



MASTERARBEIT / MASTER'S THESIS

Titel der Masterarbeit / Title of the Master's Thesis

„Expression von Toll-like Rezeptoren (TLRs) und
myeloid differentiation primary response gene 88
(MyD88) in mononukleären Zellen des peripheren
Blutes (PBMCs) von Patienten mit nicht-
alkoholbedingter Fettlebererkrankung (NAFLD) und
Kontrollen“

verfasst von / submitted by

Esther Pilar, BSc

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of

Master of Science (MSc)

Wien, 2019 / Vienna 2019

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

A 066 838

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Masterstudium Ernährungswissenschaften
UG2002

Betreut von / Supervisor:

Univ.-Prof. Dipl. oec. troph. Dr. Ina Bergheim,
Privatdoz.

Gender Erklärung

Um den Lesefluss nicht zu stören, wurde in der vorliegenden Arbeit die Sprachform des generischen Maskulinums verwendet. Dies soll geschlechtsneutral betrachtet werden und in keinem Fall eine Benachteiligung des weiblichen Geschlechts implizieren.

Danksagung

Ich bedanke mich ganz besonders bei Frau Prof. Dr. Ina Bergheim für die intensive Betreuung, die wissenschaftliche Unterstützung und die vielen Tipps und Ratschläge sowohl bei der Durchführung der Arbeit als auch der schriftlichen Ausarbeitung.

Weiterhin bedanke ich mich herzlich bei der Arbeitsgruppe für die angenehme und freundliche Arbeitsatmosphäre. Mein besonderer Dank gilt Anika Nier, die mich stets intensiv unterstützt hat und mir sowohl bei der Rekrutierung der Probanden, der Analyse im Labor, der Datenauswertung als auch der schriftlichen Verfassung der Arbeit mit Rat und Tat zur Seite stand. Außerdem bedanke ich mich herzlich bei Anja Baumann, Annette Brandt, Finn Jung, Beate Gärtner, Dragana Rajcic und Janina Engstler, die für meine vielen Fragen immer ein offenes und geduldiges Ohr hatten. Mein Dank gilt auch meinen Kollegen Vincent Winkler, Eva-Maria Stix, Elisabeth Kaufmann, Stefanie Holper, Natalie Gray und Melanie Gsöllpointner für den gegenseitigen Austausch, die Diskussionen und die angenehme Zusammenarbeit.

Besonders möchte ich mich auch bei meiner Familie, meinem Freund sowie meinen Freunden bedanken, die mich die ganze Zeit über motiviert und an mich geglaubt haben.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis.....	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
1 Einleitung	1
1.1 Die nicht-alkoholbedingte Fettlebererkrankung (NAFLD)	1
1.2 Toll-like Rezeptoren (TLRs).....	4
1.3 Molekulare Mechanismen der Pathogenese der NAFLD – Die Darm-Leber-Achse: Bedeutung von TLRs, von Markern der intestinalen Permeabilität und von NO	7
1.4 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	10
2 Materialien.....	11
2.1 Datenerhebung der Kontrollen.....	11
2.2 Bioelektrische Impedanzanalyse (BIA).....	11
2.3 Bestimmung der Genexpression von TLRs und MyD88 auf mRNA-Ebene in PBMCs von NAFLD-Patienten und gesunden Kontrollen	12
2.4 Assays.....	15
2.5 Allgemeine Verbrauchsmaterialien und Geräte	16
3 Methoden	18
3.1 Probandenkollektiv	18
3.2 Gewinnung der Blutproben	20
3.3 Datenerhebung	21
3.4 Bioelektrische Impedanzanalyse.....	22
3.5 Bestimmung der Genexpression von TLRs und MyD88 auf mRNA-Ebene in PBMCs von NAFLD-Patienten und gesunden Kontrollen	23
3.6 Bestimmung biochemischer Parameter in Blutproben bzw. im PBMC-Zellkulturüberstand von NAFLD-Patienten und gesunden Kontrollen	29
3.7 Statistische Analyse.....	33
4 Ergebnisse	34
4.1 Charakteristika der Studienteilnehmer.....	34
4.2 Körperzusammensetzung der NAFLD-Patienten und gesunden Kontrollen.....	36
4.3 Ernährung von NAFLD-Patienten und gesunden Kontrollen	37
4.4 Marker der intestinalen Permeabilität im Blut von NAFLD-Patienten und gesunden Kontrollen	38
4.5 Konzentration an hs-CRP und NO (Nitrit/Nitrat) im Blut von NAFLD-Patienten und gesunden Kontrollen.....	39

4.6 Expression von TLRs und MyD88 mRNA in isolierten PBMCs der NAFLD-Patienten und gesunden Kontrollen	40
4.7 Expression von TLR4 und MyD88 mRNA in isolierten, mit LPS stimulierten PBMCs der NAFLD-Patienten und gesunden Kontrollen	43
4.8 Proinflammatorische Zytokine im Zellkulturüberstand von PBMCs von NAFLD-Patienten und gesunden Kontrollen	45
5 Diskussion	47
5.1 Vergleich von metabolischen und klinisch-chemischen Parametern der NAFLD-Patienten und gesunden Kontrollen	47
5.2 Vergleich der Körperzusammensetzung der NAFLD-Patienten und gesunden Kontrollen	48
5.3 Vergleich der Ernährung der NAFLD-Patienten und Kontrollen.....	49
5.4 Zusammenhang zwischen der NAFLD und der Konzentration an Markern der intestinalen Permeabilität im Blut.....	51
5.5 Zusammenhang zwischen der NAFLD und der NO- und hs-CRP-Konzentration im Blut...	52
5.6 Zusammenhang zwischen der NAFLD und der mRNA-Expression von TLRs und MyD88 sowie der Sekretion von TNF- α und IL-6 in PBMCs	53
5.7 Fazit	57
Zusammenfassung.....	59
Abstract	61
Literatur	62
Anhang.....	i

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der NAFLD-Stadien und deren geschätzte Prävalenz ...	2
Abbildung 2: Darstellung der „multiple-hit-Hypothese“ für die Entstehung der NAFLD	3
Abbildung 3: Darstellung der Erkennung von PAMPs durch TLRs an der Zelloberfläche und intrazellulär sowie der darauffolgenden Signaltransduktion	6
Abbildung 4: Darstellung der möglichen Beteiligung von LPS an der Pathogenese der NAFLD ..	8
Abbildung 5: Sandwich-ELISA-Technik	30
Abbildung 6: Endotoxin-, LBP- und Peptidoglykan-Spiegel im Plasma von NAFLD-Patienten und gesunden Kontrollen.....	38
Abbildung 7: Hs-CRP-Spiegel im Serum von NAFLD-Patienten und gesunden Kontrollen.	39
Abbildung 8: Nitrit/Nitrat-Spiegel im Plasma von NAFLD-Patienten und gesunden Kontrollen.	40
Abbildung 9: TLR1, 2, 4 und 5 mRNA-Expression in PBMCs von NAFLD-Patienten und gesunden Kontrollen.	41
Abbildung 10: TLR6, 7, 8 und 10 mRNA-Expression in PBMCs von NAFLD-Patienten und gesunden Kontrollen.....	42
Abbildung 11: Vergleich der MyD88 mRNA-Expression in PBMCs von NAFLD-Patienten und gesunden Kontrollen.....	43
Abbildung 12: Vergleich der TLR4 mRNA-Expression mit und ohne LPS-Stimulation der PBMCs von NAFLD-Patienten und gesunden Kontrollen innerhalb der Gruppen.	44
Abbildung 13: Vergleich der MyD88 mRNA-Expression mit und ohne LPS-Stimulation der PBMCs von NAFLD-Patienten und gesunden Kontrollen innerhalb der Gruppen.....	44
Abbildung 14: Vergleich der Sekretion von IL-6 und TNF- α mit und ohne LPS-Stimulation der PBMCs von NAFLD-Patienten und gesunden Kontrollen innerhalb der Gruppen.....	46

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ausschlusskriterien der Probanden.....	19
Tabelle 2: Kulturmedium für PBMCs.....	25
Tabelle 3: Mastermix (cDNA-Synthese) je Probe	27
Tabelle 4: cDNA-Synthese	27
Tabelle 5: Mastermix (PCR) je Probe:.....	28
Tabelle 6: PCR-Programm	29
Tabelle 7: Ablauf des TNF- α ELISA.....	32
Tabelle 8: Charakteristika der Studienteilnehmer	34
Tabelle 9: Klinisch-chemische Parameter der Studienteilnehmer und Referenzwerte.....	35
Tabelle 10: Körperzusammensetzung der Studienteilnehmer	36
Tabelle 11: Energie- und Makronährstoffaufnahme von NAFLD-Patienten und gesunden Kontrollen	37
Tabelle 12: WHO-Einteilung des Gewichts durch den BMI und zugehöriges Risiko für Folgeerkrankungen.....	iv
Tabelle 13: Zusammenhang zwischen dem Taillenumfang und dem Risiko für kardiovaskuläre und metabolische Komplikationen.....	iv
Tabelle 14: WHO-Definition der Waist-to-Hip-Ratio bei zentraler Adipositas	iv
Tabelle 15: Kategorien des Blutdrucks.....	v
Tabelle 16: Körperzusammensetzung der Studienteilnehmer	x
Tabelle 17: Mikronährstoffaufnahme von NAFLD-Patienten und gesunden Kontrollen.....	xi

