



**Einfluss von Oncostatin M auf die Pathogenese der
Nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung**

**Influence of Oncostatin M on the pathogenesis of
non-alcoholic fatty liver disease**

Dissertation zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Klasse Biomedizin

Vorgelegt von

Sonja Gotthardt, geb. Schubert

aus

Frankfurt am Main

Würzburg, 2022



Eingereicht am:

Bürostempel

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzende: Prof. Dr. rer. nat. Grit Hein

1. Betreuer: PD Dr. rer. nat. Heike Hermanns

2. Betreuer: Prof. Dr. med. Alma Zerneck-Madsen

3. Betreuer: Prof. Dr. med. Andreas Geier

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis	IX
Vorwort	XI
1. EINLEITUNG	1
1.1 Physiologie des hepatischen Lipidstoffwechsels	1
1.1.1 Triglyzeridhomöostase	1
1.1.2 Cholesterinhomöostase	2
1.2 Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung	4
1.2.1 Definition.....	4
1.2.2 Epidemiologie	4
1.2.3 Pathogenese	5
1.2.4 Diagnose	7
1.2.5 Therapie	8
1.3 Oncostatin M	8
1.3.1 Die IL-6-Typ-Zytokinfamilie.....	8
1.3.2 OSM-Rezeptoren und Signalwege	9
1.3.3 Regulation der Expression von <i>Osm</i> und <i>Osmr</i>	10
1.3.4 Funktion bei metabolischen Erkrankungen	10
1.4 Tierversuch an <i>Osmr</i>-KO-Mäusen auf WT- und <i>Ldlr</i>-KO-Hintergrund	12
1.4.1 Durchführung des Tierversuches	12
1.4.2 Vorliegende Ergebnisse	13
1.5 Zielsetzung der Arbeit	16
2. METHODEN	17
2.1 Tierversuch	17
2.1.1 Tiere	17
2.1.2 Tierhaltung.....	17
2.1.3 Diätversuch.....	17
2.1.4 Opferung der Versuchstiere	18
2.2 Histologische Methoden	18
2.2.1 Herstellung von Paraffinschnitten aus Lebergewebe	18
2.2.2 Herstellung von Kryostatschnitten aus Lebergewebe	20
2.2.3 Färbung von Paraffinschnitten.....	21
2.2.4 Färbung von Kryostatschnitten.....	23
2.2.5 Eindecken gefärbter Schnitte	24
2.2.6 Histopathologische Beurteilung histologischer Schnitte	24

2.3 Bestimmung von Triglyzeriden und Cholesterin in Lebergewebe	25
2.3.1 Verwendete Puffer und Lösungen	25
2.3.2 Herstellung von Lipidextrakten	25
2.3.3 Messung der Triglyzeride	26
2.3.4 Messung des Gesamtcholesterins	27
2.4 Bestimmung der Serum-Lipide	28
2.4.1 Bestimmung freier Fettsäuren im Serum	28
2.4.2 Bestimmung der Triglyzeride im Serum	28
2.5 Molekularbiologische Methoden	29
2.5.1 RNA-Isolierung aus Lebergewebe.....	29
2.5.2 RNA-Quantifizierung.....	29
2.5.3 Reverse Transkription	29
2.5.4 Quantitative Echtzeit-PCR.....	31
2.6 Zellkultur	33
2.6.1 Verwendete Puffer und Lösungen	33
2.6.2 Kultur und Passage von HepG2-Zellen	34
2.6.3 Versuche	34
2.7 Statistische Methoden	36
3. MATERIAL	37
3.1 Geräte	37
3.2 Kits	38
3.3 Primer	38
3.3.1 Murine Primer	38
3.3.2 Humane Primer	39
3.4 Zellkulturmedien und -zusätze.....	39
3.5 Ver- und Gebrauchsmaterialien	40
3.6 Chemikalien und Substanzen	41
3.7 Programme	42
4. ERGEBNISSE	43
4.1 Histopathologische Untersuchung des Lebergewebes	43
4.2 Lipidgehalt des Lebergewebes	47
4.3 Serum-Spiegel von Fettsäuren und Triglyzeriden	48
4.4 Analyse der Genexpression im Lebergewebe.....	48
4.5 Einfluss der <i>Western Diet</i> auf Histologie und Genexpression der Leber.....	56
4.6 Einfluss von OSM auf die mRNA-Expression in HepG2-Zellen	61
4.6.1 Expression der OSM-Rezeptor-Gene in HepG2-Zellen	61

4.6.2 Regulation der mRNA-Expression von <i>CYP7A1</i> durch OSM und andere IL-6-Typ-Zytokine.....	61
4.6.3 Regulation der mRNA-Expression von <i>HNF4A</i> und <i>SHP</i> durch OSM	62
4.6.4 Reversibilität der <i>CYP7A1</i> -Suppression durch Signalweg-Inhibitoren	63
5. DISKUSSION.....	64
5.1 <i>Western Diet</i> führt zu beginnender Steatose in WT-Mäusen und induziert Gene der Cholesterinmetabolisierung und –exkretion in <i>Ldlr-Osmr</i> -KO-Mäusen	64
5.2 OSMR β -Signaltransduktion schützt vor hepatischer Steatose in WT-Mäusen und fördert ihre Entwicklung in <i>Ldlr</i> -KO-Mäusen.....	66
5.3 OSMR β -Defizienz beeinflusst Dyslipidämie in WT- und <i>Ldlr</i> -KO-Mäusen	68
5.4 OSMR β -Signaltransduktion fördert die mRNA-Expression von Genen mit Beteiligung an Inflammation und Fibrogenese in <i>Ldlr</i> -KO-Mäusen.....	70
5.5 Gegenläufige Regulation der <i>Cyp7a1</i> -Expression in <i>Osmr</i> -KO-Mäusen auf WT- und <i>Ldlr</i> -KO-Hintergrund kann unterschiedliche Ausprägung der Steatose erklären ..	72
5.6 OSM supprimiert <i>Cyp7a1</i> -mRNA-Expression in HepG2-Zellen	75
5.7 Dichotome Effekte von OSM	77
5.8 Mutation im <i>Nnt</i> -Gen beeinflusst möglicherweise Metabolismus in WT- und <i>Ldlr</i> -KO-Mäusen.....	78
5.9 Ausblick	81
6. ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY	82
6.1 Zusammenfassung	82
6.2 Summary	84
7. LITERATUR.....	86
Eidesstattliche Erklärung.....	96
Curriculum Vitae	97

Abkürzungsverzeichnis

ABCG5/G8	engl. <i>ATP-Binding Cassette Transporter G5/G8</i>
ACC	Acetyl-Coenzym A-Carboxylase
ACSL3	engl. <i>Long-chain-fatty-acid-CoA-Ligase 3</i>
ACSL5	engl. <i>Long-chain-fatty-acid-CoA-Ligase 5</i>
AKR1D1	engl. <i>Aldo-Ketoreductase Family 1 Member D1</i>
ALT	Alanin-Aminotransferase
ANOVA	Einweg-Varianzanalyse, engl. <i>Analysis of variance</i>
AST	Aspartat-Aminotransferase
ATGL	engl. <i>Adipose Triglyceride Lipase</i>
BMI	Body-Mass-Index
BSEP	engl. <i>Bile Salt Export Pump</i>
CA	Cholsäure, engl. <i>Cholic Acid</i>
CCL2	CC-Chemokinligand 2
CDCA	Chenodesoxycholsäure, engl. <i>Chenodeoxycholic Acid</i>
ChREBP	engl. <i>Carbohydrate-Responsive Element Binding Protein</i>
CPT-1	Carnitin-Palmitoyltransferase 1
DNA	Desoxyribonukleinsäuren, engl. <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleotide
EASL	engl. <i>European Association for the Study of the Liver</i>
ELOVL6	Fettsäure-Elongase 6, engl. <i>Elongation Of Very Long Chain Fatty Acids Protein 6</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FABPpm	Fettsäure-Bindeprotein, engl. <i>Fatty Acid Binding Protein</i>
FASN	Fettsäure-Synthase, engl. <i>Fatty Acid Synthase</i>
FATP	Fettsäure-Transportprotein, engl. <i>Fatty Acid Transport Protein</i>
FBS	engl. <i>Fetal Bovine Serum</i>
FXR	Farnesoid-X-Rezeptor
GGT	Gamma-Glutamyltransferase
gp130	Glykoprotein 130
GRB2	engl. <i>Growth-Factor-Receptor-bound Protein 2</i>
GTT	Glukose-Toleranz-Test
HCC	Hepatozelluläres Karzinom, engl. <i>Hepatocellular Carcinoma</i>
HDL	engl. <i>High-Density-Lipoprotein</i>
HMGCR	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase
HNF-4 α	engl. <i>Hepatocyte Nuclear Factor 4α</i>
HSC	Hepatische Sternzellen, engl. <i>Hepatic Stellate Cells</i>
HSD3B7	Hydroxy- δ -5-Steroid-Dehydrogenase 3 β - und Steroid δ -Isomerase 7
IDL	engl. <i>Intermediate-Density-Lipoprotein</i>
IL	Interleukin

ITT Insulin-Toleranz-Test
 JAK Januskinase
 LDL engl. *Low-Density-Lipoprotein*
 LDLR *Low-Density-Lipoprotein-Rezeptor*
Ldlr-KO Low-Density-Lipoprotein-Rezeptor-Knockout
Ldlr-Osmr-KO Low-Density-Lipoprotein-Rezeptor-Oncostatin-M-Rezeptor-β-Doppel-Knockout
 LIF engl. *Leukemia Inhibitory Factor*
 LXR engl. *Liver X Receptor*
 MAPK engl. *Mitogen Activated Protein Kinase*
 MEK MAPK/ERK-Kinase
 MTP Mikrosomales Triglyzerid-Transferprotein
 NADP⁺/NADPH *Nikotinamidanenindinukleotidphosphat*
 NAFL Nicht-alkoholische Fettleber
 NAFLD Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung, engl. *Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*
 NASH Nicht-alkoholische Steatohepatitis
 NEAA engl. *Non-Essential Amino Acids*
 NNT Nikotinamid-Nukleotid-Transhydrogenase
 NPC1L1 engl. *Niemann-Pick C1-Like Protein 1*
 OSM Oncostatin M
Osmr-KO Oncostatin-M-Rezeptor-β-Knockout
 PAI-1 Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1
 PBS Phosphatgepufferte Salzlösung, engl. *Phosphate-Buffered Saline*
 PDGF engl. *Platelet-Derived Growth Factor*
 PNPLA3 engl. *Patatin-like Phospholipase Domain Containing 3*
 PPAR α engl. *Peroxisome-Proliferator-Activated-Receptor- α*
 RAF RAF-Protoonkogen-Serin/Threonin-Proteinkinase
 RAS engl. *Rat Sarcoma*
 SAA2 Serum-Amyloid A2
 SCD1 Stearoyl-CoA-Desaturase
 SH2 engl. *Src-homology 2 Domain*
 Shc/Shc1 engl. *Src-homology 2 Domain-Containing Transforming Protein 1*
 SHP engl. *Small Heterodimer Partner*
 SOCS engl. *Suppressor Of Cytokine Signaling*
 SOS engl. *Son Of Sevenless*
 SR-B1 Scavenger-Rezeptor B1
 SREBP-1c engl. *Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c*
 SREBP-2 engl. *Sterol Regulatory Element Binding Protein 2*
 STAT engl. *Signal Transducer and Activator of Transcription*
 STD Standarddiät

TGF- β engl. *Transforming Growth Factor β*
TIMP engl. *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*
TIMP1 engl. *Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 1*
VLDL engl. *Very-Low-Density-Lipoprotein*
WD engl. *Western Diet*
WT Wildtyp

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Hepatozytäre Cholesterinhomöostase.....	2
Abbildung 2. Gallensäuresynthese	3
Abbildung 3. OSM-vermittelte Signaltransduktion	9
Abbildung 4. Experimentelles Design des Tierversuchs.....	12
Abbildung 5. Körpergewicht und Gewichtszunahme von <i>Osmr</i> -KO-Mäusen auf WT- und <i>Ldlr</i> -KO-Hintergrund.....	13
Abbildung 6. Blutglukose von <i>Osmr</i> -KO-Mäusen auf WT- und <i>Ldlr</i> -KO-Hintergrund	14
Abbildung 7. Serum-Cholesterin und aortale Plaquebildung in <i>Osmr</i> -KO-Mäusen auf WT- und <i>Ldlr</i> -KO-Hintergrund	15
Abbildung 8. Lebergewicht von <i>Osmr</i> -KO-Mäusen auf WT- und <i>Ldlr</i> -KO-Hintergrund	16
Abbildung 9. Auswertung Sudan-IV-gefärbter Leberschnitte mittels Bildanalyse-Software ..	25
Abbildung 10. Ct-Wert und Schmelzkurve der qPCR	33
Abbildung 11. Einfluss des <i>Osmr-Knockouts</i> auf die Leberhistologie in WT- und <i>Ldlr</i> -KO-Mäusen	43
Abbildung 12. Einfluss des <i>Osmr-Knockouts</i> auf die hepatische Steatose in WT- und <i>Ldlr</i> -KO-Mäusen.....	45
Abbildung 13. Korrelation von Lebergewicht und rot gefärbter Gesamtfläche in Sudan-IV-gefärbten Gewebeschnitten der Leber	46
Abbildung 14. Einfluss des <i>Osmr-Knockouts</i> auf die Fibrosierung des Lebergewebes in WT- und <i>Ldlr</i> -KO-Mäusen	46
Abbildung 15. Einfluss des <i>Osmr-Knockouts</i> auf den Lipidgehalt der Leber in WT- und <i>Ldlr</i> -KO-Mäusen.....	47
Abbildung 16. Serumspiegel von Triglyzeriden und freien Fettsäuren in <i>Osmr</i> -KO-Mäusen auf WT- und <i>Ldlr</i> -KO-Hintergrund.....	48
Abbildung 17. Expression von Genen der Fettsäuresynthese in <i>Osmr</i> -KO-Mäusen auf WT- und <i>Ldlr</i> -KO-Hintergrund	49
Abbildung 18. Expression von Genen der Triglyzerid- und Cholesterinaufnahme in <i>Osmr</i> -KO-Mäusen auf WT- und <i>Ldlr</i> -KO-Hintergrund.....	50
Abbildung 19. Hepatische Expression von Genen der Cholesterinsynthese und -sekretion in <i>Osmr</i> -KO-Mäusen auf WT- und <i>Ldlr</i> -KO-Hintergrund	50
Abbildung 20. Hepatische Expression von Genen der Gallensäuresynthese in <i>Osmr</i> -KO-Mäusen auf WT- und <i>Ldlr</i> -KO-Hintergrund.....	51
Abbildung 21. Hepatische Expression von Genen mit Beteiligung an der <i>Cyp7a1</i> -Regulation in <i>Osmr</i> -KO-Mäusen auf WT- und <i>Ldlr</i> -KO-Hintergrund.....	52

Abbildung 22. Hepatische Expression von Genen der Akute-Phase-Reaktion in <i>Osmr</i> -KO-Mäusen auf WT- und <i>Ldlr</i> -KO-Hintergrund.....	53
Abbildung 23. Hepatische Expression von <i>Ccl2</i> in <i>Osmr</i> -KO-Mäusen auf WT- und <i>Ldlr</i> -KO-Hintergrund.....	54
Abbildung 24. Hepatische Expression von Genen der Fibrogenese in <i>Osmr</i> -KO-Mäusen auf WT- und <i>Ldlr</i> -KO-Hintergrund.....	54
Abbildung 25. Hepatische Expression von <i>Osm</i> und den Genen seiner Rezeptoren in <i>Osmr</i> -KO-Mäusen auf WT- und <i>Ldlr</i> -KO-Hintergrund.....	55
Abbildung 26. Einfluss der <i>Western Diet</i> auf die Entwicklung einer hepatischen Steatose in WT-Mäusen.....	57
Abbildung 27. Serumspiegel von Triglyzeriden und freien Fettsäuren in WT-Mäusen nach <i>Western Diet</i> oder Standarddiät.....	57
Abbildung 28. Hepatische Expression von Genen der Fettsäuresynthese nach <i>Western Diet</i> oder Standarddiät.....	58
Abbildung 29. Hepatische Expression von Genen der Cholesterinsynthese und des Cholesterintransports nach <i>Western Diet</i> oder Standarddiät.....	58
Abbildung 30. Hepatische Expression von Genen der Gallensäuresynthese nach <i>Western Diet</i> oder Standarddiät.....	59
Abbildung 31. Hepatische Expression von Genen mit Beteiligung an der Akute-Phase-Reaktion nach <i>Western Diet</i> oder Standarddiät.....	59
Abbildung 32. Hepatische Expression von <i>Ccl2</i> nach <i>Western Diet</i> oder Standarddiät.....	60
Abbildung 33. Hepatische Expression von Genen der Fibrogenese nach <i>Western Diet</i> oder Standarddiät.....	60
Abbildung 34. Relative mRNA-Expression von <i>CYP7A1</i> nach Behandlung von HepG2-Zellen mit OSM.....	61
Abbildung 35. Relative mRNA-Expression von <i>CYP7A1</i> nach Stimulation mit LIF und IL-6 in HepG2-Zellen.....	62
Abbildung 36. Relative mRNA-Expression von <i>HNF4A</i> und <i>SHP</i> nach Stimulation mit OSM in HepG2-Zellen.....	62
Abbildung 37. Relative mRNA-Expression von <i>CYP7A1</i> nach Behandlung mit OSM und Signalweg-Inhibitoren in HepG2-Zellen.....	63
Abbildung 38. An <i>CYP7A1</i> -Regulation durch OSM beteiligte Signalwege.....	76
Abbildung 39. Günstige und schädliche Effekte von OSM.....	77

Vorwort

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Oncostatin M (OSM) auf die Pathogenese der Nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung (NAFLD) anhand genetischer Mausmodelle untersucht. Mehrere Jahre nach Erhebung der gezeigten Daten wurde nachgewiesen, dass bei den untersuchten Wildtyp- (WT-) und *Low-Density-Lipoprotein-Rezeptor-Knockout-* (*Ldlr*-KO-) Mäusen eine Mutation im Gen der Nikotinamid-Nukleotid-Transhydrogenase (*Nnt*) vorliegt. Eine entsprechende Limitierung der vorliegenden Daten durch die zusätzliche *Nnt*-Mutation wird im Kapitel 5.8 diskutiert.

1. EINLEITUNG

1.1 Physiologie des hepatischen Lipidstoffwechsels

Die Aufrechterhaltung der Lipidhomöostase ist eine wichtige Aufgabe der Leber. Störungen der beteiligten Stoffwechselwege können zur intrazellulären Akkumulation von Lipidtröpfchen führen, wie sie für die Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (engl. *Non-Alcoholic Fatty Liver Disease* [NAFLD]) typisch ist. Die an Triglyzerid- und Cholesterinhomöostase beteiligten Prozesse werden im folgenden Abschnitt in Kürze dargestellt.

1.1.1 Triglyzeridhomöostase

Unter physiologischen Bedingungen herrscht ein Gleichgewicht zwischen Aufnahme und Synthese von Fettsäuren und Triglyzeriden auf der einen Seite sowie Fettsäureoxidation und Sekretion von *Very-Low-Density-Lipoprotein* (VLDL) auf der anderen Seite. Die Aufnahme von Fettsäuren in die Hepatozyten erfolgt sowohl passiv durch Diffusion als auch mit Beteiligung der Transportproteine Fettsäure-Translokase (CD36), Fettsäure-Transportprotein (FATP) und Fettsäure-Bindeprotein (FABPpm) (1, 2). Die Fettsäuresynthese der Leber wird durch die Schrittmacherenzyme Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC) und Fettsäure-Synthase (engl. *Fatty Acid Synthase* [FASN]) katalysiert. Die Transkription der kodierenden Gene *Acc* und *Fasn* wird durch Aktivierung der Transkriptionsfaktoren *Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c* (SREBP-1c) durch Insulin und *Carbohydrate-Responsive Element Binding Protein* (ChREBP) durch Glukose kontrolliert (3). Außerdem wird die Aktivität beider Transkriptionsfaktoren durch den nukleären Rezeptor *Liver X Receptor* (LXR) gesteigert. LXR kann durch Cholesterinmetabolite, sogenannte Oxysterole, aktiviert werden und reguliert neben SREBP-1c und ChREBP auch direkt die Expression der Fettsäuresynthese-Gene *Acc* und *Fasn* (4, 5). Weitere Enzyme mit Beteiligung an der Fettsäuresynthese sind: Stearoyl-CoA-Desaturase (SCD1) als Schrittmacherenzym der Synthese einfach ungesättigter Fettsäuren sowie Fettsäure-Elongase 6 (engl. *Elongation Of Very Long Chain Fatty Acids Protein 6* [ELOVL6]), das die Elongation langkettiger Fettsäuren katalysiert (6, 7). Aus Fettsäuren können zusammen mit Glycerin-3-Phosphat Triglyzeride synthetisiert werden, die in der Leber unter physiologischen Bedingungen durch Bildung von VLDL in die Peripherie verteilt werden (6).

Der Abbau von Fettsäuren zur Energiebereitstellung für die Atmungskette erfolgt in den Mitochondrien und zu einem geringen Teil in den Peroxisomen. Das Schrittmacherenzym der β -Oxidation ist Carnitin-Palmitoyltransferase 1 (CPT-1), das für den Transport der Fettsäuren vom Zytosol in die mitochondriale Matrix benötigt wird (8). Die Expression von *Cpt1* unterliegt der Regulation durch den intrazellulären Rezeptor *Peroxisome-Proliferator-*

Activated-Receptor- α (PPAR α), der durch Fettsäuren aktiviert wird (9). Gehemmt wird CPT-1 durch das Fettsäuresynthese-Intermediat Malonyl-CoA (8).

1.1.2 Cholesterinhomöostase

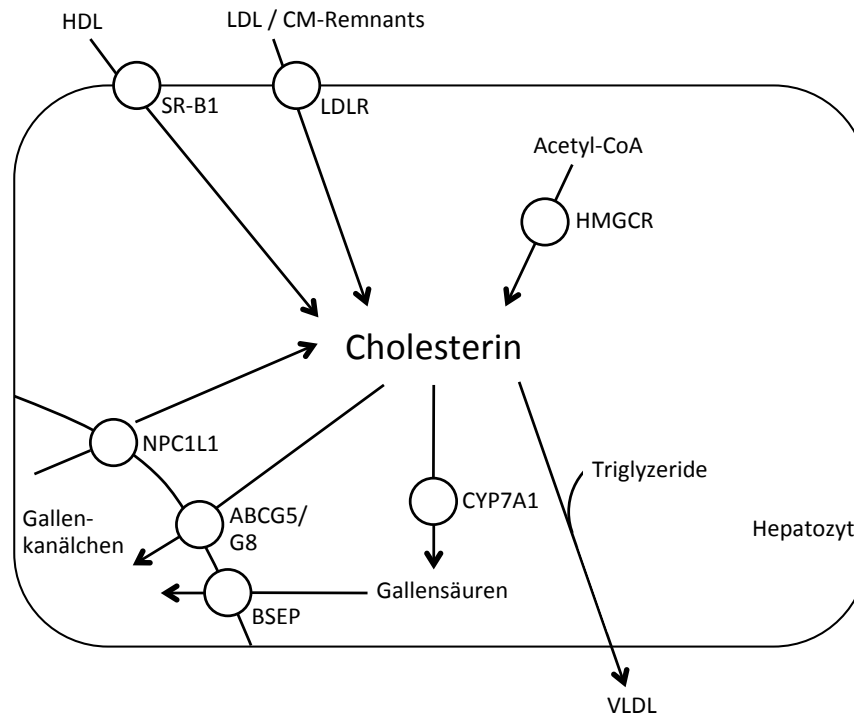


Abbildung 1. Hepatozytäre Cholesterinhomöostase. Vereinfachte Darstellung der an Cholesterinaufnahme, -metabolisierung und -export beteiligten Stoffwechselwege in Hepatozyten. Über LDLR und SR-B1 werden cholesterinhaltige Lipoproteine aus dem Blut aufgenommen. Die *de novo*-Cholesterinsynthese erfolgt über das Schrittmachereenzym HMGR. Der Cholesterinexport erfolgt über ABCG5/8 in die Gallenkanälchen oder nach Bildung von VLDL in die Sinusoide. Über CYP7A1 können aus Cholesterin Gallensäuren synthetisiert werden. Die biliäre Sekretion von Gallensäuren erfolgt durch den Transporter BSEP. LDLR = *Low-Density-Lipoprotein*-Rezeptor, CM-Remnants = Chylomikronen-Remnants, SR-B1 = Scavenger-Rezeptor B1, HMGR = 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase, ABCG5/8 = engl. *ATP Binding Cassette Subfamily G Member 5/8*, BSEP = engl. *Bile Salt Export Pump*, NPC1L1 = engl. *Niemann-Pick C1-Like Protein 1*, VLDL = *Very-Low-Density-Lipoprotein*. Modifiziert nach Enjoji M (10).

Die an der hepatozytären Cholesterinhomöostase beteiligten Stoffwechselwege sind in Abbildung 1 zusammengefasst. Die Aufnahme von Cholesterin in die Hepatozyten erfolgt durch rezeptorvermittelte Endozytose von Chylomikronen-Remnants oder *Low-Density-Lipoprotein* (LDL) nach Interaktion zwischen dem Lipoprotein ApoE und dem LDL-Rezeptor (LDLR). Außerdem können in *High-Density-Lipoprotein* (HDL) enthaltene Cholesterinester nach Bindung an den Scavenger-Rezeptor B1 in Hepatozyten aufgenommen werden. Weiterhin kann Cholesterin in der Leber – wie auch in anderen Geweben – *de novo* synthetisiert werden. Schrittmachereenzym ist hierbei die 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase (HMGR).

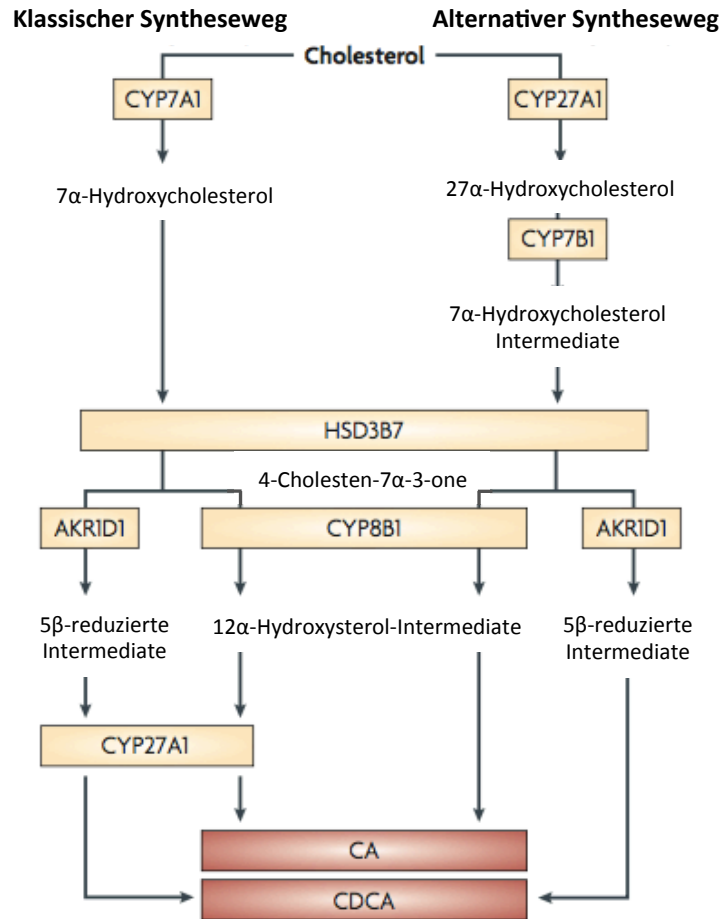


Abbildung 2. Gallensäuresynthese. Gallensäuren können über zwei verschiedene Wege aus Cholesterin hergestellt werden: den klassischen und den alternativen Syntheseweg. Schrittmacherenzym des klassischen Syntheseweges ist CYP7A1, beim alternativen Syntheseweg ist es CYP27A1. Endprodukte beider Wege sind die primären Gallensäuren Cholsäure (CA) und Chenodesoxycholsäure (CDCA). HSD3B7 = Hydroxy- δ -5-Steroid-Dehydrogenase 3 β - und Steroid δ -Isomerase 7, AKR1D1 = engl. *Aldo-Ketoreductase Family 1 Member D1*. Modifiziert nach Thomas C (11).

Überschüssiges Cholesterin kann über die *ATP-Binding Cassette Transporter G5* und *G8* (ABCG5/G8) an der kanalikulären Membran in die Galle sezerniert und so ausgeschieden werden (12, 13). Um einem überschießenden Verlust von Cholesterin mit der Gallenflüssigkeit entgegenzuwirken, kann es im menschlichen Organismus über den Transporter *Niemann-Pick C1-Like Protein 1* (NPC1L1) an der kanalikulären Membran rückresorbiert werden (14). In murinen Lebern wird NPC1L1 kaum gebildet (15). Neben der Sekretion von überschüssigem Cholesterin wird dieses zur Synthese von Gallensäuren verwendet. Diese erfolgt zu 75% über den klassischen Syntheseweg mit dem Schrittmacherenzym Cholesterin-7 α -Hydroxylase (auch CYP7A1) und zu 25% über den alternativen Syntheseweg mit dem Schrittmacherenzym Sterol-27-Hydroxylase (auch CYP27A1) (11) (siehe Abbildung 2). Die Gallensäuren können über den Gallensäuretransporter *Bile Salt Export Pump* (BSEP) an der kanalikulären Membran sezerniert werden (16). Sind die Kapazitäten von Cholesterinexport und Gallensäuresynthese erschöpft, wird Cholesterin mit Fettsäuren verestert und zusammen mit

freiem Cholesterin, Triglyzeriden, Phospholipiden und Lipoproteinen als VLDL ins Blut sezerniert. Durch Hydrolyse enthaltener Triglyzeride im Blutkreislauf wird VLDL über *Intermediate-Density-Lipoprotein* (IDL) zu LDL abgebaut. Die Aufnahme der cholesterinreichen LDL-Partikel in der Peripherie wird über die Expression des *LDLR*-Gens reguliert, das von sämtlichen Zellen des Körpers exprimiert wird (17). Die Intensität der *LDLR*-Expression zeigt dabei deutliche gewebeabhängige Unterschiede, so wird *LDLR*-mRNA in Nebennieren-, Ovarial- und Lebergewebe deutlich stärker exprimiert als beispielsweise im Skelettmuskel (vgl. Human Protein Atlas, <https://www.proteinatlas.org>, (18)). Die Regulation des intrazellulären Cholesterin-Spiegels erfolgt durch den Transkriptionsfaktor *Sterol Regulatory Element Binding Protein 2* (SREBP-2), der bei niedrigen intrazellulären Cholesterin-Spiegeln die Transkription von Genen der Cholesterinbiosynthese und –aufnahme aktiviert (19).

1.2 Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung

1.2.1 Definition

Als NAFLD bezeichnet man eine Steatose der Leber in über 5% der Hepatozyten nach Ausschluss sekundärer Ursachen einer Leberverfettung (20). Nach der Pathologie unterscheidet man die Nicht-alkoholische Fettleber (NAFL) von der Nicht-alkoholischen Steatohepatitis (NASH), die sich prognostisch unterscheiden. Zur Entität NASH gehören auch die fortgeschrittenen Krankheitsstadien Fibrose, Zirrhose und Hepatozelluläres Karzinom (engl. *Hepatocellular Carcinoma* [HCC]) (20, 21).

1.2.2 Epidemiologie

Die NAFLD ist die häufigste Ursache von Lebererkrankungen in der westlichen Welt (20). Aber auch in Entwicklungsländern gewinnt die Erkrankung an Bedeutung. Die Prävalenz beträgt weltweit 25% mit der höchsten Verbreitung im Mittleren Osten und Südamerika und der geringsten Verbreitung in Afrika (22). Männer sind häufiger betroffen als Frauen (23). Die NAFLD wird zunehmend zu einer der häufigsten Erkrankungen, die für Leberinsuffizienz, HCC und die Notwendigkeit einer orthotopen Lebertransplantation verantwortlich sind (24). NAFLD-Patienten haben eine erhöhte Mortalität gegenüber der Gesamtbevölkerung, die durch ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse zustande kommt. NASH-Patienten zeigen außerdem eine Erhöhung Leber-assoziiertes Todesfälle, insbesondere der histologische Nachweis einer Fibrose ist mit einer verminderten Überlebenszeit assoziiert (25, 26).

Mit der NAFLD assoziiert sind folgende metabolische Komorbiditäten: Adipositas (51%), Diabetes mellitus Typ 2 (23%), Dyslipidämie (69%), arterielle Hypertonie (39%) und Metabolisches Syndrom (43%) (22). Noch stärker ist die Assoziation mit den genannten Komorbiditäten unter Patienten mit histologisch gesicherter NASH (22). Aufgrund der engen

Verbindung zwischen den beiden Erkrankungen wird die NAFLD auch als hepatische Manifestation des Metabolischen Syndroms bezeichnet (27). Obwohl es eine starke Korrelation zwischen Body-Mass-Index (BMI) und der Entwicklung einer NAFLD gibt, hat die NAFLD auch in der normalgewichtigen Population eine Prävalenz von 10-30% (28). Die Entwicklung einer NAFLD bei Normalgewichtigen ist neben genetischen Faktoren mit cholesterinreicher Ernährung assoziiert (10).

1.2.3 Pathogenese

Die Pathogenese der NAFLD ist multifaktoriell und bisher nicht vollständig verstanden. Im Rahmen der „*Multiple Hit*“-Theorie geht man davon aus, dass viele ätiopathogenetische Faktoren gleichzeitig oder sequenziell auf eine genetische Prädisposition treffen und so die NAFLD verursachen (29, 30). Im folgenden Abschnitt sind ohne Anspruch auf Vollständigkeit einige wichtige Faktoren erläutert.

1.2.3.1 NAFL

Die Entwicklung einer Steatose mit intrazellulärer Akkumulation von Lipidtröpfchen wird als erster Schritt in der Pathogenese der NAFLD gesehen.

Bei Adipositas entwickelt sich im Rahmen eines Metabolischen Syndroms eine verminderte Insulinwirkung im Fettgewebe, man spricht von Insulinresistenz. Es kommt durch die fehlende Suppression der Hormon-sensitiven Lipase zur vermehrten Freisetzung von nicht-veresterten Fettsäuren aus dem Fettgewebe in den Blutstrom, die unter anderem von der Leber aufgenommen werden (31). In der Leber tragen Fettsäuren und andere Metabolite der Triglyzeridhydrolyse, die Ceramide, zur Insulinresistenz bei, indem sie Insulin-Signalwege auf mehreren Ebenen inhibieren (32, 33). Infolge der Insulinresistenz kommt es in der Leber zu einer Steigerung der Glukoneogenese mit konsekutiver Hyperglykämie bei erhaltener *de novo*-Lipogenese mit Hypertriglyzeridämie. Dieses Nebeneinander von Insulinresistenz und Insulinsensitivität in der Leber wird als selektive Insulinresistenz bezeichnet (34). Andersherum kann das Vorhandensein einer NAFLD die Entwicklung einer Insulinresistenz begünstigen. Ein möglicher Mechanismus ist, dass Diacylglycerol, welches als vorletztes Metabolit der Triglyzeridsynthese mit dem Lipidgehalt der Leber korreliert, durch Aktivierung der Proteinkinase C-ε die Kinaseaktivität des Insulinrezeptors reduziert (35, 36).

Ein weiterer wichtiger Punkt bei der Entwicklung der NAFLD ist die Kommunikation zwischen Leber und viszeralem Fettgewebe. Das Peptidhormon Adiponektin wird vom viszeralen Fettgewebe bei Adipositas in vermindertem Ausmaß sezerniert (37). Dies führt zu einer geringeren Aktivierung der AMP-aktivierten Proteinkinase in der Leber und damit zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors SREBP-1c (38, 39). Dieser erhöht die Synthese von Enzymen der Fettsäuresynthese wie ACC und FASN und trägt so zur Entwicklung der hepatischen Steatose bei (39).

Zentrale Risikofaktoren für die Entwicklung einer NAFLD sind Adipositas und Überernährung. Ein hoher Konsum von Kohlenhydraten, insbesondere von Glukose und Fructose, gesättigten Fettsäuren, Transfetten, tierischem Protein sowie ein geringer Konsum von Pflanzenfasern sind mit der Entwicklung einer NAFLD assoziiert (40). Auch ein Zusammenhang mit cholesterinreicher Nahrung wird bei nicht-adipösen NAFLD-Patienten beschrieben (41). Im Mausmodell kann eine normokalorische Diät mit hohem Cholesterinanteil eine NAFLD ohne gleichzeitiges Auftreten einer Adipositas induzieren (42), weiterhin kann der Zusatz von Cholesterin zu einer fettreichen Diät die Entwicklung einer hepatischen Steatose und Inflammation verstärken sowie eine Leberfibrose induzieren (43). Unlängst wurden einige genetische Varianten entdeckt, die mit dem Auftreten der NAFLD assoziiert sind. Am besten untersucht ist die Variante rs738409 C>G p.I148M im *Patatin-like-Phospholipase-Domain-Containing-3- (PNPLA3-)* Gen (44). PNPLA3 katalysiert neben der Hormon-sensitiven Lipase und *Adipose Triglyceride Lipase (ATGL)* die Hydrolyse von Triglyzeriden und Retinylestern in Hepatozyten und hepatischen Sternzellen (engl. *Hepatic Stellate Cells [HSC]*) (6, 45). Die genannte Genvariante stört die hydrolytische Aktivität des Enzyms und fördert so die Akkumulation von Triglyzeriden. Diese führt zur Erhöhung des Risikos für eine Leberschädigung bei NAFLD (46, 47).

1.2.3.2 NASH

Beim Fortschreiten der NAFLD kommt es zur Entzündung der Leber sowie Zelltod durch Apoptose und Nekrose. Eine andauernde Leberschädigung führt zu Fibrogenese. Hauptverantwortlich für die Produktion von extrazellulärer Matrix sind die HSC (48). Diese werden durch parakrine Stimulation der umliegenden Zellen mit Zytokinen, vor allem *Transforming Growth Factor β (TGF- β)*, aktiviert und produzieren daraufhin *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMP)* und Kollagen (49).

Ein Mechanismus der Krankheitsprogression ist die hepatozytäre Schädigung durch erhöhte intrazelluläre Konzentrationen freier Fettsäuren, die als Lipotoxizität bezeichnet wird (50). Bei Vorliegen eines intrazellulären Überschusses an freien Fettsäuren kommt es zu oxidativem Stress mit Schädigung der Desoxyribonucleinsäuren (engl. *Deoxyribonucleic Acid [DNA]*), Sekretion proinflammatorischer Zytokine (51, 52), Endoplasmatisches-Retikulum- (ER-) Stress (53) und Apoptose-Induktion (54).

Wachsende Evidenz weist darauf hin, dass die intrazelluläre Akkumulation von freiem Cholesterin durch erhöhte Aufnahme mit der Nahrung und einen gestörten Cholesterinmetabolismus bei NAFLD-Patienten zum Fortschreiten der Erkrankung beiträgt (55, 56). Durch Akkumulation von freiem Cholesterin im Zytosol der Hepatozyten kommt es zu ER-Stress mit Inflammasom-Aktivierung und Sekretion inflammatorischer Zytokine wie Interleukin- (IL-) 1 β sowie zur Aktivierung von Apoptose-Signalwegen (57, 58). Während Cholesterin in der Nahrung zur Erhöhung des oxidativen Stress bei NAFLD in Mäusen

beiträgt (59), wird Cholesterin selbst oxidativ modifiziert (60). Dabei entstehende Oxysterole können in Hepatozyten den proinflammatorischen Transkriptionsfaktor NF κ B aktivieren (61). Viele Oxysterole können außerdem durch Aktivierung mitochondrialer Signalwege die Apoptose induzieren (62). In Kupffer-Zellen, den gewebsständigen Makrophagen der Leber, steigern Oxysterole die Synthese des inflammatorischen Markers CC-Chemokinligand 2 (CCL2) und profibrogenetischer Faktoren wie TGF- β (63). Außerdem induzieren Oxysterole die Sekretion von IL-8 und TIMP durch HSC und fördern so die Inflammation und Fibrose im Rahmen der NASH-Progression (63). Jüngste Daten zeigen, dass die Bildung von Cholesterinkristallen im Bereich der Phospholipid-Monoschicht, welche die intrazellulären Lipidtröpfchen umgibt, mit der Progression einer NAFL zur NASH assoziiert ist (64). Kupffer-Zellen, die Cholesterin-Kristalle apoptotischer Hepatozyten phagozytieren, entwickeln sich zu Schaumzellen, wie sie aus der Entwicklung atherosklerotischer Plaques bekannt sind, und lösen eine Entzündungsreaktion aus (64).

1.2.4 Diagnose

Die Diagnose der NAFLD erfordert den Ausschluss eines täglichen Alkoholkonsums von mindestens 30g Ethanol bei Männern und mindestens 20g Ethanol bei Frauen. Außerdem muss ein Ausschluss der häufigsten sekundären Ursachen einer Leberverfettung erfolgen (20).

Als Goldstandard zur Diagnose der NAFLD gilt die Leberbiopsie mit dem histologischen Nachweis einer Steatose in mehr als 5% der Hepatozyten (20). Aufgrund der hohen Prävalenz der NAFLD ist die Leberbiopsie als Screening-Diagnostik jedoch nicht praktikabel. Deshalb wurden zunehmend zuverlässige nicht-invasive Methoden zur Diagnose der NAFLD und insbesondere zur Identifizierung von Patienten mit hohem Risiko für eine Progression der Erkrankung entwickelt.

Als nicht-invasive Diagnostik steht die Sonographie zu Verfügung, die eine Diagnose bei einer Verfettung von mehr als 10% der Hepatozyten erlaubt (65). Darüber hinaus stehen ultraschallbasierte Elastographie-Verfahren zur Verfügung, die die Identifizierung von Patienten mit fortgeschrittener Fibrose und Zirrhose ermöglichen (66).

Die Diagnose-Scores *Fatty Liver Index* (FLI) (67) und *NAFLD Fibrosis Score* (NFS) (68) ziehen Triglyzeride und Gamma-Glutamyltransferase (GGT) beziehungsweise Aspartat-Aminotransferase (AST), Alanin-Aminotransferase (ALT), Thrombozytenzahl und Albumin als Serummarker heran und können bei der NAFLD-Diagnose und beim Erkennen von Patienten mit fortgeschrittenen Krankheitsstadien hilfreich sein. Eine Kombination aus Bildgebung und Serummarkern verbessert die nicht-invasive Diagnostik einer fortgeschrittenen Fibrose bei NAFLD-Patienten (69-71).

1.2.5 Therapie

Bis heute gibt es keine zugelassene medikamentöse Therapie der NAFLD. Aufgrund der engen Beziehung der Erkrankung zu Übergewicht (27), ungesunder Ernährung (72) und fehlender körperlicher Aktivität (73) besteht die Therapie in einer Lebensstilveränderung. Entsprechend sind die Säulen der Lebensstilveränderung: Gewichtsreduktion um mindestens 5-10% (74), Einhalten einer mediterranen oder fettarmen Diät (75) und Steigerung der physischen Aktivität (76). Ziel der Therapie sollte neben der Verbesserung der hepatischen Steatose, Inflammation und Fibrose vor allem die Senkung der erhöhten kardiovaskulären Mortalität der Patienten sein. Begrenzt wird der Erfolg der konservativen Therapie durch die geringe langfristige Therapieadhärenz der Patienten (77, 78).

Jegliche Pharmakotherapie der NAFLD erfolgt als *Off-Label*-Gebrauch und erfordert daher eine besondere Aufklärung des Patienten. Gemäß der Leitlinie der *European Association for the Study of the Liver* (EASL) sollte eine medikamentöse Therapie für Patienten mit progressiver NASH, NASH im Frühstadium mit hohem Progressionsrisiko und aktiver NASH mit hoher nekroinflammatorischer Aktivität erwogen werden (20). Der Einsatz des *Peroxisome-Proliferator-Activated-Receptor-γ*-Agonisten Pioglitazon kann bei ausgewählten Patienten aufgrund seiner günstigen Wirkung auf biochemische Marker und histologische Kriterien der NAFLD erwogen werden (20, 79). Ebenso können Vitamin E oder eine Kombination aus Pioglitazon und Vitamin E für diese Patientengruppe erwogen werden (20, 80). Zur Senkung des kardiovaskulären Risikos wird bei Dyslipidämie die Einnahme von Statinen empfohlen (20).

Bei Patienten, die weder auf Lebensstilveränderungen noch auf Pharmakotherapie ansprechen, kann auch die bariatrische Chirurgie eingesetzt werden, um Gewicht zu reduzieren und metabolische Komplikationen zu vermeiden (20). Bei Vorliegen einer NAFLD zeigen diese Patienten postoperativ verbesserte biochemische und histologische Marker (81).

Als Ultima Ratio kommt für Patienten mit einer terminalen Lebererkrankung auf dem Boden einer NAFLD die Lebertransplantation in Betracht (20). NAFLD-Patienten, die sich einer Lebertransplantation unterziehen, haben aufgrund einer höheren Prävalenz von Adipositas und Adipositas-assoziierten Erkrankungen jedoch ein erhöhtes Risiko für postoperative Komplikationen und Transplantat-Versagen (82).

1.3 Oncostatin M

1.3.1 Die IL-6-Typ-Zytokinfamilie

Oncostatin M (OSM) gehört zur Familie der IL-6-Typ-Zytokine. Neben OSM gehören IL-6, IL-11, IL-27, IL-30, IL-31, IL-35, *Leukemia Inhibitory Factor* (LIF), *Ciliary Neurotrophic Factor*, *Cardiotrophin-1*, *Cardiotrophin-like Cytokine* und *Neuropoietin* zu dieser Familie (83). Als

Gemeinsamkeit haben alle IL-6-Typ-Zytokine die Transmembranprotein-Untereinheit Glykoprotein 130 (gp130) als Teil ihrer Rezeptorkomplexe (84). Die Signaltransduktion nach Aktivierung von gp130 durch den Liganden erfolgt durch Rekrutierung von Januskinasen (JAK) und anschließende Phosphorylierung von *Signal Transducer and Activator of Transcription* (STAT) oder Aktivierung von *Mitogen Activated Protein Kinase*- (MAPK-) und Phosphatidylinositol-3-Kinase-Signalwegen.

