

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

Lipidtropfen-assoziierte Proteine und ihre Rolle in der Entstehung von alkoholischer
und nicht-alkoholischer Steatohepatitis in Patienten mit dem *patatin-like*
phospholipase domain-containing protein 3-1148M Polymorphismus

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

Vorgelegt von

Inga Maria Gertrud Schwittai
aus Münster

Mainz, 2022

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

1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. B. K. Straub

2. Gutachter: PD Dr. med. A. J. Weinmann

Tag der Promotion: 06. Dezember 2022

Meinen wundervollen Eltern Mechthild und Jürgen

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	VI
Abbildungsverzeichnis	IX
Tabellenverzeichnis.....	XI
1 Einleitung	1
2 Literaturdiskussion.....	2
2.1 NAFLD.....	2
2.1.1 Epidemiologie der NAFLD.....	2
2.1.2 Klassifikation, Klinik und Verlaufsformen der NAFLD	3
2.1.3 Risikofaktoren und Pathogenese der NAFLD.....	4
2.1.4 Histopathologie der NASH.....	5
2.1.5 Komorbidität einer <i>Steatosis hepatis</i> mit weiteren Lebererkrankungen	6
2.2 HCC.....	6
2.3 PNPLA3.....	7
2.3.1 Funktion und Vorkommen von PNPLA3	7
2.3.2 <i>PNPLA3</i> -Polymorphismus I148M.....	8
2.4 Leberaufbau	10
2.5 Leberfunktion	11
2.6 Lipidtropfen.....	12
2.6.1 Funktion und Struktur von Lipidtropfen.....	12
2.6.2 Lipidtropfen-assoziierte Proteine der Perilipin-Familie.....	13
2.7 Lipolyse.....	18
2.7.1 Lipolyse im Fettgewebe.....	19
2.7.2 Lipolyse in oxidativen Geweben	21
2.8 Zielsetzung	23
3 Material und Methoden.....	24
3.1 Geräte	24

3.2	Allgemeine Verbrauchsmaterialien	25
3.3	Chemikalien, Lösungen, Reagenzien	27
3.4	Puffer und Medien	29
3.4.1	Puffer.....	29
3.4.2	Kulturmedien.....	31
3.5	Standards, Größenmarker	31
3.6	Fluoreszenzfarbstoffe.....	31
3.7	Substanzen zur Induktion der Lipolyse und Steatogenese	31
3.8	Kits.....	32
3.9	Zellkulturlinien.....	32
3.10	Proteine.....	32
3.10.1	Enzyme	32
3.10.2	Antikörper	32
3.11	Nukleinsäuren/Oligonukleotide	34
3.12	Software	35
3.13	Humanes Lebergewebe.....	35
3.13.1	HCCs und zugehöriges nicht-neoplastisches Lebergewebe	36
3.13.2	Normalleber und Lebergewebe mit geringer Steatose	37
3.13.3	NAFLD-/NASH-Kollektiv	38
3.14	Mikroskopische Techniken	39
3.14.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	39
3.14.2	Immunhistochemie	39
3.14.3	Immunfluoreszenzmikroskopie	40
3.15	Histopathologische Auswertung	41
3.16	Zellkultur-Techniken.....	43
3.16.1	Passagieren von Zellen	43
3.16.2	Einfrieren von Zellen	43

3.16.3	Zellzahlbestimmung	43
3.17	Biochemische Methoden	44
3.17.1	Proteinisolierung	44
3.17.2	Proteinbestimmung nach Bradford.....	44
3.17.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	45
3.17.4	Immunblot.....	46
3.18	Molekularbiologische Methoden	47
3.18.1	DNA-Isolierung und -Fällung	47
3.18.2	Polymerase-Kettenreaktion	48
3.18.3	Agarose-Gelelektrophorese	48
3.18.4	DNA-Extraktion.....	49
3.18.5	Sequenzierung.....	49
3.18.6	RNA-Isolierung.....	49
3.18.7	RNA-Konzentrationsbestimmung.....	50
3.18.8	Reverse Transkription.....	50
3.18.9	Quantitative Echtzeit-PCR (Realtime-PCR)	51
3.19	Genomeditierung	53
3.19.1	Transfektion	53
3.19.2	CRISPR/Cas9	53
3.20	Lipolyse-Assay	55
3.21	Gewebekultur von humaner Leber	56
3.21.1	Gewinnung von Gewebeschnitten	56
3.21.2	Frischgewebekultur.....	56
3.21.3	Lipolyse-Assay in einer Leber-Frischgewebekultur	57
3.22	Statistische Auswertung.....	57
4	Ergebnisse.....	57
4.1	Perilipin- und PNPLA3-Expression in humanem Lebergewebe	57

4.1.1	Analyse von Allelfrequenzen des <i>PNPLA3</i> -Polymorphismus I148M in humanem Lebergewebe	57
4.1.2	Proteinexpression von Perilipinen und Lipasen in humanem Lebergewebe mit unterschiedlichem <i>PNPLA3</i> -Status.....	59
4.1.3	mRNA-Expression von Perilipinen und Lipasen in normalem und gering steatotischem humanen Lebergewebe	62
4.1.4	Proteinexpression von Perilipinen und Lipasen in HCCs	64
4.1.5	mRNA-Expression von Perilipinen und Lipasen in HCCs.....	68
4.2	Lokalisation von Perilipinen und <i>PNPLA3</i> in humanen NAFLD-/NASH-Leberbiopsien..	70
4.3	<i>PNPLA3</i> hemmt die lipolytische Aktivität von ATGL in HepG2-Zellen	75
4.4	Lipolyse-Assay in den Zellkulturlinien Huh7, HepG2 und HEK293T.....	76
4.4.1	Forskolin und IBMX induzieren die Phosphorylierung von HSL.....	77
4.4.2	Forskolin und IBMX reduzieren die Expression von Perilipin 2	78
4.4.3	Induktion der Phosphorylierung von HSL durch eine Ölsäurebehandlung	79
4.4.4	Signifikant reduzierte <i>PNPLA3</i> -Transkription durch Induktion der Lipolyse.....	80
4.5	Generierung eines <i>PNPLA3</i> I148M-Zellkulturmodells mit CRISPR/Cas9.....	83
4.5.1	Expressionsanalyse der genomeditierten HEK293T-Zellen	86
4.5.2	Hemmung der Lipolyse durch den <i>PNPLA3</i> I148M-Polymorphismus	87
4.6	Lipidtropfen-Akkumulation in humaner Leberfrischgewebekultur nach Ölsäurebehandlung.....	89
5	Diskussion	91
5.1	Perilipine und <i>PNPLA3</i> bei primärer Lebererkrankung.....	92
5.2	Regulation von <i>PNPLA3</i>	95
5.3	Einfluss von <i>PNPLA3</i> auf Faktoren des Lipidmetabolismus	96
5.4	Funktion von <i>PNPLA3</i> in der Lipolyse	101
5.5	Ausblick	103
6	Zusammenfassung	106
7	Literaturverzeichnis	108

8	Anhang.....	120
9	Danksagung.....	121

Abkürzungsverzeichnis

ABHD5	<i>abhydrolase domain containing 5</i>
ADPN	Adiponutrin
ADRP	<i>adipose differentiation-related protein/Perilipin 2</i>
AFLD	<i>alcoholic fatty liver disease</i>
AIH	Autoimmunhepatitis
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ASH	<i>alcoholic steatohepatitis</i>
ATGL	<i>adipose tissue triglyceride lipase</i>
ATP	Adenosintriphosphat
Bodipy	Bordipyrrromethen
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Cas	<i>CRISPR-associated</i>
CCL5	CC-Chemokin-Ligand 5
cDNA	<i>complementary DNA</i>
ChREBP	<i>carbohydrate response element-binding protein</i>
cPAT	<i>constitutive PAT-Protein</i>
CRISPR	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
DAG	Diacylglycerid
DAPI	Diamidino-Phenylindol
ddNTP	Didesoxynukleotid
DE	Deutschland
DMEM	<i>dulbecco's modified eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleotid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ePAT	<i>exchangeable PAT-Protein</i>
FBS	fetales Rinderserum
FFPE-Gewebe	Formalin-fixiertes und in Paraffin eingebettetes Gewebe
GCKR	<i>glucokinase regulatory protein</i>
gDNA	genomische DNA
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
HBV	Hepatitis B Virus

HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCl	Salzsäure
HCV	Hepatitis C Virus
HE-Färbung	Hämatoxylin und Eosin-Färbung
HSC	<i>hepatic stellate cell</i>
HSL	Hormonsensitive Lipase
IBMX	Isobutylmethylxanthin
IHH	immortalisierte humane Hepatozyten
iPLA2-epsilon	<i>calcium-independent phospholipase A2 epsilon</i>
LT	Lipidtropfen
MAG	Monoacylglycerid
MAGL	Monoacylglyceridlipase
MBOAT	<i>membrane bound O-acyltransferase domain-containing</i>
MLDP	<i>myocardial lipid droplet protein/Perilipin 5</i>
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
n. b.	nicht bekannt
NaCl	Natriumchlorid
NAFLD	<i>non-alcoholic fatty liver disease</i>
NAS	NAFLD Aktivitätsscore
NASH	<i>non-alcoholic steatohepatitis</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PKA	Proteinkinase A
PLIN	Perilipin
PNPLA3	<i>patatin-like phospholipase domain-containing protein 3</i>
<i>PNPLA3-Genotyp C/C</i>	homozygoter <i>PNPLA3</i> -Wildtyp I148
<i>PNPLA3-Genotyp C/G</i>	heterozygoter <i>PNPLA3</i> -Genotyp I148/I148M
<i>PNPLA3-Genotyp G/G</i>	homozygoter <i>PNPLA3</i> -Polymorphismus I148M
PPAR	<i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
SAF-Score	<i>steatosis, activity and fibrosis Score</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
siRNA	<i>small interfering RNA</i>

SREBP	<i>sterol regulatory element-binding protein</i>
TAG	Triacylglycerid
TBS	<i>tris-buffered saline</i>
TBST	<i>tris-buffered saline</i> mit Tween
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TERT	<i>telomerase reverse transcriptase</i>
TIP 47	<i>tail-interacting protein of 47 kDa/Perilipin 3</i>
TM6SF2	<i>transmembrane 6 superfamily member 2</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
Tris	Trishydroxymethylaminoethan
VLDL	<i>very low density lipoprotein</i>

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Progression chronischer Lebererkrankungen.....	4
Abb. 2: Darstellung eines Leberläppchens.....	11
Abb. 3: Schematische Struktur eines LT.....	13
Abb. 4: Aktivierungsmechanismus der PKA.	20
Abb. 5: Lipolyse in Adipozyten.....	21
Abb. 6: Lipolyse am Beispiel einer Herzmuskelzelle.....	22
Abb. 7: Expression von Proteinen der Perilipin-Familie und Lipasen in humanem Lebergewebe in Abhängigkeit vom <i>PNPLA3</i> -Status und Steatosegrad.....	61
Abb. 8: mRNA-Expression der Perilipin-Familie und Lipasen in humanem Lebergewebe in Abhängigkeit vom <i>PNPLA3</i> -Status.....	63
Abb. 9: Expression von Proteinen der Perilipin-Familie und Lipasen in HCCs.....	65
Abb. 10: mRNA-Expression der Perilipin-Familie und Lipasen in HCCs.....	69
Abb. 11: Leberbiopsien von NAFLD-/NASH-PatientInnen mit <i>PNPLA3</i> -Genotyp G/G zeigen einen signifikant höheren Steatosegrad als Leberbiopsien mit <i>PNPLA3</i> -Genotyp C/C.....	70
Abb. 12: NAS-Score bezogen auf die <i>PNPLA3</i> -Genotypen in Leberbiopsien von NAFLD-/NASH-PatientInnen.....	72
Abb. 13: Auswertung der immunhistochemischen Färbungen von Perilipin 1-5 und <i>PNPLA3</i> in humanen NAFLD-/NASH-Leberbiopsien.....	73
Abb. 14: Anteil Perilipin 1- und 2-positiver Hepatozyten in Leberbiopsien von NAFLD-/NASH-PatientInnen.....	74
Abb. 15: Proteinanteil der Perilipine 3, 4, 5 und <i>PNPLA3</i> an LT in Leberbiopsien von NAFLD-/NASH-PatientInnen.....	74
Abb. 16: Überexpression von <i>PNPLA3</i> und <i>ATGL</i> resultiert in verringertem LT-Abbau in HepG2-Zellen.....	75
Abb. 17: Kotransfektion von <i>PNPLA3</i> und <i>ATGL</i> in HepG2-Zellen resultiert in größerer LT-Fläche als die alleinige Transfektion von <i>ATGL</i>	76
Abb. 18: Induktion der Lipolyse durch Forskolin und IBMX bzw. Isoproterenol in Zellkultur. ..	78
Abb. 19: Induktion der Lipolyse nach steatogener Behandlung in Zellkultur.....	79
Abb. 20: Anstieg von Phospho-HSL nach Induktion der Lipolyse und Ölsäurebehandlung in Zellkultur.....	80
Abb. 21: mRNA-Menge von Perilipinen und Lipasen nach Ölsäure-/Lipolyse-Behandlung in Zellkultur.....	82

Abb. 22: Bindestellen der <i>guide-RNAs</i>	83
Abb. 23: Validierung der <i>guide-RNAs</i>	84
Abb. 24: Überprüfung der Insertion der Reparaturmatrize.	85
Abb. 25: Screening der HEK293T-Einzelzellklone.	86
Abb. 26: Expressionsanalyse von PNPLA3, Perilipin 2 und ATGL nach Genomeditierung mittels CRISPR/Cas9 in HEK293T-Zellen in Abhängigkeit vom <i>PNPLA3</i> -Status.	87
Abb. 27: Expressionsanalyse von Phospho-HSL und Perilipin 2 nach Lipolyse-Induktion in genomeditierten HEK293T-Zellen.	88
Abb. 28: LT-Größe nach Lipolyse-Induktion in genomeditierten HEK293T-Zellen.	88
Abb. 29: Quantifizierung der LT-Größe nach Lipolyse-Induktion in genomeditierten HEK293T-Zellen.	89
Abb. 30 Säulendiagramm der LT-Größe nach Lipolyse-Induktion in genomeditierten HEK293T-Zellen.	89
Abb. 31: LT-Anteil nach Ölsäurebehandlung in humaner Leberfrischgewebekultur.	90
Abb. 32: Zunahme der Phosphorylierung von HSL nach Induktion der Lipolyse in humaner Leberfrischgewebekultur.	91
Abb. 33: Expressionsanalyse von Genen der Perilipin-Familie und Lipasen in humaner Leberfrischgewebekultur.	91

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Überblick über Vorkommen, Funktion sowie Überexpressions- und Knock-Out/Knock-Down-Experimente der Perilipine.....	14
Tab. 2: Klinische Daten der humanen HCC-Proben.....	36
Tab. 3: Klinische Daten von humanen Normalleberproben bzw. Lebergewebe mit geringer Steatose	37
Tab. 4: Klinische Daten von humanen NAFLD-/NASH-Proben	38
Tab. 5: NAS-Score zur Differenzierung der NAFLD von der NASH	42
Tab. 6: <i>Staging</i> der Steatohepatitis.....	42
Tab. 7: Zusammensetzung eines Polyacrylamid-Gels.	45
Tab. 8: Zusammensetzung der ECL-Lösung.....	47
Tab. 9: PCR-Ansatz zur Amplifikation der gDNA.....	48
Tab. 10: PCR-Programm zur Amplifikation der gDNA.	48
Tab. 11: PCR-Ansatz Reaktionsgemisch für die cDNA-Synthese	51
Tab. 12: PCR-Programm der cDNA-Synthese	51
Tab. 13: Ansatz „Mastermix“ für die Realtime-PCR	52
Tab. 14: Programm Realtime-PCR.....	52
Tab. 15: Ansatz Restriktionsverdau mit <i>HIND III</i>	55
Tab. 16: Anzahldichte der Zellen im Lipolyse-Assay.....	55
Tab. 17: Konzentration der Substanzen zur Induktion der Lipolyse.....	56
Tab. 18: Allelfrequenzen für <i>PNPLA3</i> (rs738409) in humanem Lebergewebe.....	58
Tab. 19: Histopathologische Charakterisierung der humanen Lebergewebe und semiquantitative Angabe der Proteinexpression.....	60
Tab. 20: Histopathologische Charakterisierung der humanen HCCs.	66
Tab. 21: Histopathologische Charakterisierung des zum HCC zugehörigen humanen nicht-neoplastischen Lebergewebes.....	67
Tab. 22: Histologische Charakteristika der humanen NAFLD-/NASH-Leberbiopsien (n=23).....	71
Tab. 23: Auswertung der immunhistochemischen Färbungen im humanen NAFLD-/NASH-Kollektiv.....	120

1 Einleitung

Als zentrales Stoffwechselorgan ist die Leber einer Vielzahl von schädigenden Einflüssen wie Alkohol, Pharmazeutika, Stoffwechsel- und Viruserkrankungen, aber auch Folgen einer hochkalorischen Diät ausgesetzt. Die nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (engl. *non-alcoholic fatty liver disease/NAFLD*) und die alkoholische Fettlebererkrankung (engl. *alcoholic fatty liver disease/AFLD*) gehen definitionsgemäß mit einer Akkumulation von Lipidtropfen (LT) in Hepatozyten einher. Die NAFLD gilt als hepatische Manifestation des metabolischen Syndroms und ist infolge der Assoziation mit kardiovaskulären Erkrankungen sowie Tumorerkrankungen und aufgrund der Lebererkrankung an sich mit einer erhöhten Mortalität verbunden (1). Die Erforschung des zugrunde liegenden Pathomechanismus der Entstehung einer NAFLD ist aufgrund steigender Prävalenz häufiger Begleiterkrankungen wie Adipositas und Diabetes mellitus Typ II von großer Relevanz. Im Jahre 2017 waren 36 % der in Deutschland lebenden Erwachsenen übergewichtig (BMI 25 bis <30) und 16 % stark übergewichtig (BMI \geq 30) (2). Diese Dissertation widmet sich Pathomechanismen, die die Entwicklung einer NAFLD begünstigen. Der Schwerpunkt liegt dabei auf der Untersuchung von LT-assoziierten Proteinen und deren Interaktion mit Lipasen. Ein bedeutender genetischer Risikofaktor für die Entstehung und Progression einer NAFLD ist ein Polymorphismus der Lipase *patatin-like phospholipase domain-containing protein 3* (PNPLA3), *PNPLA3* I148M (3). Insbesondere in Kombination mit einer kohlenhydratreichen Diät konnte in einer Population aus hispano-amerikanischen Kindern bei Trägern des homozygoten *PNPLA3*-Polymorphismus I148M eine positive Korrelation mit einem erhöhten Leberfettanteil festgestellt werden (4). Der Pathomechanismus, der der Progression einer NAFLD bei *PNPLA3* I148M zugrunde liegt sowie die genaue Funktion von *PNPLA3* sind bislang nicht abschließend geklärt. Nach aktuellem Forschungsstand weist *PNPLA3* eine schwache Lipase-Aktivität auf und ist am Transfer spezifischer Fettsäuren beteiligt (5). Träger des *PNPLA3*-Polymorphismus I148M weisen häufiger gesteigerten oxidativen Stress auf (6). Das Protein *PNPLA3* I148M zeigt zudem einen Funktionsverlust der *PNPLA3*-Lipase-Aktivität (7) und eine Zunahme des Fettsäuretransfers (8). Zudem akkumuliert *PNPLA3* I148M vermehrt an LT und korreliert positiv mit einem verringerten LT-Abbau (9). BasuRay et. al. diskutierten, dass durch *PNPLA3* I148M die Funktion anderer Lipasen und LT-assoziiierter Proteine blockiert wird (10). In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurde humanes Lebergewebe von PatientInnen mit alkoholischer Steatohepatitis (*alcoholic steatohepatitis/ASH*) mit bekanntem *PNPLA3*-Genotyp untersucht. Dabei wurde gezeigt, dass Träger von *PNPLA3* I148M in Bezug auf

Proteinexpression, mRNA-Transkription und Lokalisation von LT-assoziierten Proteinen Unterschiede aufwiesen. Zudem konnte gezeigt werden, dass Perilipin 5 mit PNPLA3 interagiert. Welchen Einfluss *PNPLA3* und der *PNPLA3*-Polymorphismus I148M auf Akteure im Lipidmetabolismus haben und ob es weitere Hinweise auf mögliche Interaktionen gibt bzw. welche Auswirkung *PNPLA3* I148M auf die Lipolyse hat, blieb jedoch unklar.

Interessanterweise kommt es nur bei einem Teil der NAFLD-PatientInnen zu einer Progression ihrer Erkrankung. Diese Dissertation soll einen Beitrag leisten, den zugrunde liegenden Pathomechanismus der Entstehung sowie Progression einer NAFLD in Zusammenhang mit dem *PNPLA3*-Polymorphismus I148M zu ergründen und damit zu der Entwicklung von weiteren diagnostischen Möglichkeiten sowie Therapieansätzen beizutragen.

2 Literaturdiskussion

2.1 NAFLD

2.1.1 Epidemiologie der NAFLD

Aufgrund der zunehmenden Häufigkeit von Lebererkrankungen ist die Erforschung der zugrunde liegenden Pathomechanismen von großer klinischer, ökonomischer und grundlagenbiologischer Bedeutung. Die NAFLD zählt mit einer Prävalenz von 25 % zur häufigsten Lebererkrankung in den westlichen Industrienationen (11). Bei der NAFLD handelt es sich um eine metabolische Erkrankung, die definitionsgemäß ein breites Spektrum von nicht durch chronischen Alkoholkonsum verursachten Leberschäden, einschließlich *Steatosis hepatis*, Steatohepatitis und Zirrhose, umfasst. Die Zunahme von Übergewicht führt als eine wesentliche Begleiterkrankung zu einer steigenden Prävalenz der NAFLD (12). Global stieg die Prävalenz der NAFLD von rund 15 % im Jahr 2005 auf rund 25 % im Jahr 2016 an (13). Die höchste Prävalenz findet sich mit 32 % im Mittleren Osten und mit 30 % in Südamerika, in Europa liegt sie bei 24 % und in afrikanischen Staaten ist mit 13,5 % im Vergleich die niedrigste Prävalenz anzutreffen (13). Auch das hepatozelluläre Karzinom (HCC), mit 75-85 % häufigstes primäres Leberkarzinom, ist epidemiologisch betrachtet von hoher Relevanz, primäre Leberkarzinome zählten 2018 zu den sechsthäufigsten malignen Tumoren und sind die vierthäufigste Ursache für krebsbedingte Mortalität (14).

2.1.2 Klassifikation, Klinik und Verlaufsformen der NAFLD

Für die Diagnose einer NAFLD muss als *Conditio sine qua non* ein Neutralfettanteil von mindestens 5 % des Leberparenchyms nachweisbar sein. Nicht-ernährungsbedingte Ursachen der Steatose wie Virushepatitiden, Stoffwechselerkrankungen sowie toxische Einflüsse in Form von Alkohol und Pharmazeutika müssen ausgeschlossen werden (15), wobei eine Kopathogenese möglich ist. Die aktuelle Datenlage weist darauf hin, dass es keine risikofreie Alkoholmenge gibt (16). Die Deutsche Gesellschaft für Ernährung sieht die Menge von 10 g reinem Alkohol für gesunde Frauen und 20 g für gesunde Männer als eine „maximal tolerierbare Alkoholzufuhr“ pro Tag an (17). Eine NAFLD umfasst verschiedene Krankheitsstadien (Abb. 1) mit unterschiedlich stark ausgeprägten klinischen Symptomen. Zu den Krankheitsstadien zählen die nicht-alkoholische Steatohepatitis (*non-alcoholic steatohepatitis/NASH*), die aus einer *Steatosis hepatis* bzw. NAFLD entsteht, und als Endstadium die Leberzirrhose. Die *Steatosis hepatis* bezeichnet eine blande Verfettung des Leberparenchyms ohne Entzündungszeichen, ist potentiell reversibel und verläuft in der Regel subklinisch. Charakteristikum einer NASH ist das Auftreten von ballonierten Hepatozyten und Entzündungsinfiltraten (18, 19). Die Ballonierung bezeichnet eine für die Steatohepatitis charakteristische Form der Hepatozytendegeneration, die mit einer massiven Zellschwellung einhergeht und ein Zeichen für den Zelltod darstellt (20). Die NASH kann klinisch inapparent verlaufen, kann jedoch auch mit Beschwerden wie Oberbauchschmerzen, Ikterus und Allgemeinzustandsverschlechterung einhergehen. Die Leberzirrhose ist eine irreversible Schädigung des Leberparenchyms als Äquivalent eines kompletten fibrotischen Parenchymbaus mit Funktionseinschränkung bis hin zum Leberversagen. Die Fibrosierung ist Folge von chronischer Entzündung, bei der HSCs (*hepatic stellate cells*) in den Sinusoiden aktiviert werden und eine Kollagenmatrix bilden (21). Aufgrund der unzureichenden Synthese- und Stoffwechselfunktion, bedingt durch die Leberzellschädigung, kommt es im Krankheitsverlauf u. a. zu Gerinnungsstörungen, hormonellen Störungen, Ikterus und Ödemen. Eine zunehmende Fibrosierung mit Ausbildung einer Architekturstörung bis hin zur Leberzirrhose hat schwerwiegende Folgen und führt zu portaler Hypertension mit Bildung von Aszites und Ösophagusvarizen. Die Leberzirrhose stellt zudem den bedeutendsten Risikofaktor für die Entstehung eines HCCs dar (22).

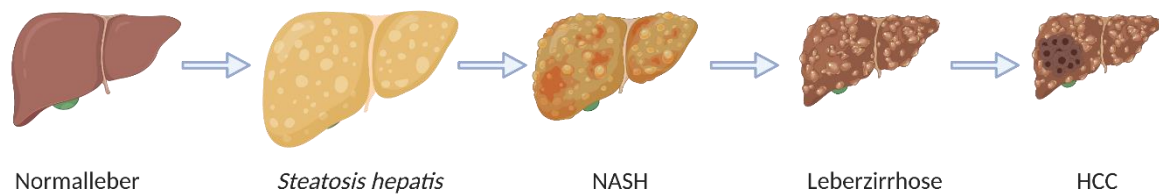


Abb. 1: **Progression chronischer Lebererkrankungen.** Schematische Darstellung des Spektrums der NAFLD mit Normalleber, *Steatosis hepatis*, NASH, Leberzirrhose und HCC. Abb. erstellt mit BioRender.com.

2.1.3 Risikofaktoren und Pathogenese der NAFLD

Eine NAFLD kann bei einem Teil der PatientInnen im Krankheitsverlauf über eine NASH bis hin zur Leberzirrhose führen (23). Da eine Progression nicht bei allen PatientInnen zu beobachten ist, formulierten Day und James die „*two hit theory*“. Diese beschreibt, dass zusätzlich zu einem „*first hit*“, der *Steatosis hepatis*, für eine Progression ein weiteres schädigendes Ereignis, der „*second hit*“, notwendig sei, der über die Induktion von oxidativem Stress zu Leberschäden führt (24). Der „*first hit*“ sensibilisiert die Leber für weitere schädigende Einflüsse wie beispielsweise Alkohol, hepatotoxische Pharmazeutika, Diabetes mellitus und die Effekte genetischer Faktoren („*second hit*“). Der häufigste und stärkste genetische Risikofaktor für die Entstehung einer steatotischen Lebererkrankung ist der Einzelnukleotid-Polymorphismus I148M des *PNPLA3*-Gens (3, 25, 26). Zusätzlich sind weitere Genvarianten beschrieben, die eine NAFLD begünstigen. Zu den entsprechenden Genen gehören u. a. *transmembrane 6 superfamily member 2* (TM6SF2) (27), *membrane bound O-acyltransferase domain-containing 7* (MBOAT7) (28) und *glucokinase regulatory protein* (GCKR) (29).

Die häufigste Ätiologie der NAFLD ist das metabolische Syndrom. Das metabolische Syndrom beschreibt einen Symptomkomplex bestehend aus stammbetonter Adipositas mit Dyslipoproteinämie, Insulinresistenz bzw. Diabetes mellitus Typ II und arterieller Hypertonie (30). Die Komponenten hängen pathophysiologisch zusammen und erhöhen u. a. das Risiko für hepatobiliäre Erkrankungen (1). Insulinresistenz und Adipositas sind Risikofaktoren für die Entstehung einer arteriellen Hypertonie, die vor allem bei gleichzeitig vorliegender Dyslipoproteinämie die Entstehung einer Atherosklerose und somit das Auftreten kardiovaskulärer Komplikationen begünstigt. Die Insulinresistenz kann Folge der NAFLD sein, forciert jedoch ihrerseits durch zellschädigende Mechanismen die Progression einer NAFLD (1). Durch die Insulinresistenz ist die Glucoseaufnahme in Muskelzellen verringert und die periphere Lipolyse gesteigert. Dieser Effekt führt u. a. aufgrund der Aufnahme freier

Fettsäuren aus dem Blut in die Leber zu einer zunehmenden hepatischen Triacylglycerid (TAG)-Akkumulation (31, 32). Freie Fettsäuren im Lebergewebe steigern die Lipidperoxidation, bewirken die Entstehung von Sauerstoffradikalen (engl. *reactive oxygen species*/ROS) und erhöhen den Spiegel des Tumornekrosefaktors α (TNF- α), eines proinflammatorischen Zytokins (33). Entzündung und oxidativer Stress, bedingt durch eine hohe Konzentration von ROS, begünstigen die Entstehung einer NAFLD und einer Leberfibrose (34). Die NAFLD wiederum begünstigt die Entstehung von Insulinresistenz, oxidativem Stress, Entzündung, Herz- sowie Nierenerkrankungen und kann somit als Multisystemerkrankung betrachtet werden (35). Die häufigsten Todesursachen bei PatientInnen mit NAFLD sind koronare Herzerkrankungen, Malignome wie das HCC sowie Folgen der Leberzirrhose in Form von Leberfunktionsstörungen und Ösophagusvarizenblutung (36). Des Weiteren gibt es Hinweise darauf, dass das Mikrobiom im menschlichen Gastrointestinaltrakt einen Einfluss auf die Progression einer NAFLD bzw. NASH hat (37).

2.1.4 Histopathologie der NASH

Eine NAFLD bzw. NASH lässt sich bis *dato* nur klinisch-histologisch diagnostizieren und in Stadien gruppieren. Die sichere Unterscheidung zwischen *Steatosis hepatis* und NASH ist ausschließlich durch eine histologische Untersuchung zu gewährleisten (1). Eine Abgrenzung zur ASH ist dagegen nur durch die Anamnese und ggf. Laborparameter wie Ethylglucuronid im Urin oder im Haar sowie Phosphatidylethanol im Blut (1) möglich. Eine nichtinvasive Diagnostik der NAFLD wird zwar verwendet, beispielsweise mithilfe von Indices, errechnet aus Variablen wie BMI, Laborparametern, Geschlecht und Vorhandensein eines Diabetes mellitus Typ II (38). Jedoch ist die Histopathologie unerlässlich für die Diagnose. Die Leberbiopsiediagnostik dient der Entitätsdiagnose (u. a. NASH oder andere Lebergrunderkrankung wie virale Hepatitis, kardiale Genese, Pharmazeutikaschaden) sowie der Einschätzung der Krankheitsschwere (*grading*) und des Fibrorestadiums (*staging*) (31, 39). Die Bestimmung des Krankheitsstadiums ist für Prognose und Therapie relevant, da eine fortgeschrittene NAFLD gehäuft in einer Leberzirrhose resultiert, die wiederum mit einer erhöhten Mortalität einhergeht (40, 41). In der vorliegenden Arbeit wurden der NAFLD Aktivitätsscore (NAS) von Kleiner et al. (42) und der *Steatosis, Activity and Fibrosis Score* (SAF-Score) von Bedossa et al. (43) verwendet.

2.1.5 Komorbidität einer *Steatosis hepatis* mit weiteren Lebererkrankungen

Das gleichzeitige Vorliegen einer *Steatosis hepatis* und einer weiteren Lebererkrankung, beispielsweise einer Virushepatitis, einer Autoimmunhepatitis (AIH), einer Hämochromatose sowie das Vorliegen von sowohl metabolischen Risikofaktoren als auch Alkoholabusus, hat einen negativen Einfluss auf den jeweiligen Krankheitsverlauf (44-47).

Die Prävalenz der *Steatosis hepatis* liegt bei Hepatitis C Virus (HCV) -positiven PatientInnen mit 55 % mehr als doppelt so hoch wie in der restlichen Bevölkerung (48). Der Einfluss von HCV auf den Glucose- und Fettstoffwechsel führt zu einer LT-Akkumulation in der Leber (48-50). *Vice versa* begünstigt das Vorliegen einer *Steatosis hepatis* die Pathogenität von HCV und führt zur Progression der Leberzellschädigung (51). Die Koinzidenz einer NASH (entsprechend dem modifizierten Brunt-System: akute lobuläre Hepatitis, ballonierte Hepatozyten und perisinusoidale Fibrose) mit einer AIH (definiert anhand der „*simplified criteria for the diagnosis of autoimmune hepatitis*“ von 2008) erhöht das Risiko für eine Leberzirrhose und korreliert negativ mit der Überlebenszeit (45). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass eine bestehende *Steatosis hepatis* in einem höheren AIH-Schweregrad resultiert (52). PatientInnen, die sowohl an einer AIH als auch an einer *Steatosis hepatis* erkrankt sind, weisen signifikant häufiger eine arterielle Hypertonie und einen Diabetes mellitus auf als PatientInnen mit alleiniger AIH (53). Jedoch wird in dieser Studie von Dalekos et. al. betont, dass eine Differenzierung zwischen AIH und NAFLD eine Herausforderung darstellt. Die Hämochromatose weist keine starke Assoziation mit einer Steatose auf, aber eine Bedeutung als Ko-Faktor bei der Progression der Leberschädigung wird als gesichert angesehen (46). Eine ASH ist ein fortgeschrittenes Krankheitsstadium der AFLD. NASH und ASH weisen eine vergleichbare Histopathologie auf. Eine AFLD ist definiert als das Vorhandensein eines Neutralfettanteils von mindestens 5 % des Leberparenchyms bei einem Alkoholkonsum von täglich über 10 g bei Frauen bzw. 20 g bei Männern (1). Bei der ASH bzw. AFLD stellt Übergewicht (ab einem BMI von 25 bei Frauen bzw. 27 bei Männern) neben dem Ausmaß des Alkoholkonsums einen Risikofaktor für die Progression der Erkrankung dar (54). Die *Steatosis hepatis* begünstigt bei zusätzlichem Alkoholabusus eine Leberschädigung (47).

2.2 HCC

Das HCC ist ein epithelialer Tumor, dessen Entstehung durch verschiedene Risikofaktoren begünstigt wird. Von großer Bedeutung ist dabei die Leberzirrhose, die ursächlich für über

80 % der HCCs ist (55). Damit einhergehende Risikofaktoren sind die der zugrundeliegenden Lebererkrankungen wie eine chronische Hepatitis B und C, NAFLD, Diabetes mellitus, Aflatoxine sowie zusätzlich genetische Faktoren und ein hohes Lebensalter (22, 56). Starkes Übergewicht ist darüber hinaus verbunden mit einer erhöhten HCC-assozierten Sterblichkeit (57). In Abwesenheit einer Leberzirrhose ist das HCC häufig ein Zufallsbefund, da unspezifische klinische Beschwerden wie Druckgefühl, Gewichtsverlust und Inappetenz in der Regel erst spät auftreten.

Auf genetischer Ebene werden bestimmte Mutationen in Zusammenhang mit der Hepatokarzinogenese gehäuft beobachtet. Die im HCC mit am häufigsten vorkommende Mutation betrifft β -Catenin, ein Protein, das sowohl für Zellkontakte der *Adherens Junctions* als auch für den Wnt-Signalweg von Bedeutung ist (58, 59). Daneben treten Mutationen im Tumorsuppressorgen *TP53* gehäuft auf (60). Zusätzlich werden u. a. Mutationen des *telomerase reverse transcriptase (TERT)*-Promotors (60), des Genpolymorphismus rs641738 der *MBOAT1* (61) und des Einzelnukleotid-Polymorphismus I148M von *PNPLA3* (62) beobachtet, wobei es sich bei letzteren beiden nicht um Driver-Mutationen handelt. Außerdem beeinflussen DNA-Schäden die HCC-Entstehung (63). Neben den genetischen Faktoren begünstigen eine chronische Entzündungskonstellation und eine Deregulation der immunologischen Reaktion die Tumorentstehung in der Leber (64-66).

2.3 PNPLA3

2.3.1 Funktion und Vorkommen von PNPLA3

Neben diätetischen Faktoren ist ein Polymorphismus eines am Lipidmetabolismus beteiligten Enzyms, *PNPLA3*, auch Adiponutrin (*ADPN*) oder *calcium-independent phospholipase A2 epsilon* (*iPLA2-epsilon*) genannt, von großer Bedeutung bei der Progression einer NAFLD (3, 62, 67-71). Für die Bezeichnung *ADPN* war hierbei die Entdeckung der Expression im Fettgewebe und deren ernährungsbedingter Regulation namensgebend (72).

Die *PNPLA*-Proteinfamilie setzt sich beim Menschen aus neun Mitgliedern zusammen (73). Die namensgebende Domäne der Proteinfamilie ist die Patatindomäne (73), die im Glykoprotein Patatin eine unspezifische Acylhydrolase-Aktivität zeigt (74). *PNPLA*-Proteine weisen eine Lipid-spaltende Hydrolase-Aktivität mit unterschiedlicher Spezifität für Substrate wie TAG, Phospholipide und Retinylester auf (73). Die größte strukturelle Homologie innerhalb der *PNPLA*-Familie zeigen *PNPLA3* und *PNPLA2* (*adipose tissue triglyceride lipase/ATGL*) (75). Das *PNPLA3*-Gen befindet sich auf Chromosom 22 (76). Das resultierende Protein besteht aus 481

Aminosäuren und weist ein Molekulargewicht von 53 kDa auf (71). PNPLA3 wird generell in Zellen exprimiert, die für den Lipid- und Vitamin A-Metabolismus von zentraler Bedeutung sind. Zuerst wurde PNPLA3 in Adipozyten von Mäusen nachgewiesen (72). Beim Menschen ist die PNPLA3-Expression in der Retina und der Leber am stärksten (7, 77). In der Leber weisen HSCs eine mit Hepatozyten verglichen deutlich stärkere PNPLA3-Expression auf (77). HSCs speichern Vitamin A in Form von Retinylpalmitat in LT und spielen eine Schlüsselrolle bei der Entstehung einer Leberfibrose (21). Bei Mäusen hingegen wird PNPLA3 am stärksten in braunem und weißem Fettgewebe exprimiert (72). PNPLA3 lokalisiert an Zellmembranen, dem Endoplasmatischen Retikulum sowie an LT (7, 78, 79).

PNPLA3 zeigt *in vitro* sowohl gegenüber TAG (5, 7, 67) als auch gegenüber Retinylestern eine Hydrolase-Aktivität (77). Eine gesteigerte PNPLA3-Expression *in vitro* führt zu einer deutlichen Reduktion der LT-Größe in HSCs (77). Neben der katabolen Funktion als Hydrolase katalysiert PNPLA3 auch den anabolen Weg in seiner Funktion als Acetyltransferase *in vitro* in Hefezellen und im Mausmodell. So katalysiert PNPLA3 die Lysophosphatidsäure-Acetyltransferase-Reaktion, ein Schritt der Lipogenese (7, 8), und zeigt eine Acylglyceridtransacylase-Aktivität (5). In hepatischen LT von Mäusen ist in Anwesenheit von PNPLA3 der Transfer langkettiger mehrfach ungesättigter Fettsäuren auf Phospholipide gesteigert (80).

Im Mausmodell und *in vitro* in den präadipozytären 3T3-L1-Zellen wird PNPLA3 beim Fasten reprimiert und bei Insulingabe induziert (81). Auch in humanen HSCs wird die Expression von PNPLA3 *in vitro* durch Insulin gesteigert und durch Retinol verringert (77). PNPLA3 wird sowohl im Mausmodell als auch in humanen Hepatozyten (Huh7-Zelllinie) wie eine Vielzahl weiterer am Lipidmetabolismus beteiligter Gene durch den Transkriptionsfaktor *sterol regulatory element-binding protein* (SREBP) 1c transkriptionell reguliert (82, 83). Des Weiteren wird die PNPLA3-Expression *in vitro* in humanen Hepatozyten glukoseabhängig durch den Transkriptionsfaktor *carbohydrate response element-binding protein* (ChREBP) reguliert (84). Die aktivierte Form dieser Transkriptionsfaktoren begünstigt die Lipogenese, die inaktive Form eher den Fettabbau.

2.3.2 PNPLA3-Polymorphismus I148M

Bei dem pathogenetisch für die NASH bedeutsamsten PNPLA3-Polymorphismus handelt es sich um einen Einzelnukleotid-Polymorphismus der Variante rs738409, der eine Isoleucin zu Methionin-Substitution an der Aminosäure 148, kurz I148M, kodiert (3). Dieser

Polymorphismus korreliert stark mit einem deutlich erhöhten Leberfettanteil, mit erhöhter Entzündungsaktivität sowie Fibrose und stellt nach diätetischen Faktoren einen der Hauptrisikofaktoren für die Entstehung einer NAFLD dar (3, 62, 67-71). Darüber hinaus stellt der *PNPLA3*-Polymorphismus I148M einen Risikofaktor für die Progression einer ASH dar und begünstigt die Entstehung einer Leberfibrose bei HCV- und Hepatitis B Virus (HBV)-Hepatitis, bei hereditärer Hämochromatose und bei primär sklerosierender Cholangitis (68, 70). Zusätzlich wurde der *PNPLA3*-Polymorphismus I148M als ein Risikofaktor für die Entstehung eines HCCs beschrieben (62, 69, 85). Pingitore et. al. berichteten von Genotyp-abhängigen Unterschieden bezüglich der Freisetzung von Proteinen, die in den Umbau der extrazellulären Matrix und damit bei der Fibrogenese involviert sind (*matrix metalloproteinase 2, tissue inhibitor of metalloproteinase 1 and 2*), wobei die nicht-mutierte *PNPLA3*-Variante im Gegensatz zum *PNPLA3*-Polymorphismus I148M eher protektiv wirkt (86). PatientInnen, die an einer NAFLD erkrankt und Träger des *PNPLA3*-Polymorphismus I148M sind, zeigen häufiger eine Fibrose sowie einen Anstieg von Markern für oxidativen Stress (6).

Bezüglich der Verteilung der Allelfrequenzen des *PNPLA3*-Polymorphismus I148M gibt es global große Unterschiede. Weltweit ist die Allelfrequenz des *PNPLA3*-Polymorphismus I148M mit 12 % in Afrika mit einem Anteil homozygoter Träger von unter 3 % der Gesamtpopulation am niedrigsten (87). In Europa liegt die Allelfrequenz bei rund 23 %, etwa 5 % der Bevölkerung sind homozygote Träger des *PNPLA3*-Polymorphismus I148M (87). Die Allelfrequenz bei Süd- und Nord-Amerikanern ist mit über 48 % am höchsten, der Anteil an homozygoten Trägern liegt hier bei knapp 25 % (87). Eine Studie mit Probanden aus Texas zeigte, dass das *PNPLA3* I148M (rs738409)-Allel am häufigsten bei Hispano-Amerikanern (49 % Allelfrequenz) vorkommt, gefolgt von europäischen Amerikanern (23 % Allelfrequenz), wohingegen es bei Afro-Amerikanern selten ist (17 % Allelfrequenz) (3).

Der *PNPLA3*-Polymorphismus I148M zeigt eine *Loss-of-function* bezüglich der Hydrolyse-Aktivität von PNPLA3. Funktionell führt der *PNPLA3*-Polymorphismus I148M *in vitro* gegenüber der nicht mutierten Genvariante zu einer reduzierten Maximalgeschwindigkeit bei der Hydrolyse von Glycerolipiden bzw. einer gestörten TAG-Hydrolyse (7, 67, 78). Humane HSCs zeigen *in vitro* in Anwesenheit des *PNPLA3*-Polymorphismus I148M eine verringerte Freisetzung von Retinol (86). Bei Überexpression von *PNPLA3* I148M *in vitro* in primären humanen HSCs ist keine Verminderung der LT-Größe erkennbar (77). Bezüglich des Fettsäuretransfers zeigt *PNPLA3* I148M eine *Gain-of-function*. Im Mausmodell besteht eine erhöhte die Lysophosphatidsäure-Acetyltransferase-Aktivität von *PNPLA3* I148M und eine

stärkere Lipid-Akkumulation (8). Bei Knock-In-Mäusen der Variante *PNPLA3* I148M ist der Transfer mehrfach ungesättigter Fettsäuren von TAG auf Phospholipide gesteigert (80). Der Phänotyp von *PNPLA3* ist jedoch nicht durch den *Loss-of-function* der Hydrolyse-Aktivität zu erklären. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass ein Knock-Out von *PNPLA3* nicht den gleichen Phänotyp hat wie die Expression von I148M. *PNPLA3* Knock-Out-Mäuse zeigen unabhängig von der Diät keine vermehrte Steatose, Leberenzymerrhöhung, Gewichtszunahme oder Insulin-Resistenz im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (88). Die transgene Überexpression von humanem *PNPLA3* I148M führt im Lebergewebe von Mäusen dagegen zu einer *Steatosis hepatis* (89).

Menschen, die Träger *PNPLA3*-Polymorphismus I148M sind, zeigen einen erhöhten TAG-Gehalt in der Leber trotz insgesamt reduzierter *de novo*-Lipogenese (90). In Knock-In-Mäusen (*PNPLA3* 148M/M) akkumuliert das mutierte Protein vermehrt an LT, möglicherweise als Folge einer gestörten Ubiquitinierung und somit geblockter proteasomaler Degradation (9, 10). BasuRay et. al. diskutierten, dass diese Akkumulation des mutierten *PNPLA3*-Proteins an LT die Bindung lipolytisch aktiver Proteine und somit die Metabolisierung von TAGs aus LT verhindern könnte (10).

2.4 Leberaufbau

Die Leber ist das größte parenchymatöse Organ des Menschen. Makroskopisch lässt sich die Leber in die zwei großen Leberlappen *Lobus dexter* und *Lobus sinister* sowie die zwei kleineren Leberlappen *Lobus quadratus* und *Lobus caudatus* unterteilen. Die Leber besteht funktionell entsprechend der Pfortaderäste aus acht Lebersegmenten. Histologisch ist das Organ aus Leberläppchen aufgebaut (Abb. 2). Die Haupt-Parenchymzelle der Leber ist die Hepatozyte. Hepatozyten befinden sich innerhalb der Leberläppchen in ein- bis zweireihigen Bälkchen, den Lebertrabekeln. Jeweils zwischen den Leberläppchen befinden sich Portalfelder, in denen Äste des Gallengangs (*Ductus biliferi interlobularis*), der *Vena portae hepatis* (*Vena interlobularis*) und der *Arteria hepatica propria* (*Arteria interlobularis*) liegen (Abb. 2). Im Zentrum eines Leberläppchens befinden sich die Zentralvenenäste der Lebervene. Zwischen den Lebertrabekeln verlaufen Sinusoide vom Portalfeld zur Zentralvene. Sinusoide sind Kapillarräume, die Blut aus der *Vena* und *Arteria interlobularis* enthalten. An der apikalen Seite der Hepatozyten befinden sich die Gallenkanalikuli (*Canaliculi biliferi*). Der Raum zwischen den Endothelzellen der Sinusoide und der basolateralen Seite der Hepatozyten ist der Disse-Raum, der Blutplasma enthält und dem Stoffaustausch dient. In

dem Disse-Raum befinden sich sowohl HSCs als auch Fortsätze der Kupffer-Makrophagen. HSCs synthetisieren Bindegewebe. Kupffer-Makrophagen sind in den Sinusoiden lokalisiert und leberspezifisch.