Abkürzungsverzeichnis

ALT	Alanin-Aminotransferase
AMV	<i>avian myoblastosis virus</i>
AST	Aspartat-Aminotransferase
BIA	Bioelektrische Impedanzanalyse
BMI	Body Mass Index
CDAA-Diät	Cholin-defiziente Aminosäure-definierte-Diät
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>)
CD14	cluster of differentiation 14
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CpG	Desoxycytidin-Phosphat-Desoxyguanosin
CRP	C-reaktives Protein
DAMPs	Schaden-assoziierte molekulare Muster (<i>damage-associated molecular patterns</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DNase	Desoxyribonuklease
DNL	<i>de novo</i> Lipogenese
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dsRNA	doppelsträngige Ribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ER	endoplasmatisches Retikulum
FBS	fetales Kälberserum (<i>fetal bovine serum</i>)
FFS	freie Fettsäuren
fw	<i>forward</i>
GU	Grundumsatz
HDL	<i>high density lipoprotein</i>
H ₂ O	Wasser
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
hs-CRP	Hochsensitives C-reaktives Protein (<i>high sensitivity C-reactive protein</i>)
IκB	<i>inhibitor of NF-κB protein</i>
IKK	IκB Kinase

IL-1 β	Interleukin-1beta
IL-6	Interleukin-6
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IRF3	<i>interferon regulatory factor 3</i>
IRF7	<i>interferon regulatory factor 7</i>
K	Kontrollen
LBP	Lipopolysaccharid-bindendes Protein
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LPS	Lipopolysaccharide
LRRs	Leucin-reiche Wiederholungen (<i>leucine-rich repeats</i>)
m	männlich/Männer
MCD-Diät	Methionin-Cholin-defiziente-Diät
MD2	<i>myeloid differentiation factor 2</i>
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mRNA	messenger RNA
MW	Mittelwert
MyD88	<i>myeloid differentiation primary response gene 88</i>
NAFL	nicht-alkoholbedingte Fettleber (<i>non-alcoholic fatty liver</i>)
NAFLD	nicht-alkoholbedingte Fettlebererkrankung (<i>non-alcoholic fatty liver disease</i>)
NASH	nicht-alkoholbedingte Steatohepatitis
NF- κ B	nuclear factor kappa B
NO	Stickstoffmonoxid
NO ₂ ⁻	Nitrit
NO ₃ ⁻	Nitrat
NTC	<i>no template control</i>
PAMPs	Pathogen-assoziierte molekulare Muster (<i>pathogen-associated molecular patterns</i>)
PBMCs	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (<i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
PBS (DPBS)	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNase	Ribonuklease

RNasin	Ribonukleaseinhibitor
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>)
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute (Zellkulturmedium)
PRRs	Pattern-Recognition Rezeptoren
RT	Raumtemperatur
RTq-PCR	<i>real-time</i> quantitative Polymerase-Kettenreaktion
rv	<i>reverse</i>
SEM	Standardfehler (<i>standard error of mean</i>)
ssRNA	einzelsträngige Ribonukleinsäure
TG	Triglyceride
TIR	Toll-IL-1 (Interleukin 1)-Rezeptor
TIRAP	<i>TIR-domain-containing adapter protein</i>
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
TRAM	<i>TRIF-related adapter molecule</i>
TRIF	<i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β</i>
Typ I IFN	Typ I Interferon
UPR	ungefaltete Proteinantwort (<i>unfolded protein response</i>)
US	unstimuliert
VF	Verdünnungsfaktor
VLDL	<i>very low density lipoprotein</i>
w	weiblich/Frauen
WHO	World Health Organization
WHR	Waist-to-Hip-Ratio

1 Einleitung

1.1 Die nicht-alkoholbedingte Fettlebererkrankung (NAFLD)

Definition

Die nicht-alkoholbedingte Fettlebererkrankung (NAFLD) ist definiert als das Vorliegen einer hepatischen Steatose in $\geq 5\%$ der Hepatozyten, welche nicht durch Alkoholkonsum oder andere sekundäre Ursachen (z.B. Medikamente) hervorgerufen wurde (1,2). Mehrere Krankheitsstadien zählen zum Erscheinungsbild der NAFLD (3). Während die Steatose (Fettleber) durch eine vermehrte Einlagerung von Fett in der Leber gekennzeichnet ist, sind bei der nicht-alkoholbedingte Steatohepatitis (NASH) auch Anzeichen einer Entzündung der Leber zu finden (3,4). Aus der NASH können sich dann Fibrose, Zirrhose und in seltenen Fällen das hepatozelluläre Karzinom (HCC) entwickeln (3,4) (siehe Abbildung 1). Von diesen Stadien sind Steatose und NASH reversibel (5).

Es besteht eine Assoziation zwischen der NAFLD und Insulinresistenz sowie dem metabolischen Syndrom (6). Als Risikofaktoren für eine NAFLD gelten neben Insulinresistenz dessen phänotypische Ausprägungen, *id est* Typ 2 Diabetes, Übergewicht/Adipositas, viszerale Adipositas, arterielle Hypertonie und Hypertriglyceridämie (6). So wird die NAFLD auch als die hepatische Manifestation des metabolischen Syndroms bezeichnet (7). Unabhängig vom Alter und BMI (Body Mass Index) wurde bei Personen mit NAFLD-Patienten in der Familie ein erhöhtes Risiko für das Auftreten der Krankheit gefunden (6). Kalorien- und fettreiche Ernährungsweisen führen zu Übergewicht, Adipositas und Insulinresistenz (8). Zusätzlich weisen NAFLD-Patienten neben genereller Überernährung (9,10) oft auch einen erhöhten Konsum an gesättigten Fetten (11,12) und Zuckern (v.a. Fruktose) (12–16) auf, während Bewegungsmangel als häufige Ursache für die Krankheit gilt (17). Daher und wegen eines zugleich herrschenden Mangels an effektiven Medikamenten (4,8), ist die derzeit gängige Methode zur Behandlung der NAFLD eine Änderung des Lebensstils (Ernährung, Bewegung) und das Herbeiführen von Gewichtsverlust (4,17,18).

Prävalenz

Die NAFLD gilt als die häufigste chronische Lebererkrankung weltweit (1). Die globale Prävalenz der NAFLD beträgt laut einer Metaanalyse von Younossi et al. ca. 25%. Hierbei wurde die höchste Prävalenz im Nahen Osten (32%) und in Südamerika (31%) gefunden, während die niedrigste Prävalenz für Afrika (14%) berichtet wurde. Für Nordamerika und Europa wurde

1 Einleitung

eine Prävalenz von 24% ermittelt (2). Die in der Literatur berichtete Prävalenz für adipöse Menschen beträgt 80-90% (1,4). Da ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer NAFLD und den Komponenten des metabolischen Syndroms besteht und die Prävalenz und Inzidenz der Personen mit Adipositas, Typ 2 Diabetes, Hypertonie und Dyslipidämie zunehmen, ist auch ein Anstieg der NAFLD-Patienten zu erwarten (1,4,19). Trotz der hohen Prävalenz der NAFLD entwickeln nur wenige der betroffenen Personen eine NASH, welche dann zur Fibrose, Zirrhose und in seltenen Fällen zum hepatozellulären Karzinom fortschreiten kann. Die Mehrzahl leidet unter einfacher Steatose der Leber (3) (siehe Abbildung 1).

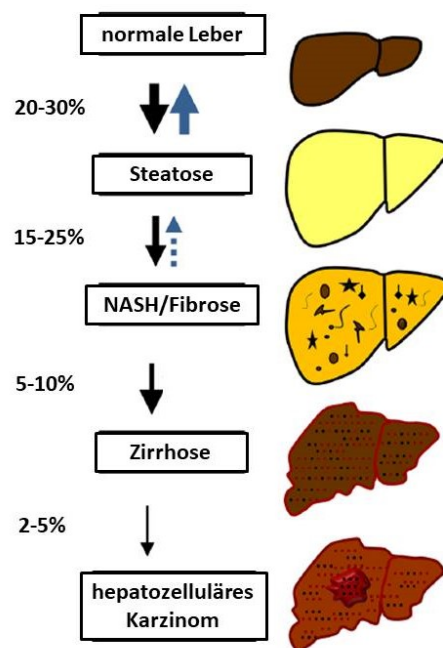


Abbildung 1: Schematische Darstellung der NAFLD-Stadien und deren geschätzte Prävalenz (modifiziert nach Alwahsh and Gebhardt, 2017 (20)). NAFLD = nicht-alkoholbedingte Fettlebererkrankung; NASH = nicht-alkoholbedingte Steatohepatitis.

Pathogenese: „multiple-hit-Hypothese“

Ursprünglich ging man bei der Pathogenese der NAFLD von einer „2-Hit-Hypothese“ aus. Dabei stellt eine Akkumulation von Fett in der Leber, welche durch einen bewegungsarmen Lebensstil, eine fettreiche Ernährung, Adipositas sowie Insulinresistenz verursacht wurde, den „1. Hit“ dar. Gleichzeitig soll dieser „1. Hit“ die Leber für den „2. Hit“ sensibilisieren (3). Der „2. Hit“, bestehend aus oxidativem Stress und Zytokinen, führt dann zu Nekrose und Entzündung und schließlich Fibrose und Zirrhose (6).

Derzeit wird jedoch von einer „multiple-hit-Hypothese“ ausgegangen, bei der viele Faktoren einen Einfluss auf die Pathogenese der NAFLD haben. Dabei handelt es sich um das parallele Auftreten von Ereignissen, die komplexe Interaktionen zwischen Umweltfaktoren, Genetik und

intestinaler Mikrobiota beinhalten, wobei als wichtige Faktoren immer noch Insulinresistenz, sowie die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und proinflammatorischen Zytokinen gelten (3,8). Diese Interaktionen können isolierte Steatose, Aktivierung des angeborenen Immunsystems, Zelltod oder progressive Leberschädigung fördern (8) (siehe Abbildung 2).

