Blut z	IV
Tabelle 15: Quantitative Bestimmung des GPT-Werts in [U/l] im venösen Blut	IV
Tabelle 16 : Zusammensetzung und Nährwerte der Spezialdiäten.	V

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren der nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung (NAFLD) und Steatohepatitis (NASH)

Im Zeitraum zwischen 1988 und 1994 wurde die NAFLD noch für 46,8% Prozent der chronischen Lebererkrankungen (engl. CLD) in den USA verantwortlich gemacht. Zirka 10 Jahre später stieg die Prävalenz der NAFLD innerhalb der CLD zwischen 2005 und 2008 auf 75,1% an (1, 2). Zahlreichen Studien zufolge liegt die Gesamtprävalenz der NAFLD mit regionalen Unterschieden und steigender Tendenz bei ca. 25%, sodass im Jahr 2021 von einer „NASH-Epidemie“ gesprochen wurde (2-5). Weltweit stellt eine Leberzirrhose die 11. häufigste und das Hepatozelluläre Karzinom (HCC) die 16. häufigste Todesursache dar (6). Hierbei war knapp jeder 10. Tod durch Leberzirrhose ursächlich durch eine NAFLD oder NASH bedingt. Global betrachtet ist eine NAFLD bzw. NASH im Vergleich mit Virushepatitiden und Alkoholabusus zwar aktuell noch die seltenste der aufgeführten Ätiologien für Tod durch Leberzirrhose, jedoch die einzige mit steigender Inzidenz und Mortalität (7). Im Gegensatz zu anderen entzündlichen Lebererkrankungen ist die Progressionsrate einer NASH zu einer Leberzirrhose oder zu einem Hepatozellulären Karzinom (HCC) mit 2,5% aller NASH-PatientInnen niedriger und schreitet langsamer fort (3). Dennoch verdoppelt sich die HCC-bedingte Mortalität durch Adipositas (Body Mass Index $>30\text{kg/m}^2$), wie Gupta et al. in einer Meta-Analyse feststellten (8). Zudem wiesen einer retrospektiven Kohortenstudie in Deutschland zufolge 41,7% der NAFLD oder NASH-PatientInnen, welche ein HCC entwickelten, keine Leberzirrhose auf. Dies ist diagnostisch relevant, da eine NAFLD/NASH eine Ausnahme von der klassischen Fibrose-Zirrhose-HCC-Sequenz darstellen kann (9). Hauptursache der NAFLD ist das Metabolische Syndrom mit Adipositas, Diabetes mellitus Typ 2, Dyslipidämie und Insulinresistenz (2, 3), bedingt durch Bewegungsmangel und Überernährung (10-12). Die steigenden Inzidenzen von NAFLD, NASH und deren Folgeerkrankungen stellen eine große Herausforderung an Gesundheitssysteme auf der ganzen Welt dar (2, 7). Um Therapie- und Präventions-Konzepte zu verbessern, ist noch Grundlagenforschung über die Dynamik und pathogenetische Relevanz der Lipidtropfen (LT) notwendig. Deshalb soll die Rolle von Perilipin 2 in der Leber hinsichtlich Steatose und Steatohepatitis im Rahmen dieser Arbeit weiter untersucht werden.

2 Literaturdiskussion

2.1 Histopathologie von NAFLD, NASH und Fibrose

Die deutsche S2k Leitlinie für NAFLD 2022 definiert einen hepatischen Fettgehalt von unter 33% als milde Steatose. Unabhängig vom Grad der Verfettung ist die blande Steatose ohne Entzündungsaktivität und Fibrose *a priori* reversibel. Zur nicht-invasiven Diagnose der NAFLD werden eine Kombination aus klinischer Anamnese, Leberenzym-Werte im Serum sowie radiologischen Methoden (Ultraschalldiagnostik, CT, MRT) eingesetzt. Der diagnostische Goldstandard, insbesondere zur Unterscheidung zwischen einer NAFLD und einer NASH, stellt jedoch die Histopathologie anhand einer Leberstanzbiopsie dar. Eine NASH liegt vor, wenn zusätzlich zur Leberzellverfettung auch assoziierte topisch-entzündliche Infiltrate ausgebildet werden und ballonierte Hepatozyten, evtl. mit Mallory-Denk-Körperchen (MDBs), nachweisbar sind (13-15). Leberzellverfettung und assoziierte perisinusoidale Fibrose beginnt häufig in Zone 3 und aktiviert dort hepatische Sternzellen (HSC). Mit zunehmender Erkrankungsintensität bilden sich portale Fibroseherde und Fibrosebrücken, bis hin zur Leberzirrhose aus (13, 16, 17). Zur Vergleichbarkeit von Entzündungsaktivität (Grading) und Fibrose-Stadium (Staging) wurden der NAFLD Aktivitäts Score-(NAS) nach Kleiner und Brunt sowie der Steatose-Aktivität-Fibrose (SAF)-Score nach Bedossa entwickelt (15, 18).

2.2 NASH und oxidativer Stress

Den Grundstein der NASH-Forschung legten Day und James im Jahr 1998 mit der „Two-Hit-Hypothese“. Demnach sensitivieren Lipide im Rahmen der Steatose („First hit“) die Leber für oxidativen Stress („Second hit“) und induzieren so eine Nekro-Inflammation (19). Durch periphere Insulinresistenz, reaktive Hyperinsulinämie und hierdurch gehemmte Lipolyse steigt das hepatische Fettsäure (FS)-Angebot (20). Dieser Effekt wird durch insulinvermittelte Stimulation des Sterol-Regulierendes-Element-Bindendes-Potein-1c(SREBP1c/SREBF1)-Wegs und resultierender *de-novo*-Lipogenese (DNL) verstärkt (21). Gleichzeitig wird Peroxisome- Proliferator-Activated Receptor γ (PPAR γ)-vermittelt die hepatische FS-Aufnahme aus der Peripherie gesteigert (22). Durch die im Rahmen des Metabolischen Syndroms erhöhte Plasmagluucose wird VLDL verstärkt gebildet, was ebenfalls zur Steatose beiträgt (23-25). Das Konzept des „Second hit“ von Day and James wurde inzwischen durch eine „Multiple-Hit-Hypothese“ erweitert (26): Als ursächlich für die komplexe

Pathogenese werden unter anderem eine Kombination von oxidativem Stress durch peroxisomale β -Oxidation (27) und endoplasmatischem-Retikulum(ER)-Stress diskutiert (23). Durch Hochfett-Diät (HFD) konnte im Mausmodell als Zeichen von zunehmendem ER-Stress eine Hochregulation der für ER-Stress essentiellen Proteine Chop (C/EBP homologous protein) und dessen Kinase, Perk (Protein Kinase R (PKR)-like Endoplasmic Reticulum Kinase) induziert werden (28).

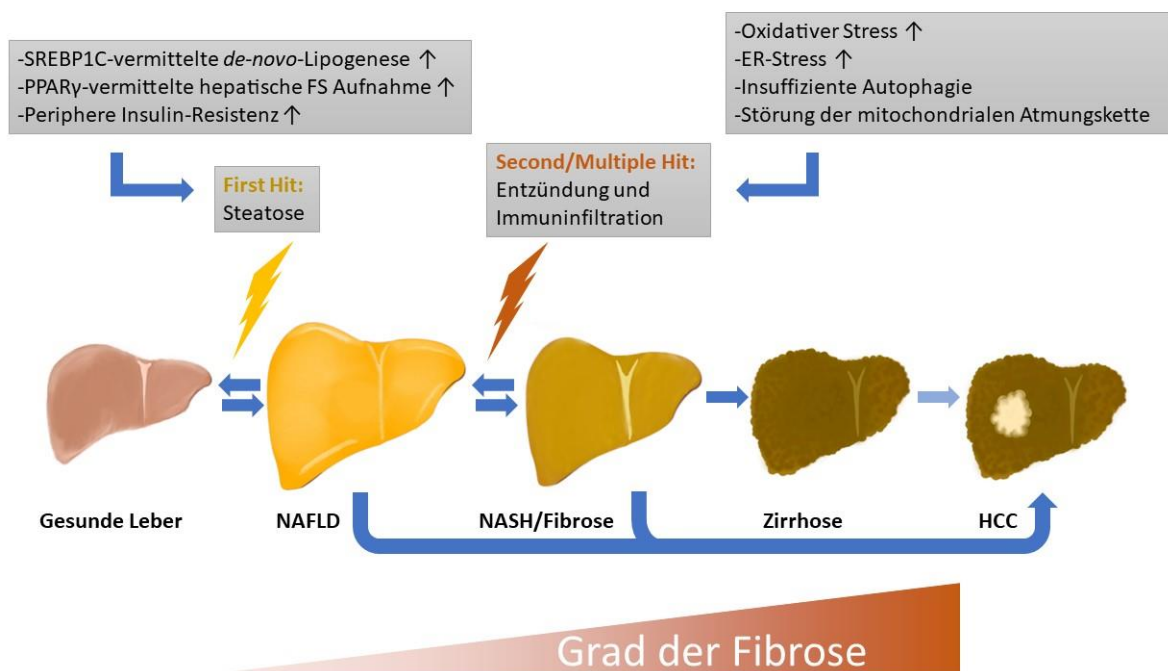


Abbildung 1: Pathophysiologie der Fettleber-assoziierten Erkrankungen in der Dysplasie-Karzinom-Sequenz. Der Progress bis einschließlich zur NASH ist potenziell reversibel, während die Leberzirrhose ein irreversibles Endstadium darstellt. Das HCC ist fakultativ.

Dieser Mechanismus wurde analog bei NASH-PatientInnen beobachtet. Steigender ER-Stress ist mit der Abnahme des Autophagie-Fluxes vergesellschaftet. Durch siRNA-vermittelte Hemmung der Chop-Perk-Signalkaskade kann der Autophagie-Flux wieder gesteigert werden (29). Der Überfluss freier Fettsäuren (FFS) kann oxidativen Stress induzieren. Es wird angenommen, dass bei der β -Oxidation exzessiver FFS eine durch Hochregulation des Entkopplungsproteins-2 (UCP-2) bedingte mitochondriale Elektronenleckage entsteht, um den Redoxgradienten entlang der Mitochondrienmembran zu senken. Diese Elektronen sind zum einen in der Lage, in Hepatozyten enthaltenen Sauerstoff zu radikalen Sauerstoffspezies umzuwandeln. Zum anderen dienen diese Elektronen nicht mehr der Adenosintriphosphat (ATP)-Synthese in der mitochondrialen Atmungskette, sodass dessen Konzentration sinkt,

was Hepatozyten insbesondere bei steigendem Energiebedarf vulnerabel für Zellschädigung und Apoptose macht (30). Im LDLr^{-/-} Mausmodell, welches genetisch für die Entwicklung einer NASH prädestiniert ist, kommt es unter HFD bereits nach 6 Wochen zu signifikanter Aktivierung profibrotischer und inflammatorischer Wege, flankiert von Veränderungen im Lipidmetabolismus, die mit oxidativem Stress einhergehen (31). Mari et al. konnten zudem zeigen, dass die Akkumulation mitochondrialen Cholesterols als Lipidmetabolit Hepatozyten für Tumornekrose-Faktor- α (TNF α) und Fas-induzierte Apoptose sensitivierten (32).

2.3 Lipidtropfen

Lipidtropfen werden als dynamische Zellorganellen verstanden, die im Zytosol aller Wirbeltiere und partiell auch niederer Organismen vorkommen. Nach neueren Ergebnissen findet man LT aber auch im Nukleus (33, 34). LT spielen eine fundamentale Rolle bei der Speicherung von Energie in Form von Triacylglyceriden (TAGs) und Sterolestern, welche für die Steroidhormonbiosynthese sowie als Membranbestandteil benötigt werden (34). TAGs und Sterolester in LT werden von einem Phospholipidmonolayer umgeben, in den Lipasen und andere Strukturproteine, sowie Mitglieder der Perilipin-Familie eingebettet sind. Proteom-Analysen konnten über 200 verschiedene Proteine an LT identifizieren, was deren komplexe Regulation unterstreicht (34, 35). Die Synthese von Neutralfetten und TAGs findet am ER durch Enzyme wie die Diacylglycerol-O-Acyltransferase (DGAT) statt, an die die *de-novo*-Synthese von LT gekoppelt ist. Bei Bedarf können die TAGs durch Lipolyse, vermittelt durch die „Adipose Triglyceride Lipase“ (ATGL), die Hormonsensitive Lipase (HSL) und die Monoacylglycerol Lipase (MGLL) abgebaut und durch peroxisomale oder mitochondriale β -Oxidation verstoffwechselt werden (36-39). Dieses Gleichgewicht ist bei vielen Erkrankungen wie z.B. bei der Atherosklerose, dem Metabolischen Syndrom und insbesondere der NAFLD gestört (40). LT nehmen im Rahmen der Steatose eine zugleich protektive und potenziell schädigende Rolle ein, indem sie zum einen die toxische Akkumulation der FS innerhalb des Zytosols verhindern, aber deren Akkumulation auch im Sinne von Day und James den „first Hit“ in der NASH-Pathogenese darstellt (19, 41, 42).

2.4 Systematik der Lipidtropfen-assoziierten Proteine.

Die Perilipin-Familie, auch Perilipin-Adipophilin-TIP47 (PAT)-Familie genannt, besteht bei Säugetieren aus den fünf Mitgliedern Perilipin 1-5. (Vgl. Tab. 1) (34, 43). Perilipine

sind hochgradig evolutionär konserviert, u. A. findet man Perilipin-ähnliche-Proteine auch bei Insekten und Pilzen. Sie sind quantitativ die häufigsten Lipidtropfen-assoziierten Proteine (34, 44).

Table 1: Übersicht über die PAT-Proteine. cPAT: konstitutiv-exprimiertes PAT; ePAT: austauschbares PAT. *Alle PAT-Proteine dienen der Erhaltung der strukturellen Integrität der Lipidtropfen, nur die weiteren spezifischen Funktionen wurden aufgeführt.

Synonyme	Expressions-Form	Expressionsort	Funktionen bis dato*	Erstbeschreibung, Jahr
Perilipin 1 , Perilipin	cPAT	weiße und braune Adipozyten, steroidhormonbildende Zellen, steatotische Hepatozyten	Wächterfunktion der hormonellen Lipolyse	Greenberg et al., 1991 (45)
Perilipin 2 , ADRP, ADFP, Adipophilin	cPAT	ubiquitär	möglicherweise Schlüsselrolle bei Progression von NAFLD zu NASH	Jiang et al., 1992 (46, 47)
Perilipin 3 , TIP47	ePAT	ubiquitär	essenziell zur LT-Maturation	Diaz et al., 1998 (48) Wolins et al., 2001 (49)
Perilipin 4 , S3-12	ePAT	weiße Adipozyten und quergestreifte Muskulatur	LT-Genese in quergestreifter Muskulatur	Scherer et al., 1998 (50)
Perilipin 5 , MLDP, OXPAT	ePAT	Quergestreifte (Herz)-Muskulatur, braune Adipozyten, mitochondrienreiche Zellen des GI-Trakts	Interaktion mit ATGL und Regulation der basalen Lipolyse	Yamaguchi et al., 2006 (51)

Mit Ausnahme von Perilipin 4 sind alle Perilipine durch eine charakteristische N-terminale PAT-Domäne gekennzeichnet (siehe Abb. 2)(52, 53). Des Weiteren bilden Perilipine N-terminal eine amphipathische α -Helix aus, die durch eine lipid-bindende 11-mer Proteinsequenz-Wiederholung gekennzeichnet ist. Dies dient zur Verankerung der Perilipine auf den LT. Disruptive Mutationen in dieser Region stören die Perilipin-LT-Interaktion signifikant, sodass LT schneller abgebaut werden (34, 54). Insbesondere in Perilipin 1-3 ist C-terminal ein hydrophober Spalt konserviert, welcher möglicherweise der Bindung hydrophober Proteine oder monomerer Lipide dient (55). Perilipin 2 und 3 werden ubiquitär, Perilipin 1, 4 und 5 gewebe-spezifisch exprimiert. Des Weiteren unterscheidet man zwischen den konstitutiv mit LT assoziierten PAT-

Proteinen (cPAT) Perilipin 1 und 2 gegenüber den austauschbaren PAT-Proteinen (ePAT) Perilipin 3, 4 und 5, die einen zytoplasmatischen Pool bilden und erst bei Stimulation an LT rekrutiert werden (34).

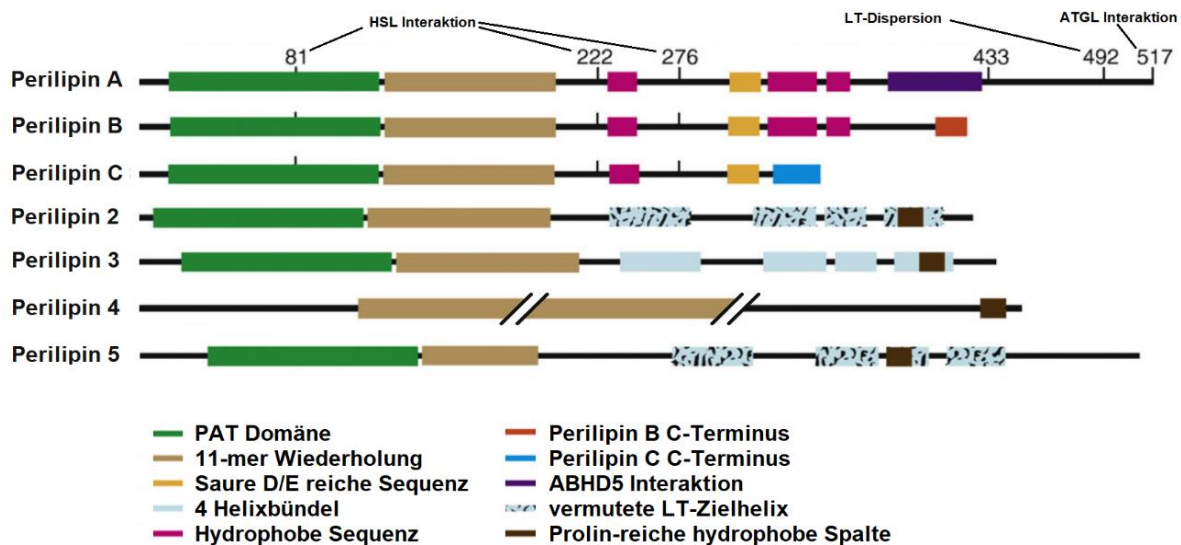


Abbildung 2: Sequenz-Übersicht der Perilipin Familie. Perilipin 1 ist in den Splice-Varianten Perilipin A-C aufgeführt. Abk.: HSL: Hormon-sensitive Lipase, ATGL: „Adipose Triglyceride Lipase“ Modifiziert nach Bickel et al.(44)

2.4.1 Perilipin 1

Perilipin 1 wurde erstmals 1991 als Substrat der Proteinkinase A (PKA) im Rahmen der Lipolyse beschrieben (45). Perilipin 1 (Plin1) kommt in weißen und braunen Adipozyten vor, findet sich aber auch in niedriger Expression in Steroidhormon bildenden Zellen, wie Zellen der Nebennierenrinde, in Leydigzellen, und im Ovar (56). Normale Hepatozyten verschiedener Spezies sind Perilipin 1-negativ, im Menschen wird jedoch bei Steatose Perilipin 1 *de novo* exprimiert (57). Eine immunhistochemische Untersuchung von Perilipin 1 bietet die Möglichkeit zwischen akuter und chronischer Steatose zu unterscheiden (vgl. Abb. 3) (58). Perilipin 1 spielt eine entscheidende Rolle in der Lipolyse. Indem es an LT eine Barriere gegenüber den löslichen Lipasen bildet und so deren TAG-Zugang verhindert, inhibiert es im basalen Zustand die Lipolyse und fördert so die intrazelluläre TAG-Speicherung (59). Granneman et al. konnten die Sequestrierung von Abhydrolase Domain Containing 5 (ABHD5), dem Koaktivator der ATGL, durch Perilipin 1 im basalen Zustand von Adipozyten nachweisen (60). Perilipin 1 wird durch die Proteinkinase A (PKA) phosphoryliert und bindet die ebenfalls durch PKA phosphorylierte HSL, die aus dem Zytoplasma an die LT-Oberfläche rekrutiert wird. Auf diese Weise wird bei Stimulation die Lipolyse gesteigert (34, 61-63). Dies ist beispielsweise im Hungerzustand unter

Abwesenheit von PKA-inhibierendem Insulin oder β -adrenerger Stimulation der Fall (34, 64). *Plin1*^{-/-} Mäuse haben einen geringeren Körperfettanteil und zeigen einen höheren metabolischen Umsatz als der Wildtyp (WT), neigen aber zu reduzierter Glukosetoleranz und peripherer Insulinresistenz (65). Im Menschen führt eine seltene, autosomal dominant vererbte Lipodystrophie durch eine heterozygote „Loss of Function“ PLIN1 Mutation zu Insulinresistenz, hepatischer Steatose und Dyslipidämie (66).

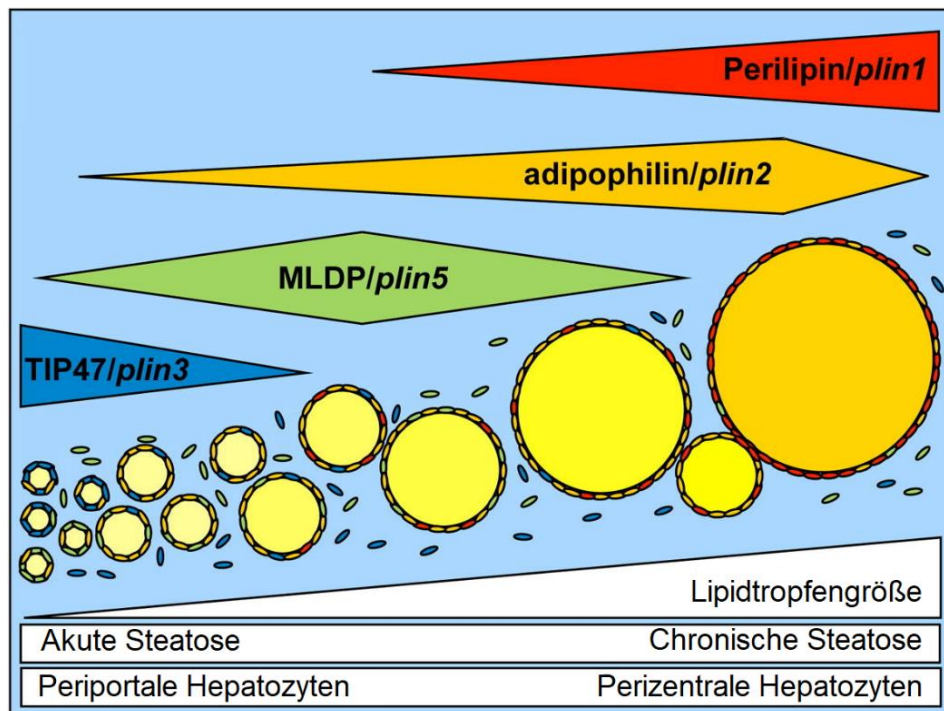


Abbildung 3: Sequenzielle Expression der Perilipine im Prozess der Lipidtropfen-Reifung. Perilipin 3 lokalisiert im Rahmen der akuten Steatose vor allem an kleinen LT, während Perilipin 1 bei chronischer Steatose an größeren LT lokalisiert. Modifiziert nach Pawella et al. (58).

2.4.2 Perilipin 2

Perilipin 2 wurde ein Jahr nach Perilipin 1 1992, als „Adipose differentiation-related protein“ ADRP, ADFP oder Adipophilin in der Frühphase der Adipogenese erstbeschrieben (46, 47). Perilipin 2 wird im Körper ubiquitär exprimiert und lokalisiert konstitutiv an LT, an denen Perilipin 1 oder Perilipin 5 typischerweise nicht lokalisiert sind (34), wie z.B in der Leber und im braunen Fettgewebe (57, 67). Die Perilipin 2-Expression korreliert maßgeblich mit dem Grad der Gewebsverfettung. (43, 57). Perilipin 2 zeigt die höchste Aminosäuresequenz-Homologie mit Perilipin 3 (34, 68). So ist die kompensatorische Rekrutierung von zytosolischem Perilipin 3 bei Herunterregulation von Perilipin 2 auf der LT-Oberfläche naheliegend, was in verschiedenen Zelllinien schon gezeigt werden konnte (69, 70). Diese Beobachtung

ließ sich jedoch nur teilweise auf das Mausmodell übertragen: Es konnte zwar eine kompensatorische Hochregulation von Perilipin 3 zusammen mit Perilipin 5 bei global Perilipin 2-defizienten Mäusen unter westlicher Diät (WD) beobachtet werden, jedoch reichte diese Kompensation nicht aus, um einen steatotischen Phänotyp zu erzeugen (71). Im Allgemeinen zeigten global Plin2-defiziente Mäuse einen schlanken Phänotyp, und entwickelten trotz WD bzw. HFD keine Insulin-Resistenz. Sie wiesen zudem im Vergleich zum WT einen erniedrigten hepatischen TAG-Gehalt auf und waren vor diätinduzierter Leberparenchymverfettung geschützt (71-74). Im Kontrast zum globalen Knock-Out konnte ein hepatozyten-spezifischer Plin2 Knock-Out im Mausmodell nicht komplett vor einer Leberparenchymverfettung schützen, aber vor Entzündung im Sinne einer NASH, sodass ein systemischer Effekt vermutet wurde (75). Orlicky et al. untersuchten diese Vermutung anhand eines hepatozyten-spezifischen Plin2 Knock-Out Mausmodells und konnten den extrahepatischen Effekt von Perilipin 2 untermauern. Dieser bedingt Insulinresistenz sowie Übergewicht und ist möglicherweise durch PPAR γ /CD36-vermittelte Fettsäureaufnahme reguliert (76). In hepatozyten-spezifischen Perilipin 2 defizienten Mäusen zeigte sich unter Methionin/Cholin defizienter Diät (MCD) eine reduzierte Expression der proinflammatorischen Marker Cox2, IL-6, Tnf- α , IL-1 β (77).

2.4.3 Perilipin 3

Perilipin 3 wurde zunächst 1998 als Mannose-6-Phosphat-Rezeptor-Substrat und endosomales Sortierungsprotein beschrieben (48). Erst im Jahr 2001 wurde es von Wolins et al. der PAT-Familie zugeschrieben (49). Perilipin 3 (TIP47) wird ubiquitär exprimiert und übernimmt eine wesentliche Rolle bei der LT-Biogenese. So wird bei der Genese neuer kleiner LT Perilipin 3 rekrutiert. Bei siRNA-vermittelter Reduktion von Perilipin 3 reifen LT, die stattdessen von Perilipin 2 ummantelt sind, nicht über dieses Frühstadium hinaus und der Durchmesser der LT bleibt klein. Der TAG-Gehalt der Zellen bleibt hiervon *in vitro* aber unberührt (69, 78). Der kombinierte Knock-Down von Perilipin 2 und 3 führte *in vitro* zu verminderter TAG-Speicherung, bei deutlich größeren, aber in ihrer Anzahl reduzierten LT (69). Bei Perilipin 2-Knock-Down Mäusen stieg unter HFD die hepatische Perilipin 3-Expression auf mRNA- und Proteinebene. Eine kompensatorische Hochregulation von Perilipin 2 konnte bei Perilipin 3-Knock-Down dagegen nicht beobachtet werden (79). Im globalen Knock-

Out von Perilipin 2 akkumulierte insbesondere Perilipin 3 vermehrt an LT von HSCs (72).

2.4.4 Perilipin 4

Perilipin 4 (S3-12) wurde 1998 erstmals im Rahmen einer Screening-Untersuchung auf adipozytenspezifische Proteine entdeckt (50). Es ist stark in LT weißen Fettgewebes (WAT) sowie in geringerer Menge in LT quergestreifter Muskulatur exprimiert. Im braunen Fettgewebe kommt Perilipin 4 nicht vor. Im Gegensatz zu allen anderen hier aufgeführten Perilipinen besitzt Perilipin 4 keine N-terminale PAT-Domäne, dafür eine repetitive 11-mer Domäne aus 33 Aminosäuren, die im Gegensatz zu anderen Proteinen der Perilipinfamilie etwa 70% des Proteins ausmacht (44, 80). In kultivierten 3T3-L1-Adipozyten bindet Perilipin 4 unter Oleat-Behandlung an naszierenden LT und ist so an der LT-Genese beteiligt (81). *Plin4^{-/-}* Mäuse zeigen einen unauffälligen Phänotyp, jedoch scheint Perilipin 4 funktionell eng mit Perilipin 5 verknüpft zu sein, dessen kardiale Expression hierdurch herabreguliert wird. Auf diese Weise wirkt die Perilipin 4-Deletion protektiv auf eine kardiale Steatose (82). Pourteymour et al. konnten in einer Interventionsstudie an zuvor sportlich inaktiven Männern mittleren Alters die Herunterregulation von muskulärem Perilipin 4 nach 12-wöchigem Training beobachten. Möglicherweise besitzt Perilipin 4 also eine wichtige Rolle in der Muskelverfettung im Rahmen von Inaktivität und metabolischem Syndrom (83).

2.4.5 Perilipin 5

Perilipin 5 (MLDP, OXPAT) wurde zuerst 2006 in der Herzmuskulatur, der Leber und den Nebennieren beschrieben (51). Dort lokalisiert Perilipin 5 insbesondere an kleinen LT. Zusätzlich kommt Perilipin 5 in braunen Adipozyten, in den mitochondrienreichen Parietalzellen des Magens, sowie in Pankreaszellen und Hepatozyten vor (84). Unter TAG-Freisetzung durch β_3 -Stimulation kolokalisiert Perilipin 5 mit ATGL und seinem Koaktivator ABHD5, allerdings konkurrieren ATGL und ABHD5 miteinander um die Perilipin 5-Bindungsstelle. Möglicherweise konzentriert Perilipin 5 ATGL und ABHD5 so auf der LT-Oberfläche und steigert hiermit die Lipolyse (85, 86). Im Rahmen einer Leberparenchymverfettung nimmt die Perilipin 5-Expression moderat zu und Perilipin 5 kolokalisiert partiell mit Perilipin 1 und 2 an vornehmlich kleinen LT (84). *Plin5^{-/-}* Mäuse zeigen gegenüber WT-Mäusen bei gleichem Gewicht einen reduzierten TAG-Gehalt in oxidativem (rotem) Muskelgewebe, jedoch nicht in glykolytischem (weißem)

Muskelgewebe. Darüber hinaus weisen *Plin5*^{-/-} Mäuse unter HFD eine verbesserte Insulinsensitivität in der Leber bei gleichzeitiger Reduktion der Insulinsensitivität im Muskel auf (87). In global Perilipin 2-defizienten Mäusen wurde unter WD eine gesteigerte Konzentration von Perilipin 5 auf der LT-Oberfläche beschrieben. Gleichzeitig war die mRNA-Konzentration von Perilipin 5 vermindert (71). Durch hepatozyten-spezifische Perilipin 2-Deletion konnte unter Normaldiät (NCD) ebenfalls in kleinen LT und unter HFD in großen LT eine vermehrte Lokalisation von Perilipin 5 gezeigt werden (76).

2.5 Lipasen

2.5.1 ATGL

Im Jahr 2004 veröffentlichten drei Gruppen unabhängig voneinander die Entdeckung eines Enzyms, das bevorzugt TAG hydrolysiert, und nannten es ATGL („adipose triglyceride lipase“) (88), Desnutrin (89) oder calciumunabhängige Phospholipase A2 ζ (90). ATGL wird stark in braunem und weißem Fettgewebe (91), und weniger stark in Leber, Herz und Hoden exprimiert (88). Als Lipase hydrolysiert ATGL ausschließlich lange FS von TAGs an den stereochemischen Positionen (SN) SN-1 und SN-2 (92). Transkriptionell wird ATGL während der Adipozytendifferenzierung durch PPAR γ reguliert (93). Die Expression lässt sich auch durch Fasten auf mRNA- sowie auf Proteinebene induzieren (94). Posttranskriptionell wird murines ATGL unter anderem durch die PKA phosphoryliert und aktiviert (95). Im Sinne der Endprodukt-Hemmung binden langkettige Acyl-CoAs ATGL N-terminal und verringern so deren Aktivität (96). ATGL wird durch Perilipin 1 und 5 reguliert, wobei ABHD5 als Koaktivator von ATGL die Hydrolyse-Spezifität von SN-1 auf zusätzlich SN-2 erweitert und die Aktivität des Enzyms verzwanzigfacht (97). *Atgl*^{-/-} Mäuse sind bereits unter Normaldiät adipös und zeigen eine starke Lipidtropfenakkumulation in Herz- und Skelettmuskulatur. Unter Nahrungskarenz entwickeln sie eine Hypoglykämie als Zeichen der gestörten Lipolyse (98).

2.5.2 HSL

Die Hormonsensitive Lipase (HSL) ist die historisch am längsten bekannte Lipase (99). Sie wird in Fettgewebe, Skelett- und Herzmuskelgewebe, im Gehirn, in der

Nebenniere, Ovarien, Hoden, pankreatischen β -Zellen und in Hepatozyten exprimiert und zeichnet sich durch breite Substratspezifität aus (100, 101). Hauptsubstrat der HSL sind Diacylglyceride, aber auch Mono- und Triacylglyceride, sowie Cholesterin- und Retinsäure-Ester werden durch sie katalysiert (102). Der lipolytische Effekt der HSL beruht, beispielsweise bei adrenerger Stimulation, auf der PKA/cAMP-vermittelten Interaktion mit Perilipin 1, welches wie HSL ebenfalls durch PKA phosphoryliert wird (45, 62, 63, 102). Umgekehrt führt eine steigende Insulinkonzentration und damit einhergehend ein sinkender cAMP-Spiegel zur Dephosphorylierung der beiden Interaktionspartner. Dies inhibiert die HSL-vermittelte Lipolyse, was maßgeblich den antilipolytischen Effekt von Insulin erklärt (62). Homo- und heterozygote „Loss of function“-Mutationen von HSL erhöhen beim Menschen zwar nicht das Risiko für eine Adipositas, jedoch für Diabetes mellitus Typ II, eine partielle Lipodystrophie im Alter, sowie für eine Leberparenchymverfettung (103).

2.5.3 PNPLA3

Die Lipase Patatin-ähnliches Phospholipase-Domänen-haltiges Protein 3 (Adiponutrin, PNPLA3) wurde 2001 erstbeschrieben (104) und besitzt die höchste Homologie zu ATGL (PNPLA2) (98) und wird vor allem in Leber, hier insbesondere in HSCs (105) in der Niere, dem Fettgewebe und in der Retina exprimiert. PNPLA3 lässt sich durch kohlenhydratreiche Diät und Insulin stark induzieren (106) und interagiert direkt mit SREBF1. SREBF1 hemmt den Abbau von hepatischem PNPLA3 und induziert dessen Transkription (107, 108). Der Einzelnukleotidpolymorphismus (SNP) PNPLA3 I148M ist assoziiert mit NAFLD, NASH, Leberzirrhose und HCC. PNPLA3 I148M ist gemäß bisherigem Stand der Wissenschaft der häufigste und stärkste genetische Risikofaktor für die Entstehung und Progression einer NAFLD bzw. NASH und korreliert stark mit der Entstehung von HCCs (109). Bruschi et al. konnten zeigen, dass PNPLA3 für die Aktivierung von HSCs benötigt wird und deren fibrotische Aktivität durch I148M verstärkt wird (110). Die Bestimmung der *PNPLA3*-Genvariante ist bereits Bestandteil der molekularen NAFLD-Diagnostik in einigen Universitätsklinika, sowie eine sinnvolle Erweiterung des „Fatty Liver Index“ (FLI) und ermöglicht eine noch präzisere Diagnostik(111), wird aber gemäß der S2k-Leitlinie NAFLD 2022 im Rahmen einer Screeninguntersuchung derzeit nicht empfohlen(13). Weder Knock-Out (112) noch Überexpression (113) von WT-*Pnpla3* beeinträchtigt

den Leberfettgehalt, allerdings konnte der steatogene Effekt von Pnpla3 I148M im murinen Knock-In-Versuch unter sucrosereicher Diät bestätigt werden. Katalytisch inaktives Pnpla3 akkumuliert unter diesen Bedingungen auf den nun vermehrt gebildeten LT(113, 114). Witzel et al. konnten zeigen, dass die gesteigerte LT-Genese möglicherweise weniger dem direkten Verlust der lipolytischen Aktivität von PNPLA3(I148M) zugrunde liegt, sondern vielmehr über eine indirekte Wirkung von PNPLA3(I148M) auf die ATGL-vermittelte lipolytische Aktivität. Es wird eine Rekrutierung von PNPLA3 durch Perilipin 5 an den lipolytisch aktiven ATGL-Multimer-Komplex vermutet, sodass diese einen trimeren Komplex bilden. PNPLA3 verdrängt so überschüssiges ATGL von der LD-Oberfläche und verringert dadurch die Lipolyse. Die I148M-Mutation verstärkt womöglich diesen Prozess (115).