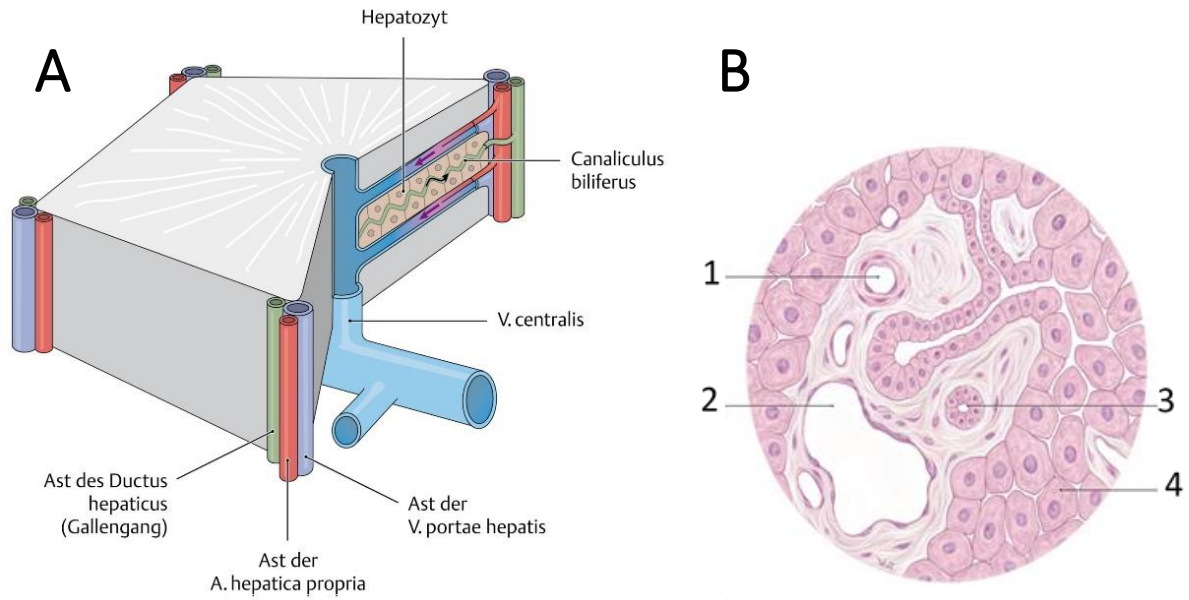


Abb. 2: **Darstellung eines Leberläppchens** A: **Schematischer Aufbau eines Leberläppchens** (*Lobulus hepatis*). B: **Histologisches Bild eines Portalfelds**. 1=Ast der *Arteria hepatica propria* (=Arteria interlobularis). 2=Ast der *Vena portae hepatis* (=Vena interlobularis). 3=Ast eines *Ductus hepaticus* (=Ductus bilifer interlobularis). 4=Hepatozyt. (Mod. nach (91)).

2.5 Leberfunktion

In der Leber finden sowohl katabole als auch anabole Stoffwechselfvorgänge statt. Zum einen nimmt die Leber eine Schlüsselfunktion im Energiehaushalt ein. In der Leber werden Fettsäuren, Kohlenhydrate und Aminosäuren abgebaut und verstoffwechselt. Zum anderen ist die Leber ein Speicher- bzw. Synthesort für Lipide, Glykogen, Galle, Vitamine, Serumproteine wie Albumin und Gerinnungsfaktoren. Sie ist außerdem zuständig für Abbau- und Entgiftungsvorgänge wie den Harnstoffzyklus und die Biotransformation von Noxen. Während der Biotransformation werden körpereigene und fremde apolare, wasserunlösliche Stoffe in polare, wasserlösliche Stoffe transformiert, um eine Ausscheidung über den Urin oder die Gallenflüssigkeit zu ermöglichen.

2.6 Lipidtropfen

2.6.1 Funktion und Struktur von Lipidtropfen

Bei erhöhter Nährstoffexposition werden neben Glykogen v. a. Neutralfette in der Leber gespeichert. Die Speicherung freier Fettsäuren in Form intrazellulärer LT stellt einen effektiven Mechanismus zum Schutz der Zellen vor Lipotoxizität dar (92). Eine pathologische Akkumulation von LT in unterschiedlichen Organen ist jedoch mit der Entstehung von metabolischen Erkrankungen wie Adipositas, Diabetes mellitus, Atherosklerose sowie NAFLD assoziiert und ist relevant bei der Pathogenese zahlreicher chronisch-entzündlicher Erkrankungen (93). LT sind dynamische Zellorganellen, deren Auf- und Abbau hochgradig reguliert sind. Sie sind als Fettsäurespeicher eine Quelle von Substraten für den Energiehaushalt, die Membransynthese sowie die Synthese von Signalmolekülen und Steroidhormonen (94, 95). LT bestehen aus einem Kern aus TAG und Cholesterinestern, der von einer amphiphilen Membran aus Phospholipiden und Sphingomyelin umschlossen ist (Abb. 3). In diesen Monolayer sind unterschiedliche LT-assoziierte Proteine wie die Perilipine eingelagert, die an der Lipid-Homöostase beteiligt sind (94). Die genaue Zusammensetzung des LT-Kerns und der Membranproteine variiert je nach Gewebe und metabolischem Status. LT interagieren mit unterschiedlichen Zellorganellen wie Peroxisomen, Endosomen, dem endoplasmatischen Retikulum, Plasmamembranen und Mitochondrien (96).

Die Speicherung großer Fettsäuremengen in Form von TAGs ist ein Vorgang, der vor allem in Adipozyten, aber auch einer Vielzahl weiterer Zelltypen wie beispielsweise Hepatozyten und Muskelzellen zu finden ist. Hepatozyten übernehmen dabei neben Adipozyten eine zentrale Funktion im Lipidmetabolismus. Fettsäuren können *de novo* in Hepatozyten synthetisiert werden, hauptsächlich werden diese jedoch in Form von nicht-veresterten Fettsäuren bzw. Lipoproteinen aus dem Blut aufgenommen (92). Je nach metabolischem Status speichern die Zellen TAGs oder mobilisieren diese in Form von *very low density lipoprotein* (VLDL) und Ketonkörpern (92).

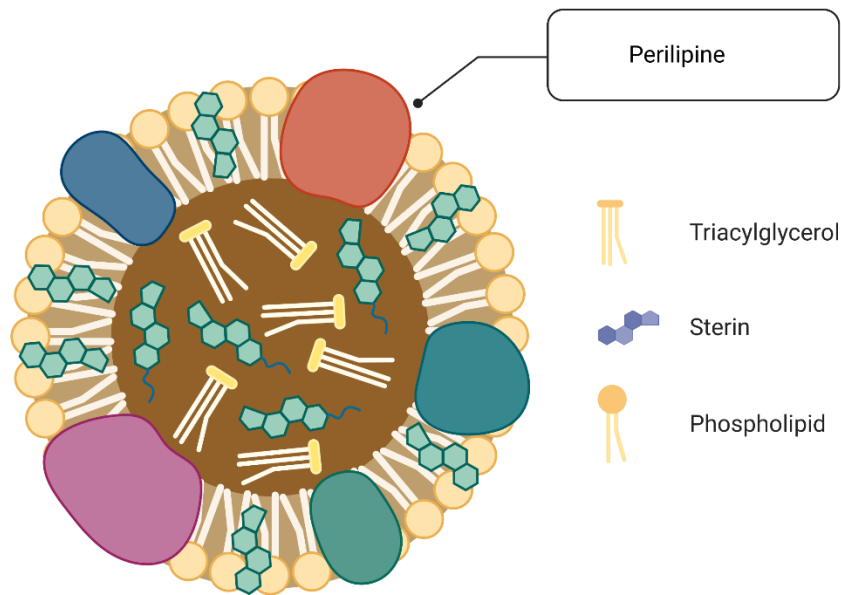


Abb. 3: **Schematische Struktur eines LT** (modifiziert nach (96)). Schematische Darstellung eines LT-Kerns, bestehend aus Cholesterinestern und TAG, umgeben von einem Monolayer aus Phospholipiden, in den LT-assoziierte Proteine der Perilipin-Familie eingelagert sind. Abb. erstellt mit BioRender.com.

2.6.2 Lipidtropfen-assoziierte Proteine der Perilipin-Familie

Die amphiphilen Proteine der Perilipin (PLIN)-Familie sind die wichtigsten LT-assoziierten Proteine und essentiell für LT-Biogenese und -Degradation (97). Die Proteinfamilie umfasst in Säugetieren fünf Mitglieder: Perilipin 1 (Perilipin, PLIN1 (98)), Perilipin 2 (Adipophilin, PLIN2, *adipose differentiation-related protein/ADRP* (99)), Perilipin 3 (*tail-interacting protein of 47 kDa/TIP 47*, PLIN3 (100)), Perilipin 4 (S3-12, PLIN4 (101)) und Perilipin 5 (*myocardial lipid droplet protein/MLDP*, PLIN5, OXPAT (102)). Die aktuelle Nomenklatur Perilipin 1-5 bezieht sich auf die Reihenfolge der Entdeckung (103). Die alte Nomenklatur „PAT-Proteine“ steht für die Anfangsbuchstaben der drei Perilipine, die zuerst entdeckt wurden: Perilipin, Adipophilin und TIP 47. In Säugetieren wurden bisher keine LT ohne Perilipine identifiziert (104), was ihre maßgebliche Bedeutung unterstreicht (Tab. 1).

Die Einteilung erfolgt in konstitutive (*constitutive*; cPAT; Perilipin 1 und 2) und austauschbare (*exchangeable*; ePAT; Perilipin 3-5) Perilipine (105). Perilipine zeigen eine unterschiedliche Affinität zu LT mit TAG- bzw. cholesterinreichem Kern. Perilipin 1A (Hauptform von Perilipin 1), Perilipin 2 und Perilipin 5 sind tendenziell mit TAG-reichen LT assoziiert, wohingegen Perilipin 3 und 4 mit cholesterinreichen LT assoziiert sind (106). Perilipin 2 und 3 wurden zudem an Retinoid-haltigen LT in HSCs und in Retinazellen der Pigmentepithelschicht nachgewiesen (107, 108).

PERILIPIN	Vorkommen und Lokalisation	Spezifische Funktion	Überexpression (<i>in vitro</i> /Mausmodell)	Knock-Out/Down (im Mausmodell)
Perilipin 1	- Adipozyten, steroidale Zellen, <i>de novo</i> in steatotischen Hepatozyten - große LT	Regulation Hormon-abhängiger Lipolyse	- TAG Akkumulation ↑ - basale Lipolyse ↓ (beides <i>in vitro</i>)	- TAG Akkumulation ↓ - aberrante Lipolyse
Perilipin 2	- nahezu ubiquitär - LT-Marker - kleine und große LT	TAG-Speicherung	- Assoziation von ATGL mit LT ↓ - TAG Akkumulation ↑ - LT-Größe + Anzahl ↑ (jeweils <i>in vitro</i>)	- Verringerung einer hepatischen Steatose - TAG Gehalt ↓
Perilipin 3	- nahezu ubiquitär - kleine LT	LT-Biogenese	- TAG-Gehalt ↑ (<i>in vitro</i>)	- hepatische Steatose ↓ - TAG-Gehalt ↓
Perilipin 4	- Adipozyten, Myozyten - naszierende LT	n. b.	n. b.	- verminderte Verfettung von Kardiomyozyten
Perilipin 5	- u. a. oxidative Zellen (Myozyten, braune Adipozyten), Hepatozyten - kleine LT	- Regulation basaler Lipolyse - Interaktion mit HSL, ATGL und ABHD5	- kardiale Dysfunktion - verstärkte Verfettung von Kardiomyozyten - Hemmung der TAG-Mobilisierung durch ATGL und HSL (jeweils im Mausmodell)	- kardiale und hepatische Dysfunktion - Fehlen von LT - TAG Gehalt ↓ - reaktive Sauerstoffspezies ↑

Tab. 1: Überblick über Vorkommen, Funktion sowie Überexpressions- und Knock-Out/Knock-Down-Experimente der Perilipine. Abk.: n. b.=nicht bekannt.

Die Transkription der Mehrzahl der Perilipine wird über die nukleären Transkriptionsfaktoren *peroxisome proliferator-activated receptors* (PPARs) reguliert (109). Die Expression der Transkriptionsfaktoren ist wie das der Perilipine gewebespezifisch. PPAR γ kontrolliert die Transkription von Perilipin 1, 4 und 5 in Adipozyten (109-111) und PPAR α die Transkription von Perilipin 2 in Hepatozyten (109, 112, 113). Bezüglich Perilipin 3 wurde bislang keine Regulation durch PPARs beschrieben (111). Perilipine werden in Abhängigkeit vom metabolischen Status unterschiedlich stark exprimiert. In der Leber variiert die Zusammensetzung der Perilipine je nach LT-Größe, dem Grad der Steatose und der Lokalisation (114, 115). In malignen Tumoren wurde eine verstärkte Expression von

Perilipin 2, 3 und 5 nachgewiesen und Perilipin 2 zeigt in HCC-Zellen eine positive Korrelation mit der Proliferationsrate (116, 117).

2.6.2.1 *Perilipin 1*

Perilipin 1 wird vor allem in weißen und braunen Adipozyten sowie in steroidal Zellen exprimiert (118, 119). Zusätzlich konnte Perilipin 1 *de novo* bei chronischer *Steatosis hepatis* in humanen Hepatozyten nachgewiesen werden (115), wohingegen Perilipin 1 in nicht-steatotischen normalen Hepatozyten nicht exprimiert wird. Perilipin 1 korreliert bei chronischer *Steatosis hepatis* positiv mit dem Grad der Steatose und lokalisiert verstärkt an größeren LT (114). Von Perilipin 1 existieren vier Isoformen, Perilipin 1A-D (120). Perilipin 1A ist die Hauptform in Adipozyten und kommt neben Perilipin 1B in steatotischen Hepatozyten vor (98, 114, 116, 121). Nicht-phosphoryliertes Perilipin 1 hat einen protektiven Effekt auf LT gegenüber Lipasen und kontrolliert den TAG-Speicher (105, 122). Durch β -adrenerge Stimulation wird Perilipin 1 phosphoryliert und die Lipolyse induziert (123, 124). Perilipin 1-Knock-Out Mäuse weisen trotz hochkalorischer Diät einen schlanken Phänotyp und kleinere LT auf als die Wildtyp-Mäuse (122). Eine Überexpression von Perilipin 1A *in vitro* in den präadipozytären 3T3-L1-Zellen führt zu aberranter Lipolyse mit verringerter basaler Lipolyse und vermehrter TAG-Akkumulation (125). Zwischen Perilipin 1 und dem Zytoskelett-Intermediärfilament Vimentin besteht eine Assoziation, wobei Perilipin 1 als Bindeglied zwischen LT und dem Vimentin-haltigen Zytoskelett in Adipozyten agiert (126).

2.6.2.2 *Perilipin 2*

Perilipin 2 wird nahezu ubiquitär exprimiert, gilt als genereller LT-Marker und ist an der TAG-Speicherung beteiligt (99, 127). Perilipin 2 wird in gesunden und steatotischen Hepatozyten exprimiert (99, 114). Auch Perilipin 2 schützt LT vor dem lipolytischen Abbau, wird jedoch im Gegensatz zu Perilipin 1 und 5 nicht über Phosphorylierung reguliert und hat einen schwächeren Einfluss auf die lipolytische Aktivität (104, 128, 129). Die Regulation der Transkription von Perilipin 2 in Hepatozyten erfolgt über PPAR α (109, 112, 113). Perilipin 2 wird in HEK293T-Zellen über den *Hypoxia Inducible Factor-2a* reguliert (130). Perilipin 2-Knock-Out Mäuse, entweder erstellt durch Gendeletion (131) oder durch Gabe eines Antisense-Oligonukleotids (132), entwickeln trotz hochkalorischer Diät keine *Steatosis hepatis* und zeigen im Vergleich mit Wildtyp-Mäusen einen verringerten TAG-Gehalt (131). Die siRNA-vermittelte Herunterregulation in AML12-Zellen, Fibroblasten und Huh7-Zellen *in vitro* gegen

Perilipin 2 wird durch Perilipin 3 kompensiert (133-135). Die zeitgleiche Herunterregulation von Perilipin 2 und 3 führt zu einer reduzierten TAG-Menge und vermehrten Lipolyse durch eine stärkere Assoziation von ATGL mit LT (134, 135). Eine erhöhte Perilipin 2-Expression *in vitro* u. a. in HEK293T-Zellen geht dagegen mit einer geringeren Rekrutierung von ATGL an LT einher (136). Jedoch konnte keine direkte Interaktion von Perilipin 2 und ATGL nachgewiesen werden. Im Zellkulturmodell in murinen Fibroblasten führt eine Überexpression von Perilipin 2 außerdem zu einer gesteigerten TAG-Akkumulation und zu einer Zunahme von LT-Größe und -Anzahl (137).

Perilipin 1 und 2 werden auch als cPAT bezeichnet. Die cPATs sind permanent an LT lokalisiert. Sie sind bei der basalen Regulation der Lipolyse sowie des Fettspeichers von Bedeutung (105).

2.6.2.3 Perilipin 3

Perilipin 3 wird analog zu Perilipin 2 beinahe ubiquitär exprimiert und ist typischerweise mit verhältnismäßig kleinen LT assoziiert (100, 114), da das Protein an der Biogenese von LT beteiligt ist (105). Die Expression von Perilipin 3 wird durch fettreiche Diät reguliert (138) und durch Ölsäure-Behandlung *in vitro* lokalisiert Perilipin 3 vermehrt an LT (100, 139, 140). Bei mikrovaskulärer *Steatosis hepatis* lokalisieren Perilipin 3 und 5 an kleinen neu gebildeten LT (114, 115). Perilipin 3 zählt neben Perilipin 4 und 5 zu den ePATs. Diese bilden einen zytoplasmatischen Pool, werden auf spezifische Signale hin an LT rekrutiert und dienen tendenziell der kurzfristigen LT-Biogenese (105). Perilipin 3 lokalisiert *in vitro* in 3T3-L1-Zellen an kleinen LT in der Nähe des endoplasmatischen Retikulums (141) und durch Lipidakkumulation wird Perilipin 3 in murinen Stromazellen an die zytosolische Seite des endoplasmatischen Retikulums rekrutiert (142). Der siRNA-vermittelte Knock-Down von Perilipin 3 im Mausmodell führt zu einer Reduktion des TAG-Gehalts und verringert die *Steatosis hepatis* (138). Eine Inkubation mit Ölsäure führt nach Herunterregulation von Perilipin 3 in murinen Leberzellen (AML12) zu einer Erhöhung der LT-Anzahl mit Verringerung der LT-Größe bei unverändertem TAG-Gehalt (135). Auf die Perilipin 2-Expression in Huh7-Zellen hat das Fehlen von Perilipin 3 keine Auswirkung (133). Die Überexpression von Perilipin 3 *in vitro* in murinen Myoblasten-Zellen (C2C12) resultiert in einem erhöhten TAG-Gehalt im Vergleich zu den Kontroll-Zellen (143).

2.6.2.4 Perilipin 4

Perilipin 4 wird neben weißem und braunem Fettgewebe auch in Herz- und Skelettmuskulatur exprimiert (144). Perilipin 4 wurde *in vitro* an naszierenden LT von 3T3-L1 Adipozyten nachgewiesen (101) und wird während der Differenzierung von Adipozyten induziert (145). Die Regulation der Transkription von Perilipin 4 in Adipozyten findet wie bei Perilipin 1 und 5 über PPAR γ statt (109-111). Perilipin 4 zählt analog zu Perilipin 3 und 5 zu den ePATs (105). Perilipin 4 weist zwar keine PAT-Domäne auf, wird jedoch aufgrund der spezifischen Aminosäuresequenz zu der PAT- bzw. Perilipin-Familie gezählt (145). Bei Perilipin 4-Knock-Out-Mäusen ist trotz hochkalorischer Diät keine Verfettung des Herzgewebes zu beobachten (146). Eine Auswirkung auf andere Gewebe, wie beispielsweise das Fettgewebe, wurde dabei nicht beschrieben.

Im Zusammenhang mit amyotropher Lateralsklerose wurde in Mäusen eine signifikante Korrelation der Perilipin 4-Expression in Neuronen des Rückenmarks mit der Progression der Erkrankung entdeckt (147). Zhu et. al. diskutieren dabei eine Beteiligung der Perilipin 4-Expression am Tod neuronaler Zellen (147).

2.6.2.5 Perilipin 5

Perilipin 5 wird hauptsächlich in oxidativem Gewebe wie u. a. der Herz- und Skelettmuskulatur und dem braunen Fettgewebe exprimiert, zusätzlich in der Niere, in der Speicheldrüse, im Pankreas, in Epithelien des Gastrointestinal- und Urogenitaltraktes, in der Haut sowie in der Leber (102, 148-150) und weniger stark in weißem Fettgewebe (144). Perilipin 5 lokalisiert bei *Steatosis hepatis* an LT, in normalen Hepatozyten zytoplasmatisch und wurde zudem an LT in der Nähe von Mitochondrien nachgewiesen (149, 150). Bei *Steatosis hepatis* (150, 151) und während erhöhter Fettsäureoxidation (105) wird Perilipin 5 vermehrt exprimiert. Perilipin 5 wird außerdem bei Erkrankungen mit verstärkter LT-Akkumulation in Herzmuskelzellen sowie in unterschiedlichen Tumoren, wie beispielsweise dem HCC (150), gesteigert exprimiert. Perilipin 5 rekrutiert *in vitro* in Kardiomyozyten Mitochondrien an die Oberfläche von LT (148), hat einen bedeutenden Einfluss auf die Lipid-Homöostase und führt in Abhängigkeit vom Phosphorylierungsstatus zu einer vermehrten TAG-Akkumulation durch Hemmung der Lipolyse (151, 152). Perilipin 5 interagiert mit den Lipasen ATGL und Hormonsensitive Lipase (HSL) (129) sowie dem Ko-Aktivator von ATGL α/β hydrolase domain containing-5 (ABHD5) (152, 153). Möglicherweise antagonisiert Perilipin 5 Lipasen funktionell und vermindert hierdurch den oxidativen Stress (154). Diese

Funktion wird durch die indirekte Inhibierung von ATGL mit kompetitiver Bindung von ABHD5 deutlich (151). Perilipin 5 Knock-Out-Mäuse weisen weniger LT und einen reduzierten TAG-Gehalt in Kardiomyozyten auf, zeigen eine verstärkte Fettsäure-Oxidation, vermehrt ROS und eine verschlechterte Herzfunktion (154, 155). Auch in der Leber führt der Knock-Out von Perilipin 5 zu einem verminderten Fettgehalt, kleineren LT, einer erhöhten mitochondrialen Oxidationskapazität und vermehrt hepatozellulären lipotoxischen Schäden (151). Eine Überexpression von Perilipin 5 in murinen Kardiomyozyten und im Zellkulturmodell führt zu einem erhöhten TAG-Gehalt mit ausgeprägter Verfettung des Herzgewebes und einer verminderten β -Oxidation mit konzentrischer linksventrikulärer Hypertrophie (148, 156). Weitere Zellkulturstudien dagegen zeigen, dass die Überexpression von Perilipin 5 zwar zu einer Akkumulation von TAG, jedoch gleichzeitig zu einer vermehrten Oxidation langkettiger Fettsäuren führt (144). Außerdem wird durch die Überexpression im Mausmodell die Mobilisierung der TAG durch ATGL und HSL gehemmt (157).

2.7 Lipolyse

Als Lipolyse wird der schrittweise hydrolytische Abbau von TAG zu freien Fettsäuren und Glycerin bezeichnet. Hierbei werden TAGs aus dem LT-Kern mobilisiert und es werden Fettsäuren freigesetzt. Der Abbau verläuft in drei Schritten und wird überwiegend von drei Lipasen katalysiert. Zu den Lipasen zählen ATGL, HSL und Monoacylglyceridlipase (MAGL). Diese bewegen sich zwischen dem Zytosol, der Oberfläche von LT und dem endoplasmatischen Retikulum. ATGL katalysiert den ersten Schritt der Lipolyse und nimmt daher eine Schlüsselfunktion ein (158). Aus einem TAG entsteht nach Abspaltung einer Fettsäure ein Diacylglycerid (DAG). HSL katalysiert die Abspaltung einer weiteren Fettsäure unter der Entstehung eines Monoacylglycerids (MAG) (130). Die Abspaltung der letzten Fettsäure katalysiert MAGL, dabei entsteht neben einer Fettsäure Glycerin (130).

ATGL wird ubiquitär exprimiert, mit den höchsten Expressionsspiegeln in weißem und braunem Fettgewebe (81). ATGL ist das Schlüsselenzym der Lipolyse in Adipozyten sowie Hepatozyten. ABHD5 ist ein bedeutender Aktivator, der die ATGL-vermittelte Lipidhydrolyse-Aktivität um das bis zu 20-fache steigert (159). Sowohl ATGL als auch PNPLA3 werden durch Energiezufuhr *in vitro* in 3T3-L1 Präadipozyten und in Fettgewebe von Mäusen reguliert, verhalten sich jedoch gegenläufig (81). Beim Fasten wird ATGL im Mausmodell im Fettgewebe hochreguliert, in der Zellkultur verringert sich die ATGL-Expression durch Insulinzugabe (81).

Durch den Knock-Out von ATGL in Mäusen ist eine massive Zunahme von LT in unterschiedlichen Geweben nachweisbar, u. a. im Herzen (160).

HSL wird analog zu ATGL vor allem, jedoch nicht ausschließlich, in weißem und braunem Fettgewebe exprimiert (104, 161). HSL wird durch Adrenalin und weitere β -Adrenorezeptor-Agonisten induziert. Die Aktivierung erfolgt durch eine Proteinkinase A (PKA)-abhängige Phosphorylierung an zwei Serin-Resten (Ser659 und Ser660) (162). Neben Perilipin 1 bindet HSL auch Perilipin 2, 3 und 5 (129). HSL zeigt eine hohe Hydrolyse- α -Aktivität gegenüber DAG, des Weiteren katalysiert das Enzym die Hydrolyse von Cholesterol- und Retinylestern (161).

MAGL ist eine Serinhydrolase und katalysiert neben der Hydrolyse von MAG die Hydrolyse von 2-Arachidonoylglycerol, einem Endocannabinoid, das eine Rolle in der neuronalen Kommunikation spielt (163, 164). Bei der Hydrolyse entsteht Arachidonsäure, ein Vorläufer von Prostaglandinen und weiteren Entzündungsmediatoren. Zudem korreliert eine hohe MAGL-Expression in humanen HCCs positiv mit Tumorgröße, fortgeschrittenem Tumorstadium und schlechter Prognose (165, 166).

2.7.1 Lipolyse im Fettgewebe

Die Regulation der Lipolyse verläuft nicht in jedem Gewebe identisch. Im Fettgewebe ist der Mechanismus am meisten untersucht. Die Lipolyse wird über Hormone und Botenstoffe, die über spezifische Rezeptoren eine intrazelluläre Signalkaskade aktivieren, induziert (Abb. 4). Die Aktivierung des in die Adipozytenmembran eingelagerten G-Protein-gekoppelten β -Adrenorezeptors erfolgt durch Bindung eines β -Rezeptor-Agonisten wie Adrenalin, Noradrenalin oder Isoprenalin. Durch die Bindung wird die intrazelluläre Adenylatzyklase aktiviert, die die Umsetzung von Adenosintriphosphat (ATP) zu zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) katalysiert. In der Folge steigt die Konzentration von intrazellulärem cAMP an und die katalytischen Untereinheiten der PKA werden aktiviert (167). Durch Phosphorylierung werden Aktivierung und Interaktion von Enzymen und Proteinen gesteuert. Die PKA phosphoryliert spezifische, an der Lipolyse beteiligte Proteine wie Perilipin 1 und führt zur Aktivierung von ATGL und HSL (98).

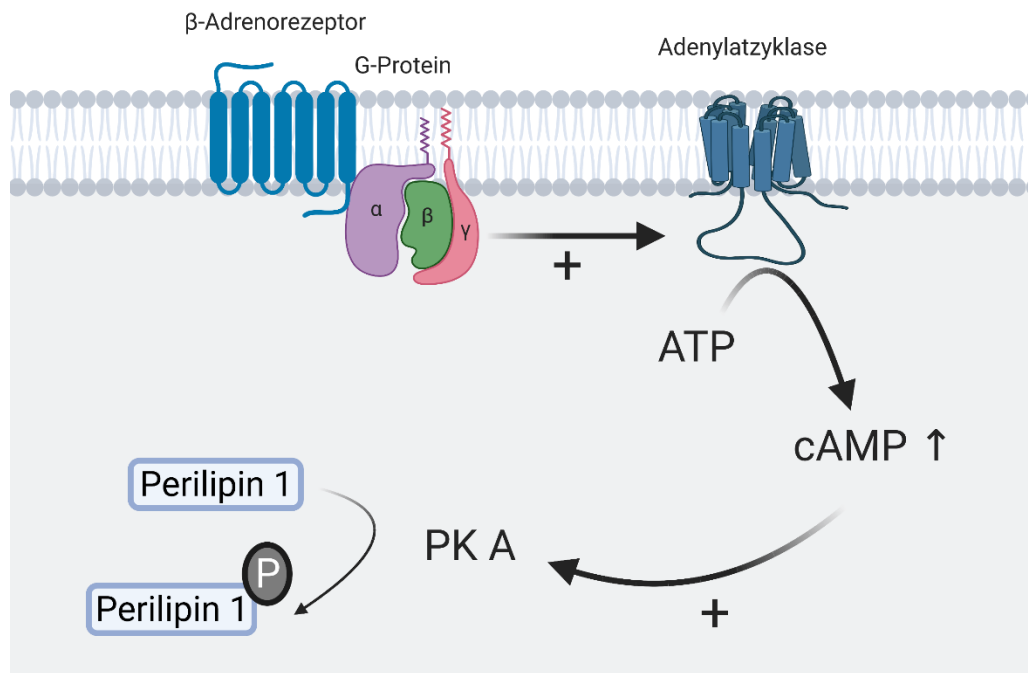


Abb. 4: **Aktivierungsmechanismus der PKA.** Schematische Darstellung der intrazellulären Signalkaskade nach Bindung eines β -Adrenorezeptor-Agonisten in Adipozyten. Die Bindung führt zu einer Aktivierung der Adenylatzyklase über Untereinheiten des G-Proteins und somit zu einem intrazellulären Anstieg der cAMP-Konzentration. Dies wiederum resultiert in einer Aktivierung der PKA mit anschließender Phosphorylierung verschiedener Proteine wie Perilipin 1. Abb. erstellt mit BioRender.com.

Im basalen Zustand und in Abwesenheit lipolytischer Stimuli sind ATGL und HSL zytoplasmatisch lokalisiert (123, 168, 169) und ABHD5 bildet mit Perilipin 1 einen Komplex, der an LT lokalisiert ist (170) (Abb. 5). Bei β -adrenerger Stimulation werden HSL und Perilipin 1 von PKA phosphoryliert. Infolge der Phosphorylierung von Perilipin 1 dissoziiert ABHD5 von Perilipin 1 und rekrutiert ATGL an LT, wodurch die Lipolyse induziert wird (124). Perilipin 1 bindet die phosphorylierte HSL an der LT-Oberfläche (123, 129, 168).

Perilipin 1 spielt eine Schlüsselrolle bei der Lipolyse im Fettgewebe. Das Protein reguliert die basale Lipolyse durch das Sequestrieren von ABHD5, wodurch in Abwesenheit lipolytischer Stimuli die Bindung und Aktivierung von ATGL verhindert wird (124). Durch Knock-Out von Perilipin 1 in Mäusen erhöht sich die basale lipolytische Aktivität durch den Verlust der indirekten Perilipin 1-abhängigen Hemmung der ATGL-vermittelten basalen Aktivität der Lipolyse in Fettgewebe (169). Ferner ist in Perilipin 1-Knock-Out-Mäusen eine geringere Maximalgeschwindigkeit der gesamten lipolytischen Aktivität in Fettgewebe nachweisbar, möglicherweise da phosphoryliertes Perilipin 1 für die stimulierte Translokation von HSL an LT unabdingbar ist (169). Ein Einfluss von Perilipin 1 auf MAGL wurde bislang nicht beschrieben.

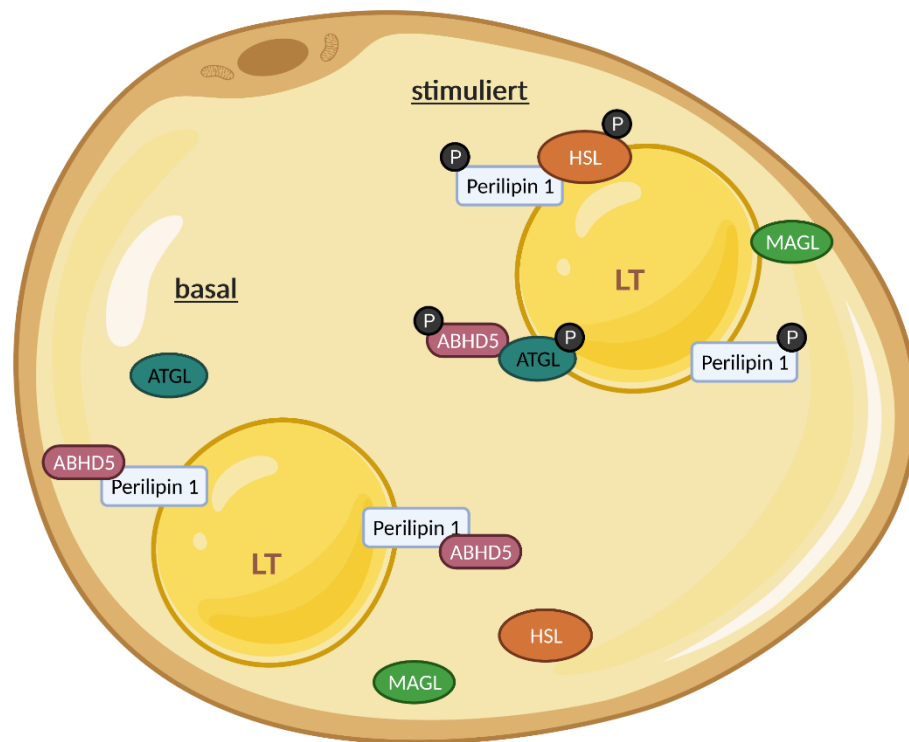


Abb. 5: **Lipolyse in Adipozyten** (modifiziert nach (104)). Schematische Darstellung der Lipolyse in Adipozyten in basalem und in stimuliertem Zustand. Durch Phosphorylierung dissoziiert ABHD5 von Perilipin 1 und rekrutiert ATGL an LT. Phosphoryliertes Perilipin 1 bindet phosphoryliertes HSL am LT. Abb. erstellt mit BioRender.com.

2.7.2 Lipolyse in oxidativen Geweben

Im Gegensatz zu weißem Fettgewebe spielt in oxidativ aktiven Geweben nicht Perilipin 1, sondern Perilipin 5 eine zentrale Rolle bei der Regulation der Lipolyse (Abb. 6). In Abwesenheit lipolytischer Stimuli bindet Perilipin 5 an ATGL (128, 152), ABHD5 (151, 152) und HSL (129) und schützt somit den TAG-Kern vor dem Abbau. Überlappende Bindestellen von ABHD5 und Perilipin 5 an ATGL schließen ein gleichzeitiges Binden beider Proteine aus (104, 152). Sowohl ABHD5 als auch Perilipin 5 rekrutieren ATGL an LT, mit entgegengesetztem Effekt auf die Lipolyse. Eine Bindung von ATGL und Perilipin 5 verringert die Lipolyse, wohingegen die Bindung von ATGL und ABHD5 die Lipolyse triggern (128). Analog zu Perilipin 1 bei der Lipolyse in Adipozyten wird in oxidativen Geweben durch die PKA-vermittelte Phosphorylierung von Perilipin 5 die Lipolyse verstärkt, wobei der zugrunde liegende Mechanismus noch nicht abschließend geklärt ist (128, 171). Die Freisetzung von ABHD5 könnte zu einer Aktivierung von ATGL führen (171). Unklar ist, ob ATGL und HSL durch Phosphorylierung von Perilipin 5 freigesetzt werden (104). Im Gegensatz zu weißem Fettgewebe führt in braunem Fettgewebe eine Aktivierung der PKA nicht zu einer erhöhten Rekrutierung von ATGL an LT (128).

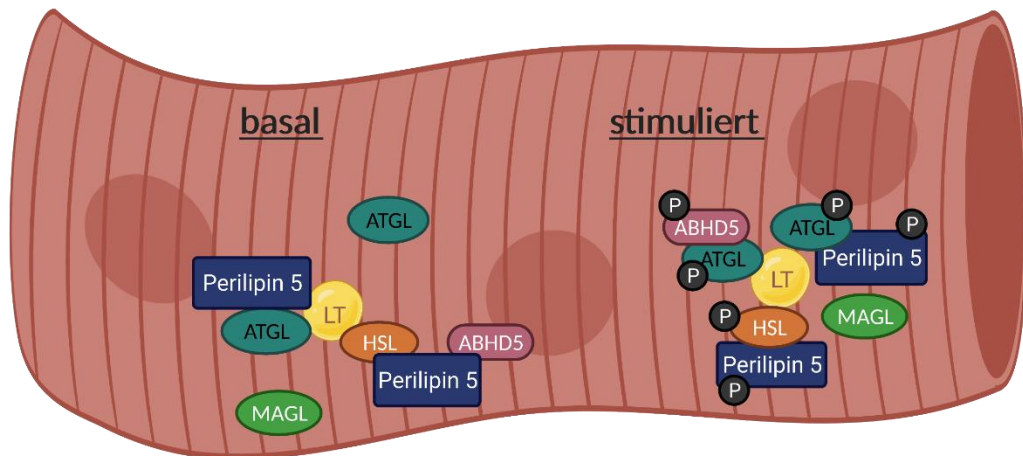


Abb. 6: **Lipolyse am Beispiel einer Herzmuskelzelle** modifiziert nach (104). Schematische Darstellung der Lipolyse in oxidativen Geweben. Bei Phosphorylierung dissoziiert ABHD5 von Perilipin 5 und rekrutiert ATGL an LT. Perilipin 5 bindet in phosphoryliertem Zustand sowohl ATGL als auch HSL am LT. Abb. erstellt mit BioRender.com.

Die Regulation der Lipolyse hängt maßgeblich von gewebespezifischen Faktoren und von der Zusammensetzung der an LT assoziierten Perilipine ab (128). Im Vergleich mit Fettgewebe und oxidativen Geweben ist die Lipolyse in der Leber noch wenig erforscht. Sowohl ATGL als auch HSL sind bei der Lipolyse in der Leber von zentraler Bedeutung (172). Zudem scheint Perilipin 5 ein wesentlicher Akteur zu sein, eine erhöhte hepatische Perilipin 5-Expression stört die Wechselwirkung von ATGL und ABHD5 durch kompetitive Bindung von ABHD5 (151). Perilipin 5-Knock-Out-Mäuse zeigten bei Vorhandensein von ATGL und ABHD5 dagegen eine verstärkte hepatische Lipolyse (151). Weitere noch unbekannte Lipasen und Proteine könnten an der Regulation der Lipolyse in der Leber beteiligt sein (104, 172).

2.8 Zielsetzung

Nur bei einem Teil der NAFLD-PatientInnen kommt es zu einer Progression der Erkrankung im Sinne einer NASH mit Fibrose bis hin zur Leberzirrhose, die Ursache ist nicht abschließend geklärt. Perilipine sind die wichtigsten LT-assoziierten Proteine und Perilipin 1 und 5 sind maßgeblich an der Lipolyse in Fett- bzw. oxidativ aktiven Geweben beteiligt. Die Lipolyse in Hepatozyten ist dagegen wenig untersucht. In unpublizierten Vorarbeiten der Arbeitsgruppe von Straub und Koautoren konnte anhand eines humanen ASH-Kollektivs gezeigt werden, dass bei homozygoten Trägern des *PNPLA3*-Polymorphismus I148M Perilipin 5 weniger an LT, sondern eher zytoplasmatisch und diffus partiell nukleär lokalisiert. Bei diesen PatientInnen war außerdem die mRNA-Menge von *PLIN5* reduziert. Auf Proteinebene konnte *in vitro* gezeigt werden, dass *PNPLA3* mit ATGL und Perilipin 5 interagiert. *PNPLA3*, ATGL und Perilipin 5 bildeten diesen Ergebnissen zufolge einen Komplex und kolokalisierten an LT.

Ziel der vorliegenden Dissertation war es, den zugrunde liegenden Pathomechanismus der Entstehung sowie Progression einer NAFLD in Zusammenhang mit dem *PNPLA3*-Polymorphismus I148M weiter zu erforschen. Da *PNPLA3* an LT lokalisiert, soll eine Interaktion von *PNPLA3* mit LT und Perilipinen sowie der genetische Einfluss von *PNPLA3* bzw. *PNPLA3* I148M auf Akteure im Lipidmetabolismus weitergehend untersucht werden. Zusätzlich soll die Auswirkung von *PNPLA3* I148M auf die Lipolyse analysiert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Geräte

Gerätebezeichnung	Hersteller
Analysewaage	Sartorius AG, Göttingen, DE
Centrifuge Z 216 MK	Hermle Labortechnik GmbH, Gosheim, DE
Chemilumineszenzimager Fusion Solo S	Vilber Lourmat, Eberhadzell, DE
CO ₂ -Inkubator BBD6220	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
CO ₂ -Inkubator C200	Labortect GmbH, Göttingen, DE
Cryo 1°C Freezing Container	Thermo Fisher Nalgene®
Digital Sonifier® SLPe	Emerson Electric Company, Missouri, USA
HARTMANN-Wärmeschrank	Paul Hartmann AG, Heidenheim, DE
Homogenisator, Precellys® 24	Bertin Technologies, Saint Aubin, Frankreich
Konfokalmikroskop SP8	Leica Biosystems, Wetzlar, DE
Kryostat Leica CM3050 S	Leica Biosystems
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
PowerPac™ 3000	Bio-Rad Laboratories

QuantStudio 3 Realtime PCR System	Thermo Fisher Scientific
Spektralphotometer NanoDrop 1000	Thermo Fisher Scientific
Spektrophotometer Tecan Spark 10 M	Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz
Sterilbank HERAsafe KS12	Thermo Fisher Scientific
Systemmikroskop Leica DM LM	Leica Mikrosysteme GmbH
Thermocycler GeneAmp® PCR System 9700	Thermo Fisher Scientific
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
Trockenschrank Heraeus™ Kelvitron®	Thermo Fisher Scientific
Universalzentrifuge Heraeus™ Multifuge™ X3	Thermo Fisher Scientific
UV-Transilluminator	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, DE
Vibratom Leica VT 1.200S	Leica Biosystems
Vortex-Genie 2	Scientific Industries Inc., New York, USA
VWR® Disposable Pellet Mixer	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
Wippschüttler CAT ST 5	Ingenieurbüro CAT M. Zipperer GmbH, Ballrechten-Dottingen, DE
Zählkammer Neubauer Improved	BRAND GmbH + CO KG, Wertheim, DE

3.2 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

6-Well Platten (Gewebekultur)	Falcon® Cell Culture Insert Companion Plates	Corning Incorporated, NY, USA
96-Well Platte (Realtime-PCR)	MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate	Thermo Fisher Scientific
Abdeckfolie für 96-Well Platten	MicroAmp™ Optical Adhesive Film	Thermo Fisher Scientific
Chamber Slide™ 8-Well Glass-Slide	Nunc® Lab-Tek® II Chamber Slide™ System	Thermo Fisher Scientific
Deckgläser	Menzel Gläser, 24x 60 mm	Thermo Fisher Scientific
Einsatz mit Membran (Gewebekultur)	Falcon® Cell Culture Insert, PET Membran 0,4 µm Porengröße	Corning Incorporated
Filterspitzen 10 µl, 100 µl, 1250 µl	SafeSeal SurPhob, steril, Low Binding, graduiert	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, DE
Kryoröhrchen	Nalgene® Cryoware, Cryogenic Vials	Thermo Scientific
Objektträger Superfrost® Plus (25x 75x 1,0 mm)	Menzel Gläser, geschliffen	Thermo Scientific
Pasteurpipetten	ohne Wattestopfen, Kalksoda- Klarglas, 150 mm	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
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, graduiert	Biozym Scientific GmbH
Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1250 µl	Refill System Nerbe	Nerbe plus GmbH, Winsen, DE
Precellys® Lysing Kit Tubes	2 ml, Ceramic Beads	Bertin Technologies
Nitrocellulose Membran	Nitrocellulose membrane, 0,45 µm	Bio-Rad Laboratories
Eppendorf Tubes® 1,5 ml	Safe-Lock Tubes, PCR clean	Eppendorf AG
Serologische Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	Cellstar®, steril, frei von DNase, RNase, DNA, Pyrogen	Greiner Bio-One GmbH

Whatman™- Chromatographiepapier	GE Healthcare 3 MM Chromatographie-Papier	Thermo Fisher Scientific
Zellkulturschale (60x 15 mm und 100x 20 mm)	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

3.3 Chemikalien, Lösungen, Reagenzien

Reagenz	Bezeichnung	Hersteller
Acrylamidstammlösung mit 0,8 % Bisacrylamid	Rotiphorese® Gel 30	Carl Roth GmbH
Agarose Pulver	UltraPure™ Agarose	Invitrogen, Kalifornien, USA
APS	Ammoniumperoxodisulfat	Carl Roth GmbH
Bradford Reagenz	Bio-Rad Protein Assay, Farbstoff+ Konzentrat	Bio-Rad Laboratories
Bromphenolblau	für Natriumsalze	Carl Roth GmbH
BSA (bovines Serumalbumin)	Albumin Fraktion V	Carl Roth GmbH
Chloroform	Trichlormethane* Methylidyne trichloride	Sigma-Aldrich
Coumarinsäure	p-Coumaric acid ≥ 98.0 %	Sigma-Aldrich
DMSO	Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich
DTT	Dithiothreitol	BioChemica AppliChem GmbH, Darmstadt, DE
Essigsäure	Essigsäure Rotipuran® 100 %	Carl Roth GmbH
Ethanol	Absolut, ≥99,8 %	Honeywell Research Chemicals, Seelze, DE
Formaldehyde solution	Formaldehydlösung, 36,6-38 % in Wasser	Sigma-Aldrich
Glycerin	Glycerol Reagent Plus™	Sigma-Aldrich
Glycin	≥ 99 %, 75,07 g/mol	Carl Roth GmbH

Halt™ Protease & Phosphatase Inhibitor	Cocktail (100X) Lot: LD144507	Thermo Fisher Scientific
Isopropanol	2-Propanol ≥ 99 %	Sigma-Aldrich
Luminol	Luminol ≥ 97 %	Sigma-Aldrich
Methanol	≥ 99,8 %	Honeywell Research Chemicals
Magermilchpulver	Nonfat Dried Milk Powder	BioChemica AppliChem GmbH
Nukleasefreies Wasser	Nuclease-Free-Water	Qiagen, Hilden, DE
PBS-Puffer	Phosphate Buffered Saline, PBS-buffer (1X, Dulbecco 's)	BioChemica AppliChem GmbH
PEI-Reagenz	Polyethylenimine (in PBS) Stammlösung 1,67 mM	Sigma-Aldrich
Penicillin-Streptomycin	P0781	Sigma-Aldrich
PeqGREEN	DNA/RNA-Farbstoff, 1 ml	VWR International GmbH
Ponceau S	Ponceau S solution, 0,1 % (w/v) in 5 % Acetic Acid	Sigma-Aldrich
Salzsäure (HCl)	Salzsäure, rauchend, 37 %	Carl Roth GmbH
SDS	Natriumdodecylsulfat in Pellets, M 288,4	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DE
SYBR™ Green	SYBR™ Green PCR Master Mix	Thermo Fisher Scientific
TEMED (≥ 98,5 %)	Tetramethylethylendiamin	Carl Roth GmbH
Transfektionsmedium	Opti-MEM® GlutaMAX™	Thermo Fisher Scientific
Transfektionsreagenz	Lipofektamin®2000 Reagent	Thermo Fisher Scientific
Tris	Tris Ultrapure, 121,14 g/mol	BioChemica AppliChem GmbH
Triton® X100	t-Octylphenoxy- polyethoxyethanol	Sigma-Aldrich
TRIzol	TRI Reagent™ Solution, RNA Isolation Reagent	Invitrogen

Trypsin	Trypsin-EDTA Solution (0,25 %)	Sigma-Aldrich
Tween	Tween 20, Molecular Biology Grade	MP Biomedicals, Eschwege, DE

3.4 Puffer und Medien

3.4.1 Puffer

Die Puffer wurden in der Regel mit doppelt destilliertem Wasser angesetzt.