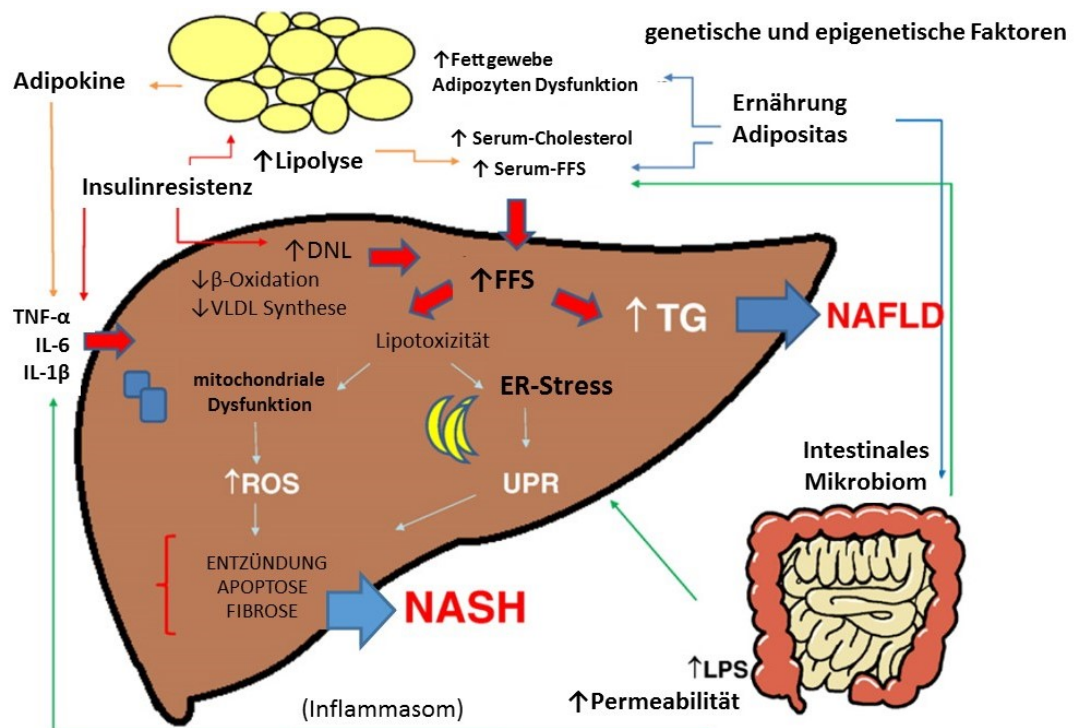


Abbildung 2: Darstellung der „multiple-hit-Hypothese“ für die Entstehung der NAFLD (modifiziert nach Buzzetti et al., 2016 (3)). Umweltfaktoren, Ernährung und Adipositas können zu erhöhten Leveln an freien Fettsäuren und Cholesterol, zur Entwicklung von Insulinresistenz, zur Proliferation von Adipozyten und deren Dysfunktion sowie zu Veränderungen des intestinalen Mikrobioms führen. Insulinresistenz wiederum verschlimmert die Adipozyten-Dysfunktion, induziert Lipolyse und die Freisetzung von Adipokinen und proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α und IL-6, welche auch zur Erhaltung der Insulinresistenz beitragen. In der Leber verstärkt Insulinresistenz die *de novo* Lipogenese. Der erhöhte Fluss an freien Fettsäuren in der Leber führt einerseits zur Synthese und Akkumulation von Triglyceriden und andererseits zu toxischen Leveln an freien Fettsäuren, freiem Cholesterol und anderen Lipidmetaboliten. Diese verursachen mitochondriale Dysfunktion mit oxidativem Stress und der Produktion von ROS. Das hat eine Entzündung der Leber zur Folge. Weiterhin kann die Permeabilität des Darms erhöht sein, was erhöhte Level an zirkulierenden Molekülen, die zur Aktivierung des Inflammasoms und Stress des ERs führen, verursacht. Zu diesen Molekülen zählen LPS und proinflammatorische Zytokine. Auch genetische Faktoren und epigenetische Modifikationen beeinflussen den Fettgehalt der Hepatozyten, enzymatische Prozesse und ein entzündliches Umfeld der Leber. FFS = freie Fettsäuren; DNL = *de novo* Lipogenese, VLDL = *very low density lipoprotein*; TNF- α = Tumornekrosefaktor-alpha; IL-6 = Interleukin-6; IL-1 β = Interleukin-1beta; TG = Triglyceride; ROS = reaktive Sauerstoffspezies; LPS = Lipopolysaccharide; NAFLD = nicht-alkoholbedingte

Fettlebererkrankung; NASH = nicht-alkoholbedingte Steatohepatitis; ER = endoplasmatisches Retikulum; UPR = ungefaltete Proteinantwort.

1.2 Toll-like Rezeptoren (TLRs)

Funktion von TLRs in der Immunabwehr

Ursprünglich wurde davon ausgegangen, dass das angeborene Immunsystem mikrobielle Bestandteile unspezifisch erkennt. Die Entdeckung der Toll-like Rezeptoren (TLRs) in den 1990ern führte jedoch zur Erkenntnis, dass dies sehr spezifisch abläuft. Mittels Pattern-Recognition Rezeptoren (PPRs), wie unter anderem TLRs, werden konservierte Strukturen fremder Pathogene, genannt Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs), detektiert (21). Dies hat die Bekämpfung der Pathogene durch das Immunsystem mittels Entzündungsreaktion und Reifung des adaptiven Immunsystems zur Folge (22). Des Weiteren können TLRs körpereigene Moleküle von geschädigten Zellen, sogenannte Schaden-assoziierte molekulare Muster (DAMPs), wie z.B. Hitzeschockproteine, Histone und mitochondriale DNA, erkennen, was ebenfalls zur Auslösung des TLR-vermittelten Signalweges und einer entzündlichen Antwort des Körpers führen kann (22,23).

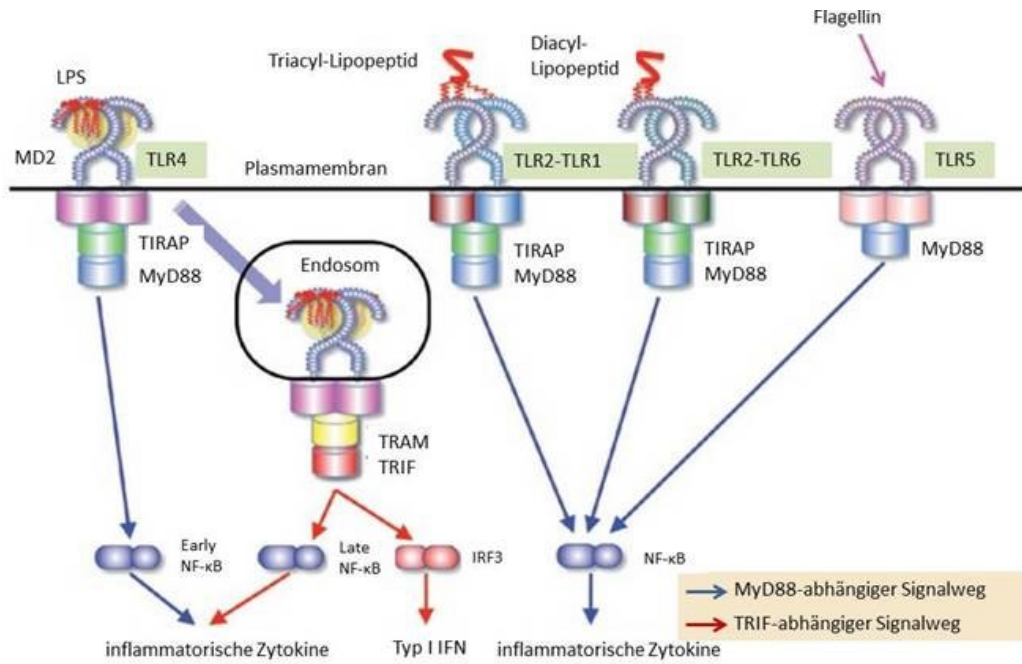
Als erstes wurden Toll-Rezeptoren in *Drosophila melanogaster* entdeckt, wobei ihnen eine wichtige Rolle bei der embryonalen Entwicklung zugeschrieben wurde. Erst danach vermutete man eine immunologische Funktion und die Entdeckung ähnlicher Proteine in Säugetieren, welche dann Toll-*like* Rezeptoren genannt wurden, folgte (24). Im Menschen wurden bis jetzt TLR1-10 identifiziert, während in Mäusen 12 TLRs (TLR1-9 und TLR11-13) bekannt sind (22). TLRs werden in Zellen des angeborenen Immunsystems, wie dendritische Zellen und Makrophagen, sowie in nicht-Immunzellen wie Fibroblasten und Epithelzellen exprimiert (22). Es handelt sich bei den TLRs um Transmembranproteine, die extrazellulär Leucin-reiche Wiederholungen (LRRs) für die Erkennung von PAMPs, eine Transmembrandomäne und eine cytoplasmatische Toll-Interleukin-1-Rezeptor(TIR)-Domäne für das Induzieren von Signalwegen besitzen (22). Sie agieren in Form von Homodimeren (z.B. TLR3/3) oder Heterodimeren (z.B. TLR2/1 und TLR2/6) (21).