2.6 Bisherige Perilipin 2 Knock-Out-Strategien im Mausmodell

2006 wurde durch Chang et al. eine globale Deletion von Perilipin 2 in der Maus etabliert, indem Exon 2 und 3 durch ein β -Galactosidase und Neomycin Resistenz-Gen (β -Geo-Kassette) ersetzt wurden. Unter NCD konnte bereits ein verringerter hepatischer Fettgehalt, sowie unter HFD in Anzahl und Größe reduzierte LT beschrieben werden (73). Zwei Jahre später entdeckten Russel et al. bei Anwendung der identischen Knock-Out-Strategie, dass diese eine trunkierte Proteinvariante zur Folge hatte und keinen kompletten Knock-Out darstellte (116). Spätere Studien dieser Arbeitsgruppe konnten durch Deletion von Exon 5 eine Frame-Shift-Mutation mit frühzeitigem Translationsabbruch von Perilipin 2 erreichen, die eine starke Reduktion des murinen Körperfettgehalts, sowie Resistenz gegen Leberparenchymverfettung unter HFD und WD zeigte (71, 72). Ein hepatozyten-spezifischer Knock-Out durch Deletion von Exon 4 von Perilipin 2 führte zu verminderter Steatose, Entzündung und Fibrose, jedoch war unter Verwendung von MCD die Versuchsdauer auf nur 15 Tage begrenzt, da der diätinduzierte Gewichtsverlust tierethisch keine längere Versuchsdauer zuließ (77). Orlicky et al. führten 2019 einen Langzeit-Versuch über 30 Wochen an global und hepatozyten-spezifisch *Plin2* deletierten Mäusen unter WD durch. Der globale Knock-Out war vor Steatose, Übergewicht und Glukose-Intoleranz geschützt, während in hepatozyten-spezifischen Knock-Out-Mäusen noch eine leichtgradige Steatose nachweisbar war. Ebenso wurden durch den hepatozyten-spezifischen Knock-Out die histologisch detektierbare Leberparenchymverfettung

etwa um die Hälfte vermindert, jedoch signifikant schwächer als durch die globale Perilipin 2-Deletion. In Perilipin 2-defizienten Lebern war keine Steatohepatitis nachweisbar (76). Partiiell hepatektomierte oder durch Tetrachlorkohlenstoff lebergeschädigte global Perilipin 2 defiziente Mäuse zeigten eine langsamere hepatische Regeneration als WT-Mäuse. Die Perilipin 2 vermittelte LT-Akkumulation ist nach einer Schädigung essentiell für die effiziente Leberregeneration (117).

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte und Laborausstattung

Gerätebezeichnung	Hersteller
Analysewaage	Sartorius AG, Göttingen, DE
Centrifuge Z 216 MK	Hermle Labortechnik GmbH, Gosheim, DE
Chemilumineszenzimager Fusion Solo S	Vilber Lourmat GmbH, Eberhadzell, DE
Cryo 1°C Freezing Container	Thermo Fisher Nalgene®, Waltham, USA
HARTMANN-Wärmeschrank	PAUL HARTMANN AG, Heidenheim, DE
Homogenisator, Precellys® 24	Bertin Technologies, Saint Aubin, Frankreich
Kryostat Leica CM3050 S	Leica Biosystems, Wetzlar, DE
Lichtmikroskop Eclipse TS100-F	Nikon, Tokyo, Japan
Magnetrührer RETbasic	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, DE
Mikrozentrifuge MIKRO 120	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, DE
Mini-PROTEAN Tetra System	Bio-Rad Laboratories, Inc., Kalifornien USA
pH-Labormessgerät inoLab®	WTW-a Xylem brand, Dinslaken, DE
PIPETBOY acu	INTEGRA Biosciences Corp., Hudson, USA
Pipetten Eppendorf Research® 10, 100, 1000	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Pipetten PIPETMAN® Classic P10, P100, P1000	Gilson® Inc, Middleton, USA

PowerPac™ Basic Power Supply	Bio-Rad Laboratories Inc.
PowerPac™ 3000	Bio-Rad Laboratories Inc.
QuantStudio 3 Realtime PCR System	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Reflovet® Teststreifen	Roche, Basel, Schweiz
Reflotron® Plus Point-of-Care-System	Roche
Spektralphotometer NanoDrop 1000	Thermo Fisher Scientific Inc.
Spektrophotometer Tecan Spark 10M	Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz
Sterilbank HERAsafe KS12	Thermo Fisher Scientific Inc.
Systemmikroskop Leica DM 3000	Leica Mikrosysteme GmbH, Wetzlar, DE
Thermocycler GeneAmp® PCR System 9700	Thermo Fisher Scientific Inc.
Thermo Haake® heating circulator	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DE
ThermoMixer® C	Eppendorf AG
Tischzentrifuge Mikro 120	Hettich AG, Bäch, Schweiz
Trans-Blot® Turbo™ Transfer System	Bio-Rad Laboratories Inc.
Trockenschrank Heraeus™ Kelvitron®	Thermo Fisher Scientific Inc.
Universalzentrifuge Heraeus™ Multifuge™ X3	Thermo Fisher Scientific Inc.
UV-Transilluminator iX 20	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, DE
Vibratom Leica VT 1.200S	Leica Biosystems
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Inc., New York, USA
Wippschüttler CAT ST 5	Ingenieurbüro CAT M.Zipperer GmbH, Ballrechten-Dottingen, DE

Zählkammer Neubauer Improved, 0,1 mm/0,0025 mm²	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim, DE
---	----------------------------------

3.1.2 Allgemeine Verbrauchsmaterialien

Material	Bezeichnung	Hersteller
6-Well Platten 12-Well Platten	Cellstar®, steril, frei von DNase, RNase, DNA, Pyrogen	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
Abdeckfolie für 96-Well Platten	MicroAmp™ optisch adhäsiver Film	Thermo Fisher Scientific Inc.
Deckgläser	Menzel Gläser, 24x 60mm	Thermo Fisher Scientific Inc.
Filterspitzen 10 µl, 100 µl, 1250 µl	SafeSeal SurPhob, steril, Low Binding, graduert, DNA- DNase- RNase-pyrogenfrei	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, DE
Kryoröhrchen	Nalgene® Cryoware, Cryogenic Vials	Thermo Scientific™, Schwerte, DE
Objektträger Superfrost® Plus (25x75x1,0 mm)	Menzel Gläser, geschliffen	Thermo Scientific™
Pasteurpipetten	ohne Wattestopfen, Kalksoda-Klarglas, 150 mm	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
96-Well Platte (Realtime-PCR)	MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate	Thermo Fisher Scientific Inc.
PCR-Reaktionsgefäße	Cellstar®, Sapphire PCR-Reaktionsgefäß, 0,2 ml	Greiner Bio-One GmbH
Pipettenspitzen mit Filter 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1250 µl	SafeSeal SurPhob Spitzen, Low Binding, graduert	Biozym Scientific GmbH

Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1250 µl	Refill System Nerbe	Nerbe plus GmbH, Winsen, DE
Precellys® Lysing Kit	Tubes, 2ml mit Keramik-Perlen	Bertin Technologies
Nitrocellulose Membran	Nitrocellulose Membranes, 0.45 µm	Bio-Rad Laboratories Inc.
Eppendorf Tubes® 1,5 ml	Safe-Lock Tubes, PCR rein	Eppendorf, Hamburg, DE
Serologische Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	Cellstar®, steril, frei von DNase RNase DNA Pyrogen	Greiner Bio-One GmbH
Whatman™ Chromatographiepapier	GE Healthcare 3MM Chr Chromatographie-Papier	Thermo Fisher Scientific
Zellkultur Schale 6 cm (60x 15mm), 10 cm (100x 20mm)	Cellstar®, steril, frei von DNase RNase DNA Pyrogen	Greiner Bio-One GmbH
Zentrifugen-Röhrchen 15 ml, 50 ml	Cellstar® Tubes, steril, konischer Boden, Schraubverschluss,	Greiner Bio-One GmbH

3.1.3 Chemikalien, Lösungen und Reagenzien

Reagenz	Bezeichnung	Hersteller
Acrylamidstamm-Lösung mit 0,8% Bisacrylamid	Rotiphorese® Gel 30	Carl Roth GmbH
Agarose Pulver	UltraPure™ Agarose	Invitrogen Inc., Carlsbad, Kalifornien
APS	Ammoniumperoxodisulfat	Carl Roth GmbH
Bradford Reagenz	Bio-Rad Protein Assay, Farbstoff+ Konzentrat	Bio-Rad Laboratories, Inc.

Bromphenolblau	Bromphenolblau für Natriumsalze	Carl Roth GmbH
BSA (bovines Serumalbumin)	Albumin Fraktion V	Carl Roth GmbH
Chloroform	Trichlormethan	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, Missouri
Coumarinsäure	p-Cumarin Säure ≥ 98.0%	Sigma-Aldrich Corp.
DMSO	Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich Corp.
DTT	Dithiothreitol	BioChemica AppliChem GmbH, Darmstadt, DE
Essigsäure	Essigsäure Rotipuran® 100%	Carl Roth GmbH
Ethanol	Absolut, ≥99,8%	Honeywell Research Chemicals GmbH, Seelze, DE
Formaldehyde solution	Formaldehydlösung, 36,6-38% in H ₂ O	Sigma-Aldrich Corp.
Glycerin	Glycerol Reagent Plus™	Sigma-Aldrich Corp.
Glycin	≥ 99%, 75,07 g/mol	Carl Roth GmbH
Halt™ Protease & Phosphatase Inhibitor	Cocktail (100X) Lot: LD144507	Thermo Fisher Scientific Inc.
Isopropanol	2-Propanol ≥ 99%, für Molekularbiologie	Sigma-Aldrich Corp.
Luminol	Luminol ≥ 97%	Sigma-Aldrich Corp.
Methanol	≥ 99,8%	Honeywell Research Chemicals GmbH
Magermilchpulver	Magermilchpulver	AppliChem GmbH, Darmstadt, DE
Nukleasefreies Wasser	Nukleasefreies Wasser	Qiagen GmbH, Hilden, DE

PBS-Puffer	Phosphat gepufferter Salz, pbs-Puffer (1X, Dulbecco)-Pulver	AppliChem GmbH
PEI-Reagenz	Polyethylenimin Stammlösung 1,67mM (in PBS) #408727	Sigma-Aldrich Corp.
Penicillin-Streptomycin	P0781	Sigma-Aldrich Corp.
PeqGREEN	DNA/RNA-Farbstoff, 1ml	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
Ponceau S	Ponceau S Lösung, 0,1% (w/v) in 5% Essigsäure	Sigma-Aldrich Corp.
Proteinase K (SIGMA-ALDRICH P6556-P100MG)	Aus Tritirachium album	Sigma-Aldrich Corp.
Salzsäure	Salzsäure rauchend 37% Rotupuran®	Carl Roth GmbH
SDS	Dodecylsulfat in Pellets, Mr 288,4	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DE
SYBR™ Green	SYBR™ Green PCR Master Mix	Thermo Fisher Scientific Inc.
TEMED	Tetramethylethylenediamin ≥ 98,5%	Carl Roth GmbH
Transfektionsreagenz	Lipofectamin®2000 Reagent	Thermo Fisher Scientific Inc.
Tris	Tris Ultrapure, 121,14 g/mol	AppliChem GmbH
Triton® X100	t-Octylphenoxy- polyethoxyethanol	Sigma-Aldrich Corp.
Trizol	TRI Reagent™ Lösung, RNA Isolation Reagent	Invitrogen Inc.
Trypsin	Trypsin-EDTA Lösung (0,25%)	Sigma-Aldrich Corp.

Tween	Tween 20, “ Molecular Biology Grade”	MP Biomedicals, Eschwege, DE
--------------	--------------------------------------	------------------------------

3.1.4 Standards und Größenmarker

Verwendung	Bezeichnung	Hersteller
Agarose-Gelelektrophorese	50 kb DANN-Leiter	New England BioLabs ®, Ipswich, Massachusetts
Proteinbestimmung	Gereinigtes BSA 10 mg/ml	New England BioLabs ®
Western Blot	PageRuler™ Vorgefärbte Protein-Leiter	Thermo Fisher Scientific Inc.

3.1.5 Lösungen und Puffer

Die Puffer wurden mit jeweils doppelt destilliertem Wasser angesetzt.

Bezeichnung	Zusammensetzung	Menge/ Konzentration
6-fach Protein-Probenpuffer	Tris-HCl (pH 6,8) SDS Glycerin DTT Bromphenolblau	350 mM 10,28% (m/V) 36% (v/v) 600 mM 1 Spatelspitze
10-fach Lysispuffer	Cell Signaling Technologies Inc., Danvers, USA	10%(v/v)
10x NEBuffer™ 2.1	New England BioLabs ®	10%(v/v)
„CO-IP“-Puffer	Tris HCl EDTA NaCl	50 mM 15 mM 100 mM
PBS Zellkultur	Dulbeccos´ s Phosphate Buffered Saline (DPBS) Sigma-Aldrich Corp	gebrauchsfertig
Proteinase K Puffer	Tris EDTA*H ₂ O SDS	100mM 5mM 0,2%

	NaCl	200mM pH 8,5
SDS-Sammelgelpuffer	Tris	500 mM pH 6,8, HCl
SDS-Trenngelpuffer	Tris	1,5 mM pH 8,8, HCl
SDS-PAGE Laufpuffer 10-fach	Tris Glycin SDS	250 mM 1,92 M 35 mM pH ca. 8,3
Semidry Blot-Puffer 10fach	Tris Glycin SDS	480 mM 390 mM 13 mM pH ca. 9,1
Semidry Blot Puffer 1fach	Semidry Blot Puffer (10-fach) Methanol	10%(v/v) 20% (v/v)
„Stripping“ Puffer #1	Glycin NaCl	200 mM 500 mM pH 2,8, HCl
„Stripping“ Puffer #2	Glycin NaCl	200 mM 500 mM pH 2,2, mit HCl eingestellt
TAE-Puffer 1-fach (Tris-Acetat-EDTA Puffer)	Tris Eisessig EDTA	40 mM 20 mM 1mM pH ca. 8,6
TBS 10-fach (Tris-buffered Saline)	Tris NaCl HCl	200 mM 1,38 M pH 7,6, HCl
TBST	TBS (10-fach) Tween 20	10% (v/v) 0,05% (v/v)

3.1.6 Kits

Bezeichnung	Hersteller
QIAquick®Gel Extraction Kit 50	Qiagen GmbH.
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Thermo Fisher Scientific Inc.
ReadyMix™REDTaq® PCR Reaction Mix MgCl ₂	Sigma-Aldrich Corp.

3.1.7 Histochemische Färbungen

3.1.7.1 HE-Färbung

Bezeichnung	Hersteller
Bluingpuffer REF:CS702	Dako Inc. Santa Clara, CA 95051
Eosin REF:CS701	Dako Inc.
Ethanol 99%, 96%, 70%	SAV Liquid Production GmbH Flintsbach am Inn
Hämatoxylin REF:CS700	Dako Inc.
Histo-Clear II REF:HS-202	Fa.national Diagnostics

3.1.7.2 Gömöri-Versilberung

Gebrauchslösung

Ansatz

Eisenalaun	6,25 g Ammoniumeisen-III-sulfat auf 250 ml Aqua dest
Essigsäure	30 ml 100%-ige Essigsäure, auf 1000 ml Aqua des
Formalin	29 ml Formalin (35%) auf 200 ml Aqua dest
Kaliumpermanganat	0,4g Kaliumpermanganat auf 50 ml Aqua dest (immer frisch angesetzt)
Kernechtrot	1g Kernechtrot und 50g Aluminiumsulfat in 1000ml Aqua dest erhitzt.

NaOH, 40%	10 g Natronplättchen auf 25 ml aqua bidest
Natriumthiosulfat	5 g Natriumthiosulfat auf 250 ml Aqua dest
Oxalsäure	5 g Oxalsäure auf 250 ml Aqua dest
Silberlösung	6 g Silbernitrat auf 60 ml Aqua bidest, mit 3,6 ml 40% NaOH und tropfenweise Ammoniak zur Auflösung des Niederschlags vermischt. Verdünnt in 200 ml Aqua bidest

3.1.8 Antikörper

Primärantikörper

Antikörper	Verdünnung für Immunblot	Tierspezies	Firma
α-PLIN2 (GP40)	1:1000	Meerschweinchen, polyklonal	PROGEN Biotechnik GmbH, Heidelberg, DE
α-PLIN3 (GP30)	1:000	Meerschweinchen, polyklonal	PROGEN Biotechnik GmbH, Heidelberg, DE
α-PLIN4 (hCT-A (07/13))	1:000	Meerschweinchen, polyklonal	Freundliche Gabe von Dr. Hans Heid, DKFZ, Heidelberg, DE
α-PLIN5 (GP31)	1:1000	Meerschweinchen, polyklonal	PROGEN Biotechnik GmbH, Heidelberg, DE
ATGL (#2138)	1:3000	Hase, polyklonal	Cell Signaling Inc.
Abhd5 (Sc-376931)	1:000	Human, monoklonal	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, Texas
α-GAPDH (6C5)	1:1000	Maus, monoklonal	Santa Cruz Biotechnology Inc.

Sekundärantikörper für den Immunblot

Antikörper	Verdünnung	Tierspezies	Hersteller	Artikelnr.
Anti-Maus IgG Hochgradig präadsorbiert	1:3000	Ziege	Invitrogen Inc.	A16078
Anti-Hase	1:3000	Ziege	Bio-Rad Laboratories, Inc.	170-6516
Anti- Meerschweinchen Hochgradig präadsorbiert	1:3000	Ziege	Invitrogen Inc.	A18775

3.1.9 Software

Programm	Herausgeber
Adobe® Photoshop CS5	Adobe Systems Inc., San José, Kalifornien
Chromas Version 2.6.2	Technelysium Pty. Ltd., South Brisbane, Australien
Excel, PowerPoint und Word aus Microsoft® Office 365	Microsoft Corporation, Redmond, USA
GraphPad Prism version 9.4.0	GraphPad Software, San Diego, USA
Image J (64 bit) 1.43	NIH, Bethesda, USA
NDP.view2 Viewing Software	Hamamatsu, Hamamatsu, Japan
Primer-BLAST online	NIH
QuantStudio™ Design & Analysis Software v1.4	Thermo Fisher Scientific Inc.

3.2 Methoden

3.2.1 Mäuse

Es wurden folgende Maus-Linien verwendet:

Linie 1: *Plin2^{fl/fl}* (Genotyp: *Plin2^{tm1c/tm1c}*)

Bei *Plin2^{fl/fl}* Mäusen handelt es sich um eine transgene promotorlose C57BL/6N Mauslinie, in der Exon 4 von Perilipin 2 von loxP-Stellen flankiert wird (vgl. Abb. 4). Die lacZ neo Kasette wurde bereits durch Einkreuzen der Linie in eine Flp-Deleter Linie entfernt. Auf diese Weise liegt ein konditionelles Setting vor. Diese Linie zeigt keinen auffälligen Phänotyp und wurde als WT-Kontrolle verwendet.

Linie 2: Alb-Cre (Genotyp: *Alb-Cre⁺*)

Bei *Alb-Cre* Mäusen handelt es sich um eine transgene Mauslinie, bei der die Cre-Rekombinase hepatozyten-spezifisch durch den Albumin/Alpha-Fetoprotein-Promoter reguliert wird. *Cre* ist in parenchymalen Zellen der Leber aktiv: In den Hepatozyten und Gallengangsepithelien, nicht jedoch in Sinusoidal-Endothelzellen der Leber (LSEC), Kupferzellen und hepatischen Sternzellen (HSC) (118-120). Diese Linie stand für die Kreuzungen mit der Linie 1 zur Verfügung. Die Mäuse zeigten keinen auffälligen Phänotyp.

Linie 3: *Plin2^{-/-}* (Genotyp: *Plin2^{tm1c/tm1c Alb-Cre⁺}*)

Diese transgene Mauslinie wurde durch Verpaarung der Linien 1 und 2 generiert. Sobald *Cre* exprimiert wird, wird Exon 4 von *Plin2* in Hepatozyten der Leber deletiert und es ergibt sich durch Frameshift-Mutation ein *Knock-Out*. Mit dieser Mauslinie sollten die Effekte eines hepatozyten-spezifischen Fehlens von Perilipin 2 auf Steatose, Steatohepatitis und Fibrose untersucht werden.

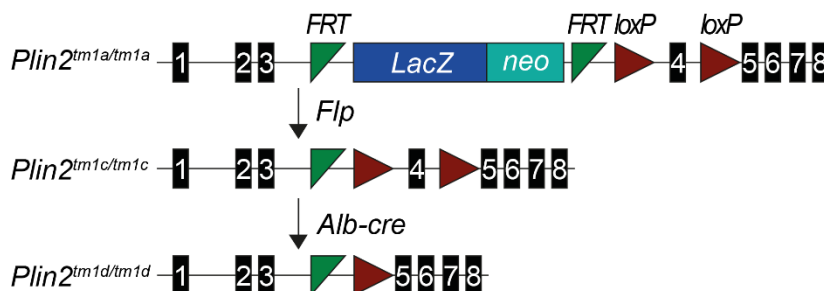


Abbildung 4: Schematische Darstellung des *Plin2*-Allels. Durch Einkreuzen in einen Flp-Deleter entsteht ein konditionelles Setting in *Plin2^{tm1c/tm1c}*. Durch Einkreuzen in eine Cre-Linie entsteht das *tm1d* Allel (Knock-Out).

3.2.2 gDNA-Isolierung und Genotyping

Zur Isolierung der gDNA wurden Schwanzspitzenbiopsate über Nacht bei 55°C unter Schütteln in Lysispuffer inkubiert. Hierzu wurden 100 µL des Puffers mit 1 µL einer 10 mg/ml Stammlösung Proteinase K verwendet.

Tabelle 2: Zusammensetzung für 250 mL Stammlösung Proteinase-K Puffers

Substanz	Gewicht/Volumen
100 mM Tris ph 8,5 (121,14 g/mol)	3,03 g
5 mM EDTA 2H ₂ O (372,24 g/mol)	465,3 mg
0,2% SDS	0,5 g
200 mM NaCl (58,44 g/mol)	0,5 g
ddH ₂ O	250 mL

Am Folgetag wurden nach zehnmütiger Hitzeinaktivierung der Proteinase K bei 95°C, die nicht lysierten Gewebeteile für 10 min bei 13000 U/min zentrifugiert und der Überstand in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß zur DNA-Fällung überführt. Der Überstand wurde mit dem 0,7-fachen Gesamt-Volumen Isopropanol versetzt, mehrfach invertiert und bei 13000 U/min für 25 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen, das DNA-Pellet mit 500 µL 70% Ethanol versetzt und bei 13000 U/min für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet bei RT getrocknet und anschließend wieder in 50 µL nukleasefreiem Wasser rückgelöst.

Reaktionsansatz der Genotypisierungs-PCR

Die PCR-Reaktionen wurden wie folgt angesetzt:

Tabelle 3: Reaktionsansatz der Genotypisierungs-PCR

Substanz	Volumen
gDNA	0,5 µL
Forward und reverse 10 µM Primer	0,3 µL + 0,3 µL
RedTaq	7,5 µL
Nukleasefreies H ₂ O	6,4 µL

Tabelle 4: Primersequenzen zur Bestimmung des Genotyps mittels PCR

Die Bandengröße für die Plin2_418-Primer betrug 463 bp und zeigte ein positives tm1c Allel an. Alle Mäuse im Versuch trugen dieses Allel. Dieses Primer-Paar wurde zur Kontrolle des Wildtyps genutzt. Die Bandengröße für die Cre-Primer betrug 309 bp und zeigte ein positives Alb-Cre Allel an, was im Rahmen des Versuchs als Kontrolle für den erfolgten Knock-Out verwendet wurde.

Primer	Sequenz von 5' nach 3'
Plin2_418_F	CTAGACTCTCCAAATCTCTCCAAAAC
Plin2_418_R:	TAGTGACAGGCAGGGTGAGG
Cre_F	GCACTGATTTTCGACCAGGTT
Cre_R	CCCGGCCAAAACAGGTAGTTA

Tabelle 5: PCR-Programm zur Bestimmung des Plin2-Genotyps

Temperatur [°C]	Dauer [min]
1. 94°C	5:00
2. 94°C	0:30
3. 58°C	0:30
4. 72°C	0:45
Ab Schritt 2 für 34 Zyklen wiederholen	
5. 72°C	5:00
6. 4°C	∞

Agarosegel-Elektrophorese

Für die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte wurden 2% Agarosegele angefertigt, indem 125 ml Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE) und 2,5 g Agarose bei 600 W in der Mikrowelle bis zum Siedepunkt aufkocht wurden. Anschließend wurden die Gele mit 1,25 µl peqGREEN™, einem DNA-interkalierenden Farbstoff, versetzt. Das flüssige Gelmaterial wurde in einen Schlitten, der vorher in einer Gießvorrichtung eingespannt wurde, gegossen und bis zur Aushärtung mit einem 15-Well-Kamm bestückt. Die ausgehärteten Gele wurden in die Elektrophoreselaufkammer gesetzt und mit 1xTAE-Puffer befüllt, sodass das Gel ca. 0,5 cm mit Puffer bedeckt war. Nach Entfernung des Kamms wurden die Proben in die Taschen pipettiert. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 50 V. Hierbei wurden die DNA-Fragmente ihrer Länge nach aufgetrennt, wobei kürzere Fragmente wie in Abb. 5 erkennbar weiter durch die Gel-Matrix wanderten als längere. Als Marker wurden 6 µL 50 bp DNA Ladder N3236 (New England BioLabs) verwendet. Die Fotodokumentation erfolgte mit dem iX 20 Gel-Imager (Intas Science Imaging Instruments GmbH).

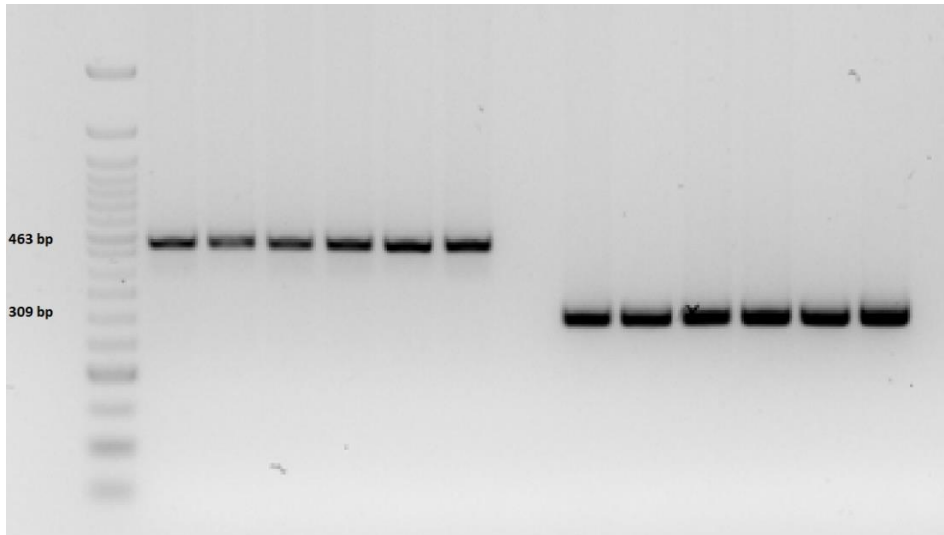


Abbildung 5: Exemplarische Gelelektrophorese der Genotypisierungs-PCR von isolierter gDNA aus den Schwanzspitzen von sechs *Plin2*^{-/-} Mäusen. Signal bei 463 bp: Positives *tm1c* Allel. Signal bei 309 bp: Positives *Alb-Cre* Allel und somit erfolgreicher Knock-Out in allen sechs getesteten Tieren. Verwendeter Marker: 50bp DNA Ladder N3236 von New England BioLabs ®. Die siebte und 14. Gel-Tasche diente der Negativ-Kontrolle.

3.2.3 RNA-Isolierung und cDNA-Synthese

Zur Probengewinnung wurden mit einem Kryotom (Leica CM3050 S) 50 µm Schnitte kryokonservierten Gewebes angefertigt und bei -25°C in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben in Flüssigstickstoff transportiert und bei -80°C gelagert. Die Proben wurden dann mit 1 mL Trizol versetzt und mit einer Pipette durch Auf- und Abpipettieren homogenisiert. Anschließend wurden 200 µL Chloroform zugegeben und 15 sek gemischt. Nach einer Inkubation der Proben für 5 min auf Eis wurden diese 10 min bei 4°C und 11.200 U/min zentrifugiert. Die obere, transparente wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorf-Tube transferiert, mit dem gleichen Volumen Isopropanol versetzt, durch mehrmaliges Invertieren gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend präzipitierte die RNA bei 11.200 U/min für 10 min bei 4°C. Der Überstand wurde entfernt, die Pellets mit 500 µL 80% Ethanol versetzt, mehrfach invertiert und 5 min bei 8800 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Dieser Waschschrift erfolgte zwei Mal. Die Pellets wurden bei RT getrocknet und in RNase freiem Wasser bei 55 °C für 15 min resolubilisiert. Die RNA-Konzentration wurde mit dem Thermofisher Nanodrop™ 1000 photometrisch gemessen. Pro Probe wurden 2 µg RNA mit dem High-Capacity cDNA Reverse Transkriptase Kit von Applied Biosystems™ nach Protokoll des Herstellers in cDNA umgeschrieben.

Tabelle 6: Reaktionsansatz der cDNA-Synthese

Komponente	Volumen
10X RT Puffer	2,0 µL
25X dNTP Mix (100 mM)	0,8 µL
10X RT Random Primer	2,0 µL
MultiScribe™ Reverse Transkriptase	1,0 µL
RNase Inhibitor	1,0 µL
Nucleasefreies Wasser	3,2 µL
2 µg RNA	10 µL (RNA+Nucleasefreies Wasser)

3.2.4 Bestimmung der leberspezifischen Laborparameter

Als Monitoring der Tiere während des Versuchs wurden alle zwei Wochen Glutamat-Pyruvat-Transaminase- (GPT), Glutamat-Oxalacetat-Transaminase- (GOT), γ -Glutamyl-transferasen- (GGT), Gesamtbilirubin- (BIL) Serumwerte, sowie das Gewicht bestimmt. Den Versuchstieren wurde 150 µL Blut abgenommen. Hierzu wurden die Tiere je nach Größe und Gewicht in einem Röhrchen fixiert, ein Hinterbein wurde rasiert und desinfiziert. Mit einer 23G Kanüle wurde die Vena saphena punktiert und das austretende Blut abpipettiert. Mit einer keimarmen Kompresse wurde die Blutung gestillt und die Maus nachbeobachtet. Die Proben wurden erst bei RT 30 min, dann 1 h bei 4°C inkubiert, anschließend bei 4°C 20 min mit 15000 U/min zentrifugiert und der Überstand mit dem Serum in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Tube transferiert. Das gewonnene Serum wurde für die Messung mit sterilem 1x PBS auf ein Gesamtvolumen von 150µL verdünnt und der Verdünnungsfaktor notiert. GPT-, GOT-, GGT- und BIL-Serumwerte wurden mit Hilfe von Reflovet®-Teststreifen von Roche und dem Reflotron® Plus Point-of-Care-System analysiert. Hierzu wurden 32 µL des verdünnten Serums auf einen Teststreifen pipettiert, die Messung durchgeführt und der Messwert notiert. Anhand des individuellen Verdünnungsfaktors wurde die Serumkonzentration der genannten Parameter berechnet.

3.2.5 Organpräparation und Probenentnahme

Die Tiere wurden nach neunwöchiger Diät im Alter von 16 Wochen durch zervikale Dislokation aus dem Versuch genommen. Unmittelbar nach der Feststellung des Todes wurde mit einer 23G Kanüle das rechte Atrium punktiert und über den linken

Ventrikel mit PBS-Puffer perfundiert. Die Lebern wurden herauspräpariert und neben einem Lineal in einer 6 cm Schale mit PBS fotodokumentiert. Für HE- und Spezialfärbungen wurde der Lobus sinister 24 h bei 4°C in Formalin fixiert, in einer aufsteigenden Alkoholreihe inkubiert und abschließend in Paraffin eingebettet. Der Rest der Leber wurde in Flüssigstickstoff kryokonserviert und im Anschluss bei -80°C gelagert. Für Immunblot und quantitative RT-PCR wurden Lobus dexter und Lobus caudatus verwendet.

3.2.6 Histologische Färbungen

3.2.6.1 Hämatoxylin und Eosin Färbung

Die HE-Färbung erfolgte nach dem in Tab. 7 aufgeführten Protokoll der Gewebe-Biobank des Mainzer Instituts für Pathologie.

Tabelle 7: Protokoll der HE-Färbung

Schritt	Reagenzien (REF Nr.)	Zeit [min]
1	Histo-Clear II (Fa.national Diagnostics REF:HS-202)	3:00 bis 3:30
2	Histo-Clear II (Fa.national Diagnostics REF:HS-202)	3:00 bis 3:30
3	Ethanol 96% (SAV Liquid Production GmbH)	0:10
4	Ethanol 96% (SAV Liquid Production GmbH)	2:00
5	Ethanol 70% (SAV Liquid Production GmbH)	2:00
6	Leitungswasser	1:00
8	Dako Hämatoxylin (REF:CS700)	1:30
9	Leitungswasser	1:00
10	Dako Bluingpuffer (REF:CS702)	1:30
11	Leitungswasser	1:30
12	Eth 70% (SAV Liquid Production GmbH)	1:00
13	Dako Eosin (REF:CS701)	1:00
14	Ethanol 96% (SAV Liquid Production GmbH)	1:00
15	Ethanol 99% (SAV Liquid Production GmbH)	1:00
16	Ethanol 99% (SAV Liquid Production GmbH)	1:00
17	Ethanol 99% (SAV Liquid Production GmbH)	1:00
18	Histo-Clear II (Fa.national Diagnostics REF:HS-202)	1:00

3.2.6.2 Gömöri-Versilberung

Die Gömöri-Versilberung erfolgte nach dem in Tab. 8 aufgeführten Protokoll.