Bezeichnung	Bestandteil	Menge/Konzentration
Sechsfach Protein- Probenpuffer	Tris-HCl (pH 6,8)	350 mM
	SDS	10,28 % (m/V)
	Glycerin	36 % (v/v)
	DTT	600 mM
	Bromphenolblau	1 Spatelspitze
Zehnfach Lysispuffer	Cell Signaling Technologies, Danvers, USA	10 % (v/v)
10x NEBuffer™ 2.1	BioLabs® Inc.	10 % (v/v)
„CO-IP-Puffer“	Tris HCl	50 mM
	EDTA	15 mM
	NaCl	100 mM
KHB-Puffer (Sigma-Aldrich)	Krebs-Henseleit Buffer Modified	in 1 l doppelt destilliertem Wasser, 2 g/l Glucose
PBS Zellkultur (Sigma-Aldrich)	Dulbeccos' s Phosphate Buffered Saline (DPBS)	gebrauchsfertig
Proteinase K Puffer pH 8,5	Tris	100 mM
	EDTA*H ₂ O	5 mM
	SDS	0,2 %
	NaCl	200 mM
SDS-Sammelgelpuffer pH 6,8	Tris	500 mM
	HCl	je nach pH titriert

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

3.4.2 Kulturmedien

Verwendung	Medium bzw. Zusatz	Hersteller
Zellkultur	DMEM (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>), 4,5 g/l D-Glucose, L-Glutamine, Pyruvate	Thermo Fisher Scientific
Zellkultur	10 % FBS, F7524	Sigma-Aldrich
Gewebekultur	DMEM	ATCC, Wesel, DE
Gewebekultur	10 % FBS (HyClone®)	Thermo Fisher Scientific

3.5 Standards, Größenmarker

Verwendung	Bezeichnung	Hersteller
Agarose-Gelelektrophorese	50 kb DNA Ladder	BioLabs®Inc., Ipswich, England
Proteinquantifizierung	<i>Purified BSA</i> 10 mg/ml	BioLabs®Inc.
Immunblot	<i>PageRuler™ Prestained Protein Ladder</i>	Thermo Fisher Scientific

3.6 Fluoreszenzfarbstoffe

Abkürzung	Bezeichnung	Darstellung	Verdünnung	Hersteller
Bodipy	Bodipyromethen	Lipide, LT	1:250	Thermo Fisher Scientific
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol	DNA, Zellkerne	1:10.000	Sigma-Aldrich

3.7 Substanzen zur Induktion der Lipolyse und Steatogenese

Hersteller aller hier aufgeführter Substanzen ist Sigma-Aldrich.

Substanz	Bezeichnung	Molekulargewicht/Konzentration	Gelöst in
Forskolin	Forskolin	410,5	DMSO
IBMX	3-Isobutyl-1-Methylxanthine	222,2	DMSO
Isoproterenol	(-) Isoproterenol hydrochloride	247,72	DMSO
Ölsäure	BSA-gekoppelt	100 mg/ml	DPBS

3.8 Kits

Bezeichnung	Hersteller
QIAquick®Gel Extraction Kit 50	Qiagen
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Thermo Fisher Scientific
ReadyMix™REDTaq® PCR Reaction Mix MgCl ₂	Sigma-Aldrich
Dako REAL™ Nachweissystem (K5001)	Align Dako, Santa Clara, USA
Dako EnVision™ FLEX Nachweissystem (K4007)	Align Dako

3.9 Zellkulturlinien

Es wurden drei adhären wachsende humane Zelllinien verwendet.

Bezeichnung	Ursprungsgewebe	Medium
Huh7	Leber, HCC	DMEM 4,5 g Glucose
HepG2	Leber, HCC	DMEM 4,5 g Glucose
HEK293T	Niere, embryonale Zellen	DMEM 4,5 g Glucose

3.10 Proteine

3.10.1 Enzyme

Bezeichnung	Enzymaktivität	Hersteller	Artikelnummer
<i>Hind III</i>	20.000 U/ml	BioLabs®Inc.	R0104S
Proteinase K	≥30 U/mg	Sigma-Aldrich	P6556

3.10.2 Antikörper

Primärantikörper

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurde zur Detektion von PNPLA3 der Primärantikörper von Abnova Corporation (B01P) in der Verdünnung 1:250 und zur Detektion von ATGL der Primärantikörper von Cell Signaling Technology® (2138) in der Verdünnung 1:250 verwendet.

Antigen	Verdünnung		Tierspezies und Klonalität	Hersteller	Artikelnr.
	Immun- blot	Immun- histochemie			
Aktin	1:10.000	-	Maus, monoklonal	Merck KGaA, Darmstadt, DE	MAB1501 Clone C4
ATGL	1:3000	-	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling Technology®	2138
Perilipin 1	1:100	1:25	Maus, monoklonal	PROGEN Bio- technik GmbH, Heidelberg, DE	651156 Clone Peri 112.17
Perilipin 2	1:20	1:25	Maus, monoklonal	PROGEN Bio- technik GmbH	651102 Clone AP 125
Perilipin 3	1:1.000	1:400	Meerschweinchen, polyklonal	PROGEN Bio- technik GmbH	GP30
Perilipin 4	-	1:200	Meerschweinchen, polyklonal	PROGEN Bio- technik GmbH	GP38
Perilipin 5	1:1.000	1:250	Meerschweinchen, polyklonal	PROGEN Bio- technik GmbH	GP31
Phospho- HSL	1:3000	-	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling Technology®	4126 (Ser660)
PNPLA3	1:1.000	-	Kaninchen, polyklonal	Sigma-Aldrich	SAB21080 57-100UL
PNPLA3	-	1:200	Maus, polyklonal	Abnova Corporation, Taipeh, Taiwan	B01P

Sekundärantikörper für Immunfluoreszenzfärbung und Immunhistochemie

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden Sekundärantikörper der Firma Invitrogen in einer Verdünnung von 1:250 verwendet. Die Bezeichnungen lauten je nach zu verwendender Wellenlänge Alexa Fluor® 546 (Ziege-Anti-Maus) und Alexa Fluor® 635 (Ziege-Anti-Kaninchen). Das für die Immunhistochemie verwendete Peroxidase-markierte Anti-Maus Globulin ist im Dako EnVision FLEX Nachweissystem (Code K4007) gebrauchsfertig enthalten. Als Anti-

Meerschweinchen Globulin wurde ein biotinylierter Ziegen-Antikörper (BA-7000) der Firma Vector Laboratories verwendet.

Sekundärantikörper für den Immunblot

Antikörper	Verdünnung	Tierspezies	Hersteller	Artikelnummer
Anti-Maus Highly cross-absorbed	1:3000	Ziege	Invitrogen	A16078
Anti-Kaninchen	1:3000	Ziege	Bio-Rad Laboratories	170-6516
Anti-Meerschweinchen Highly cross-absorbed	1:3000	Ziege	Invitrogen	A18775

3.11 Nukleinsäuren/Oligonukleotide

Primer für die Realtime-PCR

Die Primer PLIN1, 2, 3, 5 wurden von Thermo Scientific/Biopolymers und die Primer für PNPLA3, ATGL, HSL von Sigma-Aldrich hergestellt.

Zielgen	Sequenz forward 5'-3'	Sequenz reverse 5'-3'	µM
PLIN1	CTGCCGGTGGTGAGTGGCAC	CACAGAGGCCACCAGGGGGT	5
PLIN2	GATGGCAGGCGACATCTACT	GGACCTACCAGCCAGTTGAG	5
PLIN3	ATCGGTCATGGGCTCCCGCT	CTGTTCTGCCGCTGCTGCT	5
PLIN5	GCTGTGGATGTTGTACTGGA	CTGCTGTCTCCTCTGATCCT	5
PNPLA3 („Q5+6“) („Q7+8“)	GAAGTCGTGGATGCCTTGGT	ATATCGCACGCCTCTGAAGG	5
	TCAGAGGCGTGCGATATGTG	TAGAAGGGGGACACGGTGAT	5
ATGL	ACCAGCATCCAGTTCAACCT	ATCCCTGCTTGCACATCTCT	5
HSL	AGCCTTCTGGAACATCACCGAG	TCGGCAGTCAGTGGCATCTCAA	5

Primer für die PCR von PNPLA3 (resultiert in einem 724 Basenpaaren langen Transkript)

Primer Nummer	Sequenz 5'-3'	DNA-Strang	µM
#73 forward	AGGCCTTGGTATGTTCTGCTGC	plus	10
#74 reverse	TCCACCTTCCAGGGGTAACA	minus	10

Primer für die PNPLA3-Sequenzierung nach Sanger

Primer Nummer	Sequenz 5' ->3'	DNA-Strang	μM
#46 reverse	CCAGCTGTGGCTACTCTGTC	minus	10

3.12 Software

Programm	Herausgeber
Adobe® Photoshop CS5	Adobe Systems Incorporation, Dublin, Irland
Chromas Version 2.6.2	Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, Australia
Image J (64 bit) 1.43	National Institutes of Health, Bethesda, Maryland
Microsoft® Office Professional 2007 tools Excel, PowerPoint and Word	Microsoft Corporation, Redmond, USA
QuantStudio™ Design & Analysis Software v1.4	Thermo Fisher Scientific
Sparkcontrol Version 2.1	Tecan Group

3.13 Humanes Lebergewebe

Das verwendete kryokonservierte, sowie Formalin-fixiertes und in Paraffin eingebettetes (FFPE), sowie nicht-fixiertes frisches humanes Lebergewebe wurden von der Gewebe-Biobank der Universitätsmedizin Mainz mit der Genehmigung der Ethikkommission Rheinland-Pfalz zur Verfügung gestellt (Ethikantrag Nr. 13209 von 2018, Titel "Lipidtropfen-assoziierte Proteine und ihre Rolle in der Entstehung von alkoholischer und nicht-alkoholischer Steatohepatitis in Patienten mit häufig auftretenden *PNPLA3*-Polymorphismen", Antragsteller Univ.-Prof. Dr. med. Beate Katharina Straub, Dr. Roland Hagen Witzel). Die klinisch-pathologischen Daten sind den folgenden Tabellen zu entnehmen.

3.13.1 HCCs und zugehöriges nicht-neoplastisches Lebergewebe

Es wurde kryokonserviertes Lebergewebe von 14 PatientInnen mit HCC (Nr. 1-15) verwendet. Zusätzlich zu allen HCC-Proben wurden als Referenz die zugehörigen, histologisch tumorfreien Lebergewebeproben analysiert (Nr. 16-30). Probe Nr. 10 und 25 wurden aufgrund zu geringer Materialmenge nicht verwendet.

Nr. HCC	Nr. Leber	PNPLA3	Geschlecht	Alter	Klinische Angabe
6	21	C/C	W	64	Zustand nach Lebertransplantation bei HCC, V. a. Rezidiv
8	23		M	84	HCC
12	27		M	66	HCC-Rezidiv
14	29		M	71	V. a. HCC
4	19	G/G	M	66	HCC
15	30		M	75	HCC bei Leberzirrhose
1	16	C/G	W	17	HCC
2	17		M	72	HCC
3	18		M	76	HCC
5	20		M	67	HCC
7	22		M	66	HCC, Leberzirrhose
9	24		M	80	HCC, V. a. NASH
11	26		W	81	HCC
13	28		M	79	HCC

Tab. 2: Klinische Daten der humanen HCC-Proben Nr.1-15 und des zugehörigen nicht-neoplastischen Lebergewebes Nr. 16-30. Graduierung von Steatose und Fibrose/Leberzirrhose vgl. Ergebnisteil Kapitel 4.1, Tab. 20. und Tab. 21. Abkürzung: W=weiblich, M=männlich.

3.13.2 Normalleber und Lebergewebe mit geringer Steatose

Es wurde Lebergewebe von 15 PatientInnen mit Normalleber bzw. Lebergewebe mit milden Veränderungen wie geringer Steatose weit entfernt (mind. 5 cm) von einer Lebermetastase eines Kolonkarzinoms entnommen und kryokonserviert. Da von gesunden Personen naturgemäß keine Leberbiopsien vorliegen, war durch dieses Kollektiv eine Untersuchung von Gewebe ohne primäre Lebererkrankung möglich.

Nr.	PNPLA3	Geschlecht	Alter
32	C/C	M	53
34		W	56
35		W	71
36		M	46
37		M	69
38		M	69
41		M	61
43		M	61
45		M	65
39		G/G	M
31	C/G	M	58
33		W	66
40		W	69
42		W	37
44		M	82

Tab. 3: **Klinische Daten von humanen Normalleberproben bzw. Lebergewebe mit geringer Steatose (Nr. 31-45).** Graduierung von Steatose, Entzündung und Fibrose/Leberzirrhose vgl. Ergebnisteil Kapitel 4.1, Tab. 19. Klinische Angabe aller Proben: Lebermetastase bei kolorektalem Karzinom. Abkürzung: W=weiblich, M=männlich.

3.13.3 NAFLD-/NASH-Kollektiv

FFPE-Lebergewebe von 23 PatientInnen mit Hepatopathie, NAFLD, NASH und Leberzirrhose.

Nr.	PNPLA3	Geschlecht	Alter	Klinische Angabe
68	G/G	W	58	NASH
69		M	52	NASH
70		M	45	Unklare Hepatopathie
71		W	21	Steatose, Hepatomegalie
72		W	55	Unklare Hepatopathie
73		M	28	Unklare Hepatopathie
74	C/G	M	47	Unklare Hepatopathie
75		M	43	NASH/kavernöses Hämangiom
76		W	52	NASH
77		W	56	NASH
78		M	51	NASH
79		W	53	Zirrhose
80		M	39	NASH
81		M	23	Steatose
82		W	48	Zirrhose
83		W	63	Unklare Hepatopathie
84	C/C	M	36	Unklare Hepatopathie
85		W	72	NASH
86		M	51	Unklare Hepatopathie
87		M	66	NASH-assoziierte Zirrhose
88		W	37	NASH
89		W	66	NASH
90		W	53	Steatose

Tab. 4: **Klinische Daten von humanen NAFLD-/NASH-Proben** (Nr. 68-90). Graduierung anhand NAS und SAF-Score siehe Ergebnisteil Kapitel 4.1, Tab. 22. Abkürzung: W=weiblich, M=männlich. Der Steatosegrad der Proben betrug mind. 10 %.

3.14 Mikroskopische Techniken

3.14.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Für die morphologische Untersuchung eines feingeweblichen Schnitts des kryokonservierten humanen Lebergewebes wurden mittels Kryostat Lebergewebeschnitte mit einer Dicke von <math><5\ \mu\text{m}</math> angefertigt und auf *Superfrost® Plus* Objektträger gezogen. Anschließend wurden die Gewebeschnitte mit Hämatoxylin und Eosin (HE)-Färbung gefärbt. Hämatoxylin ist ein basischer Farbstoff, der die Zellkerne mit der enthaltenden DNA bläulich anfärbt. Eosin ist ein saurer Farbstoff und färbt Zytoplasma, Proteine und Kollagen rötlich an. Zunächst wurde der Objektträger mit dem Gewebeschnitt in Hämalun-Lösung inkubiert, nach 1 min für 10 sec fließend gewässert und zweimal mit Leitungswasser abgespült. Danach wurde dieser in verdünntem Ammoniakwasser geschwenkt und erneut mit Leitungswasser fließend gewässert. Der Schnitt wurde achtmal in Eosin geschwenkt und erneut mit Leitungswasser fließend gewässert. Im Anschluss folgte das Entwässern in einer aufsteigenden Alkohol-Reihe mit 70 %, 80 %, 96 % und dreimal 100 % Isopropanol. Abschließend wurde der Objektträger für 30 sec in Xylol inkubiert und mit einem Deckglas eingedeckt.

3.14.2 Immunhistochemie

Bei der Immunhistochemie wurden zur Lokalisations- und Expressionsanalyse von Proteinen zwei indirekte Methoden der Antigen-Antikörper-Reaktion angewandt: zum einen die *Labelled-Strept-Avidin-Biotin-Methode* für die Meerschweinchen-Antikörper und zum anderen ein Detektionssystem mittels Peroxidase-markiertem Anti-Maus-Globulin. Das Grundprinzip ist bei beiden Methoden gleich. Ein Primärantikörper bindet ein spezifisches Epitop des nachzuweisenden Proteins. Der Sekundärantikörper detektiert den speziesspezifischen konstanten Teil des Primärantikörpers und dient einer Farbreaktion durch die Umsetzung eines Substrates oder Chromogens, katalysiert durch das gekoppelte Enzym.

Für die Färbung wurden 2 μm dicke Mikrotomschnitte von humanem FFPE-Lebergewebe angefertigt und auf Objektträger gezogen. Diese wurden bei 37 °C zunächst über Nacht getrocknet, im Anschluss bei 60 °C mindestens 10 min erhitzt und bei Raumtemperatur (RT) abgekühlt. Nach dem Abkühlen erfolgte zum Entparaffinieren und Rehydrieren zunächst eine Inkubation für 15 min in Xylol, danach eine absteigende Alkoholreihe mit zweimal 100 %, 96 %, 70 % sowie 50 % Alkohol und zum Schluss mit destilliertem Wasser für je 5 min. Nach dem Rehydrieren wurden die Gewebeschnitte zur Demarkierung der Antigenbindungsstellen bei pH 9 (*target retrieval solution* mit Tris/EDTA-Puffer) für 20 min auf 97 °C erhitzt und zum

Abkühlen unter fließendem Leitungswasser gewässert. Die Färbung wurde anschließend im *Autostainer* durchgeführt. Im Anschluss an die Färbung wurde in einer aufsteigenden Alkoholreihe mit 50 %, 70 %, 96 % und 100 % Ethanol sowie dreimal Xylol der Gewebeschnitt dehydriert und mit Entellan eingedeckt.

3.14.3 Immunfluoreszenzmikroskopie

Zur Quantifizierung der LT-Größe und zur Visualisierung unterschiedlicher Proteine wurde eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Wie bei der Immunhistochemie ist bei der hier angewandten indirekten Methode der Primärantikörper gegen ein spezifisches Antigen gerichtet, der Sekundärantikörper bindet den konstanten Teil des Primärantikörpers und ist mit einem Fluorochrom konjugiert. Für die Färbung wurden HepG2- ($3,8 \times 10^4$ Zellen/200 μ l) und HEK293T-Zellen ($0,5 \times 10^5$ Zellen/250 μ l) verwendet, die in einem 8-Well *Chamber Slide* bzw. in einer 24-Well-Platte mit Glasplättchen kultiviert worden waren. Nach Beendigung des jeweiligen Assays wurde das Medium mit einer Absaugevorrichtung entfernt und die Zellen mit 200-500 μ l PBS 5 min gewaschen. Im Anschluss wurde 200-500 μ l 3,7 %ige Formaldehyd-Lösung zur Fixierung auf die Zellen pipettiert, für 10 min inkubiert und danach dreimal für je 5 min mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurde 200-500 μ l Blockierlösung (PBS mit 0,1 % Triton X-100 + 10 % FBS) auf die Zellen pipettiert und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden danach mit 100 μ l (*Chamber Slide*) bzw. 25 μ l (24-Well Platte) des in Blockierlösung verdünnten Primärantikörper für 30 min bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach der Inkubation wurde dreimal für 5 min mit 200-500 μ l PBS mit 0,1 % Triton X-100 gewaschen. Der Sekundärantikörper und die Fluoreszenzfarbstoffe Bodipy und DAPI wurden in PBS mit 0,1 % Triton X-100 + 1 % FBS verdünnt. Für die Inkubation mit dem Sekundärantikörper bzw. den beiden Fluoreszenzfarbstoffen wurde wie bei dem Primärantikörper verfahren, jedoch in einer dunklen Kammer. Im Anschluss wurde erneut mit PBS mit 0,1 % Triton X-100 gewaschen. Die Trennwände des *Chamber Slides* wurden abgetrennt und der Objektträger mit Mowiol eingedeckt. Die Glasplättchen wurden mit den Zellen nach unten in einen Tropfen Mowiol auf einen Objektträger gelegt. Bei beiden Verfahren wurde im Anschluss das Mowiol über Nacht bei 4 °C im Dunkeln ausgehärtet. Anschließend wurden Bilder der gefärbten Zellen mit einem Konfokalmikroskop aufgenommen.

3.15 Histopathologische Auswertung

Für die Leberbiopsiediagnostik wird routinemäßig eine Biopsie einer Länge von mind. 1 cm mit mind. 10 Portalfeldern entnommen, um eine valide Aussage an repräsentativen Lebergeweben treffen zu können. Die quantitative und semiquantitative Auswertung der Immunhistochemie mit Antikörpern gegen Perilipin 1-5 und PNPLA3 im Rahmen dieser Dissertation erfolgte lichtmikroskopisch. Die Gewebeschnitte wurden hinsichtlich des Steatosegrades, des Vorhandenseins von makro- bzw. mikrovesikulären LT und der Häufigkeit von ballonierten Hepatozyten beurteilt. Außerdem wurde für jeden/jede PatientIn der NAS-Score nach Kleiner et. al. (42) und der SAF-Score nach Bedossa et. al. (43) ermittelt. Der NAS-Score ist die Summe der Bewertungskriterien Steatose, azinäre Entzündung und hepatozelluläre Ballonierung (Tab. 5). Ein Score von 0-2 entspricht einer NAFLD, aber noch keiner NASH. Ein Score von 3 oder 4 ist für die Diagnose einer NASH grenzwertig (Borderline-Bereich). Ab einem NAS-Score von ≥ 5 liegt eine NASH vor (42). Auch für das *staging* (Tab. 6) wurde das System von Kleiner et al. verwendet (42). Der SAF-Score umfasst die Bewertungskriterien Steatose (S), Aktivität (A) und Fibrose (F) (43). Die Aktivität fasst summiert Ballonierung und lobuläre Entzündung zusammen und definiert damit die NASH (A0=keine, A1=milde, A2=moderate und A3=starke Entzündungsaktivität (43)). Für die Beurteilung von Steatose und Fibrose wurden analog die Kategorien aus Tab. 5 und Tab. 6 verwendet. Gemäß Bedossa et. al. liegt eine NAFLD ab einem Score von $S_{\geq 1}A_{\times}F_{\times}$ vor. Eine NASH liegt ab einem Score von $S_{\geq 1}A_{\geq 2}F_{\times}$ vor. Der SAF-Score sieht keinen Borderline-Bereich vor (43). Anhand der HE-Färbung wurde der prozentuale Anteil der LT am Leberparenchym zur Bestimmung des Steatosegrades lichtmikroskopisch beurteilt.

Durch die Analyse der immunhistochemischen Perilipin 2- und der HE-Färbung wurde das Vorhandensein von ballonierten Hepatozyten erfasst, die das Charakteristikum einer Steatohepatitis darstellen (18). Die Quantifizierung ballonierter Hepatozyten nach Kleiner et. al. ist in Tab. 5 dargestellt.

Das Lebergewebe wurde hinsichtlich der Intensität der jeweiligen Färbung beurteilt. Die Graduierung erfolgte in Analogie an den HER2-neu-Score (173, 174) keine Färbung=0, schwache Färbung=1, mäßig starke Färbung=2 und starke Färbung=3 Punkte. Zudem wurde für Perilipin 3, 4, 5 und PNPLA3 bestimmt, ob das jeweilige Protein vermehrt an LT, zytoplasmatisch oder granulär lokalisiert war. Für Perilipin 1 und 2 wurde der Anteil der gefärbten Zellen in Prozent bestimmt.

Kategorie	Kriterium	Score
Steatose	<5 %	0
	5-33 %	1
	34-66 %	2
	>66 %	3
Azinäre Entzündung	Keine	0
	<2 Foci/MPF	1
	2-4 Foci/MPF	2
	>4 Foci/MPF	3
Hepatozelluläre Ballonierung	Keine	0
	Wenige Hepatozyten	1
	Zahlreiche Hepatozyten/ prominente Ballonierung	2

Tab. 5: **NAS-Score zur Differenzierung der NAFLD von der NASH** (Mod. nach (42), (39)). Summenscore (NAS): 0-2=keine Steatohepatitis, 3/4=nicht beweisend für eine Steatohepatitis (Borderline-Bereich), ≥5=manifeste Steatohepatitis. MPF (mittlere Vergrößerung 200:1).

Stadium	Fibrose
0	keine
1A	Mild, Zone 3, perisinusoidal
1B	Mäßig, Zone 3, perisinusoidal
1C	Portal/periportal ohne perisinusoidale Komponente
2	Perisinusoidale und portale/periportale Fibrose
3	Septen-/brückenbildende Fibrose
4	Zirrhose

Tab. 6: **Staging der Steatohepatitis** (Mod. nach (42)).

3.16 Zellkultur-Techniken

3.16.1 Passagieren von Zellen

Die verwendeten adhären wachsenden Zelllinien Huh7, HepG2 und HEK293T wurden bei 37 °C und 5 %igem CO₂-Gehalt kultiviert. Das verwendete DMEM Nährmedium wurde mit 10 % FBS und 1 % Penicillin/Streptomycin angereichert. Je nach Wachstumsgeschwindigkeit wurden die Zellen zwei- bis dreimal pro Woche passagiert. Dabei wurde die Schale nach Absaugen des Kulturmediums mit 2 ml PBS gewaschen und im Anschluss die Zellen zum Ablösen mit 1-2 ml Trypsin-EDTA Lösung (0,25 %) für 3 min bei 37 °C behandelt. Nach der Trypsinierung wurden die Zellen abgelöst und resuspendiert. Das Aussäen erfolgte bei den HEK293T-Zellen in der Regel im Verhältnis 1:10, bei Huh7- und HepG2-Zellen je nach Zelldichte 1:3 oder 1:5.

3.16.2 Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen in Nährmedium gelöst, 5 min bei 1.200 rpm zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde in 2 ml DMEM Nährmedium plus 10 % DMSO resuspendiert und in ein Kryoröhrchen pipettiert. DMSO verhindert die Eiskristallbildung und damit eine Schädigung der Zellen. Um ein schonendes Einfrieren zu gewährleisten, wurden die Kryoröhrchen in einem *Cryo 1 °C Freezing Container* mithilfe von Isopropanol um 1 °C/min auf -80 °C heruntergekühlt. Das Auftauen erfolgte zügig bei 37 °C. Das DMSO-haltige Medium wurde nach Zentrifugation entfernt. Die Zellen wurden erneut in Nährmedium resuspendiert und ausgesät.

3.16.3 Zellzahlbestimmung

Die Quantifizierung der Zellzahl pro Volumen wurde lichtmikroskopisch mithilfe der Neubauer-Zählkammer durchgeführt. Nach Trypsinierung wurden die Zellen in 10 ml Nährmedium gleichmäßig resuspendiert und 10 µl der Zellsuspension in die Zählkammer pipettiert. Im Anschluss wurden vier Eckquadrate ausgezählt (Volumen pro Eckquadrat 0,1 µl). Die Berechnung der Zellzahl pro Volumen ergab sich wie folgt:

$$\text{Mittelwert der 4 Eckquadrate} \times 10^4 = \text{Zellzahl pro ml}$$

3.17 Biochemische Methoden

3.17.1 Proteinisolierung

Zur Proteinanalyse wurde zunächst ein Zellaufschluss entweder mittels Homogenisator, Ultraschall oder Lysis-Puffer durchgeführt. Zum Aufschluss kryokonservierten Lebergewebes wurden mit einem Kryostat >50 mal 5 µm dicke Schnitte bei -20 °C angefertigt und in *Precellys® Lysing Tubes plus Ceramic Beads* überführt. Die enthaltenen Keramikugeln unterstützen den Zellaufschluss mechanisch. Das Gewebe wurde im Anschluss mit 500 µl „CO-IP“-Puffer (Tris HCl 50 mM, EDTA 15 mM, NaCl 100 mM) mit 1 % Triton und 1 % Protease & Phosphatase Inhibitor versetzt. Der Aufschluss erfolgte mittels Homogenisator zweimal bei 6.500 rpm für je 20 sec.

Für den Aufschluss von Zellen wurde ein Verfahren mit Ultraschall angewandt. Die Zellen wurden in 5 ml PBS resuspendiert und 5 min bei 1.200 rpm zentrifugiert. Hierdurch wurden die Zellen pelletiert. Das Pellet wurde in 100 µl „CO-IP“-Puffer mit 0,1 % Triton und 1 % Protease & Phosphatase-Inhibitor resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte über Ultraschall für 10 sec bei 100 % auf Eis. Alternativ wurde für den Zellaufschluss Lysis-Puffer mit sechsfach SDS Puffer und 0,1 % Protease & Phosphatase Inhibitor verwendet. Dabei wurden nach Abschluss des Assays die Zellen mit PBS gewaschen, mit 40 µl Lysispuffer pro Well abgelöst und in ein Eppendorf-*Tube* pipettiert. Im Anschluss an alle drei Verfahren wurde das Lysat 5 min bei 4 °C und 12.000 rpm zentrifugiert und der Überstand mit dem Proteinlysate in ein neues Eppendorf-*Tube* überführt.

3.17.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinquantifizierung erfolgte photometrisch mittels Bradford-Test. Im Bradford-Reagenz befindet sich der Farbstoff Coomassie-Brillant-Blau, der mit Proteinen Komplexe bildet. Durch die Komplexe verändert sich die Absorption der Lösung in Abhängigkeit der Proteinkonzentration und somit ist die Änderung der Farbe ein Maß für die Proteinmenge. Zunächst wurde vor jeder Messung eine Eichkurve mit BSA erstellt. Das Bradford Reagenz wurde im Verhältnis 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnt. Zur Erstellung der Eichkurve wurde jeweils 0 µl, 2,5 µl, 5 µl, 7,5 µl, 10 µl und 15 µl 10xBSA (1 µg/µl) mit 1 ml verdünntem Bradford Reagenz durch Vortexen vermischt. Vom Proteinlysate wurden ebenfalls jeweils 3 µl mit 1 ml verdünntem Bradford-Reagenz durch Vortexen vermischt. 200 µl pro Ansatz wurden in eine 96-Well Messplatte pipettiert. Nach 5 min Inkubationszeit wurde am Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 595 nm die Absorption gemessen. Nach der

Messung wurde eine Eichkurve der BSA-Standardreihe in Excel (Microsoft®) erstellt und aus der Geradengleichung die Proteinkonzentration der Proteinlysate errechnet.

3.17.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der Proteine nach Molekülmasse wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) angewandt. Dabei wurde eine definierte Proteinmenge auf ein Polyacrylamid-Gel geladen. Die Proteine wandern bei der Gelelektrophorese im elektrischen Feld aufgrund ihrer Molekülmasse unterschiedlich schnell durch das Polyacrylamid-Gel. Proteine mit einer geringen Masse wandern am schnellsten. Je höher die Polyacrylamidkonzentration des Gels ist, desto langsamer wandern die Proteine. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Trenngel mit 10 % Polyacrylamid verwendet. Das Gel bestand zudem aus einem Sammelgel, das eine Konzentration der Proteine zu Beginn der SDS-PAGE gewährleistet. Die Zusammensetzung der beiden Gele unterschied sich sowohl in der Konzentration des Puffers und der Chemikalien als auch im pH-Wert (Tab. 7).

Bestandteil	Sammelgel	Trenngel 10%
Doppelt destilliertes Wasser	1,15 ml	2 ml
Puffer	0,5 ml pH 6,8 Tris 0,5 M	1,3 ml pH 8,8 Tris 1,5 M
30 % Acrylamid-Mix	0,33 ml	1,7 ml
10 % SDS	20 µl	50 µl
10% APS	20 µl	50 µl
TEMED	2 µl	2 µl

Tab. 7: **Zusammensetzung eines Polyacrylamid-Gels.** Kombination aus Sammel- und Trenngel.

Die Polymerisation wurde durch Zugabe von APS und TEMED gestartet und das flüssige Trenngel zügig in die Vorrichtung pipettiert. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das Sammelgel auf das Trenngel pipettiert und ein Kamm mit Aussparungen als Platzhalter für die Proteinlysate eingesetzt. Die auspolymerisierten Gele wurden in die Laufkammern eingespannt. Die Befüllung der Kammer erfolgte mit SDS-PAGE Laufpuffer (Tris 25 mM, Glycin 0,19 M, SDS 3,5 mM). Im Anschluss wurden die Proteinlysate mit sechsfach Protein-Probenpuffer versetzt und mit „CO-IP“ Puffer mit 0,1 % bzw. 1 % Triton auf ein Volumen von

30-40 μl eingestellt. Dieser Ansatz wurde 10 min bei 95 °C erhitzt, um die Proteine zu denaturieren. Zudem wurden 5 μl Proteinstandard verwendet, um die Größenordnung der Proteinbanden sicherzustellen. Die SDS-PAGE dauerte ca. 3 h bei 60-100 V.

3.17.4 Immunblot

Die mithilfe der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und dort für die Immunblotanalyse fixiert. Die Filterpapiere, das Polyacrylamid-Gel und die Nitrocellulosemembran wurden zunächst in *Semidry* Blot-Puffer (Tris 48 mM, Glycin 39 mM, SDS 1,3 mM, 20 % Methanol) äquilibriert. Der Blot wurde dann wie folgt luftblasenfrei aufgebaut: Auf drei Filterpapiere wurde die Nitrocellulosemembran gelegt, darauf folgte das Polyacrylamid-Gel und die oberste Schicht bildeten nochmals drei Filterpapiere. Im elektrischen Feld werden während des *Semidry*-Transfers bei 25 V und 1 A für 30 min die Proteine aus dem Polyacrylamid-Gel auf die Nitrocellulosemembran übertragen. Nach dem Transfer wurde die Membran mit Ponceau S angefärbt. Dieser Azofarbstoff färbt unspezifisch und reversibel Proteine an und ermöglichte damit eine Überprüfung des Transfers. Durch die Zugabe von TBS + 0,05 % Tween wurde die Membran entfärbt und im Anschluss 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C in 5-10 ml TBS + 0,05 % Tween mit 5 % Magermilchpulver auf einem Wippschüttler blockiert. Durch die Blockierung werden freie Proteinbindungsstellen der Membran maskiert und ein späteres unspezifisches Binden des Primärantikörpers verhindert. Im nächsten Schritt wurde die Inkubation der blockierten Membran mit dem Primärantikörper durchgeführt, der in 3-5 ml Blockierlösung verdünnt wurde. Die Inkubationszeit betrug 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C auf dem Wippschüttler. Nach der Inkubationszeit wurde dreimal für 10 min mit 10 ml TBS + 0,05 % Tween gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Der verwendete Sekundärantikörper war mit dem Reporterenzym Meerrettichperoxidase gekoppelt und wurde mit einer Verdünnung von 1:3000 in 3-5 ml Blockierlösung eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug 1 h bei RT. Nach der Inkubationszeit wurde erneut dreimal für 10 min mit 10 ml TBS + 0,05 % Tween auf dem Wippschüttler gewaschen. Im nächsten Schritt wurde der Immunblot entwickelt, um die Proteine sichtbar zu machen. Die Inkubationszeit der Nitrocellulosemembran in der ECL-Entwicklerlösung betrug 1 min. Die Zusammensetzung der ECL-Entwicklerlösung ist in Tab. 8 aufgeführt. Die Oxidation von Luminol in Gegenwart von Wasserstoffperoxid wurde durch die Meerrettichperoxidase des Sekundärantikörpers katalysiert und die Lumineszenz mit dem *Chemilumineszenzimager* detektiert.

Menge	Bestandteil
10 ml	0,1 M Tris-HCl, pH 8,5
50 µl	Luminol (250 mM in DMSO)
25 µl	Cumarinsäure (90 mM in DMSO)
4 µl	Wasserstoffperoxid (30 %-ig)

Tab. 8: **Zusammensetzung der ECL-Lösung** zum Entwickeln der Immunblots.

Um eine Membran mehrmals nutzen zu können, müssen die gebundenen Antikörper entfernt werden. Dies wurde durch die Verwendung von zwei „*Stripping*“ Puffern erreicht, zunächst mit pH 2,8 und danach mit pH 2,2. Antikörper werden durch den niedrigen pH-Wert denaturiert und lösen sich ab. Es wurden nacheinander 10 ml des jeweiligen Puffers auf die Membran pipettiert und für 10 min wippend inkubiert. Nach Entfernen des zweiten Puffers wurde die Membran für 10 min mit TBST gewaschen. Im Anschluss konnte die Membran erneut blockiert und verwendet werden.

3.18 Molekularbiologische Methoden

3.18.1 DNA-Isolierung und -Fällung

Zur Ermittlung des *PNPLA3*-Genotyps wurden zehnmal 5 µm dicke Schnitte kryokonservierten humanen Lebergewebes bzw. ein 300 µm dicker Schnitt nicht fixierten Lebergewebes verwendet. Zur Isolierung der genomischen DNA (gDNA) wurde ein Proteinase K-Verdau durchgeführt. Dazu wurden 100-200 µl Proteinase K-Puffer (Tris 100 mM, EDTA*H₂O 5 mM, SDS 0,2 %, NaCl 200 mM, pH 8,5) mit 1 % Proteinase K zum Lebergewebe pipettiert. Der Proteinase K-Verdau wurde bei 55 °C und 600 rpm über Nacht durchgeführt. Nach Hitzeinaktivierung der Proteinase K bei 95 °C für 10 min und anschließender Zentrifugation für 10 min bei 13.000 rpm wurde zum Entfernen der sedimentierten Zelltrümmer der Überstand in ein neues Eppendorf-*Tube* pipettiert. Zur Fällung der gDNA aus dem Überstand wurde nach Zugabe des 0,7-fachen Volumens Isopropanol das *Tube* mehrfach invertiert und 25 min bei RT und 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet weiterverwendet. Zum Waschen wurden 500 µl 70 %iges Ethanol zu dem Pellet pipettiert, invertiert und 5 min bei 13.000 rpm und RT zentrifugiert. Daraufhin wurde der Überstand verworfen und das Pellet bei 55 °C getrocknet. Die gDNA wurde je nach Viskosität in 50 bzw. 100 µl nukleasefreiem H₂O rückgelöst.

3.18.2 Polymerase-Kettenreaktion

Zur Genotypisierung wurde zunächst das Gen, das für PNPLA3 kodiert, mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Die Reaktion wurde mit zwei spezifischen Primern durchgeführt, die an den komplementären DNA-Strängen binden. Durch die thermostabile *Taq*-Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus* findet eine exponentielle Amplifikation des zwischen den Primern befindlichen DNA-Abschnitts statt. Für die Negativkontrolle wurde anstelle der gDNA die gleiche Menge nukleasefreies Wasser verwendet. Die Zusammensetzung des Ansatzes für die PCR und das PCR-Protokoll finden sich in Tab. 9 und Tab. 10.

Menge	Bestandteil
0,5 µl	gDNA
je 0,6 µl	Primer #73 und #74 (10 µM)
5,8 µl	ReadyMix TM REDTaq®
7,5 µl	nukleasefreies Wasser

Tab. 9: PCR-Ansatz zur Amplifikation der gDNA (15µl)

Schritt	Temperatur	Dauer	Phase
1	94 °C	5:00 min	Initialisierung
2	94 °C	0:30 min	Denaturierung
3	58 °C	0:30 min	Primer-Hybridisierung
4	72 °C	0:45 min	Elongation
5	72 °C	5:00 min	Termination
6	4 °C	∞	Abkühlung

Tab. 10: PCR-Programm zur Amplifikation der gDNA. Schritt 2-4=34 Zyklen

3.18.3 Agarose-Gelelektrophorese

Im Anschluss an die PCR wurde eine elektrophoretische Auftrennung der amplifizierten DNA über ein Agarosegel durchgeführt. Aufgrund ihrer negativen Ladung wandert DNA zur Anode. Die Auftrennung erfolgt in Abhängigkeit von der DNA-Länge, wobei die kürzeren DNA-Spezies schneller wandern. 1-2 % Agarosepulver wurden in 1xTAE Puffer (Tris 40 mM, Eisessig 20 mM, EDTA 1 mM) gelöst und aufgekocht. Zum flüssigen Agarosegel wurde *PeqGREEN* in der Verdünnung von 1:100.000 pipettiert. Der Fluoreszenzfarbstoff *PeqGREEN* dient der

Detektion von Nukleinsäuren nach Anregung unter UV-Licht. Das flüssige Agarosegel wurde in eine Elektrophorese-Zelle mit Aussparungen für Taschen gegossen. In die Taschen wurde nach der Polymerisation des Gels der PCR-Ansatz pipettiert. In die erste Tasche wurden 6 µl eines Längenstandards (50 kb DNA *Ladder-Mix*) zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente pipettiert. Nach der Auftrennung bei 100 V wurde das Resultat mithilfe des *UV-Transilluminators* fotografiert, die Banden in Gegenwart von UV-Licht ausgeschnitten und bei -20 °C gelagert.

3.18.4 DNA-Extraktion

Die Extraktion der amplifizierten DNA aus dem Agarosegel wurde mit dem *QIAquick®Gel Extraction Kit 50* nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Im letzten Schritt wurde die DNA in 15 µl nukleasefreiem Wasser eluiert.

3.18.5 Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde mit der Kettenabbruchmethode nach Sanger durchgeführt. Das Prinzip ist ähnlich dem der PCR, hierbei wird jedoch nur ein Primer verwendet und somit findet die DNA-Elongation in nur einer Richtung statt. Neben den vier Desoxynukleotiden (dNTP's) werden zusätzlich in geringerer Konzentration vier Fluoreszenz-markierte 2'-3'-Didesoxynukleotide (ddNTP's) verwendet. Diese führen nach dem zufälligen Einbau an unterschiedlichen Stellen zum Abbruch der Elongation und somit werden PCR-Produkte aller möglicher Längen erzeugt. Anschließend werden diese mithilfe einer Kapillarelektrophorese aufgetrennt und aufgrund der Detektion der vier unterschiedlichen Fluoreszenzmarkierungen der ddNTP's kann auf die Basenabfolge geschlossen werden. Der Reaktionsansatz für die Sequenzierung (StarSEQ GmbH) ergibt sich aus 3 µl gereinigtem PCR-Produkt, 1 µl Primer #46 (10 µM) und 3 µl nukleasefreiem Wasser.

3.18.6 RNA-Isolierung

Zur RNA-Isolierung wurde die Methode der Phenol-Chloroform-Extraktion angewandt. Zum einen wurden Transkriptionsanalysen von humanem Lebergewebe und zum anderen der Zelllinien durchgeführt, die Aufbereitung zu Beginn der Analyse unterschied sich dabei.

Um RNA aus humanem Lebergewebe für die Transkriptionsanalyse zu gewinnen, wurden 50 mal 5 µm dicke Gewebeschnitte mit dem Kryostat angefertigt. Diese wurden entweder in *Lysing Tubes plus Ceramic Beads* oder in *Eppendorf-Tubes* bei -80 °C gelagert. Im nächsten

Schritt erfolgte der Gewebeaufschluss. Bei Verwendung der *Lysing Tubes plus Ceramic Beads* wurde das Gewebe nach Zugabe von 1 ml Trizol mittels Homogenisator zweimal bei 6.500 rpm für 20 sec homogenisiert. Alternativ wurde das Gewebe bei Verwendung der *Eppendorf-Tubes* nach schrittweiser Zugabe von 1 ml Trizol mit dem *Disposable Pellet Mixer* lysiert. Für Transkriptionsanalysen der Zelllinien wurden die Zellen nach Entfernen des Nährmediums in 1 ml Trizol von der Zellkulturschale gelöst und in ein *Eppendorf-Tube* pipettiert.

Bei allen Verfahren wurde im Anschluss 200 µl Chloroform zu dem Gewebe- bzw. Zelllysat pipettiert und 15 sec durch Vortexen gemischt. Nach 5 min Inkubation auf Eis wurde bei 11.200 rpm und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Dabei bildeten sich drei Phasen. Bei der untersten Phase handelte es sich um die organische Phase, in der Mitte bildete sich die Interphase und die obere wässrige Phase enthielt die RNA. Die wässrige Phase wurde in ein neues *Eppendorf-Tube* überführt, zur Fällung der RNA mit dem gleichen Volumen (ca. 500 µl) Isopropanol versetzt und mehrfach invertiert. Erneut wurde 10 min auf Eis inkubiert und im Anschluss bei 11.200 rpm und bei 4 °C für 15 min zentrifugiert. Die RNA präzipitierte und der Überstand wurde verworfen. Danach wurde zweimal 700 µl 80 %iges Ethanol auf das Pellet pipettiert, bei 8.800 rpm bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand erneut verworfen. Im Anschluss wurde das Pellet bei 55 °C getrocknet und in 50 µl nukleasefreiem Wasser für 15 min bei 55 °C gelöst.

3.18.7 RNA-Konzentrationsbestimmung

Die RNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte am Spektralphotometer. Dabei wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm gemessen. Das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren liegt bei 260 nm und das von Proteinen bei 280 nm. Durch den Quotienten aus beiden Werten (260/280) kann die Reinheit der RNA beurteilt werden. Bei Werten um 2,0 ist die Verunreinigung der RNA mit Proteinen gering. Eine optische Dichte bei 260 nm von 1 entspricht ca. 40 µg/ml RNA. Dieser Wert wurde zur Berechnung der RNA-Konzentration herangezogen.

