

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II  
der Universität Würzburg  
Direktor: Professor Dr. med. Hermann Einsele

# **Vitamin D-Substitution im Adipositas-Mäuse-Modell**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

**Lisa Gildein**

aus Stuttgart

Würzburg, Februar 2019



Referent bzw. Referentin: Prof. Dr. med. Andreas Geier  
Korreferent bzw. Korreferentin: Prof. Dr. med. Martin Fassnacht  
Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 23.01.2020

Die Promovendin ist Ärztin.

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Problematik Adipositas .....	1
1.1.1 Adipositas als schnell wachsendes, weltweites Problem .....	1
1.1.2 Übergewicht und Adipositas sind Teil des metabolischen Syndroms und verursachen schwerwiegende Folgeerkrankungen .....	1
1.1.3 NAFLD als hepatische Manifestation des metabolischen Syndroms .....	2
1.1.4 Chronische Entzündungsprozesse des Fettgewebes gehen mit Adipositas einher und scheinen eine wichtige Rolle für das Auftreten von Folgeerkrankungen zu spielen .....	3
1.1.5 Assoziation zwischen Adipositas/NAFLD und niedrigen Serum Vitamin D Spiegeln .....	5
1.2 Vitamin D .....	6
1.2.1 Synthese .....	6
1.2.2 Wirkung .....	7
1.2.3 Funktionen .....	7
1.2.4 Ein Großteil der deutschen Bevölkerung leidet unter Vitamin D Mangel .....	7
1.2.5 Vitamin D Substitution als möglicher Therapieansatz der Adipositas und NAFLD .....	8
<b>2. Methoden</b> .....	<b>10</b>
2.1 Tierzucht .....	10
2.1.1 Diät .....	10
2.2 Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) .....	10
2.2.1 Material .....	10
2.2.2 Prinzip .....	11
2.2.3 Vorbereitung .....	12
2.2.4 Durchführung .....	14

2.2.5	Auswertung .....	15
2.3	Histologie .....	16
2.3.1	Material .....	16
2.3.2	Prinzip .....	16
2.3.3	Vorbereitung .....	16
2.3.4	HE-Färbung .....	17
2.4	Western Blot .....	18
2.4.1	Material .....	18
2.4.2	Prinzip .....	19
2.4.3	Durchführung .....	19
2.4.4	Auswertung .....	22
2.5	Enzyme-linked Immunosorbent Assay .....	22
2.5.1	Material .....	22
2.5.2	Prinzip .....	22
2.5.3	Insulin ELISA .....	23
2.5.4	25-OH-Vitamin-D ELISA .....	24
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>25</b>
3.1	Generelle physiologische Effekte der Vitamin D <sub>3</sub> -Substitution im Diät-induzierten Adipositas-Mäuse-Modell .....	25
3.1.1	Effekt der Vitamin D <sub>3</sub> -Substitution auf die Zunahme des Körpergewichts und der Körperfettmasse unter Hochfett-Diät .....	25
3.1.2	Effekt der Vitamin D <sub>3</sub> -Substitution auf den Vitamin D <sub>3</sub> Serum-Spiegel .....	27
3.2	Einfluss der Vitamin D <sub>3</sub> -Substitution auf die Expression von Adipozytokinen im weißen Fettgewebe .....	28
3.2.1	Leptin und Adiponectin .....	29
3.2.2	Resistin und pro-inflammatorische Zytokine .....	31
3.2.3	Mögliche anti-inflammatorische Wirkung des Vitamin D unter Hochfett-Diät .....	33
3.3	Einfluss der Vitamin D <sub>3</sub> -Behandlung auf die Infiltration von Makrophagen in das weiße Fettgewebe adipöser Mäuse .....	34

3.3.1	Hypoxie als möglicher Auslöser der Makrophageninfiltration	34
3.3.2	Spezifische Signalstoffe locken Makrophagen ins Fettgewebe der übergewichtigen Mäuse .....	35
3.3.3	Die Adipositas-assoziierte Fettgewebs-Entzündung bewirkt einen phänotypischen Switch in der Makrophagenpopulation.....	36
3.3.4	‘Kronen-ähnliche Strukturen’ als histologischer Marker für Adipozyten-Degradation.....	39
3.4	Einfluss des Vitamin D <sub>3</sub> auf die Entwicklung einer Insulinresistenz im Adipositas-Maus-Modell.....	40
3.4.1	Definition Insulinresistenz .....	40
3.4.2	Substitution von Vitamin D <sub>3</sub> zeigt keinen positiven Einfluss auf die Entwicklung einer Insulinresistenz im Adipositas-Maus-Modell .....	41
<b>4.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>46</b>
4.1	Die Maus als etablierter Organismus zur Untersuchung von Adipositas und metabolischem Syndrom.....	46
4.2	Vitamin D <sub>3</sub> -Defizienz führt zur Resistenz gegenüber Diät-induzierter Adipositas, während eine Überexpression des Vitamin D-Rezeptors im weißen Fettgewebe die Fettgewebsexpansion fördert.....	46
4.3	In Anbetracht vorliegender Studien führt die Kombination aus Hochfett- und Hoch-Vitamin D <sub>3</sub> -Diät bei schlanken Mäusen zu einer geringeren Gewichtszunahme als die Gabe einer reinen Hochfett-Diät.....	48
4.4	Durch die Hypertrophie als hauptsächlichen Mechanismus der Fettgewebsexpansion unter Hochfett- und Hoch-Vitamin D <sub>3</sub> -Diät kommt es zu verstärkter Hypoxie im epididymalen Fettgewebe dieser Mäuse.....	49
4.5	Erhöhtes Calcium im Serum ist als Ursache der beschriebenen Effekte eher unwahrscheinlich.....	49

4.6	Literatur und Betrachtung der pro-inflammatorischen Zytokine deuten in Richtung einer anti-inflammatorischen Wirkung der Hochdosis-Vitamin D-Substitution unter Hochfett-Diät .....	50
4.7	Makrophagen-Switch in Richtung pro-inflammatorischer Population deutet auf ausgeprägtere Fettgewebs-Inflammation unter Hochfett- und Hoch-Vitamin D <sub>3</sub> -Diät hin .....	51
4.8	Vitamin D kann sich im gewählten Modell nicht positiv auf die Insulinresistenz der übergewichtigen Mäuse auswirken .....	52
4.9	Der Effekt des substituierten Vitamin D <sub>3</sub> erscheint nicht ausreichend um die negativen Effekte der stärkeren Gewichtszunahme auszugleichen .....	53
4.10	Beim schlanken Menschen zeigt sich eine Korrelation von niedrigen Vitamin D-Spiegeln und Insulinresistenz.....	54
4.11	In Bezug auf die NAFLD kann eine unterstützende Therapie mittels Vitamin D <sub>3</sub> -Supplementation nützlich sein.....	55
4.12	Fazit.....	56
4.13	Stärken der Arbeit.....	57
4.14	Schwächen der Arbeit.....	58
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>59</b>
<b>6.</b>	<b>Quellenverzeichnis .....</b>	<b>61</b>

## Widmung

Für meine Eltern, dank deren Unterstützung wenig je unmöglich schien.

## 1. Einleitung

### 1.1 Problematik Adipositas

#### 1.1.1 Adipositas als schnell wachsendes, weltweites Problem

Adipositas stellt ein immer größer werdendes Problem der heutigen Weltbevölkerung dar. Die Prävalenz von Übergewicht und Adipositas (lat. adeps: `Fett`, *Fettleibigkeit*) hat sich im Zeitraum von 1975 bis 2016 beinahe verdreifacht.

Definiert wird Übergewicht von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) durch einen Body Mass Index (BMI; engl.: *Körpermasse-Index*) (=Körpergewicht in Kilogramm/(Größe in Metern)<sup>2</sup>) von  $\geq 25$  kg/m<sup>2</sup>. Ab 30 kg/m<sup>2</sup> spricht man von Adipositas, die sich in drei Grade unterteilt: [1]

Adipositas Grad I:	BMI 30-34,9 kg/m <sup>2</sup>
Adipositas Grad II:	BMI 35-39,9 kg/m <sup>2</sup>
Adipositas Grad III/ maligne Adipositas	BMI $\geq 40$ kg/m <sup>2</sup>

2016 litten ca. 1,9 Mrd. Erwachsene ( $\geq 18$  Jahre) weltweit unter Übergewicht; 650 Mio. davon unter Adipositas. Und auch unter Kindern handelt es sich hierbei um ein weit verbreitetes Problem. 2016 waren 41 Mio. der Kinder unter 5 Jahren weltweit übergewichtig oder adipös [2].

Laut aktuellster Zahlen des Statistischen Bundesamtes waren in Deutschland 2017 rund 52% der erwachsenen Bevölkerung übergewichtig, 16% adipös [3].

#### 1.1.2 Übergewicht und Adipositas sind Teil des metabolischen Syndroms und verursachen schwerwiegende Folgeerkrankungen

Die Problematik des Übergewichts besteht in der Ausbildung eines metabolischen Syndroms, auch als Wohlstandssyndrom bezeichnet. Hierbei handelt es sich um die Kombination mehrerer Risikofaktoren, die durch Überernährung und mangelnde Bewegung entstehen und für bestimmte



Erkrankungen, wie z.B. Atherosklerose oder Diabetes mellitus Typ 2 prädisponieren.

Definiert wird das metabolische Syndrom durch eine abdominelle Adipositas<sup>1</sup> in Kombination mit mindestens zwei der folgenden Faktoren:

- Triglyzeride im Serum > 150 mg/dl
- HDL-Cholesterin im Serum < 50 mg/dl (w) bzw. < 40 mg/dl (m)
- Blutdruck > 130/85 mmHg
- Nüchtern-Plasmaglukose > 100 mg/dl [4]

### 1.1.3 NAFLD als hepatische Manifestation des metabolischen Syndroms

Auch die Nichtalkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD, engl.: *Nonalcoholic fatty liver disease*) zählt zum Kreis der Adipositas-assoziierten Erkrankungen und wird als hepatische Komponente des metabolischen Syndroms bezeichnet [5].

NAFLD ist definiert durch den Nachweis einer Leberverfettung (Fettanteil von 5-10% des Lebergewichts oder Makrosteatose der Hepatozyten) in Bildgebung oder Histologie sowie den Ausschluss einer Ursache der sekundären Leberverfettung wie beispielsweise übermäßiger Alkoholkonsum oder erbliche Erkrankungen [6, 7]. Zusammengefasst werden unter dem Begriff Nichtalkoholische Fettlebererkrankung zudem alle Schweregrade von der meist asymptomatisch verlaufenden Hepatosteatose über die Steatohepatitis bis hin zu Leberfibrose und –zirrhose [8].

Die Gefahr der reinen Fettleber besteht in der Weiterentwicklung zur Nichtalkoholischen Steatohepatitis (NASH, engl.: *Nonalcoholic steatohepatitis*). Diese Zustandsverschlechterung im Sinne der Entstehung einer chronischen Inflammation betrifft ca. 5-20% der Steatose-Patienten. Verantwortlich hierfür ist ein mehrstufiger Prozess, an dessen Beginn die durch Insulinresistenz verursachte Leberverfettung steht und in dessen Verlauf es zu Leberzellschäden, Inflammation und bindegewebigem Umbau kommt. Als

---

<sup>1</sup> Taillenumfang  $\geq 94$  cm beim Mann (m) bzw.  $\geq 80$  cm bei der Frau (w) oder einen BMI  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>

hierfür ursächlich gelten oxidativer Stress und Lipidperoxidation. Der infolge der Inflammation entstehende bindegewebige Umbau des Leberparenchyms ist im Stadium der Leberfibrose noch teilweise reversibel und zumeist asymptomatisch. Schreitet dieser Prozess jedoch weiter voran und sorgt für die Entstehung von Regeneratknoten und Bindegewebssepten, die sowohl Blut- als auch Gallentransportwege stören, so spricht man vom Stadium der Leberzirrhose (betrifft ca. 10-20% der NASH-Patienten). Der hierbei stattfindende großflächige Untergang funktionellen Lebergewebes macht sich durch eine verminderte Synthese- und Entgiftungsfunktion der Leber bemerkbar und äußert sich klinisch u.a. durch Gerinnungsstörungen und portale Hypertension. Ein Entartungsrisiko im Sinne der Entstehung eines hepatozellulären Karzinoms betrifft zudem ca. 2% der Zirrhose-Patienten pro Jahr [9-12].

Durch immer weiter steigende Prävalenzen der Adipositas entwickelt sich die NAFLD zur häufigsten chronischen Lebererkrankung der westlichen Welt. In Europa betrifft sie heute bereits 20-30% der Normalbevölkerung [13].

Beteiligt an der am Beginn des Prozesses stehenden Einlagerung von Fett in den Hepatozyten sind mehrere pathophysiologische Risikofaktoren. So wurde u.a. beschrieben, dass es über eine Entzündung des Darms sowie einen bakteriellen Überwuchs zu einer Verschlechterung der intestinalen Barriere kommt, die verantwortlich für die Translokation von Bakterien und bakteriellen Produkten (Endotoxinen) ist. Diese im Blutkreislauf zirkulierenden Toxine führen gemeinsam mit der Fetteinlagerung in der Leber - in Folge einer vermehrten, generalisierten Lipolyse sowie einer dadurch erhöhten Menge zirkulierender Blutfette - zum bereits erwähnten oxidativen Stress und zur Lipotoxizität [14, 15].

#### **1.1.4 Chronische Entzündungsprozesse des Fettgewebes gehen mit Adipositas einher und scheinen eine wichtige Rolle für das Auftreten von Folgeerkrankungen zu spielen**

In den vergangenen Jahrzehnte erkannte man, dass es sich bei Adipositas nicht nur um die Hyperplasie (Zunahme der Zellzahl) und Hypertrophie (Zunahme des Zellvolumens) weißer Adipozyten handelt, sondern auch um

eine chronische, niedriggradige Inflammation des Organismus. Das erste bekannte vom Fettgewebe sezernierte, pro-inflammatorische Zytokin TNF $\alpha$  (Tumor necrosis factor  $\alpha$ ) wurde schnell um eine Vielzahl weiterer Zytokine ergänzt, die an der Entstehung und Aufrechterhaltung dieser chronischen Inflammation beteiligt sind (siehe Tab. 1) [16].

Faktoren	Metabolische Regulation	Effekte
TNF $\alpha$	erhöht bei Adipositas	pro-inflammatorisch; fördert Insulinresistenz
IL-6	erhöht bei Adipositas	fördert Insulinresistenz
Leptin	erhöht bei Adipositas	verschiedene Effekte auf das Immunsystem; zentrale Appetit-Minderung; stimuliert Fettsäureoxidation
Adiponectin	vermindert bei Adipositas	anti-inflammatorisch; fördert Insulinsensitivität; stimuliert Fettsäureoxidation
Resistin	variabel bei Adipositas	fördert Insulinresistenz; reguliert Nüchternblutzucker
IL-1	erhöht bei Hyperglykämie	pro-inflammatorisch; reguliert Insulinsekretion; involviert in zentrale Leptin-Wirkung
IL-8	erhöht bei Adipositas	pro-atherogen
IL-10	erhöht bei Adipositas	anti-inflammatorisch; fördert Insulinsensitivität
MCP-1	erhöht bei Adipositas	pro-atherogen fördert Insulinresistenz
M-CSF	erhöht bei Adipositas	Monozyten/Makrophagen-Differenzierung; fördert Adipozyten-Wachstum
TGF $\beta$	erhöht bei Adipositas	unterdrückt Adipozytendifferenzierung und Fettgewebs-Entwicklung; Rolle bei Regulation von Atherosklerose
C-reaktives Protein	erhöht bei Adipositas	pro-inflammatorisch, atherogen; Risikofaktor für Diabetes mellitus Typ 2

Tab. 1: Übersicht über einige bei der Inflammation des Fettgewebes relevante Zytokine [17]

Die Rolle des Fettgewebes beschränkt sich also bei weitem nicht nur auf die Speicherung von Energiequellen in Form von Lipiden. Vielmehr ist es auch ein endokrinologisch und immunologisch aktives Organ, das in gesundem Zustand u.a. an der Aufrechterhaltung stabiler Blutzucker- und -fettspiegel sowie der Regulation des Hungergefühls beteiligt ist [18, 19].

Das zwischen Organismus und Fettgewebe bestehende Gleichgewicht wird durch starkes Übergewicht gestört. Als Grund hierfür werden u.a. ER-Stress (ER: endoplasmatisches Retikulum) und Fettgewebshypoxie diskutiert [20-22]. Die Folge können gestörte Insulintoleranz (Diabetes mellitus Typ 2), kardiovaskuläre Erkrankungen (koronare Herzkrankheit, Schlaganfall etc.) und Tumorerkrankungen (z.B. von Kolon/Rektum, Endometrium, Mamma, Prostata) sein [23-25].

In Bezug auf die Leber spielt v. a. die im Rahmen der niedriggradigen Inflammation entstehende Insulinresistenz eine Rolle. Die in den Adipozyten über Insulin regulierte Herabsetzung der Lipolyse findet mit zunehmender Insulinresistenz vermindert statt [26]. Folglich kommt es zu einer vermehrten Freisetzung freier Fettsäuren in den Organismus, die in der Leber aufgenommen werden und gemeinsam mit einer verminderten Fettsäureoxidation und einem verminderten Triglyzerid-Export zur intrahepatischen Fettakkumulation führen [15]. An der Verschlechterung der Situation im Sinne der Entstehung einer Steatohepatitis sind dann wiederum die im Zuge der Fettgewebsinflammation freigesetzten pro-inflammatorischen Zytokine beteiligt. Das in die Blutzirkulation entlassene TNF $\alpha$  begünstigt u.a. in der Leber die Entstehung einer Entzündungsreaktion [27].

#### **1.1.5 Assoziation zwischen Adipositas/NAFLD und niedrigen Serum Vitamin D Spiegel**

In Zusammenhang mit der weltweiten Problematik Adipositas und den steigenden Zahlen NAFLD-Erkrankter ist auch das Vitamin D immer weiter in den Fokus der Wissenschaft gerückt. In klinischen Studien zeigte sich beim Menschen nicht nur eine negative Korrelation zwischen Körpergewicht und Serum-Vitamin D-Spiegeln, auch ein Zusammenhang zwischen niedrigem Serum-Vitamin D und NAFLD konnte gezeigt werden. So neigen NAFLD-Patienten mit einer um 26% erhöhten Wahrscheinlichkeit zur Vitamin D-Defizienz (Definition s.u. 1.2.4) [28-30]. Auch auf histologischer Ebene konnte ein Zusammenhang zwischen niedrigen Vitamin D-Spiegeln und dem Ausmaß an Leberverfettung, Nekroinflammation (Nekrose + Inflammation) und Fibrose beobachtet werden [31]. Aus diesem Grund soll die Physiologie des Vitamin D<sub>3</sub>

und seine potenzielle Rolle in der Entstehung von Adipositas und NAFLD im Folgenden genauer betrachtet werden.

## **1.2 Vitamin D**

### **1.2.1 Synthese**

Vitamin D zählt zur Gruppe der fettlöslichen Vitamine. Definitionsgemäß handelt es sich bei Vitaminen um Stoffe, die der Körper nicht selbst synthetisieren kann. Vitamin D ist jedoch kein Vitamin im herkömmlichen Sinne, da es nicht mit der Nahrung aufgenommen werden muss, sondern vom Körper selbst synthetisiert werden kann. Die hierfür notwendige Vorstufe 7-Dehydrocholesterin liegt beim Menschen in Stratum spinosum und basale der Epidermis vor. Durch auf die Haut treffende UVB-Strahlung wird 7-Dehydrocholesterin bei Sonnenexposition über eine fotochemische Reaktion und den Zwischenschritt über das instabile Prävitamin D<sub>3</sub> zu Cholecalciferol -auch als Vitamin D<sub>3</sub> bezeichnet- umgewandelt. Von der Haut gelangt das Vitamin D<sub>3</sub>, gebunden an Vitamin D bindendes Protein (VDBP), zur Leber. In den Hepatozyten findet eine Hydroxylierung an Position C25 statt. Das so entstandene 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub> (auch 25-Hydroxycholecalciferol) dient als Speicherform, die ebenfalls an VDBP gebunden in der Blutbahn zirkuliert. 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub> bildet den größten Anteil des Steroids im Organismus. Um zur hormonell aktivsten Form des Vitamin D<sub>3</sub> zu werden muss eine weitere Hydroxylierung (an C1) erfolgen. Diese Herstellung von 1,2-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (auch 1,2-Dihydroxycholecalciferol oder Calcitriol genannt) erfolgt bei Bedarf in den Glomeruli der Niere. Hierfür adäquate Reize sind unabhängig voneinander ein erhöhter Parathormonspiegel sowie erniedrigte Calcium- oder Phosphatspiegel [32-35].

Neben der beschriebenen endogenen Synthese ist auch eine orale Aufnahme des Vitamin D mit der Nahrung möglich. Dies betrifft zum Einen das von Pflanzen und Pilzen gebildete Vitamin D<sub>2</sub> (Ergocalciferol). Zum Anderen enthalten auch tierische Produkte wie z.B. Lachs, Hühnereier oder Milch

Vitamin D<sub>3</sub>. Es wird ebenso wie das subkutan gebildete Vitamin D<sub>3</sub> zur Leber transportiert und dort hydroxyliert [36].

### **1.2.2 Wirkung**

Seine Wirkung vermittelt das Calcitriol über den Vitamin D-Rezeptor (VDR). Nach Ligandenbindung bildet VDR einen Heterodimer mit dem Retinoid-X-Rezeptor RXR. Dieser Komplex ist in der Lage in den Zellkern zu dislozieren und dort an sog. „Vitamin D response elements“ (engl.: *Vitamin D-Antwortelemente*) zu binden, die sich in den Promoterregionen verschiedener Zielgene befinden [37]. Bis zu 3% der Gene im menschlichen und murinen Genom können so über Calcitriol und den nahezu ubiquitär vorkommenden Vitamin D-Rezeptor reguliert werden [38, 39].

### **1.2.3 Funktionen**

Die am längsten bekannte Funktion des Calcitriols ist dessen Rolle im Calcium- und Phosphathaushalt. Es ist imstande den Calciumspiegel über drei verschiedene Mechanismen zu erhöhen: über die Förderung der intestinalen Aufnahme, über eine Erhöhung der renalen Resorption sowie über eine vermehrte Freisetzung aus dem Knochen über Stimulation der Osteoklastogenese oder die Aktivierung inaktiver Osteoklasten [34].

Doch auch eine Vielzahl extraossärer (nicht-klassischer) Funktionen ist in den letzten Jahren immer weiter in den Fokus der Aufmerksamkeit gerückt, u.a. eine Modulation der angeborenen und adaptiven Immunabwehr. So wird heute eine Rolle des Vitamin D in zahlreichen pathologischen Prozessen wie dem metabolischen Syndrom, Krebs- oder kardiovaskulären Erkrankungen diskutiert [40].

### **1.2.4 Ein Großteil der deutschen Bevölkerung leidet unter Vitamin D Mangel**

Wie bereits erwähnt, lässt sich ein Zusammenhang zwischen niedrigen Vitamin D-Serumspiegeln und dem Vorkommen von Adipositas bzw. NAFLD beobachten. Es scheint also von Bedeutung zu sein, dass in Deutschland rund 60% der Bevölkerung einen zu niedrigen Vitamin D-Spiegel aufweisen. Laut

Institute of Medicine (IOM; engl.: *Institut der Medizin*) handelt es sich bei der Defizienz um Serumlevel des 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub> von unter 12 ng/ml bzw. 30 nmol/l. Sie kann zu Störungen des Calcium- und/oder Phosphathaushaltes sowie des Knochenstoffwechsels und so zu Rachitis bzw. Osteomalazie führen. Von einer Insuffizienz spricht man bei Serumleveln von 12-20 ng/ml bzw. 30-50 nmol/l. In diesem Ausmaß erniedrigte Werte gelten als inadäquat für die Knochen- und generelle Gesundheit ansonsten gesunder Individuen [41].