1.3.2 OSM-Rezeptoren und Signalwege

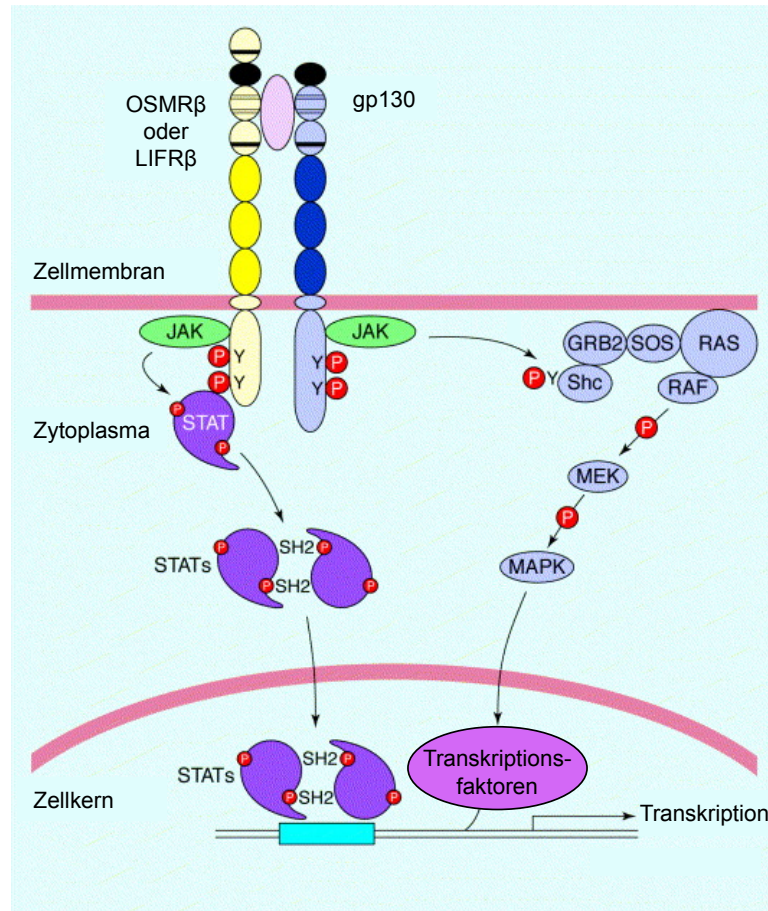


Abbildung 3. OSM-vermittelte Signaltransduktion. Nach Bindung von OSM an den Typ-1- oder Typ-2-Rezeptorkomplex kommt es zur Aktivierung von JAKs und daraufhin zur Aktivierung von STATs, die als Dimere im Zellkern die Transkription regulieren. Außerdem kommt es zur Rekrutierung von Shc, das die Aktivierung des RAS-RAF-MAPK-Signalweges induziert. MAP-Kinasen können durch Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren die Genexpression modulieren. P = Phosphat, JAK = Januskinase, STAT = engl. *Signal Transducer and Activator of Transcription*, SH2 = engl. *Src-homology 2 Domain*, Shc = engl. *Src-homology 2 Domain-Containing Transforming Protein 1*, GRB2 = engl. *Growth-Factor-Receptor-bound Protein 2*, SOS = engl. *Son Of Sevenless*, RAS = engl. *Rat Sarcoma*, RAF = RAF-Protoonkogen-Serin/Threonin-Proteinkinase, MEK = MAPK/ERK-Kinase, MAPK = engl. *Mitogen Activated Protein Kinase*, ERK = engl. *Extracellular-signal Regulated Kinase*. Modifiziert nach Grant SL 1999 (85).

Im Gegensatz zu anderen Zytokinen der Familie bindet OSM an gp130 als α -Rezeptor mit geringer Affinität (86). Dieses heterodimerisiert anschließend mit der Rezeptor-Untereinheit OSM-Rezeptor- β (OSMR β) (87). Im menschlichen und, wie neue Daten zeigen, auch im murinen Organismus kann OSM neben gp130/OSMR β auch an gp130/LIF-Rezeptor- β (LIFR β) binden. Die Bindung an gp130/LIFR β erfolgt dabei mit geringerer Affinität (88-90). Die beiden genannten OSM-Rezeptorkomplexe werden als Typ-1- (gp130/LIFR β) und Typ-2-

Rezeptorkomplex (gp130/OSMR β) bezeichnet. Auch IL-31 kann an den OSMR β als Teil seines Rezeptorkomplexes aus IL-31-Rezeptor- α und OSMR β binden. Aufgrund der Bindung von IL-31 an IL-31-Rezeptor- α statt gp130 als α -Untereinheit, zeigen OSM und IL-31 trotz großer Überschneidungen bei der Signaltransduktion zum Teil unterschiedliche Aktivierungsmuster intrazellulärer Signalwege (91).

Die Bindung von OSM an seine Rezeptoren kann über verschiedene Signalwege die Genexpression der Zelle beeinflussen. Abbildung 3 zeigt die durch OSM aktivierten Signalwege im Überblick. Nach der Rezeptordimerisierung durch Bindung von OSM kommt es zur Aktivierung von JAKs. Anschließend können STATs aktiviert werden und als Dimere die Transkription bestimmter Gene aktivieren (92). Weiterhin kann *Src-homology 2 Domain-Containing Transforming Protein 1* (Shc1) durch die Bindung von OSM an den OSMR β rekrutiert werden und initiiert dann die RAS-MAPK-Kaskade (93). Ebenso kann die Protein-Tyrosin-Phosphatase *Src-homology 2 Domain-Containing Protein Tyrosine Phosphatase 2* (SHP-2) an den zytoplasmatischen Schwanz von gp130 binden und so durch Bindung von OSM an seinen Rezeptor aktiviert werden (85). Die Aktivierung von SHP-2 führt zur Assoziation mit dem GRB2-SOS-Komplex und Auslösung der RAS-MAPK-Kaskade (85). Am Ende der RAS-MAPK-Kaskade stehen die aktivierten MAP-Kinasen *Extracellular-signal Regulated Kinase 1* (ERK1), *Extracellular-signal Regulated Kinase 2* (ERK2), c-Jun-N-terminale Kinase (JNK) und p38-MAPK, die durch Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren die Genexpression modifizieren (94-96).

1.3.3 Regulation der Expression von *Osm* und *Osmr*

OSM wird von Makrophagen, Neutrophilen, dendritischen Zellen und T-Lymphozyten sezerniert (97). Die basale Expression von *Osm* wird durch den Transkriptionsfaktor C/EBP kontrolliert. Eine gesteigerte Transkription des *Osm*-Gens infolge von Stimuli erfordert ein *STAT5 Response Element* (98, 99). Eine negative Regulation der OSM-vermittelten Signaltransduktion erfolgt durch *Suppressors Of Cytokine Signaling* (SOCS), hauptsächlich SOCS3 (100).

Das Gen des OSMR β *Osmr* wird von Endothelzellen, Epithelzellen, Fibroblasten, Adipozyten und Tumorzellen exprimiert (97). OSM selbst verringert die Rezeptordichte des OSMR β kurzfristig durch Liganden-induzierte Rezeptordegradierung, wohingegen die Rezeptorzahl langfristig durch Erhöhung der Synthese steigt (101).

1.3.4 Funktion bei metabolischen Erkrankungen

Initial wurde OSM als Zytokin mit zytostatischer Aktivität in Zellen der humanen Lymphomzelllinie U937 entdeckt (102). Daraufhin wurde seine Beteiligung in einer Vielzahl biologischer Prozesse festgestellt, darunter Hämatopoese, Inflammation, Kardiomyozyten-Remodelling, Akute-Phase-Reaktion und Leberregeneration (vgl. Hermanns HM (97)). Die

Rolle von OSM in der Entwicklung des Metabolischen Syndroms und der NAFLD wird kontrovers diskutiert. In humanen und murinen Lebern mit NAFLD konnten verminderte Protein-Spiegel von OSMR β nachgewiesen werden (103) und umgekehrt entwickeln Leberspezifische OSMR β -*Knockout*- (*Osmr*-KO-) Mäuse hepatische Steatose, Inflammation und Insulinresistenz (103). Auf molekularer Ebene wurde nachgewiesen, dass OSM durch Induktion der *Ldlr*-Expression Dyslipidämie und hepatische Steatose vermindern kann (104, 105). Komori *et al.* konnten übereinstimmend damit zeigen, dass die intraperitoneale Verabreichung von OSM bei genetisch sowie ernährungsbedingt adipösen Mäusen viszerale Adipositas, hepatische Steatose und Insulinresistenz vermindert. Diese Daten suggerieren, dass OSM für die hepatische Lipidhomöostase und Insulinsensitivität benötigt wird (106).

Auf der anderen Seite zeigten Henkel *et al.*, dass OSM *in vitro* hepatozelluläre Insulin-Signalwege und den Lipidmetabolismus inhibiert (107). Übereinstimmend damit konnte die gleiche Arbeitsgruppe in Lebern von Mäusen, die eine histologisch gesicherte NASH hatten, eine 30-fache Erhöhung der *Osm*-Expression nachweisen. Auch in Maus-Lebern mit blander Steatose ohne Inflammation konnte bereits eine erhöhte *Osm*-Expression gegenüber gesunden Kontrollen nachgewiesen werden, was eine mögliche Rolle von OSM in der frühen Phase der NAFLD-Pathogenese impliziert (107). Weiterhin kann OSM die Produktion von Kollagen und *Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 1* (TIMP1) in HSC steigern und so möglicherweise die Entwicklung einer Leberzirrhose begünstigen (108). Diese Ergebnisse legen nahe, dass übermäßige OSM-vermittelte Signaltransduktion zur Entwicklung einer hepatischen Steatose und Insulinresistenz sowie zur Progression der NAFLD beiträgt.

Es ist gut untersucht, dass eine Dysfunktion des Fettgewebes zur Entwicklung des Metabolischen Syndroms beiträgt. Die typische Fettgewebisdysfunktion ist durch eine verminderte Adipogenese, vermehrte Adipozyten-Hypertrophie, verminderte Insulinsensitivität der Adipozyten sowie eine geringgradige Fettgewebsentzündung mit Infiltration durch Makrophagen charakterisiert (109). Komori *et al.* zeigten, dass *Osmr*-KO-Mäuse neben hepatischer Steatose auch eine Insulinresistenz, β -Zell-Hyperplasie, Fettgewebsentzündung und Dyslipidämie entwickeln (110, 111). Auch Adipozytenspezifische *Osmr*-KO-Mäuse haben im Vergleich zu WT-Mäusen eine gesteigerte Fettgewebsentzündung und erhöhte systemische Insulinresistenz (112). Andererseits konnten im Fettgewebe adipöser Mäuse und Menschen erhöhte OSM-Spiegel nachgewiesen werden. Die Höhe des OSM-Spiegels im Fettgewebe korrelierte mit dem Körpergewicht und den Insulin-Spiegeln (113). *In vitro*-Daten mehrerer Arbeitsgruppen zeigen, dass OSM die Adipogenese inhibiert (114, 115) und so zur Dysfunktion des Fettgewebes bei Adipositas beitragen kann. Es ist bekannt, dass die thermogenetische Aktivierung des braunen Fettgewebes sowie die Fähigkeit des weißen Fettgewebes, einen Braun-ähnlichen-Phänotyp anzunehmen, mit metabolischer Gesundheit assoziiert sind (116). Die Applikation von OSM

stört diese Prozesse (117). Dies impliziert, dass OSM zur Fettgewebisdysfunktion bei Adipositas beitragen kann.

1.4 Tierversuch an *Osmr*-KO-Mäusen auf WT- und *Ldlr*-KO-Hintergrund

Bereits im Vorfeld der vorliegenden Arbeit erfolgte ein durch die Regierung von Unterfranken unter dem AZ 55.2-2531.01-27/14 genehmigter Tierversuch, bei dem *Osmr*-KO-Mäuse auf wildtypischem oder *Ldlr*-defizientem Hintergrund für 12 Wochen auf eine fett- und cholesterinreiche Diät gesetzt wurden. Zum Zeitpunkt des Startes der vorliegenden Arbeit lagen bereits Daten zu Körpergewicht, Blutglukose, Serumcholesterin, aortaler Plauegröße und Lebergewicht der untersuchten Tiere vor. Diese werden im Abschnitt 1.4.2 vorgestellt.

1.4.1 Durchführung des Tierversuches

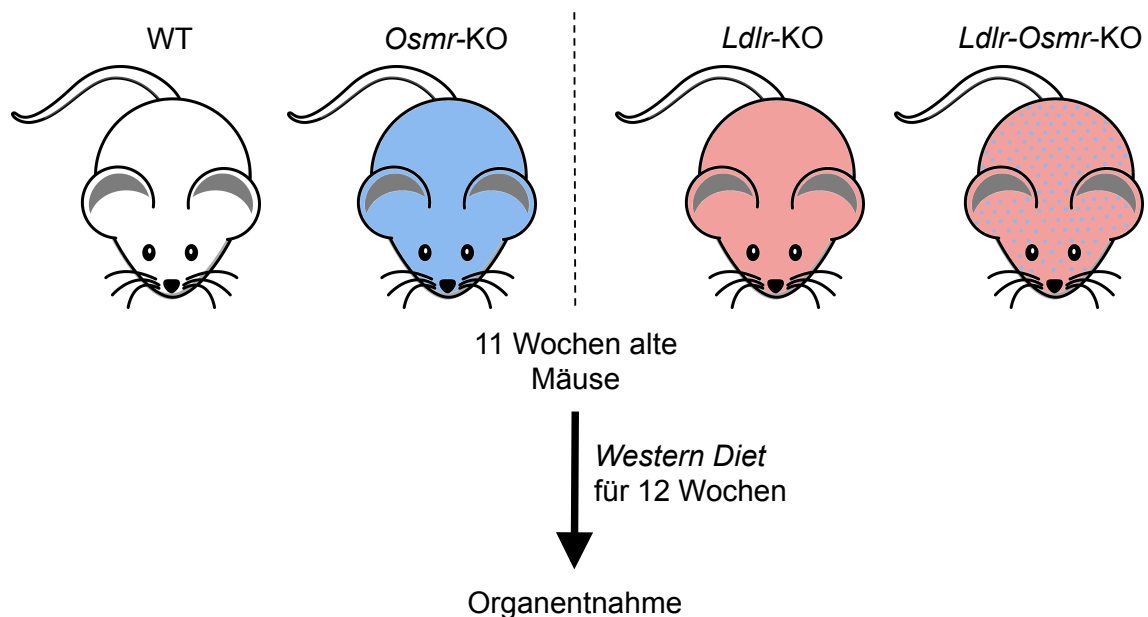


Abbildung 4. Experimentelles Design des Tierversuchs. 11 Wochen alte Wildtyp- (WT-), Oncostatin M-Rezeptor- β -Knockout- (*Osmr*-KO-), Low-Density-Lipoprotein-Rezeptor-Knockout- (*Ldlr*-KO-) und Oncostatin M-Rezeptor- β -Low-Density-Lipoprotein-Rezeptor-Doppel-Knockout- (*Ldlr*-*Osmr*-KO-) Mäuse wurden über 12 Wochen mit einer fett- und cholesterinreichen *Western Diet* gefüttert. Bei der anschließenden Organentnahme wurden Serum, Aorta, Darm und Leber zur weiteren Untersuchung entnommen. Der Diätversuch an Mäusen mit WT-Hintergrund (WT, *Osmr*-KO) einerseits und *Ldlr*-KO-Hintergrund (*Ldlr*-KO, *Ldlr*-*Osmr*-KO) andererseits wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt. Dies wird durch die gestrichelte Linie impliziert, die die Gruppen trennt.

Ldlr-Knockout- (*Ldlr*-KO-) Mäuse sind ein weit verbreitetes Tiermodell für Atherosklerose. Durch die fehlende Bildung des LDLR kommt es zur LDL-Akkumulation im Blut und atherosklerotischen Veränderungen der Blutgefäße. Weiterhin entwickeln *Ldlr*-KO-Mäuse eine hepatische Steatose bis hin zur NASH und werden deshalb als neues physiologisches Modell einer NAFLD betrachtet (118, 119). Ziel des Tierversuches war, den Einfluss von OSM auf die Entwicklung von Atherosklerose, Metabolischem Syndrom und NAFLD zu untersuchen. Dafür wurden *Osmr*-KO-Mäuse auf zwei unterschiedlichen genetischen

Hintergründen verwendet: Wildtyp- (WT-) Mäuse der Rasse C57BL/6 und *Ldlr*-KO-Mäuse, ebenfalls auf C57BL/6-Hintergrund.

WT- und *Osmr*-KO-Mäuse sowie *Ldlr*-KO- und *Ldlr-Osmr*-Doppel-Knockout- (*Ldlr-Osmr*-KO-) Mäuse wurden im Alter von 11 Wochen auf eine 12 Wochen andauernde fett- und cholesterinreiche Diät, eine sogenannte *Western Diet* (WD), gesetzt. Während des Diätversuches wurden die Tiere einmal wöchentlich gewogen und im Anschluss an die Diät wurden sie für die Entnahme von Serum, Aorta, Darm und Leber geopfert (Details siehe Abschnitt 2.1 Tierversuch).

1.4.2 Vorliegende Ergebnisse

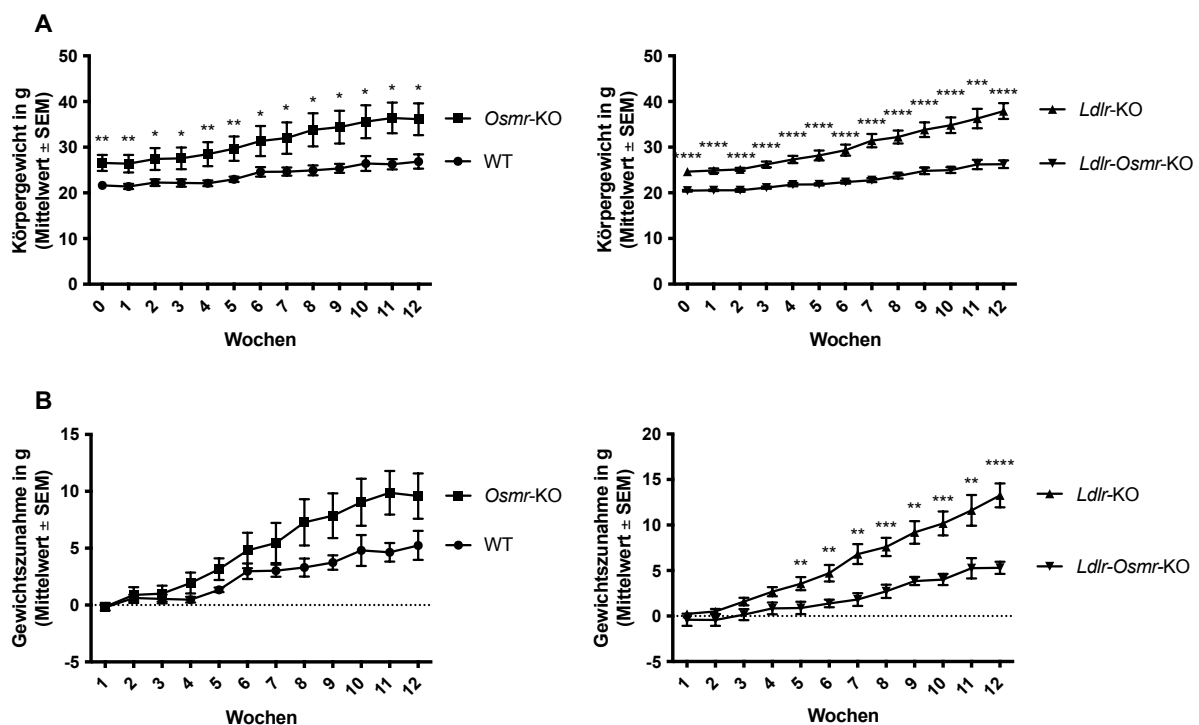


Abbildung 5. Körpergewicht und Gewichtszunahme von *Osmr*-KO-Mäusen auf WT- und *Ldlr*-KO-Hintergrund. Darstellung des wöchentlich gemessenen Körpergewichtes (A) und der Gewichtszunahme (B) im Verlauf der 12 Wochen andauernden *Western Diet*. $n=7$ für WT und *Osmr*-KO, $n=10$ für *Ldlr*-KO und *Ldlr-Osmr*-KO. Unterschiede wurden durch Verwendung des Mann-Whitney U-Tests berechnet. Darstellung als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM). * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ und **** $p<0,0001$ kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen.

Bereits das Ausgangskörpergewicht der Mäuse vor Beginn der 12-wöchigen Diät unterschied sich zwischen den Genotypen (siehe Abbildung 5). *Osmr*-KO-Mäuse waren signifikant schwerer als WT-Mäuse (im Mittel 26,5 g gegenüber 21,6 g), während *Ldlr-Osmr*-KO-Mäuse signifikant leichter waren als gleichaltrige *Ldlr*-KO-Mäuse (im Mittel 20,5 g gegenüber 24,6 g). Während der Diät stieg das Körpergewicht der Tiere in allen Gruppen im Durchschnitt an und die Differenz zwischen den verglichenen Gruppen vergrößerte sich.

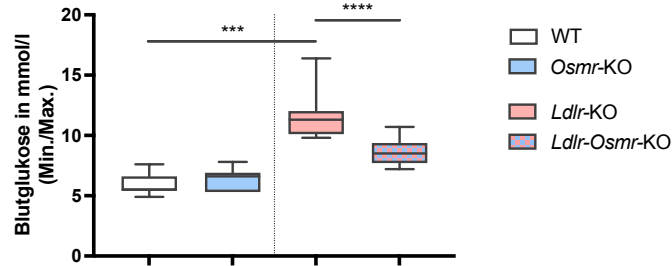


Abbildung 6. Blutglukose von *Osmr*-KO-Mäusen auf WT- und *Ldlr*-KO-Hintergrund. Darstellung des zum Zeitpunkt der Organentnahme gemessenen Spontan-Blutzuckers im Vollblut. N=7 für WT und *Osmr*-KO, n=10 für *Ldlr*-KO und *Ldlr-Osmr*-KO. Unterschiede wurden durch Verwendung des Mann-Whitney U-Tests berechnet. ***p<0,001 und ****p<0,0001 kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen.

Bei der Organentnahme wurde die Glukosekonzentration im Vollblut mit einem Schnellmessgerät gemessen. Der so ermittelte Gelegenheits-Blutzucker von WT- und *Osmr*-KO-Mäusen war vergleichbar (im Mittel 6,0 mM gegenüber 6,4 mM). Bei *Ldlr*-KO-Mäusen war der Glukose-Spiegel gegenüber WT-Mäusen deutlich erhöht. *Ldlr-Osmr*-KO-Mäuse zeigten wiederum einen gegenüber *Ldlr*-KO-Mäusen verminderten Glukose-Spiegel (im Mittel 8,5 mM gegenüber 11,3 mM). In Abbildung 6 sind die Blutzuckerkonzentrationen der 4 Genotyp-Gruppen dargestellt.

Die Bestimmung von Gesamtcholesterin-, LDL-, HDL- und VLDL-Spiegeln im Serum der Mäuse mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie erfolgte durch Prof. Dr. Elke Butt des Instituts für Experimentelle Biomedizin II der Universität Würzburg (Leitung: Prof. Dr. A. Zerneck-Madsen). Abbildung 7 zeigt die Werte im Vergleich zwischen den Genotypen. In *Osmr*-KO-Mäusen konnten gegenüber WT-Mäusen erhöhte Werte für Gesamtcholesterin, VLDL, LDL und HDL gefunden werden. Bei LDLR-defizienten Tieren waren die gemessenen Cholesterin- und Lipoprotein-Spiegel deutlich höher, insbesondere zeigten sich LDL-Spiegel von durchschnittlich 588 mg/dl in *Ldlr*-KO-Mäusen gegenüber 7 mg/dl in WT-Mäusen. Bei *Ldlr-Osmr*-KO-Mäusen waren im Vergleich zu *Ldlr*-KO-Mäusen geringere Spiegel von Gesamtcholesterin und allen Lipoproteinen nachweisbar. In weiterer Zusammenarbeit mit dem Institut für Experimentelle Biomedizin II wurden atherosklerotische Plaques im Bereich der Aorta durch eine *en face*-Präparation mit Sudan IV-Färbung sichtbar gemacht. In WT- und *Osmr*-KO-Mäusen konnten keine Plaques nachgewiesen werden. *Ldlr-Osmr*-KO-Mäuse zeigten eine geringere Plauegröße als *Ldlr*-KO-Mäuse (siehe Abbildung 7).

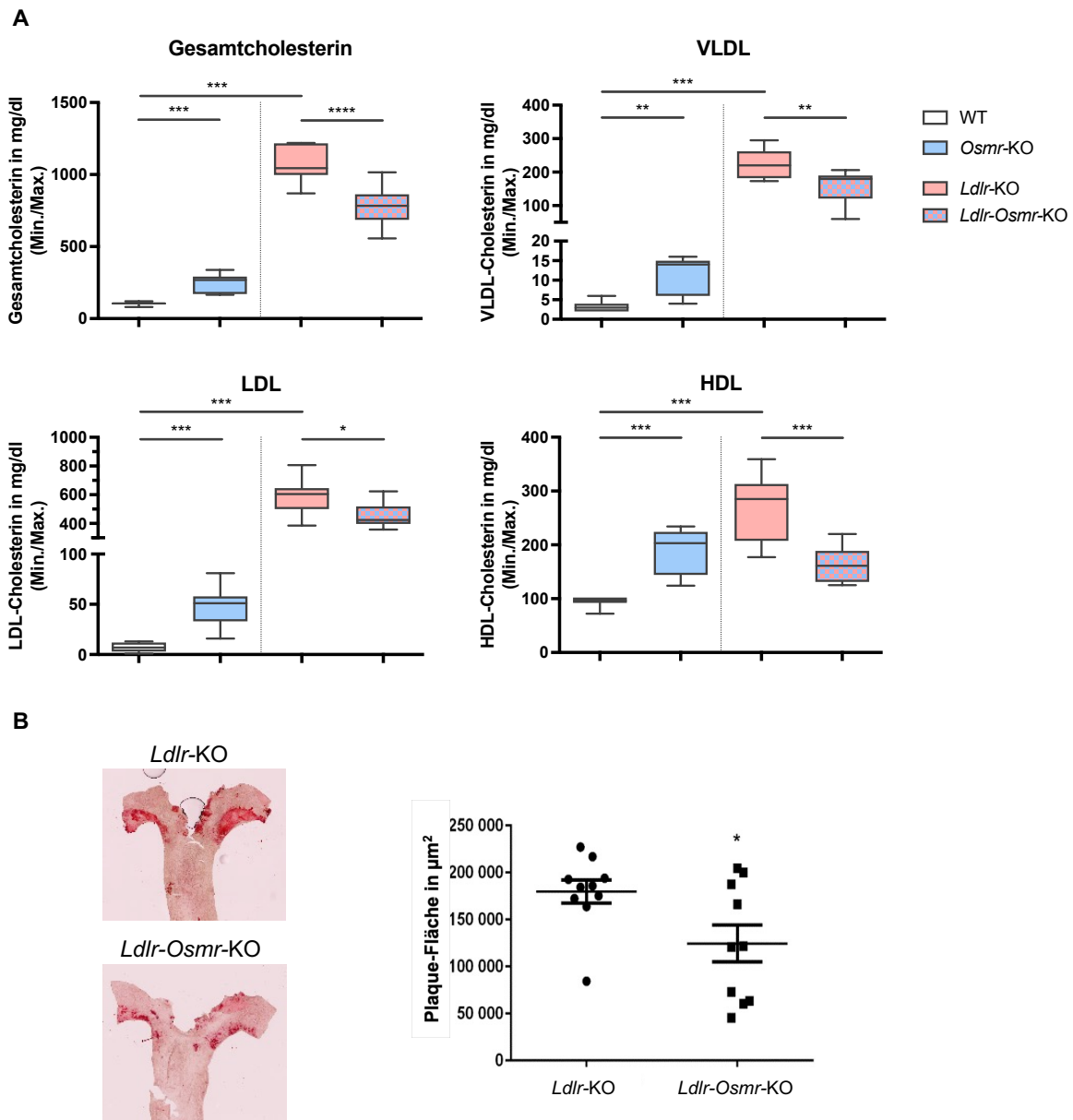


Abbildung 7. Serum-Cholesterin und aortale Plaquebildung in *Osmr*-KO-Mäusen auf WT- und *Ldlr*-KO-Hintergrund. Darstellung der zum Zeitpunkt der Organentnahme gemessenen Serumspiegel für VLDL, LDL, HDL und Gesamtcholesterin (A). Darstellung je eines repräsentativen *en face*-Präparates der thorakalen Aorta mit Lipidfärbung für *Ldlr*-KO und *Ldlr-Osmr*-KO sowie die Quantifizierung der so ermittelten Plaquefläche der thorakalen Aorta (B). n=7 für WT und *Osmr*-KO, n=10 für *Ldlr*-KO und *Ldlr-Osmr*-KO. Unterschiede wurden durch Verwendung des Mann-Whitney U-Tests berechnet. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 und ****p<0,0001 kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen.

Im Rahmen der Organentnahme wurde die Leber der Tiere gewogen. Das Ergebnis ist in Abbildung 8 dargestellt. Das Lebergewicht von *Osmr*-KO-Mäusen war höher als das der WT-Mäuse und auch *Ldlr*-KO-Tiere zeigten ein erhöhtes Lebergewicht. Interessanterweise hatten *Ldlr-Osmr*-KO-Mäuse ein geringeres Lebergewicht als *Ldlr*-KO-Mäuse.

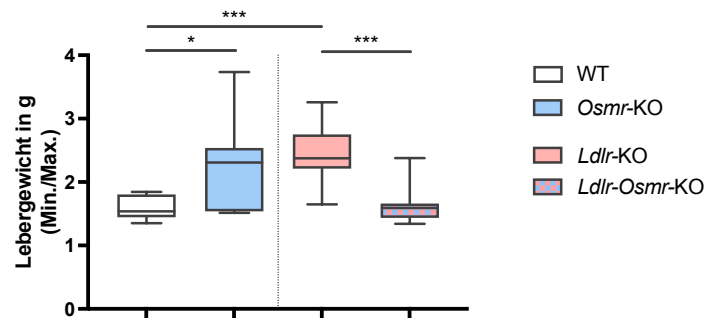


Abbildung 8. Lebergewicht von *Osmr*-KO-Mäusen auf WT- und *Ldlr*-KO-Hintergrund. Darstellung des zum Zeitpunkt der Organentnahme gemessenen Lebergewichtes. n=7 für WT und *Osmr*-KO, n=10 für *Ldlr*-KO und *Ldlr-Osmr*-KO. Unterschiede wurden durch Verwendung des Mann-Whitney U-Tests berechnet. *p<0,05 und ***p<0,001 kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Wie oben beschrieben, ist die Pathogenese der NAFLD noch nicht vollständig verstanden. Wirksame Therapien werden aufgrund der steigenden Prävalenz der Erkrankung dringend gebraucht. Kürzlich veröffentlichte Daten postulieren OSM als mögliches Therapeutikum bei NAFLD und Metabolischem Syndrom, andere Daten zeigen jedoch schädliche Einflüsse von OSM auf den Metabolismus. Um die Rolle von OSM und seinen möglichen Nutzen als therapeutisches Zielprotein weiter aufzuklären, wurden *Osmr*-KO-Mäuse auf WT- und *Ldlr*-KO-Hintergrund untersucht. Daraus hervorgehende Daten zeigten eine ambivalente Rolle von OSM bei Dyslipidämie, Plaquebildung und Hyperglykämie abhängig vom genetischen Hintergrund der Mäuse. In dieser Arbeit soll der Einfluss der OSMR β -Signaltransduktion auf die Histologie und Genexpression der Leber mithilfe dieses Mausmodells untersucht werden. Weiterhin soll untersucht werden, welchen Einfluss die Gabe einer cholesterin- und fettreichen Diät auf Histologie und Genexpression der Leber hat.

2. METHODEN

2.1 Tierversuch

Die Zucht und der Diätversuch der in der vorliegenden Doktorarbeit verwendeten Versuchstiere erfolgte bereits im Vorfeld von Dr. Carmen Schäfer und Dr. Christine Mais aus der AG PD Dr. Hermanns.

2.1.1 Tiere

Es wurden ausschließlich weibliche Mäuse des Inzuchtstammes C57BL/6 verwendet. Für die Fragestellung wurden Tiere vier verschiedener Genotypen untersucht: WT-, *Osmr*-KO- (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. T. Kubin, MPI Bad Nauheim, mit Genehmigung von Herrn Prof. Dr. K. Nakamura, LivTech Inc., Japan), *Ldlr*-KO- (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Frau Prof. A. Zerneck-Madsen) und *Ldlr-Osmr*-KO-Mäuse. Dabei wurde die 12-wöchige Diät für die WT- und *Osmr*-KO-Mäuse einerseits sowie für die *Ldlr*-KO- und *Ldlr-Osmr*-KO-Mäuse andererseits jeweils parallel durchgeführt. In den WT- und *Osmr*-KO-Gruppen waren je 7 Tiere, in den *Ldlr*-KO- und *Ldlr-Osmr*-KO-Gruppen je 10 Tiere. Die Zuchtpaare der Vergleichsgruppen entstammten Geschwistergenerationen, die im Anschluss homozygot verpaart wurden.

2.1.2 Tierhaltung

Die Mäuse wurden im Tierstall des Rudolf-Virchow-Zentrums der Universität Würzburg in Gruppenhaltung in transparenten Kunststoff-Käfigen eines individuell belüfteten Käfigsystems (IVC-Käfige) auf geeignetem Einstreumaterial und unter Bereitstellung von Nestmaterial gehalten. Alle Versuche wurden im Einklang mit den gesetzlichen Richtlinien entsprechend des durch die Regierung von Unterfranken genehmigten Tierversuchsantrags (AZ 55.2-2531.01-27/14) durchgeführt. Die Tiere hatten bis zu einem Alter von 11 Wochen freien Zugang zu Maus-Standard-Futter und Wasser.

2.1.3 Diätversuch

In einem Alter von 11 Wochen wurden die Tiere für 12 Wochen auf eine cholesterin- und fettreiche WD gesetzt (Altromin). Dabei wurde in den ersten 5 Wochen ein Futter mit 21% Milchfett und in den übrigen 7 Wochen ein Futter mit 15% Milchfett *ad libitum* gefüttert. Das Futter enthielt in beiden Fällen 0,15% Cholesterin. Weiterhin hatten die Tiere freien Zugang zu Wasser und wurden einmal wöchentlich gewogen.

Als Vergleichsgruppen wurden WT- und *Ldlr-Osmr*-KO-Mäuse herangezogen, die statt einer WD über den gleichen Zeitraum weiterhin eine Standarddiät (STD) erhielten. Die Vergleichsgruppen wurden zeitlich nach den Diät-Gruppen gehalten und geopfert.

2.1.4 Opferung der Versuchstiere

Nach Abschluss der 12-wöchigen Diät wurden die Tiere im Alter von 23 Wochen für die Organentnahme geopfert. Unmittelbar nach Euthanasie wurde mit einer 1 ml-Spritze direkt unterhalb des Xiphoids der linke Ventrikel punktiert und so viel Blut wie möglich entnommen. Die Ausbeute betrug in der Regel 1-1,5 ml. Das Blut wurde in einem Serumröhrchen gesammelt, 30 Minuten zur Gerinnung bei Raumtemperatur belassen und anschließend bei 10.000 g für 2 Minuten zentrifugiert. Das nun im Überstand befindliche Serum wurde in 1,5 ml-Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

Darauf folgte die Fixierung der Tiere auf dem Präpariertisch und die Eröffnung des Peritoneums mittels medianer Laparotomie sowie die gewebeschonende Präparation und Entnahme der Leber. Dazu wurde die Leber zunächst durch Durchtrennung des Ligamentum falciforme hepatis von der vorderen Bauchwand getrennt und dann vorsichtig von der kranialen Fixierung am Diaphragma mobilisiert. Schließlich wurden das Ligamentum hepatoduodenale sowie die Vena cava durchtrennt und die Leber im Ganzen entnommen. Die Präparation erfolgte unter Erhaltung der intakten Aorta, um die anschließende Entnahme dieser für die *en face*-Präparation zu ermöglichen.

Die Leber wurde in phosphatgepufferte Salzlösung (engl. *Phosphate-Buffered Saline* [PBS]) gelegt und in Würfel von etwa 5 mm Kantenlänge zerteilt. Für das spätere Anfertigen von Gefrierschnitten wurde für jedes Tier ein Leberwürfel in ein Kunststoff-Einbetttschälchen gelegt, mit Einbettmedium bedeckt und auf flüssigem Stickstoff eingefroren. Das eingebettete Gewebe wurde anschließend bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert. Außerdem wurde für die spätere Anfertigung von Paraffinschnitten ein Leberwürfel pro Versuchstier zur Gewebefixierung mit 8 ml säurefreier phosphatgepufferter Formaldehydlösung 4% in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen gegeben und bis zur Einbettung in Paraffin für 24-72 Stunden bei 4°C gelagert. Das restliche Lebergewebe wurde für die Isolation von Ribonukleinsäuren (engl. *Ribonucleic Acid* [RNA]) und weitere Analysen auf flüssigem Stickstoff schockgefroren und in Kryoröhrchen bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2 Histologische Methoden

2.2.1 Herstellung von Paraffinschnitten aus Lebergewebe

2.2.1.1 Verwendete Puffer und Lösungen

Ethanol (50%, 70%, 80%, 90%, 96%, 100%)

Streckwasser:

dH₂O 40 ml

Aceton	10 ml
Eiweiß-Glycerin	500 µl

2.2.1.2 Paraffineinbettung

Das Lebergewebe wurde im Rahmen der Organentnahme in Formaldehyd-Lösung fixiert (siehe Abschnitt 2.1.4 Opferung der Versuchstiere). Um aus dem fixierten Lebergewebe gleichmäßige Schnitte herstellen zu können, muss das Gewebe eine gleichmäßige Konsistenz haben. Deshalb wurde das Gewebe nach 24-72 Stunden Fixierung zunächst mit einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Anschließend wurde der Alkohol durch Xylol entfernt und das Gewebe in heißem Paraffin eingebettet.

Zunächst wurde tertiäres Butanol in einer Kunststoffflasche bei 37°C in den Wärmeschrank gestellt und zwei 500 ml-Bechergläser zur Hälfte mit festem Paraffin gefüllt und bei 70°C im Wärmeschrank verflüssigt. Außerdem wurden Edelstahl-Einbettenschälchen zur Erwärmung in den 70°C heißen Wärmeschrank gelegt. Inzwischen wurde Filterpapier in etwa auf die Größe einer Einbettkassette zugeschnitten. Ein Filterpapier wurde auf den Boden der Einbettkassette eingelegt, das fixierte Leberstück mit einer Pinzette aus der Formaldehyd-Lösung auf das Filterpapier gelegt und anschließend mit einem weiteren Filterpapier bedeckt. Die Einbettkassette wurde verschlossen und in ein mit Leitungswasser gefülltes 1000 ml-Becherglas gegeben. So wurde mit allen Proben verfahren. Dann wurde das Becherglas mit den gefüllten Kassetten für eine Stunde unter den laufenden Wasserhahn gestellt, um das Formaldehyd auszuwaschen.

Nach der Wässerung wurde das Leitungswasser verworfen. Die Kassetten wurden anschließend für die aufsteigende Alkoholreihe nacheinander in entsprechend gefüllte Kunststoffflaschen gegeben und währenddessen auf dem Wippschüttler in Bewegung gehalten. Folgende Schritte wurden dabei durchgeführt:

Lösung	Zeit	Zyklen
Ethanol 50%	30 min	2
Ethanol 70%	30 min	2
Ethanol 80%	20 min	1
Ethanol 90%	20 min	1
Ethanol 96%	20 min	1
Ethanol 100%	20 min	1

Anschließend wurde der Alkohol verworfen und die Kassetten wurden in das erwärmte tertiäre Butanol gegeben und darin für eine Stunde im Wärmeschrank bei 37°C belassen. Danach wurden die Einbettkassetten für eine Stunde in eines der mit nun flüssigem Paraffin

gefüllten Bechergläser im Wärmeschrank gegeben und anschließend in das zweite Paraffin-Glas überführt. Dort wurden sie über Nacht in Paraffin getränkt.

Am nächsten Tag wurde die Einbettstation auf 63°C vorgeheizt. Sobald das Paraffin im Paraffintank der Station vollständig geschmolzen war, wurde das Becherglas mit den darin liegenden Einbettkassetten sowie die vorgeheizten Edelstahl-Einbetttschälchen auf die Wärmeplatte gestellt. Für jedes Gewebestück wurde ein Einbetttschälchen bis zum Rand mit Paraffin gefüllt und anschließend wurde das Leberstück aus der Einbettkassette genommen und zentral in das flüssige Paraffin gelegt. Nach einer Stunde Lagerung auf Eis wurden die Blöcke über Nacht bei Raumtemperatur vollständig durchgehärtet und dann aus den Einbetttschälchen gelöst.

2.2.1.3 Schneiden des Lebergewebes

Für die Anfertigung von Gewebeschnitten wurde der Paraffinblock zugeschnitten und in ein Schlittenmikrotom eingespannt. Es wurde eine Schnittdicke von 5 µm eingestellt und manuell geschnitten. Die Schnitte wurden mithilfe eines Pinsels vorsichtig auf Objektträger überführt. Einige Tropfen Streckwasser wurden neben die Schnitte auf den Objektträger gegeben und durch Kippen des Objektträgers unter den Gewebeschnitten verteilt. Der Objektträger wurde anschließend auf eine Wärmeplatte bei 38°C gelegt, um eine Streckung der Schnitte zu erreichen. Überschüssiges Streckwasser wurde mit einem fusselfreien Tuch aufgenommen und die fertigen Objektträger über Nacht bei 37°C im Wärmeschrank belassen.

2.2.2 Herstellung von Kryostatschnitten aus Lebergewebe

Da in Paraffin eingebettete Gewebeschnitte für einige histologische Färbungen ungeeignet sind, wurden auch Gefrierschnitte aus dem Lebergewebe der Versuchstiere hergestellt.

Das im Rahmen der Opferung entnommene Lebergewebe wurde in Einbettmedium für Kryostatschnitte eingebettet (siehe Abschnitt 2.1.4 Opferung der Versuchstiere) und bis zur Anfertigung der Schnitte bei -80°C gelagert. Für die Herstellung der Kryostatschnitte wurde an einem Kryostatmikrotom eine Objekttemperatur von -11°C, eine Kerntemperatur von -14°C und eine Schnittdicke von 7 µm eingestellt. Das Lebergewebe wurde bei Raumtemperatur kurz angetaut, aus den Einbettformen gelöst und mit einer Rasierklinge knapp rund um das Gewebestück zugeschnitten. Dann wurde das Gewebestück mithilfe eines Tropfens flüssigen Einbettmediums auf dem Objekthalter des Mikrotoms fixiert. Die Schnitte wurden manuell mit dem Rotationsmikrotom angefertigt und durch einen bei Raumtemperatur gelagerten Objektträger aufgenommen. Die Objektträger wurden danach etwa 2 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend bei -20°C gelagert.

2.2.3 Färbung von Paraffinschnitten

2.2.3.1 Verwendete Puffer und Lösungen

Ethanol (100%, 96%, 80%, 70%, 50%)

Leitungswasser-Ersatz:

NaHCO ₃	7 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	40 g
dH ₂ O	2 l

Sirius-Rot-Färbelösung:

Pikrinsäure 1,3%	200 ml
Sirius Rot	0,2 g

Sirius-Waschpuffer:

Essigsäure	5 ml
dH ₂ O	1 l

2.2.3.2 Entparaffinierung

Vor einer Färbung von Paraffinschnitten muss das Paraffin aus dem Gewebe entfernt werden, um es anfärbbar zu machen.

Dazu wurden die Schnitte in einem Objektträger-Ständer zunächst für 30 Minuten bei 70°C in den Wärmeschrank gestellt, um das Paraffin zu verflüssigen. Anschließend wurde das Paraffin durch den Xylol-Ersatz Roti®-Histol und die absteigende Alkoholreihe aus dem Gewebe verdrängt. Dafür wurden die Objektträger im Ständer in entsprechend befüllte Glasküvetten gestellt und auf dem Wippschüttler in Bewegung gehalten.

Lösung	Zeit	Zyklen
Roti®-Histol	10 min	3
Ethanol 100%	5 min	2
Ethanol 96%	5 min	3
Ethanol 80%	5 min	2
Ethanol 70%	5 min	3
Ethanol 50%	5 min	2
Dest. Wasser	5 min	2

Die entparaffinierten Schnitte wurden über Nacht in einer feuchten Kammer gelagert.

2.2.3.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Bei der Hämatoxylin-Eosin- (HE-) Färbung werden zunächst die Zellkerne durch Hämalaun angefärbt, die Kernfärbung durch Spülen mit Leitungswasser gebläut und damit konserviert und dann eine Gegenfärbung mit Eosin durchgeführt, das alle anderen Strukturen rötlich färbt. Nach Abschluss der eigentlichen Färbung werden die Gewebeschnitte zur Vorbereitung auf das Eindecken mit einem organischen Eindeckmedium durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert und durch das Xylol-Ersatzmittel Roti®-Histol geklärt. Das Klären dient dem Verdrängen von Ethanol aus den Gewebeschnitten, das lichtmikroskopisch ungünstige Eigenschaften hat.

Die verwendeten gebrauchsfertigen Färbelösungen Hämalaun und Eosin wurden vor Gebrauch durch ein Filterpapier filtriert und anschließend in Glasküvetten gefüllt. Um eine Standardisierung bei schwankender Qualität des Leitungswassers zu erhalten, wurde stattdessen ein Leitungswasser-Ersatz aus destilliertem Wasser, Natriumhydrogencarbonat und Magnesiumsulfat verwendet. Die Objektträger wurden im Ständer in die jeweilige Küvette gestellt und auf dem Wippschüttler in Bewegung gehalten. Folgende Färbeschritte wurden durchgeführt:

Färbeschritt	Lösung	Zeit	Zyklen
Kernfärbung	Hämalaun	5 min	1
	Leitungswasser	5 min	3
Gegenfärbung	Eosin	3 min	1
	Leitungswasser	25 s	2
Entwässerung	Ethanol 70%	30 s	1
	Ethanol 96%	30 s	1
	Ethanol 100%	30 s	1
Klären	Roti®-Histol	1 min	3

In der letzten Küvette mit Roti®-Histol wurde der Ständer mit den Objektträgern belassen und die Schnitte nacheinander eingedeckt.