Tabelle 8: Protokoll der Gömöri-Versilberung

Schritt	Prozedere
1	15 min Inkubation mit Xylol, dann absteigende Alkoholreihe bis Aqua dest
2	5 min Inkubation mit Kaliumpermanganat-Lösung, dann in Aqua dest spülen
3	5 min Inkubation mit Oxalsäure (bis zur völligen Entfärbung der Präparate), dann mit Aqua dest spülen
4	5 min Inkubation mit Eisenalaun, dann 3-mal mit Aqua dest und 2- bis 3-mal mit Aqua bidest spülen
5	1 sek Inkubation mit Silberlösung, dann mit Aqua bidest spülen
6	2 min Inkubation mit Formalin, dann mit Aqua dest spülen
7	2 min Inkubation mit Natriumthiosulfat, dann mit Aqua dest spülen
8	10 min Inkubation mit Kernechtrot, dann kurz mit Aqua dest spülen, aufsteigende Alkoholreihe, zuletzt Xylol
9	Eindeckelung Entellan (VWR International GmbH, Darmstadt)

3.2.7 Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Färbungen wurden mit dem Dako Autostainer (Dako Cytomation Autostainer plus, Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien) und dem Dako EnVision™ FLEX Nachweissystem (Agilent Technologies) durchgeführt. Die Signalverstärkung erfolgte mit biotinylierten Sekundärantikörpern. Es wurde 150 µl Hämatoxylin eingesetzt, alle anderen Reagenzien in einem Volumen von 100 µl. Im ersten Schritt wurden die formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitte auf den Objektträgern deparaffiniert, indem die Objektträger 20 min im Wärmeschrank bei 66°C sowie im Anschluss 15 min in Xylol inkubierten. Danach wurden die Proben in einer absteigender Alkoholreihe (100%, 96%, 70%) sowie danach in destilliertem Wasser rehydriert. Die Schnitte wurden im Dampfgerar in der vorgeheizten Pufferlösung bei 97°C gekocht, um die hitzeinduzierte Epitopdemaskierung der Antigene zu induzieren („Antigen Retrieval“). Die Vorbehandlung erfolgte abhängig vom verwendeten Antikörper entweder für 35 min

mit Citratpuffer (EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH) bei einem pH von 9 oder für 20 min in Tris/EDTA-Puffer (EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, Low pH) bei einem pH von 6,1. Im folgenden Schritt wurden die Schnitte im Tank mit fließendem Leitungswasser für 7 min heruntergekühlt, für 4 min bei Raumtemperatur (RT) in DAKO-Wasch-Puffer (EnVision™ FLEX Wash Buffer) bei einem pH von 7,6 inkubiert und danach in den Färbeautomaten überführt. Zu Beginn des Färbeprozesses erfolgte die Inaktivierung der endogenen Peroxidase durch 5 min Behandlung mit wasserstoffperoxidhaltigem Phosphatpuffer (EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent). Nach einem Waschschrift mit DAKO-Waschpufferlösung (EnVision™ FLEX Wash Buffer) wurden die Proben mit dem entsprechend verdünnten Primärantikörper (in EnVision™ FLEX Antibody Diluent) inkubiert. Daraufhin erfolgte ein erneuter Waschschrift mit Waschpufferlösung. Anschließend wurden die Schnitte mit dem biotinylierten Sekundärantikörper für 15 min inkubiert. Es erfolgte ein weiterer Waschschrift mit Waschpufferlösung und 20-minütige Inkubation mit einem enzymkonjugiertem Tertiärreagenz (EnVision™ FLEX/HRP), welches wiederum abgewaschen wurde.

Die nach zwei weiteren Spülvorgängen (EnVision™ FLEX Wash Buffer) zugegebene Chromogen-Lösung bestand aus einer mit wasserstoffperoxidhaltiger Substratpufferlösung verdünnten DAB-Lösung (EnVision™ FLEX Working Solution). Nach dem letzten Waschschrift mit EnVision™ FLEX Wash Buffer wurde für 3 min mit Hämatoxylin eine Chromogenkontrastierung durchgeführt. Die gefärbten Schnitte wurden aus dem Färbeautomaten entnommen, 3 min unter fließendes Leitungswasser gehalten und in destilliertes Wasser getaucht. Anschließend wurden diese mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 95%, 100%) behandelt und in Xylol getaucht. Ein Tropfen Eindeckmedium (Entellan, VWR International GmbH, Darmstadt) wurde auf die Schnitte appliziert, eingedeckt und getrocknet. Die fertigen Schnitte wurden mit dem NDP-NanoZoomer-Scanner (Hamamatsu Photonics, Japan) in 40-facher Vergrößerung semi-automatisch eingescannt.

3.2.8 Quantitative mRNA-Analyse durch Realtime-PCR

Für die Erzeugung von 100 mM Primer-Stammlösungen wurden gefriergetrocknete Primer (Sigma-Aldrich®) nach Angaben des Herstellers in nukleasefreiem Wasser gelöst. Für die PCR-Reaktion wurden forward- und reverse-Primer mit nukleasefreiem Wasser auf 5 mM verdünnt. Zur Validierung der Primer wurde für jedes verwendete

Primerpaar eine Standardkurve erstellt und aus der Steigung der Kurve die Primereffizienz bestimmt. Hierfür wurde zunächst eine cDNA-Verdünnungsreihe hergestellt. 20 µL isolierte cDNA (siehe Abschnitt 3.2.3) einer isolierten Mäuseleber wurden mit 180 µL nukleasefreiem Wasser verdünnt, was als Verdünnungsfaktor 1:1 definiert wurde. Hieraus wurden weitere Verdünnungen angefertigt: 1:5, 1:10, 1:50, 1:100, 1:500, 1:1000 und 1:5000. Die PCR-Reaktion wurde für jede Verdünnung in Triplikaten wie in Tab. 9 angegeben durchgeführt (1 µL verdünnte cDNA und 9 µL Mastermix).

Table 9: Mastermix RT-PCR

Reagenz	Volumen
gemischter for+rev Primer 0,5 µM	0,5 µL
SYBR® Green	5 µL
nukleasefreies Wasser	3,5 µL
cDNA	1 µL

Die Realtime-PCR wurde mit dem QuantStudio™ 3 und der dazugehörigen Software „QuantStudio™ Design & Analysis“ von Applied Biosystems durchgeführt und analysiert. Die C_T-Werte wurden gegen die unterschiedlichen cDNA-Verdünnungen aufgetragen und eine Regressionsgrade durch die Datenpunkte gelegt. Über die Steigung der Geraden und die Streuung der Datenpunkte entlang der Geraden berechnet die Software die Primereffizienz sowie die Streuung der Replikate. (Vgl. Tab. 10). Die Primereffizienz sollte hierbei in einem Bereich von 100±10 % liegen. Um die Daten zu normalisieren, wurde der Δ-C_T-Wert aus der Differenz des C_T-Wertes des Ziel- und des Referenzgens (β2m-RNA) berechnet. Die relative Expression (RE) wurde mit der Formel $RE=2^{-\Delta C_T}$ berechnet.

Tabelle 10: Real-Time PCR Primer zur quantitativen Bestimmung des mRNA-Gehalts Primer ohne Referenz wurden selbst entworfen.

Gen	Sequenz von 5' nach 3'	Effizienz [%]	Gen	Sequenz von 5' nach 3'	Effizienz [%]
Plin2 (121)	For: CTGTCTACCAAGCTCTGCTC Rev: CGATGCTTCTCTTCCACTCC	90,62	β_2m (122)	For: CATGGCTCGCTCGGTGAC Rev: CAGTTCAGTATGTTCCGGCTTCC	87,87
Plin3 (123)	For: CTGAGAAAGGCGTCAAGACC Rev: CCATTTCTTGAGCCCCAGAC	97,94	Stat3 (124)	For: ACCTCCAGGACGACTTTGAT Rev: TGTCTTCTGCACGTACTIONCA	91,89
Plin4	For: TCCTGCTCTGAGGGACCCTT Rev: TCTTGCCTTTGGATTTGGGG	93,34	α-SMA (125)	For: ATGCTCCCAGGGCTGTTTT Rev: TTCCAACCATTACTCCCTGATGT	99,62
Plin5 (126)	For: TGTCAGTGCTTACAACCTCGG Rev: CAGGGCACAGGTAGTCACAC	91,51	Tnf-α (127)	For: GGCAGGTTCTGTCCCTTTCA Rev: CTGTGCTCATGGTGTCTTTTCTG	92,43
Atgl (128)	For: CAACGCCACTCACATCTACGG Rev: TCACCAGTTGAAGGAGGGAT	94,48	Ptgs2 (129)	For: CAGACAACATAAACTGCGCCTT Rev: GATACACCTCTCCACCAATGACC	111,70
Hsl (128)	For: GGCTCACAGTTACCATCTCACC Rev: GAGTACCTTGCTGTCCTGTCC	102,54	Ppary (71)	For: CGGTTTCAGAAGTGCCTTG Rev: GGTTCAGCTGGTCGATATCAC	99,71
Mgll (130)	For: CAGAGAGGCCAACCTACTTTT Rev: ATGCGCCCCAAGGTCATATTT	99,77	Ppara	For: TGCCCTGAACATCGAGTGTCAAT Rev: TCGTACACCAGCTTCAGCCGAATA	93,71
Abhd5 (131)	For: ATCTTTGGAGCCCGATCCT Rev: CTTCTGGCTGATCTGCATACAC	107,53	Srebf1 (71)	For: ACACTGGCCGAGATGTGCGA ACT Rev: GGTTGTTGATGAGCTGGAGC ATGT	102,06
Chop (71)	For: AGTCCTGTCCTCAGATGAAATTGC Rev: GCAGGGTCAAGAGTAGTGAAGTT	93,31	F4/80 (132)	For: AGCACATCCAGCCAAAG CA Rev: CCATCTCCCATCCTCCA CAT	95,24
			Perk (133)	For: TCTTGGTTGGGTCTGATGA AT Rev: GATGTTCTTGCTGTAGTGG GGG	96,24

3.2.9 Proteinanalyse durch Immunblot

Für die Proteinisolierung wurden aus murinem Lebergewebe mit dem Kryotom (Leica CM3050 S) 80 5 µm Schnitte angefertigt und in Homogenisator tubes (Precellys® Lysing Kits von Bertin Technologies) überführt. Die Schnitte wurden mit 600 µL CO-IP Puffer + 1% Triton + 6 µL (1:100) Protease/Phosphatase Inhibitor versetzt und anschließend zwei Mal für je 20 sek bei maximaler Intensität in einem Gewebhomogenisator (Precellys® 24, Bertin Technologies, Saint Aubin, Frankreich) homogenisiert. Das Gewebelysat wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und 5 min bei 4°C und 12.000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß transferiert und das Pellet verworfen.

3.2.10 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford wurde zunächst eine Eichreihe mit gereinigtem bovinem Serum-Albumin (BSA) der Konzentration 10 mg/ml pipettiert: 0; 2,5; 5; 7,5; 10 und 15 µL. Sowohl das Eichprotein als auch 3 µL des Lysats der Proben unbekannter Konzentration wurden mit verdünnter Bradford-Lösung (1:5 in 1 mL in ddH₂O) versetzt, durch Vortexen gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. 200 µl jedes Ansatzes wurden in eine 96-Well Platte pipettiert und die Absorption mit dem Tecan Spark 10M (Tecan Group, Männedorf, Schweiz) spektrometrisch gemessen. Mit Excel (Microsoft, Redmond, USA) wurde eine Gerade der Messwerte des Eichproteins extrapoliert. Die Geradengleichung wurde berechnet und umgeformt, um über Absorption der Proben die unbekannte Proteinkonzentration zu ermitteln.

3.2.11 SDS-PAGE

Für den Nachweis und die Analyse unterschiedlicher Proteine wurden diese mittels Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (engl. SDS-PAGE) unabhängig von ihrer elektrischen Ladung nach Molekulargewicht aufgetrennt (134, 135). Hierzu wurde zwischen 2 Gelplatten, hiervon eine der Glasplatten mit integriertem Abstandshalter, ein Gel gegossen. Die Glasplatten wurden hierfür mit einer Klemme fixiert und in einem Gießständer auf einer Gussständerdichtung fixiert.

Jedes der Gele besteht aus einem kurzen Sammel- und einem deutlich höheren Trenngel (Tab. 11). Ammonium-Persulfat (APS) und Tetramethylethylendiamin (TEMED) wurden jeweils zuletzt hinzugegeben und gemischt, um die Polymerisationsreaktion zu initiieren. Zuerst wurde der Ansatz für das Trenngel

zwischen zwei fixierte Glasplatten pipettiert und mit 500 µl Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde Isopropanol mit ddH₂O heruntergespült und mit Filterpapier das restliche ddH₂O entfernt. Nun wurde die Reaktion für das Sammelgel initiiert, auf die Trenngelschicht pipettiert und ein 10-Well (Volumen: 50 µL) oder 15-Well (Volumen: 30 µL) Kamm eingesetzt. Die angefertigten Gele konnten in befeuchtetem Zellstoff-Papier einige Tage im Kühlschrank gelagert werden. 25 µg Protein wurden mit Lysis-Puffer und 6-fach Ladepuffer auf ein Gesamtvolumen von 25 µL eingestellt.

Tabelle 11: Zusammensetzung der Acrylamid-Gele für Immunblot.

	10% Trenngel	Sammelgel
ddH ₂ O	2 mL	1,15 mL
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 (Trenngel); 0,5 M Tris-HCl pH 6,8 (Sammelgel)	1,3 mL	0,5 mL
30% Acrylamidmix	1,7 mL	0,33 mL
10% SDS	50 µL	20 µL
10% APS	50 µL	20 µL
TEMED	2 µL	2 µL

Die auspolymerisierten Gele wurden in die Module der Laufkammer eingespannt, in die Laufkammer gesetzt und die Kammer mit 1x SDS-Laufpuffer befüllt. Nach der Entnahme der Kämmen aus den Gelen wurden die Taschen mit Laufpuffer gespült. Vor der Beladung der Gele wurden die Proben 10 min bei 95°C hitzedenaturiert und in die Taschen des Sammelgels neben einen Proteinmarker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder) geladen. Zunächst wurde eine Spannung von 60 V angelegt, sodass die Proben adäquat fokussieren konnten. Beim Erreichen der Lauffront von Sammel/Trenngel-Grenze wurde die Spannung auf 100 V erhöht. Nach dem Herauslaufen der Lauffront am unteren Ende des Gels wurde der Lauf gestoppt. Die Glasplatten wurden mit einem Kassettenöffner geöffnet und das Sammelgel entfernt.

Für den Transfer der Proteine aus dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran wurde der Deckel der Kassette des Trans-Blot Turbo-Transfersystem abgenommen und auf die Bodenelektrode die Stapel aus drei in Semidry-Blot-Puffer getränkten Filterpapieren, Nitrozellulosemembran, das blasenfreie Trenngel, welches vorher in Transferpuffer äquilibriert wurde und drei weiteren in Puffer getränkten Filterpapieren gelegt.

Luftblasen wurde mittels Transferstapelwalze aus dem Filterpapier entfernt und überschüssiger Puffer mit einer Pipette entfernt. Die Kassette wurde mit dem Deckel der Elektrodenplatte verschlossen. Der Transfer der negativ geladenen Proteine vom Gel auf die anodenseitige Nitrocellulose-Membran erfolgte für 30 min bei einer Stromstärke von 1 A entlang eines senkrecht zum Gel bestehenden Spannungsgradienten von 25 V.

3.2.12 Ponceaufärbung

Der Transfer der Proteine auf die Nitrozellulose-Membran wurde mittels Ponceaufärbung überprüft. Hierzu wurden die Membranen nach dem Transfer mit Ponceau S überschichtet, 10 sek geschwenkt und im Anschluss mit VE-Wasser 3x gewaschen. Die aufgetrennten Proteine auf der Nitrozellulose-Membran konnten so unspezifisch angefärbt werden. So konnte einerseits die Transfereffizienz qualitativ überprüft werden, andererseits irrelevante Membranteile abgeschnitten werden. Nach Zuschnitt und Beschriftung wurden die Membranen mit TBST (TBS + 0,05% Tween 20) wieder vollständig entfärbt.

3.2.13 Entwickeln von Immunblots

Die Blotmembran wurde ü.N. in TBS + 0,05% Tween-20 + 5% (w/v) Magermilchpulver (MMP) bei 4°C auf dem Wippschüttler inkubiert, um unspezifische Antikörperbindungsstellen zu blockieren. Die Primär- und Sekundärantikörper wurden wie im Methodenteil angegeben, in o.g. MMP-TBST-Lösung (5% MMP) verdünnt. Die Nitrozellulose-Membran wurde mit 3 mL verdünntem Primär-Antikörper in einem 50 ml Falcon für 1 h auf einem Rollenmischer bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Primär-Antikörper entfernt und die Nitrozellulose-Membran drei Mal für je 10 min mit 5ml TBST auf einem Rollenmischer gewaschen. Im nächsten Schritt wurde ein gegen den Fc-Teil des Primär-Antikörpers der Wirtsspezies gerichteter Sekundär-Antikörper 1:3000 in MMP-TBST-Lösung (5% MMP) verdünnt. Dieser war mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase (engl. HRP) gekoppelt. Die Nitrozellulose-Membranen wurden eine Stunde mit dem Sekundär-Antikörper bei RT auf einem Rollmischer inkubiert. Der Sekundär-Antikörper wurde entfernt und die Nitrozellulose-Membran drei Mal für je 10 min mit 5ml TBST auf dem Rollenmischer gewaschen. Unmittelbar vor der Detektion wurde die Nitrozellulose-Membranen für 1 min unter Lichtabschluss in Elektrochemolumineszenz (ECL)-Entwicklerlösung inkubiert (Tab. 12). Die antikörpergebundene HRP katalysierte die ECL-Reaktion. Anschließend wurden das Chemie-

lumineszenz-Signal der Immunblots mit Hilfe des Chemiluminescence Imaging Systems Fusion Solo S von Vilber® detektiert und dokumentiert.

Tabelle 12: Zusammensetzung der ECL-Entwicklerlösung.

Substanz	Volumen
0,1M Tris-Hcl pH 8,5	10mL
Luminol (250 mM) in DMSO	50µL
Cumarinsäure (90 mM) in DMSO	25µL
Wasserstoffperoxid (30%) (w/w) in H ₂ O	4µL

Die Rohdaten wurden densitometrisch mit ImageJ ausgewertet. Hierzu wurde der gemittelte Schwarzwert (SW) jeder Bande innerhalb eines Rechtecks definierter Größe, subtrahiert vom SW eines gleichgroßen Rechtecks, welches als Hintergrund definiert wurde, gemessen. Für jeden Immunblot wurde eine GAPDH-Ladekontrolle entwickelt. Durch Quotienten-Bildung (Spezifischer-Antikörper/GAPDH-Signal) konnte eine Beeinflussung des Read-Outs durch unterschiedliche Lademengen ausgeschlossen und Vergleichbarkeit gewährleistet werden.

3.2.14 Diäten

Die Versuchstiere wurden in drei Diätgruppen unterteilt, die mit Spezialdiäten der (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, DE) gefüttert wurden. Die Tiere wurden *ad libitum* gefüttert und hatten freien Wasserzugang. Die genaue Nährstoffzusammensetzung findet sich im Anhang in Tab. 16.

Normal Chow Diet (NCD)

Die NCD wurde zur Vergleichskontrolle verwendet und entspricht einer normokalorischen ausgewogenen Diät. Es handelte sich hierbei um das Haltungsfutter des Translational Animal Research Centers (TARC) der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz.

High Fat Diet (HFD)

Zur Induktion einer blanden Steatose ohne Fibrose wurde eine HFD verwendet. 60% der Gesamt-Kilokalorien werden so durch Fett gedeckt. Das Nährstoff-Überangebot modelliert eine Überernährung bei gleichzeitiger physikalischer Inaktivität.

Cholin Defiziente L-Aminosäure-definierte Diät (CDAA)

Zur Induktion einer Hepatitis wurde eine CDAA-Diät gewählt. Diese verursacht gegenüber der Methionin defizienten Diät (MCD) keinen Gewichtsverlust, sodass eine Langzeitfütterung möglich ist (136). Das mangelnde Cholin beeinträchtigt die Phosphatidylcholin-Synthese, den Komplex 1 der mitochondrialen Atmungskette und erhöht durch Akkumulation von Wasserstoffperoxid den oxidativen Stress, was zu Entzündung, Fibrose und bei ausreichender Exposition zum HCC führt (137).

3.2.15 Statistische Auswertung

Die Daten wurden mit GraphPad Prism Version 9.4.0 (673) von GraphPad Software, LLC analysiert. Zunächst wurde der Shapiro-Wilk-Test auf alle Datensätze angewandt, um zu prüfen, ob eine Gaußsche Normalverteilung vorlag. Normalverteilte Daten mit sich statistisch nicht signifikant unterscheidenden Standardabweichung, wurden mit dem Student's t-Test für ungepaarte Stichproben verglichen. Zeigten die Mittelwerte signifikante Unterschiede der Standardabweichungen, wurde die Welch-Korrektur durchgeführt. Nicht normalverteilte Daten wurden mit dem nichtparametrischen Wilcoxon-Mann-Whitney-Test verglichen. P-Werte < 0.05 (*), p < 0.01 (**), p < 0.001 (***), p < 0.0001 (****) wurden als signifikant und p- Werte > 0.05 als nicht signifikant (n.s.) betrachtet. Die Erstellung der Grafiken erfolgte mit Microsoft® Excel und der Adobe® Photoshop CS5.

3.2.16 Tierschutz und Ethik

Alle Tierversuche wurden vom Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz genehmigt (Referenznummer: 23177-07/G18-1-014). Der Titel des Ethikantrags lautet: „Auswirkungen des Fehlens von Perilipin 2 für Steatohepatitis und Hepatokarzinogenese in der Maus“ (Antragstellende: Univ.-Prof. Dr. med. Beate Katharina Straub, Dr. phil nat. Hagen Roland Witzel).

4 Ergebnisse

4.1 Verifizierung der hepatozyten-spezifischen Perilipin-2 Deletion im Mausmodell

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die hepatozyten-spezifische Rolle von Perilipin 2 hinsichtlich Steatose und Steatohepatitis untersucht werden. Hierzu wurde Perilipin 2 spezifisch in den Hepatozyten der Versuchsmäuse deletiert. Der Genotyp der Versuchstiere wurde im Vorfeld über Biopsien der Schwanzspitze ermittelt und die Tiere im Anschluss dem jeweiligen Versuchsteil zugeführt. Die durch die *Cre*-Rekombinase vermittelte Exzision des durch *loxP* Stellen flankierten, kritischen Exons 4 von *Plin2*, kann jedoch nur in der Leber nachgewiesen werden, da die Rekombinase unter der Kontrolle des hepatozyten-spezifischen *Alb*-Promotors exprimiert wird. Für den Nachweis des hepatozyten-spezifischen Knock-Outs von *Plin2* wurde die Expression von Perilipin 2 auf Proteinebene mittels Immunblot, auf mRNA-Ebene über quantitativer Real-Time PCR und durch immunhistochemische Färbungen validiert. Die Ergebnisse wurden statistisch innerhalb der Mäuse gleichen Genotyps, Versuchswoche und Diät verglichen. Auf diese konstanten Parameter beziehen sich die tiefgestellten Indices der im Folgenden angegebenen p-Werte.

Die *Plin2*-mRNA-Expression in Abb. 6A zeigte bei *Plin2*^{-/-} gegenüber *Plin2*^{fl/fl} Mäusen eine Reduktion um 91±6% (vgl. Absatz 4.5). Auf Proteinebene wurde die Perilipin 2-Expression mittels Immunblot (Abb. 6B) und immunhistochemischer Färbung sowohl mit einem N- als auch C-terminalen Antikörper überprüft (Abb. 6C), um die Entstehung etwaiger verkürzter Proteinvarianten auszuschließen (116). Die densitometrische Auswertung der Immunblots ergab bei *Plin2*^{-/-} verglichen mit *Plin2*^{fl/fl} Mäusen eine Reduktion der Perilipin 2-Expression um 48% unter der Verwendung des N-terminalen Antikörpers. Unter Verwendung des C-terminalen Antikörpers betrug die Reduktion 91%. Immunhistochemische Färbungen von Leberschnitten unter der Verwendung von Antikörpern gegen den C- oder N-Terminus von Perilipin 2 zeigten bei *Plin2*^{fl/fl} Mäusen ein panlobuläres Färbungsmuster. Die HSCs waren bei *Plin2*^{fl/fl} Mäusen kräftiger angefärbt als die Hepatozyten. Im Gegensatz dazu war die Perilipin 2-Färbung bei *Plin2*^{-/-} Mäusen überwiegend negativ. Kräftig angefärbt waren lediglich HSCs, welche nicht vom Perilipin 2-Knock-Out betroffen sind. Die Färbeintensität des C-terminalen Antikörpers war generell schwächer.

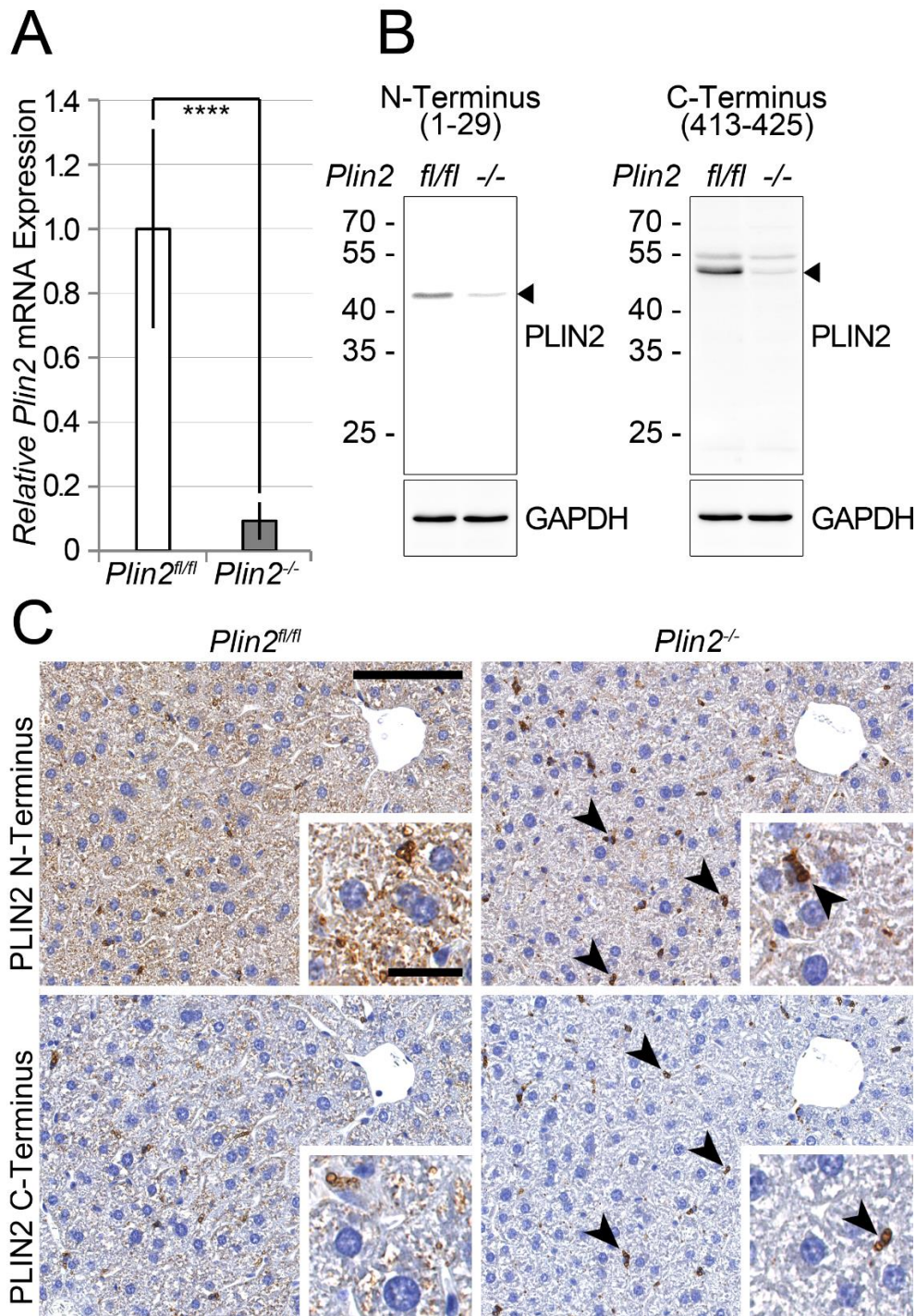


Abbildung 6: Validierung des Plin2-Knock-Outs im Mausmodell.

(A) Expressionsanalyse von Plin2 mittels Real-time PCR in Mauslebern von Plin2^{fl/fl} und Plin2^{-/-} Mäusen im Alter von 9 Wochen gemittelt über alle Diäten. $n_{fl/fl}=47$; $n_{-/-}=46$. $p_{NCD}= 1,93E-08$; $p_{HFD}= 5,34E-09$; $p_{CDAA}= 4,97E-08$. (B) Immunoblotanalyse von Plin2^{fl/fl} und Plin2^{-/-} Leberlysaten unter der Verwendung von Perilipin 2 Antikörpern gegen den C- und N-terminus von Perilipin 2. Zur Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet. Pfeilspitzen zeigen lange bzw. kurze Form von Perilipin 2; Größenmarker in kDa. Zur densitometrischen Quantifizierung wurden repräsentative Proben ausgewählt und gemeinsam in einem Immunblot entwickelt. Die densitometrischen Messwerte des jeweils untersuchten Proteins wurden auf den zugehörigen Messwert für Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) normalisiert. (C) Immunhistochemie von Plin2^{fl/fl} und Plin2^{-/-} Mäusen in Lebergewebe mit Antikörpern gegen den N- und C-Terminus von Perilipin 2. Die Pfeilspitzen zeigen eine starke Perilipin 2 Färbung von Perilipin 2 in HSCs. P-Werte < 0.05 (*), p < 0.01 (**), p < 0.001 (***), p < 0.0001 (****) wurden als signifikant, p-Werte > 0.05 als nicht signifikant (n.s.) betrachtet. Es wurde ein Students t-Test für zwei Stichproben unter Annahme unterschiedlicher Varianzen durchgeführt. In den immunhistochemischen Abbildungen markieren Pfeile Perilipin 2 positive HSCs. Maßstab: 50 μ m und 100 μ m

4.2 Auswirkungen von Diät und Genotyp auf das Körpergewicht

Für die Ermittlung der Auswirkungen eines hepatozyten-spezifischen Verlusts von Perilipin 2 auf die Entstehung einer Diät-induzierten Steatose wurde zunächst das Gewicht der Versuchstiere über einen Zeitraum von 9 Wochen zu Versuchsbeginn, dann alle zwei Wochen, sowie am Versuchsende (0, 2, 4, 6, 8 und 9 Wochen) dokumentiert. (Vgl. Abb. 7 zur durchschnittlichen Gewichtszunahme sowie Abb. 8 zur absoluten Gewichtszunahme im 2-Wochen Intervall in Bezug zum Startgewicht). Alle Gruppen zeigten eine positive Gewichtsentwicklung.

Bei der absoluten Gewichtszunahme am Versuchsende nahmen unter HFD sowohl männliche *Plin2*^{-/-} als auch *Plin2*^{fl/fl} Mäuse signifikant stärker zu als unter NCD ($p_{fl/fl} < 0,0001$; $p_{-/-} = 0,0027$). CDAA-Diät führte zu keiner signifikanten Gewichtsänderung bei männlichen *Plin2*^{-/-} und *Plin2*^{fl/fl} Mäusen gegenüber NCD ($p_{fl/fl} = 0,099$; $p_{-/-} = 0,59$). Weibliche *Plin2*^{fl/fl} Mäuse unter HFD unterschieden sich hinsichtlich der Gewichtszunahme nicht signifikant gegenüber der NCD-Vergleichsgruppe ($p_{fl/fl} = 0,28$). Die Gewichtszunahme weiblicher *Plin2*^{-/-} Mäuse war unter HFD bis zum Versuchsende signifikant höher als unter NCD ($p_{-/-} = 0,0023$). Weibliche *Plin2*^{fl/fl} Mäuse unter CDAA-Diät nahmen signifikant stärker zu als unter NCD, weibliche *Plin2*^{-/-} Mäuse dagegen nicht ($p_{fl/fl} = 0,013$; $p_{-/-} = 0,056$).

Männliche *Plin2*^{-/-} Mäuse zeigten unter NCD ab der zweiten Versuchswoche eine signifikant höhere Gewichtszunahme als *Plin2*^{fl/fl} Mäuse, weibliche *Plin2*^{-/-} Mäuse über den gesamten Versuchszeitraum nicht. Unter HFD nahmen männliche *Plin2*^{fl/fl} und *Plin2*^{-/-} Mäuse über den gesamten Versuchszeitraum ohne signifikante Unterschiede gleich stark zu. Weibliche *Plin2*^{-/-} Mäuse zeigten jedoch in Woche 2, 6, 8 und 9 eine signifikant höhere Gewichtszunahme als *Plin2*^{fl/fl} unter HFD. CDAA-Diät führte bei männlichen *Plin2*^{-/-} Mäusen ab der zweiten Versuchswoche zu einer signifikant höheren Gewichtszunahme als bei *Plin2*^{fl/fl} Mäusen unter der gleichen Diät. Bei CDAA-Diät gefütterten Weibchen waren keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Gewichtszunahme zwischen *Plin2*^{fl/fl} und *Plin2*^{-/-} Genotyp zu beobachten.

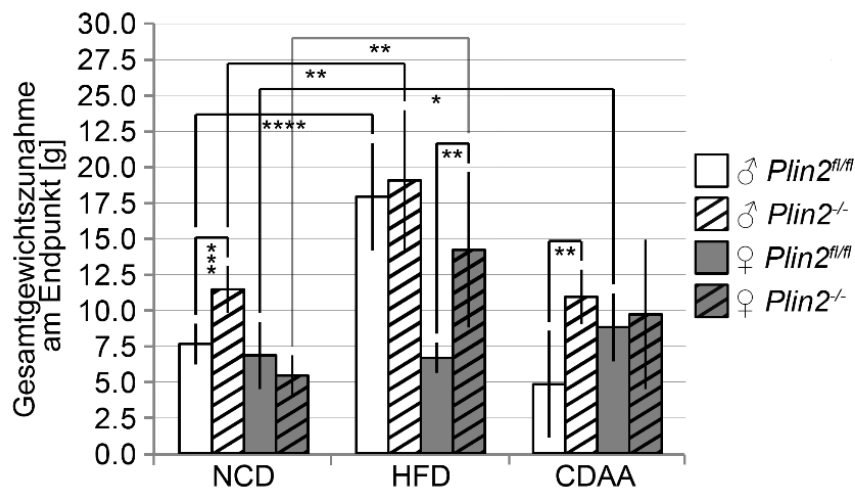


Abbildung 7: Genotyp- und Diät-abhängige Gewichtsänderung. Säulendiagramm der absoluten Gewichtszunahme zu Versuchsende in Gramm aufgeteilt nach Geschlecht, Diät und Genotyp. P-Werte < 0.05 (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***), $p < 0.0001$ (****) wurden als signifikant, p -Werte > 0.05 als nicht signifikant (n.s.) betrachtet. Es wurde, sofern statistisch erlaubt ein Students t-Test für zwei Stichproben ggf. mit Welch-Korrektur durchgeführt. Nicht parametrische Daten wurden mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test verglichen.

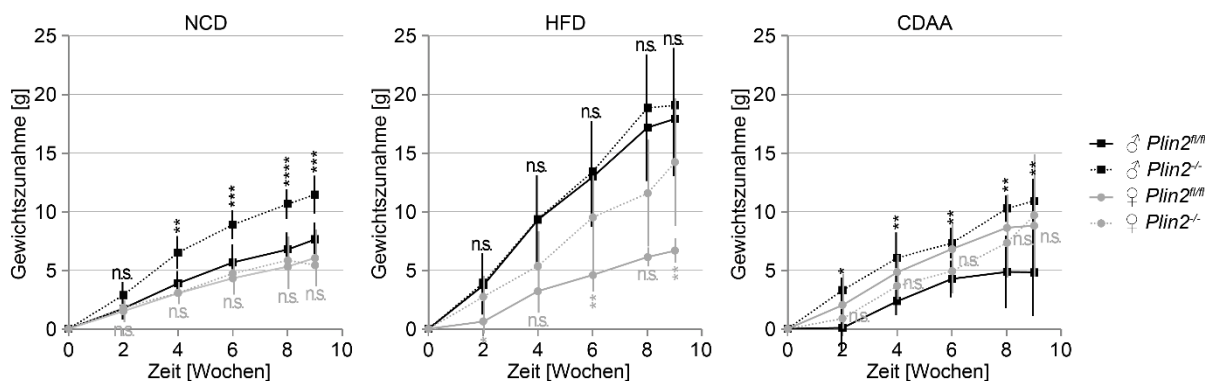


Abbildung 8: Stärkere Gewichtszunahme in *Plin2^{-/-}* Mäusen. Die Gewichtszunahme wurde bei 0, 2, 4, 6, 8 und 9 Wochen nach Versuchsbeginn gemessen. Diese Darstellung wurde gewählt, da das absolute Gewicht bei Versuchsbeginn breit streute. Die Daten wurden nach Geschlecht, Diät und Genotyp aufgeteilt. P-Werte < 0.05 (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***), $p < 0.0001$ (****) wurden als signifikant, p -Werte > 0.05 als nicht signifikant (n.s.) betrachtet. Es wurde, sofern statistisch erlaubt ein Students t-Test für zwei Stichproben ggf. mit Welch-Korrektur durchgeführt. Nicht parametrische Daten wurden mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test verglichen.