Der Bedarf an exogen zugeführtem Vitamin D beträgt bei fehlender endogener Synthese für Jugendliche und Erwachsene 20 µg/d. Durchschnittlich werden durch die Ernährung 2-4 µg/d aufgenommen; bei deutschen Männern im Schnitt 2,8 µg/d, bei deutschen Frauen ca. 2,3 µg/d [42, 43]. Der restliche Anteil muss von der endogenen Synthese abgedeckt werden, die jedoch von vielen Faktoren (Breitengrad, Jahres- und Tageszeit, Witterung, Kleidung, Aufenthaltsdauer im Freien, Hauttyp) abhängig ist und somit die Serumlevel eines jeden Menschen sehr individuell gestaltet [44].

### **1.2.5 Vitamin D Substitution als möglicher Therapieansatz der Adipositas und NAFLD**

Der vorherrschende Vitamin D-Mangel und die möglichen Auswirkungen auf Vorkommen und Ausmaß von NAFLD legen eine Vitamin D-Substitution als Therapieansatz nahe.

Möglich ist eine Substitution prinzipiell über eine vermehrte UVB-Exposition oder orale Präparate. Laut Deutscher Gesellschaft für Ernährung (DGE) erscheint es sinnvoll, die Differenz zwischen dem Bedarf von 20 µg/d und der durchschnittlichen Aufnahme über Ernährung und Sonnenexposition zu schließen. Anhaltspunkt hierfür sollte die 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub>-Serumkonzentration sein. Denkbar wäre jedoch auch ein therapeutischer Nutzen bei Überschreiten dieser Vitamin D-Spiegel-Norm.

So erschien es sinnvoll, den möglichen therapeutischen Nutzen einer Vitamin D Substitution im Rahmen von Adipositas und NAFLD im Detail zu erforschen. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Fragestellung im Mausmodell mit einer Adipositas-verursachenden Hochfettdiät experimentell untersucht. Es soll weiter

betrachtet werden ob sich eine Erhöhung des Vitamin D-Serumspiegels hemmend auf die Inflammation des Fettgewebes und so positiv auf die mit Adipositas einhergehenden Veränderungen des Organismus bzw. im Speziellen des Fettgewebes und der Leber auswirkt



## 2. Methoden

### 2.1 Tierzucht

Für die Arbeit wurden kommerziell erhältliche, wildtypische C57BL/6J Männchen (Charles River) verwendet. Das Aktenzeichen der Tierversuchsgenehmigung lautet 55.2-2531.01-77/12 (Regierung von Unterfranken)

Auskunft über die weiteren Details des Versuches bietet Kapitel 3.1.

#### 2.1.1 Diät

Die Auswahl der Diät fiel auf eine Hochfett-Diät um ein schnellen Anstieg des Körpergewichtes zu erreichen. Die Kontroll-Gruppe erhielt die unten genannte Niedrigfett-Diät mit dem Ziel kein zusätzliches Gewicht zuzunehmen.

Diät	Zusammensetzung	Hersteller
Hochfett-Diät (D12492)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Protein 24,1%</li> <li>- Kohlenhydrate 25,3%</li> <li>- Fett 34,6% (primäre Fettquelle: Schweineschmalz)</li> <li>- Vitamin A 2400 IU/kg Diät</li> </ul> <p>Dies entspricht einem kcal-Anteil des Fettes von 60%.</p>	Ssniff Spezialdiäten GmbH (Soest, Germany)
Niedrigfett/Kontroll-Diät	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Protein 20%</li> <li>- Kohlenhydrate 62,6%</li> <li>- Fett 5%</li> <li>- Vitamin A 2400 IU/kg Diät</li> </ul> <p>Dies entspricht einem kcal-Anteil des Fettes von ca. 10%.</p>	Ssniff Spezialdiäten GmbH (Soest, Germany)

Tab. 2: Zusammensetzung der verwendeten Mäuse-Diäten

## 2.2 Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

### 2.2.1 Material

Material	Hersteller
NucleoSpin® RNA-Protokoll	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co.KG (Düren, Deutschland)
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Life Technologies (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA)
SYBR Green Mastermix	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)

### 2.2.2 Prinzip

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, engl.: *polymerase chain reaction*) ist eine Methode zur Vermehrung von copy (engl.: *Kopie*) Desoxyribonukleinsäure (kurz: cDNA), die in vorherigen Schritten aus zellulärer messenger (engl.: *Botschafter*) Ribonukleinsäure (kurz: mRNA) gewonnen wurde (siehe Abschnitt 2.2.3.3). Dies ermöglicht die Quantifizierung intrazellulär vorkommender mRNA eines bestimmten Gens bzw. Genabschnitts. Die eigentliche Polymerase-Kettenreaktion setzt sich aus drei Schritten zusammen.

- 1.) **Denaturierung:** Hierbei wird die doppelsträngige DNA in ihre Einzelstränge aufgetrennt. Dies geschieht bei einer Temperatur von 95°C, bei welcher die die DNA-Stränge zusammenhaltenden Wasserstoffbrücken aufgebrochen werden.
- 2.) **Annealing** (engl.: *Kühlen*): An die so getrennten Stränge können nach Abkühlung auf 60°C die für das zu untersuchende Gen spezifischen Primer anbinden, die den Ausgangspunkt für die Replikation der DNA darstellen und die exakte Stelle des Replikationsbeginns festlegen.
- 3.) **Elongation:** Von diesem Ausgangspunkt aus wird nun ein neuer DNA-Strang synthetisiert. Als Vorlage (Template) dient hierbei der bereits vorhandene DNA-Einzelstrang.

In jedem Zyklus kann die Menge der vorhandenen DNA auf diese Weise verdoppelt werden.

Die Vorteile der quantitativen Real Time-PCR (engl.: *Echtzeit-PCR*) gegenüber der herkömmlichen PCR liegen in der Möglichkeit den Fortschritt bereits während der Reaktion verfolgen zu können. Dadurch ist es möglich die ursprünglich vorhandene Menge des zu amplifizierenden DNA-Templates exakt zu quantifizieren. Ermöglicht wird dies durch Fluoreszenzfarbstoffe (im vorliegenden Fall SYBR Green), die die neusynthetisierten DNA-Doppelstränge markieren und so deren Vermehrung sichtbar machen.

## 2.2.3 Vorbereitung

### 2.2.3.1 RNA-Isolation

Bevor mRNA in cDNA umgeschrieben werden kann muss diese zunächst aus dem Gewebe isoliert werden. Dies erfolgte anhand des NucleoSpin® RNA-Protokolls der MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG (Düren, Deutschland). Die Isolation erfolgte nach Angaben des Herstellers. Je Probe wurden 40-50 mg epididymalen Fettgewebes verwendet.

### 2.2.3.2 RNA-Bestimmung

Die Bestimmung der RNA-Konzentration [ng/µl] erfolgte mithilfe des Nanodrop 2000 der Firma PEQLAB, VWR International GmbH (Erlangen, Deutschland).

### 2.2.3.3 cDNA-Herstellung

Die Umschreibung der RNA in cDNA erfolgte mithilfe des High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA). Pro Probe wurden 1 µg cDNA hergestellt. Hierzu wurden 10,5 µl der in H<sub>2</sub>O eluierten RNA mit 9,5 µl RT Master Mix vermischt und im PEQSTAR 96X der PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen, Deutschland) revers transkribiert.

Die so erstellten cDNA-Proben wurden anschließend im Verhältnis 1:3 und 1:15 mit Aqua dest. verdünnt und bei -20°C gelagert.

### 2.2.3.4 Primererstellung

Zur Erstellung der für die RT-PCR benötigten Primer wurde die entsprechende Gensequenz zunächst über „EnsemblGenomes“ (<http://www.ensembl.org/Mus-musculus/Info/Index>) bestimmt. Mithilfe des Programms „PerlPrimer“ ([perlprimer.sourceforge.net](http://perlprimer.sourceforge.net)) wurden aus den ermittelten Genomsequenzen mögliche Primerpaare ermittelt. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich forward- und reverse-Primer (engl.: *vor- und rückwärts gerichtete Primer*) in unterschiedlichen Exons befinden, um so die Amplifikation genomischer DNA auszuschließen. Um die Kompatibilität der Schmelztemperatur der gewählten Primer und des verwendeten PCR-Gerätes (ViiA™ 7) sicher zu stellen wurde „Primer Express 3.0“ (ThermoFisher Scientific

(Waltham, MA, USA)) benutzt. Die Schmelztemperatur aller verwendeten Primer lag zwischen 58 und 60°C. Bestellt wurden die Oligonukleotide bei der Microsynth AG (Balgach, Schweiz).

Folgende Primer kamen zur Anwendung:

Target	forward	reverse
mAdiponectin	GAACTTGTGCAGGTTGGATGG	TCTCACCCCTTAGGACCAAGAAG AC
mCcl2	CATCCACGTGTTGGCTCA	GATCATCTTGCTGGTGAATGAGT
mCcl7	GGATCTCTGCCACGCTTCTG	GTAGCTCTTGAGATTCTCTTGG G
mCd11c	GGTGTGCCCATCAGTTCCTT	TCTGGGAAGCCAAATACGACAC
mCd206	ATTGCACTTTGAGGGAAGCG	GCCTGATGCCAGGTTAAAGC
mF4/80	GATGAATTCCCGTGTGTTGGT	ACATCAGTGTTCCAGGAGACAC A
mGLUT4	CCCAGATACCTCTACATCATCCG	CAGGCGCTTTAGACTCTTTTCG
mHIF1 $\alpha$	ACACAGAAATGGCCCAGTGAG	GCTGACTTGATGTTTCATCGTCC
mIL1 $\alpha$	TTGGTTAAATGACCTGCAACA	GAGCGCTCACGAACAGTTG
mIL1 $\beta$	TTGACGGACCCCAAAGAT	GATGTGCTGCTGCGAGATT
mIRS1	CTTAGGCAGCAATGAGGGCA	AGGTCTTCATTCTGCTGTGATGT C
mLeptin	CATCAAGACCATTGTCACCAGG	ATAGACTGCCAGAGTCTGGTCC A
mOSM	TGCTCCAACCTTTCCTCTCAG	CAGGTTTTGGAGGCGGATA
mPDGF $\beta$	AGAGACTCCGTAGATGAAGATG GG	ATGAGCTTTCCAACCTCGACTCC
mPPIA	GCGTCTCCTTCGAGCTGTTT	AAGTCACCACCCTGGCACAT
mResistin	GCTTAAATTGCTGGACAGTCTCC	CAGTCTATCCTTGACACTGGC
mTGF $\beta$	GCTGAACCAAGGAGACGGAAT	GCTGATCCCGTTGATTTCCA
mTNF $\alpha$	CTACTCCCAGGTTCTCTTCAA	GCAGAGAGGAGGTTGACTTTC
mVEGF $\alpha$	TCACCATGCAGATCATGCG	TGCATTACATCTGCTGTGCT

Tab. 3: Übersicht über die im Versuchsaufbau verwendeten Primer

## 2.2.4 Durchführung

### 2.2.4.1 Auftragung

Auf einer 384-Well-Platte wurden pro Well je 1  $\mu\text{l}$  der verdünnten cDNA-Probe sowie 9  $\mu\text{l}$  eines Mastermixes gegeben. Die 9  $\mu\text{l}$  Mastermix setzen sich zusammen aus 3  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O, 5  $\mu\text{l}$  SYBR Green Mastermix von Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA), sowie jeweils 0,5  $\mu\text{l}$  des vorwärts bzw. rückwärts gerichteten Primers.

### 2.2.4.2 Ablauf

Nach Einbringen der Platte in das ViiA™ 7 Real-Time PCR System von Applied Biosystems der Firma ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA) wurde die Platte von initial 25°C mit 1,6°C/s auf 50°C erwärmt. Nach Beibehaltung der 50°C über 2 Minuten erfolgt ein erneuter Temperaturanstieg auf 95°C mit 1,6°C/s.

Es folgt das eigentliche PCR-Stadium, welches aus 40 identischen Zyklen besteht. Die zuvor erreichten 95°C werden hierbei für 1 Sekunde aufrechterhalten, ehe ein erneutes Absinken mit 1,6°C/s auf 60°C erfolgt, die für weitere 30s bestehen bleiben. Es folgt eine erneute Erwärmung mit 1,6°C/s auf 95°C und daraufhin die Wiederholung des Zyklus.

#### 2.2.4.2.1 Schmelzkurve

Um die Spezifität der Amplifikate zu sichern folgt der eigentlichen PCR eine Schmelzkurvenanalyse. Hierbei werden die Proben kontinuierlich von 60°C auf ca. 95°C erhitzt. Dies führt zu einer Auftrennung der DNA-Doppel- in Einzelstränge. Da hierbei DNA-Farbstoffe (SYBR Green) freigesetzt werden kommt es zu einem Abfall der Fluoreszenz. Da die Schmelztemperatur von DNA-Doppelsträngen im Wesentlichen von der Anzahl der enthaltenen Basenpaare abhängt und die Länge des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts exakt bekannt ist, können durch die Analyse der Schmelzkurve potenziell entstehende unspezifische PCR-Produkte vom eigentlichen „Target“ unterschieden werden. Voraussetzung hierfür ist, dass unspezifische Produkte (wie z.B. Amplifikate aus genomischer DNA), sich vom spezifischen Amplikon in der Anzahl ihrer Basenpaare entsprechend unterscheiden.

Im Falle des verwendeten ViiA™ 7 Real Time PCR Systems erfolgt die Erwärmung von 60°C auf 95°C mit 1,6°C/s. Nach 15 Sekunden bei 95°C erfolgt die Abkühlung auf 60°C (für 1 Minute) erneut mit 1,6°C/s sowie eine zweite Erwärmung mit 0,05°C/s auf 95°C mit gleichzeitiger Messung der SYBR Green-Fluoreszenz.

### 2.2.5 Auswertung

Ermittelt wird die Menge der durch mehrfache Replikation entstandenen cDNA mittels der hinzugefügten Fluoreszenzfarbstoffe. Die Stärke der vom Gerät gemessenen Fluoreszenz korreliert mit der Anzahl der entstandenen DNA-Doppelstränge.

Die von der zum Gerät gehörigen ViiA™ 7 Software ermittelten CT-Werte wurden mithilfe der  $\Delta\Delta$ CT-Methode weiterverarbeitet. Die Expressionen der einzelnen Zielgene wurde zur Ermittlung einer relativen Genexpression in Relation zu einem stabil exprimierten sog. „Housekeeping“-Gen (engl.: „*Haushalts-Gen*“), in diesem Falle der Peptidylprolyl Isomerase A (Ppia), gesetzt. Dieses kodiert für ein Mitglied der Familie der Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerasen, die als geschwindigkeitsbestimmender Schritt an der Proteinfaltung beteiligt sind. Darüber hinaus wurde die Genexpression jedes Gens für die Kontrollgruppe (LF+LVD, siehe unten) auf 1 gesetzt und alle anderen hierauf bezogen. Die so ermittelten relativen Genexpressionen wurden für die Erstellung von Graphen und die Ermittlung von Signifikanzen in ‚GraphPad Prism‘ von GraphPad Software, Inc. (La Jolla, CA, USA) übertragen.

Zunächst wurde die Normalverteilung der vier Gruppen mithilfe des Kolmogorovo-Smirnov-Tests überprüft. Im Falle vorhandener Normalverteilung ( $\alpha=0,05$ ) folgte der Vergleich zweier Gruppen mithilfe des ungepaarten T-Tests. Bei fehlender Normalverteilung wurde der Mann-Whitney-Test herangezogen.

Für die Signifikanzen ermittelter p-Werte galten folgende Werte:

\* :  $p < 0,05$

\*\* :  $p < 0,01$

\*\*\* :  $p < 0,001$

## 2.3 Histologie

### 2.3.1 Material

Verwendete Materialien
Formalin 4%
Aqua dest.
Ethanol 50%, 70%, 80%, 90%, 96%, 100%
Paraplast (Merck Millipore; Darmstadt, Deutschland)
Paraffin
Roti®-Histol (Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland)
Eosin G-Lösung 0,5% (Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland)
Hämalaun (Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland)
Roti®-Histokit (Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland)

### 2.3.2 Prinzip

Unter der Histologie (griechisch: ‚*Lehre vom Gewebe*‘) versteht man die mikroskopische Anatomie eines Gewebes. Verschiedene Färbungen bzw. Immunofluoreszenz ermöglichen die Untersuchung eines Gewebes nach speziellen Gesichtspunkten. Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung ermöglicht die Unterscheidung basophiler (u.a. Zellkern, Ribosomen, raues endoplasmatisches Retikulum) und azidophiler Strukturen (u.a. Zytoplasma, kollagene Fasern).

### 2.3.3 Vorbereitung

Um das zuvor bereits bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefrorene Fettgewebe für die histologische Aufarbeitung vorzubereiten wurde es zunächst über Nacht in Formalin 4% eingelegt und dadurch fixiert. Am nächsten Tag wurde das Gewebe dann für eine Stunde in Aqua dest. gewässert. Es folgte die Entwässerung des Gewebes

in aufsteigender Alkoholreihe: 50%, 70% und 80% für je 60 Minuten mit Erneuerung der Alkohollösung nach jeweils 30 Minuten und anschließend 90%, 96% und 100% für je 40 Minuten mit Erneuerung des Alkohols nach 20 Minuten. Anschließend wurden die Proben für eine Stunde bei 37°C in tertiäres Butanol gegeben. Über Nacht lagerten die Proben in Paraplast, ehe sie am nächsten Morgen in Paraffin eingebettet und zum Aushärten gelagert wurden.

Geschnitten wurden die Paraffinblöcke mithilfe eines Mikrotoms (Jung SM 2000R) in einer Dicke von 7 µm und auf mit genauer Gewebeidentifikation versehene Objektträger überführt.

Vor der Färbung wurden die Schnitte entparaffiniert. Hierzu erfolgte zunächst eine Erwärmung der mit Gewebe versehenen Objektträger bei 35°C für 30 Minuten. Auf 3x10 Minuten in Roti®-Histol eine absteigende Alkoholreihe mit je 2x5 min in 100%, 96%, 80%, 70% und 50% Ethanol, sowie abschließenden 2x5 Minuten in Aqua dest.

#### **2.3.4 HE-Färbung**

##### **2.3.4.1 Durchführung**

Zur Färbung herangezogen wurde jeweils ein Gewebeschnitt pro Tier. Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung erfolgte mittels Eosin G-Lösung 0,5% wässrig. Die entparaffinierten Gewebeschnitte wurden zunächst für 3 Minuten mit Hämalan (sauer nach Mayer) bedeckt, kurz mit Aqua dest. abgespült und anschließend für 15 Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut. Einer erneuten zweiminütigen Spülung mit Aqua dest. folgte die Inkubation (3 Minuten) mit Eosin G-Lösung (Zugabe von 1 Tropfen Eisessig pro 100 ml Lösung) sowie das Abspülen der Lösung mit Leitungswasser. Die anschließende Entwässerung erfolgte in drei Schritten mit 70-, 96- und 100-prozentigem Ethanol für je 30 Sekunden. Als Intermedium wurde Roti®-Histol dreimalig à 1 Minute verwendet und die Gewebeschnitte letztlich in Roti®-Histokit eingedeckt und mit einer Deckplatte von Menzel-Gläser (Braunschweig, Deutschland) abgedeckt.

##### **2.3.4.2 Auswertung**

Um eine randomisierte Auswertung der HE-Schnitte zu gewährleisten wurden die der Gewebeidentifikation dienende Beschriftung der Objektträger von einer



nicht an der Auswertung beteiligten Person überklebt und mit neutralen Ziffern versehen.

Betrachtet wurden die Gewebeschnitte mit dem Fluoreszenz-Mikroskop BZ-9000 von KEYENCE (Osaka, Japan). Von jedem Schnitt wurden drei bis vier Fotos gemacht und zur Auswertung herangezogen.

## 2.4 Western Blot

### 2.4.1 Material

Puffer	Zusammensetzung
Lyse-Puffer	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tris pH 7,5 20 mM</li> <li>- NaCl 150 mM</li> <li>- <math>\beta</math>-Glycerophosphat 20 mM</li> <li>- MgCl 5 mM</li> <li>- Glycerin 5% (v/v)</li> <li>- NP40 0,2% (v/v)</li> <li>- Triton X100 (v/v)</li> <li>- Phosphatase und Protease Inhibitor 0,01% (v/v)</li> </ul>
Laemmli-Puffer	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tris-HCl pH 6,8 60 mM</li> <li>- SDS 2% (w/v)</li> <li>- Glycerol 10%</li> <li>- Bromophenol Blue 0,02% (w/v)</li> <li>- TCEP 50 mM</li> </ul>
Lauf-Puffer	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tris 250 mM</li> <li>- MOPS 250 mM</li> <li>- EDTA 5 mM</li> <li>- SDS 0,5% (w/v)</li> <li>- Natriumbisulfit 5 mM</li> </ul>
Anoden-Puffer I	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tris 300mM</li> <li>- Methanol 20% (v/v)</li> </ul>
Anoden-Puffer II	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tris 25 mM</li> <li>- Methanol 20% (v/v)</li> </ul>
Kathoden-Puffer	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 6-Aminocaprinsäure 40 mM</li> <li>- Methanol 20% (v/v)</li> </ul>
TBST	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tris/HCl ph 7,8 100 mM</li> <li>- NaCl 150 mM</li> <li>- Tween 20 0,1% (v/v)</li> </ul>

Gel	Zusammensetzung für 2 Gele
Trenngel 10%	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 6,66 ml Acrylamid 30%</li> <li>- 5,72 ml Bis-Tris pH 6,8 1,25M</li> <li>- 200 µl APS 10%</li> <li>- 7,62 ml H<sub>2</sub>O</li> <li>- 8 µl TEMED</li> </ul>

Material	Hersteller
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)
Anti-IRS1 (1:1000)	Cell Signaling Technology (Produktnummer: 2382; Danvers, MA, USA)
Goat-anti-Rabbit Antikörper, POX-konjugiert (1:2500)	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. (Produktnummer: 111-035-003; West Grove, PA, USA)
Clarity™ Western ECL Substrat	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA, USA)

## 2.4.2 Prinzip

Beim Western Blot handelt es sich um eine mehrere Schritte umfassende Methode zum Nachweis von Proteinen. Die Zellen des zu untersuchenden Gewebes werden hierzu lysiert und von Sediment befreit. Die Proteine des so gewonnenen Überstandes werden dann per Gelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt. Im Anschluss folgt das eigentlich ‚Blotting‘ (engl.: *abtupfen, beklecksen*). Mittels Elektrotransfer werden die Proteine vom Gel auf eine Membran übertragen. Dort können dann die zu untersuchenden Proteine per Erst- (bindet Ziel-Protein) und Zweit-Antikörper (bindet Erst-Antikörper) dargestellt und quantifiziert werden.

## 2.4.3 Durchführung

### 2.4.3.1 Probenaufarbeitung

Von dem zu untersuchenden Fettgewebe wurden je Probe 50-60 mg Gewebe entnommen. Je mg Gewebe wurden 5 µl Lyse-Puffer hinzugefügt und in einem 1,5 ml Eppendorf-Behälter (Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland) mithilfe eines Homogenisier-Stabes homogenisiert. Nach 10 Minuten bei Raumtemperatur wurden sie bei 13.000 g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand anschließend in ein neues Behältnis (Eppendorf Tube 1,5ml)

überführt. 100µl des Lysates wurden mit 100 µl Laemmli-Puffer versetzt und für 5 Minuten bei 95°C aufgeköcht.

Die sich im Überstand befindliche Proteinmenge wurde mit Hilfe des Pierce™ BCA Protein Assay Kits von Thermo Scientific (Rockford, IL, USA) gemäß Protokoll und unter Zuhilfenahme des Nanodrop 2000® von Peqlab (Erlangen, Deutschland) ermittelt (vor Zugabe des Laemmli-Puffers). Für die Probenauftragung wurde für jede Probe dasjenige Volumen bestimmt, welches eine Proteinmenge von 6 µg enthält.

#### **2.4.3.2 Gelherstellung**

10-prozentiges Trenngel für zwei Gele wurde hergestellt und Kämmen mit einem Taschendurchmesser von 10 mm (15 Taschen je Gel) verwendet (Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA, USA).