2.2.3.4 Sirius-Rot-Färbung

Für die Darstellung von Kollagenfasern in Lebergewebe kann eine Sirius-Rot-Färbung durchgeführt werden. Vor der Anfärbung der Kollagenfasern durch Sirius-Rot wurde eine Anfärbung der Zellkerne durch Hämalaun durchgeführt.

Vor der Verwendung der Färbelösungen Sirius-Rot und Hämalaun wurden diese filtriert und in Küvetten gegeben. Wie bei der HE-Färbung wurde statt Leitungswasser ein Leitungswasser-Ersatz verwendet. Die Objektträger wurden im Ständer in die jeweilige

Küvette gestellt und auf dem Wippschüttler in Bewegung gehalten. Folgende Schritte wurden dabei durchgeführt:

Färbeschritt	Lösung	Zeit	Zyklen
Kernfärbung	Hämalaun	8 min	1
	Leitungswasser	5 min	3
Faserfärbung	Sirius-Rot	60 min	1
	Sirius-Waschpuffer	30 s	2
Entwässerung	Ethanol 100%	30 s	3
Klären	Roti®-Histol	1 min	3

In der letzten Küvette mit Roti®-Histol wurden die Schnitte belassen und nacheinander eingedeckt.

2.2.4 Färbung von Kryostatschnitten

2.2.4.1 Verwendete Puffer und Lösungen

Ethanol (50%)

Sudan IV-Färbelösung:

Scharlachrot	5 g
Aceton	250 ml
Ethanol	125 ml
dH ₂ O	125 ml

Leitungswasser-Ersatz:

NaHCO ₃	7 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	40 g
dH ₂ O	2 l

2.2.4.2 Sudan IV-Färbung

Die Sudan IV-Färbung dient dem Nachweis von Lipiden in gefrorenen Gewebeschnitten. Nach der Anfärbung von Lipiden durch den rötlichen Farbstoff wurde eine Kernfärbung mit Hämalaun durchgeführt.

Die Färbelösungen Sudan IV und Hämalaun wurden vor der Verwendung filtriert und in Glasküvetten gefüllt. Auch hier wurde der standardisierte Leitungswasser-Ersatz verwendet.

Die Objektträger wurden im Ständer in die jeweilige Küvette gestellt und auf dem Wippschüttler in Bewegung gehalten. Folgende Schritte wurden dabei durchgeführt:

Färbeschritt	Lösung	Zeit	Zyklen
Spülen	Ethanol 50%	2 min	1
Lipidfärbung	Sudan IV-Lösung	12 min	1
	Ethanol 50%	2 min	1
	dH ₂ O	1 min	1
Kernfärbung	Hämalaun	12 min	1
	Leitungswasser	5 min	3
	dH ₂ O	2 min	1

Nach dem letzten Schritt wurden die Objektträger nacheinander aus dem destillierten Wasser entnommen und mit einem wässrigen Eindeckmedium eingedeckt. Die Aushärtung erfolgte bei 4°C für mindestens 24 Stunden.

2.2.5 Eindecken gefärbter Schnitte

Nach der Färbung wurden die Objektträger nacheinander aus der letzten Küvette entnommen und mit einem fusselfreien Tuch vorsichtig getrocknet. Die Schnitte wurden mit 3 Tropfen des passenden Eindeckmediums bedeckt und mit einem Deckglas blasenfrei eingedeckt.

2.2.6 Histopathologische Beurteilung histologischer Schnitte

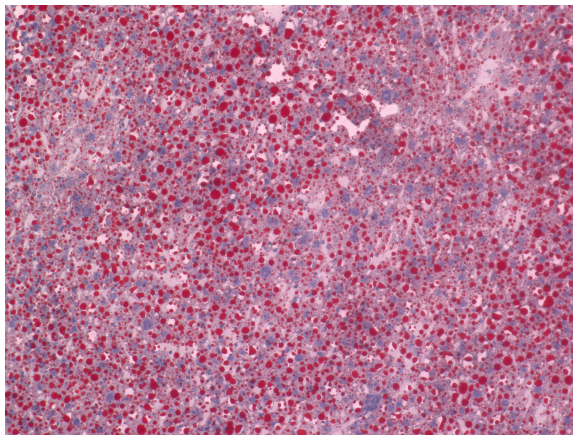
2.2.6.1 Beurteilung HE- und Sirius-Rot-gefärbter Schnitte

Mit HE gefärbte Schnitte wurden mit einem kompakten Fluoreszenzmikroskop lichtmikroskopisch beurteilt. Es wurde insbesondere auf Zeichen der Leberzellverfettung, Fibrosierung und entzündliche Infiltrate geachtet. Es wurde in jedem Präparat verblindet ein repräsentativer Bereich in 4-facher sowie 20-facher Vergrößerung ausgewählt und fotografiert.

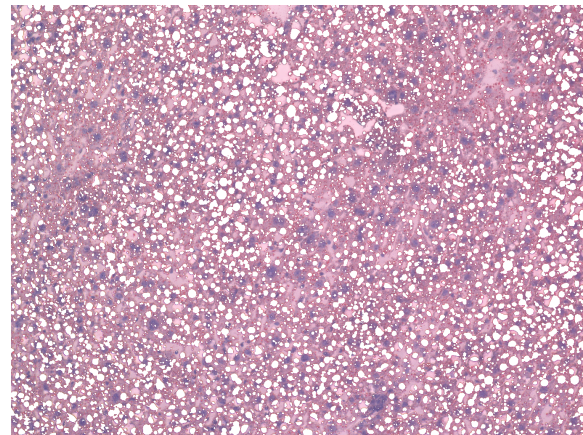
2.2.6.2 Beurteilung Sudan-IV-gefärbter Schnitte

Mit Sudan IV gefärbte Schnitte wurden ebenfalls mit einem kompakten Fluoreszenzmikroskop lichtmikroskopisch beurteilt. Für eine quantitative Analyse der Lipideinlagerung im Lebergewebe wurde die rot gefärbte Fläche in den Schnitten mithilfe der zum Mikroskop gehörenden Bildanalyse-Software bestimmt. Dazu wurde verblindet für jedes Versuchstier ein repräsentativer Bereich in dem mit Sudan IV gefärbten Leberschnitt bei 20-facher Vergrößerung ausgewählt und fotografiert. In dem so erstellten Bild wurde dann die rote Fläche mit Hilfe des Programmes ausgewählt. Dabei wurde die Sensitivität

schrittweise erhöht, bis die vom Programm erkannte Fläche mit der tatsächlich rot gefärbten Fläche des Bildes übereinstimmte. Abbildung 9 zeigt die Auswahl dieser Fläche mithilfe des Programmes anhand eines exemplarischen Präparates. Anhand dieser Auswahl berechnet die genannte Software die Fläche.



Ursprünglicher Bildausschnitt



Nach Subtraktion der rot gefärbten Fläche durch Keyence BZ-II-Bildanalyse-Software

Abbildung 9. Auswertung Sudan-IV-gefärbter Leberschnitte mittels Bildanalyse-Software. Exemplarische Darstellung eines Leberschnittes, der mit Sudan IV gefärbt wurde, in 20-facher Vergrößerung (links). Die Bildanalyse-Software Keyence BZ-II ermöglicht die Berechnung der roten Fläche in einem ausgewählten Bildausschnitt. Rechts ist der gleiche Bildausschnitt nach Subtraktion rot gefärbter Bildbereiche dargestellt, der die Grundlage für die Flächenberechnung bildet.

2.3 Bestimmung von Triglyzeriden und Cholesterin in Lebergewebe

2.3.1 Verwendete Puffer und Lösungen

2:1-Chloroform-Methanol-Gemisch:

Chloroform	40 ml
Methanol	20 ml

Isotonische Kochsalzlösung:

NaCl	9 g
dH ₂ O	1 l

2.3.2 Herstellung von Lipidextrakten

Um den Triglyzerid- beziehungsweise Cholesteringehalt des Lebergewebes der Versuchstiere zu bestimmen, müssen zunächst die Lipide aus dem Lebergewebe extrahiert werden, um sie dann zu quantifizieren. Als Grundlage der Lipidextraktion diente die Methode nach Folch (120), die adaptiert wurde.

Für jedes Versuchstier wurde ein Würfel schockgefrorenen Lebergewebes mithilfe eines Metallmörser auf Trockeneis pulverisiert und in ein vorgekühltes 2 ml-Reaktionsgefäß gefüllt. Das abgefüllte Leber-Pulver wurde mithilfe einer Feinwaage gewogen. Die Werte lagen zwischen 40 mg und 60 mg. Die 2 ml-Reaktionsgefäße mit dem pulverisierten Lebergewebe wurden bis zur Zerkleinerung aller Leberproben bei -20°C zwischengelagert. Anschließend wurde ein 2:1-Chloroform-Methanol-Gemisch bei Raumtemperatur in die 2 ml-Reaktionsgefäße gegeben. Dabei wurden 20 µl pro mg Leber verwendet. Mit dem Rotor-Stator-Homogenisator erfolgte anschließend über 3 Minuten auf Stufe 3-4 eine Homogenisierung. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße für 2 Stunden bei 23°C auf den Heizschüttler gestellt. Dann wurden die Proben mit der Tischzentrifuge bei 1000 g für 10 Minuten zentrifugiert, um die gelösten Stoffe von verbleibenden Feststoffen zu trennen. Der klare Überstand wurde in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und das feste Pellet verworfen. Zu dem Überstand wurden anschließend pro mg Lebergewebe 4 µl isotonische Kochsalzlösung gegeben und kräftig auf dem Reagenzschüttler gemischt, um hydrophile Stoffe darin zu lösen. Durch die anschließende Zentrifugation bei 1000 g für 5 Minuten erfolgte die endgültige Trennung von unterer Lipidphase und oberer wässriger Phase. Für eine Separierung der Phasen wurde eine Pipette unter Überdruck durch die wässrige Phase hindurch in die Lipidphase eingeführt und dann die Lipidphase vorsichtig aspiriert. Dabei wurde die Interphase, die sich zwischen Lipidphase und wässriger Phase befand, bei der wässrigen Phase im Reaktionsgefäß belassen und mit dieser verworfen. Die aspirierte Lipidphase wurde in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Um die aus dem Lebergewebe gelösten Lipide von den flüchtigen Lösungsmitteln zu befreien, wurden die Reaktionsgefäße mit geöffnetem Deckel über Nacht auf dem Heizblock auf 37°C erwärmt. Die zurückbleibenden Lipide wurden in 5 µl pro mg Leber einer 5-prozentigen wässrigen Lösung des Detergens Nonidet P-40 gelöst. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

2.3.3 Messung der Triglyzeride

Die Bestimmung der Triglyzeridkonzentration in den Lipidextrakten der Leber wurde mithilfe eines kolorimetrischen Kits für Serum-Triglyzeride durchgeführt. Die Durchführung wurde gegenüber dem Herstellerprotokoll modifiziert und wird im Folgenden erläutert.

Vor Verwendung der Extrakte wurden diese bei Raumtemperatur aufgetaut und kräftig mit dem Vortexmischer gemischt. In die *Wells* einer 96-*Well*-Mikrotiterplatte wurden zunächst 5 µl der zu untersuchenden Lipidextrakte gegeben. Für jede Probe erfolgte eine Doppelbestimmung. Anschließend wurde mithilfe einer Mehrkanalpipette 150 µl Glycerol-Reagenz dazugegeben. Die Platte wurde für 14 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die erste Absorptionsmessung mit dem Mikroplattenleser bei der Wellenlänge 540 nm vorgenommen. Anschließend wurde in jedes *Well* 50 µl Triglyzerid-Reagenz gegeben, vorsichtig gemischt und nach 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur die

zweite Messung bei 540 nm durchgeführt. Auf der gleichen Mikrotiterplatte wurde stets ein Leerwert sowie ein Standard mit bekannter Triglyzeridkonzentration (2,5 mg/ml) gemessen, von denen je 2,5 µl eingesetzt wurden.

Für die Berechnung der Triglyzeridkonzentration wurden die Werte aus der zweiten Messung für die Probe (E_{Probe}), den Triglyzerid-Standard ($E_{Standard}$) und den Leerwert ($E_{Leerwert}$) sowie die Triglyzeridkonzentration des Standards ($c_{Standard}$) gemäß dem Herstellerprotokoll in die folgende Formel eingesetzt:

$$c_{Probe} = \frac{E_{Probe} - E_{Leerwert}}{E_{Standard} - E_{Leerwert}} \times c_{Standard}$$

(c: Konzentration, E: Absorption)

Da 5 µl jeder Probe eingesetzt wurde und nur 2,5 µl der Standardlösung, wurde die so ermittelte Konzentration am Ende mit dem Faktor 0,5 multipliziert und auf das Lebergewicht bezogen.

2.3.4 Messung des Gesamtcholesterins

Zur Bestimmung des Cholesteringehaltes in den Leber-Lipidextrakten wurde ein kolorimetrisches Kit verwendet. Die Durchführung wurde gegenüber dem Herstellerprotokoll modifiziert und wird im Folgenden erläutert.

Es wurden 3 µl des Lipidextraktes und 350 µl des RA1-Reagenz pro *Well* auf einer 96-*Well*-Mikrotiterplatte vermengt. Für jede Probe wurden Duplikate erstellt, aus deren Messwerten im Rahmen der Auswertung der Mittelwert gebildet wurde. Nach 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Platte in den Mikroplattenleser gestellt und die Absorption bei den Wellenlängen 505 nm und 700 nm gemessen. Ein Leerwert sowie eine Standardreihe mit 6 Lösungen bekannter Cholesterinkonzentrationen zwischen 19,75 mg/ml und 632 mg/ml wurden auf der gleichen Platte gemessen.

Für die Berechnung der Cholesterinkonzentration wurde zunächst eine Standardgerade berechnet. Dazu wurden im Programm Microsoft® Excel® die Mittelwerte aus den Messwerten der Duplikate der Standardlösungen bestimmt und dann die Differenz zwischen den Messwerten bei 505 nm und 700 nm gebildet. Dies trägt der Tatsache Rechnung, dass auch bei 700 nm Absorptionsunterschiede zwischen den Proben auftraten, die nicht auf das aromatische Produkt der Nachweisreaktion von Cholesterin zurückzuführen sein konnten. Wahrscheinlich sind diese Unterschiede auf unspezifische Absorption elektromagnetischer Strahlen durch Trübstoffe in den Proben zurückzuführen. Die so bestimmte Absorptionsdifferenz wurde in Abhängigkeit von der bekannten Cholesterinkonzentration der Standardlösung dargestellt und eine Regressionsgerade bestimmt. In die Formel der Regressionsgeraden wurden dann die gemessenen Absorptionsdifferenzen zwischen 505 nm und 700 nm der Leberlipidextrakt-Proben eingesetzt. Die bestimmten Cholesterinkonzentrationen wurden auf das Lebergewicht bezogen.

2.4 Bestimmung der Serum-Lipide

2.4.1 Bestimmung freier Fettsäuren im Serum

Zur Bestimmung der Konzentration freier Fettsäuren im Serum der Versuchstiere wurde ein enzymatisches Kit verwendet. Die Durchführung wurde gegenüber dem Herstellerprotokoll verändert und wird im Folgenden erläutert.

Es wurde zunächst von jedem Versuchstier ein Serum-Aliquot auf Eis aufgetaut. In die *Wells* einer 96-*Well*-Mikrotiterplatte wurden 5 µl der zu untersuchenden Serumproben gegeben. Für jede Probe wurde zur Vermeidung von Messfehlern Duplikate gemacht, sodass der später zur Berechnung der Fettsäurekonzentration benötigte Absorptionswert als Mittelwert der beiden Messwerte einer Probe berechnet wurde. Nach dem Pipettieren aller Serumproben wurde mithilfe einer Mehrkanalpipette zügig 150 µl RA1-Reagenz in jedes *Well* gegeben. Nach 3 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die erste Absorptionsmessung mit einem Mikroplattenleser bei der Wellenlänge 546 nm. Mithilfe der Multikanalpipette wurden nun 75 µl des RA2-Reagenz in jedes *Well* hinzugegeben, vorsichtig gemischt und nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur die zweite Absorptionsmessung bei 546 nm durchgeführt. Auf der gleichen Mikrotiterplatte wurde stets ein Leerwert mit dem Einsatz von 5 µl Wasser sowie eine Standardreihe aus 7 Standardlösungen mit bekannter Fettsäurekonzentration zwischen 0,0625 mM und 4 mM gemessen.

Beim Pipettiervorgang konnte in wenigen *Wells* eine Blasenbildung nicht vermieden werden, sodass in diesen *Wells* durch Reflexion der elektromagnetischen Strahlen an den Blasen unglaublich hohe Absorptionswerte gemessen wurden. In diesen Fällen wurde statt einem Mittelwert zwischen den beiden Messwerten der gleichen Probe ausschließlich dem Wert aus dem *Well* ohne Blasenbildung vertraut und der andere Wert verworfen.

Die Berechnung der Konzentration freier Fettsäuren in den Serumproben erfolgte analog zur Berechnung der Cholesterinkonzentration in Leberlipidextrakten (siehe Abschnitt 2.3.4 Messung des Gesamtcholesterins). Statt der Differenz zwischen den Messwerten bei verschiedenen Wellenlängen wurde hierbei die Differenz zwischen den Messwerten an den beiden Messzeitpunkten bestimmt und für die Berechnung verwendet.

2.4.2 Bestimmung der Triglyzeride im Serum

Die Bestimmung der Triglyzeridkonzentration im Serum der Versuchstiere wurde mithilfe eines kolorimetrischen Kits durchgeführt. Die Durchführung erfolgte analog zur Messung der Triglyzeridkonzentrationen in Leberlipidextrakten (siehe Abschnitt 2.3.3 Messung der Triglyzeride). Für Proben aus WT- und *Osmr*-KO-Mäusen wurden 5 µl, für Probe aus *Ldlr*-KO- und *Ldlr-Osmr*-KO-Mäusen 2,5 µl Serum eingesetzt, da in LDLR-defizienten Tieren deutlich höhere Triglyzeridkonzentrationen erwartet wurden. Entsprechend wurden die

berechneten Triglyzeridkonzentrationen bei Serumproben aus WT- und *Osmr*-KO-Mäusen am Ende mit dem Faktor 0,5 multipliziert.

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 RNA-Isolierung aus Lebergewebe

Um die Genexpression in den Leberzellen der Versuchstiere zu untersuchen, ist es möglich, die Gesamt-RNA aus dem Gewebe zu isolieren. Die RNA-Isolierung aus murinem Lebergewebe erfolgte mithilfe eines Kits. Bei der RNA-Isolierung werden die Zellen des Gewebes lysiert, RNasen werden inaktiviert und die enthaltene RNA wird an die Siliziumdioxid-Membran des Isolations-Röhrchens gebunden. Kontaminierende DNA wird durch die Zugabe von DNase von der Membran entfernt. Proteine, Salze und andere Verunreinigungen werden anschließend durch Waschschriffe mit drei verschiedenen Puffern entfernt. Am Ende wird die isolierte RNA von der Membran in RNase-freiem Wasser eluiert. Die RNA-Isolation wurde gemäß dem Hersteller-Protokoll mit folgenden Besonderheiten durchgeführt: Es wurden je Versuchstier etwa 50 mg Lebergewebe eingesetzt und mit je 350 µl des im Kit enthaltenen Lysepuffers RA1 sowie 8 µl Tris-(2-Carboxyethyl)-Phosphin (TCEP) vermenget. Nach etwa 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Homogenisierung des Leberlysates mit einem Rotor-Stator-Homogenisator. Zwischen den einzelnen Proben wurde der Werkzeugkopf gereinigt. Alle weiteren Isolations Schritte wurden nach Hersteller-Vorgaben durchgeführt.

2.5.2 RNA-Quantifizierung

Zur Bestimmung des RNA-Gehaltes des Isolates aus Lebergewebe wurde ein Spektrophotometer verwendet. Nach Reinigung der optischen Flächen des Gerätes wurden 1,5 µl RNase-freien Wassers auf die untere optische Oberfläche pipettiert und anschließend der Leerwert bestimmt. Nach erneuter Reinigung mit einem fusselfreien Tuch erfolgte die Messung der Proben. Dazu wurden jeweils 1,5 µl des RNA-Isolats auf die untere optische Oberfläche pipettiert, der Hebelarm geschlossen und die Messung gestartet. Aus den gemessenen Absorptionskurven berechnete das Programm die enthaltene RNA-Konzentration. Zur Vermeidung von Messfehlern wurde jede Probe im Sinne einer Doppelbestimmung 2 mal gemessen und dann die RNA-Konzentration als Mittelwert der beiden gemessenen Konzentrationen berechnet. Zwischen den 2 Messwerten einer Probe wurde eine Differenz bis zu 1% toleriert. Im Falle einer größeren Differenz oder untypischer Absorptionskurven wurde eine dritte Messung durchgeführt.

2.5.3 Reverse Transkription

Bei der zweischrittigen quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (engl. *Real-time quantitative Polymerase Chain Reaction* [qPCR]) werden reverse Transkription und DNA-

Amplifikation nacheinander in unterschiedlichen Reaktionsgefäßen durchgeführt. Für die reverse Transkription werden neben einer definierten RNA-Menge das katalysierende Enzym Reverse Transkriptase, Primer und Desoxyribonukleotide (dNTP) benötigt. Da in dieser Reaktion ein Desoxyribonukleotidstrang komplementär zu der ursprünglich isolierten RNA gebildet wird, nennt man das Produkt *complementary DNA* (cDNA).

Von jeder RNA-Probe aus Lebergewebe oder Kulturzellen wurden 1000 ng RNA in cDNA umgeschrieben. Für jede Probe wurde ein PCR- (Polymerase-Kettenreaktion, engl. *Polymerase Chain Reaction*) Reaktionsgefäß mit dem 1000 ng entsprechenden Volumen der RNA-Probe vorbereitet. Anschließend wurde das Gesamtvolumen mit RNase-freiem Wasser auf 10,5 µl aufgefüllt. Danach wurde die Reverse-Transkriptase-Reaktionslösung aus den Reagenzien des Reverse-Transkriptase-Kits in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß hergestellt. Die verwendeten Volumina zur Herstellung der Reaktionslösung wurden gegenüber dem Herstellerprotokoll leicht modifiziert:

Komponente	Volumen pro Reaktion (µl)
10 x RT Puffer	2
100 mM dNTP Mix	0,8
10 x Random Primer	2
MultiScribe Reverse Transkriptase	0,5
Nuklease-freies Wasser	4,2

In jedes PCR-Reaktionsgefäß wurden 9,5 µl der Reaktionslösung gegeben und anschließend kurz herunterzentrifugiert. Die reverse Transkription erfolgte im PCR-Thermozykler durch folgendes Programm:

Programm	Temperatur	Zeit
Primer-Annealing	25°C	10 min
Reverse Transkription	37°C	120 min
Beendigung der Reaktion	85°C	5 min
Aufbewahrung	4°C	∞

Nach Ablauf des Programms wurden die cDNA-Proben im Verhältnis 1:3 mit RNase-freiem Wasser verdünnt und in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.5.4 Quantitative Echtzeit-PCR

2.5.4.1 Prinzip der qPCR

In der qPCR können durch das Prinzip einer herkömmlichen PCR Nukleinsäuren quantifiziert werden. Die PCR erfordert neben der cDNA-Probe das katalysierende Enzym DNA-Polymerase, spezifische Primer für das zu untersuchende Zielgen sowie Desoxyribonukleotide. Die Quantifizierung erfolgt durch Zugabe des Cyanin-Farbstoffs SYBR Green, der an der kleinen Furche doppelsträngiger DNA bindet und als DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplex grünes Licht der Wellenlänge λ_{\max} 521 nm emittiert. Durch Fluoreszenz-Messung in Echtzeit kann so auf die Menge des Matrizenstranges, also der untersuchten cDNA, in der Probe geschlossen werden.

2.5.4.2 Durchführung der qPCR

Für die Genexpressionsanalyse wurde ein qPCR-Thermozykler mit 384-Well-Mikrotiterplatten verwendet. Für jede Probe wurden technische Replikate im Sinne einer Doppelbestimmung gemacht, bei der Differenzen von bis zu 0,5 Ct- (engl. *Cycle threshold*) Punkten toleriert wurden.

Zunächst wurden die zu untersuchenden cDNA-Proben sowie die spezifischen Primer für das zu untersuchende Gen auf Eis aufgetaut. Inzwischen wurde die Reaktionslösung aus dem gebrauchsfertigen SYBR Select Master Mix und spezifischen Primern in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß hergestellt:

Komponente	Volumen pro Reaktion (μ l)
SYBR Select Master Mix	5
Primer vorwärts	0,5
Primer rückwärts	0,5
Nuklease-freies Wasser	3

Der SYBR Select Master Mix enthält DNA-Polymerase, Desoxyribonukleotide, den Cyanin-Farbstoff SYBR-Green und Puffer. Primer wurden im Verhältnis 1:10 oder 1:20 mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt eingesetzt.

In jedes *Well* wurden zunächst 9 μ l der Reaktionslösung und dann 1 μ l der cDNA-Probe pipettiert. Die Mikrotiterplatte wurde anschließend mit einer adhäsiven Folie beklebt und 1 Minute lang bei 900 g zentrifugiert. Die Platte wurde in das qPCR-Gerät eingelegt und das folgende Programm gestartet:

Programm	Anzahl der Zyklen	Temperatur	Zeit/Geschwindigkeit
Prä-Inkubation	1	Aufheizen auf 50°C	1,6°C/s

Programm	Anzahl der Zyklen	Temperatur	Zeit/Geschwindigkeit
		50°C	2 min
		Aufheizen auf 95°C	1,6°C/s
		95°C	2 min
Amplifikation	40	95°C	15 s
		Abkühlen auf 56°C	1,6°C/s
		56°C	15 s
		Aufheizen auf 72°C	1,6°C/s
		72°C	1 min
Schmelzkurve	1	Aufheizen auf 95°C	1,6°C/s
		95°C	15 s
		Abkühlen auf 60°C	1,6°C/s
		60°C	1 min
		Aufheizen auf 95°C	0,05°C/s
		95°C	15 s

2.5.4.3 Auswertung der qPCR

Die Quantifizierung des Matrizenstranges in der Probe erfolgte relativ, also als Mengen-Vergleich zu den stabil exprimierten Referenz-Genen *Rplp0* für murine Proben und *HPRT* für humane Proben als endogene Kontrolle.

Man unterscheidet bei der PCR drei Phasen der Amplifikation: In der ersten Phase liegen nur geringe Mengen des Matrizenstranges vor, sodass die Wahrscheinlichkeit für ein Zusammentreffen von Matrize, Primer, Polymerase und Desoxyribonukleotiden gering ist. In der dritten Phase hingegen kommt es durch die Akkumulation von Reaktionsprodukten und den zunehmenden Substratverbrauch zu einer verminderten Aktivität der Polymerase. Der quantifizierbare Anstieg der Amplikon-Menge findet daher in der zweiten Phase statt. Hier kommt es zu einem exponentiellen Anstieg, dessen Beginn abhängig von der Konzentration der untersuchten cDNA in der Probe ist.

Als Maß für die Menge des Matrizenstranges wird deshalb derjenige Zyklus bestimmt, in dem die Fluoreszenz in einem *Well* erstmals signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Dieser Zyklus wird als Ct-Wert bezeichnet und ist umso niedriger, je höher die cDNA-Konzentration in der Probe ist. Er wurde von der Software des qPCR-Thermostyplers automatisch anhand des Kurvenverlaufes ermittelt. Die Berechnung der relativen Genexpression aus den gemessenen Ct-Werten erfolgte durch Anwendung der Delta-Delta-Ct-Methode (121) gemäß folgender Formel:

$$R = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

(R: Relative Genexpression, Ct: engl. *Cycle threshold*, ΔCt : Ct-Differenz zwischen Ziel- und Referenzgen, $\Delta\Delta Ct$: ΔCt -Differenz zwischen Probe und Kontrollgruppe)

Als Hinweis für die Spezifität der PCR-Reaktion für ein Produkt zeigte sich stets nur ein Scheitelwert der Schmelzkurve bei Betrachtung eines Zielgens, der bei allen Proben bei der gleichen Temperatur lag (siehe Abbildung 10). Vor der ersten Verwendung der Primer wurde deren Funktion stets mit einer cDNA-Verdünnungsreihe getestet. Es wurden ausschließlich Primerpaare verwendet, bei denen die Messwerte der Standardreihe zuverlässig auf einer Standardgeraden lagen.

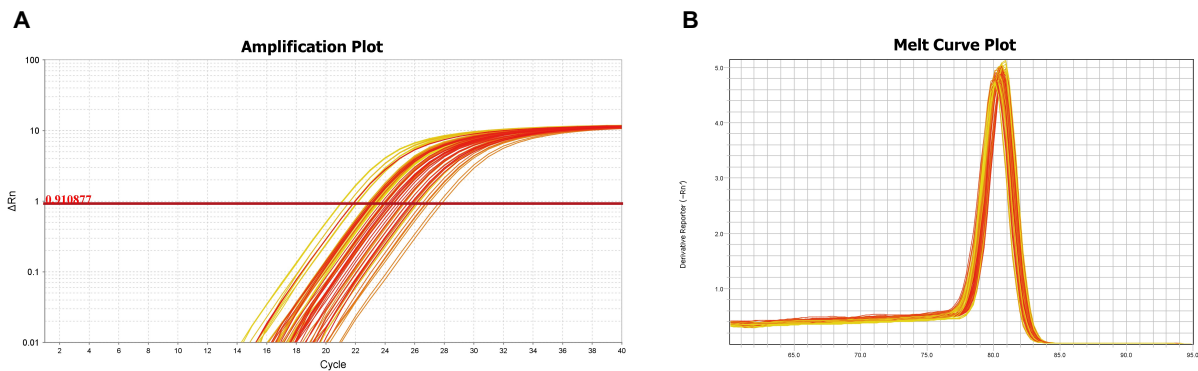


Abbildung 10. Ct-Wert und Schmelzkurve der qPCR. Exemplarische Darstellung einer Amplifikationskurve (A) und einer Schmelzkurve (B) für *Cyp7a1*. (A) In der Amplifikationskurve ist die gemessene Absorption bei 521nm gegen den PCR-Zyklus aufgetragen. Die rote Linie markiert den Punkt des stärksten Kurvenanstiegs, der von der ViiA Software automatisch bestimmt wird. In welchem Amplifikationszyklus dieser stärkste Anstieg stattfindet ist abhängig vom Gehalt der *Cyp7a1*-cDNA in der jeweiligen Probe. (B) Beim Aufzeichnen der Schmelzkurve wird die Absorption unter kontinuierlicher langsamer Temperaturerhöhung gemessen. Bei einer für das Amplifikat spezifischen Schmelztemperatur kommt es zur Trennung des DNA-Doppelstrangs in Einzelstränge mit Freiwerden des interkalierenden Farbstoffes SYBR Green. Durch das Freiwerden des Farbstoffes kommt es zu einer plötzlichen Abnahme der Absorption nach Erreichen des Schmelzpunktes. Die abgebildete Schmelzkurve hat nur einen Peak, dies schließt Nebenprodukte, die den Farbstoff ebenfalls einlagern und so zu einer Verfälschung der qPCR-Ergebnisse führen, aus.

2.6 Zellkultur

2.6.1 Verwendete Puffer und Lösungen

HepG2-Kulturmedium:

DMEM High Glucose	87%	435 ml
FBS	10%	50 ml
L-Glutamin	1%	5 ml
NEAA	1%	5 ml
Penicillin-Streptomycin	1%	5 ml

HepG2-Hungermedium:

DMEM High Glucose	97%	485 ml
-------------------	-----	--------

L-Glutamin	1%	5 ml
NEAA	1%	5 ml
Penicillin-Streptomycin	1%	5 ml

2.6.2 Kultur und Passage von HepG2-Zellen

2.6.2.1 Kulturbedingungen

Es wurden Zellen der humanen Hepatom-Zelllinie HepG2 verwendet. Sie wurden in 75 cm²-Zellkulturflaschen mit 20 ml HepG2-Kulturmedium bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert. Das sterile Arbeiten erfolgte unter einer Sterilwerkbank mit vertikalem Luftstrom. Das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt. Alle Kulturmedien wurden bei 4°C gelagert und nur zur Anwendung im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

2.6.2.2 Passagieren von Zellen

Bei Erreichen einer 80-prozentigen Konfluenz wurden die Zellen im Verhältnis 1:2 bis 1:4 gesplittet. Für das Splitten wurde das Medium abgesaugt, zunächst mit 4 ml PBS und dann mit 3 ml Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure (-EDTA) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 7 Minuten mit 2 ml Trypsin-EDTA im Brutschrank inkubiert, um die Zellen zu lösen. Die gelösten Zellen wurden anschließend in 18 ml Medium aufgenommen und in einem 50 ml-Zentrifugenröhrchen bei 130 g für 10 Minuten pelletiert. Dann wurden die Zellen in der benötigten Menge Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde dann zur besseren Trennung der einzelnen Zellen in eine kanülierte 20 ml-Einmalspritze aufgenommen und kräftig in ein neues Zentrifugenröhrchen gespritzt. Die Zellen wurden dann in neue Zellkulturflaschen oder nach Zellzählung für die Versuche auf 24-Well-Platten ausgesät.

2.6.3 Versuche

2.6.3.1 Aussäen der Zellen für den Versuch

Um standardisierte Bedingungen für die Versuche herzustellen, ist es essenziell, immer die gleiche Zellzahl pro Well auszusäen. Zur Zählung der Zellen wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Für die Bestimmung der Zellzahl einer Suspension vor dem Aussäen für einen Versuch wurden 100 µl der Zellsuspension entnommen und mit 100 µl Trypanblau gemischt. 10 µl der gefärbten Zellsuspension wurden dann in die Zählkammer pipettiert und die Zellen in 4 Quadraten gezählt. Anschließend wurde der Mittelwert aus den 4 Werten gebildet und die Gesamtzellzahl unter Berücksichtigung der Verdünnung durch Trypanblau (Faktor 2) und der Verteilung von 0,1 µl in einem Quadrat der Zählkammer (Faktor 10⁴) nach folgender Formel berechnet:

$$Z = n \times 10^4 \times 2 \times V$$

(Z: Gesamtzellzahl, n: Zellen pro Quadrat, V: Gesamtvolumen der Suspension)

Für die im Folgenden beschriebenen Versuche wurden 200 000 Zellen pro *Well* auf einer 24-*Well*-Zellkulturplatte ausgesät und anschließend 2-3 Tage in 1 ml Kulturmedium inkubiert.

2.6.3.2 Behandlung mit OSM, IL-6 und LIF

Um der Frage nachzugehen, ob OSM und andere IL-6-Typ-Zytokine die Genexpression von *Cyp7a1* in Hepatozyten beeinflussen können, wurden HepG2-Zellen mit den Zytokinen OSM, IL-6 oder LIF behandelt und anschließend die Genexpression mittels qPCR analysiert.

Nach Erreichen einer Konfluenz von 80% wurden die Zellen für 24-44 Stunden in Hungermedium inkubiert. Anschließend wurden sie mit den mit Hungermedium verdünnten Zytokinen OSM oder LIF in den Konzentrationen 10 ng/μl und 100 ng/μl beziehungsweise mit IL-6 in den Konzentrationen 20 ng/μl und 100 ng/μl behandelt. Bei der Behandlung mit OSM wurden 2 Zeitpunkte für das Versuchsende gewählt: 4 Stunden und 24 Stunden. Bei der Stimulation mit LIF und IL-6 wurde der Versuch nach 24 Stunden für die RNA-Isolation gestoppt.

Für jede Variante wurden Duplikate gemacht und insgesamt wurde jeder Versuch 3 mal durchgeführt. Als Kontrollen dienten Zellen, die für die gleiche Zeit normalem Hungermedium beziehungsweise Hungermedium mit Zusatz von Essigsäure in 1:1000-Verdünnung ausgesetzt waren. Das Hungermedium mit Essigsäure-Zusatz diente als Kontrollmedium für mit IL-6 behandelte Zellen, da die verwendete IL-6-Vorratslösung in Essigsäure gelöst vorlag.

2.6.3.3 OSM-Stimulation mit Zugabe von Signalweg-Inhibitoren

Um der Frage nachzugehen, über welche Signalwege die Regulation der *Cyp7a1*-Expression durch OSM vermittelt wird, wurde die OSM-Behandlung der HepG2-Zellen in diesem Versuch mit der Zugabe von bestimmten Signalweg-Inhibitoren kombiniert.

Nach Erreichen einer Konfluenz von 80% wurden die Zellen für 24 Stunden mit Hungermedium inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von OSM in einer Konzentration von 10 ng/μl über 16 Stunden mit und ohne die gleichzeitige Zugabe eines der folgenden Signalweg-Inhibitoren: MAPK-Inhibitor, MAPK/ERK-Kinase- (MEK-) Inhibitor, p38-Inhibitor, JAK-Inhibitor und JNK-Inhibitor. Die Inhibitoren wurden in einer Verdünnung von 1:2000 eingesetzt.

Als Kontrollmedium wurden zum Einen Hungermedium und zum Anderen Hungermedium mit Zusatz geringer Mengen Dimethylsulfoxid (DMSO) in einer Verdünnung von 1:2000 eingesetzt, da die verwendete Vorratslösung der Inhibitoren DMSO enthielt. Ebenso wurde zum Ausschluss einer Beeinflussung der OSM-Wirkung durch DMSO eine weitere Kontrolle mit OSM-Behandlung und gleichzeitiger Zugabe von DMSO in einer 1:2000-Verdünnung

durchgeführt. Für jeden Ansatz wurden Duplikate auf der gleichen Zellkulturplatte angefertigt und der Versuch insgesamt 3 mal durchgeführt.

2.6.3.4 Vorbereitung der Zellkulturproben für qPCR-Analysen

Nach Ende der Versuchszeit wurde das Versuchsmedium abgesaugt, jedes *Well* einmal mit PBS gewaschen und erneut gründlich abgesaugt. Die Zellkulturplatten wurden dann mit Verschlussfolie umwickelt und sofort bei -80°C eingefroren. Für die RNA-Isolation mithilfe eines kommerziellen Kits wurden $8\ \mu\text{l}$ TCEP und $350\ \mu\text{l}$ des im RNA-Isolations-Kit enthaltenen RA1-Puffers direkt in die *Wells* der Zellkulturplatte gegeben und bei Raumtemperatur für 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Zell-Lysate auf den NucleoSpin-Filter in einem 2 ml-Auffangröhrchen gegeben und die RNA-Isolation nach dem Hersteller-Protokoll fortgesetzt. Im letzten Schritt wurde die RNA in $30\ \mu\text{l}$ RNase-freiem Wasser eluiert. Die reverse Transkription mit anschließender qPCR erfolgte dann wie in den Abschnitten 2.5.3 und 2.5.4 beschrieben.

2.7 Statistische Methoden

Die Daten wurden mithilfe des Statistik-Programmes GraphPad Prism 7 ausgewertet und visualisiert. Bei den tierexperimentellen Daten war eine sinnvolle Testung auf Normalverteilung aufgrund der kleinen Gruppengrößen nicht möglich, es wurde deshalb von nicht-normalverteilten Daten ausgegangen. Die statistische Signifikanzprüfung zwischen den Gruppen unterschiedlicher Genotypen erfolgte mithilfe des Mann-Whitney U-Tests. Folgende Gruppen wurden dabei jeweils verglichen: WT gegenüber *Osmr*-KO, WT gegenüber *Ldlr*-KO sowie *Ldlr*-KO gegenüber *Ldlr*-*Osmr*-KO. Bei dem durchgeführten Tierversuch handelt es sich um eine explorative Studie, es wurde deshalb $p < 0,05$ als Signifikanzniveau für die einzelnen Vergleiche angenommen. Für die Berechnung einer Korrelation wurde die Rangkorrelation nach Spearman verwendet, hierbei wurde $p < 0,05$ als Signifikanzniveau angenommen. Aufgrund von logischen Überlegungen wurde für die Daten aus den zellkulturellen Experimenten eine Normalverteilung angenommen. Zur Überprüfung der statistischen Signifikanz wurde beim Vergleich zweier Gruppen ein t-Test durchgeführt. Wurden mehr als zwei Gruppen verglichen, erfolgte eine Einweg-Varianzanalyse (engl. *Analysis of variance*, kurz ANOVA) mit Holm-Šidák-Korrekturtest. Als Signifikanzniveau wurde auch hier stets $p < 0,05$ angenommen.

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Daten als Box-Plot visualisiert. Die Box wird dabei durch das obere und untere Quartil begrenzt. Der Median ist als durchgezogene Linie in der Box dargestellt.

