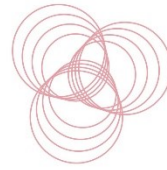


Universität  
Rostock



Traditio et Innovatio



Universitätsmedizin  
Rostock

Aus dem Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie der  
Universitätsmedizin Rostock

Direktorin: Prof. Brigitte Vollmar

Titel: Hepatoprotektiver Effekt von Interventionen bei  
Hochfettdiät-induzierter Adipositas in der Maus

Inauguraldissertation

zur Erlangung des akademischen Grades doctor medicinae (Dr. med.)

Universitätsmedizin Rostock

Vorgelegt von:

Katharina Leyens

Geb. 19.05.1997 in Köln

Dekan: Prof. Dr. med. Emil Reisinger

1. Gutachten: Prof. Dr. rer. nat. Angela Kuhla, Universitätsmedizin Rostock, Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie
2. Gutachten: Prof. Dr. H.S. Willenberg, Universitätsmedizin Rostock, Sektion für Endokrinologie und Stoffwechselkrankheiten
3. Gutachten: Prof. Dr. rer. nat. Markus Gräler, Universitätsklinikum Jena, Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin

Jahr der Einreichung: 2023

Jahr der Verteidigung: 2024

# Inhaltsverzeichnis

## **Inhaltsverzeichnis**

Zusammenfassung .....	I
Abbildungsverzeichnis .....	I
Tabellenverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis .....	I
1 Einleitung.....	1
1.1 Adipositas und das metabolische Syndrom.....	1
1.2 Nichtalkoholische Fettlebererkrankung .....	2
1.3 Merkmale der Leberschädigung .....	4
1.4 Veränderungen des Fettstoffwechsels bei NAFLD.....	5
1.5 Low-grade-Inflammation .....	7
1.6 Fibroblast-growth-factor 21 .....	8
1.7 Therapieansätze bei Adipositas .....	10
1.8 Fragestellung .....	12
2 Material und Methoden.....	13
2.1 Tierexperimentelles Design.....	13
2.2 Interventions-Parameter .....	15
2.2.1 Futterwechsel .....	15
2.2.2 Laufband.....	15
2.2.3 Intervallfasten.....	16
2.3 <i>In-vitro</i> -Experimente .....	17
2.4 Organentnahme .....	17
2.5 Blutplasmaanalysen.....	18
2.6 Histologische und immunhistochemische Lebergewebeanalysen .....	18
2.6.1 Histologie .....	18
2.6.2 Immunhistochemie .....	23
2.7 Molekularbiologische Untersuchungen.....	24
2.7.1 Western Blot.....	24

2.7.2	mRNA-Expressionsanalyse.....	29
2.8	Korrelationsanalyse.....	31
2.9	Statistik.....	32
3	Ergebnisse.....	33
3.1	Körpergewicht und -zusammensetzung.....	33
3.2	Hepatische Steatose.....	35
3.3	Inflammation.....	37
3.4	Systemische metabolische Marker.....	42
3.5	Leberenzyme.....	45
3.6	Entzündungsmarker.....	47
3.7	Fettstoffwechsel.....	48
3.7.1	Lipogenese.....	49
3.7.2	Cholesterinsynthese.....	50
3.7.3	$\beta$ -Oxidation.....	51
3.7.4	Ketogenese.....	54
3.7.5	Lipoproteine.....	55
3.8	FGF21.....	56
3.9	Korrelationsanalysen.....	58
3.10	<i>In-vitro</i> -Experiment $\beta$ - <i>klotho</i> -Expression.....	62
4	Diskussion.....	64
4.1	Methodische Betrachtung.....	64
4.2	Wirkung der Interventionen.....	65
4.2.1	Gewichtsreduktion und Veränderung des hepatischen Fettstoffwechsels durch Diätwechsel, Laufbandtraining und Fasten.....	66
4.2.2	Regeneratives Potenzial der Interventionen auf eine Leberschädigung.....	70
4.2.3	Reduktion TNF $\alpha$ -induzierter Low-grade-Inflammation durch Interventionen in der Leber.....	71
4.2.4	Regeneration einer TNF $\alpha$ -induzierten FGF21-Resistenz.....	72

5	Schlussfolgerung.....	74
6	Thesen.....	76
	Anhang.....	77
	Literatur.....	83
	Lebenslauf.....	102
	Danksagung.....	103
	Eidesstattliche Erklärung.....	105

### **Zusammenfassung**

*Hintergrund:* Adipositas wird meist durch ein Missverhältnis von Energieaufnahme und -verbrauch bedingt und steht häufig in engem Zusammenhang mit der Ausbildung einer Nichtalkoholischen Fettlebererkrankung (NAFLD). Die damit einhergehende Veränderung des Fettstoffwechsels ist auch mit einer verringerten FGF21-Sensitivität, welche durch hohe FGF21-Plasmakonzentration bei gleichzeitiger Reduktion des FGF21-Rezeptorkomplexes (FGFR1c und  $\beta$ -klotho) charakterisiert ist, assoziiert. Es wird vermutet, dass die im Rahmen von Adipositas assoziierte Inflammation dafür ursächlich ist. Mögliche langfristige Therapieansätze bei Adipositas und der damit assoziierten NAFLD sind ein Diätwechsel, körperliche Aktivität und Fasten. Ziel der vorliegenden Studie war es, den hepatoprotektiven Effekt dieser Therapieansätze zu untersuchen und in den Kontext mit Veränderungen des Fettstoffwechsels, inflammatorischer Vorgänge und der FGF21-Sensitivität zu setzen.

*Material und Methoden:* Ausgehend von einer ernährungsinduzierten Adipositas (diet-induced obesity (DIO)) (6 Monate) durch Fütterung einer Hochfettdiät (HFD) wurden C57BL/6-Mäuse für weitere 6 Monate verschiedenen Interventionen bzw. Kombinationen von Interventionen zugeführt. Nach Ablauf der 12-monatigen Experimente erfolgten verschiedene histologische und immunhistochemische Untersuchungen des Lebergewebes. Ergänzt wurde dies durch Blutplasma- und mRNA-Expressionsanalysen von inflammatorischen Mediatoren (Zytokinen) und Enzymen des Fettstoffwechsels. Der Zusammenhang zwischen Inflammation, NAFLD und FGF21-Sensitivität wurde ebenfalls durch Plasma- und Expressionsanalysen evaluiert sowie durch Korrelationsanalysen und *in-vitro* Experimente ergänzt.

*Ergebnisse:* Die Intervention Diätwechsel und die Kombination aus Aktivität und Fasten bei bestehender HFD zeigten *in-vivo* den größten hepatoprotektiven Effekt. Dieser äußerte sich vorwiegend in einer Verringerung von Gewicht und Fettmasse, Verbesserungen im Fettstoffwechsel sowie einer deutlichen Reduktion hepatischer *TNF $\alpha$* - und *FGF21*- Expression. Eine starke Korrelation von erhöhter  $\beta$ -klotho und FGFR1c-Expression in der Leber bei sinkender *TNF $\alpha$* -Expression und steigender FGF21-Plasmakonzentrationen deuten auf eine Erhöhung der FGF21-Responsivität durch Diätwechsel hin. Auch die *in-vitro* signifikant verringerte  $\beta$ -klotho Expression nach Behandlung von HepG2-Zellen mit hTNF $\alpha$  bekräftigen diesen Zusammenhang.

*Schlussfolgerung:* Eine erfolgreiche Therapie einer NAFLD ist durch einen Diätwechsel und auch die Kombination von Aktivität und Fasten bei bestehender HFD möglich und geht mit der Umkehr einer wohl durch TNF $\alpha$ -induzierten FGF21-Resistenz einher.

## Abbildungsverzeichnis

### **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Prävalenz von Übergewicht und Adipositas bei Erwachsenen in der Europäischen Union .....	1
Abbildung 2: Das metabolische Syndrom.....	2
Abbildung 3: Entstehungsmechanismen der Nichtalkoholischen Steatohepatitis .....	4
Abbildung 4: Die verschiedenen Mechanismen der TAG-Ansammlung in der Leber bei NAFLD .....	5
Abbildung 5: Entstehung des FGF21/ $\beta$ -klotho/FGFR1c-Rezeptorkomplexes .....	9
Abbildung 6: Funktionen von FGF21 .....	10
Abbildung 7: Versuchsaufbau .....	14
Abbildung 8: Monatlicher Vergleich des Gewichtsverlaufes .....	33
Abbildung 9: Finales Gewicht.....	34
Abbildung 10: Repräsentative Bilder HE-Färbung .....	36
Abbildung 11: Repräsentative Bilder Ölrot O-Färbung.....	36
Abbildung 12: Ausprägung der Leberverfettung .....	37
Abbildung 13: Repräsentative Bilder Ballonierung in der HE-Färbung.....	38
Abbildung 14: Repräsentative Bilder der Inflammation in der HE-Färbung.....	38
Abbildung 15: Merkmale der hepatischen Inflammation in der Leber .....	39
Abbildung 16: Darstellung des NAS anhand der Leberhistologie .....	40
Abbildung 17: Repräsentative Bilder CAE-Färbung .....	41
Abbildung 18: Repräsentative Bilder F4/80-Färbung .....	41
Abbildung 19: Anteil neutrophiler Granulozyten (CAE) und Makrophagen (F4/80) .....	42
Abbildung 20: Systemische metabolische Marker .....	44
Abbildung 21: Plasmakonzentration von ALT, AST und Albumin.....	45
Abbildung 22: ALT/AST-Quotient.....	46
Abbildung 23: mRNA-Expression pro- und anti-inflammatorischer Zytokine .....	48
Abbildung 24: mRNA-Expression von lipogenetischen Faktoren.....	50
Abbildung 25: mRNA-Expression von Genen der Cholesterinsynthese .....	51
Abbildung 26: mRNA-Expression von Proteinen und Enzymen der $\beta$ -Oxidation .....	53
Abbildung 27: $\beta$ -Hydroxybutyrat-Konzentration.....	54
Abbildung 28: Plasmakonzentration von HDL und LDL und mRNA-Expression von <i>ApoE</i> .....	56
Abbildung 29: Plasmakonzentration von FGF21 und mRNA-Expression von <i>FGF21</i> in der Leber .....	57

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 30: Expression der Rezeptoren in der Leber mit repräsentativem Western Blot...	58
Abbildung 31: Heat-Map-Darstellung der Pearson's Korrelation. ....	60
Abbildung 32: Darstellung des Clusterings für <i>TNF<math>\alpha</math></i> in einem Dotplot .....	61
Abbildung 33: Darstellung des Clusterings für <i>FGF21</i> in der Leber in einem Dotplot .....	61
Abbildung 34: Darstellung des Clusterings für $\beta$ -klotho in der Leber in einem Dotplot.....	62
Abbildung 35: Proteinexpression von $\beta$ -klotho in HepG2-Zellen nach 24h Inkubation mit hTNF $\alpha$ .....	63
Abbildung A 1: Exaktes Protokoll für das Laufbandtraining .....	80
Abbildung A 2: Beispielhafte Darstellung des Scorings für Steatose .....	80
Abbildung A 3: Beispielhafte Darstellung des Scorings für Ballonierung .....	81
Abbildung A 4: Beispielhafte Darstellung des Scorings für Inflammation .....	81
Abbildung A 5: Einstellungen Color Treshold für die Auswertung einer Ölrot O-Aufnahme .....	81
Abbildung A 6: Batch zur Auswertung der Ölrot O-Aufnahmen in Image J.....	82

## Tabellenverzeichnis

### **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Übersicht der Versuchsgruppen .....	15
Tabelle 2: Lösungen HE-Färbung .....	19
Tabelle 3: Vergabe der Score-Werte für Steatose, Ballonierung und Inflammation .....	20
Tabelle 4: Lösungen Ölrot O-Färbung .....	21
Tabelle 5: Lösungen CAE-Färbung .....	23
Tabelle 6: Verwendete Antikörper F4/80-Färbung .....	24
Tabelle 7: Bestandteile des Lysepuffers .....	25
Tabelle 8: Bestandteile Trenn- und Sammelgel (für jeweils 2 Gele) .....	26
Tabelle 9: Probenpuffer .....	26
Tabelle 10: Laufpuffer pH 8,3 .....	26
Tabelle 11: Zusammensetzung Anodenpuffer I und II pH 10,4 und Kathodenpuffer pH 9,4 .....	27
Tabelle 12: Zusammensetzung TBS-T, TBS, BDS und PBST .....	27
Tabelle 13: Primärantikörper .....	28
Tabelle 14: Sekundärantikörper .....	28
Tabelle 15: Strip-Lösung .....	28
Tabelle 16: Zusammensetzung des Agarosegels 1 % .....	29
Tabelle 17: Bestandteile des TRIS-Acetat-EDTA-Puffer .....	30
Tabelle 18: Bestandteile des Ladepuffers .....	30
Tabelle 19: Denaturierungsansatz .....	31
Tabelle 20: Zusammensetzung des Mastermixes .....	31
Tabelle 21: Primer für RT-qPCR .....	31
Tabelle A 1: Zusammensetzung Hochfettdiät HFD D12492 .....	77
Tabelle A 2: Zusammensetzung S10026B RD-96 Mineral Mix .....	77
Tabelle A 3: Zusammensetzung V10001C AIN-76A Vitamin Mix (10x Concentration) .....	78
Tabelle A 4: Zusammensetzung Niedrigfettfutter NFD D12450J .....	78
Tabelle A 5: Kameraeinstellungen für die Ölrot O-Aufnahmen .....	79
Tabelle A 6: Kameraeinstellungen für die Aufnahme der Bilder der CAE-Färbung .....	79

## Abkürzungsverzeichnis

### Abkürzungsverzeichnis

<b>Acetyl-CoA</b>	Acetyl-Coenzym A
<b>ACOX 1</b>	Peroxisomales Acyl-Coenzym 1
<b>ADP</b>	Adenosindiphosphat
<b>ALT</b>	Alaninaminotransferase
<b>AMP</b>	Adenosinmonophosphat
<b>AMPK</b>	Adenosinmonophosphat-abhängige Proteinkinase
<b>ANOVA</b>	Abweichungsanalyse (engl. analysis of variance)
<b>ApoE</b>	Apolipoprotein E
<b>AST</b>	Aspartataminotransferase
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>BMI</b>	Körpermasseindex (engl. body mass index)
<b>BSA</b>	Rinderserumalbumin (engl. bovine serum albumin)
<b>CAE</b>	Naphthol-AS-D-Chloracetatesterase
<b>CO<sub>2</sub></b>	Kohlenstoffdioxid
<b>CoA</b>	Coenzym A
<b>CPT</b>	Carnitin-Palmitoyltransferase
<b>Ct-Wert</b>	Zyklus-Schwellenwert (engl. Cycle Treshold)
<b>CVD</b>	kardiovaskuläre Erkrankung (engl. cardiovascular disease)
<b>DAG</b>	Diacylglycerine
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	Destilliertes Wasser
<b>DIO</b>	Ernährungsinduziertes Übergewicht (engl. diet induced obesity)
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNL</b>	De-novo Lipogenese
<b>ER</b>	Endoplasmatisches Retikulum
<b>FAS</b>	Fettsäuresynthase (engl. fatty acid synthase)
<b>FFA</b>	freie Fettsäuren (engl. free fatty acids)
<b>FGF</b>	Fibroblasten-Wachstumsfaktor (engl. fibroblast growth factor)
<b>FGFR</b>	Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor (engl. fibroblast growth factor receptor)
<b>GLUT</b>	Glukosetransporter
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Wasser
<b>HCC</b>	hepatozelluläres Karzinom
<b>HCl</b>	Chlorwasserstoff

## Abkürzungsverzeichnis

<b>HDL</b>	Lipoprotein mit hoher Dichte (engl. high-density lipoprotein)
<b>HE</b>	Hämatoxylin-Eosin
<b>HepG2</b>	Hepatische Leberzelllinie 2
<b>HFD</b>	Hochfettdiät
<b>HKG</b>	konstitutiv exprimiertes Gen (engl. Housekeeping gen)
<b>HMG-CoA</b>	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A
<b>HPF</b>	Hauptgesichtsfeld (engl. high power field)
<b>IDF</b>	Internationale Diabetes Föderation
<b>IF</b>	Intervallfasten
<b>IL</b>	Interleukin
<b>LB</b>	Laufband
<b>LDL</b>	Lipoprotein mit niedriger Dichte (engl. low-density lipoprotein)
<b>LGI</b>	schwache Entzündung (engl. Low-grade Inflammation)
<b>LXR<math>\alpha</math></b>	Leber X Rezeptor $\alpha$ (engl. liver x receptor)
<b>mRNA</b>	Boten-Ribonukleinsäure (engl. messenger ribonucleic acid)
<b>NAFLD</b>	nichtalkoholische Fettlebererkrankung (engl. non-alcoholic fatty liver disease)
<b>NAS</b>	NAFLD-Aktivitäts-Score
<b>NFD</b>	Niedrig Fett Diät
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Transkriptionsfaktor $\kappa$ B (engl. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells)
<b>NK Zellen</b>	Natürliche Killerzellen
<b>OT</b>	Objektträger
<b>PBS-Puffer</b>	Phosphat-gepufferte Salzlösung
<b>PFA</b>	Paraformaldehyd
<b>pFGF</b>	phosphorylierter Fibroblasten-Wachstumsfaktor (engl. phosphorylated fibroblast growth factor)
<b>PPAR<math>\alpha</math></b>	Peroxisomen-Proliferator-aktivierter Rezeptor $\alpha$ (engl. peroxisomal proliferator-activated receptor $\alpha$ )
<b>ROUT</b>	Robuste Regression und Ausreißerentfernung (engl. robust regression and outlier removal)
<b>RPM</b>	Drehzahl (engl. rounds per minute)
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>RT-PCR</b>	Real-Time Polymerasekettenreaktion
<b>SCN</b>	suprachiasmatischer Kern (engl. suprachiasmatic nucleus)

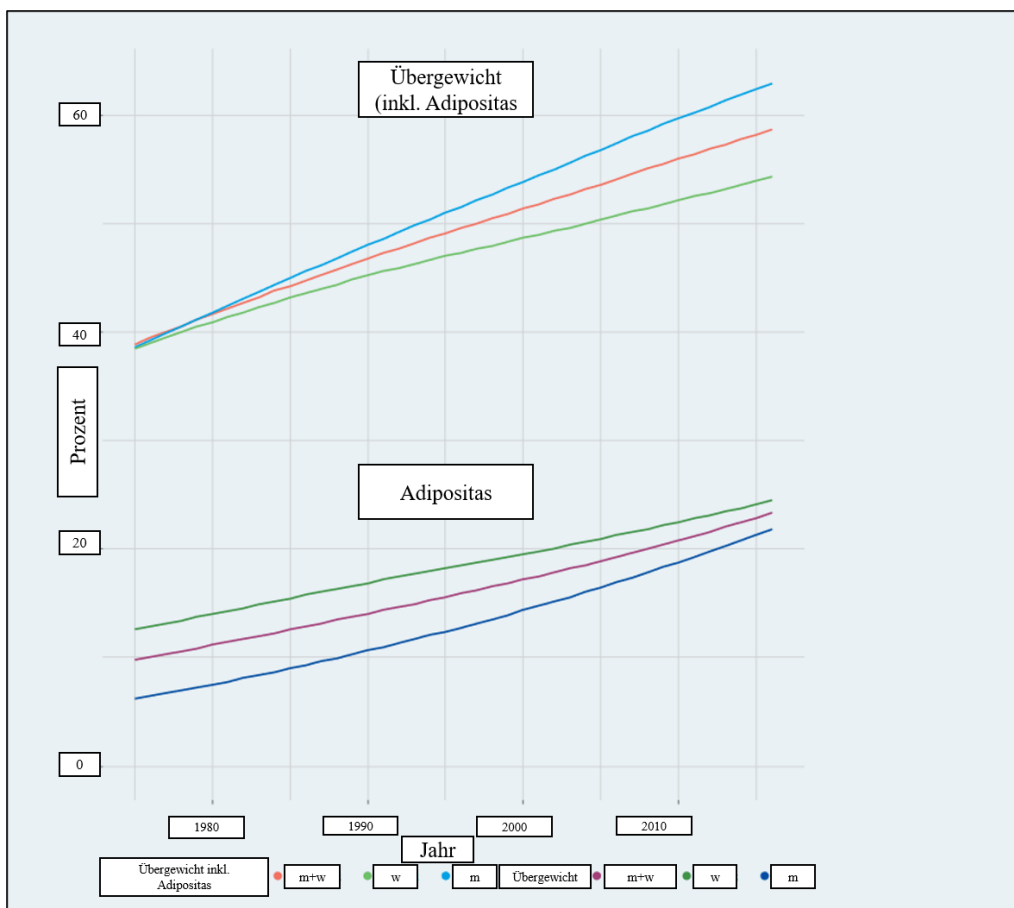
## Abkürzungsverzeichnis

<b>SREBP</b>	Transkriptionsfaktor, der eine Vielzahl von Genen reguliert, die an der Cholesterin- und Fettsäuresynthese beteiligt sind (engl. sterol regulatory element-binding receptor)
<b>TAG</b>	Triglyceride
<b>TH</b>	T-Helferzelle
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Tumornekrosefaktor $\alpha$
<b>USP</b>	amerikanisches Arzneibuch (engl. United States Pharmacopeia)
<b>VLDL</b>	Lipoprotein mit sehr geringer Dichte (engl. very-low-density-Lipoprotein)
<b>WHO</b>	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation)
<b>ZNS</b>	Zentrales Nervensystem

# 1 Einleitung

## 1.1 Adipositas und das metabolische Syndrom

Seit vielen Jahren zählt Adipositas zu den weltweit am häufigsten vorkommenden Erkrankungen. Laut der Weltgesundheitsorganisation (WHO), Stand April 2020, hat sich die Zahl der Menschen mit Übergewicht bzw. Adipositas seit 1975 verdreifacht [1]. Dabei liegt Übergewicht ab einem body mass index (BMI) von  $\geq 25 \text{ kg/m}^2$ , Adipositas ab einem BMI von  $30 \text{ kg/m}^2$  [2] vor. Weltweit sind etwa 2 Milliarden Menschen übergewichtig, bei 650 Millionen liegt eine Adipositas vor [3]. In Europa sind rund 60% der erwachsenen Bevölkerung (**Abbildung 1**) und etwa jedes dritte Kind von Übergewicht und Adipositas betroffen [4].

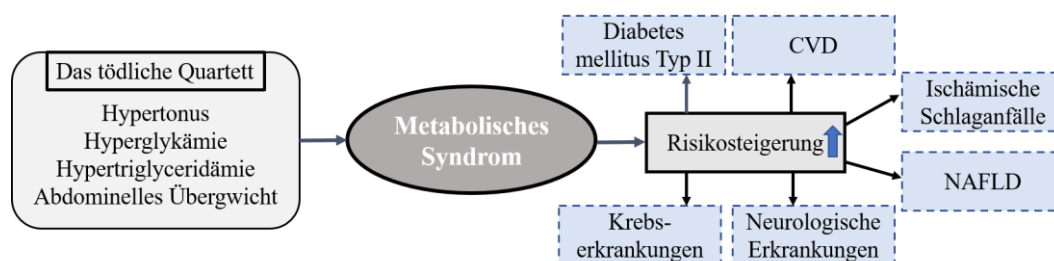


**Abbildung 1: Prävalenz von Übergewicht und Adipositas bei Erwachsenen in der Europäischen Union von 1975-2016** (modifiziert nach [4])

Übergewicht ist ein entscheidender Risikofaktor verschiedener Folgeerkrankungen, darunter auch des metabolischen Syndroms. Dieses wurde erstmals 1989 von Kaplan beschrieben und als tödliches Quartett, aus dem Englischen „Deadly Quartet“, bezeichnet [5]. Ein metabolisches

Syndrom liegt nach Einteilung der Internationalen Diabetes Föderation (IDF) dann vor, wenn zusätzlich zu abdominellem Übergewicht mindestens eine Erhöhung der Triglyceride (TAG), ein erniedrigtes high-density lipoprotein (HDL)-Cholesterin, ein erhöhter Blutdruck oder Nüchternblutglukosespiegel vorliegt [6].

Das metabolische Syndrom steigert das Risiko für Diabetes mellitus Typ II, kardiovaskuläre Erkrankungen (CVD) [7–9], ischämische Schlaganfälle [10, 11], die Ausbildung einer NAFLD [12], neurologische Erkrankungen und verschiedene Krebserkrankungen [13] (**Abbildung 2**). Viele der Folgeerkrankungen zählen weltweit aufgrund der starken Verbreitung der Adipositas zu den allgemeinen Haupttodesursachen [14], was die Wichtigkeit der Entwicklung neuer effektiver Therapiemöglichkeiten bekräftigt.



**Abbildung 2: Das metabolische Syndrom.** Die als „tödliches Quartett“ [5] zusammengefassten Faktoren Hypertonus, Hyperglykämie, Hypertriglyceridämie und abdominelles Übergewicht bilden die Grundlage für die Ausbildung eines metabolischen Syndroms. Das metabolische Syndrom steigert das Risiko für Folgeerkrankungen wie Diabetes mellitus Typ II und kardiovaskuläre Erkrankungen [7–9], ischämische Schlaganfälle [10, 11], die Entstehung einer NAFLD [12], das vermehrte Auftreten neurologischer Erkrankungen und das Auftreten von Krebserkrankungen [13].

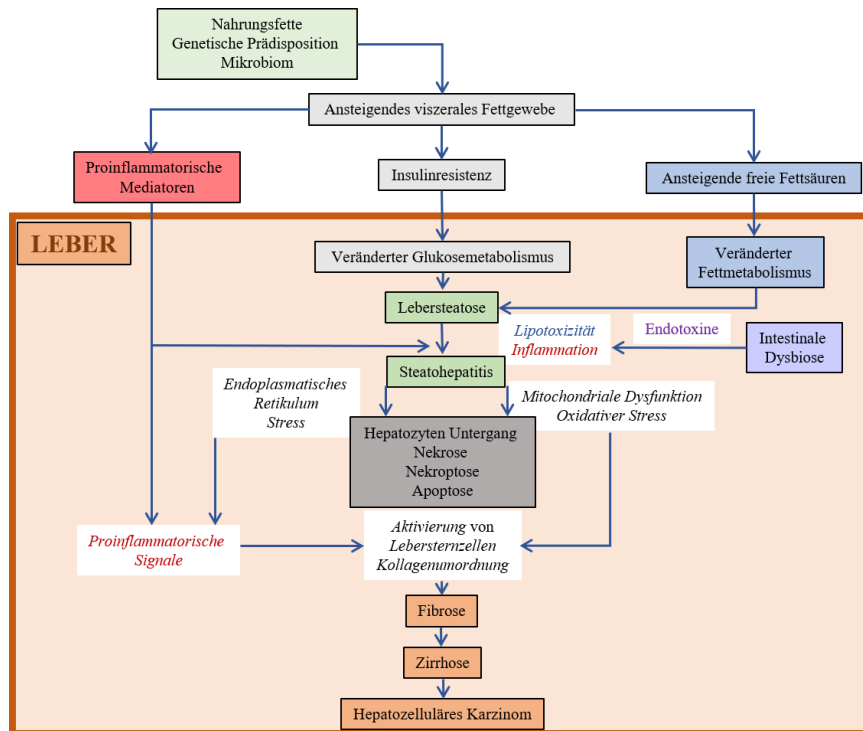
## 1.2 Nichtalkoholische Fettlebererkrankung

Adipositas stellt einen Hauptrisikofaktor für die Ausbildung eines metabolischen Syndroms dar [6], was sich in der Leber als NAFLD manifestiert [12]. Die NAFLD, erstmals 1980 beschrieben, ist die häufigste Ursache für Lebererkrankungen. Studien zeigen, dass weltweit 25-45 % Menschen davon betroffen sind [15] und die Prävalenz parallel zu der von Übergewicht [1] weiter ansteigt. Hauptmerkmal der NAFLD ist die erhöhte hepatische Steatose. Durch Progression der Erkrankung kommt es zur Ausbildung einer nichtalkoholischen Steatohepatitis, bei der zusätzlich Inflammation, hepatozelluläre Schäden und Fibrose auftreten [15]. Eine enge metabolische Verbindung von Leber, Muskulatur und Fettgewebe bildet die Grundlage für die Entstehung der Erkrankung [16]. Dabei spielen verschiedene Faktoren eine wichtige Rolle. Eine erhöhte Zufuhr von Fetten mit der Nahrung [15, 17], genetische Faktoren [18] und das Mikrobiom [19–21] bewirken eine Zunahme von

## Einleitung

viszeralem Fettgewebe (**Abbildung 3**). Durch die Ausschüttung von Botenstoffen aus dem Fettgewebe kommt es zur Ausbildung einer Insulinresistenz, die einerseits zu einem gestörten Glukosemetabolismus führt und andererseits zu einer vermehrten hepatischen Triglyceridsynthese [22–24]. Eine vermehrte Freisetzung von Fettsäuren aus dem Fettgewebe führt zudem zu einem veränderten Fettstoffwechsel [15] (**Abbildung 3**). Es resultiert eine Überladung der mitochondrialen  $\beta$ -Oxidation in den Hepatozyten und ein Ungleichgewicht zwischen Aufnahme und Abgabe von Fettsäuren durch very-low-density-Lipoprotein (VLDL), sodass es zu einer vermehrten Speicherung von Fett in Form von TAGs [25] in der Leber kommt. Der Progress der Leberverfettung (**Abbildung 3**) zu einer Steatohepatitis wird durch Wirkung pro-inflammatorischer Mediatoren [26], die aus dem Fettgewebe freigesetzt werden [15] und Ausschüttung von Endotoxinen durch intestinale Dysbiose hervorgerufen, die zusätzlich lipotoxisch und inflammatorisch wirken [27, 28]. Dadurch hervorgerufener Endoplasmatischer Retikulum (ER)-Stress, mitochondriale Dysfunktion und oxidativer Stress [25, 29, 30] aktivieren Nekrose, Nekroptose oder Apoptose [15] und führen zum Untergang von Hepatozyten. Durch Aktivierung von hepatischen Sternzellen und Kollagen-produzierenden Myofibroblasten wird ein fibrotischer Umbau der Leber bewirkt [29]. Ein Fortschreiten der Fibrose kann zu einer Leberzirrhose führen, die mit einem deutlich erhöhten Risiko für die Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms einhergeht [15].

## Einleitung



**Abbildung 3: Entstehungsmechanismen der Nichtalkoholischen Steatohepatitis** (modifiziert nach [15]). Der Anstieg von Fettgewebe führt aufgrund von Insulinresistenz und ansteigender freier Fettsäuren zu Veränderungen im Glukose- und Fettstoffwechsel, indem es zu einer verstärkten Ansammlung von Fett in der Leber kommt. Unter dem Einfluss eines proinflammatorischen Milieus und aufgrund von ER-Stress, oxidativem Stress und mitochondrialer Dysfunktion kommt es zum Untergang von Lebergewebe und in Folge zu fortschreitender Fibrose und Zirrhose, die ein erhöhtes Risiko für die Ausbildung eines hepatozellulären Karzinoms darstellen.

### 1.3 Merkmale der Leberschädigung

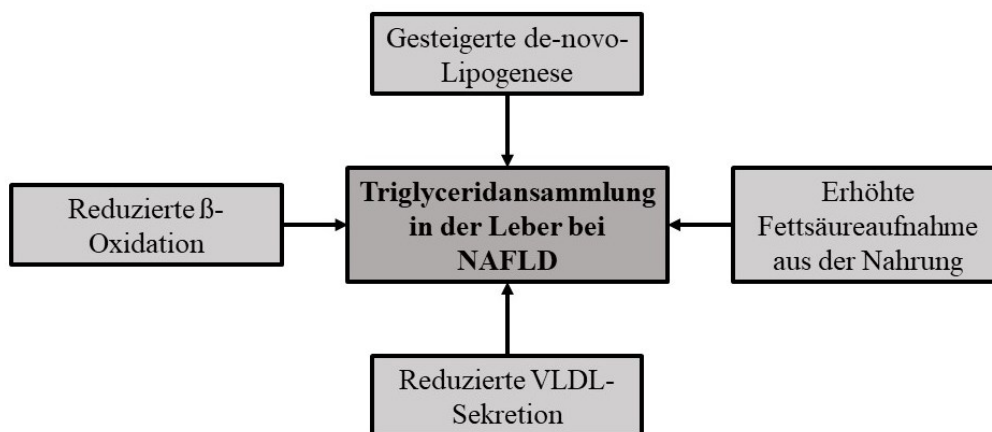
Die Belastung der Leber durch die NAFLD äußert sich neben den oben beschriebenen Umbauprozessen durch einen Anstieg der aus dem Zytoplasma bzw. den Mitochondrien der Hepatozyten freigesetzten Leberenzyme Alaninaminotransferase (ALT) und Aspartataminotransferase (AST) [31, 32]. Eine starke Erhöhung von ALT im Rahmen des metabolischen Syndroms und einer NAFLD [33–35], die sich auch im Anstieg des ALT/AST-Quotienten äußert, spiegelt die überwiegende Freisetzung von ALT aus dem zytoplasmatischen Kompartiment im Rahmen der Leberschädigung wider [36]. Im Gegensatz zu ALT und AST zeigt der Albuminstoffwechsel bei NAFLD und deren Komplikationen vor allem eine Reduktion der Albumin(bindungs)funktion [37, 38] der Leber, und erst in fortgeschrittenen Stadien auch eine verringerte Serumalbuminkonzentration [39, 40]. Dadurch werden essentielle Prozesse wie die Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Druckes in Zellen, die Funktion als pH-Wert Puffer im Blut [39] sowie als Transporter für körpereigene Substanzen wie Bilirubin, Fettsäuren [41], Hormone, Metallionen und nicht körpereigene Stoffe wie Medikamente [42] beeinträchtigt.

## Einleitung

Die Diagnose einer NAFLD umfasst neben der Leberverfettung auch den Ausschluss anderer Lebererkrankungen, wie viraler Hepatitis, Autoimmunhepatitis oder hereditärer Lebererkrankungen sowie der Pathogenese durch Alkohol [43]. Anhand des NAFLD-Activity-Scores (NAS), der auf der histologischen Beurteilung von hepatischer Steatose, Ballonierung und Inflammation in der Leber mit Hilfe eines Scoring Systems [44] beruht, wird die Ausprägung der NAFLD bestimmt. Eine detaillierte Beschreibung der Kriterien sind **Tabelle 3** zu entnehmen.

### 1.4 Veränderungen des Fettstoffwechsels bei NAFLD

Zentraler Pathomechanismus in der Entstehung der NAFLD ist die vermehrte Speicherung von TAGs in der Leber [25], die durch Veränderung des Fettstoffwechsels (**Abbildung 4**) begründet ist. Beeinflusst wird der Fettstoffwechsel nicht nur durch die Aufnahme von Fetten aus der Nahrung sondern auch die körpereigene Synthese [45], den Transport von Fetten zwischen Organen und den Abbau aus peripherem Fettgewebe. Fette dienen dem Körper als Grundbausteine für Lipide, Membranen oder Cholesterin und sind neben Kohlenhydraten und Eiweiß eine essentielle Energiequelle für den Körper [46].



**Abbildung 4: Die verschiedenen Mechanismen der TAG-Ansammlung in der Leber bei NAFLD.** Quelle: eigene Darstellung. Ein Zusammenspiel aus erhöhter Fettsäureaufnahme mit der Nahrung [15, 17], gesteigerter de-novo-Lipogenese [47, 48] und reduzierter  $\beta$ -Oxidation [49–51] und VLDL-Sekretion [25] führen zu einem erhöhten Angebot an Fettsäuren in der Leber, die als Triglyceride in der Leber gespeichert werden und zur Verfettung der Leber führen.

## Einleitung

Bei Patienten mit einer NAFLD entstammen etwa 60 % der hepatischen TAGs aus freien Fettsäuren, 25 % der de-novo-Lipogenese (DNL) und 15 % werden über die Nahrung aufgenommen [48].

Wie bei Gesunden spielt die lipolytische Freisetzung von Fettsäuren aus Fettgewebe und der Transport dieser zur Leber [30], auch im Rahmen einer NAFLD, eine wichtige Rolle. Der Anstieg von viszeralem Fettgewebe bei NAFLD führt zu einer Verstärkung dieses Prozesses [15], sodass in der Leber vermehrt TAGs als Speicherform der Fettsäuren abgelagert werden [52]. Aufgrund der hohen Insulinresponsivität von Adipozyten [53] kommt es, begleitet von hohen Insulinkonzentrationen, zur Entstehung einer Insulinresistenz [54]. Dies verursacht neben einer verstärkten Lipolyse [55] auch eine deutliche Steigerung der hepatischen DNL [47, 48] im Vergleich zu Gesunden [56]. Erhöhte Glukose- und Insulinlevel führen zur Induktion von sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1c [57–59], das die Fettsäuresynthase (FAS) auf Transkriptionsebene reguliert und zu einer gesteigerten Expression der FAS als Aktivitäts-bestimmendem Enzym der DNL [60] führt. Daneben zeigt sich eine Hochregulation des Leber-X-Rezeptors (LXR)  $\alpha$ , der die Expression von SREBP-1c reguliert [61] und zusätzlich durch Interaktion mit dem FAS Promotor regulierend auf die FAS [62] wirkt. Auch die Zufuhr von Fetten mit der Nahrung spielt eine wichtige Rolle. Die Aufnahme erfolgt über intestinal gebildete Chylomikronen, die durch Hydrolyse in TAGs veresterte Fettsäuren als Energiequelle freigegeben [63] oder als TAGs im Fettgewebe gespeichert werden [64, 65]. Ein Teil der Fettsäuren wird auch in Form TAG-reicher Chylomikronen-Remnants in die Leber aufgenommen [48, 64, 66]. Durch die Bildung von very-low-density-lipoproteins (VLDLs) [67] ist die Leber in der Lage, Fettsäuren wieder abzugeben. Zwar kommt es durch die vermehrte Fettansammlung zu einer gesteigerten Sekretion von VLDL, einhergehend mit einer Erhöhung von VLDL regulierendem Apolipoprotein (Apo) E [68], trotzdem besteht ein Ungleichgewicht zugunsten der Fettsäuren, welches zu vermehrter Speicherung dieser in Form von TAGs in der Leber [25] führt.

Zusätzlich führt die Akkumulation von Fettsäuren zu einer Überladung der mitochondrialen  $\beta$ -Oxidation [49, 50] in der Leber [51], die sich durch Hemmung des Transkriptionsfaktors Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor (PPAR) $\alpha$  [69] und der die  $\beta$ -Oxidation regulierenden [70] Enzyme Carnitin-Palmitoyl-Transferase (CPT) Ia und CPT II [71] zeigt. Kompensatorisch kommt es zur Überexpression [69] von peroxisomalem Acyl-Coenzym (ACOX)1 [72]. Die erhöhte Rate an freien Fettsäuren [50] übersteigt jedoch auch die gesteigerte Kapazität der peroxisomalen  $\beta$ -Oxidation.

## Einleitung

In engem Zusammenhang mit der  $\beta$ -Oxidation steht die Bildung von Ketonkörpern. Das Endprodukt der  $\beta$ -Oxidation, das Acetyl-Coenzym A (CoA), wird entweder im Citratzyklus recycelt oder dient als Grundbaustein für die Bildung von Ketonkörpern in der Leber [73, 74]. Eine Senkung der Plasmakonzentration des Ketonkörpers  $\beta$ -Hydroxybutyrat im Plasma weist darauf hin, dass die hepatische Ketogenese bei NAFLD inhibiert wird [73, 75].

Neben einem veränderten Fettsäure- und TAG-Metabolismus zeigt sich unter NAFLD auch eine Veränderung des Cholesterinstoffwechsel, die am ehesten auf die erhöhte Fettansammlung in der Leber zurückzuführen ist [76]. Die Leber ist in der Lage, reguliert durch Expression von SREBP-2 [77], Cholesterin zu synthetisieren [78] oder das mit der Nahrung aufgenommene Cholesterin über Chylomikronen-Remnants aufzunehmen [48, 64, 66]. Einhergehend mit einer erhöhten Fettansammlung in der Leber kommt es durch Induktion von SREBP-2 bei NAFLD [79] zu einer gesteigerten Cholesterinsynthese [76]. In der Folge verändern sich auch die Serumkonzentrationen der Lipoproteine low-density lipoprotein (LDL) und high-density lipoprotein (HDL), die für den Transport von Cholesterin in periphere Gewebe (LDL [80]) bzw. den reversen Cholesterintransport (HDL [81]) zur Leber zuständig sind. Diese als Dyslipidämie [82] bezeichnete Veränderung zeichnet sich durch erhöhte TAG-, LDL- und HDL-Cholesterin-Konzentrationen im Blut aus [83].