#### **2.4.3.3 Gelelektrophorese**

Vor der Probenauftragung wurde die Gelelektrophoresekammer inklusive aller Geltaschen mit Lauf-Puffer befüllt.

Von den (mit Laemmli-Puffer versetzten) Proben wurde jeweils das Volumen auf das Gel aufgetragen, das einer Proteinmenge von 6 µg entspricht. An den Seiten wurde je 1 Tasche mit 3 µl Page Ruler™ Plus von Thermo Scientific (Rockford, IL, USA), sowie alle von Proben freien Taschen mit 10 µl Laemmli-Puffer befüllt.

Die Gelelektrophorese erfolgte bei 100 V (Gerät 150W, 1000mA) für 1 Stunde 20 Minuten.

#### **2.4.3.4 Blotting**

Das Blotting der sich im Gel befindlichen Proteine auf die Amersham™ Hybond™ 45 µm PVDF-Membran von GE Healthcare Life Sciences (Freiburg, Deutschland) erfolgte mithilfe eines Semi-Dry-Blots.

Zur Aktivierung wurde die PVDF-Membran zunächst für 10 Sekunden in Methanol und anschließend 5 Minuten in Aqua dest. gegeben bevor sie weitere 5 Minuten in Anoden-Puffer I inkubierte. Ebenfalls 5 Minuten wurde das Gel in Kathoden-Puffer inkubiert.

Vier auf die Größe des Gels zugeschnittene Whatman-Papiere von GE Healthcare Life Sciences (Freiburg, Deutschland) wurden in Anoden-Puffer I getränkt und auf die Blotting-Kammer aufgebracht, gefolgt von zwei in Anoden-Puffer II getränkten Whatman-Papieren sowie der PVDF-Membran. Auf diese wurde dann das Gel sowie vier mit Kathodenpuffer getränkte Whatmanpapiere gelegt. Bei 12-16 V und 150 W wurde bei einer Stromstärke von 0,8 mA pro cm<sup>2</sup> für 1 Stunde geblottet.

#### **2.4.3.5 Blocken**

Die so geblottete Membran wurde zunächst kurz in 1xTBST gebettet, in ein 50 ml Falcon-Röhrchen der Firma Greiner bio-one (Frickenhausen, Deutschland) befördert und anschließend für 1 Stunde in 5%iger Milch (Magermilchpulver in 1xTBST) bei Raumtemperatur geblockt.

#### **2.4.3.6 Erst-Antikörper**

Der in einer Verdünnung von 1:1000 hinzugegebene Erst-Antikörper wurde über Nacht bei 4°C inkubiert.

Folgende Erst-Antikörper wurden verwendet:

- IRS1: aus Hasen gewonnener Antikörper

Am darauffolgenden Morgen wurde die Membran mitsamt Antikörper-versetzter Milch innerhalb einer Stunde auf Raumtemperatur aufgewärmt. Bei erreichter Raumtemperatur wurde sie mit 1xTBST gewaschen (3x3 Minuten + 3x5 Minuten).

#### **2.4.3.7 Zweit-Antikörper**

Der Zweit-Antikörper wurde im Verhältnis 1:2500 mit 5%iger Milch vermischt, auf die Membran gegeben und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Folgende Zweit-Antikörper wurden verwendet:

- Goat-anti-Rabbit POX-konjugiert

Es folgte ein erneuter Waschschrift mit 1xTBST (3x3 Minuten + 3x5 Minuten).

Vor der Auswertung wurde die Membran mit Clarity™ Western ECL Substrat von Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA, USA) für ca. 1 Minute befeuchtet.

#### 2.4.4 Auswertung

Die Membranen wurden abschließend mithilfe des ChemiDoc MP der Firma Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA, USA) abgebildet und mit der dazugehörigen Software ImageLab derselben Firma ausgewertet.

## 2.5 Enzyme-linked Immunosorbent Assay

### 2.5.1 Material

Material	Hersteller
Mouse Ultrasensitive Insulin ELISA	ALPCO Diagnostics (Salem, NH, USA)
25-OH-Vitamin-D ELISA	DLD Gesellschaft für Diagnostika und medizinische Geräte GmbH (Hamburg, Deutschland)

### 2.5.2 Prinzip

Beim Enzyme-linked Immunosorbent Assay (kurz: ELISA; engl.: *enzymgekoppelter Immunadsorptionstest*) handelt es sich um eine Methode zur quantitativen Messung der Menge eines bestimmten Stoffes innerhalb einer Probe.

In unserem Fall wurde die Menge an Insulin und 25-OH-Vitamin D im Blutserum der Versuchsmäuse bestimmt.

Die Methode bedient sich verschiedener selektiver Antikörper. Ein erster, für den nachzuweisenden Stoff selektiver Antikörper befindet sich auf der Platte, auf die die Proben aufgetragen werden. Nach Bindung des Stoffes an den Erst-Antikörper sowie Beseitigung aller nicht gebundenen Stoffe wird ein zweiter, ebenfalls für den Stoff selektiver Antikörper hinzugefügt. Der nachzuweisende Stoff befindet sich dann vergleichbar mit dem Belag eines Sandwiches (auch als ‚Sandwich-ELISA‘ bezeichnet) zwischen den beiden Antikörpern und ist aufgrund des Erst-Antikörpers fest mit der Versuchsplatte verbunden.

Die quantitative Messung der Stoffmenge erfolgt anschließend mithilfe einer Messung der optischen Dichte, die direkt proportional zur Menge des zu untersuchenden Stoffes in der Probe ist.

### **2.5.3 Insulin ELISA**

#### **2.5.3.1 Vorbereitung**

Zur Bestimmung des Serum-Insulins der Versuchstiere verwendeten wir den ‚Mouse Ultrasensitive Insulin ELISA‘ der Firma ALPCO Diagnostics (Salem, NH, USA).

Die hierfür verwendeten Serum-Proben der Versuchstiere wurden nach Entnahme bei -20°C gelagert.

Für einen Probelauf entschieden wir uns für die Proben dünner und besonders dicker Tiere (LF+LVD#5, LF+HVD#2, HF+LVD#6, HF+HVD#2), um eine Lage aller zu erwartenden Ergebnisse innerhalb der Standardkurve sicherzustellen.

Da sich die gemessenen Insulin-Serummengen der dünnen Tiere als relativ niedrig darstellten, entschieden wir uns für eine Probenmenge von 10 µl für die Proben der beiden Niedrigfett-Gruppen. Für die Proben der Hochfett-Gruppen behielten wir die Probenmenge von 5 µl bei. Die unterschiedlichen Probenmengen wurden im Rahmen der Auswertung mathematisch normalisiert.

#### **2.5.3.2 Durchführung**

Das Experiment wurde gemäß Protokoll durchgeführt. Standards und Kontrollen wurden für alle Proben gemäß der Angaben für eine Probenmenge von 5 µl angewandt.

#### **2.5.3.3 Auswertung**

Die optische Dichte wurde mit dem Multidetektions-Mikroplatten-Reader Synergy HT der Firma BioTek (Winooski, VT, USA) bei 450 nm gemessen. Die so ermittelten Werte wurden mithilfe der Software „Gen5“ ebenfalls von BioTek ausgewertet.

## **2.5.4 25-OH-Vitamin-D ELISA**

### **2.5.4.1 Durchführung**

Die 25-OH-Vitamin D-Serumlevel wurden mithilfe des ‚25-OH-Vitamin D-ELISA‘ von DLD Gesellschaft für Diagnostika und medizinische Geräte GmbH (Hamburg, Deutschland) ermittelt.

Die verwendeten Serumproben wurden nach Entnahme bei -20°C gelagert.

Eingesetzt wurden pro Well jeweils 8 µl Serum und 200 µl Puffer. Alle Proben wurden als Duplikate gemessen und alle Schritte gemäß des Protokolls ausgeführt.

### **2.5.4.2 Auswertung**

Die optische Dichte wurde mit dem Multidetektions-Mikroplatten-Reader Synergy HT der Firma BioTek (Winooski, VT, USA) bei 450 nm gemessen. Die so ermittelten Werte wurden mithilfe der Software „Gen5“ ebenfalls von BioTek ausgewertet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Generelle physiologische Effekte der Vitamin D<sub>3</sub>-Substitution im Diät-induzierten Adipositas-Mäuse-Modell

##### 3.1.1 Effekt der Vitamin D<sub>3</sub>-Substitution auf die Zunahme des Körpergewichts und der Körperfettmasse unter Hochfett-Diät

Um die Effekte einer Vitamin D<sub>3</sub>-Substitution im Mäusemodell unter Berücksichtigung von Adipositas und NAFLD untersuchen zu können wurde eine Gesamtanzahl von 24 Mäusen (C57BL/6/J (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA), männlich, Alter von 8 Wochen bei Versuchsbeginn) in vier Gruppen à 6 Tiere unterteilt. Um die Effekte des Vitamin D<sub>3</sub> auf adipöse mit denen auf schlanke Mäuse vergleichen zu können erhielten jeweils zwei Gruppen eine Hochfett-Diät (HF; *engl.: high fat*, D12492) wohingegen sich die anderen zwei Gruppen von einer Niedrigfett-Diät (LF; *engl.: low fat*) ernährten. Sowohl die Hochfett-Diät-Tiere, als auch die Niedrigfett-Diät-Tiere erhielten zunächst 500 IU Vitamin D<sub>3</sub>/kg Futter. Da dies nur der Hälfte der für Labormäuse empfohlenen Dosis an Vitamin D entspricht [45], zielte diese Strategie darauf ab einen moderaten Vitamin D-Mangel zu erzeugen, ähnlich der klinischen Situation von Patienten mit Adipositas und/oder NAFLD.

Ab dem Alter von 14 Wochen (also 6 Wochen nach Versuchsbeginn) erhielt je eine Gruppe der Niedrig- und Hochfett-Diät-Tiere eine Substitution von 10.000 Vitamin D<sub>3</sub>/kg Diät (HVD; *engl.: high vitamin D*), während die jeweils andere Niedrig- bzw. Hochfett-Gruppe weiterhin mit 500 IU Vitamin D<sub>3</sub>/kg Diät gefüttert wurde (LVD; *engl.: low vitamin D*). Geerntet wurden die Tiere im Alter von 16 Wochen nach einer Gesamtversuchsdauer von 8 Wochen. Einen Überblick über das experimentelle Design gibt Abbildung 1.



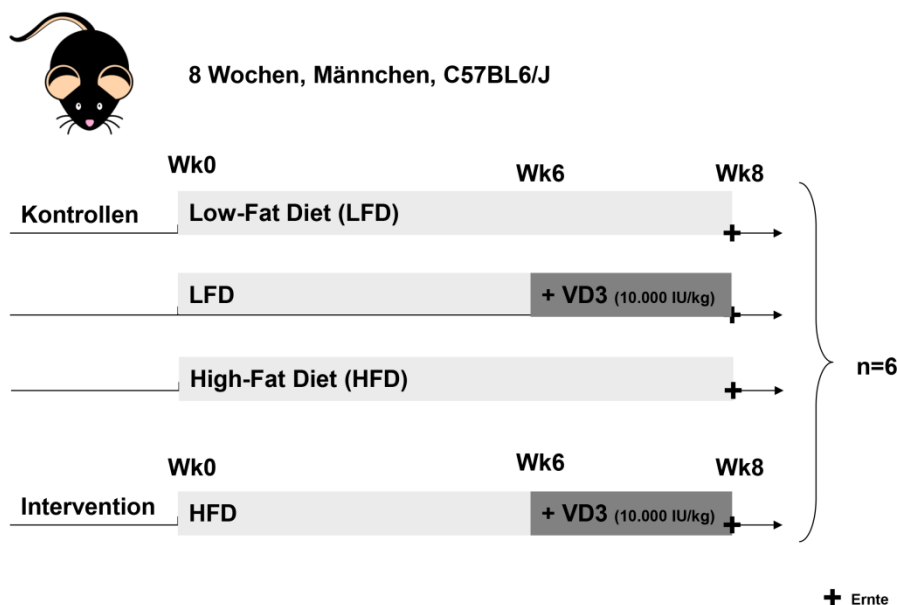


Abb. 1: **Versuchsaufbau der Tieraufzucht:** Für den in dieser Arbeit beschriebenen Versuchsaufbau wurden 24 C57BL/6/J-Mäuse im Alter von 8 Wochen in 4 Gruppen unterteilt. Je zwei der Gruppen erhielten eine Niedrigfett-Diät, die zwei anderen wurden auf eine Hochfett-Diät (je mit 500 IU Vitamin D<sub>3</sub>/kg Futter) gesetzt. Zum Versuchszeitpunkt von 6 Wochen erhielt je eine Gruppe der schlanken sowie eine Gruppe der adipösen Mäuse zusätzlich 10.000 IU Vitamin D<sub>3</sub>/kg Futter. Die Tiere wurden im Alter von 16 Wochen, 8 Wochen nach Versuchsbeginn, geerntet.

Wie erwartet nahmen die Tiere unter Hochfett-Diät schneller an Gewicht zu als diejenigen unter Niedrigfett-Diät. Eine interessante Beobachtung konnte nach Einsetzen der Vitamin D<sub>3</sub>-Substitution gemacht werden: beim Vergleich der Hochfett-Gruppen nahmen die Tiere unter Hoch-Vitamin D<sub>3</sub>-Diät mehr Gewicht zu. Ein Trend, der sich auch im abschließenden Vergleich der Gewichtszunahme der beiden Hochfett-Gruppen zeigte ( $p=0,0595$ , siehe Abb.3).

Bei Betrachtung des Lebergewichts der Tiere zeigte sich diese Gewichtszunahme nicht. Zwar nahmen die Tiere unter Hochfett-Diät auch beim Lebergewicht signifikant mehr zu als unter Niedrigfett-Diät; ein Unterschied zwischen den verschiedenen Vitamin D-Substitutionen konnte jedoch nicht beobachtet werden (Abb. 2). Im Gegensatz dazu wurde für das epididymale Fettgewebe ebenfalls ein signifikanter Anstieg des Gewichts unter Hochfett- und Hoch-Vitamin D<sub>3</sub>-Diät verzeichnet (Abb. 2).

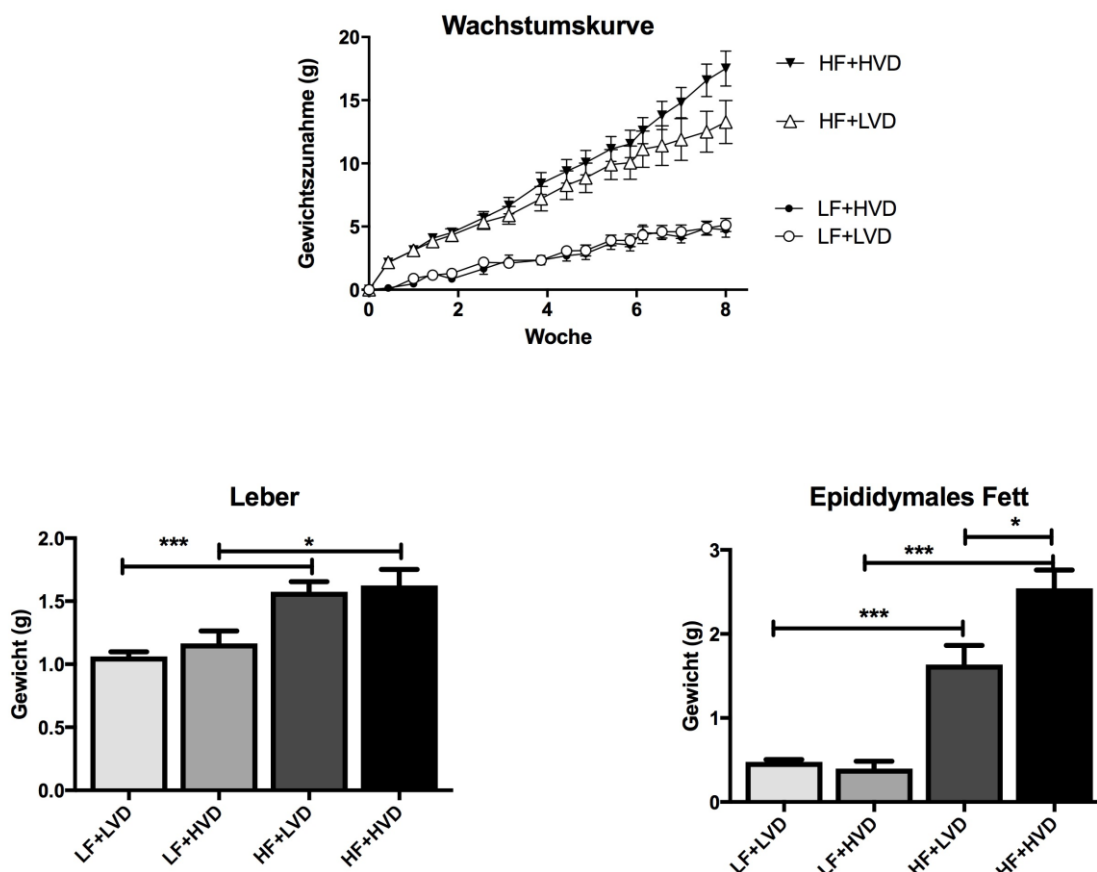


Abb. 2: **Veränderungen des Körpergewichts sowie Endgewicht von Leber und epididymalem Fettgewebe:** Das Gewicht aller 24 Mäuse wurde während des gesamten Versuchs regelmäßig ermittelt. Nach der Ernte wurde zudem das Gewicht der Leber und des epididymalen Fettgewebes gemessen. Beim Vergleich der beiden Hochfett-Diät-Gruppen zeigt sich eine vermehrte Gewichtszunahme unter 10.000 IU Vitamin D<sub>3</sub>/kg Futter über zwei Wochen in Bezug auf Gesamtgewicht und Gewicht des epididymalen Fetts. Beim Gewicht der Lebern beider Gruppen zeigten sich keine Unterschiede.

Zusammenfassend deuteten diese ersten Versuche demnach auf einen moderat pro-adipogenen Effekt einer Hochdosis-Vitamin D<sub>3</sub>-Substitution im verwendeten Adipositas-Maus-Modell hin. Diese Beobachtung war mitunter ausschlaggebend für die Entscheidung einer genaueren Untersuchung dieses epididymalen weißen Fettgewebes, um mehr über mögliche Effekte einer Vitamin D<sub>3</sub>-Substitution auf die Physiologie dieses Gewebes zu erfahren.

### 3.1.2 Effekt der Vitamin D<sub>3</sub>-Substitution auf den Vitamin D<sub>3</sub> Serum-Spiegel

Um den Effekt der oralen Vitamin D<sub>3</sub>-Substitution auf die Vitamin D-Serumlevel der Mäuse festzustellen, bestimmten wir diese mithilfe eines 25-OH-Vitamin D-ELISA. Neben den mit ‚synthetischen‘ Diäten (LF, HF) gefütterten Mäusen nahmen wir auch eine altersangeglichene Gruppe in die Messung auf, die ein ‚natürliches‘ Tierfutter („Standard Chow“ mit ausreichendem Vitamin D-Gehalt)

erhielt. Beim Vergleich zeigte sich, dass die Niedrig-Vitamin D<sub>3</sub>-Diät (500 IU/kg Diät) im Vergleich zur Standard Chow in niedrigeren Vitamin D-Serumspiegel resultierte, vergleichbar mit dem bei adipösen Patienten oft beschriebenen Vitamin-D-Mangel (Abb. 3). Gleichzeitig zeigte sich, dass die zweiwöchige Substitution mit 10.000 IU Vitamin D<sub>3</sub>/kg Futter diesen Mangel ausglich bzw. überkompensierte. Durch die nach Substitution von 10.000 IU/kg Diät gemessenen Serumlevel sind Rückschlüsse auf die Effekte einer dem Mangel entgegenwirkenden Substitution bei adipösen Patienten demnach eventuell möglich.

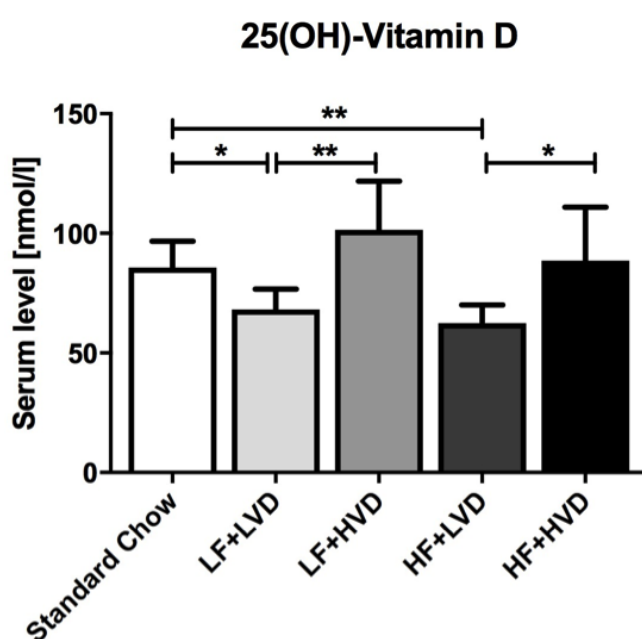


Abb. 3: **25(OH)-Vitamin D**: Ein zur Kontrolle der Vitamin D-Serumspiegel durchgeführter ELISA bestätigte zum einen den induzierten Vitamin D-Mangel unter 500 IU Vitamin D<sub>3</sub>/kg Futter wie auch eine Erhöhung des Serum-Vitamin D unter 10.000 IU Vitamin D<sub>3</sub>/kg Futter über das normale Ernährungsmaß (Standard Chow) hinaus.

### 3.2 Einfluss der Vitamin D<sub>3</sub>-Substitution auf die Expression von Adipozytokinen im weißen Fettgewebe

Das Fettgewebe dient nicht nur der Synthese und Speicherung energiereicher Lipide, die dem Organismus in Tagen erhöhten Energiebedarfs zur Verfügung gestellt werden können. Immer weiter in den Fokus rückt auch dessen Funktion als hormonell aktives Organ. Heute sind mehr als 260 Stoffe unterschiedlicher Molekülgruppen bekannt (u.a. Prostaglandine, C-reaktives Protein, etc.), die von den Adipozyten produziert und sezerniert werden [46, 47]. Hierunter fallen auch die sog. Adipozytokine, vom Fettgewebe sezernierte Zytokine. Zytokine

wirken v. a. regulierend auf die Differenzierung und Proliferation ihrer Zielzellen und nehmen somit Einfluss auf Wachstum, Entzündung und immunologische Reaktionen [48, 49].

### 3.2.1 Leptin und Adiponectin

Eines dieser Adipozytokine ist das Leptin, ein Proteohormon, welches vor allem von Adipozyten exprimiert und sezerniert wird. Über Ob-Rezeptoren bewirkt es eine zentrale Herabsetzung des Hungergefühls - eine Wirkung, die im Knockout-Mäusemodell in adipösen, diabetischen Mäusen resultiert [50]. Sind die Leptinspiegel bei erhöhtem Fettanteil (und somit mehr Leptin-sezernierenden Adipozyten) jedoch konstant erhöht, wird die Wirkung des gedämpften Hungergefühls herabgesetzt. Man spricht von einer Leptin-Resistenz [51].

Vor dem beschriebenen Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression von Leptin im Fettgewebe auf mRNA-Ebene untersucht. Hierbei zeigte sich – wie zu erwarten – eine gesteigerte Expression von Leptin in den adipösen Mäusen im Vergleich zu den Kontroll-Tieren. Innerhalb der Gruppen unter Hochfett-Diät war die Leptin-Expression in den Tieren, die Vitamin D<sub>3</sub> in hoher Dosierung erhielten, nochmals erhöht. Die Leptin-Expression zeigt somit eine positive Korrelation mit der Zunahme des Körpergewichts und der Körperfettmasse (siehe Abb. 4). Die gewonnenen Daten stehen daher im Einklang mit publizierter Literatur und unterstreichen die Validität des Versuchsansatzes.