Anhand ihrer zellulären Lokalisation und ihrer Liganden können TLRs in zwei Gruppen eingeteilt werden. So befinden sich TLR1, 2, 4, 5, 6 und 10 an der Plasmamembran und binden hauptsächlich mikrobielle Membranbestandteile (z.B. bakterielle Diacyl- und Triacyl-Lipopeptide, Peptidoglykane, Lipoteichonsäure, Lipopolysaccharide (LPS) und Flagellin), während TLR 3, 7, 8 und 9 intrazellulär an der Membran von Endosomen, Lysosomen, Endolysosomen oder des endoplasmatischen Retikulums zu finden sind und mikrobielle

Nukleinsäuren erkennen (z.B. virale einzelsträngige RNA (ssRNA), virale doppelsträngige RNA (dsRNA) und unmethylierte CpG (Desoxycytidin-Phosphat-Desoxyguanosin)-Motive viraler und bakterieller DNA). Nach Bindung der Liganden lösen TLRs einen Signalweg aus, der zur inflammatorischen, antibakteriellen bzw. antiviralen Antwort des Körpers führt (25). Je nach TLR werden die Adaptermoleküle MyD88 (*myeloid differentiation primary response gene 88*), TRIF (*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β*), TRAM (*TRIF-related adapter molecule*) oder TIRAP (*TIR-domain-containing adapter protein*) rekrutiert, Transkriptionsfaktoren (NF- κ B (*nuclear factor kappa B*), IRF3 (*interferon regulatory factor 3*) oder IRF7 (*interferon regulatory factor 7*)) aktiviert und schließlich inflammatorische Zytokine bzw. Typ I Interferone exprimiert (siehe Abbildung 3) (21). Die Aktivierung der TLRs ist nicht nur für die schnelle Abwehr des Körpers wie eine entzündliche Antwort zuständig, sondern hat auch die Entwicklung des antigenspezifischen adaptiven Immunsystems (Reifung von dendritischen Zellen, Induktion stimulierender Moleküle und erhöhte Antigen-präsentierende Kapazität) zur Folge und lenkt die adaptive Immunantwort auf die detektierten Pathogene (22,26,27). Diese Schritte sind essentiell für die Beseitigung von Pathogenen durch den Körper (22).

1 Einleitung

A



B

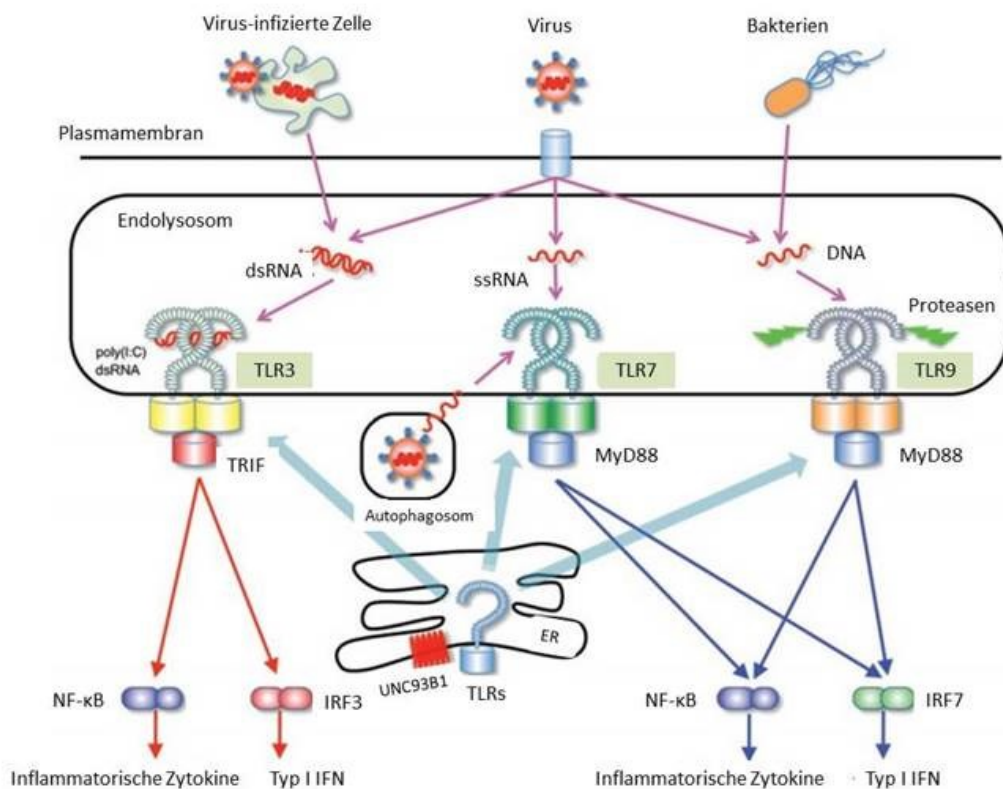


Abbildung 3: Darstellung der Erkennung von PAMPs durch TLRs an der Zelloberfläche und intrazellulär sowie der darauffolgenden Signaltransduktion (modifiziert nach Kawai and Akira, 2010 (21)). A: TLRs an der Zelloberfläche: Ein Komplex aus TLR4 und MD2 bindet LPS, ein Heterodimer aus TLR2 und TLR1 Triacyl-Lipopeptide, ein Heterodimer aus TLR2 und TLR6 Diacyl-Lipopeptide und TLR5 Flagellin. B: Intrazellulär befindliche TLRs: TLR3 bindet dsRNA von Viren, TLR7 ssRNA von Viren und TLR9 unmethylierte CpG-Motive der DNA von Bakterien oder Viren. A und B: Die anschließende Rekrutierung von Adaptermolekülen (TIRAP, MyD88, TRAM oder TRIF) führt zur Aktivierung der

Transkriptionsfaktoren NF- κ B, IRF3 bzw. IRF7 und schließlich zur Expression von inflammatorischen Zytokinen bzw. von Typ I Interferonen. Dies hat die Stimulation des angeborenen Immunsystems, Entzündung sowie die Reifung des adaptiven Immunsystems zur Folge und dient der Immunabwehr des Körpers gegenüber Pathogenen. PAMPs = Pathogen-assoziierte molekulare Muster; TLR = Toll-like Rezeptor; LPS = Lipopolysaccharide; MD2 = *myeloid differentiation factor 2*; TIR = Toll-Interleukin-1-Rezeptor; TIRAP = *TIR-domain-containing adapter protein*; MyD88 = *myeloid differentiation primary response gene 88*; TRIF = *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β* ; TRAM = *TRIF-related adapter molecule*; NF- κ B = *nuclear factor kappa B*; IRF3 = *interferon regulatory factor 3*; Typ I IFN = Typ I Interferon; dsRNA = doppelsträngige Ribonukleinsäure; ssRNA = einzelsträngige Ribonukleinsäure; DNA = Desoxyribonukleinsäure; CpG = Desoxycytidin-Phosphat-Desoxyguanosin; IRF7 = *interferon regulatory factor 7*.

1.3 Molekulare Mechanismen der Pathogenese der NAFLD – Die Darm-Leber-Achse: Bedeutung von TLRs, von Markern der intestinalen Permeabilität und von NO

Die Pathogenese der NAFLD ist derzeit noch nicht vollends geklärt, es besteht jedoch die Vermutung, dass TLRs daran beteiligt sind (8,28–30). Einige Studien zeigten, dass die Entwicklung der NAFLD mit einer veränderten Darmbarriere und erhöhten Endotoxin-Leveln einhergeht (14,31–33). Als Faktoren, die dazu führen können, werden ein erhöhter Fruktosekonsum sowie eine fettreiche Ernährung diskutiert (16,34). Weiterhin wurde bei NAFLD-Patienten eine geringere intestinale Expression von Tight Junction Proteinen (Zonula occludens-1 und Occludin), welche eine Rolle bei der Barrierefunktion des Darms spielen, gefunden (32,35). Durch eine gestörte Darmbarriere können neben Endotoxin auch andere Bakterienbestandteile in die Schleimhaut eindringen wie z.B. Peptidoglykane, Lipoteichonsäure (Wandbestandteile von gram-positiven Bakterien) und Lipoproteine von gram-positiven und gram-negativen Bakterien (36). Die Bakterienbestandteile gelangen über die Pfortader zur Leber, wo sie an TLRs binden bzw. über diese aufgenommen werden (21,37).

In Tiermodellen der NAFLD wurde eine erhöhte Translokation von Endotoxin mit einer Veränderung der TLR-Expression, der TLR-abhängigen Signalkaskaden sowie einer vermehrten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies und des Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) assoziiert (zur Übersicht siehe: (28)). So wurde auch in Studien der eigenen Arbeitsgruppe sowohl in der Leber von Mäusen mit Fruktose-induzierter Fettleber als auch in der Leber von NAFLD-Patienten eine veränderte TLR mRNA-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe gefunden (28,38).

1 Einleitung

TLR4, welcher unter anderem an der Oberfläche von Kupffer-Zellen (hepatischen Makrophagen) lokalisiert ist, bindet Endotoxin und führt zur Aktivierung von Adaptermolekülen wie MyD88. In Folge wird der Transkriptionsfaktor NF κ B aktiviert, was schließlich die Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen wie TNF- α , welcher zur Entwicklung von Insulinresistenz beitragen und Leberschäden sowie Fibrose hervorrufen kann, verursacht (21,28,39). An der Bindung von LPS (Lipopolysaccharide/Endotoxin) sind auch das Lipopolysaccharid-bindende Protein (LBP), ein akut-Phase Protein, und CD14 (*cluster of differentiation 14*) beteiligt. Sie erleichtern die Bindung von LPS durch den TLR4-MD2 (*myeloid differentiation factor 2*) Komplex, indem LBP LPS monomerisiert, bindet und LBP-LPS von CD14 gebunden und dem TLR4-MD2-Komplex präsentiert wird (21,40) (siehe Abbildung 4).