### **1.5 Low-grade-Inflammation**

Die Entstehung einer NAFLD im Rahmen des metabolischen Syndroms ergibt sich nicht alleine aus den Veränderungen des Fettstoffwechsels [15], sondern begründet sich auch in der engen Assoziation von Übergewicht und der Ausbildung einer Low-grade-Inflammation (LGI) [84]. Da diese nicht wie im klassischen Sinne Pathogen-assoziiert ist, wird sie auch als sterile Inflammation bezeichnet [85]. Fettgewebe selbst wirkt als endokrines Organ und produziert und sezerniert pro-inflammatorische Zytokine [86], darunter die Interleukine (IL)-1 $\beta$ , IL-6 und Tumornekrosefaktor (TNF) $\alpha$  [87, 88]. Die Hypertrophie der Adipozyten aufgrund der vermehrten Fettansammlung führt zu einer Aktivierung des Nuclear Faktor (NF)- $\kappa$ B induzierten Signalweges [88], der die Sekretion von pro-inflammatorischen Adipokinen auslöst. Es kommt zur Mobilisierung pro-inflammatorischer M1-Makrophagen [89], die durch Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine [84, 88] einen Entzündungszustand hervorrufen und aufrecht erhalten. Eine damit einhergehende Insulinresistenz [90] wird dadurch verursacht, dass IL-6 und TNF $\alpha$  [91] die Rezeptorwirkungskaskade von Insulin hemmen und zusätzlich die Expression von Insulin-

## Einleitung

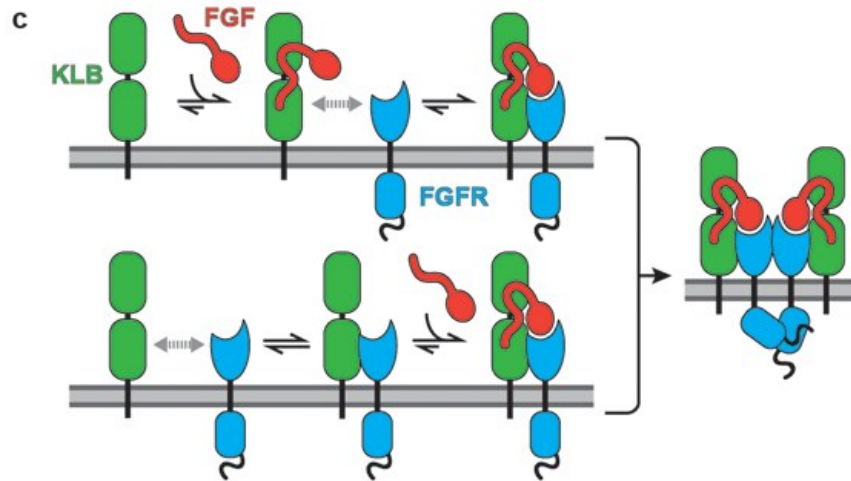
hemmenden Proteinen verstärkt wird. Auch IL-1 $\beta$  wirkt inhibierend auf den Insulinstoffwechsel, indem durch veränderte Translokation von Glukosetransporter (GLUT) 4 in Adipozyten der Glukosetransport gehemmt wird [92]. Die Insulinresistenz führt nicht nur zu Veränderungen im Insulinstoffwechsel, sondern reguliert auch über verringerte Konzentration von Adiponektinen die Ausschüttung von IL-10 [93]. IL-10 wird durch M2-Makrophagen ausgeschüttet und wirkt anti-inflammatorisch, indem es unter anderem die Apoptose von M1-Makrophagen induziert [94]. Es kommt zur Verschiebung des Gleichgewichtes pro- und anti-inflammatorischer Zytokine, die neben Veränderungen des Insulin- auch zur Beeinflussung des Lipidstoffwechsels [85] führt. IL-6 führt zu gesteigerter lipolytischer Aktivität im Fettgewebe und Fettsäureverwertung in Muskeln. Die Ausschüttung von TNF $\alpha$  führt ebenfalls zu einer Steigerung der Lipolyse und über die gesteigerte Freisetzung von freien Fettsäuren zu Leberverfettung. Auch IL-1 $\beta$  führt durch Akkumulation von TAGs in der Leber zu einer Verfettung, indem die DNL gesteigert wird [95].

Die gegenseitige Beeinflussung von Fettstoffwechsel und Inflammation und dadurch bedingte Verstärkung von Übergewicht [94, 96] begründet sich auch in der Ausbildung einer Leptinresistenz [97] und der Dysregulation der Hormone Ghrelin und Orexin [98], die an der Regulation der Nahrungsaufnahme beteiligt sind. In diesem Zusammenhang spielt auch das Hormon Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF)21 im metabolischen Gleichgewicht eine wichtige Rolle [99], da es ähnlich wie Leptin, Orexin und Ghrelin die Futterraufnahme reguliert.

### 1.6 Fibroblast-growth-factor 21

FGF21, erstmals 2000 durch Nishimura et. al. [100] beschrieben, gehört zur Gruppe der Fibroblasten-Wachstumsfaktoren. Er wird vorwiegend von der Leber gebildet, daneben auch im Skelettmuskel, weißem und braunem Fettgewebe sowie dem Darm, Herz, der Niere und dem Pankreas [99]. FGF21 wirkt über Ausbildung eines Rezeptorkomplexes (**Abbildung 5**) mit einem FGF-Rezeptor (FGFR)1c und  $\beta$ -klotho als obligatem Corezeptor [101, 102].  $\beta$ -klotho wird in weißem Fettgewebe, der Leber und im Pankreas exprimiert [101, 103] und wirkt als Transmembranprotein [104].

## Einleitung



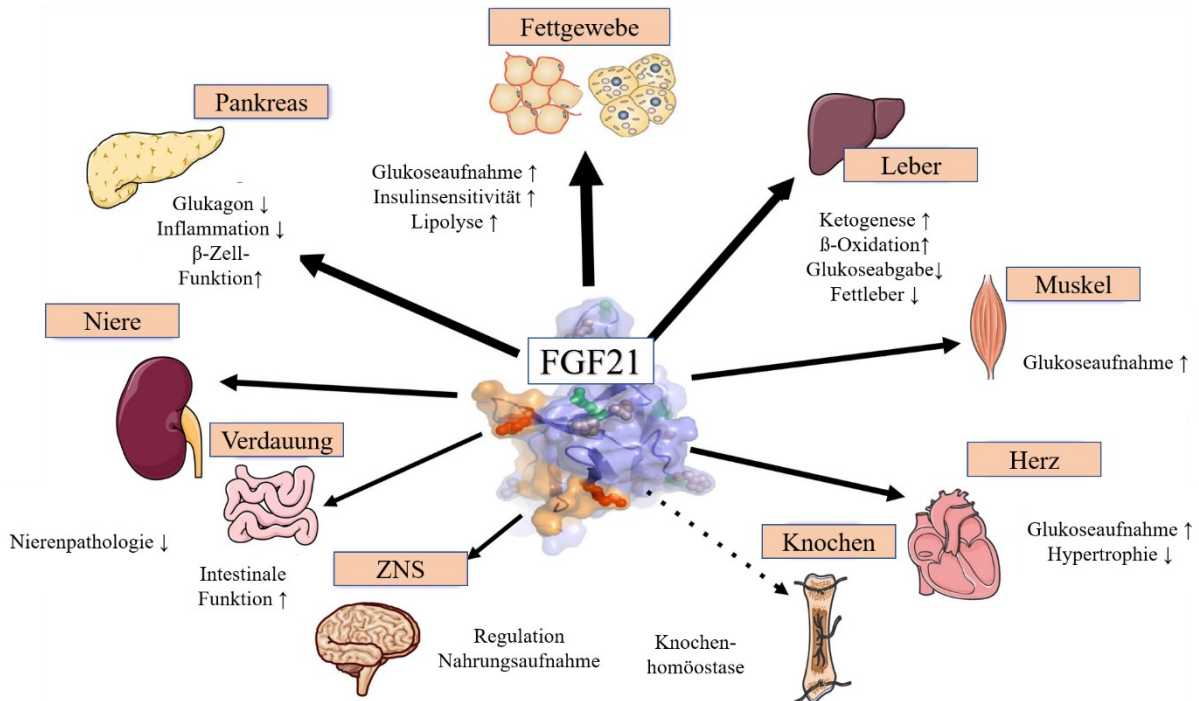
**Abbildung 5: Entstehung des FGF21/β-klotho/FGFR1c-Rezeptorkomplexes** (nach [105]). In der Zellmembran liegen β-klotho (KLB) und FGFR1c (FGFR) Monomere und FGFR/β-klotho Heterodimere im Gleichgewicht vor. Bindet FGF21 (FGF) an β-klotho und zwei FGFR1c, entsteht der FGF21/β-klotho/FGFR1c-Rezeptorkomplex.

FGF21 (**Abbildung 6**) wirkt als endokriner Faktor in Form eines metabolischen Regulators [102, 106] auf verschiedene Organe. Über seine Wirkung im Hypothalamus und Rhombencephalon beeinflusst FGF21 die Anpassung an Hungerzustände [107, 108]. Als Fastenhormon [109, 110] weist FGF21 bei niedrigem Energieangebot erhöhte Konzentrationen auf. Im Pankreas bewirkt FGF21 eine Verbesserung der β-Zellfunktion [111], eine Verringerung von Inflammation [112] und Glukagon [106]. Neben einer Induktion der Lipolyse [113] und einer verstärkten insulinunabhängigen Glukoseaufnahme in Adipozyten über GLUT 1 [102, 106] bei Menschen wird bei Mäusen durch FGF21 auch die Ketogenese in der Leber angeregt [109]. Außerdem erhöht FGF21 in der Leber die β-Oxidation und reduziert die Glukoseabgabe [114], was in Folge zur Reduktion von hepatischer Steatose führt [115]. In Muskeln [116] und im Herz [117] bewirkt FGF21 eine erhöhte Glukoseaufnahme und verringert die Ausbildung einer kardialen Hypertrophie [118]. FGF21 ist außerdem wichtiger Regulator der Knochenhomöostase [119], wirkt protektiv auf Nierenpathologien [120] und soll bereits bei Säuglingen die intestinale Funktion [121] positiv beeinflussen.

Obwohl FGF21 vor allem bei Fasten [109] und Kalorienrestriktion erhöht ist, zeigen sich bei Adipositas sowohl bei Mäusen als auch Menschen ebenfalls erhöhte FGF21-Konzentrationen [122–124], was zur Bezeichnung „FGF21 Paradox“ [125] geführt hat. Grundlage ist, ähnlich wie bei einer Leptin- [97] und Insulinresistenz [53], eine Dysregulierung des FGF21-Metabolismus, was ebenfalls als FGF21-Resistenz bezeichnet wird. Hierbei ist charakteristisch, dass es trotz erhöhter Plasmakonzentration von FGF21 zur Reduktion des Rezeptorkomplexes FGFR1c/β-klotho kommt [125]. Dies steht in engem Zusammenhang mit

## Einleitung

dem Auftreten von Inflammation bei Adipositas [126]. So ist beschrieben, dass z.B. das Zytokin TNF $\alpha$  die Expression von  $\beta$ -klotho inhibiert, was in einer Reduktion der FGF21-Sensitivität resultiert [127].



**Abbildung 6: Funktionen von FGF21** modifiziert nach [128]. FGF21 wirkt auf verschiedene Organe. Er ist an der Regulation der Nahrungsaufnahme im zentralen Nervensystem (ZNS) beteiligt und bewirkt eine erhöhte Lipolyseaktivität, Glukoseaufnahme und Insulinsensitivität im Fettgewebe. In der Leber erhöht er die Ketogenese,  $\beta$ -Oxidation und verringert die Glukoseabgabe sowie die Verfettung. Sowohl im Muskel als auch im Herzen sorgt FGF21 für eine erhöhte Glukoseaufnahme und verringert die Ausbildung einer kardialen Hypertrophie. Zusätzlich beeinflusst FGF21 die Knochenhomöostase, verbessert die intestinale Funktion und verringert die Ausbildung von Nierenpathologien.

### 1.7 Therapieansätze bei Adipositas

Um den Kreislauf aus Übergewicht und Inflammation zu durchbrechen, werden Interventionen wie Kalorienrestriktion, Bewegung [129] und Fasten [130, 131] als wirksame Therapien beschrieben.

Durch Kalorienrestriktion kann dem Ungleichgewicht von Energiezufuhr und -verbrauch und der resultierenden Gewichtszunahme entgegen gewirkt werden [132]. Sowohl bei Mäusen [133] als auch bei Menschen [134] bewirkt ein Wechsel von einer Hochfett-diät zu einer Niedrigfett-diät (NFD) eine signifikante Reduktion von Körpergewicht und Fettmasse. Eine Steigerung der körperlichen Aktivität durch Bewegung führt, abhängig von der Intensität, zu einer Gewichtsreduktion [135, 136], die durch die Kombination aus Kalorienrestriktion und Bewegung zusätzlich verstärkt werden kann. Im Mausmodell wurde außerdem gezeigt, dass

## Einleitung

sich Bewegung dadurch positiv auf den FGF21-Metabolismus auswirkt, dass die Expression des FGF21-Rezeptorkomplexes im Fettgewebe wiederhergestellt und so die FGF21-Sensitivität regeneriert wird [127]. Fasten dient auch der Regeneration des zirkadianen Rhythmus [137], welcher nachweislich durch Adipositas gestört wird. Eine Reihe physiologischer Prozesse [138], wie die Freisetzung von Hormonen oder metabolische Vorgänge [139], unterliegen der Steuerung durch den suprachiasmatischen Kern (SCN) im Hypothalamus [140] und sind abhängig von Faktoren wie individuellem Tag-Nacht-Rhythmus oder Temperatur [141, 142]. Auch periphere Gewebe wie die Leber oder Fettgewebe [143–145] unterliegen einem zirkadianen Rhythmus, durch den die Expression von Genen mit Einfluss auf den Metabolismus gesteuert wird. Die enge Verbindung von zirkadianem Rhythmus und Metabolismus zeigt sich bei Menschen und Mäusen in einer Gewichtsabnahme und Fettmassenreduktion bei Fasten [146], wobei der Effekt bei Mäusen nur unter einer Hochfettdiät, nicht aber unter einer kalorienrestriktiven Diät gezeigt werden konnte [137].

### 1.8 Fragestellung

In zahlreichen Untersuchungen an Mäusen und Menschen wurde bereits gezeigt, dass eine Ernährungsumstellung, körperliche Aktivität und Intervallfasten wirksame Interventionsmaßnahmen bei einer Adipositas, auch im Rahmen eines metabolischen Syndroms sein können. Was noch nicht gezeigt wurde ist, wie sich die Kombination der genannten Interventionen auf die Leber auswirkt und welche Rolle das Fastenhormon FGF21 in diesem Kontext spielt.

Daher wurde in der vorliegenden präklinisch murinen Studie vor allem der *hepatoprotektive Effekt* der Interventionen auf eine ernährungsinduzierte Adipositas und NAFLD hervorgehoben. Der Fokus lag neben dem Einfluss auf den gesamten Metabolismus insbesondere auf Auswirkungen auf den *Fettstoffwechsel*. Weiterhin standen die Rolle von *FGF21* im Rahmen einer NAFLD sowie der Zusammenhang zwischen einer LGI und FGF21 im Mittelpunkt der Betrachtungen. Daraus könnten Schlussfolgerungen für einen *klinischen Ansatz* zu einer weniger invasiven Therapiekontrolle einer NAFLD entstehen, der in der Klinik beispielsweise einer Bestimmung der FGF21 Serumkonzentration beim Patienten entsprechen könnte.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Tierexperimentelles Design**

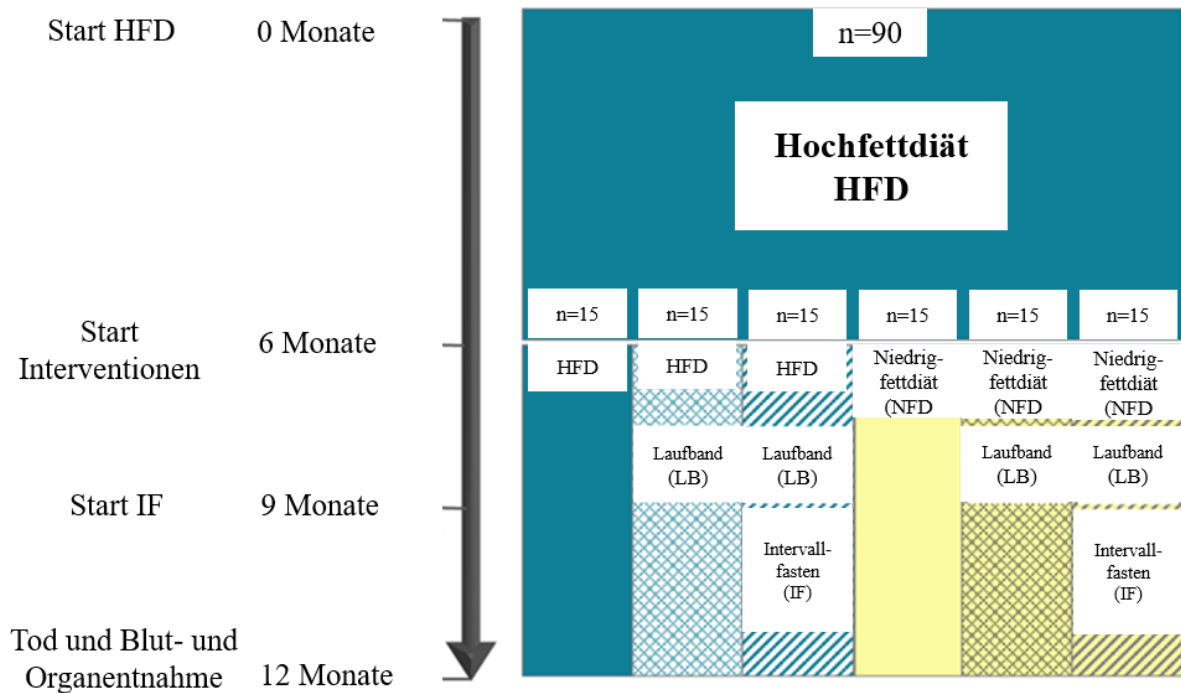
Für die durchgeführten Untersuchungen wurden n=90 vier Wochen alte weibliche C57BL/6-Mäuse von Charles River (Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Die C57BL/6-Maus als Modelltier ist sehr gut geeignet, um Auswirkungen unterschiedlich zusammengesetzter Nahrung auf die Entstehung von Pathologien wie Hyperinsulinämie oder Übergewicht zu beobachten, da die Tiere bei Fütterung einer NFD keine körperlichen Veränderungen aufweisen aber unter Fütterung einer HFD analog zum menschlichen Körper [147] schnell Übergewicht und eine Leberverfettung entwickeln [148]. Die Tiere wurden in 5-er Gruppen in Standardkäfigen in einem temperaturregulierten ( $21\pm 3^{\circ}\text{C}$ ) Raum mit einem 12/12h Tag-Nacht-Zyklus (Licht an von 6-18 Uhr, 30 min Dämmerungsperiode) gehalten. Während der gesamten Versuchszeit hatten die Tiere unbegrenzt Zugang zu Wasser.

Der Tierversuch wurde in insgesamt drei große zeitliche Abschnitte unterteilt, die **Abbildung 7** zu entnehmen sind.

Zunächst wurden alle 90 Mäuse über einen Zeitraum von 6 Monaten mit einer HFD (HFD D12492; Research Diets, Lane, USA) gefüttert, um den Zustand eines ernährungsinduzierten Übergewichts (DIO) zu erzeugen.

Nach 6 Monaten wurden zur Einführung von verschiedenen Interventionen jeweils 15 Tiere einer von 6 Versuchsgruppen (**Tabelle 1**) zugeteilt. Dies erfolgte randomisiert.

Die ersten drei Versuchsgruppen (Gruppen 1-3, blaue Gruppen) erhielten weiterhin die HFD. Während bei der ersten Gruppe HFD/HFD (n=15) keine weiteren Parameter verändert wurden, durchliefen zwei der HFD-Gruppen (jeweils n=15) weitere Interventionen. Gruppe 2 betrieb für die nächsten 3 Monate zusätzlich ein Laufbandtraining (LB) (HFD+LB, n=15) und bei Gruppe 3 wurde neben dem LB nach 9 Monaten bis zum Ende noch eine dritte Intervention, die zeitlich begrenzte Fütterung in Form von Intervallfasten (IF), eingeführt (HFD+LB+IF, n=15).



**Abbildung 7: Versuchsaufbau.** Zu Beginn wurden n=90 Mäuse über einen Zeitraum von 6 Monaten mit einer HFD gefüttert. Nach 6 Monaten wurde die Gruppe in sechs Untergruppen a 15 Tiere eingeteilt und die Interventionen gestartet. Die Tiere in der ersten Gruppe (HFD/HFD) erhielten für weitere 6 Monate das HFD. In der zweiten Gruppe wurde ebenfalls weiter mit HFD gefüttert, zusätzlich wurde das LB eingeführt. In der dritten Gruppe wurde neben HFD und LB nach drei weiteren Monaten das IF gestartet. Die vierte Gruppe wurde nach 6 Monaten für die restliche Zeit auf eine NFD umgestellt, ebenso die fünfte Gruppe wo zusätzlich ein LB eingeführt wurde. In der sechsten Gruppe wurde neben der Umstellung auf NFD und Laufbandtraining nach insgesamt 9 Monaten ein IF eingeführt. Nach 12 Monaten erfolgte die Organentnahme.

Bei den Gruppen 4-6 (gelbe Gruppen) erfolgte nach den ersten 6 Monaten ein Wechsel auf eine NFD (D12450J, Research Diets, Lane, USA). Bei Gruppe 4 (HFD/NFD, n=15) wurde nur das Futter gewechselt, bei Gruppe 5 (HFD/NFD+LB, n=15) analog wie bei Gruppe 2 zusätzlich LB eingeführt und bei Gruppe 6 in Analogie zu Gruppe 3 nach 9 Monaten das IF (HFD/NFD+LB+IF, n=15). Die Versuchsgruppen sind **Tabelle 1** zu entnehmen.

Bei allen Tieren wurde monatlich das Körpergewicht und nach Abschluss der Experimente (12 Monate) zusätzlich das Lebergewicht und das Gewicht von viszeralem und subkutanem Fettgewebe erfasst.

**Tabelle 1: Übersicht der Versuchsgruppen**

<b>Gruppe</b>	<b>Anzahl n</b>
HFD/HFD	15
HFD/HFD+LB	15
HFD/HFD+LB+IF	15
HFD/NFD	15
HFD/NFD+LB	15
HFD/NFD+LB+IF	15

## **2.2 Interventions-Parameter**

### **2.2.1 Futterwechsel**

In der ersten Phase der Studie erhielten alle Tiere das Hochfettdiät-Futter. Dieses setzt sich aus 20 %/kcal Kohlenhydraten, 60 %/kcal Fett und 20 %/kcal Protein mit einer Energiedichte von 5,24 kcal/g zusammen [149] (genaue Zusammensetzung siehe **Tabelle A 1, Tabelle A 2, Tabelle A 3**).

Ein Teil der Tiere erhielt über den gesamten Versuchszeitraum von 12 Monaten die HFD, der andere Teil wurde ab dem 6. Monat mit einer NFD für die verbliebenen 6 Monate gefüttert. Die Verteilung der Komponenten verhält sich hier wie folgt: 70 %/kcal Kohlenhydrate, 10 %/kcal Fett, 20 %/kcal Protein, mit einer Energiedichte von 3,82 kcal/g [149] (genaue Zusammensetzung **Tabelle A 4, Tabelle A 2, Tabelle A 3**). Bei der Auswahl der NFD wurde darauf geachtet, dass das Futter eine nahezu identische Struktur der Fette und Proteine wie das HFD-Futter aufweist, um die Vergleichbarkeit der Gruppen zu gewährleisten.

### **2.2.2 Laufband**

Das Laufbandtraining wurde nach 6 Monaten Versuchszeit eingeführt und dauerte drei Monate. Unmittelbar nach Futterwechsel auf eine NFD (n=45) wurde bei jeweils 30 Tieren der Gruppe HFD und 30 Tieren der Gruppe NFD zusätzlich die Intervention LB (n=60) begonnen.

Das Training auf dem Laufband (Treadmill, TSE System, Treadmill 303401) erfolgte aus logistischen Gründen in 5-er Gruppen. Nach einer Gewöhnung der Tiere an das Training sowohl in Bezug auf die Trainingsbelastung an sich sowie auf die Geschwindigkeit erfolgte eine Intensivierung des Trainings auf bis zu 60 Minuten 2x wöchentlich. Das Training erfolgte

angelehnt an das Protokoll von Marinho [150] und wurde an die Leistung der Tiere angepasst (**Abbildung A 1**).

Der Einstieg in das Laufbandtraining erfolgte mit einer 1x täglichen Einheit von 10 min Dauer mit einer Laufgeschwindigkeit von 0,1 m/s. Um sicher zu stellen, dass es durch das Training im Wesentlichen zur Lipidoxidation und nicht zur Verbrennung von Kohlenhydraten kommt, also kein Übergang von anaeroben zu aeroben Energiestoffwechsel stattfindet, musste der maximale Lactat-steady-state bei den Tieren eingehalten werden. Eine konstante Akkumulation von Lactat im Blut kann nur dann verhindert werden, wenn die Belastung für die Tiere im Ausdauertraining unterhalb ihrer Arbeitsbelastung (work load), in diesem Fall der maximal erzielten Geschwindigkeit beim Laufen, liegt [151, 152].

In einem zweiten Abschnitt wurde ein Intervalltraining eingeführt, beginnend mit einer Geschwindigkeit von 0,1 m/s, die alle 300 s um 0,05 m/s bis zur Erschöpfung der Mäuse gesteigert wurde. Die hier maximal erzielte Laufgeschwindigkeit wurde als „work load“ definiert, 60 % dieser Geschwindigkeit entsprechen nach Definition von Ferreira [153] der zu wählenden Geschwindigkeit für ein Ausdauertraining im rein anaeroben Energiezustand.

In der dritten Phase, die über 8 Wochen Training lief, wurde 2x wöchentlich das Laufbandtraining durchgeführt, beginnend mit 15-minütigem Training in der zuvor ermittelten Geschwindigkeit. Die Dauer wurde alle 2 Wochen um 15 min erhöht, maximal wurde 2x wöchentlich für 60 min gelaufen.

Danach erfolgte ein erneuter Test zur Feststellung der maximalen Arbeitsbelastung und Ausdauergerwindigkeit. Die Geschwindigkeit wurde bei Bedarf angepasst und für weitere 8 Wochen ein 2x wöchentliches Training von 60 min Dauer durchgeführt. Abschließend wurde ein weiteres Mal die Belastung und Geschwindigkeit ermittelt.

Das Training wurde bis zum Ende der Studie fortgeführt.

### **2.2.3 Intervallfasten**

Als dritte Intervention wurde bei jeweils (n=15) Tieren der Futtergruppen HFD/HFD und HFD/NFD Intervallfasten (IF) eingeführt. In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Einführung eines Fastens zu Verbesserungen des Leberstoffwechsels, einer Gewichtsreduktion und Verhinderung einer Leberverfettung beitragen kann [137, 145]. Des Weiteren wurde beschrieben, dass inflammatorische Prozesse verringert werden können [154]. Nach einem 16:8 h Schema fasteten die Tiere 16 h und erhielten anschließend für 8 h Zugang

zu ihrem jeweiligen Futter (HFD vs. NFD). Die Fastenperiode wurde in den Lichtzyklus (von 7 bis 23 Uhr) eingetaktet. Um die Phasen exakt einhalten zu können, wurde in dieser Phase der Studie mit einem Fischfutter-Automaten (EHEIM, Deizisau, Deutschland) gearbeitet, dessen Öffnung vergrößert wurde. Der Start der Futtergabe wurde auf exakt 23 Uhr festgelegt und mit einer Infrarotkamera überwacht. Am Ende der Futterperiode wurden die Tiere in einen frischen Käfig mit freiem Wasserzugang gesetzt. Um die Vergleichbarkeit zu erhalten, wurden auch alle Tiere, die nicht in der Fastengruppe waren, zur gleichen Zeit in einen frischen Käfig umgesetzt. Das IF wurde bis zum Ende der Versuche fortgeführt.

### **2.3 *In-vitro*-Experimente**

Für die *in-vitro*-Experimente wurden humane HepG2-Zellen verwendet, die wie von Guy et. al [162] beschrieben, kultiviert wurden. Die Zellen wurden in 6-Well-Platten ausgesät und bei 95 % Konfluenz mit 20 µg/ml humanem TNF $\alpha$  (hTNF $\alpha$ , Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) oder destilliertem Wasser (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) für 24 h inkubiert. Nach erfolgter Zell-Lyse (siehe 2.5.1) wurde die Expression von  $\beta$ -klotho mittels Western Blot (siehe 2.5.1) bestimmt.

### **2.4 Organentnahme**

Nach Abschluss der Experimente (12 Monate) wurden die Tiere mittels Narkose, bestehend aus 5 %igem Isofluran (Baxter, Unterschleißheim, Deutschland), 0,8 l/min O<sub>2</sub> (Air Liquide, Hamburg, Deutschland) und 1,25 l/min N<sub>2</sub>O (Air Liquide, Hamburg, Deutschland), betäubt. Nach retrobulbärer Blutentnahme erfolgte das Ausbluten der Tiere sowie die Entnahme von Organen für die Untersuchungen. Für die histologischen und immunhistochemischen Analysen der Leber wurde ein Teil des Organs in 4% Paraformaldehyd (PFA) (Paraformaldehyd Lösung 4 % in PBS, SC281692, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) fixiert und anschließend in Paraffin (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) eingebettet (Hämatoxylin-Eosin (HE), Naphthol-AS-D-Chloracetatesterase (CAE), F4/80) oder unmittelbar nach Entnahme in Tissue-Tek ®O.C.T.™ Compound eingebettet und bei -80°C in gasförmigem Stickstoff schockgefrostet (Ölrot O). Für die molekularen Analysen wurde der Rest der Organe mit flüssigem Stickstoff schockgefrostet und bei -80°C gelagert. Die dauerhafte Lagerung dieser Proben erfolgte bei -21°C.

### **2.5 Blutplasmaanalysen**

Im Zuge der Exsanguination der Tiere wurden Blutproben gewonnen und bei 4°C bis zur Aufbereitung gelagert. Danach wurden die Proben bei 1,65 xg und 6 °C für 10 min zentrifugiert (Zentrifuge 5424, Eppendorf, Leipzig, Deutschland) und anschließend der Überstand bei -80°C gefroren.

Für die Messung von ALT, AST und Albumin wurden entsprechende Reaction Kits (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) nach Angaben des Herstellers verwendet und die Extinktion bei 340/387 nm spektrophotometrisch mit dem cobas®c111Analyzer (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) gemessen.

Für die Messung der Plasma Triglyceride (unverdünnt) wurden das Triglyceride Colorimetric Assay Kit (Cayman Chemical Company, Hamburg, Deutschland), für LDL/VLDL (1:10) das Cholesterin Assay Kit (ab65390, abcam, Cambridge, UK), und für Leptin (1:100), Insulin (unverdünnt) und FGF21 (1:5) jeweils Kits (R&D System, MI, USA) nach Angaben der Hersteller verwendet.

Die Bestimmung von  $\beta$ -Hydroxybutyrat (1:2) erfolgte mit dem  $\beta$ -Hydroxybutyrate (Ketone Body) Colorimetric Assay Kit (CAY700190, Cayman Chemical Company, Hamburg, Deutschland).

### **2.6 Histologische und immunhistochemische Lebergewebeanalysen**

Zur Untersuchung des Lebergewebes wurden Präparate histologisch und immunhistochemisch aufgearbeitet. Insgesamt wurden drei histologische (HE), Ölrot O, (CAE) und eine immunhistochemische (F4/80) Färbung durchgeführt. Ziel war die Untersuchung der Leberproben auf mögliche Ausprägungen von hepatischer Steatose und inflammatorischer Zellveränderungen.

#### **2.6.1 Histologie**

##### ***2.6.1.1 Hämatoxylin-Eosin***

Für die Anfertigung von HE-Präparaten wurden 4  $\mu$ m dicke Paraffinschnitte mit dem Mikrotrom (Leica EG1160, Leica Mikrosystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland) angefertigt und auf Menzel-Objektträger (OT) (Thermo Scientific, Menzel Gläser 76x26 mm, Gerhard Menzel B.V. & Co KG Braunschweig, Deutschland) gezogen. Die Schnitte

## Material und Methoden

wurden zunächst in einer absteigenden Alkoholreihe (Ethanol von MEDITE Medical GmbH, Burgdorf, Deutschland) rehydriert (X-TRA-Solv® Medite, X-TRA-Solv® Medite, 100 %, 90 %, 80 %, 70 %) und im Anschluss für 5 min bei Raumtemperatur (RT) in gefiltertem Hämalaun (Hämalaun nach Mayer, Merck KGaA Darmstadt, Deutschland) im Verhältnis 1:5 (**Tabelle 2**) gefärbt. Danach wurden die Schnitte für 10 min bei RT in handwarmem Leitungswasser gebläut, bevor sie für 1 min bei RT in 0,5 % Eosin (**Tabelle 2**) (Eosin G, Merck KGaA Darmstadt, Deutschland) getaucht wurden. Unmittelbar im Anschluss erfolgte das Waschen der Schnitte mit Leitungswasser und das Tauchen in destilliertes Wasser (dH<sub>2</sub>O). Zum Haltbarmachen und Vorbereiten für die Mikroskopie wurden die Schnitte zum Schluss dehydriert. Dies erfolgte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 96 %, 100 %, 100 %, X-TRA-Solv® (MEDITE Medical GmbH, Burgdorf, Deutschland) X-TRA-Solv® (MEDITE Medical GmbH, Burgdorf, Deutschland). Das Eindecken der Schnitte erfolgte mit X-TRA Kitt® (MEDITE Medical GmbH, Burgdorf, Deutschland). Vor der Auswertung wurden die Schnitte für mindestens 24 h bei RT getrocknet. Die genaue Zusammensetzung der Färbelösungen ist **Tabelle 2** zu entnehmen.

**Tabelle 2: Lösungen HE-Färbung**

<b>Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Hämalaun	1:5 Verdünnung: 50 ml Hämalaun+ 200 ml dH <sub>2</sub> O
Eosin G	2,5 g Eosin auf 500 ml dH <sub>2</sub> O gelöst und filtriert und mit 6 Tropfen Eisessig angesäuert
Ethanol	99 % Ethanol

Die Schnitte wurden unter einem Lichtmikroskop (Carl Zeiss Axioskop 40, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) ausgewertet. Die Aufnahmen erfolgten mit einer Mid-Range-Mikroskopie-Kamera (Zeiss AxioCam MRc5, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) unter Nutzung der Software Zeiss ZEN 2 lite (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) in 50-, 100- und 200-facher Vergrößerung.

Tabelle 3: Vergabe der Score-Werte für Steatose, Ballonierung und Inflammation

Steatose		Ballonierung		Inflammation	
Grad	Kriterium	Grad	Kriterium	Grad	Kriterium
0	0<5 % Ausprägung	0	Nicht ausgeprägt	0	Keine Herde
1	5-33 % Ausprägung	1	Wenige pro HPF	1	≤2 Herde pro HPF
2	34-66 % Ausprägung	2	Viele pro HPF	2	2-4 Herde pro HPF
3	>66 % Ausprägung			3	>4 Herde pro HPF

Die Auswertung erfolgte hinsichtlich der drei Aspekte Steatose (**Abbildung A 2**) in 50-facher, Ballonierung (**Abbildung A 3**) in 100-facher und Inflammation (**Abbildung A 4**) in 200-facher Vergrößerung anhand einer Punktevergabe in allen Kategorien unter Einhaltung festgelegter und dafür üblicher Kriterien [44, 155] (**Tabelle 3**).

Sowohl zur Bewertung der Steatose als auch der Ballonierung wurde der komplette Schnitt betrachtet und anschließend ein fester Wert zwischen 0-2(3) vergeben. Für das Kriterium Inflammation wurden 10 unterschiedliche Gesichtsfelder ausgewertet und pro Gesichtsfeld die absolute Anzahl von inflammatorischen Herden ausgezählt. Angelehnt an frühere Arbeiten aus dem Institut [155] ist ein Herd in diesem Fall definiert als eine Ansammlung von mindestens 5 Entzündungszellen im Gewebe, die nicht in einer Reihe angeordnet sind. Am Ende wurde das arithmetische Mittel über alle 10 Gesichtsfelder gebildet, wobei mathematisch zum nächst höheren Punktwert aufgerundet wurde. Entsprechend der Anzahl von Herden wurde dann der Score-Wert vergeben.

Zum Schluss wurden die Werte aller drei Kategorien, wie in der Literatur beschrieben, ungewichtet addiert [156] und der NAFLD-Activity-Score (NAS ) (Werte von 0-8) ermittelt.

### 2.6.1.2 Ölrot O

Die Ölrot O-Färbung wird verwendet, um Fetteinlagerungen in den Zellen nativer Kryopräparate darstellen zu können. Diese Färbung eignet sich daher gut zum Nachweis von hepatischer Steatose [157, 158].

Die Schnitte wurden mit einem Leica CM1850 Mikrotom (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland) angefertigt. Das Aufbetten der Proben erfolgte mit Tissue-Tek ®O.C.T.™ Compound bei -21°C. Die Temperatur für das Anfertigen der Schnitte mit dem Mikrotom wurde zwischen -18°C und -19°C gewählt. Für jedes Präparat wurden zwei 8 µm dicke Schnitte auf einen Menzel-OT gezogen und mindestens über Nacht bei RT getrocknet.

**Tabelle 4: Lösungen Ölrot O-Färbung**

<b>Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Ölrot O Grundlösung (0,5 % w/v)	0,5 g Ölrot O 100 ml Isopropanol (100 %)
Ölrot O Arbeitslösung	150 ml der Ölrot-O Stock Lösung (0,5 % w/v) 100 ml H <sub>2</sub> O Lösung frisch ansetzen und filtrieren
60 % Isopropanol	120 ml Isopropanol (100 %) 80 ml dH <sub>2</sub> O
Hämalaun 1:5	50 ml Hämalaun 200 ml dH <sub>2</sub> O Lösung frisch ansetzen und filtrieren

Vor dem Färbevorgang wurden die Schnitte in 4 % PFA für 10 min bei RT fixiert. Die verwendeten Lösungen (**Tabelle 4**) wurden unmittelbar vor dem Färbevorgang angesetzt. Zunächst wurden die Schnitte nach der Fixierung zweimal mit Leitungswasser gespült und kurz in 60 % Isopropanol getaucht. Die anschließende Färbung mit der Arbeitslösung (**Tabelle 4**) erfolgte für 15 min bei RT, danach wurden die Schnitte erneut kurz in 60 % Isopropanol getaucht und daraufhin in dH<sub>2</sub>O gegeben. Die Gegenfärbung erfolgte für 1 min mit Hämalaun bei RT, gefolgt vom Bläuen mit handwarmem Leitungswasser für weitere 10 min. Zum Schluss wurden alle Schnitte mit Ultramount Eindeckmedium (Aqueous Mounting Medium, Dako) eingedeckt und über Nacht bei RT getrocknet.

Die Aufnahme der Bilder von den Leberpräparaten erfolgte zeitnah (maximal 14 d nach Färbevorgang, da der Farbstoff ausbleicht) am Carl Zeiss Axioskop 40 (**Tabelle A 5**) mit der Mikroskopie-Kamera AxioCam MRc5 unter Nutzung der Software Zeiss ZEN 2 lite. Da die Auswertung der Schnitte anhand von fotografierten Gesichtsfeldern erfolgte, wurden für die Aufnahmen konstante Kamera- und Belichtungseinstellungen (**Tabelle A 5**) verwendet. Mit einem 40fach-Objektiv und einem in das rechte Okular eingebrachten Hilfsraster wurden für jeden Schnitt insgesamt 10 Gesichtsfelder aufgenommen. Anschließend wurde der Anteil des rot eingefärbten Fettes am Gesamtbild bestimmt. Dafür wurde das Verhältnis der roten Pixel im Verhältnis zur Gesamtpixelzahl ermittelt. Dies erfolgte unter Nutzung der Software Image J (1.52v Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) durch Anwendung der Color Treshold Methode. Die Schwellenwerte für Rot, Grün und Blau wurden so eingestellt, dass das rot angefärbte Fett als zu messendes Merkmal und der Rest des Gewebes als Hintergrund erkannt wird (**Abbildung A 5**). Als Ergebnis der Analyse erhält man jeweils die Anzahl an Pixel des Merkmals bzw. des Hintergrundes und die Gesamtzahl der Pixel für das gesamte Bild. Anschließend wurde die Anzahl der Pixel des gemessenen Merkmals (rot

angefärbtes Fett) ins Verhältnis zur Gesamtzahl der Pixel gesetzt, woraus sich der prozentuale Anteil des Fettes am Präparat ergibt. Aufgrund der großen Anzahl an Analysen erfolgte die Auswertung mithilfe eines Codes (**Abbildung A 6**), sodass jeweils alle 10 Aufnahmen pro Präparat zeitgleich analysiert werden konnten. Die Berechnung des prozentualen Anteils erfolgte in Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA).