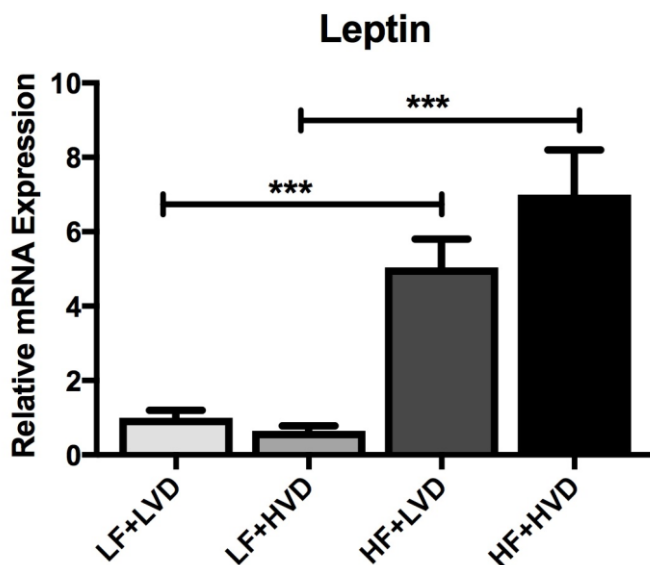


Abb. 4: **Leptin**: Das Proteohormon und Adipozytokin Leptin, das eine zentral vermittelte Herabsetzung des Hungergefühls bewirkt, korreliert positiv mit Körpergewicht und –fettmasse. Wie zu erwarten zeigten die mit Hochfett-Diät gefütterten dickeren Mäuse eine signifikant höhere mRNA-Expression. Der beschriebene Effekt auf das Hungergefühl unterliegt hier (d.h. bei dauerhaft erhöhten Leptinspiegeln) jedoch einem Gewöhnungseffekt und wirkt dem zunehmenden Körpergewicht so nicht entgegen.

Eine inverse Korrelation mit dem prozentualen Körperfettanteil ist hingegen für die Expression des Adiponectin beschrieben. Produziert wird dieses Proteohormon ausschließlich von Adipozyten. Hinsichtlich der Adiponectin-Expression war im Versuchsansatz zwar eine Abnahme bei Gewichtszunahme unter Niedrig-Vitamin D<sub>3</sub>-Diät (beim Vergleich der Niedrig- und Hochfett-Diät-Gruppen) nachweisbar, generell tiefere Adiponectin-Expressionsraten unter Hoch-Vitamin D<sub>3</sub>-Diät lassen sich jedoch nicht anhand des Körpergewichtes erklären. Eine Ursache hierfür könnte im Vitamin D selbst liegen. Dieser Befund wurde im weiteren Verlauf der Arbeit jedoch nicht genauer untersucht.

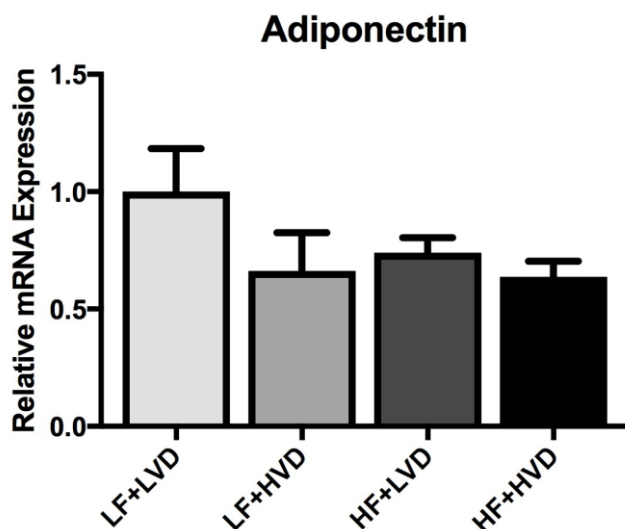


Abb. 5: **Adiponectin**: Neben dem Leptin zählt auch das Adiponectin zur Gruppe der Adipozytokine. Eine für das Adiponectin beschriebene inverse Korrelation zum Körpergewicht konnte im vorliegenden Versuchsaufbau nur beim Vergleich der beiden Gruppen unter Niedrig-Vitamin D<sub>3</sub>-Diät beobachtet werden. Ein Erklärungsansatz für die niedrige Expression unter Niedrigfett- und Niedrig-Vitamin D<sub>3</sub>-Diät wurde im Verlauf dieser Arbeit nicht weiterverfolgt.

### 3.2.2 Resistin und pro-inflammatorische Zytokine

Das nächste Adipozytokin, dessen Expression wir näher betrachteten, war das Resistin. Es handelt sich um ein im murinen Organismus ausschließlich von Adipozyten exprimiertes Proteohormon, das seinen Namen einer ausgebildeten Insulinresistenz in Mäusen nach Injektion verdankt. Es wird diskutiert als einer derjenigen Faktoren, die einen Zusammenhang zwischen Adipositas und einer gestörten Insulinreaktion des Organismus herstellen. Im Diät-induzierten Adipositas-Modell finden sich bei Mäusen erhöhte zirkulierende Resistinlevel, die für eine Diabetes mellitus Typ 2-Erkrankung prädisponieren [52]. Außerdem ist über die Aktivierung des NFκB-Signalwegs eine vermehrte Transkription pro-inflammatorischer Zytokine (IL-1β, IL-6, TNFα) beschrieben [53]. Da dieser Signalweg einer Inhibition durch Vitamin D unterliegt wäre eine anti-inflammatorische Wirkung der Hoch-Vitamin D<sub>3</sub>-Diät denkbar [54].

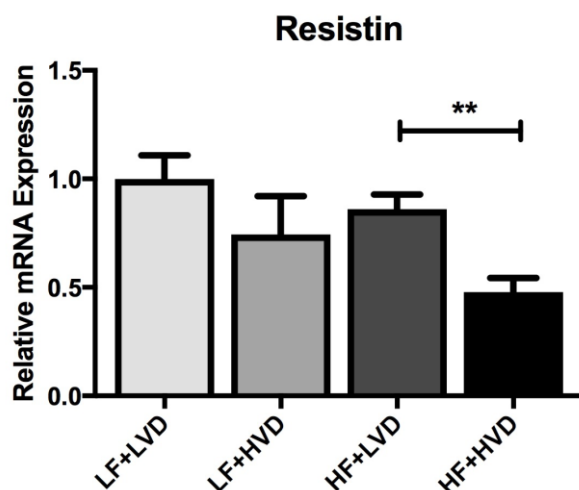


Abb. 6: **Resistin**: Für das Adipozytokin Resistin wurde eine Korrelation zwischen erhöhten Expressionsraten und einer Prädisposition für Diabetes mellitus Typ 2 beschrieben. Bei Betrachtung der Resistin-Expression zeigen sich erniedrigte Werte unter Hoch-Vitamin D<sub>3</sub>-Diät bei sowohl Niedrig- als auch Hochfett-Diät. Hierbei könnte es sich um einen ersten Hinweis auf eine anti-inflammatorische Wirkung des Vitamin D und somit auch einen protektiven Faktor in Bezug auf die Entstehung eines Diabetes mellitus handeln.

Im Versuch zeigte sich beim Vergleich der beiden Hochfett-Gruppen eine signifikante Abnahme der Resistin-Expression unter Hoch-Vitamin D<sub>3</sub>-Diät (Abb. 6). Die Annahme eines hemmenden Effekts hoher Vitamin D-Spiegel auf die Resistin-mRNA-Expression wird auch durch die Beobachtung von Roth et al. bestätigt, der eine zunehmende Expression unter Vitamin D-Mangel in Ratten beobachtete [55].

Bei im Anschluss erfolgter Betrachtung einiger inflammationsrelevanter Zytokine konnte diese vermutete anti-inflammatorische Wirkung jedoch nur bedingt bestätigt werden. Auch wenn sich minimale Abnahmen der Expression von IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF $\alpha$  unter Hoch-Vitamin D<sub>3</sub>-Diät beim Vergleich der Hochfett-Gruppen zeigen (Abb. 7), so müssen diese per RT-PCR gewonnenen Ergebnisse als nur bedingt aussagekräftig eingestuft werden. Die niedrigen im Organismus vorherrschenden Zytokin-Konzentrationen spiegeln sich auch in deren Expression auf RNA-Ebene wider. In der RT-PCR kam es so erst in späten Zyklen zu einer messbaren Amplifikation, was sich in teilweise relativ hohen Standardabweichungen zeigte.

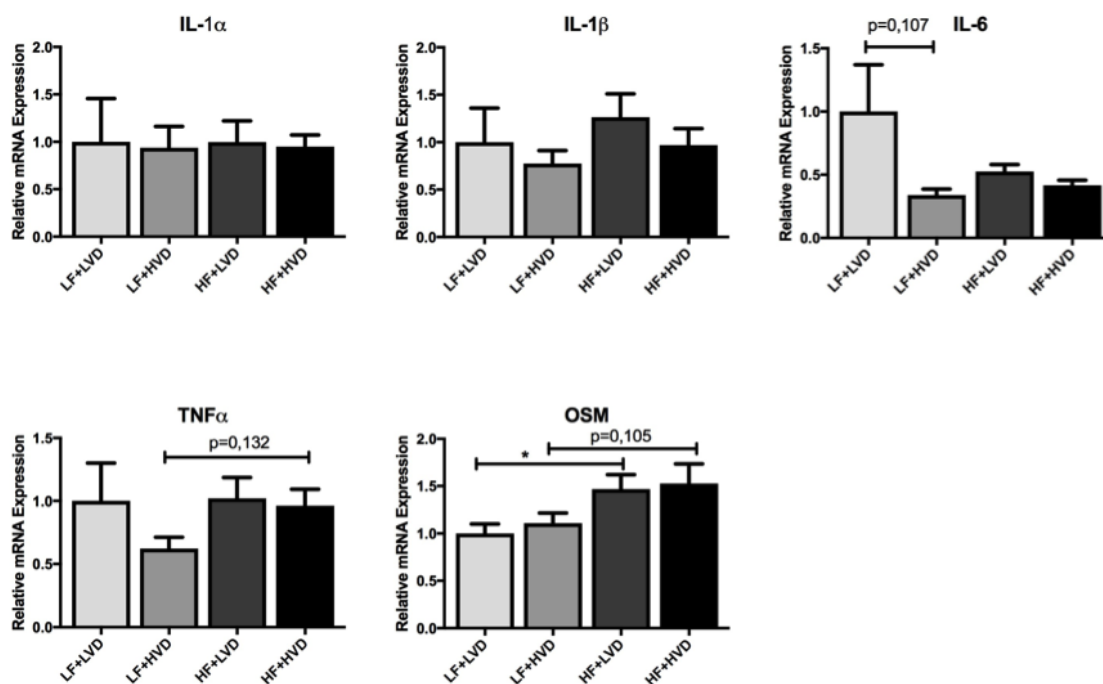


Abb. 7: **Pro-inflammatorische Zytokine (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ , OSM)**: Die hier beschriebenen Zytokine gelten als klassische pro-inflammatorische Zytokine, deren erhöhte Transkription auf eine entzündliche Reaktion des Gewebes hindeuten kann. Ein deutlicher anti-inflammatorischer Effekt der hohen Vitamin D-Spiegel unter Hoch-Vitamin D<sub>3</sub>-Diät kann nicht gezeigt werden. Auch wenn die Höhe der Transkriptionen von IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF $\alpha$  in diese Richtung tendieren, so sind die Ergebnisse aufgrund niedriger Transkriptions-Raten und daraus bedingten hohen Standardabweichungen nur bedingt aussagekräftig.

### 3.2.3 Mögliche anti-inflammatorische Wirkung des Vitamin D unter Hochfett-Diät

Bei Betrachtung der bis zu diesem Zeitpunkt erlangten Ergebnisse erscheint eine anti-inflammatorische Wirkung des Vitamin D in Kombination mit einer Hochfett-Diät möglich. Die mRNA-Expressionen des Leptin und Adiponectin zeigen sich im Verhältnis zum Körpergewicht bzw. Fettanteil des Organismus wie bereits in zahlreichen Artikeln beschrieben. Der so als valide bestätigte experimentelle Aufbau lässt es zu, den Abfall der Resistin-Expression unter Hochfett- und Hoch-Vitamin D<sub>3</sub>-Diät als anti-inflammatorische Wirkung des Vitamin D zu interpretieren. Ein minimaler Abfall der mRNA-Expressionen von IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF $\alpha$  unter Hoch-Vitamin D<sub>3</sub>-Diät beim Vergleich der beiden Hochfett-Gruppen deutet ebenfalls in diese Richtung. Da es sich jedoch nur beim Resistin um eine signifikante Differenz handelt und die großen Standardabweichungen der pro-inflammatorischen Zytokine nicht außer Acht gelassen werden können, kann es sich bei den obigen Ergebnissen nur um einen ersten Hinweis handeln, der weitere Untersuchungen erfordert. In



Betracht gezogen werden muss hierbei auch die inhibierende Wirkung des Fastens auf die Resistin-Expression [56]. Da die im Versuchsaufbau verwendeten Mäuse acht Stunden vor der Ernte gefastet wurden, ist die Aussagekraft der Resistin-Expression gemindert.

### **3.3 Einfluss der Vitamin D<sub>3</sub>-Behandlung auf die Infiltration von Makrophagen in das weiße Fettgewebe adipöser Mäuse**

Um genauere Auskünfte über das Ausmaß der Entzündung des Fettgewebes zu erhalten legten wir das Augenmerk dann auf die im Fettgewebe vorkommenden Makrophagen oder kurz ATM (Adipose Tissue Macrophages; engl.: *Fettgewebismakrophagen*), da ein Zusammenhang zwischen Adipositas und vermehrter Inflammation des weißen Fettgewebe ebenso wie ein dadurch bedingter Anstieg der Makrophagenanzahl bereits mehrfach beschrieben wurde [24].

#### **3.3.1 Hypoxie als möglicher Auslöser der Makrophageninfiltration**

Als Grund hierfür wird u.a. eine im Gewebe entstehende Hypoxie bei Hypertrophie der Adipozyten vermutet, die bei Gewichtszunahme durch Volumenvergrößerung der unilokulären Fetttropfen entsteht (Durchmesser bis zu 140-180  $\mu\text{m}$ ). Die so vergrößerte vom Sauerstoff zurückzulegende Diffusionsstrecke resultiert stellenweise in einer Minderversorgung der Adipozyten, da der freie Sauerstoff maximal über eine Distanz von 100  $\mu\text{m}$  diffundieren kann [21].

Auf RNA-Ebene konnte dies durch einen signifikanten Anstieg des HIF1 $\alpha$  (Hypoxia induced factor; engl: *Hypoxie induzierter Faktor*) nachvollzogen werden (Abb. 8). Bei HIF1 $\alpha$  handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der bei O<sub>2</sub>-Mangel in der Zelle akkumuliert und über mehrere Achsen (Steigerung der renalen Erythropoetin-Synthese, Sekretion von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF; engl: *vaskulär-endothelialer Wachstumsfaktor*), enzymale Induktion der anaeroben Glykolyse) die Perfusion des hypoxischen Gewebes zu verbessern sucht [57, 58]. Eine erhöhte Expression des VEGF kann in den vorliegenden Ergebnissen nicht gezeigt werden (Abb. 8). Es findet sich jedoch

ein signifikanter Anstieg des Platelet Derived Growth Factor (PDGF; engl.: *aus Thrombozyten stammender Wachstumsfaktor*; Gen: PDGFA-D), ein Faktor, der seinen Ursprung im Gewebe v. a. in aktivierten Makrophagen hat und als pro-angiogenetisch beschrieben wird [59].

Der signifikante Anstieg der PDGFA-D-Expression sowie der Anstieg der Expression von HIF1 $\alpha$  unter Hochfett-diät könnten demnach auf eine vermehrte Makrophagenakkumulation im Fettgewebe dieser Tiere hindeuten.

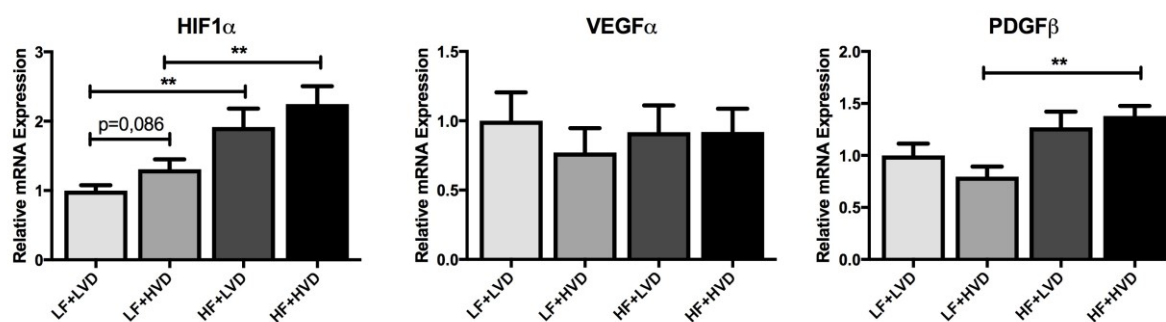


Abb. 8: **HIF1 $\alpha$ , VEGF $\alpha$ , PDGF $\beta$** : Zur Annäherung an das Thema der Makrophagenakkumulation im Fettgewebe suchten wir zunächst Hinweise auf Gewebhypoxie, die u.a. als Ursache für Makrophagenansammlungen diskutiert wird. Der Vergleich der Niedrig- und Hochfett-Diät-Gruppen zeigte zum einen, dass durch Hypoxie vermehrt transkribierte HIF1 $\alpha$  als auch das infolge pro-angiogenetisch wirkende PDGF $\beta$  einer vermehrte Expression unter Hochfett-Diät unterliegen. Für das ebenfalls pro-angiogenetisch wirkende VEGF $\alpha$  konnte kein vergleichbarer Effekt gezeigt werden.

### 3.3.2 Spezifische Signalstoffe locken Makrophagen ins Fettgewebe der übergewichtigen Mäuse

Im schlanken Individuum ist das Fettgewebe fast frei von Leukozyten. Dass sich dies im adipösen Organismus ändert liegt an einer Reihe von klassisch pro-inflammatorischen Zytokinen, wie Tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), Interleukin 6 (IL-6) oder Interleukin 1 (IL-1), die für die Akkumulation pro-inflammatorischer Zellen verantwortlich sind [16, 60, 61].

Eine ähnliche Funktion hat auch das Chemokin Ccl2 (chemokine (C-C motif) ligand 2; engl.: *Chemokinligand 2*), auch als MCP1 (monocyte chemotactic protein 1; engl.: *für Monozyten chemotaktisches Protein 1*) bezeichnet, welches Monozyten, dendritische Zellen und Gedächtnis-T-Zellen in entzündliches Gewebe „lockt“ [62]. Dessen RNA-Expression zeigt sich unter Hochfett-diät signifikant erhöht. Die Makrophagen, bei denen es sich um im Gewebe befindliche Monozyten handelt, verfügen über einen positiven

Rückkopplungsmechanismus, der zum einen mehr Monozyten anlockt und zum anderen die Aktivität der Makrophagen weiter aufrechterhält. Vermittelt wird dieser über Ccl7 (chemokine (C-C motif) ligand 7; engl.: *Chemokinligand 7*). Die Expression dieses Faktors zeigte sich in den durchgeführten Versuchen unter Hochfett-Diät ebenfalls signifikant verstärkt (Abb. 9). Neben einem Anstieg unter Hochfett-Diät für sowohl Ccl2 als auch Ccl7 zeigte sich ein weiterer Anstieg dieser Spiegel unter Hoch-Vitamin D<sub>3</sub>-Diät beim Vergleich der Hochfett-Gruppen. Da diese Ergebnisse im scheinbaren Widerspruch mit der bisherigen Annahme einer reduzierten Inflammation unter Vitamin D-Einfluss stehen, entschieden wir uns für eine weitere Untersuchung der Makrophageninfiltration und -akkumulation.

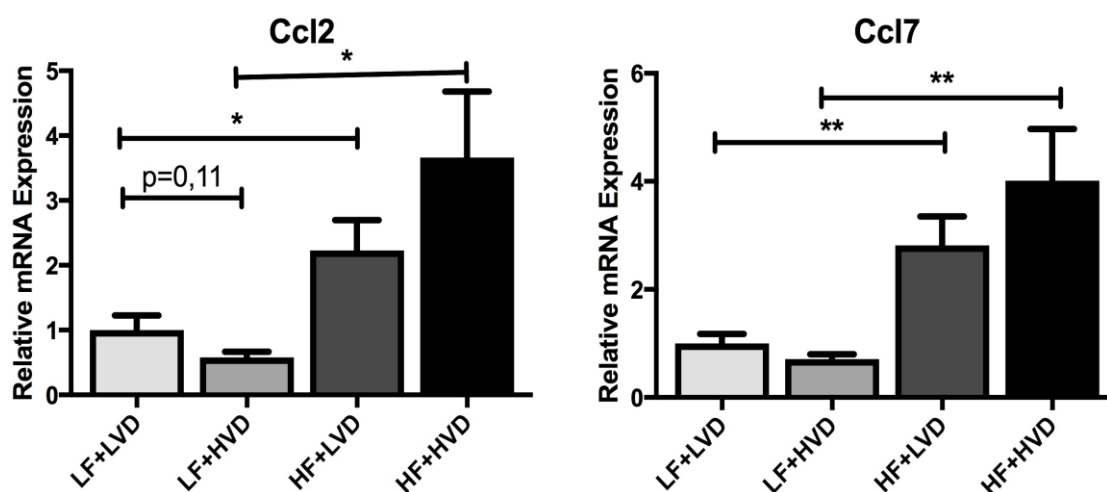


Abb. 9: **Ccl2 und Ccl7**: Die Chemokine Ccl2 und Ccl7 dienen der Makrophagen-Anlockung. Ein signifikanter Anstieg der Transkription der beiden Chemokine zeigt sich beim Vergleich der schlanken und adipösen Mäuse. Des Weiteren deutet eine vermehrte Transkription unter Hoch-Vitamin D<sub>3</sub>-Diät beim Vergleich der adipösen Mäuse auf eine vermehrte Makrophageninfiltration unter erhöhten Vitamin D-Spiegeln hin. Dies steht im scheinbaren Widerspruch mit der bisherigen Annahme einer anti-inflammatorischen Wirkung des Vitamin D.

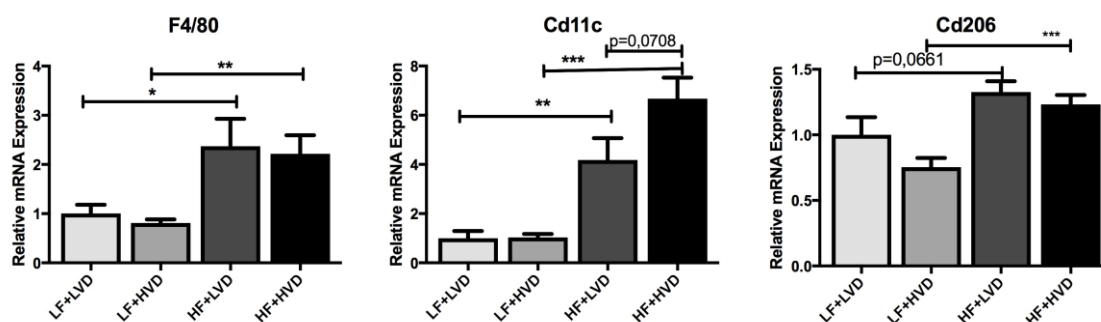
### 3.3.3 Die Adipositas-assoziierte Fettgewebs-Entzündung bewirkt einen phänotypischen Switch in der Makrophagenpopulation

Hierbei gilt es zu beachten, dass bei den ATMs bzw. Gewebsmakrophagen zwei Subpopulationen beschrieben sind [63]. Beide sind mit dem Oberflächenmarker F4/80 ausgestattet.

Zum Einen die sog. M1- oder klassisch aktivierten Makrophagen. Sie produzieren und sezernieren klassisch pro-inflammatorische Zytokine wie TNF $\alpha$ , IL-6 und IL-12 und sorgen auf diese Weise im Gewebe für ein pro-

inflammatorisches Milieu. Induziert wird ihre Aktivierung und Vermehrung durch Interferon  $\gamma$ , TNF $\alpha$  und LPS. Als Oberflächenmarker dieser M1-Makrophagen dienen Cd11c und iNOS (induzierbare NO-Synthase), über welches auch die Produktion hoher Level toxischer Intermediate, wie Stickstoffmonoxid (NO), vermittelt wird.