3. MATERIAL

3.1 Geräte

Gerät	Produktname	Hersteller
Allgemein		
Vortexmischer	D-6012	neoLab
Analysenwaage	ABT 120-5DNM	KERN
Rotor-Stator-Homogenisator	VDI12	VWR
Dispergierwerkzeug für Rotor-Stator-Homogenisator	S12N-5S6/3,5mm	VWR
Pipetten	Research Plus	Eppendorf
Wippschüttler	ST 5	CAT M. Zipperer
Tischzentrifuge	Mikro200	Hettich Zentrifugen
Molekularbiologie		
qPCR-Thermozykler	ViiA 7	Applied Biosystems
RT-PCR-Thermozykler	peqSTAR	Peqlab, Thermo Scientific
Spektrophotometer	Nanodrop 2000	Peqlab, Thermo Scientific
Histologie		
Einbettstation	Tissue Block System TBS 88	Medite
Schlittenmikrotom	Jung SM 2000 R	Leica
Wärmeschrank	Isotherm	ESCO
Wärmeschrank	TK L 4061	EHRET Labor- und Pharmatechnik
Wärmeplatte	OTS 40	Medite
Kryostat-Rotationsmikrotom	Jung CM 3000	Leica
Fluoreszenzmikroskop	BZ-9000	Keyence
Lipidbestimmungen		
Mikroplattenleser	Synergy HT	BioTek
Heizschüttler	Eppendorf Thermomixer Compact	Sigma-Aldrich
Zellkultur		
Brutschrank	ICO	Memmert
Wasserbad	WTB	Memmert
Mikroskop	AE2000	Motic
Sterilwerkbank	Class II BSC	ESCO
Absaugsystem	Vacunsafe	Integra

Gerät	Produktname	Hersteller
Zentrifuge	Centrifuge 5810 R	Eppendorf

3.2 Kits

Kit	Produktname	Hersteller
qPCR-Mastermix	SYBR Select Master Mix	Applied Biosystems
RNA-Isolations-Kit	NucleoSpin RNA	Macherey-Nagel
Reverse-Transkriptase-Kit	High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems
Fettsäure-Kit	Wako HR series NEFA-HR(2)	Wako Diagnostics
Triglyzerid-Kit	Serum Triglyceride Determination Kit	Sigma-Aldrich
Cholesterin-Kit	Cobas Cholesterol CHOD-PAP	Roche Diagnostics

3.3 Primer

3.3.1 Murine Primer

Gen	Vorwärts-Primer	Rückwärts-Primer
<i>Abcg5</i>	CTGCTGAGGCGAGTAACAAGAA	GACGCATAATCACTGCCTGCT
<i>Abcg8</i>	ACTTCAGGATGCTTCGCAGG	TGCTCAAACCAAGGCACCTG
<i>Acc</i>	GCCATTGGTATTGGGGCTTAC	CCCGACCAAGGACTTTGTTG
<i>Ccl2</i>	CATCCACGTGTTGGCTCA	GATCATCTTGCTGGTGAATGAGT
<i>Col1a1</i>	CCTGGCCTTGGAGGAACTT	GAGACCACGAGGACCAGAAGG
<i>Col3a1</i>	GCAATGATGGTGTCTCGGG	AGCCATTTGAGCCAGGGG
<i>Col4a1</i>	TGGCAGGCATTTACACCT	TAGTGGTCCGAGTCTGCCCT
<i>Crp</i>	GGAGTCTGCTACGGGGATTG	CCTTGTGCAGACTTTTCCGC
<i>Cyp27a1</i>	TTTTGGCTGGGGTGGACA	GGGCACCACACCAGTCACTT
<i>Cyp7a1</i>	AACGGGTTGATTCCATACCTGG	GTGGACATATTTCCCATCAGTT
<i>Cyp7b1</i>	CAGCTTGGTCTGCCTGGAAA	CACTTCTCGGATGATGCTGGA
<i>Cyp8b1</i>	ACCAGGCCATGCTGGACA	CCCAGACTCGAACCTTTAGGC
<i>Elovl6</i>	CCTTGTGCTCTTCTGCCATT	TACTCAGCCTTCGTGGCTTT
<i>Fasn</i>	TTCGGCTGCTGTTGGAAGTC	CACCCAGACGCCAGTGTTTC
<i>Hmgcr</i>	CTTGTGGAATGCCTTGTGATTG	AGCCGAAGCAGCACATGAT
<i>Hnf4a</i>	GGATATGGCCGACTACAGCG	AGATGGGGACGTGTCATTGC
<i>Hp</i>	GCTGTGCTGAGTATGGTGTG	TGTGCAGCCTTCTAGTGAGCC
<i>Hsd3b7</i>	GCGCTTTGGAGGTCGTCTATT	CCAGTATGTGCATCCAAGCAA

<i>Il1a</i>	TTGGTTAAATGACCTGCAACA	GAGCGCTCACGAACAGTTG
<i>Il1b</i>	TTGACGGACCCCAAAAGAT	GATGTGCTGCTGCGAGATT
<i>Il6st</i>	CATTTGTGTGCTGAAGGAGGC	AAAGGACAGGATGTTGCAGGTG
<i>Ldlr</i>	GCCGACCTGATGAATTCCA	GCAGTCATGTTACGGTCACA
<i>Lifr</i>	AAAGCTAATTCCAAGAAAGAAGTGAGG	CAGCAACATGGTAAGTTGAATCCTC
<i>Osm</i>	TGCTCCAACCTCTTCTCTCAG	CAGGTTTTGGAGGCGGATA
<i>Osmr</i>	CCAAAAAGAGTTCAGCACACCC	CCGACCACACTTGTCTCCATAC
<i>Rplp0</i>	GAAACTGCTGCCTCACATCCG	CTGGCACAGTGACCTCACACG
<i>Saa2</i>	ACTTCCATGCTCGGGGGA	ACTGCGATGTCTGTTG
<i>Scarb1</i>	CTGGGGCTGCTGTTTGCT	GCGGACATTCTTGAGCACCT
<i>Shp</i>	CGATCCTCTTCAACCCAGATG	AGGGCTCCAAGACTTCACACA
<i>Srebp1c</i>	ACTTTTCCTTAACGTGGGCCTAG	AGCTGGAGCATGTCTTCGATG
<i>Tgfb</i>	GCTGAACCAAGGAGACGGAAT	GCTGATCCCGTTGATTCCA
<i>Timp1</i>	CAGCAAAGAGCTTTCTCAAAGACC	GATAAACAGGGAAACACTGTGCAC
<i>Tnfa</i>	CTACTCCCA GGTCTCTTCAA	GCAGAGAGGAGGTTGACTTTC

3.3.2 Humane Primer

Gen	Vorwärts-Primer	Rückwärts-Primer
<i>CYP7A1</i>	GCTTATTCTTGGAAATTAGGAGAAGG	TTGGCACCAAATTGCAGAG
<i>HNF4A</i>	GTGGACAAAGACAAGAGGAACCAG	CTGTCCTCATAGCTTGACCTTCG
<i>HPRT</i>	TGGGAGGCCATCACATTGTA	AGCAGGTCAGCAAAGAATTTATAG
<i>IL6ST</i>	TAGGACCAAAGATGCCTCAACTT	GAATGAAGATCGGGTGGATG
<i>LIFR</i>	AAGAGTATGTATGTGGTGACAAAGGAA	TCACCACTCCAACAATGACAGC
<i>OSMR</i>	AGTTCCTGAGCCAAATTTCTG	CGAACAATATATCCTGTCCAGTAGAATC
<i>SHP</i>	GTCCAGCTATGTGCACCTCATC	TTCCTGAGGAAGGCCACTGT

3.4 Zellkulturmedien und -zusätze

Substanz	Hersteller
Trypanblau	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
DMEM High Glucose	Sigma-Aldrich
Fetales Bovines Serum (FBS)	Sigma-Aldrich
Penicillin-Streptomycin	Sigma-Aldrich
L-Glutamin	GE Healthcare
Trypsin-EDTA	Sigma-Aldrich
Dulbecco's PBS	Sigma-Aldrich

Oncostatin M (OSM), human 40ecombinant (227 a.a.)	PeptoTech
Interleukin-6 (IL-6)	PeptoTech
<i>Leukemia Inhibitory Factor</i> (LIF)	Sigma-Aldrich
MAPK-Inhibitor (U0126)	SelleckChem
MEK-Inhibitor (MEK-Inhibitor 1)	SelleckChem
p38-Inhibitor (SB202190)	SelleckChem
JAK-Inhibitor (JAK-Inhibitor 1)	Merck Millipore
JNK-Inhibitor (SP600125)	SelleckChem

3.5 Ver- und Gebrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Allgemein	
Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf
Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner bio-one
Kryoröhrchen	Simport
Bechergläser	Roth
Wägeschalen	Hartenstein
Pipettenspitzen	Sarstedt
Fusselfreie Tücher	Kimtech
Tierversuch	
Maus-Standardfutter (STD)	Ssniff Spezialdiäten
<i>Western Diet</i> (WD)	Altromin Spezialfutter
1 ml-Spritzen	Braun
Serumröhrchen (Microtainer SST Tubes)	BD
Einmalskalpelle	Braun
Rasierklingen	Hartenstein
Molekularbiologie	
PCR-Reaktionsgefäße	Sarstedt
384-Well-Mikrotiterplatten	Sarstedt
Adhäsive PCR-Folie	Sarstedt
Histologie	
Kunststoff-Einbettschälchen (Tissue-Tek Cryomold)	Sakura

Material	Hersteller
Einbettkassetten	R. Langenbrinck
Filterpapier	Hartenstein
Edelstahl-Einbettschälchen	R. Langenbrinck
Pinsel	R. Langenbrinck
Objekträger (SuperFrost Plus)	R. Langenbrinck
Objekträgerständer	Hartenstein
Deckgläser (Menzel-Gläser)	Thermo Scientific
Glasküvetten	Hartenstein
Faltenfilter	Hartenstein
Lipidbestimmungen	
96-Well-Mikrotiterplatten	Fisher Scientific
Zellkultur	
Zellkulturplatten 6-Well, 24-Well	Falcon
Zellkulturflaschen 25 cm ² , 75 cm ²	Greiner bio-one
Serologische Einmalpipetten	Sarstedt
1 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	
Einmalkanülen 20 G (Microlance 3)	BD
Einmalspritzen mit Luer-Lock-Ansatz 20 ml (Plastipak)	BD
Spritzenvorsatzfilter	Fisher Scientific
Neubauer-Zählkammer	Blaubrand
Verschlussfolie (Parafilm M)	Sigma-Aldrich

3.6 Chemikalien und Substanzen

Substanz	Hersteller
Tertiäres Butanol (2-Methyl-2-Butanol)	AppliChem
Aceton	Sigma-Aldrich
Chloroform	Roth
Destilliertes Wasser (dH ₂ O, Ampuwa)	Fresenius Kabi
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Roth
Einbettmedium für Kryostatschnitte (Tissue-Tek O.C.T. Compound)	Sakura
Eindeckmedium für Kryostatschnitte (Aquatex)	Merck

Substanz	Hersteller
Eindeckmedium für Paraffinschnitte (Roti®-Histokitt)	Roth
Eiweiß-Glycerin	Roth
Eosin G 0,5% wässrig	Roth
Essigsäure	Roth
Ethanol	Roth
Hämalaun sauer nach Mayer	Roth
Intermedium (Roti®-Histol)	Roth
Kaliumchlorid (KCl)	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Roth
Magnesiumsulfat-Heptahydrat (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	Roth
Methanol	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	AppliChem
Nonidet P-40	Roth
Paraffin	Merck
Pikrinsäure 1,3% in Wasser	Sigma-Aldrich
RNase-freies Wasser	Roth
Säurefreie phosphatgepufferte Formaldehydlösung 4% (Roti®-Histofix)	Roth
Scharlachrot (Scharlach R)	Roth
Siriusrot	Sigma-Aldrich
Tris-(2-Carboxyethyl)-Phosphin (TCEP)	Thermo Scientific

3.7 Programme

Name	Version
Microsoft® Word für Mac	16.49
Microsoft® Excel® für Mac	16.49
EndNote 20	20.0.1
Prism 9 for macOS	9.1.2
ViiA™ 7 Software	1.2.1
NanoDrop 2000	1.4.2
Keyence BZ-II Analyzer	-

4. ERGEBNISSE

4.1 Histopathologische Untersuchung des Lebergewebes

Die bereits im Vorfeld von der Arbeitsgruppe erhobenen Ergebnisse zeigten ein höheres Körpergewicht mit stärkerer Gewichtszunahme während der Fütterung der WD sowie ein höheres Lebergewicht bei *Osmr*-KO-Mäusen gegenüber WT-Mäusen. *Ldlr*-*Osmr*-KO-Mäuse zeigten hingegen ein geringeres Körpergewicht, eine geringere Gewichtszunahme während der Fütterung der WD sowie ein geringeres Lebergewicht im Vergleich zu *Ldlr*-KO-Mäusen. In Anbetracht dessen stellte sich zunächst die Frage nach der Auswirkung des Genotyps auf die Morphologie des Lebergewebes. Um einen Überblick über mögliche histologische Veränderungen zu erhalten, wurden zunächst die mit HE gefärbten Gewebeschnitte beurteilt. Dabei wurde insbesondere auf das Vorhandensein einer Leberverfettung, entzündlicher Infiltrate sowie Fibrosierung des Gewebes geachtet.

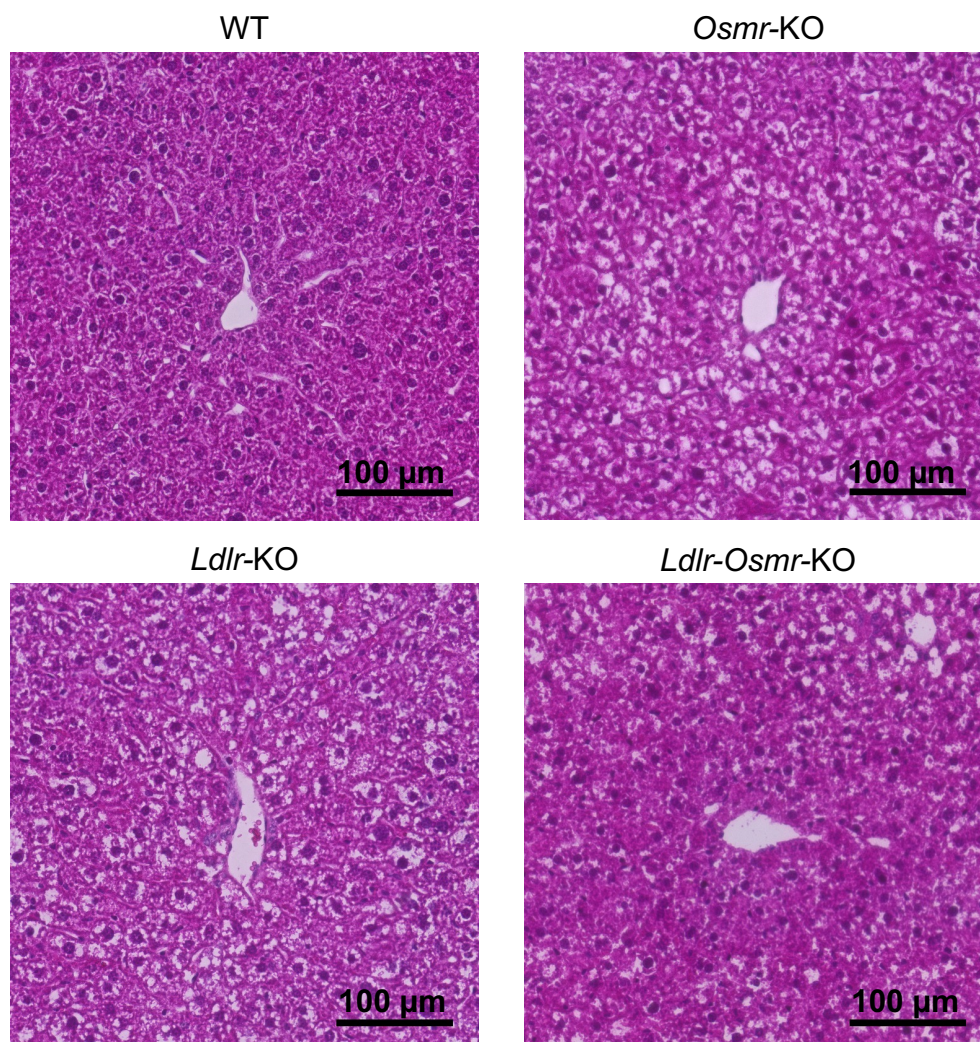


Abbildung 11. Einfluss des *Osmr*-Knockouts auf die Leberhistologie in WT- und *Ldlr*-KO-Mäusen. Repräsentative histologische Erscheinung mit Hämatoxylin-Eosin gefärbter Leberschnitte in 20-facher Vergrößerung von WT-, *Osmr*-KO-, *Ldlr*-KO- und *Ldlr*-*Osmr*-KO-Mäusen.

In Abbildung 11 ist für jede der betrachteten Gruppen ein Bildausschnitt eines repräsentativen Präparats in 20-facher Vergrößerung dargestellt. Bei *Osmr*-KO-Mäusen zeigten sich gegenüber WT-Mäusen deutliche intrazelluläre Aufhellungen, die am ehesten durch intrazelluläre Lipideinlagerung erklärt werden können. Leberzellzerstörung mit Ausbildung eines Leberzell-*Ballooning* konnte weder in WT- noch in *Osmr*-KO-Mäusen sicher ausgemacht werden. Das histologische Bild bei *Ldlr*-KO-Tieren zeigte sich ähnlich wie bei *Osmr*-KO-Tieren: Lipideinlagerungen ohne deutliche Entzündung oder Fibrose. Interessanterweise zeigte sich bei *Ldlr*-*Osmr*-KO-Mäusen zwar ebenfalls eine Steatose der Hepatozyten, allerdings in augenscheinlich geringerem Ausmaß als bei *Ldlr*-KO-Mäusen.

Zur Qualifizierung der in der HE-Färbung hellen Bereiche wurden Lipide mittels einer Sudan IV-Färbung selektiv rot gefärbt. Für jede Gruppe ist ein repräsentatives Präparat in Abbildung 12A dargestellt. Bei WT-Mäusen zeigten sich kleine multiple diffus verteilte Lipidtröpfchen. Bei *Osmr*-KO-Mäusen waren die Lipidtröpfchen im Vergleich zu WT-Mäusen deutlich voluminöser. Während in der HE-Färbung der Grad der Verfettung bei *Osmr*-KO- und *Ldlr*-KO-Mäusen vergleichbar eingeschätzt wurde, zeigten sich in der Sudan IV-Färbung bei *Ldlr*-KO-Mäusen im Vergleich noch mehr und größere Lipidtropfen. Weiterhin fiel auf, dass die Lipideinlagerungen in Lebern von *Ldlr*-*Osmr*-KO-Mäusen geringer ausgeprägt waren als bei *Ldlr*-KO-Mäusen.

Um eine Objektivierung der unterschiedlichen Lipideinlagerung zwischen den Gruppen zu erreichen, wurde eine Quantifizierung der rot gefärbten Gesamtfläche sowie der größten zusammenhängenden Fläche auf einem Bildausschnitt vorgenommen. Die rote Gesamtfläche auf den gleich großen repräsentativen Bildausschnitten fungierte als objektives Maß für den Grad der Leberverfettung, wohingegen die größte zusammenhängende rote Fläche in einem Bildausschnitt als Maß für die Größe der Lipidtropfen diente. Die Auswertung ist in Abbildung 12B dargestellt. Dabei konnten die bereits augenscheinlich festgestellten Unterschiede zwischen den Gruppen objektiviert werden: Es zeigte sich bei *Osmr*-KO-Mäusen eine insgesamt größere rot gefärbte Fläche im Vergleich zu WT-Mäusen, dieser Effekt erreichte jedoch keine statistische Signifikanz ($p=0,1726$). *Ldlr*-KO-Mäuse hatten im Vergleich zu WT-Mäusen eine größere Lipidfläche ($p=0,0031$). Bei Mäusen mit LDLR-Defizienz zeigte sich eine Abnahme der rot gefärbten Fläche durch das zusätzliche Fehlen des OSMR β ($p=0,0172$). Bei Betrachtung der Größe des größten Lipidtropfens in einem Präparatausschnitt zeigte sich, dass die Tropfen in *Osmr*-KO-Mäusen ($p=0,1282$) und in noch größerem Maße in *Ldlr*-KO-Mäusen ($p=0,0001$) größer waren als in WT-Mäusen. Bei *Ldlr*-*Osmr*-KO-Mäusen war der größte Tropfen signifikant kleiner als bei *Ldlr*-KO-Mäusen ($p=0,0133$).

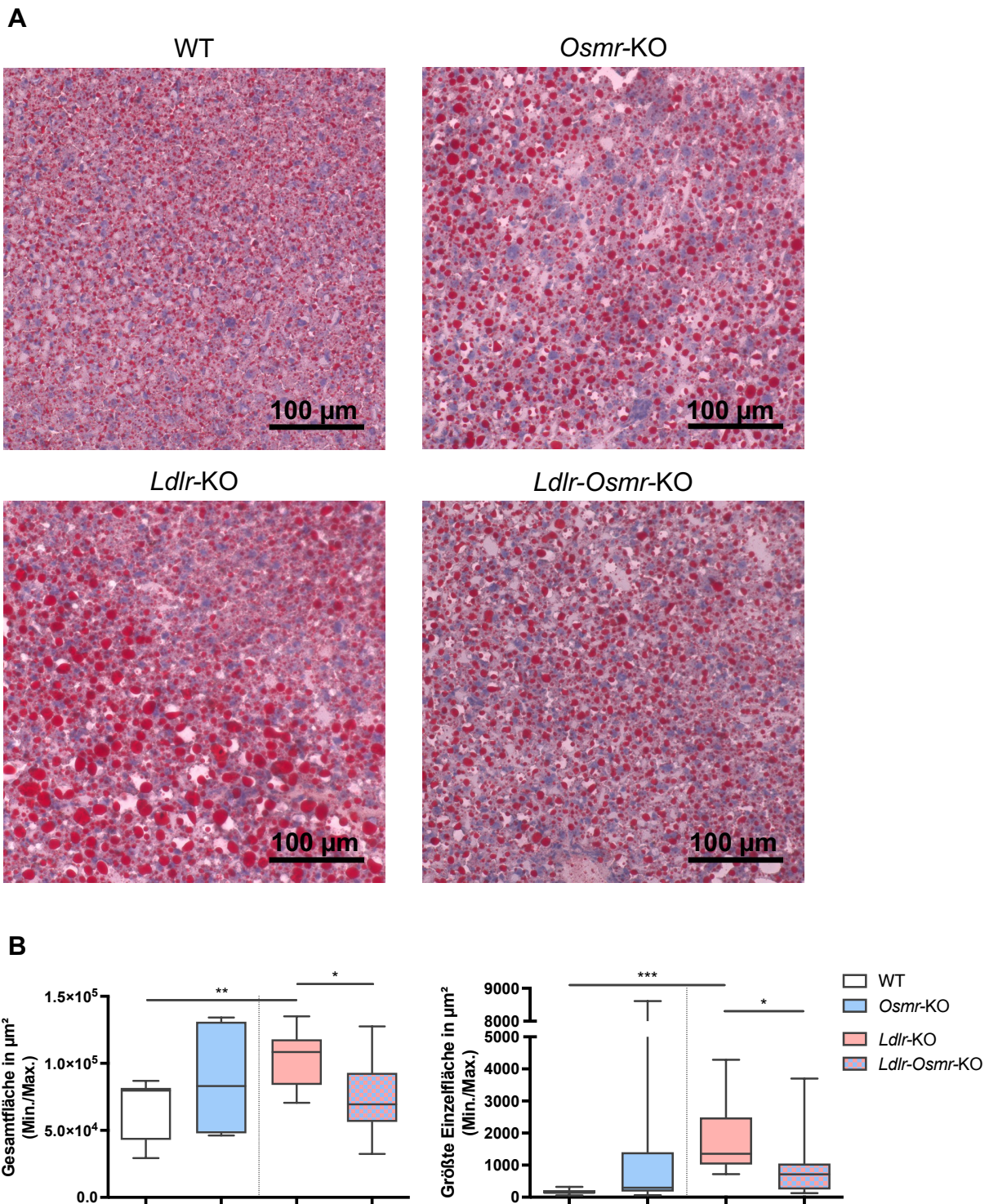


Abbildung 12. Einfluss des *Osmr*-Knockouts auf die hepatische Steatose in WT- und *Ldlr*-KO-Mäusen. (A) Darstellung repräsentativer Bildausschnitte Sudan-IV-gefärbter Gewebeschnitte der Lebern von WT-, *Osmr*-KO-, *Ldlr*-KO- und *Ldlr*-*Osmr*-KO-Mäusen in 20-facher Vergrößerung. (B) Darstellung der rot gefärbten Gesamtfläche sowie der größten zusammenhängenden rot gefärbten Einzelfläche in je einem Sudan-gefärbten repräsentativen Bildausschnitt in 20-facher Vergrößerung pro Versuchstier. n=7 für WT und *Osmr*-KO, n=10 für *Ldlr*-KO und *Ldlr*-*Osmr*-KO. Unterschiede wurden durch Verwendung des Mann-Whitney U-Tests berechnet. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen.

Um den Zusammenhang zwischen Lebergewicht der Versuchstiere und dem durch Flächenquantifizierung in Sudan-IV-gefärbten Leberschnitten ermittelten Steatosegrad zu untersuchen und damit die Validität der verwendeten Flächenquantifizierung zu überprüfen,

wurden Lebergewicht und rot gefärbte Fläche korreliert (siehe Abbildung 13). Dabei zeigte sich ein deutlicher Zusammenhang der beiden Variablen (Spearman $r=0,59$; $p=0,0003$).

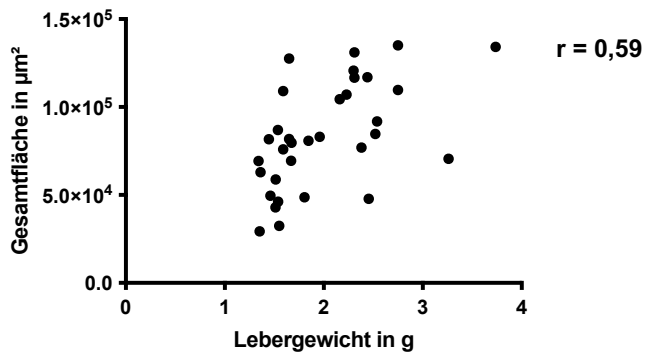


Abbildung 13. Korrelation von Lebergewicht und rot gefärbter Gesamtfläche in Sudan-IV-gefärbten Gewebeschnitten der Leber. Darstellung des Lebergewichtes gegen die rot gefärbte Gesamtfläche in je einem Sudan-IV-gefärbten repräsentativen Bildausschnitt in 20-facher Vergrößerung pro Versuchstier von WT-, *Osmr*-KO-, *Ldlr*-KO- und *Ldlr-Osmr*-KO-Mäusen ($n=33$). Der Zusammenhang zwischen den Variablen wurde mithilfe der Spearman-Korrelation berechnet.

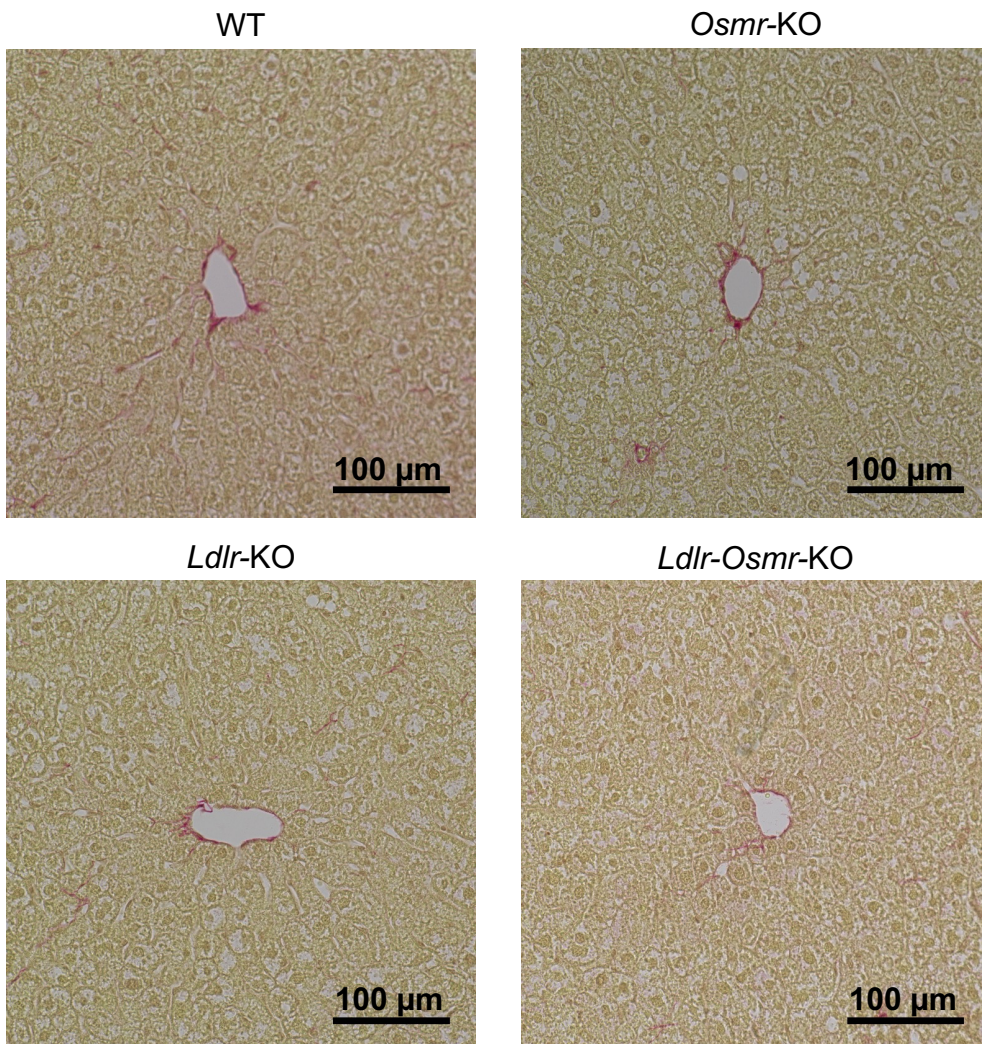


Abbildung 14. Einfluss des *Osmr-Knockouts* auf die Fibrosierung des Lebergewebes in WT- und *Ldlr*-KO-Mäusen. Darstellung repräsentativer Bildausschnitte von mit Sirius-Rot gefärbten Leberschnitten von WT-, *Osmr*-KO-, *Ldlr*-KO- und *Ldlr-Osmr*-KO-Mäusen in 20-facher Vergrößerung.

Da Kollagenfaservermehrung im Sinne einer Leberfibrose in HE-gefärbten Schnitten erst bei starker Ausprägung sichtbar werden, wurde außerdem eine Sirius-Rot-Färbung durchgeführt. Durch Sirius-Rot werden Kollagenfasern rot angefärbt. Wie in Abbildung 14 dargestellt, zeigten sich bei allen Tieren periportal und perivaskulär betonte feine rot gefärbte Fasern ohne deutliche Unterschiede zwischen den Genotypen. Eine Faservermehrung konnte auch bei den Tieren, die eine kräftige Steatose aufwiesen, nicht nachgewiesen werden.

4.2 Lipidgehalt des Lebergewebes

Mithilfe einer Lipidbestimmung im Lebergewebe sollten die in der Histologie gefundenen Unterschiede zwischen den Genotypen weiter objektiviert werden. In der Annahme, dass die Lipideinlagerungen in der Leber vor allem Triglyzeride, Cholesterin und Cholesterinester enthalten, wurden die Konzentrationen von Triglyzeriden und Gesamt-Cholesterin in den Lipidextrakten bestimmt (Abbildung 15).

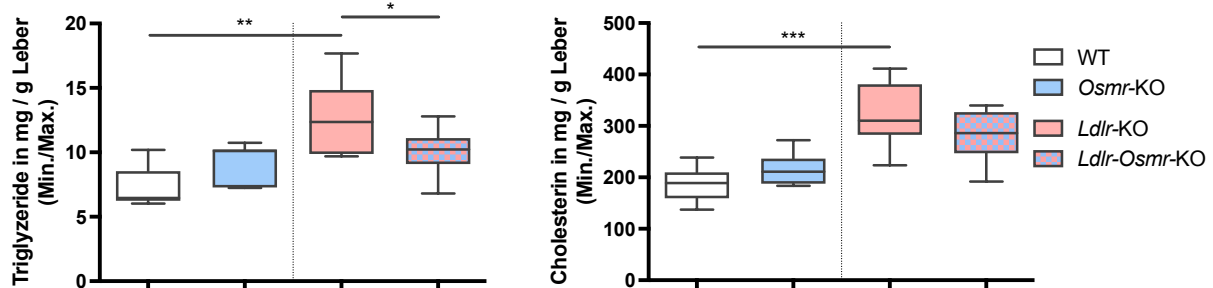


Abbildung 15. Einfluss des *Osmr-Knockouts* auf den Lipidgehalt der Leber in WT- und *Ldlr*-KO-Mäusen. Dargestellt sind die mit kolorimetrischen Kits ermittelten Konzentrationen von Triglyzeriden und Cholesterin in Gewebelysaten der Leber bezogen auf das Lebergewicht. n=6 für WT, n=7 für *Osmr*-KO, n=10 für *Ldlr*-KO und *Ldlr-Osmr*-KO. (A) Unterschiede wurden durch Verwendung des Mann-Whitney U-Tests berechnet. *p<0,05, **p<0,01 und ***p<0,001 kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen.

Der Triglyzeridgehalt im Lebergewebe lag bei WT-Tieren bei durchschnittlich 7,2 mg/g. Der Triglyzeridgehalt in Lebern von OSMR β -defizienten Mäusen war gegenüber WT-Mäusen leicht erhöht (p=0,0513). In *Ldlr*-KO-Mäusen wurden signifikant höhere Triglyzeridkonzentrationen in der Leber gefunden als in WT-Mäusen (p=0,0017). In *Ldlr-Osmr*-KO-Mäusen war der Triglyzeridgehalt gegenüber *Ldlr*-KO-Mäusen verringert (p=0,0433). Der Cholesteringehalt betrug bei WT-Mäusen im Mittel 186,7 mg/g. Bei *Ldlr*-KO-Mäusen war der hepatische Cholesteringehalt deutlich und signifikant höher als bei WT-Mäusen (p=0,0005). In der *Osmr*-KO-Gruppe waren etwas höhere Cholesterin-Werte im Vergleich zur WT-Gruppe zu messen (p=0,1375). Weiterhin waren die Werte bei *Ldlr-Osmr*-KO-Mäusen niedriger als bei den *Ldlr*-KO-Mäusen (p=0,2101). Diese Veränderungen waren jedoch nicht signifikant.

4.3 Serum-Spiegel von Fettsäuren und Triglyzeriden

Ein typischer Aspekt des Metabolischen Syndroms ist auch eine Dyslipidämie mit Verminderung des HDL-Cholesterins und eine Erhöhung der Triglyzeride im Serum, oft in Kombination mit einer Erhöhung des LDL-Cholesterins (23). Veränderungen der Konzentration freier Fettsäuren im Serum können Aufschluss über das Stattfinden exzessiver Lipolyse im Rahmen einer Insulinresistenz geben (122). Zum besseren Verständnis des Lipidmetabolismus in unseren Tieren wurden daher die Serumspiegel von Triglyzeriden und freien Fettsäuren untersucht.

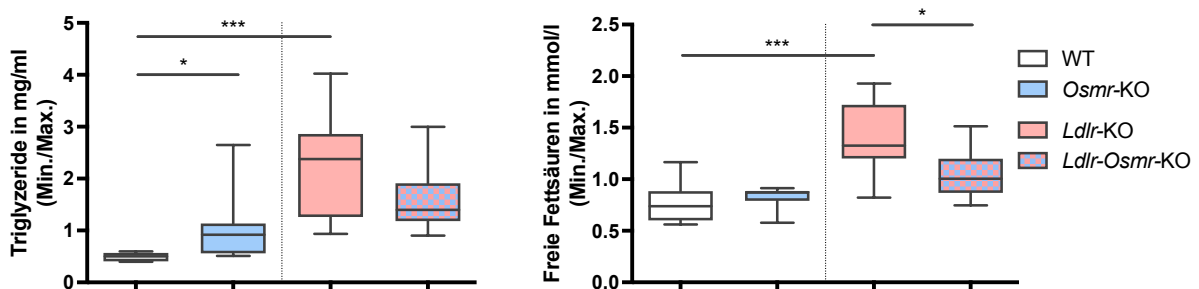


Abbildung 16. Serumspiegel von Triglyzeriden und freien Fettsäuren in *Osmr*-KO-Mäusen auf WT- und *Ldlr*-KO-Hintergrund. Darstellung mittels kolorimetrischer Kits gemessener Konzentrationen der Triglyzeride und freien Fettsäuren im Serum von WT-, *Osmr*-KO-, *Ldlr*-KO- und *Ldlr-Osmr*-KO-Mäusen. $n=7$ für WT und *Osmr*-KO, $n=10$ für *Ldlr*-KO und *Ldlr-Osmr*-KO. Unterschiede wurden durch Verwendung des Mann-Whitney U-Tests berechnet. * $p<0,05$ und *** $p<0,001$ kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen.

Die gemessenen Serum-Triglyzerid-Werte werden in Abbildung 16 gezeigt. Bei *Osmr*-KO-Mäusen waren die Werte im Vergleich zu WT-Mäusen signifikant erhöht (im Mittel 1,0 mg/ml gegenüber 0,5 mg/ml, $p=0,0111$). Noch höhere Triglyzeridkonzentrationen wurden im Serum von *Ldlr*-KO-Mäusen gemessen (im Mittel 2,3 mg/ml), diese waren gegenüber WT-Mäusen signifikant erhöht ($p=0,0001$). Ähnlich wie bei den im Vorfeld dieser Arbeit gemessenen Cholesterin-Spiegeln (siehe 1.4.2 Vorliegende Ergebnisse) hatten *Ldlr-Osmr*-KO-Mäuse im Vergleich zu *Ldlr*-KO-Mäusen etwas geringere Triglyzerid-Spiegel im Serum, dieser Effekt war jedoch nicht signifikant (im Mittel 1,6 mg/ml gegenüber 2,3 mg/ml, $p=0,1431$). Wie in Abbildung 16 dargestellt, zeigten sich bei der Messung der freien Fettsäuren im Serum in der *Osmr*-KO-Gruppe ähnlich hohe Werte wie in der WT-Gruppe (im Mittel um 0,8 mM, $p=0,3660$). Signifikant höhere Fettsäure-Spiegel wiesen hingegen *Ldlr*-KO-Mäuse auf (im Mittel 1,4 mM, $p=0,0007$). *Ldlr-Osmr*-KO-Mäuse hatten signifikant geringere Fettsäure-Spiegel als *Ldlr*-KO-Mäuse (im Mittel 1,1 mM gegenüber 1,4 mM, $p=0,0176$).

4.4 Analyse der Genexpression im Lebergewebe

Um mögliche Ursachen für die unterschiedliche Leberhistologie zwischen den untersuchten Mäusen zu finden, wurde die mRNA-Expression verschiedener Gene mittels qPCR untersucht.

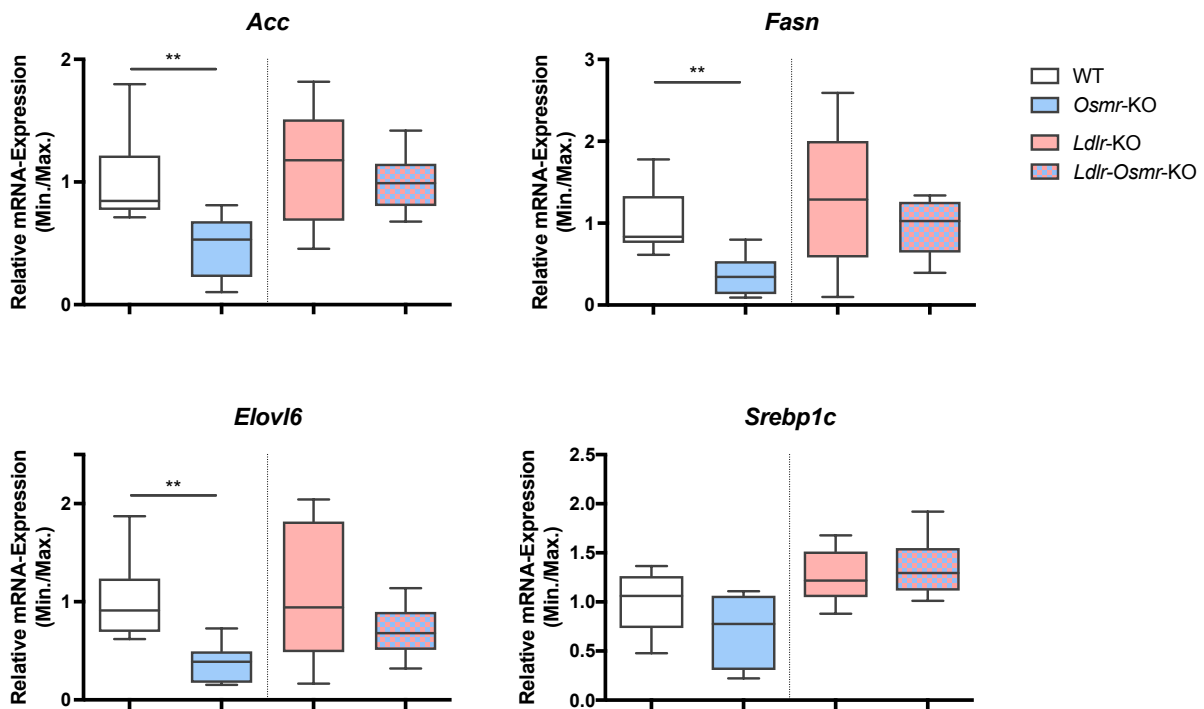


Abbildung 17. Expression von Genen der Fettsäuresynthese in *Osmr*-KO-Mäusen auf WT- und *Ldlr*-KO-Hintergrund. Darstellung der relativen mRNA-Expression von *Acc* (Acetyl-CoA-Carboxylase), *Fasn* (Fettsäuresynthase), *Elovl6* (Fettsäureelongase-6, engl. *Elongation Of Very Long Chain Fatty Acids Protein 6*) und *Srebp1c* (engl. *Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c*). n=7 für WT und *Osmr*-KO, n=10 für *Ldlr*-KO und *Ldlr-Osmr*-KO. Unterschiede wurden durch Verwendung des Mann-Whitney U-Tests berechnet. **p<0,01 kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen.

An der Fettsäuresynthese sind die Gene der Fettsäuresynthase (*Fasn*), der Acetyl-CoA-Carboxylase (*Acc*) und der Fettsäure-Elongase 6 (*Elovl6*) beteiligt (6, 7). Die mRNA-Expression dieser Gene ist in Abbildung 17 dargestellt. Alle drei Gene wurden in *Osmr*-KO-Mäusen gegenüber WT-Mäusen signifikant geringer exprimiert (*Acc* p=0,0082; *Fasn* p=0,0082; *Elovl6* p=0,0082). In den anderen Gruppen war die Expression auf einem ähnlichen Niveau wie in WT-Mäusen. Das Gen des Transkriptionsfaktors SREBP-1c, der eine wichtige Rolle bei der Regulation der Fettsäuresyntheseaktivität spielt (6), wies in *Osmr*-KO-Mäusen ebenfalls eine im Mittel geringere Expression auf als in WT-Mäusen. Dieser Effekt war jedoch nicht signifikant (p=0,1649). *Ldlr*-KO-Mäuse wiesen eine etwas höhere *Srebp1c*-Expression auf als WT-Mäuse (p=0,1331), der *Knockout* des OSMR β hatte hier keinen nachweisbaren Einfluss.

Aufgrund ihrer Beteiligung an der hepatozytären Aufnahme von Triglyzeriden und Cholesterin, wurde die Expression der Gene des LDLR (*Ldlr*) sowie des Scavenger-Rezeptors B1 (*Scarb1*) untersucht (siehe Abbildung 18). *Ldlr* war in *Osmr*-KO-Mäusen gegenüber WT-Mäusen herunterreguliert (p=0,0111). Aufgrund des genetischen *Knockouts* war in *Ldlr*-KO-Tieren nur eine minimale Expression von *Ldlr*-mRNA nachweisbar. *Scarb1* zeigte ebenfalls eine geringere Expression in *Osmr*-KO-Mäusen (p=0,0111). Bei LDLR-defizienten Mäusen zeigte das Fehlen des OSMR β keinen Effekt auf die *Scarb1*-Expression.

Insgesamt war die *Scarb1*-Expression in *Ldlr*-KO-Mäusen gegenüber WT-Mäusen jedoch vermindert ($p=0,0007$).

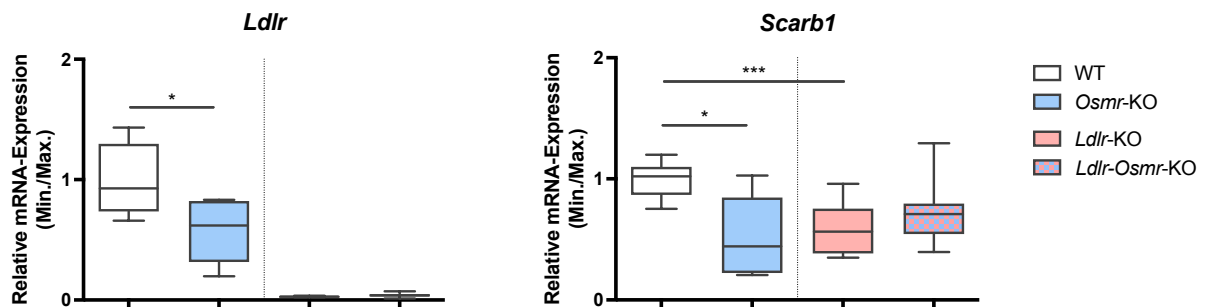


Abbildung 18. Expression von Genen der Triglyzerid- und Cholesterinaufnahme in *Osmr*-KO-Mäusen auf WT- und *Ldlr*-KO-Hintergrund. Darstellung der relativen mRNA-Expression von *Ldlr* (Low-Density-Lipoprotein-Rezeptor) und *Scarb1* (Scavenger-Rezeptor B1). $n=7$ für WT und *Osmr*-KO, $n=10$ für *Ldlr*-KO und *Ldlr-Osmr*-KO. Unterschiede wurden durch Verwendung des Mann-Whitney U-Tests berechnet. $*p<0,05$ und $***p<0,001$ kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen.

Zur weiteren Untersuchung der hepatozytären Cholesterinhomöostase wurde die Expression von Genen der Cholesterinsynthese (*Hmgcr*), der biliären Cholesterinsekretion (*Abcg5*, *Abcg8*) gemessen (siehe Abbildung 19). Die Expression von *Hmgcr* war in *Osmr*-KO-Mäusen signifikant geringer als in WT-Mäusen ($p=0,0023$). In *Ldlr*-KO-Mäusen war die *Hmgcr*-Expression gegenüber WT-Mäusen erhöht ($p=0,1331$). Zwischen *Ldlr*-KO- und *Ldlr-Osmr*-KO-Mäusen unterschied sich die *Hmgcr*-Expression nicht. Die Expression von *Abcg5* und *Abcg8* war zwischen den vier Genotypen nicht signifikant verschieden.

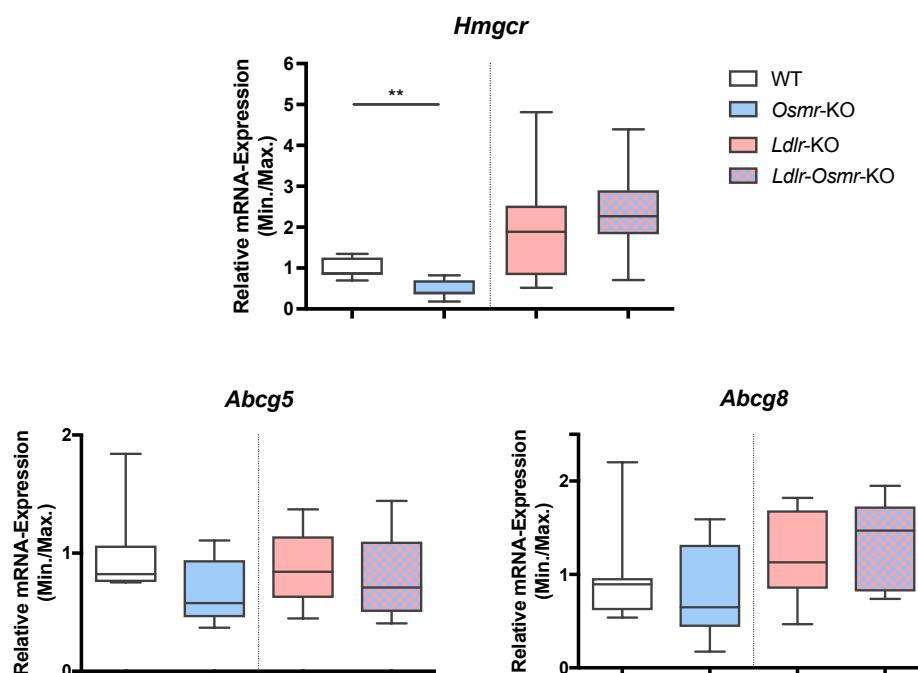


Abbildung 19. Hepatische Expression von Genen der Cholesterinsynthese und -sekretion in *Osmr*-KO-Mäusen auf WT- und *Ldlr*-KO-Hintergrund. Darstellung der relativen mRNA-Expression von *Hmgcr* (HMG-CoA-Reduktase), *Abcg5* und *Abcg8* (engl. ATP-Binding Cassette Transporter G5/G8) im Lebergewebe. $n=7$ für WT und *Osmr*-KO, $n=10$ für *Ldlr*-KO und *Ldlr-Osmr*-KO. Unterschiede wurden durch Verwendung des Mann-Whitney U-Tests berechnet. $**p<0,01$ kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen.

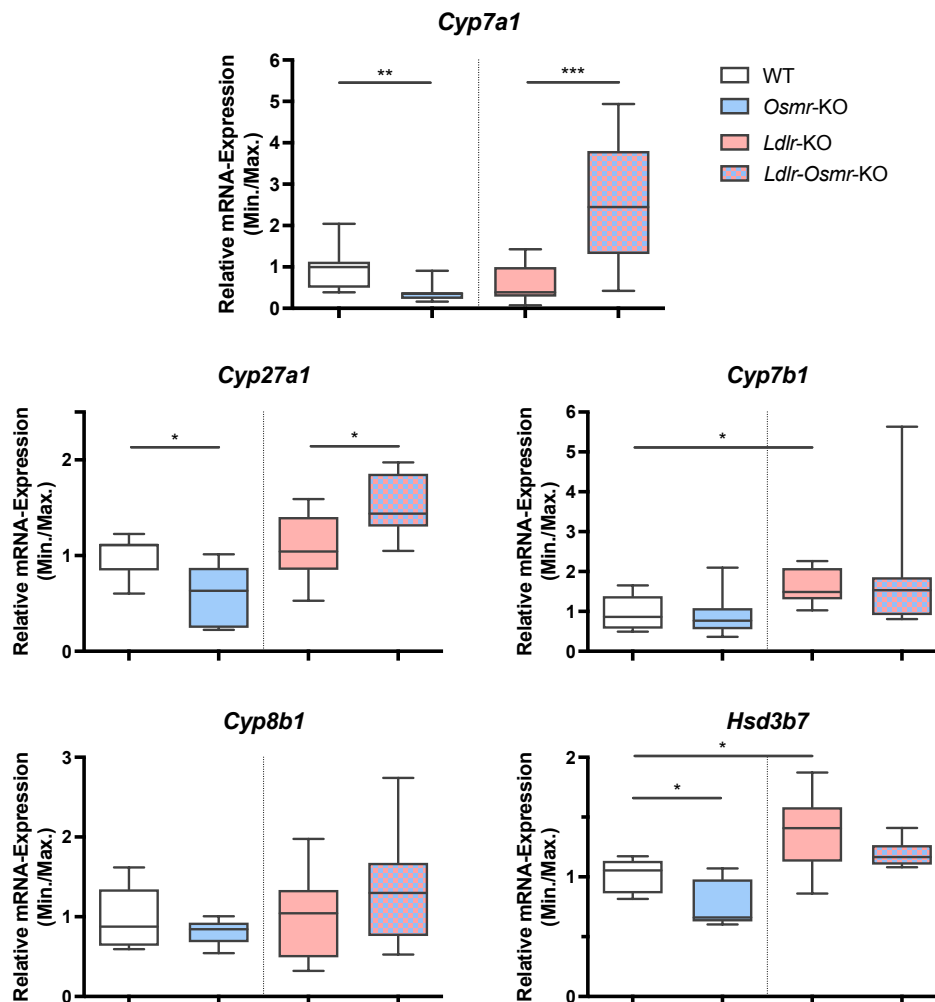


Abbildung 20. Hepatische Expression von Genen der Gallensäuresynthese in *Osmr*-KO-Mäusen auf WT- und *Ldlr*-KO-Hintergrund. Darstellung der relativen mRNA-Expression von *Cyp7a1*, *Cyp27a1*, *Cyp7b1*, *Hsd3b7* (Hydroxy- δ -5-Steroid-Dehydrogenase 3 β - und Steroid δ -Isomerase 7) und *Cyp8b1* im Lebergewebe. n=7 für WT und *Osmr*-KO, n=10 für *Ldlr*-KO und *Ldlr-Osmr*-KO. Unterschiede wurden durch Verwendung des Mann-Whitney U-Tests berechnet. *p<0,05, **p<0,01 und ***p<0,001 kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen.