### ***2.6.1.3 Naphthol-AS-D-Chloracetatesterase-Färbung***

Mit Hilfe der CAE-Färbung lassen sich Granulozyten [159] im Gewebe in Abgrenzung zu anderen Zellen anfärben und somit Aussagen bezüglich einer vorliegenden Inflammation im Gewebe machen. Es handelt sich hierbei um eine enzymhistochemische Färbung, wobei die Färbung das Ergebnis von Enzymaktivität ist [160]. Die Naphthol-AS-D-Chloracetatesterase bewirkt eine Hydrolyse zu einer Naphtholverbindung, die wiederum in einer Kopplungsreaktion zu einem wasserlöslichen roten Azofarbstoff reagiert. Da die Esterase in Granulozyten eine deutliche Reaktion zeigt, erscheinen diese bei Vorliegen im Gewebe rot [161].

Es wurden 4 µm dicke Paraffinschnitte am Leica Mikrotom angefertigt, die im ersten Schritt analog zu den HE-Schnitten rehydriert wurden. Die Färbung erfolgte mit den in der **Tabelle 5** aufgeführten Lösungen. Zunächst wurden die Schnitte bei RT für 1 h in der Naphthol-AS-D-Chloracetatesterase-Lösung (Sigma Aldrich Taufkirchen, Deutschland) inkubiert, fließend gewässert und in dH<sub>2</sub>O gewaschen, die Gegenfärbung erfolgte für 5 min mit Hämalaun. Direkt nach dem Bläuen mit handwarmem Leitungswasser wurden die Schnitte mit dem Ultramount Eindeckmedium eingedeckt.

**Tabelle 5: Lösungen CAE-Färbung**

<b>Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
PBS Pufferkonzentrat	2,95 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O (Merck KGaA Darmstadt, Deutschland) + 0,49 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Merck KGaA Darmstadt, Deutschland) in 100 ml dH <sub>2</sub> O gelöst
PBS Gebrauchslösung	5 ml PBS-Pufferkonzentrat + 95 ml dH <sub>2</sub> O
Naphthol-AS-D-Chloracetatesterase	10 mg Echtgranatsalz (Fast Granat, Sigma Aldrich Taufkirchen, Deutschland) in 100 ml PBS-Gebrauchslösung gelöst 16 mg Naphthol-AS-D-Chlorazetat in 2 ml DMSO (Merck KGaA Darmstadt, Deutschland) gelöst Mischen, Schütteln und Filtrieren der Lösungen
Hämalaun 1:5	50 ml Hämalaun 200 ml dH <sub>2</sub> O Lösung frisch ansetzen und filtrieren

Die Auswertung erfolgte anhand von 10 Fotos, die mit dem Carl Zeiss Axioskop 40 mit einer Zeiss AxioCam MRc5 unter Nutzung der Software Zeiss ZEN 2 lite aufgenommen wurden. Für alle Aufnahmen wurde ein 40fach-Objektiv verwendet und die Farb- und Belichtungseinstellungen einheitlich gewählt (**Tabelle A 6**). Die Auswertung der Schnitte erfolgte mit Hilfe von Image J unter Nutzung der Funktion Cell Counter (Zellzählung). Hierzu wurden die Anzahl der rot angefärbten CAE-positiven Zellen und der bläulich-bräunlichen Hepatozyten gezählt und ins Verhältnis gesetzt.

## **2.6.2 Immunhistochemie**

### **2.6.2.1 F4/80**

Die F4/80-Färbung ist eine immunhistochemische Färbung, durch die Makrophagen in Form von F4/80-positiven Zellen dargestellt werden können. Bei entzündlichen Prozessen haben Makrophagen verschiedene Funktionen wie Antigenpräsentation, Phagozytose und Immunmodulation durch Ausschüttung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren.

Mit einem Leica Mikrotom wurden die Präparate geschnitten und auf Polysin-beschichtete OT gezogen (Thermo Scientific, Menzel Gläser, Polysine slides, 25x75x1,0 mm, Gerhard Menzel B.V. Co& KG Braunschweig, Deutschland). In einem ersten Schritt wurden die Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe (70 %, 80 %, 90 %, 100 %, X-TRA-Solv® Medite) dehydriert. Anschließend wurden diese in Citratpuffer pH 6,0 (Target Revital Solution, Dako Corporation, California, USA, Ref. S1699) für 7 min bei 700 W in der Mikrowelle erhitzt, auf RT heruntergekühlt und dreimal mit dH<sub>2</sub>O gespült. Einem Peroxidaseblock mit Peroxidase Blocking Solution (Dako Corporation, California, USA, Ref. S2023) folgte ein erneutes Spülen

(3x) und daraufhin ein Protein-Block mit einem serumfreien Protein-Block (Dako Corporation, California, USA, Ref. X0909) für 30 min. Anschließend wurden die Schnitte mit den Antikörpern (**Tabelle 6**) inkubiert (Primärantikörper über Nacht, Sekundärantikörper für 1 h). Die Farbreaktion des Antikörpers wurde durch Nutzung des Chromogens Permanent Red (Dako Corporation, California, USA, Ref. K0640) sichtbar gemacht. Als Gegenfärbung wurde Hämalun verwendet. Alle Schnitte wurden nach dem Bläuen in einer aufsteigenden Alkoholreihe rehydriert und mit dem X-TRA Kitt® Medite eingedeckt.

**Tabelle 6: Verwendete Antikörper F4/80-Färbung**

<b>Antikörper</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Verdünnung</b>
Primärantikörper	Ratte anti-Maus F4/80-Bio RAD MCA 497 in Antikörperverdünnungsmittel mit Hintergrund reduzierenden Komponenten, Dako Ref 3022	1:10
Sekundärantikörper	Ziege anti-Ratte abcam 97054 in Antikörperverdünnungsmittel mit Hintergrund reduzierenden Komponenten, Dako Ref 3022	1:100

Von jedem Präparat wurden lichtmikroskopische Aufnahmen am Carl Zeiss Axioskop 40 unter Nutzung der Zeiss AxioCam MRc5 und der Software Zeiss ZEN 2 lite angefertigt. Unter Verwendung des 40fach-Objektivs und bei konstanten Farb- und Belichtungseinstellungen (**Tabelle A 7**) wurden 10 Bilder aus unterschiedlichen Gesichtsfeldern aufgenommen. Anschließend erfolgte manuell die Auszählung der F4/80-positiven-Zellen (rot) und Hepatozyten (blau) mit Hilfe des Cell Counters im Programm Image J. Zur Auswertung wurde das Verhältnis von F4/80-positiven Zellen zu Hepatozytenzahl gebildet.

## 2.7 Molekularbiologische Untersuchungen

### 2.7.1 Western Blot

Der Western Blot wird zur Detektion von spezifischen Proteinen in einem Zelllysate verwendet [162]. Das Verfahren wurde bereits 1979 etabliert [163] und ist seitdem fester Bestandteil molekularbiologischer Untersuchungen.

Für die Proteinisolierung wurden entweder 30 mg Lebergewebe oder mit TNF $\alpha$  inkubierte HepG2-Zellen verwendet. Zur Proteinextraktion wurden sowohl das Lebergewebe, als auch die Zellen mit einem Lysepuffer (**Tabelle 7**) (10  $\mu$ l/10 mg Gewebe) versetzt. Für die Detektion von phosphorylierten Proteinen wurde 1 Tbl. PhosSTOP™ (Roche Diagnostics, Schweiz) zum

## Material und Methoden

Lysepuffer hinzugefügt. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis und 10-minütiger Zentrifugation bei 4°C und 10.000 xg wurde der Überstand abgetrennt und im Verhältnis 1:30 verdünnt.

Tabelle 7: Bestandteile des Lysepuffers

Substanzen	Menge
Aqua dest.	9,026 ml
1M TRIS, pH 7,5	100 µl
5M NaCl	20 µl
250 mM EDTA	4 µl
10 % Triton-X-100	500 µl
100 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	200 µl
4 % Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	50 µl
Protease Inhibitor Cocktail (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)	100 µl

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels Bicinchoninsäuremethode (Pierce Biotechnology Inc., Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) unter Verwendung von Rinderserumalbumin (BSA) (Pierce Biotechnology Inc., Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) als Standard. Die Bicinchoninsäure (BCA) Reagenz wurde vor Gebrauch aus 50 Teilen BCA™ Protein Assay Reagenz A und 1 Teil Reagenz B (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) hergestellt. 12,5 µl der im Verhältnis 1:30 verdünnten Proteinprobe wurden mit 100 µl der BCA Reagenz vermischt und bei 37°C für 30 min inkubiert. Durch die Reaktion von einem Kupfer-Ion und zwei BCA-Molekülen entsteht ein wasserlöslicher violett gefärbter Chelatkomplex, dessen Absorption bei 562 nm im Spectrophotometer (Sunrise™ Tecan, Tecan Trading AG, Schweiz) gemessen wurde. Die Proteinmenge wurde über den Standard automatisiert berechnet.

Es wurde ein 10 %iges Mini-PROTEAN ® TGX Stain-Free™-Gel (Fertiggel Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland) oder ein 8 %iges (FGFR1c und pFGFR1c) SDS-Gel (selbstgegossen) verwendet. Für das SDS-Gel wurde zunächst das Trenngel (**Tabelle 8**) gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach Polymerisation wurde das Sammelgel (**Tabelle 8**) auf das Trenngel aufgetragen. Die Proteinproben mit einer Konzentration von 20µg/µl wurden mit Probenpuffer (**Tabelle 9**) versetzt und abzentrifugiert. Es folgte eine Denaturierung bei 95°C für 5 min und der sofortige Transfer auf Eis. Die fertigen SDS-Gele wurden nach der Polymerisation in die Elektrophoreseeinheit gesetzt und die Kammern mit Laufpuffer (von 4-fach auf 2-fach/1-fach verdünnt) (**Tabelle 10**) gefüllt. Anschließend wurden

## Material und Methoden

die Proteinproben in die Taschen des Sammelgels gegeben. Als Größenstandard wurden 5 µg Marker (je 2,5 µg des Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standards Nr. 1610363 und Nr. 1610373, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Kalifornien, USA) mitgeführt. Beginnend bei einer Stromstärke von 20 mA wurde die Auftrennung der Proben gestartet und bis auf maximal 40 mA bis zur vollständigen Durchwanderung des Gels und Auftrennung des Markers erhöht. Nach dem Gellauf wurde die Gesamtheit der Proteine für die Stain-Free Gele colorimetrisch unter UV-Licht detektiert.

**Tabelle 8: Bestandteile Trenn- und Sammelgel (für jeweils 2 Gele)**

Substanzen	Trenngel 8 %	Sammelgel 5 %
Aqua dest.	3,35 ml	4,1 ml
Acrylamid	2,7 ml	1 ml
TRIS pH 8,8	3,75 ml	
TRIS pH 6,8		0,75 ml
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	100 µl	50 µl
Ammoniumperoxidisulfat	100 µl	50 µl
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	10 µl	5 µl

**Tabelle 9: Probenpuffer**

Substanz	Menge
Aqua dest.	
250 mM TRIS pH 6,6	2,5 ml
8 % SDS	0,8 g
87 % Glycerin	4,5697 g
100 mM DTT	154,2 mg
0,2 % Bromphenolblau	0,2 ml

**Tabelle 10: Laufpuffer pH 8,3**

Substanz	Menge
TRIS	30,3 g
Glycin	144 g
SDS	10 g

## Material und Methoden

**Tabelle 11: Zusammensetzung Anodenpuffer I und II pH 10,4 und Kathodenpuffer pH 9,4**

Substanz	Anodenpuffer I	Anodenpuffer II	Kathodenpuffer
25 mM TRIS		0,757 g	0,757 g
30 mM TRIS	9,0855 g		
40 mM Glycin			0,751 g
20 % Methanol	50 ml	50 mL	50 ml
Aqua dest.	Auf 250 ml aufgefüllt	Auf 250 ml aufgefüllt	Auf 250 ml aufgefüllt

**Tabelle 12: Zusammensetzung TBS-T, TBS, BDS und PBST**

Substanz	TBS-T	TBS pH 7,6	2,5 % BSA	1xPBST
BSA			12,5 g	
TRIS		24,2 g		
NaCl		80 g		
10 % TBS	100 ml			
TBS-T			500 ml	
10x PBS (P7059 Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)				100 ml
0,1 % Tween 20	1 ml			1 ml
H <sub>2</sub> O	900 ml	1000 ml		900 ml

Die Übertragung der Proteine auf eine Polyvinylfluorid (PVDF)-Membran (Immobilon-P, Millipore, Eschborn, Deutschland) erfolgte über ein Semi-Dry-Blotting-System. Um die hydrophoben Eigenschaften der PVDF-Membran zu verringern, wurde diese für 15 s in 100 %iges Methanol (J.T. Baker™, Thermo Fisher Scientific Inc., Schwerte, Deutschland) eingetaucht, 2 min in Wasser gewaschen und anschließend für 5 min im Anodenpuffer II (**Tabelle 11**) äquilibriert. Der Blot setzt sich aus 3 Schichten in Kathodenpuffer (**Tabelle 11**), dem Gel, der PVDF-Membran und 1 Schicht in Anodenpuffer II (**Tabelle 11**) und 2 Schichten in Anodenpuffer I (**Tabelle 11**) zusammen. Der Blot lief für 1h 45 min bei 2,8 mA/cm<sup>2</sup>. Anschließend wurde die Membran kurz mit TBS-T (**Tabelle 12**) gewaschen und für 30 min bei 37°C unter Schütteln mit 2,5 % BSA-Lösung (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) geblockt, um unspezifische Bindungen von Antikörpern zu verhindern.

Die Membranen wurden bei 4°C über Nacht mit entsprechend verdünnten Primärantikörpern (**Tabelle 13**) unter Schütteln inkubiert. Nach Waschen (1x 5 min in 1xTBS-T und 1x5 min in TBS) (**Tabelle 12**) erfolgte die Inkubation mit dem entsprechenden Peroxidase-gebundenen Sekundärantikörper (**Tabelle 14**) für 1 h bei RT auf dem Schüttler. Die Membranen wurden danach 3x5 min mit 1x TBS-T und 2x5 min mit 1x TBS gewaschen. Durch Luminol-verstärkte Chemilumineszenz (ECL plus, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) konnte

die Proteinexpression bestimmt und mit dem ChemiDoc LB XRS System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA) erfasst werden.

**Tabelle 13: Primärantikörper**

<b>Primärantikörper</b>	<b>Host</b>	<b>Klonalität</b>	<b>Verdünnung</b>
Anti-β-klotho (LBioScience, Seattle, USA)	Hase	Polyklonal	1:1.000
Anti-pFGFR1c (Tyr 653/654, Cell Signaling Technology, Cambridge, UK)	Hase	Polyklonal	1:1.000
Anti- GAPDH (Millipore Sigma, Burlington, Massachusetts, USA)	Maus	Monoklonal	1:20.000
Anti-Maus (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)	Maus	Monoklonal	1:40.000
Anti-FGFR1c (D8E4, Cell Signaling Technology, Cambridge, UK)	Maus	Polyklonal	1:10.000

**Tabelle 14: Sekundärantikörper**

<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Host</b>	<b>Verdünnung</b>
Anti-rabbit IgG, HRP-linked (Cell Signaling Technology, Cambridge, UK)	Maus	1:10.000

**Tabelle 15: Strip-Lösung**

<b>Substanz</b>
25 mM Glycin
1 % SDS pH 2

Bei Reinkubation der Membranen mit einem weiteren Primärantikörper wurde der vorherige Antikörper mittels einer Strip Lösung (**Tabelle 15**) entfernt, indem die Membran in dieser für 15 min bei 37 °C inkubiert und anschließend 15 min mit TBS-T gewaschen wurde. Die Membran wurde wie oben beschrieben erneut in Primärantikörperlösung sowie in Sekundärantikörperlösung inkubiert, wobei darauf zu achten war, dass bei Inkubation mit anti-GAPDH Antikörper die Membran zusätzlich über Nacht in 2.5% BSA geblockt wurde.

Die Auswertung des Western Blot erfolgte mithilfe des Programmes Image Lab™ Software. Die Lumineszenzsignale wurden densitometrisch (Quantity One, Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien, USA) ausgewertet und die relative Proteinexpression anhand des Quotienten aus Zielprotein (pFGF, β-klotho) und jeweiligem Kontrollprotein

(FGF, Gesamtprotein) ermittelt. Die Ergebnisse eines Western Blots sind als semiquantitativ zu bewerten [162].

### 2.7.2 mRNA-Expressionsanalyse

mRNA-Expressionsanalysen wurden mit Hilfe einer quantitativen Real-Time-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) durchgeführt. Dabei wurde zuerst RNA aus gefrorenem Lebergewebe mit dem RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Venlo, Niederlande) unter Beachtung der Herstellerangaben isoliert. Zunächst wurde 30 mg gefrorenes Lebergewebe lysiert, um die gesamte enthaltene RNA im Gewebe freizusetzen. Im nächsten Schritt erfolgte die Homogenisierung. Durch die Zugabe des zugehörigen Puffers wird eine effiziente Bindung der RNA an die RNeasy-Silikatmembran der RNeasy-Mini-Spin-Säule ermöglicht, wobei Verunreinigungen durch Rest-DNA durch das RNase-Free-DNase-Set verhindert werden. Nach mehrmaliger Zentrifugation und Waschen mit Puffer wurde die RNA mit 30 µl RNase free H<sub>2</sub>O von der Säule eluiert. Die RNA-Konzentrationsmessung erfolgte durch Absorptionsmessung am NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), wobei die Absorption bei 260 nm und 280 nm gemessen wurde und H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> als Referenz diente. Die Konzentration ist dabei proportional zur Lichtabsorption. Aussagen über die Reinheit der RNA-Probe können mittels Quotienten von A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> getroffen werden. Der Absorptionsquotient sollte bei ~2 liegen. Zusätzlich wurde die Qualität der RNA mittels Agarosegel-Elektrophorese überprüft. **Tabelle 16** zeigt die Bestandteile des Agarosegels, **Tabelle 17** des TRIS-Acetat-EDTA (TAE)-Puffers und **Tabelle 18** die Zusammensetzung des Ladepuffers. Für die qualitative Agarose-Gelelektrophorese wurde jeweils 1 µl der Probe mit 1 µl RNA-Ladepuffer versetzt und mit RNase freiem H<sub>2</sub>O auf 11 µl aufgefüllt und auf das Agarosegel aufgetragen. Der Gel-Lauf wurde bei 50-90 V durchgeführt.

**Tabelle 16: Zusammensetzung des Agarosegels 1 %**

<b>Substanzen</b>	<b>Menge</b>
Aqua dest.	30 ml
1x TRIS-Acetat-EDTA-Puffer	30 ml
Agarose	0,3 g
Lonza Gelstar Nucleid Acid Gel Stain 10,000 conc. In DMSO Cat. No 50535	0,6 µl

## Material und Methoden

Tabelle 17: Bestandteile des TRIS-Acetat-EDTA-Puffer

Substanz	Menge
Aqua dest.	0,5 l
2 M TRIS	121,65 g
1 M Na-Acetat-3H <sub>2</sub> O	68,04 g
50 mM Na <sub>2</sub> EDTA	9,305 g

Tabelle 18: Bestandteile des Ladepuffers

Substanzen	Menge
Aqua dest.	0,5 l
87 % Glycerol	2,875 ml
0,5 M EDTA	10 µl
Bromphenolblau	20 mg
Xylene Cyanol	20 mg

Nach erfolgreicher Isolation der RNA folgte die quantitative RT-PCR. Hier wurde ein 2-Schritt Protokoll befolgt, d.h. zuerst wurde die mRNA in cDNA reverse transkribiert, gefolgt von einer RT-PCR. Die RNA wurde in einem ersten Schritt denaturiert. Der dafür verwendete Ansatz ist **Tabelle 19** zu entnehmen. Im Mastercycler gradient 5.331 (Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland) wurde im Programm RNADENAT für 10 min bei 72°C mit anschließender Kühlung auf 4°C die Denaturierung durchgeführt. Anschließend erfolgte unter Kühlung auf Eis die Zugabe des cDNA-Synthese-Mastermix (MM) zum Reaktionsansatz. Die Zusammensetzung des MM ist in **Tabelle 20** abgebildet.

Im Mastercycler erfolgte nach Zugabe des MM die Erstellung der cDNA durch Durchlauf des Programms RT42 (1h bei 42°C, 5 min bei 95°C und Kühlung bei 4°C).

Die Expressionsanalyse der Zytokine erfolgte mit Hilfe einer quantitativen Real-Time-PCR im BioRad iQ5 Multicolor Real Time PCR Detection System (Conquer Scientific, San Diego, California, USA) mit dem iQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, California, USA). Als Fluoreszenzfarbstoff diente SYBR® Green der Detektion doppelsträngiger DNA, dabei nimmt mit zunehmenden PCR-Produkt das Fluoreszenzsignal zu. Es wurden jeweils 80 µl PCR-Wasser und 10 µl der jeweiligen Primer (**Tabelle 21**) abgebildet, wobei 40S Ribosomal Protein S18 (RPS18) als Housekeeping Gen (HKG) diente. 19 µl Mastermix wurden mit 1 µl cDNA in eine Kavität gefüllt, als Positivkontrolle diente ein 1:2 verdünnter C57BL/6-Maus-Lebergenpool und eine Negativkontrolle (PCR-Wasser), um Verunreinigungen oder falsch-positive Signale auszuschließen.

Tabelle 19: Denaturierungsansatz

Substanzen	Menge
RNA	2 µg/µl
RNAse freies Wasser	Ad 11µl
Oligod(T) 18mRNA Primer	1 µl

Tabelle 20: Zusammensetzung des Mastermixes

Substanzen	Menge
5x First Strand Puffer	4 µl
0,1 M DTT	2 µl
10 mM dNTP's	1 µl
Superscript	1 µl

Tabelle 21: Primer für RT-qPCR

Primer	5'-3' Vorwärtsprimer	5'-3' Rückwärtsprimer
FGF21	GCTGTCTTCCTGCTGGGG	CCTGGTTTGGGGAGTCCTTC
TNF $\alpha$	ACATTCGAGGCTCCAGTGAATTCGG	GGCAGGTCTACTTTGGAGTCATTGC
IL-1 $\beta$	CCCAAGCAATACCCAAAGAA	TTGTGAGGTGCTGATGTACCA
IL-6	TCTGACCACAGTGAGGAATGTCCAC	TGGAGTCACAGAAGGAGTGGCTAAG
IL-10	GCCTTGCAGAAAAGAGAGCT	AAAGAAAGTCTTCACCTGGC
RPS18	AGGATGTGAAGGATGGGAAG	TTGGATACACCCACAGTTCG

Die Expression der Zielgene wurden mit der CycleTreshold (CT) Methode  $-\Delta\Delta CT$  quantifiziert. Die Normalisierung erfolgte hierbei gegen das HKG RPS18. Der Cycle Treshold-Wert (Ct, Schwellenzyklus) spiegelt die Stelle des stärksten Anstiegs der gemessenen Fluoreszenz wider. Je geringer die Expression eines Genes ist, umso höher ist der Ct-Wert. Da besonders die Expressionsunterschiede von Interesse sind, wurde zunächst  $\Delta CT$  zwischen HKG und Zielgen bestimmt und anschließend das  $\Delta CT$  der Positivkontrolle vom  $\Delta CT$  des Zielgens subtrahiert.  $\Delta\Delta CT$  wird letztlich als Ratio  $2^{-\Delta\Delta CT}$  angegeben, wodurch eine relative Quantifizierung der Expressionsunterschiede möglich ist.

## 2.8 Korrelationsanalyse

Die Korrelationsanalysen wurden mithilfe von R (Version 4.0.2, R studio, Boston, USA) anhand der prcomp Methode durchgeführt. Die Pearson-Korrelation wurde verwendet, um die lineare Abhängigkeit zweier Parameter darstellen zu können. Es wurde auf eine mögliche Korrelation zwischen allen 26 gemessenen Parameter getestet und diese in einer HeatMap dargestellt. Rote Farbe bedeutet eine streng positive Korrelation (1,00-0,70), blau eine streng

negative Korrelation (-0,70—1,00) und helle Farben eine moderate Korrelation ( $>0,40$  oder  $<-0,40$ ). Da nicht bei allen Tieren Werte für alle 26 Parameter vorlagen, wurden die fehlenden Werte vor der Analyse durch den Mittelwert der jeweiligen Versuchsgruppe ersetzt.

### 2.9 Statistik

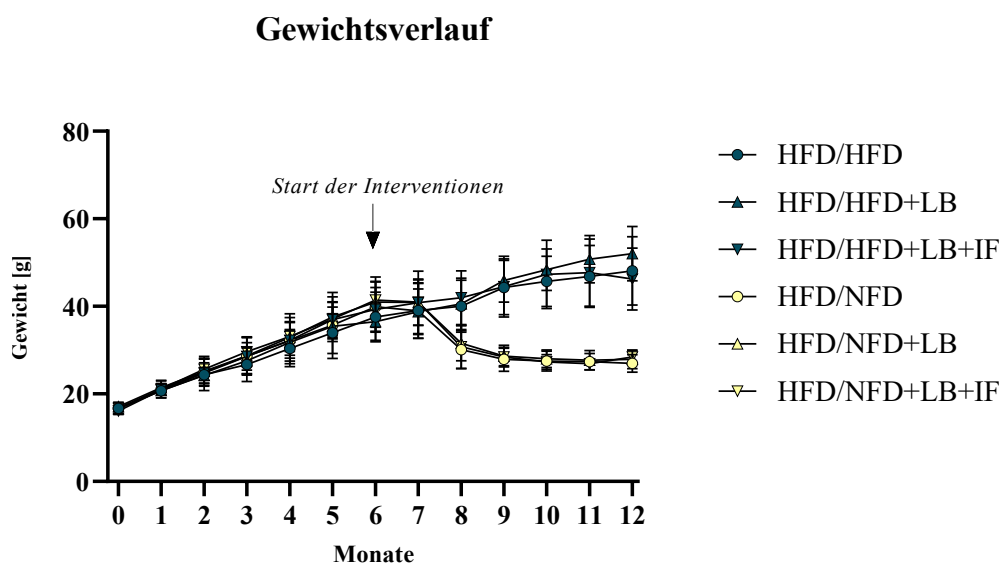
Die statistischen Analysen wurden mit Hilfe von Microsoft Excel und GraphPad PRISM 8.0.1 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) durchgeführt. Ausgeschlossen aus den Analysen wurden Proben von Tieren, die aus unterschiedlichen Gründen vorzeitig im Verlauf der Studie verstorben waren oder bei denen bei Organentnahme anatomische und morphologische Veränderungen an der Leber aufgefallen waren, welche Hinweis auf ein außerhalb der untersuchten Aspekte pathologisches Ereignis geben konnten (z.B. Tumor, Nekrose).

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt in Form von Box Plots, wobei der Median sowie die 25% und 75% Perzentile mit einem Konfidenzintervall von 95% dargestellt sind. Ausreißer wurden mit der Robust regression and Outlier removal (ROUT)-Methode bestimmt. Mittels Kolmogorov-Smirnov Test für Scores oder Shapiro-Wilk wurde zunächst auf Normalverteilung getestet. Im Falle normalverteilter Werte wurde mittels Bartlett's auf signifikante Abweichung  $p>0,05$  der Standardabweichung getestet, wenn dies zutraf mit Brown-Forsythe und Welch-Analysis of Variance (ANOVA) gefolgt von Tamhane's comparisons test, ansonsten mit One-way ANOVA gefolgt vom Sidak's multiple comparisons Test die Signifikanz getestet. Wenn die Werte nicht einer Normalverteilung entsprachen, so wurde die Varianzanalyse mittels Kruskal-Wallis-Test und Dunn's multiple comparisons test durchgeführt, wobei das Signifikanzniveau auf  $p\leq 0,05$  festgelegt wurde. Die graphische Darstellung erfolgte ebenfalls mit der Software GraphPad PRISM 8.0.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Körpergewicht und -zusammensetzung

Ausgehend von einem Körpergewicht von ~18g verdoppelte sich das Körpergewicht aller Tiere nach 6 Monaten mit HFD bei nahezu linearem Verlauf auf ~35-40g. Nach Einführung der Interventionen bei Monat 6 stieg das Körpergewicht zunächst weiter, allerdings nicht mehr in allen Gruppen linear. Ab Monat 7 kam es zu sichtbaren Unterschieden in der Gewichtsentwicklung zwischen den Futtergruppen HFD vs. NFD. Während die Tiere, die weiterhin HFD erhielten, auf bis zu 45-50g Endgewicht zunahmen (Abflachung der Kurve), verloren die Tiere mit Futterwechsel auf NFD zunächst stark an Körpergewicht (5-10g, >10% des Körpergewichtes) und pendelten sich nach 9 Monaten auf ein relativ konstantes Körpergewicht von ~25-30g ein (**Abbildung 8**). Nicht alle Tiere überlebten bis zum Ende des Versuchszeitraums, sodass in einigen Gruppen die Anzahl der Tiere am Ende geringer war.

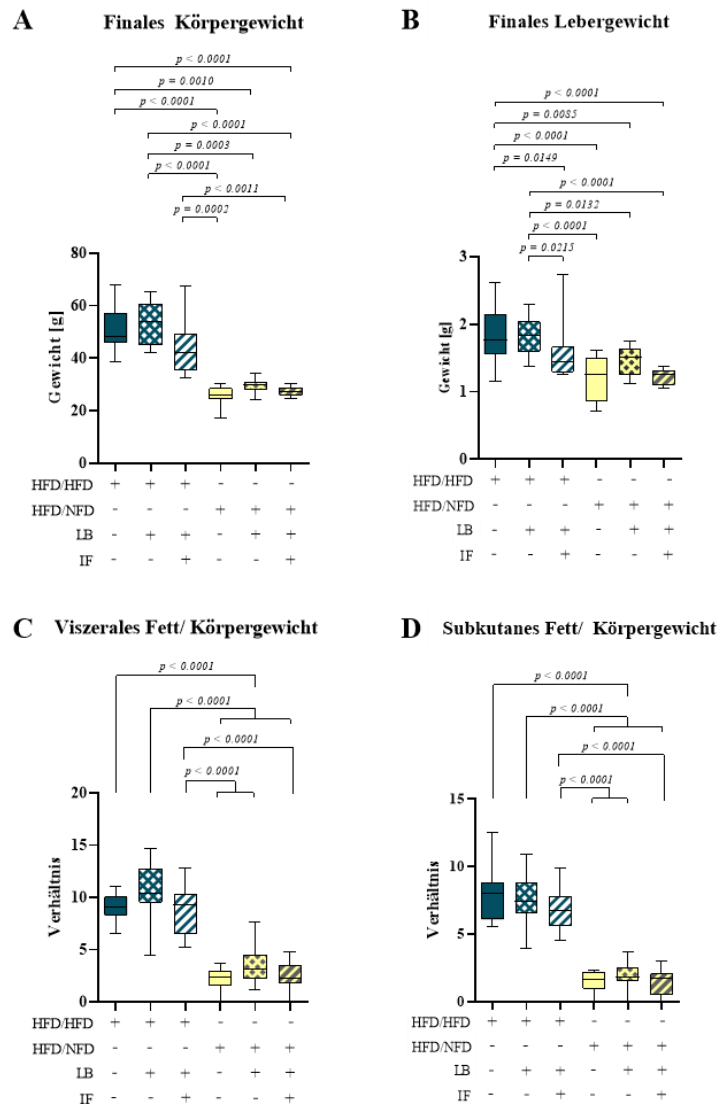


**Abbildung 8: Monatlicher Vergleich des Gewichtsverlaufes.** Alle Versuchsgruppen mit Beginn n=90 Tiere und Ende n=84, (HFD/HFD n=13, HFD/HFD+LB n=13, HFD/HFD+LB+IF n=15, HFD/NFD n=13, HFD/NFD+LB n=15, HFD/NFD+LB+IF n=13), MW±SD, HFD=Hochfettdiät, NFD=Niedrig-Fett-Diät, LB=Laufband, IF=Intervallfasten

Bei Abschluss der Versuche nach 12 Monaten wurden deutliche Gewichtsunterschiede zwischen den Gruppen sichtbar (**Abbildung 8**). Betrachtet man alle HFD-Gruppen (blau) gegenüber allen NFD-Gruppen (gelb) so zeigt sich ein generell signifikant geringeres Körpergewicht (**Abbildung 9 A**) in den Gruppen mit NFD. Das Lebergewicht (**Abbildung 9 B**) war sowohl in den Gruppen mit Diätwechsel als auch der Gruppe HFD/HFD+LB+IF gegenüber

## Ergebnisse

den anderen HFD-Gruppen signifikant verringert. Auch das Gewicht von viszeralem (**Abbildung 9 C**) und subkutanem (**Abbildung 9 D**) Fettgewebe war in allen Gruppen mit NFD signifikant gegenüber den Gruppen mit HFD verringert. Sowohl der Diätwechsel als auch die Kombination von LB und IF zeigten somit einen gewichts- und fettreduzierenden Einfluss bei den Tieren.



**Abbildung 9: Finales Gewicht.** Körpergewicht (A: HFD/HFD n=13, HFD/HFD+LB n=13, HFD/HFD+LB+IF n=15, HFD/NFD n=14, HFD/NFD+LB n=15, HFD/NFD+LB+IF n=13), Lebergewicht (B: HFD/HFD n=12, HFD/HFD+LB n=11, HFD/HFD+LB+IF n=12, HFD/NFD n=11, HFD/NFD+LB n=15, HFD/NFD+LB+IF n=11), Anteil des viszeralen Fettes (C: HFD/HFD n=13, HFD/HFD+LB n=13, HFD/HFD+LB+IF n=15, HFD/NFD n=14, HFD/NFD+LB n=15, HFD/NFD+LB+IF n=14) und subkutanen Fettes (D: HFD/HFD n=13, HFD/HFD+LB n=13, HFD/HFD+LB+IF n=15, HFD/NFD n=14, HFD/NFD+LB n=15, HFD/NFD+LB+IF n=14) am Körpergewicht, Median+25%+75% Perzentile, Signifikanz mit Kruskal-Wallis gefolgt von Dunn's post hoc Test (A), Brown-Forsythe und Welch's ANOVA mit Tamhane T2 post hoc Test (B: F value (F)=11, Degree of Freedom (DF)= 5, C: F=51.82, DF= 5, D: F= 66.19, DF= 5), HFD=Hochfett-diät, NFD=Niedrigfett-diät, LB=Laufband, IF=Intervallfasten

### 3.2 Hepatische Steatose

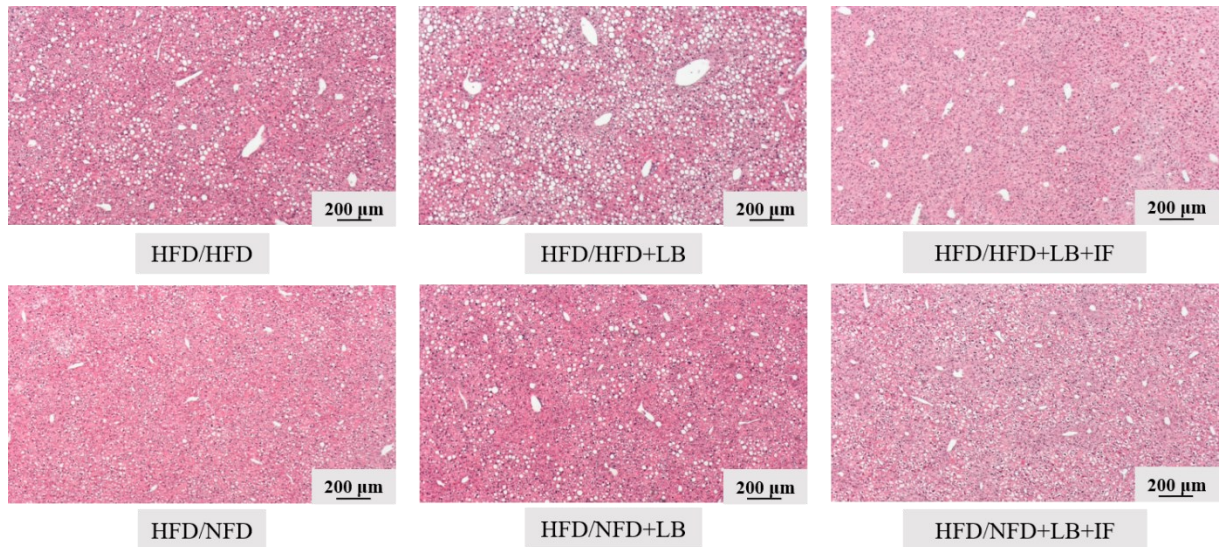
Die Körper- und Lebergewichtsunterschiede sowie die Unterschiede der verschiedenen Fettmassen zwischen den Untersuchungsgruppen lassen vermuten, dass durch das Einführen der Intervention(en) nicht nur eine Gewichtsreduktion *per se* erfolgt ist, sondern, ähnlich wie beim viszeralen und subkutanen Körperfett, auch eine Reduktion von Fettgewebe in der Leber. Die Stärke der hepatischen Steatose lässt sich durch die Darstellung der Adipozyten in der HE- oder Ölrot O-Färbung darstellen. So kann erfasst werden, wie groß der Anteil des Fettgewebes am gesamten Lebergewebe ist.

Die Verfettung des Lebergewebes wurde zunächst in der HE-Färbung (**Abbildung 10**) anhand des Steatose-Scores (Beispiele für die Punkteverteilung siehe **Abbildung A 2**) bewertet. Dabei nimmt mit steigendem Score-Wert das Ausmaß der Verfettung zu. Die stärkste anhand dieses Scores gemessene Verfettung war mit Werten von durchschnittlich 2,5-3 in den Gruppen HFD/HFD und HFD/HFD+LB zu sehen. Dahingegen zeigten sich in allen Gruppen mit NFD und der Gruppe HFD/HFD+LB+IF (**Abbildung 12 A**) mit  $\sim 1$  signifikant niedrigere Werte gegenüber den Gruppen HFD/HFD und HFD/HFD+LB.

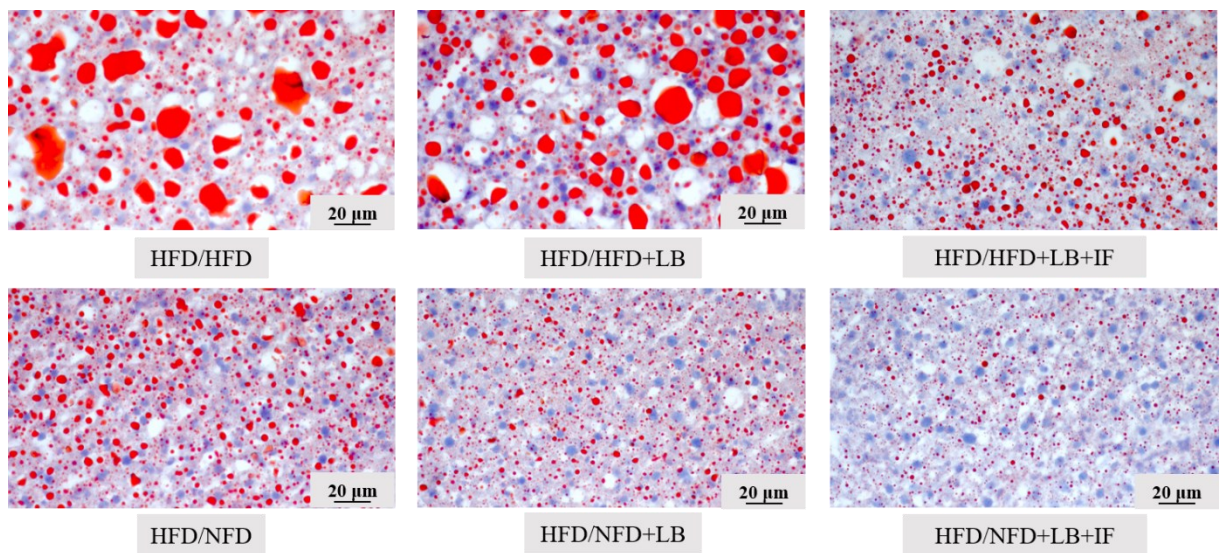
Mit der Ölrot O-Färbung lässt sich der Anteil des Fettgewebes am Gesamtgewebe prozentual angeben. Aus **Abbildung 12 B** kann entnommen werden, dass parallel zu den Ergebnissen aus der HE-Färbung der höchste Anteil an Fettzellen in den Gruppen HFD/HFD und HFD/HFD+LB mit 15-20 % Anteil am Gesamtgewebe gemessen wurde, während in den Gruppen mit NFD dieser Anteil nur etwa halb so groß und damit signifikant geringer war.