3.18.8 Reverse Transkription

Für die quantitative Transkriptionsanalyse durch die *Realtime-PCR* wurde die isolierte mRNA zunächst durch reverse Transkription mit dem *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* in *complementary DNA* (cDNA) umgeschrieben. Die reverse Transkription erfolgte dabei durch

eine RNA-abhängige DNA-Polymerase. Eingesetzt wurden maximal 2 µg mRNA. Diese Menge wurde mit nukleasefreiem Wasser auf ein Volumen von 10 µl eingestellt. Der gesamte Reaktionsansatz wurde nach dem in Tab. 11 aufgelisteten Mengenverhältnis in ein PCR-Reaktionsgefäß pipettiert und anschließend die Reaktion im *Thermocycler* durchgeführt. Tab. 12 zeigt das verwendete PCR-Programm. Die eingesetzten Primer sind *random hexamers*, die zufällig an der mRNA hybridisieren und somit sind im Anschluss an die Reaktion alle Bereiche der mRNA in der cDNA abgebildet.

Menge	Bestandteil
10 µl	nukleasefreies Wasser plus RNA
1 µl	RNase-Inhibitor
2 µl	10x reverse Transkription-Puffer
0,8 µl	25x dNTP Mix (100 mM)
2 µl	10x reverse Transkription-random Primer
1 µl	<i>Multi Scribe Reverse Transkriptase</i>
3,2 µl	nukleasefreies Wasser

Tab. 11: PCR-Ansatz Reaktionsgemisch für die cDNA-Synthese

Schritt	Temperatur	Dauer
1	25 °C	10 min
2	37 °C	120 min
3	85 °C	5 min
4	4 °C	∞

Tab. 12: PCR-Programm der cDNA-Synthese

3.18.9 Quantitative Echtzeit-PCR (Realtime-PCR)

Die Quantifizierung der Expression unterschiedlicher Gene auf mRNA-Ebene erfolgte mittels Realtime-PCR. Dabei handelt es sich um eine Kombination aus PCR-Gerät und Fluoreszenz-Detektor. Bei der Realtime-PCR werden spezifische Bereiche eines Gens aus der zuvor hergestellten cDNA amplifiziert. In das doppelsträngige PCR-Produkt interkaliert während der Reaktion der Fluoreszenzfarbstoff *SYBR® green*, der während der Replikation durch die Polymerase freigesetzt wird und ein Lichtsignal erzeugt. Die Fluoreszenz steigt somit in jedem PCR-Zyklus proportional in Abhängigkeit der Menge des PCR-Produktes an. Als Messwert

ausgegeben wird die Anzahl an PCR-Zyklen zu Beginn der exponentiellen Phase der Amplifikation, der C_T -Wert. Der C_T -Wert ist der Schwellenwert, ab dem ein relevanter Fluoreszenz-Signalanstieg im Vergleich zum Hintergrund detektiert wird. Um die Unterschiede der eingesetzten Menge RNA bei der cDNA-Synthese auszugleichen, wird ein Referenzgen, in diesem Fall die 18S rRNA, verwendet. Die 18S rRNA wurde gewählt, da die zelluläre 18S rRNA-Expression trotz äußerer Einflüsse annähernd stabil bleibt. Die C_T -Werte der spezifischen PCR-Produkte bzw. Zielgene wurden mithilfe der C_T -Werte des Referenzgens (18S rRNA) normalisiert. Für die Realtime-PCR wurde die cDNA 1:4 mit nukleasefreiem Wasser verdünnt. Der Ansatz erfolgte in Duplikaten (Tab. 13; zum PCR-Programm vgl. Tab. 14).

Menge	Bestandteil
1 μ l	verdünnte cDNA
5 μ l	<i>SYBR[®] green</i>
3,5 μ l	Doppelt destilliertes Wasser
0,5 μ l	Primer-Mix (<i>reverse</i> + <i>forward</i> je 5 μ M)

Tab. 13: Ansatz „Mastermix“ für die Realtime-PCR zur cDNA-Amplifikation

Phase	Temperatur	Dauer
<i>Hold stage</i>	50,0 °C	2 min
	95,0 °C	10 min
<i>PCR stage (40 Zyklen)</i>	95,0 °C	15 sec
	60,0 °C	1 min
<i>Melt curve stage</i>	95,0 °C	15 sec
	60,0 °C	1 min
<i>Dissociation</i>	95,0 °C	1 sec

Tab. 14: Programm Realtime-PCR zur cDNA-Amplifikation

Zur Analyse wurde die zugehörige *QuantStudio™ Design & Analysis Software* verwendet. Die Quantifizierung erfolgte bei jeder Probe durch den dazugehörigen spezifischen C_T -Wert. Zur Normalisierung wurde der Δ - C_T -Wert aus der Differenz des C_T -Wertes des Zielgens und des zugehörigen Referenzgens (18S rRNA) errechnet. Der $\Delta\Delta$ - C_T -Wert errechnete sich aus der Differenz des Δ - C_T -Wertes und einem Bezugspunkt, wie der Kontrolle des jeweiligen Assays. Bei humanem Lebergewebe entfiel dieser Schritt, da es keinen Bezugspunkt gab. Der Endwert

wurde wie folgt berechnet: $2^{-\Delta\Delta CT}$. Aus den Duplikaten wurden mit Excel (Microsoft®) Mittelwert und Standardabweichung errechnet.

3.19 Genomeditierung

3.19.1 Transfektion

Für die Transfektion wurden zwei unterschiedliche Methoden angewandt. Zum einen wurde mittels Lipofektamin transfiziert. Dafür wurden in einem 8-Well *Chamber slide* $3,8 \times 10^4$ Zellen/200 μ l ausgebracht und für 24 h kultiviert. Für den Transfektionsansatz wurde jeweils 1 μ g Plasmid-DNA und 50 μ l OptiMEM-Medium in ein Eppendorf-*Tube* pipettiert und kurz gemischt. In ein weiteres Eppendorf-*Tube* wurden 50 μ l OptiMEM-Medium und 2,5 bzw. 5 μ l Lipofektamin pipettiert, kurz gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Beide Ansätze wurden dann zusammen pipettiert, kurz gemischt und 20 min bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde der jeweilige Transfektionsansatz tropfenweise auf die Zellen gegeben und für 6 h inkubiert. Anschließend wurde das Transfektionsmedium entfernt und durch normales Nährmedium ersetzt.

Zum anderen fand die Transfektion mit PEI-Reagenz statt. Die Zellen wurden in 6-Well Platten mit einer Zellzahl von $0,25 \times 10^6$ Zellen/2 ml ausgebracht und für 24-48 h kultiviert. Für den Transfektionsansatz wurden 45 μ l PBS mit 2,5 μ g DNA (Plasmid und *ssODN* 10 μ M) und 54 μ l PEI-PBS in ein Eppendorf-*Tube* pipettiert. Im Anschluss wurde der Transfektionsansatz gemischt, 5 min bei RT inkubiert, danach tropfenweise auf die Zellen pipettiert und für 48 h inkubiert.

3.19.2 CRISPR/Cas9

Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR associated (Cas) 9 ist eine Methode, mit der das zelleigene Genom gezielt editiert werden kann (175-178). Die Genomeditierung mittels CRISPR/Cas9 ermöglichte einen unmittelbaren Vergleich derselben Zelllinien mit unterschiedlichen *PNPLA3*-Genotypen. Somit konnte beispielsweise ein möglicher Einfluss des *PNPLA3*-Polymorphismus I148M auf die zelluläre Lipolyse untersucht werden. Durch Transfektion wird ein Plasmid in die Zelle eingebracht, das u. a. für eine *single guide*-RNA kodiert. Mithilfe dieser *single guide*-RNA wird die gDNA der Zelle in der Nähe des zu mutierenden Bereichs gebunden. Durch die Endonuklease Cas9, deren Gen sich ebenfalls auf dem Plasmid befindet, wird ein spezifischer DNA-Doppelstrangbruch erzeugt, indem *single guide*-RNA und Cas9 einen Komplex bilden. Gleichzeitig mit dem Plasmid wird eine

modifizierte DNA-Reparaturmatrize (*ssODN template*) transfiziert. Nach deren Vorlage repariert das endogene System der Zelle den Doppelstrangbruch und fügt im besten Fall die veränderte Gensequenz ein. Die 120 bp lange Reparaturmatrize weist neben dem modifizierten Basentriplet eine Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease *Hind III* auf.

Nach Testung der effizientesten *guide*-RNAs wurde mittels Transfektion das Plasmid, inklusive der entsprechenden *guide*-RNA und Cas9, sowie die Reparaturmatrize in die Zellen eingebracht. Die Transfektion der HEK293T-Zellen verlief nach dem PEI-Protokoll mit 2,5 µg DNA. HepG2- und Huh7-Zellen wurden mit Lipofektamin transfiziert. Um ausschließlich mit den Zellen weiterzuarbeiten, die erfolgreich transfiziert wurden, und daraus Einzelzellklone zu generieren, wurde zunächst eine Selektion durchgeführt. Das transfizierte Plasmid beinhaltet ein Puromycin-Resistenzgen, das für die Selektion der transfizierten Zellen verwendet wurde. Um die optimale Konzentration für das Antibiotikum Puromycin zu bestimmen, wurden zunächst nicht-transfizierte Zellen getestet. Dazu wurden auf einer 24-Well Platte 1×10^5 Zellen pro Well ausgebracht. Nach 48 h wurde Nährmedium, das mit Puromycin einer Konzentration zwischen 50 ng/ml und 25 µg/ml angereichert wurde, verwendet. Im Anschluss an die Transfektion wurde mit 1 µg Puromycin über sieben Tage selektioniert. Nach der Selektion wurden die überlebenden Zellen trypsiniert, in Nährmedium suspendiert und gezählt. Die Zell-Suspension wurde mit Nährmedium verdünnt, bis sich statistisch nur noch eine Zelle in 100 µl befand. Auf zwei 96-Well-Platten wurden je Vertiefung 100 µl dieser Suspension ausgesät, um Einzelzellklone zu generieren. Nach mehrtägiger Kultivierung bildeten sich im positiven Fall aus den einzelnen Klonen Zellkolonien. Diese wurden zunächst auf eine 12-Well-Platte und bei einer Konfluenz von > 50 % auf eine 6 cm-Zellkultur-Schale expandiert. Im nächsten Schritt folgte ein Screening der Zellklone. Da die Reparaturmatrize eine *HIND III*-Schnittstelle beinhaltete, schnitt das Enzym *HIND III* die DNA in zwei Stränge, falls die Zelle die Matrize zur Reparatur verwendet hat. Um das zu überprüfen, wurde beim Passagieren der Zellen ein Teil der Zell-Suspension für eine PCR (Primer #73 und 74) verwendet. Die PCR wurde mit doppeltem Ansatz (30 µl) durchgeführt. Nach der PCR wurde der halbe Ansatz (15 µl) für einen Restriktionsverdau mit der Restriktionsendonuklease *HIND III* bei 37 °C über Nacht verwendet. Tab. 15 zeigt den Reaktionsansatz für den Restriktionsverdau. Nach dem *HIND III*-Verdau wurden das unverdaute PCR-Produkt und der verdaute Ansatz nebeneinander auf ein Agarosegel geladen. Bei den Zellklonen mit unterschiedlich langen DNA-Strängen wurde eine Gelaufreinigung mit der entsprechenden Bande und anschließender Sequenzierung mit dem Primer #46 durchgeführt.

Menge	Bestandteil
15 μ l	PCR-Produkt
0,3 μ l	<i>Hind III</i>
3 μ l	10xNEB Puffer 2.1
11,7 μ l	Wasser

Tab. 15: Ansatz Restriktionsverdau mit *HIND III*

3.20 Lipolyse-Assay

Die Expression von Perilipinen und ATGL auf Protein- und mRNA-Ebene in Abhängigkeit vom *PNPLA3*-Status wurde in dieser Arbeit unter lipolytischen Bedingungen näher untersucht. Zur Induktion der Lipolyse wurden drei verschiedene Substanzen getestet. Isoproterenol ist ein β -Adrenorezeptor-Agonist, Forskolin aktiviert die Adenylatzyklase und IBMX hemmt die cAMP-Phosphodiesterase. Alle drei führen zu einem erhöhten cAMP-Spiegel und aktivieren somit die PKA. Forskolin und IBMX wurden in Kombination eingesetzt. Alle Substanzen wurden in DMSO gelöst. Um ein Auskristallisieren von IBMX und Forskolin im Kulturmedium zu verhindern, wurde eine 1:10 Vorverdünnung in DMSO hergestellt. Zudem wurde der Effekt einer steatogenen Behandlung mit Ölsäure getestet, mit alleiniger Behandlung mit Ölsäure sowie in Kombination mit anschließender Lipolyse-Induktion. Der Assay wurde mit unterschiedlicher Zelldichte und Konzentration der Substanzen durchgeführt (vgl. Tab. 16 und Tab. 17).

Kulturschale	Zellzahl/Volumen Nährmedium
6 cm	4×10^5 Zellen/3 ml
12-Well	2×10^5 Zellen/0,5 bzw. 1 ml
24-Well mit Glasplättchen	$0,5 \times 10^5$ Zellen/250 μ l

Tab. 16: Anzahldichte der Zellen im Lipolyse-Assay in Abhängigkeit der Größe der Kulturschale

Die Zellen wurden vor Testbeginn 24 h kultiviert. Forskolin und IBMX bzw. Isoproterenol wurden mit definierter Konzentration in das Nährmedium pipettiert und die Lipolyse für 1 h, 3 h oder 6 h induziert. Die steatogene Behandlung dauerte 24 h, 48 h oder 72 h. Das Nährmedium wurde täglich erneuert. Nach Beendigung des Assays wurden Expressionsanalysen durchgeführt.

Substanz	Getestete Konzentrationen
Isoproterenol	50, 100 μM
Forskolin	5, 10, 20 μM
IBMX	250, 500, 1000 μM
Ölsäure	120, 240 μM

Tab. 17: Konzentration der Substanzen zur Induktion der Lipolyse

3.21 Gewebekultur von humaner Leber

3.21.1 Gewinnung von Gewebeschnitten

Die Interaktion unterschiedlicher Zelltypen in der Leber *in situ* wird durch Zellkultur-Experimente naturgemäß nicht umfassend dargestellt. Um die Komplexität von Lebergewebe in unseren Analysen besser abzubilden, untersuchten wir ergänzend unfixiertes humanes Lebergewebe hinsichtlich der Reaktion auf steatogene und lipolytische Stimuli. Dazu wurde für die Routinediagnostik in die Pathologie eingesandtes humanes Lebergewebe nach operativer Entnahme zeitnah (< 20 min) durch einen/eine PathologIn in einem Abstand von mind. 5 cm vom Tumor entfernt in Form einer Gewebestanze gewonnen. Vom unfixierten Gewebe wurden am Vibratom 300 μm dicke Gewebeschnitte mit einer Geschwindigkeit von 0,4 mm/s und einer Amplitude von ca. 1,0 angefertigt. Die Gewebeschnitte wurden in gekühlten Krebs-Henseleit-Puffer transportiert und aufbewahrt. Für die Genotypisierung wurde jeweils ein Gewebeschnitt verwendet.

3.21.2 Frischgewebekultur

Die Gewebeschnitte wurden in DMEM-Nährmedium mit 10 % FBS und 1 % Penicillin/Streptomycin bei 37 °C und 5 %igem CO₂ Gehalt kultiviert. Zudem wurde durch Rotation auf dem Orbitalschüttler bei 55 rpm eine gleichmäßige Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff gewährleistet. Es wurden 6-Well Platten mit speziellem Einsatz verwendet, auf deren PET-Membran die Gewebeschnitte plan aufgelegt wurden. In jedes Well mit jeweils drei Gewebeschnitten wurde 1500 μl Nährmedium pipettiert, so dass die Schnitte vollständig benetzt waren. Das Medium wurde auch während der Assays täglich gewechselt.

3.21.3 Lipolyse-Assay in einer Leber-Frischgewebekultur

Um die Proteinexpressions- und Transkriptionsanalysen unter Bedingungen durchzuführen, die denen *in vivo* möglichst ähnlich sind, wurde der in der Zellkultur etablierte Lipolyse-Assay auf kultiviertes vitales humanes Lebergewebe angewendet. Die Behandlung erfolgte jeweils im Doppelansatz, ein Well für Protein- und RNA-Analysen, das andere für eine histopathologische Beurteilung des Gewebes. Das Gewebe wurde in zwei der sechs Wells mit Ölsäure (240 μ M) für 72 h behandelt. Das Lebergewebe in zwei der nicht mit Ölsäure behandelten Wells wurde nach 72 h Kultivierung lipolytisch mit der Kombination aus 10 μ M Forskolin und 0,5 mM IBMX für 3 h behandelt. Die Kontrolle erfolgte mit äquivalenter Menge DMSO in den verbliebenden, bisher nicht behandelten beiden Wells. Nach Abschluss des Assays wurden jeweils zwei Gewebeschnitte für die Proteinanalyse in *Lysing Tubes plus Ceramic Beads* überführt und bei -20 °C gelagert. Der dritte Gewebeschnitt wurde für die RNA-Analyse in ein Eppendorf-*Tube* überführt und bei -80 °C gelagert. Für die histologische Beurteilung wurden Gewebeschnitte mit 2 ml 4 %igem Formalin fixiert und eine HE-Färbung durchgeführt.

3.22 Statistische Auswertung

Die Datenanalyse wurde mit Excel (Microsoft®) durchgeführt. In Abhängigkeit von der berechneten Varianz wurde unter Wirkungsvermutung ein einseitiger T-Test durchgeführt. Wenn keine Wirkungsvermutung vorlag, wurde ein zweiseitiger T-Test ausgeführt. Es handelte sich um eine unabhängige Stichprobe. Die Auswertung bezüglich der Signifikanz unterlag einem Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$.

4 Ergebnisse

4.1 Perilipin- und PNPLA3-Expression in humanem Lebergewebe

4.1.1 Analyse von Allelfrequenzen des *PNPLA3*-Polymorphismus I148M in humanem Lebergewebe

In vorangegangenen Analysen der Arbeitsgruppe wurde ein Kollektiv von humanen Leberbiopsien von NASH-PatientInnen mit bekanntem *PNPLA3*-Genotyp immunhistochemisch mit Antikörpern gegen Perilipine gefärbt. Hierbei zeigten homozygote Träger des *PNPLA3*-Polymorphismus (G/G) eine geänderte Lokalisation von Perilipin 5 gegenüber Trägern des

dominanten (C/C-) Allels: Perilipin 5 lokalisierte weniger stark an LT, sondern eher zytoplasmatisch und partiell nukleär. Weitere *in vitro* Experimente der Arbeitsgruppe zeigten eine Interaktion von PNPLA3 mit ATGL sowie von PNPLA3 mit Perilipin 5 auf Proteinebene. Bis *dato* gibt es nur wenige Studien, die sich mit einer proteinbiochemischen Charakterisierung von PNPLA3 in humanem Lebergewebe beschäftigten.

Für eine detailliertere Untersuchung wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein weiteres Kollektiv humaner Lebergewebe in Hinblick auf eine mögliche Interaktion zwischen PNPLA3, weiteren Lipasen und Proteinen der Perilipin-Familie sowie deren Expressionsmuster abhängig vom *PNPLA3*-Genotyp untersucht. Das Kollektiv umfasste u. a. kryokonserviertes Lebergewebe mit unbekanntem *PNPLA3*-Status von 15 PatientInnen mit Normalleber bzw. gering steatotischer Leber (jeweils tumorfreies Lebergewebe weit entfernt von einer Lebermetastase eines Kolonkarzinoms) und von 14 PatientInnen mit HCC. Zusätzlich zu allen HCC-Proben wurden als Referenz die nicht-neoplastischen Lebergewebeproben analysiert. Die Leberproben der 29 PatientInnen wurden zunächst hinsichtlich des *PNPLA3*-Status mittels PCR und Sanger-Sequenzierung genotypisiert (Tab. 18). Die Allelfrequenzen des Kollektivs teilten sich wie folgt auf: Insgesamt 45 % der PatientInnen wiesen den *PNPLA3*-Genotyp C/C auf, ebenfalls 45 % den heterozygoten *PNPLA3*-Genotyp C/G und lediglich 10 % den homozygoten *PNPLA3*-Polymorphismus G/G. Verglichen mit dem Lebergewebe bei kolorektaler Metastase (7 %) kam der homozygote *PNPLA3*-Polymorphismus G/G bei PatientInnen mit HCC (14 %) doppelt so häufig vor (Tab. 18).

Zusätzlich wurde FFPE-Lebergewebe von 23 PatientInnen mit NAFLD/NASH mit bekanntem *PNPLA3*-Status immunhistochemisch gefärbt und hinsichtlich der Proteinexpression und -lokalisierung analysiert (vgl. Kapitel 4.2).

<i>PNPLA3</i> -Genotyp (rs738409)	nicht-neoplastisches Lebergewebe bei HCC	Normalleber bzw. gering steatotische Leber	Gesamtzahl
C/C	4 (29 %)	9 (60 %)	13 (45 %)
C/G	8 (57 %)	5 (33 %)	13 (45 %)
G/G	2 (14 %)	1 (7 %)	3 (10 %)
Gesamt	14 (100 %)	15 (100 %)	29 (100 %)

Tab. 18: Allelfrequenzen für *PNPLA3* (rs738409) in humanem Lebergewebe. Zur Ermittlung des *PNPLA3*-Genotyps wurden die Proben mit Sanger-Sequenzierung genotypisiert.

4.1.2 Proteinexpression von Perilipinen und Lipasen in humanem Lebergewebe mit unterschiedlichem *PNPLA3*-Status

Im Folgenden untersuchten wir die Proteinexpression von Perilipinen und Lipasen abhängig vom *PNPLA3*-Status in normalem und gering steatotischem Lebergewebe von 15 PatientInnen, die aufgrund einer Kolonkarzinom-Metastase operiert wurden.

PNPLA3 wurde im Immunblot als Doppelbande auf einer Laufhöhe von 53 und 55 kDa detektiert und war in allen 15 Leberproben vorhanden. Interindividuell gab es Unterschiede der Bandenintensität von *PNPLA3*, jedoch ließen sich keine Unterschiede bezüglich des *PNPLA3*-Status detektieren. *ATGL* wurde als Doppelbande bei 53 und 56 kDa detektiert. Die interindividuellen Unterschiede bezüglich der *ATGL*-Proteinexpression waren weniger stark ausgeprägt als bei *PNPLA3*. Bei heterozygoten Trägern des *PNPLA3*-Polymorphismus I148M zeigte sich die stärkste Proteinexpression von *ATGL*. Perilipin 1A war auf einer Höhe von 68 kDa nachweisbar und wurde unterschiedlich stark exprimiert. Bei acht Leberproben von 15 war keine Perilipin 1A-Bande erkennbar. Perilipin 1A wurde tendentiell bei *PNPLA3* C/C am stärksten exprimiert. Perilipin 2 konnte bei ca. 53 kDa nachgewiesen werden und zeigte unabhängig vom *PNPLA3*-Genotyp eine große Variabilität. Vereinzelt zeigten Proben keine detektierbare Perilipin 2-Bande. Perilipin 3 wurde auf einer Höhe von etwa 43 kDa nachgewiesen und gleichmäßig exprimiert. Perilipin 3 war in jedem Lebergewebe nachweisbar. Perilipin 5 war als Einzelbande bei 56 kDa nachweisbar. Auch bei Perilipin 5 zeigte sich eine deutliche Variabilität der interindividuellen Proteinexpression. Perilipin 5 wurde insgesamt im Lebergewebe mit *PNPLA3* C/G- und G/G-Genotypen am schwächsten exprimiert. Unabhängig vom *PNPLA3*-Genotyp zeigten die untersuchten Proben mit einer hohen *PNPLA3*-Proteinexpression eine hohe Perilipin 5-Proteinexpression und umgekehrt. Ferner bestand keine Korrelation der Expression der untersuchten Proteine untereinander. Von denselben Lebergewebeproben wurden neben der proteinbiochemischen Aufarbeitung anhand einer HE-Färbung pathologische Charakteristika wie Steatosegrad, Entzündung und Fibrose erhoben (Tab. 19).

PNPLA3	Nr.	Steatose	Entzündung	Fibrose	PLIN1	PLIN2	PLIN3	PLIN5	PNPLA3
C/C	32	15%	A1	F0	0	+	++	+	++
	34	<5%	A0	F0	+	+	+	+++	+++
	35	20%	A1	F1c	++	+	+	+++	+++
	36	<5%	A0	F0	0	0	+	+++	++
	37	<5%	A0	F0	+	0	+	0	+
	38	<5%	A1	F1c	++	0	+	+	+
	41	<5%	A0	F0	0	0	+	+++	++
	43	15%	A1	F0	++	+++	++	+++	+++
	45	30%	A0	F0	++	+++	++	++	++
G/G	39	30%	A1	F0	0	++	+	+	+
C/G	31	<5%	A2	F1c	0	0	+	+	+
	33	10%	A1	F0	0	+	+	+	++
	40	5%	A0	F0	0	+	+	+	+++
	42	40%	A1	F0	++	+++	+	+++	+++
	44	<5%	A0	F0	0	0	++	0	++

Tab. 19: **Histopathologische Charakterisierung der humanen Lebergewebe und semiquantitative Angabe der Proteinexpression.** Angabe der Steatose in Prozent, des Fibrosegrads nach Kleiner et. al. (42) mit F0=keine, F1+F2+F3=portale Fibrose/septenbildende Architekturstörung, F4=Leberzirrhose sowie der Entzündungsaktivität (A0=keine, A1=milde, A2=moderate, A3=starke Entzündungsaktivität) nach Bedossa et. al. (43). Semiquantitative Beurteilung der Proteinexpression anhand der Bandenstärke des zugehörigen Immunblots (Abb. 7). Legende: 0 keine Bande, + schwache Bande, ++ deutliche Bande, +++ starke Bande. Die Reihenfolge entspricht der des Immunblots (Abb. 7). Zu den klinischen Angaben, Alter und Geschlecht vgl. Kapitel 3.13.

Eine Korrelation der Proteinexpression mit dem Steatosegrad war insbesondere für Perilipin 1A und 2 erkennbar (Abb. 7 und Tab. 19). In der Regel war ein positiver Zusammenhang zwischen einem Steatosegrad von über 20 % mit einer verstärkten Perilipin 1A-Expression erkennbar. Bei den meisten Proben mit einem niedrigeren Steatosegrad war entsprechend die Perilipin 1A-Expression geringer. Passend zu seinem Vorkommen bei Steatose korrelierte die Proteinexpression von Perilipin 2 noch stärker mit dem Steatosegrad als Perilipin 1A. Bei Proben mit einem Steatoseanteil von unter 5 % wurde Perilipin 2 abgesehen von einer Ausnahme nicht exprimiert. Bei einem Steatoseanteil von mind. 30 % war eine deutliche bis starke Perilipin 2-Expression vorhanden. Für Perilipin 3, 5, ATGL und PNPLA3 war kein

positiver Zusammenhang in Bezug auf den Steatosegrad erkennbar, grundsätzlich in Übereinstimmung mit den Vordaten.

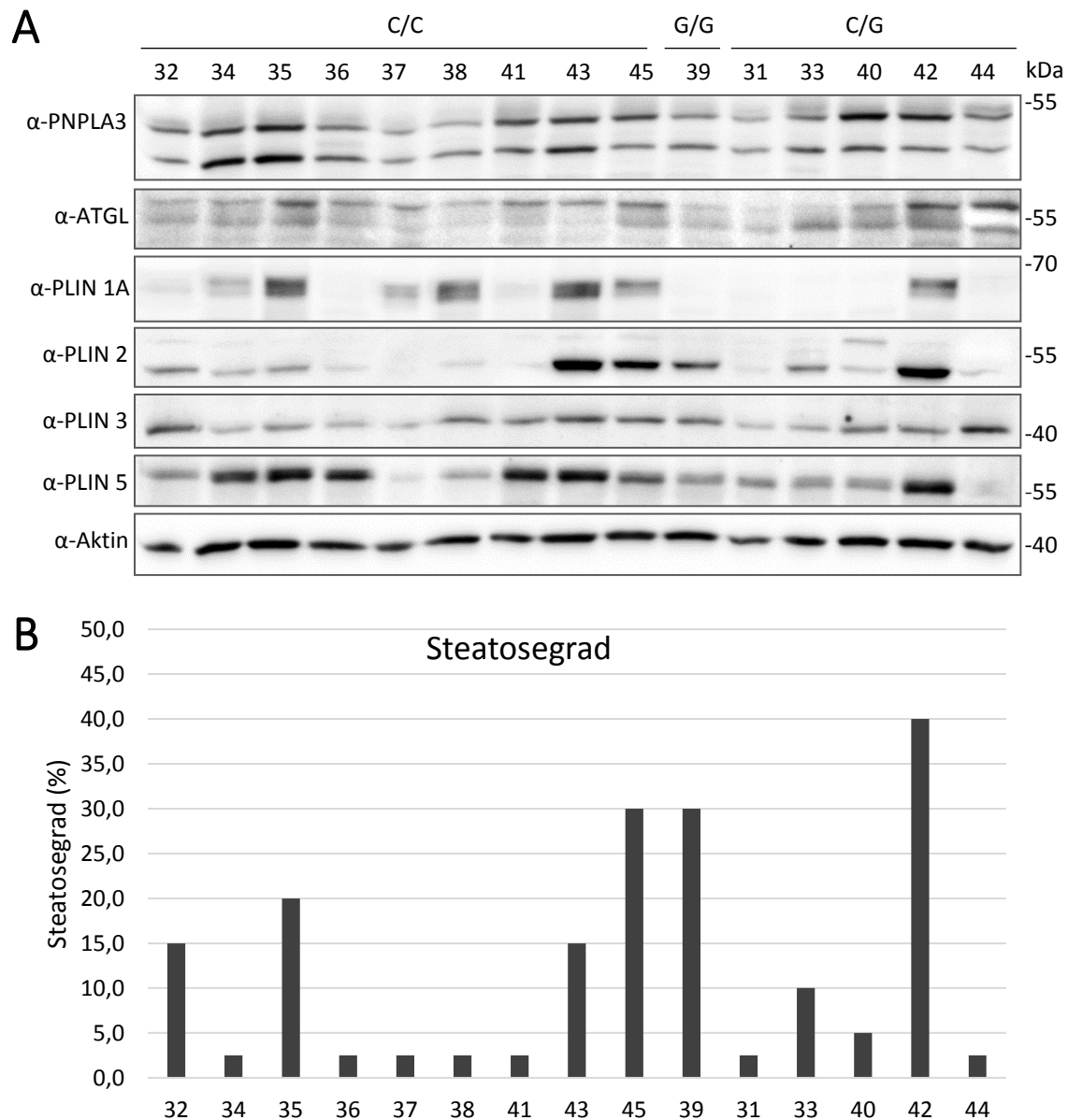


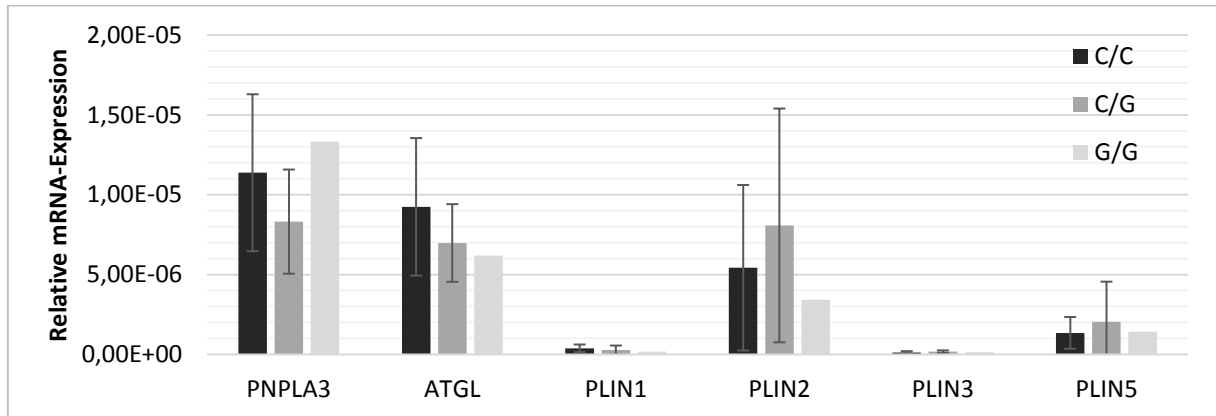
Abb. 7: Expression von Proteinen der Perilipin-Familie und Lipasen in humanem Lebergewebe in Abhängigkeit vom *PNPLA3*-Status und Steatosegrad. A: Immunblotanalyse von insgesamt 15 Leberproben, davon 9 mit *PNPLA3*-Genotyp C/C, 1 mit homozygotem G/G-Genotyp und 5 mit C/G-Genotyp. Es wurden jeweils 25 μ g Gesamtprotein aufgetragen. Die Detektion erfolgte mit Antikörpern gegen PNPLA3 (α -PNPLA3, ~53 und 55 kDa), ATGL (α -ATGL, ~53 und 56 kDa), Perilipin 1A (α -PLIN1, ~68 kDa), Perilipin 2 (α -PLIN2, ~53 kDa), Perilipin 3 (α -PLIN3, ~43 kDa) und Perilipin 5 (α -PLIN5, ~56 kDa). Aktin diente als Ladekontrolle (~42 kDa). Molekulargewichtsmarker sind auf der rechten Seite angegeben. B: Steatosegrad der Leberproben Nr. 31-45 in Prozent entsprechend der Reihenfolge im Immunblot.

4.1.3 mRNA-Expression von Perilipinen und Lipasen in normalem und gering steatotischem humanen Lebergewebe

In einem nächsten Schritt wurde die Expression der Gene der Perilipine sowie LT-assoziiierter Lipasen mittels Realtime-PCR auf mRNA-Ebene im gleichen Kollektiv untersucht. Bei Betrachtung der Mittelwerte der relativen Expression fiel auf, dass die mRNA-Menge von *PLIN2*, *ATGL* und *PNPLA3* im Vergleich mit den anderen Gentranskripten am größten war (Abb. 8A). Die größte Standardabweichung der mRNA-Expression in Bezug auf die Messwerte zeigten *PLIN2* und *PLIN5*.

Im Folgenden wurde die mRNA-Expression von *PNPLA3*, *ATGL*, *PLIN 1*, *2*, *3* und *5* in Bezug auf den *PNPLA3*-Genotyp analysiert (Abb. 8A und B). Die mRNA-Expression von *PNPLA3* war beim heterozygoten Genotyp C/G am niedrigsten ($8,3 \times 10^{-6}$) und bei der Probe mit dem homozygoten Genotyp G/G am höchsten ($1,3 \times 10^{-5}$) (Abb. 8A). *ATGL*-mRNA-Spiegel waren beim *PNPLA3*-Genotyp C/C im Mittel am höchsten ($9,2 \times 10^{-6}$) und beim *PNPLA3*-Genotyp G/G am niedrigsten ($6,2 \times 10^{-6}$) (Abb. 8A). *PLIN1* zeigte bei *PNPLA3* C/C im Durchschnitt die höchste ($3,9 \times 10^{-7}$) und beim *PNPLA3*-Genotyp G/G die niedrigste ($1,9 \times 10^{-7}$) Expression (Abb. 8A). *PLIN2* wies bei *PNPLA3* G/G die geringste ($3,4 \times 10^{-6}$) und bei C/G die stärkste ($8,1 \times 10^{-6}$) Expression auf (Abb. 8A). Generell fiel eine hohe Variabilität der Expressionsspiegel zwischen den unterschiedlichen Proben für *PLIN2* auf (Abb. 8B). Es bestand keine eindeutige Korrelation der mRNA-Expression von *PLIN2* mit dem Steatosegrad (Abb. 8B und Tab. 18). Die *PLIN3*-mRNA-Expression war bei PatientInnen mit *PNPLA3* C/G tendentiell am stärksten ($1,8 \times 10^{-7}$) und zeigte bei *PNPLA3* C/C mit $1,3 \times 10^{-7}$ und bei *PNPLA3* G/G mit $1,5 \times 10^{-7}$ keine signifikanten Unterschiede (Abb. 8A). *PLIN5* wurde im Durchschnitt wie *PLIN2* und *PLIN3* bei *PNPLA3* C/G am stärksten exprimiert ($2,1 \times 10^{-6}$) und wies bis auf die Proben 41 und 42 eine relativ stabile mRNA-Transkription auf (Abb. 8B).

A: Mittelwerte



B: Normales und gering steatotisches humanes Lebergewebe

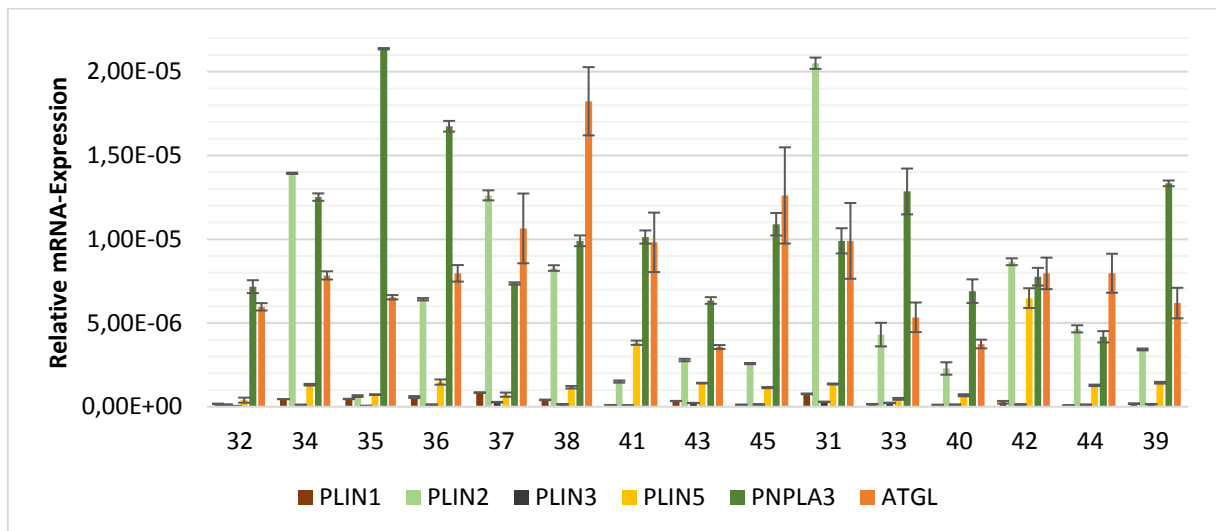


Abb. 8: mRNA-Expression der Perilipin-Familie und Lipasen in humanem Lebergewebe in Abhängigkeit vom *PNPLA3*-Status. Semiquantitative Realtime-PCR Analyse der unter Punkt 4.1.3 analysierten Leberproben. **(A)** Darstellung der relativen mRNA-Expression in Abhängigkeit vom *PNPLA3*-Genotyp. Die Expression von Proben mit gleichem *PNPLA3*-Status wurde zusammengefasst. **(B)** Darstellung der relativen Expression der einzelnen analysierten Proben. Die Mittelwerte wurden mit zugehöriger Standardabweichung vom Mittelwert aufgetragen. *PNPLA3*-Genotyp C/C: Proben Nr. 32, 34-38, 41, 43, 45. *PNPLA3*-Genotyp C/G: Nr. 31, 33, 40, 42, 44. *PNPLA3*-Genotyp G/G: Nr. 39. Die Expression der unterschiedlichen analysierten Gene wurde auf die Expression von 18S RNA normalisiert.

4.1.4 Proteinexpression von Perilipinen und Lipasen in HCCs

Ergänzend untersuchten wir, inwiefern sich die Proteinexpression von Perilipinen und die von LT-assoziierten Lipasen im HCC im Vergleich zum zugehörigen nicht-neoplastischen Lebergewebe unterscheidet und ob Expressionsunterschiede in Abhängigkeit vom *PNPLA3*-Status bestehen (Abb. 9). HCCs entstehen in der Mehrzahl der Fälle auf dem Boden einer Leberzirrhose, sowie zum Teil bei NAFLD/NASH (22, 55). Der *PNPLA3*-Polymorphismus I148M ist ein bedeutender Risikofaktor bei der HCC-Entstehung (3, 62, 69).

PNPLA3 zeigte in den 14 nicht-neoplastischen Lebergewebeproben eine stabile Expression (Abb. 9). Die 14 HCC-Proben zeigten dagegen eine deutlich höhere Variabilität in den Expressionsspiegeln von *PNPLA3* verglichen mit dem nicht-neoplastischen Lebergewebe. Das HCC-Gewebe zeigte zudem insgesamt eine reduzierte *PNPLA3*-Expression gegenüber dem nicht-neoplastischen Lebergewebe (Abb. 9). *ATGL* wurde im nicht-neoplastischen Lebergewebe ebenfalls tendentiell stärker exprimiert als in den zugehörigen HCCs und die *ATGL*-Expression zeigte im nicht-neoplastischen Gewebe eine geringere Variabilität der Proteinmenge als im HCC (Abb. 9). Perilipin 1A war im HCC im Gegensatz zu *PNPLA3* und *ATGL* bisweilen höher exprimiert als im nicht-neoplastischen Lebergewebe. Auch zeigten die HCC-Proben eine höhere Variabilität der Perilipin 1A-Expressionsspiegel. Perilipin 2 zeigte sowohl im nicht-neoplastischen Lebergewebe als auch im zugehörigen HCC eine starke Variabilität der Expressionsspiegel (Abb. 9). Perilipin 3 war in den HCCs und dem nicht-neoplastischen Lebergewebe variabel exprimiert (Abb. 9). Die Unterschiede der Perilipin-3-Expression zwischen nicht-neoplastischem Lebergewebe und HCC waren weniger stark ausgeprägt als bei den anderen hier untersuchten Proteinen. Perilipin 5 wurde im nicht-neoplastischen Lebergewebe stabil exprimiert (Abb. 9). Die Variabilität der Expressionsspiegel von Perilipin 5 war im HCC größer. Im nicht-neoplastischen Lebergewebe zeigten sowohl *PNPLA3* als auch Perilipin 5 insgesamt eine starke Proteinexpression. Dabei korrelierte die Bandenstärke von Perilipin 5 und *PNPLA3* im nicht-neoplastischen Lebergewebe, mit Ausnahme von Probe 22 und 26.

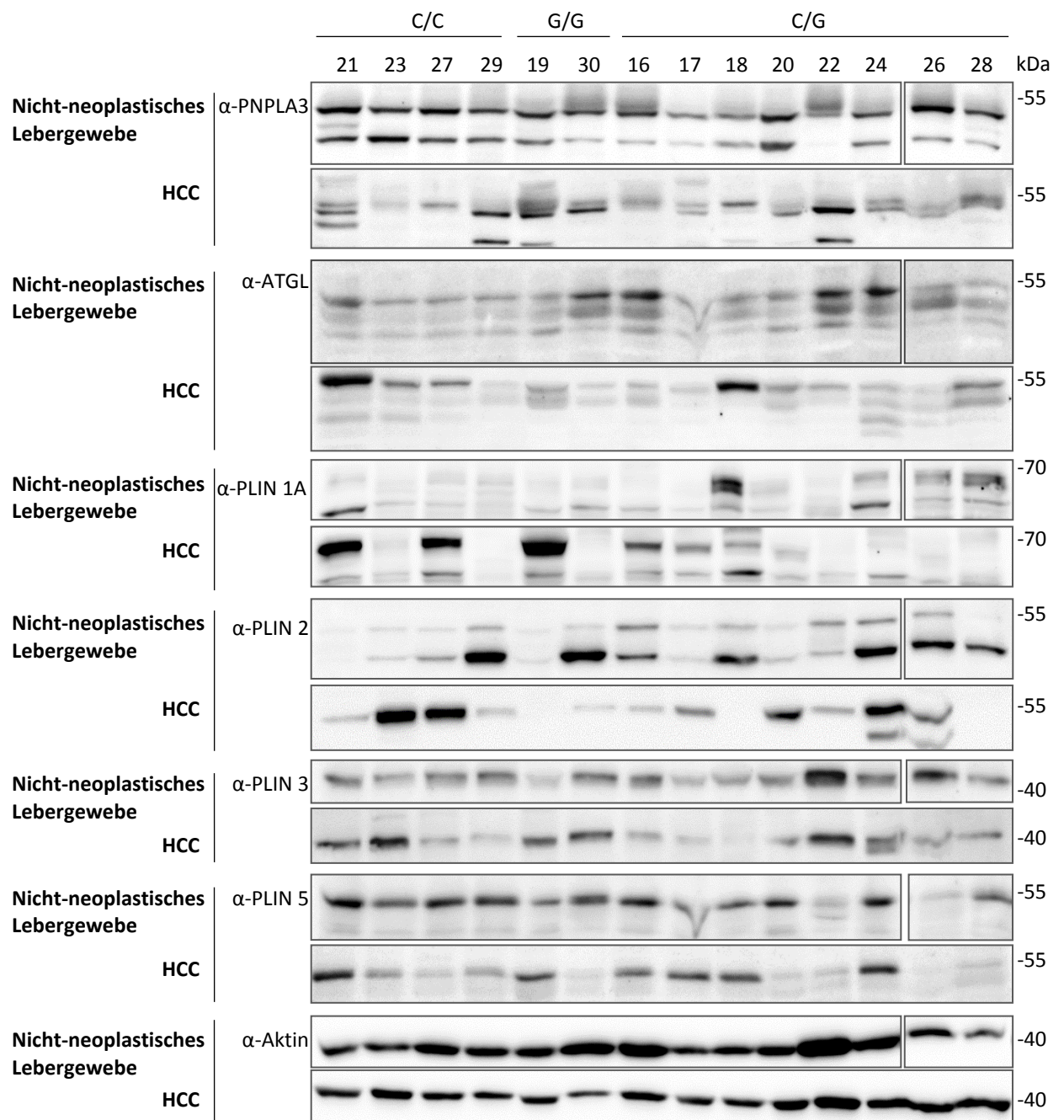


Abb. 9: Expression von Proteinen der Perilipin-Familie und Lipasen in HCCs und dem zugehörigen nicht-neoplastischen Lebergewebe in Abhängigkeit vom *PNPLA3*-Status. Es wurden Leberproben mit *PNPLA3* C/C, G/G und C/G Status vergleichend betrachtet. Immunblotanalyse von insgesamt 14 Leberproben, davon 4 mit C/C-Genotyp, 2 mit G/G-Genotyp und 8 mit C/G-Genotyp. Die Detektion erfolgte mit Antikörpern gegen PNPLA3 (α -PNPLA3, ~53 und 55 kDa), ATGL (α -ATGL, ~53 und 56 kDa), Perilipin 1A (α -PLIN1, ~68 kDa), Perilipin 2 (α -PLIN2, ~53 und 55 kDa), Perilipin 3 (α -PLIN3, ~43 kDa) und Perilipin 5 (α -PLIN5, ~56 kDa). Pro Spur wurden jeweils 25 μ g Gesamtprotein geladen. Aktin diente als Ladekontrolle (~42 kDa). Molekulargewicht in kDa auf der rechten Seite.