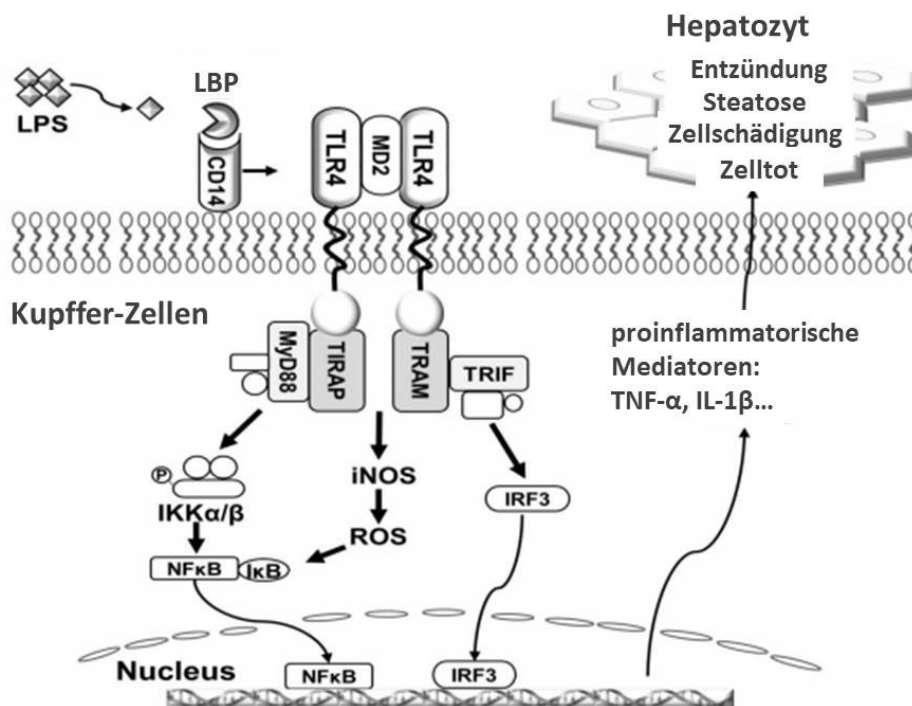


Abbildung 4: Darstellung der möglichen Beteiligung von LPS an der Pathogenese der NAFLD

(modifiziert nach Jin et. al., 2017 (29)). Lipopolysaccharide, die über die Darmbarriere gelangen, werden von LBP gebunden und induzieren TLR4-abhängige Signalkaskaden in Kupffer-Zellen (hepatischen Makrophagen). Die dadurch gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies und proinflammatorischen Mediatoren können zur Entwicklung von Insulinresistenz und der Pathogenese der NAFLD beitragen. NAFLD = nicht-alkoholbedingte Fettlebererkrankung; LPS = Lipopolysaccharide; LBP = Lipopolysaccharid-bindendes Protein; CD14 = *cluster of differentiation 14*; TLR4 = Toll-like Rezeptor 4; MD2 = *myeloid differentiation factor 2*; MyD88 = *myeloid differentiation primary response gene 88*; TIR = Toll-Interleukin-1-Rezeptor; TIRAP = *TIR-domain-containing adaptor protein*; TRIF = *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β* ; TRAM = *TRIF-related adaptor molecule*; NF- κ B = *nuclear factor kappa B*; I κ B = *inhibitor of NF- κ B protein*; IKK = I κ B Kinase; iNOS = induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase; ROS =

reaktive Sauerstoffspezies; IRF3 = *interferon regulatory factor 3*; TNF- α = Tumornekrosefaktor-alpha; IL-1 β = Interleukin-1beta.

So wiesen Studien der eigenen Arbeitsgruppe und anderer auf eine erhöhte mRNA-Expression von TLR4 (14,28,41) und dem Adaptermolekül MyD88 in der Leber von NAFLD-Patienten im Vergleich zu Kontrollen hin (28) und zeigten bei NAFLD-Patienten erhöhte LBP-Plasma- und –Serumspiegel (42–44) sowie erhöhte TNF- α -Spiegel im Blut (45,46).

Neben TNF- α wurde auch das inflammatorische Zytokin IL-6 (Interleukin-6) mit Steatose, Insulinresistenz sowie dem Entzündungsgrad der Leber und Fibrose assoziiert (zum Überblick siehe: (47)). So war die Expression von IL-6, welche positiv mit den IL-6-Plasmaspiegeln korrelierte, in der Leber von NASH-Patienten höher als jene von Patienten mit Lebersteatose und Kontrollen (48). Weiters wurde bei Kinder mit frühen Anzeichen einer NAFLD ein Trend zu erhöhten Werten an IL-6 im Serum gefunden (44).

Außerdem besteht neben der oben genannten Beschreibung des durch Endotoxin ausgelösten TLR4-abhängigen Signalweges die Diskussion, dass iNOS (induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase) und das dadurch gebildete NO (Stickstoffmonoxid) sowie andere reaktive Stickstoff- bzw. Sauerstoffspezies bei diesem Signalweg eine Rolle spielen und zur folgenden Leberschädigung beitragen (zur Übersicht siehe: (49)) (siehe Abbildung 4). Andererseits ist NO aber ein wichtiger, blutdrucksenkender Vasodilator, stellt einen Marker für vaskuläre endotheliale Dysfunktion dar und scheint im Plasma von Patienten mit Hypertonie im Vergleich zu Kontrollen erniedrigt zu sein (50–52). Zwischen Hypertonie, einem Bestandteil des metabolischen Syndroms, und der NAFLD wurde oftmals ein Zusammenhang berichtet (1,2,19).

Trotz intensiver Forschung ist jedoch die genaue Pathogenese der NAFLD und welche Rolle die TLRs, deren Signalwege und NO dabei spielen noch nicht vollends geklärt (8,28–30).

1.4 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Es besteht eine Assoziation zwischen der NAFLD und dem metabolischen Syndrom (6). So zählen Insulinresistenz und Adipositas zu den Hauptrisikofaktoren der NAFLD (6), welche selbst als die hepatische Manifestation des metabolischen Syndroms bezeichnet wird (7). Obwohl die NAFLD als die häufigste chronische Lebererkrankung weltweit gilt und ihre Prävalenz ansteigt (1,53), sind die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen der Pathogenese der NAFLD nicht vollends geklärt (28,29). Es wurde jedoch eine Assoziation der NAFLD mit einer veränderten Darmbarriere und erhöhten Endotoxin-Spiegeln gefunden (14,31–33) sowie eine Beteiligung von TLRs, deren Signalwegen (8,29,30) und NO vermutet (49).

Da die Expression der TLRs in der Leber von NAFLD-Patienten von der eigenen Arbeitsgruppe bereits untersucht wurde (28) und der Endotoxin-abhängige TLR4-Signalweg in Kupffer-Zellen (Makrophagen der Leber) im Zusammenhang mit NAFLD öfters beschrieben wurde (39,54), war das Ziel dieser Arbeit, die mRNA-Expression von TLRs und deren Signalweg in PBMCs (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes) zwischen NAFLD-Patienten und gesunden Kontrollen zu vergleichen. Weiterhin sollten die beiden Gruppen auf Unterschiede bezüglich Marker der intestinalen Permeabilität sowie NO und CRP untersucht werden.

Folgende Fragen wurden im Zuge der vorliegenden Masterarbeit bearbeitet:

- 1) Unterscheidet sich die mRNA-Expression von TLRs und MyD88 in PBMCs von NAFLD-Patienten von jener gesunder Kontrollen?
- 2) Gibt es einen Unterschied bei der mRNA-Expression von TLR4 und MyD88 sowie der Sekretion der inflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- α in PBMCs von NAFLD-Patienten und gesunden Kontrollen vor und nach der Stimulation mit LPS?
- 3) Unterscheiden sich die Spiegel an NO und CRP oder an Markern der intestinalen Permeabilität wie Endotoxin, LBP und Peptidoglykan im Blut von NAFLD-Patienten von jenen gesunder Kontrollen?

2 Materialien

2.1 Datenerhebung der Kontrollen

Erhebung von anthropometrischen Größen und des Blutdrucks

Flachwaage Seca 877	FRANK® Waagen – Maschinen, Wiener Neudorf, Österreich
Längenmessung Seca 217	FRANK® Waagen – Maschinen, Wiener Neudorf, Österreich
Umfangmessband Seca 201	FRANK® Waagen – Maschinen, Wiener Neudorf, Österreich
Blutdruckmessgerät boso medicus uno	BOSCH + SOHN GmbH u. Co. KG, Jungingen, Deutschland

Erhebung des Gesundheitszustandes und des Alkoholkonsums

Fragebogen zur Gesundheit und zum Alkoholkonsum (siehe Anhang A)

Erhebung der Ernährung

EPIC Picturebook
 24-h-Recall Formular (siehe Anhang C)
 24-h-Recall Fragenliste (siehe Anhang D)
 Laptop

2.2 Bioelektrische Impedanzanalyse (BIA)

Nutriguard – MS Body Impedance Analyzer	Data Input GmbH, Pöcking, Deutschland
Soft-Zellin Alkoholtupfer (60 mm x 30 mm)	Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland
BIANOSTIC AT® Elektroden (5x10)	Data Input GmbH, Pöcking, Deutschland
Liege	
Laptop	

2.3 Bestimmung der Genexpression von TLRs und MyD88 auf mRNA-Ebene in PBMCs von NAFLD-Patienten und gesunden Kontrollen

Isolation von PBMCs

Chemikalien:

DPBS	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Histopaque	Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, USA
ibidi Freezing Medium Classic	ibidi GmbH, Martinsried, Deutschland
Trypan Blue solution, T8154-20ML	Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, USA

Verbrauchsmaterialien und Geräte:

Sicherheitswerkbank Heraeus HS 12/2	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland
Primovert Mikroskop 415510-1100-000	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
Levo me motorized Pipette Filler YF6A000912	DLAB Scientific Co., Ltd., Beijing Airport, China
Hand Tally Counter	Tamaco Industrial Co., Ltd., Taichung, Taiwan
Neubauer Improved Brightline	LO – Laboroptik Ltd., Lancing, UK
Serologische Pipetten	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Eppendorf CryoCube F570h	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland

Stimulationsexperiment mit PBMCs

Chemikalien:

RPMI 1640 Medium, R8758-1L	Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, USA
FBS	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Penicillin-Streptomycin	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Lipopolysaccharides from E. coli O55:B5	Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, USA
Trypan Blue solution T8154-20ML	Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, USA
DPBS	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Trizol (peqGOLD TriFast™)	VWR International GmbH, Erlangen, Deutschland

Verbrauchsmaterialien und Geräte:

Sicherheitswerkbank Heraeus HS 12/2	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland
CO ₂ Inkubator MCO-170AIC	Panasonic Healthcare Co. Ltd, Oizumi-Machi, Japan