Insgesamt zeigte sich vor allem durch den Diätwechsel und die Kombination der Interventionen LB und IF bei gleichbleibender HFD neben einer Reduktion von viszeralem und subkutanem Fettgewebe auch eine signifikante Reduktion von Fettgewebe in der Leber.

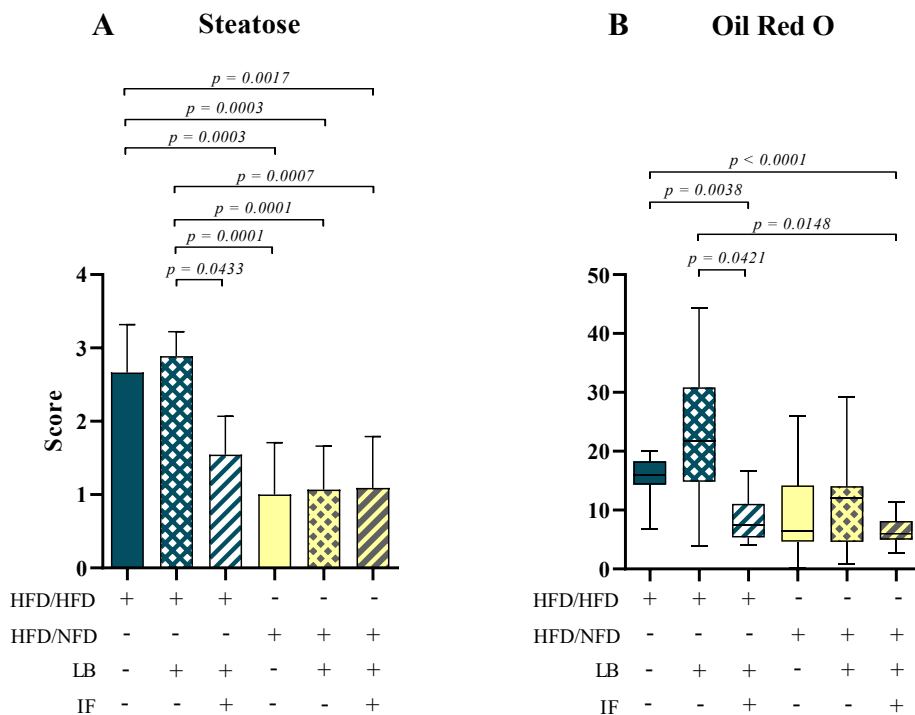
## Ergebnisse



**Abbildung 10: Repräsentative Bilder HE-Färbung.** 50x Vergrößerung, Skalierung 200µm, HFD=Hochfettdiät, NFD=Niedrigfettdiät, LB=Laufband, IF=Intervallfasten



**Abbildung 11: Repräsentative Bilder Ölrot O-Färbung.** 100x Vergrößerung, Skalierung 20µm, HFD=Hochfettdiät, NFD=Niedrigfettdiät, LB=Laufband, IF=Intervallfasten



**Abbildung 12: Ausprägung der Leberverfettung.** HE-Färbung (A: HFD/HFD n=12, HFD/HFD+LB n=9, HFD/HFD+LB+IF n=11, HFD/NFD n=13, HFD/NFD+LB n=15, HFD/NFD+LB+IF n=11, Ölrot O (B: HFD/HFD n=11, HFD/HFD+LB n=11, HFD/HFD+LB+IF n=12, HFD/NFD n=13, HFD/NFD+LB n=15, HFD/NFD+LB+IF n=10), Signifikanz mit Kruskal-Wallis gefolgt von Dunn's post hoc Test (A, B), HFD=Hochfettidiät, NFD=Niedrigfettidiät, LB=Laufband, IF=Intervallfasten

### 3.3 Inflammation

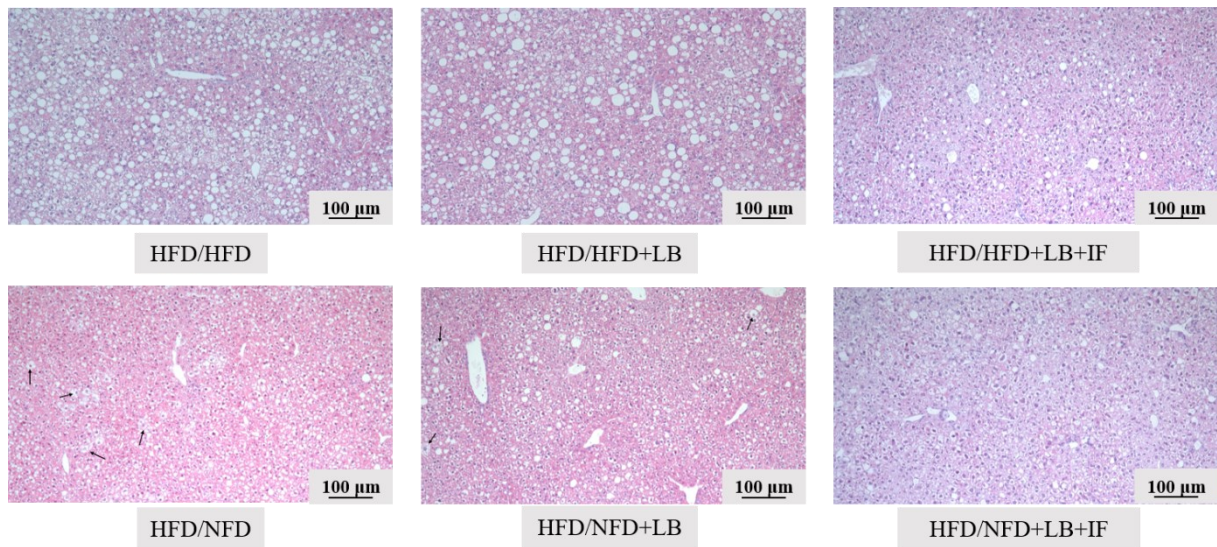
Eine HFD wirkt sich im Rahmen einer NAFLD nicht nur auf eine Gewichts- und Fettgewebszunahme, sondern auch auf entzündliche Prozesse aus, was in Folge zur Ansammlung von Entzündungszellen in der Leber führen kann. Diese stellt sich an HE-gefärbten Präparaten in Veränderungen der Zellform (Ballonierung) oder Ansammlung von Entzündungszellen (Inflammation) dar.

#### 3.3.1 Ballonierung und Inflammation

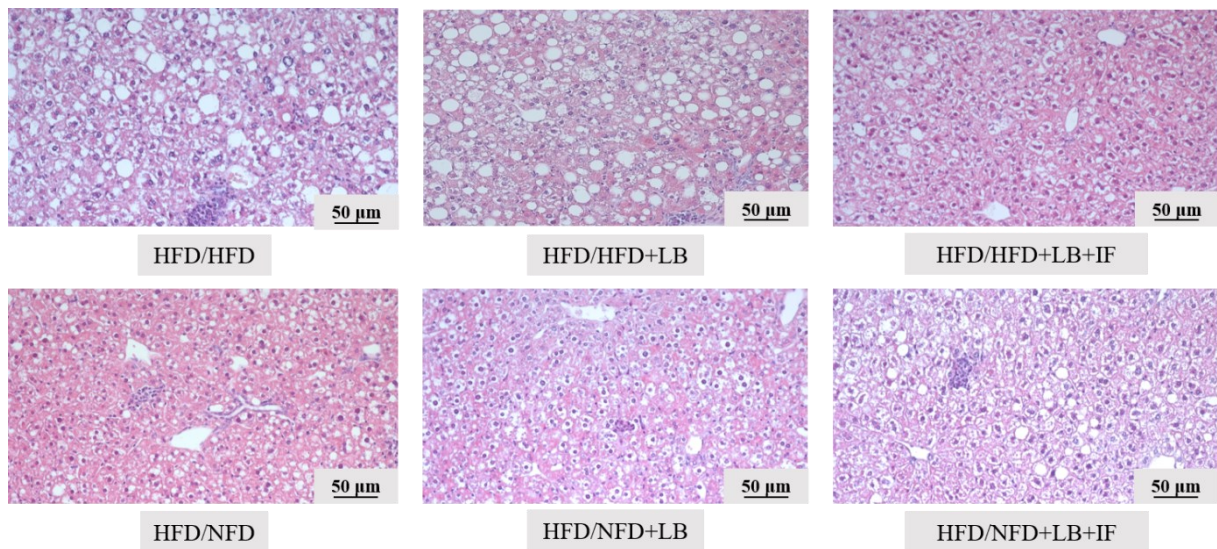
In **Abbildung 15** sind die Score-Werte für die Kriterien Ballonierung (A) und Inflammation (B) in der HE-Färbung (**Abbildung 13**, **Abbildung 14**) nach 12 Monaten aufgetragen (Beispiele für die Punkteverteilung siehe Anhang **Abbildung A 3**, **Abbildung A 4**). Die Ausprägung ballonierter Zellen (**Abbildung 15 A**) war in der Gruppe HFD/HFD am größten und zeigte eine abnehmende Tendenz in den Gruppen mit Diätwechsel sowie in der Gruppe HFD/HFD+LB+IF, wies jedoch insgesamt keine statistisch signifikanten Unterschiede auf. Der Score-Wert für das

## Ergebnisse

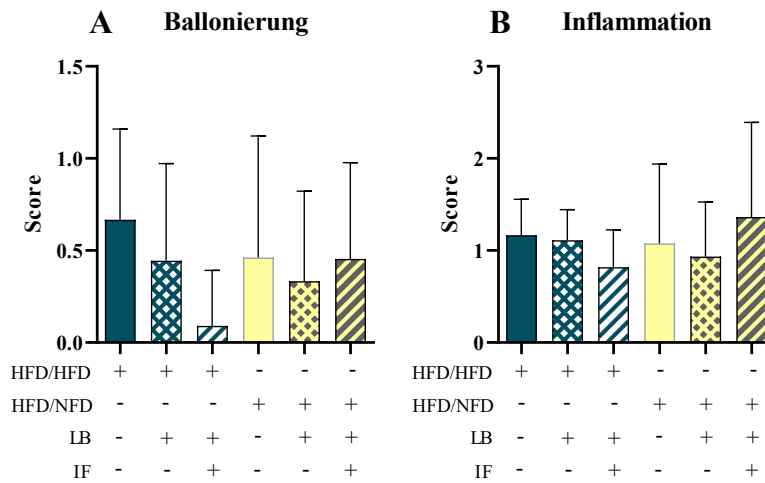
Kriterium Inflammation (**Abbildung 15 B**) war in allen Gruppen bei ~1 und unterschied sich nicht signifikant voneinander.



**Abbildung 13: Repräsentative Bilder Ballonierung in der HE-Färbung.** 100x Vergrößerung, Skalierung 100µm, HFD=Hochfett-diät, NFD=Niedrigfett-diät, LB=Laufband, IF=Intervallfasten



**Abbildung 14: Repräsentative Bilder der Inflammation in der HE-Färbung.** 200x Vergrößerung, Skalierung 50µm, HFD=Hochfett-diät, NFD=Niedrigfett-diät, LB=Laufband, IF=Intervallfasten



**Abbildung 15: Merkmale der hepatischen Inflammation in der Leber.** Ballonierung (A: HFD/HFD n=12, HFD/HFD+LB n=9, HFD/HFD+LB+IF n=10, HFD/NFD n=13, HFD/NFD+LB n=15, HFD/NFD+LB+IF n=11), Inflammation (B: HFD/HFD n=10, HFD/HFD+LB n=8, HFD/HFD+LB+IF n=9, HFD/NFD n=13, HFD/NFD+LB n=15, HFD/NFD+LB+IF n=11), Signifikanz mit One-way ANOVA gefolgt von Tukey's multiple comparisons test (A), Kruskal-Wallis gefolgt von Dunn's multiple comparisons test (B), HFD=Hochfettdiät, NFD=Niedrigfettdiät, LB=Laufband, IF=Intervallfasten

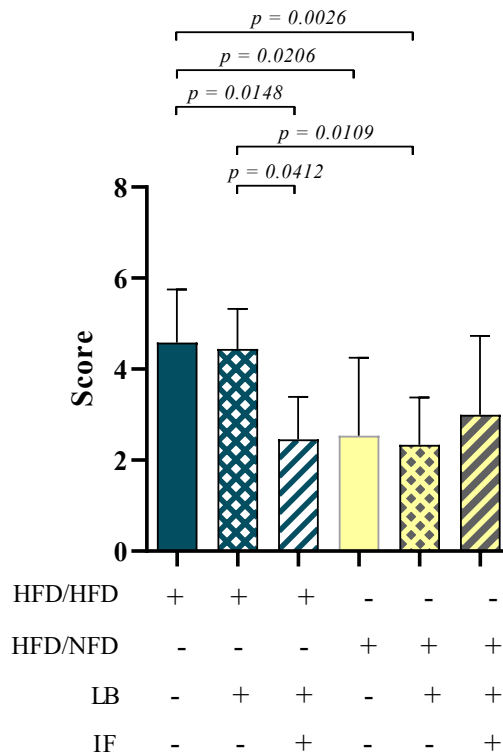
### 3.3.2 NAS

Die Kriterien hepatische Steatose, Ballonierung und Inflammation (jeweils in der HE-Färbung) werden zur genaueren Einschätzung der Ausprägung der NAFLD als NAS zusammenfasst. Mit stärkerer Ausprägung der hepatischen Steatose, Ballonierung und Inflammation steigt der NAS und spiegelt die stärkere Ausprägung der Erkrankung in der Leber wider.

Die Werte des NAS (**Abbildung 16**) waren mit Durchschnittswerten >4 in den Gruppen HFD/HFD und HFD/HFD+LB am höchsten, während die Score-Werte in allen Gruppen mit NFD und der Gruppe HFD/HFD+LB+IF in etwa halbiert und gegenüber den HFD Gruppen signifikant verringert waren. Die Ausprägung der NAFLD konnte demnach durch den Diätwechsel und auch die Kombination aus LB und IF bei gleichbleibender HFD reduziert werden.

## Ergebnisse

### NAS



**Abbildung 16: Darstellung des NAS anhand der Leberhistologie.** (HFD/HFD n=12, HFD/HFD+LB n=9, HFD/HFD+LB+IF n=11, HFD/NFD n=13, HFD/NFD+LB n=15, HFD/NFD+LB+IF n=11), Signifikanz mit Kruskal-Wallis gefolgt von Dunn's multiple comparisons test, HFD=Hochfett-diät, NFD=Niedrigfett-diät, LB=Laufband, IF=Intervallfasten

### 3.3.3 CAE und F4/80

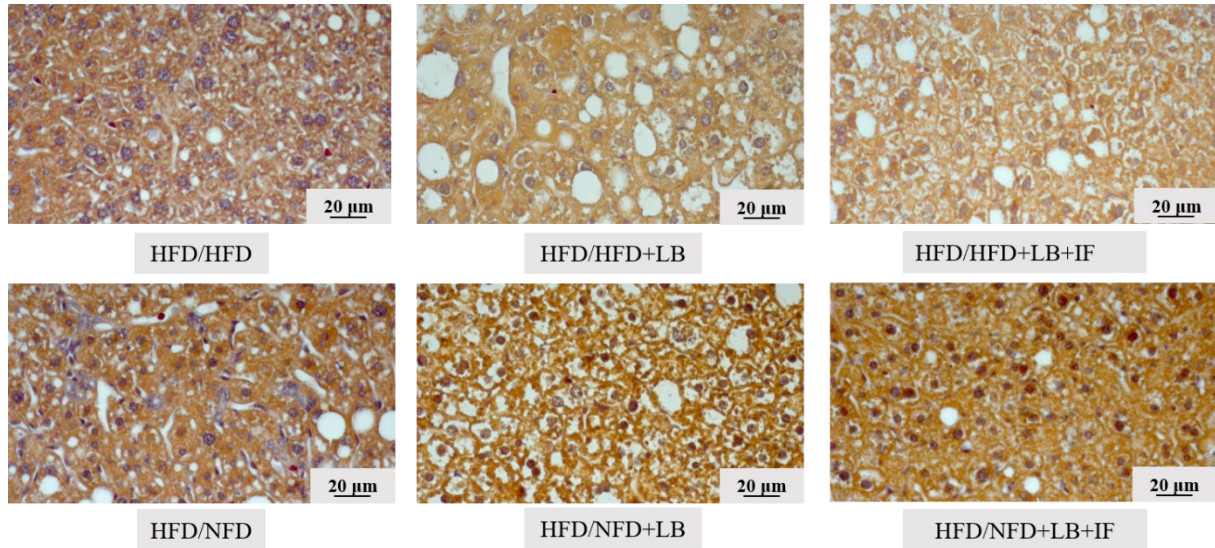
Eine genauere Erfassung inflammatorischer Zellen in der Leber erfolgte durch Anfärbung von neutrophilen Granulozyten (CAE) oder Makrophagen (F4/80).

Die Anzahl neutrophiler Granulozyten in der Leber wurde histologisch mit der CAE-Färbung (**Abbildung 17**) quantifiziert. Insgesamt war der Anteil der CAE-positiven Zellen (**Abbildung 19 A**) in allen Untersuchungsgruppen <4 %, wobei der Anteil neutrophiler Granulozyten in der Gruppe HFD/HFD+LB am höchsten und in der Gruppe HFD/NFD+LB am niedrigsten war. Insgesamt unterschieden sich die Gruppen HFD und NFD aber nicht signifikant voneinander.

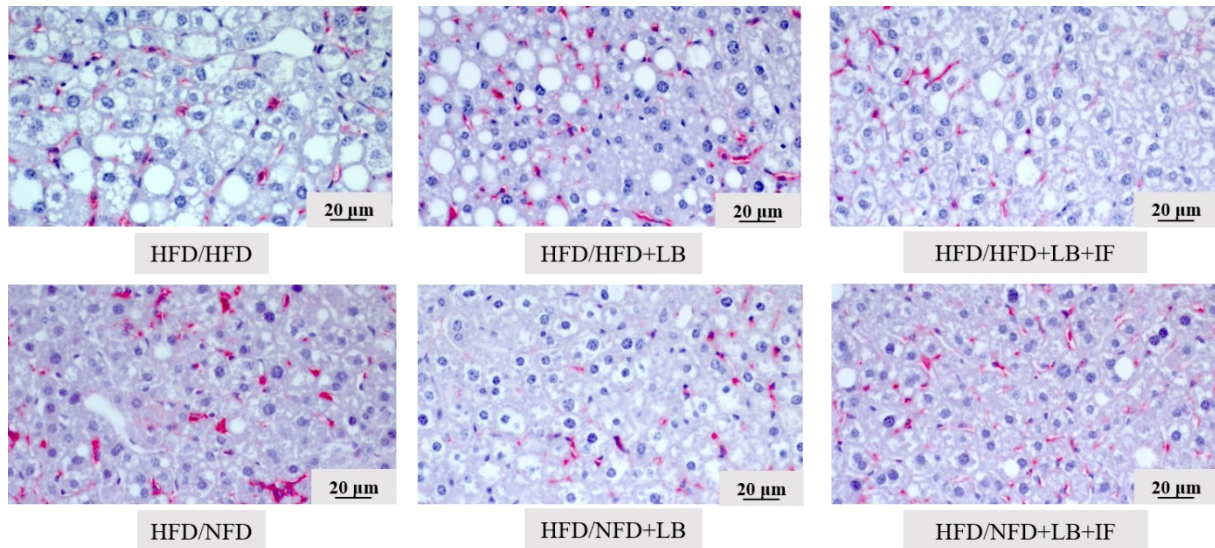
In **Abbildung 19 B** ist der Anteil aktivierter Makrophagen, der anhand der F4/80 Färbung (**Abbildung 18**) quantifiziert wurde, dargestellt. Die Werte unterschieden sich zwischen den

## Ergebnisse

HFD-Gruppen und NFD-Gruppen nicht signifikant und schwankten um einen Wert von ~50 %. Dennoch zeigte sich eine leicht abnehmende Tendenz der NFD gegenüber den HFD-Gruppen.

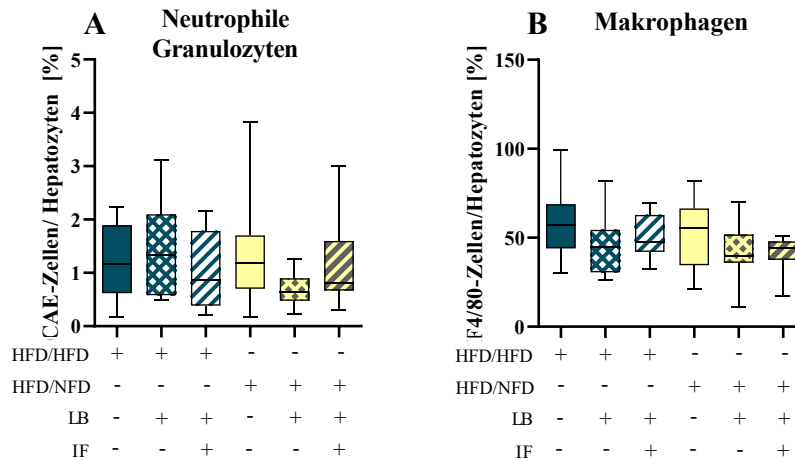


**Abbildung 17: Repräsentative Bilder CAE-Färbung.** 100x Vergrößerung, Skalierung 20µm, HFD=Hochfettdiät, NFD=Niedrigfettdiät, LB=Laufband, IF=Intervallfasten



**Abbildung 18: Repräsentative Bilder F4/80-Färbung.** 100x Vergrößerung, Skalierung 20µm, HFD=Hochfettdiät, NFD=Niedrigfettdiät, LB=Laufband, IF=Intervallfasten

## Ergebnisse



**Abbildung 19: Anteil neutrophiler Granulozyten (CAE) und Makrophagen (F4/80).** CAE (A: HFD/HFD n=12, HFD/HFD+LB n=9, HFD/HFD+LB+IF n=12, HFD/NFD n=13, HFD/NFD+LB n=13, HFD/NFD+LB+IF n=11), F4/80 (B: HFD/HFD n=12, HFD/HFD+LB n=10, HFD/HFD+LB+IF n=12, HFD/NFD n=13, HFD/NFD+LB n=15, HFD/NFD+LB+IF n=11), Signifikanz mit One-way ANOVA gefolgt von Tukey's multiple comparison test (A), Kruskal-Wallis gefolgt von Dunn's multiple comparisons test (B), HFD=Hochfettdiät, NFD=Niedrigfettdiät, LB=Laufband, IF=Intervallfasten

### 3.4 Systemische metabolische Marker

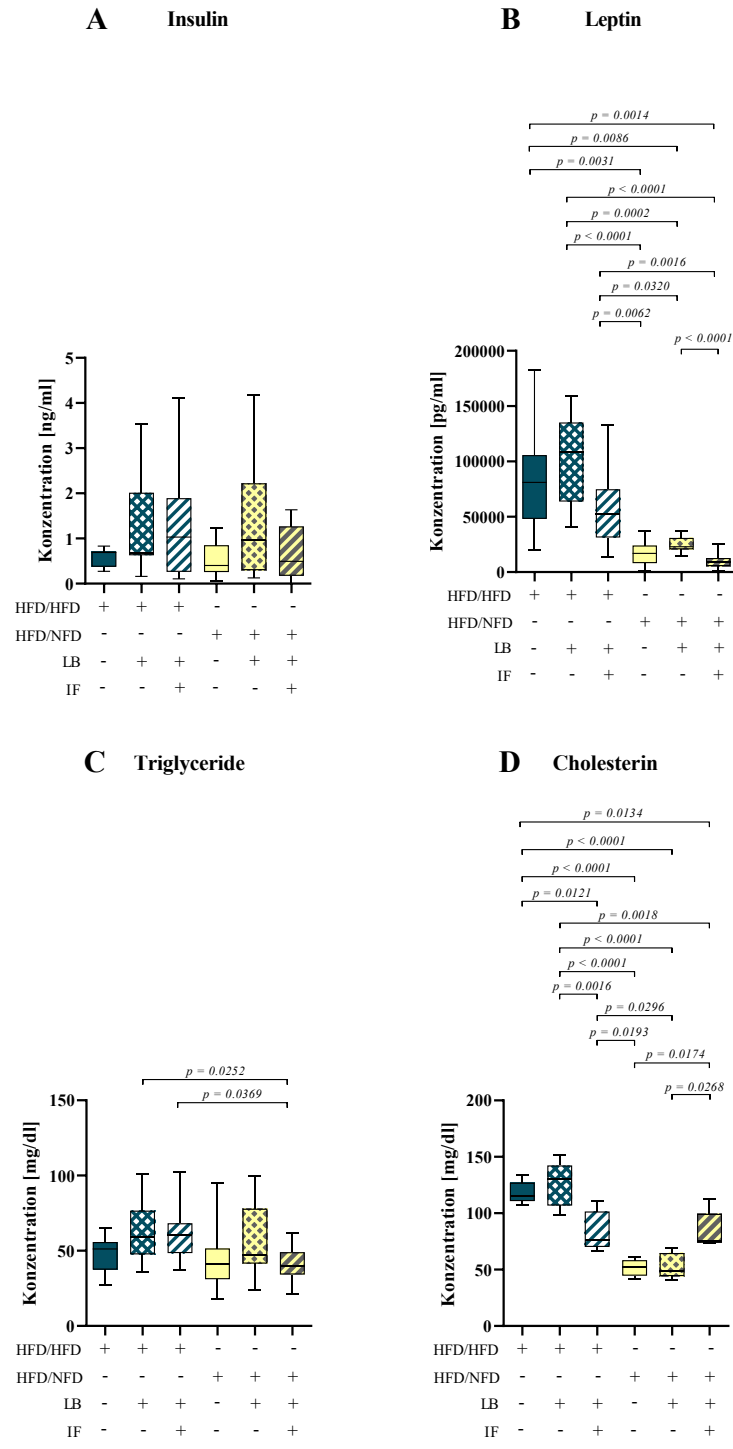
Um Veränderungen der Leber im Kontext des Gesamtmetabolismus betrachten zu können, wurden die Parameter Insulin, Leptin und die TAG- und Cholesterin-Konzentration im Serum bestimmt, da sie in enger Verbindung mit der Pathologie einer Adipositas und NAFLD stehen.

Während sich die Insulinkonzentrationen (**Abbildung 20 A**) zwischen allen Untersuchungsgruppen nicht signifikant unterschieden, zeigte sich für die Leptinkonzentration (**Abbildung 20 B**) eine signifikante Verringerung um das 2 - 8 -fache in den Gruppen mit NFD und der Gruppe HFD/HFD+LB+IF, wobei die niedrigste Leptinkonzentration in der Gruppe HFD/NFD+LB+IF gemessen wurde. Damit einher gingen ebenfalls geringere TAG-Konzentrationen in den NFD-Gruppen, wobei sich eine signifikante Reduktion in der Gruppe HFD/NFD+LB+IF gegenüber den Gruppen HFD/HFD+LB und HFD/HFD+LB+IF zeigte (**Abbildung 20 C**). Eine signifikante Reduktion der Cholesterinkonzentration (**Abbildung 20 D**) im Serum zeigte sich in allen Gruppen mit NFD und der Gruppe HFD/HFD+LB+IF gegenüber den Gruppen HFD/HFD und HFD/HFD+LB. Am niedrigsten war die Cholesterinkonzentration mit ~50 mg/dl in den Gruppen HFD/NFD und HFD/NFD+LB, sodass sich diese Gruppen auch gegenüber den Gruppen HFD/HFD+LB+IF und HFD/NFD+LB+IF signifikant unterschieden.

## Ergebnisse

Sowohl der Diätwechsel als auch die Kombination der Interventionen LB und IF bei bestehender HFD wirkten sich insbesondere senkend auf die Leptin- und Cholesterinkonzentrationen aus. Die Insulin- und TAG-Konzentrationen wurden dagegen nur gering beeinflusst.

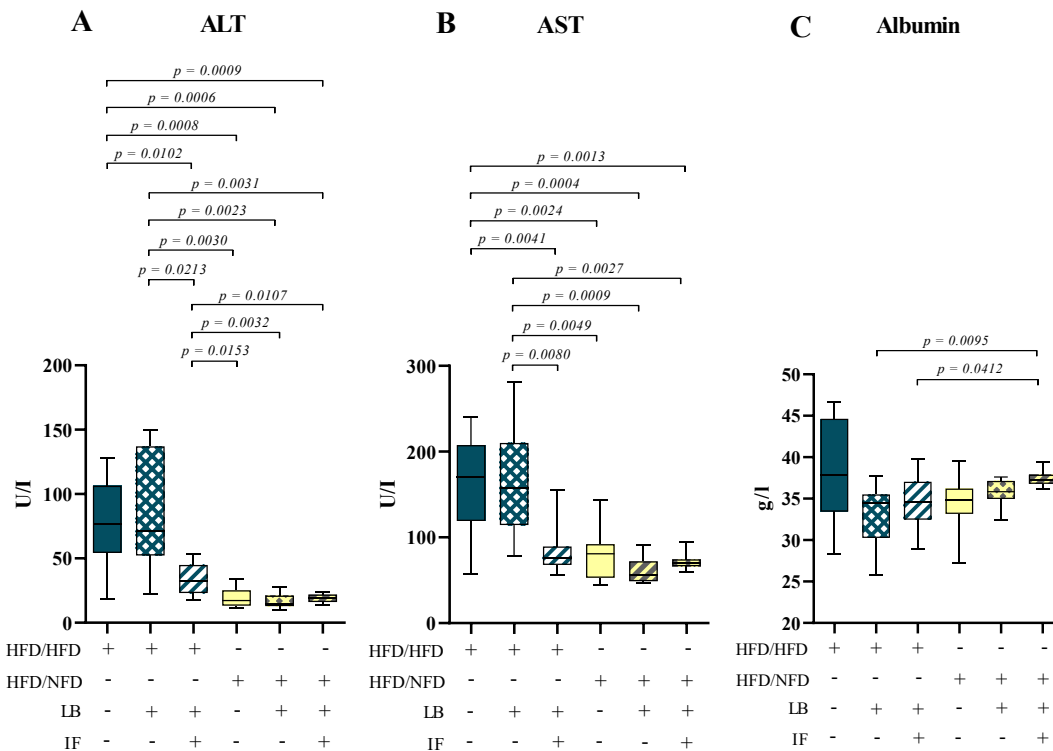
# Ergebnisse



**Abbildung 20: Systemische metabolische Marker.** Insulin (A: HFD/HFD n=8, HFD/HFD+LB n=9, HFD/HFD+LB+IF n=11, HFD/NFD n=13, HFD/NFD+LB n=15, HFD/NFD+LB+IF n=9), Leptin (B: HFD/HFD n=13, HFD/HFD+LB n=13, HFD/HFD+LB+IF n=14, HFD/NFD n=14, HFD/NFD+LB n=15, HFD/NFD+LB+IF n=13), Triglyceride (C: HFD/HFD n=13, HFD/HFD+LB n=13, HFD/HFD+LB+IF n=15, HFD/NFD n=14, HFD/NFD+LB n=15, HFD/NFD+LB+IF n=14), Cholesterin (D: HFD/HFD n=5, HFD/HFD+LB n=5, HFD/HFD+LB+IF n=5, HFD/NFD n=5, HFD/NFD+LB n=5, HFD/NFD+LB+IF n=5), Signifikanz mit Kruskal-Wallis gefolgt von Dunn's hoc Test (A), Brown-Forsythe und Welch ANOVA gefolgt von Tamhane's multiple comparisons test (B: F value (F)=22.68, Degree of Freedom (DF)= 5, One-way ANOVA gefolgt von Tukey's multiple comparisons test (C, D), HFD= Hochfett-diät, NFD=Niedrigfett-diät, LB=Laufband, IF=Intervallfasten

### 3.5 Leberenzyme

Die Leberenzyme AST, ALT und das Eiweiß Albumin sowie das Verhältnis von ALT/AST können im Rahmen von Leberschädigungen durch verschiedene Ursachen Veränderungen in ihrer Serumkonzentration/ Ratio aufweisen. Aus diesem Grund wurde die Konzentration aller drei Enzyme bei den Tieren nach den 12-monatigen Tierexperimenten gemessen.



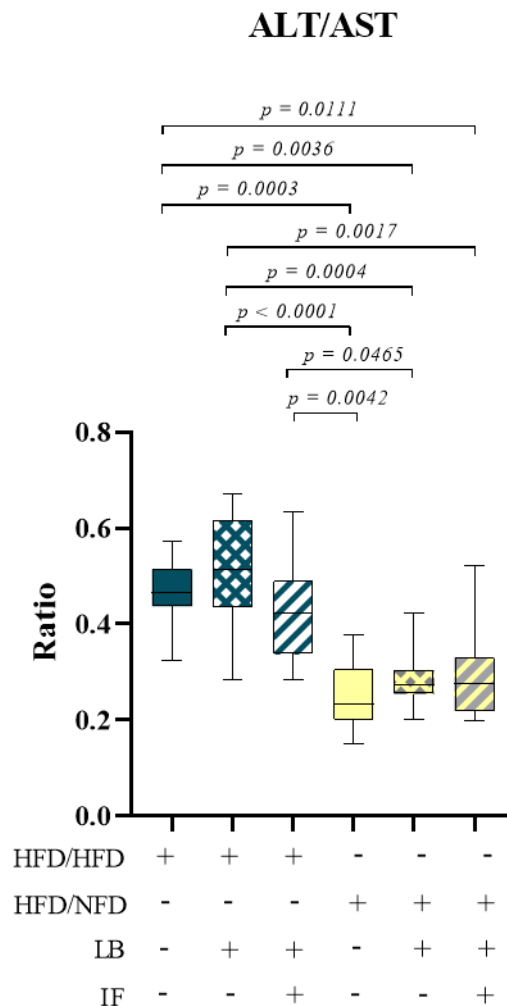
**Abbildung 21: Plasmakonzentration von ALT, AST und Albumin.** ALT (A: HFD/HFD n=12, HFD/HFD+LB n=12, HFD/HFD+LB+IF n=13, HFD/NFD n=13, HFD/NFD+LB n=15, HFD/NFD+LB+IF n=11), AST (B: HFD/HFD n=12, HFD/HFD+LB n=12, HFD/HFD+LB+IF n=13, HFD/NFD n=13, HFD/NFD+LB n=15, HFD/NFD+LB+IF n=11), Albumin (C: HFD/HFD n=12, HFD/HFD+LB n=12, HFD/HFD+LB+IF n=13, HFD/NFD n=13, HFD/NFD+LB n=15, HFD/NFD+LB+IF n=11), Signifikanz mit Kruskal-Wallis gefolgt von Dunn's hoc Test (C), Brown-Forsythe und Welch ANOVA gefolgt von Tamhane's multiple comparisons test (A: F value (F)=22.80, Degree of Freedom (DF)= 5, B: F=20.35, DF=5), HFD= Hochfett diät, NFD=Niedrigfett diät, LB=Laufband, IF=Intervallfasten

Sowohl ALT (**Abbildung 21 A**) als auch AST (**Abbildung 21 B**) zeigten in allen Gruppen mit NFD und der Gruppe HFD/HFD+LB+IF signifikant verringerte Konzentrationen gegenüber den Gruppen HFD/HFD und HFD/HFD+LB. Zusätzlich war die Konzentration von ALT in den Gruppen mit NFD gegenüber der Gruppe HFD/HFD+LB+IF signifikant verringert. Die Albuminkonzentration (**Abbildung 21 C**) unterschied sich dagegen nur zwischen der Gruppe HFD/NFD+LB+IF und HFD/HFD+LB bzw. HFD/HFD+LB+IF signifikant, wobei ausgenommen von der Gruppe HFD/HFD eine ansteigende Konzentration mit Zunahme der Anzahl der Interventionen zu sehen war.

## Ergebnisse

Der ALT/AST-Quotient (**Abbildung 22**) zeigte in allen Gruppen mit Diätwechsel gegenüber den Gruppen mit HFD niedrigere Werte, wobei diese gegenüber den Gruppen HFD/HFD und HFD/HFD+LB verringert waren. Zwischen den Gruppen HFD/HFD und HFD/HFD+LB und allen Diätgruppen sowie zwischen der Gruppe HFD/HFD+LB+IF und den Gruppen HFD/NFD und HFD/NFD+LB war die Ratio signifikant verringert.

Eine Wiederherstellung der Leberfunktion durch den Diätwechsel und die Kombination aus Bewegung und Fasten zeigte sich also im Wesentlichen durch eine Senkung der Konzentration der Leberenzyme AST und ALT, des Quotienten ALT/AST und nur geringfügig in einer Erhöhung der Konzentration von Albumin.



**Abbildung 22: ALT/AST-Quotient:** HFD/HFD n=12, HFD/HFD+LB n=12, HFD/HFD+LB+IF n=13, HFD/NFD n=12, HFD/NFD+LB n=15, HFD/NFD+LB+IF n=11), Signifikanz mit Kruskal-Wallis gefolgt von Dunn's hoc Test, HFD=Hochfett diät, NFD=Niedrigfett diät, LB=Laufband, IF=Intervallfasten

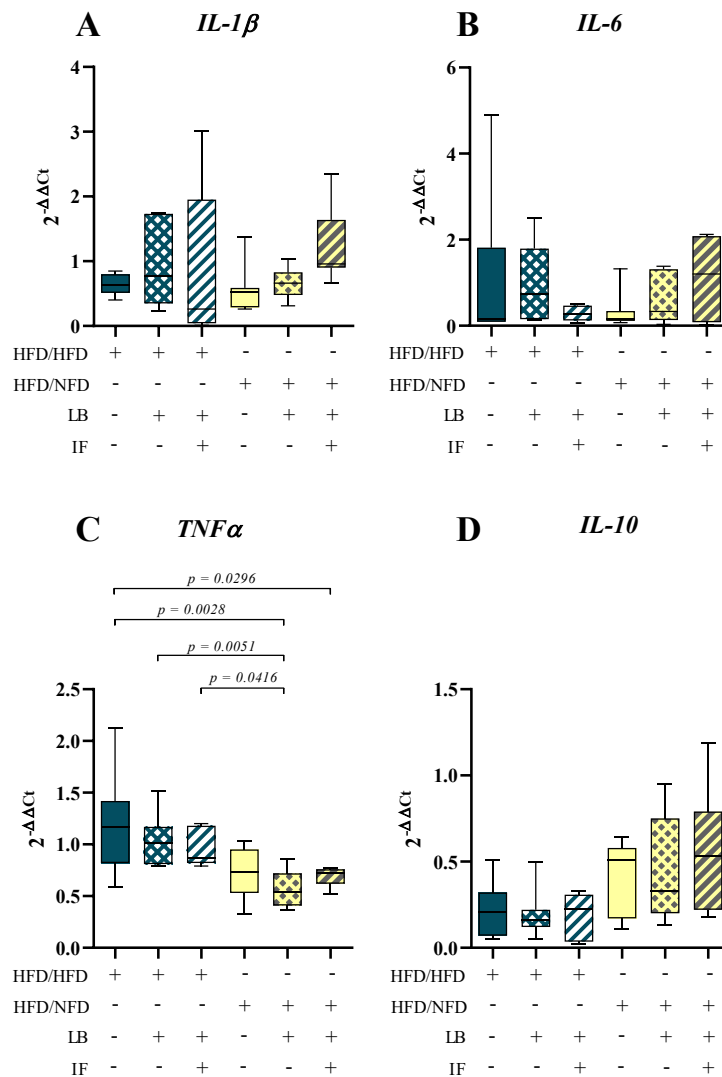
### 3.6 Entzündungsmarker

Um die NAFLD im Kontext einer LGI zu untersuchen, wurde neben der histologischen Untersuchung auf Entzündungszellen im Lebergewebe mittels PCR die mRNA-Expression verschiedener pro- und anti-inflammatorischer IL bestimmt.