Eine Korrelation zwischen Steatosegrad und Proteinexpression war lediglich für Perilipin 1A und Perilipin 2 im nicht-neoplastischen Gewebe nachweisbar (Tab. 21). Perilipin 1A war im Immunblot auf Proteinebene im nicht-neoplastischen Gewebe erst ab einem Steatosegrad von ca. 20% nachweisbar, Probe 21 bildete hiervon eine Ausnahme (Tab. 21). Mit wenigen Ausnahmen war ebenfalls eine positive Korrelation zwischen dem Steatosegrad und der Perilipin 2-Expression im nicht-neoplastischen Lebergewebe nachweisbar (Tab. 21). In den HCCs sowie für die übrigen Perilipine und Lipasen bestand dagegen keine Korrelation zwischen Steatosegrad und Proteinexpression (Tab. 20).

Effekte des *PNPLA3*-Status auf die Expression der untersuchten Proteine waren weder in den HCCs noch im nicht-neoplastischen Lebergewebe erkennbar. Mit Ausnahme von Perilipin 3 zeigten die analysierten Proteine deutliche Expressionsunterschiede zwischen HCC und nicht-neoplastischem Lebergewebe. *PNPLA3*, *ATGL*, Perilipin 2 und 5 wurden tendentiell im nicht-neoplastischem Lebergewebe stärker exprimiert als in den HCCs, lediglich die Perilipin 1-Expression war in den HCCs stärker.

PNPLA3	Nr.	Steatose	PNPLA3	ATGL	PLIN1A	PLIN2	PLIN3	PLIN5
C/C	21	<5%	+	+++	+++	+	++	++
	23	30%	0	++	0	+++	++	+
	27	20%	+	++	+++	+++	+	0
	29	25%	+++	0	0	+	+	+
G/G	19	<5%	+++	+	+++	0	++	++
	30	10%	++	0	0	+	++	0
C/G	16	<5%	+	+	++	+	+	++
	17	<5%	+	0	++	++	+	++
	18	<5%	++	+++	++	0	0	++
	20	<5%	+	+	+	+++	+	0
	22	10%	+++	+	0	++	+++	0
	24	15%	+	+	0	+++	++	++
	26	10%	+	0	0	++	+	0
	28	5%	+	++	0	0	+	0

Tab. 20: Histopathologische Charakterisierung der humanen HCCs. Angabe der Verfettung in Prozent sowie semiquantitative Beurteilung der Bandenstärke des zugehörigen Immunblots (Abb. 9). Legende: 0 keine Bande, + schwache Bande, ++ deutliche Bande, +++ starke Bande. Die Reihenfolge entspricht der des Immunblots (Abb. 9). Zu den klinischen Angaben, Alter und Geschlecht vgl. Kapitel 3.13.

PNPLA3	Nr.	Steatose	Fibrose	PNPLA3	ATGL	PLIN1A	PLIN2	PLIN3	PLIN5
C/C	21	<5%	F0	+++	++	++	0	++	++
	23	<5%	F0	+++	+	0	+	++	++
	27	15%	F1c	+++	+	0	+	++	++
	29	40%	F1c	+++	+	0	+++	++	++
G/G	19	15%	F0	+++	+	0	0	+	++
	30	20%	F3	+++	+++	0	+++	++	++
C/G	16	30%	F2	+++	+++	0	++	++	++
	17	15%	F2	++	+	0	+	+	+
	18	20%	F3	++	+	+++	++	+	++
	20	15%	F0	+++	+	0	+	++	++
	22	<5%	F4	++	+++	0	+	+++	0
	24	20%	F0	+++	+++	+	+++	++	++
	26	20%	F3	+++	++	+	+++	+++	0
	28	30%	F0	+++	+	+	++	+	+

Tab. 21: **Histopathologische Charakterisierung des zum HCC zugehörigen humanen nicht-neoplastischen Lebergewebes.** Angabe der Steatose in Prozent sowie des Fibrosegrads nach Kleiner et. al. (42) mit F0=keine, F1+F2+F3=portale Fibrose/septenbildende Architekturstörung, F4=Leberzirrhose. Semiquantitative Beurteilung der Bandenstärke des zugehörigen Immunblots (Abb. 9). Legende: 0 keine Bande, + schwache Bande, ++ deutliche Bande, +++ starke Bande. Die Reihenfolge entspricht der des Immunblots (Abb. 9). Zu den klinischen Angaben, Alter und Geschlecht vgl. Kapitel 3.13.

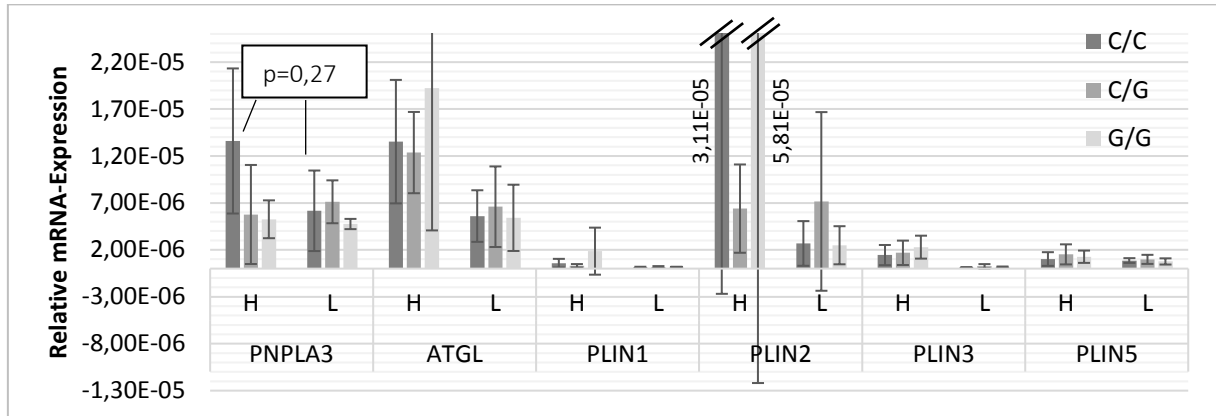
4.1.5 mRNA-Expression von Perilipinen und Lipasen in HCCs

Ergänzend zur Proteinanalyse wurde im Folgenden die Genexpression der Perilipine sowie LT-assoziiierter Lipasen in denselben HCC-Proben untersucht, da eine Regulation sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene stattfinden kann. Zu diesem Zweck wurde die relative mRNA-Menge von HCCs wieder im Vergleich zum zugehörigen nicht-neoplastischen Lebergewebe analysiert.

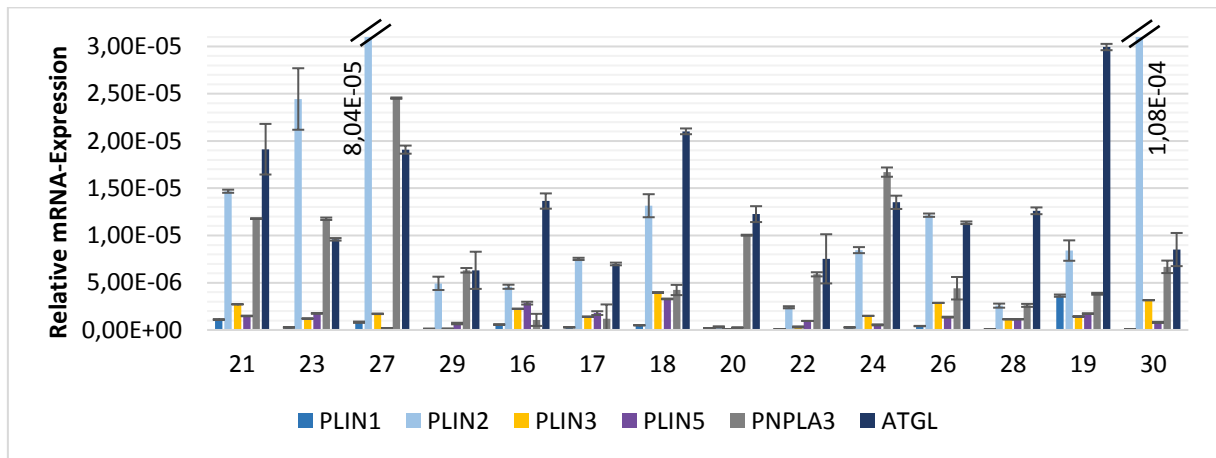
Die relative Expression von *PNPLA3*, *ATGL* und *PLIN2* war im Vergleich der untersuchten Gene sowohl im HCC als auch im nicht-neoplastischen Lebergewebe am höchsten (Abb. 10A). Es fiel auf, dass die *PNPLA3*-Expression im Mittel beim *PNPLA3*-Genotyp C/C im HCC ($1,4 \times 10^{-5}$) höher war als im nicht-neoplastischen Lebergewebe ($6,2 \times 10^{-6}$) (Abb. 10A). Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant ($p=0,27$; $\alpha=0,05$). Im HCC war die Expression von *PNPLA3* weniger stabil als im nicht-neoplastischen Lebergewebe (Abb. 10B und C). *ATGL* zeigte bei allen untersuchten *PNPLA3*-Genotypen im HCC eine stärkere Expression als im zugehörigen nicht-neoplastischen Lebergewebe (Abb. 10A). *PLIN1* zeigte im Mittel bei *PNPLA3* G/G im HCC die höchste Expression (HCC $1,9 \times 10^{-6}$, Lebergewebe $1,9 \times 10^{-7}$) (Abb. 10A). Insbesondere im nicht-neoplastischen Lebergewebe war die Variabilität der Expression von *PLIN1* zwischen den hier vorliegenden Proben gering (Abb. 10C). *PLIN2* wies im HCC eine stärkere Expression als im zugehörigen nicht-neoplastischen Lebergewebe auf, sowohl bei *PNPLA3* C/C (HCC $3,1 \times 10^{-5}$, Lebergewebe $2,7 \times 10^{-6}$) als auch bei *PNPLA3* G/G (HCC $5,8 \times 10^{-5}$, Lebergewebe $2,5 \times 10^{-6}$) (Abb. 10A). Die Expression von *PLIN2* variierte zwischen den Proben insgesamt stark (Abb. 10 B und D). *PLIN3* und *PLIN5* zeigten eine geringe mRNA-Expression (Abb. 10A). Die *PLIN5*-Expression war im HCC tendentiell höher als im entsprechenden nicht-neoplastischen Lebergewebe.

Insgesamt war im HCC die relative Expression der Gene von *PLIN2* (bei *PNPLA3* C/C und G/G), *PLIN3* und *ATGL* im Vergleich zu dem zugehörigen nicht-neoplastischen Lebergewebe verstärkt. Signifikante *PNPLA3*-Status-abhängige Expressionsunterschiede zeigten sich bei den hier untersuchten Genen im HCC nicht.

A: Mittelwerte



B: HCCs



C: Nicht-neoplastisches Lebergewebe

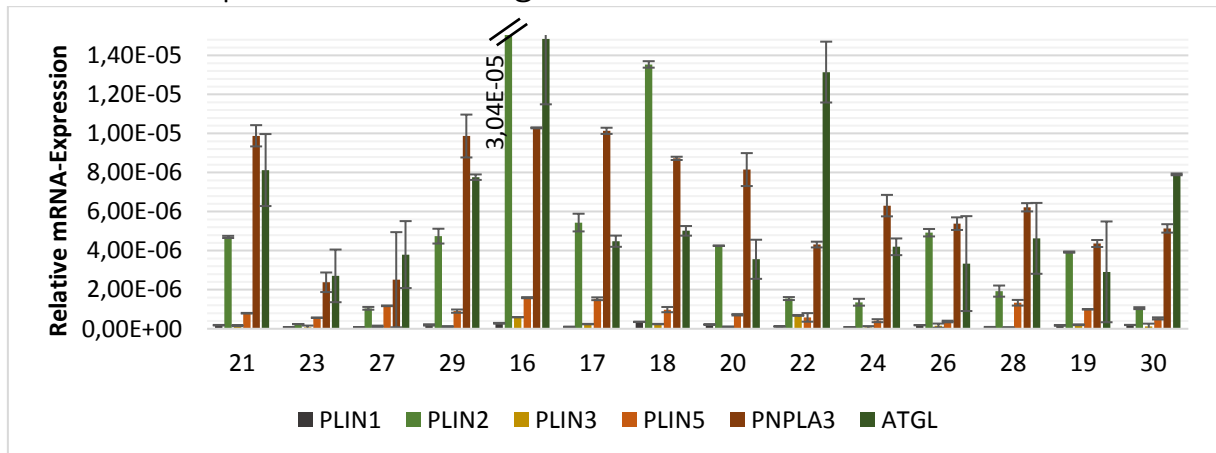


Abb. 10: mRNA-Expression der Perilipin-Familie und Lipasen in HCCs, verglichen mit dem zugehörigen nicht-neoplastischen Lebergewebe in Abhängigkeit vom *PNPLA3*-Status. Analyse mit semiquantitativer Realtime-PCR. (A) Die mRNA-Expression im HCC (H) und die des zugehörigen nicht-neoplastischen Lebergewebes (L) wurden gegenübergestellt. Darstellung der relativen mRNA-Expression in Abhängigkeit vom *PNPLA3*-Genotyp. Die Expression von Proben mit gleichem *PNPLA3*-Status wurde zusammengefasst. Der Unterschied der *PNPLA3*-Expression zwischen HCC und nicht-neoplastischem Lebergewebe beim *PNPLA3*-Genotyp C/C ist mit einem p-Wert von 0,27 nicht signifikant ($\alpha=0,05$). (B) Darstellung der relativen mRNA-Expression der einzelnen analysierten HCC- und (C) die der zugehörigen nicht-neoplastischen Lebergewebeprobe. Die Mittelwerte sind mit zugehöriger Standardabweichung vom Mittelwert aufgetragen. Die mRNA-Expression der unterschiedlichen analysierten Gene wurde auf die Expression von 18S RNA normalisiert. *PNPLA3*-Genotyp C/C: Proben Nr. 21, 23, 27, 29. *PNPLA3*-Genotyp C/G: Nr. 16, 17, 18, 20, 22, 24, 26, 28. *PNPLA3*-Genotyp G/G: Nr. 19, 30.

4.2 Lokalisation von Perilipinen und PNPLA3 in humanen NAFLD-/NASH-Leberbiopsien

In einem nächsten Schritt führten wir anhand von immunhistochemischen Färbungen von humanen NAFLD-/NASH-Leberbiopsien Lokalisationsanalysen von Proteinen der Perilipin-Familie und von Lipasen durch. Diese Analyse stellte somit eine Ergänzung der Expressionsanalyse der untersuchten Proteine und Gene aus humanem Lebergewebe (vgl. Kapitel 4.1) dar. Wir analysierten ein NAFLD-/NASH-Kollektiv bestehend aus 23 Leberbiopsien mit bekanntem *PNPLA3*-Genotyp (Tab. 22, Tab. 23 Anhang). Dazu bestimmten wir semiquantitativ lichtmikroskopisch u. a. die Intensität der einzelnen Färbungen, den Anteil gefärbter Hepatozyten am Parenchym, den Proteinanteil an LT und den Steatosegrad. Bei Lebergewebe mit homozygotem *PNPLA3*-Polymorphismus G/G war der Steatosegrad (62,5 %) im Vergleich zu dem Lebergewebe mit *PNPLA3*-Genotyp C/C (35,7 %) signifikant größer ($p=0,04$) (Abb. 11).

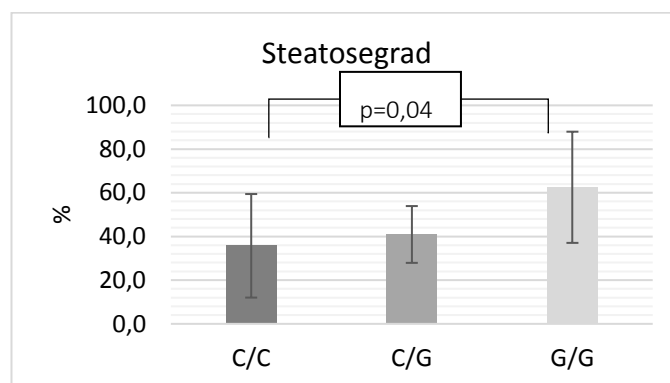


Abb. 11: Leberbiopsien von NAFLD-/NASH-PatientInnen mit *PNPLA3*-Genotyp G/G zeigen einen signifikant höheren Steatosegrad als Leberbiopsien mit *PNPLA3*-Genotyp C/C ($p=0,04$). Der Steatosegrad entspricht dem lichtmikroskopisch ermittelten Anteil der LT am Parenchym in Prozent. Proben mit gleichem *PNPLA3*-Genotyp wurden zusammengefasst und Mittelwert sowie Standardabweichung aufgetragen. Insgesamt wurden 23 Proben analysiert, 6x *PNPLA3*-Genotyp G/G, 10x *PNPLA3*-Genotyp C/G und 7x *PNPLA3*-Genotyp C/C.

Charakteristikum einer NASH ist neben dem Vorhandensein entzündlicher Infiltrate das Auftreten ballonierter Hepatozyten (18, 19). Zunächst wurde semiquantitativ die Anzahl ballonierter Hepatozyten im Parenchym der 23 NAFLD-/NASH-Proben beurteilt (Tab. 22). Am häufigsten waren ballonierete Hepatozyten beim *PNPLA3* C/G- (1,36; Standardabweichung 0,5) und G/G- (1,17; Standardabweichung 0,75), seltener beim *PNPLA3* C/C-Genotyp (0,86; Standardabweichung 0,69) nachweisbar. Der Unterschied der Anzahl ballonierter Hepatozyten zwischen *PNPLA3* C/C im Vergleich mit *PNPLA3* G/G und C/G war jedoch aufgrund der kleinen Kollektivgröße nicht signifikant ($p=0,08$). Zudem wurde die Expression

der Perilipine sowie von PNPLA3 in ballonierten Hepatozyten beurteilt. Die Färbung von v. a. Perilipin 2 und geringer von Perilipin 5 war in ballonierten Hepatozyten stark positiv, Perilipin 1 und PNPLA3 waren schwach positiv. PNPLA3 war bei ballonierten Hepatozyten eher granulär lokalisiert, Perilipin 1 dagegen an LT. Perilipin 2 war zytoplasmatisch und an LT, Perilipin 5 v. a. zytoplasmatisch und granulär exprimiert. Perilipin 3 und 4 wurden mittelstark in ballonierten Hepatozyten exprimiert und waren granulär sowie zum Teil an LT lokalisiert.

PNPLA3	Nr.	Ballo- nierung	HSCs	Steatose (%)	NAS-Score nach Kleiner et. al.	SAF-Score nach Bedossa et. al.
G/G	68	1	1	75	6	S3 A3 F1c
	69	1	1	25	3-4	S2 A1 F3
	70	1	1	80	4	S3 A1 F1c
	71	2	2	80	5	S3 A2 F1a
	72	0	2	35	4	S2 A2 F2
	73	2	1	80	7	S3 A4 F2
C/G	74	1	2	40	3	S2 A1 F1c
	75	2	1	25	3	S1 A2 F0
	76	2	2	45	6	S2 A4 F3
	77	1	2	50	3	S2 A1 F2
	78	2	1	65	5	S2 A3 F2
	79	2	0	50	6-7	S2 A4-5 F4
	80	1	1	40	5	S2 A3 F1c
	81	1	0,5	35	3	S2 A1 F0
	82	1	0	50	4	S2 A1 F4
	83	1	1	30	2	S1 A1 F1c
C/C	84	0	1	10	1	S1 A0 F1c
	85	1	2	30	2	S1 A1 F0
	86	1	1	20	3	S1 A2 F0
	87	2	1	40	5	S2 A3 F4
	88	1	1	80	6	S3 A3 F2
	89	1	2	20	1	S1 A1 F0
	90	0	1	50	2	S2 A0 F0

Tab. 22: **Histologische Charakteristika der humanen NAFLD-/NASH-Leberbiopsien (n=23).** Die Häufigkeit ballonierter Hepatozyten wurde lichtmikroskopisch beurteilt: 0=keine, 1=wenige, 2=zahlreiche, sowie die Häufigkeit von LT in HSCs: 0=keine, 1=vereinzelt, 2=zahlreiche. Der Steatosegrad entspricht dem lichtmikroskopisch ermittelten Anteil der LT am Parenchym in Prozent. Der SAF-Score nach Bedossa et. al. (43) beinhaltet die Graduierung von Steatose (S), Entzündungsaktivität (A) und Fibrose (F). Der NAS-Score nach Kleiner et. al. (42) ist die Summe der Bewertungskriterien Steatose, azinäre Entzündung und hepatozelluläre Ballonierung. Zu klinischen Daten vgl. Kapitel 3.13.

Die 23 NAFLD-/NASH-Leberbiopsien wurden mit dem NAS- und SAF-Score hinsichtlich histologischer Bewertungskriterien graduiert (Tab. 22). Der SAF-Score beinhaltet die Graduierung von Steatose (S), Entzündungsaktivität (A) und Fibrose (F). Der NAS-Score ist die Summe der Bewertungskriterien Steatose, azinäre Entzündung und hepatozelluläre Ballonierung. Der Mittelwert des NAS-Scores der NAFLD-/NASH-Leberbiopsien mit dem *PNPLA3*-Genotyp G/G entsprach mit einem Wert von 5 einer manifesten Steatohepatitis (Abb. 12). Im Mittel lagen die NAS-Scores der Leberbiopsien mit C/C- und C/G-Genotyp mit Werten zwischen 3 und 4 im Borderline-Bereich. Auf einem Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ war der NAS-Score des *PNPLA3*-Genotyp G/G mit $p=0,02$ signifikant höher als der NAS-Score des C/C-Genotyp (Abb. 12).

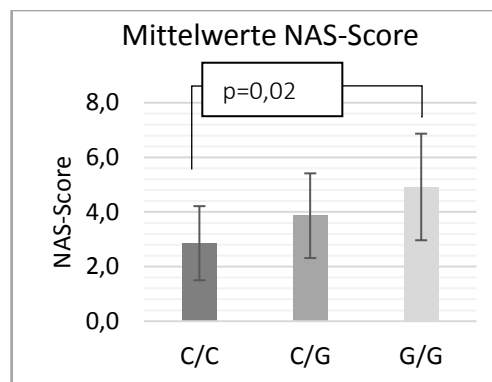


Abb. 12: **NAS-Score bezogen auf die *PNPLA3*-Genotypen in Leberbiopsien von NAFLD-/NASH-PatientInnen.** NAS-Score zusammengesetzt aus Steatose (0-3), Entzündung (0-3) und hepatozellulärer Ballonierung (0-3). Proben mit gleichem *PNPLA3*-Genotyp wurden zusammengefasst und Mittelwert sowie Standardabweichung aufgetragen. Insgesamt wurden 23 Proben analysiert, davon 6x *PNPLA3* G/G, 10x *PNPLA3* C/G und 7x *PNPLA3* C/C. Der Unterschied des NAS-Scores zwischen *PNPLA3* C/C und *PNPLA3* G/G war signifikant (p -Wert=0,02).

Da HSCs eine Schlüsselrolle bei der Entstehung einer Leberfibrose spielen (21), wurde die Anzahl der LT-haltigen HSCs semiquantitativ beurteilt (0=keine, 1=vereinzelt, 2=zahlreich). LT-haltige HSCs waren in allen Leberbiopsien vorhanden (Tab. 22). Der Mittelwert bei *PNPLA3* G/G und C/C betrug je 1,3 (Standardabweichung je 0,5) und bei *PNPLA3* C/G 1,2 (Standardabweichung 0,6). Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den *PNPLA3*-Genotypen in Bezug auf die Häufigkeit der Perilipin-positiven HSCs, möglicherweise da keine fortgeschrittene Fibrose bzw. Zirrhose in dem Kollektiv vorhanden war.

Die Proteinexpression der Perilipine 1-5 und von *PNPLA3* wurde anhand der Intensität der immunhistochemischen Färbung in Bezug auf den *PNPLA3*-Genotyp beurteilt (Tab. 23 Anhang, Abb. 13). Die Perilipine 1-3 und *PNPLA3* zeigten sowohl bei homo- als auch heterozygoten Trägern des *PNPLA3*-Polymorphismus I148M eine reduzierte, aber nicht

signifikant schwächere Färbeintensität verglichen mit homozygoten Trägern des Wildtyp-Allels (Abb. 13).

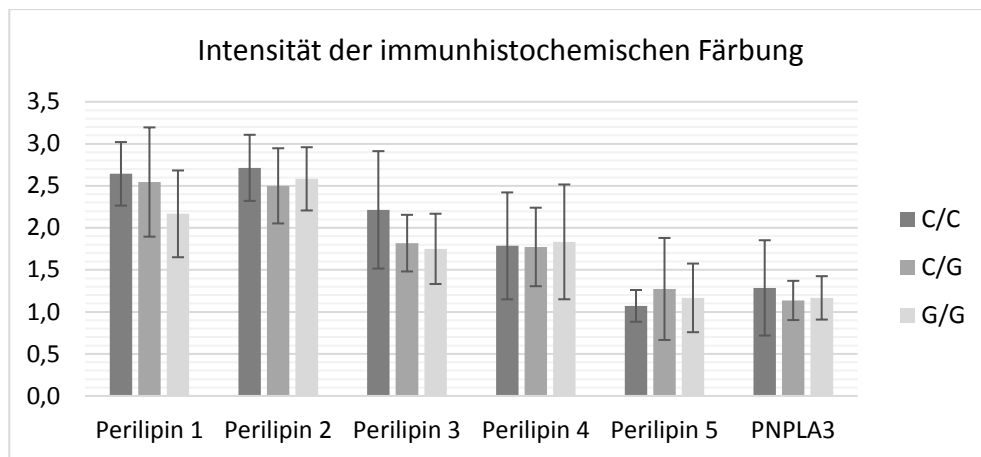


Abb. 13: **Auswertung der immunhistochemischen Färbungen von Perilipin 1-5 und PNPLA3 in humanen NAFLD-/NASH-Leberbiopsien.** Semiquantitative Beurteilung der Intensität der Färbung (0=keine Färbung, 1=wenig Färbung, 2=deutliche Färbung und 3=sehr starke Färbung). Proben mit gleichem *PNPLA3*-Genotyp wurden zusammengefasst und Mittelwert und Standardabweichung aufgetragen. Insgesamt wurden 23 Proben analysiert, davon 6x *PNPLA3* G/G, 10x *PNPLA3* C/G und 7x *PNPLA3* C/C.

Für die Perilipin 1- und 2-Färbungen wurde zusätzlich der prozentuale Anteil gefärbter Hepatozyten im Leberparenchym ermittelt (Tab. 23 Anhang, Abb. 14). Träger zweier Wildtyp-Allele (*PNPLA3* C/C) zeigten einen Anteil von 59,3 % Perilipin 1-positiver Hepatozyten im Parenchym. Hetero- und homozygote Träger des Polymorphismus (*PNPLA3* C/G; G/G) zeigten mit 56,4 % (C/G) sowie 50,8 % (G/G) eine leichte, aber nicht signifikante Reduktion ($p=0,46$) im Vergleich zum *PNPLA3* Wildtyp (Abb. 14). Für den Anteil Perilipin 2-positiver Hepatozyten konnte kein Unterschied ermittelt werden. Der Anteil lag für *PNPLA3* C/C bei 97,9 %, für *PNPLA3* C/G bei 97,3 % und für *PNPLA3* G/G bei 94,2 %.

Zudem wurde die Lokalisation von Perilipin 3-5 und PNPLA3 ermittelt. Hierbei wurde zwischen einer Proteinlokalisierung an LT und in Zytoplasma unterschieden (Tab. 23 Anhang, Abb. 15). Perilipin 3 war unabhängig vom *PNPLA3*-Status zu ca. 30 % an LT-assoziiert (28,3 % bis 30,5 %). Perilipin 4 war zu ca. 25 % an LT lokalisiert (24,6 % bis 26,7 %) und zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den *PNPLA3*-Genotypen. Bei Perilipin 5 lag der Proteinanteil an LT mit 17 % bei *PNPLA3* C/C am niedrigsten. Bei *PNPLA3* G/G (26 %) und bei *PNPLA3* C/G (24,6 %) war der Proteinanteil von Perilipin 5 an LT signifikant größer ($p=0,013$; Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$, Abb. 15). Beim *PNPLA3*-Genotyp C/C lag der Proteinanteil von PNPLA3 an LT bei 12,5 %. Dagegen war PNPLA3 bei den Genotypen G/G und C/G mit 40 % bei G/G und 43,6 % bei C/G deutlich stärker an LT lokalisiert. Dieser Unterschied der

Assoziation von PNPLA3 mit LT zwischen *PNPLA3* C/C im Vergleich mit *PNPLA3* C/G und G/G war signifikant (p -Wert = 0,0017, Abb. 15).

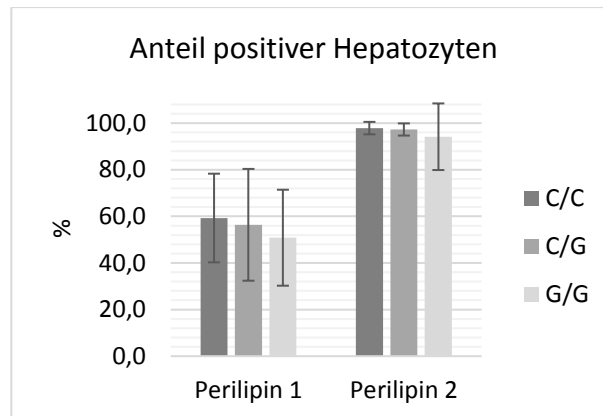


Abb. 14: Anteil Perilipin 1- und 2-positiver Hepatozyten in Leberbiopsien von NAFLD-/NASH-PatientInnen. Auswertung der immunhistochemischen Färbungen von Perilipin 1 und 2 in NAFLD-/NASH-Leberbiopsien. Der Anteil der Hepatozyten, der positiv für das jeweilige Protein war, wurde in Prozent angegeben. Proben mit gleichem *PNPLA3*-Genotyp wurden zusammengefasst und Mittelwert sowie Standardabweichung aufgetragen. Insgesamt wurden 23 Proben analysiert, davon 6x *PNPLA3* G/G, 10x *PNPLA3* C/G und 7x *PNPLA3* C/C.

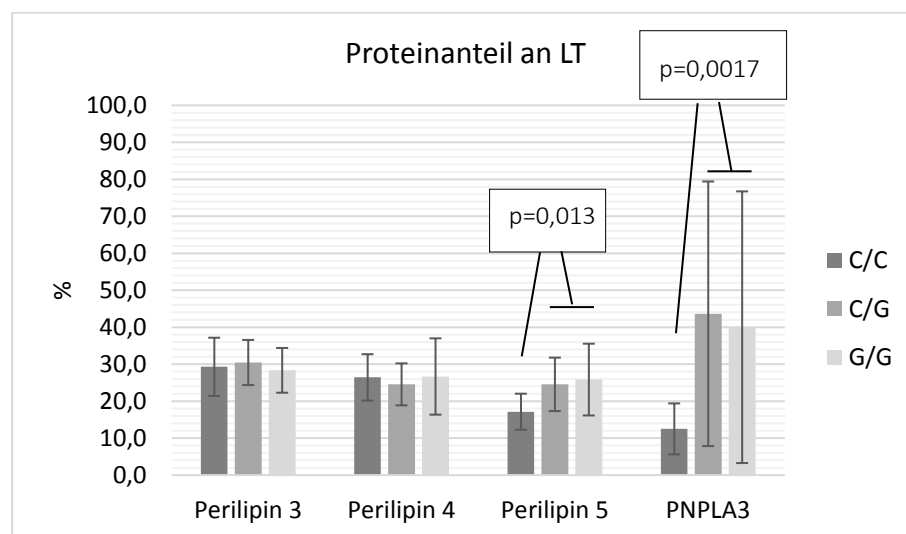


Abb. 15: Proteinanteil der Perilipine 3, 4, 5 und PNPLA3 an LT in Leberbiopsien von NAFLD-/NASH-PatientInnen. Auswertung anhand der immunhistochemischen Färbungen von Perilipin 3-5 und PNPLA3 in humanen NAFLD-/NASH-Leberbiopsien. Die jeweilige Proteinmenge, die an LT lokalisiert war, wurde in Prozent angegeben. Proben mit gleichem *PNPLA3*-Genotyp wurden zusammengefasst und Mittelwert sowie Standardabweichung aufgetragen. Insgesamt wurden 23 Proben analysiert, davon 6x *PNPLA3* G/G, 10x *PNPLA3* C/G und 7x *PNPLA3* C/C. Der Unterschied zwischen *PNPLA3* C/C im Vergleich mit *PNPLA3* C/G und G/G bezüglich der Assoziation von PNPLA3 (p -Wert=0,0017) sowie von Perilipin 5 (p -Wert=0,013) mit LT war signifikant (Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$).

4.3 PNPLA3 hemmt die lipolytische Aktivität von ATGL in HepG2-Zellen

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass PNPLA3 mit der Lipase ATGL auf Proteinebene interagiert. Um zu analysieren, ob diese Interaktion einen Einfluss auf die lipolytische Aktivität von ATGL hat, wurde in HepG2-Zellen *ATGL* allein sowie in Kombination mit *PNPLA3* C/C bzw. *PNPLA3* G/G überexprimiert (Abb. 16).

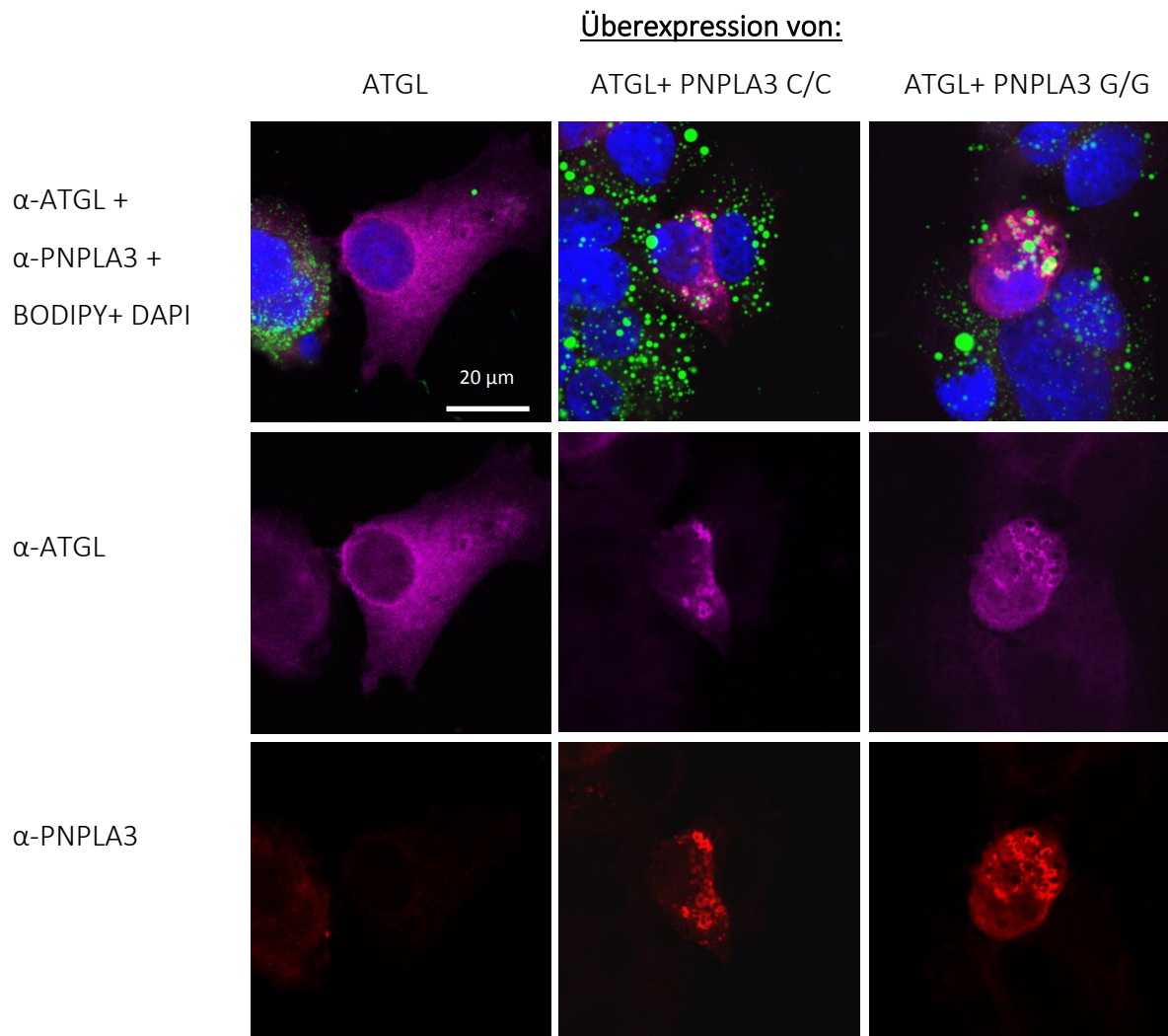


Abb. 16: Überexpression von *PNPLA3* und *ATGL* resultiert in verringertem LT-Abbau in HepG2-Zellen. Immunfluoreszenzmikroskopie von HepG2-Zellen mit Überexpression von *ATGL*, bzw. Überexpression von *ATGL* und *PNPLA3* (C/C oder G/G) (α -PNPLA3=rot, Alexa Fluor® 546; α -ATGL=violett, Alexa Fluor® 635; LT=grün, Bodipy; Zellkerne=blau, DAPI). Transfektion mit Lipofektamin nach Kultivierung in 8-Well Chamberslide, Zelldichte $3,8 \times 10^4$ /200 μ l. PNPLA3 ist ohne Überexpression nicht signifikant detektierbar.

Die lipolytische Aktivität von ATGL wurde mit Immunfluoreszenzmikroskopie anhand der LT-Größe analysiert, da die Größe der LT naturgemäß umgekehrt mit der lipolytischen Aktivität korreliert. Dazu wurde die LT-Fläche in den transfizierten HepG2-Zellen berechnet (Abb. 17). Die Überexpression von *ATGL* allein führte zu einem fast vollständigen Verlust der LT-Fläche

(0,1 μm^2). Die Überexpression von *PNPLA3* C/C in Kombination mit *ATGL* führte zu größeren LT (0,25 μm^2) im Vergleich zu alleiniger *ATGL*-Transfektion. Bei der Überexpression von *ATGL* mit dem *PNPLA3*-Polymorphismus G/G war dieser Effekt noch stärker als bei den mit *PNPLA3* C/C und *ATGL* transfizierten Zellen, die LT-Fläche war im Vergleich am größten (0,3 μm^2).

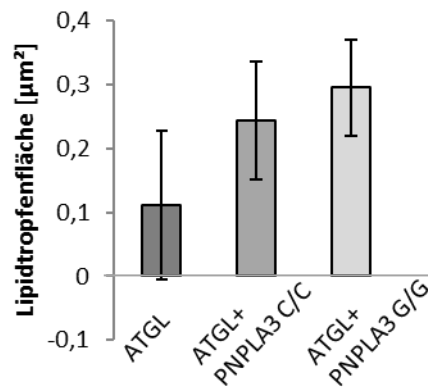


Abb. 17: **Kotransfektion von *PNPLA3* und *ATGL* in HepG2-Zellen resultiert in größerer LT-Fläche als die alleinige Transfektion von *ATGL*.** Quantifizierung der LT-Fläche (in μm^2) von HepG2-Zellen nach Überexpression von *ATGL*, bzw. Überexpression von *ATGL* und *PNPLA3* (C/C bzw. G/G). Nach Konvertierung eines Bildausschnittes (Abb. 16) nach Image J wurde die Fläche der LT der transfizierten Zellen summiert und durch die Anzahl der Zellen geteilt. Der jeweilige Mittelwert der LT-Fläche pro transfizierter Zelle wurde mit Standardabweichung dargestellt.

4.4 Lipolyse-Assay in den Zellkulturlinien Huh7, HepG2 und HEK293T

Humanes Lebergewebe unterliegt naturgemäß vielen Einflussfaktoren wie beispielsweise dem Fasten, einer vermehrten Nahrungsaufnahme, der Einnahme von Pharmazeutika und einem veränderten Stoffwechsel. Diese unbekannt Faktoren können Einfluss auf Proteine und Enzyme im Lebergewebe nehmen. Um dem Einfluss der *PNPLA3*-Genotypen und der Rolle des *PNPLA3*-Polymorphismus I148M in der Lipolyse weiter nachzugehen und exogene Einflüsse zu reduzieren, wurden *in vitro* Studien angeschlossen.

Im Folgenden wurde die Expression von Perilipinen und Lipasen im Zusammenhang mit Lipolyse und Steatogenese analysiert. *ATGL* ist ein Schlüsselenzym der Lipolyse. Für das LT-lokalisierte *PNPLA3*, das Schwesterprotein mit der höchsten Homologie zu *ATGL*, wurde *in vitro* eine lipolytische Aktivität gegenüber TAG nachgewiesen (5, 7, 78). Proteine der Perilipin-Familie und im Speziellen Perilipin 1, 2 und 5 spielen eine wesentliche Rolle in der Lipolyse (124, 128, 136, 152). Um zu überprüfen, ob der *PNPLA3*-Status einen Einfluss auf die gesamte lipolytische Aktivität in Zellen hat, wurde sowohl Lipolyse als auch Steatogenese durch die Zugabe unterschiedlicher Substanzen in Zellkultur induziert. Hierbei wurden drei Zelllinien

(Huh7, HepG2 und HEK293T) verwendet, die sich durch unterschiedliche *PNPLA3*-Genotypen auszeichnen. Huh7- und HepG2-Zellen stammen von HCCs ab und tragen den *PNPLA3*-Polymorphismus (G/G). HEK293T-Zellen stammen von embryonalen Nierenzellen ab und tragen den *PNPLA3* C/C-Genotyp. Zur Detektion der Lipolyse wurde ein polyklonaler Kaninchen-Antikörper verwendet, der die phosphorylierte Form von HSL am Serin 660 erkennt. Für die Induktion der Steatogenese wurde BSA-gekoppelte Ölsäure verwendet.

4.4.1 Forskolin und IBMX induzieren die Phosphorylierung von HSL

Für die Induktion der Lipolyse wurde entweder eine Kombination aus Forskolin und IBMX oder Isoproterenol verwendet, die zu einem Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels und zur Aktivierung der PKA führen. PKA phosphoryliert und aktiviert HSL, eine weitere Schlüssellipase (162), sowie Perilipin 1 (123) und Perilipin 5 (171). Zunächst wurde mit einer Kinetik unter der Verwendung der Zeitpunkte 0, 1, 3 und 6 h die ideale Stimulationsdauer für die Induktion der Lipolyse ermittelt. Als Maß für die Aktivierung wurde die PKA-vermittelte Phosphorylierung von HSL an Serin 660 quantifiziert (162).

In Lysaten von Huh7-Zellen konnte nach der Kombinationsbehandlung mit Forskolin und IBMX, verglichen mit der alleinigen DMSO Behandlung, nach 1 und 3 h eine starke Zunahme der Phospho-HSL Doppelbande bei 69 und 71 kDa detektiert werden (Abb. 18). Nach 6 h Doppelbehandlung nahm die Phospho-HSL Bande deutlich an Intensität ab. Nach 1 bzw. 3 h Behandlung mit Isoproterenol zeigte sich ebenfalls eine Zunahme der HSL-Phosphorylierung, jedoch deutlich schwächer im Vergleich zur Forskolin/IBMX-Behandlung. Auch hier nahm die Bandenstärke nach 6 h Behandlung wieder ab. In den HepG2-Zellysaten war die Zunahme der Doppelbande von Phospho-HSL ebenfalls nach der Kombinationsbehandlung mit Forskolin und IBMX über 1 h und über 3 h am stärksten (Abb. 18). Nach 6 h Kombinationsbehandlung nahm die Bandenstärke von Phospho-HSL wieder ab. Die Behandlung mit Isoproterenol über 0, 1, 3 und 6 h zeigte in den HepG2-Zellen keinen signifikanten Unterschied der Phosphorylierung von HSL im Vergleich zur alleinigen DMSO-Behandlung. In Lysaten von HEK293T-Zellen zeigte die Bandenintensität von Phospho-HSL nach der Kombinationsbehandlung mit Forskolin und IBMX nach 1 h die stärkste Zunahme, nach 3 und 6 h Kombinationsbehandlung war die Intensität der Doppelbande wieder rückläufig (Abb. 18). Die Behandlung mit Isoproterenol über 0, 1, 3 und 6 h im Vergleich zur alleinigen DMSO-Behandlung zeigte keine Zunahme der Phosphorylierung von HSL in HEK293T-Zellen.

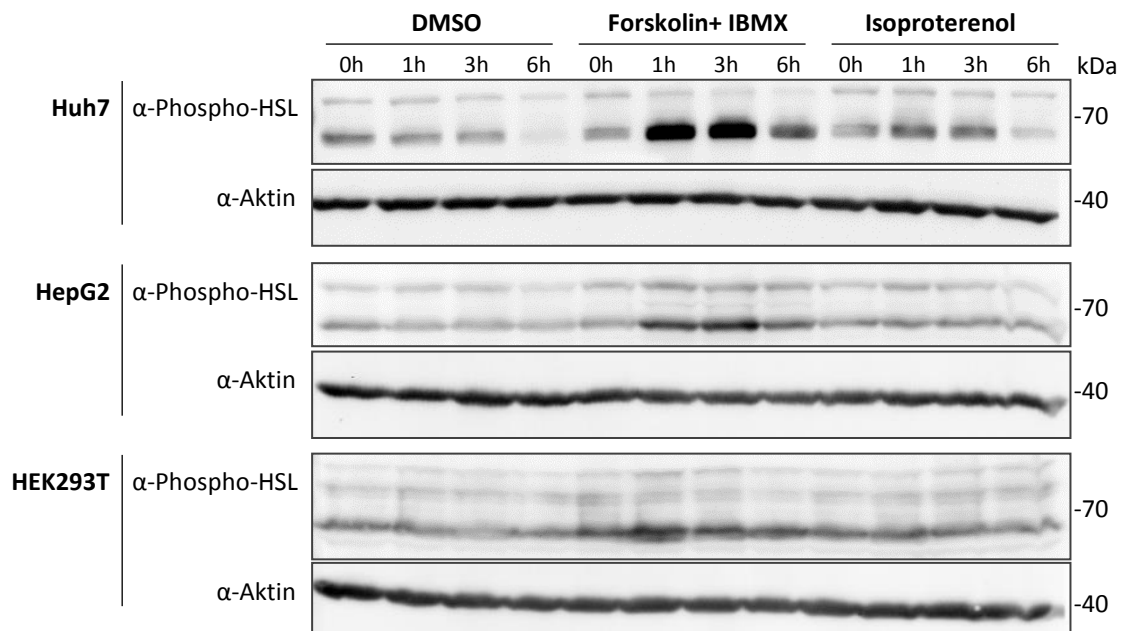


Abb. 18: **Induktion der Lipolyse durch Forskolin und IBMX bzw. Isoproterenol in Zellkultur.** Immunblot mit Antikörpern gegen Phospho-HSL Ser660 (α-Phospho-HSL, ~69 und 71 kDa). Behandlung von Huh7-, HepG2- und HEK293T-Zellen mit DMSO, Forskolin (10 μM) + IBMX (0,5 mM) bzw. mit Isoproterenol (50 μM) für 0, 1, 3 oder 6 h. Aktin diente als Ladekontrolle (~42 kDa). Das Molekulargewicht ist in kDa auf der rechten Seite angegeben.