Zum Anderen spricht man von sog. M2- bzw. alternativ aktivierten Makrophagen. Sie haben im Gegensatz zur M1-Population eine eher anti-inflammatorische Funktion. Diese äußert sich zum einen in der Aktivierung und Vermehrung dieser Population unter dem Einfluss der anti-inflammatorischen Zytokine IL-4 und IL-13 sowie in der Produktion und Sekretion des ebenfalls anti-inflammatorisch wirkenden IL-10. Angekurbelt wird in diesen Makrophagen zudem die Produktion von Arginase, die u.a. über eine kompetitive Hemmung der NO-Produktion die iNOS-Aktivität blockiert. Die Aktivität der M2-Makrophagen steht also im funktionellen Gegensatz zur M1-Population. Als Oberflächenmarker dieser Makrophagengruppe hat sich das Cd206 (cluster of differentiation; engl.: *Unterscheidungsmuster*; auch Mannose Rezeptor C, Typ1 (MRC1) genannt) etabliert [63, 64].



3. 10: **F4/80, Cd11c, Cd206**: Wie nach Auswertung der Makrophagen-anlockenden Chemokine bereits vermutet zeigt sich bei den adipösen Tieren eine höhere Expression des allgemeinen Makrophagen-Markers F4/80. Betrachtet man den Marker der pro-inflammatorischen M1-Makrophagen Cd11c so zeigt sich die Expression unter Hoch-Vitamin D<sub>3</sub>-Diät beim Vergleich der Hochfett-Gruppen beinahe signifikant ( $p=0,0708$ ) erhöht. Beim Marker der anti-inflammatorischen M2-Population Cd206 ist dies nicht der Fall, so dass eine vermehrte Makrophageninfiltration und somit Inflammation unter Hochfett- und Hoch-Vitamin D<sub>3</sub>-Diät vermutet werden kann.

Wie unter Berücksichtigung vorheriger Forschungsergebnisse zu erwarten zeigte sich in der RT-PCR ein signifikanter Anstieg des allgemeinen Makrophagenmarkers F4/80 in den beiden Hochfett-Gruppen (Abb. 10). Auch

ein Anstieg der M1-Makrophagen (Cd11c) unter Hochfett-Diät konnte repliziert werden. Unter dem Einfluss der Hoch-Vitamin D<sub>3</sub>-Diät zeigt sich ein weiterer Anstieg des Cd11c ( $p=0,0708$ ), der auf eine mögliche Verstärkung der inflammatorischen Situation des weißen Fettgewebes unter Vitamin D-Einfluss hindeuten könnte. Dies steht zunächst im Gegensatz zu der beim Menschen beobachteten anti-inflammatorischen Wirkung des Vitamin D bzw. der positiven Korrelation von Adipositas und niedrigem Vitamin D-Status [65].

Auch ein Anstieg des M2-Makrophagenmarkers Cd206 unter Hochfett-Diät konnte gezeigt werden. Zu erklären ist dieser durch die gesteigerte Rekrutierung von Makrophagen ins Fettgewebe, die auch mit einem Anstieg der anti-inflammatorischen Subpopulation einhergeht. Entscheidend ist hierbei jedoch vermutlich die Zunahme der M1/M2-Ratio im Fettgewebe der adipösen Tiere (gemessen als Verhältnis der Oberflächenmarker Cd11c und Cd206, siehe Abb. 11), die im Einklang mit bestehender Literatur steht und sich unter dem Einfluss der Vitamin D<sub>3</sub>-Substitution noch signifikant zu verstärken scheint.

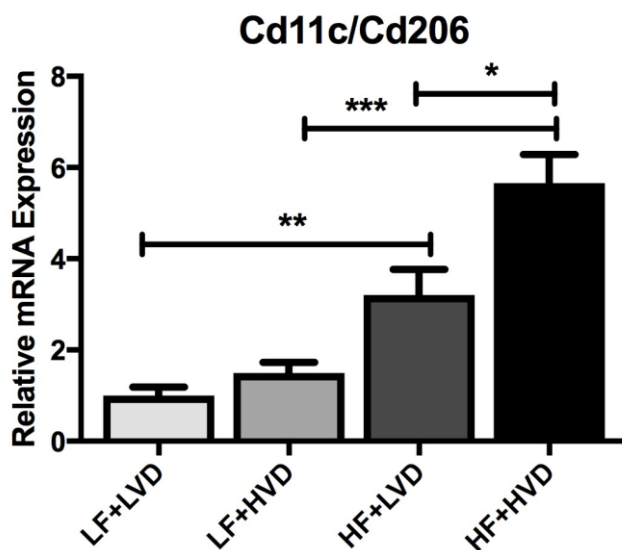


Abb. 11: **M1/M2-Ratio**: Setzt man die Expression der Marker für M1- und M2-Subpopulation der Makrophagen ins Verhältnis, so zeigt sich ein signifikanter Anstieg der pro-inflammatorischen M1-Makrophagen mit deren Marker Cd11c unter Hoch-Vitamin D<sub>3</sub>-Diät beim Vergleich der Hochfett-Gruppen. Die inflammatorische Situation im Fettgewebe der adipösen Mäuse scheint sich unter Vitamin D-Einfluss also nicht zu bessern.

### 3.3.4 'Kronen-ähnliche Strukturen' als histologischer Marker für Adipozyten-Degradation

Makrophagen des weißen Fettgewebes sind z.T. in sog. ‚crown like structures‘ (engl.: *Kronen-ähnliche Strukturen*; CLS) anzutreffen. Diese CLS zeichnen sich durch die an eine Krone erinnernde Morphologie der Makrophagenansammlung um einen einzelnen Adipozyten aus. Sie werden hauptsächlich durch Cd11c-positive Makrophagen (M1-Subpopulation) gebildet und korrelieren mit dem Ausmaß an Inflammation [66].

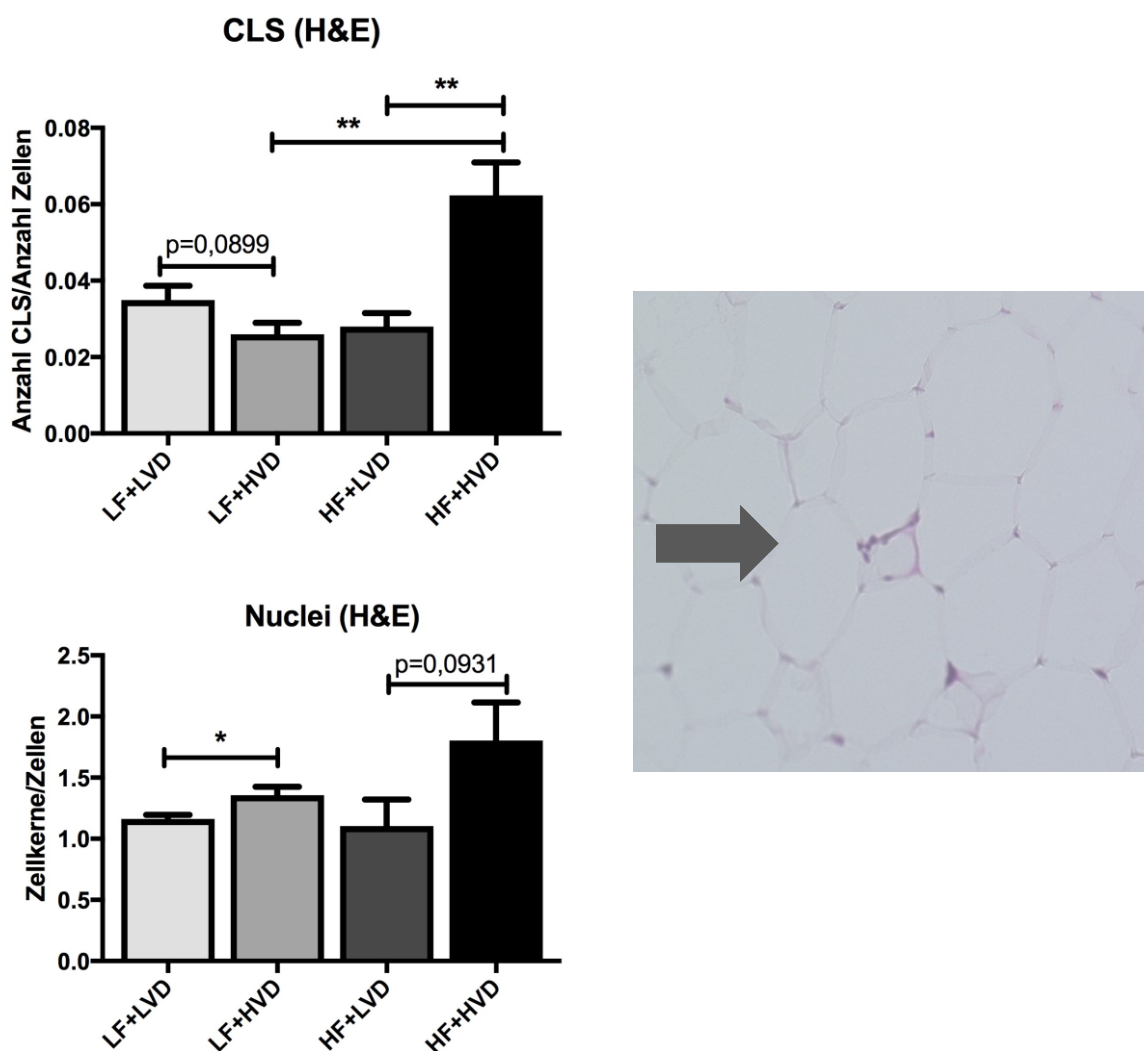


Abb. 12: **CLS und Anzahl Nuclei/Adipozyt:** Zur Veranschaulichung und Bestätigung des auf mRNA-Ebene vermuteten Trends der vermehrten Makrophageninfiltration unter Hoch-Vitamin D<sub>3</sub>- und Hochfett-Diät wurden H&E-Schnitte aller Gruppen auf CLS und Zellkern-Anzahl untersucht. Hier zeigte sich ein signifikanter Anstieg an CLS unter Hoch-Vitamin D<sub>3</sub>-Diät beim Vergleich der Hochfett-Gruppen. Auch in der Auszählung der Nuclei bestätigte sich dieser Trend, wenn gleich weniger stark ausgeprägt. Die Abbildung rechts zeigt eine CLS im H&E-Schnitt des weißen Fettgewebes einer Maus der Hochfett-Gruppe.

Im Einklang mit der stärker ausgebildeten Fettgewebs-Inflammation der mit Hochfett- und Hoch-Vitamin D<sub>3</sub>-Diät gefütterten Mäuse und der erhöhten Expression von M1-spezifischen Markern auf mRNA-Ebene konnte in der HE-Färbung dieser Gruppe eine signifikant höhere Anzahl an CLS im Vergleich zu den Tieren der Hochfett- und Niedrig-Vitamin D<sub>3</sub>-Gruppe gesichtet werden. Als zweite unabhängige Auswertung, wurde die Anzahl der Zellkerne ermittelt und in Relation zur Zahl der Adipozyten gesetzt. Auch hier konnte ein Trend zu einem Anstieg des Verhältnisses (Zellkerne pro Adipozyt) in der Hoch-Vitamin D<sub>3</sub>-Diät beim Vergleich der adipösen Tiere festgestellt werden ( $p=0,0931$ ). Dies deutet ebenfalls auf eine erhöhte Rekrutierung von ATMs und ggf. anderer Entzündungszellen in das Gewebe hin und unterstreicht so die bei der Auszählung der CLS erhaltenen Ergebnisse.

### **3.4 Einfluss des Vitamin D<sub>3</sub> auf die Entwicklung einer Insulinresistenz im Adipositas-Maus-Modell**

Von einer anti-inflammatorischen Wirkung des Vitamin D ist bei den Versuchstieren unter Berücksichtigung der vorliegenden Daten der RT-PCR sowie der Histologie im verwendeten Maus-Modell nicht auszugehen. Da Zusammenhänge zwischen niedriggradiger Inflammation und Insulinresistenz beschrieben sind legten die bis zu diesem Zeitpunkt gewonnenen Ergebnisse die Vermutung nahe, dass sich eine solche Insulinresistenz unter der Kombination Hochfett- und Hochdosis-Vitamin D-Diät ebenfalls verschlechtern könnte [16, 67].

#### **3.4.1 Definition Insulinresistenz**

Unter Insulinresistenz versteht man die verschlechterte Reaktion peripherer Zellen (Myozyten, Adipozyten, etc.) auf das Proteohormon Insulin. Das von den  $\beta$ -Zellen des Pankreas sezernierte Hormon wirkt im humanen wie auch murinen Organismus über die extrazelluläre Bindung an den Insulinrezeptor (IR). Die so ausgelöste intrazelluläre Signalkaskade führt in den Zielorganen (wie z.B. dem weißen Fettgewebe) u.a. zur Translokation von intrazellulären Vesikeln an die Zelloberfläche, die mit Glukose-Transporter GLUT4 beladen sind. Durch diesen Transporter wird Glukose insulinabhängig aus der Blutbahn in die Zellen

transportiert und so eine systemische Blutzuckersenkung herbeigeführt [68]. Beim Vorliegen einer Insulinresistenz ist das Reaktionspotenzial der peripheren Zellen auf den vom Pankreas ausgesandten Insulinreiz herabgesetzt. Für dieselbe insulinabhängige intrazelluläre Reaktion wird also mehr Insulin benötigt bzw. muss mehr Insulin vom Pankreas sezerniert werden [67]. Durch die erhöhte Konzentration freier Fettsäuren im Serum sind Übergewicht und Adipositas wichtige prädisponierende Faktoren für die Insulinresistenz. Ist das Pankreas dann nicht imstande genügend Insulin zu produzieren kommt es zu erhöhten Blutzuckerwerten und somit zur Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ 2 [69].

### **3.4.2 Substitution von Vitamin D<sub>3</sub> zeigt keinen positiven Einfluss auf die Entwicklung einer Insulinresistenz im Adipositas-Maus-Modell**

Vor dem oben beschriebenen Hintergrund des moderat pro-adipogenen und scheinbar pro-inflammatorischen Effektes einer Hochdosis-Vitamin D<sub>3</sub>-Substitution im verwendeten Maus-Modell betrachteten wir den Glukose- und Insulinhaushalt der Versuchstiere auf mehreren Ebenen. Die Serum-Insulinspiegel der Tiere unter Hochfett- und Hoch-Vitamin D<sub>3</sub>-Diät waren, kohärent mit Körpergewicht und Serumglukose, höher als in der Gruppe der entsprechenden Niedrig-Vitamin D<sub>3</sub>-Tiere (Abb.13). Zu erwarten war so auch ein höherer HOMA-Index (Homeostasis Model Assessment; engl.: *Modell zur Einschätzung der Homöostase*) ( $\text{Insulin (}\mu\text{U/ml)} \times \text{Glukose (mmol/l)} / 22,5$ ) als Maß der Insulinresistenz. Mit Werten  $>5$  befinden sich beide Hochfettgruppen deutlich im Bereich der Insulinresistenz. Im Einklang mit den bisherigen Ergebnissen war allerdings ein Trend zu einer weiteren Verschlechterung der Resistenzlage unter Hochfett- und Hoch-Vitamin D<sub>3</sub>-Diät zu beobachten.



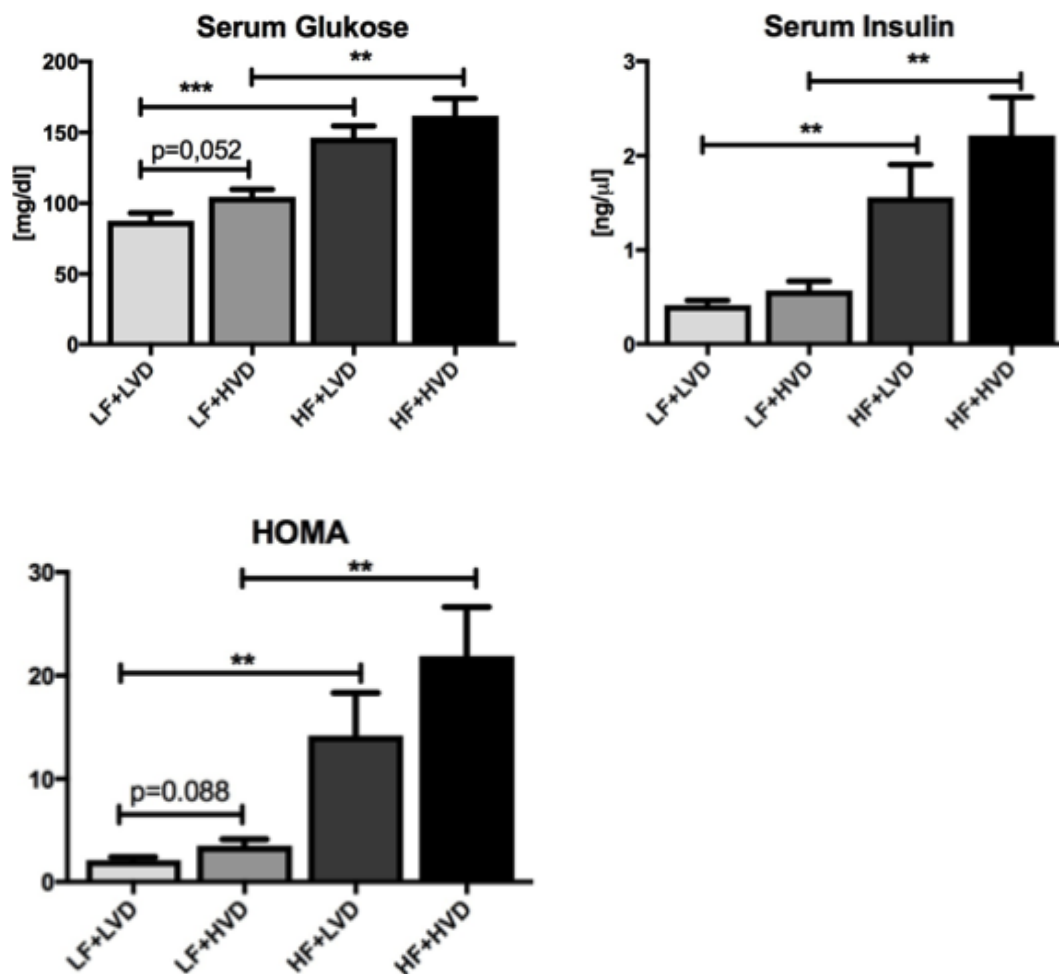


Abb. 13: **Serum-Glukose- und -Insulin-Spiegel / Homa-Index:** Um einen Zusammenhang zwischen inflammatorischer Situation im Fettgewebe und diabetogener Stoffwechsellage im vorliegenden Maus-Modell zu untersuchen wurden Serum-Glukose und -Insulin aller Tiere bestimmt und im sog. HOMA-Index als Maß für Insulinresistenz ins Verhältnis gesetzt. Unter Hochfett- und Hoch-Vitamin D<sub>3</sub>-Diät zeigten sich als Ausdruck einer verstärkten Insulinresistenz höhere Serum-Glukose- und -Insulin-Werte sowie ein höherer HOMA-Index als in der Gruppe der Hochfett-Niedrig-Vitamin D<sub>3</sub>-Diät.

Zur weiteren Investigation richteten wir unser Augenmerk auch auf die RNA-Ebene. Relevant für die Prozessierung des extrazellulären Insulinreizes sowie die Reaktion der gesteigerten Glukoseverwertung sind die Expressionen des insulinabhängigen Glukose-Transporters 4 (GLUT4) und des Insulinrezeptor-Substrat 1 (IRS1).

Bei IRS1 handelt es sich um das Bindeglied zwischen extrazellulärem Insulin, das an der Zellmembran den Insulinrezeptor bindet, und den intrazellulären Signalwegen, die die Reaktion der Zelle auf den Insulinreiz bewirken. So spielt es u.a. eine wichtige Rolle beim Zellwachstum und der Glukoseverwertung, die über GLUT4 gewährleistet wird [70]. Bindet Insulin an den Insulin-Rezeptor wird IRS1 phosphoryliert und dient in dann aktivierter Form als „Adapter-Protein“ für

nachgeschaltete Signalwege, die Glukose-Aufnahme, Lipogenese und Protein-Synthese regulieren. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit einer hemmenden Phosphorylierung, die das Interaktionspotential des IRS1 herabsetzt und sich somit fördernd auf die Insulinresistenz auswirkt [71].

Im Einklang mit der Theorie der vermehrten Insulinresistenz und somit einer verschlechterten zellulären Antwort auf den Insulinreiz unter Hochfett- und Hoch-Vitamin D<sub>3</sub>-Diät zeigte sich sowohl bei GLUT4 als auch bei IRS1 jeweils ein leichter Trend zu einer verminderten Expression auf mRNA-Ebene im Vergleich zu den Mäusen der Hochfett- und Niedrig-Vitamin D<sub>3</sub>-Diät (Abb. 14).

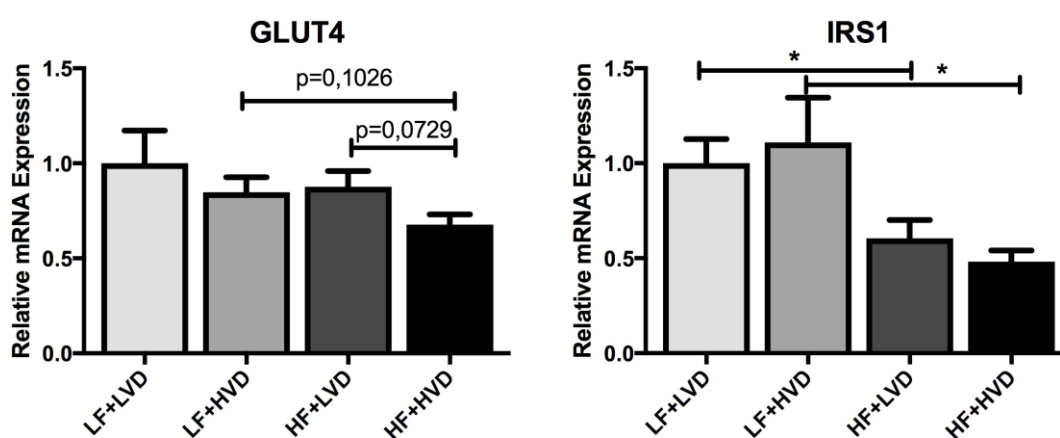


Abb. 14: **GLUT4 und IRS1**: Die Proteine GLUT4 und IRS sind für die zelluläre, insulinabhängige Glukoseaufnahme essentiell. Bei der Untersuchung ihrer Transkriptions-Raten zeigt sich ebenfalls ein Trend zur verminderten Transkription (im Falle des GLUT4 beinahe signifikant) und dadurch erhöhten Insulinresistenz unter Hoch-Vitamin D<sub>3</sub>-Diät beim Vergleich der Hochfett-Gruppen.

Wir entschieden uns anschließend für eine Untersuchung des IRS1 auf Proteinebene mittels Western Blot. Korrelierend mit bekannten Forschungsergebnissen zeigte sich beim Vergleich von Niedrig- und Hochfett-Diät jeweils unter Niedrig-Vitamin D<sub>3</sub> eine Reduktion der IRS1-Protein-Expression unter Hochfett-Diät (Abb. 15, oberer Panel). Interessanterweise und im Einklang mit den oben beschriebenen Daten zur Insulinresistenz wurde dieser Hochfett-Diät-assoziierte Rückgang des IRS1-Proteins in der Hochfett- und Hoch-Vitamin D<sub>3</sub>-Gruppe weiter verstärkt (Abb. 15, unterer Panel).