Die *IL-1 $\beta$* - (**Abbildung 23 A**) und *IL-6*- (**Abbildung 23 B**) Expression unterschied sich weder zwischen den HFD- und NFD-Gruppen noch innerhalb der Futtergruppen signifikant voneinander. Die *TNF $\alpha$* - (**Abbildung 23 C**) Expression dagegen war in den Gruppen mit NFD deutlich geringer als in den HFD-Gruppen, wobei sowohl die Gruppe HFD/NFD+LB gegenüber allen HFD-Gruppen als auch die Gruppe HFD/NFD+LB+IF gegenüber der Gruppe HFD/HFD eine signifikant verringerte *TNF $\alpha$* -Expression aufwiesen. Die *IL-10*- (**Abbildung 23 D**) Expression war in den Gruppen mit NFD tendenziell höher, wobei die höchste *IL-10*-Expression in der Gruppe mit Futterwechsel, LB und IF und die niedrigste in der HFD-Gruppe mit LB gemessen wurde.

Die Interventionen führten zu unterschiedlich starken Veränderungen der IL-Expressionen. Während die pro-inflammatorischen Zytokine *IL-1 $\beta$*  und *IL-6* keine relevante Veränderung ihrer Expression in der Leber aufwiesen, zeigte sich eine deutliche Reduktion der Expression des pro-inflammatorischen *TNF $\alpha$* , was im Zusammenspiel mit dem tendenziellen Expressionsanstieg des anti-inflammatorischen *IL-10* Anzeichen für eine Reduktion von Entzündungsprozessen in der Leber durch die Interventionen darstellt.

## Ergebnisse



**Abbildung 23: mRNA-Expression pro- und anti-inflammatorischer Zytokine.** *IL-1 $\beta$*  (A: HFD/HFD n=6, HFD/HFD+LB n=7, HFD/HFD+LB+IF n=7, HFD/NFD n=7, HFD/NFD+LB n=7, HFD/NFD+LB+IF n=7), *IL-6* (B: HFD/HFD n=6, HFD/HFD+LB n=6, HFD/HFD+LB+IF n=7, HFD/NFD n=7, HFD/NFD+LB n=7, HFD/NFD+LB+IF n=7), *TNF $\alpha$*  (C: HFD/HFD n=7, HFD/HFD+LB n=7, HFD/HFD+LB+IF n=7, HFD/NFD n=7, HFD/NFD+LB n=7, HFD/NFD+LB+IF n=7), *IL-10* (D: HFD/HFD n=7, HFD/HFD+LB n=7, HFD/HFD+LB+IF n=7, HFD/NFD n=7, HFD/NFD+LB n=6, HFD/NFD+LB+IF n=7), Signifikanz mit Kruskal-Wallis gefolgt von Dunn's post hoc test (A, B), One-way ANOVA gefolgt von Tukey's multiple comparisons test (C, D) HFD=Hochfett-diät, NFD=Niedrigfett-diät, LB=Laufband, IF=Intervallfasten

### 3.7 Fettstoffwechsel

Der Fettstoffwechsel wird neben der Aufnahme von Fetten durch die Nahrung auch wesentlich durch den Auf- und Abbau von Fetten beeinflusst. Die lipogenetischen und lipolytischen Prozesse wirken in einem komplexen Zusammenspiel und werden durch verschiedene Faktoren reguliert. Ob die signifikante Reduktion des Fettgewebes bei den Mäusen in den Gruppen mit Interventionen aufgrund der Senkung lipogenetischer, der Steigerung lipolytischer oder einem Zusammenspiel der Prozesse bewirkt wurde, wurde daher durch Expressionsbestimmung von

Enzymen und Regulationsfaktoren der Stoffwechselwege nach Abschluss der Tierexperimente untersucht.

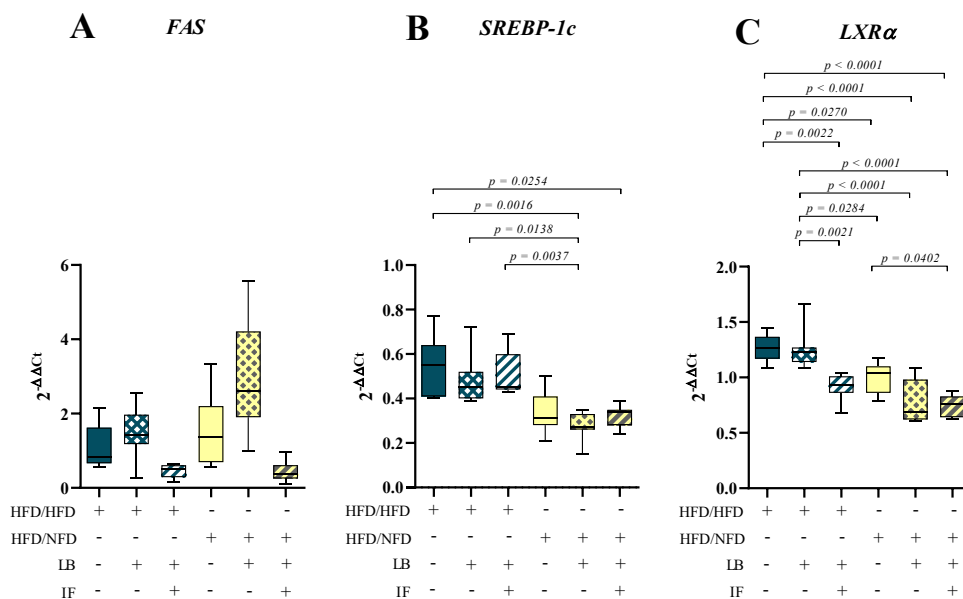
### 3.7.1 Lipogenese

Der Hauptmechanismus der Lipogenese ist die Fettsäuresynthese, die der Speicherung von Energie in Form von Fett in Organen dient. Die FAS wird für die Verlängerung der Fettsäureketten benötigt und durch verschiedene Faktoren reguliert. Daher wurde sowohl die Expression der *FAS* als auch ihrer regulatorischen Faktoren *SREBP-1c* und *LXR $\alpha$*  bestimmt.

Die Expression der *FAS* (**Abbildung 24 A**) war in den Gruppen mit NFD tendenziell höher als in den Gruppen mit HFD. Am geringsten war die *FAS*-Expression in den Gruppen HFD/HFD+LB+IF und HFD/NFD+LB+IF. Der regulatorische Faktor *SREBP-1c* (**Abbildung 24 B**) war in den Gruppen mit NFD deutlich niedriger exprimiert als in den Gruppen mit HFD, wobei sich die Gruppe HFD/NFD+LB gegenüber allen Gruppen mit HFD und die Gruppe HFD/NFD+LB+IF gegenüber der Gruppe HFD/HFD signifikant unterschieden. Ähnlich verhielt sich auch die Expression von *LXR $\alpha$*  (**Abbildung 24 C**), wobei zusätzlich zu den Gruppen mit NFD auch in der Gruppe HFD/HFD+LB+IF eine signifikante Reduktion der Expression gegenüber den Gruppen HFD/HFD und HFD/HFD+LB vorlag. Die niedrigste Expression fand sich in der Gruppe HFD/NFD+LB+IF, die sich daher auch gegenüber der Gruppe HFD/NFD signifikant unterschied.

Zwar konnte infolge des Diätwechsels und der Kombination von LB und IF bei weiter bestehender HFD keine verringerte Expression der *FAS*, aber eine signifikant verringerte Expression ihrer Regulationsfaktoren *SREBP-1c* und *LXR $\alpha$*  beobachtet werden.

## Ergebnisse

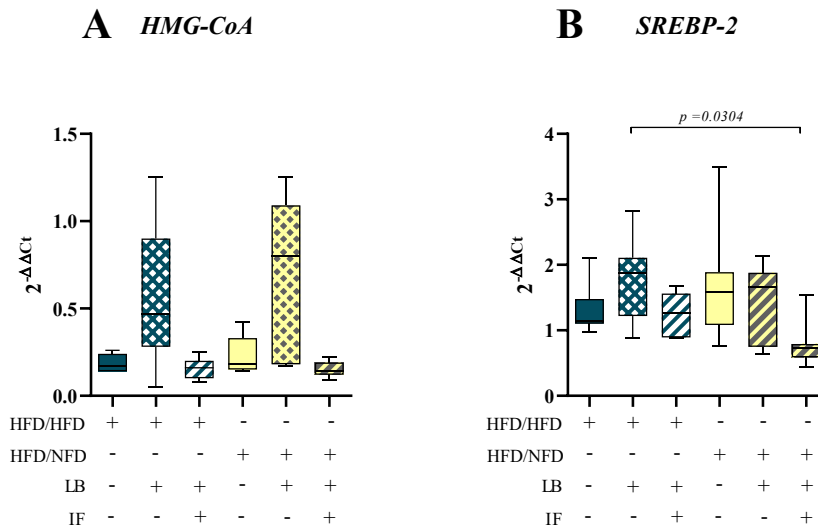


**Abbildung 24: mRNA-Expression von lipogenetischen Faktoren.** *FAS* (A: HFD/HFD n=7, HFD/HFD+LB n=7, HFD/HFD+LB+IF n=, HFD/NFD n=7, HFD/NFD+LB n=7, HFD/NFD+LB+IF n=7), *SREBP-1c* (B: HFD/HFD n=7, HFD/HFD+LB n=7, HFD/HFD+LB+IF n=7, HFD/NFD n=7, HFD/NFD+LB n=7, HFD/NFD+LB+IF n=7), *LXRα* (C: HFD/HFD n=6, HFD/HFD+LB n=7, HFD/HFD+LB+IF n=6, HFD/NFD n=7, HFD/NFD+LB n=7, HFD/NFD+LB+IF n=7), Signifikanz mit Brown-Forsythe und Welch-ANOVA gefolgt von Tamhanes's multiple comparisons test, (A: F value (F)=8.044, Degree of Freedom (DF)= 5, DF=5), Kruskal-Wallis gefolgt von Dunn's multiple comparisons test (B), One-way ANOVA gefolgt von Tukey's multiple comparisons test (C), HFD=Hochfettdiät, NFD=Niedrigfettdiät, LB=Laufband, IF=Intervallfasten

### 3.7.2 Cholesterinsynthese

Neben der Synthese von Fettsäuren spielt auch die endogene Synthese von Cholesterin eine wichtige Rolle im Fettstoffwechsel. HMG-CoA ist ein wichtiges Zwischenprodukt der Cholesterinsynthese und Ketonkörper und SREBP-2 ein wichtiger Regulationsfaktor der Cholesterinsynthese.

Die *HMG-CoA*-Expression (**Abbildung 25 A**) war in den beiden Gruppen mit LB höher, unterschied sich aber gegenüber den anderen Gruppen nicht signifikant. Damit einhergehend, zeigte auch der Regulationsfaktor *SREBP-2* (**Abbildung 25 B**) in diesen beiden Gruppen die höchste Expression. Insgesamt unterschied sich die Expression zwischen den Gruppen aber ebenfalls nur gering, lediglich die Gruppe HFD/NFD+LB+IF wies eine signifikante Expressionsverringering gegenüber der Gruppe HFD/HFD+LB auf.



**Abbildung 25: mRNA-Expression von Genen der Cholesterinsynthese.** *HMG-CoA* (A: HFD/HFD n=7, HFD/HFD+LB n=7, HFD/HFD+LB+IF n=7, HFD/NFD n=7, HFD/NFD+LB n=7, HFD/NFD+LB+IF n=7), *SREBP-2* (B: HFD/HFD n=7, HFD/HFD+LB n=7, HFD/HFD+LB+IF n=7, HFD/NFD n=7, HFD/NFD+LB n=7, HFD/NFD+LB+IF n=7). Signifikanz mit Brown-Forsythe und Welch-ANOVA gefolgt von Tamhanes's multiple comparisons test, (A: F value (F)=6.495, Degree of Freedom (DF)= 5 oder One-way ANOVA gefolgt von Tukey's multiple comparisons test (B), HFD=Hochfettdiät, NFD=Niedrigfettdiät, LB=Laufband, IF=Intervallfasten

Während die *HMG-CoA*-Expression durch die Interventionen nur geringfügig beeinflusst wurde, zeigte sich dennoch ein senkender Effekt auf die Expression des Regulationsfaktors *SREBP-2* in der Gruppe mit allen Interventionen.

### 3.7.3 $\beta$ -Oxidation

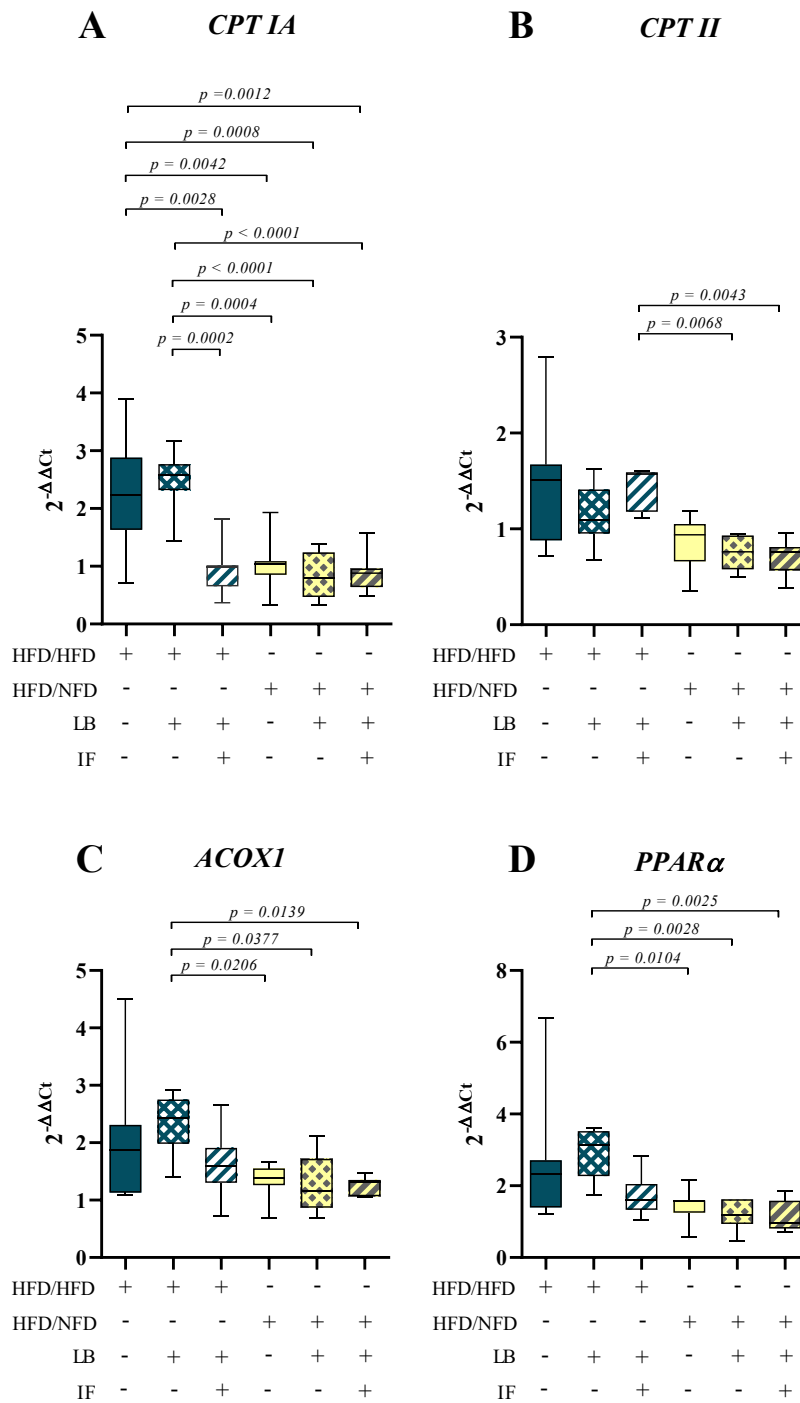
Die  $\beta$ -Oxidation gehört zu den lipolytischen Stoffwechselwegen und dient dem Abbau von Fettsäuren in Peroxisomen oder der Gewinnung von Energie in Mitochondrien. Neben der Expression der Enzyme *CPT IA* und *CPT II*, die die Aktivität der mitochondrialen  $\beta$ -Oxidation maßgeblich steuern, wurde auch die Expression von *ACOX 1* und *PPAR $\alpha$*  bestimmt, die regulatorisch auf die mitochondriale und peroxisomale  $\beta$ -Oxidation wirken.

Die Expression von *CPT Ia* (**Abbildung 26 A**) war in allen Gruppen mit NFD gegenüber den Gruppen HFD/HFD und HFD/HFD+LB um etwa 50 % signifikant verringert, wobei die Expression in der Gruppe HFD/HFD+LB am höchsten und in der Gruppe HFD/NFD+LB am niedrigsten war. Auch die Expression von *CPT II* (**Abbildung 26 B**) war in den Gruppen mit NFD prinzipiell geringer exprimiert als in den Gruppen mit HFD. Die Gruppen HFD/NFD+LB und HFD/NFD+LB+IF zeigten gegenüber der Gruppe HFD/HFD+LB+IF zudem eine

## Ergebnisse

statistisch signifikant verringerte *CPT II*-Expression. Die Expressionen von *ACOX 1* (**Abbildung 26 C**) und von *PPAR $\alpha$*  (**Abbildung 26 D**) waren in den NFD-Gruppen gegenüber den HFD-Gruppen erniedrigt. Alle NFD-Gruppen zeigten dabei auch gegenüber der Gruppe HFD/HFD+LB signifikant verringerte Expressionen.

Vor allem der Diätwechsel zeigte einen stark senkenden Effekt auf die *CPT IA*-Expression, aber auch auf die *CPT II*-, *ACOX I*- und *PPAR $\alpha$* -Expression. Zusätzlich zeigte sich eine signifikante Verringerung der *CPT IA*-Expression in der Gruppe mit LB und IF bei bestehender HFD. Die Interventionen wirkten sich also signifikant senkend auf die Expression der Enzyme der  $\beta$ -Oxidation und ihrer regulatorischen Faktoren aus.

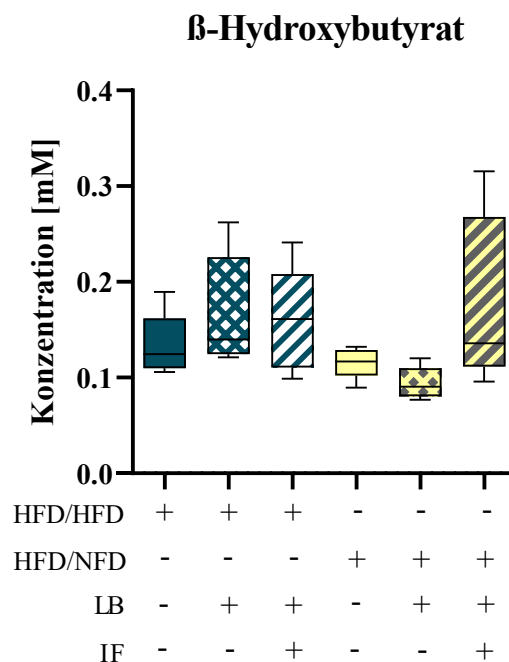


**Abbildung 26: mRNA-Expression von Proteinen und Enzymen der  $\beta$ -Oxidation.** *CPT1a* (A: HFD/HFD n=7, HFD/HFD+LB n=7, HFD/HFD+LB+IF n=7, HFD/NFD n=7, HFD/NFD+LB n=7, HFD/HFD+LB+IF n=7), *CPT2* (B: HFD/HFD n=7, HFD/HFD+LB n=7, HFD/HFD+LB+IF n=7, HFD/NFD n=7, HFD/NFD+LB n=7, HFD/HFD+LB+IF n=7), *PPAR $\alpha$*  (C: HFD/HFD n=7, HFD/HFD+LB n=7, HFD/HFD+LB+IF n=7, HFD/NFD n=7, HFD/NFD+LB n=7, HFD/HFD+LB+IF n=7), *ACOX1* (D: HFD/HFD n=7, HFD/HFD+LB n=7, HFD/HFD+LB+IF n=7, HFD/NFD n=7, HFD/NFD+LB n=7, HFD/NFD+LB n=7, HFD/HFD+LB+IF n=7), Signifikanz mit One-way ANOVA gefolgt von Tukey's multiple comparisons test (A), Kruskal-Wallis gefolgt von Dunn's post hoc test (B), Brown-Forsythe und Welch ANOVA gefolgt von Tamhane's multiple comparisons test (C: F value (F)=4.049, Degree of Freedom (DF)= 5, D: F=5.142, DF=5), HFD=Hochfettdiät, NFD=Niedrigfettdiät, LB=Laufband, IF=time-restricted feeding

### 3.7.4 Ketogenese

Primär gewinnt der Körper seine Energie über die Produkte aus dem Citratzyklus. Durch Kohlenhydratmangel, beispielsweise bei Hungerzuständen, kann es zur Blockade des Citratzyklus kommen, sodass Acetyl-CoA und Aminosäuren als Substrate in die Ketogenese der Mitochondrien in den Hepatozyten eingehen. Dabei entstehen Ketonkörper, darunter das  $\beta$ -Hydroxybutyrat, die wiederum als alternative Energiequelle dienen. Um mögliche Veränderungen der Ketogenese, vor allem durch den Diätwechsel, zu erkennen, wurde die Konzentration des Ketonkörpers  $\beta$ -Hydroxybutyrat nach Abschluss der Experimente gemessen.

Obwohl die Konzentration von  $\beta$ -Hydroxybutyrat (**Abbildung 27**) in den Gruppen mit NFD tendenziell verringerte Werte aufwies, unterschieden sich diese insgesamt nur geringfügig von den Gruppen mit HFD, was dafür spricht, dass der Ketonkörperstoffwechsel bei den Tieren durch die Interventionen kaum beeinflusst wurde und genügend Energie für die Tiere zur Verfügung stand.



**Abbildung 27:  $\beta$ -Hydroxybutyrat-Konzentration.** (A: HFD/HFD n=5, HFD/HFD+LB n=5, HFD/HFD+LB+IF n=5, HFD/NFD n=5, HFD/NFD+LB n=5, HFD/HFD+LB+IF n=5), Signifikanz mit Brown-Forsythe und Welch ANOVA gefolgt von Tamhane's multiple comparisons test (C: F value (F)=2.010, Degree of Freedom (DF)= 5), HFD=Hochfett-diät, NFD=Niedrigfett-diät, LB=Laufband, IF=time-restricted feeding

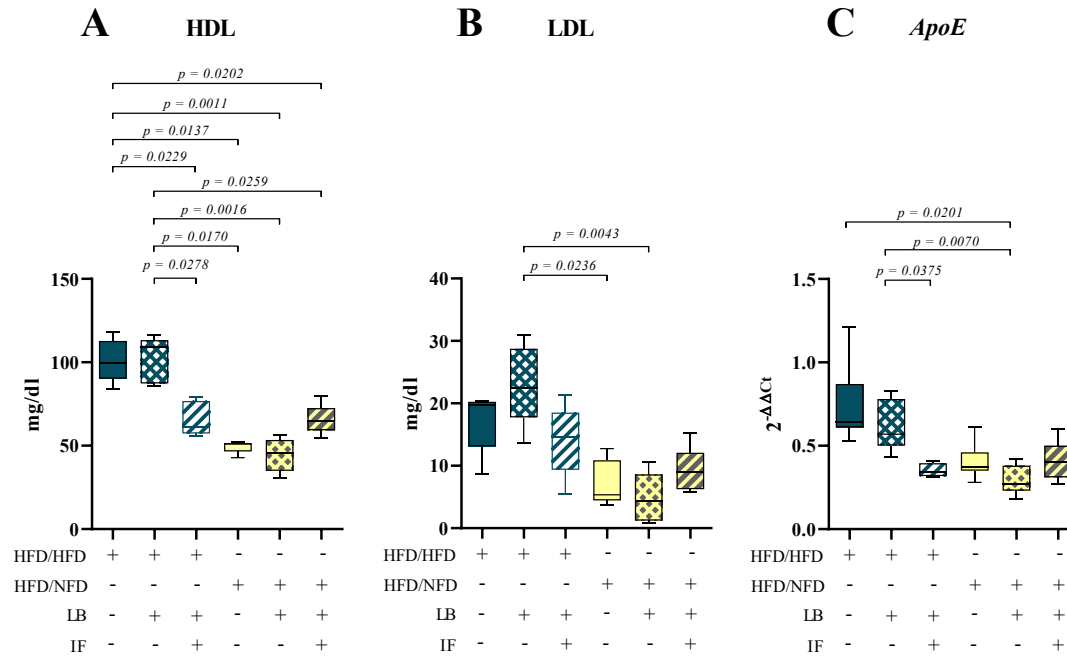
### 3.7.5 Lipoproteine

Der Transport von Fetten in Form von Fettsäuren, TAGs oder Cholesterin erfolgt im Körper durch die Lipoproteine, zu denen das HDL und LDL gehören. Zusätzlich werden Apolipoproteine, darunter ApoE, zur Aufnahme der Lipoproteinbestandteile in die Leber benötigt. Der Transport und die Aufnahme können neben der Synthese oder dem Abbau also maßgeblich den Fettgehalt in der Leber beeinflussen. Ausgehend von der Vermutung, dass durch die veränderten Fettkonzentrationen in Fettgewebe und Leber infolge der Interventionen auch der Transport von Fetten beeinflusst sein könnte, wurde die Konzentration bzw. Expression der aufgeführten Parameter bestimmt.

Die im Plasma gemessene HDL-Konzentration (**Abbildung 28 A**) zeigte sich in allen Gruppen mit NFD und der Gruppe HFD/HFD+LB+IF gegenüber den Gruppen HFD/HFD und HFD/HFD+LB signifikant verringert. Ähnlich reduzierte sich auch die LDL-Konzentration (**Abbildung 28 B**), wobei die Unterschiede hier lediglich zwischen den Gruppen HFD/NFD und HFD/NFD+LB gegenüber der Gruppe HFD/HFD+LB statistisch signifikant waren. Die Expression von *ApoE* (**Abbildung 28 C**) war in den NFD-Gruppen und der Gruppe HFD/HFD+LB+IF gegenüber den Gruppen HFD/HFD und HFD/HFD+LB verringert. Die Expression in der Gruppe HFD/HFD+LB+IF war dabei gegenüber der Gruppe HFD/HFD+LB und die Expression in der Gruppe HFD/NFD+LB gegenüber den Gruppen HFD/HFD und HFD/HFD+LB signifikant verringert.

Die reduzierten Plasmakonzentrationen von HDL und LDL und die reduzierte Expression von *ApoE* zeigen, dass durch die Interventionen nicht nur die Fettansammlung, sondern auch der Transport der Fette reduziert wurde.

## Ergebnisse



**Abbildung 28: Plasmakonzentration von HDL und LDL und mRNA-Expression von ApoE.** HDL (A: HFD/HFD n=5, HFD/HFD+LB n=5, HFD/HFD+LB+IF n=5, HFD/NFD n=4, HFD/NFD+LB n=5, HFD/NFD+LB+IF n=5), LDL (B: HFD/HFD n=5, HFD/HFD+LB n=5, HFD/HFD+LB+IF n=5, HFD/NFD n=5, HFD/NFD+LB n=5, HFD/NFD+LB+IF n=5), ApoE (C: HFD/HFD n=7, HFD/HFD+LB n=7, HFD/HFD+LB+IF n=6, HFD/NFD n=7, HFD/NFD+LB n=7, HFD/NFD+LB+IF n=7), Signifikanz mit Brown-Forsythe und Welch-ANOVA gefolgt von Tamhanes' s multiple comparisons test (A: F value (F)=27.55, Degree of Freedom (DF)= 5, C: F=8.142, DF= 5) oder One-way ANOVA gefolgt von Tukey' s multiple comparisons test (B), HFD=Hochfett-diät, NFD=Niedrigfett-diät, LB=Laufband, IF=Intervallfasten

### 3.8 FGF21

FGF21 spielt ähnlich wie Leptin und Insulin eine wichtige Rolle im Stoffwechsel, welche durch Adipositas gestört wird und so zu einer FGF21-Resistenz [127] führt. Neben der Frage inwieweit der FGF21-Metabolismus unter Adipositas [122–124] verändert sein könnte, stand auch die Frage nach einer möglichen Regeneration einer FGF21-Resistenz im Mittelpunkt. Aus diesem Grund wurden neben der FGF21-Plasmakonzentration auch die Expression von FGF21 in der Leber sowie dessen phosphoryliertem Rezeptor FGFR1c und Corezeptor  $\beta$ -klotho in der Leber bestimmt.

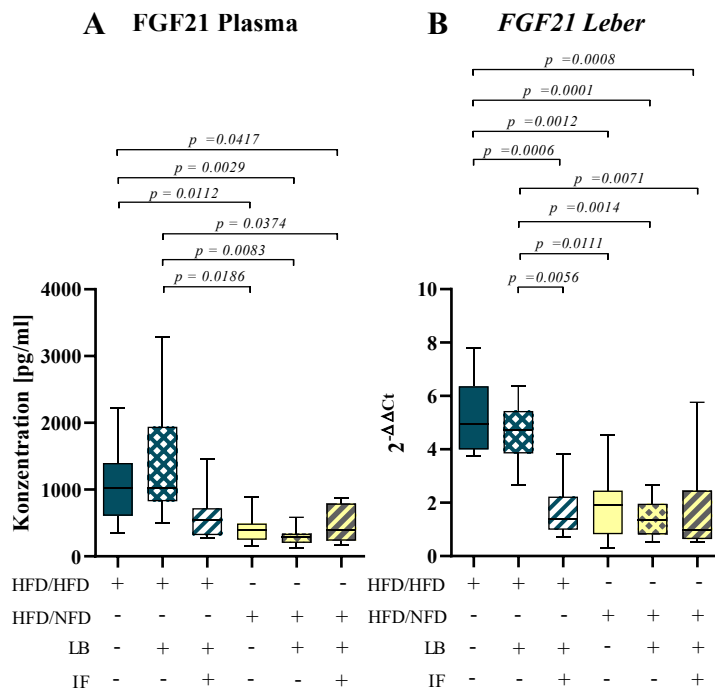
Die FGF21-Plasmakonzentration war in den NFD-Gruppen gegenüber den HFD/HFD- und HFD/HFD+LB-Gruppen statistisch signifikant verringert (**Abbildung 29 A**). Auch in der Gruppe HFD/HFD+LB+IF zeigte sich eine starke Reduktion der FGF21-Plasmakonzentration durch die Interventionen, aber diese war nicht statistisch signifikant. Ähnlich verhielt es sich mit der mRNA-Expression von *FGF21* in der Leber (**Abbildung 29 B**). Hier führten die

## Ergebnisse

Interventionen jedoch sowohl in allen Gruppen mit NFD als auch der Gruppe HFD/HFD+LB+IF zu einer signifikanten Reduktion der mRNA-Expression.

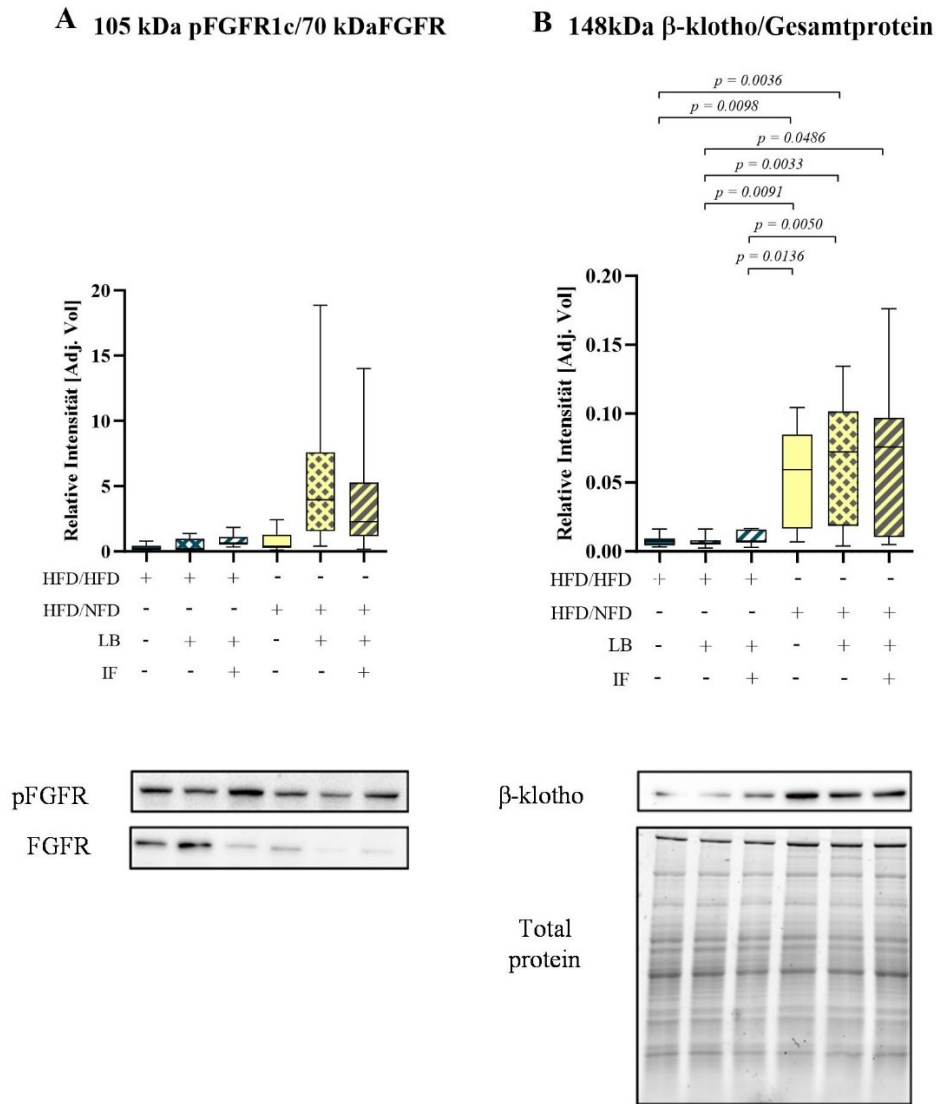
Die Phosphorylierung des Rezeptors FGFR1c (**Abbildung 30 A**) war in den Gruppen HFD/NFD+LB+IF und HFD/NFD+LB+IF gegenüber allen anderen Gruppen deutlich erhöht. Auch der Corezeptor  $\beta$ -klotho (**Abbildung 30 B**) war in allen NFD-Gruppen gegenüber den HFD-Gruppen signifikant erhöht exprimiert, was dafür spricht, dass durch die Interventionen nicht nur das Hormon FGF21 sondern auch die zur Wirkung notwendigen (Co)rezeptoren beeinflusst wurden.

Insgesamt zeigten sowohl der Diätwechsel als auch die Kombination von LB und IF bei bestehender HFD einen starken Einfluss sowohl auf die FGF21-Plasmakonzentration als auch auf die Expression von *FGF21* in der Leber und dessen Rezeptoren.



**Abbildung 29: Plasmakonzentration von FGF21 und mRNA-Expression von *FGF21* in der Leber.** (A: HFD/HFD n=13, HFD/HFD+LB n=13, HFD/HFD+LB+IF n=15, HFD/NFD n=12, HFD/NFD+LB n=14, HFD/NFD+LB+IF n=11), *FGF21* Expression Leber (B: HFD/HFD n=6, HFD/HFD+LB n=6, HFD/HFD+LB+IF n=7, HFD/NFD n=7, HFD/NFD+LB n=7, HFD/NFD+LB+IF n=7, Signifikanz mit Brown-Forsythe und Welch ANOVA gefolgt von Tamhane's multiple comparisons test (A: F value (F)=8.142, Degree of Freedom (DF)= 5, B: F=11.65, DF=5 C: F=7.835, DF=5 D: F=10.33, DF=5), HFD=Hochfett diät, NFD=Niedrigfett diät, LB=Laufband, IF=Intervallfasten

## Ergebnisse



**Abbildung 30: Expression der Rezeptoren in der Leber mit repräsentativem Western Blot.** FGFR1c (A: HFD/HFD n=12, HFD/HFD+LB n=10, HFD/HFD+LB+IF n=10, HFD/NFD n=9, HFD/NFD+LB n=11, HFD/NFD+LB+IF n=9),  $\beta$ -klotho Expression (B: HFD/HFD n=12, HFD/HFD+LB n=9, HFD/HFD+LB+IF n=10, HFD/NFD n=12, HFD/NFD+LB n=15, HFD/NFD+LB+IF n=11), Signifikanz mit Brown-Forsythe und Welch ANOVA gefolgt von Tamhane's multiple comparisons test (A: F value (F)=7.835, Degree of Freedom (DF)= 5, B: F=10.33, DF=5), HFD=Hochfettdiät, NFD=Niedrigfettdiät, LB=Laufband, IF=Intervallfasten

### 3.9 Korrelationsanalysen

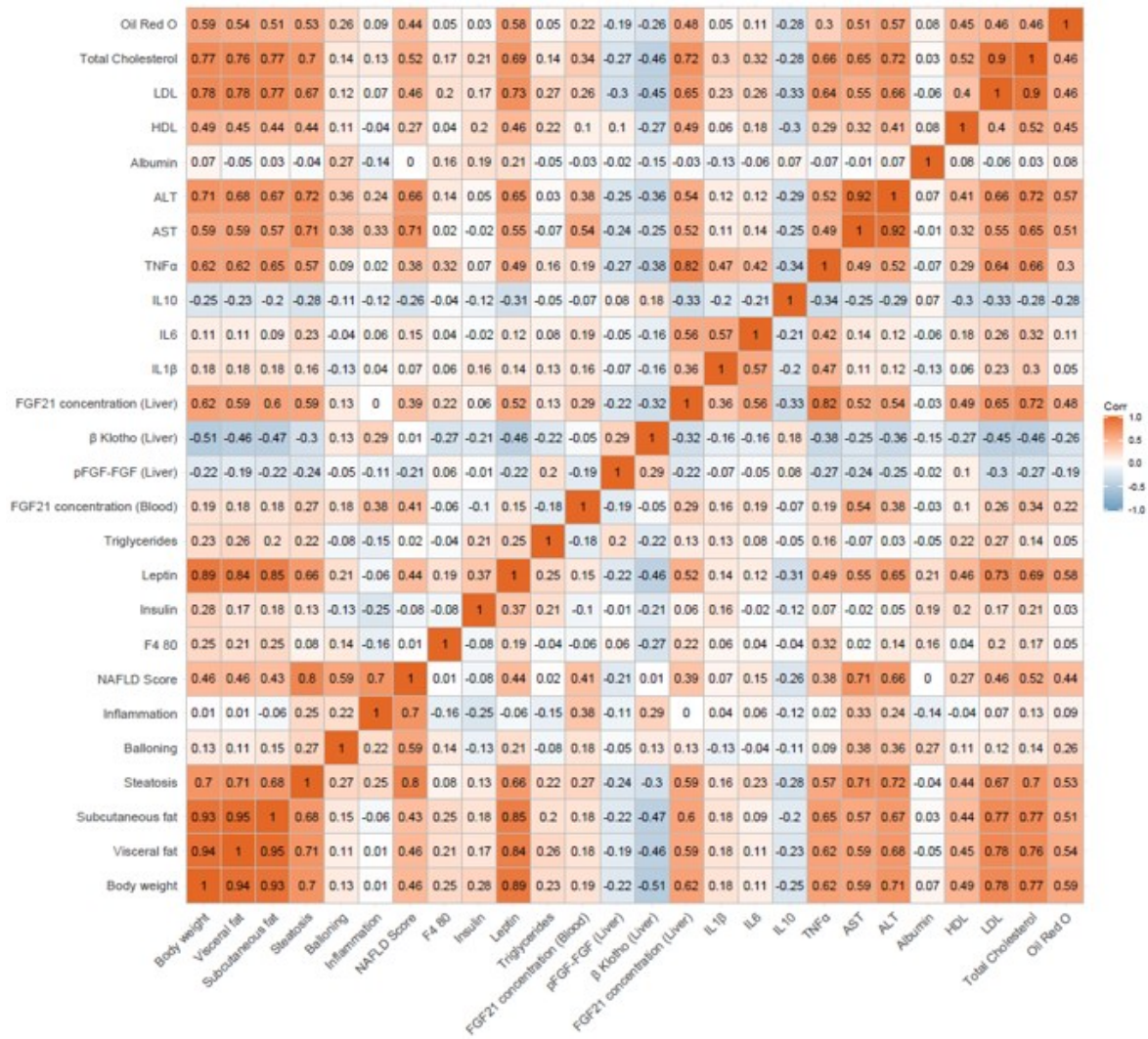
Um herauszufinden, ob innerhalb der Untersuchungsgruppen Korrelationen zwischen den gemessenen Parametern bestehen, wurden jeweils zwei Parameter über den Pearson's Korrelationskoeffizienten miteinander in Beziehung gesetzt und in eine Heat Map eingetragen. Zudem wurde ein mögliches Clustering der sechs Untersuchungsgruppen in einem Dotplot einer Principal-Component-Analyse (PCA) abgebildet.