4.3 Veränderung der Serum-Parameter im Versuchszeitraum

Um zwischen den beiden *Plin2*-Genotypen bzw. zwischen den verabreichten Diäten induzierte Leberschädigung während des laufenden Versuchs zu ermitteln, wurde zwei-wöchentlich venöses Blut entnommen und analysiert. Im Serum bestimmt wurden: Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT), Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT), γ -Glutamyltransferase (GGT) und Gesamtbilirubin (BIL). Die GGT-Messung konnte nicht ausgewertet werden, da die Konzentrationen im Serum nur bei drei Tieren jeweils einmalig die Messgrenze von 5 U/l überschritten, sodass die Messung aufgrund zu geringer Blutmenge nicht möglich war. Gleiches galt für die Bilirubin-Werte, die nur einmal knapp die Messgrenze von 0,5 mg/dl überschritt. Die GOT-

Werte unter NCD waren über den gesamten Versuchszeitraum mit geringer Varianz konstant. Unter NCD zeigten hierbei männliche *Plin2^{fl/fl}* Mäuse gegenüber *Plin2^{-/-}* Mäusen von Woche 4 bis 8 signifikant erhöhte GOT-Werte ($p_{w4}=0,012$; $p_{w6}=0,040$, $p_{w8}=0,026$). Bei weiblichen Tieren unter gleicher Diät waren derartige Unterschiede nicht zu beobachten. Unter HFD unterschieden sich die GOT-Werte bei männlichen Versuchstieren bezüglich des Genotyps nicht. Weibliche *Plin2^{-/-}* Mäuse entwickelten unter HFD nur in Woche 8 signifikant höhere GOT-Werte als der weibliche Wildtyp ($p_{w8}=0,031$). Die Serumleberwerte unter CDAA-Diät unterlagen insbesondere bei den männlichen Tieren großen Schwankungen. Nur in Versuchswoche 6 und 8 konnten bei männlichen *Plin2^{-/-}* Mäusen signifikant erhöhte GOT-Werte gegenüber *Plin2^{fl/fl}* Mäusen gemessen werden ($p_{w6}=0,037$, $p_{w8}=0,038$). Bei weiblichen Mäusen unter CDAA-Diät zeigten sich in Woche 4 und 9 ($p_{w4}=0,0047$, $p_{w9}=0,021$) signifikant niedrigere GOT-Werte in *Plin2^{-/-}* Mäusen.

Unter NCD zeigten die GPT-Werte über den gesamten Versuchszeitraum nur geringe Auffälligkeiten. Auch unter HFD zeigten sich kaum signifikante Änderungen. Männliche *Plin2^{-/-}* Mäuse zeigten unter HFD nur in Woche 2 signifikant höhere GPT-Werte als *Plin2^{fl/fl}*-Mäuse ($p_{w2}=0,0085$). Die einzige signifikante GPT-Wert-Erhöpfung unter HFD zeigten weibliche *Plin2^{-/-}* Mäuse in Woche 6 und 8 ($p_{w6}=0,013$; $p_{w8}=0,029$). Unter CDAA-Diät war der GPT-Wert männlicher *Plin2^{-/-}* Mäuse 4 Wochen nach Versuchsbeginn bis zum Versuchsende stets signifikant höher als in der *Plin2^{fl/fl}* Vergleichsgruppe ($p_{w4}=0,012$; $p_{w6}=0,0028$; $p_{w8}=0,019$; $p_{w9}=0,023$), während sich bei Weibchen nur in Woche 4 eine signifikante Erhöhung in *Plin2^{-/-}* gegenüber *Plin2^{fl/fl}* Mäusen zeigte ($p_{w4}=0,015$).

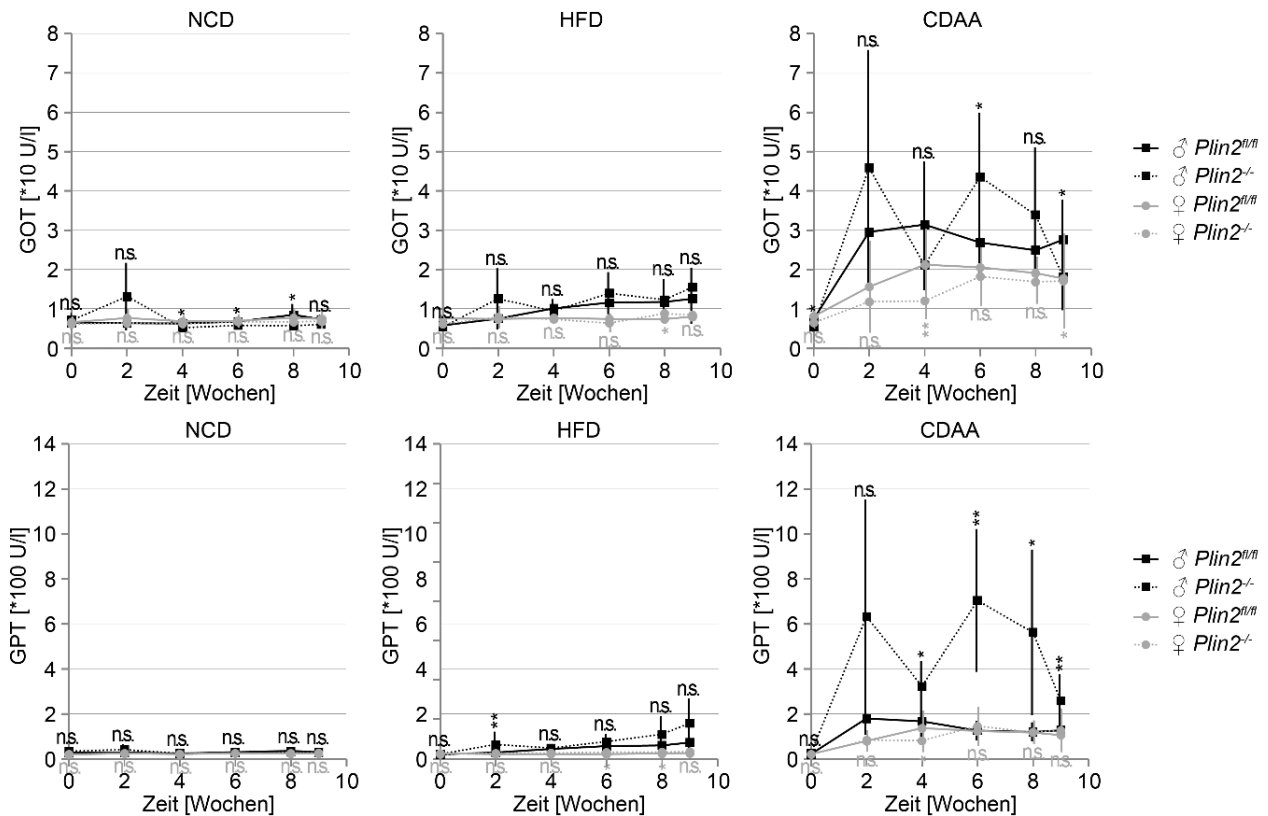


Abbildung 9: Geringe Zunahme der GOT- und GPT-Werte in *Plin2*^{-/-} Mäusen. Die Entwicklung der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) und Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) Werte gemessen bei 0, 2, 4, 6, 8 und 9 Wochen nach Versuchsbeginn ist aufgetragen. Die Daten wurden nach Geschlecht, Diät und Genotyp aufgeteilt. P-Werte < 0.05 (*), p < 0.01 (**), p < 0.001 (***), p < 0.0001 (****) wurden als signifikant, p-Werte > 0.05 als nicht signifikant (n.s.) betrachtet. Verteilungsabhängig wurde ein Students t-Test für zwei Stichproben unter Annahme unterschiedlicher oder gleicher Varianzen durchgeführt. Sofern statistisch erlaubt, wurde ein Students t-Test für zwei Stichproben ggf. mit Welch-Korrektur durchgeführt. Nicht parametrische Daten wurden mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test verglichen.

4.4 Steatose, Aktivierungsgrad, Immuninfiltration und Zelluntergänge in *Plin2*^{fl/fl} und *Plin2*^{-/-} Mäusen

4.4.1 Histologische Analyse

Um *Plin2*-Genotyp und diätinduzierte Veränderungen innerhalb des Lebergewebes zu analysieren, wurde den Versuchstieren am Versuchsende die Leber entnommen und histopathologisch untersucht. Die histologische Aufarbeitung im HE-Schnitt zeigte bei NCD gefütterten Mäusen keine Leberverfettung (0-5%) ohne signifikante Unterschiede bezüglich des Geschlechts oder des Genotyps. Männliche HFD gefütterte *Plin2*^{fl/fl} Mäuse entwickelten hingegen Steatose. Überraschenderweise entwickelte sich diese aber ebenfalls in *Plin2*^{-/-} Mäusen, sodass unter HFD kein signifikanter Unterschied zwischen männlichen *Plin2*^{fl/fl} (36±25,14%) und *Plin2*^{-/-} (37,5±34,12%) Mäusen festzustellen war. Unter HFD entwickelte sich in männlichen *Plin2*^{fl/fl} und *Plin2*^{-/-} Mäusen eine Steatose betont in Zone 2 und 3. In HFD gefütterten Weibchen beider Genotypen war keine Steatose nachweisbar (*Plin2*^{fl/fl} 4,83±3,82%;

Plin2^{-/-} 2,14±3,93%; $p_{\text{HFD}}=0,24$). Hier war kein Unterschied zu NCD gefütterten Weibchen festzustellen. CDAA-Diät induzierte in Männchen beider Genotypen eine ausgeprägte panlobuläre Steatose, sodass kein signifikanter Unterschied bezüglich des Steatosegrades festzustellen war (*Plin2*^{fl/fl} 70,0±7,64%; *Plin2*^{-/-} 70,71±4,5%). Im Gegensatz zu den Männchen zeigte sich bei Weibchen unter CDAA-Diät ein deutlicher Unterschied zwischen den Genotypen. Weibliche *Plin2*^{fl/fl} Mäuse wiesen mit 78,75±8,35% einen signifikant höheren Steatosegrad auf als weibliche *Plin2*^{-/-} Mäuse mit 54,38±12,94% ($p_{\text{CDAA}}=0,00076$) (Vgl. Abb. 10).

Kennzeichen einer Steatohepatitis sind das Auftreten sogenannter ballonierter Hepatozyten sowie von Zelluntergängen, die maßgeblich mit der zellulären Schädigung korrelieren, während sich die entzündliche Aktivität unter anderem in der Anzahl und Art der infiltrierenden Immunzellen widerspiegelt (16, 138). Immunzellen bilden hierbei häufig Aggregate, sogenannte Foci (Vgl. Abb. 12). Als Immunzellfoci wurden Konglomerate mit 10 oder mehr Immunzellen gewertet. Unter NCD waren unabhängig vom untersuchten Genotyp keine ballonierten Hepatozyten nachweisbar. Unter HFD zeigten männliche *Plin2*^{fl/fl} Mäuse dagegen eine signifikant ausgeprägtere Ballonierung als *Plin2*^{-/-} Mäuse (Score: *Plin2*^{fl/fl}= 0,5±0,53; *Plin2*^{-/-}=0,0±0,00; $p_{\text{HFD}}=0,0359$; Abb. 9). Unter CDAA-Diät zeigte sich ein ähnliches Bild wie unter HFD: Männliche *Plin2*^{fl/fl} Mäuse wiesen mehr ballonierete Hepatozyten auf als *Plin2*^{-/-} Mäuse (Score: *Plin2*^{fl/fl}=1,43±0,53; *Plin2*^{-/-}=0,14±0,38; $p_{\text{CDAA}}=0,0029$). Weibliche *Plin2*^{fl/fl} Mäuse zeigten unter CDAA-Diät signifikant mehr Ballonierung als *Plin2*^{-/-} Mäuse (Score: *Plin2*^{fl/fl}=1,125±0,125; *Plin2*^{-/-}=0,125±0,125; $p_{\text{CDAA}}=0,0002$) (Vgl. Abb. 11).

Bereits unter NCD war eine geringfügige, aber nicht signifikante Reduktion der Anzahl der Immunzellfoci bei *Plin2*^{-/-} (Männchen: $n_{\text{fl/fl}}=1,0\pm1,14$; $n_{-/-}=0,14\pm0,14$; Weibchen: $n_{\text{fl/fl}}=1,125\pm2,6964$; $n_{-/-}=0,5\pm0,57$) gegenüber *Plin2*^{fl/fl} Mäusen zu erkennen (Abb. 10, Abb. 11). Unter HFD zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen *Plin2*^{fl/fl} und *Plin2*^{-/-} Mäusen bei männlichen Tieren ($n_{\text{fl/fl}}=3,4\pm15,38$; $n_{-/-}=0,25\pm0,21$; $p_{\text{HFD}}=0,051$), jedoch Unterschiede bei weiblichen Tieren ($n_{\text{fl/fl}}=5,7\pm9,47$; $n_{-/-}=1,75\pm1,07$; $p_{\text{HFD}}=0,026$). Die größte Anzahl an Immunzellfoci konnte unter CDAA-Diät detektiert werden. Bei männlichen *Plin2*^{-/-} Mäusen war ein hinsichtlich geringerer Immunzellfoci zu erkennen, das Signifikanzniveau von $p=0,05$ wurde bei großen Varianzen jedoch knapp verfehlt ($n_{\text{fl/fl}}=31\pm657$; $n_{-/-}=5\pm36,3$; $p_{\text{CDAA}}=0,055$). Weibliche *Plin2*^{-/-} Mäuse unter

CDAА-Diät zeigten ebenfalls mit großer Varianz signifikant weniger Foci als *Plin2^{fl/fl}* Mäuse ($n_{fl/fl}=17,5\pm396,86$; $n_{-/-}=2,5\pm5,14$; $p_{CDAА}= 0,0071$) (Vgl. Abb. 11).

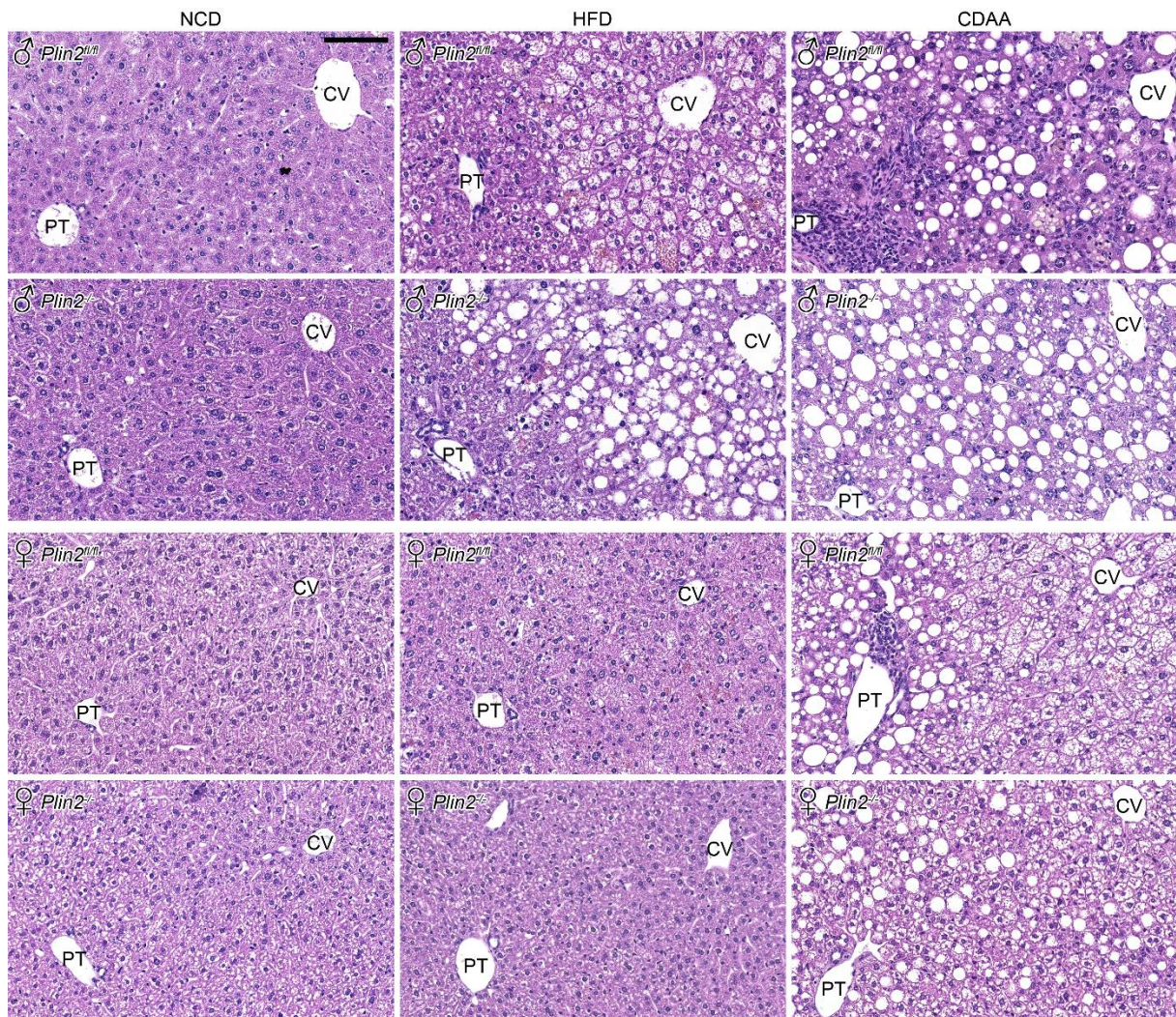


Abbildung 10: Geringere Immunezellinfiltration und Leberparenchymverfettung in *Plin2^{-/-}* Mäusen. *Plin2^{fl/fl}* und *Plin2^{-/-}* Mäuse beider Geschlechter wurden mit NCD, HFD und CDAА-Diät ad libitum gefüttert. Die Organ-Entnahme erfolgte 9 Wochen nach Versuchsbeginn. Abkürzungen: Portaltrias (PT) Zentralvene (CV). Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Maßstab: 100µm

Die Quantifizierung der Zelluntergänge zeigte unter NCD nur eine sehr geringe Anzahl an Zelluntergängen in 15 20-fach vergrößerten Gesichtsfeldern, wobei keine signifikanten Änderungen zwischen den unterschiedlichen Genotypen und Geschlechtern erkennbar waren. Unter HFD stieg die Anzahl an Zelluntergängen gegenüber NCD an. Für beide Geschlechter war eine signifikante Reduktion der Zelluntergänge bei *Plin2^{-/-}* gegenüber *Plin2^{fl/fl}* Mäusen zu beobachten. Im Vergleich weiblicher *Plin2^{fl/fl}* zu *Plin2^{-/-}* Mäusen waren in 15 20-fach vergrößerten Gesichtsfeldern $n_{fl/fl}=6,2\pm3,4$ gegenüber $n_{-/-}=2,3\pm1,6$ Zelluntergänge nachzuweisen, was einer Reduktion um etwa 63% entspricht ($p_{HFD}=0,0017$). Auch unter CDAА-Diät waren bei

männlichen *Plin2*^{-/-} Mäusen signifikant weniger Zelluntergänge ($n_{-/-}=7,29\pm 1,38$) nachzuweisen als bei *Plin2*^{fl/fl} Mäusen ($n_{fl/fl}=17,14\pm 6,01$; $p_{CDAA}=0,0044$). Analog wiesen weibliche *Plin2*^{-/-} Mäuse signifikant weniger Zelluntergänge ($n_{-/-}=3,75\pm 1,49$) auf als *Plin2*^{fl/fl} Mäuse ($n_{fl/fl}=17,63\pm 6,16$; $p_{CDAA}=0,0002$) (Vgl. Abb. 11).

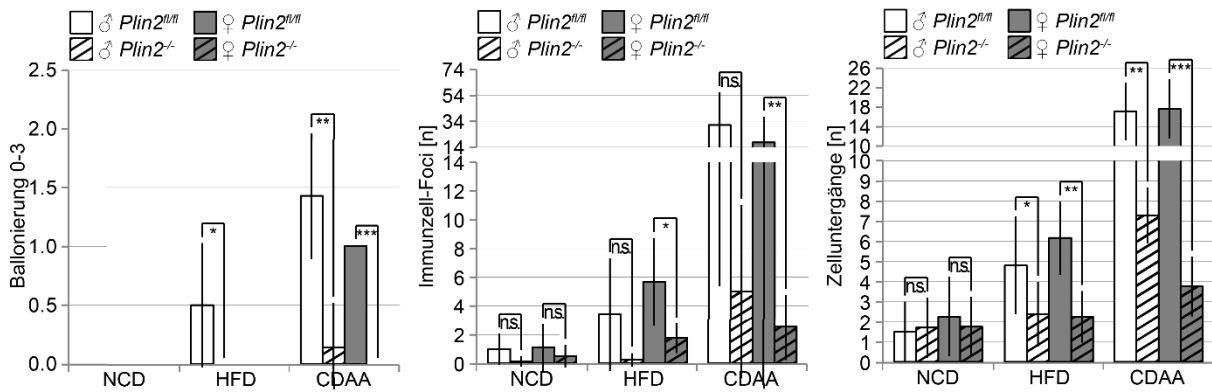


Abbildung 11: Reduzierter histologischer Leberschaden in *Plin2*^{-/-} Mäusen. Ballonierung adaptiert nach Bedossa et al.(15): abwesend = Grad 0, wenige ballionierte Hepatozyten = Grad 1, zahlreiche ballionierte Hepatozyten, mindestens doppelt so häufig wie normale Zellen = Grad 2. Immunzellfoci und Zelluntergänge wurden morphologisch identifiziert, vgl. Abb. 10 und 12. Die Daten wurden nach Geschlecht, Diät und Genotyp aufgeteilt. P-Werte < 0.05 (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***), $p < 0.0001$ (****) wurden als signifikant, p -Werte > 0.05 als nicht signifikant (n.s.) betrachtet. Es wurde, sofern statistisch erlaubt, ein Students t-Test für zwei Stichproben ggf. mit Welch-Korrektur durchgeführt. Nicht parametrische Daten wurden mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test verglichen.

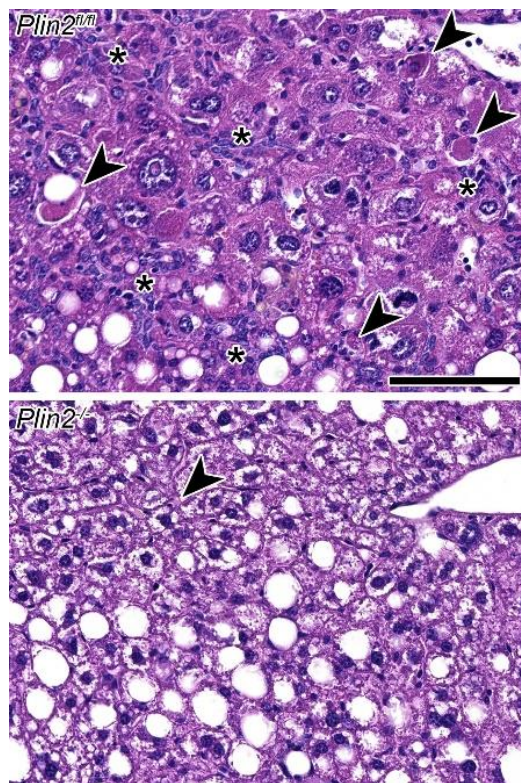


Abbildung 12: Geringere Anzahl an Zelluntergängen in *Plin2*^{-/-} Mäusen. *Plin2*^{fl/fl} und *Plin2*^{-/-} Mäuse wurden mit CDAA-Diät ad libitum gefüttert. Die Organ-Entnahme erfolgte 9 Wochen nach Versuchsbeginn. Die Pfeile markieren Zelluntergänge. Sterne markieren Mikroimmuninfiltrate. Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Maßstab: 100µm

4.4.2 mRNA-Expression der proapoptotischen und profibrotischen Marker *Chop* und *Perk*

Um die molekularen Ursachen zu analysieren, die in *Plin2*^{-/-} Mäusen zu einer Reduktion von Zelltod in der Leber führen, wurden die Expression der proapoptotischen und profibrotischen Marker *Chop* und *Perk* als Schlüsselproteine des Unfolded Protein Response (UPR) mittels quantitativer Real-Time PCR untersucht (28, 139-141). Verglichen mit Mäusen unter NCD zeigten *Plin2*^{fl/fl} Mäuse unter HFD einen signifikanten Unterschied des *Chop*-mRNA-Spiegels. Die relative mRNA-Expression, engl. „Foldchange“ (FC) gegenüber NCD betrug für HFD 1,20 ($p_{fl/fl}=0,045$). Unter HFD wiesen *Plin2*^{-/-} Mäuse um das 1,35-fache signifikant höhere *Chop*-mRNA-Spiegel auf als unter NCD ($p_{-/-}=0,0085$). CDAA-Diät induzierte in *Plin2*^{fl/fl} Mäusen eine signifikant auf das 2,57-fach erhöhte *Chop*-Expression gegenüber NCD ($p_{fl/fl}=0,0002$). Unter CDAA wiesen *Plin2*^{-/-} Mäuse ebenfalls signifikant höhere *Chop*-mRNA-Spiegel auf als unter NCD, allerdings nur um den Faktor 1,54 ($p_{-/-}=0,049$). Der Vergleich beider Genotypen unter derselben Diät zeigte für alle verwendeten Diäten bei *Plin2*^{-/-} gegenüber *Plin2*^{fl/fl} Mäusen eine signifikante Reduktion der *Chop*-Expression. Diese war mit einem FC von 0,37 gegenüber *Plin2*^{fl/fl} Mäusen in der CDAA-Gruppe am stärksten. ($p_{NCD}<0,0001$; $p_{HFD}=0,0003$; $p_{CDAA}=0,0001$) (Abb. 13).

Bei der Analyse der *Perk*-Expression in *Plin2*^{fl/fl} Mäusen zeigte sich bereits unter HFD eine signifikante Induktion gegenüber NCD ($p_{fl/fl}=0,034$), die dann unter CDAA-Diät mit einer Expressionszunahme um das 1,78-fache noch deutlich größer ausfiel ($p_{fl/fl}=0,0001$). Bei *Plin2*^{-/-} Mäusen waren keine signifikanten Diät-induzierten Änderung des *Perk*-mRNA-Spiegels nachzuweisen ($FC_{HFD}=0,96$; $FC_{CDAA}=1,26$). Analog zu *Chop*, exprimierten *Plin2*^{-/-} signifikant weniger *Perk*-mRNA als *Plin2*^{fl/fl} Mäuse bei gleicher Diät. Ebenso war die Reduktion in der CDAA-Gruppe mit einem FC von 0,49 gegenüber *Plin2*^{fl/fl} Mäusen am ausgeprägtesten ($p_{NCD}=0,0002$; $p_{HFD}<0,0001$; $p_{CDAA}<0,0001$) (Abb. 13).

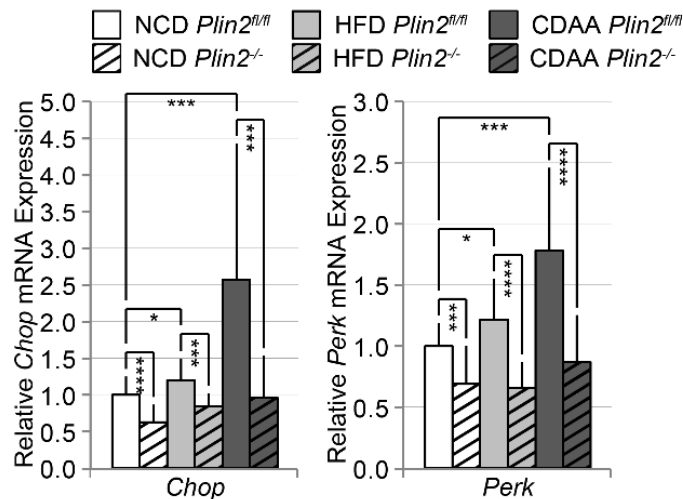


Abbildung 13: Reduktion der proapoptotischen und profibrotischen Faktoren Chop und Perk bei *Plin2^{-/-}* Mäusen. Mit quantitativer RT-PCR wurde die mRNA-Expression von Chop und Perk untersucht und auf $\beta 2M$ normalisiert. Die Daten wurden nach Diät und Genotyp aufgeteilt und beziehen sich auf die Vervielfachung gegenüber *Plin2^{fl/fl}* unter NCD. P-Werte < 0.05 (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***), $p < 0.0001$ (****) wurden als signifikant, p -Werte > 0.05 als nicht signifikant (n.s.) betrachtet. Sofern statistisch erlaubt, wurde ein Students t -Test für zwei Stichproben ggf. mit Welch-Korrektur durchgeführt. Nicht parametrische Daten wurden mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test verglichen.

4.4.3 Unterschiede in *Plin2^{-/-}* und *Plin2^{fl/fl}* Mäusen hinsichtlich Entzündung und Fibrose

Die histologische Analyse zeigte bereits eine starke Abnahme entzündlicher Aktivität in *Plin2^{-/-}* gegenüber *Plin2^{fl/fl}* Mäusen (Vgl. Abb. 10). Dies wurde im Folgenden genauer anhand der mRNA-Spiegel proinflammatorischer Faktoren wie Tumornekrosefaktor α (*Tnf- α*), Prostaglandinsynthetase-2 (*Ptgs2*) und des makrophagenspezifischen Rezeptors *F4/80* mittels quantitativer Real-Time PCR untersucht. *Tnf- α* aktiviert den nukleären Transkriptionsfaktor NF- κ B, was zu Zytokinproduktion, verminderter Apoptose und Steigerung der Aktivität von *Ptgs2* führt (142, 143)

HFD führte im Vergleich zu NCD weder bei *Plin2^{fl/fl}* noch bei *Plin2^{-/-}* Mäusen zu einer signifikanten Änderung des *Tnf- α* mRNA-Spiegels (*Plin2^{fl/fl}*: $FC_{HFD}=0,87$; *Plin2^{-/-}*: $FC_{HFD}=0,89$) (Abb. 14). Unter CDAA-Diät hingegen stieg der *Tnf- α* -mRNA-Spiegel bei *Plin2^{fl/fl}* signifikant um das 4,78-fache ($p_{fl/fl}<0,0001$) und bei *Plin2^{-/-}* Mäusen um das 3,88-fache ($p_{-/-}=0,00089$) gegenüber NCD gefütterten Mäusen gleichen Genotyps an. Der Genotyp hatte unter NCD und HFD keinen signifikanten Einfluss auf den *Tnf- α* -mRNA-Spiegel. Unter CDAA-Diät war dagegen eine signifikante Reduktion bei *Plin2^{-/-}* gegenüber *Plin2^{fl/fl}* Mäusen mit einem FC von 0,61 nachweisbar ($p_{CDAA}=0,019$).

Der mRNA-Spiegel der *Ptgs2* wurde durch HFD im Vergleich zu NCD in beiden Genotypen nicht signifikant beeinflusst (*Plin2^{fl/fl}*: $FC_{HFD}=1,21$; *Plin2^{-/-}*: $FC_{HFD}=1,40$).

Unter CDAA-Diät nahm die Expression jedoch bei *Plin2^{fl/fl}* um das 7,56-fache ($p_{fl/fl} < 0,0001$) und bei *Plin2^{-/-}* Mäusen um das 5,57-fache ($p_{-/-} < 0,0001$) signifikant gegenüber NCD zu. Interessanterweise zeigten *Plin2^{-/-}* Mäuse gegenüber *Plin2^{fl/fl}* Mäusen in allen Diäten eine hochsignifikante Reduktion des *Ptgs2*-mRNA-Spiegels. Diese war mit einem FC von 0,16 gegenüber *Plin2^{fl/fl}* Mäusen in der CDAA-Gruppe am stärksten. ($p_{NCD} < 0,0001$; $p_{HFD} < 0,0001$; $p_{CDAA} < 0,0001$).

Die Expressionsanalyse des makrophagenspezifischen Rezeptors *F4/80* (144) als Ausdruck entzündlich-resorptiver Vorgänge zeigte unter HFD weder in *Plin2^{fl/fl}* noch in *Plin2^{-/-}* Mäusen eine signifikante Veränderung des mRNA-Spiegels gegenüber der NCD-Kontrollgruppe (*Plin2^{fl/fl}*: $FC_{HFD} = 1,00$; *Plin2^{-/-}*: $FC_{HFD} = 1,15$). Unter CDAA-Diät konnte in *Plin2^{fl/fl}* Mäusen hingegen eine signifikante Zunahme um das 1,81-fache verglichen mit NCD ermittelt werden ($p_{fl/fl} < 0,0001$). In *Plin2^{-/-}* Mäusen unter CDAA-Diät war die Expression gegenüber NCD um das 2,33-fache gesteigert ($p_{-/-} < 0,0001$). CDAA-Diät steigerte sowohl bei *Plin2^{fl/fl}* als auch bei *Plin2^{-/-}* Mäusen den *F4/80*-mRNA-Spiegel signifikant ($p_{fl/fl} < 0,0001$; $p_{-/-} < 0,0001$). *Plin2^{-/-}* Mäuse hatten unter NCD und HFD signifikant niedrigere *F4/80*-mRNA-Spiegel als Wildtyp-Mäuse ($p_{NCD} < 0,0001$; $p_{HFD} = 0,019$). Unter CDAA-Diät zeigten *Plin2^{-/-}* Mäuse ebenfalls eine signifikante Reduktion der Expression gegenüber Wildtyp-Mäusen ($p_{CDAA} = 0,013$).

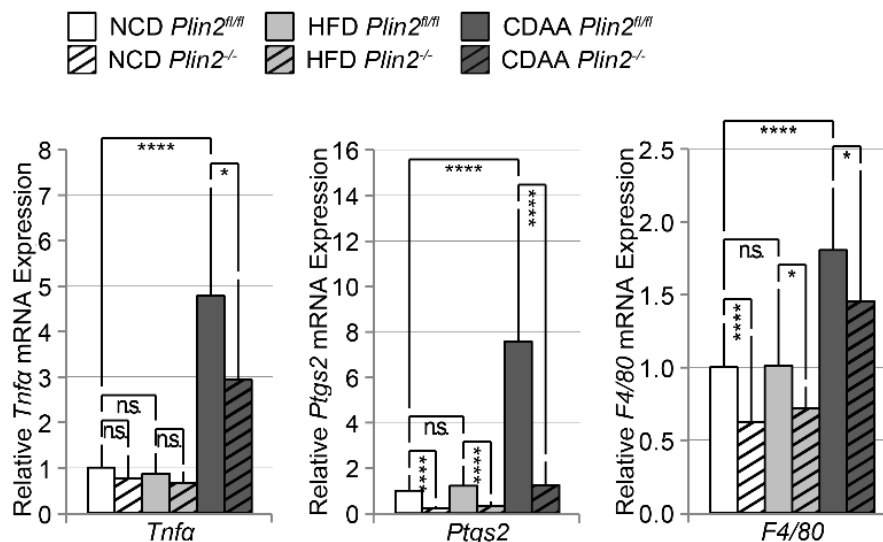


Abbildung 14: Herabregulation proinflammatorischer Faktoren in *Plin2^{-/-}* Mäusen Mit quantitativer RT-PCR wurde die mRNA-Expression von *Tnf- α* , *Ptgs2* und *F4/80* untersucht und mittels ΔC_T -Methode auf β_2m normalisiert. Die Daten wurden nach Diät und Genotyp aufgeteilt und beziehen sich auf die Vervielfachung gegenüber *Plin2^{fl/fl}* unter NCD. P-Werte $< 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****) wurden als signifikant, p-Werte $> 0,05$ als nicht signifikant (n.s.) betrachtet. Es wurde, sofern statistisch erlaubt, ein Students *t*-Test für zwei Stichproben ggf. mit Welch-Korrektur durchgeführt. Nicht parametrische Daten wurden mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test verglichen.