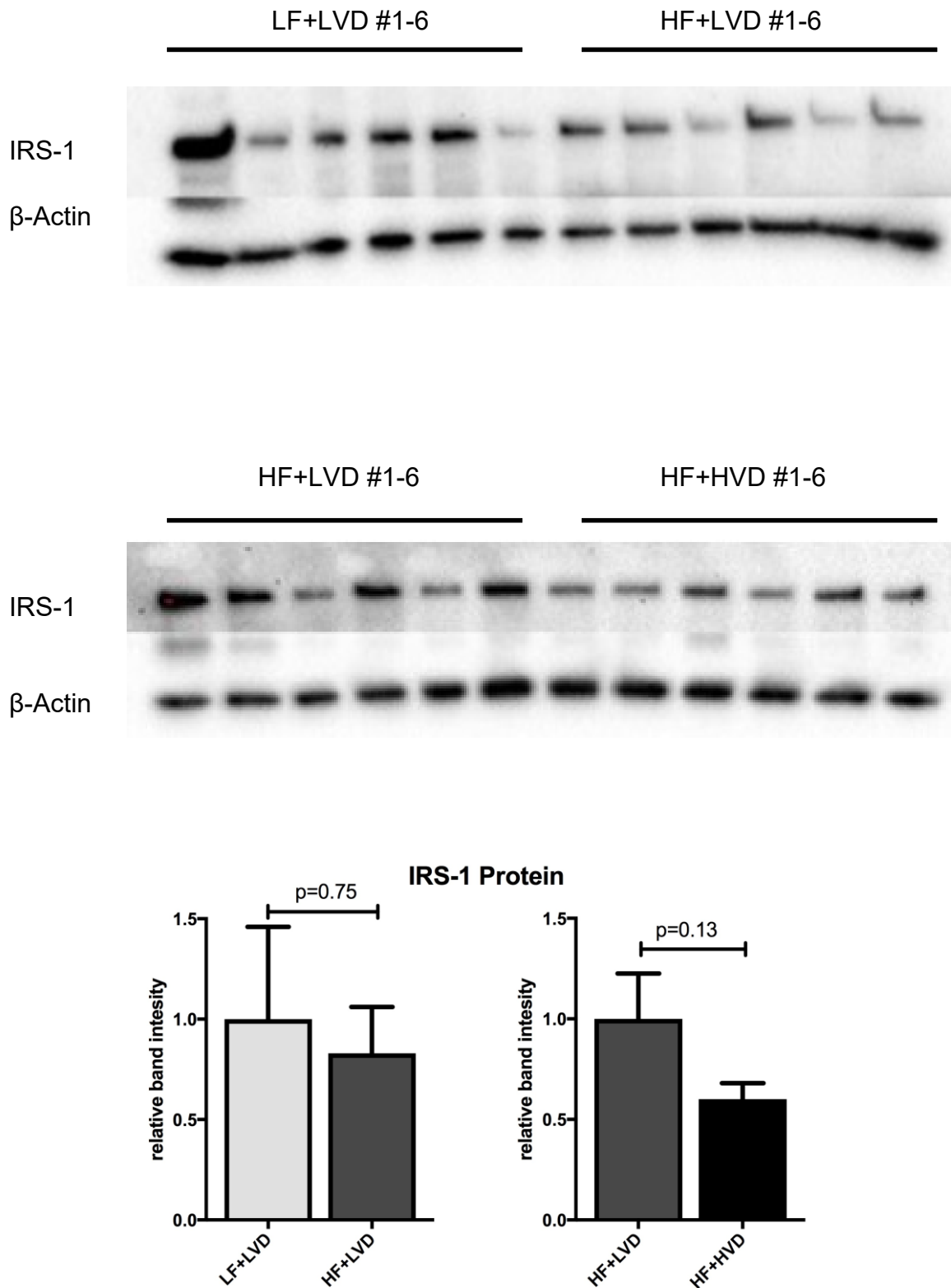


Abb. 15: **IRS1-Western Blot:** Um untersuchen zu können ob IRS1 als Protein in der Zelle auch vermehrt vorliegt wurde ein Western Blot durchgeführt. Dieser zeigte die erwartete Reduktion unter Hochfett-Diät beim Vergleich der Niedrig-Vitamin D<sub>3</sub>-Gruppen. Eine weitere Reduktion unter Hochfett- und Hoch-Vitamin D<sub>3</sub>-Diät (im Vergleich zur Hochfett- und Niedrig-Vitamin D<sub>3</sub>-Gruppe) passt zum bereits beschriebenen Trend einer vermehrten Insulinresistenz unter 10.000 IU Vitamin D<sub>3</sub>/kg Futter.

Auch wenn es sich bei den vorliegenden Ergebnissen um Unterschiede handelt, die teilweise unterhalb der statistischen Signifikanzgrenze liegen, ergibt sich qualitativ doch ein einheitliches Bild, das die Annahme der verstärkten Insulinresistenz unter Hochdosis-Vitamin D (im Vergleich zur reinen Hochfett-Diät) zulässig erscheinen lässt.

## 4. Diskussion

### 4.1 Die Maus als etablierter Organismus zur Untersuchung von Adipositas und metabolischem Syndrom

Im Zuge des immer größer werdenden Interesses an Adipositas, ihrer Entstehung sowie der durch sie prädisponierten Erkrankungen hat sich die Maus als Modellorganismus etabliert. Einer Hochfett-Diät ausgesetzt reagiert sie vergleichbar mit dem humanen Organismus mit der Ausbildung eines metabolischen Syndroms [72]. Da die vorliegende Arbeit den möglichen Nutzen einer Vitamin D<sub>3</sub>-Substitution im adipösen murinen Organismus untersuchen sollte begannen wir die Substitution sechs Wochen nach Beginn der Hochfettdiät. Als bestes *in toto* resezierbares weißes, viszerales Fettgewebskompartiment entschieden wir uns für die weitere Untersuchung des epididymalen Fettes. Dieses gewährleistet eine gute Vergleichbarkeit der einzelnen Gruppe. Als Einstieg und zur Gewinnung eines Überblickes über die Vorgänge im epididymalen Fett der vier Gruppen wurde die Expression einer Vielzahl an Genen mittels RT-PCR bestimmt. ELISA, Western Blot und Mikroskopie vervollständigten die experimentelle Herangehensweise besonders in Bezug auf das entzündliche Geschehen und die Stoffwechsellage.

Entgegen der Erwartung eines möglichen positiven Effektes des Vitamin D auf die im Modell dickgefütterten Mäuse beobachteten wir unter dem Einfluss der Hochfett-Diät mit 10.000 IU Vitamin D<sub>3</sub>/kg Futter nicht nur eine vermehrte Gewichtszunahme. Ebenso zeigte sich eine verstärkt inflammatorische Situation des weißen Fettgewebes mit vermehrter Makrophageninfiltration sowie eine darauf folgende Verschlechterung der Stoffwechsellage hinsichtlich der Entwicklung einer Insulinresistenz.

### 4.2 Vitamin D<sub>3</sub>-Defizienz führt zur Resistenz gegenüber Diät-induzierter Adipositas, während eine Überexpression des Vitamin D-Rezeptors im weißen Fettgewebe die Fettgewebsexpansion fördert

Im Einklang mit dem in dieser Arbeit beschriebenen Effekt der verstärkten Gewichtszunahme unter Steigerung der Vitamin D-Spiegel konnten

vorhergehende Arbeiten in anderen Modellen den entgegengesetzten Effekt bei Vitamin D-Mangel bzw. -Fehlen zeigen. Eine fehlende Wirkung von Vitamin D<sub>3</sub> im murinen Organismus manifestierte sich in diesen Arbeiten durch eine geringere Zunahme an Körpergewicht und Fettmasse, sei es im Rahmen eines Vitamin D-Rezeptor-Knockouts oder einer Vitamin D-defizienten Ernährung.

So zeigten beispielsweise die Arbeiten von Narvaez et. al. und Wong et. al. eine Resistenz von *Vdr*<sup>-/-</sup> (Vitamin D-Rezeptor-Knock out-) Mäusen gegenüber Diät-induzierter Adipositas. Die durch gentechnische Depletion des Vitamin D-Rezeptors dem Vitamin D<sub>3</sub> gegenüber resistenten Mäuse wiesen unter Hochfett-Diät kleinere Adipozyten auf. Ein Adipositas-assoziiertes Anstieg von freien Fettsäuren, Insulin und Glukose bleibt ebenfalls aus. Als ursächlich vermuteten jene Arbeiten u.a. die Hochregulierung des Energieumsatzes durch vermehrte Expression von sog. entkoppelnden Proteinen (*engl.: uncoupling protein*, kurz: UCP), die durch Entkopplung der Atmungskette der Thermogenese dienen [73, 74]. Eine geringere Zunahme an Fettmasse durch Diät-induzierte Vitamin D<sub>3</sub>-Defizienz beschrieben Bhat et. al. im Rattenmodell. Hier konnte zudem eine Umkehr dieses Effekts durch die anschließende Substitution von Vitamin D<sub>3</sub> gezeigt werden [75]. Entzieht man dem murinen Organismus in bestimmten Modellen also das Vitamin D<sub>3</sub>, so scheint dieser mit verminderter Gewichtszunahme bzw. einer Resistenz gegenüber Diät-induzierter Adipositas zu reagieren.

Wong et.al. beobachteten zudem, dass eine gewebespezifische Überexpression des Vitamin D-Rezeptors im Fettgewebe unter Hochfett- und Standard-Diät eine vermehrte Gewichtszunahme zur Folge hat [76]. Als Ursachen nahmen sie einen reduzierten Energieumsatz sowie eine verminderte Lipolyse unter Einfluss des Vitamin D-Rezeptors an.

Diese Studien bestätigen somit in Zusammenschau mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, dass Vitamin D<sub>3</sub> bzw. der Vitamin D-Rezeptor in der Lage zu sein scheinen eine Fettgewebsexpansion herbeizuführen und damit die Ausbildung der Diät-induzierten Adipositas im Tiermodell zu verstärken.

### **4.3 In Anbetracht vorliegender Studien führt die Kombination aus Hochfett- und Hoch-Vitamin D<sub>3</sub>-Diät bei schlanken Mäusen zu einer geringeren Gewichtszunahme als die Gabe einer reinen Hochfett-Diät**

Betrachtet man nun Arbeiten, die sich ebenfalls einer Kombination aus hochkalorischer Diät und Vitamin D<sub>3</sub>-Supplementation im genetisch unveränderten Organismus bedienen, so ergibt sich ein anderes Bild. Die Mehrheit der hierzu vorliegenden Arbeiten wie z.B. Mostafa et. al. beschreiben eine geringere Gewichtszunahme unter Supplementation [77-79]. Ein Grund hierfür könnte im unterschiedlichen Versuchsaufbau liegen. Alle hier zitierten Arbeiten verabreichten den bis dato schlanken Mäusen ab Tag eins die Kombination aus hochkalorischer Nahrung und hochdosiertem Vitamin D<sub>3</sub>. Was beschrieben wird ist also die Wirkung auf den schlanken im Gegensatz zum bereits adipösen Organismus.

Ein möglichen Erklärungsansatz für die unterschiedlichen Gewichtsentwicklungen könnte die Wirkung des Vitamin D<sub>3</sub> auf die Adipogenese (= Prozess der Zelldifferenzierung vom Präadipozyten zum reifen Adipozyten) bieten.

So konnten Kong et. al. *in vitro* zeigen, dass Vitamin D<sub>3</sub> murine 3T3-L1-Präadipozyten an der Differenzierung hindert; ein Mechanismus, an dem laut Hida et. al. unter anderem die Inhibition der Proteinexpression von PPAR $\gamma$ 2 (Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor  $\gamma$ 2) beteiligt ist. Vermittelt wird dieser Prozess über den Vitamin D-Rezeptor [80, 81]. Im Umkehrschluss beobachteten Narvaez et. al. bei Vitamin D-Rezeptor Knock-out-Mäusen *in vivo* eine erhöhte Anzahl kleinerer Adipozyten im abdominalen Fettgewebe im Vergleich zum Wildtypen [73]. Es scheint unter Vitamin D-Einfluss also zu einem verminderten Heranreifen reifer Adipozyten zu kommen. Des Weiteren beobachteten Blumberg et. al. eine unter dem Einfluss des Vitamin D-Rezeptors verminderte Lipolyse [82]. Zum Zweck der Fettgewebsexpansion bleibt in jenem Fall also v. a. der Mechanismus der Zellhypertrophie. Das zu Beginn der Hochfett- und Hoch-Vitamin D<sub>3</sub>-Diät schlanke Tier hätte so weniger Möglichkeit Fettgewebe zu vermehren und zeigt so –wie in der Literatur beschrieben- weniger Gewichtszunahme als die Vergleichsgruppe unter reiner Hochfett-Diät. Den im vorliegenden Versuch zu Beginn der Substitution bereits

adipösen Mäusen stehen hingegen bereits eine Vielzahl ausgereifter Adipozyten zur Verfügung, in denen zudem intrazellulär weniger Fettsäuren abgebaut werden können. Sie können demnach mehr Gewicht zunehmen als ihre unter Hochfett- und Niedrig-Vitamin D<sub>3</sub>-Diät stehende Vergleichsgruppe.

#### **4.4 Durch die Hypertrophie als hauptsächlichsten Mechanismus der Fettgewebsexpansion unter Hochfett- und Hoch-Vitamin D<sub>3</sub>-Diät kommt es zu verstärkter Hypoxie im epididymalen Fettgewebe dieser Mäuse**

Wie im vorausgehenden Abschnitt beschrieben scheint die vermehrte Gewichtszunahme unter Hochfett- und Hoch-Vitamin D<sub>3</sub>-Diät v. a. über eine vermehrte Hypertrophie der Adipozyten stattzufinden. Der dadurch erhöhte vom Sauerstoff zurückzulegende Diffusionsabstand scheint eine Gewebehypoxie zur Folge zu haben, die sich im vorliegenden Versuchsaufbau in einer gesteigerten mRNA-Expression des HIF1 $\alpha$  widerspiegelt. Dass VEGF als Hauptfaktor der Initiierung der Angiogenese trotz Hypoxie und HIF1 $\alpha$  nicht ansteigt könnte Teil des Mechanismus sein, der die Hypoxie als Mitverursacher der niedriggradigen Inflammation des adipösen Fettgewebes aufrechterhält. Im Einklang hiermit berichteten West et. al. eine verminderte Durchblutung des Fettgewebes adipöser Ratten beim Vergleich mit ihren schlanken Artgenossen. Die Durchblutung anderer Gewebe zeigte jedoch keinerlei Veränderung [83].

#### **4.5 Erhöhtes Calcium im Serum ist als Ursache der beschriebenen Effekte eher unwahrscheinlich**

Da das Vitamin D eine wichtige Rolle im Calciumhaushalt spielt stellt sich bei Betrachtung der Verhältnisse *in vivo* zudem die Frage, inwieweit Vitamin D<sub>3</sub> selbst für Veränderungen verantwortlich ist oder ob vielmehr dessen Wirkung auf den Organismus mit Erhöhung des Serum-Calciums Veränderungen herbeiführt. Wong et. al. näherten sich dieser Thematik im Rahmen einer Diät mit hohem Calcium-Anteil bei *Vdr*<sup>-/-</sup> Mäusen. Da sich auch bei konstant normwertigen Calcium-Serumleveln dieselbe vermehrte Gewichtszunahme



zeigte scheinen Veränderungen der Calcium-Homöostase nicht hauptverantwortlich für die beobachteten Effekte zu sein [74]. Da Serum-Werte für Calcium oder Parathormon im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht bestimmt wurden ist eine abschließende Beurteilung der möglichen indirekten Wirkung von Calcium auf die untersuchten physiologischen Parameter zu diesem Zeitpunkt nicht möglich.

#### **4.6 Literatur und Betrachtung der pro-inflammatorischen Zytokine deuten in Richtung einer anti-inflammatorischen Wirkung der Hochdosis-Vitamin D-Substitution unter Hochfett-Diät**

Sowohl die Theorie der niedriggradigen Inflammation im adipösen Fettgewebe als auch die der anti-inflammatorischen Wirkung des Vitamin D<sub>3</sub> wurden im Rahmen dieser Arbeit bereits erwähnt. Es bestand somit die Vermutung einer möglichen Besserung dieser Entzündung sowie deren Folgen (Insulinresistenz, Diabetes mellitus Typ 2 etc.) durch eine Vitamin D<sub>3</sub>-Substitution im Adipositas-Mäusemodell.

Blicken wir allein auf die ‚klassischen‘ pro-inflammatorischen Zytokine (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ , etc., siehe 3. 7) so brachte die Untersuchung auf Basis der mRNA-Expression im weißen Fettgewebe keine zufriedenstellenden Ergebnisse, da das niedrige Transkriptionsniveau aussagekräftige Ergebnisse verhinderte. Lediglich ein leichter Trend in Richtung verminderter Transkription unter Hoch-Vitamin D<sub>3</sub>-Diät beim Vergleich der Hochfett-Gruppen konnte beobachtet werden.

Während die pro-inflammatorischen Zytokine unter Hoch-Vitamin D<sub>3</sub>-Diät lediglich leicht in Richtung einer anti-inflammatorischen Wirkung des Vitamin D tendieren, zeigen sich die Makrophagen-anlockenden Chemokine Ccl2 und Ccl7 unter dessen Einfluss beim Vergleich der adipösen Tiere deutlich erhöht. Dies deutet eine vermehrte Makrophageninfiltration unter Hochfett- und Hoch-Vitamin D<sub>3</sub>-Diät an (im Vergleich zu Hochfett- und Niedrig-Vitamin D<sub>3</sub>-Diät).

Betrachtet man die Literatur so findet man, dass der Vitamin D-Rezeptor auf Zellebene *in vitro* eine Rolle bei der Verminderung der Sekretion pro-

inflammatorischer Zytokine nach Stimulation bei sowohl murinen als auch humanen Adipozyten zu spielen scheint [84]. In Bezug auf den gesamten murinen Organismus konnten Bastie et. al. einen anti-inflammatorischen Effekt des Vitamin D<sub>3</sub> zeigen. Die unter Vitamin D<sub>3</sub>-Substitution ebenfalls adipöseren Mäuse zeigten eine Abnahme der pro-inflammatorischen Zytokine (IL-1 $\beta$ , Ccl2) im Serum [85].

Einen ebenfalls anti-inflammatorischen Effekt der Vitamin D-Substitution beobachteten Karkeni et. al. Mit Hochfett- und Hoch-Vitamin D<sub>3</sub>-Diät gefütterte Mäuse zeigten hier nicht nur eine geringere mRNA-Expression pro-inflammatorischer Zytokine; auch Markergene von sowohl M1- als auch M2-Makrophagen zeigten sich supprimiert unter dem Einfluss von Vitamin D<sub>3</sub>, in Einklang mit einer geringeren Anzahl an Makrophagen in der Fluss-Zytometrie. Hier wurde außerdem gezeigt, dass u.a. Ccl2 für die Anlockung der Makrophagen von Bedeutung ist, da Anti-Ccl2-Antikörper die Anlockung und somit auch Ansammlung an Makrophagen verminderten [77].

Dass die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen sich in Bezug auf die pro-inflammatorischen Zytokine unterscheiden könnte sich z. B. durch die unterschiedlichen verwendeten Diäten erklären. So erhielten die Mäuse im Versuchsaufbau von Bastie et. al. eine sog. Western-style Diät (engl.: *westliche Art*), die mit 20% des Gewichtsanteils einen deutlich niedrigeren Fettanteil aufweist. Als Diät verwendeten Karkeni et. al. ebenfalls eine Hochfett-Diät, diese jedoch direkt in Kombination mit einer Hochdosis-Vitamin D-Substitution. Wie sich dies auf das Gewicht der Mäuse beim Vergleich der beiden Versuchsgruppen über zehn Wochen auswirkt wird nicht beschrieben. Es scheint also möglich, dass der anti-inflammatorische Effekt des Vitamin D hier bei geringer ausgeprägtem Übergewicht zu Tragen kommen kann.

#### **4.7 Makrophagen-Switch in Richtung pro-inflammatorischer Population deutet auf ausgeprägtere Fettgewebs-Inflammation unter Hochfett- und Hoch-Vitamin D<sub>3</sub>-Diät hin**

Bei Betrachtung der Fettgewebs-Makrophagen konnten wir im Einklang mit Lumeng et al. [86] unter Hochfett-diät einen signifikanten Anstieg der

Makrophagenmarker F4/80 und Cd11c im weißen Fettgewebe feststellen. Dabei wurde in unseren Versuchen der Adipositas-assoziierte Anstieg des M1-assoziierten Markers Cd11c durch die Hoch-Dosis-Substitution mit Vitamin D<sub>3</sub> noch weiter verstärkt. Gleichzeitig erhöhte sich das Verhältnis von Cd11c/Cd206 in mit Hochfett-Diät gefütterten Tieren durch die Vitamin D<sub>3</sub>-Substitution signifikant im Vergleich zu nicht-substituierten Tieren (siehe Abb. 10 und 11). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der im Fettgewebe histologisch gefundenen Anzahl der sog. ‚crown like structures‘ (CLS) als Korrelate einer Ansammlung v. a. Cd11c-positiver M1-Makrophagen [87], die unter Hochfett- und Hoch-Vitamin D<sub>3</sub>-Diät (im Vergleich zur reinen Hochfett-Diät) noch weiter anstiegen (siehe Abb. 12). Dieser Effekt lässt sich wohl am ehesten durch das höhere Gewicht der Gruppe unter Hochfett- und Hoch-Vitamin D<sub>3</sub>-Diät erklären. Obwohl diese Befunde scheinbar im Widerspruch zur allgemein anti-inflammatorischen Wirkung des Vitamin D [88] stehen, liegen zum jetzigen Zeitpunkt keine weiteren Arbeiten vor, die das weiße Fettgewebe unter ausgeprägter Adipositas und Vitamin D<sub>3</sub>-Substitution betrachten. Daher scheint es möglich, dass ein möglicher und im Rahmen dieser Arbeit nicht auszuschließender anti-inflammatorischer Effekt des Vitamin D<sub>3</sub> nicht stark genug sein könnte, um dem der stärkeren Gewichtszunahme entgegenzuwirken.

#### **4.8 Vitamin D kann sich im gewählten Modell nicht positiv auf die Insulinresistenz der übergewichtigen Mäuse auswirken**

Die Kenntnis darüber, dass Adipositas prädisponierender Faktor für die Entstehung einer Insulinresistenz und somit auch eines Diabetes mellitus Typ 2 ist besteht seit langer Zeit. Ebenso auch die Theorie, dass diese Ausbildung einer Insulinresistenz auf der Grundlage der im adipösen Fettgewebe herrschenden niedriggradigen Inflammation entsteht [16, 24]. Im Einklang mit den etablierten Theorien zeigten auch in der vorliegenden Arbeit die Mäuse unter Hochfett- und Hoch-Vitamin D<sub>3</sub>-Diät mit dem höchsten Körpergewicht eine verstärkte Insulinresistenz. Nicht nur die Betrachtung der Serum-Insulin- und -Blutzuckerwerte (siehe Abb. 13) lässt diesen Schluss zu, sondern auch die intrazellulären Vorgänge im Sinne einer verminderten Expression von GLUT4

und IRS1 (siehe Abb. 14) legen diesen Schluss nahe. Eine Korrelation von Insulinresistenz und verminderter mRNA-Expression sowie erniedrigten Protein-Leveln von sowohl GLUT4 als auch IRS1 beschrieben Stephens et. al. in murinen 3T3-L1-Adipozyten [89]. Auch Jager et. al. zeigten eine geringere mRNA-Expression des IRS1 in adipösen *ob/ob*-Mäusen im Vergleich zu ihren genetisch unveränderten schlanken Geschwistern [90].

Dass Vitamin D<sub>3</sub> eine Rolle bei der Insulinsekretion spielt beobachteten Zeitz et. al. Deren Vitamin D Rezeptor-defizienten Mäuse zeigten auch bei normalen Calcium-Spiegeln eine nach Glukose-Gabe verminderte Insulinsekretion [91]. Eine insulinsensitivere Reaktion in Bezug auf das periphere Gewebe bei vorliegendem Vitamin D-Mangel und Adipositas zeigten Liu et.al.. Deren unter Hochfett- und Vitamin D-defizienter Diät stehende Mäuse zeigten im Vergleich zur reinen Hochfett-Gruppe niedrigere nüchtern Serum-Glukose- und Serum-Insulin-Spiegel sowie eine schnellere Glukose-Verwertung im Glukose-Toleranz-Test [92]. Eine insulinsensitivere Reaktion Vitamin D-defizienter Mäuse lässt sich im Umkehrschluss gut mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit vereinbaren.