## Ergebnisse

Bei den Korrelationsanalysen (**Abbildung 31**) zeigte sich eine negative Korrelation von hepatischem  $\beta$ -klotho mit hepatischem  $TNF\alpha$  ( $r=-0,38$ ;  $p\leq 0,05$ ) und hepatischem  $FGF21$  ( $r=-0,32$ ;  $p\leq 0,05$ ). Das hepatische  $FGF21$  wiederum korrelierte stark positiv mit  $TNF\alpha$  ( $r=0,82$ ;  $p\leq 0,05$ ). Das spricht dafür, dass es einhergehend mit der Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine zwar zu einer Steigerung des hepatischen  $FGF21$  kommt, gleichzeitig aber zu einer verringerten Expression des Corezeptors  $\beta$ -klotho.

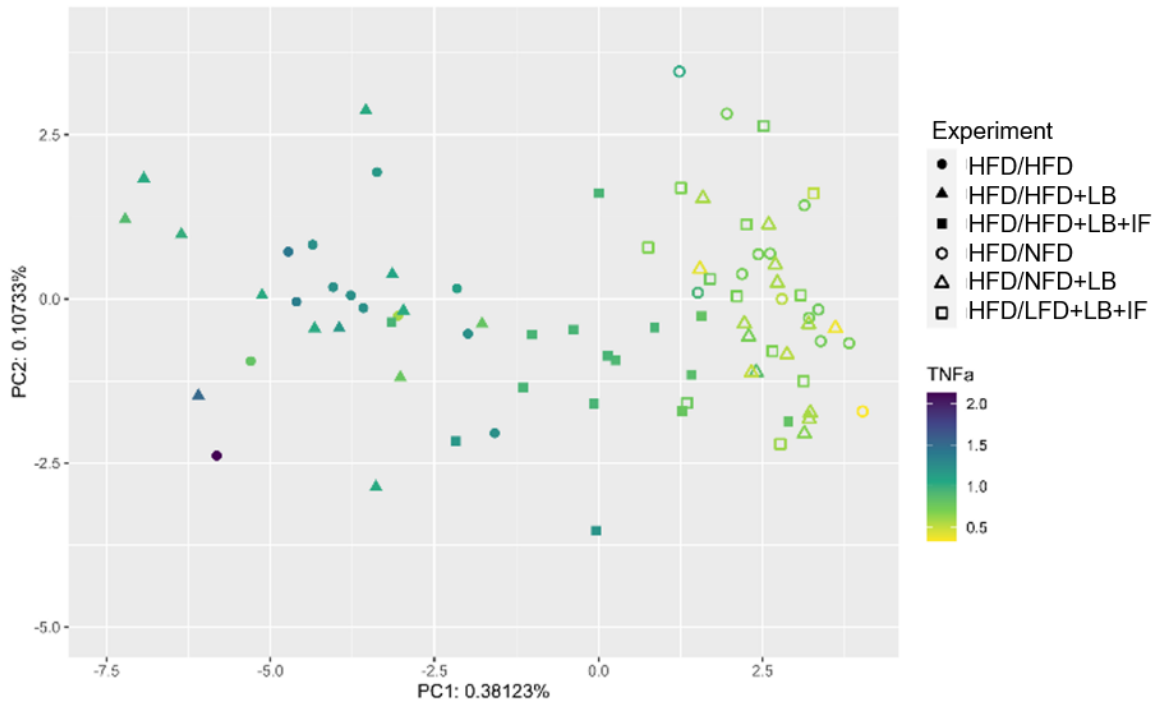
Darauf aufbauend wurde das Verhältnis von  $TNF\alpha$  (**Abbildung 32**),  $FGF21$  (**Abbildung 33**) und  $\beta$ -klotho (**Abbildung 34**) zwischen den Diätgruppen untersucht. Hier zeigte sich ein Clustering der NFD-Gruppen auf der einen und der HFD-Gruppen auf der anderen Seite, mit Ausnahme der HFD/HFD+LB+IF-Gruppe, die eher auf der Seite der NFD-Gruppen clusterte. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass sich  $TNF\alpha$ ,  $FGF21$  und  $\beta$ -klotho vor allem innerhalb der Diätgruppen sehr ähnlich zueinander verhalten.

# Ergebnisse

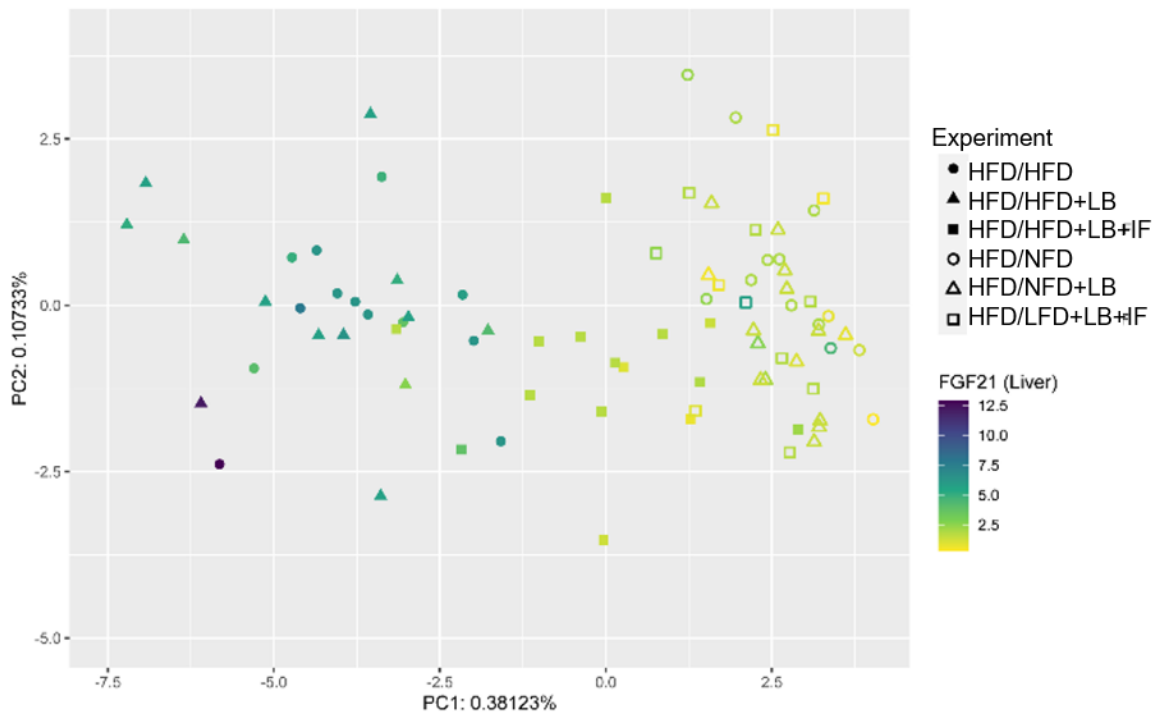


**Abbildung 31: Heat-Map-Darstellung der Pearson's Korrelation.** Korrelationsdarstellung zwischen n=26 Parametern. Stark positive Korrelation (1,00-0,70) ist rot, stark negative Korrelation (-0,70- -1,00) blau und moderate Farben durch leichte Farben (>0,40 oder <-0,40). Fehlende Werte innerhalb der Gruppen wurden mit Durchschnittswerten aufgefüllt.

## Ergebnisse

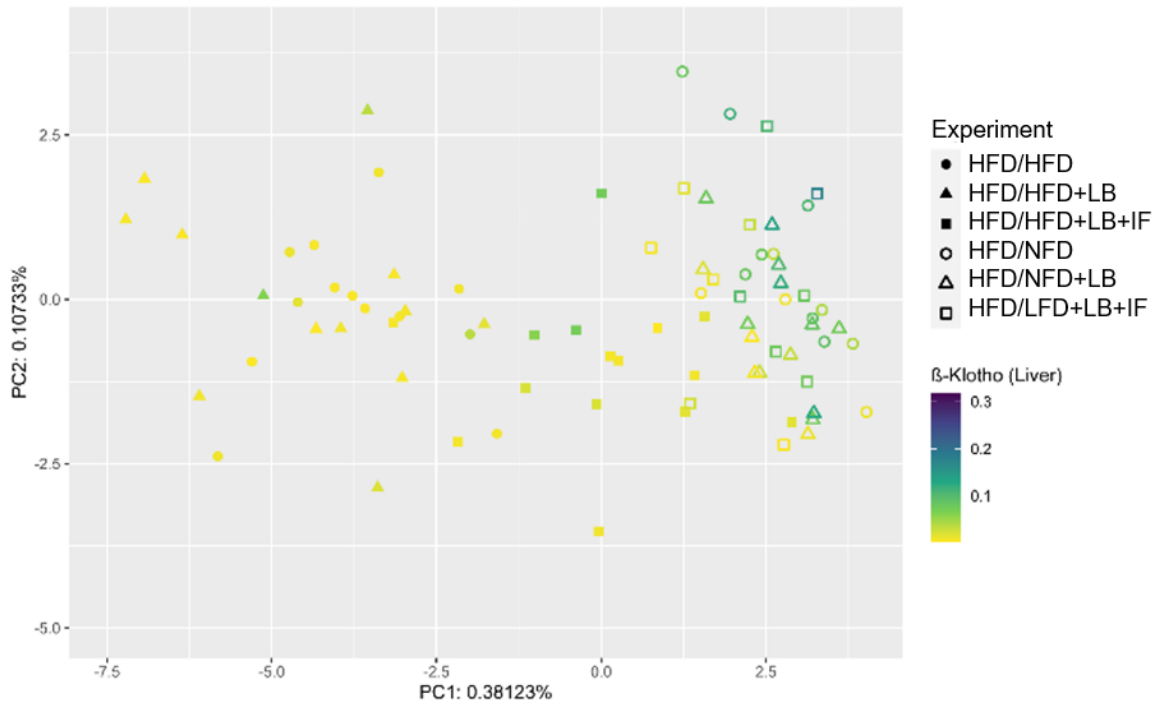


**Abbildung 32: Darstellung des Clusterings für *TNFα* in einem Dotplot.** Ausgefüllte Kreise, Dreiecke und Rechtecke stehen für die HFD-Gruppen, unausgefüllte für die NFD-Gruppen, (HFD/HFD n=13, HFD/HFD+LB n=13, HFD/HFD+LB+IF n=15, HFD/NFD n=14, HFD/NFD+LB n=15, HFD/NFD+LB+IF n=14), HFD=Hochfett-diät, NFD=Niedrigfett-diät, LB=Laufband, IF=Intervallfasten



**Abbildung 33: Darstellung des Clusterings für *FGF21* in der Leber in einem Dotplot.** Ausgefüllte Kreise, Dreiecke und Rechtecke stehen für die HFD-Gruppen, unausgefüllte für die NFD-Gruppen, (HFD/HFD n=13, HFD/HFD+LB n=13, HFD/HFD+LB+IF n=15, HFD/NFD n=14, HFD/NFD+LB n=15, HFD/NFD+LB+IF n=14), HFD=Hochfett-diät, NFD=Niedrigfett-diät, LB=Laufband, IF=Intervallfasten

## Ergebnisse



**Abbildung 34: Darstellung des Clusterings für  $\beta$ -klotho in der Leber in einem Dotplot.** Ausgefüllte Kreise, Dreiecke und Rechtecke stehen für die HFD-Gruppen, unausgefüllte für die NFD-Gruppen, (HFD/HFD n=13, HFD/HFD+LB n=13, HFD/HFD+LB+IF n=15, HFD/NFD n=14, HFD/NFD+LB n=15, HFD/NFD+LB+IF n=14), HFD=Hochfettdiät, NFD=Niedrigfettdiät, LB=Laufband, IF=Intervallfasten

### 3.10 *In-vitro*-Experiment $\beta$ -klotho-Expression

Um die in der PCA gesehene negative Korrelation von  $TNF\alpha$  und  $\beta$ -klotho zu validieren, und zu untersuchen inwieweit dieser Zusammenhang möglicherweise kausal sein könnte, wurde eine *in-vitro*-Analyse mit HepG2-Zellen durchgeführt.

Hier zeigte sich über n=9 Durchläufe (**Abbildung 35**), dass die HepG2-Zellen, die 24 h mit hTNF $\alpha$  inkubiert wurden, gegenüber den Kontrollgruppe eine signifikant verringerte Expression von  $\beta$ -klotho aufwiesen. Somit kann geschlussfolgert werden, dass TNF $\alpha$  in der Lage ist, die Expression von  $\beta$ -klotho zu reduzieren.



## **4 Diskussion**

Ziel der Studie war es, anhand eines Mausmodells der ernährungsinduzierten Adipositas den hepatoprotektiven Effekt von verschiedenen Interventionen zu untersuchen und hierbei ganz wesentlich auf mechanistische Vorgänge zu fokussieren. Die gewählten Interventionen sind in der Literatur bereits als mögliche Therapieansätze zur Behandlung einer Adipositas beim Menschen bekannt. Durch die Parallelen vieler metabolischer Vorgänge bei Mäusen und Tieren lassen sich so auch Rückschlüsse für den Menschen ziehen.

### **4.1 Methodische Betrachtung**

Für die Untersuchungen wurden weibliche C57BL/6-Mäuse benutzt, bei denen durch die Gabe eines Futters mit einem hohen Fettanteil eine Adipositas induziert wurde (DIO). Dieses Mausmodell wird häufig für solche Art von Versuchen verwendet, da viele Vorgänge bei der Mauslinie den Vorgängen beim Menschen stark ähneln [147] und so am ehesten Rückschlüsse auf die Prozesse beim Menschen gezogen werden können.

Es wurden zwei verschiedene Futter gegeben, die sich in der Verteilung von Kohlenhydraten, Fetten und Proteinen unterschieden, aber deren Struktur und Zusammensetzung der einzelnen Komponenten möglichst ähnlich waren, um zu vermeiden, dass die Tiere nach dem Futterwechsel aufgrund ungewohnter Konsistenz die Nahrungsaufnahme vollständig verweigerten. Die Auswahl des passenden Futters mit niedrigem Fettanteil erfolgte anhand der Empfehlung des Herstellers. Kritisch zu bewerten ist in diesem Zusammenhang, dass bei der Futtersorte mit niedrigem Fettanteil 70 % der Energie durch Kohlenhydrate, in diesem Fall Maisstärke, gedeckt werden. Auch Kohlenhydrate können zu ähnlichen inflammatorischen Veränderungen wie eine HFD in der Leber führen [164].

Die Futtergabe erfolgte in den gleichen Gruppen, in denen die Tiere die gesamte Zeit über gehalten wurden. Dabei konnte die Menge, die jedes einzelne Tier gefressen hat, nicht gemessen werden. Daher kann keine genaue Aussage darüber getroffen werden, ob einige Tiere in der Gruppe besonders wenig oder besonders viel gefressen haben.

Während des Versuchszeitraumes entwickelten einzelne Tiere gesundheitliche Probleme. So wiesen einige Tiere starke Kratzspuren und Hautläsionen an den Extremitäten und am Hals auf. Hierbei lässt sich nicht genau sagen, ob diese selbst zugefügt wurden oder dies durch andere Tiere im gleichen Käfig geschah. Die Läsionen wurden mit Babypuder behandelt und heilten anschließend komplett aus. Bei der Organentnahme nach 12 Monaten fielen in wenigen Fällen

tumorartige Gewebeeränderungen im Fettgewebe und in der Leber auf, die möglicherweise auf das Vorliegen eines hepatozellulären Karzinoms (HCC) hindeuten könnten. Außerdem wurde vereinzelt ein verflüssigtes Nierengewebe und ein stark vergrößerter Magen-Darm-Trakt beobachtet. Einige Tiere verstarben noch innerhalb des Versuchszeitraumes. Die bis dahin gesammelten Daten der Tiere gingen daher nicht in die weiteren Analysen ein.

Wie für die Diagnostik einer NAFLD im Rahmen eines metabolischen Syndroms üblich, erfolgte die Auswertung histologischer Schnitte von Gewebe der Leber. Während ein Teil der Auswertung unter Nutzung eines Grafikprogramms (ImageJ) erfolgte, wurde ein Teil auch manuell am Mikroskop oder anhand von Bildern durchgeführt. Dazu zählte unter anderem die Erstellung des NAS, der auch in der Klinik aufgrund bislang fehlender valider nicht-invasiver Methoden ein wichtiges Mittel zur Beurteilung einer NAFLD bei Patienten darstellt. Obwohl für die einzelnen Bewertungskategorien Vorgaben zur Punktevergabe bekannt sind, lässt sich eine Untersucher-Variabilität [156] nicht ausschließen. Um diese Fehlerquelle zu minimieren, wurden alle Präparate von einer Person ausgewertet und bereits in der Arbeitsgruppe zuvor etablierte Vorgaben [155] angewendet. Des Weiteren wurden die Ergebnisse des NAS durch weitere histologische Analysen validiert und durch molekularbiologische Untersuchungen ergänzt, um aussagekräftigere Ergebnisse machen zu können.

### **4.2 Wirkung der Interventionen**

Ausgangspunkt der Untersuchungen war eine ernährungsinduzierte Adipositas, die im Mausmodell durch 6-monatige Fütterung einer HFD erzeugt wurde.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die eingeführten Interventionen, insbesondere der Diätwechsel *per se*, Folgen einer HFD-induzierten Adipositas verringern konnten. Dabei führten sie insbesondere zu einer Reduktion von Körperfett und Leberverfettung. Dies ging einher mit einer verringerten Expression von Enzymen der  $\beta$ -Oxidation und einer leichten Reduktion der TAG- und signifikanten Senkung der Cholesterinkonzentration. Das regenerative Potenzial der Interventionen auf die Leberinflammation zeigte sich auch in einer verringerten *TNF $\alpha$* -Expression, mit der mutmaßlich auch eine Wiederherstellung der FGF21-Sensitivität einherging.

Ein Energieüberschuss aufgrund kalorienreicher Ernährung führt bei Menschen [165] und Mäusen [165, 166] zu einer Gewichtszunahme sowie einer Zunahme von Fettmasse im Körper. Eine krankhafte Ansammlung von Fett wird aus dem Lateinischen abgeleitet auch als

Adipositas bezeichnet. Adipositas ist die zentrale Pathologie des metabolischen Syndroms [5], welches inzwischen auch immer mehr Kinder betrifft [1]. Die Frage nach effektiven Therapieansätzen abseits von Medikamenten und bariatrischer Chirurgie [167] gewinnt daher immer mehr Bedeutung.

Im Fokus der Untersuchungen standen die Auswirkungen von Interventionen auf die Leber, in der sich das metabolische Syndrom als NAFLD, in Verbindung mit Effekten auf den Gesamtmetabolismus (Leptin, Insulin, Triglyceride, FGF21), manifestiert.

### **4.2.1 Gewichtsreduktion und Veränderung des hepatischen Fettstoffwechsels durch Diätwechsel, Laufbandtraining und Fasten**

Wie erwartet [165, 166] führte das fettreiche Futter bei allen Tieren in den ersten 6 Monaten zu einer stetigen Gewichtszunahme. Bei den Tieren, die weiterhin die Hochfettdiät erhielten, setzte sich diese Entwicklung auch in den folgenden 6 Monaten fort. Im Gegensatz dazu kam es durch den Diätwechsel nach initialer Gewichtsabnahme zu einer Stabilisierung des Körpergewichtes auf etwa 50 % des Niveaus der Tiere mit fortgeführter Hochfettdiät und der Tiere mit Hochfettdiät und Laufbandtraining. Diese Entwicklung war laut der Ergebnisse vorheriger Studien auch zu erwarten [133, 168]. Während in einigen Untersuchungen ein zusätzlich gewichtsreduzierender Effekt durch körperliche Aktivität gezeigt wurde [127, 169, 170], zeigte sich dies bei den Tieren mit Laufbandtraining aber auch in anderen Untersuchungen [171] nicht. Erstaunlicherweise konnte auch bei den Tieren mit den Interventionen „Training und Fasten“ trotz bestehender Hochfettdiät eine Reduktion des Körpergewichtes um 20 % gegenüber den Tieren mit dauerhafter Hochfettdiät gesehen werden. Dass eine so starke Gewichtsreduktion trotz bestehender Hochfettdiät erfolgte, deutet darauf hin, dass sich vor allem das Fasten in der aktiven Phase der Mäuse positiv auf die Gewichtsreduktion ausgewirkt haben könnte. Dies stimmt auch mit Ergebnissen von Studien überein, in denen die Auswirkung des Fastens isoliert betrachtet wurde [145, 172]. Hier zeigte sich, dass die Tiere, die Futter ausschließlich in der aktiven Phase von Mäusen (Dunkelphase von 23-7 Uhr) erhielten, trotz gleichen Futters weniger Gewicht zunahmten als die Tiere, die ihr Futter außerhalb der aktiven Phase (Hellphase von 7-22 Uhr) erhielten. [173]. Neben dem Gewichtsverlust an sich zeigten sich bei den Tieren mit Diätwechsel nach 12 Monaten signifikant verringerte Anteile viszeralen und subkutanen Fettgewebes gemessen am Körpergewicht, einhergehend mit einer signifikanten Reduktion der Leptinkonzentration. Aufgrund des engen Zusammenhangs von Leptin mit Übergewicht, der Fettmasse und dem BMI [174–176] und einer mit zunehmender Fettmasse erhöhten Expression

## Diskussion

von Leptin im subkutanen Fett wie auch viszeralem Fettgewebe [177] kann ein kausaler Zusammenhang zwischen Abnahme der Fettmasse bei den Tieren mit Diätwechsel und der Abnahme der Leptinkonzentration vermutet werden. Umgekehrt ist auch eine Beeinflussung der Fettmasse aufgrund der Leptinfunktion an sich denkbar, da Leptin durch eine Senkung von Insulin [178] und Glukose im Serum [179] und Stimulation von Lipolyse [180–182] und Hemmung der Lipogenese [183, 184] eine Reduktion von Fettgewebe bewirkt. Diesem Wirkmechanismus entgegen steht, dass bei den Tieren mit Hochfettdiät trotz signifikant höherer Leptinkonzentrationen im Vergleich zu den Tieren mit Diätwechsel keine Verringerung der Fettmasse gesehen wurde. Eine mögliche Erklärung dafür könnte das Vorliegen einer Leptinresistenz sein. Hierbei steigt in Folge fettreicher Ernährung die Leptinkonzentration zwar stark an, die normalerweise gewichtsreduzierende Wirkung des Leptins wird allerdings aufgehoben [97]. Eine in Zusammenhang mit dem Leptinmetabolismus stehende Beeinflussung des Insulinstoffwechsels konnte nicht gezeigt werden, da die Plasma-Insulinkonzentrationen lediglich eine leichte Tendenz zu niedrigeren Werten bei den Tieren mit Diätwechsel aufwiesen. Inwieweit der hohe Kohlenhydratanteil [185] im Diätfutter die Insulinkonzentration beeinflusst haben könnte und hierbei eine mögliche Senkung der Insulinkonzentration maskierte, lässt sich nicht genau sagen. Neben einer Verringerung von Körpergewicht und Körperfettgewebe *per se* zeigte sich auch eine signifikante Reduktion des Lebergewichts und der Leberverfettung. Histologisch stellte sich dies durch signifikant verringerte Anteile von Lipidtropfen am Gesamtgewebe in der Ölrot O-Färbung und signifikante Reduktion des Steatose-Scores in der HE-Färbung bei allen Tieren mit Diätwechsel und denen mit Training und Fasten bei Hochfettdiät dar. Der positive Effekt der Interventionen äußerte sich auch in einer signifikanten Reduktion des NAS [44], die bei den Tieren überwiegend durch die starke Reduktion der Steatose-Score-Werte bei nahezu konstanten Score Werten für Ballonierung und Inflammation zustande kam. Dennoch kann vermutet werden, dass unter Annahme des Vorliegens einer NAFLD [186] bei den Tieren mit Hochfettdiät und der Kombination von Hochfettdiät und Laufbandtraining die Interventionen zu einer reduzierten Ausprägung der NAFLD im Vergleich zu den anderen Tieren geführt hat. Ob und inwieweit sich die Interventionen auch positiv auf entzündliche Prozesse ausgewirkt haben, wird im Verlauf noch weiter diskutiert.

Im Plasma äußerte sich die Reduktion des Fettgewebes durch signifikante Verringerung des plasmatischen Cholesterins bei den Tieren mit Diätwechsel sowie denen mit Laufbandtraining und Fasten bei bestehender Hochfettdiät gegenüber den Tieren mit dauerhafter Hochfettdiät. Auch bei isolierter Betrachtung der Fraktionen HDL- und LDL-Cholesterin zeigte sich eine

Reduktion der Konzentration bei den gleichen Mäusen. Da sich eine fettarme Ernährung senkend auf HDL- und LDL-Cholesterin auswirkt [187] und sowohl die Expression von *HMG-CoA* als wichtigem Zwischenprodukt der Cholesterinsynthese, als auch die Expression des Regulationsfaktors *SREBP-2* [77] nur geringe Unterschiede aufwiesen, kann vermutet werden, dass die Reduktion im Wesentlichen auf die geringere Zufuhr von Cholesterin mit der Nahrung zurückzuführen ist. Da zwar nach Diätwechsel und Training, nicht aber bei den Tieren mit dauerhafter Hochfettdiät und zusätzlich Laufbandtraining eine Reduktion von Cholesterin und der Fraktionen HDL und LDL gemessen wurde, scheint sich der Faktor der längerfristigen Aktivität [188, 189] nicht senkend auf den Cholesterinstoffwechsel ausgewirkt zu haben. Die Intervention „Fasten“ zeigt in Studien heterogene Ergebnisse. Während in einigen Untersuchungen keine Veränderung der Cholesterinkonzentration durch Fasten gesehen werden konnte [190, 191], zeigte sich in anderen Studien ein Cholesterin-senkender Effekt [137]. In unseren Messungen konnte lediglich eine leichte Verringerung der LDL-Konzentration bei den Tieren mit Diätwechsel, Training und Fasten gegenüber denen mit dauerhafter Hochfettdiät, Training und Fasten gesehen werden. Da die Intervention Fasten in unserer Studie allerdings nur in Kombination mit einem Futterwechsel und Training untersucht wurde, bleibt der Einfluss des Fastens als isolierter Faktor weitestgehend unklar.

Die signifikante Reduktion der Verfettung durch die Interventionen ging nicht einher mit signifikant verringerten TAG-Konzentrationen. Es zeigten sich lediglich tendenziell niedrigere Konzentrationen bei den Tieren mit Diätwechsel. Da die TAG-Konzentration nicht nur durch die Aufnahme von TAG aus der Nahrung, sondern auch die postprandiale Synthese aus Fettsäuren in der Leber beeinflusst wird [48], wurde die mRNA-Expression der als Housekeeping Enzym [192] bezeichneten *FAS* [193] gemessen, um mögliche Veränderungen des lipogenetischen Wegs durch die Interventionen zu detektieren. Dies erfolgte auch vor dem Hintergrund, dass eine erhöhte DNL in der Pathogenese einer NAFLD [47, 48] und Insulinresistenz [193] durch vermehrte Speicherung von TAGs in Fettgewebe und den Hepatozyten [45] eine wichtige Rolle spielt. Da sich in unseren Untersuchungen keine signifikanten Unterschiede der *FAS*-Expression zwischen den Tieren der unterschiedlichen Gruppen zeigten, wurde zusätzlich die *SREBP-1c*- und *LXR $\alpha$* -mRNA Expression gemessen. Obwohl zwischen der *FAS*- und *SREBP-1c*-Expression eine positive Korrelation besteht, die auch unter NAFLD gezeigt werden konnte [194, 195], wurde trotz ausbleibender Veränderung der *FAS*-Expression eine signifikante Reduktion der *SREBP-1c*-Expression durch die Interventionen gesehen. Eine, wie in anderen Untersuchungen, mit fettreduzierter Diät einhergehende Reduktion der *LXR $\alpha$* -Expression, konnten wir ebenfalls zeigen und weist somit

auch in unserem Modell auf die bekannte regulatorische Wirkung von *LXR $\alpha$*  auf die *SREBP-1c*-Expression [196] in der Leber [197] hin. Dass die *FAS*-Expression selbst durch die Interventionen nicht beeinflusst wurde, obwohl ein deutlicher Effekt auf die Expression von Regulationsfaktoren gezeigt wurde, verwundert auch dahingehend, dass in vielen anderen Untersuchungen unter Gabe eines fettreichen Futters eine signifikant erhöhte *FAS*-Expression gezeigt [198, 199] werden konnte. Allerdings sind die Fütterungszeiträume in diese Untersuchungen deutlich kürzer. Durch die über 12 Monate dauerhaft erhöhte Aufnahme von Fetten aus der Nahrung bei den Mäusen mit Hochfettdiät wäre eine Art Feedback-Mechanismus [200] denkbar, wobei die *FAS*-Expression nicht mehr über *SREBP-1c*- und *LXR $\alpha$* -Expression reguliert wird. Eine weitere Erklärung für die ausbleibenden Unterschiede könnte auch der hohe Kohlenhydratanteil im Futter der Tiere mit Diätwechsel sein, da Kohlenhydrate zu einer Steigerung der Lipogenese [201] führen können. Inwieweit einer oder mehrere dieser Mechanismen in unseren Untersuchungen eine Rolle spielten, bleibt allerdings rein spekulativ.

Neben einer verringerten Aufnahme von Fetten mit der Nahrung und einer reduzierten endogenen Synthese kann sich auch der Abbau von Fettsäuren und TAG durch  $\beta$ -Oxidation auf den Fettstoffwechsel auswirken. Daher wurde die mRNA-Expression von wichtigen Enzymen der  $\beta$ -Oxidation bzw. deren Regulationsfaktoren mittels PCR gemessen. Sowohl die *CPT Ia*- und *CPT II*-Expression als auch die *PPAR $\alpha$* - und *ACOXI*-Expression als regulatorische Faktoren waren bei den Tieren mit Diätwechsel gegenüber den Tieren mit dauerhaft fettreichem Futter signifikant verringert. Das deutet darauf hin, dass bei diesen Tieren sowohl die mitochondriale  $\beta$ -Oxidation als auch die peroxisomale  $\beta$ -Oxidation [72, 202] verringert waren und weniger mittel- und langkettige Fettsäuren abgebaut wurden. Da nach Diätwechsel auch die Verfettung signifikant verringert war, kann vermutet werden, dass eine Kompensation von starker Fettaufnahme [203, 204] durch  $\beta$ -Oxidation nicht mehr erfolgte.

Zwischen Geweben und Organen erfolgt der Transport von Lipiden durch Transportproteine. Eine wichtige Rolle im Austausch von körpereigenen und mit der Nahrung aufgenommenen Fetten zwischen Geweben und Organen, darunter der Leber, spielt ApoE [64, 205]. Der in unseren Untersuchungen gesehene signifikante Rückgang der *ApoE*-Expression in der Leber bei den Tieren, die auch eine verringerte hepatische Steatose aufwiesen, ist hinweisend auf den engen Zusammenhang zwischen Fettangebot und *ApoE*-Expression [68, 206] und deutet darauf hin, dass es durch den Rückgang der Verfettung auch zu einer verringerten Expression von *ApoE* in der Leber gekommen ist. Die ebenfalls gezeigte Reduktion der VLDL-Konzentration, dessen Bestandteil ApoE ist [205] und der protektive Effekt einer ApoE-Defizienz bei Mäusen

auf eine NAFLD [207] deuten darauf hin, dass ApoE eine wichtige Rolle in der Pathologie einer NAFLD zu spielen scheint.

### **4.2.2 Regeneratives Potenzial der Interventionen auf eine Leberschädigung**

Als wichtiger Indikator für eine Leberschädigung infolge von Entzündungen in der Leber, ischämischer Schädigung oder toxischen Einflüssen gelten auch die Transaminasen ALT, AST und das in der Leber synthetisierte Eiweiß Albumin [208, 209]. Aufgrund der Zerstörung von Hepatozyten kommt es zu einer erhöhten Freisetzung der Transaminasen, sodass ein Serumanstieg von ALT und AST resultiert [33–36]. Gleichzeitig führt die verringerte Syntheseleistung der Leber zu erniedrigten Albuminserumwerten [39, 40]. Um herauszufinden, inwieweit sich die Interventionen auf die Konzentration der Leberenzyme auswirken, wurde diese nach Abschluss der Experimente bestimmt. Verglichen mit Normwerten für ALT (57 U/l) und AST (133 U/l) bei dem verwendeten Mausstamm [210] zeigte sich bei den Tieren mit dauerhafter Hochfettdiät und/oder Laufbandtraining, eine Erhöhung der Enzyme um etwa 30 % (ALT) und 35 % (AST). Ähnlich wie in humanen Studien, in denen es infolge von Diät [211] und Bewegung [212] zu einer Reduktion der Transaminasen im Serum kam, führten auch in der vorliegenden murinen Studie der Diätwechsel und die Kombination der Interventionen „Laufband und Fasten“ zu einer Änderung der Transaminasen. So kam es zu einer signifikanten Reduktion von ALT und AST nach Diätwechsel und auch mit Laufbandtraining und Fasten bei bestehender Hochfettdiät sanken die Werte bis mindestens auf das angegebene Normalniveau. Dies spiegelte sich auch in einer deutlich abnehmenden ALT/AST-Ratio bei den Tieren mit Diätwechsel wider. Das deutet darauf hin, dass sich die Interventionen regenerativ auf Leberschädigungen durch eine NAFLD ausgewirkt haben könnten. Anzumerken sei, dass alle angegebenen Werte lediglich als Richtwerte dienen, da sich sowohl das Alter der Mäuse als auch das verwendete Futter unserer Tiere von der „Normgruppe“ unterschieden. Die Albuminkonzentration wurde durch die Interventionen nur gering beeinflusst. Bei allen Tieren zeigten sich nur leichte Abweichungen von der als Normwert angegebenen Konzentration (34 g/l) [210], wobei eine leicht steigende Tendenz nach Diätwechsel und die höchste Albuminkonzentration bei den Tieren mit allen Interventionen gemessen wurde. Eine mögliche Erklärung für die nur geringe Veränderung könnte sein, dass häufig nicht die Albuminkonzentration an sich, sondern vor allem die Albumin(bindungs)funktion durch eine Leberschädigung beeinflusst wird [37, 38] und sich erst eine stark fortgeschrittene Schädigung der Leber auch auf die Konzentration von Albumin auswirkt. Dass sich die Interventionen regenerativ auf die Albuminfunktion und -konzentration ausgewirkt haben könnten, lässt sich

anhand unserer Ergebnisse nur vermuten. Dennoch scheinen sich die Interventionen im Gesamtbild betrachtet regenerierend auf eine durch NAFLD induzierte Leberschädigung auszuwirken.

### **4.2.3 Reduktion TNF $\alpha$ -induzierter Low-grade-Inflammation durch Interventionen in der Leber**

Die vermehrte Ansammlung von Fettvakuolen führt auf Grundlage der engen Verbindung von Fettgewebe, Leber und blutbildendem System zu einer systemischen LGI [213], die sich im Verlauf auch auf die Leber [214] ausbreitet und zur Progression einer NAFLD beiträgt [215]. Entgegen der Erwartung und Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen [216] konnten in der histologischen Untersuchung weder durch Diätwechsel noch durch Laufbandtraining und Fasten auf zellulärer Ebene Änderungen in der Akkumulation inflammatorischer Zellen in der Leber gesehen werden. Sowohl hinsichtlich typischer Zellveränderungen (Ballonierung) als auch der Ansammlung von Entzündungszellen *per se* (Entzündung) gab es keine Unterschiede. Auch in der isolierten Betrachtung von neutrophilen Granulozyten (CAE) und Makrophagen (F4/80) konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tieren der Untersuchungsgruppen gesehen werden. Lediglich die Kombination aus Diätwechsel, Laufbandtraining und Fasten schien der Ansammlung von Makrophagen in der Leber leicht entgegenzuwirken. Auf molekularbiologischer Ebene zeigten sich auch für die Expression der pro-inflammatorischen Zytokine *IL-1 $\beta$*  und *IL-6* [217] keine Veränderungen. Allerdings führten der Diätwechsel und die Kombination aus Laufbandtraining und Fasten trotz bestehender Hochfettdiät zu einer signifikanten Reduktion der TNF $\alpha$ -Expression. TNF $\alpha$  wird als pro-inflammatorisches Zytokin von Makrophagen ausgeschüttet und steht in enger Verbindung mit Adipositas und einer NAFLD [218, 219]. Bei Menschen kommt es durch eine Steigerung der lipolytischen Aktivität [220] zu einer erhöhten TNF $\alpha$ -Ausschüttung aus dem Fettgewebe. Gleichzeitig kam es auch zu einer erhöhten Expression des anti-inflammatorischen *IL-10* [221]. Eine Erklärung für die ausbleibende Sichtbarkeit dieser Veränderungen auf zellulärer Ebene könnte eine fehlende Differenzierung von pro- und anti-inflammatorischen Makrophagen in der angewandten F4/80-Immunhistochemie sein. Ein weiterer Einflussfaktor könnte auch der hohe Kohlenhydratanteil des Diätfutters in der Studie gewesen sein. In Untersuchungen, in denen ein direkter Vergleich von einer Hochfettdiät mit einer kohlenhydratreichen Diät erfolgte, zeigten sich auch keine Unterschiede hinsichtlich der *F4/80*-mRNA-Expression in der Leber. Daraus kann abgeleitet werden, dass beide Diäten zu einer ähnlich starken Makrophageninfiltration in der Leber führen könnten [164]. Zuletzt könnte auch der Prozess der Chronifizierung in diesem

Zusammenhang eine wichtige Rolle spielen. So zeigen unterschiedliche Studien, dass ein Wechsel von einer Hochfettdiät zu einer fettreduzierten Diät zwar zu einer Gewichtsreduktion [222] führen und den Progress einer NASH aufhalten können [223], aber weiterhin eine erhöhte Leberverfettung und inflammatorische Prozesse nachweisbar bleiben [222, 223]. Da die Gabe der Hochfettdiät im vorliegenden Fall über einen vergleichsweise langen Zeitraum von 6 Monaten erfolgte, wäre also durchaus denkbar, dass die Leber als eine Art molekulares Gedächtnis hinsichtlich inflammatorischer Prozesse fungierte [222].

#### 4.2.4 Regeneration einer $TNF\alpha$ -induzierten FGF21-Resistenz

In engem Zusammenhang mit der Expression von  $TNF\alpha$  bei Adipositas und NAFLD steht auch die Aktivität des Fastenhormons FGF21 [109, 110], was sich neben einer bereits bekannten verringerten  $\beta$ -klotho (Corezeptor von FGF21) Expression in Adipozyten [126] in unseren Untersuchungen auch durch eine verringerte  $\beta$ -klotho-Expression in der Leber nach Hochfettdiät sowie starke Korrelation von steigendem hepatischem  $\beta$ -klotho mit sinkendem  $TNF\alpha$  durch den Diätwechsel darstellte. Auch die in den *in-vitro*-Experimenten gezeigte signifikant verringerte  $\beta$ -klotho-Expression nach Behandlung von HepG2-Zellen mit  $hTNF\alpha$  ist hinweisend auf den inhibierenden Einfluss von  $TNF\alpha$  auf die Expression von  $\beta$ -klotho. Die wichtige Rolle von FGF21 in der Pathogenese von Übergewicht und NAFLD zeigte sich sowohl in einer positiven Korrelation von FGF21-Serumkonzentration und BMI [224] als auch in einer positiven Korrelation der FGF21-Serumkonzentration und des NAS. Dies könnte darauf hinweisen, dass neben dem NAS auch die FGF21-Serumkonzentration als möglicher Marker für die Einschätzung der Ausprägung einer NAFLD in Frage kommen könnte.