4.4.2 Forskolin und IBMX reduzieren die Expression von Perilipin 2

Die in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien zeichnen sich durch eine unterschiedliche Anzahl und Größe von LT pro Zelle aus. Die Induktion der Lipolyse führt in diesen Zelllinien zu einem raschen Abbau von LT. Es ist davon auszugehen, dass die bei diesem Vorgang gemessenen Effekte deutlich größer ausfallen, wenn die Anzahl und Größe der LT durch eine steatogene Behandlung wie mit BSA-gekoppelter Ölsäure (179) erhöht wird.

Im vorangegangenen Assay 4.4.1 zeigte sich in den drei getesteten Zelllinien eine verstärkte Phosphorylierung von HSL nach 1 h und 3 h Behandlung mit einer Kombination aus Forskolin und IBMX. Im Folgenden wurde die Auswirkung einer Ölsäurebehandlung (120 μM) für 24 und 72 h mit anschließender Induktion der Lipolyse (5 μM Forskolin und 250 μM IBMX für 3 h) auf die Proteinexpression von Perilipin 2 getestet (Abb. 19). Perilipin 2 gilt als Marker für die Lipidakkumulation in LT (99). Die Behandlung mit BSA-gekoppelter Ölsäure führte in Huh7- und HepG2-Zellen verglichen mit mit BSA behandelten Zellen nach 24 h zu einer moderaten und nach 72 h zu einer starken Zunahme von Perilipin 2. Bei HEK293T-Zellen war nur nach 72 h Behandlung mit BSA-gekoppelter Ölsäure eine schwache Perilipin 2-Bande nachweisbar, wobei hier nach alleiniger BSA-Behandlung kein Perilipin 2 detektiert werden konnte. Die 3 h Behandlung der Zellen mit Forskolin und IBMX (+, Abb. 19) führte unter annähernd allen

getesteten Bedingungen zu einer Reduktion der Perilipin 2-Bandenintensität. Dieser Effekt war nach vorheriger steatogener Behandlung am größten.

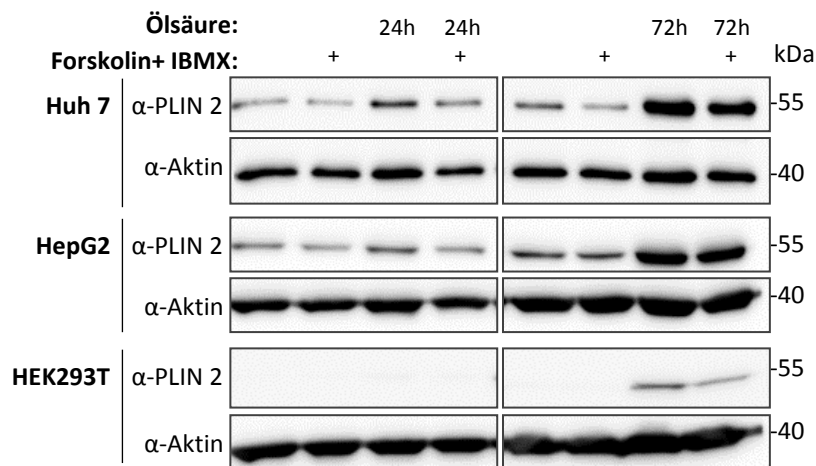


Abb. 19: **Induktion der Lipolyse nach steatogener Behandlung in Zellkultur.** Immunblot mit Antikörpern gegen Perilipin 2 (α -PLIN2, ~55 kDa) nach Behandlung von Huh7-, HepG2- und HEK293T-Zellen über 24 und 72 h mit Ölsäure (120 μ M) sowie in Kombination mit IBMX (250 μ M) und Forskolin (5 μ M) über 3 h (+). Aktin diente als Ladekontrolle (~42 kDa). Das Molekulargewicht ist in kDa auf der rechten Seite angegeben.

4.4.3 Induktion der Phosphorylierung von HSL durch eine Ölsäurebehandlung

Sowohl Lipolyse als auch Steatogenese konnten in Zellkultur wirksam induziert und detektiert werden. Im Folgenden sollte eine mögliche Auswirkung der Ölsäurebehandlung auf den Phosphorylierungsstatus von HSL untersucht werden.

Eine 72 h Behandlung mit BSA-gekoppelter Ölsäure (240 μ M) führte zu einer vergleichbaren Zunahme von Perilipin 2 wie im Vorversuch (Kapitel 4.4.2). Die Abnahme der Bandenintensität von Perilipin 2 nach Lipolyse (+) im Anschluss an die Ölsäurebehandlung fiel im Vergleich jedoch geringer aus (Abb. 20). Perilipin 2 konnte in HEK293T-Zellen ausschließlich nach 72 h Ölsäurebehandlung nachgewiesen werden. Die Detektion von Phospho-HSL zeigte eine Zunahme nach 3 h Behandlung mit IBMX (0,5 mM) und Forskolin (10 μ M) in allen Zelllinien (Abb. 20). In der Zunahme der Phosphorylierung von HSL nach Induktion der Lipolyse waren keine Unterschiede zwischen mit BSA-gekoppelter Ölsäure und BSA behandelten Zellen zu detektieren (Spur 2 und 4). Nach alleiniger 72-stündiger Ölsäurebehandlung war jedoch in allen drei Zelllinien eine diskret verstärkte Intensität der Phospho-HSL Bande (Spur 3) im Vergleich zur Kontrolle (Spur 1) ohne Behandlung erkennbar. Besonders deutlich war dieser Effekt bei den Huh 7-Zellen.

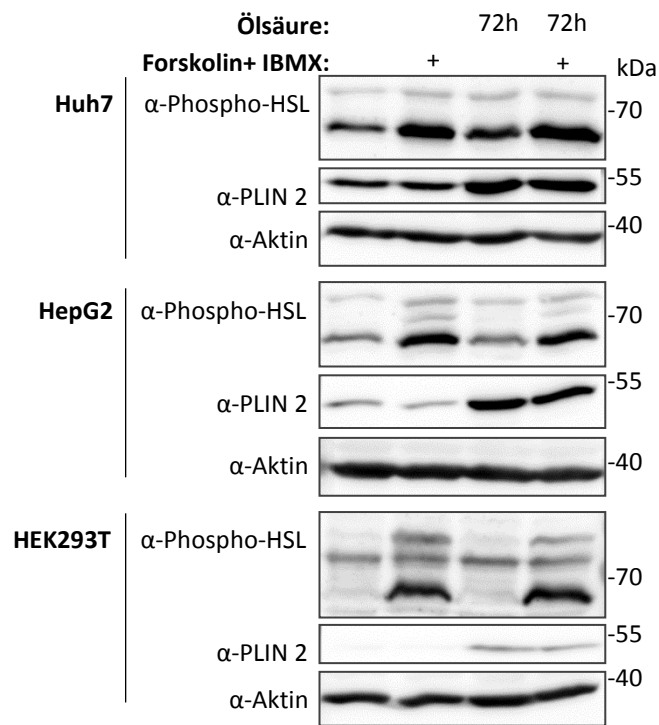


Abb. 20: **Anstieg von Phospho-HSL nach Induktion der Lipolyse und Ölsäurebehandlung in Zellkultur.** Immunblot mit Antikörpern gegen Perilipin 2 (α -PLIN2, ~55 kDa) und Phospho-HSL Ser660 (α -Phospho-HSL, ~69, 70 und 71 kDa) nach Behandlung von Huh7-, HepG2- und HEK293T-Zellen mit Ölsäure (240 μ M) über 72 h, sowie in Kombination mit IBMX (0,5 mM) und Forskolin (10 μ M) über 3 h (+). Aktin diente als Ladekontrolle (~42 kDa). Das Molekulargewicht ist in kDa auf der rechten Seite angegeben.

4.4.4 Signifikant reduzierte *PNPLA3*-Transkription durch Induktion der Lipolyse

In einem nächsten Schritt sollte nun auf mRNA-Ebene der Einfluss der steatogenen und lipolytischen Behandlung sowie der Kombinationsbehandlung auf die Expression der Perilipine und der an der Lipolyse beteiligten Lipasen untersucht werden (Abb. 21).

Die *PLIN1*-Expression sank in Huh7-Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen auf unter 40 %, sowohl durch die Behandlung mit Forskolin und IBMX (37 %), mit Ölsäure (39 %) als auch durch die Kombinationsbehandlung (35 %). In HepG2-Zellen war die mRNA-Expression von *PLIN1* nach der Behandlung mit Forskolin und IBMX sowohl mit als auch ohne vorherige Ölsäurebehandlung auf 50 % supprimiert. In HEK293T-Zellen war die mRNA-Menge von *PLIN1* nach kombinierter Behandlung mit Forskolin und IBMX und Ölsäure auf 73 % verringert, ansonsten zeigte sich kein signifikanter Effekt. In Huh7-Zellen zeigte sowohl die Induktion der Steatogenese als auch die der Lipolyse keinen Effekt auf die *PLIN2*-Menge. In HepG2-Zellen war die *PLIN2*-Menge nach alleiniger Behandlung mit Forskolin und IBMX deutlich (auf 32 %) und in Kombination mit Ölsäure moderat (auf 76 %) reduziert. Die alleinige Behandlung mit Ölsäure resultierte in HepG2-Zellen in einer deutlichen Zunahme von *PLIN2* auf 155 %. In

HEK293T-Zellen war die mRNA-Expression von *PLIN2* durch die Lipolyse-Behandlung mit und ohne Ölsäurebehandlung deutlich auf 31 % verringert. Die alleinige Ölsäurebehandlung zeigte in HEK293T-Zellen keinen Effekt. Die *PLIN3*-Expression sank nach Induktion der Lipolyse mit Forskolin und IBMX in allen drei Zelllinien (in Huh7-Zellen auf 50 %, in HepG2-Zellen auf 57 %, in Hek293T-Zellen auf 63 %). Eine deutliche Verringerung der *PLIN3*-Menge war auch nach Kombinationsbehandlung mit Forskolin und IBMX und vorheriger Ölsäurebehandlung erkennbar (in Huh7- und HepG2-Zellen auf 64 %, in Hek293T-Zellen auf 47 %). Dagegen zeigte die alleinige steatogene Behandlung keinen signifikanten Effekt. Die alleinige Lipolyse-Behandlung resultierte in einer Reduktion der *PLIN5*-mRNA-Menge in Huh7-Zellen auf 60 %. Die Behandlung mit Ölsäure führte in HepG2- und HEK293T-Zellen zu einer leichten Reduktion der *PLIN5*-Expression, wohingegen in Huh7-Zellen kein Effekt zu beobachten war.

PNPLA3 war nach der Behandlung mit Forskolin und IBMX in allen drei Zelllinien mit einem p-Wert von $5,33 \times 10^{-6}$ signifikant reduziert (in Huh7- auf 58 %, in HepG2- auf 53 % und in HEK293T-Zellen auf 51 %). Auch durch die Kombinationsbehandlung aus Ölsäure und Forskolin und IBMX war *PNPLA3* mit einem p-Wert von $2,02 \times 10^{-4}$ signifikant reduziert (in Huh7- auf 56 %, in HepG2- auf 45 % und in HEK293T-Zellen auf 53 %). Die alleinige Ölsäurebehandlung hatte auf die *PNPLA3*-Menge in den untersuchten Zelllinien keinen deutlichen Effekt. *ATGL* wurde nach Induktion der Lipolyse im Gegensatz zu *Perilipinen* und *PNPLA3* verstärkt transkribiert. In Huh7-Zellen stieg die *ATGL*-Expression nach Behandlung mit Forskolin und IBMX auf 180 % und in Kombination mit Ölsäure auf 210 %. In HEK293T-Zellen war lediglich ein leichter Anstieg der *ATGL*-Expression durch Lipolyse auf 122 % ohne und auf 119 % mit vorheriger Ölsäurebehandlung zu erkennen. Die *ATGL*-Expression in den HEK293T-Zellen stieg durch die Lipolyse ebenfalls deutlich auf 166 % ohne und auf 152 % mit vorheriger Ölsäurebehandlung. Die mRNA-Expression von *HSL* in Huh7-Zellen war sowohl durch die Behandlung mit Forskolin und IBMX (auf 55 %), durch die Ölsäurebehandlung (auf 21 %) als auch durch die Kombinationsbehandlung (auf 42 %) supprimiert. Die Behandlungen hatten auf die *HSL*-Expression in den HepG2-Zellen den gegenteiligen Effekt. Durch alleinige Ölsäurebehandlung stieg die mRNA-Menge von *HSL* auf 395 %, durch die Kombinationsbehandlung auf 260 % und durch die alleinige Behandlung mit Forskolin und IBMX auf etwa das Doppelte, hier jedoch mit hoher Standardabweichung. In den HEK293T-Zellen resultierte die Lipolyse in einer Suppression der *HSL*-Menge auf 71 % und in Kombinationsbehandlung mit Ölsäure auf 66 %. Die alleinige Ölsäurebehandlung hatte keinen signifikanten Effekt.

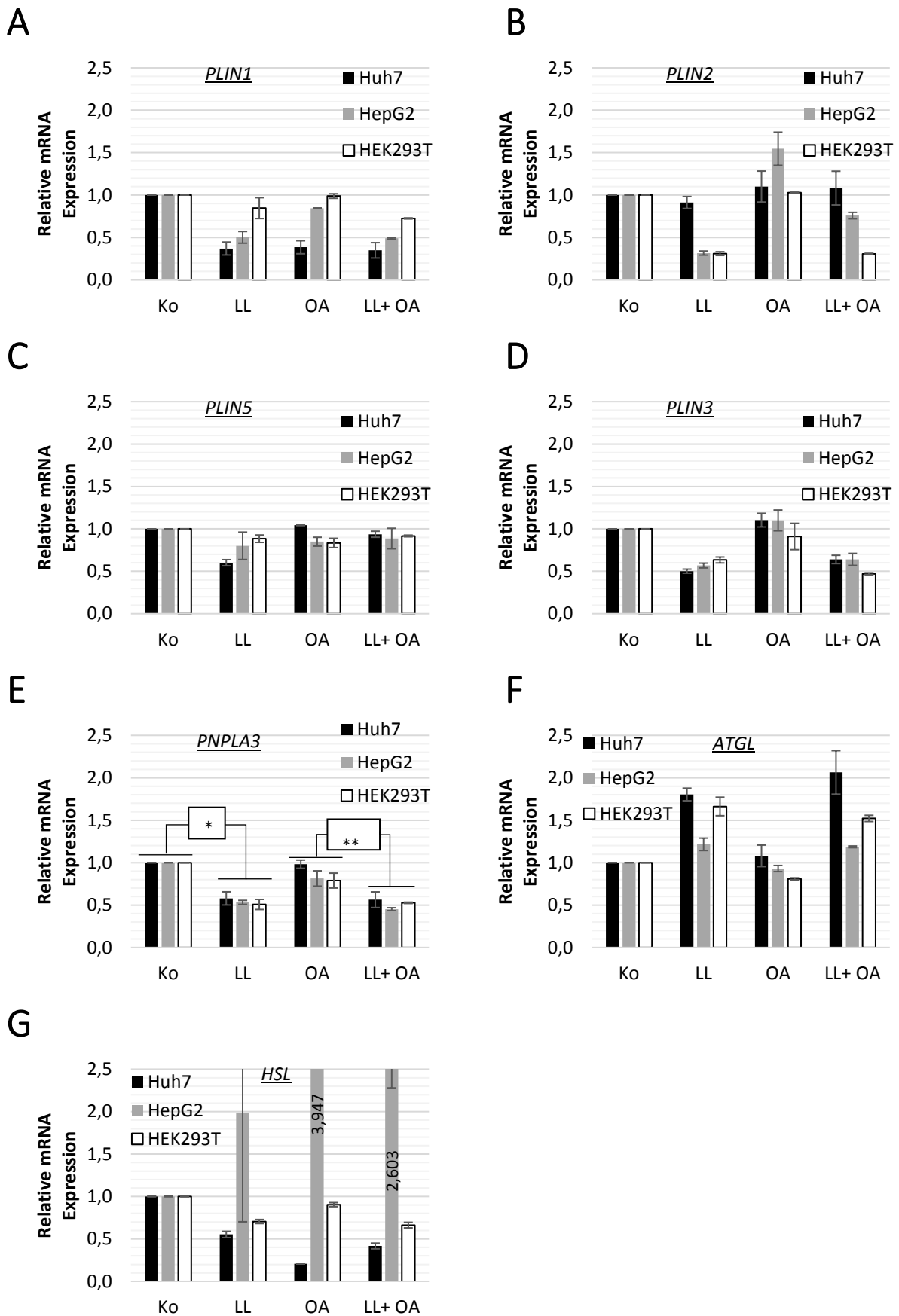


Abb. 21: mRNA-Menge von Perilipinen und Lipasen nach Ölsäure-/Lipolyse-Behandlung in Zellkultur durch semiquantitative Realtime-PCR Analyse. A-G: Relative mRNA-Expression mit Normalisierung auf den Kontrollwert unterteilt nach Art der Behandlung. Legende: Ko=Kontrolle (=1; mit Nährmedium kultivierte Zellen); OA=Ölsäurebehandlung (240 μ M über 72 h); LL=Lipolyse-Behandlung (IBMX 0,5 mM und Forskolin 10 μ M über 3 h) bzw. LL+ OA=kombinierte Behandlung. * entspricht p-Wert=5,33E-06, ** entspricht p-Wert=2,02E-04.

4.5 Generierung eines *PNPLA3* I148M-Zellkulturmodells mit CRISPR/Cas9

Die durch die Transfektion von Plasmiden verursachte Überexpression von Proteinen ist eine geeignete Methode für die Identifizierung genereller zellulärer Mechanismen, generiert aber eine artefizielle Situation. Um die Funktion von *PNPLA3* Wildtyp und *PNPLA3* I148M in einem weniger artefiziellen Modellsystem zu untersuchen, wurden CRISPR/Cas-vermittelt *PNPLA3/PNPLA3*(I148M) Knock-In Zelllinien generiert (178). In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurden bereits drei *single-guide-RNAs* (G1, G2 und G6) designt, die nah am für die Aminosäure 148 kodierenden Triplet binden und Cas9-vermittelt einen Doppelstrangbruch an dieser Stelle induzieren können. Die *guide-RNAs* binden hierbei spezifisch die gDNA an unterschiedlichen Stellen am Plus- bzw. Minus-Strang im *PNPLA3*-Lokus (Abb. 22).

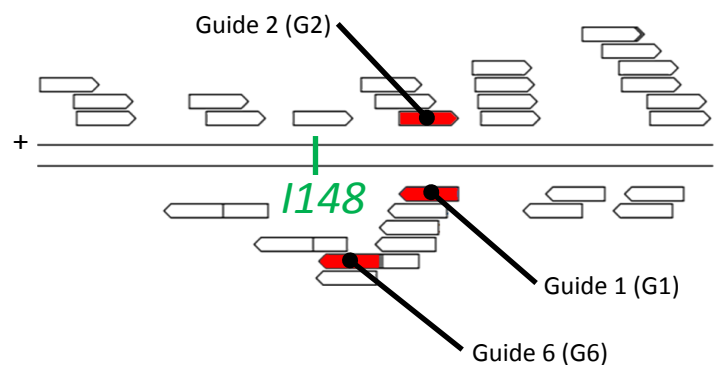


Abb. 22: **Bindestellen der *guide-RNAs*.** Schematische Darstellung des *PNPLA3*-Lokus. I148 steht für das Basentriplett, das für die Aminosäure Isoleucin an der Stelle 148 kodiert. Die roten Pfeile entsprechen den Bindestellen der *guide-RNAs* am Plus- bzw. Minusstrang. Die Pfeilspitze kennzeichnet die Orientierung der jeweiligen *guide-RNA*.

Die entsprechenden *guide-RNAs* lagen inseriert in Plasmiden (Px459 ver.2.0) vor. Auf diesen Plasmiden ist neben der jeweiligen *guide-RNA* (G1, G2 oder G6) u. a. die Endonuklease Cas9 sowie ein Puromycin-Resistenzgen kodiert. Neben den Plasmiden wurden zwei 120 bp lange DNA-Reparaturmatrizen, die entweder für das *PNPLA3*-Wildtypgen oder den *PNPLA3*-Polymorphismus I148M kodieren, synthetisiert. Für den Screening-Prozess wurde eine *HindIII*-Schnittstelle inseriert, über die nach erfolgreicher Insertion der Reparaturmatrize in das Genom die entsprechenden Klone identifiziert werden können. Über diese DNA-Reparaturmatrize wird durch den endogenen Reparaturmechanismus der homologen Rekombination die modifizierte Gensequenz in das Genom der Zelle inseriert.

Zur Überprüfung der Effizienz der unterschiedlichen *guide-RNAs* wurde nach der Transfektion der Zellen mit den entsprechenden Plasmiden und anschließender Puromycin-Selektion die

gDNA der Zellen isoliert, der Lokus rund um die Insertionsstelle der Reparaturmatrize mittels PCR amplifiziert und die PCR-Produkte sequenziert. Die Chromatogramme der Sequenzierungen zeigten für die unterschiedlichen *guide-RNAs* einen Abfall der Signalstärke und Überlagerung von Signalen beginnend rund um die Schnittstelle der jeweiligen *guide-RNA* (Abb. 23). Die Überlagerung war für die *guide-RNA* G2 am stärksten. Die Sequenzierung der mit Leervektor transfizierten Zellen (Px459) zeigte keine Überlagerung und keinen Intensitätsabfall.

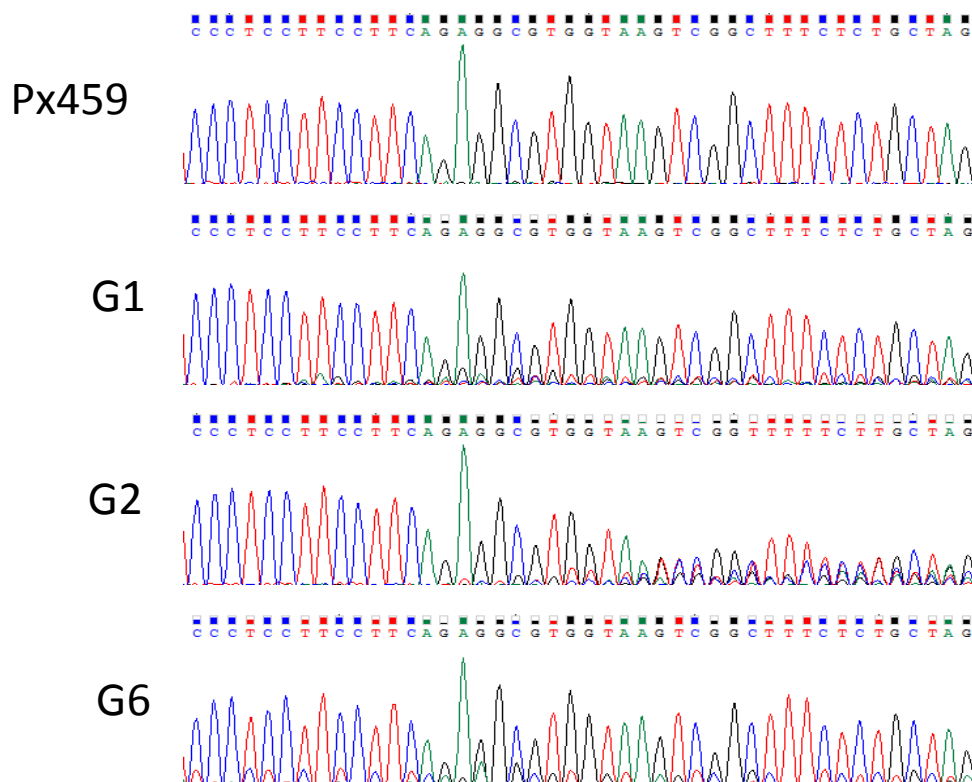


Abb. 23: **Validierung der *guide-RNAs*.** Chromatogramme der Sanger-Sequenzierung nach Transfektion der HEK293T-Zellen mit Leervektor (Px459) sowie der die unterschiedlichen *guide-RNAs* beinhaltenden Vektoren PX459-G1, G2, G6.

Nach der Validierung der drei *guide-RNAs* wurden die entsprechenden Plasmide zusammen mit den Reparaturmatrizen transfiziert und wie oben beschrieben der *PNPLA3*-Lokus analysiert. Neben der beschriebenen Modifikation des Isoleuzin 148 Triplets und der *HindIII*-Schnittstelle wurden in den *guide*-Bindestellen der Reparaturmatrize stille Mutationen inseriert, die nach erfolgreicher Insertion der Matrize ein erneutes Schneiden verhindern. Die Sequenzierung nach Transfektion mit Plasmid und Reparaturmatrize zeigte im Chromatogramm eine Überlagerung an Stellen der inserierten, stillen Mutationen (Abb. 24).

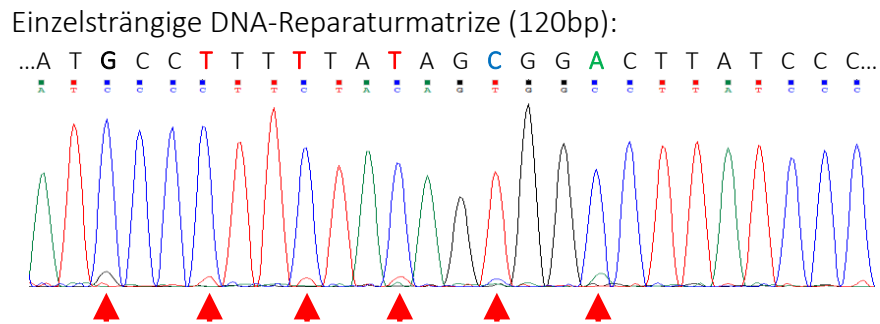


Abb. 24: **Überprüfung der Insertion der Reparaturmatrize.** Chromatogramm der Sanger-Sequenzierung nach Transfektion der HEK293T-Zellen mit den Plasmiden zusammen mit den Reparaturmatrizen. Überlagerung an Stellen der inserierten, stillen Mutationen zur Verhinderung eines erneuten Schneidens.

Zur Generation von Einzelzellklonen wurden Zellen zunächst transfiziert und mit Puromycin selektiert. Transfizierte Huh7-, HepG2- und HEK293T-Zellen konnten erfolgreich selektiert werden. Die Herstellung von Einzelzellklonen gelang für Huh7- und HepG2-Zellen jedoch nicht. Das Erzeugen von HEK293T-Einzelzellklonen gelang hingegen erfolgreich. Mithilfe der in der DNA-Reparaturmatrize enthaltenen Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease *HindIII* wurden die Einzelzellklone anschließend gescreent. Die gDNA der Einzelzellklone wurde isoliert und mit PCR der *PNPLA3*-Lokus amplifiziert. Ein Restriktions-Verdau der PCR-Produkte mit *HindIII* führte im Fall einer erfolgreichen Insertion der Reparaturmatrize zu geschnittener gDNA von zwei Abschnitten mit einer Länge von 671 und 53 bp (Abb. 25). Im negativen Fall bzw. nach Transfektion des Leervektors PX459 konnte *HindIII* nicht schneiden, da keine Schnittstelle vorhanden war. Nach Auftrennung des PCR-Produktes lag dann eine einzelne Bande mit einer Länge von 724 bp vor (Abb. 25).

Es wurden ca. 100 Einzelzellklone mittels Restriktionsverdau gescreent und positive Klone im Anschluss sequenziert. Nach der Sequenzierung wählten wir drei Zellklone aus, die jeweils auf einem Allel die Punktmutation aufwiesen: ein Klon mit heterozygotem Genotyp der *guide-RNA* G1 (G1#7 C/G), ein Klon der *guide-RNA* G1 mit Punktmutation des einen und Deletion des zweiten Allels (G1#12 G/-(Δ 1)) und ein Klon der *guide-RNA* G6 ebenfalls mit Punktmutation des einen und Deletion des zweiten Allels (G6#30 G/-(Δ 13)). Keiner der Einzelzellklone wies den homozygoten *PNPLA3*-Polymorphismus G/G auf. Zusätzlich wurden drei Klone mit dem Leervektor PX459 (*PNPLA3* C/C) als Kontrolle ausgewählt.

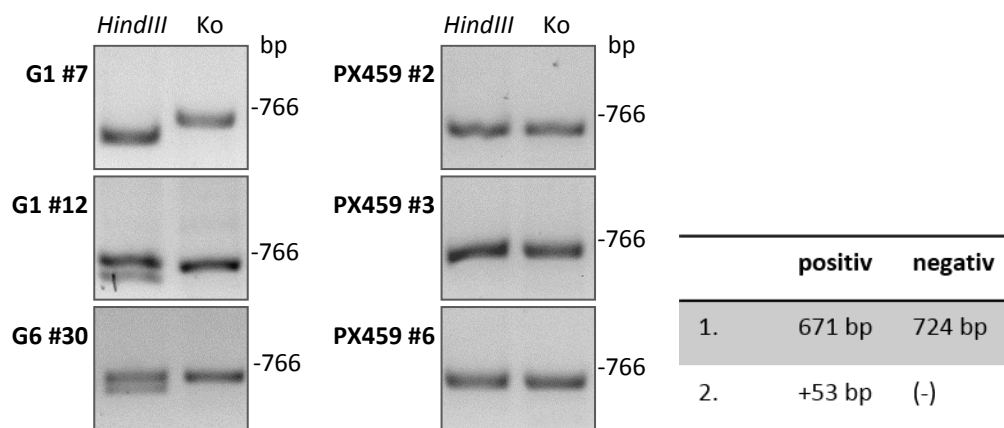


Abb. 25: **Screening der HEK293T-Einzelzellklone.** Gelelektrophorese (1 %iges Agarosegel) der HEK293T-Einzelzellklone nach PCR-Amplifikation des *PNPLA3*-Lokus mit anschließendem *HindIII*-Verdau. Das Screening war positiv bei Vorliegen von Banden unterschiedlicher Länge (671 und 53 bp) und negativ bei Vorliegen einer Bande der Länge von 724 bp, entsprechend dem Leervektor PX459. Von den positiven Banden wurde eine Gel-Extraktion durchgeführt und das Eluat anschließend sequenziert. Abk.: Ko=Kontrolle, bp=Basenpaare.

4.5.1 Expressionsanalyse der genomeditierten HEK293T-Zellen

Bei den generierten Einzelzellklonen wurde nun der Einfluss der unterschiedlichen *PNPLA3*-Genotypen auf die Expression von *PNPLA3*, *Perilipin 2* und *ATGL* untersucht. Immunblot-Analysen zeigten für *PNPLA3* unabhängig vom untersuchten Genotyp eine Doppelbande bei 53 und 55 kDa (Abb. 26). Die stärkste *PNPLA3*-Expression war bei den Klonen PX459#6 (C/C), G1#7 (C/G) und G1#12 (G/-(Δ 1)) erkennbar. Am geringsten war im Immunblot die *PNPLA3*-Menge bei G6#30 (G/-(Δ 13)) und PX459#2 (C/C) ausgeprägt. *ATGL* und *Perilipin 2* zeigten keine signifikante Expressions-Änderung in Bezug auf die unterschiedlichen *PNPLA3*-Genotypen. Am geringsten war die *ATGL*-Proteinexpression des Klons G1#12 und unter Berücksichtigung von Aktin tendentiell am stärksten bei G6#30. *Perilipin 2* wurde von allen Klonen gering exprimiert.

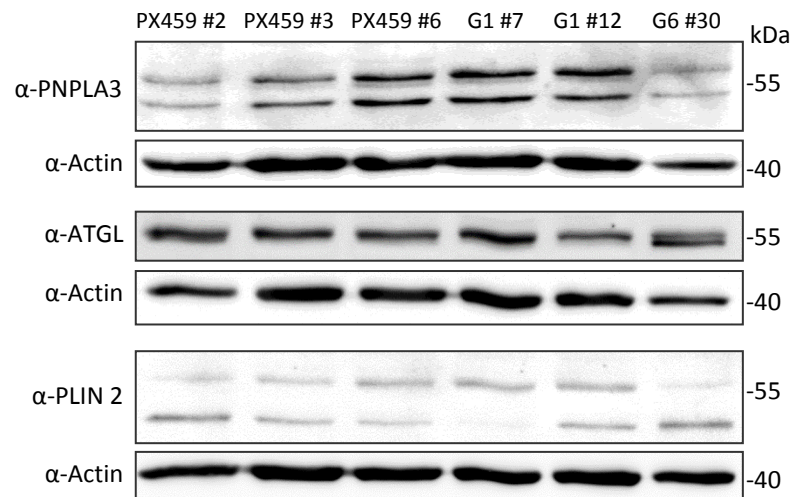


Abb. 26: Expressionsanalyse von PNPLA3, Perilipin 2 und ATGL nach Genomeditierung mittels CRISPR/Cas9 in HEK293T-Zellen in Abhängigkeit vom *PNPLA3*-Status. Immunblotanalyse von sechs Proben: PX459 #2, #3 und #6 mit *PNPLA3*-Genotyp C/C, G1#7 mit *PNPLA3*-Genotyp C/G, G1#12 mit *PNPLA3*-Genotyp G/-(Δ 1) und G6#30 mit *PNPLA3*-Genotyp G/-(Δ 13). Es wurden jeweils 30 μ g Protein aufgetragen. Die Detektion erfolgte mit Antikörpern gegen PNPLA3 (α -PNPLA3, ~53 und 55 kDa), ATGL (α -ATGL, ~56 kDa) und Perilipin 2 (α -PLIN2, ~53 und 55 kDa). Aktin diente als Ladekontrolle (~42 kDa). Molekulargewichtsmarker sind auf der rechten Seite angegeben.

4.5.2 Hemmung der Lipolyse durch den *PNPLA3* I148M-Polymorphismus

Im Folgenden wurden die Auswirkungen der unterschiedlichen *PNPLA3*-Modifikationen der Einzelzellklone auf die lipolytische Kapazität der Klone analysiert. Zur Kontrolle der Induktion der Lipolyse wurde ein Immunblot gegen Phospho-HSL und Perilipin 2 durchgeführt (Abb. 27). Phospho-HSL zeigte eine signifikante Zunahme der Bandenintensität nach 1 h Behandlung mit Forskolin und IBMX bei allen Klonen. In den zur Kontrolle mit DMSO-behandelten Zellen war keine Bande nachweisbar. Perilipin 2 zeigte unter Berücksichtigung von Aktin keine signifikanten Unterschiede in stimulierten Zellen und Kontrollzellen. Die Perilipin 2-Proteinexpression war im Kontroll-Klon PX459#6 insgesamt am schwächsten.

Zur Quantifizierung der lipolytischen Aktivität wurde die Auswirkung eines Lipolyse-Stimulus nach steatogener Behandlung mit Ölsäure auf die LT-Größe mittels Immunfluoreszenzfärbung beurteilt (Abb. 28). Der Kontroll-Klon PX459#3 (*PNPLA3* C/C) zeigte nach Induktion der Lipolyse im Vergleich zu DMSO-behandelten Zellen einen fast vollständigen Verlust von LT. Auch bei Zellen des Klons G1#7 (*PNPLA3* C/G) war eine deutliche Verringerung der LT-Größe zu beobachten. Bei den Klonen G1#12 (*PNPLA3* G/-(Δ 1)) und G6#30 (*PNPLA3* G/-(Δ 13)) war die Verringerung der LT-Größe schwächer ausgeprägt.

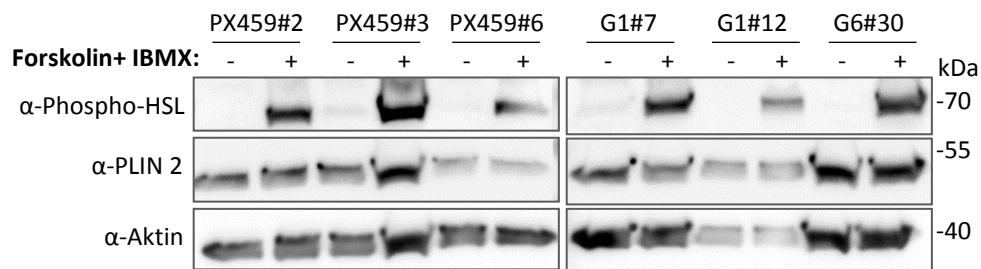


Abb. 27: **Expressionsanalyse von Phospho-HSL und Perilipin 2 nach Lipolyse-Induktion in genomeditierten HEK293T-Zellen.** Immunblotanalyse von 6 Proben, PX459 #2, #3 und #6 mit *PNPLA3*-Genotyp C/C, G1#7 mit *PNPLA3*-Genotyp C/G, G1#12 mit *PNPLA3*-Genotyp G/-(Δ 1) und G6#30 mit *PNPLA3*-Genotyp G/-(Δ 13). Antikörper gegen Phospho-HSL Ser660 (α -Phospho-HSL, ~70 kDa) und Perilipin 2 (α -PLIN2, ~53 kDa). Zelldichte jeweils 5×10^5 Zellen pro Vertiefung auf einer 24 Well-Patte. Ölsäurebehandlung (240 μ M) aller Zellen je 24 h und 48 h nach Aussaat. 72 h nach Aussaat Behandlung der Hälfte der Zellen mit 10 μ M Forskolin und 0,5 mM IBMX für 1 h. Aktin diente als Ladekontrolle (~42 kDa). Molekulargewichtsmarker sind auf der rechten Seite angegeben.

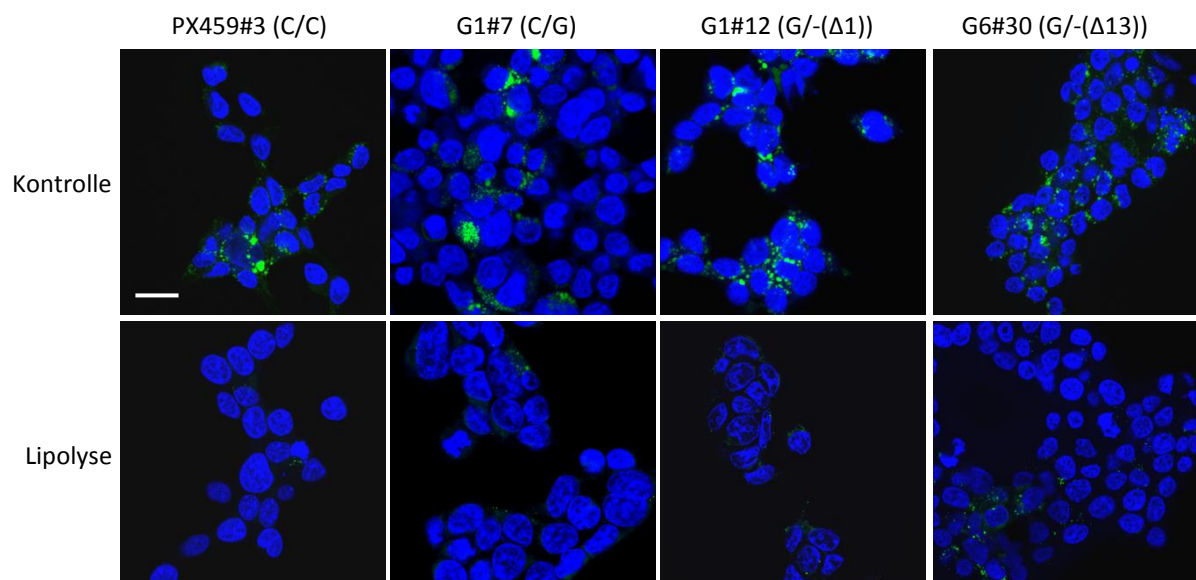


Abb. 28: **LT-Größe nach Lipolyse-Induktion in genomeditierten HEK293T-Zellen.** Konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie von LT. Erste Zeile: Kontrollzellen nach Ölsäurebehandlung. Zweite Zeile: Zellen nach Lipolyse-Induktion. Ölsäurebehandlung (240 μ M) aller Zellen je 24 h und 48 h nach Aussaat. 72 h nach Aussaat Behandlung der Hälfte der Zellen (zweite Reihe) mit 10 μ M Forskolin und 0,5 mM IBMX für 1 h (LT=grün, Bodipy; Zellkerne=blau, DAPI). Messbalken: 10 μ m. Zelldichte jeweils 5×10^5 Zellen pro Vertiefung auf einer 24 Well-Patte.

Die Quantifizierung der LT-Größe ergab, dass sich die LT-Fläche des Kontroll-Klons PX459#3 durch Lipolyse am stärksten verringerte, insgesamt auf 2 % der Vergleichs-LT-Fläche (Abb. 29). Zudem waren Unterschiede zwischen heterozygoten Zellen und den Zellen mit Deletion auszumachen. Der Klon G1#7 mit heterozygotem *PNPLA3*-Genotyp zeigte durch die Induktion der Lipolyse eine Verringerung der LT-Fläche auf 39 % im Vergleich zur Kontrolle. Die Verringerung der LT-Fläche war bei den beiden Klonen G1#12 und G6#30 je mit Punktmutation und Deletion eines Allels am geringsten ausgeprägt. Die LT-Größe verringerte

sich bei diesen beiden Klonen lediglich auf 65 % bzw. auf 55 % verglichen mit den Kontrollzellen ohne Lipolyse-Behandlung.

Klon	Genotyp	LT-Fläche Kontrolle	LT-Fläche Lipolyse
PX459#3	C/C	100%	2%
G1#7	C/G	100%	39%
G1#12	G/-(Δ 1)	100%	65%
G6#30	G/-(Δ 13)	100%	55%

Abb. 29: **Quantifizierung der LT-Größe nach Lipolyse-Induktion in genomeditierten HEK293T-Zellen.** Die Fläche von LT (μm^2) wurde anhand der Immunfluoreszenzmikroskopie von Abb. 28 ermittelt. Die Normalisierung wurde auf die jeweiligen Kontrollzellen ohne Lipolyse-Behandlung durchgeführt. Lipolyse-Behandlung mit 10 μM Forskolin und 0,5 mM IBMX für 1 h. Nach Konvertierung eines Bildausschnittes (Abb. 28) nach Image J wurde die Fläche der LT der transfizierten Zellen summiert.

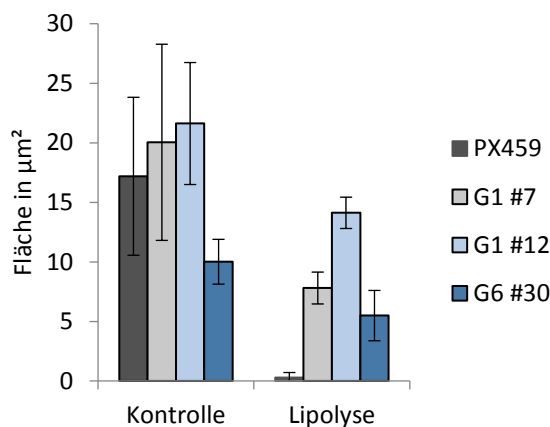


Abb. 30 **Säulendiagramm der LT-Größe nach Lipolyse-Induktion in genomeditierten HEK293T-Zellen.** Es ist der jeweilige Mittelwert der LT-Fläche mit Standardabweichung dargestellt.

4.6 Lipidtropfen-Akkumulation in humaner Leberfrischgewebekultur nach Ölsäurebehandlung

In vitro Studien mit Zellkulturen bieten die Möglichkeit, Analysen unter standardisierten Bedingungen durchzuführen. Des Weiteren sind genetische Manipulationen leicht zu etablieren. Die Zellkulturen weisen jedoch etliche Limitationen auf. So spiegeln sie beispielsweise nicht die Komplexität eines Gewebes oder Organs wider, das aus verschiedenen miteinander interagierenden Zelltypen besteht. Gerade die Interaktion von Epithelien mit Gefäßen, Stromazellen und Entzündungszellen untereinander beeinflusst

maßgeblich zelluläre Ereignisse. Um die komplexen Bedingungen *in vivo* besser abzubilden, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit humanes Lebergewebe unfixiert direkt nach der Operation kultiviert und untersucht. Ziel war es, zunächst die optimalen Bedingungen zu etablieren. Wir entwickelten ein Kurzzeitsteatose-Modell über 72 h. Langfristig können mithilfe dieses Modells beispielsweise mögliche Interaktionen von PNPLA3 mit Perilipinen, sowie Expressionsanalysen von PNPLA3 in Bezug auf steatogenen und lipolytische Stimuli untersucht werden. Parallel wurde der *PNPLA3*-Status des Lebergewebes ermittelt (Genotyp C/C) und das Gewebe charakterisiert (Normalleber mit geringem Fettanteil). Nach drei Tagen Kultivierung war anhand der HE-Färbung das Gewebe vital (Abb. 31). Die Behandlung mit Ölsäure über 72 h führte bereits zu einer Zunahme der LT.

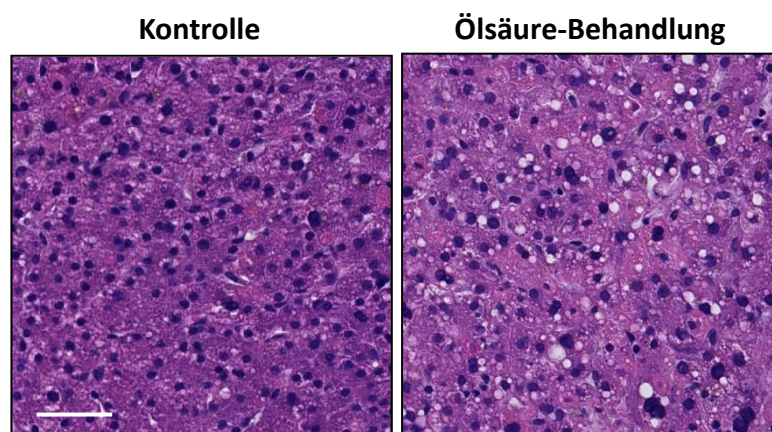


Abb. 31: LT-Anteil nach Ölsäurebehandlung in humaner Leberfrischgewebekultur. HE-Färbung der Kontrolle und nach Ölsäurebehandlung. 300 μm dicke Gewebsschnitte wurden in Nährmedium über 72 h kultiviert. Neben der Kontrolle ohne Behandlung wurde bei einem Teil der Gewebeschnitte das Nährmedium über den Behandlungszeitraum mit Ölsäure (240 μM) angereichert. Messbalken: 60 μm .

Ein weiterer Gewebeschnitt wurde nach 72 h Kultivierung zur Induktion der Lipolyse mit der Kombination aus 10 μM Forskolin und 0,5 mM IBMX über 3 h behandelt. Auf Proteinebene war als Reaktion auf diese Behandlung eine Zunahme der Phosphorylierung von HSL festzustellen (Abb. 32). Die bei 70 kDa nachgewiesene Phospho-HSL-Bande zeigt eine deutliche Zunahme.

Auf mRNA-Ebene zeigten sich Veränderungen der Transkriptionsmenge der *Perilipine*, von *ATGL*, *HSL* und von *PNPLA3* während der Lipolyse (Abb. 33). Die mRNA-Transkription von *PNPLA3*, *ATGL* und *PLIN1* wurde während der Lipolyse induziert, die von *PLIN2*, *3*, *5* und *HSL* reprimiert.