Alles in allem entsteht so ein Bild, das zumindest im untersuchten Modell dieser Versuchsreihe bei den adipösen, Vitamin D-substituierten Mäusen eine ausgeprägtere Insulinresistenz bei stärkerer Inflammation zeigt, trotz oder aufgrund der höheren Vitamin D-Spiegel. Hier dürfte der Vergleich mit anderen Hochfett-Fütterungsmodellen und Vitamin-D-Rezeptor (VDR) defizienten Mäusen, die derzeit von der Arbeitsgruppe untersucht werden, eine weiterführende Bewertung ermöglichen.

#### **4.9 Der Effekt des substituierten Vitamin D<sub>3</sub> erscheint nicht ausreichend um die negativen Effekte der stärkeren Gewichtszunahme auszugleichen**

Bei Betrachtung aller gewonnenen Ergebnisse entsteht ein Gesamteindruck, der dem Vitamin D als Substitutionstherapie bei adipösen Mäusen zumindest im vorliegenden Modell keinen positiven Effekt attestieren kann. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen den folgenden Mechanismus als ursächlich nahe:

Die Vitamin D<sub>3</sub>-Substitution der adipösen Mäuse führte zu verstärkter Gewichtszunahme, am ehesten als Ausdruck einer verstärkten Hypertrophie der Adipozyten des weißen Fettgewebes. Die hierdurch verstärkte Hypoxie im epididymalen Fettgewebe bedingt und verstärkt die bei Adipositas bestehende niedriggradige Inflammation. Der für das adipöse Fettgewebe bereits bekannte Mechanismus der einwandernden Makrophagen und deren Switch in Richtung der pro-inflammatorischen M1-Population sowie deren Anordnung in ‚crown like structures‘ wird bestätigt. Ergänzt wird dies zudem um die Erkenntnis, dass sich diese Ansammlung von M1-Makrophagen durch das noch höhere Gewicht weiter verstärkt und dieser Effekt vom Vitamin D<sub>3</sub> in den zwei Wochen der Substitution nicht positiv beeinflusst werden kann. Insulinresistenz als Folge der niedriggradigen Entzündung wird nicht gemindert, sondern verstärkt sich im Rahmen des höheren Maßes an Adipositas.

#### **4.10 Beim schlanken Menschen zeigt sich eine Korrelation von niedrigen Vitamin D-Spiegeln und Insulinresistenz**

Letztlich ist es jedoch eine mögliche Übertragbarkeit auf den humanen Organismus, der jedem Experiment am murinen zugrunde liegt. Stets in der Hoffnung auf therapeutischen Nutzen.

Über die Zusammenhänge von Adipositas und Vitamin D-Mangel beim Menschen wurden viele Theorien aufgestellt. Aufgrund des Körpergewichts verminderte Aktivität und Aufenthalt im Freien mit folglich geringerer UV-B-Exposition, andere Ernährungsgewohnheiten mit geringerer Aufnahme von Vitamin D oder auch eine verminderte systemische Verfügbarkeit durch Akkumulation des fettlöslichen Vitamins im vermehrt vorkommenden Fettgewebe werden diskutiert [93, 94]. Drincic et. al. schlugen des Weiteren vor, dass dem Vitamin D-Mangel der Effekt einer volumetrischen Verdünnung zugrunde liegen könnte. So hatten schlanke und adipöse Probanden bezogen auf das Körpervolumen ähnliche Vitamin-D-Level; die gleiche Menge an Substitution bewirkte bei den adipösen Probanden im Umkehrschluss eine geringere Anhebung des Serum-Vitamin D [95].

Betrachtet man mögliche Zusammenhänge von Vitamin D-Mangel und Insulinresistenz bzw. Ausbildung eines Diabetes mellitus Typ 2, so findet man keine ganz klare Datenlage. So fanden Scragg et. al. bei der Betrachtung der Daten von 6228 Probanden unterschiedlicher Ethnizitäten eine positive Korrelation von niedrigem Vitamin D<sub>3</sub>-Spiegel und hohem HOMA-Index bei mexikanisch-amerikanischen und weißen Probanden, nicht jedoch bei dunkelhäutigen [96]. Hyppönen et.al. zeigten eine inverse Korrelation von HbA1c und Vitamin D-Spiegel in einer Kohorte von 6810 Briten [97]. Da sich die Kohorten beider Arbeiten aus schlanken und übergewichtigen Probanden zusammensetzten, besteht der BMI als indirektes Maß des Körperfettes als möglicher Confounder, der mit Insulinresistenz und folglich erhöhten Blutzuckerspiegeln korreliert [98].

Bei ausgeprägt adipösen Frauen (BMI  $48,79 \pm 7,08 \text{ kg/m}^2$ ) fanden Manco et. al. keine inverse Korrelation von Insulinsensitivität und niedrigen Vitamin D-Spiegeln. Vielmehr sahen sie eine inverse Korrelation zu Fettmasse und zirkulierenden Triglyzeriden [99]. Ähnlich wie im murinen Organismus vermutet könnte das Vitamin D auch beim Menschen einen anderen Effekt auf den schlanken im Vergleich zum adipösen Organismus haben.

In diese Richtung deuten auch Studien, die sich mit Vitamin D-Supplementation beschäftigen. So zeigten Pittas et. al. beispielsweise bei insgesamt 314 schlanken Probanden einen nach drei Jahren geringeren HOMA-Index unter Calcium- und Vitamin D-Supplementation im Vergleich zur Placebo-Gruppe [100]. Bei 43 adipösen Probandinnen beobachteten Wamberg et. al. hingegen keinerlei Unterschiede in Bezug auf Körpergewicht, Fettverteilung und Insulinresistenz beim Vergleich von Vitamin D<sub>3</sub>-Supplementation (7000 IU/d) und Placebo [101].

#### **4.11 In Bezug auf die NAFLD kann eine unterstützende Therapie mittels Vitamin D<sub>3</sub>-Supplementation nützlich sein**

Wie zu Beginn dieser Arbeit bereits beschrieben wird auch ein Zusammenhang zwischen niedrigen Vitamin D-Spiegeln und der Ausbildung und Schwere einer Nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung vermutet. Betrachtet man hierzu

vorliegende Arbeiten so liegt auch hier die Vermutung nahe, dass kein kausaler Zusammenhang vorliegt, sondern vielmehr das Ausmaß an Adipositas entscheidend ist. Deren Schwere korreliert sowohl mit niedrigen Vitamin D-Spiegeln als auch mit einer höheren Wahrscheinlichkeit der Ausbildung einer NAFLD. Dies zeigt sich deutlich beim Vergleich von Probanden mit und ohne NAFLD. Hier weisen die gesunden Probanden signifikant niedrigere BMI auf, als jene an NAFLD Erkrankte [31, 102]. Schließt man jedoch Kontrollen und NAFLD-Erkrankte vergleichbarer BMI-Werte ein so zeigt sich keine Korrelation von niedrigen Vitamin D-Spiegeln und dem Ausmaß an Leberverfettung und Inflammation [103, 104].

Arbeiten, die sich mit dem möglichen Nutzen einer oralen Vitamin D-Substitution in Bezug auf die NAFLD beschäftigen unterscheiden sich je nach Patientenkollektiv. So beobachteten Amiri et. al. im Rahmen einer hypokalorischen Diät übergewichtiger Probanden eine Besserung des Steatosegrades in der Gruppe mit Vitamin D<sub>3</sub>-Supplementation. In der Placebo-Gruppe hingegen stagnierten die Steatosegrade im 12-wöchigen Beobachtungszeitraum weitestgehend [105]. Über einen Zeitraum von 24 Wochen zeigte die Arbeit von Barchetta et. al. bei Typ 2-Diabetikern jedoch keine Veränderung der Hepatosteatoses [106]. Eine mögliche Ursache hierfür könnte in der Assoziation von Insulinresistenz und NAFLD liegen [107]. Ein beim Nicht-Diabetiker möglicher positiver Effekt des Vitamin D auf die Insulinresistenz ist beim Typ 2-Diabetiker nicht mehr im selben Ausmaß erreichbar, folglich auch nicht auf das Ausmaß an Leberverfettung.

#### **4.12 Fazit**

Die Frage, inwiefern Vitamin D-Mangel Folge oder Entstehungsfaktor der Adipositas und der durch sie prädisponierten Erkrankungen ist kann zum jetzigen Zeitpunkt und Stand der Wissenschaft - einschließlich der in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse - nicht abschließend geklärt werden. Während viele aktuelle Studien vermuten lassen, dass es sich beim Vitamin D nicht um den erhofften vielversprechenden Therapieansatz bei Adipositas und Folgeerkrankungen handelt gibt es ebenfalls Studien, die einen gegenteiligen

Eindruck vermitteln. Letzterer basiert neben einer Reihe oben zitierter Arbeiten auch auf präliminären Daten aus der Arbeitsgruppe, die unter anderem zeigen, dass eine Hochdosis-Substitution mit Vitamin D im NASH-Mausmodell einen relevanten therapeutischen Nutzen ausüben kann [108]. Im Unterschied zur vorliegenden Arbeit wurde in der letztgenannten Studie eine Diät mit einer deutlich anderen Zusammensetzung an Makronährstoffen zur Induktion der Adipositas/NAFLD verwendet. Ob und in welchem Ausmaß die zu beobachtenden physiologischen Effekte des Vitamin D im Tiermodell eventuell von der konkreten Zusammensetzung des Futters beeinflusst werden könnten bleibt daher abzuwarten.

Im Gegensatz zum in der vorliegenden Arbeit verwendeten Mausmodell deutet beim adipösen Menschen zudem nichts darauf hin, dass sich eine vorliegende Fettgewebs-Entzündung oder Insulinresistenz unter Vitamin D-Supplementation weiter verschlechtern könnte. Eine Supplementation zur Erreichung physiologischer Werte erscheint demnach sinnvoll. Hierbei sollte beachtet werden, dass es bei Adipösen vermutlich höherer Mengen an Vitamin D bedarf um den Mangel auszugleichen.

#### **4.13 Stärken der Arbeit**

Die Stärken der vorliegenden Arbeit liegen in der Betrachtung des gesamten murinen Organismus, mit Fokus auf dem weißen Fettgewebe. Zu meiner Kenntnis ist sie die erste Arbeit, die die Wirkung einer Vitamin D<sub>3</sub>-Substitution auf die adipöse Maus und deren Fettgewebe beschreibt. So bietet sie einen Eindruck über möglich Vor- und Nachteile einer ‚therapeutischen‘ Vitamin D<sub>3</sub>-Substitution. Es zeigt sich, dass ein *in vitro* beobachteter anti-inflammatorischer Effekt im hier verwendeten Maus-Modell nicht zum Tragen kommt bzw. die vermehrte Gewichtszunahme überwiegt.



#### 4.14 Schwächen der Arbeit

Da die vorliegende Arbeit wie bereits beschrieben die Wirkung der Vitamin D<sub>3</sub>-Substitution auf den murinen adipösen Organismus beschreibt liegen ihre Schwächen im limitierten Tiefgang hinsichtlich mechanistischer Details. Mechanistische Fragen, z. B. in Bezug auf die verstärkte Gewichtszunahme oder das genaue Wirken des Vitamin D auf die Insulinresistenz am Adipozyten hätten den zeitlichen Rahmen der Arbeit überschritten und konnten daher nicht beantwortet werden. Des Weiteren ist die verwendete Hochfett-Diät, wenn auch effektiv in der Herbeiführung einer Diät-induzierten Adipositas, in ihrer Zusammensetzung nur bedingt mit der menschlichen Diät vergleichbar, die in der westlichen Welt am Problem Adipositas beteiligt ist. Dies trifft allerdings auf Adipositas-induzierende Maus-Diäten im Allgemeinen zu, die in der Zusammensetzung ihrer Makronährstoffe generell sehr „einseitig“ konzipiert sind. Derselbe Versuchsaufbau zur Fragestellung der Vitamin D-Substitution unter Verwendung einer stärker zucker- und kohlenhydrathaltigen Diät oder einer Diät mit einer anderen Fettsäurezusammensetzung könnte hier weitere Erkenntnisse bringen. Wie in Abschnitt 4.12 erwähnt wurden entsprechende Versuche in der Arbeitsgruppe außerhalb der vorliegenden Arbeit bereits begonnen. Da das Vitamin D Teil eines hormonellen Schaltkreises ist, wäre wie bereits erwähnt auch die Bestimmung von Calcium- und Parathormon-Leveln von Interesse, um weitere Erkenntnisse zu deren Einfluss auf die beobachteten physiologischen Vorgänge und ihren Anteil an der systemischen Reaktion zu erhalten.

## 5. Zusammenfassung

Adipositas und die hiermit verbundenen Folgen und Krankheitsbilder (wie Diabetes mellitus, Koronare Herzerkrankung etc.) haben sich in den letzten Jahren und Jahrzehnten zu einem globalen Problem entwickelt. Mögliche Therapieansätze und die Risikominimierung der Entstehung von Folgeerkrankungen (wie z.B. der Nichtalkoholischen Fettlebererkrankung) sind somit immer weiter in den Fokus der Wissenschaft gerückt.

Da eine Korrelation zwischen hohem Körpergewicht und niedrigen Vitamin D-Spiegel mehrfach beschrieben wurde ebenso wie die positiven (u.a. antiinflammatorischen) Wirkungen des Vitamin D auf den menschlichen und murinen Organismus, beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit der Möglichkeit einer Vitamin D-Substitution als möglichen Therapieansatz zur Prävention und besseren Behandlung adipöser Folgeerkrankungen.

Zur Anwendung kam in der vorliegenden Arbeit ein Adipositas-Mäuse-Modell wobei der Fokus auf der Untersuchung des epididymalen, weißen Fettgewebes lag. Verglichen wurden jeweils zwei Gruppen unter Niedrigfett- und Hochfett-Diät von denen jeweils eine Gruppe eine Hochdosis-Vitamin D<sub>3</sub>-Substitution erhielt. Das Fettgewebe wurde auf RNA- (mittels PCR) und Protein-Ebene (mittels ELISA und Western Blot) sowie auf mikroskopischer Ebene untersucht.

In der Gruppe der adipösen Tiere konnte bei den Tieren unter Hochfett- und Hoch-Vitamin D<sub>3</sub>-Diät ab Beginn der Substitution eine vermehrte Gewichtszunahme beobachtet werden. Einhergehend hiermit zeigten sich auf RNA-Ebene Hinweise auf eine vermehrte Hypoxie des Fettgewebes, die wir im Rahmen einer v.a. zunehmenden Hypertrophie als Mechanismus der Fettgewebiszunahme werteten. Eine vermehrte Makrophagen-Einwanderung infolge der Hypoxie sowie ein Switch der Makrophagenpopulation in Richtung der pro-inflammatorischen M1-Makrophagen konnte beobachtet werden. Auf mikroskopischer Ebene bestätigte sich dies mit einer Zunahme an ‚crown like structures‘, als morphologisches Korrelat der Ansammlung von M1-Makrophagen um die Adipozyten.

Als möglicher Ausdruck der vermehrten Fettgewebsinflammation konnte auch eine Zunahme an Insulinresistenz bei den Tieren unter Hochfett-Diät und Hoch-

Vitamin D<sub>3</sub>-Substitution gezeigt werden. Neben erhöhten Glukose- und Insulinspiegeln im Serum der erwähnten Versuchsgruppe zeigten sich auch auf zellulärer Ebene eine Herabsetzung der Translation und Transkription von Genen der Insulinreiz-Antwort und Glukose-Aufnahme (IRS1 und GLUT4).

Zusammenfassend entsteht der Eindruck, dass die Vitamin D-Substitution im vorliegenden Untersuchungsmodell keinen positiven Effekt auf die niedriggradige Fettgewebsinflammation sowie auf die hierausfolgende Ausbildung einer Insulinresistenz hat. Als Ursache hierfür muss die gleich zu Beginn des Versuchsaufbaus auffallende vermehrte Gewichtszunahme unter Hochfett-Diät und Hochdosis-Vitamin D<sub>3</sub>-Substitution beim Vergleich der Hochfett-Gruppen gewertete werden. Der mögliche positive Effekt des Vitamin D<sub>3</sub> scheint im untersuchten Zeitraum dem negativen Effekt des vermehrten Übergewichts nicht entgegenwirken zu können.

## 6. Quellenverzeichnis

1. WHO, *Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation*. WHO Technical Report Series, 2000. **894**.
2. WHO, *Obesity and overweight*. Fact sheet N°311, 2017.
3. Bundesamt, S., 2017: *Jeder zwei-te Er-wachsene in Deutsch-land hat Über-gewicht*. destatis.de, 2017.
4. Alberti, K.G., P. Zimmet, and J. Shaw, *Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation*. Diabet Med, 2006. **23**(5): p. 469-80.
5. Marceau, P., et al., *Liver pathology and the metabolic syndrome X in severe obesity*. J Clin Endocrinol Metab, 1999. **84**(5): p. 1513-7.
6. Chalasani, N., 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): p. 2005-23.
7. Weiß, J.R., Monika; Geier, Andreas, *Nichtalkoholische Fettlebererkrankung: Epidemiologie, Verlauf, Diagnostik und Therapie*. Dtsch Arztebl International, 2014. **111**(26): p. 447-52.
8. Powell, E.E., et al., *The natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a follow-up study of forty-two patients for up to 21 years*. Hepatology, 1990. **11**(1): p. 74-80.
9. Bacon, B.R., et al., *Nonalcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity*. Gastroenterology, 1994. **107**(4): p. 1103-9.
10. Nagore, N. and P.J. Scheuer, *The pathology of diabetic hepatitis*. J Pathol, 1988. **156**(2): p. 155-60.
11. Day, C.P. and O.F. James, *Steatohepatitis: a tale of two "hits"?* Gastroenterology, 1998. **114**(4): p. 842-5.
12. Matteoni, C.A., et al., *Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity*. Gastroenterology, 1999. **116**(6): p. 1413-9.
13. Blachier, M., et al., *The burden of liver disease in Europe: a review of available epidemiological data*. J Hepatol, 2013. **58**(3): p. 593-608.
14. Wigg, A.J., et al., *The role of small intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability, endotoxaemia, and tumour necrosis factor alpha in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis*. Gut, 2001. **48**(2): p. 206-11.
15. Katsiki, N., D.P. Mikhailidis, and C.S. Mantzoros, *Non-alcoholic fatty liver disease and dyslipidemia: An update*. Metabolism, 2016. **65**(8): p. 1109-23.
16. Hotamisligil, G.S., N.S. Shargill, and B.M. Spiegelman, *Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance*. Science, 1993. **259**(5091): p. 87-91.
17. Wellen, K.E. and G.S. Hotamisligil, *Inflammation, stress, and diabetes*. J Clin Invest, 2005. **115**(5): p. 1111-9.
18. Campfield, L.A., et al., *Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks*. Science, 1995. **269**(5223): p. 546-9.

19. Trayhurn, P. and J.H. Beattie, *Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ*. Proc Nutr Soc, 2001. **60**(3): p. 329-39.
20. Yin, J., et al., *Role of hypoxia in obesity-induced disorders of glucose and lipid metabolism in adipose tissue*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2009. **296**(2): p. E333-42.
21. Hosogai, N., et al., *Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation*. Diabetes, 2007. **56**(4): p. 901-11.
22. Kawasaki, N., et al., *Obesity-induced endoplasmic reticulum stress causes chronic inflammation in adipose tissue*. Sci Rep, 2012. **2**: p. 799.
23. Cheng, K.H., et al., *Adipocytokines and proinflammatory mediators from abdominal and epicardial adipose tissue in patients with coronary artery disease*. Int J Obes (Lond), 2008. **32**(2): p. 268-74.
24. Xu, H., et al., *Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance*. J Clin Invest, 2003. **112**(12): p. 1821-30.
25. Lashinger, L.M., N.A. Ford, and S.D. Hursting, *Interacting inflammatory and growth factor signals underlie the obesity-cancer link*. J Nutr, 2014. **144**(2): p. 109-13.
26. Boden, G. and G.I. Shulman, *Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction*. Eur J Clin Invest, 2002. **32 Suppl 3**: p. 14-23.
27. Chu, C.J., et al., *Risk factors associated with non-alcoholic fatty liver disease in Chinese patients and the role of tumor necrosis factor-alpha*. Hepatogastroenterology, 2007. **54**(79): p. 2099-102.
28. Eliades, M., et al., *Meta-analysis: vitamin D and non-alcoholic fatty liver disease*. Aliment Pharmacol Ther, 2013. **38**(3): p. 246-54.
29. Parikh, S.J., et al., *The relationship between obesity and serum 1,25-dihydroxy vitamin D concentrations in healthy adults*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(3): p. 1196-9.
30. Vimalaswaran, K.S., et al., *Causal relationship between obesity and vitamin D status: bi-directional Mendelian randomization analysis of multiple cohorts*. PLoS Med, 2013. **10**(2): p. e1001383.
31. Targher, G., et al., *Associations between serum 25-hydroxyvitamin D3 concentrations and liver histology in patients with non-alcoholic fatty liver disease*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2007. **17**(7): p. 517-24.
32. Holick, M.F., et al., *Photosynthesis of previtamin D3 in human skin and the physiologic consequences*. Science, 1980. **210**(4466): p. 203-5.
33. Ding, C., et al., *Vitamin D signalling in adipose tissue*. Br J Nutr, 2012. **108**(11): p. 1915-23.
34. DeLuca, H.F., *Overview of general physiologic features and functions of vitamin D*. Am J Clin Nutr, 2004. **80**(6 Suppl): p. 1689S-96S.
35. Stokes, C.S., et al., *Vitamin D in chronic liver disease*. Liver Int, 2013. **33**(3): p. 338-52.
36. Holick, M.F., *Vitamin D deficiency*. N Engl J Med, 2007. **357**(3): p. 266-81.
37. Bouillon, R., et al., *Vitamin D and energy homeostasis: of mice and men*. Nat Rev Endocrinol, 2014. **10**(2): p. 79-87.
38. Kriebitzsch, C., et al., *The impact of 1,25(OH)2D3 and its structural analogs on gene expression in cancer cells--a microarray approach*. Anticancer Res, 2009. **29**(9): p. 3471-83.