Wasserbad Type 1002 No.106742940	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Primovert Mikroskop 415510-1100-000	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
Levo me motorized Pipette Filler YF6A000912	DLAB Scientific Co., Ltd., Beijing Airport, China
Tissue Culture Plate 24-Well	Sarstedt, Inc., Newton, USA
Neubauer Improved Brightline	LO – Laboroptik Ltd., Lancing, UK
Serologische Pipetten	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Hand Tally Counter	Tamaco Industrial Co., Ltd., Taichung, Taiwan

RNA-Extraktion**Chemikalien:**

Trizol (peqGOLD TriFast™)	VWR International GmbH, Erlangen, Deutschland
Trichlormethan/Chloroform	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
2-Propanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Wasser Nuklease-frei, steril filtriert & autoklaviert	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol absolut, EMSURE® ACS, ISO, Reag. Ph. Eur. zur Analyse	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland

Verbrauchsmaterialien und Geräte:

PocketBloc Thermomixer	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
------------------------	---

cDNA-Synthese**Chemikalien:**

Reverse Transcription System	Promega Corporation, Madison, USA
RQ1 RNase Free DNase	Promega Corporation, Madison, USA
Wasser Nuklease-frei, steril filtriert & autoklaviert	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Verbrauchsmaterialien und Geräte:

Multiply®-µStrip Pro 8er Kette	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
DLAB Mini Zentrifuge Typ D1008	DLAB Scientific Co., Ltd., Beijing Airport, China

Materialien

LifeEco Thermal Cycler

Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf,
Deutschland

PCR

Chemikalien:

iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix

Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf,
Deutschland

Wasser Nuklease-frei, steril filtriert &
autoklaviert

Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe,
Deutschland

Primer (siehe unten)

Eurofins MWG Operon, Ebersberg,
Deutschland

Gene	Sequenz
18S	fw (forward): 5'-GGGCCC GAAGCGTTTACTTT-3'
	rv (reverse): 5'-CGCCGGTCCAAGAATTTAC-3'
MyD88	fw: 5'-GCACATGGGCACATACAGAC-3'
	rv: 5'-GACATGGTTAGGCTCCCTCA-3'
TLR-1	fw: 5'-AGGGTCAGCTGGACTTCAGA-3'
	rv: 5'-TAATTTTGGATGGGCAAAGC-3'
TLR-2	fw: 5'-ATTGTGCCCATTGCTCTTTC-3'
	rv: 5'-CTGCCCTTG CAGATACCATT-3'
TLR-3	fw: 5'-AGCCTTCAACGACTGATGCT-3'
	rv: 5'-TTCCAGAGCCGTGCTAAGT-3'
TLR-4	fw: 5'-TGAGCAGTCGTGCTGGTATC-3'
	rv: 5'-CAGGGCTTTTCTGAGTCGTC-3'
TLR-5	fw: 5'-GAGCCCCTACAAGGGAAAAC-3'
	rv: 5'-TGCTGATGGCATTGCTAAAG-3'
TLR-6	fw: 5'-CAAGGCCCTCCAATAACTCA-3'
	rv: 5'-CATTGCAAGGGAAGAGGGTA-3'
TLR-7	fw: 5'-AATGTCACAGCCGTCCCTAC-3'
	rv: 5'-TTATTTTACACGGCGCACA-3'
TLR-8	fw: 5'-TCCTTCAGTCGTCAATGCTG-3'
	rv: 5'-CGTTTGGGGAACTTCCTGTA-3'
TLR-9	fw: 5'-AAATGGCCTTTGACTCATGG-3'
	rv: 5'-ACAGCAGCTACAGGGAAGGA-3'

<i>TLR-10</i>	fw: 5'-ACTTTGCCCACCACAATCTC-3'
	rv: 5'-CCCAGAAAAGCCCACATTTA-3'

Verbrauchsmaterialien und Geräte:

CFX Connect™ Real-Time System	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
DLAB Mini Zentrifuge Typ D1008	DLAB Scientific Co., Ltd., Beijing Airport, China
Individual PCR Tubes 8-tube strip, clear	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Optical Flat 8-Cap Strips for 0.2 ml tube strips/plates	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA

2.4 Assays***Nitrit/Nitrat-Assay*****Chemikalien:**

OxiSelect™ In Vitro Nitric Oxide (Nitrite/Nitrate) Assay Kit (Fluorometric), STA-801	Cell Biolabs, Inc., San Diego, USA
DPBS	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland

Verbrauchsmaterialien und Geräte:

UV-star® microplate, 96 well, coc, f-bottom	Greiner Bio One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
---	---

Peptidoglykan-ELISA

Human Peptidoglycan ELISA Kit, abx052129	Abbexa Ltd., Cambridge, UK
--	----------------------------

hs-CRP-ELISA

Human high sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) ELISA Kit, CSB-E08617h	Cusabio Technology LLC, Houston, USA
--	--------------------------------------

LBP-ELISA

LBP (Human) ELISA Kit, KA0448	Abnova Corporation, Taipei City, Taiwan
-------------------------------	---

IL-6-ELISA

Human IL-6 Quantikine HS ELISA Kit, HS600B	R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA
--	-------------------------------------

TNF-α-ELISA

Human TNF-alpha High Sensitivity ELISA, RAF145R	BioVendor, Brünn, Tschechien
--	------------------------------

Verbrauchsmaterialien und Geräte für Nitrit/Nitrat-Assay und ELISAs:

Rotilabo®–Abdeckfolien für Mikrotestpl., Polyester, steril, Sträke 50 µm	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Merkanalpipette	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Thermo-Shaker PST-60HL	BioSan SIA, Riga, Lettland
SpectraMax M3 Multi-Mode	Molecular Devices GmbH, Biberach an der Riß, Deutschland

2.5 Allgemeine Verbrauchsmaterialien und Geräte

Puffer/Lösungen/Chemikalien:

Ethanol vergällt (≥ 99,8 %)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Destilliertes Wasser	Laborbestand

Verbrauchsmaterialien:

Reagiergefäß (0.5 mL, 1.5 mL, 2 mL)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Biosphere® SafeSeal Tube (0.5 mL)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen für Eppendorfpipetten	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
epT.I.P.S. Biopur®	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
SafeSeal-Tips® premium	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
TipOne Filterspitzen	STARLAB GmbH, Hamburg, Deutschland
Falcon-Tubes mit Schraubverschluss (15 mL, 50 mL)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Laborhandschuhe	STARLAB GmbH, Hamburg, Deutschland
Aluminiumfolie	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Geräte:

Tischzentrifuge Z 446 K	Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Deutschland
Mikroliter Zentrifuge Z 216 MK	Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Deutschland
DLAB Mini Zentrifuge Typ D1008	DLAB Scientific Co., Ltd., Beijing Airport, China

Eppendorf CryoCube F570h	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
Thermo-Shaker PST-60HL	BioSan SIA, Riga, Lettland
Scotsman Flockeneisbereiter EF 103	Scotsman Industries, Inc., Vernon Hills, USA
SpectraMax M3 Multi-Mode	Molecular Devices GmbH, Biberach an der Riß, Deutschland
Vortexer REAX 2000	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Stoppuhr	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Eppendorf Research Plus® Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Merkanalpipette	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Labormarker	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Messkolben/-zylinder	Laborbestand
Bechergläser	Laborbestand
Pufferwanne	Laborbestand
Rotilabo®-Reaktionsgefäßständer	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Software:	
GraphPad Prism 4 & 7	GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA
Microsoft Office 2010 & 2013	Microsoft Corporation, Redmond, USA
SoftMax Pro 7 Software	Molecular Devices GmbH, Biberach an der Riß, Deutschland
EBISpro für Windows 2011	Dr. Jürgen Erhardt, Universität Hohenheim, Stuttgart, Deutschland
NutriPlus 5.4.1	Data Input GmbH, Pöcking, Deutschland
CFX Manager™ Software Version 3.1	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA

3 Methoden

Um die Expression von TLRs und abhängige Signalwege in von NAFLD-Patienten isolierten PBMCs mit PBMCs gesunder Personen zu vergleichen, wurden in der vorliegenden Arbeit Daten der im Rahmen der sogenannten *Nuces NASH Studie* rekrutierten Patienten mit jenen gesunder Probanden, die an der Universität Wien rekrutiert und in die Studie eingeschlossen wurden, verglichen. Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Medizinischen Universität Wien bzw. die Ethikkommission der Landesärztekammer Mainz genehmigt.

Zur Rekrutierung der NAFLD-Patienten wurden Flyer am Universitätsklinikum Mainz sowie an Ärzte in Mainz und Wiesbaden verteilt. Außerdem wurden Patienten aus einer Datenbank des Universitätsklinikum Mainz angerufen. Gesunde Probanden wurden in Wien ebenfalls mittels Flyer, unter anderem im Universitätszentrum Althanstraße (UZA II) der Universität Wien, rekrutiert. Alle Studienteilnehmer wurden vor der Teilnahme an der Studie über die Studieninhalte und die zur Anwendung kommenden Messungen durch den Studienarzt informiert und gaben ihr schriftliches Einverständnis. Beim Screening erfolgte eine Blutabnahme und die Messung anthropometrischer Daten (Körpergröße, Gewicht, Taillen- und Hüftumfang) sowie die Bestimmung des Blutdrucks. Weiterhin wurde die Ernährung mittels 24-h-Recall erhoben und eine Bioelektrische Impedanzanalyse durchgeführt. Die Studienteilnehmer füllten einen Fragebogen zu ihrer Gesundheit sowie zu ihrem Alkoholkonsum aus (siehe Anhang A). Mittels Ultraschall wurde die Leber auf mögliche Erkrankungen untersucht. Ein zweiter 24-h-Recall erfolgte telefonisch.