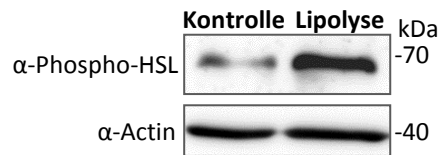


Abb. 32: **Zunahme der Phosphorylierung von HSL nach Induktion der Lipolyse in humaner Leberfrischgewebekultur.** Immunblotanalyse von Lebergewebe (*PNPLA3*-Genotyp C/C) nach 72 h Kultivierung. Im Anschluss Lipolyse-Induktion mit 10 μ M Forskolin und 0,5 mM IBMX über 3 h. Es wurden jeweils 30 μ g Protein aufgetragen. Zur Detektion von Phospho-HSL wurde ein Antikörper gegen die Phosphorylierung am Ser660 (α -Phospho-HSL, ~70 kDa) verwendet. Aktin diente als Ladekontrolle (~42 kDa). Molekulargewichtsmarker sind auf der rechten Seite angegeben.

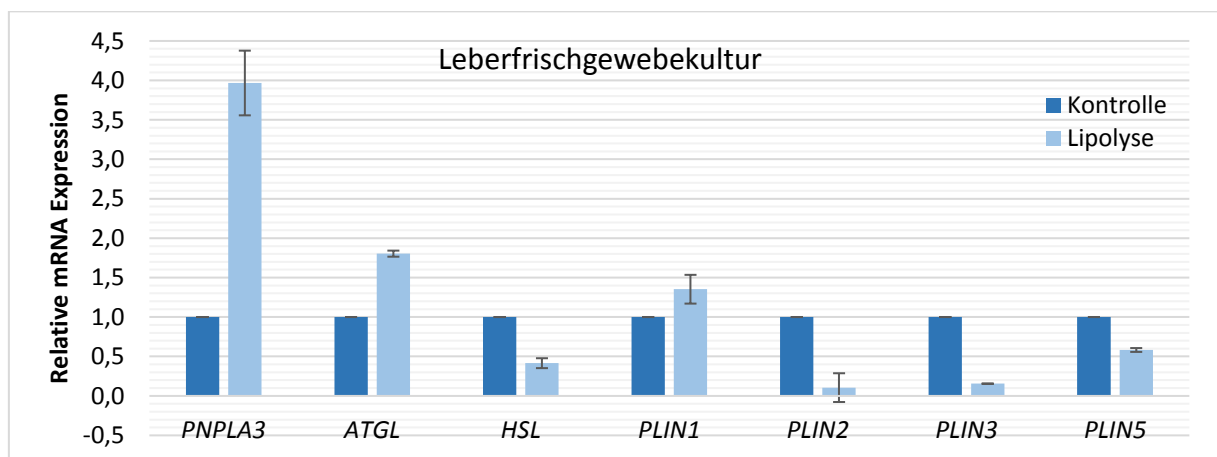


Abb. 33: **Expressionsanalyse von Genen der Perilipin-Familie und Lipasen in humaner Leberfrischgewebekultur** durch semiquantitative Realtime-PCR Analyse mit Darstellung der relativen mRNA-Expression. 300 μ m dicke Gewebsschnitte wurden in Nährmedium über 72 h kultiviert. Neben der Kontrolle ohne Behandlung wurde bei einem Teil der Gewebsschnitte über 3 h mit 10 μ M Forskolin und 0,5 mM IBMX die Lipolyse induziert. Die Mittelwerte mit zugehöriger Standardabweichung sind dargestellt. Relative mRNA-Expression mit Normalisierung auf den jeweiligen Wert der Kontrolle ohne Behandlung (=1).

5 Diskussion

Die NAFLD ist aufgrund der Assoziation mit kardiovaskulären Erkrankungen, Tumorerkrankungen und aufgrund einer möglichen Progredienz der Lebererkrankung an sich (1) von zunehmender klinischer Relevanz und stark im Fokus aktueller Forschung (12). Ziel der vorliegenden Arbeit war, aufbauend auf den Vorarbeiten der Arbeitsgruppe von Straub und Koautoren, die Erforschung der einer Progression einer NAFLD zur NASH zugrunde liegenden Pathomechanismen in Abhängigkeit vom *PNPLA3*-Polymorphismus I148M. Langfristig ist auch die Entwicklung von Therapieansätzen bei genauerer Kenntnis der Funktion von *PNPLA3* und des hepatozytären Lipolyse-Mechanismus denkbar. Sowohl die enzymatische als auch molekulare Funktion von *PNPLA3* als auch der Mechanismus, durch den der *PNPLA3*-

Polymorphismus I148M die Entstehung einer NAFLD begünstigt (3, 25, 26), ist bisher weitgehend unerforscht. Um den zugrunde liegenden Pathomechanismus aufzuklären, wurde die Interaktion von PNPLA3 mit LT-assoziierten Proteinen der Perilipin-Familie untersucht, sowie ein möglicher Einfluss von PNPLA3 auf ATGL analysiert. Die Lipolyse und die für diesen Prozess relevanten Faktoren unterscheiden sich stark je nach Gewebe. Zum besseren Verständnis der Lipolyse in Lebergewebe untersuchten wir die Rolle von PNPLA3 und den Einfluss des *PNPLA3*-Polymorphismus I148M auf die Lipolyse u. a. in den HCC-Zellen der Linien HepG2 und Huh7 als auch in humanem Lebergewebe.

5.1 Perilipine und PNPLA3 bei primärer Lebererkrankung

Die NAFLD ist bei steigender Prävalenz (13) die häufigste Lebererkrankung in den westlichen Industrienationen (11). Eine Assoziation des *PNPLA3*-Polymorphismus I148M mit hepatischer Steatose und Entzündung wurde 2008 erstmalig in einer Population hispanischer, afroamerikanischer und europäisch-amerikanischer Individuen beschrieben (3) und im Verlauf von weiteren Studien bestätigt (62, 68, 180-182). Ein Teil der vorliegenden Arbeit umfasste die Analyse humanen Lebergewebes von PatientInnen mit NAFLD/NASH (als Leberbiopsien) sowie von Resektaten bei Tumoroperationen (als Leberresektate). Das Auftreten des *PNPLA3*-Polymorphismus I148M korrelierte in dem von uns untersuchten Kollektiv positiv mit dem Auftreten eines HCCs. Bei PatientInnen mit HCC wiesen über 71 % entweder den *PNPLA3* C/G- oder den G/G-Genotypen auf und bei Kontroll-PatientInnen mit hepatisch metastasiertem Kolonkarzinom wiesen lediglich 40 % den *PNPLA3* C/G- oder G/G-Genotypen auf. Unsere Daten deckten sich mit Studienergebnissen, die den *PNPLA3*-Polymorphismus I148M als stärksten genetischen Risikofaktor für die Entstehung einer NAFLD (3, 62, 67-71) und als unabhängigen Risikofaktor für die Entstehung von HCCs (62) beschreiben. Der *PNPLA3*-Polymorphismus I148M ist nicht der einzige bekannte genetische Risikofaktor. So konnte u. a. eine Assoziation von Mutationen der Gene *TM6SF2*, *GCKR*, *MBOAT7* und *HSD17B13* mit der Entstehung und Progression einer NASH sowie der Entstehung von HCCs nachgewiesen werden (183). Insgesamt war die Prävalenz des *PNPLA3*-Polymorphismus I148M auf mindestens einem Allel in dem von uns untersuchten Kollektiv mit 55 % überrepräsentiert verglichen mit dem europäischen Durchschnitt von 23 % (87). Ursache hierfür könnte die Probenauswahl sein, da Leberbiopsien ohne das Vorliegen einer primären oder sekundären Lebererkrankung nicht durchgeführt werden.

Wir untersuchten das humane Lebergewebe zudem hinsichtlich histopathologischer Merkmale wie Steatose- und Entzündungsgrad sowie der Lokalisation von Perilipin 3, Perilipin 4, Perilipin 5 und PNPLA3 in Abhängigkeit vom *PNPLA3*-Genotyp. Der *PNPLA3*-Polymorphismus I148M korreliert bei einer NAFLD positiv mit dem Steatose-, Entzündungs- und Fibrosegrad (62, 68, 180-182). Anhand histopathologischer Analysen unseres Kollektivs konnten wir zeigen, dass Lebergewebe homozygoter Träger des *PNPLA3*-Polymorphismus I148M verglichen mit homozygoten Trägern des Wildtyp-Allels *PNPLA3* I148 eine signifikant stärkere Verfettung und Entzündung aufwiesen, wobei beide Werte anhand des *NAS-Scores* graduiert wurden. Der *NAS-Score* dient der Differenzierung zwischen NAFLD und einer NASH, d. h. je höher der *Score*, desto eher sind die Kriterien für das Vorliegen einer NASH erfüllt (42). Es zeigte sich ein signifikant höherer *NAS-Score* bei dem von uns untersuchten Gewebe mit *PNPLA3*-Genotyp G/G im Vergleich zum *PNPLA3*-Genotyp C/C ($p=0,02$). Das Gewebe mit dem *PNPLA3*-Genotyp G/G war außerdem anhand des *NAS-Scores* im Gegensatz zu den Genotypen C/C und C/G im Durchschnitt einer manifesten NASH zuzuordnen (42). Verstärkte Steatose und Entzündung in Lebergewebe begünstigen die Progression einer NAFLD (33, 34). Daraus resultiert, dass *PNPLA3* I148M das Risiko für eine Progression der NAFLD bei Trägern des *PNPLA3* I148M-Polymorphismus aufgrund der signifikanten Assoziation mit Steatose und Entzündung erhöht. Ein zugrunde liegender Pathomechanismus für die Assoziation von *PNPLA3* I148M mit Entzündung ist möglicherweise die signifikant höhere Expression und Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, wie dem CC-Chemokin-Ligand 5 (CCL5) und dem Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF), wie *in vitro* in humanen HSCs bei Vorhandensein des *PNPLA3*-Polymorphismus I148M gezeigt werden konnte (184). Der Knock-Down von *PNPLA3* I148M *in vitro* in der HSC-Zelllinie LX-2 führte wiederum zu einer signifikanten Reduktion von CCL5 (184). Die Zytokine CCL5 und GM-CSF begünstigen die Migration von Immunzellen (184) und somit die Entzündungsreaktion.

Der *PNPLA3*-Polymorphismus I148M ist nicht nur mit hepatischer Steatose und Entzündung, sondern auch mit dem Fibrosegrad assoziiert (6). Der Fibrosegrad lag bei Vorliegen des *PNPLA3*-Polymorphismus I148M (*PNPLA3* C/G und G/G) bei dem von uns analysierten HCC-Kollektiv deutlich höher (Mittelwert: 1,7) als bei *PNPLA3* C/C (Mittelwert: 0,5). Ursächlich für die Assoziation des *PNPLA3*-Polymorphismus I148M mit einer Fibrose ist möglicherweise, dass *PNPLA3* neben Hepatozyten auch von HSCs exprimiert wird (77). Die Progression einer Steatohepatitis geht unter der Beteiligung von HSCs mit einer zunehmenden Fibrosierung des Leberparenchyms einher (21, 108). HSCs können sich auf bestimmte Reize hin zu

myofibroblastären Zellen umwandeln, Kollagen Typ III synthetisieren und sind damit an der Entstehung der perisinusoidalen Leberfibrose beteiligt (21). PNPLA3 wird *in vitro* bereits während der frühen Aktivierungsphase von humanen HSCs auf mRNA- und Proteinebene exprimiert und die PNPLA3-Expression bleibt während der vollständigen Aktivierung der HSCs hoch (184). *In vitro* Studien in Zellkultur konnten zeigen, dass in der HSC-Zelllinie LX-2 die Anwesenheit des PNPLA3-Polymorphismus I148M im Vergleich zu Zellen ohne Polymorphismus profibrogen wirkt (86). Begründet wird dieser Phänotyp durch die Induktion der Expression von Proteinen, die in Zusammenhang mit Fibrogenese stehen. So waren die *Matrix metalloproteinase 2* und die *Tissue inhibitor of metalloproteinase 1* und *2* um das fünffache bzw. um mehr als das doppelte erhöht (86).

Die Leberzirrhose stellt einen bedeutenden Risikofaktor für die Entstehung eines HCCs dar (55). In Bezug auf den PNPLA3-Polymorphismus I148M lässt sich sagen, dass dieser eine besonders häufig im HCC detektierte Mutation ist (62). Möglicherweise ist dieser Zusammenhang durch die Assoziation von PNPLA3 I148M mit Leberzirrhose, sowie von Leberzirrhose mit HCCs bedingt. Von Straub und Koautoren wurde zudem gezeigt, dass Perilipine in Neoplasien unterschiedlich stark exprimiert werden. Die Perilipin 2-Expression korrelierte positiv und die Perilipin 1-Expression negativ mit der Proliferationsrate eines HCCs (116). Die Menge von Perilipin 2- und 3-positiven LT ist in bestimmten Karzinomen (z. B. im Nierenzellkarzinom, kolorektalem Adenokarzinom und Plattenepithelkarzinom der Lunge) erhöht (116). Unsere Immunblotanalysen zeigten, dass im HCC grundsätzlich sowohl Perilipin 1-3 als auch Perilipin 5 exprimiert sind. Wir stellten eine starke Deregulation der Perilipin-Expression zwischen HCC- und dem zugehörigen nicht-neoplastischen Lebergewebe fest, sowohl auf Transkript- als auch auf mRNA-Ebene. Die mRNA-Menge von *PLIN2* und *PLIN3* war im HCC im Vergleich zum zugehörigen nicht-neoplastischen Lebergewebe in unserem Kollektiv hochreguliert. Diese Hochregulation deckt sich mit Studien, die eine verstärkte Expression von Perilipin 2, 3 und 5 auf Proteinebene im Rahmen der Karzinogenese zeigten (117). Zahlreiche Karzinome zeigen analog zur Perilipin-Expression eine verstärkte LT-Akkumulation als mögliche Folge eines veränderten Stoffwechsels, wie sie in Form einer gesteigerten Laktatbildung im Glukosestoffwechsel, dem sogenannten Warburg-Effekt, bereits für maligne Tumore beschrieben wurde (116, 117). Effekte des PNPLA3-Status auf die Expression der untersuchten Proteine waren weder in den HCCs noch im nicht-neoplastischen Lebergewebe erkennbar.

Neben PNPLA3 wurden auch die maßgeblich an der LT-Genese und -Degradation beteiligten Perilipine 1 und 2 (97) hinsichtlich einer Korrelation mit Steatose analysiert. Perilipine weisen eine unterschiedliche Gewebespezifität, intrazelluläre Lokalisation und Funktion auf. In der Leber variiert die Zusammensetzung der mit LT-Tropfen assoziierten Perilipine in Abhängigkeit der LT-Größe und dem Steatosegrad (114, 115). Für humane Hepatozyten konnte gezeigt werden, dass die Perilipin 1-Expression positiv mit dem Steatosegrad korreliert, (99, 114). Bei der Mehrzahl des untersuchten humanen Lebergewebes in unserem Kollektiv korrelierte die Perilipin 1A-Expression auf Proteinebene ebenfalls positiv mit dem Steatosegrad. In humanen Lebern ohne nennenswerte Verfettung oder Schädigung war keine Perilipin 1A-Expression nachweisbar. Bei chronischer *Steatosis hepatis* kann in Hepatozyten eine zonale Perilipin 1-Expression nachgewiesen werden, die sich in Abhängigkeit vom Steatosegrad damit deutlich von der von Perilipin 2 unterscheidet (115). Im Fettgewebe spielt Perilipin 1 als Schlüsselprotein der Lipolyse eine zentrale Rolle (123, 124, 129, 168). Perilipin 1 reguliert die hormonabhängige Lipolyse (123, 124) und ist höchstwahrscheinlich aufgrund dieser Funktion mit Steatose und LT assoziiert. Die Bedeutung von Perilipin 1 bei der Lipolyse in Hepatozyten ist bis *dato* unklar. In humanem Lebergewebe korrelierte bei der Mehrzahl der Proben in unseren Immunblotanalysen ein höherer Steatosegrad neben Perilipin 1A ebenfalls mit einer verstärkten Perilipin 2-Expression. Perilipin 2 korreliert mit dem Verfettungsgrad unterschiedlicher Zellen und Gewebe (127) und gilt als Marker für die Lipidakkumulation (99). Grund für die deutliche Assoziation von Perilipin 2 mit Steatose ist, dass Perilipin 2 LT vor dem lipolytischen Abbau schützt (104, 128, 131, 137). Ein Zusammenhang zwischen dem *PNPLA3*-Genotyp und der Perilipin 1- und 2-Proteinexpression in humanem Lebergewebe war nicht nachweisbar.

5.2 Regulation von PNPLA3

Um zu überprüfen, ob eine durch den *PNPLA3*-Genotyp bedingte Deregulation der *PNPLA3*-Proteinexpression als möglicher Erklärungsansatz für die Assoziation von *PNPLA3* I148M mit hepatischer Steatose, Entzündung und Fibrose in Frage kommt, untersuchten wir die *PNPLA3*-Proteinexpression in humanem Lebergewebe und in genomeditierten HEK293T-Zellen. In dem von uns untersuchten Lebergewebe und in HEK293T *PNPLA3* I148M Knock-In-Zellen konnten wir keinen Zusammenhang zwischen dem *PNPLA3*-Status und der zugehörigen *PNPLA3*-Proteinexpression detektieren. Ferner zeigte sich auch kein Zusammenhang zwischen *PNPLA3*-Genotyp und *PNPLA3*-mRNA-Menge in humanem Lebergewebe. In *PNPLA3*

(I148M/M) Knock-In Mäusen wurde hingegen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen nach vierwöchiger Saccharose-reicher Diät eine Akkumulation von PNPLA3 I148M auf Proteinebene beobachtet (10) und ebenfalls nach vierwöchiger Saccharose-reicher Diät in einer anderen Studie unabhängig vom *PNPLA3*-Genotyp ein Anstieg der *PNPLA3*-mRNA-Menge (185). Die Akkumulation auf Proteinebene war bedingt durch eine verminderte Ubiquitinierung und infolgedessen einer reduzierten proteasomalen Degradation von PNPLA3 (10). Eine Erklärung für die Diskrepanz dieser Ergebnisse ist, dass es Unterschiede in der Regulation von PNPLA3 in Mäusen und in Zellkultur gibt. Strukturelle Spezies-Unterschiede von murinem und humanem *PNPLA3* (186) könnten hier ursächlich sein, sodass die Vergleichbarkeit zwischen den Modellen eingeschränkt ist. Die Glucose-abhängige Induktion von PNPLA3 wird *in vitro* in immortalisierten humanen Hepatozyten (IHH-Zellen) durch das Silencing von ChREBP aufgehoben (84). Diese Beobachtung spricht für eine Glucose-abhängige Regulation von PNPLA3 über ChREBP. Jedoch wird durch adenovirale Überexpression von Maus-ChREBP in IHH-Zellen die Expression der *PNPLA3*-mRNA nicht induziert (84). Im Widerspruch zu dieser Studie gibt es eine Studie von Dubuquoy et. al., die zeigt, dass PNPLA3 zwar in Mäusen über ChREBP und SREBP1c reguliert wird, jedoch in IHH-Zellen und HepG2-Zellen eine Induktion von PNPLA3 lediglich über SREBP1c und nicht über ChREBP möglich war (187).

Wir führten zudem *in vitro* eine steatogene Behandlung mit Ölsäure über 72 h in HEK293T-, Huh7- und HepG2-Zellen durch. Hier zeigte sich keine signifikante Veränderung der mRNA-Expression von PNPLA3 im Vergleich zu den Kontroll-Zellen ohne Ölsäure-Behandlung. Ein möglicher Grund für das fehlende Ansprechen von *PNPLA3* auf den Stimulus könnte ein zu kurzer Behandlungszeitraum sein. Hierzu wäre in Zukunft ein Langzeit-Steatose-Modell und die weitere Analyse der Regulation von *PNPLA3* interessant. Pawella et. al. entwickelten ein Langzeitmodell mit Huh7-Zellen, bei dem die Zellen bis zu 40 Tage mit einer Kombination aus Ölsäure, DMSO und *preadipocyte-adipocyte differentiation medium* behandelt wurden und *in vitro* eine chronische Steatose generiert werden konnte (115). Zudem wurde im Jahr 2012 von Perttilä et. al. gezeigt, dass es nach 18 h Ölsäurebehandlung von Huh7-Zellen erst in Anwesenheit von freien Fettsäuren zu einem erhöhten *PNPLA3*-Spiegel kam (84).

5.3 Einfluss von PNPLA3 auf Faktoren des Lipidmetabolismus

PNPLA3 ist eine Lipase, dessen lipolytische Aktivität mit rekombinantem humanem *PNPLA3* *in vitro* in Sf-9-Zellen, Ovar-Zellen von *Spodoptera frugiperda*, und Hefezellen, *Pichia pastoris*, nachgewiesen wurde (5, 7, 67). Welche exakte Funktion und Rolle PNPLA3 im

Lipidmetabolismus spielt und wie sich der *PNPLA3*-Polymorphismus I148M auf diese Prozesse auswirkt, ist noch weitgehend ungeklärt. Ebenfalls unbekannt ist die Rolle der Lokalisation von *PNPLA3* bzw. *PNPLA3* I148M an LT und dessen Einfluss auf sowohl anabole als auch katabole Prozesse. Zur Überprüfung dieses Aspektes wurde mittels immunhistochemischer Färbungen in humanem Lebergewebe die Expression und Lokalisation LT-assoziiierter Proteine und *PNPLA3* in Abhängigkeit vom *PNPLA3*-Genotyp analysiert. Wir konnten zeigen, dass der *PNPLA3*-Polymorphismus I148M zu einer Translokation des *PNPLA3*-Proteins aus dem Zytoplasma an LT führte. Diese Translokation war bereits bei Heterozygotie in dem von uns untersuchten humanem NAFLD-/NASH-Gewebe nachweisbar. Eine analoge Translokation von *PNPLA3* I148M wurde bereits bei Knock-In Mäusen (*PNPLA3* 148M/M) beschrieben. In dieser Studie von BasuRay et. al. von 2017 akkumulierte *PNPLA3* I148M im Vergleich zum *PNPLA3* Wildtyp vermehrt an hepatischen LT (10). Möglicherweise spielt die geänderte Lokalisation von *PNPLA3* I148M und die Assoziation mit LT bei der Entstehung und Progression einer NAFLD eine entscheidende Rolle (9, 185, 186).

Um zu untersuchen, ob neben der Lokalisation an LT eine direkte Interaktion von *PNPLA3* mit LT besteht, führten wir *in vitro* Studien unter Lipolyse-Bedingungen durch. Dabei sollte die LT-Größe als Indikator der lipolytischen Aktivität von *PNPLA3* I148M im Vergleich zu *PNPLA3* Wildtyp als Hinweis auf eine veränderte Lipolyse analysiert werden. Für die bessere Vergleichbarkeit der *PNPLA3*-Genotypen verwendeten wir genomeditierte HEK293T-Zellen. Mit CRISPR/Cas9 fügten wir den *PNPLA3*-Polymorphismus I148M in HEK293T-Zellen ein und generierten u. a. den heterozygoten *PNPLA3*-Genotyp C/G. Während der Lipolyse reduzierte sich beim *PNPLA3* C/C-Genotyp die LT-Fläche auf 2 % der Vergleichs-LT-Fläche. In den genomeditierten HEK293T-Zellen mit dem *PNPLA3*-Polymorphismus I148M in heterozygoter Form (*PNPLA3* C/G) verringerte sich die LT-Fläche lediglich auf 39 % und somit war der LT-Abbau signifikant gehemmt. Die vom *PNPLA3*-Genotyp abhängige LT-Größe wurde bereits 2014 von Pirazzi et. al. in HSCs beschrieben (77). Hierbei waren die LT in HSCs bei der Überexpression vom *PNPLA3* Wildtyp größer als bei der Überexpression des *PNPLA3*-Polymorphismus I148M (77). Der unterschiedliche Einfluss von *PNPLA3* Wildtyp und *PNPLA3* I148M auf die LT-Größe deutet auf eine durch *PNPLA3* respektive den *PNPLA3*-Genotypen abhängige Modulation der lipolytischen Aktivität an LT hin. Der *PNPLA3*-Polymorphismus I148M scheint demnach einen Einfluss auf die intrazelluläre lipolytische Aktivität zu nehmen und somit die Entstehung einer NAFLD zu begünstigen. Die Entstehung einer NAFLD ist dabei möglicherweise bedingt durch die Verschiebung des Gleichgewichts zwischen LT-Biogenese

und LT-Abbau zugunsten der LT-Biogenese. Grundsätzlich denkbar für die Verschiebung des Gleichgewichts wäre die schwächere lipolytische Aktivität von *PNPLA3* I148M im Vergleich zum Wildtyp (71). Da *PNPLA3* eine Lipase-Aktivität gegenüber TAG aufweist (5, 7, 67), wäre vorstellbar, dass der durch die Mutation bedingte Verlust dieser Lipase-Aktivität, wie in Sf-9-Zellen, Hepatozyten, Mausleber und Hefezellen gezeigt (7, 67, 78), in einer LT-Akkumulation resultiert. Jedoch führt der Knock-Out von *PNPLA3* in Mäusen unter fettreicher Diät nicht zur Entstehung einer NASH, zu Gewichtszunahme oder zu einer Insulin-Resistenz und ist somit nicht gleichbedeutend mit dem Vorhandensein des *PNPLA3*-Polymorphismus I148M (88). Aufgrund dessen wird angenommen, dass der Verlust der Lipase-Aktivität des *PNPLA3*-Polymorphismus I148M keine ausreichende Erklärung für die Lipidakkumulation in Hepatozyten liefert (71), wobei hier Spezies-Unterschiede eine Rolle spielen könnten.

Da der Verlust der Lipase-Aktivität von *PNPLA3* I148M für die *PNPLA3* abhängige LT-Akkumulation nicht ursächlich zu sein scheint, untersuchten wir eine mögliche Interaktion von *PNPLA3* mit integralen Schlüsselproteinen des Lipid-Metabolismus. Aufgrund der Assoziation von *PNPLA3* mit LT wurde eine mögliche direkte oder indirekte Interaktion mit LT-assoziierten Proteinen der Perilipin-Familie als auch weiteren Lipasen analysiert. Da ATGL (*PNPLA2*) und *PNPLA3* innerhalb der *PNPLA*-Familie die größte Homologie zueinander aufweisen (75), ist nicht nur eine ähnliche enzymatische Funktion denkbar, sondern auch davon auszugehen, dass Interaktionen mit einem ähnlichen Set an Protein-Interaktionspartnern stattfinden könnten. Vorarbeiten der Arbeitsgruppe zeigten auf Proteinebene eine Interaktion von *PNPLA3* mit Perilipin 5 und ATGL. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Ko-Expression von *PNPLA3* mit ATGL bzw. von *PNPLA3* mit Perilipin 5 zu einer Ko-Lokalisation der Proteine an LT führte. Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass ATGL Homodimere und in Anwesenheit von *PNPLA3* auch Heterodimere mit *PNPLA3* bilden kann. Die Heterodimerbildung wurde hierbei konzentrations-abhängig durch Perilipin 5 unter der Bildung eines Komplexes aus *PNPLA3*, ATGL und Perilipin 5 vermittelt. Des Weiteren wurde von der Arbeitsgruppe beschrieben, dass Perilipin 1 die entgegengesetzte Rolle zu Perilipin 5 einnimmt. Konzentrationsabhängig verhindert Perilipin 1 die Komplexbildung von *PNPLA3* mit ATGL. Ein negativer Effekt durch den *PNPLA3*-Polymorphismus I148M auf die Interaktion von ATGL und Perilipin 5 wurde nicht beobachtet. Eine indirekte Interaktion von Perilipin 1 mit ATGL sowie eine Interaktion von Perilipin 5 mit ATGL in transfizierten Cos7- bzw. 3T3-L1-Zellen wurde von Granneman et. al. 2009 und 2011 beschrieben (124, 152). Durch Überexpression von ATGL in Kombination mit *PNPLA3* C/C bzw. G/G in HepG2-Zellen zeigten

wir, dass beim *PNPLA3*-Genotyp C/C sowie G/G der LT-Abbau gehemmt war. Der *PNPLA3*-Polymorphismus I148M hemmte den LT-Abbau jedoch signifikant stärker als *PNPLA3* Wildtyp. Die LT-Größe war bei alleiniger Überexpression von ATGL signifikant kleiner als bei der Ko-Expression mit *PNPLA3*. In Mäusen resultiert eine Inaktivierung des *ATGL*-Gens in einer hepatischen LT-Akkumulation (160). Da die Ko-Expression von ATGL und *PNPLA3* (insbesondere I148M) in unserer Untersuchung den gleichen Effekt auf LT wie eine Inaktivierung des *ATGL*-Gens zeigte, ist anzunehmen, dass *PNPLA3 in vitro* die lipolytische Aktivität von ATGL hemmt. Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe, dass *PNPLA3* Heterodimere mit ATGL bildet, suggerieren, dass enzymatisch weniger aktives *PNPLA3* das lipolytisch aktivere ATGL ersetzt bzw. verdrängt und somit das Gleichgewicht in Richtung LT-Biogenese verschoben wird. Die gesamte lipolytische Aktivität wird reduziert. Demzufolge konnte in der vorliegenden Dissertation ATGL, das Schlüsselenzym der Lipolyse in Adipozyten sowie in Hepatozyten (81, 172), als Interaktionspartner von *PNPLA3* identifiziert werden. Bei Vorliegen des *PNPLA3*-Polymorphismus I148M wird unseren Daten zufolge die lipolytische Aktivität signifikant stärker verringert als beim *PNPLA3* Wildtyp. Somit liefert diese Arbeit einen bedeutenden Hinweis auf den Mechanismus, durch den *PNPLA3* I148M die Entstehung einer NAFLD und die Progression zu einer NASH begünstigt. Kongruent mit unseren Daten wurde von Wang et. al. und Yang et. al. eine Inhibition der Lipolyse durch *PNPLA3* in Huh7-Zellen sowie braunen Adipozyten beschrieben (188, 189). Dabei wurde eine mögliche indirekte Hemmung von ATGL über eine Interaktion von *PNPLA3* mit ABHD5 diskutiert (188, 189). Der bekannte Ko-Aktivator von ATGL, ABHD5, bindet ATGL und steigert die ATGL-vermittelte Lipolyse um das ca. 20-fache (159). Eine mögliche Interaktion von *PNPLA3* mit ABHD5 wurde von der Arbeitsgruppe untersucht, dabei konnte jedoch in HEK293T- und Huh7-Zellen keine Interaktion nachgewiesen werden.

Neben der Interaktion von *PNPLA3* mit ATGL wurde in dieser Arbeit eine mögliche Interaktion von *PNPLA3* mit Perilipin 5 untersucht. Perilipin 5 wird bei *Steatosis hepatis* vermehrt exprimiert (150, 151) und induziert bei Mäusen in Hepatozyten sowie *in vitro* in Cos7-Zellen in Abhängigkeit vom Phosphorylierungsstatus durch Hemmung der Lipolyse eine vermehrte TAG-Akkumulation (151, 152). Die Experimente der vorliegenden Arbeit belegten eine partielle Korrelation der Expression von *PNPLA3* und Perilipin 5 in humanem Lebergewebe auf Proteinebene und nach Lipolyse in Huh7-Zellen auf mRNA-Ebene. Im nicht-neoplastischen Lebergewebe von HCC-PatientInnen und in Lebergewebe mit geringer Steatose korrelierte die Proteinmenge von *PNPLA3*- und Perilipin 5 positiv. Bei PatientInnen mit hoher *PNPLA3*-

Expression wurde i. d. R. Perilipin 5 ebenfalls stark exprimiert. Ferner analysierten wir anhand immunhistochemischer Färbungen in NAFLD-/NASH-Lebergewebe die Lokalisation von PNPLA3 und Perilipin 5. Perilipin 5 war bei PatientInnen mit dem *PNPLA3*-Polymorphismus I148M kongruent zu *PNPLA3* signifikant stärker mit LT assoziiert. Vorangegangene immunhistochemische Analysen der Arbeitsgruppe eines Kollektivs von PatientInnen mit ASH zeigten hingegen, dass bei homozygoten Trägern des *PNPLA3*-Polymorphismus (G/G) Perilipin 5 oft zytoplasmatisch und partiell nukleär lokalisierte. Hashani et. al. zeigten, dass Perilipin 5 u. a. bei AFLD sowie bei akuten Leberschäden verstärkt an kleinen LT und bei chronischen steatotischen Lebererkrankungen an größeren LT lokalisiert (150). Neben Proteinexpressions- und Lokalisationsanalysen in humanem Lebergewebe führten wir Analysen der mRNA-Expression von Perilipin 5 und *PNPLA3* u. a. in Huh7-Zellen unter Lipolyse-Bedingungen durch. Auf mRNA-Ebene wurde während der Lipolyse in Huh7-Zellen neben *PNPLA3* auch *PLIN5* supprimiert. Die Lipolyse in Hepatozyten ist aktuell nur unzureichend untersucht, im Gegensatz zu beispielsweise Adipozyten und Myozyten. Für Perilipin 5 wird neben seiner Rolle als wesentlicher Akteur der Lipolyse im Muskelgewebe auch eine Rolle im Lebergewebe diskutiert (151). In Abwesenheit lipolytischer Stimuli bindet Perilipin 5 in nicht-phosphorylierten Zustand ABHD5 und verhindert somit die Komplexbildung zwischen ATGL und ABHD5, wie *in vitro* in COS7 Zellen, in Lebergewebe von Mäusen und in Skelettmuskulatur von Ratten gezeigt werden konnte (151-153). Die kompetitive Bindung von Perilipin 5 mit ABHD5 verminderte die ABHD5-vermittelte Aktivierung von ATGL und resultiert in einer Hemmung der Lipolyse. Unter Verwendung von Zellkultur-Modellen (CHO-K1, CHO Flp, humanen Fibroblasten und 3T3-L1 Mauszellen) zeigten Wang et. al. 2011, dass Perilipin 5 in nicht-phosphoryliertem Zustand ATGL bindet und somit ebenfalls die lipolytische Aktivität verringert (128). Umgekehrt wird durch die Phosphorylierung von Perilipin 5 die Lipolyse induziert (128). Da sowohl *PNPLA3* als auch Perilipin 5 indirekt ATGL inhibieren, ist eine Interaktion von *PNPLA3* mit Perilipin 5 denkbar. Möglicherweise ist die Interaktion der beiden Proteine dabei abhängig vom *PNPLA3*-Genotyp, da bei Lebergewebe mit *PNPLA3* Wildtyp unseren Ergebnissen zu Folge keine Akkumulation von Perilipin 5 an LT nachgewiesen werden konnte. Darüber hinaus legt die zeitgleiche Suppression von *PLIN5* und *PNPLA3* auf mRNA-Ebene während der Lipolyse in Huh7-Zellen die Annahme nahe, dass neben *PNPLA3* auch Perilipin 5 in humanen Hepatozyten als ein Akteur der Lipolyse zu diskutieren ist. Diese Beobachtung ist kongruent mit den Daten der Arbeitsgruppe, dass Perilipin 5 die Interaktion

zwischen PNPLA3 und ATGL konzentrationsabhängig fördert und somit möglicherweise indirekt die Lipolyse hemmt.

Im Vergleich mit Kardiomyozyten, in denen Perilipin 5 die Lipolyse abhängig vom Phosphorylierungsstatus beeinflusst (128, 154, 155), reguliert in Adipozyten in Abhängigkeit vom Phosphorylierungsstatus insbesondere Perilipin 1 die Lipolyse (122, 123, 125, 129, 169). Während der Lipolyse konnten wir in den HCC-Zelllinien Huh7 und HepG2 eine Herunterregulation von *PLIN1* auf mRNA-Ebene feststellen, analog zu *PNPLA3*. In den Adipozyten- und Fibroblasten-Zelllinien 3T3-L1 und Cos 7 wurde von Subramanian et. al. 2004 und von Granneman et. al 2009 gezeigt, dass aufgrund der Sequestrierung des ATGL Ko-Aktivators ABHD5 und Komplexbildung mit nicht-phosphorylierten Perilipin 1 die lipolytische Aktivität von ATGL deutlich reduziert wird (124, 170). Die β -adrenerge Stimulation führt zur Phosphorylierung von Perilipin 1 und Dissoziation von ABHD5 (124). ABHD5 rekrutiert ATGL an LT und die Lipolyse wird induziert (124). Unsere Daten zeigten, dass in Huh7- und HepG2-Zellen *PLIN1* analog zu *PNPLA3* supprimiert wird und Perilipin 1 in der Lipolyse von Hepatozyten von Bedeutung ist.

5.4 Funktion von PNPLA3 in der Lipolyse

Bei Assoziation von PNPLA3 mit LT sowie Interaktion von PNPLA3 mit der Lipase ATGL (siehe 5.3), liegt in Verbindung mit der schwachen PNPLA3 Lipase-Aktivität (5, 7, 67) und der ernährungsbedingten Regulation von PNPLA3 (72) eine Funktion von PNPLA3 im Lipidstoffwechsel nahe. Ferner konnten wir zeigen, dass durch β -adrenerge Stimulation, *PNPLA3* auf mRNA-Ebene in HEK293T-Zellen (*PNPLA3*-Genotyp C/C) sowie in den HCC-Zelllinien Huh7 und HepG2 (beide *PNPLA3*-Genotyp G/G) signifikant reprimiert wurde (siehe 5.3). Interessanterweise hatte der *PNPLA3*-Genotyp dabei keinen Einfluss auf die mRNA-Expression von *PNPLA3*. In Mäusen wird PNPLA3 beim Fasten reprimiert und durch Insulin induziert (81). Durch β -adrenerge Stimulation über Katecholamine oder bei Glucose-Mangel wie beim Fasten wird die Lipolyse gesteigert und damit dem Organismus Energie in Form freier Fettsäuren zur Verfügung gestellt. Analog zu den Ergebnissen der murinen Studie (81) konnten wir die Suppression von *PNPLA3* in humanen Zelllinien während der Lipolyse, induziert durch β -adrenerge Stimulation, bestätigen. Die Phosphorylierung der Lipase HSL sowie die mRNA-Expression von *ATGL*, insbesondere in Huh7-Zellen, wurde durch β -adrenerge Stimulation im Gegensatz zu *PNPLA3* signifikant verstärkt. Im Umkehrschluss stützen diese Beobachtungen die Hypothese, dass die Lipase-Aktivität von PNPLA3 eine

untergeordnete Funktion während der Lipolyse spielt (siehe 5.3). Somit ist die Interaktion von PNPLA3 mit ATGL sowie möglicherweise mit Perilipin 5 in Bezug auf Entstehung und Progression einer NAFLD wesentlich relevanter. Ergänzend zu *in vitro* Zellkulturstudien wurde im Rahmen dieser Arbeit die Kultivierung von humanem Lebergewebe mittels Gewebeschnittkultur über mind. 72 h etabliert. In der Gewebekultur wurde im Gegensatz zu unseren *in vitro* Untersuchungen während der Lipolyse die Transkription von *PNPLA3* induziert. Jedoch konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit lediglich exemplarisch eine Gewebeprobe untersucht werden.

Nicht alle PatientInnen, die Träger des *PNPLA3*-Polymorphismus I148M sind, entwickeln auch eine NAFLD oder NASH. *PNPLA3*(148M)-Knock-In-Mäuse entwickeln erst in Kombination mit einer hochkalorischen Diät eine NAFLD, nicht jedoch bei einer Normaldiät (185). Analog zu der Beobachtung dieser Studie korrelierte der *PNPLA3*-Genotyp I148M in den von uns untersuchten humanen Lebergewebebeobachtungen zwar positiv mit der Prävalenz einer NAFLD, jedoch wies ein Teil der PatientInnen, die Träger des Polymorphismus I148M waren, nur eine Steatose von unter 5 % auf. Der *PNPLA3*-Polymorphismus I148M resultiert also nicht grundsätzlich in einer NAFLD. Zusätzlich zum Vorliegen des *PNPLA3*-Polymorphismus I148M spielen die Diät und weitere äußere Einflussfaktoren eine relevante Rolle bei der Entstehung einer NAFLD, wie anhand der *PNPLA3*(148M)-Knock-In-Mäuse gezeigt (185). Diese Beobachtung ist mit der „*two hit theory*“ von Day und James vereinbar, die für die Entstehung einer NASH mindestens zwei schädigende Faktoren voraussetzt. Eine *Steatosis hepatis* begünstigt hierbei die Entstehung von oxidativem Stress und sensibilisiert die Hepatozyten gegenüber genetischen Einflüssen, hepatotoxischen Pharmazeutika, Alkohol und weiteren zellschädigenden Faktoren (24). Zusätzlich wird bei hochkalorischer und vor allem kohlenhydratreicher Diät vermehrt Insulin ausgeschüttet, welches wiederum eine Hochregulation der *PNPLA3*-Expression bewirkt (81). Hierdurch liegt quantitativ mehr *PNPLA3* vor, welches bei Menschen mit dem *PNPLA3*-Polymorphismus I148M lipolytisch aktives ATGL von LT verdrängt und somit die lipolytische Aktivität verringert. Darüber hinaus akkumuliert *PNPLA3* I148M auf Proteinebene in Hepatozyten aufgrund einer verminderten proteasomalen Degradation (9, 10). Die Akkumulation von *PNPLA3* könnte den Einfluss des *PNPLA3*-Polymorphismus I148M auf die Hemmung der Lipolyse noch erhöhen. Anhand von Gewebekultur-Experimenten konnten wir zeigen, dass eine Ölsäurebehandlung bereits ohne Vorliegen des *PNPLA3*-Polymorphismus I148M in kultiviertem Lebergewebe zu einer deutlichen LT-Akkumulation führte. Dieses Ergebnis *ex vivo* zeigte die schnelle Reaktion des

Gewebes auf exogene Einflüsse und damit die Dynamik von LT (96). In PatientInnen mit *PNPLA3*-Polymorphismus I148M wird bei gleichzeitig hochkalorischer Diät *PNPLA3* hochreguliert, akkumuliert an LT und führt durch Verdrängung von ATGL von LT zu einer Verringerung der Lipolyse. Dieser Mechanismus liefert einen möglichen Erklärungsansatz, wie es bei PatientInnen, die Träger des *PNPLA3*-Polymorphismus I148M sind, unter einer hochkalorischen Diät verstärkt zur Entstehung und Progression einer NAFLD kommt.

5.5 Ausblick

Die Frischgewebekultur bietet großes Potential in Bezug auf die weitere Erforschung der NAFLD und bietet die Möglichkeit, auch pharmakologische Therapien *ex vivo* zu entwickeln. Durch unsere Ergebnisse wird die Notwendigkeit der Verwendung von komplexen Zellmodellen unterstrichen, die die Interaktionen zwischen den verschiedenen Zelltypen berücksichtigen. Bei Expressionsanalysen von *PNPLA3* zeigten sich Unterschiede zwischen humanem Lebergewebe und Zellkultur. Beispielsweise hatte die Induktion der Lipolyse einen konträren Effekt auf die *PNPLA3*-Transkription in dem exemplarisch untersuchten humanen Lebergewebe im Vergleich zur Zellkultur. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass sich Untersuchungsergebnisse nicht ohne Weiteres auf andere Modelle oder die Konstellation *in vivo* übertragen lassen. Von großer Bedeutung wären weitere Gewebekultur-Analysen von vitalem humanem Lebergewebe unterschiedlicher *PNPLA3*-Genotypen. Ein Langzeitsteatose-Modell könnte zusätzliche Einblicke in die Progression einer NAFLD bieten (115). Der Mechanismus sowie die Schlüsselproteine der Lipolyse in der Leber *ex vivo* könnten exakter erforscht werden als in der Zellkultur, jedoch muss bei der Analyse von humanem Gewebe, gerade bei älteren PatientInnen, beachtet werden, dass dieses zahlreichen Einflussfaktoren wie beispielsweise Fasten, hochkalorischer Diät, Alkoholkonsum Pharmakotherapie, Alter, verändertem Stoffwechsel u. v. m. unterliegt. Diese Faktoren nehmen potenziell Einfluss auf die Expression von Proteinen und Enzymen in humanem Lebergewebe.

Die Bestimmung des *PNPLA3*-Genotyps eignet sich aufgrund der Assoziation mit Risiko und Schwere einer NAFLD (190) zur Beurteilung des individuellen Krankheitsrisikos. Ein Screening auf NAFLD in der Allgemeinbevölkerung wird in der aktuellen NAFLD S2k-Leitlinie von 2022 nicht empfohlen (1), jedoch sollte eine weitere NAFLD-Abklärung bei PatientInnen mit Diabetes mellitus Typ II, metabolischem Syndrom, Übergewicht und arterieller Hypertonie erfolgen. Analog wäre eine Genotypisierung hinsichtlich *PNPLA3* nur bei Vorliegen weiterer Risikofaktoren wie Diabetes mellitus und Adipositas zielführend, da das Vorhandensein des

PNPLA3-Polymorphismus I148M allein nicht zur Entwicklung einer NAFLD führt (185). Die Kenntnis des *PNPLA3*-Status könnte es ermöglichen, frühzeitig ein geeignetes individuelles Therapiekonzept zu erarbeiten, wie die Steigerung der physischen Aktivität in Kombination mit kohlenhydratreduzierter Diät (191). Anhand einer Studie mit hispano-amerikanischen Kindern konnten Davis et. al. 2010 zeigen, dass der Steatosegrad im Lebergewebe durch eine signifikante Wechselwirkung zwischen dem *PNPLA3*-Genotyp und der Ernährung beeinflusst wird (4). Die Kenntnis des *PNPLA3*-Status ist bei PatientInnen mit NAFLD von Nutzen, um den PatientInnen die Dringlichkeit einer kalorienreduzierten und kohlenhydratarmen Diät sowie die Vermeidung weiterer Risikofaktoren wie Alkoholkonsum oder Einnahme hepatotoxischer Pharmazeutika zu verdeutlichen. Die Aufklärung der PatientInnen über das individuelle Krankheitsrisiko kann darüber hinaus die Therapieadhärenz steigern. Eine NAFLD weist wenig Frühsymptome auf, sodass eine frühzeitige Identifikation von RisikopatientInnen die Prognose verbessern könnte. Zudem kann die Kenntnis des *PNPLA3*-Genotyps für die Diagnose einer NAFLD von Nutzen sein, ohne dass eine invasive Diagnostik notwendig wäre. Bis *dato* ist die Histopathologie der Leberbiopsie Goldstandard für die Diagnose der NAFLD, jedoch existieren Ansatzpunkte zur nichtinvasiven Diagnostik einer NAFLD anhand von *PNPLA3* und weiteren Parametern, wie BMI, Laborparametern, Geschlecht und Diabetes mellitus Typ II (38). Die Aussagekraft des Ergebnisses ist jedoch in hohem Maße vom *PNPLA3*-Genotyp abhängig (38) und findet bisher keine routinemäßige Anwendung in der Praxis.

Bei der Therapie einer NAFLD steht die Modifikation des Lebensstils mit mediterraner bzw. hypokalorischer Diät, aerobem Training und Gewichtsreduktion im Vordergrund (1). Eine generelle Empfehlung zum Einsatz von Pharmazeutika zur Therapie einer NAFLD besteht aktuell nicht. Jedoch besteht in Abhängigkeit von der Komorbidität die Indikation für eine Pharmakotherapie, beispielsweise wird bei gleichzeitigem Vorliegen von NAFLD und Diabetes Typ II die Einnahme von Metformin plus Glucagon-like Peptide 1 Agonisten empfohlen (1). Zur Therapie anderer genetischer Erkrankungen wie z. B. der Muskeldystrophie Duchenne, existieren Therapieansätze mithilfe Genom-editierender Methoden, wie CRISPR/Cas9 (192). Auch zwei PatientInnen mit β -Thalassämie und Sichelzellanämie wurden bereits mit CRISPR/Cas9-editierten hämatopoetischen Stammzellen therapiert (193). Es gibt jedoch kontroverse Meinungen zu der Therapie mit CRISPR/Cas9. *Off-target* Effekte wie Mutationen außerhalb der Zielsequenz können ein Problem sein (194). Zudem existieren bisher keine Langzeitstudien. Grundsätzlich wäre eine Therapie mittels Modifikation des *PNPLA3*-Polymorphismus I148M über CRISPR/Cas9 denkbar, da lediglich ein Gen zu editieren wäre.