Ebenso wurde die Expression von Genen der Gallensäuresynthese (*Cyp7a1*, *Cyp27a1*, *Cyp7b1*, *Cyp8b1*, *Hsd3b7*) untersucht (Abbildung 20). Die mRNA-Expression von *Cyp7a1*, das für das Schrittmacherenzym der Gallensäuresynthese kodiert, unterschied sich zwischen den Genotypen deutlich: *Osmr*-KO-Mäuse zeigten eine signifikant geringere Expression als WT-Mäuse (p=0,0041), wohingegen die Expression bei *Ldlr-Osmr*-KO- im Vergleich zu *Ldlr*-KO-Mäusen deutlich und signifikant erhöht war (p=0,0007). Die Expression von *Cyp27a1*, das für das Schrittmacherenzym des alternativen Syntheseweges der Gallensäuren kodiert, war in *Osmr*-KO- gegenüber WT-Mäusen herunterreguliert (p=0,0262) und in *Ldlr-Osmr*-KO- gegenüber *Ldlr*-KO-Mäusen hochreguliert (p=0,0115). Die mRNA-Expression der ebenfalls an der Gallensäuresynthese beteiligten Gene *Cyp7b1*, *Cyp8b1* und *Hsd3b7* war weniger stark reguliert. *Cyp7b1* und *Hsd3b7* waren in *Ldlr*-KO-Mäusen etwas stärker exprimiert als in WT-Mäusen (*Cyp7b1* p=0,0136; *Hsd3b7* p=0,0136). *Osmr*-KO-Mäuse zeigten eine etwas geringere *Hsd3b7*-Expression als Tiere mit erhaltenem OSMR β (p=0,0280).

Hepatocyte Nuclear Factor 4α (HNF-4α) und *Small Heterodimer Partner* (SHP) sind an der Regulation der *Cyp7a1*-Expression beteiligt (123). Die Expression ihrer Gene wurde aufgrund der starken *Cyp7a1*-Induktion in *Ldlr-Osmr*-KO-Mäusen gegenüber *Ldlr*-KO-Mäusen ebenfalls gemessen und ist in Abbildung 21 dargestellt. *Hnf4a*, dessen Genprodukt als Transkriptionsfaktor für die basale Expression von *Cyp7a1* verantwortlich ist, war wie *Cyp7a1* selbst in *Osmr*-KO-Mäusen gegenüber WT-Mäusen herunterreguliert ($p=0,0097$). *Ldlr-Osmr*-KO-Mäuse wiesen gegenüber *Ldlr*-KO-Mäusen eine höhere *Hnf4a*-Expression auf ($p=0,0011$). Die Expression von *Shp* war zwischen den untersuchten Gruppen nicht verschieden.

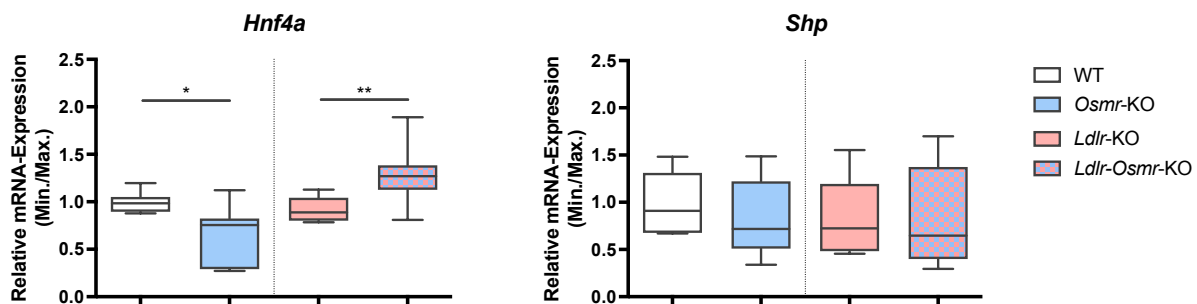


Abbildung 21. Hepatische Expression von Genen mit Beteiligung an der *Cyp7a1*-Regulation in *Osmr*-KO-Mäusen auf WT- und *Ldlr*-KO-Hintergrund. Darstellung der relativen mRNA-Expression von *Shp* (engl. *Small Heterodimer Partner*) und *Hnf4a* (engl. *Hepatocyte Nuclear Factor 4α*) im Lebergewebe. $n=7$ für WT und *Osmr*-KO, $n=10$ für *Ldlr*-KO und *Ldlr-Osmr*-KO. Unterschiede wurden durch Verwendung des Mann-Whitney U-Tests berechnet. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ und **** $p<0,0001$ kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen.

Nachdem in der Leberhistologie in keiner der Gruppen entzündliche Infiltrate ausgemacht werden konnten, wurde die Expression von inflammatorischen Genen betrachtet. Proinflammatorische Zytokine, die beim Fortschreiten einer NAFLD durch Immunzellen des Lebergewebes sezerniert werden, sind unter anderem $TNF\alpha$, $IL-1\alpha$, $IL-1\beta$ und $IL-6$ (124-128). Diese können die Akute-Phase-Proteine CRP, Haptoglobin (Gen *Hp*) und Serum-Amyloid A2 (SAA2, Gen *Saa2*) in Hepatozyten induzieren (129). Die Genexpression der genannten Akute-Phase-Induktoren und Akute-Phase-Proteine ist in Abbildung 22 dargestellt. Die *Tnfa*-Expression war in Lebern von *Ldlr*-KO-Mäusen etwas geringer als in WT-Mäusen ($p=0,0250$). *Osmr*-KO-Mäuse zeigten eine etwas geringere *Tnfa*-Expression als WT-Mäuse ($p=0,2086$). Bei Mäusen mit *Ldlr*-KO-Hintergrund veränderte der *Knockout* des OSMR β die Expression von *Tnfa* nicht. *Il1a* wies in *Ldlr*-KO-Mäusen gegenüber WT-Mäusen eine stärkere Expression auf ($p=0,0001$). Bei beiden genetischen Hintergründen hatte der *Knockout* des OSMR β keinen Einfluss auf die *Il1a*-Expression. Die *Il1b*-Expression war in *Osmr*-KO-Mäusen auf beiden genetischen Hintergründen vermindert (WT-Hintergrund $p=0,0012$; *Ldlr*-KO-Hintergrund $p=0,0115$). Die Expression von *Il6* war über alle Gruppen hinweg nicht nachweisbar. Die mRNA-Expression von *Crp*, *Hp* und *Saa2* war in LDLR-defizienten Mäusen höher als in WT-Mäusen, bei *Hp* ($p=0,0031$) und *Saa2* ($p=0,0002$) war der Effekt signifikant. *Crp* wurde in *Osmr*-KO-Mäusen deutlich weniger exprimiert als in WT-

Mäusen ($p=0,0006$), wohingegen *Ldlr-Osmr*-KO-Mäuse gegenüber *Ldlr*-KO-Mäusen eine höhere *Crp*-Expression aufwiesen ($p=0,0500$).

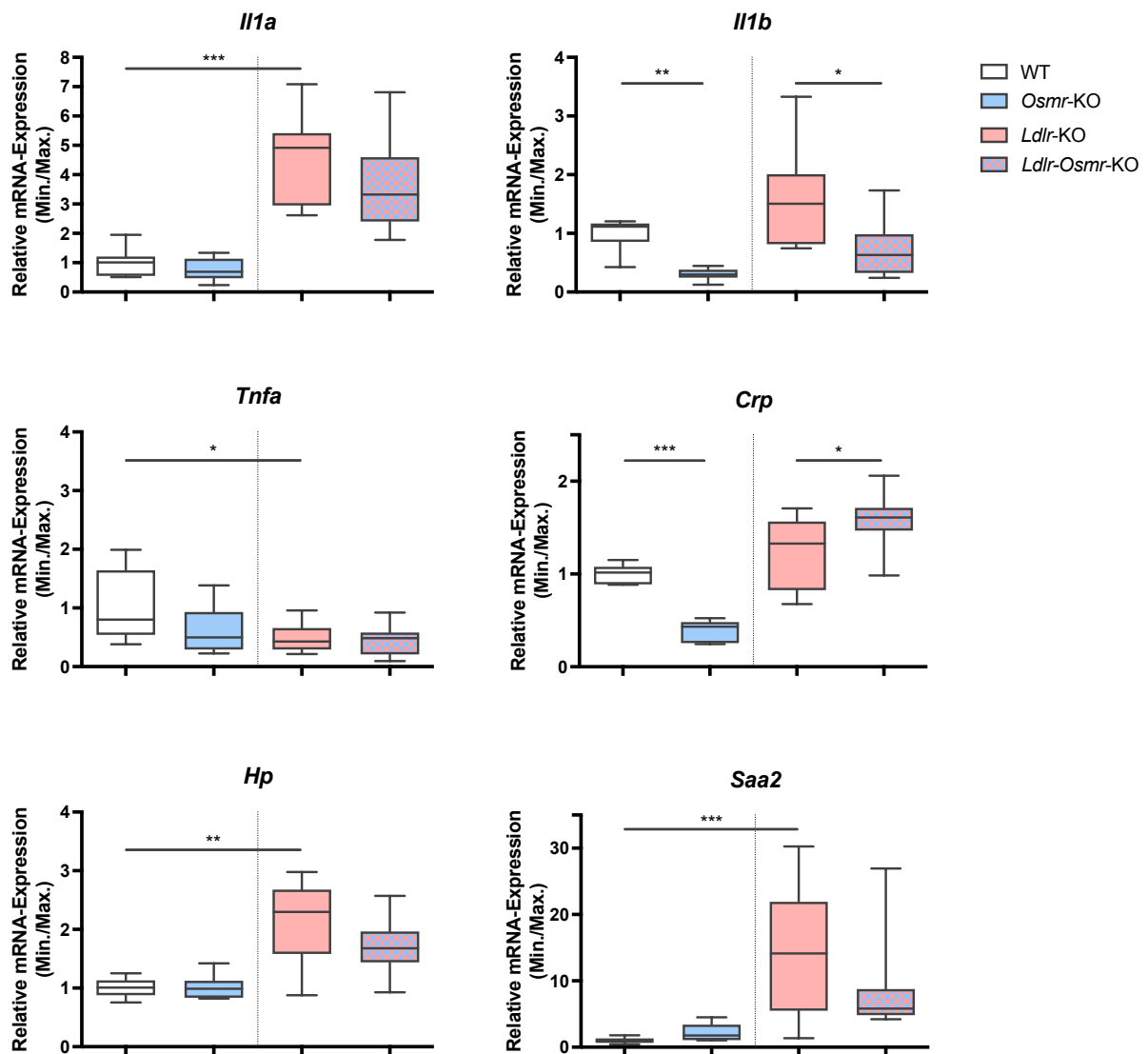


Abbildung 22. Hepatische Expression von Genen der Akute-Phase-Reaktion in *Osmr*-KO-Mäusen auf WT- und *Ldlr*-KO-Hintergrund. Darstellung der relativen mRNA-Expression von *Il1a*, *Il1b*, *Tnfa* (Tumornekrosefaktor α), *Crp*, *Hp* (Haptoglobin) und *Saa2* (Serum-Amyloid A2) im Lebergewebe. $n=7$ für WT und *Osmr*-KO, $n=10$ für *Ldlr*-KO und *Ldlr-Osmr*-KO. Unterschiede wurden durch Verwendung des Mann-Whitney U-Tests berechnet. * $p<0,05$, ** $p<0,01$ und *** $p<0,001$ kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen.

Ein weiteres proinflammatorisches Zytokin, dem eine Beteiligung an der NAFLD-Progression zugeschrieben wird, ist CCL2, welches unter anderem von Hepatozyten sezerniert wird (130, 131). Die mRNA-Expression von *Ccl2* in der Leber ist in Abbildung 23 dargestellt. In *Ldlr*-KO-Mäusen zeigte sich eine erhöhte Expression von *Ccl2* gegenüber WT-Mäusen ($p=0,0097$), die in *Ldlr-Osmr*-KO-Mäusen aufgehoben war ($p<0,0001$). Bei Mäusen mit WT-Hintergrund hatte die Defizienz des OSMR β keinen signifikanten Einfluss auf die *Ccl2*-Expression.

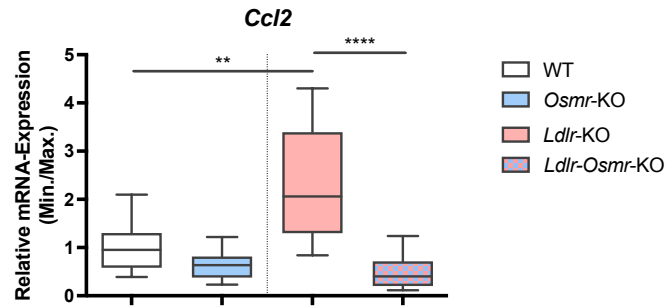


Abbildung 23. Hepatische Expression von *Ccl2* in *Osmr*-KO-Mäusen auf WT- und *Ldlr*-KO-Hintergrund. Darstellung der relativen mRNA-Expression von *Ccl2* (CC-Chemokinligand 2) im Lebergewebe. n=7 für WT und *Osmr*-KO, n=10 für *Ldlr*-KO und *Ldlr-Osmr*-KO. Unterschiede wurden durch Verwendung des Mann-Whitney U-Tests berechnet. **p<0,01 und ****p<0,0001 kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen.

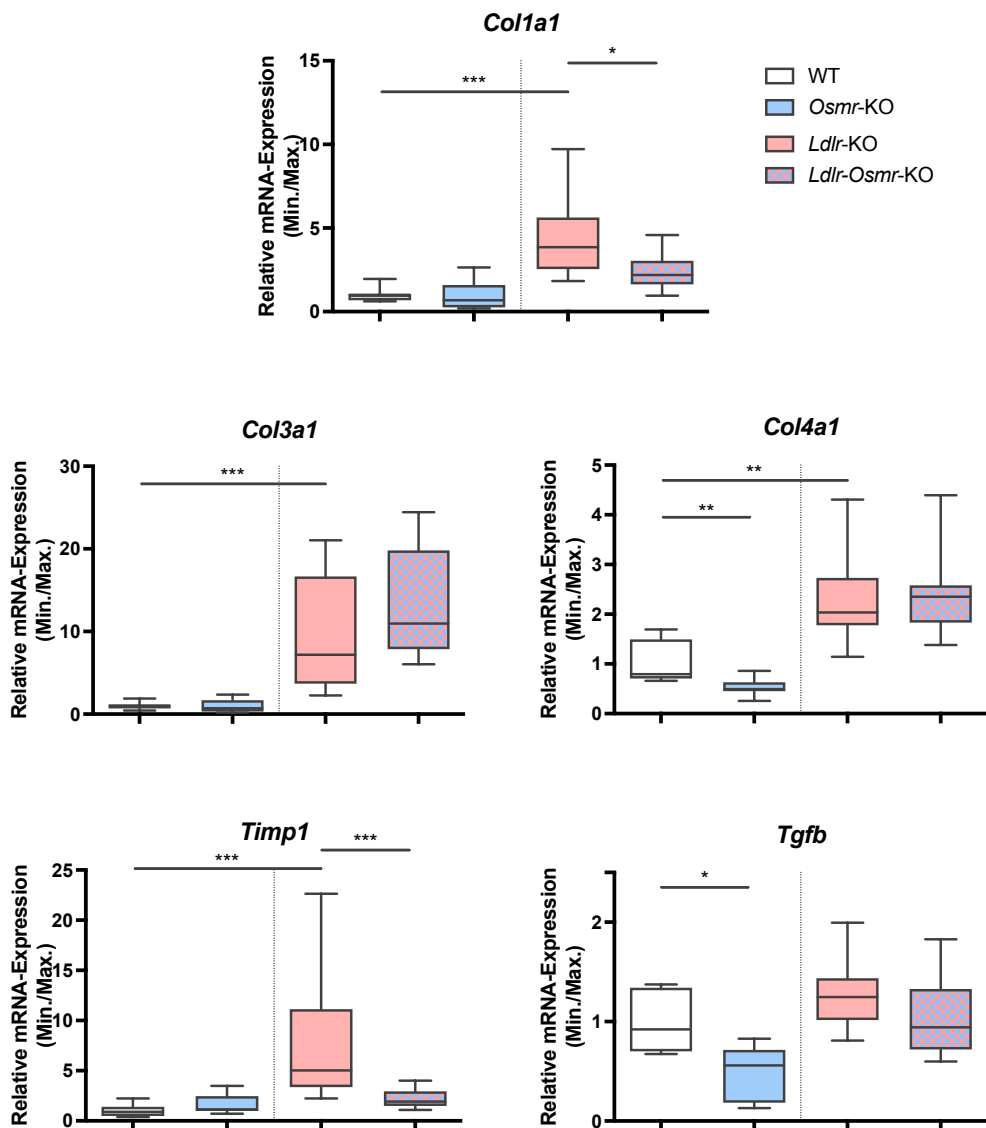


Abbildung 24. Hepatische Expression von Genen der Fibrogenese in *Osmr*-KO-Mäusen auf WT- und *Ldlr*-KO-Hintergrund. Darstellung der relativen mRNA-Expression von *Col1a1* (Kollagen I), *Col3a1* (Kollagen III), *Col4a1* (Kollagen IV), *Timp1* (engl. *Tissue Inhibitor Of Metalloproteinases 1*) und *Tgfb* (engl. *Transforming Growth Factor β*) im Lebergewebe. n=7 für WT und *Osmr*-KO, n=10 für *Ldlr*-KO und *Ldlr-Osmr*-KO. Unterschiede wurden durch Verwendung des Mann-Whitney U-Tests berechnet. *p<0,05, **p<0,01 und ***p<0,001 kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen.

Neben der Entzündungsaktivität im Lebergewebe der Versuchstiere wurde auch die Expression von Fibrose-induzierenden Genen betrachtet (siehe Abbildung 24). Die Kollagen-Gene *Col1a1*, *Col3a1* und *Col4a1* wurden in *Ldlr*-KO-Mäusen stärker exprimiert als in WT-Mäusen (*Col1a1* $p=0,0002$; *Col3a1* $p=0,0001$; *Col4a1* $p=0,0012$). *Col1a1* wurde in *Ldlr-Osmr*-KO-Mäusen signifikant schwächer exprimiert als in *Ldlr*-KO-Mäusen ($p=0,0288$). Außerdem zeigte sich eine geringere Expression von *Col4a1* in *Osmr*-KO- gegenüber WT-Mäusen ($p=0,0070$). Ansonsten hatte der *Osmr*-Knockout keinen Einfluss auf die Expression der Kollagen-Gene. Ein weiteres Fibrose-assoziiertes Protein ist TIMP1 (132). Die Expression seines Gens *Timp1* war analog zur Expression der Kollagen-Gene bei LDLR-Defizienz induziert ($p=0,0001$), wohingegen die Expression bei *Ldlr-Osmr*-KO-Mäusen gegenüber *Ldlr*-KO-Mäusen deutlich geringer war ($p=0,0008$). Die *Tgfb*-Expression war in *Osmr*-KO-Mäusen geringer als in WT-Mäusen ($p=0,0111$). Zwischen *Ldlr*-KO- und *Ldlr-Osmr*-KO-Mäusen war die *Tgfb*-Expression nicht signifikant verschieden ($p=0,0753$).

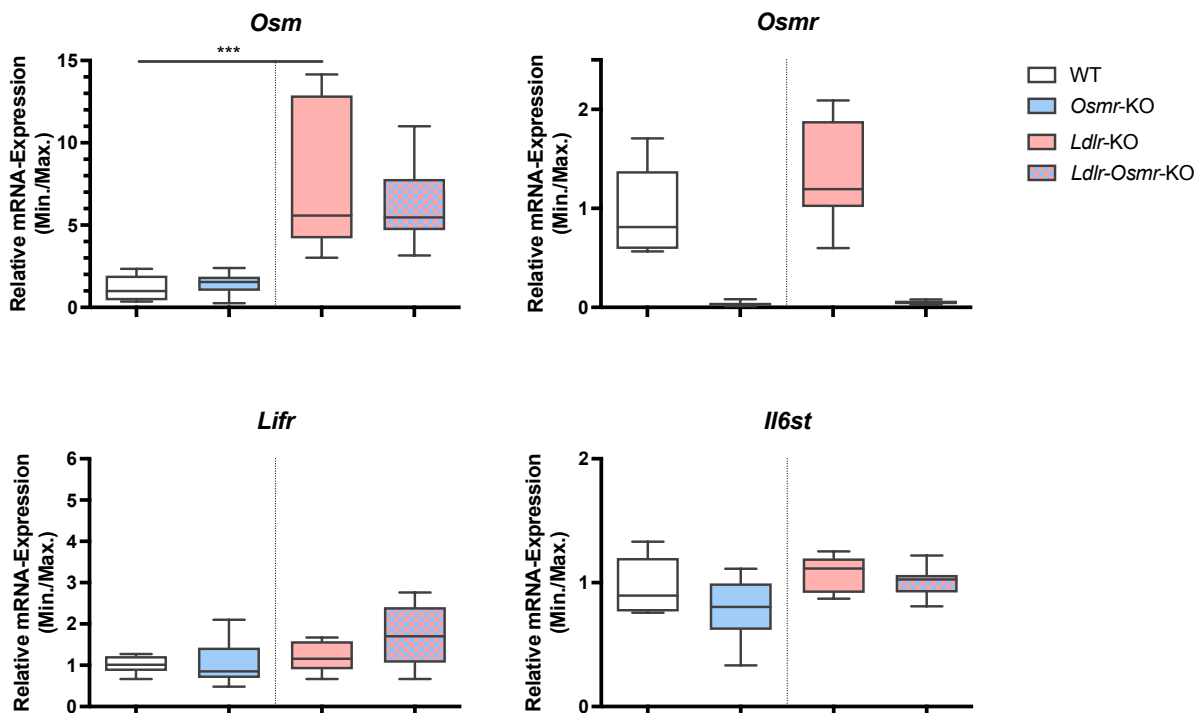


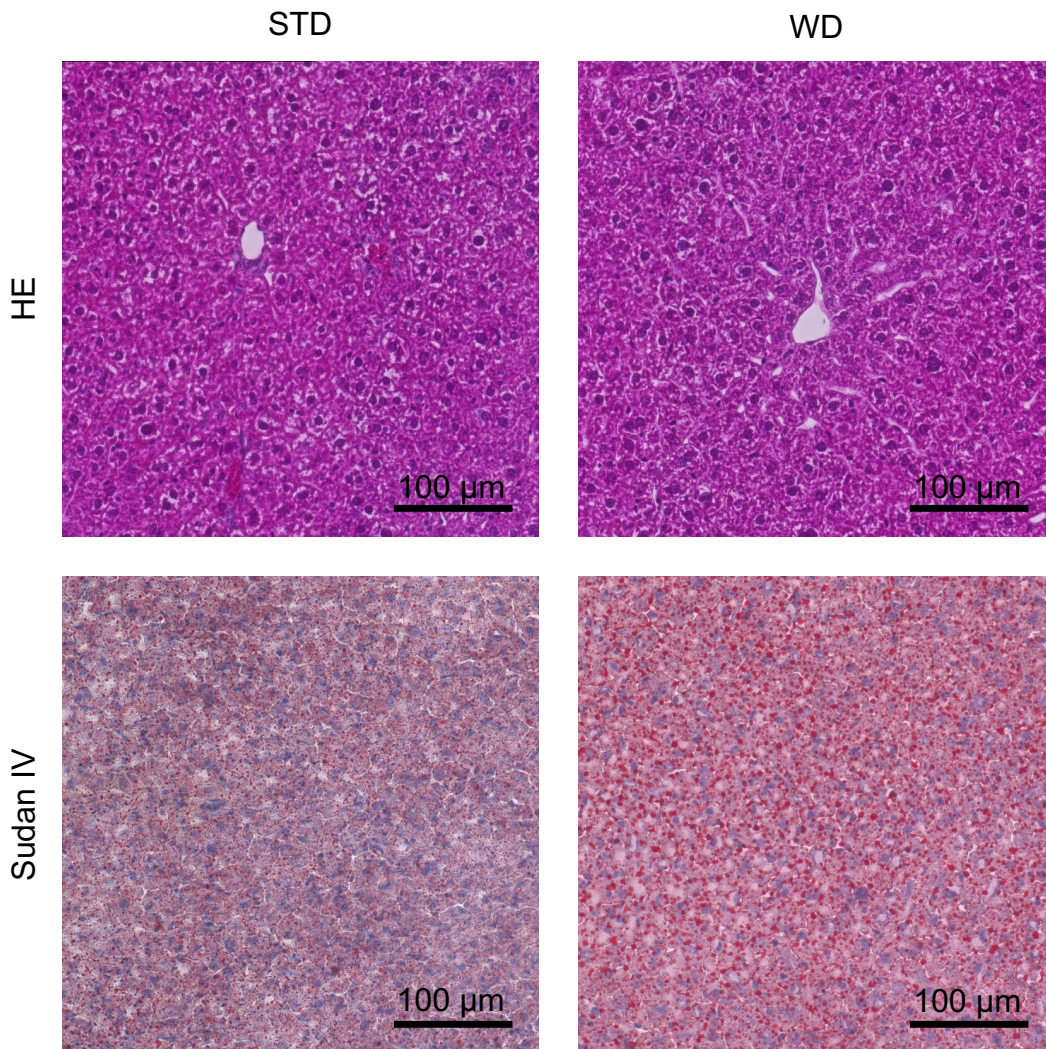
Abbildung 25. Hepatische Expression von *Osm* und den Genen seiner Rezeptoren in *Osmr*-KO-Mäusen auf WT- und *Ldlr*-KO-Hintergrund. Darstellung der relativen mRNA-Expression von *Osm* (Oncostatin M), *Osmr* (Oncostatin M-Rezeptor β), *Lifr* (*Leukemia Inhibitory Factor*-Rezeptor β) und *Il6st* (Glykoprotein gp130) im Lebergewebe. $n=7$ für WT und *Osmr*-KO, $n=10$ für *Ldlr*-KO und *Ldlr-Osmr*-KO. Unterschiede wurden durch Verwendung des Mann-Whitney U-Tests berechnet. *** $p<0,001$ kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen.

Auch OSM wird im Rahmen entzündlicher Prozesse der NAFLD von Immunzellen des Lebergewebes sezerniert (107). Die mRNA-Expression von *Osm* und den Genen seiner Rezeptoren ist in Abbildung 25 dargestellt. Die *Osm*-Expression zeigte sich in *Ldlr*-KO-Tieren erhöht gegenüber WT-Tieren, unabhängig vom Vorhandensein des OSMR β ($p=0,0001$). In allen Mäusen waren die mRNA-Spiegel von *Osm* im Vergleich zu anderen Zielgenen gering. *Osmr*-mRNA konnte aufgrund des genetischen *Knockouts* in *Osmr*-KO- und *Ldlr-Osmr*-KO-

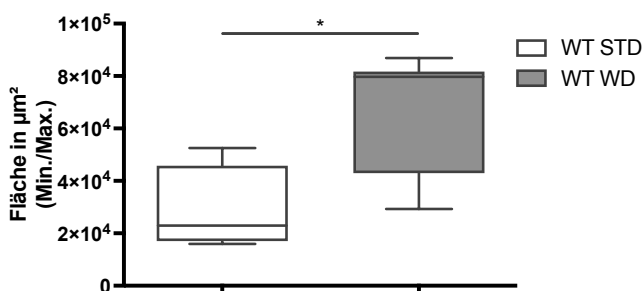
Mäusen kaum nachgewiesen werden. Die *Osmr*-Expression war in *Ldlr*-KO-Mäusen gegenüber WT-Mäusen leicht erhöht ($p=0,1613$). Die Expression von *Lifr* unterscheidet sich zwischen WT-Mäusen und *Osmr*-KO-Mäusen nicht, allerdings zeigte sich eine leicht erhöhte Expression in *Ldlr*-*Osmr*-KO-Mäusen gegenüber *Ldlr*-KO-Mäusen ($p=0,0775$). Das *Il6st*-Gen kodiert für das Glykoprotein gp130, das als α -Rezeptoruntereinheit für die OSM Signaltransduktion über beide Rezeptorkomplexe benötigt wird (86). Seine Expression zeigte keine deutlichen Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen.

4.5 Einfluss der *Western Diet* auf Histologie und Genexpression der Leber

A



B



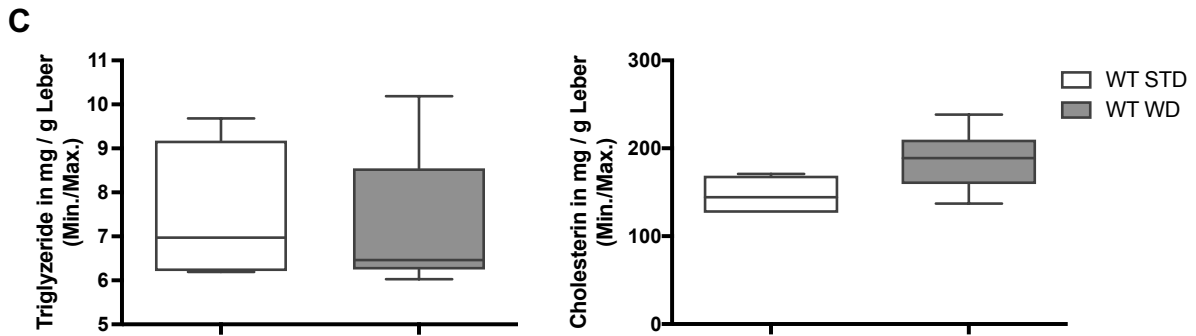


Abbildung 26. Einfluss der *Western Diet* auf die Entwicklung einer hepatischen Steatose in WT-Mäusen. (A) Darstellung repräsentativer Bildausschnitte von mit Hämatoxylin-Eosin (HE) oder Sudan IV gefärbten Gewebeschnitten der Leber von WT-Mäusen, die entweder eine fett- und cholesterinreiche *Western Diet* (WD) über 12 Wochen oder eine Standarddiät (STD) über den gleichen Zeitraum erhielten. (B) Darstellung der rot gefärbten Gesamtfläche in je einem Sudan-IV-gefärbten repräsentativen Bildausschnitt pro Versuchstier. (C) Darstellung der Triglyzerid- und Cholesterinmenge in Lebergewebelysaten bezogen auf das Lebergewicht. N=4 für STD, n=7 für WD. Unterschiede wurden durch Verwendung des Mann-Whitney U-Tests berechnet. * $p < 0,05$ kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen.

Zwischen über 12 Wochen mit WD gefütterten WT-Mäusen und mit STD gefütterten WT-Mäusen zeigte sich kein deutlicher Unterschied bei Betrachtung mit HE gefärbter Leberschnitte. In beiden Gruppen konnte weder eine deutliche Lipideinlagerung im Sinne einer Steatose noch ein Hinweis auf Entzündung oder Fibrose gefunden werden. Wie in Abbildung 26A dargestellt, fiel jedoch in der Sudan IV-Färbung bei mit WD gefütterten Tieren eine leichte Vermehrung der kleinen intrazellulären Lipidtröpfchen auf. WT-Tiere, die mit WD gefüttert wurden, zeigten entsprechend eine größere rot gefärbte Fläche je Bildausschnitt als die ausschließlich mit STD gefütterten Tiere (siehe Abbildung 26B) ($p=0,0424$). Der Triglyzeridgehalt im Lebergewebe war bei beiden Diätgruppen ähnlich hoch (im Mittel 7,5 mg/g bei STD gegenüber 7,2 mg/g bei WD), während der Cholesteringehalt in mit WD gefütterten Tieren tendenziell höher war (im Mittel 187 mg/g gegenüber 147 mg/g, $p=0,0619$) (siehe Abbildung 26C).

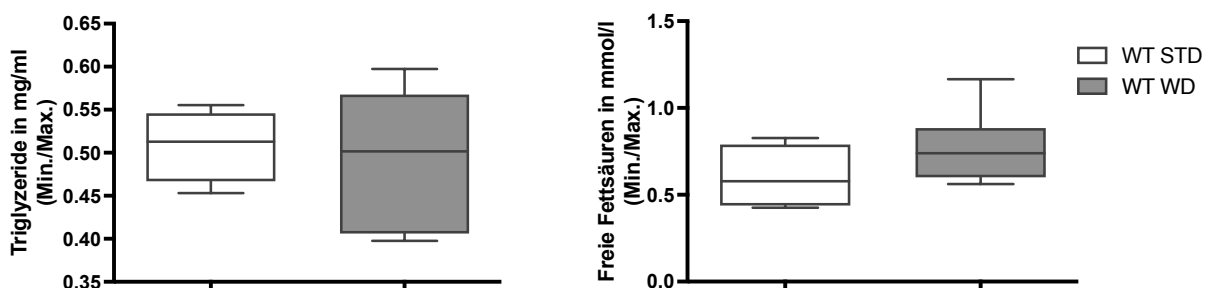


Abbildung 27. Serumspiegel von Triglyzeriden und freien Fettsäuren in WT-Mäusen nach *Western Diet* oder Standarddiät. Darstellung mittels kolorimetrischer Kits gemessener Konzentrationen der Triglyzeride und freien Fettsäuren im Serum von WT-Mäusen, die 12 Wochen eine fett- und cholesterinreiche *Western Diet* (WD) oder Standarddiät (STD) erhielten. n=4 für STD, n=7 für WD. Unterschiede wurden durch Verwendung des Mann-Whitney U-Tests berechnet.

Wie in Abbildung 27 dargestellt, hatte die Diät keinen Einfluss auf die Höhe der Triglyzerid- und Fettsäure-Spiegel im Serum der Mäuse.

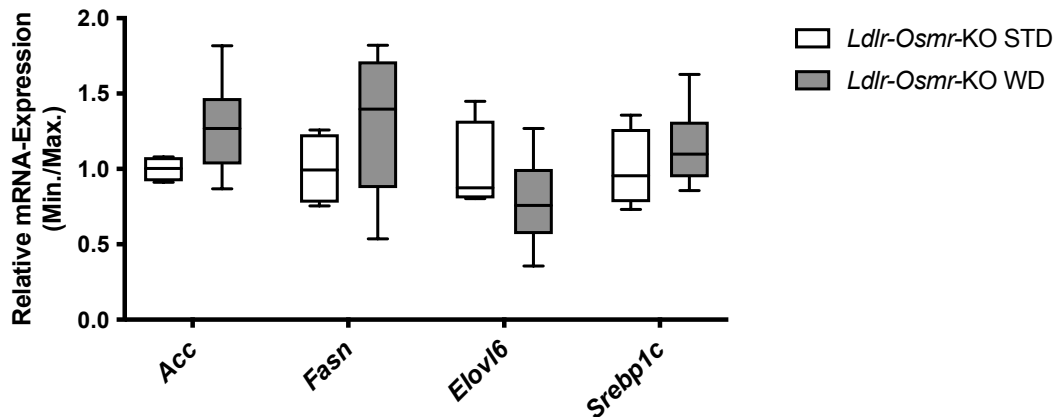


Abbildung 28. Hepatische Expression von Genen der Fettsäuresynthese nach *Western Diet* oder Standarddiät. Darstellung der relativen mRNA-Expression von *Acc* (Acetyl-CoA-Carboxylase), *Fasn* (Fettsäuresynthase), *Elovl6* (Fettsäureelongase-6) und *Srebp1c* (engl. *Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c*) in *Ldlr-Osmr*-KO-Mäusen, die eine *Western Diet* (WD) über 12 Wochen oder eine Standarddiät (STD) über den gleichen Zeitraum erhielten. n=4 für STD, n=10 für WD. Unterschiede wurden durch Verwendung des Mann-Whitney U-Tests berechnet.

Weiterhin wurde die Genexpression in der Leber von *Ldlr-Osmr*-KO-Mäusen auf STD gegenüber WD analysiert. Dabei wurden 10 Mäuse in der WD-Gruppe mit nur 4 Mäusen in der STD-Gruppe verglichen. Wie Abbildung 28 zeigt, war das *Acc*-Gen, das für eines der Schrittmacherezyme der Fettsäuresynthese, Acetyl-CoA-Carboxylase, kodiert, in WD-Mäusen hochreguliert ($p=0,1059$). Auch *Fasn*, das Gen der Fettsäuresynthase, war in WD-Mäusen im Mittel stärker exprimiert als in STD-Mäusen ($p=0,1296$). In beiden Fällen war dies jedoch nicht signifikant. Die Gene der Fettsäure-Elongase 6 (*Elovl6*) und des Transkriptionsfaktors SREBP-1c (*Srebp1c*) zeigten keine eindeutige diätabhängige Regulation.

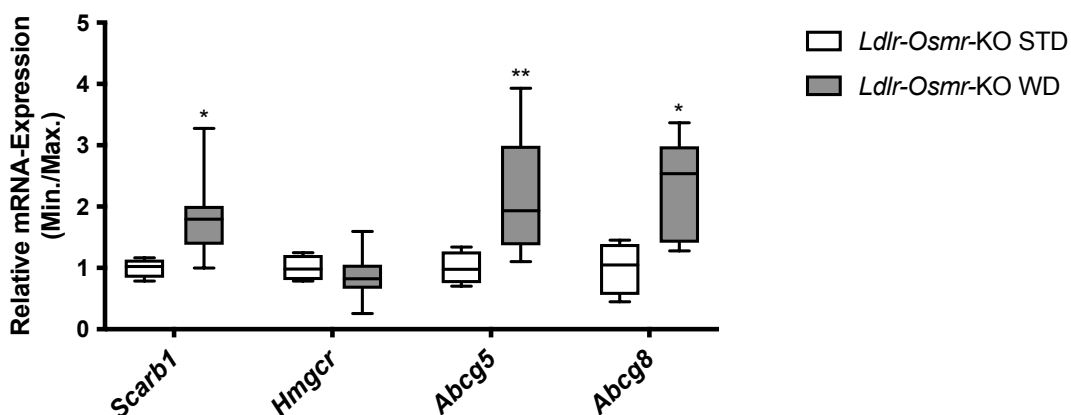


Abbildung 29. Hepatische Expression von Genen der Cholesterinsynthese und des Cholesterintransports nach *Western Diet* oder Standarddiät. Darstellung der relativen mRNA-Expression von *Scarb1* (Scavenger-Rezeptor B1), *Hmgcr* (HMG-CoA-Reduktase) sowie *Abcg5* und *Abcg8* (engl. *ATP-Binding Cassette Transporter G5/G8*) in *Ldlr-Osmr*-KO-Mäusen, die eine *Western Diet* (WD) über 12 Wochen oder eine Standarddiät (STD) über den gleichen Zeitraum erhielten. n=4 für STD, n=10 für WD. Unterschiede wurden durch Verwendung des Mann-Whitney U-Tests berechnet. * $p<0,05$ und ** $p<0,01$ kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen.

In Abbildung 29 wird der Einfluss der WD auf Gene mit Beteiligung an Transport und Synthese von Cholesterin gezeigt. Es zeigte sich eine erhöhte Expression des Gens *Scarb1*

in mit WD gefütterten Tieren ($p=0,0140$), das für den HDL-Rezeptor Scavenger-Rezeptor B1 kodiert. Weiterhin zeigte sich eine höhere mRNA-Expression der Gene des Cholesterintransporters ABCG5/G8 in WD-Mäusen gegenüber STD-Mäusen (*Abcg5* $p=0,0080$; *Abcg8* $p=0,0140$). Das Gen des Schrittmacherenzym der Cholesterinsynthese *Hmgcr* zeigte keine diätabhängige Regulation. Obwohl es sich um *Ldlr*-KO-Mäuse handelt, ließ sich in beiden Diätgruppen eine minimale Menge von *Ldlr* mRNA nachweisen.

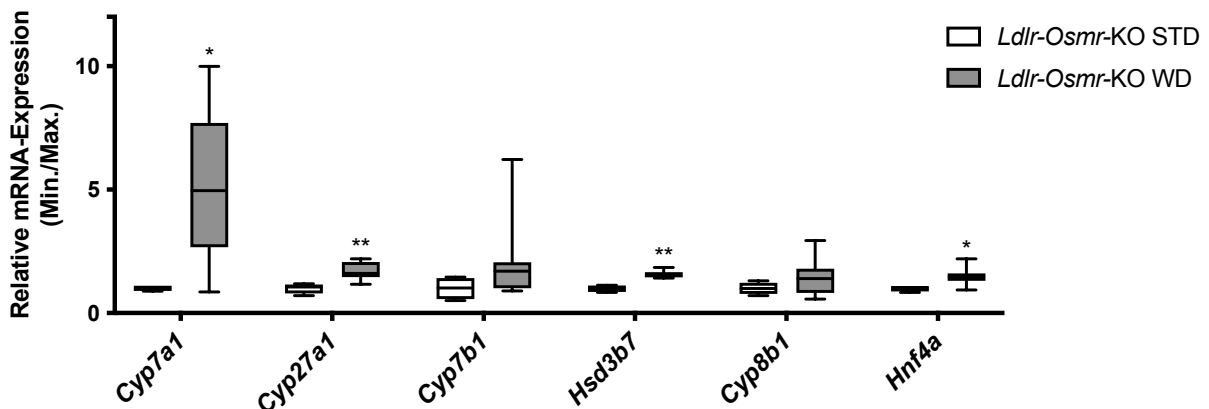


Abbildung 30. Hepatische Expression von Genen der Gallensäuresynthese nach *Western Diet* oder Standarddiät. Darstellung der relativen mRNA-Expression von *Cyp7a1*, *Cyp27a1*, *Cyp7b1*, *Hsd3b7* (Hydroxy- δ -5-Steroid-Dehydrogenase 3 β - und Steroid δ -Isomerase 7), *Cyp8b1* und *Hnf4a* (engl. *Hepatocyte Nuclear Factor 4a*) in *Ldlr-Osmr*-KO-Mäusen, die eine *Western Diet* (WD) über 12 Wochen oder eine Standarddiät (STD) über den gleichen Zeitraum erhielten. $n=4$ für STD, $n=10$ für WD. Unterschiede wurden durch Verwendung des Mann-Whitney U-Tests berechnet. * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$ kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen.

Ebenso wie die Gene der biliären Cholesterinexporter zeigten auch die untersuchten Gene der Gallensäuresynthese eine erhöhte Expression in mit WD gefütterten Tieren (siehe Abbildung 30). Bei *Cyp7a1*, *Cyp27a1* und *Hsd3b7* war dieser Effekt signifikant (*Cyp7a1* $p=0,0240$; *Cyp27a1* $p=0,0040$; *Hsd3b7* $p=0,0020$). *Hnf4a*, dessen Genprodukt die basale Expression von *Cyp7a1* reguliert, war in WD-Mäusen ebenfalls hochreguliert ($p=0,0140$).

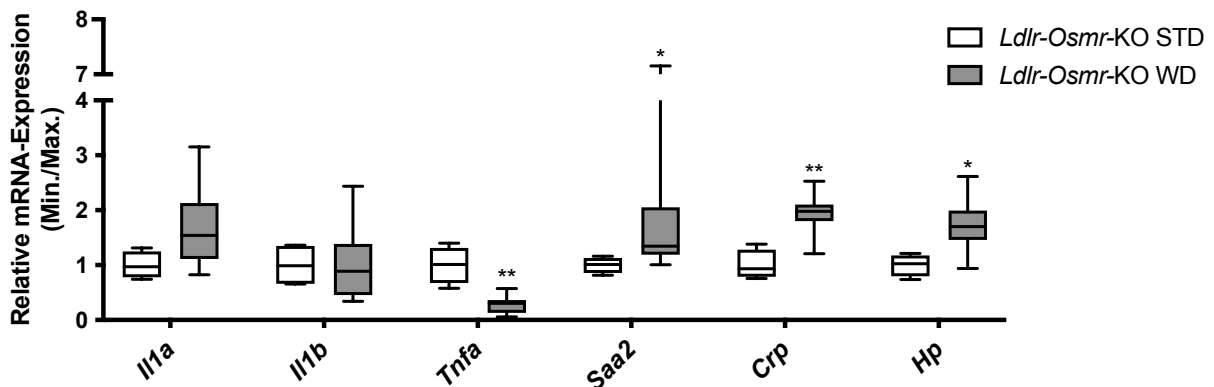


Abbildung 31. Hepatische Expression von Genen mit Beteiligung an der Akute-Phase-Reaktion nach *Western Diet* oder Standarddiät. Darstellung der relativen mRNA-Expression von *Il1a* (Interleukin-1 α), *Il1b* (Interleukin-1 β), *Tnfa* (Tumor-Nekrose-Faktor α), *Crp* (C-Reaktives Protein), *Hp* (Haptoglobin) und *Saa2* (Serum-Amyloid A2) in *Ldlr-Osmr*-KO-Mäusen, die eine *Western Diet* (WD) über 12 Wochen oder eine Standarddiät (STD) über den gleichen Zeitraum erhielten. $n=4$ für STD, $n=10$ für WD. Unterschiede wurden durch Verwendung des Mann-Whitney U-Tests berechnet. * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$ kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen.