39. Bouillon, R., et al., *Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice*. *Endocr Rev*, 2008. **29**(6): p. 726-76.
40. Rosen, C.J., et al., *The nonskeletal effects of vitamin D: an Endocrine Society scientific statement*. *Endocr Rev*, 2012. **33**(3): p. 456-92.
41. Medicine, I.o., *Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D*. National Academies Press, 2011.
42. Rubner-Institut, M., *Nationale Verzehrsstudie II*. Ergebnisbericht Teil 2, 2008.
43. Hintzpeter, B., et al., *Vitamin D status and health correlates among German adults*. *Eur J Clin Nutr*, 2008. **62**(9): p. 1079-89.
44. (DGE), D.G.f.E.e.V., *Neue Referenzwerte für Vitamin D* Presseinformation der Deutschen Gesellschaft für Ernährung e.V., 2012. **01/12**.
45. in *Nutrient Requirements of Laboratory Animals: Fourth Revised Edition*, 1995. 1995: Washington (DC).
46. Hauner, H., *Secretory factors from human adipose tissue and their functional role*. *Proc Nutr Soc*, 2005. **64**(2): p. 163-9.
47. Lehr, S., et al., *Identification and validation of novel adipokines released from primary human adipocytes*. *Mol Cell Proteomics*, 2012. **11**(1): p. M111 010504.
48. Lackie, J., *A Dictionary of Biomedicine*. 2010, Oxford University Press. p. 'Cytokines'.
49. Martin, E.H., R., *A Dictionary of Biology*. 2014, Oxford University Press. p. 'Cytokine'.
50. Pelleymounter, M.A., et al., *Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice*. *Science*, 1995. **269**(5223): p. 540-3.
51. Maffei, M., et al., *Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects*. *Nat Med*, 1995. **1**(11): p. 1155-61.
52. Stepan, C.M., et al., *The hormone resistin links obesity to diabetes*. *Nature*, 2001. **409**(6818): p. 307-12.
53. Bokarewa, M., et al., *Resistin, an adipokine with potent proinflammatory properties*. *J Immunol*, 2005. **174**(9): p. 5789-95.
54. Mutt, S.J., et al., *Vitamin D and adipose tissue-more than storage*. *Front Physiol*, 2014. **5**: p. 228.
55. Roth, C.L., et al., *Vitamin D deficiency in obese rats exacerbates nonalcoholic fatty liver disease and increases hepatic resistin and Toll-like receptor activation*. *Hepatology*, 2012. **55**(4): p. 1103-11.
56. Rajala, M.W., et al., *Cell type-specific expression and coregulation of murine resistin and resistin-like molecule-alpha in adipose tissue*. *Mol Endocrinol*, 2002. **16**(8): p. 1920-30.
57. Semenza, G.L., et al., *Structural and functional analysis of hypoxia-inducible factor 1*. *Kidney Int*, 1997. **51**(2): p. 553-5.
58. Semenza, G.L., *Targeting HIF-1 for cancer therapy*. *Nat Rev Cancer*, 2003. **3**(10): p. 721-32.
59. Murdoch, C., M. Muthana, and C.E. Lewis, *Hypoxia regulates macrophage functions in inflammation*. *J Immunol*, 2005. **175**(10): p. 6257-63.
60. Fried, S.K., D.A. Bunkin, and A.S. Greenberg, *Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6:*

- depot difference and regulation by glucocorticoid.* J Clin Endocrinol Metab, 1998. **83**(3): p. 847-50.
61. Weisberg, S.P., et al., *Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue.* J Clin Invest, 2003. **112**(12): p. 1796-808.
62. Gu, L., S.C. Tseng, and B.J. Rollins, *Monocyte chemoattractant protein-1.* Chem Immunol, 1999. **72**: p. 7-29.
63. Gordon, S., *Alternative activation of macrophages.* Nat Rev Immunol, 2003. **3**(1): p. 23-35.
64. Ezekowitz, R.A. and S. Gordon, *Alterations of surface properties by macrophage activation: expression of receptors for Fc and mannose-terminal glycoproteins and differentiation antigens.* Contemp Top Immunobiol, 1984. **13**: p. 33-56.
65. Van Belle, T.L., C. Gysemans, and C. Mathieu, *Vitamin D and diabetes: the odd couple.* Trends Endocrinol Metab, 2013. **24**(11): p. 561-8.
66. Patsouris, D., et al., *Ablation of CD11c-positive cells normalizes insulin sensitivity in obese insulin resistant animals.* Cell Metab, 2008. **8**(4): p. 301-9.
67. Kahn, S.E., R.L. Hull, and K.M. Utzschneider, *Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes.* Nature, 2006. **444**(7121): p. 840-6.
68. Deems, R.O., et al., *Expression of human GLUT4 in mice results in increased insulin action.* Diabetologia, 1994. **37**(11): p. 1097-104.
69. Reaven, G.M., *Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease.* Diabetes, 1988. **37**(12): p. 1595-607.
70. White, M.F. and C.R. Kahn, *The insulin signaling system.* J Biol Chem, 1994. **269**(1): p. 1-4.
71. Paz, K., et al., *Phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1) by protein kinase B positively regulates IRS-1 function.* J Biol Chem, 1999. **274**(40): p. 28816-22.
72. Buettner, R., J. Scholmerich, and L.C. Bollheimer, *High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents.* Obesity (Silver Spring), 2007. **15**(4): p. 798-808.
73. Narvaez, C.J., et al., *Lean phenotype and resistance to diet-induced obesity in vitamin D receptor knockout mice correlates with induction of uncoupling protein-1 in white adipose tissue.* Endocrinology, 2009. **150**(2): p. 651-61.
74. Wong, K.E., et al., *Involvement of the vitamin D receptor in energy metabolism: regulation of uncoupling proteins.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2009. **296**(4): p. E820-8.
75. Bhat, M., et al., *Vitamin D deficiency decreases adiposity in rats and causes altered expression of uncoupling proteins and steroid receptor coactivator3.* J Steroid Biochem Mol Biol, 2014. **144 Pt B**: p. 304-12.
76. Wong, K.E., et al., *Targeted expression of human vitamin D receptor in adipocytes decreases energy expenditure and induces obesity in mice.* J Biol Chem, 2011. **286**(39): p. 33804-10.
77. Karkeni, E., et al., *Vitamin D limits chemokine expression in adipocytes and macrophage migration in vitro and in male mice.* Endocrinology, 2015. **156**(5): p. 1782-93.

78. Mostafa, D.K., et al., *Pleiotropic protective effects of Vitamin D against high fat diet-induced metabolic syndrome in rats: One for all*. Eur J Pharmacol, 2016. **792**: p. 38-47.
79. Sergeev, I.N. and Q. Song, *High vitamin D and calcium intakes reduce diet-induced obesity in mice by increasing adipose tissue apoptosis*. Mol Nutr Food Res, 2014. **58**(6): p. 1342-8.
80. Hida, Y., et al., *Counteraction of retinoic acid and 1,25-dihydroxyvitamin D3 on up-regulation of adipocyte differentiation with PPARgamma ligand, an antidiabetic thiazolidinedione, in 3T3-L1 cells*. Life Sci, 1998. **62**(14): p. PL205-11.
81. Kong, J. and Y.C. Li, *Molecular mechanism of 1,25-dihydroxyvitamin D3 inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 cells*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2006. **290**(5): p. E916-24.
82. Blumberg, J.M., et al., *Complex role of the vitamin D receptor and its ligand in adipogenesis in 3T3-L1 cells*. J Biol Chem, 2006. **281**(16): p. 11205-13.
83. West, D.B., et al., *Adipocyte blood flow is decreased in obese Zucker rats*. Am J Physiol, 1987. **253**(2 Pt 2): p. R228-33.
84. Marcotorchino, J., et al., *Vitamin D reduces the inflammatory response and restores glucose uptake in adipocytes*. Mol Nutr Food Res, 2012. **56**(12): p. 1771-82.
85. Bastie, C.C., et al., *Dietary cholecalciferol and calcium levels in a Western-style defined rodent diet alter energy metabolism and inflammatory responses in mice*. J Nutr, 2012. **142**(5): p. 859-65.
86. Lumeng, C.N., J.L. Bodzin, and A.R. Saltiel, *Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization*. J Clin Invest, 2007. **117**(1): p. 175-84.
87. Fujisaka, S., et al., *Regulatory mechanisms for adipose tissue M1 and M2 macrophages in diet-induced obese mice*. Diabetes, 2009. **58**(11): p. 2574-82.
88. Adams, J.S. and M. Hewison, *Unexpected actions of vitamin D: new perspectives on the regulation of innate and adaptive immunity*. Nat Clin Pract Endocrinol Metab, 2008. **4**(2): p. 80-90.
89. Stephens, J.M., J. Lee, and P.F. Pilch, *Tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is accompanied by a loss of insulin receptor substrate-1 and GLUT4 expression without a loss of insulin receptor-mediated signal transduction*. J Biol Chem, 1997. **272**(2): p. 971-6.
90. Jager, J., et al., *Interleukin-1beta-induced insulin resistance in adipocytes through down-regulation of insulin receptor substrate-1 expression*. Endocrinology, 2007. **148**(1): p. 241-51.
91. Zeitz, U., et al., *Impaired insulin secretory capacity in mice lacking a functional vitamin D receptor*. FASEB J, 2003. **17**(3): p. 509-11.
92. Liu, X.J., et al., *Vitamin d deficiency attenuates high-fat diet-induced hyperinsulinemia and hepatic lipid accumulation in male mice*. Endocrinology, 2015. **156**(6): p. 2103-13.
93. Kull, M., R. Kallikorm, and M. Lember, *Body mass index determines sunbathing habits: implications on vitamin D levels*. Intern Med J, 2009. **39**(4): p. 256-8.
94. Wortsman, J., et al., *Decreased bioavailability of vitamin D in obesity*. Am J Clin Nutr, 2000. **72**(3): p. 690-3.



95. Drincic, A.T., et al., *Volumetric dilution, rather than sequestration best explains the low vitamin D status of obesity*. Obesity (Silver Spring), 2012. **20**(7): p. 1444-8.
96. Scragg, R., et al., *Serum 25-hydroxyvitamin D, diabetes, and ethnicity in the Third National Health and Nutrition Examination Survey*. Diabetes Care, 2004. **27**(12): p. 2813-8.
97. Hypponen, E., et al., *25-hydroxyvitamin D, IGF-1, and metabolic syndrome at 45 years of age: a cross-sectional study in the 1958 British Birth Cohort*. Diabetes, 2008. **57**(2): p. 298-305.
98. Abbasi, F., et al., *Relationship between obesity, insulin resistance, and coronary heart disease risk*. J Am Coll Cardiol, 2002. **40**(5): p. 937-43.
99. Manco, M., et al., *Low 25-hydroxyvitamin D does not affect insulin sensitivity in obesity after bariatric surgery*. Obes Res, 2005. **13**(10): p. 1692-700.
100. Pittas, A.G., et al., *The effects of calcium and vitamin D supplementation on blood glucose and markers of inflammation in nondiabetic adults*. Diabetes Care, 2007. **30**(4): p. 980-6.
101. Wamberg, L., et al., *Effects of vitamin D supplementation on body fat accumulation, inflammation, and metabolic risk factors in obese adults with low vitamin D levels - results from a randomized trial*. Eur J Intern Med, 2013. **24**(7): p. 644-9.
102. Barchetta, I., et al., *Strong association between non alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and low 25(OH) vitamin D levels in an adult population with normal serum liver enzymes*. BMC Med, 2011. **9**: p. 85.
103. Patel, Y.A., et al., *Vitamin D is Not Associated With Severity in NAFLD: Results of a Paired Clinical and Gene Expression Profile Analysis*. Am J Gastroenterol, 2016. **111**(11): p. 1591-1598.
104. Brill, F., et al., *Relationship of vitamin D with insulin resistance and disease severity in non-alcoholic steatohepatitis*. J Hepatol, 2015. **62**(2): p. 405-11.
105. Lorvand Amiri, H., et al., *Regression of Non-Alcoholic Fatty Liver by Vitamin D Supplement: A Double-Blind Randomized Controlled Clinical Trial*. Arch Iran Med, 2016. **19**(9): p. 631-8.
106. Barchetta, I., et al., *No effects of oral vitamin D supplementation on non-alcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial*. BMC Med, 2016. **14**: p. 92.
107. Sanyal, A.J., et al., *Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities*. Gastroenterology, 2001. **120**(5): p. 1183-92.
108. D. Jahn, D.D., S. Kircher, H.M. Hermanns, A. Geier, *Vitamin D3 Treatment improves liver histology and hepatic gene expression in a murine obesity/NASH model independent of intestinal FGF15 induction*. Journal of Hepatology, 2016. **64**(Supplement 2): p. 667, Meeting Abstract.

## Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: **Versuchsaufbau der Tieraufzucht:** Für den in dieser Arbeit beschriebenen Versuchsaufbau wurden 24 C57BL/6/J-Mäuse im Alter von 8 Wochen in 4 Gruppen unterteilt. Je zwei der Gruppen erhielten eine Niedrigfett-Diät, die zwei anderen wurden auf eine Hochfett-Diät (je mit 500 IU Vitamin D<sub>3</sub>/kg Futter) gesetzt. Zum Versuchszeitpunkt von 6 Wochen erhielt je eine Gruppe der schlanken sowie eine Gruppe der adipösen Mäuse zusätzlich 10.000 IU Vitamin D<sub>3</sub>/kg Futter. Die Tiere wurden im Alter von 16 Wochen, 8 Wochen nach Versuchsbeginn, geerntet.....26
- Abb. 2: **Veränderungen des Körpergewichts sowie Endgewicht von Leber und epididymalem Fettgewebe:** Das Gewicht aller 24 Mäuse wurde während des gesamten Versuchs regelmäßig ermittelt. Nach der Ernte wurde zudem das Gewicht der Leber und des epididymalen Fettgewebes gemessen. Beim Vergleich der beiden Hochfett-Diät-Gruppen zeigt sich eine vermehrte Gewichtszunahme unter 10.000 IU Vitamin D<sub>3</sub>/kg Futter über zwei Wochen in Bezug auf Gesamtgewicht und Gewicht des epididymalen Fetts. Beim Gewicht der Lebern beider Gruppen zeigten sich keine Unterschiede.....27
- Abb. 3: **25(OH)-Vitamin D:** Ein zur Kontrolle der Vitamin D-Serumspiegel durchgeführter ELISA bestätigte zum einen den induzierten Vitamin D-Mangel unter 500 IU Vitamin D<sub>3</sub>/kg Futter wie auch eine Erhöhung des Serum-Vitamin D unter 10.000 IU Vitamin D<sub>3</sub>/kg Futter über das normale Ernährungsmaß (Standard Chow) hinaus.....28
- Abb. 4: **Leptin:** Das Proteohormon und Adipozytokin Leptin, das eine zentral vermittelte Herabsetzung des Hungergefühls bewirkt, korreliert positiv mit Körpergewicht und –fettmasse. Wie zu erwarten zeigten die mit Hochfett-Diät gefütterten dickeren Mäuse eine signifikant höhere mRNA-Expression. Der beschriebene Effekt auf das Hungergefühl unterliegt hier (d.h. bei dauerhaft erhöhten Leptinspiegeln) jedoch einem Gewöhnungseffekt und wirkt dem zunehmenden Körpergewicht so nicht entgegen.....30
- Abb. 5: **Adiponektin:** Neben dem Leptin zählt auch das Adiponectin zur Gruppe der Adipozytokine. Eine für das Adiponectin beschriebene inverse Korrelation zum Körpergewicht konnte im vorliegenden Versuchsaufbau nur beim Vergleich der beiden Gruppen unter Niedrig-Vitamin D<sub>3</sub>-Diät beobachtet werden. Ein Erklärungsansatz für die niedrige Expression unter Niedrigfett- und Niedrig-Vitamin D<sub>3</sub>-Diät wurde im Verlauf dieser Arbeit nicht weiterverfolgt. ....31
- Abb. 6: **Resistin:** Für das Adipozytokin Resistin wurde eine Korrelation zwischen erhöhten Expressionsraten und einer Prädisposition für Diabetes mellitus Typ 2 beschrieben. Bei Betrachtung der Resistin-Expression zeigen sich erniedrigte Werte unter Hoch-Vitamin D<sub>3</sub>-Diät bei sowohl Niedrig- als auch Hochfett-Diät. Hierbei könnte es sich um einen ersten Hinweis auf eine anti-inflammatorische Wirkung des Vitamin D und somit auch einen protektiven Faktor in Bezug auf die Entstehung eines Diabetes mellitus handeln.....32
- Abb. 7: **Pro-inflammatorische Zytokine (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ , OSM):** Die hier beschriebenen Zytokine gelten als klassische pro-inflammatorische Zytokine, deren erhöhte Transkription auf eine entzündliche Reaktion des Gewebes hindeuten kann. Ein deutlicher anti-inflammatorischer Effekt der hohen Vitamin D-Spiegel unter Hoch-Vitamin D<sub>3</sub>-Diät kann nicht gezeigt werden. Auch wenn die Höhe der Transkriptionen von IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF $\alpha$  in diese Richtung tendieren, so sind die Ergebnisse aufgrund niedriger Transkriptions-Raten und daraus bedingten hohen Standardabweichungen nur bedingt aussagekräftig.....33
- Abb. 8: **HIF1 $\alpha$ , VEGF $\alpha$ , PDGF $\beta$ :** Zur Annäherung an das Thema der Makrophagenakkumulation im Fettgewebe suchten wir zunächst Hinweise auf Gewebehypoxie, die u.a. als Ursache für

- Makrophagenansammlungen diskutiert wird. Der Vergleich der Niedrig- und Hochfett-Diät-Gruppen zeigte zum einen, dass durch Hypoxie vermehrt transkribierte HIF1 $\alpha$  als auch das infolge pro-angiogenetisch wirkende PDGF $\beta$  einer vermehrte Expression unter Hochfett-Diät unterliegen. Für das ebenfalls pro-angiogenetisch wirkende VEGF $\alpha$  konnte kein vergleichbarer Effekt gezeigt werden..... 35
- Abb. 9: **Ccl2 und Ccl7**: Die Chemokine Ccl2 und Ccl7 dienen der Makrophagen-Anlockung. Ein signifikanter Anstieg der Transkription der beiden Chemokine zeigt sich beim Vergleich der schlanken und adipösen Mäuse. Des Weiteren deutet eine vermehrte Transkription unter Hoch-Vitamin D<sub>3</sub>-Diät beim Vergleich der adipösen Mäuse auf eine vermehrte Makrophageninfiltration unter erhöhten Vitamin D-Spiegeln hin. Dies steht im scheinbaren Widerspruch mit der bisherigen Annahme einer anti-inflammatorischen Wirkung des Vitamin D. .... 36
3. 10: **F4/80, Cd11c, Cd206**: Wie nach Auswertung der Makrophagen-anlockenden Chemokine bereits vermutet zeigt sich bei den adipösen Tieren eine höhere Expression des allgemeinen Makrophagen-Markers F4/80. Betrachtet man den Marker der pro-inflammatorischen M1-Makrophagen Cd11c so zeigt sich die Expression unter Hoch-Vitamin D<sub>3</sub>-Diät beim Vergleich der Hochfett-Gruppen beinahe signifikant (p=0,0708) erhöht. Beim Marker der anti-inflammatorischen M2-Population Cd206 ist dies nicht der Fall, so dass eine vermehrte Makrophageninfiltration und somit Inflammation unter Hochfett- und Hoch-Vitamin D<sub>3</sub>-Diät vermutet werden kann..... 37
- Abb. 11: **M1/M2-Ratio**: Setzt man die Expression der Marker für M1- und M2-Subpopulation der Makrophagen ins Verhältnis, so zeigt sich ein signifikanter Anstieg der pro-inflammatorischen M1-Makrophagen mit deren Marker Cd11c unter Hoch-Vitamin D<sub>3</sub>-Diät beim Vergleich der Hochfett-Gruppen. Die inflammatorische Situation im Fettgewebe der adipösen Mäuse scheint sich unter Vitamin D-Einfluss also nicht zu bessern..... 38
- Abb. 12: **CLS und Anzahl Nuclei/Adipozyt**: Zur Veranschaulichung und Bestätigung des auf mRNA-Ebene vermuteten Trends der vermehrten Makrophageninfiltration unter Hoch-Vitamin D<sub>3</sub>- und Hochfett-Diät wurden H&E-Schnitte aller Gruppen auf CLS und Zellkern-Anzahl untersucht. Hier zeigte sich ein signifikanter Anstieg an CLS unter Hoch-Vitamin D<sub>3</sub>-Diät beim Vergleich der Hochfett-Gruppen. Auch in der Auszählung der Nuclei bestätigte sich dieser Trend, wenn gleich weniger stark ausgeprägt. Die Abbildung rechts zeigt eine CLS im H&E-Schnitt des weißen Fettgewebes einer Maus der Hochfett-Gruppe. .... 39
- Abb. 13: **Serum-Glukose- und -Insulin-Spiegel / Homa-Index**: Um einen Zusammenhang zwischen inflammatorischer Situation im Fettgewebe und diabetogener Stoffwechsellage im vorliegenden Maus-Modell zu untersuchen wurden Serum-Glukose und -Insulin aller Tiere bestimmt und im sog. HOMA-Index als Maß für Insulinresistenz ins Verhältnis gesetzt. Unter Hochfett- und Hoch-Vitamin D<sub>3</sub>-Diät zeigten sich als Ausdruck einer verstärkten Insulinresistenz höhere Serum-Glukose- und -Insulin-Werte sowie ein höherer HOMA-Index als in der Gruppe der Hochfett-Niedrig-Vitamin D<sub>3</sub>-Diät. .... 42
- Abb. 14: **GLUT4 und IRS1**: Die Proteine GLUT4 und IRS sind für die zelluläre, insulinabhängige Glukoseaufnahme essentiell. Bei der Untersuchung ihrer Transkriptions-Raten zeigt sich ebenfalls ein Trend zur verminderten Transkription (im Falle des GLUT4 beinahe signifikant) und dadurch erhöhten Insulinresistenz unter Hoch-Vitamin D<sub>3</sub>-Diät beim Vergleich der Hochfett-Gruppen. .... 43
- Abb. 15: **IRS1-Western Blot**: Um untersuchen zu können ob IRS1 als Protein in der Zelle auch vermehrt vorliegt wurde ein Western Blot durchgeführt. Dieser zeigte die erwartete Reduktion unter

Hochfett-Diät beim Vergleich der Niedrig-Vitamin D<sub>3</sub>-Gruppen. Eine weitere Reduktion unter Hochfett- und Hoch-Vitamin D<sub>3</sub>-Diät (im Vergleich zur Hochfett- und Niedrig-Vitamin D<sub>3</sub>-Gruppe) passt zum bereits beschriebenen Trend einer vermehrten Insulinresistenz unter 10.000 IU Vitamin D<sub>3</sub>/kg Futter .....44

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Übersicht über einige bei der Inflammation des Fettgewebes relevante Zytokine [17] .....	4
Tab. 2: Zusammensetzung der verwendeten Mäuse-Diäten .....	10
Tab. 3: Übersicht über die im Versuchsaufbau verwendeten Primer .....	13

**Abkürzungsverzeichnis**

ATM	Fettgewebsmakrophagen
CCL	Chemokinligand
CD	Unterscheidungsgruppen
cDNA	Kopie-Desoxyribonukleinsäure
CLS	Kronen-ähnliche Struktur
DGE	Deutsche Gesellschaft für Ernährung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
ER	Endoplasmatisches Retikulum
HE	Hämatoxylin-Eosin
HF	Hoch-Fett
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
HVD	Hoch-Vitamin D
IL	Interleukin
IRS1	Insulinrezeptor-Substrat 1
IU	Internationale Einheiten
LF	Niedrig-Fett
LPS	Lipopolysaccharid
LVD	Niedrig-Vitamin D
MCP	für Monozyten chemotaktisches Protein
NAFLD	Nichtalkoholische Fettlebererkrankung
NASH	Nichtalkoholische Steatohepatitis
NF	Nukleärer Faktor

NO	Stickstoffmonoxid
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RT-PCR	Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	aus Thrombozyten stammender Wachstumsfaktor
PPIA	Peptidylprolyl Isomerase A
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
mRNA	Botschafter-Ribonukleinsäure
TBST	Dreifach gepufferte salzhaltige Lösung mit Tween 20
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor
TNF	Tumornekrose-Faktor
VDBP	Vitamin D bindendes Protein
VDR	Vitamin D-Rezeptor
VEGF	Vaskulär-endothelialer Wachstumsfaktor

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich zuerst bei den Menschen bedanken, die diese Arbeit ermöglicht haben. Bei meinem Doktorvater Prof. A. Geier für die Ermöglichung der Arbeit in seinem Labor sowie die Begleitung der Arbeit mit wertvollen Ratschlägen.

Vielen Dank an meinen Betreuer Dr. Daniel Jahn, der stets ein offenes Ohr hatte und helfend zur Seite stand, von der ersten PCR bis zur fertigen Arbeit. Danke auch dem ganzen Labor-Team, das stets mit Rat und Tat zur Seite stand. Dank euch allen werde ich immer gerne auf die Zeit im Auvera-Haus zurückblicken.

Danke auch an all die wundervollen Menschen, die das Studium und die Zeit in Würzburg zu einer unvergesslichen Zeit haben werden lassen. Dank euch wird Würzburg für immer ein Stück Heimat bleiben.

Und zuletzt Danke an meine Familie, die Studium und Promotion überhaupt erst ermöglicht haben. Danke, dass ihr mich in all meinen Unternehmungen stets unterstützt und mir die nötige Sicherheit gegeben habt.

---