3.1 Probandenkollektiv

NAFLD-Patienten

Die NAFLD-Gruppe der vorliegenden Arbeit setzte sich aus 19 NAFLD-Patienten der *Nuces NASH Studie* und aus zwei Probanden, bei denen bei der Rekrutierung der gesunden Kontrollen in Wien mittels Ultraschall eine Fettleber festgestellt wurde, zusammen. Es wurden jene 19 NAFLD-Patienten der *Nuces NASH Studie* ausgewählt, von denen Stuhlproben vorhanden waren, da als Weiterführung der vorliegenden Arbeit das intestinale Mikrobiom der NAFLD-Gruppe mit jenem der gesunden Kontrollen verglichen werden soll. Ziel der *Nuces NASH Studie* war es, die Auswirkung eines reduzierten Fruktosekonsums sowie der Einnahme von Yakult auf die Entwicklung der NAFLD zu untersuchen.

Gesunde Kontrollen

Als Vergleichskollektiv wurden an der Universität Wien 10 altersgematchte, gesunde Kontrollen rekrutiert.

Ein-/Ausschlusskriterien der Probanden

Eingeschlossen wurden nur Personen zwischen 18 und 75 Jahren, wobei der Alkoholkonsum bei Frauen unter 20 g pro Tag und bei Männern unter 30 g pro Tag liegen musste. Die Ausschlusskriterien der Studienteilnehmer sind in Tabelle 1 angeführt.

Tabelle 1: Ausschlusskriterien der Probanden

Ausschlusskriterien der Probanden	
andere Lebererkrankungen	bariatrische Operationen (innerhalb der letzten 5 Jahre)
Diabetes mellitus Typ 1	Niereninsuffizienz
Entzündung der Bauchspeicheldrüse	Schwangerschaft
Einnahme von Medikamenten, die eine sekundäre NASH verursachen können (Fluanxol, Tamoxifen, Corticosteroide)	Einnahme von Medikamenten, die einen Einfluss auf Entzündungen haben können (TNF-Antagonisten)
Abnormale Ernährungsgewohnheiten: (z.B.: Binge Eating, Veganer, Diäten aufgrund der Leber,...)	Veränderung der Ernährungsgewohnheiten im letzten Jahr
Marcumartherapie	

Zusätzliche Ein-/Ausschlusskriterien der NAFLD-Patienten

Zusätzlich zu den oben genannten Ein-/Ausschlusskriterien (Tabelle 1) wurden in die NAFLD-Gruppe nur Personen eingeschlossen, bei denen mit Hilfe eines Ultraschalls eine NAFLD diagnostiziert wurde und deren BMI $\geq 18,5 \text{ kg/m}^2$ und $\leq 45 \text{ kg/m}^2$ betrug.

Zusätzliche Ein-/Ausschlusskriterien der gesunden Kontrollen

Zusätzlich zu den oben genannten Ein-/Ausschlusskriterien (Tabelle 1), wurde bei den gesunden Kontrollen das Vorliegen einer NAFLD mittels Ultraschall ausgeschlossen. Des Weiteren sollten die gesunden Kontrollen keine metabolische Erkrankungen (Bluthochdruck, Fettstoffwechselstörung, Diabetes/Insulinresistenz) und einen BMI $\geq 18,5 \text{ kg/m}^2$ und $\leq 25 \text{ kg/m}^2$ aufweisen. Außerdem galten die vom Labor Dr. Greiner (1220 Wien, Wagramer Straße

144) bestimmten Werte und deren Referenzwerte als Ausschlusskriterien der Kontrollgruppe, wobei beim Cholesterin der LDL(*low density lipoprotein*)-/HDL(*high density lipoprotein*)-Cholesterin-Quotient berechnet und beurteilt wurde (siehe Punkt 3.2 bzw. Punkt 4.1, Tabelle 9). Zusätzlich wurde anhand des Taillenumfangs sowie der Waist-to-Hip-Ratio ein Ausschluss der Kontrollen vorgenommen. Die dazugehörigen Referenzwerte und deren Beurteilung sind in den jeweiligen Unterpunkten angeführt (siehe Punkt 3.3).

3.2 Gewinnung der Blutproben

Blutabnahme und Labor:

Pro Studienteilnehmer wurden vom zuständigen Arzt insgesamt rund 21 ml Vollblut abgenommen. Einerseits wurden aus dem Blut PBMCs isoliert (siehe Punkt 3.5), andererseits wurden die klinisch-chemischen Parameter Blutzucker, Harnsäure, AST (Aspartat-Aminotransferase), ALT (Alanin-Aminotransferase), HDL-, LDL- sowie Gesamtcholesterin und Triglyceride vom Routinelabor Dr. Gabriele Greiner (Wien, Österreich) bzw. im Zentrallabor der Johannes Gutenberg-Universität (Mainz, Deutschland) bestimmt. Zusätzlich erfolgte die Messung von bakteriellem Endotoxin, LBP, Peptidoglykan, Nitrit/Nitrat und hs-CRP (Hochsensitives C-reaktives Protein) (siehe Punkt 3.6).

4.5 ml des EDTA-Blutes wurden für die Isolation der PBMCs verwendet (siehe Punkt 3.5). Ein Teil des übrigen Blutes wurde ins Labor geschickt, der Rest nach der Methode „Aufarbeitung der Blutproben“ (siehe unten) aufbereitet und eingefroren.

Aufarbeitung der Blutproben

Serum-Proben wurden 2-5x geschwenkt und 30-60 min bei Raumtemperatur (RT) zur Gerinnung stehen gelassen (nicht gekühlt). Anschließend wurden sie bei 2500 g = 3600 rpm für 10 min bei 18°C zentrifugiert.

Lithium-Heparin-Plasma und EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)-Proben wurde 2-5x geschwenkt und bei 2000 g = 3200 rpm für 10 min bei 18°C zentrifugiert. Es folgte eine Aliquotierung des Überstands zu je ca. 500 µl und eine Lagerung bei -80°C.

3.3 Datenerhebung

Anthropometrische Daten

Das Körpergewicht und die Körpergröße wurden morgens, nüchtern und mit leichter Bekleidung erfasst. Aus Körpergröße und Gewicht wurde anhand folgender Formel der BMI berechnet (55):

$$BMI = \frac{\text{Körpergewicht (kg)}}{\text{Körpergröße (m)}^2}$$

Der BMI der Probanden wurde nach Tabelle 12 (siehe Anhang B) beurteilt und ein Ausschluss der Probanden wie bei Punkt 3.1 beschrieben vorgenommen.

Der Taillenumfang wurde mit einem Maßband in der Mitte zwischen Beckenkamm und unterem Rippenbogen erhoben (56). Der Hüftumfang wurde an der breitesten Stelle der Hüfte gemessen. Aus Taillen- und Hüftumfang wurde dann die Waist-to-Hip-Ratio (WHR) berechnet. Die Ergebnisse der Probanden wurden nach Tabelle 13 und 14 beurteilt (siehe Anhang B). Die gesunden Kontrollen sollten einen Taillenumfang aufweisen, der unter der Kategorie „erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre und metabolische Komplikationen“ (w: ≥ 80 ; m: ≥ 94) lag und ihr WHR sollte geringer als der Referenzwert für zentrale Adipositas (w: $> 0,85$; m: $> 0,9$) sein.

Blutdruck

Der Blutdruck wurde nüchtern nach mindestens fünfminütigem Sitzen am rechten Arm, Unterarm auf einem Tisch liegend, mit dem Blutdruckmessgerät bosomedicus uno gemessen. Die Beurteilung des Blutdrucks der Studienteilnehmer erfolgte nach Tabelle 15 (siehe Anhang B). Probanden, die die Kategorie „hochnormal“ (systolisch: 130-139 und/oder diastolisch 85-89) überstiegen, wurden aus der Kontrollgruppe ausgeschlossen.

Erfassung der Gesundheit der Leber

Bei den Studienteilnehmern wurde ein Ultraschall der Leber durchgeführt. Weiterhin wurde die Aktivität der Transaminasen AST und ALT im Serum bestimmt und mit den Referenzwerten des Zentrallabors Dr. Greiner verglichen (siehe Punkt 4.1, Tabelle 9).

Ernährungserhebung

Um die Ernährung der Probanden zu ermitteln, wurde die Methode des 24-h-Recalls gewählt. Generell dient ein 24-h-Recall dazu, alle Lebensmittel, die von den befragten Personen am Vortag konsumiert wurden, zu erfassen (57). Es wurden zwei 24h-Recalls an nicht-aufeinanderfolgenden Tagen bzw. jeweils einer zu einem Wochentag und der andere zu einem

Wochenendtag durchgeführt. Somit konnte die individuelle Variation des Essverhaltens besser erfasst werden (58).

Der erste 24-h-Recall fand in Form eines strukturierten und somit vergleichbaren, persönlichen Gesprächs statt. Die Bilder des *EPIC Picturebook (EPIC-SOFT picture book)* dienten zur besseren Einschätzung der Portionsgrößen und des Gewichts der verzehrten Lebensmittel (59). Die Probanden berichteten, was sie am Vortag gegessen hatten, indem sie sich den Tagesablauf in Erinnerung riefen. Danach wurde genauer nach (Zubereitungs-)Art, Menge, Mahlzeit, Uhrzeit und Ort der verzehrten Lebensmittel gefragt. Weiterhin wurden zusätzliche Fragen (Anhang D) gestellt, um das Vergessen von Lebensmitteln zu minimieren. Der zweite Recall erfolgte dann per Telefon. Für die Berechnung der aufgenommenen Energie- und Nährstoffmenge wurden die 24-h-Recalls in das Programm EBISpro für Windows 2011, welches auf dem Bundeslebensmittelschlüssel basiert, eingetragen. Der Mittelwert der beiden 24-h-Recalls wurde für den Vergleich der Kontrollen mit den Patienten herangezogen. Die Ermittlung des Grundumsatzes und des Gesamtenergiebedarfs der Probanden erfolgte auch mithilfe des Programms EBISpro, wobei die Berechnung des Grundumsatzes (GU) auf folgenden Formeln basierte (60):

Männer: $GU = 9.99 \cdot \text{Gewicht(kg)} + 6.25 \cdot \text{Größe(cm)} - 4.92 \cdot \text{Alter(Jahre)} + 5$

Frauen: $GU = 9.99 \cdot \text{Gewicht(kg)} + 6.25 \cdot \text{Größe(cm)} - 4.92 \cdot \text{Alter(Jahre)} - 161$

Auch der Leistungsumsatz wurde mit EBISpro berechnet. Das Programm zeigte dann den Gesamtenergiebedarf als Summe des berechneten Grund- und Leistungsumsatzes an.