Eine Progression einer chronischen Lebererkrankungen jedweder Genese manifestiert mit vermehrter Fibrose. Diese wurde mittels Gömöri-Färbung visualisiert und mit dem Kleiner-Score (Werte zwischen 0 und 4) evaluiert (18). Hinsichtlich der Fibrose waren weder in *Plin2^{fl/fl}* noch *Plin2^{-/-}* Mäusen Unterschiede zwischen HFD und NCD gefütterten Mäusen zu erkennen. Nur unter CDAA-Diät war in beiden Genotypen eine deutliche Vermehrung des Bindegewebes im Vergleich zu NCD gefütterten Tieren nachweisbar. *Plin2^{-/-}* Mäuse wiesen gegenüber *Plin2^{fl/fl}* Mäusen eine leichte Reduktion der Fibrose auf, die lediglich bei CDAA gefütterten Weibchen signifikant war ($p_{CDAA}=0,0014$). Geschlechts- und diätabhängig fielen keine signifikanten Unterschiede des Kleiner-Scores (16) auf (Vgl. Abb. 15).

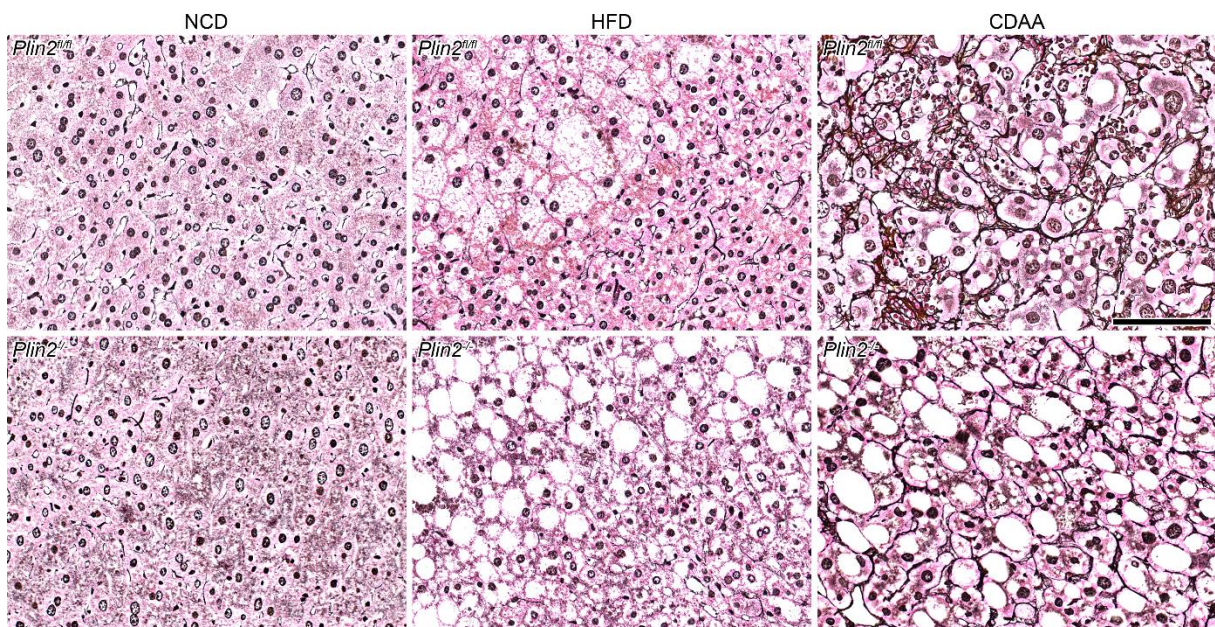


Abbildung 15: Geringere Fibrose in *Plin2^{-/-}* Mäusen. Gömöri-Färbungen, aufgeteilt nach Diät und Genotyp. *Plin2^{fl/fl}* und *Plin2^{-/-}* Mäuse wurden mit NCD, HFD und CDAA-Diät ad libitum gefüttert. Die Organ-Entnahme erfolgte 9 Wochen nach Versuchsbeginn. Maßstab: 100µm

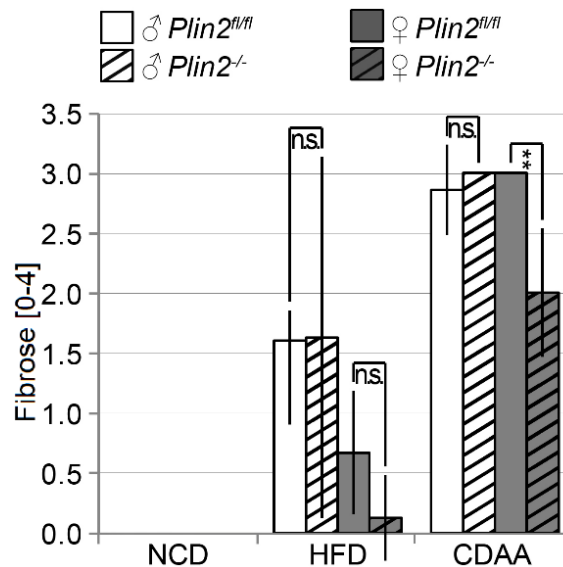


Abbildung 16: Geringere Fibrose in weiblichen *Plin2^{-/-}* Mäusen gegenüber Wildtyp-Mäusen. Fibrose quantifiziert nach Kleiner et al., 2005 (18): 0= keine Fibrose; 1=milde perisinusoidale Fibrose in Zone 3; 2= portale und periportale Fibrose; 4= Zirrhose. Zweiseitiger t-Test für ungepaarte Proben. Die Daten wurden nach Geschlecht, Diät und Genotyp aufgeteilt. P-Werte < 0.05 (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***), $p < 0.0001$ (****) wurden als signifikant, p -Werte > 0.05 als nicht signifikant (n.s.) betrachtet. Es wurde, sofern statistisch erlaubt, ein Students t-Test für zwei Stichproben ggf. mit Welch-Korrektur durchgeführt. Nicht parametrische Daten wurden mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test verglichen.

Zusätzlich zu den histologischen Analysen des Fibrosegrads wurde die Expression von α -Glattmuskel-Aktin (*Acta2*), welches mit der Aktivierung hepatischer Sternzellen korreliert (145), mittels quantitativer Real-Time PCR untersucht. Verglichen mit Mäusen unter NCD zeigten *Plin2^{fl/fl}* Mäuse unter HFD um das 2,6-fach signifikant erhöhte *Acta2*-mRNA-Spiegel ($p_{fl/fl}=0,027$; Abb. 17). Bei *Plin2^{-/-}* Mäusen war keine signifikante Zunahme durch HFD im Vergleich zu NCD detektierbar ($FC_{HFD}=1,25$). CDAA-Diät steigerte den *Acta2*-mRNA-Spiegel in *Plin2^{fl/fl}* Mäusen signifikant um das 3,16-fache gegenüber NCD ($p_{fl/fl}<0,0001$). Bei *Plin2^{-/-}* Mäusen zeigte sich unter CDAA-Diät ebenfalls kein signifikanter Effekt gegenüber NCD. Innerhalb der Diäten waren nur unter NCD *Plin2^{-/-}* Mäuse höhere *Acta2*-mRNA-Spiegel als *Plin2^{fl/fl}* Mäuse nachweisbar ($p_{NCD}=0,0086$). In den anderen Diät-Gruppen waren keine signifikanten Unterschiede zu beobachten.

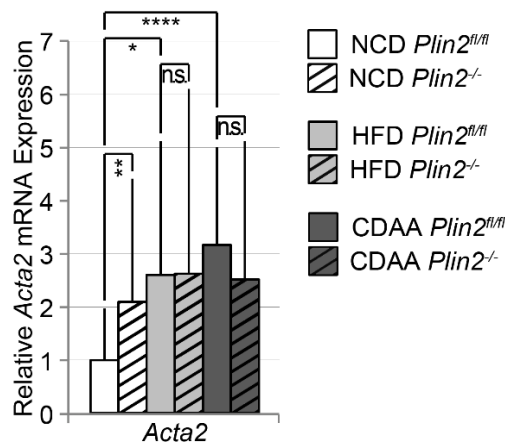


Abbildung 17 Steigerung der Acta2 mRNA-Expression durch HFD und CDAA-Diät. Mit quantitativer RT-PCR wurde die mRNA-Expression von Acta2 untersucht. Die Expression wurde mittels ΔC_T -Methode auf $\beta 2m$ normalisiert. Die Daten wurden nach Diät und Genotyp aufgeteilt und beziehen sich auf die Vervielfachung gegenüber *Plin2^{fl/fl}* unter NCD. P-Werte < 0.05 (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***), $p < 0.0001$ (****) wurden als signifikant, p -Werte > 0.05 als nicht signifikant (n.s.) betrachtet. Es wurde, sofern statistisch erlaubt, ein Students t-Test für zwei Stichproben ggf. mit Welch-Korrektur durchgeführt. Nicht parametrische Daten wurden mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test verglichen.

4.5 mRNA- und Protein-Expression Lipidtropfen-assoziiierter Proteine

4.5.1 mRNA-Expression von Perilipin 2, 3, 4 und 5

Eine hepatozyten-spezifische Perilipin 2-Deletion schützt männliche Tiere nicht und weibliche Tiere nur bedingt vor Diät-induzierter Steatose (Vgl. Abb. 10). Deswegen ergibt sich die Frage, ob andere Perilipine den Verlust von Perilipin 2 kompensieren können. Deshalb wurden auf mRNA-Ebene durch quantitative Real-Time PCR die Expressions-Spiegel der PAT-Gene *Plin2*, *Plin3*, *Plin4*, und *Plin5* analysiert (Abb. 18).

Plin2^{fl/fl} Mäuse zeigten unter HFD eine leichte, aber nicht signifikante ($FC_{HFD}=1,22$; $p_{fl/fl}=0,082$), unter CDAA-Diät hingegen eine um das 1,51-fach signifikante Erhöhung ($p_{fl/fl}=0,0026$) des *Plin2* mRNA-Spiegels verglichen mit NCD gefütterten Tieren. Weder unter HFD noch unter CDAA-Diät war bei *Plin2^{-/-}* Mäusen eine signifikante Expressionszunahme gegenüber NCD zu beobachten. Wie erwartet zeigten *Plin2^{-/-}* Mäuse in allen drei Diäten hochsignifikant weniger *Plin2*-Expression als *Plin2^{fl/fl}* Mäuse ($p_{NCD}<0,0001$; $p_{HFD}<0,0001$; $p_{CDAA}<0,0001$).

Die *Plin3* Expression unter HFD zeigte unabhängig vom Genotyp keine signifikanten Unterschiede gegenüber NCD *Plin2^{fl/fl}* (*Plin2^{fl/fl}*: $FC_{HFD}=1,1$; *Plin2^{-/-}*: $FC_{HFD}=1,0$). Unter CDAA-Diät konnte in *Plin2^{fl/fl}* Mäusen hingegen eine signifikante Expressions-Zunahme um das 1,54-fache verglichen mit NCD ermittelt werden ($p_{fl/fl}<0,0001$). In *Plin2^{-/-}* Mäusen unter CDAA-Diät war die Expression gegenüber NCD um das 1,79-

fache gesteigert ($p_{-/-}=0,0004$). *Plin2*^{-/-} Mäuse zeigten unter NCD und HFD signifikant niedrigere *Plin3*-Spiegel als *Plin2*^{fl/fl} Mäuse ($p_{\text{NCD}}=0,033$; $p_{\text{HFD}}=0,039$).

Die *Plin4*-Expression in *Plin2*^{fl/fl} Mäusen nahm unter HFD verglichen mit NCD um das 5,57-fache zu ($p_{\text{fl/fl}}<0,0001$). Unter CDAA-Diät war die Expression gegenüber NCD um das 10,65-fache gesteigert ($p_{\text{fl/fl}}<0,0001$). *Plin2*^{-/-} Mäuse zeigten eine ähnliche Dynamik: Unter HFD nahm die *Plin4*-Expression gegenüber NCD um das 5,42-fache zu ($p_{-/-}=0,008$), unter CDAA-Diät um das 9,56-fache ($p_{-/-}<0,0001$). *Plin2*^{-/-} Mäuse zeigten unabhängig von der Diät eine geringfügig höhere *Plin4*-Expression als *Plin2*^{fl/fl} Mäuse, ohne das Signifikanzniveau zu erreichen.

Die *Plin5* mRNA-Expression stieg in *Plin2*^{fl/fl} Mäusen unter HFD signifikant um das 1,93-fache ($p_{\text{fl/fl}}=0,0008$) und unter CDAA-Diät um das 1,81-fache gegenüber der NCD-Kontrolle an ($p_{\text{fl/fl}}<0,0001$). *Plin2*^{-/-} Mäuse unter HFD zeigten keine erhöhte *Plin5*-Expressionszunahme gegenüber NCD ($p_{-/-}=0,066$). *Plin2*^{-/-} Mäuse unter CDAA-Diät zeigten ebenfalls keine signifikante Expressionszunahme gegenüber NCD ($p_{-/-}=0,059$). Auffällig ist die signifikante Abnahme der *Plin5* mRNA-Expression bei *Plin2*^{-/-} unter HFD ($p_{\text{HFD}}=0,019$) mit einem FC von 0,62 gegenüber *Plin2*^{fl/fl} Mäusen. Unter CDAA-Diät betrug die Reduktion in *Plin2*^{-/-} Mäusen gegenüber *Plin2*^{fl/fl} Mäusen das 0,67-fache ($p_{\text{CDAA}}=0,0003$).

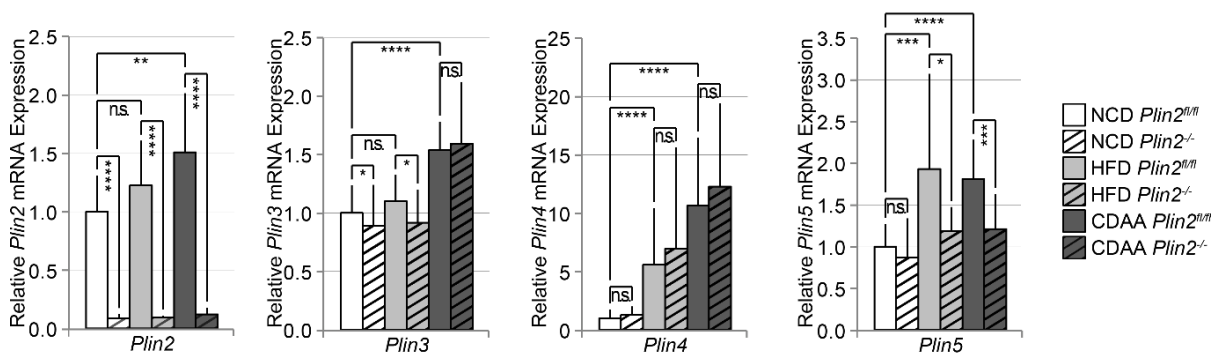


Abbildung 18: Verminderte *Plin5*-mRNA-Expression in *Plin2*^{-/-} Mäusen. Aus Leberproben wurde mRNA isoliert und zu cDNA umgeschrieben. Mit quantitativer RT-PCR wurde die mRNA-Expression von Perilipin 2, Perilipin 3, Perilipin 4 und Perilipin 5 untersucht. Die Expression wurde mittels ΔC_T -Methode auf $\beta 2m$ normalisiert. Die Daten wurden nach Diät und Genotyp aufgeteilt und beziehen sich auf die Vervielfachung gegenüber *Plin2*^{fl/fl} unter NCD. P-Werte < 0.05 (*), < 0.01 (**), < 0.001 (***), < 0.0001 (****) wurden als signifikant, p-Werte > 0.05 als nicht signifikant (n.s.) betrachtet. Es wurde, sofern statistisch erlaubt, ein Students t-Test für zwei Stichproben ggf. mit Welch-Korrektur durchgeführt. Nicht parametrische Daten wurden mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test verglichen.

4.5.2 Protein-Expression von Perilipin 2,3,4 und 5 im Immunblot und Immunhistochemie

Neben der Analyse der Perilipin-Expression auf transkriptioneller Ebene wurden diese zusätzlich auf Proteinebene mittels Immunblot untersucht und densitometrisch mit NCD gefütterten *Plin2^{fl/fl}* Mäusen des jeweiligen Geschlechts verglichen. Sowohl unter HFD als auch unter CDAA-Diät zeigten unabhängig vom Geschlecht *Plin2^{fl/fl}* Mäuse auf Proteinebene einen deutlichen Anstieg von Perilipin 2. Bei *Plin2^{fl/fl}* Männchen nahm die Perilipin 2-Expression im Vergleich zu NCD auf das 5,86-fache zu, bei Weibchen war dies deutlich schwächer (3,60-fach) ausgeprägt. Unter CDAA-Diät stieg die Perilipin 2-Expression in *Plin2^{fl/fl}* Männchen auf das 3,58-fache, bei Weibchen auf das 4,05-fache. *Plin2^{-/-}* Mäuse zeigten eine schwache residuale Expression ohne Diät-induzierte Veränderungen (Abb. 19).

Männliche *Plin2^{fl/fl}* Mäuse zeigten unter HFD eine deutliche Reduktion von Perilipin 3 auf 25% im Vergleich zu NCD. Unter CDAA-Diät hingegen waren densitometrisch keine Unterschiede detektierbar. Männliche *Plin2^{-/-}* Mäuse zeigten unter HFD ebenfalls eine Reduktion auf 56% auf, während unter CDAA-Diät keine Änderung der Perilipin 3 Protein-Expression zu beobachten war. *Plin2^{fl/fl}* Weibchen zeigten dagegen unter HFD und CDAA-Diät leicht erhöhte Perilipin 3 Proteinspiegel, während *Plin2^{-/-}* Weibchen unveränderte Spiegel aufwiesen.

Die stärkste Expression von Perilipin 4 zeigte sich geschlechtsunabhängig in *Plin2^{fl/fl}* Mäusen unter NCD. Während *Plin2^{fl/fl}* Mäuse unter HFD nur eine leichte Reduktion der Expression gegenüber NCD-Mäusen zeigten, führte der Knock-Out von *Plin2* zu einer starken Reduktion der Perilipin 4-Expression auf 57% bei Weibchen und 38% bei Männchen gegenüber NCD gefütterten *Plin2^{fl/fl}* Mäusen. Unter CDAA-Diät waren unabhängig vom Genotyp signifikant reduzierte Perilipin 4-Proteinspiegel zu beobachten, wobei *Plin2^{fl/fl}* Männchen die geringsten Spiegel zeigten. In dieser Gruppe war die Expression gegenüber NCD auf 40% reduziert.

Die densitometrische Quantifizierung von Perilipin 5 im Immunblot ergab bereits unter NCD bei *Plin2^{-/-}* Mäusen eine Zunahme auf das 1,53-fache bei Weibchen und 2,03-fache bei Männchen. Unter HFD und CDAA-Diät zeigte sich bei *Plin2^{fl/fl}* Mäusen keine gesteigerte Plin5-Expression. Unter CDAA-Diät zeigten weibliche *Plin2^{fl/fl}* Mäuse

überraschenderweise sogar eine Reduktion von Perilipin 5 auf 47% gegenüber NCD gefütterten *Plin2^{fl/fl}* Mäusen. Bei männlichen *Plin2^{-/-}* Mäusen steigerte HFD die Perilipin 5-Expression auf das 3,27-fache gegenüber NCD *Plin2^{fl/fl}* Mäusen. Am stärksten war die Perilipin 5-Induktion bei männlichen *Plin2^{-/-}* Mäusen unter CDAA-Diät auf das 7,14-fache gegenüber NCD gefütterten *Plin2^{fl/fl}* Mäusen. *Plin2^{-/-}* Weibchen unter CDAA-Diät wiesen ebenfalls eine Zunahme der Perilipin 5-Expression auf das 3,49-fache auf. Zusammenfassend war die Perilipin 5-Protein-Expression geschlechtsübergreifend und unabhängig von der verabreichten Diät bei *Plin2^{-/-}* Mäusen gegenüber *Plin2^{fl/fl}* Mäusen erhöht.

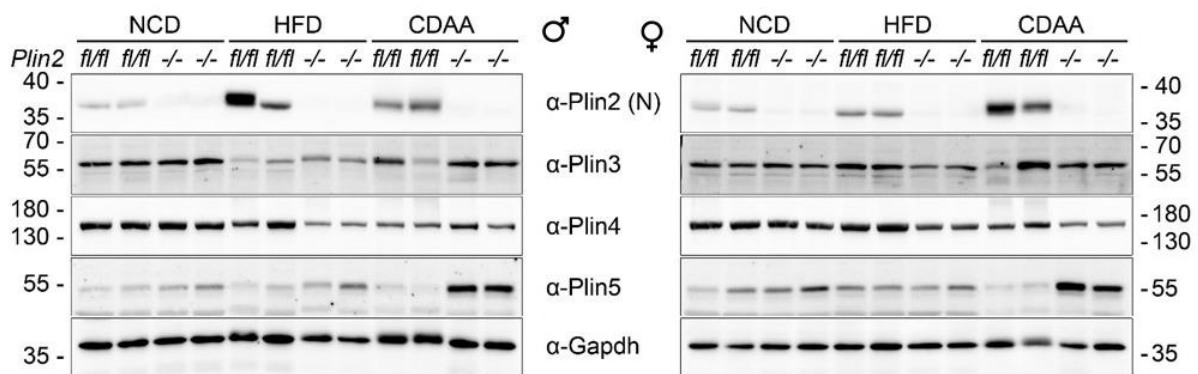


Abbildung 19: Gesteigerte Perilipin 5-Expression in *Plin2^{-/-}* Mäusen. Repräsentative Darstellung der Protein-Expression untersuchter Perilipine aufgeteilt nach Männchen (links) und Weibchen (rechts). Es wurden Immunblots aller Proben wurden angefertigt. Zur densitometrischen Quantifizierung wurden repräsentative Proben ausgewählt und gemeinsam in einem Immunblot entwickelt. Die densitometrischen Messwerte des jeweils untersuchten Proteins wurden auf den zugehörigen Messwert für Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) normalisiert. Perilipin 2 wurde mit dem N-terminalen Antikörper detektiert. Links ist das Molekulargewicht in Kilodalton (kDa) angegeben.

Um den möglichen Einfluss des hepatozyten-spezifischen Verlusts von Perilipin 2 auf die Lokalisation andere Proteine der Perilipin-Familie zu untersuchen, wurden immunhistochemische Färbungen (IHC) der Leberproben für die Perilipine 2, 3 und 5 durchgeführt (Abb. 20). Perilipin 1 wurde nicht untersucht, da dieses in der Mausleber auch unter steatogenen Bedingungen nicht exprimiert wird. Die IHC von Perilipin 2 zeigte in *Plin2^{fl/fl}* Mäusen unter NCD eine punkt-, teils kreisförmige Färbung in den Hepatozyten. Es bestand keine zonale Lokalisation. In *Plin2^{-/-}* Mäusen waren die Hepatozyten Perilipin 2-negativ. Unter HFD zeigten *Plin2^{fl/fl}* Mäuse sowohl ein punktförmiges Färbemuster als auch eine Anfärbung mittelgroßer LT, mit zentralvenös deutlich verstärkter Färbung. *Plin2^{-/-}* Mäuse unter HFD zeigten zwar mittelgroße und große LT in Hepatozyten jedoch ohne Positivität für Perilipin 2. Unter CDAA-Diät zeigte sich in *Plin2^{fl/fl}* Mäusen ein Färbemuster von gemischter Intensität. Während

periportal ein mäßig intensives punktförmiges Färbemuster mit gelegentlich kräftig angefärbten großen LT dominierte, ließen sich um die Zentralvene deutlich kräftiger angefärbte Cluster kleiner LT erkennen. Die zahlreichen Immuzellinfiltrate waren Perilipin 2-negativ. *Plin2*^{-/-} Mäuse unter CDAA-Diät zeigten mittelgroße bis große LT ohne Perilipin 2-Färbung. HSCs aller Genotypen waren Perilipin 2-positiv.

Unter NCD lokalisierte Perilipin 3 in *Plin2*^{fl/fl} Mäusen vornehmlich im Zytoplasma mit periportal Zunahme der Färbeintensität. In *Plin2*^{-/-} Mäusen unter NCD zeigte sich ebenfalls eine periportal betonte Färbung bei im Vergleich zum Wildtyp verstärkter Perilipin 3-Lokalisation an kleinen LT. Das zonale Färbungsmuster unter HFD war bei *Plin2*^{fl/fl} Mäusen ebenfalls periportal betont. Auffällig war die Zunahme der Perilipin 3 Färbeintensität bei HFD gefütterten *Plin2*^{-/-} Mäusen. Zwar waren hier zentralvenös vermehrt Perilipin 3-positiv große LT zu erkennen, ein zonales Färbemuster wie im Wildtyp zeigte sich jedoch nicht, da kleine LT periportal ebenfalls angefärbt wurden. Unter CDAA-Diät war in *Plin2*^{fl/fl} Mäusen Perilipin 3 zytoplasmatisch und in LT ohne zonales Färbemuster zu erkennen. Dagegen lokalisierte Perilipin 3 bei *Plin2*^{-/-} Mäusen unter CDAA-Diät vermehrt an LT von Hepatozyten der intermediären und zentralvenösen Zone.

Plin2^{fl/fl} Mäuse wiesen unter NCD eine nur äußerst diskrete Anfärbbarkeit für Perilipin 5 auf. Interessanterweise war bei *Plin2*^{-/-} Mäusen schon unter NCD in allen Zonen der Leber eine deutliche Zunahme der Färbeintensität zu beobachten. Lebern von HFD gefütterten *Plin2*^{fl/fl} Mäusen waren nahezu negativ für Perilipin 5, dafür stark positiv in *Plin2*^{-/-} Mäusen. Hier war Perilipin 5 sowohl an unterschiedlich großen LT als auch im Zytoplasma ohne zonale Betonung lokalisiert. Am deutlichsten fiel jedoch die Diskrepanz der Perilipin 5-Lokalisation zwischen *Plin2*^{fl/fl} und *Plin2*^{-/-} Mäusen unter CDAA-Diät aus. Bei *Plin2*^{fl/fl} Mäusen zeigte sich, trotz etwa gleicher Steatose, nur eine diskrete Färbeintensität für Perilipin 5 mit einzelnen verstärkt angefärbten Clustern. Dagegen zeigte sich bei *Plin2*^{-/-} Mäusen ohne zonale Betonung eine deutliche verstärkte Anfärbbarkeit für Perilipin 5 im Vergleich zu *Plin2*^{fl/fl} Mäusen.

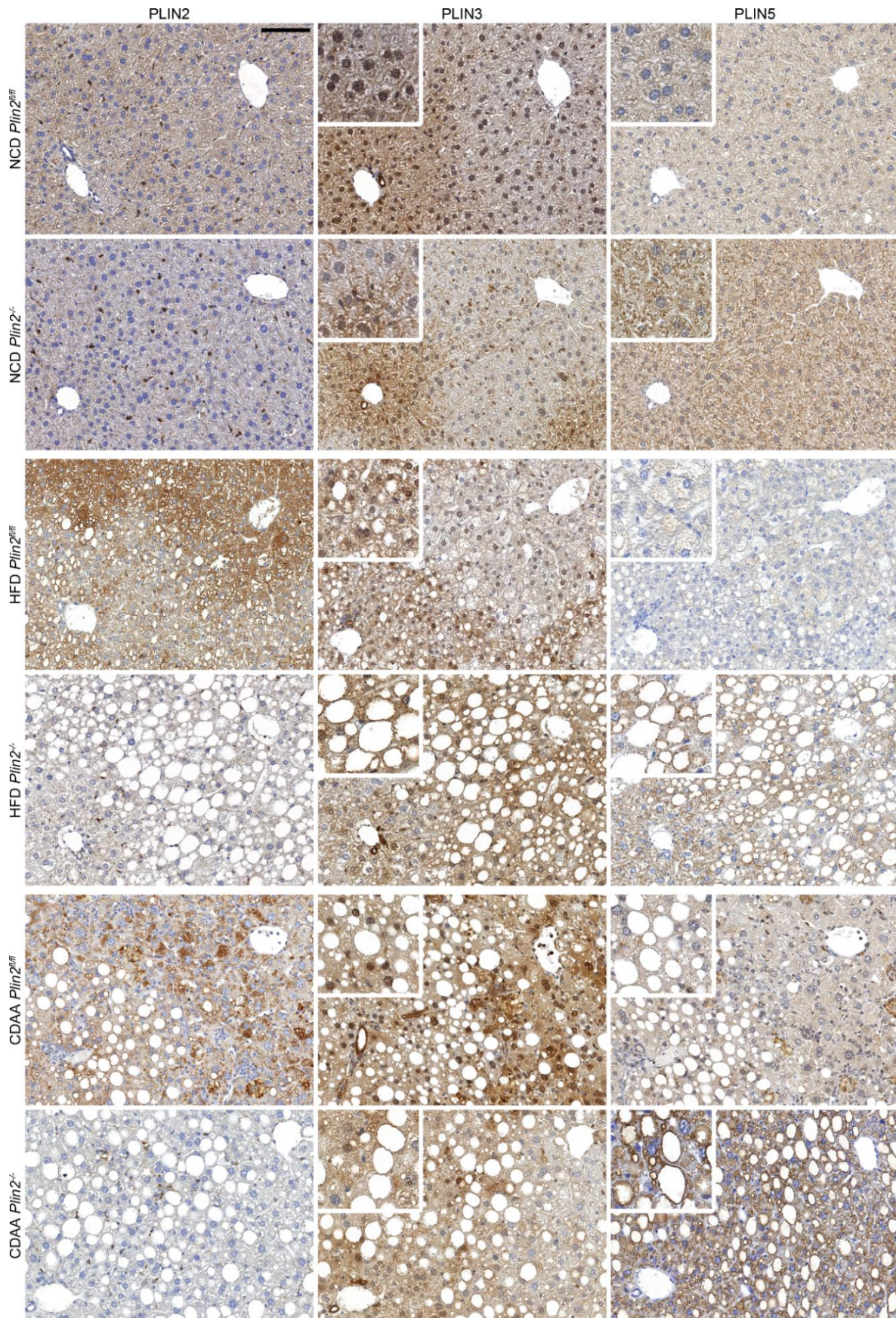


Abbildung 20: Höhere Expression von Perilipin 3 und Perilipin 5 in *Plin2^{-/-}* Mäusen. *Plin2^{fl/fl}* und *Plin2^{-/-}* Mäuse nach 9-wöchiger Diät mit NCD, HFD und CDAAs. Die Organ-Entnahme erfolgte 9 Wochen nach Versuchsbeginn. IHC von Perilipin 2, 3 und 5. Maßstab: 100µm.

Zur Analyse der Auswirkungen des Perilipin 2-Knock-Outs auf den Fettsäuremetabolismus und im Speziellen auf die Regulation LT-assoziiertes Lipasen, wurden Expressionsanalysen auf Protein- und Transkriptionsebene durchgeführt. Atgl katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Lipolyse, wobei Abhd5 als Ko-Aktivator von Atgl deren Hydrolyse-Spezifität stimuliert und so die Aktivität des Enzyms steigert (38, 97). Die *Atgl*-mRNA-Expression änderte sich durch HFD weder in *Plin2^{fl/fl}* noch in *Plin2^{-/-}* Mäusen signifikant (*Plin2^{fl/fl}*: FC_{HFD}=0,94; *Plin2^{-/-}*: FC_{HFD}=0,86). CDAA-Diät steigerte aber den *Atgl*-mRNA-Spiegel in *Plin2^{fl/fl}* Mäusen gegenüber NCD signifikant um das 1,29-fache (p_{fl/fl}= 0,023), bei *Plin2^{-/-}* Mäusen unter CDAA-Diät war gegenüber NCD keine signifikante Änderung zu beobachten (FC_{CDAA}=1,08). Auffällig war in allen drei Diäten eine signifikante Abnahme der *Atgl*-mRNA-Spiegel bei *Plin2^{-/-}* Mäusen im Vergleich zu *Plin2^{fl/fl}* Mäusen (p_{NCD}= 0,016; p_{HFD}= 0,0009; p_{CDAA}= 0,0003).

Die Analyse des *Atgl*-Ko-Aktivators *Abhd5* ergab bei *Plin2^{fl/fl}* Mäusen unter HFD eine signifikante Verminderung des *Abhd5*-mRNA-Spiegels auf 80% verglichen mit NCD (p_{fl/fl}= 0,0147). Auch bei *Plin2^{fl/fl}* Mäusen unter CDAA-Diät war die Reduktion auf ebenfalls 80% signifikant (p_{fl/fl}= 0,028). Bei *Plin2^{-/-}* Mäusen hingegen konnte kein signifikanter Diät-induzierter Unterschied detektiert werden (FC_{HFD}=1,15; FC_{CDAA}=1,21). Dagegen konnte bei *Plin2^{-/-}* Mäusen gegenüber *Plin2^{fl/fl}* Mäusen in allen drei Diätgruppen eine hochsignifikante Reduktion des *Abhd5*-mRNA-Spiegels gezeigt werden (p_{NCD}<0,0001; p_{HFD}<0,0001; p_{CDAA}<0,0001).

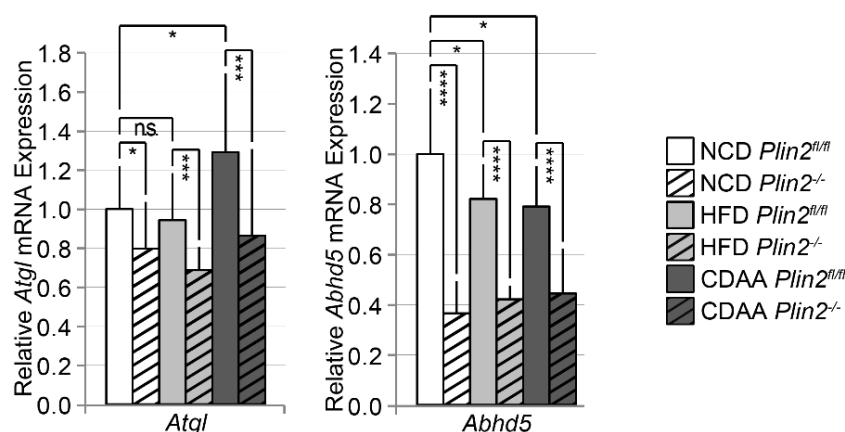


Abbildung 21: Verminderte mRNA-Expression von *Atgl* und *Abhd5* in *Plin2^{-/-}* Mäusen. Mit quantitativer RT-PCR wurde die mRNA-Expression von *Atgl* und *Abhd5* untersucht und mittels ΔC_T -Methode auf $\beta 2m$ normalisiert. Die Daten wurden nach Diät und Genotyp aufgeteilt und beziehen sich auf die Vervielfachung gegenüber *Plin2^{fl/fl}* unter NCD. P-Werte < 0.05 (*), p < 0.01 (**), p < 0.001 (***), p < 0.0001(****) wurden als signifikant, p-Werte > 0.05 als nicht signifikant (n.s.) betrachtet. Es wurde, sofern statistisch erlaubt, ein Students t-Test für zwei Stichproben ggf. mit Welch-Korrektur durchgeführt. Nicht parametrische Daten wurden mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test verglichen.

Nach der initialen Hydrolyse von TAG zu Diacylglycerin (DAG) durch Atgl erfolgt die Hydrolyse durch die Hormonsensitive Lipase (Hsl) zu Monoacylglycerin (MAG), welches durch die Monoacylglycerin-Lipase (Mgll) zu Glycerin hydrolysiert wird. In jedem Schritt wird dabei eine Fettsäure abgespalten. Die Aktivität von Hsl ist im metabolischen Hungerzustand beispielsweise durch Glukagon oder Adrenalin PKA vermittelt gesteigert, während Insulin die Aktivität der Hsl inhibiert (39, 62). *Pnpla3* wird dagegen durch Insulin induziert (106) und interagiert direkt mit Srebf1. Dies hemmt den Abbau von hepatischem *Pnpla3* und induziert dessen Transkription (107, 108). Aufgrund dieses interessanten metabolischen Zusammenspiels wurden die genannten Gene mittels quantitativer Real-Time PCR analysiert, um mögliche Auswirkungen des hepatozyten-spezifischen Perilipin 2 Knock-Outs, sowie der Spezialdiäten beobachten zu können.