Als Fastenhormon weist FGF21 im Rahmen von Hungerzuständen [109, 110] erhöhte Plasmakonzentrationen auf. Paradoxerweise werden diese aber auch unter Adipositas [122-124] gemessen, sodass ähnlich wie bei Leptin und Insulin eine FGF21-Resistenz [124] durch erniedrigte FGF21-Sensitivität [127] vermutet wird. Unsere Ergebnisse zeigen, dass es durch die Interventionen einerseits zu einer signifikanten Reduktion der FGF21-Plasmakonzentration und  $FGF21$ -Expression in der Leber gekommen ist und andererseits zu einer signifikanten Expressionserhöhung der Rezeptoren pFGFR1c und  $\beta$ -klotho in der Leber. Dies könnte darauf hinweisen, dass es auch in unserem Modell, ähnlich wie von Geng et. al [127] beschrieben, durch die Interventionen zu einer gesteigerten FGF21-Sensitivität gekommen ist. Obwohl sowohl körperliche Aktivität als Mittel zur Senkung der  $FGF21$  Expression und gleichzeitiger Regeneration der FGF21-Sensitivität bei Adipositas

## Diskussion

[127] als auch Fasten zur Beseitigung einer Adipositas [137, 225, 226] und FGF21-Resistenz [125] beschrieben werden, zeigte in unseren Untersuchungen neben dem Diätwechsel vor allem das Fasten bei bestehender Adipositas diese Effekte. So sank die FGF21-Konzentration im Plasma und die Expression in der Leber lediglich bei den Tieren, die bei Hochfettdiät sowohl die Interventionen Laufband und Fasten erhielten, auf ähnlich niedrige Werte wie bei den Tieren mit Diätwechsel. Eine mögliche Erklärung dafür könnte in der Wiederherstellung des unter Hochfettdiät gestörten zirkadianen Rhythmus [145, 227] durch Verlagerung der Futtergabe in die aktive Phase der Nacht beim Fasten liegen. Insgesamt lässt sich darauf basierend annehmen, dass durch den Diätwechsel und Fasten eine TNF $\alpha$ -assoziierte FGF21-Resistenz [124] durch Erhöhung der FGF21-Sensitivität [127] bei gleichzeitiger  $\beta$ -klotho Expressionserhöhung entgegengewirkt werden konnte. Dieser Mechanismus wird auch dadurch unterstützt, dass *TNF $\alpha$* , *FGF21* und  $\beta$ -klotho in der PCA ein starkes Clustering bei den Tieren mit Diätwechsel zeigten, was wiederum den Diätwechsel als effektivstes Mittel zur Aufhebung einer FGF21-Resistenz hervorhebt.

### **5 Schlussfolgerung**

Die murine Studie wurde vor dem Hintergrund immer weiter stark ansteigender Inzidenzen von Übergewicht und Adipositas weltweit und der Suche nach langfristig effektiven Therapiemaßnahmen zur Behandlung der Erkrankung durchgeführt. Im Mittelpunkt stand dabei vor allem die Frage, welche Intervention bzw. Kombination von Interventionen zur Regeneration hepatischer Schädigung bei NAFLD im Rahmen eines metabolischen Syndroms am besten wirkt. Weiterhin wurde der Frage nachgegangen, inwieweit die Interventionen zu einer Wiederherstellung der durch Adipositas gestörten FGF21-Sensitivität beitragen könnten.

Erstaunlicherweise zeigten die Interventionen Laufbandtraining und Fasten trotz bestehender Hochfettdiät [137] und Übergewicht [228] gleiche reduzierende Effekte auf das Körpergewicht und die Fettmasse wie ein Diätwechsel *per se* und die Kombination aus Diätwechsel, Laufbandtraining und Fasten, sodass die Vermutung nahe liegt, dass ein Diätwechsel nicht zwingend notwendig ist, um eine Reduktion von Gewicht und Fettmasse zu erzielen. Ein histologisch sichtbarer Rückgang inflammatorischer Zellen in der Leber konnte nicht gesehen werden. Dennoch zeigte sich auf molekularer Ebene vor allem eine Reduktion der Expression von pro-inflammatorischem *TNF $\alpha$*  durch den Diätwechsel sowie die Kombination aus Training und Fasten bei anhaltender fettreicher Diät. Damit einhergehend kam es durch die Interventionen zu einer Reduktion der Konzentrationen der Leberenzyme AST und ALT. Insgesamt kann daher vermutet werden, dass die durch die HFD-induzierte Adipositas verursachte NAFLD in den Gruppen mit Diätwechsel und der Gruppe mit Laufbandtraining und Fasten bei gleichzeitiger Hochfettdiät umgekehrt werden konnte. Der positive Effekt der Interventionen blieb dabei nicht nur auf die Leber begrenzt, sondern wirkte sich auch regenerativ auf Veränderungen im Leptin-, Insulin- und Cholesterinstoffwechsel aus.

Weiterhin zeigten die Interventionen bei den Tieren mit Diätwechsel und den Tieren mit Laufbandtraining und Fasten bei bestehender fettreicher Diät eine reduzierende Wirkung auf die FGF21-Konzentration und Expression in der Leber, bei gleichzeitig steigender Wirkung auf die Expression der Rezeptoren pFGFR1c und des Corezeptors  $\beta$ -klotho. Unter Annahme einer FGF21-Resistenz bei den Tieren mit alleiniger Hochfettdiät und Laufbandtraining bei Hochfettdiät deuten die Ergebnisse auf eine Umkehr der Resistenz bei den Tieren in den Interventionsgruppen hin. Ob wirklich eine Regeneration der FGF21-Sensitivität ursächlich für diesen Mechanismus ist, lässt sich anhand unserer Untersuchungsergebnisse allerdings nicht mit Sicherheit sagen.

## Schlussfolgerung

Der enge Zusammenhang von Inflammation, NAFLD und Aktivität des Fastenhormons FGF21 zeigte sich durch eine positive Korrelation von BMI und NAS sowie FGF21-Konzentration und NAS. Weiterhin deutet bei den Tieren mit Diätwechsel und der Kombination von Diätwechsel mit Fasten die Reduktion der *TNF $\alpha$* -Expression bei gleichzeitig gesteigerter  $\beta$ -klotho-Expression in der Leber auf eine Umkehr einer *TNF $\alpha$* -assoziierten FGF21-Resistenz hin. Auch der senkende Einfluss von *TNF $\alpha$*  auf die  $\beta$ -klotho-Expression im *in-vitro*-Experiment unterstützen diese Beobachtung. Zusätzlich zeigen *TNF $\alpha$* , *FGF21* und  $\beta$ -klotho in der Korrelationsanalyse ein starkes Clustering bei den Tieren mit Diätwechsel.

Insgesamt zeigten sowohl der Diätwechsel zu einer fettreduzierten Diät als auch die Kombination von Laufbandtraining und Fasten bei bestehender fettreicher Nahrung die stärksten Effekte. Dies zeigt, dass nicht zwangsläufig ein Diätwechsel zur Regeneration einer NAFLD nötig ist, sondern bereits Aktivität und Fasten zu positiven Effekten führen können.

Die Untersuchungen stellen weiterhin eine gute Grundlage für die Entwicklung eines klinischen Ansatzes zur Diagnose und Therapiekontrolle einer NAFLD bei Patienten dar. Potenziell könnte so in der Zukunft der Erfolg einer NAFLD Therapie durch eine wenig invasive und schnell durchzuführende Blutplasmaanalyse von FGF21 erfolgen und FGF21 als Biomarker fungieren. Hierfür sind Ansätze mit Künstlicher Intelligenz geplant, bei denen auf Grundlage des engen Zusammenhangs von FGF21 mit weiteren zu NAFLD beitragenden Faktoren (z.B. Verfettung, Entzündung, Blutbildveränderungen) gezielt Therapiemaßnahmen ausgewählt und deren Erfolg überprüft werden könnten.

Ein Teil der Ergebnisse dieser Arbeit wurden bereits im August 2022 im Journal „Frontiers in Nutrition“ publiziert.

Power Guerra N, Leyens K, Müller L, Brauer D, Janowitz D, Schlick S, Pilz K, Grabe HJ, Vollmar B and Kuhla A (2022). The effect of different weight loss strategies to treat non-alcoholic fatty liver disease focusing on fibroblast growth factor 21. *Frontiers in Nutrition*. 9:935805. doi: 10.3389/fnut.2022.935805

## 6 Thesen

Übergewicht und Adipositas gehören mit über 2 Milliarden Betroffenen zu den weltweit am häufigsten vorkommenden Erkrankungen [1]. Maßnahmen wie Diätwechsel, körperliche Aktivität und Fasten sind bekannte wirksame Interventionen bei Adipositas und einem metabolischen Syndrom. Ziel dieser präklinischen tierexperimentellen Studie an Mäusen war es, insbesondere den hepatoprotektiven Effekt der Interventionen Diätwechsel, körperliche Aktivität und Fasten sowie die Rolle des Fastenhormons FGF21 bei Hochfett-diät-induzierter Adipositas zu untersuchen. Aufgrund einer damit einhergehenden low-grade-Inflammation werden die Rezeptoren von FGF21 ( $\beta$ -klotho, FGFR1c) herunterreguliert. Ähnlich wie eine Leptinresistenz, die klassischerweise bei Adipositas vorliegt, bezeichnet man dies als FGF21-Resistenz. Vor diesem Hintergrund ergeben sich folgende Thesen für das Mausmodell:

1. Bei Mäusen mit einer Hochfett-diät-induzierten Adipositas führen die Interventionen zu einer Gewichtsreduktion.
2. Die Interventionen zeigen einen Einfluss auf den Fettstoffwechsel und bewirken eine Reduktion hepatischer Steatose.
3. Eine low-grade-Inflammation in der Leber kann durch die Interventionen reduziert werden.
4. Die Interventionen haben regeneratives Potenzial auf eine Leberschädigung und bewirken eine Reduktion des NAFLD-Activity-Scores.
5. Die Interventionen führen zu Veränderungen im Leptin-, Insulin und Cholesterinstoffwechsel.
6. Die Interventionen beeinflussen die Aktivität des Fastenhormons FGF21. Eine verringerte FGF21-Serumkonzentration geht mit einer reduzierten FGF21-Konzentration und -Expression in der Leber einher.
7. Eine Veränderung der FGF21-Sensitivität zeigt sich in einer Steigerung von hepatischem  $\beta$ -klotho bei gleichzeitig sinkendem TNF $\alpha$  und stellt die Grundlage der Umkehrbarkeit einer TNF $\alpha$ -induzierten FGF21-Resistenz durch die Interventionen dar.
8. In-vitro zeigt sich in Leberzellen ein inhibierender Einfluss von TNF $\alpha$  auf die  $\beta$ -klotho Expression, was somit eine Kausalität, wie unter Punkt 7 beschrieben, untermauert.
9. In Korrelations- und Clusteringanalysen kann FGF21 als zentraler Parameter im Rahmen einer Adipositas und NAFLD klassifiziert werden. Dementsprechend kann FGF21 als Biomarker zur Therapiekontrolle einer Adipositas fungieren.

## Anhang

### Anhang

**Tabelle A 1: Zusammensetzung Hochfettdiät HFD D12492** von Research Diets. Inc, nach [229]

<b>Gruppe</b>	<b>Genaue Bestandteile</b>	<b>Gewicht [g]</b>
Protein	Casein, Lactat, 30 Mesh	200
Protein	Cystin, L	3
Kohlenhydrate	Lodex 10	125
Kohlenhydrate	Sucrose, fein granuliert	72.8
Faser	Solka Floc, FCC200	50
Fett	Schmalz	245
Fett	Sojabohnen-Öl, USP	25
Mineralien	S10026B <sup>1</sup>	50
Vitamine	Cholinbitrat	2
Vitamine	V10001C <sup>2</sup>	1
Farbe	Blau FD&C #1, Alum. Lake 35-42 %	0.05
<b>Gesamtgewicht</b>		<b>773.85</b>

**Tabelle A 2: Zusammensetzung S10026B RD-96 Mineral Mix** von Research Diets Inc., nach [230]

<b>Gruppe</b>	<b>Genaue Bestandteile</b>	<b>Gewicht [g]</b>
Kohlenhydrate	Sucrose, fein granuliert	179.82
Mineral	Kaliumcitrat, Monohydrat	330
Mineral	Calcium Phoshat, dibasisch	260
Mineral	Calcium Carbonat, leicht USP	110
Mineral	Natriumchlorid	51.80
Mineral	Magnesium Sulfat, Heptahydrat	51.52
Mineral	Eisen(III)citrat	8.38
Mineral	Mangankarbonat-Hydrat	4.20
Mineral	Cholinbitrat	2.45
Mineral	Zinkcarbonat	1.12
Mineral	Chrom-Kalium Sulfat	0.39
Mineral	Kupfercarbonat	0.21
Mineral	Ammonium Molybdän Tetrahydrat	0.06
Mineral	Natriumfluorid	0.04
Mineral	Natriumselen	0.01
Mineral	Kaliumjodat	0.01
<b>Gesamtgewicht</b>		<b>1000</b>

<sup>1</sup> Genaue Zusammensetzung siehe Tabelle A2

<sup>2</sup> Genaue Zusammensetzung siehe Tabelle A3

## Anhang

**Tabelle A 3: Zusammensetzung V10001C AIN-76A Vitamin Mix (10x Concentration) von Research Diets, Inc., nach [231]**

<b>Gruppe</b>	<b>Genaue Bestandteile</b>	<b>Gewicht [g]</b>
Kohlenhydrate	Sucrose, fein granuliert	78.42
Vitamin	Vitamin E Acetat, 50 %	10
Vitamin	Niacin B3	3
Vitamin	Biotin 1 %	2
Vitamin	Pantothensäure, d, Calcium, B5	1.60
Vitamin	Vitamin D3, 100.000 IU/gm	1
Vitamin	Vitamin B12, 0.1 % Mannitol	1
Vitamin	Vitamin A Acetat, 500.000 IU/gm	0.80
Vitamin	Pyridoxin HCl, B6	0.70
Vitamin	Riboflavin, B2	0.60
Vitamin	Thiamin HCl, B1	0.60
Vitamin	Folsäure	0.20
Vitamin	Menadion-Natriumbisulfit	0.08
Gesamtgewicht		100

**Tabelle A 4: Zusammensetzung Niedrigfettfutter NFD D12450J von Research Diets. Inc, nach [232]**

<b>Gruppe</b>	<b>Genaue Bestandteile</b>	<b>Gewicht [g]</b>
Protein	Casein, Lactat, 30 Mesh	200
Protein	Cystin, L	3
Kohlenhydrate	Maisstärke	506.2
Kohlenhydrate	Lodex 10	125
Faser	Solka Floc, FCC200	72.8
Fett	Sojabohnen-Öl, USP	25
Fett	Schmalz	20
Mineralien	S10026B <sup>3</sup>	50
Vitamine	Cholinbitratrat	2
Vitamine	V10001C <sup>4</sup>	1
Farbe	Gelb FD&C #5, Alum. Lake 35-42%	0.04
Farbe	Blau FD&C #1, Alum. Lake 35-42%	0.01
Gesamtgewicht		1055.05

<sup>3</sup> Genaue Zusammensetzung siehe Tabelle A2

<sup>4</sup> Genaue Zusammensetzung siehe Tabelle A3

## Anhang

**Tabelle A 5: Kameraeinstellungen für die Aufnahme der Bilder der Ölrot O-Färbung**

<b>Komponente</b>	<b>Einstellung</b>
Kamera	Axioscope
Objektiv	40fach
Zoom	1,0x
Belichtungszeit	52,75 ms
Schwarz	520
Gamma	0,33
Weiß	3074

**Tabelle A 6: Kameraeinstellungen für die Aufnahme der Bilder der CAE-Färbung**

<b>Komponente</b>	<b>Einstellung</b>
Kamera	Axioscope
Objektiv	40fach
Zoom	1,0x
Belichtungszeit	60 ms
Schwarz	268
Gamma	0,33
Weiß	3342

**Tabelle A 7: Kameraeinstellungen für die Aufnahme der Bilder der F4/80-Färbung**

<b>Komponente</b>	<b>Einstellung</b>
Kamera	Axioscope
Objektiv	40fach
Zoom	1,0x
Belichtungszeit	60 ms
Schwarz	268
Gamma	0,33
Weiß	3342

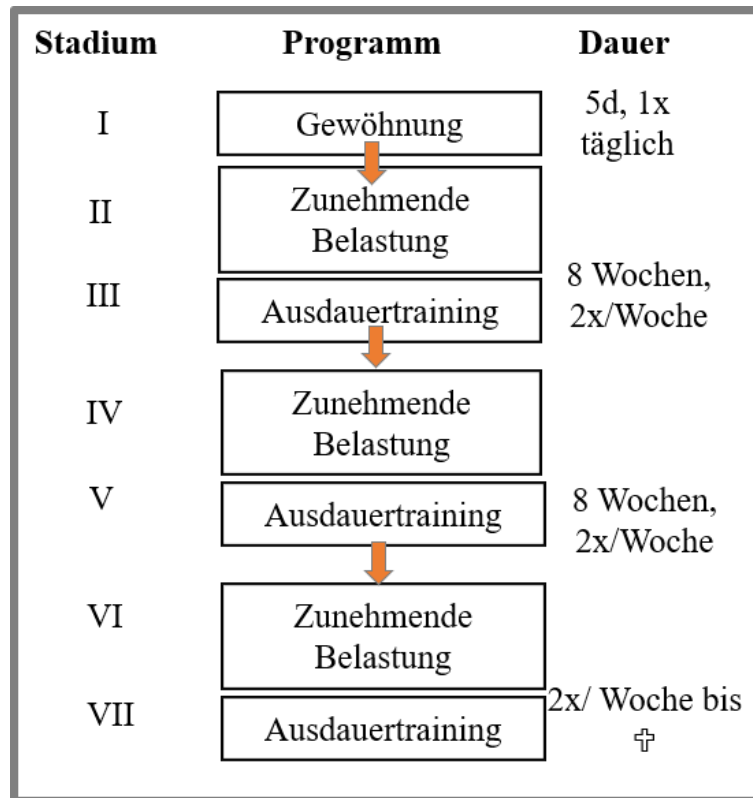


Abbildung A 1: Exaktes Protokoll für das Laufbandtraining angelehnt an [150]

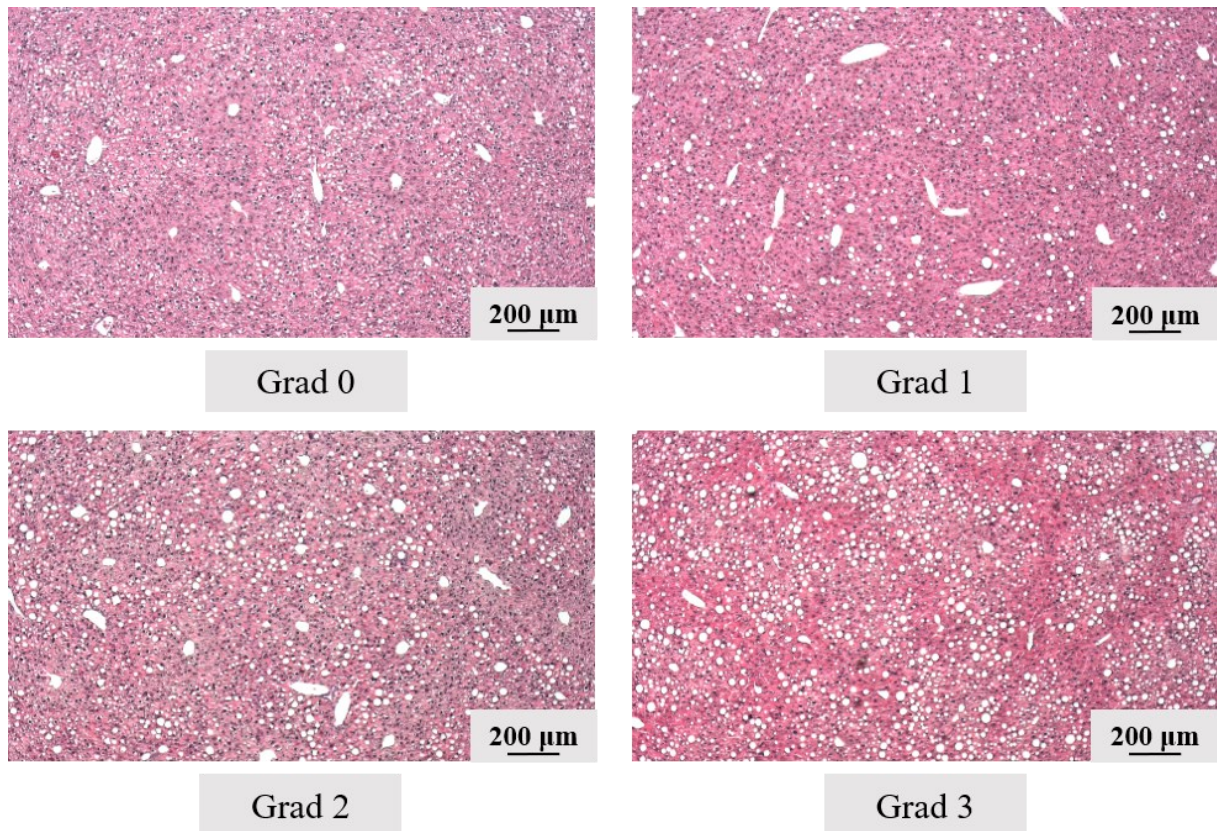


Abbildung A 2: Beispielhafte Darstellung des Scorings für Steatose in der HE-Färbung

## Anhang

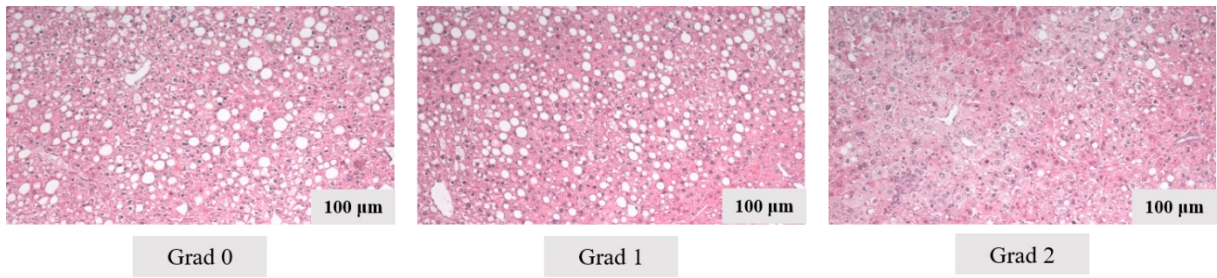


Abbildung A 3: Beispielhafte Darstellung des Scorings für Ballonierung in der HE-Färbung

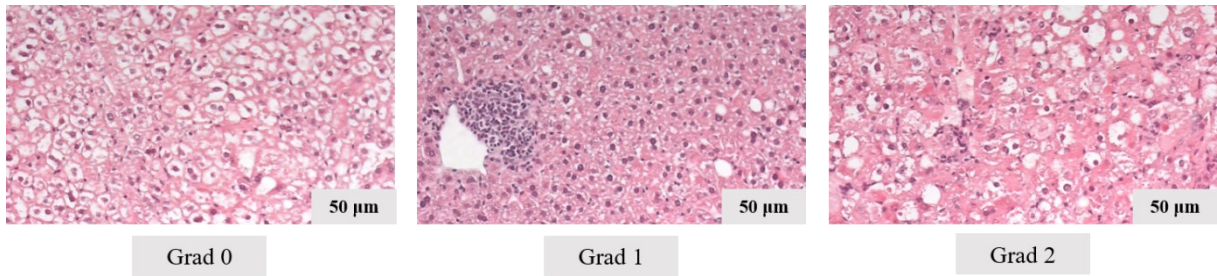


Abbildung A 4: Beispielhafte Darstellung des Scorings für Inflammation in der HE-Färbung

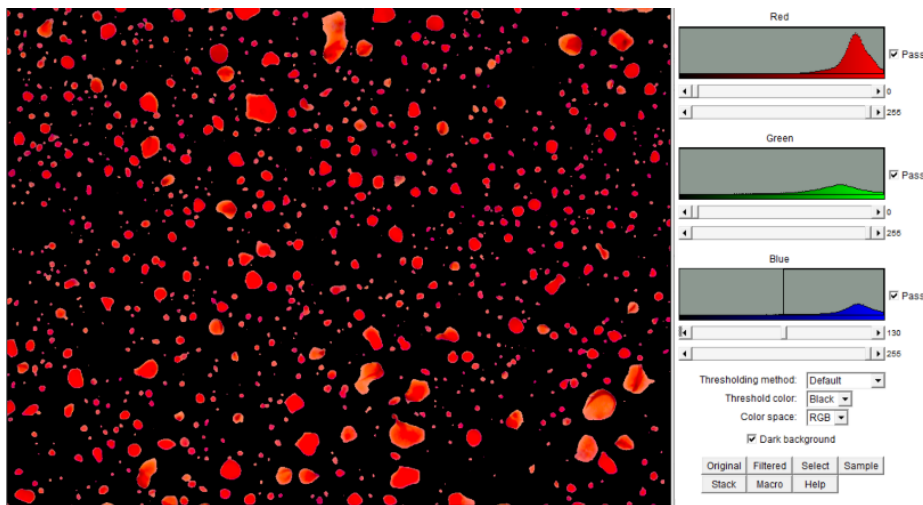


Abbildung A 5: Einstellungen Color Treshold für die Auswertung einer Ölrot O-Aufnahme, Aufnahme aus der Gruppe HFD/HFD

## Anhang

```
imgName=getTitle();
run("Duplicate...", "title=1.tif");
run("Color Threshold...");
// Color Thresholder 1.47v
// Autogenerated macro, single images only!
min=newArray(3);
max=newArray(3);
filter=newArray(3);
a=getTitle();
run("RGB Stack");
run("Convert Stack to Images");
selectWindow("Red");
rename("0");
selectWindow("Green");
rename("1");
selectWindow("Blue");
rename("2");
min[0]=0;
max[0]=255;
filter[0]="pass";
min[1]=0;
max[1]=255;
filter[1]="pass";
min[2]=130;
max[2]=255;
filter[2]="pass";
for (i=0;i<3;i++){
    selectWindow(""+i);
    setThreshold(min[i], max[i]);
    run("Convert to Mask");
    if (filter[i]="stop") run("Invert");
}
imageCalculator("AND create", "0","1");
imageCalculator("AND create", "Result of 0","2");
for (i=0;i<3;i++){
    selectWindow(""+i);
    close();
}
selectWindow("Result of 0");
close();
selectWindow("Result of Result of 0");
rename(a);
// Colour Thresholding-----
run("8-bit");
run("Create Selection");
selectWindow(imgName);
run("Restore Selection");
run("Set Measurements...", "area display redirect=None decimal=3");
run("Measure");
run("Clear", "slice");
```

Abbildung A 6: Batch zur Auswertung der Ölrot O-Aufnahmen in Image J

## Literatur

- [1] WHO. Obesity and overweight (01.04.2020). Im Internet: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
- [2] Organization WH. Obesity - Preventing and Managing the Global Epidemic: Report on a WHO Consultation. Geneva: World Health Organization; 2000
- [3] Lipoproteins, Apolipoproteins, and Lipases; 1994
- [4] World Health Organization. Regional Office for Europe. WHO European Regional Obesity Report 2022.; 2022
- [5] Kaplan NM. The deadly quartet. Upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension. *Arch Intern Med* 1989; 149: 1514–1520; DOI: 10.1001/archinte.149.7.1514
- [6] International Diabetes Federation. The IDF consensus worldwide definition of the Metabolic Syndrome (29.07.2020). Im Internet: <https://www.idf.org/e-library/consensus-statements/60-idfconsensus-worldwide-definitionof-the-metabolic-syndrome.html>; Stand: 15.09.2021
- [7] Grundy SM, Brewer HB, Cleeman JI et al. Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: e13-8; DOI: 10.1161/01.ATV.0000111245.75752.C6
- [8] Grundy SM. Obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 2595–2600; DOI: 10.1210/jc.2004-0372
- [9] [Anonymous] Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* 2002; 106: 3143–3421
- [10] Suk S-H, Sacco RL, Boden-Albala B et al. Abdominal obesity and risk of ischemic stroke: the Northern Manhattan Stroke Study. *Stroke* 2003; 34: 1586–1592; DOI: 10.1161/01.STR.0000075294.98582.2F
- [11] Chen H-J, Bai C-H, Yeh W-T et al. Influence of metabolic syndrome and general obesity on the risk of ischemic stroke. *Stroke* 2006; 37: 1060–1064; DOI: 10.1161/01.STR.0000206458.58142.f3
- [12] Marchesini G, Brizi M, Bianchi G et al. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes* 2001; 50: 1844–1850; DOI: 10.2337/diabetes.50.8.1844
- [13] Carroll KK. Obesity as a risk factor for certain types of cancer. *Lipids* 1998; 33: 1055–1059; DOI: 10.1007/s11745-998-0305-8

- [14] WHO. The top 10 causes of death. Im Internet: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>; Stand: 13.09.2021
- [15] Rinella ME. Nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review. *JAMA* 2015; 313: 2263–2273; DOI: 10.1001/jama.2015.5370
- [16] Rui L. Energy metabolism in the liver. *Compr Physiol* 2014; 4: 177–197; DOI: 10.1002/cphy.c130024
- [17] Vanni E, Bugianesi E, Kotronen A et al. From the metabolic syndrome to NAFLD or vice versa? *Dig Liver Dis* 2010; 42: 320–330; DOI: 10.1016/j.dld.2010.01.016
- [18] Katzmarzyk PT, Prusse L, Bouchard C. Genetics of abdominal visceral fat levels. *Am. J. Hum. Biol.* 1999; 11: 225–235; DOI: 10.1002/(sici)1520-6300(1999)11:2<225::aid-ajhb10>3.0.co;2-j
- [19] Gérard P. Gut microbiota and obesity. *Cell Mol Life Sci* 2016; 73: 147–162; DOI: 10.1007/s00018-015-2061-5
- [20] Safari Z, Gérard P. The links between the gut microbiome and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Cell Mol Life Sci* 2019; 76: 1541–1558; DOI: 10.1007/s00018-019-03011-w
- [21] Kolodziejczyk AA, Zheng D, Shibolet O et al. The role of the microbiome in NAFLD and NASH. *EMBO Mol Med* 2019; 11; DOI: 10.15252/emmm.201809302
- [22] Wanless IR, Bargman JM, Oreopoulos DG et al. Subcapsular steatonecrosis in response to peritoneal insulin delivery: a clue to the pathogenesis of steatonecrosis in obesity. *Mod Pathol* 1989; 2: 69–74
- [23] Brown MS, Goldstein JL. Selective versus total insulin resistance: a pathogenic paradox. *Cell Metab* 2008; 7: 95–96; DOI: 10.1016/j.cmet.2007.12.009
- [24] Li S, Brown MS, Goldstein JL. Bifurcation of insulin signaling pathway in rat liver: mTORC1 required for stimulation of lipogenesis, but not inhibition of gluconeogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 3441–3446
- [25] Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2002; 346: 1221–1231; DOI: 10.1056/NEJMra011775
- [26] Juge-Aubry CE, Henrichot E, Meier CA. Adipose tissue: a regulator of inflammation. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2005; 19: 547–566; DOI: 10.1016/j.beem.2005.07.009
- [27] Auguet T, Bertran L, Binetti J. Intestinal Dysbiosis and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. In: V. Beloborodova N, V. Grechko A, Hrsg. *Human Microbiome: IntechOpen*; 2021

- [28] Leung C, Rivera L, Furness JB et al. The role of the gut microbiota in NAFLD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2016; 13: 412–425; DOI: 10.1038/nrgastro.2016.85
- [29] Brunt EM, Wong VW-S, Nobili V et al. Nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Rev Dis Primers* 2015; 1: 15080; DOI: 10.1038/nrdp.2015.80
- [30] Friedman SL, Neuschwander-Tetri BA, Rinella M et al. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nat Med* 2018; 24: 908–922; DOI: 10.1038/s41591-018-0104-9
- [31] Kim WR, Flamm SL, Di Bisceglie AM et al. Serum activity of alanine aminotransferase (ALT) as an indicator of health and disease. *Hepatology* 2008; 47: 1363–1370; DOI: 10.1002/hep.22109
- [32] Sherman KE. Alanine Aminotransferase in Clinical Practice. *Arch Intern Med* 1991; 151: 260; DOI: 10.1001/archinte.1991.00400020036008
- [33] Westerbacka J, Cornér A, Tiikkainen M et al. Women and men have similar amounts of liver and intra-abdominal fat, despite more subcutaneous fat in women: implications for sex differences in markers of cardiovascular risk. *Diabetologia* 2004; 47: 1360–1369; DOI: 10.1007/s00125-004-1460-1
- [34] Schindhelm RK, Diamant M, Dekker JM et al. Alanine aminotransferase as a marker of non-alcoholic fatty liver disease in relation to type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disease. *Diabetes Metab Res Rev* 2006; 22: 437–443; DOI: 10.1002/dmrr.666
- [35] Chen Z-w, Chen L-y, Dai H-l et al. Relationship between alanine aminotransferase levels and metabolic syndrome in nonalcoholic fatty liver disease. *J Zhejiang Univ Sci B* 2008; 9: 616–622; DOI: 10.1631/jzus.B0720016
- [36] Nanji AA, French SW, Freeman JB. Serum alanine aminotransferase to aspartate aminotransferase ratio and degree of fatty liver in morbidly obese patients. *Enzyme* 1986; 36: 266–269; DOI: 10.1159/000469304
- [37] Garcia-Martinez R, Caraceni P, Bernardi M et al. Albumin: pathophysiologic basis of its role in the treatment of cirrhosis and its complications. *Hepatology* 2013; 58: 1836–1846; DOI: 10.1002/hep.26338
- [38] Sun L, Wang Q, Liu M et al. Albumin binding function is a novel biomarker for early liver damage and disease progression in non-alcoholic fatty liver disease. *Endocrine* 2020; 69: 294–302; DOI: 10.1007/s12020-020-02319-z
- [39] Doweiko JP, Nompleggi DJ. Role of albumin in human physiology and pathophysiology. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1991; 15: 207–211; DOI: 10.1177/0148607191015002207

- [40] Kawaguchi K, Sakai Y, Terashima T et al. Decline in serum albumin concentration is a predictor of serious events in nonalcoholic fatty liver disease. *Medicine (Baltimore)* 2021; 100: e26835; DOI: 10.1097/MD.00000000000026835
- [41] van der Vusse GJ. Albumin as fatty acid transporter. *Drug Metab Pharmacokinet* 2009; 24: 300–307; DOI: 10.2133/dmpk.24.300
- [42] Rothschild MA, Oratz M, Schreiber SS. Serum albumin. *Hepatology* 1988; 8: 385–401; DOI: 10.1002/hep.1840080234
- [43] Hashimoto E, Taniai M, Tokushige K. Characteristics and diagnosis of NAFLD/NASH. *J Gastroenterol Hepatol* 2013; 28 Suppl 4: 64–70; DOI: 10.1111/jgh.12271
- [44] Kleiner DE, Brunt EM, van Natta M et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005; 41: 1313–1321; DOI: 10.1002/hep.20701
- [45] Alves-Bezerra M, Cohen DE. Triglyceride Metabolism in the Liver. *Compr Physiol* 2017; 8: 1–8; DOI: 10.1002/cphy.c170012
- [46] Carvalho CCCR de, Caramujo MJ. The Various Roles of Fatty Acids. *Molecules* 2018; 23; DOI: 10.3390/molecules23102583
- [47] Diraison F, Moulin P, Beylot M. Contribution of hepatic de novo lipogenesis and reesterification of plasma non esterified fatty acids to plasma triglyceride synthesis during non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetes & Metabolism* 2003; 29: 478–485; DOI: 10.1016/S1262-3636(07)70061-7
- [48] Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ et al. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* 2005; 115: 1343–1351; DOI: 10.1172/JCI23621
- [49] Hashimoto T, Fujita T, Usuda N et al. Peroxisomal and mitochondrial fatty acid beta-oxidation in mice nullizygous for both peroxisome proliferator-activated receptor alpha and peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase. Genotype correlation with fatty liver phenotype. *J Biol Chem* 1999; 274: 19228–19236; DOI: 10.1074/jbc.274.27.19228
- [50] Bessone F, Razori MV, Roma MG. Molecular pathways of nonalcoholic fatty liver disease development and progression. *Cell Mol Life Sci* 2019; 76: 99–128; DOI: 10.1007/s00018-018-2947-0
- [51] Bartlett K, Eaton S. Mitochondrial beta-oxidation. *Eur J Biochem* 2004; 271: 462–469; DOI: 10.1046/j.1432-1033.2003.03947.x
- [52] Choi SS, Diehl AM. Hepatic triglyceride synthesis and nonalcoholic fatty liver disease. *Current Opinion in Lipidology* 2008; 19: 295–300; DOI: 10.1097/MOL.0b013e3282ff5e55

- [53] Kahn BB, Flier JS. Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 2000; 106: 473–481; DOI: 10.1172/JCI10842
- [54] Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F et al. Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* 2001; 120: 1183–1192; DOI: 10.1053/gast.2001.23256
- [55] Lomonaco R, Ortiz-Lopez C, Orsak B et al. Effect of adipose tissue insulin resistance on metabolic parameters and liver histology in obese patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2012; 55: 1389–1397; DOI: 10.1002/hep.25539
- [56] Diraison F, Beylot M. Role of human liver lipogenesis and reesterification in triglycerides secretion and in FFA reesterification. *Am J Physiol* 1998; 274: E321-7; DOI: 10.1152/ajpendo.1998.274.2.E321
- [57] Dif N, Euthine V, Gonnet E et al. Insulin activates human sterol-regulatory-element-binding protein-1c (SREBP-1c) promoter through SRE motifs. *Biochem J* 2006; 400: 179–188; DOI: 10.1042/BJ20060499
- [58] Latasa M-J, Griffin MJ, Moon YS et al. Occupancy and function of the -150 sterol regulatory element and -65 E-box in nutritional regulation of the fatty acid synthase gene in living animals. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 5896–5907; DOI: 10.1128/MCB.23.16.5896-5907.2003
- [59] Hillgartner FB, Salati LM, Goodridge AG. Physiological and molecular mechanisms involved in nutritional regulation of fatty acid synthesis. *Physiol Rev* 1995; 75: 47–76; DOI: 10.1152/physrev.1995.75.1.47
- [60] Dorn C, Riener M-O, Kirovski G et al. Expression of fatty acid synthase in nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Clin Exp Pathol* 2010; 3: 505–514
- [61] Higuchi N, Kato M, Shundo Y et al. Liver X receptor in cooperation with SREBP-1c is a major lipid synthesis regulator in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res* 2008; 38: 1122–1129; DOI: 10.1111/j.1872-034x.2008.00382.x
- [62] Joseph SB, Laffitte BA, Patel PH et al. Direct and indirect mechanisms for regulation of fatty acid synthase gene expression by liver X receptors. *J Biol Chem* 2002; 277: 11019–11025; DOI: 10.1074/jbc.M111041200
- [63] Mahley RW, Hussain MM. Chylomicron and chylomicron remnant catabolism. *Current Opinion in Lipidology* 1991; 2: 170–176; DOI: 10.1097/00041433-199106000-00005
- [64] Mahley RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 1988; 240: 622–630; DOI: 10.1126/science.3283935

- [65] Cooper AD. Hepatic uptake of chylomicron remnants. *J Lipid Res* 1997; 38: 2173–2192; DOI: 10.1016/S0022-2275(20)34932-4
- [66] Willnow TE. Mechanisms of hepatic chylomicron remnant clearance. *Diabet Med* 1997; 14 Suppl 3: S75-80; DOI: 10.1002/(sici)1096-9136(199708)14:3
- [67] Nakajima K, Nakano T, Tokita Y et al. Postprandial lipoprotein metabolism: VLDL vs chylomicrons. *Clin Chim Acta* 2011; 412: 1306–1318; DOI: 10.1016/j.cca.2011.04.018
- [68] van den Berg EH, Corsetti JP, Bakker SJL et al. Plasma ApoE elevations are associated with NAFLD: The PREVEND Study. *PLoS One* 2019; 14: e0220659; DOI: 10.1371/journal.pone.0220659
- [69] Kohjima M, Enjoji M, Higuchi N et al. Re-evaluation of fatty acid metabolism-related gene expression in nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Med* 2007; DOI: 10.3892/ijmm.20.3.351
- [70] Eaton S. Control of mitochondrial beta-oxidation flux. *Progress in Lipid Research* 2002; 41: 197–239; DOI: 10.1016/s0163-7827(01)00024-8
- [71] BARRERO MJ, CAMARERO N, MARRERO PF et al. Control of human carnitine palmitoyltransferase II gene transcription by peroxisome proliferator-activated receptor through a partially conserved peroxisome proliferator-responsive element. *Biochemical Journal* 2003; 369: 721–729; DOI: 10.1042/bj20020851
- [72] Vluggens A, Andreoletti P, Viswakarma N et al. Reversal of mouse Acyl-CoA oxidase 1 (ACOX1) null phenotype by human ACOX1b isoform corrected. *Lab Invest* 2010; 90: 696–708; DOI: 10.1038/labinvest.2010.46
- [73] Fletcher JA, Deja S, Satapati S et al. Impaired ketogenesis and increased acetyl-CoA oxidation promote hyperglycemia in human fatty liver. *JCI Insight* 2019; 5; DOI: 10.1172/jci.insight.127737
- [74] H.A. Krebs. Rate control of the tricarboxylic acid cycle. *Advances in Enzyme Regulation* 1970; 8: 335–353; DOI: 10.1016/0065-2571(70)90028-2
- [75] Croci I, Byrne NM, Choquette S et al. Whole-body substrate metabolism is associated with disease severity in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Gut* 2013; 62: 1625–1633; DOI: 10.1136/gutjnl-2012-302789
- [76] Simonen P, Kotronen A, Hallikainen M et al. Cholesterol synthesis is increased and absorption decreased in non-alcoholic fatty liver disease independent of obesity. *J Hepatol* 2011; 54: 153–159; DOI: 10.1016/j.jhep.2010.05.037