Die mRNA-Expression von Genen der Akute-Phase-Reaktion ist in Abbildung 31 dargestellt. In mit WD gefütterten Mäusen war die Expression von *Ii1a* höher als in STD-Mäusen ($p=0,0226$), die Expression von *Tnfa* war jedoch in WD-Mäusen niedriger ($p=0,0190$). Die Expression von *Ii1b*, dessen Genprodukt ebenfalls als Akute-Phase-Induktor der Leber bekannt ist, war zwischen den beiden Diätgruppen nicht verschieden. Die *Ii6*-Expression war in beiden Gruppen nicht nachweisbar. Die Gene der Akute-Phase-Proteine Serum-Amyloid A2 (Gen *Saa2*), CRP und Haptoglobin (Gen *Hp*) waren in WD-Tieren signifikant stärker exprimiert (*Saa2* $p=0,0140$; *Crp* $p=0,0040$; *Hp* $p=0,0240$).

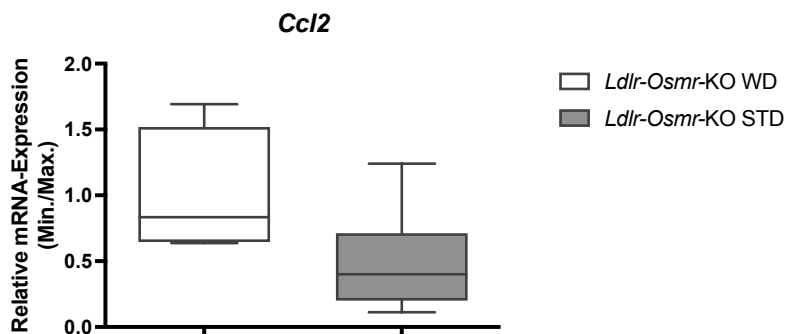


Abbildung 32. Hepatische Expression von *Ccl2* nach *Western Diet* oder Standarddiät. Darstellung der relativen mRNA-Expression von *Ccl2* (CC-Chemokinligand 2) in *Ldlr-Osmr-KO*-Mäusen, die eine *Western Diet* (WD) über 12 Wochen oder eine Standarddiät (STD) über den gleichen Zeitraum erhielten. $n=4$ für STD, $n=10$ für WD. Unterschiede wurden durch Verwendung des Mann-Whitney U-Tests berechnet.

Neben den inflammatorischen Zytokinen, die die Akute-Phase-Reaktion der Leber induzieren, ist CCL2 ein wichtiges Chemokin, dem eine Rolle bei der Progression der NAFLD zugeschrieben wird (130). Die mRNA-Expression von *Ccl2* wird in Abbildung 32 gezeigt. Es wurde in unseren mit WD gefütterten Tieren schwächer exprimiert als in STD-Tieren, der Effekt war allerdings nicht signifikant ($p=0,0759$).

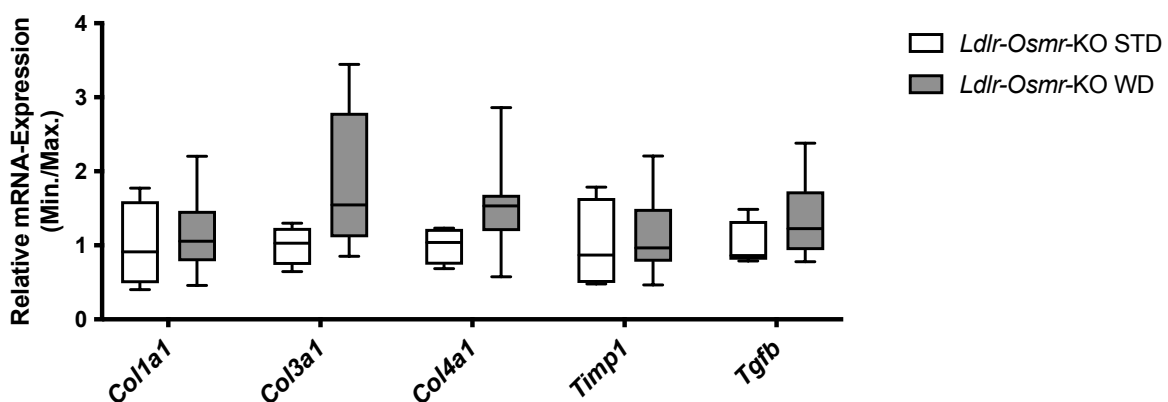


Abbildung 33. Hepatische Expression von Genen der Fibrogenese nach *Western Diet* oder Standarddiät. Darstellung der relativen mRNA-Expression von *Col1a1* (Kollagen I), *Col3a1* (Kollagen III), *Col4a1* (Kollagen IV), *Timp1* (engl. *Tissue Inhibitor Of Metalloproteinases 1*) und *Tgfb* (engl. *Transforming Growth Factor β*) in *Ldlr-Osmr-KO*-Mäusen, die eine *Western Diet* (WD) über 12 Wochen oder eine Standarddiät (STD) über den gleichen Zeitraum erhielten. $n=4$ für STD, $n=10$ für WD. Unterschiede wurden durch Verwendung des Mann-Whitney U-Tests berechnet.

Die Analyse der mRNA-Expression von Genen, die an der Produktion von Extrazellulärmatrix in der Leber beteiligt sind, ist in Abbildung 33 gezeigt. In WD-Mäusen war die Expression der Gene von Kollagen III (Gen *Col3a1*) und IV (Gen *Col4a1*) höher als in STD-Mäusen, allerdings ohne Signifikanz (*Col3a1* $p=0,0759$, *Col4a1* $p=0,0539$). *Col1a1*, *Timp1* und *Tgfb* wurden in beiden Diätgruppen gleich stark exprimiert.

4.6 Einfluss von OSM auf die mRNA-Expression in HepG2-Zellen

4.6.1 Expression der OSM-Rezeptor-Gene in HepG2-Zellen

Die Expression seiner Rezeptoren ist die Voraussetzung für die Wirkung von OSM an den kultivierten humanen Hepatom-Zellen. Um zu untersuchen, ob HepG2-Zellen ein geeignetes Zellsystem zur Untersuchung der OSM-vermittelten Signaltransduktion sind, wurde deshalb die Genexpression von *OSMR*, *LIFR* und *IL6ST* analysiert. Es zeigte sich, dass die Gene aller 3 Rezeptoruntereinheiten in HepG2-Zellen exprimiert wurden.

4.6.2 Regulation der mRNA-Expression von *CYP7A1* durch OSM und andere IL-6-Typ-Zytokine

Die Ergebnisse der zuvor dargestellten Versuche in *Ldlr-Osmr*-KO-Mäusen legten nahe, dass OSM die Expression von *Cyp7a1* reprimieren kann. Um zu untersuchen, ob dies auch in humanen Zellen beobachtet werden kann, wurde die *CYP7A1*-Expression in mit OSM behandelten HepG2-Zellen gemessen. Es zeigte sich, dass die Behandlung mit OSM die Expression von *CYP7A1* in HepG2-Zellen konzentrations- und zeitabhängig reduzierte (siehe Abbildung 34). Nach Behandlung der humanen Hepatomzellen mit 10 ng/ml OSM sank die *CYP7A1*-Expression nach 4 Stunden auf 74% ($p=0,0002$) und nach 24 Stunden auf 6% des Ausgangswertes ($p<0,0001$). Mit der höheren OSM-Konzentration von 100 ng/ml fiel die *CYP7A1*-Expression auf 35% ($p<0,0001$) bzw. 1% ($p<0,0001$) des Ausgangswertes.

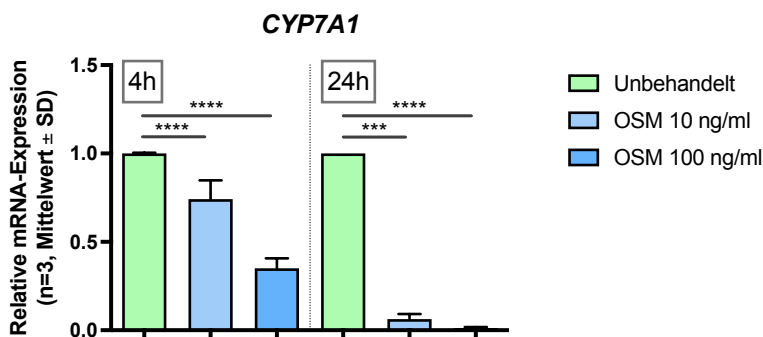


Abbildung 34. Relative mRNA-Expression von *CYP7A1* nach Behandlung von HepG2-Zellen mit OSM. Darstellung der relativen mRNA-Expression von *CYP7A1*. HepG2 Zellen wurden über 4 und 24 Stunden mit humanem rekombinantem OSM in den Konzentrationen 10 ng/ml und 100 ng/ml behandelt. Unterschiede wurden mithilfe der ANOVA und Šidák-Korrekturtest berechnet. *** $p<0,001$ und **** $p<0,0001$ kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen.

Um die Spezifität des Effektes für OSM zu testen, wurden die Zellen in den darauffolgenden Versuchen mit zwei anderen Zytokinen der IL-6-Familie, IL-6 und LIF, über 24 Stunden

behandelt. Abbildung 35 zeigt die *CYP7A1*-Expression nach dieser Behandlung. Bei beiden Zytokinen kam es ebenfalls zu einer Suppression der *CYP7A1*-Genexpression, allerdings in geringerem Ausmaß. Bei LIF-Behandlung mit 10 ng/ml sank die Expression auf durchschnittlich 27% des Ausgangswertes ($p < 0,0001$), während sie unter IL-6-Behandlung mit 20 ng/ml auf durchschnittlich 47% des Ausgangswertes ($p = 0,01$) fiel. Durch Erhöhung der Konzentration von LIF und IL-6 auf 100 ng/ml zeigte sich keine Steigerung des Effektes (LIF $p < 0,0001$; IL-6 $p = 0,0069$).

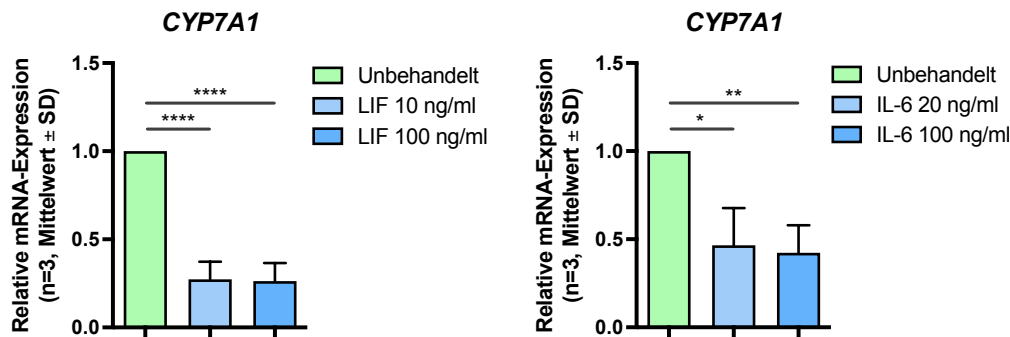


Abbildung 35. Relative mRNA-Expression von *CYP7A1* nach Stimulation mit LIF und IL-6 in HepG2-Zellen. Darstellung der relativen mRNA-Expression von *CYP7A1*. HepG2-Zellen wurden über 24 Stunden mit LIF in den Konzentrationen 10 ng/ml und 100 ng/ml bzw. IL-6 in den Konzentrationen 20 ng/ml und 100 ng/ml behandelt. Unterschiede wurden mithilfe der ANOVA und Šidák-Korrekturtest berechnet. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und **** $p < 0,0001$ kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen.

4.6.3 Regulation der mRNA-Expression von *HNF4A* und *SHP* durch OSM

Um den Mechanismus der Suppression von *CYP7A1* durch OSM zu beleuchten, wurde die Genexpression von *HNF4A* und *SHP* untersucht. Die Produkte beider Gene sind bekanntermaßen an der Regulation der *CYP7A1*-Expression beteiligt (133) und könnten daher den beobachteten OSM-Effekt vermitteln. Wie in Abbildung 36 dargestellt, zeigte sich eine Reduktion der *HNF4A*-Expression auf 72% des Ausgangswertes nach 24 Stunden Behandlung mit 10 ng/ml OSM ($p = 0,0723$). Dieser Effekt war jedoch nicht signifikant. Die Expression von *SHP* veränderte sich durch die Behandlung mit OSM nicht deutlich ($p = 0,3003$).

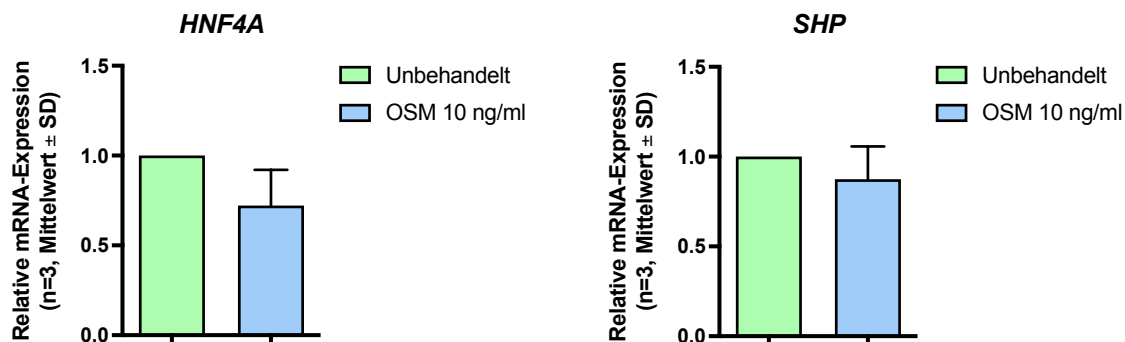


Abbildung 36. Relative mRNA-Expression von *HNF4A* und *SHP* nach Stimulation mit OSM in HepG2-Zellen. Darstellung der relativen mRNA-Expression von *HNF4A* (engl. *Hepatocyte Nuclear Factor 4a*) und *SHP* (engl. *Small Heterodimer Partner*). HepG2-Zellen wurden über 24 Stunden mit OSM in einer Konzentration von 10 ng/ml behandelt. Unterschiede wurden mithilfe des t-Tests berechnet.

4.6.4 Reversibilität der *CYP7A1*-Suppression durch Signalweg-Inhibitoren

Um herauszufinden, welcher Signalweg dem Effekt von OSM auf die *CYP7A1*-Expression zugrunde liegen könnte, wurde die Reversibilität des Effektes durch unterschiedliche Signalweg-Inhibitoren untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 37 dargestellt. Die Suppression der *CYP7A1*-Expression durch OSM konnte durch die Zugabe eines JAK-Inhibitors oder MEK-Inhibitors vollständig und durch einen ERK1/2-Inhibitor größtenteils antagonisiert werden (JAK-Inhibitor $p < 0,0001$; MEK-Inhibitor $p < 0,0001$; ERK1/2-Inhibitor $p = 0,0014$). Bei Zugabe des JAK-Inhibitors zeigte sich sogar eine gegenüber unbehandelten Zellen leicht erhöhte *CYP7A1*-Expression (Relative Genexpression im Mittel 1,25). Die Zugabe von DMSO zu unbehandelten Zellen veränderte die Expression von *CYP7A1* nicht.

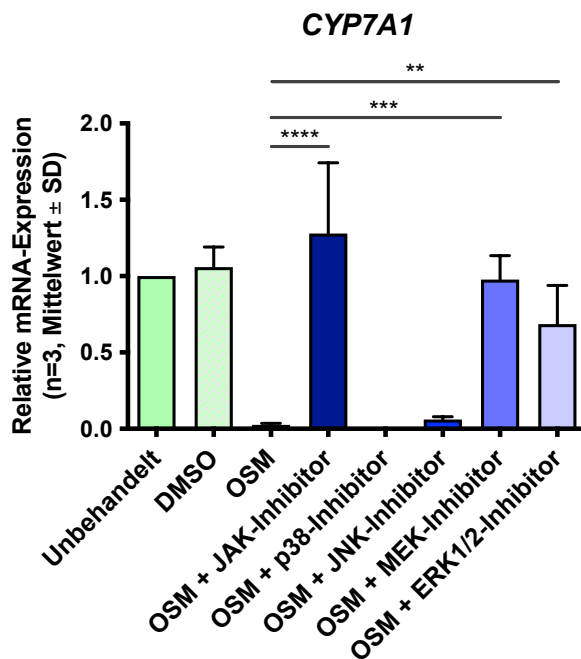


Abbildung 37. Relative mRNA-Expression von *CYP7A1* nach Behandlung mit OSM und Signalweg-Inhibitoren in HepG2-Zellen. Darstellung der relativen mRNA-Expression von *CYP7A1*. HepG2-Zellen wurden über 16 Stunden mit OSM 10 ng/ml behandelt. Zusätzlich wurden dem Kulturmedium die angegebenen Signalweg-Inhibitoren zugesetzt. JAK = Januskinase, MAPK = engl. *Mitogen Activated Protein Kinase*, p38 = p38-MAPK, JNK = c-Jun-N-terminale-Kinase, MEK = MAPK/ERK-Kinase, ERK1/2 = engl. *Extracellular-signal Regulated Kinase 1/2*. Unterschiede wurden mithilfe der ANOVA und Šidák-Korrekturtest berechnet. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ und **** $p < 0,0001$ kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen.

5. DISKUSSION

Um die Rolle von OSM in der Pathogenese der NAFLD und damit seine Eignung als mögliches therapeutisches Zielprotein weiter aufzuklären, sollte in dieser Arbeit der Einfluss der OSMR β -Signaltransduktion auf die Histologie und Genexpression der Leber mithilfe von *Osmr*-KO-Mäusen auf WT- und *Ldlr*-KO-Hintergrund untersucht werden. Weiterhin sollte untersucht werden, welchen Einfluss die Gabe einer cholesterin- und fettreichen Diät auf Histologie und Genexpression der Leber hat.

5.1 *Western Diet* führt zu beginnender Steatose in WT-Mäusen und induziert Gene der Cholesterinmetabolisierung und –exkretion in *Ldlr-Osmr*-KO-Mäusen

Um den Einfluss der cholesterinreichen WD auf die Entwicklung einer hepatischen Steatose zu beleuchten, wurde eine kleine Gruppe aus 4 WT-Mäusen, die STD erhielten, mit 7 WT-Mäusen, die WD erhielten, verglichen. Die WD enthielt 15-21% Fett und 0,15% Cholesterin. Histologisch fiel bei WD-Tieren eine beginnende hepatische Steatose auf. Die Bildanalyse der Sudan-IV-gefärbten Leberschnitte bestätigte den Augenschein. Passend dazu hatten WD-Tiere im Trend einen höheren hepatischen Cholesteringehalt, während der Triglyzeridgehalt sich nicht unterschied. Unsere Ergebnisse passen zu jenen von Matsuzawa *et al.*, die den Einfluss unterschiedlicher Diäten auf die Entwicklung einer hepatischen Steatose untersuchten (134). Mäuse, die über 6 Wochen mit einer atherogenen Diät (14% Fett, 1,25% Cholesterin, 0,5% Cholat) gefüttert wurden, entwickelten eine hepatische Steatose mit deutlicher Erhöhung des hepatischen Cholesteringehaltes und geringer Veränderung des hepatischen Triglyzeridgehaltes (134). In der genannten Publikation wird ein deutlich stärkerer und signifikanter diätbedingter Anstieg des Cholesteringehaltes der Leber gemessen. Dies kann durch den mehr als 8-fach höheren Cholesteringehalt der Diät sowie den die Cholesterinaufnahme erhöhenden Zusatz von Cholat erklärt werden (135).

Durch die WD erhöhte sich der Lipidgehalt der Leber, es zeigten sich jedoch keine entzündlichen Infiltrate oder Faservermehrung im Sinne einer Fibrose. Andere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass durch die Verwendung aggressiverer Diäten mit höherem Cholesterinanteil (0,9% bzw. 1% Cholesterin) im gleichen Zeitraum bereits eine NASH entstehen kann (43, 136). Eine Diät mit 15% Fett und 1% Cholesterin konnte erst nach 30 Wochen eine nachweisbare Fibrose induzieren (43). Eine andere Arbeitsgruppe zeigte, dass eine atherogene Diät mit 14% Fett, 1,25% Cholesterin und 0,5% Cholat bereits nach 6 Wochen zu einer NASH mit beginnender Fibrosierung des Lebergewebes führt (134). Dieser Effekt wurde durch Zusatz einer fettreichen Komponente zum Futter weiter verstärkt (134). Für die Induktion einer Leberfibrose scheint also eine längere Diät, einen höheren Cholesterinanteil der Diät oder der Zusatz von Cholat zur Erhöhung der Cholesterinaufnahme aus der Nahrung nötig zu sein.

Die WD beeinflusste die Spiegel von Triglyzeriden und freien Fettsäuren im Serum von WT-Mäusen nicht. In der Literatur ist hingegen beschrieben, dass der Zusatz von Cholesterin zur Nahrung die Triglyzerid-Spiegel senkt. Als Begründung wird angenommen, dass der nahrungsbedingte Überschuss an freiem Cholesterin in Hepatozyten dazu führt, dass Fettsäuren für die Synthese von Cholesterinestern statt Triglyzeriden verwendet werden (60). Übereinstimmend mit unseren Daten zeigten Matsuzawa *et al.* keinen signifikanten Einfluss der Diätzusammensetzung auf die Fettsäure-Spiegel (134). Es ist davon auszugehen, dass unsere Tiere aufgrund der moderaten Diät mit vergleichsweise geringem Cholesterin- und Fettanteil keine diätbedingten Veränderungen der Serum-Triglyzeride und -Fettsäuren zeigen. Es ist zu beachten, dass die in dieser Arbeit verglichenen Mäuse der STD- und WD-Gruppe zu unterschiedlichen Zeitpunkten gehalten und geopfert wurden und somit eine geringere Standardisierung vorhanden war.

Um den Einfluss der Diät auf die Genexpression in der Leber zu untersuchen, wurden *Ldlr-Osmr*-KO-Mäuse auf STD und WD verglichen. Während die Expression der Gene der Fettsäuresynthese (*Fasn*, *Acc*, *Elovl6*) durch die Diät nicht verändert wurde, wurden die Gene für den Scavenger-Rezeptor-B1 (*Scarb1*), den Cholesterintransporter ABCG5/G8 (*Abcg5*, *Abcg8*) sowie alle untersuchten Gene der Gallensäuresynthese, insbesondere *Cyp7a1*, *Cyp27a1* und *Hsd3b7*, in WD-Mäusen verstärkt exprimiert. Dies kann als Kompensationsmechanismus für das mit der Nahrung zugeführte Cholesterin in WD-Mäusen verstanden werden. Überschüssiges Cholesterin kann aus der Peripherie durch eine erhöhte Bildung des Scavenger-Rezeptors B1 vermehrt in Hepatozyten aufgenommen und über ABCG5/G8 direkt in die Galle sezerniert oder zu Gallensäuren metabolisiert werden. Die Expression von *Hmgcr*, das für das Schrittmacherenzym der Cholesterinsynthese kodiert, blieb durch die Diät unbeeinflusst. Interessanterweise scheint das mit der Nahrung zugeführte Cholesterin demnach nicht durch Drosselung der körpereigenen Cholesterinbiosynthese, sondern durch Erhöhung der biliären Cholesterinausscheidung kompensiert zu werden. Die Gene der Zytokine, die die Akute-Phase-Reaktion induzieren, zeigten keine konklusive Regulation abhängig von der Diät: Während *Tnfa* bei WD-Tieren überraschenderweise herunterreguliert war, war *I1a* in WD-Tieren hochreguliert. Die Gene der Akute-Phase-Proteine CRP und Haptoglobin waren in WD-Tieren stärker exprimiert, während sich die Expression von *Saa2* nicht veränderte. Gene mit Beteiligung an der hepatischen Fibrogenese zeigten keine Diät-abhängige Regulation in unseren Mäusen. Für WT-Mäuse, die eine cholesterinreiche Diät erhalten, ist die Entwicklung einer Steatose bis hin zur NASH bei gleichzeitiger Hochregulation von Genen der Fettsäuresynthese (*Fasn*), der Fibrogenese (*Col1a1*) und proinflammatorischer Zytokine (*Tnfa*) beschrieben (134). Die im Vergleich dazu fehlende Auswirkung der WD in unseren Tieren auf die Regulation der Fettsäuresynthese und Fibrogenese ist wahrscheinlich durch die vergleichsweise milde

Komposition der WD mit einem moderaten Cholesterinanteil von 0,15% im Gegensatz zu 1,25% bei der genannten Publikation bedingt. Weiterhin wurden in der vorliegenden Arbeit *Ldlr-Osmr*-KO-Mäuse untersucht. Die Genregulation als Reaktion auf die Diätveränderung kann jedoch durch den veränderten Cholesterinmetabolismus in diesen Mäusen von der Regulation in WT-Mäusen abweichen. Die beiden Diätgruppen wurden außerdem zu unterschiedlichen Zeitpunkten gehalten und geopfert, was eine Verzerrung der Daten wahrscheinlicher macht. Dies sollte bei der Interpretation der Daten beachtet werden.

Die Hochregulation von Genen, die die Exkretion und Metabolisierung von Cholesterin fördern, sowie die beginnende hepatische Steatose ohne Inflammation oder Fibrose bei mit WD gefütterten WT-Mäusen weist auf intakte Kompensationsmechanismen in diesen Tieren hin.

5.2 OSMR β -Signaltransduktion schützt vor hepatischer Steatose in WT-Mäusen und fördert ihre Entwicklung in *Ldlr*-KO-Mäusen

Um den Einfluss der OSMR β -Signaltransduktion auf Histologie und Genexpression der Leber sowie Serum-Lipid-Spiegel zu untersuchen, wurden WT-, *Osmr*-KO-, *Ldlr*-KO- und *Ldlr-Osmr*-KO-Mäuse verglichen, die über 12 Wochen eine WD erhielten. *Osmr*-KO-Mäuse entwickelten nach 12 Wochen WD eine hepatische Steatose ohne Inflammation. Der Trend zur vermehrten Steatose in *Osmr*-KO- gegenüber WT-Mäusen wurde durch Flächenquantifizierung in Sudan-IV-gefärbten Leberschnitten objektiviert. Diese histologischen Auffälligkeiten konnten durch Bestimmung von Triglyzerid- und Cholesterinkonzentrationen in Leber-Lipidextrakten bestätigt werden, auch hier war der Unterschied jedoch nicht signifikant. Der Cholesteringehalt im Lebergewebe war in allen Gruppen deutlich höher als der Triglyzeridgehalt. Dies zeigt, dass die histologisch nachgewiesenen Lipidtröpfchen hauptsächlich aus Cholesterin und seinen Estern und zu einem geringeren Anteil aus Triglyzeriden bestehen.

Auch die japanische Arbeitsgruppe um Komori *et al.* zeigte, dass *Osmr*-KO-Mäuse, die über 8 Wochen eine fettreiche Diät erhielten, gegenüber WT-Mäusen eine stärkere Steatose aufwiesen (110). Bei ihrer Analyse der Leber-Lipidextrakte konnte dies bestätigt werden. Sie fanden im Vergleich zu unseren Daten eine hohe Konzentration von Triglyzeriden (100-300 mg/g) und eine geringere Konzentration von Cholesterin (2-4 mg/g) im Lebergewebe. In der Literatur findet man eine hohe Variabilität der intrahepatischen Lipidkomposition, die von der Diätzusammensetzung der Tiere abhängt. So erhöht sich der Cholesteringehalt der Leber nach Zusatz von Cholesterin zur Nahrung deutlich (43, 60). Nachdem Komori und Kollegen eine Diät mit 56,7% Fett ohne Zusatz von Cholesterin verwendeten, während unsere Tiere eine WD mit 0,15% Cholesterin und einem moderaten Fettanteil von 15-21% erhielten, können die großen Unterschiede bei der Leberlipidzusammensetzung mit den unterschiedlichen Diäten erklärt werden. Weiterhin sind

die verwendeten Kits zur Ermittlung der Triglyzerid- und Cholesterinkonzentration nur für Serum- oder Plasma-Proben validiert, eine Beeinflussung der Reagenzien durch in den Lipidextrakten enthaltene Lösungsmittelreste ist daher nicht ausgeschlossen. Die Verwendung kolorimetrischer Kits ist jedoch auch für die Analyse von Gewebelysaten weit verbreitet. In der Literatur werden häufig ebenfalls kolorimetrische Test-Kits mit dem gleichen Testprinzip von anderen Herstellern verwendet (110). Für zukünftige Experimente stellt die Flüssig- oder Gaschromatographie eine alternative Methode zur Messung des Triglyzerid- und Cholesteringehalts in Leberlysaten dar. Die Daten zur Leberhistologie aus *Osmr*-KO-Mäusen suggerieren einen protektiven Effekt von OSM auf die Leberverfettung. Bei der Interpretation der Daten sollte beachtet werden, dass neben OSM auch IL-31 den OSMR β als Rezeptoruntereinheit binden kann. Entsprechend sind in *Osmr*-KO-Mäusen auch IL-31-Effekte gestört und nicht alle Beobachtungen können ohne Zweifel auf OSM zurückgeführt werden. Weiterhin gibt es auch in *Osmr*-KO-Mäusen ein erhaltenes *Signaling* von OSM über den Typ-1-Rezeptorkomplex, sodass OSM einen Teil seiner Funktionen auch in diesen Mäusen weiterhin erfüllen kann. Grundsätzlich sind *Osmr*-KO-Mäuse gesund, vermehrungsfähig und erreichen das Erwachsenenalter (137). Da OSM die Differenzierung fötaler Hepatozyten fördert (138), ist es dennoch möglich, dass *Osmr*-KO-Mäuse eine veränderte Organentwicklung aufweisen und diese zu dem veränderten Phänotyp beiträgt. Umstrittene Evidenz gibt es zur Fähigkeit von OSM, die Differenzierung pluripotenter embryonaler Stammzellen zu hemmen (139). In der genannten Publikation wurde allerdings humanes OSM zur Behandlung muriner Zellen verwendet. Da humanes OSM auf murinen Zellen nur an den LIFR β , nicht aber an den OSMR β bindet (140), ist davon auszugehen, dass es sich hierbei um einen LIFR β -vermittelten OSM-Effekt handelte, der in *Osmr*-KO-Mäusen nicht verändert ist. Weitreichende Entwicklungsstörungen in den Tieren sind daher unwahrscheinlich. Komori *et al.* zeigten passend zur gesteigerten Steatose in *Osmr*-KO-Mäusen auch, dass nach intraperitonealer Applikation von OSM in genetisch und ernährungsbedingt adipösen Mäusen eine Verbesserung von hepatischer Steatose und Insulinsensitivität auftritt (106). In OSM-behandelten HepG2-Zellen sowie in Lebern von OSM-behandelten Hamstern wurde eine erhöhte Aktivität der Enzyme *Long-chain-fatty-acid-CoA-Ligase 3* (ACSL3) und *Long-chain-fatty-acid-CoA-Ligase 5* (ACSL5) nachgewiesen, die mit einer erhöhten β -Oxidation und einer verminderten Lipidakkumulation assoziiert war (141). Weiterhin induziert OSM die Biosynthese des LDLR in Hepatozyten (104). In NAFLD-Patienten ist die hepatische *Ldlr*-Expression vermindert (56) und *Ldlr*-KO-Mäuse entwickeln eine hepatische Steatose (118, 142). Deshalb liegt nahe, dass OSM durch Induktion der *Ldlr*-Expression vor der Entwicklung einer Steatose schützen kann. Dieser metabolisch protektive Effekt von OSM entfällt naturgemäß in *Ldlr*-KO-Mäusen.

Wie erwartet, zeigten *Ldlr*-KO-Mäuse nach 12 Wochen WD histologisch eine deutliche Steatose. Obwohl in der Literatur beschrieben wird, dass die Zugabe von Cholesterin (0,15% Cholesterin) zu einer fettreichen Diät (36,6% Fett) bei *Ldlr*-KO-Mäusen zur Verstärkung von Dyslipidämie, hepatischer Steatose und Inflammation führt (142), zeigten unsere *Ldlr*-KO-Mäuse keine Zeichen einer Inflammation. Wahrscheinlich ist zur Induktion fortgeschrittener Stadien der NAFLD eine längere Dauer der atherogenen Diät oder ein höherer Fettanteil nötig (142). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Lebergewicht und die durch Lipidfärbung quantifizierte Steatose in den untersuchten Mäusen gut korrelieren. Passend zum geringeren Lebergewicht von *Ldlr-Osmr*-KO-Mäusen war folglich die Steatose in diesen Tieren gegenüber *Ldlr*-KO-Mäusen geringer ausgeprägt. In der Leber von *Ldlr-Osmr*-KO-Mäusen wurde entsprechend ein geringerer Gehalt an Triglyzeriden und Cholesterin im Vergleich zu *Ldlr*-KO-Mäusen gefunden. Wie in *Ldlr*-KO-Mäusen gab es auch in *Ldlr-Osmr*-KO-Mäusen keinen Hinweis auf Entzündungsaktivität des Lebergewebes. Analog zu den Mäusen auf WT-Hintergrund bestanden die Lipidtröpfchen hauptsächlich aus Cholesterin und seinen Estern und zu einem geringeren Anteil aus Triglyzeriden. In *Ldlr*-KO-Mäusen scheint OSM also zur Entwicklung einer Steatose beizutragen.

Auch in der Literatur gibt es Evidenz, dass OSM die Entwicklung und Progression einer NAFLD fördern kann. So ist die hepatische *Osm*-mRNA-Expression bei Mäusen mit ernährungsbedingter Steatose und noch mehr bei Steatohepatitis erhöht (107). Auch im subkutanen Fettgewebe von adipösen Mäusen und Menschen finden sich erhöhte *Osm*-mRNA- und OSM-Protein-Spiegel, die bei Menschen mit dem Körpergewicht korrelieren (113). In Kupffer-Zellen produziertes OSM vermindert *in vitro* die hepatozytäre Expression des *Cpt1*-Gens, das für das Schrittmacherenzym der β -Oxidation kodiert (107). Weiterhin vermindert OSM die Expression von *Mtp*, dessen Genprodukt an der Zusammensetzung von VLDL-Partikeln beteiligt ist (107). Dies suggeriert eine Beteiligung von OSM an der Lipidakkumulation in Hepatozyten.

Es ist bekannt, dass OSM am fibrotischen Umbau im Rahmen chronischer Lebererkrankungen beteiligt ist (143). Am ehesten aufgrund der von uns durchgeführten kurzen und milden Diät zeigte keines unserer Versuchstiere histologisch eine Faservermehrung im Sinne einer Leberfibrose. Ein Einfluss des *Osmr*-Knockouts auf die Leberfibrosierung konnte demnach nicht nachgewiesen werden.

5.3 OSMR β -Defizienz beeinflusst Dyslipidämie in WT- und *Ldlr*-KO-Mäusen

Passend zur im Vorfeld dieser Arbeit festgestellten Dyslipidämie mit Erhöhung von Gesamtcholesterin, VLDL, LDL und HDL in *Osmr*-KO-Mäusen, hatten diese Tiere auch gegenüber WT-Mäusen erhöhte Triglyzerid-Spiegel im Serum. Auch in der Literatur ist eine Serum-Triglyzerid-Erhöhung in *Osmr*-KO-Mäusen beschrieben (110). Während die in der vorliegenden Arbeit untersuchten *Osmr*-KO-Mäuse Triglyzerid-Spiegel von durchschnittlich

108 mg/dl hatten, waren sie bei der japanischen Arbeitsgruppe um Komori mit etwa 176 mg/dl deutlich höher (110). Sie verwendeten allerdings eine Diät mit deutlich höherem Triglyzeridanteil (56%), der wahrscheinlich für diesen Unterschied verantwortlich ist. Die freien Fettsäuren im Serum unterschieden sich in dieser Arbeit zwischen WT- und *Osmr*-KO-Mäusen nicht. Da freie Fettsäuren im Serum das Produkt der Lipolyse im Fettgewebe sind, sind die Fettsäure-Spiegel im Rahmen einer manifesten Insulinresistenz regelhaft erhöht (144). Eine manifeste Insulinresistenz in unseren *Osmr*-KO-Mäusen ist demnach, und auch in Anbetracht der gegenüber WT-Mäusen unveränderten Blutglukose-Werte (siehe Abschnitt 1.4.2 Vorliegende Ergebnisse), unwahrscheinlich. Ein unmittelbarer Test der Insulinsensitivität im Sinne eines Glukose-Toleranz-Tests (GTT) oder Insulin-Toleranz-Tests (ITT) erfolgte jedoch nicht. Komori *et al.* konnten in ihren *Osmr*-KO-Mäusen hingegen eine leichte Erhöhung der freien Fettsäuren messen und durch einen intraperitonealen GTT sowie einen ITT eine Insulinresistenz nachweisen (110). Insgesamt sind die von Komori *et al.* gemessenen Serum-Spiegel freier Fettsäuren in WT-Mäusen und *Osmr*-KO-Mäusen deutlich höher als unsere Werte (im Mittel 1,8 bzw. 1,9 mmol/l in WT- bzw. *Osmr*-KO-Mäusen bei Komori *et al.* gegenüber 0,8 mmol/l in beiden Gruppen in dieser Arbeit) (110). Ein Grund dafür könnte auch hier der höhere Triglyzeridgehalt der von Komori *et al.* verwendeten Diät sein.

Wie aufgrund der Erhöhung des triglyzeridhaltigen VLDL bei *Ldlr*-KO-Mäusen zu erwarten war (siehe Abschnitt 1.4.2 Vorliegende Ergebnisse), zeigten diese Tiere auch erhöhte Triglyzerid-Spiegel im Serum verglichen mit WT-Mäusen. Ebenso wie VLDL und die anderen Lipoproteine waren die Triglyzerid-Spiegel bei *Ldlr-Osmr*-KO- etwas niedriger als bei *Ldlr*-KO-Mäusen. OSM scheint in *Ldlr*-KO-Mäusen demnach einen günstigen Effekt auf die Dyslipidämie zu haben. Die Übertragbarkeit auf dyslipidämische NAFLD-Patienten ist jedoch nicht zweifelsfrei gegeben. Da der LDLR von nahezu allen Zelltypen gebildet wird, um die Versorgung mit Cholesterin sicherzustellen, stellt ein globaler *Knockout* seines Gens einen großen Eingriff in die Cholesterinhomöostase des Körpers dar. Eine Störung zellulärer Funktionen aufgrund mangelnder Cholesterinaufnahme ist dennoch nicht zu erwarten. Denn neben der rezeptorabhängigen Aufnahme kann LDL auch rezeptorunabhängig aufgenommen werden (145). *Ldlr*-KO-Mäuse sind grundsätzlich gesund, vermehrungsfähig und erreichen das Erwachsenenalter (146). Aufgrund der Ausprägung mehrerer Komponenten des Metabolischen Syndroms in *Ldlr*-KO-Mäusen (118, 142), wie sie auch für das NAFLD-Patientenkollektiv typisch ist, scheinen diese Tiere ein geeignetes Modell zur Erforschung der NAFLD zu sein (118). Neben einer leichten Verringerung der Triglyzerid-Spiegel zeigten *Ldlr-Osmr*-KO-Mäuse im Mittel geringere Spiegel freier Fettsäuren verglichen mit *Ldlr*-KO-Mäusen mit erhaltenem OSMR β . Dies kann eine verbesserte Insulinsensitivität in *Ldlr-Osmr*-KO-Mäusen gegenüber *Ldlr*-KO-Mäusen anzeigen.

OSM scheint demnach bei *Ldlr*-KO-Mäusen zur Entwicklung einer Insulinresistenz beizutragen, während es sich bei WT-Mäusen nicht auf die Blutzucker-Spiegel auswirkt. Die Rolle von OSM bei der Entwicklung einer Insulinresistenz wird auch in der Literatur kontrovers diskutiert. Einerseits gibt es Daten, die zeigen, dass OSM die Insulinsensitivität verbessern kann. So weisen *Osmr*-KO-Mäuse eine geringere Insulinsensitivität gegenüber WT-Mäusen auf (111). Weiterhin führte die zweimal tägliche intraperitoneale Applikation von OSM über eine Woche zur Reduktion von Körpergewicht, hepatischer Steatose und Insulinresistenz in WT-Mäusen (106). Allerdings wurden den Tieren bei der intraperitonealen Applikation supraphysiologische OSM-Dosen verabreicht, die den Allgemeinzustand der Tiere beeinträchtigt haben könnten (112). Andererseits gibt es Publikationen, die auf eine Beteiligung des Zytokins an der Pathogenese der Insulinresistenz hinweisen. *In vitro* wurde beobachtet, dass OSM die Insulin-abhängige AKT-Aktivierung in isolierten Ratten-Hepatozyten reduziert (107). Passend dazu korrelieren OSM-Expressionsspiegel im subkutanen Fettgewebe von adipösen Menschen mit den Insulin-Spiegeln im Blut (113). Die Sekretion von Adiponektin wird im Fettgewebe durch OSM vermindert (147). Adiponektin steigert die Insulinsensitivität (148) und seine Serum-Spiegel korrelieren im Menschen invers mit dem Typ-2-Diabetes-Risiko (149). Außerdem hemmt OSM die Dedifferenzierung von Adipozyten (114, 150), was ein kritischer Prozess in der Pathogenese der Insulinresistenz ist (151, 152). In Adipozyten aus humanem subkutanem Fettgewebe induziert OSM die Expression von Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) (153). PAI-1-Plasma-Spiegel sind mit einem erhöhten Diabetes-Risiko assoziiert (154) und die pharmakologische Inhibition von PAI-1 verbessert die Insulinsensitivität in Mäusen (155, 156). Diese Daten passen zu den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen aus Mäusen mit *Ldlr*-KO-Hintergrund.

5.4 OSMR β -Signaltransduktion fördert die mRNA-Expression von Genen mit Beteiligung an Inflammation und Fibrogenese in *Ldlr*-KO-Mäusen

Nachdem sich in der Histologie kein Hinweis auf entzündliche Prozesse im Lebergewebe der Mäuse zeigte, wurde die Expression proinflammatorischer Zytokine auf mRNA-Ebene untersucht. CCL2 ist ein Zytokin, das an Orten der Entzündung unter anderem von Monozyten sezerniert wird (157). Da bekannt ist, dass hepatische CCL2-Spiegel bei NAFLD und noch mehr bei NASH erhöht sind, wird angenommen, dass CCL2 zur Progression der NAFLD beiträgt (130). Die Genexpression von *Ccl2* war in dieser Arbeit zwischen WT- und *Osmr*-KO-Mäusen nicht eindeutig verschieden, in *Ldlr*-KO-Mäusen war sie gegenüber WT-Mäusen jedoch deutlich erhöht. Dies weist auf eine beginnende Entzündungsaktivität in unseren *Ldlr*-KO-Mäusen nach 12 Wochen WD hin. Interessanterweise war diese Erhöhung in *Ldlr*-*Osmr*-KO-Mäusen komplett aufgehoben. Dies impliziert eine mögliche Beteiligung von OSM an der Entzündungsreaktion im Rahmen der NAFLD-Progression. Da OSM als Induktor der Akute-Phase-Reaktion in der Leber bekannt ist (158), wurde die mRNA-

Expression der Akute-Phase-Gene *Crp*, *Hp* (Haptoglobin) und *Saa2* (Serum-Amyloid A2) sowie weiterer Akute-Phase-Induktor-Gene wie *Il6*, *Tnfa*, *Il1a* und *Il1b* in den Lebern der Mäuse gemessen. Die mRNA-Expression von *Il6* ließ sich aufgrund zu niedriger Expressionsspiegel nicht verwerten. Die Expression von *Il1b* war in *Osmr*-KO-Mäusen gegenüber WT-Mäusen herunterreguliert, während *Il1a* und *Tnfa* keine Veränderung zeigten. Die *Crp*-Expression war entsprechend in *Osmr*-KO-Mäusen herunterreguliert, *Saa2* war dafür allerdings um den Faktor 2 stärker exprimiert, die *Hp*-Expression war zwischen diesen beiden Gruppen hingegen unverändert. Da SAA2 ein Akute-Phase-Protein ist, das sehr sensitiv und deutlich das Vorhandensein einer Akute-Phase-Reaktion anzeigt (159), ist in unseren *Osmr*-KO-Mäusen keine ausgeprägte Akute-Phase-Reaktion anzunehmen. Übereinstimmend mit diesen Genexpressionsdaten zeigten Komori *et al.*, dass die Serum-Spiegel des Akute-Phase-Proteins SAA nach intraperitonealer Applikation von OSM reduziert waren (106). Die Serum-Spiegel anderer Akute-Phase-Proteine wie Haptoglobin oder Fibrinogen, deren Genexpression bekanntermaßen durch OSM induziert wird (158), wurden von der japanischen Arbeitsgruppe nicht bestimmt. In unseren *Ldlr*-KO-Mäusen ließen sich gegenüber WT-Mäusen um den Faktor 4 erhöhte *Il1a*-mRNA-Spiegel nachweisen. IL-1 α kann in der Leber die Synthese von Akute-Phase-Proteinen induzieren (160). Entsprechend ließ sich in *Ldlr*-KO-Mäusen auch eine erhöhte Expression von *Hp* und *Saa2* nachweisen, wohingegen die *Crp*-Expression unverändert blieb. Anders als im menschlichen Organismus ist CRP bei Mäusen ein schwaches Akute-Phase-Protein, das auf entsprechende Stimuli nur mit einem geringen Anstieg seiner Genexpression reagiert (161, 162). Eine Akute-Phase-Reaktion kann in *Ldlr*-KO-Mäusen demnach auch ohne Anstieg der *Crp*-Expression vorliegen. Der zusätzliche *Osmr*-Knockout bei *Ldlr*-KO-Mäusen führte zwar zu einer Verminderung der Expression von *Il1b*, die mRNA-Expression der Gene der Akute-Phase-Proteine zeigte jedoch keine deutlichen Unterschiede zwischen den Genotypen. In *Ldlr*-KO-Mäusen, in denen die Akute-Phase-Reaktion induziert ist, hat OSM demnach keinen großen Einfluss auf diese.