Unter HFD stieg verglichen mit der NCD-Kontrolle der mRNA-Spiegel von *Hsl* in *Plin2^{fl/fl}* Mäusen signifikant um das 1,24-fache an ($p_{fl/fl} = 0,040$), bei *Plin2^{-/-}* Mäusen zeigte sich hingegen kein signifikanter Unterschied ($FC_{HFD} = 1,05$). CDAA-Diät führte bei beiden Genotypen nicht zu einer signifikanten Änderung des *Hsl*-mRNA-Spiegels. Ähnlich wie bei *Atgl* zeigten sich bei *Plin2^{-/-}* Mäusen unter NCD und HFD signifikant niedrigere *Hsl*-mRNA-Spiegel im Vergleich zu *Plin2^{fl/fl}* ($p_{NCD} = 0,0060$; $p_{HFD} = 0,00018$). Unter CDAA-Diät wiesen *Plin2^{fl/fl}* und *Plin2^{-/-}* Mäuse jedoch keine signifikant unterschiedlichen *Hsl*-mRNA-Spiegel auf (*Plin2^{fl/fl}*: $FC_{CDAA} = 0,83$; *Plin2^{-/-}*: $FC_{CDAA} = 1,16$).

Als letzte der drei maßgeblichen Lipasen wurde *Mgll* untersucht. Unter HFD stieg der *Mgll*-mRNA-Spiegel in *Plin2^{fl/fl}* Mäusen um das 1,50-fache und in *Plin2^{-/-}* Mäusen um das 1,58-fache gegenüber NCD signifikant an ($p_{fl/fl} = 0,0026$; $p_{-/-} = 0,001$). CDAA-Diät führte nur bei *Plin2^{-/-}* Mäusen zu einer signifikanten Expressionssteigerung gegenüber NCD um das 1,36-fache ($p_{-/-} = 0,03$). Analog zu *Atgl* und *Hsl* sank auch der *Mgll*-mRNA-Spiegel bei *Plin2^{-/-}* gegenüber *Plin2^{fl/fl}* Mäusen in allen drei Diäten hochsignifikant ($p_{NCD} = 0,0002$; $p_{HFD} < 0,0001$; $p_{CDAA} = 0,00032$).

Die *Pnpla3*-mRNA-Spiegel der untersuchten Proben waren auffällig niedrig, bei starker Varianz zwischen den einzelnen Messwerten. Die *Pnpla3*-mRNA-Spiegel nahmen in *Plin2^{fl/fl}* Mäusen unter HFD und CDAA-Diät im Vergleich zu NCD geringfügig, aber nicht signifikant ab. Bei *Plin2^{-/-}* Mäusen unter HFD war kein

signifikanter Unterschied gegenüber NCD zu erkennen ($p=0,97$), auch unter CDAA-Diät war dies nicht der Fall. Signifikante Unterschiede des *Pnpla3*-mRNA-Spiegels zwischen den Genotypen innerhalb einer Diät konnten nicht gezeigt werden.

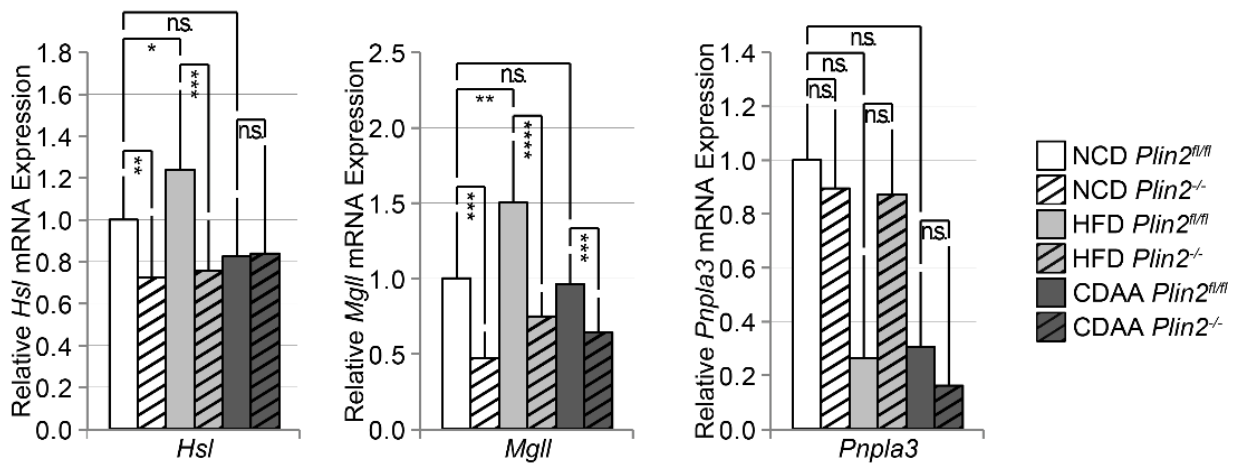


Abbildung 22: Verminderte mRNA-Expression von Hsl, Mgl1 und Pnpla3 in *Plin2^{-/-}* Mäusen. Mit quantitativer RT-PCR wurde die mRNA-Expression von Hsl, Mgl1 und Pnpla3 untersucht und mittels ΔC_T -Methode auf $\beta 2m$ normalisiert. Die Daten wurden nach Diät und Genotyp aufgeteilt und beziehen sich auf die Vervielfachung gegenüber *Plin2^{fl/fl}* unter NCD. P-Werte < 0.05 (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***), $p < 0.0001$ (****) wurden als signifikant, p-Werte > 0.05 als nicht signifikant (n.s.) betrachtet. Es wurde, sofern statistisch erlaubt, ein Students t-Test für zwei Stichproben ggf. mit Welch-Korrektur durchgeführt. Nicht parametrische Daten wurden mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test verglichen.

Die Quantifizierung der Atgl-Expression zeigte in *Plin2^{fl/fl}* Männchen unter HFD eine Reduktion auf 65% gegenüber *Plin2^{fl/fl}* Mäusen unter NCD. Bei *Plin2^{-/-}* Männchen unter HFD stieg die Expression von Atgl dagegen auf das 2,70-fache. Weibliche Mäuse beider Genotypen unterschieden sich unter HFD bezüglich ihres Atgl-Protein Spiegels nicht gegenüber *Plin2^{fl/fl}* Mäusen unter NCD. Unter CDAA-Diät stieg die Atgl-Protein-Expression bei männlichen *Plin2^{fl/fl}* Mäusen auf das 3,99-fache gegenüber *Plin2^{fl/fl}* unter NCD. Unter CDAA-Diät zeigten männliche *Plin2^{-/-}* Mäuse dagegen eine densitometrisch auf das 5,47-fache gesteigerte Atgl-Protein-Expression gegenüber *Plin2^{fl/fl}* Mäusen unter NCD. Unter CDAA-Diät wiesen *Plin2^{fl/fl}* Weibchen eine Expressionssteigerung um das 2,74-fache, *Plin2^{-/-}* Weibchen dagegen auf das 3,37-fache gegenüber *Plin2^{fl/fl}* Mäusen unter NCD auf.

Parallel zu Atgl wurde dessen Ko-Aktivator Abhd5 densitometrisch analysiert und quantifiziert. Hier zeigten männliche *Plin2^{-/-}* Mäuse unter NCD auf 62% verminderte Abhd5-Spiegel gegenüber *Plin2^{fl/fl}* Mäusen, weibliche *Plin2^{-/-}* Mäuse unterschieden sich gegenüber dem Wildtyp nicht. Unter HFD wurde die Expression von Abhd5 bei *Plin2^{fl/fl}* Männchen auf 60% gegenüber *Plin2^{fl/fl}* unter NCD vermindert, während sie in *Plin2^{-/-}* Männchen gegenüber *Plin2^{fl/fl}* unter NCD konstant blieb. Weibliche Mäuse

zeigten unter HFD unabhängig vom Genotyp keine veränderten Abhd5 Protein-Spiegel. Unter CDAA-Diät konnte vor allem in *Plin2*^{-/-} Mäusen beider Geschlechter eine signifikant gesteigerte Abhd5-Expression beobachtet werden. Weibliche *Plin2*^{fl/fl} Mäuse unter CDAA-Diät unterschieden sich hinsichtlich des Abhd5-Spiegels nicht von NCD gefütterten *Plin2*^{fl/fl} Weibchen, während *Plin2*^{-/-} Weibchen im Vergleich zur Kontrolle eine 2,59-fache Expressionssteigerung aufwiesen. Männliche *Plin2*^{fl/fl} Mäuse zeigten unter CDAA-Diät eine geringfügige Zunahme um das 1,26-fache gegenüber NCD. Bei männlichen *Plin2*^{-/-} Mäusen unter CDAA-Diät zeigte sich gegenüber *Plin2*^{fl/fl} Mäusen unter NCD dagegen eine Abhd5-Expressions-Zunahme auf das 2,19-fache. Zusammenfassend wiesen *Plin2*^{-/-} Mäuse tendenziell höhere Proteinspiegel von Atgl und dessen Ko-Aktivator Abhd5 auf als der Wildtyp.

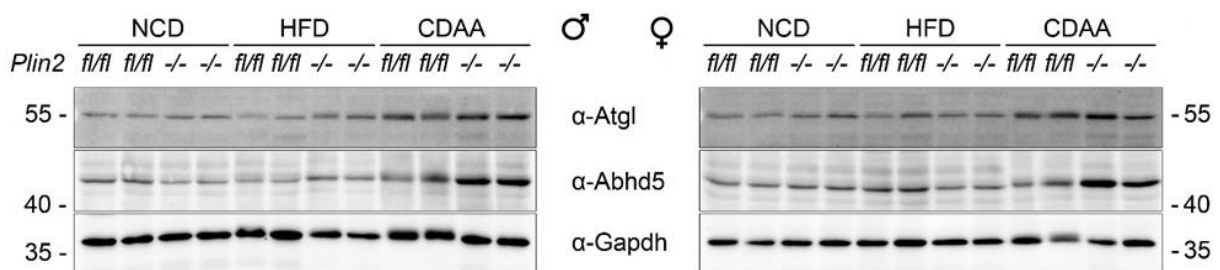


Abbildung 23 : Repräsentative Darstellung der Protein-Expression von Atgl und dessen Ko-Aktivator Abhd5 Repräsentative Darstellung der Protein-Expression aufgeteilt nach Männchen (links) und Weibchen (rechts). Immunoblots aller Proben wurden angefertigt. Zur densitometrischen Quantifizierung wurden repräsentative Proben ausgewählt und gemeinsam in einem Immunoblot entwickelt. Die densitometrischen Messwerte des jeweils untersuchten Proteins wurden auf die zugehörigen Messwerte für Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) normalisiert. *Plin2* bezieht sich auf den verwendeten N-terminalen Antikörper. Links ist das Molekulargewicht in Kilodalton (kDa) angegeben.

4.6 mRNA-Expression übergeordneter Transkriptionsfaktoren des Lipidstoffwechsels

Transkriptionsfaktoren spielen eine entscheidende Rolle in der Regulation der Expression LT-assoziiierter Proteine, Lipasen und generell am Lipidmetabolismus beteiligter Faktoren. Transkriptionsfaktoren der PPAR-Familie dienen der Adaptation des Körpers an einen Überschuss freier FS, ein pathophysiologisches Charakteristikum einer NAFLD. Sie stimulieren die Transkription von Genen der zellulären Fettsäureaufnahme, der β -Oxidation sowie durch die Aktivierung von *Srebf1* die *de-novo*-Fettsäuresynthese (93, 146-149). Im Folgenden soll nun der Einfluss des hepatischen Perilipin 2 Knock-Outs, HFDs und der CDAA-Diät auf die mRNA-Expression der aufgeführten Gene untersucht werden.

Unter HFD stieg der *Ppara*-mRNA-Spiegel bei *Plin2^{fl/fl}* Mäusen verglichen mit NCD signifikant auf das 1,28-fache an ($p_{fl/fl} = 0,011$). Die Zunahme bei *Plin2^{-/-}* Mäusen unter HFD belief sich auf das 1,48-fache ($p_{-/-} = 0,003$). Eine CDAA-Diät hatte in beiden Genotypen keinen signifikanten Einfluss auf die *Ppara*-Expression. Auffällig war die signifikante Reduktion des *Ppara*-mRNA-Spiegels bei NCD und HFD in *Plin2^{-/-}* Mäusen im Vergleich zu *Plin2^{fl/fl}* Mäusen ($FC_{NCD} = 0,60$, $p_{NCD} = 0,00043$; $FC_{HFD} = 0,70$, $p_{HFD} < 0,0001$), wohingegen unter CDAA-Diät kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen zu beobachten war.

Ebenso wurde unter HFD keine signifikante Änderung des *Ppary*-mRNA-Spiegels bei beiden Genotypen im Vergleich zu NCD nachgewiesen. Unter CDAA-Diät stieg die Expression dagegen signifikant um das 1,85-fache in *Plin2^{fl/fl}* Mäusen und um das 1,87-fache in *Plin2^{-/-}* Mäusen gegenüber NCD ($p_{fl/fl} < 0,0001$; $p_{-/-} = 0,009$). Ähnlich wie schon für *Ppara* beschrieben, wiesen alle *Plin2^{-/-}* Mäuse unabhängig von der Diät signifikant niedrigere *Ppary*-mRNA-Spiegel auf als *Plin2^{fl/fl}* Mäuse ($p_{NCD} = 0,0025$ $p_{HFD} = 0,042$ $p_{CDAA} = 0,0023$). Für beide Transkriptionsfaktoren *Ppara* und *Ppary* lässt sich also ein Trend zu einer verminderten mRNA-Expression in *Plin2^{-/-}* Mäusen gegenüber dem Wildtyp beschreiben.

Als eines der Schlüsselenzyme der *de-novo*-Lipogenese (150) wurde *Srebf1* untersucht. Für HFD und CDAA-Diät konnte im Vergleich zu NCD keine signifikante Änderung zwischen Mäusen identischen Genotyps gezeigt werden. Dagegen konnte in *Plin2^{-/-}* Mäusen eine hochsignifikante Reduktion der *Srebf1*-mRNA-Spiegel gegenüber *Plin2^{fl/fl}* Mäusen in allen Diäten nachgewiesen werden ($p_{NCD} < 0,0001$; $p_{HFD} < 0,0001$; $p_{CDAA} < 0,0001$). Am ausgeprägtesten fiel diese in *Plin2^{-/-}* Mäusen unter NCD mit einer Reduktion auf 42% gegenüber *Plin2^{fl/fl}* Mäusen unter gleicher Diät aus.

Die mRNA-Expression von *Stat3* wurde sowohl durch HFD als auch durch CDAA-Diät bei *Plin2^{fl/fl}* Mäusen verglichen mit NCD nicht signifikant beeinflusst. Interessanterweise wiesen *Plin2^{-/-}* Mäuse in allen Diäten hochsignifikant niedrigere *Stat3*-mRNA-Spiegel auf als *Plin2^{fl/fl}* Mäuse ($p_{NCD} < 0,0001$; $p_{HFD} < 0,0001$; $p_{CDAA} = 0,003$). Diese war für CDAA gefütterte *Plin2^{-/-}* Mäuse mit einer Reduktion auf 56% gegenüber *Plin2^{fl/fl}* Mäusen unter NCD am ausgeprägtesten.

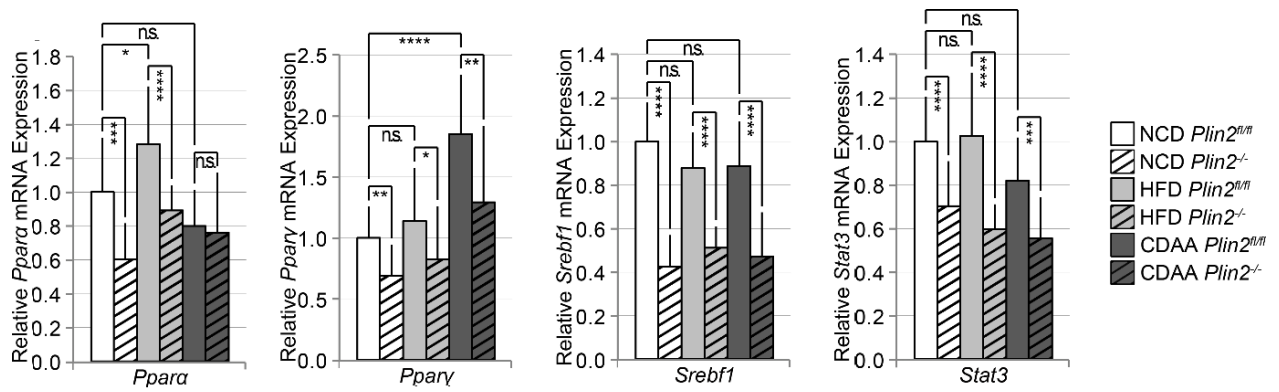


Abbildung 24: Verminderte mRNA-Expression von *Ppara*, *Pparγ* und *Srebf1* in *Plin2^{-/-}*. Mit quantitativer RT-PCR wurde die mRNA-Expression von *Ppara*, *Pparγ*, *Srebf1* und *Stat3* untersucht und mittels ΔC_T -Methode auf $\beta 2m$ normalisiert. Die Daten wurden nach Diät und Genotyp aufgeteilt und beziehen sich auf die Vervielfachung gegenüber *Plin2^{fl/fl}* unter NCD. P-Werte < 0.05 (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***), $p < 0.0001$ (****) wurden als signifikant, p-Werte > 0.05 als nicht signifikant (n.s.) betrachtet. Es wurde, sofern statistisch erlaubt, ein Students *t*-Test für zwei Stichproben ggf. mit Welch-Korrektur durchgeführt. Nicht parametrische Daten wurden mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test verglichen.

5 Diskussion

Die NAFLD und das häufig assoziierte metabolische Syndrom sind mit einer Gesamtprävalenz von ca. 25% für viele Industrienationen im 21. Jahrhundert eine der großen gesundheitlichen Herausforderungen mit hohem sozioökonomischem Schaden (2-4). Die essenzielle Rolle von Perilipin 2 bei der Assemblierung von LT und der Zusammenhang Perilipin 2-Expression mit dem Grad der Leberparenchymverfettung ist gut untersucht (43, 57). Trotz intensiver Forschung ist die exakte Rolle von Perilipin 2 bei der Genese und Progression von NAFLD, speziell bei Entzündung und Fibrogenese nur unzureichend verstanden. Um mögliche prognostische oder therapeutische Implikationen der Perilipin 2-Expression in Bezug auf NAFLD abzuleiten, ist Grundlagenforschung nötig. Verschiedene Arbeitsgruppen untersuchten die Funktion von Perilipin 2 im Mausmodell mit unterschiedlichen Knock-Out-Strategien und Interventions-Diäten mit unterschiedlichem Wirkprofil. Die Auswahl des deletierten Exons, sowie die Art und Dauer der verabreichten Diät beeinflusst die Ergebnisse erheblich und erschwert die Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Studien. Die einflussreichste Variable ist die experimentelle Unterscheidung zwischen globaler und hepatozyten-spezifischer Perilipin 2-Deletion. Während Mäuse mit einem globalen Perilipin 2-Knock-Out vollständig vor Diät-induzierter Steatose und Gewichtszunahme geschützt waren (71, 72), vermittelte die hepatozyten-spezifische Deletion von Perilipin 2 nur einen partiellen Schutz (76, 77). Aufbauend auf diesen Studien sollte in dieser Arbeit die Auswirkung eines hepatozyten-spezifischen Verlusts von Perilipin 2 unter diät-induzierter Steatose und Steatohepatitis untersucht werden. In dieser Arbeit wurde eine HFD zur Induktion einer (bilden) Steatose und eine CDAA-Diät zur Induktion einer Steatohepatitis verwendet. NCD diente als Kontrolldiät. Der in dieser Arbeit verwendete hepatozyten-spezifische Knock-Out von Perilipin 2 erfolgte *Alb-Cre* vermittelt über die Deletion von Exon 4. 7 Wochen alte männliche und weibliche *Plin2^{fl/fl}* und *Plin2^{-/-}* Mäuse wurden über einen Zeitraum von 9 Wochen mit NCD, HFD und CDAA-Diät gefüttert. Im Folgenden sollen nun mögliche Ursachen für die im Versuch beobachtete Suszeptibilität gegenüber diätinduzierter Steatose sowie die Reduktion von Entzündung und UPR-Stress in *Plin2^{-/-}* Mäusen diskutiert werden. Ebenso soll die kompensatorische Hochregulation von Perilipin 3 und 5 in *Plin2^{-/-}* Mäusen diskutiert und mit der Literatur verglichen werden.

5.1 Hepatozelluläre Perilipin 2 Deletion in der Maus schützt nicht komplett vor diätinduzierter Leberparenchymverfettung

Verglichen mit Daten von Najt et al., die einen vollständigen Verlust von Perilipin 2 auf Proteinebene detektierten (77), konnten wir mittels Realtime-PCR und Immunblot eine residuelle Perilipin 2-Expression in der Leber nachweisen. Diese konnte mit Hilfe immunhistochemischer Färbung auf HSCs und auf singuläre Hepatozyten zurückgeführt werden, die wie von Straub et al. vorbeschrieben, stark Perilipin 2 exprimieren (56). Als nicht-parenchymale Zellen der Leber exprimieren HSCs kein Albumin, sodass eine *Alb-Cre* vermittelte Deletion des Zielgens, in unserem Fall Perilipin 2 nicht stattfindet (120). Orlicky et al. konnten dies ebenfalls immunfluoreszenzmikroskopisch nachvollziehen (76). Mögliche Ursachen für das Ergebnis von Najt et al. könnten zum Beispiel die Verwendung eines von Najt et al. gegen Perilipin 2 produzierten Antikörpers oder kürzere Entwicklungszeiten im Immunblot sein, in denen eine Proteinexpression nicht nachweisbar wird. Diese Beobachtung schließt einen akzidentiellen globalen Knock-Out aus und bestätigt in Kombination mit Immunblot und IHC den erfolgreichen selektiven Knock-Out in den Hepatozyten der Versuchstiere (Vgl. Abb. 6). Die HSC-Aktivierung wird durch die Perilipin 2 vermittelte LT-Genese in den HSCs gehemmt. In primärer HSC-Kultur führte die Retinol-induzierte Hochregulation von Perilipin 2 zu einer verminderten Expression von profibrotischem ACTA2 (151). Auch dieser Faktor könnte in unserem Modell eine protektive Rolle bei der Fibrogenese spielen. Das exakte Zusammenspiel pro- und anti-apoptotischer Faktoren, sowie die Rolle der LT in Wechselwirkung zwischen UPR und ROS ist jedoch komplex und unterliegt derzeit intensiver Grundlagenforschung.

Tabelle 13: Literatur-Übersicht vergleichbarer Experimente hinsichtlich Steatose, Übergewicht, Entzündung und Fibrose.

Parameter	Globale Plin2-Deletion	Hepatozyten-spezifische Plin2-Deletion	
		Eigene Daten	Literatur
Steatose	Kompletter Schutz (72, 76)	Kein Schutz in Männchen, eingeschränkter Schutz in weiblichen <i>Plin2</i> ^{-/-} Mäusen	Eingeschränkter Schutz in männlichen Mäusen; k.A. für Weibchen (76, 77)
Übergewicht	Protektiv in beiden Geschlechtern (72)	Kein kompletter Schutz. Stärkere Gewichtszunahme in weiblichen <i>Plin2</i> ^{-/-} Mäusen unter HFD.	Kein Schutz in männlichen Mäusen; k.A. für Weibchen (76)
Entzündung	Kompletter Schutz (72, 76)	Starke Reduktion der Entzündung mit Verminderung von <i>Tnf-α</i> und UPR-Stress.	Reduktion von Entzündung mit Verminderung von <i>Tnf-α</i> (77) Keine Verminderung von <i>Tnf-α</i> (76)
Fibrose	Kompletter Schutz (76)	Starke Reduktion profibrotischer Transkriptionsfaktoren, gering verminderte Fibrose.	Kompletter Schutz (76, 77)

HFD-Diät induzierte bei männlichen Mäusen unabhängig vom Genotyp nicht nur eine signifikante Körpergewichtszunahme, sondern auch eine gemischte mikro- und makrovesikuläre Steatose in den Zonen 2 und 3 der Leber, sodass *Plin2*^{-/-} Mäuse phänotypisch kaum von Kontrolltieren zu unterscheiden waren. Verglichen mit NCD-gefütterten Tieren zeigten weibliche Tiere beider Genotypen unter HFD keine signifikante Steatose. Interessanterweise beobachteten McManaman et al. (72) in global Perilipin 2-defizienten Mäusen einen Schutz vor diätinduzierter Steatose in beiden Geschlechtern. Dieser Schutz ging mit starker Verringerung des subkutanen und epididymalen Fettgewebes einher, welches verglichen mit WT-Mäusen deutlich mikrovesikulärer strukturiert war. Im Fettgewebe ist Perilipin 2 für die LT-Assemblierung und Adipogenese unerlässlich. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der isolierte Verlust von Perilipin 2 in der Leber unter HFD offensichtlich kompensiert werden kann. Unsere Ergebnisse aus Immunblot und IHC zeigen eine mögliche Kompensation des Verlusts von Perilipin 2 durch Perilipin 3 und 5. Physiologischerweise lokalisieren Perilipin 3 und Perilipin 5 insbesondere an kleinen, aber kaum an großen LT, während die Perilipin 2-Expression kontinuierlich mit Steatosegrad und LT-Durchmesser zunimmt (58). Perilipin 2 wird demnach vor

allem zur Bildung großer LT benötigt, sodass eine Größenlimitierung durch die LT-Stabilisationskapazität von Perilipin 3 und Perilipin 5 naheliegend wäre. Diese hierarchische Betrachtungsweise könnte eine mögliche Erklärung für die in *Plin2*^{-/-} Mäusen gesteigerte Perilipin 3 und Perilipin 5-Expression an kleinen LT sein. In *Plin2*^{-/-} Mäusen war jedoch keine rein mikrovesikuläre Steatose, sondern ein vielmehr gemischt steatotisches Bild mit großen LT nachweisbar. Große Perilipin 3- und 5-positive LT traten diätunabhängig vor allem in *Plin2*^{-/-} Mäusen auf, deutlich seltener hingegen bei WT-Mäusen. Vergleichbare Ergebnisse beschrieben Orlicky et al. mittels Immunfluoreszenzmikroskopie (76). Möglicherweise führt der Verlust von Perilipin 2 zu einer Rekrutierung anderer LT-assoziiertes Proteine an LT, wie zuvor schon für Atgl und Perilipin 3 gezeigt wurde. Als mögliche Ursache dafür wurde die besondere Affinität von Perilipin 2 zu *a priori* hydrophoben LT vermutet. Durch die Bindung von Perilipin 2 werden diese hydrophiler und lösen sich besser im Zytosol. In Abwesenheit von Perilipin 2 könnten andere Perilipine diesen anti-hydrophoben Effekt kompensieren (70, 152). Dies wäre auch für Perilipin 5 denkbar. Diese Hypothese wird von der gesteigerten Atgl und Abhd5-Expression in unserem Versuch unterstützt, welche mit Perilipin 5 an der LT-Oberfläche interagieren (60, 85, 86, 115). Eine CDAA-Diät steigerte den Steatosegrad gegenüber HFD und NCD in männlichen Mäusen beider Genotypen erheblich und induzierte eine nicht zonal gebundene Steatose. Analog zu unseren Beobachtungen in der HFD-Gruppe waren *Plin2*^{-/-} Mäuse nicht signifikant besser vor einer Steatose geschützt als WT-Mäuse. Najt et al. und Orlicky et al. untersuchten bereits das Vorliegen einer Steatohepatitis an Mäusen mittels eines hepatozyten-spezifischen Perilipin 2-Knock-Out-Modells unter MCD (77) oder WD (76) und beobachteten einen eingeschränkten Schutz vor diätinduzierter Steatose. Diese entwickelte sich unter WD ebenfalls in den Zonen 2 und 3 (76). Unter WD war diese in *Plin2*^{-/-} Mäusen aber auf die Zone 2 beschränkt und makrovesikulär. Kontrolltiere entwickelten dagegen ebenfalls eine nicht zonal gebundene, gemischt-tropfige Steatose (76). Ergänzend zu den bisherigen hepatozyten-spezifischen Perilipin 2-Deletions-Modellen (76, 77), konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass weibliche Mäuse im Gegensatz zu männlichen Mäusen partiell vor CDAA-induzierter Steatose geschützt sind. Männliche *Plin2*^{-/-} Mäuse unter NCD und CDAA-Diät wiesen ein signifikant höheres Körpergewicht auf als WT-Mäuse. Unter HFD war dagegen bei beiden Genotypen eine starke Gewichtszunahme zu beobachten, die sich aber statistisch nicht signifikant unterschied. Orlicky et al.

konnten unter WD keinen genotyp-spezifischen Unterschied nachweisen, aber analog zu unseren Ergebnissen eine signifikante Gewichtszunahme gegenüber NCD. Erst die globale Perilipin 2-Deletion verhinderte signifikant eine diätinduzierte Gewichtszunahme. Perilipin 2 besitzt somit sowohl eine intra- als auch extra-hepatische Rolle bei der Induktion von Steatose unter Steatohepatitis induzierender Diät (76). Ursächlich dafür dürfte die weitestgehend uneingeschränkte LT-Reifung im subkutanen und epididymalen Fettgewebe (eWAT) der *Plin2*^{-/-} Mäuse mit hepatozyten-spezifischem Knock-Out sein. Dennoch stellt sich die Frage, wie sich in männlichen *Plin2*^{-/-} Mäusen trotz des hepatischen Knock-Outs eines substanziiell an der Steatogenese beteiligten PAT-Proteins eine Steatose entwickeln konnte. Wir beobachteten bezüglich der *de-novo*-Lipogenese keine diätinduzierte Zunahme der *Srebf1*-mRNA in *Plin2*^{-/-} Mäusen, diese wiesen grundsätzlich niedrigere *Srebf1*-mRNA-Spiegel auf als *Plin2*^{fl/fl} Mäuse. Orlicky et al. kamen durch analoge Ergebnisse zu der Annahme, dass der hepatozyten-spezifische Effekt der Perilipin 2-Deletion möglicherweise auf einer Hemmung der *de-novo*-Lipogenese beruhen könnte (76). Unsere Daten zur *Srebf1*-Expression unterstützen die Hypothese einer durch hepatische Perilipin 2-Defizienz gehemmten *de-novo*-Lipogenese. Die Spaltung von SREBP-cleavage-activating protein (SCAP) und SREBF1 wird, analog zur klassischen Induktion durch Cholesterin, durch ER-Stress induziert, was die *de-novo*-Lipogenese steigert (153, 154). Es wäre denkbar, dass der Schutz vor UPR-Stress, repräsentiert durch *Chop/Perk* und die verminderte *de-novo*-Lipogenese, repräsentiert durch *Srebf1*, durch den hepatischen Perilipin 2-Verlust in unserem Versuch kausal zusammenhängen.

Zwar konnten wir gegenüber dem WT eine starke Reduktion des *Pparγ*-mRNA Spiegels in *Plin2*^{-/-} Mäusen in allen Diäten beobachten, jedoch wurde die Aktivierung von *Pparγ* durch CDAA-Diät in unserem Versuch durch hepatozyten-spezifische Perilipin 2-Deletion nicht inhibiert. Orlicky et al. zeigten ebenso eine Induktion von *Pparγ*-mRNA in *Plin2*^{-/-} Mäusen unter WD. Eine verminderte Aktivierung der *Pparγ*-Signalkaskade zeigte sich nur im globalen Knock-Out, woraus die Autoren diesbezüglich auf einen peripheren Effekt von Perilipin 2 schlussfolgerten (76). Die Aktivierung der *Pparγ*-Signalkaskade fördert bekanntermaßen die hepatische Aufnahme von FS und fördert so die Steatogenese, was den steatotischen Phänotyp in unserem Versuch erklären könnte (22).

5.2 *Tnf- α* wird via hepatischem Perilipin 2 durch CDAA-Diät stärker beeinflusst als durch WD

Interessanterweise waren die *Tnf- α* -mRNA-Spiegel der *Plin2*^{-/-} Mäuse unter CDAA-Diät gegenüber dem Wildtyp zwar signifikant verringert, jedoch konnte die Zunahme des hepatischen *Tnf- α* -mRNA-Spiegels gegenüber der NCD-Gruppe auch bei *Plin2*^{-/-} Mäusen unter CDAA-Diät nicht komplett verhindert werden. Orlicky et al. (76) beobachteten unter WD eine Induktion von *Tnf- α* in beiden Genotypen, die sich im Gegensatz zu unserem Versuch nicht signifikant unterschied. Zusätzlich wurde von Orlicky et al. die *Tnf- α* -Expression im eWAT untersucht und gezeigt, dass diese in murinem eWAT und Lebergewebe nur durch globalen Perilipin 2-Knock-Out, nicht aber durch hepatozyten-spezifischen Knock-Out gegenüber WT-Mäusen verringert war. Der hepatozyten-spezifische Knock-Out von Perilipin 2 zeigte bezüglich *Tnf- α* zwar einen gewissen antiinflammatorischen Effekt, jedoch scheint dieser in unserem Versuch durch CDAA-Diät stärker zum Tragen zu kommen als durch WD (76) oder HFD. Es ist anzunehmen, dass ein globaler Perilipin 2-Knock-Out gegenüber dem hepatozyten-spezifischen Knock-Out eine deutlich stärkere Reduktion der *Tnf- α* Expression gegenüber dem WT induziert.

5.3 Antientzündlicher Effekt und Verminderung von Zelltod durch hepatozelluläre Perilipin 2-Deletion

Plin2^{-/-} Mäuse wiesen im HE-Schnitt gegenüber *Plin2*^{fl/fl} Mäusen eine starke Reduktion histologisch detektierbarer Zelluntergänge, Immunzellfoci, sowie ballonierter Hepatozyten auf. Auf mRNA-Ebene zeigten *Plin2*^{-/-} Mäuse signifikant niedrigere Entzündungs- und Apoptose-Marker wie *Ptgs2*, *Tnf- α* und *Stat3*. Um die Ursache der verminderten Zelluntergänge genauer beschreiben zu können, wurde zudem die mRNA-Expression der *Chop-Perk*-Signalkaskade untersucht, dessen Aktivierung als Ausdruck von UPR-Stress gewertet werden kann (139). Es konnte gezeigt werden, dass die *Chop-Perk*-Signalkaskade bei *Plin2*^{fl/fl} Mäusen durch CDAA-Diät hochreguliert wird. *Plin2*^{-/-} Mäuse waren dagegen vor der CDAA-vermittelten *Chop-Perk*-Aktivierung geschützt. Die verminderte Aktivität der *Chop-Perk*-Signalkaskade in *Plin2*^{-/-} Mäusen war in unserem Versuch bereits unter NCD zu beobachten. Najt et al. (77) beobachteten die verminderte *Chop-Perk*-Aktivierung in *Plin2*^{-/-} gegenüber

Plin2^{fl/fl} Mäusen nur unter MCD, wohingegen unter NCD nur ein Trend erkennbar war. Eine mögliche Einflussvariable könnte die durch MCD limitierte Versuchsdauer von 15 Tagen sein. Es ist bekannt, dass UPR-Stress und Expression von *Chop* mit steigendem Alter zunehmen (155, 156). Unsere Daten unterstützen die Hypothese, dass der Verlust von hepatozellulärem Perilipin 2 bereits in der gesunden Leber einen inhibitorischen Effekt auf die Expression von *Chop* und *Perk* ausübt. Somit scheint der hepatische Perilipin 2-Verlust nicht nur weniger UPR-Stress unter CDAA-Diät zu verursachen, sondern auch einen „präventiven“ Effekt unter NCD zu besitzen. Tsai et al. (157) zeigten, dass global Perilipin 2-defiziente Mäuse bereits ohne UPR-Stress-induzierende Tunicamycin-Behandlung eine gesteigerte Autophagie aufwiesen, was ihnen hilft, bei dieser schneller auf die anfallenden ungefalteten Proteine zu reagieren. Dies manifestierte sich ebenfalls in verringerten Perk und Chop Protein-Spiegeln in Knock-Out Mäusen und konnte durch den zusätzlichen Knock-Down des Autophagy related Protein 7 (Atg7) rückgängig gemacht werden. Libby et al. (71) beobachteten bei global Perilipin 2-defizienten Mäusen nach 30-wöchiger WD ebenfalls eine gegenüber dem WT signifikante Reduktion von Chop- und Perk-Protein. Das analoge Verhalten von *Chop* und *Perk* in unserem hepatozyten-spezifischen Setting legt nahe, dass die Reduktion von UPR-Stress lokal durch den Verlust von Perilipin 2 verursacht ist. Im Umkehrschluss unterstützen diese Beobachtungen die Hypothese, dass Perilipin 2 im Rahmen einer NASH UPR-Stress mitverursacht, was sich in Zelluntergängen und ballonierten Hepatozyten manifestiert.