- [77] Sakakura Y, Shimano H, Sone H et al. Sterol Regulatory Element-Binding Proteins Induce an Entire Pathway of Cholesterol Synthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2001; 286: 176–183; DOI: 10.1006/bbrc.2001.5375
- [78] Charlton-Menys V, Durrington PN. Human cholesterol metabolism and therapeutic molecules. *Experimental Physiology* 2008; 93: 27–42; DOI: 10.1113/expphysiol.2006.035147
- [79] Caballero F, Fernández A, Lacy AM de et al. Enhanced free cholesterol, SREBP-2 and StAR expression in human NASH. *J Hepatol* 2009; 50: 789–796; DOI: 10.1016/j.jhep.2008.12.016
- [80] Jonas A. Lipoprotein structure. In: . *New Comprehensive Biochemistry : Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, 4th edition: Elsevier; 2002: 483–504
- [81] Rothblat GH, Phillips MC. High-density lipoprotein heterogeneity and function in reverse cholesterol transport. *Current Opinion in Lipidology* 2010; 21: 229–238; DOI: 10.1097/mol.0b013e328338472d
- [82] Deprince A, Haas JT, Staels B. Dysregulated lipid metabolism links NAFLD to cardiovascular disease. *Mol Metab* 2020; 42: 101092; DOI: 10.1016/j.molmet.2020.101092
- [83] Kasper P, Martin A, Lang S et al. NAFLD and cardiovascular diseases: a clinical review. *Clin Res Cardiol* 2021; 110: 921–937; DOI: 10.1007/s00392-020-01709-7
- [84] Wellen KE, Hotamisligil GS. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003; 112: 1785–1788; DOI: 10.1172/JCI20514
- [85] Arrese M, Cabrera D, Kalergis AM et al. Innate Immunity and Inflammation in NAFLD/NASH. *Dig Dis Sci* 2016; 61: 1294–1303; DOI: 10.1007/s10620-016-4049-x
- [86] Ahima RS, Flier JS. Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 2000; 11: 327–332; DOI: 10.1016/S1043-2760(00)00301-5
- [87] Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 1993; 259: 87–91; DOI: 10.1126/science.7678183
- [88] Elks CM, Francis J. Central adiposity, systemic inflammation, and the metabolic syndrome. *Curr Hypertens Rep* 2010; 12: 99–104; DOI: 10.1007/s11906-010-0096-4
- [89] Saltiel AR, Olefsky JM. Inflammatory mechanisms linking obesity and metabolic disease. *J Clin Invest* 2017; 127: 1–4; DOI: 10.1172/JCI92035

- [90] Hotamisligil GS. Molecular mechanisms of insulin resistance and the role of the adipocyte. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000; 24 Suppl 4: S23-7; DOI: 10.1038/sj.ijo.0801497
- [91] Hotamisligil GS, Murray DL, Choy LN et al. Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 4854–4858; DOI: 10.1073/pnas.91.11.4854
- [92] Jager J, Grémeaux T, Cormont M et al. Interleukin-1beta-induced insulin resistance in adipocytes through down-regulation of insulin receptor substrate-1 expression. *Endocrinology* 2007; 148: 241–251; DOI: 10.1210/en.2006-0692
- [93] Tilg H, Hotamisligil GS. Nonalcoholic fatty liver disease: Cytokine-adipokine interplay and regulation of insulin resistance. *Gastroenterology* 2006; 131: 934–945; DOI: 10.1053/j.gastro.2006.05.054
- [94] Wan J, Benkdane M, Teixeira-Clerc F et al. M2 Kupffer cells promote M1 Kupffer cell apoptosis: a protective mechanism against alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2014; 59: 130–142; DOI: 10.1002/hep.26607
- [95] Chen Y, Yu C-Y, Deng W-M. The role of pro-inflammatory cytokines in lipid metabolism of metabolic diseases. *Int Rev Immunol* 2019; 38: 249–266; DOI: 10.1080/08830185.2019.1645138
- [96] Koyama Y, Brenner DA. Liver inflammation and fibrosis. *J Clin Invest* 2017; 127: 55–64; DOI: 10.1172/JCI88881
- [97] Frederich RC, Hamann A, Anderson S et al. Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat Med* 1995; 1: 1311–1314; DOI: 10.1038/nm1295-1311
- [98] Toshinai K, Date Y, Murakami N et al. Ghrelin-induced food intake is mediated via the orexin pathway. *Endocrinology* 2003; 144: 1506–1512; DOI: 10.1210/en.2002-220788
- [99] Martínez-Garza Ú, Torres-Oteros D, Yarritu-Gallego A et al. Fibroblast Growth Factor 21 and the Adaptive Response to Nutritional Challenges. *Int J Mol Sci* 2019; 20; DOI: 10.3390/ijms20194692
- [100] Nishimura T, Nakatake Y, Konishi M et al. Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1492: 203–206; DOI: 10.1016/s0167-4781(00)00067-1
- [101] Ogawa Y, Kurosu H, Yamamoto M et al.  $\beta$ Klotho is required for metabolic activity of fibroblast growth factor 21. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 7432–7437; DOI: 10.1073/pnas.0701600104

- [102] Kurosu H, Choi M, Ogawa Y et al. Tissue-specific expression of betaKlotho and fibroblast growth factor (FGF) receptor isoforms determines metabolic activity of FGF19 and FGF21. *J Biol Chem* 2007; 282: 26687–26695; DOI: 10.1074/jbc.M704165200
- [103] Ito S, Kinoshita S, Shiraishi N et al. Molecular cloning and expression analyses of mouse  $\beta$ klotho, which encodes a novel Klotho family protein. *Mechanisms of Development* 2000; 98: 115–119; DOI: 10.1016/s0925-4773(00)00439-1
- [104] Adams AC, Cheng CC, Coskun T et al. FGF21 requires  $\beta$ klotho to act in vivo. *PLoS One* 2012; 7: e49977; DOI: 10.1371/journal.pone.0049977
- [105] Lee S, Choi J, Mohanty J et al. Structures of  $\beta$ -klotho reveal a 'zip code'-like mechanism for endocrine FGF signalling. *Nature* 2018; 553: 501–505; DOI: 10.1038/nature25010
- [106] Kharitononkov A, Shiyanova TL, Koester A et al. FGF-21 as a novel metabolic regulator. *J Clin Invest* 2005; 115: 1627–1635; DOI: 10.1172/JCI23606
- [107] Izumiya Y, Bina HA, Ouchi N et al. FGF21 is an Akt-regulated myokine. *FEBS Lett* 2008; 582: 3805–3810; DOI: 10.1016/j.febslet.2008.10.021
- [108] Bookout AL, Groot MHM de, Owen BM et al. FGF21 regulates metabolism and circadian behavior by acting on the nervous system. *Nat Med* 2013; 19: 1147–1152; DOI: 10.1038/nm.3249
- [109] Inagaki T, Dutchak P, Zhao G et al. Endocrine regulation of the fasting response by PPAR $\alpha$ -mediated induction of fibroblast growth factor 21. *Cell Metab* 2007; 5: 415–425; DOI: 10.1016/j.cmet.2007.05.003
- [110] Badman MK, Pissios P, Kennedy AR et al. Hepatic fibroblast growth factor 21 is regulated by PPAR $\alpha$  and is a key mediator of hepatic lipid metabolism in ketotic states. *Cell Metab* 2007; 5: 426–437; DOI: 10.1016/j.cmet.2007.05.002
- [111] Wente W, Efanov AM, Brenner M et al. Fibroblast growth factor-21 improves pancreatic beta-cell function and survival by activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and Akt signaling pathways. *Diabetes* 2006; 55: 2470–2478; DOI: 10.2337/db05-1435
- [112] Singhal G, Fisher FM, Chee MJ et al. Fibroblast Growth Factor 21 (FGF21) Protects against High Fat Diet Induced Inflammation and Islet Hyperplasia in Pancreas. *PLoS One* 2016; 11: e0148252; DOI: 10.1371/journal.pone.0148252
- [113] Arner P, Pettersson A, Mitchell PJ et al. FGF21 attenuates lipolysis in human adipocytes - a possible link to improved insulin sensitivity. *FEBS Lett* 2008; 582: 1725–1730; DOI: 10.1016/j.febslet.2008.04.038

- [114] Camporez JPG, Asrih M, Zhang D et al. Hepatic insulin resistance and increased hepatic glucose production in mice lacking Fgf21. *J Endocrinol* 2015; 226: 207–217; DOI: 10.1530/JOE-15-0136
- [115] Li Y, Wong K, Giles A et al. Hepatic SIRT1 attenuates hepatic steatosis and controls energy balance in mice by inducing fibroblast growth factor 21. *Gastroenterology* 2014; 146: 539-49.e7; DOI: 10.1053/j.gastro.2013.10.059
- [116] Mashili FL, Austin RL, Deshmukh AS et al. Direct effects of FGF21 on glucose uptake in human skeletal muscle: implications for type 2 diabetes and obesity. *Diabetes Metab Res Rev* 2011; 27: 286–297; DOI: 10.1002/dmrr.1177
- [117] Zhang C, Huang Z, Gu J et al. Fibroblast growth factor 21 protects the heart from apoptosis in a diabetic mouse model via extracellular signal-regulated kinase 1/2-dependent signalling pathway. *Diabetologia* 2015; 58: 1937–1948; DOI: 10.1007/s00125-015-3630-8
- [118] Planavila A, Redondo I, Hondares E et al. Fibroblast growth factor 21 protects against cardiac hypertrophy in mice. *Nat Commun* 2013; 4: 2019; DOI: 10.1038/ncomms3019
- [119] Wei W, Dutchak PA, Wang X et al. Fibroblast growth factor 21 promotes bone loss by potentiating the effects of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ . *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109: 3143–3148; DOI: 10.1073/pnas.1200797109
- [120] Kim HW, Lee JE, Cha JJ et al. Fibroblast growth factor 21 improves insulin resistance and ameliorates renal injury in db/db mice. *Endocrinology* 2013; 154: 3366–3376; DOI: 10.1210/en.2012-2276
- [121] Gavaldà-Navarro A, Hondares E, Giralt M et al. Fibroblast growth factor 21 in breast milk controls neonatal intestine function. *Sci Rep* 2015; 5: 13717; DOI: 10.1038/srep13717
- [122] Dushay J, Chui PC, Gopalakrishnan GS et al. Increased fibroblast growth factor 21 in obesity and nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2010; 139: 456–463; DOI: 10.1053/j.gastro.2010.04.054
- [123] Gimeno RE, Moller DE. FGF21-based pharmacotherapy--potential utility for metabolic disorders. *Trends Endocrinol Metab* 2014; 25: 303–311; DOI: 10.1016/j.tem.2014.03.001
- [124] Gallego-Escuredo JM, Gómez-Ambrosi J, Catalan V et al. Opposite alterations in FGF21 and FGF19 levels and disturbed expression of the receptor machinery for endocrine FGFs in obese patients. *Int J Obes (Lond)* 2015; 39: 121–129; DOI: 10.1038/ijo.2014.76
- [125] Fisher FM, Chui PC, Antonellis PJ et al. Obesity is a fibroblast growth factor 21 (FGF21)-resistant state. *Diabetes* 2010; 59: 2781–2789; DOI: 10.2337/db10-0193

- [126] Díaz-Delfín J, Hondares E, Iglesias R et al. TNF- $\alpha$  represses  $\beta$ -Klotho expression and impairs FGF21 action in adipose cells: involvement of JNK1 in the FGF21 pathway. *Endocrinology* 2012; 153: 4238–4245; DOI: 10.1210/en.2012-1193
- [127] Geng L, Liao B, Jin L et al. Exercise Alleviates Obesity-Induced Metabolic Dysfunction via Enhancing FGF21 Sensitivity in Adipose Tissues. *Cell Rep* 2019; 26: 2738-2752.e4; DOI: 10.1016/j.celrep.2019.02.014
- [128] Kharitononkov A, DiMarchi R. Fibroblast growth factor 21 night watch: advances and uncertainties in the field. *J Intern Med* 2017; 281: 233–246; DOI: 10.1111/joim.12580
- [129] Deedwania PC, Volkova N. Current Treatment Options for the Metabolic Syndrome. *Curr Treat Options Cardiovasc Med* 2005; 7: 61–74; DOI: 10.1007/s11936-005-0007-1
- [130] Ballantyne DA. Starvation therapy in obesity. *Br Med J* 1971; 3: 370; DOI: 10.1136/bmj.3.5770.370-c
- [131] Johnstone A. Fasting for weight loss: an effective strategy or latest dieting trend? *Int J Obes (Lond)* 2015; 39: 727–733; DOI: 10.1038/ijo.2014.214
- [132] Pacy PJ, Webster J, Garrow JS. Exercise and obesity. *Sports Med* 1986; 3: 89–113; DOI: 10.2165/00007256-198603020-00002
- [133] Shirakawa K, Endo J, Katsumata Y et al. Negative legacy of obesity. *PLoS One* 2017; 12: e0186303; DOI: 10.1371/journal.pone.0186303
- [134] Redman LM, Heilbronn LK, Martin CK et al. Effect of calorie restriction with or without exercise on body composition and fat distribution. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 865–872; DOI: 10.1210/jc.2006-2184
- [135] Bell RR, Spencer MJ, Sherriff JL. Diet-induced obesity in mice can be treated without energy restriction using exercise and/or a low fat diet. *J Nutr* 1995; 125: 2356–2363; DOI: 10.1093/jn/125.9.2356
- [136] Swift DL, McGee JE, Earnest CP et al. The Effects of Exercise and Physical Activity on Weight Loss and Maintenance. *Prog Cardiovasc Dis* 2018; 61: 206–213; DOI: 10.1016/j.pcad.2018.07.014
- [137] Chaix A, Zarrinpar A, Miu P et al. Time-restricted feeding is a preventative and therapeutic intervention against diverse nutritional challenges. *Cell Metab* 2014; 20: 991–1005; DOI: 10.1016/j.cmet.2014.11.001
- [138] Vitaterna MH, Takahashi JS, Turek FW. Overview of circadian rhythms. *Alcohol Res Health* 2001; 25: 85–93
- [139] Froy O. Circadian rhythms, aging, and life span in mammals. *Physiology (Bethesda)* 2011; 26: 225–235; DOI: 10.1152/physiol.00012.2011

- [140] Moore RY, Eichler VB. Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res* 1972; 42: 201–206; DOI: 10.1016/0006-8993(72)90054-6
- [141] KLEITMAN N. Biological rhythms and cycles. *Physiol Rev* 1949; 29: 1–30; DOI: 10.1152/physrev.1949.29.1.1
- [142] Panda S, Antoch MP, Miller BH et al. Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell* 2002; 109: 307–320; DOI: 10.1016/s0092-8674(02)00722-5
- [143] Bray MS, Young ME. The role of cell-specific circadian clocks in metabolism and disease. *Obes Rev* 2009; 10 Suppl 2: 6–13; DOI: 10.1111/j.1467-789X.2009.00684.x
- [144] Mindikoglu AL, Opekun AR, Gagan SK et al. Impact of Time-Restricted Feeding and Dawn-to-Sunset Fasting on Circadian Rhythm, Obesity, Metabolic Syndrome, and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterol Res Pract* 2017: 3932491; DOI: 10.1155/2017/3932491
- [145] Hatori M, Vollmers C, Zarrinpar A et al. Time restricted feeding without reducing caloric intake prevents metabolic diseases in mice fed a high fat diet. *Cell Metab* 2012; 15: 848–860; DOI: 10.1016/j.cmet.2012.04.019
- [146] Gill S, Panda S. A Smartphone App Reveals Erratic Diurnal Eating Patterns in Humans that Can Be Modulated for Health Benefits. *Cell Metab* 2015; 22: 789–798; DOI: 10.1016/j.cmet.2015.09.005
- [147] Collins S, Martin TL, Surwit RS et al. Genetic vulnerability to diet-induced obesity in the C57BL/6J mouse: physiological and molecular characteristics. *Physiol Behav* 2004; 81: 243–248; DOI: 10.1016/j.physbeh.2004.02.006
- [148] Fraulob JC, Ogg-Diamantino R, Fernandes-Santos C et al. A Mouse Model of Metabolic Syndrome: Insulin Resistance, Fatty Liver and Non-Alcoholic Fatty Pancreas Disease (NAFPD) in C57BL/6 Mice Fed a High Fat Diet. *J Clin Biochem Nutr* 2010; 46: 212–223; DOI: 10.3164/jcbtn.09-83
- [149] E. A. Ulman PD. The “Original” High-Fat Diets for Diet Induced Obesity
- [150] Marinho R, Munõz VR, Pauli LSS et al. Endurance training prevents inflammation and apoptosis in hypothalamic neurons of obese mice. *J Cell Physiol* 2018; 234: 880–890; DOI: 10.1002/jcp.26909
- [151] Goodwin ML, Harris JE, Hernández A et al. Blood lactate measurements and analysis during exercise: a guide for clinicians. *J Diabetes Sci Technol* 2007; 1: 558–569; DOI: 10.1177/193229680700100414

- [152] Billat VL, Sirvent P, Py G et al. The concept of maximal lactate steady state: a bridge between biochemistry, physiology and sport science. *Sports Med* 2003; 33: 407–426; DOI: 10.2165/00007256-200333060-00003
- [153] Ferreira JCB, Rolim NPL, Bartholomeu JB et al. Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007; 34: 760–765; DOI: 10.1111/j.1440-1681.2007.04635.x
- [154] Sundaram S, Yan L. Time-restricted feeding reduces adiposity in mice fed a high-fat diet. *Nutr Res* 2016; 36: 603–611; DOI: 10.1016/j.nutres.2016.02.005
- [155] Liebig M, Hassanzada A, Kämmerling M et al. Microcirculatory disturbances and cellular changes during progression of hepatic steatosis to liver tumors. *Exp Biol Med* (Maywood) 2018; 243: 1–12; DOI: 10.1177/1535370217738730
- [156] Bedossa P. Current histological classification of NAFLD: strength and limitations. *Hepatol Int* 2013; 7 Suppl 2: 765–770; DOI: 10.1007/s12072-013-9446-z
- [157] Mehlem A, Hagberg CE, Muhl L et al. Imaging of neutral lipids by oil red O for analyzing the metabolic status in health and disease. *Nat Protoc* 2013; 8: 1149–1154; DOI: 10.1038/nprot.2013.055
- [158] Ramírez-Zacarías JL, Castro-Muñozledo F, Kuri-Harcuch W. Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with Oil red O. *Histochemistry* 1992; 97: 493–497; DOI: 10.1007/BF00316069
- [159] GOMORI G. Chloroacyl esters as histochemical substrates. *J Histochem Cytochem* 1953; 1: 469–470; DOI: 10.1177/1.6.469
- [160] Lüllmann-Rauch R, Asan E. Taschenbuch Histologie. 5. Aufl. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag; 2015
- [161] Merck KGaA. Leucognost NASDCL Neu: Nachweis der Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase in Granulocyten. Im Internet: [https://www.merckmillipore.com/INTERSHOP/web/WFS/Merck-BE-Site/fr\\_FR/-/EUR/ShowDocument-File?ProductSKU=MDA\\_CHEM-117198&DocumentType=MSD&DocumentId=117198\\_DE\\_BE.PDF&DocumentUID=82194293&Language=DE&Country=BE&Origin=PDP](https://www.merckmillipore.com/INTERSHOP/web/WFS/Merck-BE-Site/fr_FR/-/EUR/ShowDocument-File?ProductSKU=MDA_CHEM-117198&DocumentType=MSD&DocumentId=117198_DE_BE.PDF&DocumentUID=82194293&Language=DE&Country=BE&Origin=PDP); Stand: 14.12.2020
- [162] Mahmood T, Yang P-C. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci* 2012; 4: 429–434; DOI: 10.4103/1947-2714.100998
- [163] Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76: 4350–4354; DOI: 10.1073/pnas.76.9.4350

- [164] Da Silva-Santi LG, Antunes MM, Caparroz-Assef SM et al. Liver Fatty Acid Composition and Inflammation in Mice Fed with High-Carbohydrate Diet or High-Fat Diet. *Nutrients* 2016; 8; DOI: 10.3390/nu8110682
- [165] George V, Tremblay A, Després JP et al. Effect of dietary fat content on total and regional adiposity in men and women. *Int J Obes* 1990; 14: 1085–1094
- [166] Salmon DM, Flatt JP. Effect of dietary fat content on the incidence of obesity among ad libitum fed mice. *Int J Obes* 1985; 9: 443–449
- [167] Weiner RA. *Neue Chancen bei Adipositas: Magenband, Magenbypass, Magenschrittmacher: Erfolge, Risiken, Kosten: das sollten Sie wissen.* Stuttgart: TRIAS; 2002
- [168] Astrup A. The role of dietary fat in the prevention and treatment of obesity. Efficacy and safety of low-fat diets. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001; 25 Suppl 1: S46-50; DOI: 10.1038/sj.ijo.0801698
- [169] Laing BT, Do K, Matsubara T et al. Voluntary exercise improves hypothalamic and metabolic function in obese mice. *J Endocrinol* 2016; 229: 109–122; DOI: 10.1530/JOE-15-0510
- [170] Yang W, Liu L, Wei Y et al. Exercise ameliorates the FGF21-adiponectin axis impairment in diet-induced obese mice. *Endocr Connect* 2019; 8: 596–604; DOI: 10.1530/EC-19-0034
- [171] Ringseis R, Mooren F-C, Keller J et al. Regular endurance exercise improves the diminished hepatic carnitine status in mice fed a high-fat diet. *Mol Nutr Food Res* 2011; 55 Suppl 2: S193-202; DOI: 10.1002/mnfr.201100040
- [172] Delahaye LB, Bloomer RJ, Butawan MB et al. Time-restricted feeding of a high-fat diet in male C57BL/6 mice reduces adiposity but does not protect against increased systemic inflammation. *Appl Physiol Nutr Metab* 2018; 43: 1033–1042; DOI: 10.1139/apnm-2017-0706
- [173] Arble DM, Bass J, Laposky AD et al. Circadian timing of food intake contributes to weight gain. *Obesity (Silver Spring)* 2009; 17: 2100–2102; DOI: 10.1038/oby.2009.264
- [174] Considine RV, Sinha MK, Heiman ML et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* 1996; 334: 292–295; DOI: 10.1056/NEJM199602013340503
- [175] Barbier M, Vidal H, Desreumaux P et al. Overexpression of leptin mRNA in mesenteric adipose tissue in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterol Clin Biol* 2003; 27: 987–991

## Literatur

- [176] Masuzaki H, Ogawa Y, Isse N et al. Human obese gene expression. Adipocyte-specific expression and regional differences in the adipose tissue. *Diabetes* 1995; 44: 855–858; DOI: 10.2337/diab.44.7.855
- [177] Hube F, Lietz U, Igel M et al. Difference in leptin mRNA levels between omental and subcutaneous abdominal adipose tissue from obese humans. *Horm Metab Res* 1996; 28: 690–693; DOI: 10.1055/s-2007-979879
- [178] Kulkarni RN, Wang ZL, Wang RM et al. Leptin rapidly suppresses insulin release from insulinoma cells, rat and human islets and, in vivo, in mice. *J Clin Invest* 1997; 100: 2729–2736; DOI: 10.1172/JCI119818
- [179] Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB et al. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* 1995; 269: 540–543; DOI: 10.1126/science.7624776
- [180] Wang ZW, Zhou YT, Kakuma T et al. Comparing the hypothalamic and extrahypothalamic actions of endogenous hyperleptinemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 10373–10378; DOI: 10.1073/pnas.96.18.10373
- [181] Wang MY, Lee Y, Unger RH. Novel form of lipolysis induced by leptin. *J Biol Chem* 1999; 274: 17541–17544; DOI: 10.1074/jbc.274.25.17541
- [182] Bornstein SR, Abu-Asab M, Glasow A et al. Immunohistochemical and ultrastructural localization of leptin and leptin receptor in human white adipose tissue and differentiating human adipose cells in primary culture. *Diabetes* 2000; 49: 532–538; DOI: 10.2337/diabetes.49.4.532
- [183] Bryson JM, Phuyal JL, Swan V et al. Leptin has acute effects on glucose and lipid metabolism in both lean and gold thioglucose-obese mice. *Am J Physiol* 1999; 277: E417–22; DOI: 10.1152/ajpendo.1999.277.3.e417
- [184] Fukuda H, Iritani N, Sugimoto T et al. Transcriptional regulation of fatty acid synthase gene by insulin/glucose, polyunsaturated fatty acid and leptin in hepatocytes and adipocytes in normal and genetically obese rats. *Eur J Biochem* 1999; 260: 505–511; DOI: 10.1046/j.1432-1327.1999.00183.x
- [185] Straznicki NE, O'Callaghan CJ, Barrington VE et al. Hypotensive effect of low-fat, high-carbohydrate diet can be independent of changes in plasma insulin concentrations. *Hypertension* 1999; 34: 580–585; DOI: 10.1161/01.HYP.34.4.580
- [186] Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice guideline by the American Gastroenterological Association, American Association for the Study of Liver Diseases, and American College

- of Gastroenterology. *Gastroenterology* 2012; 142: 1592–1609; DOI: 10.1053/j.gastro.2012.04.001
- [187] Schaefer EJ, Levy RI, Ernst ND et al. The effects of low cholesterol, high polyunsaturated fat, and low fat diets on plasma lipid and lipoprotein cholesterol levels in normal and hypercholesterolemic subjects. *Am J Clin Nutr* 1981; 34: 1758–1763; DOI: 10.1093/ajcn/34.9.1758
- [188] Gordon B, Chen S, Durstine JL. The effects of exercise training on the traditional lipid profile and beyond. *Curr Sports Med Rep* 2014; 13: 253–259; DOI: 10.1249/JSR.0000000000000073
- [189] ALEKSANDROW D, KLOPOTOWSKI T, SMIETANSKA Z. EFFECT OF PHYSICAL ACTIVITY UPON CHOLESTEROL SYNTHESIS IN THE RAT LIVER. *J Atheroscler Res* 1964; 4: 351–355; DOI: 10.1016/S0368-1319(64)80046-6
- [190] Gabel K, Hoddy KK, Haggerty N et al. Effects of 8-hour time restricted feeding on body weight and metabolic disease risk factors in obese adults: A pilot study. *Nutr Healthy Aging* 2018; 4: 345–353; DOI: 10.3233/NHA-170036
- [191] Moro T, Tinsley G, Bianco A et al. Effects of eight weeks of time-restricted feeding (16/8) on basal metabolism, maximal strength, body composition, inflammation, and cardiovascular risk factors in resistance-trained males. *Journal of Translational Medicine* 2016; 14: 290; DOI: 10.1186/s12967-016-1044-0
- [192] Jensen-Urstad APL, Semenkovich CF. Fatty acid synthase and liver triglyceride metabolism: housekeeper or messenger? *Biochim Biophys Acta* 2012; 1821: 747–753; DOI: 10.1016/j.bbailip.2011.09.017
- [193] Ameer F, Scandiuzzi L, Hasnain S et al. De novo lipogenesis in health and disease. *Metabolism* 2014; 63: 895–902; DOI: 10.1016/j.metabol.2014.04.003
- [194] Kohjima M, Higuchi N, Kato M et al. SREBP-1c, regulated by the insulin and AMPK signaling pathways, plays a role in nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Med* 2008; DOI: 10.3892/ijmm.21.4.507
- [195] Boizard M, Le Liepvre X, Lemarchand P et al. Obesity-related overexpression of fatty-acid synthase gene in adipose tissue involves sterol regulatory element-binding protein transcription factors. *J Biol Chem* 1998; 273: 29164–29171; DOI: 10.1074/jbc.273.44.29164
- [196] Repa JJ, Liang G, Ou J et al. Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *Genes Dev* 2000; 14: 2819–2830; DOI: 10.1101/gad.844900

- [197] Ghoneim RH, Ngo Sock ET, Lavoie J-M et al. Effect of a high-fat diet on the hepatic expression of nuclear receptors and their target genes: relevance to drug disposition. *Br J Nutr* 2015; 113: 507–516; DOI: 10.1017/S0007114514003717
- [198] Ito M, Suzuki J, Tsujioka S et al. Longitudinal analysis of murine steatohepatitis model induced by chronic exposure to high-fat diet. *Hepatol Res* 2007; 37: 50–57; DOI: 10.1111/j.1872-034X.2007.00008.x
- [199] Gregoire FM, Zhang Q, Smith SJ et al. Diet-induced obesity and hepatic gene expression alterations in C57BL/6J and ICAM-1-deficient mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 282: E703-13; DOI: 10.1152/ajpendo.00072.2001
- [200] Kim S, Sohn I, Ahn J-I et al. Hepatic gene expression profiles in a long-term high-fat diet-induced obesity mouse model. *Gene* 2004; 340: 99–109; DOI: 10.1016/j.gene.2004.06.015
- [201] Schwarz J-M, Linfoot P, Dare D et al. Hepatic de novo lipogenesis in normoinsulinemic and hyperinsulinemic subjects consuming high-fat, low-carbohydrate and low-fat, high-carbohydrate isoenergetic diets. *Am J Clin Nutr* 2003; 77: 43–50; DOI: 10.1093/ajcn/77.1.43
- [202] Moreno-Fernandez ME, Giles DA, Stankiewicz TE et al. Peroxisomal  $\beta$ -oxidation regulates whole body metabolism, inflammatory vigor, and pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *JCI Insight* 2018; 3; DOI: 10.1172/jci.insight.93626
- [203] Akbiyik F, Cinar K, Demirpence E et al. Ligand-induced expression of peroxisome proliferator-activated receptor alpha and activation of fatty acid oxidation enzymes in fatty liver. *Eur J Clin Invest* 2004; 34: 429–435; DOI: 10.1111/j.1365-2362.2004.01359.x
- [204] Matsuzawa-Nagata N, Takamura T, Ando H et al. Increased oxidative stress precedes the onset of high-fat diet-induced insulin resistance and obesity. *Metabolism* 2008; 57: 1071–1077; DOI: 10.1016/j.metabol.2008.03.010
- [205] Mahley RW, Rall SC. Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2000; 1: 507–537; DOI: 10.1146/annurev.genom.1.1.507
- [206] Jiang ZG, Robson SC, Yao Z. Lipoprotein metabolism in nonalcoholic fatty liver disease. *J Biomed Res* 2013; 27: 1–13; DOI: 10.7555/JBR.27.20120077
- [207] Karavia EA, Papachristou DJ, Kotsikogianni I et al. Deficiency in apolipoprotein E has a protective effect on diet-induced nonalcoholic fatty liver disease in mice. *FEBS J* 2011; 278: 3119–3129; DOI: 10.1111/j.1742-4658.2011.08238.x
- [208] KALLAI L, HAHN A, ROEDER V et al. CORRELATION BETWEEN HISTOLOGICAL FINDINGS AND SERUM TRANSAMINASE VALUES IN

- CHRONIC DISEASES OF THE LIVER. *Acta Med Scand* 1964; 175: 49–56; DOI: 10.1111/j.0954-6820.1964.tb00549.x
- [209] Panteghini M, Falsetti F, Chiari E et al. Determination of aspartate aminotransferase isoenzymes in hepatic diseases — preliminary findings. *Clinica Chimica Acta* 1983; 128: 133–140; DOI: 10.1016/0009-8981(83)90063-3
- [210] Charles River. C57BL/6 Mice: Charles River Health Profiles for C57BL/6N. Im Internet:  
<https://www.criver.com/sites/default/files/resources/C57BL6MouseModelInformationSheet.pdf>; Stand: 04.03.22
- [211] Luis DA de, Aller R, Izaola O et al. Effect of a hypocaloric diet in transaminases in nonalcoholic fatty liver disease and obese patients, relation with insulin resistance. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2008; 79: 74–78; DOI: 10.1016/j.diabres.2007.07.015
- [212] Hong F, Liu Y, Lebaka VR et al. Effect of Exercise Training on Serum Transaminases in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Physiol* 2022; 13: 894044; DOI: 10.3389/fphys.2022.894044
- [213] Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 2006; 444: 860–867; DOI: 10.1038/nature05485
- [214] van der Heijden RA, Sheedfar F, Morrison MC et al. High-fat diet induced obesity primes inflammation in adipose tissue prior to liver in C57BL/6j mice. *Aging (Albany NY)* 2015; 7: 256–268; DOI: 10.18632/aging.100738
- [215] Ganz M, Szabo G. Immune and inflammatory pathways in NASH. *Hepatol Int* 2013; 7: 771–781; DOI: 10.1007/s12072-013-9468-6
- [216] Vieira VJ, Valentine RJ, Wilund KR et al. Effects of exercise and low-fat diet on adipose tissue inflammation and metabolic complications in obese mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; 296: E1164-71; DOI: 10.1152/ajpendo.00054.2009
- [217] MACKANESS GB. Cellular resistance to infection. *J Exp Med* 1962; 116: 381–406; DOI: 10.1084/jem.116.3.381
- [218] Das SK, Balakrishnan V. Role of cytokines in the pathogenesis of non-alcoholic Fatty liver disease. *Indian J Clin Biochem* 2011; 26: 202–209; DOI: 10.1007/s12291-011-0121-7
- [219] Tilg H, Diehl AM. Cytokines in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med* 2000; 343: 1467–1476; DOI: 10.1056/NEJM200011163432007
- [220] Arner P. Human fat cell lipolysis: biochemistry, regulation and clinical role. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2005; 19: 471–482; DOI: 10.1016/j.beem.2005.07.004

- [221] Lefere S, Tacke F. Macrophages in obesity and non-alcoholic fatty liver disease: Crosstalk with metabolism. *JHEP Rep* 2019; 1: 30–43; DOI: 10.1016/j.jhepr.2019.02.004
- [222] Fischer IP, Irmeler M, Meyer CW et al. A history of obesity leaves an inflammatory fingerprint in liver and adipose tissue. *Int J Obes* 2018; 42: 507–517; DOI: 10.1038/ijo.2017.224
- [223] Omagari K, Kato S, Tsuneyama K et al. Effects of a long-term high-fat diet and switching from a high-fat to low-fat, standard diet on hepatic fat accumulation in Sprague-Dawley rats. *Dig Dis Sci* 2008; 53: 3206–3212; DOI: 10.1007/s10620-008-0303-1
- [224] Zhang X, Yeung DCY, Karpisek M et al. Serum FGF21 levels are increased in obesity and are independently associated with the metabolic syndrome in humans. *Diabetes* 2008; 57: 1246–1253; DOI: 10.2337/db07-1476
- [225] Chaix A, Lin T, Le HD et al. Time-Restricted Feeding Prevents Obesity and Metabolic Syndrome in Mice Lacking a Circadian Clock. *Cell Metab* 2019; 29: 303-319.e4; DOI: 10.1016/j.cmet.2018.08.004
- [226] Kentish SJ, Hatzinikolas G, Li H et al. Time-Restricted Feeding Prevents Ablation of Diurnal Rhythms in Gastric Vagal Afferent Mechanosensitivity Observed in High-Fat Diet-Induced Obese Mice. *J Neurosci* 2018; 38: 5088–5095; DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0052-18.2018
- [227] Chapnik N, Genzer Y, Froy O. Relationship between FGF21 and UCP1 levels under time-restricted feeding and high-fat diet. *J Nutr Biochem* 2017; 40: 116–121; DOI: 10.1016/j.jnutbio.2016.10.017
- [228] Swift DL, Houmard JA, Slentz CA et al. Effects of aerobic training with and without weight loss on insulin sensitivity and lipids. *PLoS One* 2018; 13: e0196637; DOI: 10.1371/journal.pone.0196637
- [229] Research Diets, Inc. D12492: Rodent Diet With 60 kcal% Fat. Im Internet: <https://researchdiets.com/formulas/d12492>; Stand: 15.09.2021
- [230] Reserach Diets, Inc. S10026B: RD-96 Mineral Mix. Im Internet: <https://researchdiets.com/formulas/S10026B>; Stand: 15.09.2021
- [231] Research Diets, Inc. V10001C: AIN-76A Vitamin Mix (10X Concentration). Im Internet: <https://researchdiets.com/formulas/V10001C>; Stand: 15.09.2021
- [232] Research Diets, Inc. D12450J: Rodent Diet With 10 kcal% Fat (Matching Sucrose to D12492). Im Internet: <https://researchdiets.com/formulas/d12450J>; Stand: 15.09.2021

**Lebenslauf**

## Danksagung

### **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei den nachfolgenden Personen bedanken, ohne deren Mithilfe das Anfertigen dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Zunächst gilt mein besonderer Dank Frau Prof. Dr. rer. nat. Angela Kuhla, meiner Doktormutter, für die Bereitstellung des Promotionsthemas und die jederzeit professionelle und sehr engagierte Betreuung meiner Arbeit. Ich habe mich über die gesamte Zeit sehr gut begleitet und unterstützt gefühlt. Ihre Expertise, Motivation und Ideen haben wesentlich zum Gelingen der Promotionsarbeit beigetragen.

Mein weiterer Dank gilt Frau Dr. rer. hum. Nicole Power Guerra für die Betreuung und Unterstützung bei meiner Arbeit und all die wertvollen Tipps und Anregungen. Deine „Power“ war stets eine große Motivation und hat immer gute Laune bereitet.

Frau Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar danke ich für die Möglichkeit, die Arbeit am Rudolf-Zenker- Institut für Experimentelle Chirurgie unter Ihrer Leitung durchführen zu können.

Weiterhin bedanke ich mich für die Anfertigung des Zweit- und Drittgutachtens.

Außerdem möchte ich mich bei allen weiteren Mitgliedern der AG Kuhla, insbesondere Luisa Müller, Annika Glatzel und Franziska Eyo für ihre immer zur Verfügung stehende Hilfe und den überaus wertvollen Austausch bedanken.

Ein großer Dank gilt Frau Dorothea Frenz für die Hilfe bei der histologischen Aufarbeitung der Schnittpräparate und Frau Berit Blendow, Maren Nerowski und Eva Lorbeer für die Durchführung der molekularbiologischen Analysen, Blutplasmaanalysen und *in-vitro*-Analytik.

Ich bedanke mich außerdem beim gesamten Team des Institutes für Experimentelle Chirurgie für die immer angenehme Zusammenarbeit, die wertvollen Hinweise, Anregungen und Unterstützung.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Eltern Juliane und Christoph Leyens und meinen Schwestern Johanna und Antonia. Ohne sie wäre das Studium und die Promotion nicht möglich gewesen. Ihre liebevolle und uneingeschränkte Unterstützung und immer wieder motivierenden Worte während des Studiums und beim Verfassen dieser Arbeit waren auch trotz der weiten räumlichen Entfernung ein großer Rückhalt für mich.

## Danksagung

Darüber hinaus gilt mein Dank meinen Freundinnen Ann-Sophie, Elisabeth, Lena und Miriam, die mich immer unterstützt und auch in schwierigen Zeiten aufgeheitert haben. Ohne euch wäre die Zeit des Studiums nur halb so schön, aufregend und bereichernd gewesen.

**Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel “*Hepatoprotektiver Effekt von Interventionen bei Hochfettdiät-induzierter Adipositas in der Maus*“ selbstständig unter Nutzung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe und entsprechende wörtliche und inhaltliche Aussagen markiert habe.

Diese Arbeit wurde bei keiner anderen Einrichtung als der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock zur Eröffnung des Promotionsverfahrens eingereicht.

Rostock, gez. K. Leyens