Neben Genen, die an Entzündungsprozessen beteiligt sind, wurde auch die Expression von Genen untersucht, die an der Bildung von Extrazellulärmatrix in der Leber beteiligt sind. Das Gen *Tgfb* des pleiotropen Zytokins TGF- β war in Lebern der *Osmr*-KO-Mäuse gegenüber WT-Mäusen herunterreguliert. Obwohl bekannt ist, dass TGF- β an der Aktivierung der fibrogenetischen Antwort in HSC beteiligt ist (163) und die Kollagen-I-Synthese als Hauptkomponente der Extrazellulärmatrix von Ratten-Hepatozyten *in vitro* steigert (164), zeigten die mRNA-Spiegel von *Col1a1* und *Col3a1*, die für die Kollagene I und III kodieren, in dieser Arbeit keinen signifikanten Unterschied zwischen WT- und *Osmr*-KO-Mäusen. Allerdings war die Expression von *Col4a1*, das für Kollagen IV kodiert, in *Osmr*-KO-Mäusen gegenüber WT-Mäusen herunterreguliert. Kollagen IV wird als Bestandteil der

Basalmembran im Rahmen einer Leberfibrose verstärkt exprimiert und seine Synthese unterliegt ebenfalls der Stimulation durch TGF- β (165). Während die *Tgfb*-Expression in *Ldlr*-KO- und *Ldlr-Osmr*-KO-Mäusen ebenso hoch war wie in WT-Mäusen, zeigte sich eine deutliche Erhöhung der Expression von *Col1a1*, *Col3a1* und *Col4a1* sowie von *Timp1* in *Ldlr*-KO-Mäusen. In *Ldlr*-KO-Mäusen gab es somit eine erhöhte Expression an der Leberfibrosierung beteiligter Gene. Sowohl *Col1a1* als auch das Gen des Kollagenase-Inhibitors TIMP-1 zeigten in *Ldlr-Osmr*-KO- gegenüber *Ldlr*-KO-Mäusen eine geringere Expression. Dies verträgt sich mit *in vitro*-Daten aus kultivierten humanen Fibroblasten, die nach Stimulation mit OSM eine *TIMP1*-Induktion zeigten (166). Ebenso konnte eine andere Publikation kürzlich zeigen, dass OSM bei Ko-Kultivierung primärer Hepatozyten und hepatischer Makrophagen die Expression von *Tgfb* in hepatischen Makrophagen sowie von *Timp1* in HSC induzieren kann (143). Die kontinuierliche hepatische Überexpression von OSM bei Mäusen führt zur Entwicklung einer Leberfibrose (143). Insgesamt suggerieren unsere Daten eine fördernde Wirkung von OSM auf die Expression profibrogenetischer Gene in *Ldlr*-KO-Mäusen bei geringem Effekt in WT-Mäusen.

5.5 Gegenläufige Regulation der *Cyp7a1*-Expression in *Osmr*-KO-Mäusen auf WT- und *Ldlr*-KO-Hintergrund kann unterschiedliche Ausprägung der Steatose erklären

Da Körpergewicht, Serum-Lipide und Leberhistologie in unseren Versuchstieren einen gegensätzlichen Effekt von OSM auf die Steatose-Entwicklung abhängig vom genetischen Hintergrund aufdeckten, wurde auf Genexpressions-Ebene nach möglichen Ursachen gesucht. Dabei wurde die Expression von Genen, die an der hepatischen Lipidhomöostase beteiligt sind, analysiert.

Überraschenderweise wurden die an der Fettsäuresynthese beteiligten Gene *Fasn*, *Acc* und *Elovl6* in *Osmr*-KO-Mäusen gegenüber WT-Mäusen geringer exprimiert. Die in *Osmr*-KO-Mäusen beobachtete Steatose und Hypertriglyzeridämie scheint demnach, in unseren Tieren nicht mit einer erhöhten, sondern sogar verminderten, Fettsäuresynthese einherzugehen. Allerdings führt nicht in allen Fällen eine Veränderung der mRNA-Expression eines Gens tatsächlich ebenfalls zu einer entsprechenden Veränderung der Proteinbiosynthese. Zur Bestätigung der Ergebnisse auf mRNA-Ebene müsste somit zukünftig auch eine Bestimmung der Proteinmenge im Western Blot erfolgen. Passend zur Regulation der Gene der Fettsäuresynthese war auch die Expression von *Srebp1c*, dessen Genprodukt als Transkriptionsfaktor die Gene der Fettsäuresynthese kontrolliert, in *Osmr*-KO-Mäusen geringer als in WT-Mäusen. Unter den LDLR-defizienten Gruppen zeigte sich kein deutlicher Unterschied in der Expression der Fettsäuresynthese-Gene, auch hier ist die unterschiedlich starke hepatische Steatose nicht durch eine Veränderung der Fettsäuresynthese erklärbar. Die Expression von Genen der β -Oxidation wurde nicht analysiert.

Unsere Daten aus *Osmr*-KO-Mäusen stehen denen von Komori und Kollegen entgegen, die in *Osmr*-KO-Mäusen eine erhöhte Expression von *Fasn* und *Srebp1* gegenüber WT-Mäusen bei gleichzeitig verstärkter hepatischer Steatose zeigen konnten (110). In einer folgenden Publikation zeigten sie, dass nach zweimal täglicher intraperitonealer Applikation von rekombinatem Maus-OSM über eine Woche in adipösen Mäusen die Leberverfettung sowie die *Fasn*-Expression in der Leber vermindert war (106). Ebenso wurde nach OSM-Behandlung eine erhöhte Expression von *Acs/3* und *Acs/5* gefunden, deren Genprodukte die Veresterung langkettiger Fettsäuren mit Coenzym A für die weitere Metabolisierung in β -Oxidation oder Lipidsynthese katalysieren. Komori *et al.* schlussfolgern, dass OSM durch Verminderung der Fettsäuresynthese und Steigerung der β -Oxidation zu einer Verbesserung der metabolischen Situation in adipösen Mäusen führt (106). Die Expression von *Cpt1*, das für das Schrittmacherenzym der β -Oxidation kodiert, wurde von der japanischen Arbeitsgruppe jedoch nicht untersucht. An isolierten Ratten-Hepatozyten verminderte OSM die Expression von *Cpt1* (107). Ebenso konnte OSM die Expression von *Mtp* reduzieren (107). Mikrosomales Triglyzerid-Transferprotein (MTP) ist an der Zusammensetzung von VLDL-Partikeln beteiligt und ist somit wichtig für die hepatische Lipid-Clearance. Eine Regulation von *Fasn* und *Acc* durch OSM ist *in vitro* nicht beschrieben. Eine kürzlich veröffentlichte Studie an *IL-6-Knockout*-Mäusen zeigt jedoch Parallelen zu unseren Ergebnissen an *Osmr*-KO-Mäusen: *IL-6-Knockout*-Mäuse, die eine fettreiche Diät erhielten, entwickelten im Vergleich zu WT-Mäusen eine verstärkte hepatische Steatose bei gleichzeitig verminderter hepatischer Protein-Spiegel von FASN und ACC. Ähnlich wie bei OSM sind *IL-6*-Spiegel in Plasma und Lebergewebe bei NAFLD-Patienten erhöht und die Verabreichung von *IL-6* schützt vor der Entwicklung einer hepatischen Steatose in Mäusen (167). Diskutiert wird die verminderte Expression von *Fasn* und *Acc* in *IL-6*-KO-Mäusen als Kompensationsmechanismus für eine verminderte β -Oxidation bei verminderter *Cpt1*-Expression in diesen Mäusen.

Bekanntermaßen induziert OSM in Hepatozyten die *Ldlr*-Expression (104). Damit übereinstimmend wiesen die in dieser Arbeit untersuchten *Osmr*-KO-Mäuse eine verminderte hepatische *Ldlr*-Expression auf. Diese Verminderung der *Ldlr*-Expression könnte zur in *Osmr*-KO-Mäusen beobachteten Dyslipidämie beigetragen haben. Neben dem LDLR kann auch der Scavenger-Rezeptor B1 durch Aufnahme von cholesterinreichem HDL die Lipidhomöostase beeinflussen. Die Expression seines Gens *Scarb1* war in *Osmr*-KO-Mäusen gegenüber WT-Mäusen herunterreguliert, während die OSMR β -Defizienz bei *Ldlr*-KO-Mäusen die *Scarb1*-Expression nicht beeinflusste. In Anbetracht der Tatsache, dass *Osmr*-KO-Mäuse sowie *Ldlr*-KO- und *Ldlr*-*Osmr*-KO-Mäuse einen höheren hepatischen Cholesteringehalt hatten als WT-Mäuse, könnte die geringere *Scarb1*-Expression in diesen Gruppen als kompensatorischer Mechanismus zur Aufrechterhaltung der

Cholesterinhomöostase verstanden werden. Allerdings ist die Regulation der *Scarb1*-Expression komplex und wird durch diverse diätetische, metabolische und hormonelle Einflüsse reguliert (168). Neben der Regulation auf mRNA-Ebene modulieren vor allem posttranskriptionale Faktoren die Scavenger-Rezeptor B1-Proteinbiosynthese. Die Relevanz der mRNA-Expression für seine Aktivität ist dadurch gering (168, 169).

Da das Gen des Schrittmacherenzym der Cholesterinbiosynthese *Hmgcr* in *Osmr*-KO-Mäusen eine geringere Expression aufwies als in WT-Mäusen, geht die histologisch nachgewiesene Lipidakkumulation in *Osmr*-KO-Mäusen offenbar neben einer Verminderung der Fettsäuresynthese und Cholesterinaufnahme auch mit einer verminderten Cholesterinbiosynthese einher. Interessanterweise konnte eine andere Arbeitsgruppe an *Osmr*-KO-Mäusen, die über 24 Wochen eine fettreiche Diät (61,6% Fett) erhielten, eine erhöhte Expression von Genen der Fettsäuresynthese (z.B. *Fasn*, *Srebp1c*) und der Cholesterinbiosynthese (*Hmgcr*) feststellen (103). Die Transkription des *Hmgcr*-Gens unterliegt einem negativen Feedback-Mechanismus, bei dem geringe intrazelluläre Cholesterinkonzentrationen zur Aktivierung des Transkriptionsfaktor SREBP-2 führen, der die Transkription des *Hmgcr*-Gens hochreguliert (170). Da der hepatische Cholesteringehalt in *Osmr*-KO-Mäusen gegenüber WT-Mäusen erhöht war, ist denkbar, dass der negative Feedback-Mechanismus zu einer verminderten *Hmgcr*-Expression in *Osmr*-KO-Mäusen führte. In *Ldlr*-KO-Mäusen war die *Hmgcr*-Expression im Mittel gegenüber WT-Mäusen erhöht. Auch Wang *et al.* zeigten für *Ldlr*-KO-Ratten eine mit Dyslipidämie und Änderungen des hepatischen Lipidprofils einhergehende Erhöhung der hepatischen *Hmgcr*-Expression (171). Die fehlende LDLR-Bildung mit konsekutiv verminderter Aufnahme cholesterinreicher LDL-Partikel (172) verursacht wahrscheinlich durch fehlende Aktivierung des negativen Feedbacks eine Erhöhung der Cholesterinbiosynthese. Der *Osmr*-Knockout bei *Ldlr*-KO-Mäusen führte zu keiner Änderung der *Hmgcr*-Expression. Die Beeinflussung der Cholesterinbiosynthese scheint demnach nicht für den Effekt des *Osmr*-Knockouts auf die Steatose in den Tieren verantwortlich zu sein.

Die Gene der ABC-Transporter ABCG5 und ABCG8, die für die biliäre Sekretion von Cholesterin zuständig sind, zeigten keine deutlich unterschiedliche Expression zwischen den untersuchten Genotypen.

Das *Cyp7a1*-Gen, das für das Schrittmacherenzym des klassischen Syntheseweges der Gallensäuren kodiert, war in *Osmr*-KO- gegenüber WT-Mäusen im Mittel geringer exprimiert. Die anderen untersuchten an der Gallensäuresynthese beteiligten Gene wiesen keine deutlichen Unterschiede zwischen WT- und *Osmr*-KO-Mäusen auf. Die Verminderung der Gallensäuresynthese durch einer geringere *Cyp7a1*-Expression in *Osmr*-KO-Mäusen könnte zur hepatischen Lipidakkumulation in diesen Tieren beigetragen haben. *Ldlr*-*Osmr*-KO-Mäuse zeigten gegenüber *Ldlr*-KO-Mäusen eine deutliche Erhöhung der *Cyp7a1*-Expression

sowie eine erhöhte *Cyp27a1*-Expression. Dass die Gene beider Schrittmacherenzyme in *Ldlr-Osmr*-KO-Mäusen verstärkt exprimiert wurden, weist auf eine erhöhte Gallensäuresynthese in diesen Tieren hin. In früheren Publikationen wurde gezeigt, dass die hepatische Überexpression von *Cyp7a1* die Entwicklung einer hepatischen Steatose sowie Adipositas und Insulinresistenz in mit fettreicher Diät gefütterten Mäusen verhindern kann (173). Deshalb ist vorstellbar, dass auch in unserem Mausmodell die erhöhte *Cyp7a1*-Expression durch eine verstärkte Metabolisierung von Cholesterin zu der verminderten Steatose in *Ldlr-Osmr*-KO-Mäusen beigetragen hat. Die basale Expression von *Cyp7a1* wird durch Bindung von HNF-4 α in der Promotorregion stimuliert. Dieser Prozess kann über einen negativen Feedbackmechanismus inhibiert werden: Gallensäuren binden an den Farnesoid-X-Rezeptor (FXR), der nach Translokation in den Zellkern die Transkription des *Shp*-Gens induziert. SHP wiederum vermindert die transkriptionale Aktivität von HNF-4 α und inhibiert somit die Transkription von *Cyp7a1* (123). Durch Aktivierung des nukleären Oxysterolrezeptors LXR kann die *Cyp7a1*-Transkription stimuliert werden (174). Die Expression von *Cyp7a1* ist demnach abhängig von der Aktivierung der nukleären Rezeptoren LXR und FXR, der daraus resultierenden Expression von *Shp* und transkriptionalen Aktivität von HNF-4 α . *Hnf4a* zeigte bei *Osmr*-KO-Mäusen eine gegenüber WT-Mäusen verminderte und bei *Ldlr-Osmr*-KO-Mäusen eine gegenüber *Ldlr*-KO-Mäusen erhöhte mRNA-Expression. Diese Veränderungen der *Hnf4a*-Expression könnten somit den beobachteten Effekt von OSM auf die *Cyp7a1*-Expression vermitteln. Die Expression von *Shp* war zwischen den Gruppen dagegen nicht verschieden. Dies weist darauf hin, dass die beobachtete Regulation von *Cyp7a1* unabhängig von SHP erfolgt. Neben den bereits genannten bekannten Regulationsmechanismen, die durch den *Osmr-Knockout* beeinflusst werden könnten, gibt es auch die Möglichkeit einer direkten Regulation der *Cyp7a1*-Transkription durch OSM. Der Frage einer möglichen Regulation von *Cyp7a1* durch OSM wurde in darauffolgenden *in vitro*-Experimenten an Zellen der humanen Hepatom-Zelllinie HepG2 nachgegangen.

5.6 OSM supprimiert *Cyp7a1*-mRNA-Expression in HepG2-Zellen

In der Zellkultur bestätigte sich, dass OSM die Expression von *CYP7A1* in HepG2-Zellen zeit- und konzentrationsabhängig supprimiert. LIF und IL-6 konnten die *CYP7A1*-Expression ebenfalls supprimieren, allerdings in deutlich geringerem Ausmaß. Ein bekannter Mechanismus der *CYP7A1*-Suppression ist der negative Gallensäurefeedback über FXR mit Induktion von *SHp*, dessen Genprodukt die HNF-4 α -abhängige Transkription von *CYP7A1* inhibiert (133). *SHp* war in den untersuchten HepG2-Zellen nach der OSM-Behandlung jedoch nicht induziert. Dies impliziert, dass die *CYP7A1*-Suppression durch OSM über einen *SHp*-unabhängigen Weg erfolgt. *HNF4A* war in mit OSM behandelten Zellen interessanterweise herunterreguliert, der Effekt war allerdings nicht signifikant.

Möglicherweise wird die *HNF4A*-Expression durch OSM supprimiert und führt so zu einer Verminderung der *CYP7A1*-Transkription.

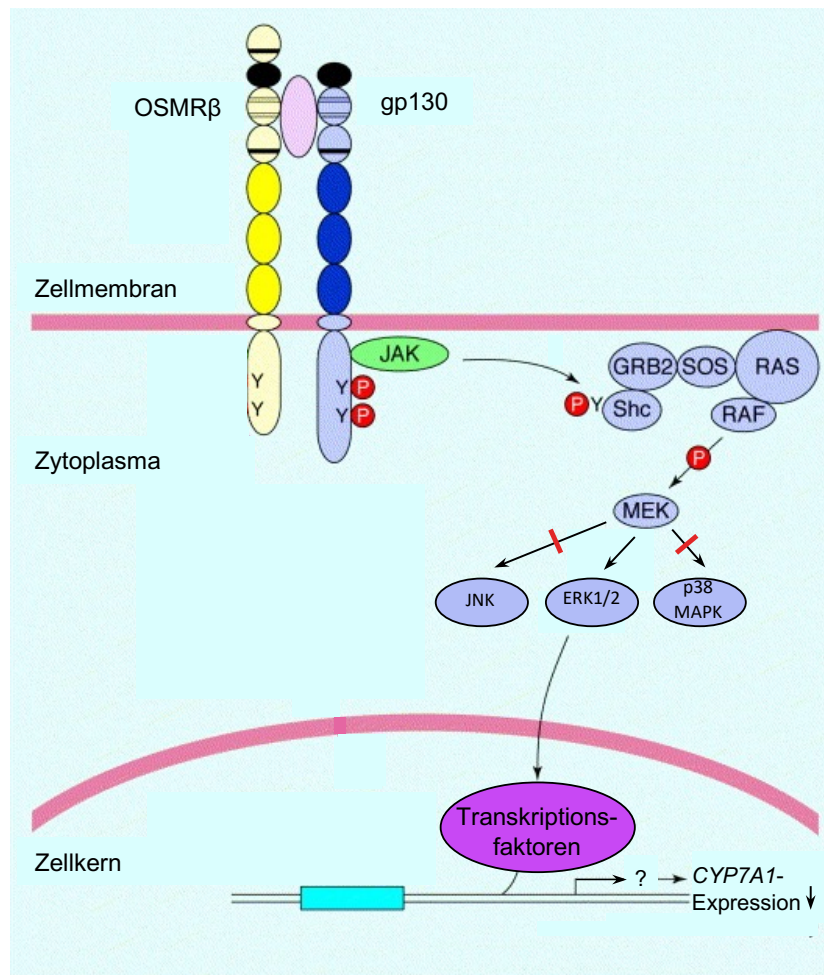


Abbildung 38. An *CYP7A1*-Regulation durch OSM beteiligte Signalwege. Darstellung der OSMRβ-Signaltransduktion über die RAS-MAPK-Kaskade mit Aktivierung von ERK1/2 als Mechanismus für die in HepG2-Zellen nachgewiesene Hemmung der *CYP7A1*-Expression durch OSM. ERK1/2 führt zur Beeinflussung von Transkriptionsfaktoren und könnte so direkt die *CYP7A1*-Expression modifizieren. Möglicherweise ist auch ein noch ungeklärter Zwischenschritt an der Regulation beteiligt. P = Phosphat, JAK = Januskinase, Shc = engl. *SHC-Transforming Protein 1*, GRB2 = engl. *Growth-Factor-Receptor-bound Protein 2*, SOS = engl. *Son Of Sevenless*, RAS = GTPase H-Ras, RAF = RAF-Protoonkogen-Serin/Threonin-Proteinkinase, MEK = MAPK/ERK-Kinase, JNK = c-Jun N-terminale Kinasen, ERK1/2 = engl. *Extracellular-signal Regulated Kinase 1/2*, p38 MAPK = engl. *p38 Mitogen Activated Protein Kinase*. Modifiziert nach Grant SL 1999 (85).

Die Regulation von *CYP7A1* durch OSM war durch Inhibition von JAK und der MAP-Kinase-Kinasen MEK1 und MEK2 vollständig sowie durch Inhibition von ERK1/2 größtenteils reversibel. Diese Daten weisen darauf hin, dass OSM über Aktivierung des RAS-MAPK-Signalweges, der die Aktivierung von MEK1/2 sowie ERK1/2 umfasst, die Expression von *CYP7A1* supprimiert (siehe Abbildung 38). Noch ungeklärt ist, ob ERK1/2 die *CYP7A1*-Transkription beeinflusst oder die *CYP7A1*-mRNA posttranskriptionell modifiziert sowie auf welchem Wege dies passiert. Die *CYP7A1*-Suppression scheint dabei SHP-unabhängig zu sein. Da die *HNF4A*-mRNA nach OSM-Behandlung vermindert war, ist eine Beeinflussung der *HNF4A*-Transkription oder posttranskriptionelle Modifikation von *HNF4A*-mRNA als Mechanismus denkbar.

Die Beeinflussung der *Cyp7a1*-Expression durch Kinase-Signalwege ist seit Langem bekannt. Sowohl die Aktivierung der Proteinkinase C als auch der JNK führen zur Suppression der *Cyp7a1*-Expression (175-177). Unsere Daten zeigen zum ersten Mal eine Beeinflussung der *CYP7A1*-Expression durch den ERK1/2-Signalweg.

5.7 Dichotome Effekte von OSM

Interessanterweise konnte die in der Zellkultur nachgewiesene Suppression der *CYP7A1*-Expression durch OSM *in vivo* nur in LDLR-defizienten Mäusen beobachtet werden. In diesen Mäusen zeigte sich auch ein günstiger Effekt des *Osmr-Knockouts* auf die Leberverfettung, wohingegen der *Osmr-Knockout* bei WT-Mäusen ungünstige Auswirkungen auf die Steatose hatte.

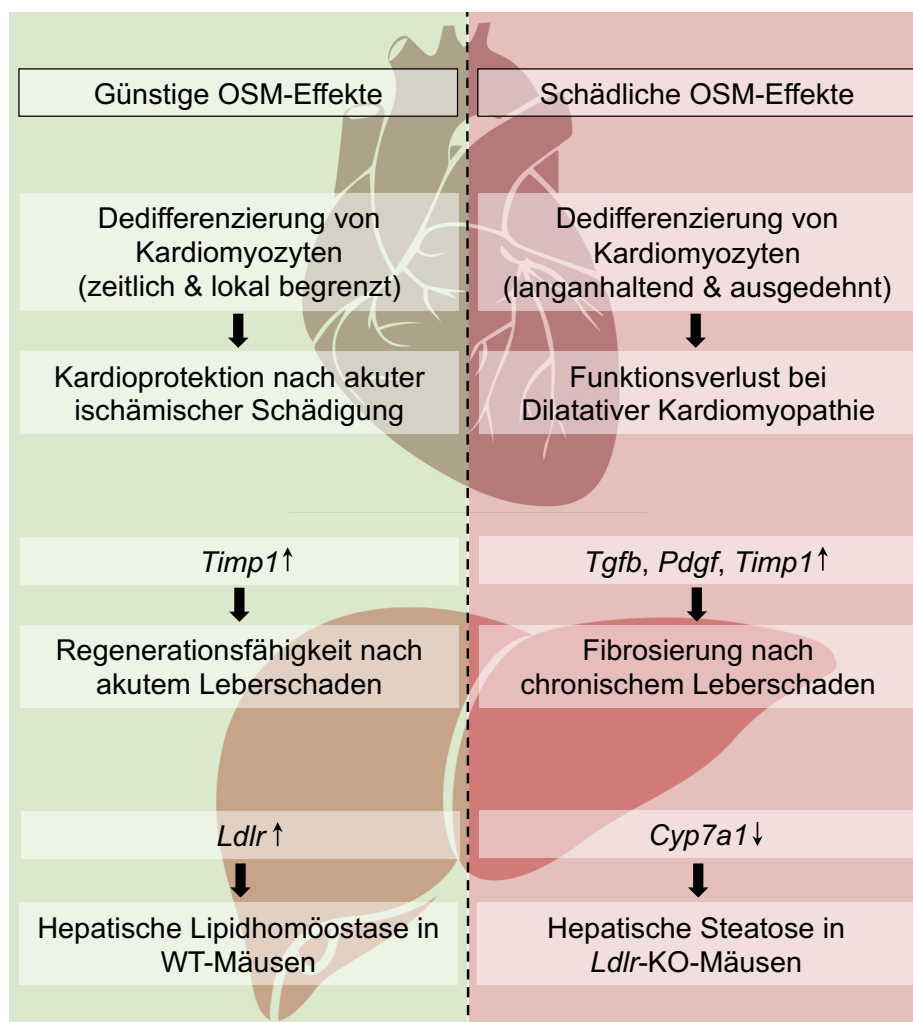


Abbildung 39. Günstige und schädliche Effekte von OSM. Abhängig vom Kontext sind für OSM dichotome Effekte bekannt. Es wirkt kardioprotektiv nach akuter ischämischer Schädigung des Herzens, wohingegen es bei chronischer dilatativer Myopathie den myokardialen Funktionsverlust fördert (178). Nach akutem Leberschaden trägt OSM zur Regenerationsfähigkeit des Lebergewebes bei (138), während es nach chronischem Leberschaden die Fibrosierung fördert (143). Passend dazu weisen die Daten dieser Arbeit darauf hin, dass OSM unter physiologischen Bedingungen in WT-Mäusen wichtig für die hepatische Lipidhomöostase ist, wohingegen OSM in *Ldlr*-KO-Mäusen zur Entwicklung der hepatischen Steatose beiträgt. *Timp1* = engl. *Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 1*, *Tgfb* = engl. *Transforming Growth Factor β*, *Pdgf* = engl. *Platelet-Derived Growth Factor*, *Ldlr* = *Low-Density-Lipoprotein*-Rezeptor.

Kontextabhängig gegensätzliche Effekte von OSM sind auch aus anderen Erkrankungen bekannt (siehe Abbildung 39). So zeigten Kubin *et al.*, dass OSM nach akuter ischämischer Schädigung des Myokards kardioprotektiv wirkt, wohingegen es bei chronischer Aktivierung im murinen Modell der Dilatativen Kardiomyopathie den Funktionsverlust fördert (178). Bezüglich seiner Rolle bei akutem und chronischem Leberschaden wurde gezeigt, dass die transiente Hochregulation von OSM nach Induktion eines akuten Leberschadens im Mausmodell durch Induktion von *Timp1* zur Regenerationsfähigkeit der Leber beiträgt (138), doch andererseits OSM-Defizienz die Entwicklung einer Leberfibrose nach chronischem Leberschaden im Mausmodell vermindert (143). Diese Unterschiede könnten durch Höhe und Kinetik der *Osm*-Expression bedingt sein (97), die zur differenziellen Aktivierung von Signalwegen oder zur Veränderung der Expression von *Osmr* und *Lifr* führen könnten. Da OSM nur durch nicht-parenchymatöse Zellen des Lebergewebes exprimiert wird, waren die hepatischen *Osm*-mRNA-Spiegel in den untersuchten Mäusen der vorliegenden Arbeit insgesamt gering. Deshalb mussten für die Durchführung der qPCR größere Mengen cDNA eingesetzt werden als bei anderen Zielgenen. Die mRNA-Expression von *Osm* war in *Ldlr*-KO-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen deutlich erhöht. Dies könnte zur divergierenden Rolle von OSM in WT- und *Ldlr*-KO-Mäusen beigetragen haben und passt zu Daten von Henkel *et al.*, die eine erhöhte hepatische *Osm*-Expression in zwei verschiedenen NAFLD-Maus-Modellen messen konnten (107). Die erhöhte *Osmr*-Expression in *Ldlr*-KO-Mäusen gegenüber WT-Mäusen sowie die leicht erhöhte *Lifr*-Expression in *Ldlr*-*Osmr*-KO-Mäusen gegenüber *Ldlr*-KO-Mäusen, impliziert, dass die Signaltransduktion über den OSMR β die Expression von *Osmr* steigert und die von *Lifr* limitiert. In HepG2-Zellen wurden die Gene beider OSM-Rezeptortypen exprimiert. In ersten Vorversuchen erhöhte sich passend zu unseren *in vivo*-Daten durch Stimulation mit OSM konzentrations- und zeitabhängig die OSMR-Expression, wohingegen die LIFR-Expression abfiel. Die Expression von *IL6ST*, dessen Genprodukt gp130 von beiden Rezeptortypen benötigt wird, war nach 4 Stunden OSM-Behandlung (100 ng/ml) um den Faktor 2 erhöht, nach 24 Stunden zeigte sich jedoch kein Effekt mehr. Dies suggeriert, dass in Hepatozyten mit steigender Konzentration und Dauer der OSM-Exposition die Typ-2-OSM-Rezeptor-Signaltransduktion gegenüber der Typ-1-OSM-Rezeptor-Signaltransduktion an Bedeutung gewinnt. Andere Publikation zeigten hingegen, dass OSM die mRNA-Expression von OSMR, aber auch von LIFR und *IL6ST*, in humanen Lungenfibroblasten und -epithelzellen steigert (101). Möglicherweise ist die Regulation der Rezeptorexpression durch OSM abhängig vom Zelltyp.

5.8 Mutation im *Nnt*-Gen beeinflusst möglicherweise Metabolismus in WT- und *Ldlr*-KO-Mäusen

Mehrere Jahre nach Erhebung der in der vorliegenden Arbeit gezeigten Daten wurde nachgewiesen, dass bei den untersuchten WT- sowie *Ldlr*-KO-Mäusen eine Mutation im Gen

der Nikotinamid-Nukleotid-Transhydrogenase (NNT) vorliegt. NNT ist ein membrangebundenes Protein der inneren Mitochondrienmembran, das gekoppelt an die Reduktion von Nikotinamidadenindinukleotidphosphat (NADP⁺) Protonen transportiert (179). Die gefundene Mutation im *Nnt*-Gen, die zu einer deutlich geringeren Expression von *Nnt* in Hepatozyten und β -Zellen des Pankreas führt, liegt typischerweise bei C57BL/6-Mäusen des Stammes J vor (180). Dagegen liegt in C57BL/6-Mäusen des Stammes N die Wildtyp-Variante des *Nnt*-Gens vor (180). Das Vorliegen der *Nnt*-Mutation in WT- und *Ldlr*-KO-Mäusen bei gleichzeitigem Vorliegen des *Nnt*-Wildtyps in *Osmr*-KO- und *Ldlr*-*Osmr*-KO-Mäusen lässt Rückschlüsse darauf zu, dass die zur Verfügung gestellten *Osmr*-KO-Mäuse einen C57BL/6N-Hintergrund hatten, während die zur Verfügung gestellten *Ldlr*-KO-Mäuse einen C57BL/6J-Hintergrund hatten. Die in der Arbeitsgruppe nach Erhalt der *Osmr*-KO-Tiere durchgeführten weiteren Verpaarungen mit C57BL/6J-Tieren scheinen nicht zu einer Homozygotie auf diesem Hintergrund geführt zu haben. Obwohl alle Tiere der hier untersuchten vier Genotypen (WT, *Osmr*-KO, *Ldlr*-KO und *Ldlr*-*Osmr*-KO) Geschwistertieren einer C57BL/6J x *Ldlr*-*Osmr*-KO Verpaarung entstammten, ergab sich leider für WT- und *Ldlr*-KO-Mäuse ein uniformer C57BL/6J- und für *Osmr*-KO- und *Ldlr*-*Osmr*-KO-Mäuse ein uniformer C57BL/6N-Hintergrund.

Mehrere Publikationen weisen darauf hin, dass eine verminderte *Nnt*-Expression in C57BL/6J-Mäusen durch eine gestörte Adenosintriphosphat-Produktion zu einer verminderten Glukose-induzierten Insulinsekretion in β -Zellen des Pankreas führt und damit zu einer geringeren Glukosetoleranz verglichen mit C57BL/6N-Mäusen beiträgt (180, 181). Ebenso konnte nach Fütterung einer fettreichen Diät (40% Fett) in C57BL/6J-Mäusen eine erhöhte Gewichtszunahme, erhöhte Serum-Glukose-Spiegel sowie eine verminderte Glukosetoleranz gegenüber C57BL/6N-Mäusen gezeigt werden (182). Andererseits konnte nach Fütterung einer fettreichen Diät mit moderatem Fettanteil (10% Fett) und entsprechend höherem Kohlenhydratanteil bei C57BL/6N-Mäusen eine erhöhte Gewichtszunahme sowie höhere Serum-Insulin-Spiegel als bei C57BL/6J-Mäusen nachgewiesen werden (182). Abhängig von der Diätzusammensetzung können *Nnt*-mutierte C57BL/6J-Mäuse demnach eine erhöhte oder verminderte Suszeptibilität gegenüber einer ernährungsbedingten Adipositas haben. In einer kürzlich veröffentlichten Publikation wurde der Einfluss des C57BL/6-Stammes auf die Ausprägung von Steatose, Leberschädigung und Fibrose in verschiedenen NASH-Modellen untersucht. Bei der Fütterung einer fett- und cholesterinreichen Diät (20% Fett, 2% Cholesterin) über 30 Wochen zeigten C57BL/6N-Mäuse ein höheres Körpergewicht und höhere ALT- und AST-Serum-Spiegel als Zeichen einer Leberschädigung verglichen mit C57BL/6J-Mäusen. C57BL/6J-Mäuse zeigten wiederum eine stärkere hepatische Triglyzerid-Akkumulation (183). Die beschriebene Gegenläufigkeit von Körpergewicht und hepatischer Steatose durch die *Nnt*-Mutation lässt

sich in den Versuchstieren der vorliegenden Arbeit nicht wiederfinden: Das erhöhte Körpergewicht in *Osmr*-KO- gegenüber WT-Mäusen geht mit einer erhöhten Steatose einher und das verminderte Körpergewicht in *Ldlr-Osmr*-KO- gegenüber *Ldlr*-KO-Mäusen geht mit einer verminderten Steatose einher. Es erscheint deshalb unwahrscheinlich, dass ein Großteil der beobachteten Effekte auf die *Nnt*-Mutation zurückzuführen ist. Für den Vergleich von Körpergewicht und hepatischer Steatose zwischen *Osmr*-KO- und WT-Mäusen gibt es bereits Publikationen anderer Arbeitsgruppen, die Mäuse mit einheitlichem C57BL/6J-Hintergrund verwenden. Sie beschreiben mit den in dieser Arbeit vorgestellten Daten vergleichbare Effekte des *Osmr*-Knockouts (110). Die Arbeitsgruppe um Wong *et al.* untersuchte die NNT-Enzymaktivität, gemessen als Konversion von NADP⁺ zu NADH, in β -Zellen des Pankreas (179). Sie fanden keinen deutlichen Unterschied zwischen C57BL/6J- und C57BL/6N-Mäusen (179). Ebenso waren Körpergewicht, epididymale Fettmasse, Insulinsensitivität sowie Glukose- und Insulin-Spiegel im oralen Glukosetoleranz-Test zwischen C57BL/6N- und C57BL/6J-Mäusen vergleichbar. Diese Daten suggerieren, dass die fehlende NNT-Enzymaktivität bei C57BL/6N-Mäusen durch andere Enzyme kompensiert wird (179). Übereinstimmend damit postulieren Aston-Mourney und Kollegen, dass NNT bei niedrigen Expressionsspiegeln seines Gens, wie sie in C57BL/6J-Mäusen vorliegen, eine geringe Rolle bei der Insulinsekretion spielt (184). Diese Daten stützen die Vermutung, dass das Vorliegen einer *Nnt*-Mutation in WT- und *Ldlr*-KO-Mäusen nicht entscheidend für den veränderten Metabolismus in diesen Tieren ist.

Bei der Behandlung von HepG2-Zellen mit OSM konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Expression von *CYP7A1* supprimiert wird. Dies legt nahe, dass die *in vivo* beobachtete Hochregulation von *Cyp7a1* bei *Ldlr-Osmr*-KO-Mäusen wahrscheinlich durch OSM und nicht etwa durch die *Nnt*-Variante bedingt ist. Präliminäre Daten der Arbeitsgruppe zeigen diese Regulation der *Cyp7a1*-Expression durch OSM ebenfalls in immortalisierten humanen Leberzellen der Zelllinie IHH. Darüber hinaus wurden von der Arbeitsgruppe die Expressionen von *Acc* und *Fasn*, deren Genprodukte an der Fettsäuresynthese beteiligt sind, in HepG2-Zellen untersucht. Dabei zeigte sich keine Veränderung der Expression nach Behandlung mit OSM. Die verminderte Expression von *Acc* und *Fasn* in *Osmr*-KO-Mäusen ist demnach wahrscheinlich nicht auf einen direkten OSM-Effekt, sondern entweder auf die Veränderung des Metabolismus in diesen Tieren oder möglicherweise auch auf die *Nnt*-Mutation in WT-Mäusen zurückzuführen.

Insgesamt ist eine Beeinflussung der Ergebnisse durch den *Nnt*-Status nicht ausgeschlossen, die wesentlichen Unterschiede zwischen den Gruppen kommen jedoch wahrscheinlich durch den *Osmr*-Knockout zustande. In kommenden Studien sollten die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche an Mäusen mit einheitlichem C57BL/6N- oder

C57BL/6J-Hintergrund wiederholt werden, um die Relevanz der vorliegenden Ergebnisse zu überprüfen.

5.9 Ausblick

Insgesamt zeigt diese Arbeit die differenzielle Rolle der OSMR β -Signaltransduktion in der Pathogenese der NAFLD abhängig vom genetischen Hintergrund. Während OSM in WT-Mäusen der Entwicklung einer hepatischen Steatose entgegenwirkt, fördert es die Steatose-Entwicklung in *Ldlr*-KO-Mäusen. Als möglicher Mechanismus der ungünstigen Wirkung von OSM auf die hepatische Steatose in *Ldlr*-KO-Mäusen wurde die Suppression der *Cyp7a1*-Expression durch relevante OSM-Spiegel identifiziert. In der Zellkultur zeigte sich, dass dieser Effekt durch die Aktivierung des RAS-MAPK-ERK1/2-Signalweges vermittelt wird und mit einer verminderten Expression des Transkriptionsfaktor-Gens *HNF4A* einhergeht. Die differenzielle Rolle in WT- und *Ldlr*-KO-Mäusen könnte durch unterschiedliche *Osm*-Expressionsspiegel zustande kommen: Während basale OSMR β -Signaltransduktion durch geringe OSM-Spiegel in WT Mäusen für die Lipidhomöostase essenziell zu sein scheint, könnte eine erhöhte oder prolongierte OSMR β -Signaltransduktion durch höhere OSM-Spiegel in *Ldlr*-KO-Mäusen das Fortschreiten der hepatischen Steatose fördern. Die hier gezeigten Ergebnisse stellen OSM als mögliches NAFLD-Therapeutikum, wie es kürzlich postuliert wurde, in Frage. Zur Untermauerung der nachgewiesenen Beeinflussung der *CYP7A1*-Expression durch OSM in HepG2-Zellen, sollte diese zukünftig auch auf Proteinebene mittels Western Blot gemessen werden. Durch Untersuchung der Leberhistologie nach OSM-Behandlung von *Ldlr*-KO-Mäusen könnte die Relevanz der Ergebnisse aus *Ldlr*-*Osmr*-KO-Mäusen überprüft werden. Weiterhin könnte der Einfluss kurz- und langfristiger Behandlung von WT-Mäusen mit OSM unterschiedlicher Konzentrationen auf die Entwicklung einer Steatose untersucht werden. So könnte beleuchtet werden, ob Höhe und Kinetik der OSM-Spiegel für seine differenziellen Effekte verantwortlich sind. In kommenden Studien sollten die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche an Mäusen mit einheitlichem C57BL/6N- oder C57BL/6J-Hintergrund wiederholt werden, um eine Beeinflussung der vorliegenden Ergebnisse durch die *Nnt*-Variante auszuschließen. Angesichts einer möglichen Beeinträchtigung des Stoffwechsels durch die mutierte Variante des *Nnt*-Gens in C57BL/6J-Mäusen sollte die Verwendung von Mäusen auf C57BL/6N-Hintergrund als neuer Standard für die Untersuchung des Metabolischen Syndroms und der NAFLD evaluiert werden.

6. ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY

6.1 Zusammenfassung

Die Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD) ist eine der häufigsten chronischen Lebererkrankungen der westlichen Welt. Die Pathogenese der Erkrankung ist noch nicht vollständig erforscht und wirksame medikamentöse Therapien sind bisher nicht zugelassen. Wachsende Evidenz zeigt, dass das Interleukin-6-Typ-Zytokin Oncostatin M (OSM) eine wichtige Rolle in der Pathogenese der NAFLD spielt. Die japanische Arbeitsgruppe um Komori *et al.* zeigte an OSM-Rezeptor- β -defizienten (*Osmr*-KO-) Mäusen sowie durch OSM-Behandlung von genetisch und ernährungsbedingt adipösen Mäusen, dass OSM vor einer hepatischen Steatose und metabolischer Komorbidität schützen kann. Andere Publikationen suggerieren, dass OSM an NAFLD-Entwicklung und -Progression beteiligt ist, indem es die Expression von Genen der β -Oxidation und *Very-Low-Density-Lipoprotein* (VLDL-) Sekretion reprimiert und die Expression profibrogenetischer Gene fördert. *Low-Density-Lipoprotein*-Rezeptor-defiziente- (*Ldlr*-KO-) Mäuse sind seit Langem als Atherosklerose-Modell etabliert und wurden zuletzt auch als physiologisches Modell für NAFLD identifiziert.

Um die Rolle von OSM in der NAFLD-Pathogenese zu beleuchten, wurden *Osmr*-KO-Mäuse auf Wildtyp- (WT-) und *Ldlr*-KO-Hintergrund untersucht, die über 12 Wochen eine fett- und cholesterinreiche *Western Diet* erhielten und anschließend für die Organentnahme geopfert wurden. Im Vorfeld dieser Arbeit wurden Körpergewicht, Blutglukose, Serum-Cholesterin und Lebergewicht der Tiere gemessen. Hierbei zeigte sich ein erhöhtes Körpergewicht, unveränderte Blutglukose, erhöhtes Serum-Cholesterin sowie ein erhöhtes Lebergewicht in *Osmr*-KO- gegenüber WT-Mäusen. Andersherum waren Körpergewicht, Blutglukose, Serum-Cholesterin und Lebergewicht in *Ldlr*-*Osmr*-KO- gegenüber *Ldlr*-KO-Mäusen vermindert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte die histologische Untersuchung des Lebergewebes, die Messung von Serum-Triglyzeriden und -Fettsäuren sowie die Untersuchung der hepatischen Genexpression. An kultivierten Zellen der humanen Hepatom-Zelllinie HepG2 wurde eine mögliche Regulation der *CYP7A1*-Genexpression durch OSM untersucht. *CYP7A1* ist als Schrittmacherenzym der Gallensäuresynthese an der hepatischen Cholesterin-Clearance beteiligt.

Osmr-KO-Mäuse zeigten gegenüber WT-Mäusen histologisch eine verstärkte hepatische Steatose. Bei der Untersuchung der mRNA-Expression von Genen mit Beteiligung an der hepatischen Lipidhomöostase zeigte sich eine Minderexpression von *Ldlr* in *Osmr*-KO-Mäusen. Weiterhin zeigte sich eine etwas geringere Expression von *Cyp7a1* in *Osmr*-KO-Mäusen. Die Expression aller anderen untersuchten Gene, die an Fettsäuresynthese, Cholesterintransport und -metabolismus beteiligt sind, lieferten keine Erklärung für eine

erhöhte hepatische Lipidakkumulation in *Osmr*-KO-Mäusen. *Ldlr-Osmr*-KO-Mäuse hatten gegenüber *Ldlr*-KO-Mäusen eine geringer ausgeprägte hepatische Steatose. Die mRNA-Expression von Genen der Fettsäuresynthese, der Cholesterinbiosynthese und des Cholesterintransports waren in *Ldlr-Osmr*-KO- gegenüber *Ldlr*-KO-Mäusen nicht wesentlich verändert. Allerdings fiel eine deutliche Hochregulation von *Cyp7a1* in *Ldlr-Osmr*-KO-Mäusen auf. Darüber hinaus war *Osm* in *Ldlr*-KO-Mäusen gegenüber WT-Mäusen stärker exprimiert. Um eine Regulation von *CYP7A1* durch OSM nachzuweisen, wurde die Genexpression in HepG2-Zellen nach Stimulation mit OSM untersucht. Hierbei zeigte sich, dass OSM die mRNA-Expression von *CYP7A1* supprimierte. Dieser Effekt war durch die Zugabe von Inhibitoren der Januskinasen (JAK), *Mitogen Activated Protein Kinase/ERK-Kinase* (MEK) und *Extracellular-signal Regulated Kinase 1/2* (ERK1/2) reversibel. Die *CYP7A1*-Suppression durch OSM ging mit einer verminderten Expression des Transkriptionsfaktor-Gens *HNF4A* einher.

Osmr-KO-Mäuse zeigten gegenüber WT-Mäusen nach 12 Wochen *Western Diet* verstärkte Adipositas, Dyslipidämie sowie eine hepatische Steatose. Die Analyse der hepatischen mRNA-Expression legt nahe, dass die Minderexpression von *Ldlr* in *Osmr*-KO-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen zur Verstärkung der Dyslipidämie und hepatischen Steatose beigetragen hat. Weiterhin kann die geringere Expression von *Cyp7a1* in *Osmr*-KO-Mäusen durch daraus resultierende Akkumulation von Cholesterin zur erhöhten hepatischen Lipidakkumulation in diesen Mäusen beigetragen haben. *Ldlr*-KO-Mäuse zeigten nach 12 Wochen *Western Diet* ebenfalls eine hepatische Steatose. Diese war in *Ldlr-Osmr*-KO-Mäusen gegenüber *Ldlr*-KO-Mäusen geringer ausgeprägt. Die erhöhte Expression von *Cyp7a1* in *Ldlr-Osmr*-KO-Mäusen kann die Verbesserung von hepatischer Lipidakkumulation und Dyslipidämie durch erhöhte Cholesterinmetabolisierung zu Gallensäuren erklären. Übereinstimmend mit der *Cyp7a1*-Regulation in LDLR-defizienten Mäusen zeigte sich *in vitro*, dass OSM die Expression von *CYP7A1* in HepG2-Zellen vermindert und sich so negativ auf die hepatische Lipidhomöostase auswirken kann. Insgesamt implizieren diese Ergebnisse eine divergierende Rolle von OSM bei der Entwicklung einer hepatischen Steatose abhängig vom genetischen Hintergrund. OSM scheint bei WT-Mäusen für die Erhaltung der metabolischen Gesundheit wichtig zu sein. Bei *Ldlr*-KO-Mäusen hingegen scheint OSM die Entwicklung von Adipositas, Dyslipidämie und hepatischer Steatose zu fördern. Die differenzielle Rolle in WT- und *Ldlr*-KO-Mäusen könnte durch unterschiedliche *Osm*-Expressionsspiegel zustande kommen: Während basale OSMR β -Signaltransduktion durch geringe OSM-Spiegel in WT-Mäusen für die Lipidhomöostase essenziell zu sein scheint, könnte erhöhte oder prolongierte OSMR β -Signaltransduktion durch höhere OSM-Spiegel in *Ldlr*-KO-Mäusen das Fortschreiten der hepatischen Steatose fördern. Dies stellt OSM als mögliches NAFLD-Therapeutikum in Frage. Um die Hypothese zu überprüfen, dass

OSM abhängig von der Höhe und Kinetik der Spiegel günstige oder ungünstige Effekte auf die NAFLD-Entwicklung hat, sollte in zukünftigen Experimenten der Einfluss kurz- und langfristiger Behandlung von WT-Mäusen mit OSM unterschiedlicher Konzentrationen auf die Entwicklung einer hepatischen Steatose untersucht werden.