5.4 Verwertbarkeit der GPT- und GOT-Werte

Die in *Plin2^{-/-}* Mäusen tendenziell gegenüber dem Wildtyp erhöhten GPT- und GOT-Werte im Serum korrelierten nicht bzw. zum Teil invers mit den Ergebnissen aus histologischen und molekularbiologischen Untersuchungen, sodass die Aussagekraft dieser Serum-Biomarker zumindest im Umfeld der Grundlagenforschung fraglich bleibt. Hier könnte zum einen die Präanalytik, z.B. durch Messung von unverdünntem Serum, als auch die Messmethode selbst modifiziert werden, um weniger stark streuende Ergebnisse zu generieren. Um hierbei die Tierschutzaufgaben, welche die maximal entnehmbaren Blutvolumina limitieren, einhalten zu können, könnte in Zukunft mit Mess-Apparaturen, die geringere Serumvolumina benötigen, gearbeitet werden. Es besteht die Möglichkeit, dass der Leberschaden zu gering und die Beobachtungsdauer durch das Versuchsdesign zu kurz sind, um eindeutige

Ergebnisse mit dieser Methode zu erzielen. Zudem liegt der klinische Nutzen nicht-invasiver Serum-Tests, darunter auch der GOT/GPT-Quotient vor allem in deren hohen negativen prädiktiven Wert. Der positiv prädiktive Wert für das tatsächliche Vorliegen einer CLD bei auffälligen Werten wird dagegen meist nur als moderat eingeschätzt (158). Einen höheren prognostischen Wert zum Erkennen einer NASH bietet in der Klinik z.B. der Index aus GOT und Thrombozytenzahl (APRI) (159). Der Rückschluss von klinischen Daten auf unseren Tierversuch, in welchem zudem GPT- und GOT-Wert getrennt analysiert wurden, ist allerdings nur eingeschränkt möglich. Dennoch zeigen auch unsere Daten das erhöhte Serumleberwerte und der Goldstandard Histologie keine strenge Korrelation aufweisen, was in der klinischen Praxis bedacht werden muss.

5.5 Verhindert Perilipin 2 die Lokalisation von Perilipin 5 an Lipidtropfen über UPR-Stress?

Perilipin 2 spielt in der Leber eine essenzielle Rolle bei der LT-Genese. Seine protektive Rolle gegenüber LT-Hydrolyse ist gut untersucht (57, 72, 76, 160). Dies wirft die Frage auf, welche Lipidtropfen-assoziierten Proteine den Verlust von Perilipin 2 in der Leber kompensieren und wo diese während der LT-Genese lokalisieren. *Plin2*^{-/-} Mäuse zeigten insbesondere unter HFD und CDAA-Diät deutlich reduzierte *Plin5*-mRNA-Spiegel, jedoch konnte auf Proteinebene eine starke Zunahme unabhängig von der verabreichten Diät beobachtet werden. Selbst bei einem nahezu vollständigen Fehlen von LT ist in *Plin2*^{-/-} Mäusen unter NCD mehr Perilipin 5 vorhanden (Vgl. Abb 20). Najt et al. (77) konnten bei *Plin2*^{-/-} Mäusen unter MCD gegenüber dem WT einen Trend hin zu erhöhten hepatischen Perilipin 5-Spiegeln im Immunblot beobachten. Unter NCD wurde dagegen kein genotypspezifischer Effekt beobachtet. Orlicky et al. (76) zeigten im Vergleich zu NCD immunfluoreszenzmikroskopisch eine erhöhte Expression von Perilipin 3 und 5 unter WD in *Plin2*^{-/-} Mäusen. Diese Beobachtung ist kongruent mit unseren immunhistochemischen Daten. Im globalen Knock-Out unter WD konnten Libby et al. (71) gegenüber dem WT eine signifikante Abnahme von *Plin3*- und *Plin5*-mRNA beobachten. Eine kompensatorische Übernahme der Perilipin 2-Funktion durch Perilipin 3 und 5 auf Proteinebene fand jedoch nicht statt, was wohl auch im kompletten Schutz vor Leberparenchymverfettung durch den Knock-Out begründet ist. Zum ersten Mal konnten wir in einem hepatozyten-spezifischen Perilipin 2 Knock-Out-Modell die Herabregulation der *Plin5*-mRNA bei gleichzeitig deutlich

erhöhten Protein-Spiegeln nachweisen. Dies zeigt, dass Perilipin 3 und 5 bei lokal hohem TAG-Angebot in der Lage sind, die Funktion von Perilipin 2 in der Leber zu übernehmen. Ein möglicher Erklärungsansatz wäre ein Stabilisations-Mechanismus der *Plin5*-mRNA, sodass das quantitativ reduzierte Transkript insbesondere unter HFD und CDAA-Diät vermehrt translatiert werden kann. Unter NCD war der Perilipin 5-Spiegel in *Plin2*^{-/-} Mäusen bei im Vergleich zum WT konstanter mRNA-Konzentration erhöht. Denkbar wäre eine Interferenz von Chop, Perk oder UPR-Stress im Allgemeinen mit der Transkription von Perilipin 5. Die Verminderung dieser Faktoren in *Plin2*^{-/-} Mäusen könnte im Umkehrschluss die Translation von Perilipin 5 steigern. Ob die Verminderung von *Chop* und *Perk* in *Plin2*^{-/-} Mäusen in allen Diäten mit der gleichzeitigen Steigerung der Perilipin 5 kausal zusammenhängt oder nur ein Zufallsbefund ist, müsste jedoch weiter untersucht werden. Für Perilipin 2 und andere LT-assoziierten Proteine wurde bereits gezeigt, dass diese im Zytosol vermehrt über den Ubiquitin/Proteasom-Weg abgebaut werden (161, 162). Unter der Prämisse, dass dieser Prozess auch für LT-ungebundenes Perilipin 3 und 5 gilt, könnte unabhängig vom UPR-Stress die gesteigerte LT-Lokalisation von Perilipin 3 und 5 bei *Plin2*^{-/-} Mäusen eine intensive Translation, wie diese im WT stattfindet, überflüssig machen, da Perilipin 3 und 5 in *Plin2*^{-/-} Mäusen durch die LT-Assoziation vor dem proteasomalen Abbau im Zytosol besser geschützt sind als der WT. Darüber hinaus zeigten Gemmink et al. (163) mittels Stimulated Emission Depletion (STED)-Konfokalmikroskopie, dass Perilipin 2 und Perilipin 5 auf LT als räumlich getrennte Cluster auftreten und nicht, wie ursprünglich vermutet, homogen kolokalisieren. Insbesondere Perilipin 5-Cluster scheinen als Bindeglied (sog. Teathering von Organellen) zwischen LT und Mitochondrien zu dienen. Perilipin 5 rekrutiert Mitochondrien mit einer 20 Aminosäuren langen Sequenz am C-terminalen Ende. Dies verbessert die Kanalisierung von FS aus den Mitochondrien in LT und schützt die Mitochondrien vor Lipotoxizität (164). Auf diese Weise könnte durch gesteigerte Perilipin 5-Expression auch in unserem Versuch Lipotoxizität und UPR-Stress verringert werden, was die verminderten *Chop*- und *Perk*-Spiegel erklären würde. Zusammengefasst verringert Perilipin 5 durch verbesserte LT-Mitochondrien-Interaktion UPR-Stress, was wiederum die Perilipin 5-Expression steigern könnte. In Abwesenheit von hepatischem Perilipin 2 könnte sich dieser Mechanismus selbst verstärken. Die aufgeführten Ergebnisse stützen die Hypothese einer Abschwächung des sog. „Second Hits“ durch die hepatozyten-spezifische Perilipin 2-Deletion, sodass

es unter Spezial-Diäten zwar zur Leberparenchymverfettung kommt, die Entzündung und Immuninfiltration jedoch weitestgehend verhindert werden kann. Perspektivisch ergibt sich aus dieser Beobachtung die Frage nach der Rolle der hepatozyten-spezifischen Perilipin 2-Deletion in der Entstehung des HCCs, insbesondere im modulierten immuninflammatorischen Milieu der *Plin2*^{-/-} Mäuse.

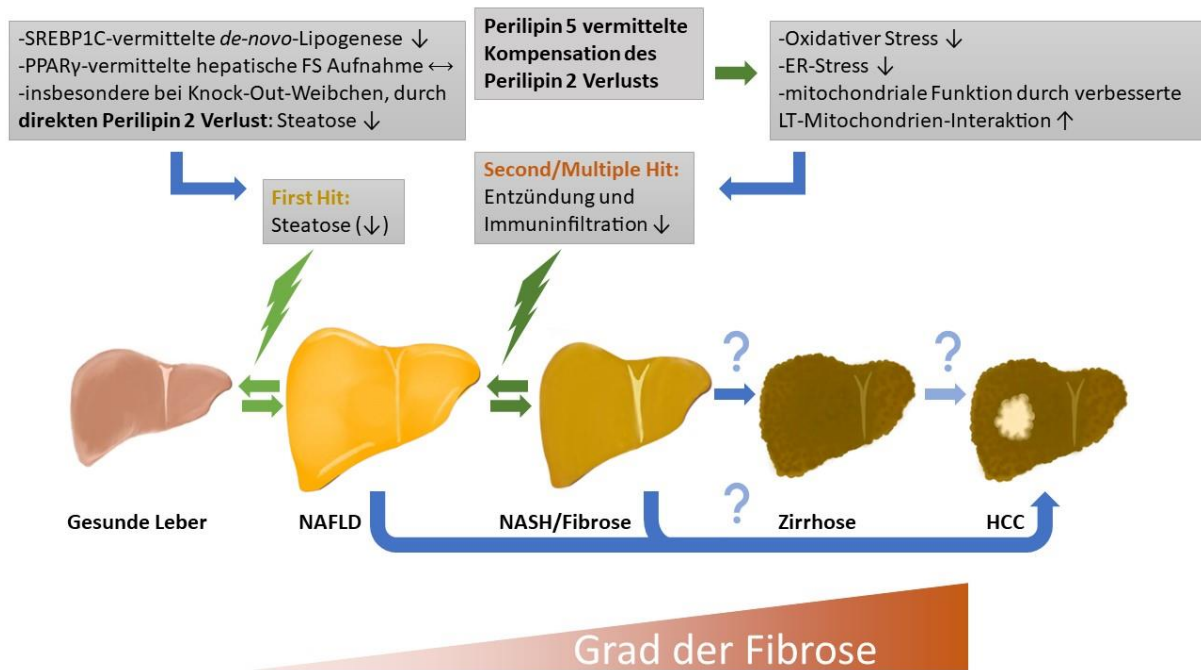


Abbildung 25: Effekte der Perilipin 5 vermittelten Kompensation des hepatischen Perilipin 2 Verlusts in Bezug auf Abb. 1 in der Einleitung. Der „Second Hit“ wird stärker abgeschwächt als der „First Hit“.

5.6 Geschlechtsspezifische Unterschiede bei der Genese Diät-induzierter Steatohepatitis

Weibliche *Plin2*^{fl/fl} Mäuse nahmen unter HFD deutlich weniger an Gewicht zu als männliche *Plin2*^{fl/fl} Mäuse. Ebenso entwickelten Weibchen beider Genotypen unter HFD keine oder nur eine geringe Steatose. Dagegen war die Gewichtszunahme für weibliche *Plin2*^{-/-} Mäuse unter HFD doppelt so hoch wie für weibliche *Plin2*^{fl/fl} Mäuse, welche keinen Unterschied zu NCD gefütterten Tieren zeigten. Die unter HFD fehlende Steatose weiblicher *Plin2*^{-/-} Mäuse in Kombination mit erhöhter Gewichtszunahme ist eine überraschende Beobachtung. Während der globale Perilipin 2-Knock-Out auch bei Weibchen einen starken Schutz vor diätinduzierter Gewichtszunahme bietet (72, 76), scheint der hepatozyten-spezifische Knock-Out für

Weibchen unter HFD den gegenteiligen Effekt zu haben. Es ist bekannt, dass der erhöhte Östrogenspiegel des weiblichen Organismus sowohl bei Tiermodellen als auch beim Menschen einen protektiven Effekt auf die Entwicklung einer Steatose besitzt. An Ratten konnten durch Ovariectomie die hepatische Lipogenese und so auch der hepatische TAG-Gehalt gesteigert werden. Bei Ovariectomie und gleichzeitiger Östrogen-Substitution dagegen war kein solcher Effekt zu beobachten (165). Damit konsistent zeigen retrospektive Daten ovariectomierter, prämenopausaler Patientinnen ein um das 1,85-fache steigendes Risiko für NAFLD (166). Die beschriebene Steatose-Resistenz durch Östrogen wird mit dem beobachteten Phänotyp der weiblichen *Plin2^{fl/fl}* Mäuse unter HFD unterstützt. Die paradoxerweise gesteigerte Gewichtszunahme in weiblichen *Plin2^{-/-}* Mäusen unter HFD konnte bisher jedoch nicht erklärt werden. Es wäre in Zukunft interessant, Adipozyten weiblicher *Plin2^{-/-}* Mäuse hinsichtlich der Expression von *Sreb1f*, *Ppara*, *Pparγ* oder anderen in den Metabolismus von Adipozyten involvierten Genen zu untersuchen. Dies könnte möglicherweise zusätzliche Einblicke in den Crosstalk zwischen Leber und Fettgewebe, sowie die Rolle von Östrogen bei der Entwicklung von Adipositas und NAFLD bieten. Zuletzt unterstreicht der phänotypische Unterschied selektiv in weiblichen Mäusen unter HFD die Relevanz einer geschlechtsparitätischen Versuchsplanung. Nicht nur im Hinblick auf die Grundlagenforschung zur NAFLD ließe sich durch diese Maßnahme großes wissenschaftliches Potenzial ausschöpfen, welches die Verallgemeinerbarkeit auf die Grundgesamtheit verbessert und im besten Fall neue therapeutische Implikationen bieten könnte.

5.7 Klinischer Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit an *Plin2^{-/-}* Mäusen skizzieren hinsichtlich der Verringerung einer Steatohepatitis das Bild eines klinisch erstrebenswerten Phänotyps. Auch wenn die diätinduzierte Steatose in *Plin2^{-/-}* Mäusen überwiegend persistierte, scheint eine Progression zur NASH und perspektivisch zur Leberfibrose zumindest verzögert zu sein. Eine gezielte pharmakologische Intervention gegen Perilipin 2 ist jedoch problematisch, da Perilipin 2 ubiquitär exprimiert wird. Zum derzeitigen Zeitpunkt existieren keine Therapiekonzepte oder (prä)klinischen Studien dieser Art. Nichtsdestotrotz könnte insbesondere eine selektive hepatische Intervention gegen Perilipin 2 zur Therapie der entzündlichen Komponente einer NASH von hohem klinischem Nutzen sein. Das Nebenwirkungsprofil einer solchen

Substanz wäre möglicherweise verträglicher als ein ebenfalls hypothetischer systemischer Perilipin 2 Antagonist. In einem systemischen Therapie-Konzept müssten die gesamten aufgenommenen und möglicherweise auch die in den Adipozyten gespeicherten TAGs den Organismus wieder über den Verdauungstrakt verlassen, was erhebliches Nebenwirkungspotenzial birgt. Zudem sollte grundsätzlich bedacht werden, dass sich die Forschungsergebnisse eines artifiziellen Versuchsaufbaus, wie auch in dieser Arbeit dargestellt, nicht uneingeschränkt von der Maus auf den Menschen übertragen lassen. Eine perspektivisch näherliegende Möglichkeit der pharmakologischen Intervention bieten PPAR γ -Agonisten, wie z.B. Pioglitazon. Diese wurden ursprünglich als orale Antidiabetika entwickelt, werden aber seit 2011 wegen eines ungünstigen Nebenwirkungsprofils (Verschlimmerung von Osteoporose, Herzinsuffizienz und Cholestase) nicht mehr von den gesetzlichen Krankenversicherungen übernommen (167, 168). Cusi et al. zeigten 2016 in einer randomisiert kontrollierten Studie mit lediglich 101 Teilnehmern mit Prädiabetes oder Typ 2 Diabetes eine hochsignifikante metabolische und histologische Verbesserung der Steatohepatitis bei 3-jähriger Behandlung mit Pioglitazon. Die Autoren betonten aber die Notwendigkeit einer präziseren Stratifizierung hinsichtlich Vorerkrankungen, welche für die o.g. Nebenwirkungen prädestinieren. Desweiteren konnte keiner der in der Studie untersuchten klinischen Parameter eine verlässliche Vorhersage über das Therapieansprechen treffen. In Anbetracht der unter Pioglitazon-Therapie starken Reduktion von ballonierten Hepatozyten (169), welche vermehrt Perilipin 2 exprimieren (170), könnte eine initiale histologische Quantifizierung der hepatischen Perilipin 2-Expression diese notwendige Stratifizierung ermöglichen. Weiterführende Forschung hinsichtlich der Frage, ob sich hepatisches Perilipin 2 als prädiktiver Biomarker für den Erfolg einer PPAR γ -Agonisten-Therapie eignet, wäre an dieser Stelle notwendig. Dies würde für eine ausgewählte PatientInnen-Subgruppe eine günstige und wirksame Substanz in der NASH-Therapie zur Verfügung stellen. Zudem geben unsere Daten weitere Hinweise darauf, dass Perilipin 5 einen protektiven Effekt auf die Progression einer NASH besitzt. Deshalb wäre es interessant, den Quotienten von Perilipin 2 zu Perilipin 5 als prognostischen Biomarker zu validieren. Erwies sich dieser als verlässlich, könnte man Hochrisiko-PatientInnen frühzeitig identifizieren, Empfehlungen zu intensiverer pharmakologischer und nicht-pharmakologischer Therapie der NASH aussprechen oder von potenziell hepatotoxischen Therapieregimen anderer Krankheiten abraten. Es ist darüber hinaus bekannt, dass

hepatisches Perilipin 5 durch intermittierendes Fasten induziert wird, was die hepatische Autophagie SIRT1-abhängig fördert und antientzündlich wirkt (171). Der protektive Effekt von Perilipin 5 auf die Progression einer NASH, der durch unsere Daten unterstützt wird, könnte mit einer derartigen Diät-Intervention genutzt werden. Die praktische Umsetzung einer alleinigen Ernährungsberatung liefert häufig nur unbefriedigende Ergebnisse hinsichtlich der histologischen Verbesserung einer NASH sowie des Gewichtsverlusts, sodass die Kombination aus gesteigerter physischer Aktivität, gut angeleiteten behavioralen Strategien, und effektiver Kalorienrestriktion notwendig ist. Dieses Therapiekonzept ist zwar prinzipiell wirksam, erfordert aber sowohl von PatientInnen- als auch von therapeutischer Seite nicht zu vernachlässigende Adhärenz und Engagement (172). Hier könnte die bariatrische Chirurgie, deren Effekt auf den Gewichtsverlust und Insulinresistenz gut belegt ist, den Interventions-Prozess unterstützen (173). Unsere Daten legen gemeinsam mit jenen von Orlicky et al. (76) nahe, dass der hepatozyten-spezifische Verlust von Perilipin 2 unter anderem über eine Verminderung der Srebf1-abhängigen *de-novo*-Lipogenese zur Verringerung von Steatose und Steatohepatitis führt. Eine kürzlich durchgeführte Studie von Ju et al. (174) untersuchte die Inhibition von Srebf1 mittels des NEDD8 („neural-precursor-cell-expressed developmentally down-regulated 8“)-Inhibitors MLN4924/Pevonedistat an Mäusen. Die Substanz wurde in höherer Dosierung zur Behandlung myeloproliferativer Neoplasien entwickelt und befindet sich diesbezüglich in klinischer Erprobung (175). Bereits in niedrigerer Dosierung beschrieben Ju et al. eine Inhibition der Neddylierung von Srebf1. Diese dient dazu, Srebf1 zu stabilisieren, was als antagonistischer Prozess zur Ubiquitinierung verstanden werden darf. MLN4924 konnte so die Expression von Srebf1 und die HFD-induzierte Steatose in Mäusen signifikant reduzieren (174). Auch wenn der direkte therapeutische Nutzen von Perilipin 2 aktuell beschränkt ist, scheint die pharmakologische Intervention dessen Up-Stream-Zielstrukturen, wie SREBF1 oder PPAR γ , eine vielversprechende Option zur zukünftigen Behandlung einer NASH darzustellen, die weitere präklinische und klinische Untersuchung verdient.

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde der Effekt des hepatozyten-spezifischen Knock-Outs von Perilipin 2 auf eine diätinduzierte Steatose und Steatohepatitis mittels 9-wöchiger Diät an Mäusen beider Geschlechter untersucht. Der hepatozyten-spezifische Knock-Out schützte weder komplett vor diätinduzierter Steatose noch vor Gewichtszunahme. Im Gegenteil nahmen weibliche *Plin2*^{-/-} Mäuse unter HFD sogar stärker zu. Allerdings führte der Knock-Out zu einer starken Reduktion der histologisch entzündlichen Aktivität der NASH, sowie zu signifikant niedrigeren *Tnf-α*, *Ptgs2*, *Stat3*, *Chop* und *Perk*-Spiegeln auf mRNA-Ebene. Der hepatische Verlust von Perilipin 2 in Hepatozyten schien in allen untersuchten Diäten durch Perilipin 3 und 5, hinsichtlich der Aufrechterhaltung der Integrität von LT kompensiert zu werden. Perilipin 5 lokalisierte in *Plin2*^{-/-} Mäusen stärker an LT, was sowohl die LT als auch Perilipin 5 selbst stabilisiert. Dies könnte ein möglicher Erklärungsansatz für die in unserem Versuch verringerte Transkription von Perilipin 5 sein. Anknüpfend an die Erkenntnisse anderer Arbeitsgruppen unterstützen wir die Hypothese, dass die diätinduzierte Steatose bei isoliertem hepatischen Perilipin 2-Verlust durch eine ungehemmte Aktivierung der *Pparγ*-Signalkaskade vermittelt ist, während die *de-novo*-Lipogenese gehemmt wird. Eine mögliche Ursache für die *de-novo*-Lipogenese-Hemmung könnte die reduzierte Induktion von Srebf1 durch UPR-Stress darstellen. Ursache für die Reduktion von UPR-Stress könnte wiederum die gesteigerte Expression von Perilipin 5 sein. Für Perilipin 5 wurde bereits eine Mediatorrolle in der Interaktion von LT mit Mitochondrien beschrieben, sodass *Plin2*^{-/-} Mäuse in unserem Versuch möglicherweise Perilipin 5-vermittelt besser auf Lipotoxizität reagieren konnten. Anders als männliche Mäuse nahmen weibliche *Plin2*^{-/-} Mäuse unter HFD stärker an Gewicht zu als WT-Mäuse, obwohl beide weiblichen Genotypen vor Steatose in der Leber geschützt waren. Dies konnte nicht hinreichend erklärt werden und unterstreicht die Bedeutung einer geschlechts-paritätischen Versuchsplanung in Tierversuchen und klinischen Studien. Perilipin 2 stellt auf Grund seines ubiquitären Vorkommens im Organismus derzeit kein geeignetes pharmakologisches Ziel dar, jedoch dürfte die Intervention von Signalkaskaden, die regulatorisch auf Perilipin 2 wirken, klinisch vielversprechend sein. In der Literatur beschriebene Beispiele hierfür sind Pioglitazon oder MLN4924 als Inhibitoren von PPARγ respektive SREBF1. Perspektivisch besteht diesbezüglich noch erhebliches Forschungspotential, die

Hoffnung besteht aber, dass eine NASH in Zukunft seine Rolle als Treiber des metabolischen Syndroms verliert.

Anhang

Tabelle 14: Quantitative Bestimmung des GOT-Werts in [U/l] im venösen Blut zu Beginn des Versuchs (0. Woche). Ab dann wurden die Werte bis zum Versuchsende in Woche 9 in zweiwöchentlichen Abständen bestimmt. Innerhalb der Versuchsgruppen wurde der Durchschnittswert mit Standardabweichung bestimmt und angegeben.

Geschlecht	Genotyp	Diät	0	2	4	6	8	9
♂	<i>Plin2^{fl/fl}</i>	NCD	64.7 ± 16.4	63.1 ± 11.2	62.4 ± 10.5	67.4 ± 10.6	84.3 ± 27.9	72.8 ± 12.0
		HFD	57.8 ± 7.0	74.8 ± 27.6	100.9 ± 23.8	115.2 ± 22.9	117.0 ± 53.3	125.3 ± 63.5
		CDAA	72.6 ± 17.9	295.1 ± 112.4	313.8 ± 160.0	268.4 ± 94.4	248.7 ± 38.2	275.6 ± 101.6
	<i>Plin2^{-/-}</i>	NCD	70.9 ± 18.3	130.9 ± 86.3	51.9 ± 3.3	57.5 ± 4.5	56.4 ± 7.8	60.3 ± 9.7
		HFD	53.5 ± 10.4	125.3 ± 77.5	94.5 ± 18.5	139.4 ± 53.3	122.7 ± 53.6	154.7 ± 49.5
		CDAA	55.0 ± 14.1	458.6 ± 299.7	210.5 ± 64.0	435.5 ± 163.4	338.7 ± 171.9	180.8 ± 85.2
♀	<i>Plin2^{fl/fl}</i>	NCD	65.8 ± 14.5	75.9 ± 24.9	67.8 ± 15.5	69.2 ± 16.9	76.9 ± 21.5	73.6 ± 25.1
		HFD	75.0 ± 21.9	73.4 ± 9.9	76.4 ± 7.0	74.1 ± 7.5	73.6 ± 7.1	79.4 ± 12.0
		CDAA	80.6 ± 18.0	155.7 ± 117.4	211.6 ± 92.7	205.1 ± 33.3	190.6 ± 41.3	176.9 ± 26.8
	<i>Plin2^{-/-}</i>	NCD	60.9 ± 6.6	63.9 ± 9.9	61.8 ± 7.7	66.6 ± 15.4	66.3 ± 7.1	68.2 ± 7.5
		HFD	61.1 ± 5.6	78.3 ± 29.1	73.1 ± 3.8	63.5 ± 23.7	87.7 ± 12.6	83.6 ± 10.8
		CDAA	64.3 ± 14.1	117.7 ± 23.0	119.6 ± 45.7	181.7 ± 74.6	168.4 ± 56.1	170.4 ± 120.3

Tabelle 15: Quantitative Bestimmung des GPT-Werts in [U/l] im venösen Blut zu Beginn des Versuchs (0. Woche). Ab dann wurden die Werte bis zum Versuchsende in Woche 9 in zweiwöchentlichen Abständen bestimmt. Innerhalb der Versuchsgruppen wurde der Durchschnittswert mit Standardabweichung bestimmt und angegeben.

Geschlecht	Genotyp	Diät	0	2	4	6	8	9
♂	<i>Plin2^{fl/fl}</i>	NCD	26.0 ± 3.9	27.8 ± 5.6	22.9 ± 3.5	29.2 ± 4.8	34.1 ± 9.8	28.9 ± 4.7
		HFD	18.8 ± 3.9	27.7 ± 8.6	43.4 ± 15.0	55.6 ± 24.2	59.1 ± 36.9	72.6 ± 56.9
		CDAA	19.9 ± 8.7	178.6 ± 72.6	166.8 ± 80.4	125.2 ± 44.5	119.4 ± 42.3	126.5 ± 34.3
	<i>Plin2^{-/-}</i>	NCD	33.0 ± 9.2	41.1 ± 22.9	23.9 ± 3.5	27.5 ± 3.4	29.6 ± 4.3	29.03 ± 6.8
		HFD	20.8 ± 2.7	63.2 ± 57.9	47.0 ± 17.4	76.2 ± 34.1	109.0 ± 81.7	157.8 ± 110.5
		CDAA	24.0 ± 5.5	633.0 ± 519.3	322.0 ± 112.8	703.7 ± 317.9	562.3 ± 368.1	258.8 ± 115.4
♀	<i>Plin2^{fl/fl}</i>	NCD	19.7 ± 5.1	23.6 ± 2.7	19.9 ± 3.7	24.2 ± 7.3	22.9 ± 3.8	22.3 ± 2.8
		HFD	23.1 ± 10.1	21.1 ± 3.3	20.6 ± 5.2	19.9 ± 2.1	23.2 ± 3.8	24.6 ± 8.1
		CDAA	20.3 ± 9.5	78.8 ± 48.9	136.1 ± 79.3	123.1 ± 32.3	116.4 ± 49.0	105.2 ± 33.5
	<i>Plin2^{-/-}</i>	NCD	19.9 ± 2.9	23.3 ± 3.4	20.8 ± 2.3	24.0 ± 4.3	24.6 ± 2.2	26.1 ± 4.5
		HFD	19.5 ± 1.3	24.4 ± 4.0	25.5 ± 3.4	28.9 ± 11.6	29.7 ± 6.5	31.8 ± 7.9
		CDAA	19.7 ± 2.2	82.8 ± 29.2	80.0 ± 51.0	144.2 ± 86.0	118.0 ± 53.2	126.0 ± 97.3

Tabelle 16 : Zusammensetzung und Nährwerte der Spezialdiäten. Die Angaben zur CDAA-Diät sind hellgrau, jene zur HFD weiß hinterlegt.

Diät	CDAA	HFD	Diät	CDAA	HFD
Produkt-Nummer	S8251-E061	E15742-30	Leucin [%]	0,60	2,42
Protein [%]	12,10	24,40	Phenylalanin [%]	0,72	1,27
Fett [%]	15,00	34,60	Glycin [%]	0,61	0,52
Ballaststoffe %	5,00	6,00	Glutamat [%]	2,86	5,50
Roh-Asche [%]	2,80	5,30	Glutamin [%]	————	————
Stärke [%]	9,60	0,10	Aspartat [%]	1,57	1,82
Zucker [%]	41,60	9,40	Prolin [%]	0,75	2,80
Lysin [%]	0,71	2,02	Serin [%]	0,72	1,46
Methionin [%]	0,17	0,86	Alanin [%]	0,51	0,81
Cystin [%]	0,37	0,45	Cholin mg/kg	————	1,140
Threonin [%]	0,45	1,07	Natrium [%]	0,22	0,20
Tryptophan [%]	0,18	0,33	Kalium [%]	0,36	0,97
Arginin [%]	1,25	0,95	Calcium [%]	0,52	0,92
Histidin [%]	0,34	0,74	Brennwert MJ/kg	18,40	25,00
Valin [%]	0,62	1,70	Kcal _{Protein} / Kcal _Σ [%]	11,00	20,00
Isoleucin [%]	0,60	1,38	Kcal _{Fett} / Kcal _Σ [%]	31,00	60,00
			Kcal _{Kohlenhydrat} / Kcal _Σ [%]	58,00	20,00

7 Literaturverzeichnis

1. Younossi ZM, Stepanova M, Afendy M, Fang Y, Younossi Y, Mir H, et al. Changes in the prevalence of the most common causes of chronic liver diseases in the United States from 1988 to 2008. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2011;9(6):524-30 e1; quiz e60.
2. Younossi Z, Anstee QM, Marietti M, Hardy T, Henry L, Eslam M, et al. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2018;15(1):11-20.
3. Bellentani S. The epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2017;37 Suppl 1:81-4.
4. Blachier M, Leleu H, Peck-Radosavljevic M, Valla DC, Roudot-Thoraval F. The burden of liver disease in Europe: a review of available epidemiological data. *J Hepatol*. 2013;58(3):593-608.
5. Kanwal F, Shubrook JH, Younossi Z, Natarajan Y, Bugianesi E, Rinella ME, et al. Preparing for the NASH epidemic: A call to action. *Metabolism*. 2021;122:154822.
6. Asrani SK, Devarbhavi H, Eaton J, Kamath PS. Burden of liver diseases in the world. *J Hepatol*. 2019;70(1):151-71.
7. Paik JM, Golabi P, Younossi Y, Mishra A, Younossi ZM. Changes in the Global Burden of Chronic Liver Diseases From 2012 to 2017: The Growing Impact of NAFLD. *Hepatology*. 2020;72(5):1605-16.
8. Gupta A, Das A, Majumder K, Arora N, Mayo HG, Singh PP, et al. Obesity is Independently Associated With Increased Risk of Hepatocellular Cancer-related Mortality: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Am J Clin Oncol*. 2018;41(9):874-81.
9. Ertle J, Dechêne A, Sowa JP, Penndorf V, Herzer K, Kaiser G, et al. Non-alcoholic fatty liver disease progresses to hepatocellular carcinoma in the absence of apparent cirrhosis. *Int J Cancer*. 2011;128(10):2436-43.
10. Anstee QM, Reeves HL, Kotsiliti E, Govaere O, Heikenwalder M. From NASH to HCC: current concepts and future challenges. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2019.
11. Hallsworth K, Thoma C, Moore S, Ploetz T, Anstee QM, Taylor R, et al. Non-alcoholic fatty liver disease is associated with higher levels of objectively measured sedentary behaviour and lower levels of physical activity than matched healthy controls. *Frontline Gastroenterol*. 2015;6(1):44-51.
12. Anstee QM, Targher G, Day CP. Progression of NAFLD to diabetes mellitus, cardiovascular disease or cirrhosis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013;10(6):330-44.
13. E. Roeb AC, H. Bantel, J. Bojunga, J. de Laffolie, M. Demir, U. W. Denzer, A. Geier, W. P. Hofmann,, C. Hudert TK, M. Krawczyk, T. Longerich, T. Luedde, M. Roden, J. Schattenberg, M. Sterneck,, A. Tannapfel PL, F. Tacke. S2k Leitlinie Nicht-alkoholische Fettlebererkrankungen. AWMF. 2022;1.
14. Kaplan JM, Alexis J, Grimaldi G, Islam M, Izzard SM, Lee T-P. A comparison of magnetic resonance elastography (MRE) to biomarker testing for staging fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Translational Gastroenterology and Hepatology*. 2022;8.