PNPLA3 Knock-Out-Mäuse zeigen einen Phänotyp, der im Gegensatz zu Wildtyp-Mäusen unabhängig von der Diät nicht in der Entwicklung einer *Steatosis hepatis*, Leberenzymerrhöhung, Gewichtszunahme oder Insulin-Resistenz resultiert (88). Da der Phänotyp mit *Steatosis hepatis*, NASH und HCC jedoch ausschließlich in Kombination mit einem „*second hit*“ wie beispielsweise hochkalorischer Diät oder weiterer hepatotoxischer exogener Faktoren auftritt, ist die Vermeidung von Risikofaktoren für betroffene PatientInnen deutlich zielführender und risikoärmer als eine Gentherapie mit CRISPR/Cas9. Dagegen werden bereits Studien mit *PNPLA3* I148M als Zielstruktur auf Protein- und mRNA-Ebene in Mäusen sowie eine klinische Phase III-Studie mit Proproteinkonvertase Subtilisin/Kexin Typ 9 (PCSK9) RNAi durchgeführt (186, 195).

Letztendlich bietet die Kenntnis des *PNPLA3*-Status das Potential, ein individuelles Risikoprofil für PatientInnen zu erstellen und somit die vorhandenen Therapieoptionen frühzeitig einzuleiten, jedoch bedarf es weiterer intensiver Forschung in Bezug auf die pharmakologischen Therapie-Möglichkeiten einer NAFLD.

6 Zusammenfassung

Die vorliegende Dissertation untersuchte die Expression von Perilipinen und Lipasen in Abhängigkeit vom *PNPLA3*-Status *in vitro* und *in situ* in Zusammenhang mit der Lipolyse sowie eine etwaige Interaktion von *PNPLA3* mit *ATGL* und Perilipin 5. Anhand der Analyse von humanem Lebergewebe konnten wir eine positive Korrelation zwischen dem *PNPLA3*-Genotyp I148M und der Prävalenz einer NAFLD sowie eines HCCs bestätigen. Wir konnten durch histopathologische Analysen von NAFLD-/NASH-PatientInnen zeigen, dass Lebergewebe bei *PNPLA3* I148M eine signifikant schwerere Steatose, Entzündung und Fibrose aufwies. Zudem wiesen wir bei PatientInnen mit *PNPLA3* I148M eine Verschiebung der Lokalisation von *PNPLA3* aus dem Zytoplasma und aus granulären Strukturen in Richtung LT nach. Aufgrund der Assoziation von *PNPLA3* I148M mit Steatose und LT führten wir *in vitro* Studien unter Lipolyse-Bedingungen durch. Bei Vorhandensein des *PNPLA3*-Polymorphismus I148M lag ein signifikant gehemmter LT-Abbau während der Lipolyse in mittels CRISPR/Cas9-genomeditierten HEK293T-Zellen vor. Als Erklärung für den gehemmten LT-Abbau konnten wir durch Überexpression von *ATGL* in Kombination mit *PNPLA3* C/C bzw. G/G in den HCC-Zellen der Linie HepG2 zeigen, dass bereits die Wildtyp-Variante von *PNPLA3* die Lipase *ATGL* hemmt und bei *PNPLA3* I148M die Hemmung von *ATGL* signifikant stärker ausfällt. Wir identifizierten somit *ATGL* als Interaktionspartner von *PNPLA3*. *ATGL* ist das Schlüsselenzym der Lipolyse in Hepatozyten (81, 172). Darüber hinaus stützen unsere Untersuchungsergebnisse die Hypothese der Arbeitsgruppe, dass Perilipin 5 neben *ATGL* als Interaktionspartner von *PNPLA3* fungiert. Perilipin 5 war in NAFLD-/NASH-Gewebe bei *PNPLA3* I148M-PatientInnen kongruent zu *PNPLA3* signifikant stärker mit LT assoziiert. Auch bestand eine partielle Korrelation der Expression von *PNPLA3* und Perilipin 5 in humanem Lebergewebe auf Protein- und in Huh7-Zellen auf mRNA-Ebene. Durch β -adrenerge Stimulation wurde in Huh7-Zellen neben *PNPLA3* auch *PLIN5* auf mRNA-Ebene supprimiert. Neben *PLIN5* wurde auch *PLIN1* analog zu *PNPLA3* während der Lipolyse in Huh7- und HepG2-Zellen auf mRNA-Ebene herunterreguliert. Die Herunterregulation von *PNPLA3* durch β -adrenerge Stimulation war dabei signifikant. Ein Effekt des *PNPLA3*-Genotyps auf die *PNPLA3*-Expression während der Lipolyse war nicht nachzuweisen. Die schwache Lipase-Aktivität von *PNPLA3* hat eine untergeordnete Rolle in Bezug auf die reduzierte lipolytische Aktivität bei Vorliegen von *PNPLA3* I148M und in Bezug auf die Assoziation von *PNPLA3* I148M und NAFLD. Die Ergebnisse der Arbeit liefern Hinweise darauf, dass *PNPLA3*, Perilipin 5 und *ATGL* eine Schlüsselrolle bei der Lipolyse in der Leber einnehmen und können als

Grundlage für die weitere Erforschung einer möglichen Interaktion dieser Proteine in Hepatozyten dienen. Weiterführend ergibt sich die Frage, durch welchen Mechanismus PNPLA3 ATGL hemmt und weshalb diese Hemmung von ATGL durch *PNPLA3* I148M verstärkt ist.

7 Literaturverzeichnis

1. Roeb E CA, Bantel H, Bojunga J, de Laffolie J, Demir M, Denzer UW, Geier A, Hofmann WP, Hudert C, Karlas T, Krawczyk M, Longerich T, Luedde T, Roden M, Schattenberg J, Sterneck M, Tannapfel A, Lorenz P, Tacke F. Leitlinie der aktualisierten S2k-Leitlinie nicht-alkoholische Fettlebererkrankung der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) Deutsche Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS). 2022.
2. Bundesamt S. Körpermaße nach Altersgruppen und Geschlecht. Homepage Statistisches Bundesamt. 2017.
3. Romeo S, Kozlitina J, Xing C, Pertsemlidis A, Cox D, Pennacchio LA, et al. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nature genetics*. 2008;40(12):1461-5.
4. Davis JN, Lê KA, Walker RW, Vikman S, Spruijt-Metz D, Weigensberg MJ, et al. Increased hepatic fat in overweight Hispanic youth influenced by interaction between genetic variation in PNPLA3 and high dietary carbohydrate and sugar consumption. *The American journal of clinical nutrition*. 2010;92(6):1522-7.
5. 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. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(47):48968-75.
6. Carpino G, Pastori D, Baratta F, Overi D, Labbadia G, Polimeni L, et al. PNPLA3 variant and portal/periportal histological pattern in patients with biopsy-proven non-alcoholic fatty liver disease: a possible role for oxidative stress. *Scientific reports*. 2017;7(1):15756.
7. Pingitore P, Pirazzi C, Mancina RM, Motta BM, Indiveri C, Pujia A, et al. Recombinant PNPLA3 protein shows triglyceride hydrolase activity and its I148M mutation results in loss of function. *Biochimica et biophysica acta*. 2014;1841(4):574-80.
8. Kumari M, Schoiswohl G, Chitraju C, Paar M, Cornaciu I, Rangrez AY, et al. Adiponutrin functions as a nutritionally regulated lysophosphatidic acid acyltransferase. *Cell metabolism*. 2012;15(5):691-702.
9. BasuRay S, Wang Y, Smagris E, Cohen JC, Hobbs HH. Accumulation of PNPLA3 on lipid droplets is the basis of associated hepatic steatosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2019;116(19):9521-6.
10. BasuRay S, Smagris E, Cohen JC, Hobbs HH. The PNPLA3 variant associated with fatty liver disease (I148M) accumulates on lipid droplets by evading ubiquitylation. *Hepatology*. 2017;66(4):1111-24.
11. Perumpail BJ, Khan MA, Yoo ER, Cholankeril G, Kim D, Ahmed A. Clinical epidemiology and disease burden of nonalcoholic fatty liver disease. *World journal of gastroenterology*. 2017;23(47):8263-76.
12. 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. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2018;15(1):11-20.
13. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*. 2016;64(1):73-84.
14. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2018;68(6):394-424.

15. Carr RM, Oranu A, Khungar V. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Pathophysiology and Management. *Gastroenterology clinics of North America*. 2016;45(4):639-52.
16. Alcohol use and burden for 195 countries and territories, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet (London, England)*. 2018;392(10152):1015-35.
17. Ernährung DGf. Richtwert für Alkohol 2000 [updated 03.02.2022]. Available from: <https://www.dge.de/wissenschaft/referenzwerte/alkohol/?L=0>.
18. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K, et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology*. 2012;55(6):2005-23.
19. Sanyal AJ, Brunt EM, Kleiner DE, Kowdley KV, Chalasani N, Lavine JE, et al. Endpoints and clinical trial design for nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2011;54(1):344-53.
20. Bedossa P. Pathology of non-alcoholic fatty liver disease. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2017;37 Suppl 1:85-9.
21. Lee UE, Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Best practice & research Clinical gastroenterology*. 2011;25(2):195-206.
22. Kanwal F, Kramer JR, Mapakshi S, Natarajan Y, Chayanupatkul M, Richardson PA, et al. Risk of Hepatocellular Cancer in Patients With Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*. 2018;155(6):1828-37 e2.
23. Angulo P, Kleiner DE, Dam-Larsen S, Adams LA, Bjornsson ES, Charatcharoenwitthaya P, et al. Liver Fibrosis, but No Other Histologic Features, Is Associated With Long-term Outcomes of Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*. 2015;149(2):389-97.e10.
24. Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology*. 1998;114(4):842-5.
25. Anstee QM, Day CP. The Genetics of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Spotlight on PNPLA3 and TM6SF2. *Seminars in liver disease*. 2015;35(3):270-90.
26. Hardy T, Oakley F, Anstee QM, Day CP. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Pathogenesis and Disease Spectrum. *Annual review of pathology*. 2016;11:451-96.
27. Kozlitina J, Smagris E, Stender S, Nordestgaard BG, Zhou HH, Tybjærg-Hansen A, et al. Exome-wide association study identifies a TM6SF2 variant that confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nature genetics*. 2014;46(4):352-6.
28. Mancina RM, Dongiovanni P, Petta S, Pingitore P, Meroni M, Rametta R, et al. The MBOAT7-TMC4 Variant rs641738 Increases Risk of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Individuals of European Descent. *Gastroenterology*. 2016;150(5):1219-30.e6.
29. Hernaez R, McLean J, Lazo M, Brancati FL, Hirschhorn JN, Borecki IB, et al. Association between variants in or near PNPLA3, GCKR, and PPP1R3B with ultrasound-defined steatosis based on data from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2013;11(9):1183-90.e2.
30. Huang PL. A comprehensive definition for metabolic syndrome. *Disease models & mechanisms*. 2009;2(5-6):231-7.
31. Tannapfel A, Denk H, Dienes HP, Langner C, Schirmacher P, Trauner M, et al. [Histopathological diagnosis of non-alcoholic and alcoholic fatty liver disease. Grade 2 consensus-based guidelines]. *Der Pathologe*. 2010;31(3):225-37.
32. Arner P. Insulin resistance in type 2 diabetes: role of fatty acids. *Diabetes/metabolism research and reviews*. 2002;18 Suppl 2:S5-9.

33. Day CP. Pathogenesis of steatohepatitis. Best practice & research Clinical gastroenterology. 2002;16(5):663-78.
34. Polimeni L, Del Ben M, Baratta F, Perri L, Albanese F, Pastori D, et al. Oxidative stress: New insights on the association of non-alcoholic fatty liver disease and atherosclerosis. World journal of hepatology. 2015;7(10):1325-36.
35. Byrne CD, Targher G. NAFLD: a multisystem disease. Journal of hepatology. 2015;62(1 Suppl):S47-64.
36. Rafiq N, Bai C, Fang Y, Srishord M, McCullough A, Gramlich T, et al. Long-term follow-up of patients with nonalcoholic fatty liver. Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association. 2009;7(2):234-8.
37. Zhu L, Baker SS, Gill C, Liu W, Alkhoury R, Baker RD, et al. Characterization of gut microbiomes in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) patients: a connection between endogenous alcohol and NASH. Hepatology. 2013;57(2):601-9.
38. Liu WY, Zheng KI, Pan XY, Ma HL, Zhu PW, Wu XX, et al. Effect of PNPLA3 polymorphism on diagnostic performance of various noninvasive markers for diagnosing and staging nonalcoholic fatty liver disease. Journal of gastroenterology and hepatology. 2019.
39. Longerich T, Flechtenmacher C, Schirmacher P. [Quality and quantity in hepatopathology. Diagnostic and clinically relevant grading for non-tumourous liver diseases]. Der Pathologe. 2008;29(1):15-26.
40. Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. Gastroenterology. 1999;116(6):1413-9.
41. Dulai PS, Singh S, Patel J, Soni M, Prokop LJ, Younossi Z, et al. Increased risk of mortality by fibrosis stage in nonalcoholic fatty liver disease: Systematic review and meta-analysis. Hepatology. 2017;65(5):1557-65.
42. 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.
43. 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.
44. Persico M, Iolascon A. Steatosis as a co-factor in chronic liver diseases. World journal of gastroenterology. 2010;16(10):1171-6.
45. De Luca-Johnson J, Wangensteen KJ, Hanson J, Krawitt E, Wilcox R. Natural History of Patients Presenting with Autoimmune Hepatitis and Coincident Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Digestive diseases and sciences. 2016;61(9):2710-20.
46. Powell EE, Ali A, Clouston AD, Dixon JL, Lincoln DJ, Purdie DM, et al. Steatosis is a cofactor in liver injury in hemochromatosis. Gastroenterology. 2005;129(6):1937-43.
47. Powell EE, Jonsson JR, Clouston AD. Steatosis: co-factor in other liver diseases. Hepatology. 2005;42(1):5-13.
48. Adinolfi LE, Rinaldi L, Guerrera B, Restivo L, Marrone A, Giordano M, et al. NAFLD and NASH in HCV Infection: Prevalence and Significance in Hepatic and Extrahepatic Manifestations. International journal of molecular sciences. 2016;17(6).
49. de Gottardi A, Paziienza V, Pugnale P, Bruttin F, Rubbia-Brandt L, Juge-Aubry CE, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and -gamma mRNA levels are reduced in chronic hepatitis C with steatosis and genotype 3 infection. Alimentary pharmacology & therapeutics. 2006;23(1):107-14.

50. Perlemuter G, Sabile A, Letteron P, Vona G, Topilco A, Chretien Y, et al. Hepatitis C virus core protein inhibits microsomal triglyceride transfer protein activity and very low density lipoprotein secretion: a model of viral-related steatosis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2002;16(2):185-94.
51. Lonardo A, Adinolfi LE, Restivo L, Ballestri S, Romagnoli D, Baldelli E, et al. Pathogenesis and significance of hepatitis C virus steatosis: an update on survival strategy of a successful pathogen. *World journal of gastroenterology*. 2014;20(23):7089-103.
52. Müller P, Messmer M, Bayer M, Pfeilschifter JM, Hintermann E, Christen U. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) potentiates autoimmune hepatitis in the CYP2D6 mouse model. *Journal of autoimmunity*. 2016;69:51-8.
53. Dalekos GN, Gatselis NK, Zachou K, Koukoulis GK. NAFLD and autoimmune hepatitis: Do not judge a book by its cover. *European journal of internal medicine*. 2020;75:1-9.
54. Naveau S, Giraud V, Borotto E, Aubert A, Capron F, Chaput JC. Excess weight risk factor for alcoholic liver disease. *Hepatology*. 1997;25(1):108-11.
55. Hashimoto E, Yatsuji S, Tobari M, Taniai M, Torii N, Tokushige K, et al. Hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Journal of gastroenterology*. 2009;44 Suppl 19:89-95.
56. El-Serag HB, Tran T, Everhart JE. Diabetes increases the risk of chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2004;126(2):460-8.
57. 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. *American journal of clinical oncology*. 2018;41(9):874-81.
58. Morin PJ. beta-catenin signaling and cancer. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 1999;21(12):1021-30.
59. Perugorria MJ, Olaizola P, Labiano I, Esparza-Baquer A, Marzioni M, Marin JJG, et al. Wnt- β -catenin signalling in liver development, health and disease. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2019;16(2):121-36.
60. Zucman-Rossi J, Villanueva A, Nault JC, Llovet JM. Genetic Landscape and Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*. 2015;149(5):1226-39 e4.
61. Donati B, Dongiovanni P, Romeo S, Meroni M, McCain M, Miele L, et al. MBOAT7 rs641738 variant and hepatocellular carcinoma in non-cirrhotic individuals. *Scientific reports*. 2017;7(1):4492.
62. 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. *The American journal of gastroenterology*. 2014;109(3):325-34.
63. Tanaka S, Miyanishi K, Kobune M, Kawano Y, Hoki T, Kubo T, et al. Increased hepatic oxidative DNA damage in patients with nonalcoholic steatohepatitis who develop hepatocellular carcinoma. *Journal of gastroenterology*. 2013;48(11):1249-58.
64. Ringelhan M, Pfister D, O'Connor T, Pikarsky E, Heikenwalder M. The immunology of hepatocellular carcinoma. *Nature immunology*. 2018;19(3):222-32.
65. Zhang QF, Yin WW, Xia Y, Yi YY, He QF, Wang X, et al. Liver-infiltrating CD11b(-)CD27(-) NK subsets account for NK-cell dysfunction in patients with hepatocellular carcinoma and are associated with tumor progression. *Cellular & molecular immunology*. 2017;14(10):819-29.
66. Lanthier N. Targeting Kupffer cells in non-alcoholic fatty liver disease/non-alcoholic steatohepatitis: Why and how? *World journal of hepatology*. 2015;7(19):2184-8.

67. Huang Y, Cohen JC, Hobbs HH. Expression and characterization of a PNPLA3 protein isoform (I148M) associated with nonalcoholic fatty liver disease. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(43):37085-93.
68. Dongiovanni P, Donati B, Fares R, Lombardi R, Mancina RM, Romeo S, et al. PNPLA3 I148M polymorphism and progressive liver disease. *World journal of gastroenterology*. 2013;19(41):6969-78.
69. Liu YL, Patman GL, Leathart JB, Piguet AC, Burt AD, Dufour JF, et al. Carriage of the PNPLA3 rs738409 C >G polymorphism confers an increased risk of non-alcoholic fatty liver disease associated hepatocellular carcinoma. *Journal of hepatology*. 2014;61(1):75-81.
70. 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.
71. Pingitore P, Romeo S. The role of PNPLA3 in health and disease. *Biochimica et biophysica acta Molecular and cell biology of lipids*. 2019;1864(6):900-6.
72. 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. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(36):33336-44.
73. Kienesberger PC, Oberer M, Lass A, Zechner R. Mammalian patatin domain containing proteins: a family with diverse lipolytic activities involved in multiple biological functions. *Journal of lipid research*. 2009;50 Suppl:S63-8.
74. Andrews DL, Beames B, Summers MD, Park WD. Characterization of the lipid acyl hydrolase activity of the major potato (*Solanum tuberosum*) tuber protein, patatin, by cloning and abundant expression in a baculovirus vector 1988 [updated May 15; cited 252 1]. 1988/05/15:[199-206].
75. Basantani MK, Sitnick MT, Cai L, Brenner DS, Gardner NP, Li JZ, et al. Pnpla3/Adiponutrin deficiency in mice does not contribute to fatty liver disease or metabolic syndrome. *Journal of lipid research*. 2011;52(2):318-29.
76. Sookoian S, Pirola CJ. PNPLA3, the triacylglycerol synthesis/hydrolysis/storage dilemma, and nonalcoholic fatty liver disease. *World journal of gastroenterology*. 2012;18(42):6018-26.
77. 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.
78. He S, McPhaul C, Li JZ, Garuti R, Kinch L, Grishin NV, et al. A sequence variation (I148M) in PNPLA3 associated with nonalcoholic fatty liver disease disrupts triglyceride hydrolysis. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(9):6706-15.
79. Pirazzi C, Adiels M, Burza MA, Mancina RM, Levin M, Stahlman M, et al. Patatin-like phospholipase domain-containing 3 (PNPLA3) I148M (rs738409) affects hepatic VLDL secretion in humans and in vitro. *Journal of hepatology*. 2012;57(6):1276-82.
80. Mitsche MA, Hobbs HH, Cohen JC. Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 promotes transfer of essential fatty acids from triglycerides to phospholipids in hepatic lipid droplets. *The Journal of biological chemistry*. 2018;293(18):6958-68.
81. Kershaw EE, Hamm JK, Verhagen LA, Peroni O, Katic M, Flier JS. Adipose triglyceride lipase: function, regulation by insulin, and comparison with adiponutrin. *Diabetes*. 2006;55(1):148-57.
82. Huang Y, He S, Li JZ, Seo YK, Osborne TF, Cohen JC, et al. A feed-forward loop amplifies nutritional regulation of PNPLA3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(17):7892-7.

83. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *The Journal of clinical investigation*. 2002;109(9):1125-31.
84. Perttilä J, Huaman-Samanez C, Caron S, Tanhuanpää K, Staels B, Yki-Järvinen H, et al. PNPLA3 is regulated by glucose in human hepatocytes, and its I148M mutant slows down triglyceride hydrolysis. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2012;302(9):E1063-9.
85. Krawczyk M, Stokes CS, Romeo S, Lammert F. HCC and liver disease risks in homozygous PNPLA3 p.I148M carriers approach monogenic inheritance. *Journal of hepatology*. 2015;62(4):980-1.
86. Pingitore P, Dongiovanni P, Motta BM, Meroni M, Lepore SM, Mancina RM, et al. PNPLA3 overexpression results in reduction of proteins predisposing to fibrosis. *Human molecular genetics*. 2016;25(23):5212-22.
87. Population genetics Variant rs738409 [http://www.ensembl.org: National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine; 2020 \[updated April 2020\]. Available from: http://apr2020.archive.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=22:43928347-43929347;v=rs738409;vdb=variation;vf=88266706](http://www.ensembl.org: National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine; 2020 [updated April 2020]. Available from: http://apr2020.archive.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=22:43928347-43929347;v=rs738409;vdb=variation;vf=88266706).
88. 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.
89. 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.
90. Mancina RM, Matikainen N, Maglio C, Soderlund S, Lundbom N, Hakkarainen A, et al. Paradoxical dissociation between hepatic fat content and de novo lipogenesis due to PNPLA3 sequence variant. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2015;100(5):E821-5.
91. Schünke M SE, Schumacher U et al. Prometheus LernAtlas - Innere Organe. Leber: Segmente und Histologie: Thieme; 2009 2., überarbeitete und erweiterte Auflage.
92. Gibbons GF, Islam K, Pease RJ. Mobilisation of triacylglycerol stores. *Biochimica et biophysica acta*. 2000;1483(1):37-57.
93. Greenberg AS, Obin MS. Many roads lead to the lipid droplet. *Cell metabolism*. 2008;7(6):472-3.
94. Murphy DJ. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Progress in lipid research*. 2001;40(5):325-438.
95. Martin S, Parton RG. Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2006;7(5):373-8.
96. Guo Y, Cordes KR, Farese RV, Jr., Walther TC. Lipid droplets at a glance. *Journal of cell science*. 2009;122(Pt 6):749-52.
97. Sztalryd C, Kimmel AR. Perilipins: lipid droplet coat proteins adapted for tissue-specific energy storage and utilization, and lipid cytoprotection. *Biochimie*. 2014;96:96-101.
98. 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. *The Journal of biological chemistry*. 1991;266(17):11341-6.
99. 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 and tissue research*. 1998;294(2):309-21.
100. Wolins NE, Rubin B, Brasaemle DL. TIP47 associates with lipid droplets. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(7):5101-8.

101. Wolins NE, Skinner JR, Schoenfish MJ, Tzekov A, Bensch KG, Bickel PE. Adipocyte protein S3-12 coats nascent lipid droplets. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(39):37713-21.
102. 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. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(20):14232-40.
103. Kimmel AR, Brasaemle DL, McAndrews-Hill M, Sztalryd C, Londos C. Adoption of PERILIPIN as a unifying nomenclature for the mammalian PAT-family of intracellular lipid storage droplet proteins. *Journal of lipid research*. 2010;51(3):468-71.
104. Sztalryd C, Brasaemle DL. The perilipin family of lipid droplet proteins: Gatekeepers of intracellular lipolysis. *Biochimica et biophysica acta Molecular and cell biology of lipids*. 2017;1862(10 Pt B):1221-32.
105. Wolins NE, Brasaemle DL, Bickel PE. A proposed model of fat packaging by exchangeable lipid droplet proteins. *FEBS letters*. 2006;580(23):5484-91.
106. Hsieh K, Lee YK, Londos C, Raaka BM, Dalen KT, Kimmel AR. Perilipin family members preferentially sequester to either triacylglycerol-specific or cholesteryl-ester-specific intracellular lipid storage droplets. *Journal of cell science*. 2012;125(Pt 17):4067-76.
107. Orban T, Palczewska G, Palczewski K. Retinyl ester storage particles (retinosomes) from the retinal pigmented epithelium resemble lipid droplets in other tissues. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(19):17248-58.
108. Blaner WS, O'Byrne SM, Wongsiriroj N, Kluwe J, D'Ambrosio DM, Jiang H, et al. Hepatic stellate cell lipid droplets: a specialized lipid droplet for retinoid storage. *Biochimica et biophysica acta*. 2009;1791(6):467-73.
109. Shimizu M, Yamashita D, Yamaguchi T, Hirose F, Osumi T. Aspects of the regulatory mechanisms of PPAR functions: analysis of a bidirectional response element and regulation by sumoylation. *Molecular and cellular biochemistry*. 2006;286(1-2):33-42.
110. Takahashi Y, Shinoda A, Inoue J, Sato R. The gene expression of the myocardial lipid droplet protein is highly regulated by PPARgamma in adipocytes differentiated from MEFs or SVCs. *Biochemical and biophysical research communications*. 2010;399(2):209-14.
111. 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.
112. Targett-Adams P, McElwee MJ, Ehrenborg E, Gustafsson MC, Palmer CN, McLauchlan J. A PPAR response element regulates transcription of the gene for human adipose differentiation-related protein. *Biochimica et biophysica acta*. 2005;1728(1-2):95-104.
113. Edvardsson U, Ljungberg A, Lindén D, William-Olsson L, Peilot-Sjögren H, Ahnmark A, et al. PPARalpha activation increases triglyceride mass and adipose differentiation-related protein in hepatocytes. *Journal of lipid research*. 2006;47(2):329-40.
114. 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.
115. Pawella LM, Hashani M, Eiteneuer E, Renner M, Bartenschlager R, Schirmacher P, et al. Perilipin discerns chronic from acute hepatocellular steatosis. *Journal of hepatology*. 2014;60(3):633-42.
116. Straub BK, Herpel E, Singer S, Zimbelmann R, Breuhahn K, Macher-Goeppinger S, et al. Lipid droplet-associated PAT-proteins show frequent and differential expression in neoplastic

- steatogenesis. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 2010;23(3):480-92.
117. Straub BK. [Lipid droplet-associated proteins. Importance in steatosis, steatohepatitis and hepatocarcinogenesis]. *Der Pathologe.* 2015;36 Suppl 2:146-52.
118. 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. *The Journal of biological chemistry.* 1995;270(28):16970-3.
119. Blanchette-Mackie EJ, Dwyer NK, Barber T, Coxey RA, Takeda T, Rondinone CM, et al. Perilipin is located on the surface layer of intracellular lipid droplets in adipocytes. *Journal of lipid research.* 1995;36(6):1211-26.
120. 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. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society.* 2001;12(9):741-9.
121. Greenberg AS, Egan JJ, Wek SA, Moos MC, Jr., Londos C, Kimmel AR. Isolation of cDNAs for perilipins A and B: sequence and expression of lipid droplet-associated proteins of adipocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1993;90(24):12035-9.
122. Tansey JT, Sztalryd C, Gruia-Gray J, Roush DL, Zee JV, Gavriloova O, et al. Perilipin ablation results in a lean mouse with aberrant adipocyte lipolysis, enhanced leptin production, and resistance to diet-induced obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2001;98(11):6494-9.
123. Clifford GM, Londos C, Kraemer FB, Vernon RG, Yeaman SJ. Translocation of hormone-sensitive lipase and perilipin upon lipolytic stimulation of rat adipocytes. *The Journal of biological chemistry.* 2000;275(7):5011-5.
124. Granneman JG, Moore HP, 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.
125. 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. *The Journal of biological chemistry.* 2000;275(49):38486-93.
126. Heid H, Rickelt S, Zimbelmann R, Winter S, Schumacher H, Dörflinger Y, et al. On the formation of lipid droplets in human adipocytes: the organization of the perilipin-vimentin cortex. *PloS one.* 2014;9(2):e90386.
127. Brasaemle DL, Barber T, Wolins NE, Serrero G, Blanchette-Mackie EJ, Londos C. Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein. *Journal of lipid research.* 1997;38(11):2249-63.
128. Wang H, Bell M, Sreenivasan U, Hu H, Liu J, Dalen K, et al. Unique regulation of adipose triglyceride lipase (ATGL) by perilipin 5, a lipid droplet-associated protein. *The Journal of biological chemistry.* 2011;286(18):15707-15.
129. Wang H, Hu L, Dalen K, Dorward H, Marcinkiewicz A, Russell D, et al. Activation of hormone-sensitive lipase requires two steps, protein phosphorylation and binding to the PAT-1 domain of lipid droplet coat proteins. *The Journal of biological chemistry.* 2009;284(46):32116-25.
130. Fredrikson G, Tornqvist H, Belfrage P. Hormone-sensitive lipase and monoacylglycerol lipase are both required for complete degradation of adipocyte triacylglycerol. *Biochimica et biophysica acta.* 1986;876(2):288-93.

131. 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. *Molecular and cellular biology*. 2006;26(3):1063-76.
132. 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.
133. Ohsaki Y, Maeda T, Maeda M, Tauchi-Sato K, Fujimoto T. Recruitment of TIP47 to lipid droplets is controlled by the putative hydrophobic cleft. *Biochemical and biophysical research communications*. 2006;347(1):279-87.
134. 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. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(45):34341-8.
135. 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.
136. 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. *Journal of lipid research*. 2007;48(12):2751-61.
137. Imamura M, Inoguchi T, Ikuyama S, Taniguchi S, Kobayashi K, Nakashima N, et al. ADRP stimulates lipid accumulation and lipid droplet formation in murine fibroblasts. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2002;283(4):E775-83.
138. 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. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2012;302(8):R996-1003.
139. 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*. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(35):32253-7.
140. Bulankina AV, Deggerich A, Wenzel D, Mutenda K, Wittmann JG, Rudolph MG, et al. TIP47 functions in the biogenesis of lipid droplets. *The Journal of cell biology*. 2009;185(4):641-55.
141. Wolins NE, Quaynor BK, Skinner JR, Schoenfish MJ, Tzekov A, Bickel PE. S3-12, Adipophilin, and TIP47 package lipid in adipocytes. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(19):19146-55.
142. Skinner JR, Shew TM, Schwartz DM, Tzekov A, Lepus CM, Abumrad NA, et al. Diacylglycerol enrichment of endoplasmic reticulum or lipid droplets recruits perilipin 3/TIP47 during lipid storage and mobilization. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(45):30941-8.
143. Kleinert M, Parker BL, Chaudhuri R, Fazakerley DJ, Serup A, Thomas KC, et al. mTORC2 and AMPK differentially regulate muscle triglyceride content via Perilipin 3. *Molecular metabolism*. 2016;5(8):646-55.
144. Wolins NE, Quaynor BK, Skinner JR, Tzekov A, Croce MA, Gropler MC, et al. OXPAT/PAT-1 is a PPAR-induced lipid droplet protein that promotes fatty acid utilization. *Diabetes*. 2006;55(12):3418-28.
145. Scherer PE, Bickel PE, Kotler M, Lodish HF. Cloning of cell-specific secreted and surface proteins by subtractive antibody screening. *Nature biotechnology*. 1998;16(6):581-6.
146. Chen W, Chang B, Wu X, Li L, Sleeman M, Chan L. Inactivation of Plin4 downregulates Plin5 and reduces cardiac lipid accumulation in mice. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2013;304(7):E770-9.

147. Zhu L, Hu F, Li C, Zhang C, Hang R, Xu R. Perilipin 4 Protein: an Impending Target for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Molecular neurobiology*. 2021;58(4):1723-37.
148. 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.
149. Bosma M, Minnaard R, Sparks LM, Schaart G, Losen M, de Baets MH, et al. The lipid droplet coat protein perilipin 5 also localizes to muscle mitochondria. *Histochemistry and cell biology*. 2012;137(2):205-16.
150. 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 and tissue research*. 2018;374(1):121-36.
151. Wang C, Zhao Y, Gao X, Li L, Yuan Y, Liu F, et al. Perilipin 5 improves hepatic lipotoxicity by inhibiting lipolysis. *Hepatology*. 2015;61(3):870-82.
152. Granneman JG, Moore HP, Mottillo EP, Zhu Z, Zhou L. Interactions of perilipin-5 (Plin5) with adipose triglyceride lipase. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(7):5126-35.
153. MacPherson RE, Ramos SV, Vandenboom R, Roy BD, Peters SJ. Skeletal muscle PLIN proteins, ATGL and CGI-58, interactions at rest and following stimulated contraction. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2013;304(8):R644-50.
154. Kuramoto K, Okamura T, Yamaguchi T, Nakamura TY, Wakabayashi S, Morinaga H, et al. Perilipin 5, a lipid droplet-binding protein, protects heart from oxidative burden by sequestering fatty acid from excessive oxidation. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(28):23852-63.
155. Drevinge C, Dalen KT, Mannila MN, Tang MS, Stahlman M, Klevstig M, et al. Perilipin 5 is protective in the ischemic heart. *International journal of cardiology*. 2016;219:446-54.
156. Wang H, Sreenivasan U, Gong DW, O'Connell KA, Dabkowski ER, Hecker PA, et al. Cardiomyocyte-specific perilipin 5 overexpression leads to myocardial steatosis and modest cardiac dysfunction. *Journal of lipid research*. 2013;54(4):953-65.
157. Pollak NM, Schweiger M, Jaeger D, Kolb D, Kumari M, Schreiber R, et al. Cardiac-specific overexpression of perilipin 5 provokes severe cardiac steatosis via the formation of a lipolytic barrier. *Journal of lipid research*. 2013;54(4):1092-102.
158. 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 (New York, NY)*. 2004;306(5700):1383-6.
159. 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.
160. 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 (New York, NY)*. 2006;312(5774):734-7.
161. Holm C. Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Biochemical Society transactions*. 2003;31(Pt 6):1120-4.
162. Anthonsen MW, Ronnstrand L, Wernstedt C, Degerman E, Holm C. Identification of novel phosphorylation sites in hormone-sensitive lipase that are phosphorylated in response to isoproterenol and govern activation properties in vitro. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(1):215-21.

163. Dinh TP, Carpenter D, Leslie FM, Freund TF, Katona I, Sensi SL, et al. Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(16):10819-24.
164. Deng H, Li W. Monoacylglycerol lipase inhibitors: modulators for lipid metabolism in cancer malignancy, neurological and metabolic disorders. *Acta pharmaceutica Sinica B*. 2020;10(4):582-602.
165. Zhu W, Zhao Y, Zhou J, Wang X, Pan Q, Zhang N, et al. Monoacylglycerol lipase promotes progression of hepatocellular carcinoma via NF- κ B-mediated epithelial-mesenchymal transition. *Journal of hematology & oncology*. 2016;9(1):127.
166. Zhang J, Liu Z, Lian Z, Liao R, Chen Y, Qin Y, et al. Monoacylglycerol Lipase: A Novel Potential Therapeutic Target and Prognostic Indicator for Hepatocellular Carcinoma. *Scientific reports*. 2016;6:35784.
167. Taylor SS, Ilouz R, Zhang P, Kornev AP. Assembly of allosteric macromolecular switches: lessons from PKA. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2012;13(10):646-58.
168. Brasaemle DL, Levin DM, Adler-Wailes DC, Londos C. The lipolytic stimulation of 3T3-L1 adipocytes promotes the translocation of hormone-sensitive lipase to the surfaces of lipid storage droplets. *Biochimica et biophysica acta*. 2000;1483(2):251-62.
169. Sztalryd C, Xu G, Dorward H, Tansey JT, Contreras JA, Kimmel AR, et al. Perilipin A is essential for the translocation of hormone-sensitive lipase during lipolytic activation. *The Journal of cell biology*. 2003;161(6):1093-103.
170. Subramanian V, Rothenberg A, Gomez C, Cohen AW, Garcia A, Bhattacharyya S, et al. Perilipin A mediates the reversible binding of CGI-58 to lipid droplets in 3T3-L1 adipocytes. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(40):42062-71.
171. Pollak NM, Jaeger D, Kolleritsch S, Zimmermann R, Zechner R, Lass A, et al. The interplay of protein kinase A and perilipin 5 regulates cardiac lipolysis. *The Journal of biological chemistry*. 2015;290(3):1295-306.
172. Reid BN, Ables GP, Otlivanchik OA, Schoiswohl G, Zechner R, Blaner WS, et al. Hepatic overexpression of hormone-sensitive lipase and adipose triglyceride lipase promotes fatty acid oxidation, stimulates direct release of free fatty acids, and ameliorates steatosis. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(19):13087-99.
173. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2007;131(1):18-43.
174. Schmidt G, Gerlinger C, Juhasz-Böss I, Stickeler E, Rody A, Liedtke C, et al. Her2-neu score as a prognostic factor for outcome in patients with triple-negative breast cancer. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2016;142(6):1369-76.
175. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science (New York, NY)*. 2013;339(6121):819-23.
176. Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science (New York, NY)*. 2013;339(6121):823-6.
177. Cho SW, Kim S, Kim JM, Kim JS. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nature biotechnology*. 2013;31(3):230-2.
178. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature protocols*. 2013;8(11):2281-308.
179. Pawella LM, Hashani M, Schirmacher P, Straub BK. [Lipid droplet-associated proteins in steatosis. Effects of induction and siRNA-mediated downregulation of PAT proteins in cell culture models of hepatocyte steatosis]. *Der Pathologe*. 2010;31 Suppl 2:126-31.

180. Sookoian S, Castaño GO, Burgueño AL, Gianotti TF, Rosselli MS, Pirola CJ. A nonsynonymous gene variant in the adiponutrin gene is associated with nonalcoholic fatty liver disease severity. *Journal of lipid research*. 2009;50(10):2111-6.
181. Valenti L, Al-Serri A, Daly AK, Galmozzi E, Rametta R, Dongiovanni P, et al. Homozygosity for the patatin-like phospholipase-3/adiponutrin I148M polymorphism influences liver fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2010;51(4):1209-17.
182. Rotman Y, Koh C, Zmuda JM, Kleiner DE, Liang TJ. The association of genetic variability in patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 (PNPLA3) with histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2010;52(3):894-903.
183. Carlsson B, Lindén D, Brolén G, Liljeblad M, Bjursell M, Romeo S, et al. Review article: the emerging role of genetics in precision medicine for patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2020;51(12):1305-20.
184. 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.
185. Smagris E, BasuRay S, Li J, Huang Y, Lai KM, Gromada J, et al. Pnpla3^{I148M} knockin mice accumulate PNPLA3 on lipid droplets and develop hepatic steatosis. *Hepatology*. 2015;61(1):108-18.
186. Dong XC. PNPLA3-A Potential Therapeutic Target for Personalized Treatment of Chronic Liver Disease. *Frontiers in medicine*. 2019;6:304.
187. 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. *Journal of hepatology*. 2011;55(1):145-53.
188. Wang Y, Kory N, BasuRay S, Cohen JC, Hobbs HH. PNPLA3, CGI-58, and Inhibition of Hepatic Triglyceride Hydrolysis in Mice. *Hepatology*. 2019;69(6):2427-41.
189. Yang A, Mottillo EP, Mladenovic-Lucas L, Zhou L, Granneman JG. Dynamic interactions of ABHD5 with PNPLA3 regulate triacylglycerol metabolism in brown adipocytes. *Nature metabolism*. 2019;1(5):560-9.
190. Salameh H, Hanayneh MA, Masadeh M, Naseemuddin M, Matin T, Erwin A, et al. PNPLA3 as a Genetic Determinant of Risk for and Severity of Non-alcoholic Fatty Liver Disease Spectrum. *Journal of clinical and translational hepatology*. 2016;4(3):175-91.
191. Walker RW, Belbin GM, Sorokin EP, Van Vleck T, Wojcik GL, Moscati A, et al. A common variant in PNPLA3 is associated with age at diagnosis of NAFLD in patients from a multi-ethnic biobank. *Journal of hepatology*. 2020;72(6):1070-81.
192. Min YL, Bassel-Duby R, Olson EN. CRISPR Correction of Duchenne Muscular Dystrophy. *Annual review of medicine*. 2019;70:239-55.
193. Frangoul H, Altshuler D, Cappellini MD, Chen YS, Domm J, Eustace BK, et al. CRISPR-Cas9 Gene Editing for Sickle Cell Disease and β -Thalassemia. *The New England journal of medicine*. 2021;384(3):252-60.
194. Watters KE, Kirkpatrick J, Palmer MJ, Koblentz GD. The CRISPR revolution and its potential impact on global health security. *Pathogens and global health*. 2021;115(2):80-92.
195. Mullard A. PCSK9-lowering RNAi contender clears first phase III trial. *Nature reviews Drug discovery*. 2019;18(10):737.

8 Anhang

Genotyp	Nr.	Perilipin 1		Perilipin 2		Perilipin 3		Perilipin 4		Perilipin 5		PNPLA3	
		Pos. (%)	Score	Pos. (%)	Score	LT (%)	Score	LT (%)	Score	LT (%)	Score	LT (%)	Score
G/G	68	45	2	100	2,5	30	1,5	25	1,5	15	1	80	1
	69	55	2	65	2	25	2	20	2	25	1	70	1,5
	70	65	2,5	100	2,5	35	1,5	15	1	20	1	5	1
	71	15	1,5	100	3	35	1,5	45	1,5	35	1	70	1
	72	50	2	100	2,5	25	1,5	30	2	40	1	10	1,5
	73	75	3	100	3	20	2,5	25	3	20	2	5	1
C/G	74	70	2,5	100	2	30	1,5	20	2	25	1	5	1
	75	45	3	95	2,5	35	2	25	1	30	1	75	1
	76	40	2	100	2	35	1,5	20	1	25	1	5	1
	77	60	2	95	2,5	35	2,5	25	2	35	1,5	5	1
	78	90	3	100	3	25	2	25	2	10	1	10	1
	79	5	1	95	3	40	2	40	2	25	1,5	20	1
	80	50	3	95	2,5	25	2	25	1,5	20	3	80	1
	81	90	3	100	3	30	1,5	25	2	30	1	70	1,5
	82	60	2,5	100	3	25	1,5	20	2,5	15	1	95	1,5
	83	65	3	95	2	20	1,5	20	2	25	1	40	1,5
C/C	84	70	3	95	2,5	20	1,5	30	2	10	1,5	5	1
	85	45	2,5	95	3	25	2,5	20	1	25	1	20	2
	86	35	2	100	3	20	3	20	2	15	1	5	2
	87	60	3	95	2	35	3	30	2,5	15	1	5	0,5
	88	70	2,5	100	3	40	1,5	35	1,5	20	1	15	1
	89	45	2,5	100	2,5	35	2,5	30	2,5	15	1	10	1
	90	90	3	100	3	30	1,5	20	1	20	1	20	1,5

Tab. 23: **Auswertung der immunhistochemischen Färbungen im humanen NAFLD-/NASH-Kollektiv** (Proben Nr. 68-90). Die immunhistochemische Färbung von Perilipin 1-5 und PNPLA3 wurde ausgewertet (zu Antikörpern siehe Material und Methodenteil unter 3.10.2). Die Intensität der Färbung (*Score*) wurde von Perilipin 1-5 und PNPLA3 semiquantitativ analysiert mit 0=keine, 1=schwache, 2=deutliche und 3=sehr starke Färbung. Zudem wurde der Anteil Perilipin 1- und 2-positiver Hepatozyten am Parenchym in Prozent anhand der immunhistochemischen Färbungen von Perilipin 1 und 2 ermittelt. Hierbei wurde der Prozentanteil der für das jeweilige Protein positiven Hepatozyten beurteilt. Der Proteinanteil an LT der Perilipine 3, 4, 5 und PNPLA3 wurde anhand der jeweiligen immunhistochemischen Färbung in Prozent angegeben. Insgesamt wurden 23 NAFLD-/NASH-Proben analysiert, davon 6x *PNPLA3* G/G, 10x *PNPLA3* C/G und 7x *PNPLA3* C/C.

9 Danksagung

Prof. Dr. Beate K. Straub möchte ich sehr für die anspruchsvolle und interessante Promotionsthematik sowie die hervorragende Betreuung danken. Danke für die stete Unterstützung bei der praktischen Durchführung und die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens.

Dr. Hagen Witzel danke ich sehr für die engagierte und uneingeschränkte Unterstützung sowie die stete Hilfsbereitschaft auch bei der Korrektur meiner Dissertation. Danke für die geduldige Einarbeitung in die umfangreiche praktische Arbeit im Labor, insbesondere für die Hilfe bei der zeitaufwendigen Genomeditierung mit CRISPR/Cas9 und die Einweisung am konfokalen Mikroskop u. a. zur Analyse der Interaktion von PNPLA3 und ATGL.

Prof. Dr. Wilfried Roth danke ich für die Möglichkeit, am Institut für Pathologie der Universitätsmedizin Mainz meine Promotionsarbeit anfertigen zu dürfen.

Der Arbeitsgruppe Straub möchte ich für die hilfsbereite und angenehme Arbeitsatmosphäre danken. Insbesondere danke ich Sabine Jakubowski für das Aufbereiten des humanen FFPE-Lebergewebes für die immunhistochemischen Analysen der Perilipine und PNPLA3. Dr. Dirk Ridder und den MitarbeiterInnen der Gewebebank danke ich für die Bereitstellung des kryokonservierten humanen NAFLD-Gewebes für die proteinbiochemischen und molekulargenetischen Analysen.

Der Arbeitsgruppe Roth danke ich für die kameradschaftliche gemeinsame Arbeit im Labor und für die vielen hilfreichen Tipps. Nina Hörner möchte ich für das Anfertigen der Gewebeschnitte für die Leberfrischgewebekultur danken. Zudem bedanke ich mich bei den MitarbeiterInnen des Schnellschnitts für die Unterstützung bei der Arbeit mit dem Kryostat.

Ein großer Dank gilt meinen Eltern und meiner Familie, die mir das Studium ermöglichten und mich jederzeit unterstützten.