6.2 Summary

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is among the most common chronic liver diseases in Western societies. Pathogenetic mechanisms are not fully elucidated and to date there is no approved drug therapy available. There is mounting evidence that the Interleukin-6-type-cytokine Oncostatin M (OSM) plays a crucial role in the pathogenesis of NAFLD. The Japanese working group of Komori *et al.* had shown that OSM has favorable effects on metabolism and protects against hepatic steatosis using OSM-receptor- β -deficient (*Osmr*-KO-) mice as well as OSM treatment of genetically or diet-induced obese mice. Other publications suggest that OSM contributes to the pathogenesis and progression of NAFLD by reducing the expression of genes involved in β -oxidation and Very-Low-Density-Lipoprotein (VLDL) secretion and inducing the expression of genes involved in fibrogenesis. Recently Low-Density-Lipoprotein-Receptor-deficient (*Ldlr*-KO-) mice, which are a well-established model for atherosclerosis, have also been considered a physiological model for NAFLD.

To further investigate the role of OSM in NAFLD pathogenesis *Osmr*-KO mice on either wild type- (WT-) or *Ldlr*-KO-background were fed a high-fat and high-cholesterol Western diet for 12 weeks and were then sacrificed for tissue collection. Prior to the present thesis body weight, blood glucose levels, serum cholesterol and liver weight of the mice were measured. *Osmr*-KO mice showed increased body weight, serum cholesterol levels and liver weight compared to WT mice, whereas blood glucose levels did not differ. On the contrary, *Ldlr*-*Osmr*-KO mice showed decreased values in all parameters compared to *Ldlr*-KO mice, including body weight, blood glucose levels, serum cholesterol levels and liver weight. In the present thesis a histological examination of the liver tissue was made, serum levels of triglycerides and fatty acids were measured, and hepatic gene expression was analyzed. In cultured cells of the human hepatoma cell line HepG2 a potential regulation of *CYP7A1* gene expression by OSM was examined. *CYP7A1* is the rate limiting enzyme of bile acid synthesis and is therefore involved in hepatic cholesterol clearance.

Osmr-KO mice showed enhanced hepatic steatosis compared to WT mice. Examination of gene expression involved in hepatic lipid homeostasis revealed reduced *Ldlr* expression levels in *Osmr*-KO mice. Furthermore, a slightly decreased *Cyp7a1* expression was observed. The expression of other genes involved in fatty acid synthesis, cholesterol transport and cholesterol metabolism did not explain the enhanced hepatic lipid accumulation in *Osmr*-KO mice. In *Ldlr*-*Osmr*-KO mice hepatic steatosis was reduced compared to *Ldlr*-KO mice. The expression of genes involved in fatty acid synthesis, cholesterol synthesis and

cholesterol transport was not considerably altered in *Ldlr-Osmr*-KO compared to *Ldlr*-KO mice. However, *Cyp7a1* was markedly upregulated in *Ldlr-Osmr*-KO mice. In addition, *Osm* expression was increased in *Ldlr*-KO mice compared to WT mice. To prove the regulation of *CYP7A1* by OSM, gene expression was determined in OSM-treated HepG2 cells. The results show that OSM attenuated *CYP7A1* expression. This effect was reversed by the addition of inhibitors of either januskinases (JAK), mitogen-activated protein kinase/ERK-kinase (MEK) or extracellular-signal regulated kinase 1/2 (ERK1/2). *CYP7A1*-suppression by OSM was accompanied by reduced expression levels of the transcription factor gene *HNF4A*.

After 12 weeks of Western diet *Osmr*-KO mice showed enhanced obesity, dyslipidemia and hepatic steatosis compared to WT mice. Determination of hepatic gene expression suggests that decreased expression of *Ldlr* in *Osmr*-KO mice compared to WT mice contributes to dyslipidemia and hepatic steatosis. Furthermore, the decreased expression of *Cyp7a1* in *Osmr*-KO mice may contribute to cholesterol accumulation and accordingly to hepatic lipid accumulation in these mice. *Ldlr*-KO mice also showed hepatic steatosis after 12 weeks of Western diet. In comparison, hepatic steatosis was markedly reduced in *Ldlr-Osmr*-KO mice. Increased expression levels of *Cyp7a1* and hence enhanced metabolism of cholesterol to bile acids in *Ldlr-Osmr*-KO mice can explain improved hepatic lipid accumulation and dyslipidemia in these mice compared to *Ldlr*-KO mice. Consistent with the discovered *Cyp7a1* regulation in LDLR-deficient mice, OSM decreased the expression of *CYP7A1* in HepG2 cells and therefore may have detrimental effects on hepatic lipid homeostasis. Altogether the results implicate a diverging role of OSM in the pathogenesis of hepatic steatosis depending on the genetic background. In WT mice OSM seems to convey protective effects on lipid homeostasis, whereas in *Ldlr*-KO mice OSM seems to promote the development of obesity, dyslipidemia and hepatic steatosis. The differential role of OSM in WT and *Ldlr*-KO mice might be caused by diverging *Osm* expression levels: Basal OSMR β signal transduction caused by low OSM levels seems to be essential for lipid homeostasis, whereas enhanced or prolonged OSMR β signal transduction caused by higher OSM levels might foster the progression of hepatic steatosis. These findings question OSM as a putative therapeutic agent for NAFLD. To test the hypothesis that OSM has beneficial or detrimental effects on NAFLD pathogenesis depending on OSM levels and kinetics, future studies should examine the effect of short- and long-term administration of OSM in different concentrations on the development of hepatic steatosis in WT mice.

7. LITERATUR

1. Abumrad N, Coburn C, and Ibrahimi A. Membrane proteins implicated in long-chain fatty acid uptake by mammalian cells: CD36, FATP and FABPm. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1441(1):4-13.
2. Pohl J, Ring A, Ehehalt R, Herrmann T, and Stremmel W. New concepts of cellular fatty acid uptake: role of fatty acid transport proteins and of caveolae. *Proc Nutr Soc*. 2004;63(2):259-62.
3. Iizuka K, Bruick RK, Liang G, Horton JD, and Uyeda K. Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(19):7281-6.
4. DeBose-Boyd RA, Ou J, Goldstein JL, and Brown MS. Expression of sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP-1c) mRNA in rat hepatoma cells requires endogenous LXR ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(4):1477-82.
5. Joseph SB, Laffitte BA, Patel PH, Watson MA, Matsukuma KE, Walczak R, et al. Direct and indirect mechanisms for regulation of fatty acid synthase gene expression by liver X receptors. *J Biol Chem*. 2002;277(13):11019-25.
6. Alves-Bezerra M, and Cohen DE. Triglyceride Metabolism in the Liver. *Compr Physiol*. 2017;8(1):1-8.
7. Matsuzaka T, Shimano H, Yahagi N, Yoshikawa T, Amemiya-Kudo M, Hasty AH, et al. Cloning and characterization of a mammalian fatty acyl-CoA elongase as a lipogenic enzyme regulated by SREBPs. *J Lipid Res*. 2002;43(6):911-20.
8. Houten SM, and Wanders RJ. A general introduction to the biochemistry of mitochondrial fatty acid beta-oxidation. *J Inherit Metab Dis*. 2010;33(5):469-77.
9. Aoyama T, Peters JM, Iritani N, Nakajima T, Furihata K, Hashimoto T, et al. Altered constitutive expression of fatty acid-metabolizing enzymes in mice lacking the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha). *J Biol Chem*. 1998;273(10):5678-84.
10. Enjoji M, Yasutake K, Kohjima M, and Nakamuta M. Nutrition and nonalcoholic Fatty liver disease: the significance of cholesterol. *Int J Hepatol*. 2012;2012:925807.
11. Thomas C, Pellicciari R, Pruzanski M, Auwerx J, and Schoonjans K. Targeting bile-acid signalling for metabolic diseases. *Nat Rev Drug Discov*. 2008;7(8):678-93.
12. Lu K, Lee MH, Hazard S, Brooks-Wilson A, Hidaka H, Kojima H, et al. Two genes that map to the STSL locus cause sitosterolemia: genomic structure and spectrum of mutations involving sterolin-1 and sterolin-2, encoded by ABCG5 and ABCG8, respectively. *Am J Hum Genet*. 2001;69(2):278-90.
13. Ordovas JM, and Tai ES. The babel of the ABCs: novel transporters involved in the regulation of sterol absorption and excretion. *Nutr Rev*. 2002;60(1):30-3.
14. Graf GA, Li WP, Gerard RD, Gelissen I, White A, Cohen JC, et al. Coexpression of ATP-binding cassette proteins ABCG5 and ABCG8 permits their transport to the apical surface. *J Clin Invest*. 2002;110(5):659-69.
15. Altmann SW, Davis HR, Jr., Zhu LJ, Yao X, Hoos LM, Tetzloff G, et al. Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science*. 2004;303(5661):1201-4.
16. Gerloff T, Stieger B, Hagenbuch B, Madon J, Landmann L, Roth J, et al. The sister of P-glycoprotein represents the canalicular bile salt export pump of mammalian liver. *J Biol Chem*. 1998;273(16):10046-50.
17. Brown MS, and Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*. 1986;232(4746):34-47.
18. Uhlen M, Fagerberg L, Hallstrom BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, et al. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science*. 2015;347(6220):1260419.
19. Goldstein JL, DeBose-Boyd RA, and Brown MS. Protein sensors for membrane sterols. *Cell*. 2006;124(1):35-46.

20. European Association for the Study of the L, European Association for the Study of D, and European Association for the Study of O. EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. 2016;64(6):1388-402.
21. Rau M, Weiss J, and Geier A. [Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)]. *Dtsch Med Wochenschr*. 2015;140(14):1051-5.
22. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, and Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*. 2016;64(1):73-84.
23. Lonardo A, Ballestri S, Marchesini G, Angulo P, and Loria P. Nonalcoholic fatty liver disease: a precursor of the metabolic syndrome. *Dig Liver Dis*. 2015;47(3):181-90.
24. Charlton MR, Burns JM, Pedersen RA, Watt KD, Heimbach JK, and Dierkhising RA. Frequency and outcomes of liver transplantation for nonalcoholic steatohepatitis in the United States. *Gastroenterology*. 2011;141(4):1249-53.
25. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Charlton M, Cusi K, Rinella M, et al. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*. 2018;67(1):328-57.
26. Angulo P, Kleiner DE, Dam-Larsen S, Adams LA, Bjornsson ES, Charatcharoenwitthaya P, et al. Liver Fibrosis, but No Other Histologic Features, Is Associated With Long-term Outcomes of Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*. 2015;149(2):389-97 e10.
27. Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, Cerrelli F, Lenzi M, Manini R, et al. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology*. 2003;37(4):917-23.
28. Kim D, and Kim WR. Nonobese Fatty Liver Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2017;15(4):474-85.
29. Takaki A, Kawai D, and Yamamoto K. Multiple hits, including oxidative stress, as pathogenesis and treatment target in non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *Int J Mol Sci*. 2013;14(10):20704-28.
30. Lonardo A, Nascimbeni F, Maurantonio M, Marrazzo A, Rinaldi L, and Adinolfi LE. Nonalcoholic fatty liver disease: Evolving paradigms. *World J Gastroenterol*. 2017;23(36):6571-92.
31. Arner P. Insulin resistance in type 2 diabetes: role of fatty acids. *Diabetes Metab Res Rev*. 2002;18 Suppl 2:S5-9.
32. Bourbon NA, Yun J, and Kester M. Ceramide directly activates protein kinase C zeta to regulate a stress-activated protein kinase signaling complex. *J Biol Chem*. 2000;275(45):35617-23.
33. Salinas M, Lopez-Valdaliso R, Martin D, Alvarez A, and Cuadrado A. Inhibition of PKB/Akt1 by C2-ceramide involves activation of ceramide-activated protein phosphatase in PC12 cells. *Mol Cell Neurosci*. 2000;15(2):156-69.
34. Brown MS, and Goldstein JL. Selective versus total insulin resistance: a pathogenic paradox. *Cell Metab*. 2008;7(2):95-6.
35. Petersen MC, Madiraju AK, Gassaway BM, Marcel M, Nasiri AR, Butrico G, et al. Insulin receptor Thr1160 phosphorylation mediates lipid-induced hepatic insulin resistance. *J Clin Invest*. 2016;126(11):4361-71.
36. Samuel VT, Liu ZX, Wang A, Beddow SA, Geisler JG, Kahn M, et al. Inhibition of protein kinase C epsilon prevents hepatic insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest*. 2007;117(3):739-45.
37. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;257(1):79-83.
38. Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, Hara K, Ueki K, and Tobe K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest*. 2006;116(7):1784-92.

39. Awazawa M, Ueki K, Inabe K, Yamauchi T, Kaneko K, Okazaki Y, et al. Adiponectin suppresses hepatic SREBP1c expression in an AdipoR1/LKB1/AMPK dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;382(1):51-6.
40. Perdomo CM, Fruhbeck G, and Escalada J. Impact of Nutritional Changes on Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Nutrients*. 2019;11(3).
41. Nakamuta M, Kohjima M, Morizono S, Kotoh K, Yoshimoto T, Miyagi I, et al. Evaluation of fatty acid metabolism-related gene expression in nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Med*. 2005;16(4):631-5.
42. Kainuma M, Fujimoto M, Sekiya N, Tsuneyama K, Cheng C, Takano Y, et al. Cholesterol-fed rabbit as a unique model of nonalcoholic, nonobese, non-insulin-resistant fatty liver disease with characteristic fibrosis. *J Gastroenterol*. 2006;41(10):971-80.
43. Savard C, Tartaglione EV, Kuver R, Haigh WG, Farrell GC, Subramanian S, et al. Synergistic interaction of dietary cholesterol and dietary fat in inducing experimental steatohepatitis. *Hepatology*. 2013;57(1):81-92.
44. Romeo S, Kozlitina J, Xing C, Pertsemlidis A, Cox D, Pennacchio LA, et al. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet*. 2008;40(12):1461-5.
45. He S, McPhaul C, Li JZ, Garuti R, Kinch L, Grishin NV, et al. A sequence variation (I148M) in PNPLA3 associated with nonalcoholic fatty liver disease disrupts triglyceride hydrolysis. *J Biol Chem*. 2010;285(9):6706-15.
46. Trepo E. Contribution of PNPLA3 gene to the natural history of liver diseases. *Acta Gastroenterol Belg*. 2017;80(1):43-51.
47. Krawczyk M, Rau M, Schattenberg JM, Bantel H, Pathil A, Demir M, et al. Combined effects of the PNPLA3 rs738409, TM6SF2 rs58542926, and MBOAT7 rs641738 variants on NAFLD severity: a multicenter biopsy-based study. *J Lipid Res*. 2017;58(1):247-55.
48. Higashi T, Friedman SL, and Hoshida Y. Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis. *Adv Drug Deliv Rev*. 2017;121:27-42.
49. Puche JE, Saiman Y, and Friedman SL. Hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Compr Physiol*. 2013;3(4):1473-92.
50. Trauner M, Arrese M, and Wagner M. Fatty liver and lipotoxicity. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1801(3):299-310.
51. Koliaki C, Szendroedi J, Kaul K, Jelenik T, Nowotny P, Jankowiak F, et al. Adaptation of hepatic mitochondrial function in humans with non-alcoholic fatty liver is lost in steatohepatitis. *Cell Metab*. 2015;21(5):739-46.
52. Marchisello S, Di Pino A, Scicali R, Urbano F, Piro S, Purrello F, et al. Pathophysiological, Molecular and Therapeutic Issues of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: An Overview. *Int J Mol Sci*. 2019;20(8).
53. Malhi H, and Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress in liver disease. *J Hepatol*. 2011;54(4):795-809.
54. McClain CJ, Barve S, and Deaciuc I. Good fat/bad fat. *Hepatology*. 2007;45(6):1343-6.
55. Arguello G, Balboa E, Arrese M, and Zanlungo S. Recent insights on the role of cholesterol in non-alcoholic fatty liver disease. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1852(9):1765-78.
56. Min HK, Kapoor A, Fuchs M, Mirshahi F, Zhou H, Maher J, et al. Increased hepatic synthesis and dysregulation of cholesterol metabolism is associated with the severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Cell Metab*. 2012;15(5):665-74.
57. Bashiri A, Nesan D, Tavallaei G, Sue-Chue-Lam I, Chien K, Maguire GF, et al. Cellular cholesterol accumulation modulates high fat high sucrose (HFHS) diet-induced ER stress and hepatic inflammasome activation in the development of non-alcoholic steatohepatitis. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1861(7):594-605.
58. Bozaykut P, Sahin A, Karademir B, and Ozer NK. Endoplasmic reticulum stress related molecular mechanisms in nonalcoholic steatohepatitis. *Mech Ageing Dev*. 2016;157:17-29.

59. Henkel J, Coleman CD, Schraplau A, Jhrens K, Weber D, Castro JP, et al. Induction of steatohepatitis (NASH) with insulin resistance in wildtype B6 mice by a western-type diet containing soybean oil and cholesterol. *Mol Med*. 2017;23:70-82.
60. Puschel GP, and Henkel J. Dietary cholesterol does not break your heart but kills your liver. *Porto Biomed J*. 2018;3(1):e12.
61. Xu L, Bai Q, Rodriguez-Agudo D, Hylemon PB, Heuman DM, Pandak WM, et al. Regulation of hepatocyte lipid metabolism and inflammatory response by 25-hydroxycholesterol and 25-hydroxycholesterol-3-sulfate. *Lipids*. 2010;45(9):821-32.
62. Bellanti F, Mitarotonda D, Tamborra R, Blonda M, Iannelli G, Petrella A, et al. Oxysterols induce mitochondrial impairment and hepatocellular toxicity in non-alcoholic fatty liver disease. *Free Radic Biol Med*. 2014;75 Suppl 1:S16-7.
63. Ferre N, Martinez-Clemente M, Lopez-Parra M, Gonzalez-Periz A, Horrillo R, Planaguma A, et al. Increased susceptibility to exacerbated liver injury in hypercholesterolemic ApoE-deficient mice: potential involvement of oxysterols. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2009;296(3):G553-62.
64. Ioannou GN, Haigh WG, Thorning D, and Savard C. Hepatic cholesterol crystals and crown-like structures distinguish NASH from simple steatosis. *J Lipid Res*. 2013;54(5):1326-34.
65. Ballestri S, Nascimbeni F, Baldelli E, Marrazzo A, Romagnoli D, Targher G, et al. Ultrasonographic fatty liver indicator detects mild steatosis and correlates with metabolic/histological parameters in various liver diseases. *Metabolism*. 2017;72:57-65.
66. Castera L, Friedrich-Rust M, and Loomba R. Noninvasive Assessment of Liver Disease in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*. 2019;156(5):1264-81 e4.
67. Bedogni G, Bellentani S, Miglioli L, Masutti F, Passalacqua M, Castiglione A, et al. The Fatty Liver Index: a simple and accurate predictor of hepatic steatosis in the general population. *BMC Gastroenterol*. 2006;6:33.
68. Angulo P, Hui JM, Marchesini G, Bugianesi E, George J, Farrell GC, et al. The NAFLD fibrosis score: a noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD. *Hepatology*. 2007;45(4):846-54.
69. Petta S, Vanni E, Bugianesi E, Di Marco V, Camma C, Cabibi D, et al. The combination of liver stiffness measurement and NAFLD fibrosis score improves the noninvasive diagnostic accuracy for severe liver fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Liver Int*. 2015;35(5):1566-73.
70. Petta S, Wong VW, Camma C, Hiriart JB, Wong GL, Marra F, et al. Improved noninvasive prediction of liver fibrosis by liver stiffness measurement in patients with nonalcoholic fatty liver disease accounting for controlled attenuation parameter values. *Hepatology*. 2017;65(4):1145-55.
71. Geier A, and Boursier J. Non-invasive diagnosis of patients with 'at-risk' NAFLD : only fibrosis counts? *Gut*. 2020;69(7):1164-5.
72. Zelber-Sagi S, Nitzan-Kaluski D, Goldsmith R, Webb M, Blendis L, Halpern Z, et al. Long term nutritional intake and the risk for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a population based study. *J Hepatol*. 2007;47(5):711-7.
73. Zelber-Sagi S, Nitzan-Kaluski D, Goldsmith R, Webb M, Zvibel I, Goldiner I, et al. Role of leisure-time physical activity in nonalcoholic fatty liver disease: a population-based study. *Hepatology*. 2008;48(6):1791-8.
74. Vilar-Gomez E, Martinez-Perez Y, Calzadilla-Bertot L, Torres-Gonzalez A, Gra-Oramas B, Gonzalez-Fabian L, et al. Weight Loss Through Lifestyle Modification Significantly Reduces Features of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology*. 2015;149(2):367-78 e5; quiz e14-5.
75. Properzi C, O'Sullivan TA, Sherriff JL, Ching HL, Jeffrey GP, Buckley RF, et al. Ad Libitum Mediterranean and Low-Fat Diets Both Significantly Reduce Hepatic Steatosis: A Randomized Controlled Trial. *Hepatology*. 2018;68(5):1741-54.
76. Kim HS, Ike A, and Mathew J. Effect of exercise on the development of new fatty liver and the resolution of existing fatty liver. *J Hepatol*. 2017;66(3):664-5.

77. Wadden TA, Butryn ML, and Wilson C. Lifestyle modification for the management of obesity. *Gastroenterology*. 2007;132(6):2226-38.
78. Roeb E, and Geier A. Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) - current treatment recommendations and future developments. *Z Gastroenterol*. 2019;57(4):508-17.
79. Cusi K, Orsak B, Bril F, Lomonaco R, Hecht J, Ortiz-Lopez C, et al. Long-Term Pioglitazone Treatment for Patients With Nonalcoholic Steatohepatitis and Prediabetes or Type 2 Diabetes Mellitus: A Randomized Trial. *Ann Intern Med*. 2016;165(5):305-15.
80. Sanyal AJ, Chalasani N, Kowdley KV, McCullough A, Diehl AM, Bass NM, et al. Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med*. 2010;362(18):1675-85.
81. Bower G, Athanasiou T, Isla AM, Harling L, Li JV, Holmes E, et al. Bariatric surgery and nonalcoholic fatty liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2015;27(7):755-68.
82. Nair S, Verma S, and Thuluvath PJ. Obesity and its effect on survival in patients undergoing orthotopic liver transplantation in the United States. *Hepatology*. 2002;35(1):105-9.
83. Boulay JL, O'Shea JJ, and Paul WE. Molecular phylogeny within type I cytokines and their cognate receptors. *Immunity*. 2003;19(2):159-63.
84. Taga T, Hibi M, Hirata Y, Yamasaki K, Yasukawa K, Matsuda T, et al. Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. *Cell*. 1989;58(3):573-81.
85. Grant SL, and Begley CG. The oncostatin M signalling pathway: reversing the neoplastic phenotype? *Mol Med Today*. 1999;5(9):406-12.
86. Liu J, Modrell B, Aruffo A, Marken JS, Taga T, Yasukawa K, et al. Interleukin-6 signal transducer gp130 mediates oncostatin M signaling. *J Biol Chem*. 1992;267(24):16763-6.
87. Mosley B, De Imus C, Friend D, Boiani N, Thoma B, Park LS, et al. Dual oncostatin M (OSM) receptors. Cloning and characterization of an alternative signaling subunit conferring OSM-specific receptor activation. *J Biol Chem*. 1996;271(51):32635-43.
88. Gearing DP, Comeau MR, Friend DJ, Gimpel SD, Thut CJ, McGourty J, et al. The IL-6 signal transducer, gp130: an oncostatin M receptor and affinity converter for the LIF receptor. *Science*. 1992;255(5050):1434-7.
89. Walker EC, McGregor NE, Poulton IJ, Solano M, Pompolo S, Fernandes TJ, et al. Oncostatin M promotes bone formation independently of resorption when signaling through leukemia inhibitory factor receptor in mice. *J Clin Invest*. 2010;120(2):582-92.
90. Walker EC, Johnson RW, Hu Y, Brennan HJ, Poulton IJ, Zhang JG, et al. Murine Oncostatin M Acts via Leukemia Inhibitory Factor Receptor to Phosphorylate Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) but Not STAT1, an Effect That Protects Bone Mass. *J Biol Chem*. 2016;291(41):21703-16.
91. Chattopadhyay S, Tracy E, Liang P, Robledo O, Rose-John S, and Baumann H. Interleukin-31 and oncostatin-M mediate distinct signaling reactions and response patterns in lung epithelial cells. *J Biol Chem*. 2007;282(5):3014-26.
92. Boulton TG, Zhong Z, Wen Z, Darnell JE, Jr., Stahl N, and Yancopoulos GD. STAT3 activation by cytokines utilizing gp130 and related transducers involves a secondary modification requiring an H7-sensitive kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(15):6915-9.
93. Hermanns HM, Radtke S, Schaper F, Heinrich PC, and Behrmann I. Non-redundant signal transduction of interleukin-6-type cytokines. The adapter protein Shc is specifically recruited to the oncostatin M receptor. *J Biol Chem*. 2000;275(52):40742-8.
94. Li WQ, Dehnade F, and Zafarullah M. Oncostatin M-induced matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase-3 genes expression in chondrocytes requires Janus kinase/STAT signaling pathway. *J Immunol*. 2001;166(5):3491-8.
95. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G, and Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J*. 2003;374(Pt 1):1-20.

96. Boing I, Stross C, Radtke S, Lippok BE, Heinrich PC, and Hermanns HM. Oncostatin M-induced activation of stress-activated MAP kinases depends on tyrosine 861 in the OSM receptor and requires Jak1 but not Src kinases. *Cell Signal*. 2006;18(1):50-61.
97. Hermanns HM. Oncostatin M and interleukin-31: Cytokines, receptors, signal transduction and physiology. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2015;26(5):545-58.
98. Yoshimura A, Ichihara M, Kinjyo I, Moriyama M, Copeland NG, Gilbert DJ, et al. Mouse oncostatin M: an immediate early gene induced by multiple cytokines through the JAK-STAT5 pathway. *EMBO J*. 1996;15(5):1055-63.
99. Ma Y, Streiff RJ, Liu J, Spence MJ, and Vestal RE. Cloning and characterization of human oncostatin M promoter. *Nucleic Acids Res*. 1999;27(23):4649-57.
100. Magrangeas F, Boisteau O, Denis S, Jacques Y, and Minvielle S. Negative regulation of oncostatin M signaling by suppressor of cytokine signaling (SOCS-3). *Eur Cytokine Netw*. 2001;12(2):309-15.
101. Blanchard F, Wang Y, Kinzie E, Duplomb L, Godard A, and Baumann H. Oncostatin M regulates the synthesis and turnover of gp130, leukemia inhibitory factor receptor alpha, and oncostatin M receptor beta by distinct mechanisms. *J Biol Chem*. 2001;276(50):47038-45.
102. Zarling JM, Shoyab M, Marquardt H, Hanson MB, Lioubin MN, and Todaro GJ. Oncostatin M: a growth regulator produced by differentiated histiocytic lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83(24):9739-43.
103. Luo P, Wang PX, Li ZZ, Zhang XJ, Jiang X, Gong J, et al. Hepatic Oncostatin M Receptor beta Regulates Obesity-Induced Steatosis and Insulin Resistance. *Am J Pathol*. 2016;186(5):1278-92.
104. Grove RI, Mazzucco CE, Radka SF, Shoyab M, and Kiener PA. Oncostatin M up-regulates low density lipoprotein receptors in HepG2 cells by a novel mechanism. *J Biol Chem*. 1991;266(27):18194-9.
105. Kong W, Abidi P, Kraemer FB, Jiang JD, and Liu J. In vivo activities of cytokine oncostatin M in the regulation of plasma lipid levels. *J Lipid Res*. 2005;46(6):1163-71.
106. Komori T, Tanaka M, Furuta H, Akamizu T, Miyajima A, and Morikawa Y. Oncostatin M is a potential agent for the treatment of obesity and related metabolic disorders: a study in mice. *Diabetologia*. 2015;58(8):1868-76.
107. Henkel J, Gartner D, Dorn C, Hellerbrand C, Schanze N, Elz SR, et al. Oncostatin M produced in Kupffer cells in response to PGE2: possible contributor to hepatic insulin resistance and steatosis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2011;91(7):1107-17.
108. Levy MT, Trojanowska M, and Reuben A. Oncostatin M: a cytokine upregulated in human cirrhosis, increases collagen production by human hepatic stellate cells. *J Hepatol*. 2000;32(2):218-26.
109. Longo M, Zatterale F, Naderi J, Parrillo L, Formisano P, Raciti GA, et al. Adipose Tissue Dysfunction as Determinant of Obesity-Associated Metabolic Complications. *Int J Mol Sci*. 2019;20(9).
110. Komori T, Tanaka M, Senba E, Miyajima A, and Morikawa Y. Deficiency of oncostatin M receptor beta (OSMRbeta) exacerbates high-fat diet-induced obesity and related metabolic disorders in mice. *J Biol Chem*. 2014;289(20):13821-37.
111. Komori T, Tanaka M, Senba E, Miyajima A, and Morikawa Y. Lack of oncostatin M receptor beta leads to adipose tissue inflammation and insulin resistance by switching macrophage phenotype. *J Biol Chem*. 2013;288(30):21861-75.
112. Elks CM, Zhao P, Grant RW, Hang H, Bailey JL, Burk DH, et al. Loss of Oncostatin M Signaling in Adipocytes Induces Insulin Resistance and Adipose Tissue Inflammation in Vivo. *J Biol Chem*. 2016;291(33):17066-76.
113. Sanchez-Infantes D, White UA, Elks CM, Morrison RF, Gimble JM, Considine RV, et al. Oncostatin m is produced in adipose tissue and is regulated in conditions of obesity and type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(2):E217-25.
114. White UA, Stewart WC, Mynatt RL, and Stephens JM. Neuropoietin attenuates adipogenesis and induces insulin resistance in adipocytes. *J Biol Chem*. 2008;283(33):22505-12.

115. Miyaoka Y, Tanaka M, Naiki T, and Miyajima A. Oncostatin M inhibits adipogenesis through the RAS/ERK and STAT5 signaling pathways. *J Biol Chem*. 2006;281(49):37913-20.
116. Villarroya J, Cereijo R, and Villarroya F. An endocrine role for brown adipose tissue? *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2013;305(5):E567-72.
117. Sanchez-Infantes D, Cereijo R, Peyrou M, Piquer-Garcia I, Stephens JM, and Villarroya F. Oncostatin m impairs brown adipose tissue thermogenic function and the browning of subcutaneous white adipose tissue. *Obesity (Silver Spring)*. 2017;25(1):85-93.
118. Bieghs V, Van Gorp PJ, Wouters K, Hendriks T, Gijbels MJ, van Bilsen M, et al. LDL receptor knock-out mice are a physiological model particularly vulnerable to study the onset of inflammation in non-alcoholic fatty liver disease. *PLoS One*. 2012;7(1):e30668.
119. Jahn D, Kircher S, Hermanns HM, and Geier A. Animal models of NAFLD from a hepatologist's point of view. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2019;1865(5):943-53.
120. Folch J, Lees M, and Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*. 1957;226(1):497-509.
121. Livak KJ, and Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
122. Hajer GR, van Haeften TW, and Visseren FL. Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *Eur Heart J*. 2008;29(24):2959-71.
123. Wagner M, Zollner G, and Trauner M. Nuclear receptor regulation of the adaptive response of bile acid transporters in cholestasis. *Semin Liver Dis*. 2010;30(2):160-77.
124. Brass EP, and Vetter WH. Interleukin-6, but not tumour necrosis factor-alpha, increases lipogenesis in rat hepatocyte primary cultures. *Biochem J*. 1994;301 (Pt 1):193-7.
125. Kakino S, Ohki T, Nakayama H, Yuan X, Otabe S, Hashinaga T, et al. Pivotal Role of TNF-alpha in the Development and Progression of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in a Murine Model. *Horm Metab Res*. 2018;50(1):80-7.
126. Kubes P, and Mehal WZ. Sterile inflammation in the liver. *Gastroenterology*. 2012;143(5):1158-72.
127. Mirea AM, Tack CJ, Chavakis T, Joosten LAB, and Toonen EJM. IL-1 Family Cytokine Pathways Underlying NAFLD: Towards New Treatment Strategies. *Trends Mol Med*. 2018;24(5):458-71.
128. Negrin KA, Roth Flach RJ, DiStefano MT, Matevossian A, Friedline RH, Jung D, et al. IL-1 signaling in obesity-induced hepatic lipogenesis and steatosis. *PLoS One*. 2014;9(9):e107265.
129. Baumann H, and Gaudie J. Regulation of hepatic acute phase plasma protein genes by hepatocyte stimulating factors and other mediators of inflammation. *Mol Biol Med*. 1990;7(2):147-59.
130. Haukeland JW, Damas JK, Konopski Z, Loberg EM, Haaland T, Goverud I, et al. Systemic inflammation in nonalcoholic fatty liver disease is characterized by elevated levels of CCL2. *J Hepatol*. 2006;44(6):1167-74.
131. Obstfeld AE, Sugaru E, Thearle M, Francisco AM, Gayet C, Ginsberg HN, et al. C-C chemokine receptor 2 (CCR2) regulates the hepatic recruitment of myeloid cells that promote obesity-induced hepatic steatosis. *Diabetes*. 2010;59(4):916-25.
132. Yoshiji H, Kuriyama S, Miyamoto Y, Thorgerisson UP, Gomez DE, Kawata M, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 promotes liver fibrosis development in a transgenic mouse model. *Hepatology*. 2000;32(6):1248-54.
133. Kir S, Zhang Y, Gerard RD, Kliewer SA, and Mangelsdorf DJ. Nuclear receptors HNF4alpha and LXR-1 cooperate in regulating Cyp7a1 in vivo. *J Biol Chem*. 2012;287(49):41334-41.

134. Matsuzawa N, Takamura T, Kurita S, Misu H, Ota T, Ando H, et al. Lipid-induced oxidative stress causes steatohepatitis in mice fed an atherogenic diet. *Hepatology*. 2007;46(5):1392-403.
135. Woollett LA, Buckley DD, Yao L, Jones PJ, Granholm NA, Tolley EA, et al. Cholic acid supplementation enhances cholesterol absorption in humans. *Gastroenterology*. 2004;126(3):724-31.
136. Sturzeneker MCS, de Noronha L, Olandoski M, Wendling LU, and Precoma DB. Ramipril significantly attenuates the development of non-alcoholic steatohepatitis in hyperlipidaemic rabbits. *Am J Cardiovasc Dis*. 2019;9(2):8-17.
137. Tanaka M, Hirabayashi Y, Sekiguchi T, Inoue T, Katsuki M, and Miyajima A. Targeted disruption of oncostatin M receptor results in altered hematopoiesis. *Blood*. 2003;102(9):3154-62.
138. Nakamura K, Nonaka H, Saito H, Tanaka M, and Miyajima A. Hepatocyte proliferation and tissue remodeling is impaired after liver injury in oncostatin M receptor knockout mice. *Hepatology*. 2004;39(3):635-44.
139. Rose TM, Weiford DM, Gunderson NL, and Bruce AG. Oncostatin M (OSM) inhibits the differentiation of pluripotent embryonic stem cells in vitro. *Cytokine*. 1994;6(1):48-54.
140. Lindberg RA, Juan TS, Welcher AA, Sun Y, Cupples R, Guthrie B, et al. Cloning and characterization of a specific receptor for mouse oncostatin M. *Mol Cell Biol*. 1998;18(6):3357-67.
141. Zhou Y, Abidi P, Kim A, Chen W, Huang TT, Kraemer FB, et al. Transcriptional activation of hepatic ACSL3 and ACSL5 by oncostatin m reduces hypertriglyceridemia through enhanced beta-oxidation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(10):2198-205.
142. Subramanian S, Goodspeed L, Wang S, Kim J, Zeng L, Ioannou GN, et al. Dietary cholesterol exacerbates hepatic steatosis and inflammation in obese LDL receptor-deficient mice. *J Lipid Res*. 2011;52(9):1626-35.
143. Matsuda M, Tsurusaki S, Miyata N, Saijou E, Okochi H, Miyajima A, et al. Oncostatin M causes liver fibrosis by regulating cooperation between hepatic stellate cells and macrophages in mice. *Hepatology*. 2018;67(1):296-312.
144. Miller MR, Pereira RI, Langefeld CD, Lorenzo C, Rotter JI, Chen YD, et al. Levels of free fatty acids (FFA) are associated with insulin resistance but do not explain the relationship between adiposity and insulin resistance in Hispanic Americans: the IRAS Family Study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(9):3285-91.
145. Pittman RC, Carew TE, Attie AD, Witztum JL, Watanabe Y, and Steinberg D. Receptor-dependent and receptor-independent degradation of low density lipoprotein in normal rabbits and in receptor-deficient mutant rabbits. *J Biol Chem*. 1982;257(14):7994-8000.
146. Ishibashi S, Brown MS, Goldstein JL, Gerard RD, Hammer RE, and Herz J. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J Clin Invest*. 1993;92(2):883-93.
147. Song HY, Kim MR, Lee MJ, Jeon ES, Bae YC, Jung JS, et al. Oncostatin M decreases adiponectin expression and induces dedifferentiation of adipocytes by JAK3- and MEK-dependent pathways. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(2):439-49.
148. Berg AH, Combs TP, Du X, Brownlee M, and Scherer PE. The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med*. 2001;7(8):947-53.
149. Li S, Shin HJ, Ding EL, and van Dam RM. Adiponectin levels and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*. 2009;302(2):179-88.
150. White UA, Stewart WC, and Stephens JM. Gp130 cytokines exert differential patterns of crosstalk in adipocytes both in vitro and in vivo. *Obesity (Silver Spring)*. 2011;19(5):903-10.
151. Kim JY, van de Wall E, Laplante M, Azzara A, Trujillo ME, Hofmann SM, et al. Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue. *J Clin Invest*. 2007;117(9):2621-37.

152. Sarjeant K, and Stephens JM. Adipogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(9):a008417.
153. Rega G, Kaun C, Weiss TW, Demyanets S, Zorn G, Kastl SP, et al. Inflammatory cytokines interleukin-6 and oncostatin m induce plasminogen activator inhibitor-1 in human adipose tissue. *Circulation.* 2005;111(15):1938-45.
154. Festa A, Williams K, Tracy RP, Wagenknecht LE, and Haffner SM. Progression of plasminogen activator inhibitor-1 and fibrinogen levels in relation to incident type 2 diabetes. *Circulation.* 2006;113(14):1753-9.
155. Lijnen HR, Alessi MC, Frederix L, Collen D, and Juhan-Vague I. Tiplaxtinin impairs nutritionally induced obesity in mice. *Thromb Haemost.* 2006;96(6):731-7.
156. Alessi MC, Poggi M, and Juhan-Vague I. Plasminogen activator inhibitor-1, adipose tissue and insulin resistance. *Curr Opin Lipidol.* 2007;18(3):240-5.
157. Yoshimura T, Robinson EA, Tanaka S, Appella E, Kuratsu J, and Leonard EJ. Purification and amino acid analysis of two human glioma-derived monocyte chemoattractants. *J Exp Med.* 1989;169(4):1449-59.
158. Richards CD, Brown TJ, Shoyab M, Baumann H, and Gauldie J. Recombinant oncostatin M stimulates the production of acute phase proteins in HepG2 cells and rat primary hepatocytes in vitro. *J Immunol.* 1992;148(6):1731-6.
159. Raynes JG, and Cooper EH. Comparison of serum amyloid A protein and C-reactive protein concentrations in cancer and non-malignant disease. *J Clin Pathol.* 1983;36(7):798-803.
160. Kampschmidt RF, and Upchurch HF. Effect of leukocytic endogenous mediator on plasma fibrinogen and haptoglobin. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1974;146(3):904-7.
161. Ku NO, and Mortensen RF. The mouse C-reactive protein (CRP) gene is expressed in response to IL-1 but not IL-6. *Cytokine.* 1993;5(4):319-26.
162. Pepys MB, Baltz M, Gomer K, Davies AJ, and Doenhoff M. Serum amyloid P-component is an acute-phase reactant in the mouse. *Nature.* 1979;278(5701):259-61.
163. Dooley S, and ten Dijke P. TGF-beta in progression of liver disease. *Cell Tissue Res.* 2012;347(1):245-56.
164. Castilla A, Prieto J, and Fausto N. Transforming growth factors beta 1 and alpha in chronic liver disease. Effects of interferon alfa therapy. *N Engl J Med.* 1991;324(14):933-40.
165. Neubauer K, Kruger M, Quondamatteo F, Knittel T, Saile B, and Ramadori G. Transforming growth factor-beta1 stimulates the synthesis of basement membrane proteins laminin, collagen type IV and entactin in rat liver sinusoidal endothelial cells. *J Hepatol.* 1999;31(4):692-702.
166. Richards CD, Shoyab M, Brown TJ, and Gauldie J. Selective regulation of metalloproteinase inhibitor (TIMP-1) by oncostatin M in fibroblasts in culture. *J Immunol.* 1993;150(12):5596-603.
167. Vida M, Gavito AL, Pavon FJ, Bautista D, Serrano A, Suarez J, et al. Chronic administration of recombinant IL-6 upregulates lipogenic enzyme expression and aggravates high-fat-diet-induced steatosis in IL-6-deficient mice. *Dis Model Mech.* 2015;8(7):721-31.
168. Rigotti A, Miettinen HE, and Krieger M. The role of the high-density lipoprotein receptor SR-BI in the lipid metabolism of endocrine and other tissues. *Endocr Rev.* 2003;24(3):357-87.
169. Mardones P, Pilon A, Bouly M, Duran D, Nishimoto T, Arai H, et al. Fibrates down-regulate hepatic scavenger receptor class B type I protein expression in mice. *J Biol Chem.* 2003;278(10):7884-90.
170. Brown MS, Radhakrishnan A, and Goldstein JL. Retrospective on Cholesterol Homeostasis: The Central Role of Scap. *Annu Rev Biochem.* 2018;87:783-807.
171. Wang HY, Quan C, Hu C, Xie B, Du Y, Chen L, et al. A lipidomics study reveals hepatic lipid signatures associating with deficiency of the LDL receptor in a rat model. *Biol Open.* 2016;5(7):979-86.

172. Spady DK, Huettinger M, Bilheimer DW, and Dietschy JM. Role of receptor-independent low density lipoprotein transport in the maintenance of tissue cholesterol balance in the normal and WHHL rabbit. *J Lipid Res.* 1987;28(1):32-41.
173. Li T, Owsley E, Matozel M, Hsu P, Novak CM, and Chiang JY. Transgenic expression of cholesterol 7 α -hydroxylase in the liver prevents high-fat diet-induced obesity and insulin resistance in mice. *Hepatology.* 2010;52(2):678-90.
174. Chiang JY, Kimmel R, and Stroup D. Regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase gene (CYP7A1) transcription by the liver orphan receptor (LXR α). *Gene.* 2001;262(1-2):257-65.
175. Stravitz RT, Rao YP, Vlahcevic ZR, Gurley EC, Jarvis WD, and Hylemon PB. Hepatocellular protein kinase C activation by bile acids: implications for regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase. *Am J Physiol.* 1996;271(2 Pt 1):G293-303.
176. Gupta S, Stravitz RT, Dent P, and Hylemon PB. Down-regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) gene expression by bile acids in primary rat hepatocytes is mediated by the c-Jun N-terminal kinase pathway. *J Biol Chem.* 2001;276(19):15816-22.
177. Holt JA, Luo G, Billin AN, Bisi J, McNeill YY, Kozarsky KF, et al. Definition of a novel growth factor-dependent signal cascade for the suppression of bile acid biosynthesis. *Genes Dev.* 2003;17(13):1581-91.
178. Kubin T, Poling J, Kostin S, Gajawada P, Hein S, Rees W, et al. Oncostatin M is a major mediator of cardiomyocyte dedifferentiation and remodeling. *Cell Stem Cell.* 2011;9(5):420-32.
179. Wong N, Blair AR, Morahan G, and Andrikopoulos S. The deletion variant of nicotinamide nucleotide transhydrogenase (Nnt) does not affect insulin secretion or glucose tolerance. *Endocrinology.* 2010;151(1):96-102.
180. Toye AA, Lippiat JD, Proks P, Shimomura K, Bentley L, Hugill A, et al. A genetic and physiological study of impaired glucose homeostasis control in C57BL/6J mice. *Diabetologia.* 2005;48(4):675-86.
181. Freeman HC, Hugill A, Dear NT, Ashcroft FM, and Cox RD. Deletion of nicotinamide nucleotide transhydrogenase: a new quantitative trait locus accounting for glucose intolerance in C57BL/6J mice. *Diabetes.* 2006;55(7):2153-6.
182. Nicholson A, Reifsnyder PC, Malcolm RD, Lucas CA, MacGregor GR, Zhang W, et al. Diet-induced obesity in two C57BL/6 substrains with intact or mutant nicotinamide nucleotide transhydrogenase (Nnt) gene. *Obesity (Silver Spring).* 2010;18(10):1902-5.
183. Kawashita E, Ishihara K, Nomoto M, Taniguchi M, and Akiba S. A comparative analysis of hepatic pathological phenotypes in C57BL/6J and C57BL/6N mouse strains in non-alcoholic steatohepatitis models. *Sci Rep.* 2019;9(1):204.
184. Aston-Mourney K, Wong N, Kebede M, Zraika S, Balmer L, McMahon JM, et al. Increased nicotinamide nucleotide transhydrogenase levels predispose to insulin hypersecretion in a mouse strain susceptible to diabetes. *Diabetologia.* 2007;50(12):2476-85.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Einfluss von Oncostatin M auf die Pathogenese der Nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung“ eigenständig, d.h. insbesondere selbstständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ort, Datum

Unterschrift

Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled „Influence of Oncostatin M on the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease“ is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Place, Date

Signature

Curriculum Vitae