15. Bedossa P, Poitou C, Veyrie N, Bouillot JL, Basdevant A, Paradis V, et al. Histopathological algorithm and scoring system for evaluation of liver lesions in morbidly obese patients. *Hepatology*. 2012;56(5):1751-9.
16. Brunt EM. Pathology of nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2010;7(4):195-203.
17. Richardson MM, Jonsson JR, Powell EE, Brunt EM, Neuschwander-Tetri BA, Bhathal PS, et al. Progressive fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis: association with altered regeneration and a ductular reaction. *Gastroenterology*. 2007;133(1):80-90.
18. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005;41(6):1313-21.
19. Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology*. 1998;114(4):842-5.
20. Kissebah AH, Tulloch BR, Hope-Gill H, Clarke PV, Vydellingum N, Fraser TR. Mode of insulin action. *Lancet (London, England)*. 1975;1(7899):144-7.
21. Latasa MJ, Moon YS, Kim KH, Sul HS. Nutritional regulation of the fatty acid synthase promoter in vivo: sterol regulatory element binding protein functions through an upstream region containing a sterol regulatory element. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(19):10619-24.
22. Inoue M, Ohtake T, Motomura W, Takahashi N, Hosoki Y, Miyoshi S, et al. Increased expression of PPARgamma in high fat diet-induced liver steatosis in mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;336(1):215-22.
23. Hardy T, Oakley F, Anstee QM, Day CP. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Pathogenesis and Disease Spectrum. *Annu Rev Pathol*. 2016;11:451-96.
24. Nguyen P, Leray V, Diez M, Serisier S, Le Bloc'h J, Siliart B, et al. Liver lipid metabolism. *Journal of animal physiology and animal nutrition*. 2008;92(3):272-83.
25. Adiels M, Taskinen MR, Packard C, Caslake MJ, Soro-Paavonen A, Westerbacka J, et al. Overproduction of large VLDL particles is driven by increased liver fat content in man. *Diabetologia*. 2006;49(4):755-65.
26. Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism*. 2016;65(8):1038-48.
27. Robertson G, Leclercq I, Farrell GC. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. II. Cytochrome P-450 enzymes and oxidative stress. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2001;281(5):G1135-9.
28. Harding HP, Zhang Y, Zeng H, Novoa I, Lu PD, Calton M, et al. An Integrated Stress Response Regulates Amino Acid Metabolism and Resistance to Oxidative Stress. *Molecular Cell*. 2003;11(3):619-33.
29. González-Rodríguez A, Mayoral R, Agra N, Valdecantos MP, Pardo V, Miquilena-Colina ME, et al. Impaired autophagic flux is associated with increased endoplasmic reticulum stress during the development of NAFLD. *Cell Death Dis*. 2014;5(4):e1179.
30. Serviddio G, Bellanti F, Tamborra R, Rollo T, Capitanio N, Romano AD, et al. Uncoupling protein-2 (UCP2) induces mitochondrial proton leak and increases susceptibility of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) liver to ischaemia-reperfusion injury. *Gut*. 2008;57(7):957.
31. van Koppen A, Verschuren L, van den Hoek AM, Verheij J, Morrison MC, Li K, et al. Uncovering a Predictive Molecular Signature for the Onset of NASH-Related Fibrosis in a Translational NASH Mouse Model. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2018;5(1):83-98 e10.

32. Mari M, Caballero F, Colell A, Morales A, Caballeria J, Fernandez A, et al. Mitochondrial free cholesterol loading sensitizes to TNF- and Fas-mediated steatohepatitis. *Cell metabolism*. 2006;4(3):185-98.
33. Uzbekov R, Roingard P. Nuclear lipid droplets identified by electron microscopy of serial sections. *BMC research notes*. 2013;6:386-.
34. Sztalryd C, Brasaemle DL. The perilipin family of lipid droplet proteins: Gatekeepers of intracellular lipolysis. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2017;1862(10 Pt B):1221-32.
35. Walther TC, Chung J, Jr. RVF. Lipid Droplet Biogenesis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 2017;33(1):491-510.
36. Welte MA, Gould AP. Lipid droplet functions beyond energy storage. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2017;1862(10 Pt B):1260-72.
37. Fredrikson G, Belfrage P. Positional specificity of hormone-sensitive lipase from rat adipose tissue. *J Biol Chem*. 1983;258(23):14253-6.
38. Smirnova E, Goldberg EB, Makarova KS, Lin L, Brown WJ, Jackson CL. ATGL has a key role in lipid droplet/adiposome degradation in mammalian cells. *EMBO Rep*. 2006;7(1):106-13.
39. Vaughan M, Berger JE, Steinberg D. HORMONE-SENSITIVE LIPASE AND MONOGLYCERIDE LIPASE ACTIVITIES IN ADIPOSE TISSUE. *J Biol Chem*. 1964;239:401-9.
40. Krahmer N, Farese RV, Jr., Walther TC. Balancing the fat: lipid droplets and human disease. *EMBO Mol Med*. 2013;5(7):973-83.
41. Neuschwander-Tetri BA. Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: the central role of nontriglyceride fatty acid metabolites. *Hepatology*. 2010;52(2):774-88.
42. Garbarino J, Sturley SL. Saturated with fat: new perspectives on lipotoxicity. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*. 2009;12(2):110-6.
43. Heid HW, Moll R, Schwetlick I, Rackwitz HR, Keenan TW. Adipophilin is a specific marker of lipid accumulation in diverse cell types and diseases. *Cell Tissue Res*. 1998;294(2):309-21.
44. Bickel PE, Tansey JT, Welte MA. PAT proteins, an ancient family of lipid droplet proteins that regulate cellular lipid stores. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1791(6):419-40.
45. Greenberg AS, Egan JJ, Wek SA, Garty NB, Blanchette-Mackie EJ, Londos C. Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets. *J Biol Chem*. 1991;266(17):11341-6.
46. Jiang HP, Harris SE, Serrero G. Molecular cloning of a differentiation-related mRNA in the adipogenic cell line 1246. *Cell Growth Differ*. 1992;3(1):21-30.
47. Jiang HP, Serrero G. Isolation and characterization of a full-length cDNA coding for an adipose differentiation-related protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(17):7856-60.
48. Díaz E, Pfeffer SR. TIP47: a cargo selection device for mannose 6-phosphate receptor trafficking. *Cell*. 1998;93(3):433-43.
49. Wolins NE, Rubin B, Brasaemle DL. TIP47 associates with lipid droplets. *J Biol Chem*. 2001;276(7):5101-8.
50. Scherer PE, Bickel PE, Kotler M, Lodish HF. Cloning of cell-specific secreted and surface proteins by subtractive antibody screening. *Nat Biotechnol*. 1998;16(6):581-6.

51. Yamaguchi T, Matsushita S, Motojima K, Hirose F, Osumi T. MLDP, a novel PAT family protein localized to lipid droplets and enriched in the heart, is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *J Biol Chem*. 2006;281(20):14232-40.
52. Bickel PE, Tansey JT, Welte MA. PAT proteins, an ancient family of lipid droplet proteins that regulate cellular lipid stores. *Biochimica et biophysica acta*. 2009;1791(6):419-40.
53. Lu X, Gruia-Gray J, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Londos C, et al. The murine perilipin gene: the lipid droplet-associated perilipins derive from tissue-specific, mRNA splice variants and define a gene family of ancient origin. *Mamm Genome*. 2001;12(9):741-9.
54. Rowe ER, Mimmack ML, Barbosa AD, Haider A, Isaac I, Ouberai MM, et al. Conserved Amphipathic Helices Mediate Lipid Droplet Targeting of Perilipins 1-3. *J Biol Chem*. 2016;291(13):6664-78.
55. Hickenbottom SJ, Kimmel AR, Londos C, Hurley JH. Structure of a Lipid Droplet Protein: The PAT Family Member TIP47. *Structure*. 2004;12(7):1199-207.
56. Servetnick DA, Brasaemle DL, Gruia-Gray J, Kimmel AR, Wolff J, Londos C. Perilipins are associated with cholesteryl ester droplets in steroidogenic adrenal cortical and Leydig cells. *J Biol Chem*. 1995;270(28):16970-3.
57. Straub BK, Stoeffel P, Heid H, Zimbelmann R, Schirmacher P. Differential pattern of lipid droplet-associated proteins and de novo perilipin expression in hepatocyte steatogenesis. *Hepatology*. 2008;47(6):1936-46.
58. Pawella LM, Hashani M, Eiteneuer E, Renner M, Bartenschlager R, Schirmacher P, et al. Perilipin discerns chronic from acute hepatocellular steatosis. *J Hepatol*. 2014;60(3):633-42.
59. Brasaemle DL, Rubin B, Harten IA, Gruia-Gray J, Kimmel AR, Londos C. Perilipin A increases triacylglycerol storage by decreasing the rate of triacylglycerol hydrolysis. *J Biol Chem*. 2000;275(49):38486-93.
60. Granneman JG, Moore H-PH, Krishnamoorthy R, Rathod M. Perilipin controls lipolysis by regulating the interactions of AB-hydrolase containing 5 (Abhd5) and adipose triglyceride lipase (Atgl). *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(50):34538-44.
61. Gandotra S, Lim K, Grousse A, Saudek V, O'Rahilly S, Savage DB. Human frame shift mutations affecting the carboxyl terminus of perilipin increase lipolysis by failing to sequester the adipose triglyceride lipase (ATGL) coactivator AB-hydrolase-containing 5 (ABHD5). *J Biol Chem*. 2011;286(40):34998-5006.
62. Holm C. Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Biochemical Society Transactions*. 2003;31(6):1120.
63. Clifford GM, Londos C, Kraemer FB, Vernon RG, Yeaman SJ. Translocation of hormone-sensitive lipase and perilipin upon lipolytic stimulation of rat adipocytes. *J Biol Chem*. 2000;275(7):5011-5.
64. Burns TW, Terry BE, Langley PE, Robison GA. Insulin Inhibition of Lipolysis of Human Adipocytes: The Role of Cyclic Adenosine Monophosphate. *Diabetes*. 1979;28(11):957-61.
65. Tansey JT, Sztalryd C, Gruia-Gray J, Roush DL, Zee JV, Gavrilova O, et al. Perilipin ablation results in a lean mouse with aberrant adipocyte lipolysis, enhanced leptin production, and resistance to diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(11):6494-9.

66. Gandotra S, Le Dour C, Bottomley W, Cervera P, Giral P, Reznik Y, et al. Perilipin deficiency and autosomal dominant partial lipodystrophy. *N Engl J Med*. 2011;364(8):740-8.
67. Straub BK, Gyoengyoesi B, Koenig M, Hashani M, Pawella LM, Herpel E, et al. Adipophilin/perilipin-2 as a lipid droplet-specific marker for metabolically active cells and diseases associated with metabolic dysregulation. *Histopathology*. 2013;62(4):617-31.
68. Miura S, Gan JW, Brzostowski J, Parisi MJ, Schultz CJ, Londos C, et al. Functional conservation for lipid storage droplet association among Perilipin, ADRP, and TIP47 (PAT)-related proteins in mammals, *Drosophila*, and *Dictyostelium*. *J Biol Chem*. 2002;277(35):32253-7.
69. Bell M, Wang H, Chen H, McLenithan JC, Gong DW, Yang RZ, et al. Consequences of lipid droplet coat protein downregulation in liver cells: abnormal lipid droplet metabolism and induction of insulin resistance. *Diabetes*. 2008;57(8):2037-45.
70. Sztalryd C, Bell M, Lu X, Mertz P, Hickenbottom S, Chang BH, et al. Functional compensation for adipose differentiation-related protein (ADFP) by Tip47 in an ADFP null embryonic cell line. *J Biol Chem*. 2006;281(45):34341-8.
71. Libby AE, Bales E, Orlicky DJ, McManaman JL. Perilipin-2 Deletion Impairs Hepatic Lipid Accumulation by Interfering with Sterol Regulatory Element-binding Protein (SREBP) Activation and Altering the Hepatic Lipidome. *J Biol Chem*. 2016;291(46):24231-46.
72. McManaman JL, Bales ES, Orlicky DJ, Jackman M, MacLean PS, Cain S, et al. Perilipin-2-null mice are protected against diet-induced obesity, adipose inflammation, and fatty liver disease. *J Lipid Res*. 2013;54(5):1346-59.
73. Chang BH, Li L, Paul A, Taniguchi S, Nannegari V, Heird WC, et al. Protection against fatty liver but normal adipogenesis in mice lacking adipose differentiation-related protein. *Mol Cell Biol*. 2006;26(3):1063-76.
74. Chang BH, Li L, Saha P, Chan L. Absence of adipose differentiation related protein upregulates hepatic VLDL secretion, relieves hepatosteatosis, and improves whole body insulin resistance in leptin-deficient mice. *J Lipid Res*. 2010;51(8):2132-42.
75. Griffin JD, Salter DM, Bowman T, Greenberg A. Role of Hepatic PLIN2 and PLIN4 in The Development of Western Type Diet Induced Hepatosteatosis. *The FASEB Journal*. 2017;31(1_supplement):458.3-3.
76. Orlicky DJ, Libby AE, Bales ES, McMahan RH, Monks J, La Rosa FG, et al. Perilipin-2 promotes obesity and progressive fatty liver disease in mice through mechanistically distinct hepatocyte and extra-hepatocyte actions. *The Journal of physiology*. 2019;597(6):1565-84.
77. Najt CP, Senthivinayagam S, Aljazi MB, Fader KA, Olenic SD, Brock JR, et al. Liver-specific loss of Perilipin 2 alleviates diet-induced hepatic steatosis, inflammation, and fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2016;310(9):G726-38.
78. Bulankina AV, Deggerich A, Wenzel D, Mutenda K, Wittmann JG, Rudolph MG, et al. TIP47 functions in the biogenesis of lipid droplets. *J Cell Biol*. 2009;185(4):641-55.
79. Carr RM, Patel RT, Rao V, Dhir R, Graham MJ, Crooke RM, et al. Reduction of TIP47 improves hepatic steatosis and glucose homeostasis in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2012;302(8):R996-1003.

80. Čopič A, Antoine-Bally S, Giménez-Andrés M, La Torre Garay C, Antony B, Manni MM, et al. A giant amphipathic helix from a perilipin that is adapted for coating lipid droplets. *Nature Communications*. 2018;9(1):1332.
81. Wolins NE, Skinner JR, Schoenfish MJ, Tzekov A, Bensch KG, Bickel PE. Adipocyte protein S3-12 coats nascent lipid droplets. *J Biol Chem*. 2003;278(39):37713-21.
82. Chen W, Chang B, Wu X, Li L, Sleeman M, Chan L. Inactivation of Plin4 downregulates Plin5 and reduces cardiac lipid accumulation in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2013;304(7):E770-9.
83. Pourteymour S, Lee S, Langleite TM, Eckardt K, Hjorth M, Bindesboll C, et al. Perilipin 4 in human skeletal muscle: localization and effect of physical activity. *Physiological reports*. 2015;3(8).
84. Hashani M, Witzel HR, Pawella LM, Lehmann-Koch J, Schumacher J, Mechttersheimer G, et al. Widespread expression of perilipin 5 in normal human tissues and in diseases is restricted to distinct lipid droplet subpopulations. *Cell Tissue Res*. 2018;374(1):121-36.
85. Granneman JG, Moore HP, Mottillo EP, Zhu Z. Functional interactions between Mldp (LSDP5) and Abhd5 in the control of intracellular lipid accumulation. *J Biol Chem*. 2009;284(5):3049-57.
86. Granneman JG, Moore HP, Mottillo EP, Zhu Z, Zhou L. Interactions of perilipin-5 (Plin5) with adipose triglyceride lipase. *J Biol Chem*. 2011;286(7):5126-35.
87. Mason RR, Mokhtar R, Matzaris M, Selathurai A, Kowalski GM, Mokbel N, et al. PLIN5 deletion remodels intracellular lipid composition and causes insulin resistance in muscle. *Mol Metab*. 2014;3(6):652-63.
88. Zimmermann R, Strauss JG, Haemmerle G, Schoiswohl G, Birner-Gruenberger R, Riederer M, et al. Fat Mobilization in Adipose Tissue Is Promoted by Adipose Triglyceride Lipase. *Science*. 2004;306(5700):1383.
89. Villena JA, Roy S, Sarkadi-Nagy E, Kim KH, Sul HS. Desnutrin, an adipocyte gene encoding a novel patatin domain-containing protein, is induced by fasting and glucocorticoids: ectopic expression of desnutrin increases triglyceride hydrolysis. *J Biol Chem*. 2004;279(45):47066-75.
90. Jenkins CM, Mancuso DJ, Yan W, Sims HF, Gibson B, Gross RW. Identification, cloning, expression, and purification of three novel human calcium-independent phospholipase A2 family members possessing triacylglycerol lipase and acylglycerol transacylase activities. *J Biol Chem*. 2004;279(47):48968-75.
91. Schreiber R, Xie H, Schweiger M. Of mice and men: The physiological role of adipose triglyceride lipase (ATGL). *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2019;1864(6):880-99.
92. Eichmann TO, Kumari M, Haas JT, Farese RV, Jr., Zimmermann R, Lass A, et al. Studies on the substrate and stereo/regioselectivity of adipose triglyceride lipase, hormone-sensitive lipase, and diacylglycerol-O-acyltransferases. *J Biol Chem*. 2012;287(49):41446-57.
93. Roy D, Farabaugh KT, Wu J, Charrier A, Smas C, Hatzoglou M, et al. Coordinated transcriptional control of adipocyte triglyceride lipase (Atgl) by transcription factors Sp1 and peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) during adipocyte differentiation. *Journal of Biological Chemistry*. 2017;292(36):14827-35.
94. Nielsen TS, Vendelbo MH, Jessen N, Pedersen SB, Jørgensen JO, Lund S, et al. Fasting, But Not Exercise, Increases Adipose Triglyceride Lipase (ATGL) Protein

- and Reduces G(0)/G(1) Switch Gene 2 (G0S2) Protein and mRNA Content in Human Adipose Tissue. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2011;96(8):E1293-E7.
95. Pagnon J, Matzaris M, Stark R, Meex RCR, Macaulay SL, Brown W, et al. Identification and Functional Characterization of Protein Kinase A Phosphorylation Sites in the Major Lipolytic Protein, Adipose Triglyceride Lipase. *Endocrinology*. 2012;153(9):4278-89.
96. Nagy HM, Paar M, Heier C, Moustafa T, Hofer P, Haemmerle G, et al. Adipose triglyceride lipase activity is inhibited by long-chain acyl-coenzyme A. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2014;1841(4):588-94.
97. Lass A, Zimmermann R, Haemmerle G, Riederer M, Schoiswohl G, Schweiger M, et al. Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome. *Cell metabolism*. 2006;3(5):309-19.
98. Haemmerle G, Lass A, Zimmermann R, Gorkiewicz G, Meyer C, Rozman J, et al. Defective lipolysis and altered energy metabolism in mice lacking adipose triglyceride lipase. *Science*. 2006;312(5774):734-7.
99. Fredrikson G, Strålfors P, Nilsson NO, Belfrage P. Hormone-sensitive lipase of rat adipose tissue. Purification and some properties. *J Biol Chem*. 1981;256(12):6311-20.
100. Kraemer FB, Patel S, Saedi MS, Sztalryd C. Detection of hormone-sensitive lipase in various tissues. I. Expression of an HSL/bacterial fusion protein and generation of anti-HSL antibodies. *J Lipid Res*. 1993;34(4):663-71.
101. Sekiya M, Osuga J, Yahagi N, Okazaki H, Tamura Y, Igarashi M, et al. Hormone-sensitive lipase is involved in hepatic cholesteryl ester hydrolysis. *J Lipid Res*. 2008;49(8):1829-38.
102. Lee FT, Adams JB, Garton AJ, Yeaman SJ. Hormone-sensitive lipase is involved in the hydrolysis of lipoidal derivatives of estrogens and other steroid hormones. *Biochim Biophys Acta*. 1988;963(2):258-64.
103. Albert JS, Yerges-Armstrong LM, Horenstein RB, Pollin TI, Sreenivasan UT, Chai S, et al. Null mutation in hormone-sensitive lipase gene and risk of type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2014;370(24):2307-15.
104. Baulande S, Lasnier F, Lucas M, Pairault J. Adiponutrin, a transmembrane protein corresponding to a novel dietary- and obesity-linked mRNA specifically expressed in the adipose lineage. *J Biol Chem*. 2001;276(36):33336-44.
105. Pirazzi C, Valenti L, Motta BM, Pingitore P, Hedfalk K, Mancina RM, et al. PNPLA3 has retinyl-palmitate lipase activity in human hepatic stellate cells. *Human molecular genetics*. 2014;23(15):4077-85.
106. Bruschi FV, Tardelli M, Claudel T, Trauner M. PNPLA3 expression and its impact on the liver: current perspectives. *Hepatic medicine : evidence and research*. 2017;9:55-66.
107. Huang Y, He S, Li JZ, Seo YK, Osborne TF, Cohen JC, et al. A feed-forward loop amplifies nutritional regulation of PNPLA3. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(17):7892-7.
108. Dubuquoy C, Robichon C, Lasnier F, Langlois C, Dugail I, Foufelle F, et al. Distinct regulation of adiponutrin/PNPLA3 gene expression by the transcription factors ChREBP and SREBP1c in mouse and human hepatocytes. *J Hepatol*. 2011;55(1):145-53.

109. Singal AG, Manjunath H, Yopp AC, Beg MS, Marrero JA, Gopal P, et al. The effect of PNPLA3 on fibrosis progression and development of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol.* 2014;109(3):325-34.
110. Bruschi FV, Claudel T, Tardelli M, Caligiuri A, Stulnig TM, Marra F, et al. The PNPLA3 I148M variant modulates the fibrogenic phenotype of human hepatic stellate cells. *Hepatology.* 2017;65(6):1875-90.
111. Kantartzis K, Rettig I, Staiger H, Machann J, Schick F, Scheja L, et al. An extended fatty liver index to predict non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetes Metab.* 2017;43(3):229-39.
112. Chen W, Chang B, Li L, Chan L. Patatin-like phospholipase domain-containing 3/adiponutrin deficiency in mice is not associated with fatty liver disease. *Hepatology.* 2010;52(3):1134-42.
113. Li JZ, Huang Y, Karaman R, Ivanova PT, Brown HA, Roddy T, et al. Chronic overexpression of PNPLA3I148M in mouse liver causes hepatic steatosis. *The Journal of clinical investigation.* 2012;122(11):4130-44.
114. Smagris E, BasuRay S, Li J, Huang Y, Lai KM, Gromada J, et al. Pnpla3I148M knockin mice accumulate PNPLA3 on lipid droplets and develop hepatic steatosis. *Hepatology.* 2015;61(1):108-18.
115. Witzel HR, Schwittai IMG, Hartmann N, Mueller S, Schattenberg JM, Gong XM, et al. PNPLA3(I148M) Inhibits Lipolysis by Perilipin-5-Dependent Competition with ATGL. *Cells.* 2022;12(1).
116. Russell TD, Palmer CA, Orlicky DJ, Bales ES, Chang BH, Chan L, et al. Mammary glands of adipophilin-null mice produce an amino-terminally truncated form of adipophilin that mediates milk lipid droplet formation and secretion. *J Lipid Res.* 2008;49(1):206-16.
117. Kohjima M, Tsai T-H, Tackett BC, Thevananther S, Li L, Chang BH-J, et al. Delayed liver regeneration after partial hepatectomy in adipose differentiation related protein-null mice. *Journal of Hepatology.* 2013;59(6):1246-54.
118. Kellendonk C, Opherk C, Anlag K, Schutz G, Tronche F. Hepatocyte-specific expression of Cre recombinase. *Genesis.* 2000;26(2):151-3.
119. Coffinier C, Gresh L, Fiette L, Tronche F, Schutz G, Babinet C, et al. Bile system morphogenesis defects and liver dysfunction upon targeted deletion of HNF1beta. *Development.* 2002;129(8):1829-38.
120. Postic C, Shiota M, Niswender KD, Jetton TL, Chen Y, Moates JM, et al. Dual Roles for Glucokinase in Glucose Homeostasis as Determined by Liver and Pancreatic β Cell-specific Gene Knock-outs Using Cre Recombinase*. *Journal of Biological Chemistry.* 1999;274(1):305-15.
121. Tornai D, Furi I, Shen ZT, Sigalov AB, Coban S, Szabo G. Inhibition of Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 1 Ameliorates Inflammation and Macrophage and Neutrophil Activation in Alcoholic Liver Disease in Mice. *Hepatol Commun.* 2018;3(1):99-115.
122. Gong H, Sun L, Chen B, Han Y, Pang J, Wu W, et al. Evaluation of candidate reference genes for RT-qPCR studies in three metabolism related tissues of mice after caloric restriction. *Scientific reports.* 2016;6:38513-.
123. Zou S, Zhu L, Huang K, Luo H, Xu W, He X. Adipose tissues of MPC1(\pm) mice display altered lipid metabolism-related enzyme expression levels. *PeerJ.* 2018;6:e5799-e.

124. Zhao X, Qi R, Sun C, Xie Y. Silencing SOCS3 could inhibit TNF- α induced apoptosis in 3T3-L1 and mouse preadipocytes. *Molecular Biology Reports*. 2012;39(9):8853-60.
125. Martinez EF, Demasi APD, Napimoga MH, Arana-Chavez VE, Altemani A, de Araújo NS, et al. In vitro influence of the extracellular matrix in myoepithelial cells stimulated by malignant conditioned medium. *Oral Oncology*. 2012;48(2):102-9.
126. van Diepen JA, Wong MC, Guigas B, Bos J, Stienstra R, Hodson L, et al. Hepatocyte-specific IKK- β activation enhances VLDL-triglyceride production in APOE*3-Leiden mice. *Journal of lipid research*. 2011;52(5):942-50.
127. Pamir N, McMillen TS, Edgel KA, Kim F, LeBoeuf RC. Deficiency of lymphotoxin- α does not exacerbate high-fat diet-induced obesity but does enhance inflammation in mice. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2012;302(8):E961-E71.
128. Shostak A, Meyer-Kovac J, Oster H. Circadian regulation of lipid mobilization in white adipose tissues. *Diabetes*. 2013;62(7):2195-203.
129. Aoki R, Aoki-Yoshida A, Suzuki C, Takayama Y. Protective Effect of Indole-3-Pyruvate against Ultraviolet B-Induced Damage to Cultured HaCaT Keratinocytes and the Skin of Hairless Mice. *PLOS ONE*. 2014;9(5):e96804.
130. Douglass JD, Zhou YX, Wu A, Zadroga JA, Gajda AM, Lackey AI, et al. Global deletion of MGL in mice delays lipid absorption and alters energy homeostasis and diet-induced obesity. *J Lipid Res*. 2015;56(6):1153-71.
131. Laperrousaz E, Denis RG, Kassis N, Contreras C, López M, Luquet S, et al. Lipoprotein Lipase Expression in Hypothalamus Is Involved in the Central Regulation of Thermogenesis and the Response to Cold Exposure. *Frontiers in Endocrinology*. 2018;9(103).
132. Yang L, Han Z, Tian L, Mai P, Zhang Y, Wang L, et al. Sphingosine 1-Phosphate Receptor 2 and 3 Mediate Bone Marrow-Derived Monocyte/Macrophage Motility in Cholestatic Liver Injury in Mice. *Scientific reports*. 2015;5:13423-.
133. Saito A, Ochiai K, Kondo S, Tsumagari K, Murakami T, Cavener DR, et al. Endoplasmic reticulum stress response mediated by the PERK-eIF2(α)-ATF4 pathway is involved in osteoblast differentiation induced by BMP2. *J Biol Chem*. 2011;286(6):4809-18.
134. Shapiro AL, Viñuela E, Maizel JV, Jr. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Commun*. 1967;28(5):815-20.
135. Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-5.
136. Kodama Y, Kisseleva T, Iwaisako K, Miura K, Taura K, De Minicis S, et al. c-Jun N-terminal kinase-1 from hematopoietic cells mediates progression from hepatic steatosis to steatohepatitis and fibrosis in mice. *Gastroenterology*. 2009;137(4):1467-77 e5.
137. Hensley K, Kotake Y, Sang H, Pye QN, Wallis GL, Kolker LM, et al. Dietary choline restriction causes complex I dysfunction and increased H₂O₂ generation in liver mitochondria. *Carcinogenesis*. 2000;21(5):983-9.
138. Alkhouri N, Carter-Kent C, Feldstein AE. Apoptosis in nonalcoholic fatty liver disease: diagnostic and therapeutic implications. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2011;5(2):201-12.
139. Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death & Differentiation*. 2004;11(4):381-9.

140. Rao J, Zhang C, Wang P, Lu L, Qian X, Qin J, et al. C/EBP homologous protein (CHOP) contributes to hepatocyte death via the promotion of ERO1 α signalling in acute liver failure. *Biochem J.* 2015;466(2):369-78.
141. Hu H, Tian M, Ding C, Yu S. The C/EBP Homologous Protein (CHOP) Transcription Factor Functions in Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Apoptosis and Microbial Infection. *Front Immunol.* 2018;9:3083.
142. Schütze S, Wiegmann K, Machleidt T, Krönke M. TNF-induced activation of NF-kappa B. *Immunobiology.* 1995;193(2-4):193-203.
143. Huang ZF, Massey JB, Via DP. Differential regulation of cyclooxygenase-2 (COX-2) mRNA stability by interleukin-1 beta (IL-1 beta) and tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in human in vitro differentiated macrophages. *Biochem Pharmacol.* 2000;59(2):187-94.
144. Leenen P, de Bruijn M, Voerman J, Campbell P, van Ewijk W. Markers of mouse macrophage development detected by monoclonal antibodies. *Journal of Immunological Methods.* 1994;174(1-2):5-19.
145. Carpino G, Morini S, Ginanni Corradini S, Franchitto A, Merli M, Siciliano M, et al. Alpha-SMA expression in hepatic stellate cells and quantitative analysis of hepatic fibrosis in cirrhosis and in recurrent chronic hepatitis after liver transplantation. *Dig Liver Dis.* 2005;37(5):349-56.
146. Fernández-Alvarez A, Alvarez MS, Gonzalez R, Cucarella C, Muntané J, Casado M. Human SREBP1c expression in liver is directly regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha). *J Biol Chem.* 2011;286(24):21466-77.
147. Liss KHH, Finck BN. PPARs and nonalcoholic fatty liver disease. *Biochimie.* 2017;136:65-74.
148. Dalen KT, Schoonjans K, Ulven SM, Weedon-Fekjaer MS, Bentzen TG, Koutnikova H, et al. Adipose tissue expression of the lipid droplet-associating proteins S3-12 and perilipin is controlled by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Diabetes.* 2004;53(5):1243-52.
149. Dalen KT, Ulven SM, Arntsen BM, Solaas K, Nebb HI. PPARalpha activators and fasting induce the expression of adipose differentiation-related protein in liver. *J Lipid Res.* 2006;47(5):931-43.
150. Shimano H, Yahagi N, Amemiya-Kudo M, Hasty AH, Osuga J, Tamura Y, et al. Sterol regulatory element-binding protein-1 as a key transcription factor for nutritional induction of lipogenic enzyme genes. *J Biol Chem.* 1999;274(50):35832-9.
151. Lee TF, Mak KM, Rackovsky O, Lin Y-L, Kwong AJ, Loke JC, et al. Downregulation of hepatic stellate cell activation by retinol and palmitate mediated by adipose differentiation-related protein (ADRP). *J Cell Physiol.* 2010;223(3):648-57.
152. Listenberger LL, Ostermeyer-Fay AG, Goldberg EB, Brown WJ, Brown DA. Adipocyte differentiation-related protein reduces the lipid droplet association of adipose triglyceride lipase and slows triacylglycerol turnover. *J Lipid Res.* 2007;48(12):2751-61.
153. Song MJ, Malhi H. The unfolded protein response and hepatic lipid metabolism in non alcoholic fatty liver disease. *Pharmacology & therapeutics.* 2019;203:107401-.
154. Kammoun HL, Chabanon H, Hainault I, Luquet S, Magnan C, Koike T, et al. GRP78 expression inhibits insulin and ER stress-induced SREBP-1c activation and reduces hepatic steatosis in mice. *The Journal of clinical investigation.* 2009;119(5):1201-15.

155. Nuss JE, Choksi KB, DeFord JH, Papaconstantinou J. Decreased enzyme activities of chaperones PDI and BiP in aged mouse livers. *Biochemical and biophysical research communications*. 2008;365(2):355-61.
156. Ikeyama S, Wang X-T, Li J, Podlutzky A, Martindale JL, Kokkonen G, et al. Expression of the Pro-apoptotic Gene *gadd153/chop* Is Elevated in Liver with Aging and Sensitizes Cells to Oxidant Injury *. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(19):16726-31.
157. Tsai TH, Chen E, Li L, Saha P, Lee HJ, Huang LS, et al. The constitutive lipid droplet protein PLIN2 regulates autophagy in liver. *Autophagy*. 2017;13(7):1130-44.
158. Cleveland E, Bandy A, VanWagner LB. Diagnostic challenges of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *Clin Liver Dis (Hoboken)*. 2018;11(4):98-104.
159. Contreras D, González-Rocha A, Clark P, Barquera S, Denova-Gutiérrez E. Diagnostic accuracy of blood biomarkers and non-invasive scores for the diagnosis of NAFLD and NASH: Systematic review and meta-analysis. *Annals of Hepatology*. 2023;28(1):100873.
160. Imai Y, Varela GM, Jackson MB, Graham MJ, Crooke RM, Ahima RS. Reduction of hepatosteatosis and lipid levels by an adipose differentiation-related protein antisense oligonucleotide. *Gastroenterology*. 2007;132(5):1947-54.
161. Zhou M, Fisher EA, Ginsberg HN. Regulated Co-translational ubiquitination of apolipoprotein B100. A new paradigm for proteasomal degradation of a secretory protein. *J Biol Chem*. 1998;273(38):24649-53.
162. Xu G, Sztalryd C, Lu X, Tansey JT, Gan J, Dorward H, et al. Post-translational Regulation of Adipose Differentiation-related Protein by the Ubiquitin/Proteasome Pathway *. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(52):42841-7.
163. Gemmink A, Daemen S, Kuijpers HJH, Schaart G, Duimel H, López-Iglesias C, et al. Super-resolution microscopy localizes perilipin 5 at lipid droplet-mitochondria interaction sites and at lipid droplets juxtaposing to perilipin 2. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2018;1863(11):1423-32.
164. Wang H, Sreenivasan U, Hu H, Saladino A, Polster BM, Lund LM, et al. Perilipin 5, a lipid droplet-associated protein, provides physical and metabolic linkage to mitochondria. *Journal of lipid research*. 2011;52(12):2159-68.
165. Paquette A, Wang D, Jankowski M, Gutkowska J, Lavoie JM. Effects of ovariectomy on PPAR alpha, SREBP-1c, and SCD-1 gene expression in the rat liver. *Menopause*. 2008;15(6):1169-75.
166. Matsuo K, Gualtieri MR, Cahoon SS, Jung CE, Paulson RJ, Shoupe D, et al. Surgical menopause and increased risk of nonalcoholic fatty liver disease in endometrial cancer. *Menopause*. 2016;23(2):189-96.
167. Shah P, Mudaliar S. Pioglitazone: side effect and safety profile. *Expert Opinion on Drug Safety*. 2010;9(2):347-54.
168. Hess R. Bekanntmachung eines Beschlusses des Gemeinsamen Bundesausschusses über eine Änderung der Arzneimittel-Richtlinie (AM-RL): Anlage III – Übersicht der Verordnungseinschränkungen und -ausschlüsse Glitazone zur Behandlung des Diabetes mellitus Typ 2. *Arzneimittel-Richtlinie/ Anlage III*. 2010;BANz. Nr. 175 (S. 3855).
169. Cusi K, Orsak B, Bril F, Lomonaco R, Hecht J, Ortiz-Lopez C, et al. Long-Term Pioglitazone Treatment for Patients With Nonalcoholic Steatohepatitis and Prediabetes or Type 2 Diabetes Mellitus. *Annals of Internal Medicine*. 2016;165(5):305-15.

170. Fujii H, Ikura Y, Arimoto J, Sugioka K, Iezzoni JC, Park SH, et al. Expression of Perilipin and Adipophilin in Nonalcoholic Fatty Liver Disease; Relevance to Oxidative Injury and Hepatocyte Ballooning. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*. 2009;16(6):893-901.
171. Zhang E, Cui W, Lopresti M, Mashek MT, Najt CP, Hu H, et al. Hepatic PLIN5 signals via SIRT1 to promote autophagy and prevent inflammation during fasting. *Journal of lipid research*. 2020;61(3):338-50.
172. Promrat K, Kleiner DE, Niemeier HM, Jackvony E, Kearns M, Wands JR, et al. Randomized controlled trial testing the effects of weight loss on nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2010;51(1):121-9.
173. McGlone ER, Carey I, Veličković V, Chana P, Mahawar K, Batterham RL, et al. Bariatric surgery for patients with type 2 diabetes mellitus requiring insulin: Clinical outcome and cost-effectiveness analyses. *PLOS Medicine*. 2020;17(12):e1003228.
174. Ju U-I, Jeong D-W, Seo J, Park JB, Park J-W, Suh K-S, et al. Neddylation of sterol regulatory element-binding protein 1c is a potential therapeutic target for nonalcoholic fatty liver treatment. *Cell Death & Disease*. 2020;11(4):283.
175. Swords RT, Coutre S, Maris MB, Zeidner JF, Foran JM, Cruz J, et al. Pevonedistat, a first-in-class NEDD8-activating enzyme inhibitor, combined with azacitidine in patients with AML. *Blood*. 2018;131(13):1415-24.