3.4 Bioelektrische Impedanzanalyse

Um die Körperzusammensetzung der NAFLD-Patienten mit jener der gesunden Probanden vergleichen zu können, wurde eine Bioelektrische Impedanzanalyse durchgeführt.

Durch das Anlegen eines Wechselstroms und Messen des Körperwiderstands (Resistance und Reactance) sowie Berücksichtigen von Alter, Geschlecht, Gewicht und Größe kann der Körper mithilfe von Formeln in Kompartimente wie fettfreie Masse, extrazelluläre Masse und Körperzellmasse unterteilt werden (61). Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers (62): Die Probanden wurden angewiesen, am Tag vor der Messung Schwitzen (Sport, Sauna) sowie Alkoholkonsum zu vermeiden und nüchtern zu kommen, um die Messergebnisse nicht zu beeinflussen. Vor der Messung lagen die Probanden 5 min auf der Liege. Arme und Beine waren normal temperiert und wurden so platziert, dass sie einander bzw. den Rumpf nicht berührten (Arme: ca. 30°C, Beine: ca. 45°C abgespreizt). Mit Alkoholtupfern wurde der Bereich, an dem die Elektroden angebracht wurden, desinfiziert. Je

2 Elektroden wurden auf der Hand und am Fuß, im Normalfall an der rechten Körperseite, so angebracht, dass min. 5 cm Abstand zwischen den beiden Elektroden herrschte. Die Kabel hingen locker zwischen Messgerät und sowohl Hand, Fuß, als auch Elektroden und Kabel berührten keine Metallteile der Liege. Es wurde Strom mit 5, 50 und 100 kHz durch den Körper geleitet.

3.5 Bestimmung der Genexpression von TLRs und MyD88 auf mRNA-Ebene in PBMCs von NAFLD-Patienten und gesunden Kontrollen

Zu den mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs = *peripheral blood mononuclear cells*) gehören Monozyten/Makrophagen, T-Lymphozyten und B-Lymphozyten (63). Diese gelten als Hauptquelle von Zytokinen und werden unter anderem für Stimulationsexperimente, in denen die Zytokinsekretion angeregt wird, verwendet (64). Solch ein Stimulationsexperiment wurde durchgeführt, mit dem Ziel, die mRNA-Expression von TLR4 und MyD88 in PBMCs von NAFLD-Patienten und gesunden Kontrollen sowie die Sekretion der Zytokine IL-6 und TNF- α im PBMC-Zellkulturüberstand sowohl mit als auch ohne Stimulation mit LPS zu messen (Letzteres siehe Punkt 3.6). Des Weiteren wurde die mRNA-Expression von TLR1-10 und MyD88 in unstimulierten PBMCs zwischen NAFLD-Patienten und Kontrollen verglichen. Dafür erfolgte zuerst die Isolation der PBMCs aus dem Blut mit anschließender RNA-Extraktion aus den mit LPS stimulierten bzw. unstimulierten PBMCs. Dann wurde die zugehörige cDNA (*complementary DNA*) synthetisiert, welche schließlich als *template* für die RTq-PCR (*real-time* quantitative Polymerase-Kettenreaktion) diene.

PBMC-Isolation

Für die Isolation der PBMCs aus dem Blut der Probanden wurden Histopaque, PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung) und ibidi Freezing Medium Classic auf Raumtemperatur gebracht. Pro Proband wurden 4.5 ml PBS und 4.5 ml Histopaque in 2 verschiedenen Falcon-Tubes vorgelegt. In das Falcon-Tube mit PBS wurden 4.5 ml EDTA-Blut hinzugefügt und gut gemischt. Anschließend wurde diese Mischung von PBS und EDTA-Blut mit dem motorisierten Pipette Filler langsam über das Histopaque geschichtet, wobei die Spitze schräg an den Rand des Falcon-Tubes gehalten wurde. Dann folgte eine Zentrifugation für 30 min bei 400 g (rcf) und Raumtemperatur ohne Bremse (break = 0, accel = 5). Die Falcon-Tubes wurden vorsichtig aus der Zentrifuge genommen und die trübe Leukobande (= PBMCs) mit dem motorisierten Pipette Filler (5 ml serologische Pipette) kreisend abgenommen und in ein 15 ml Falcon-Tube überführt. Mit PBS wurde dann auf 14 ml aufgefüllt und gut gemischt.

Zählen der Zellzahl

Für das Zählen der Zellen wurde die Neubauer Zählkammer angehaucht und das Deckglas vorsichtig auf die Kammer geschoben. Dann wurden 20 µl der obigen Zellsuspension in ein 0.5 ml Eppi pipettiert und 20 µl Trypanblau hinzugefügt. Nach gutem Mischen wurden davon 10 µl auf die Neubauer Zählkammer pipettiert. Die Neubauer Zählkammer wurde unter das Lichtmikroskop gelegt und die Zellen der vier Quadrate gezählt.

Berechnung der Gesamtzellzahl

Die Gesamtzellzahl wurde dann mittels folgender Formel berechnet (VF = Verdünnungsfaktor):

$$\text{Gesamtzellzahl} = \frac{\sum \text{Zellzahl aller Quadrate}}{\text{Anzahl der Quadrate}} * 10^4 * VF * \text{Volumen der Zellsuspension}$$

Nach dem Zählen der Zellzahl wurde die PBS-PBMC-Mischung für 10 min bei 300 g (rcf) und Raumtemperatur mit Bremse zentrifugiert. Die Flüssigkeit wurde mit dem Pipette Filler abgesaugt und darauf geachtet, dass das Zellpellet im Falcon-Tube blieb. Je nach Zellzahl wurde die entsprechende Menge an ibidi Freezing Medium Classic (Einfriermedium) hinzugefügt, sodass die Zellkonzentration pro ml nicht kleiner als $5 \cdot 10^5$ und nicht größer als $2.5 \cdot 10^6$ Zellen war. Meist wurden 4-5 ml an ibidi Freezing Medium hinzugefügt. Es erfolgte eine Aliquotierung und das Einfrieren von je 1 ml pro Cryotube bei -80°C .

Auftauen der PBMCs

Um die isolierten und eingefrorenen PBMCs für weitere Experimente verwenden zu können wurden sie nach folgendem Verfahren aufgetaut und aufbereitet:

Die mit ibidi Freezing Medium Classic eingefrorenen Zellen wurden im Wasserbad (37°C) unter häufigem Schwenken aufgetaut bis nur noch ein kleiner Eisklumpen vorhanden war. Nach reichlichem Mischen wurden sie in ein 15 ml Falcon-Tube mit vorgelegtem, auf 37°C aufgewärmten Kulturmedium (siehe Tabelle 2) pipettiert und die Cryotubes mit 1 ml Kulturmedium nachgespült, sodass das Gesamtvolumen im Falcon-Tube 14 ml maß. Die Zellsuspension wurde gemischt und schnellstmöglich abzentrifugiert, um das im Einfriermedium enthaltene DMSO (Dimethylsulfoxid) zu entfernen (300 g, 3 min, RT, Bremse). Der Überstand wurde anfangs mit dem Pipette Filler, gegen Ende mit einer 1000µl-Pipette abgesaugt und das Pellet danach in 1 ml Kulturmedium aufgenommen und gut gemischt. 20 µl der Zellsuspension wurden in ein 0.5 ml Eppi zu 20 µl Trypanblau pipettiert und eine Zellzählung wie bei „PBMC-Isolation“ durchgeführt, während das Falcon-Tube mit der restlichen Zellsuspension auf Eis gestellt wurde. Anschließend wurde die Zellsuspension so

aufgeteilt, dass ungefähr 500 000 Zellen für die RNA-Extraktion ohne Stimulationsexperiment und rund 1 000 000 Zellen für das Stimulationsexperiment eingesetzt wurden.

Tabelle 2: Kulturmedium für PBMCs

Substanz	Volumen/Anteil/Konzentration
hitzeinaktiviertes FBS (fetales Kälberserum) (56°C Wasserbad, 35 min)*	10 %
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml
RPML-1640	restliches Volumen

*FBS wurde im Wasserbad (56°C) für 35 min unter häufigem Mischen hitzeinaktiviert und anschließend für die Herstellung des Kulturmediums abgekühlt.

Stimulationsexperiment

Pro Proband wurden in 2 Wells einer 24-Well Tissue Culture Plate je ca. 500 000 der aufgetauten und aufbereiteten PBMCs pipettiert, das Volumen auf 400 µl mit Kulturmedium (RT) aufgefüllt und für ca. eine Stunde bei 5% CO₂ und 37°C inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 100 µl LPS-Lösung (Konzentration im Well = 100 ng LPS/ml) (1. Well) bzw. von 100 µl Kulturmedium für die unstimulierten Zellen (2. Well). Die PBMCs wurden anschließend für 18 h inkubiert (5% CO₂, 37°C). Nach 18 h wurde die 24-Well Tissue Culture Plate unter das Lichtmikroskop gehalten und kontrolliert, ob die Zellen noch lebten. Danach erfolgte das Mischen der Zellsuspensionen in den Wells, das Überführen in 1.5 ml-Eppis und das Abzentrifugieren (1000 rpm, 5 min, RT, Bremse). Der Überstand wurde abgenommen und für die Bestimmung der sezernierten Zytokine (IL-6 und TNF-α) bei -80°C eingefroren. Zum Zellpellet wurden 500 µl PBS hinzugefügt und die Suspension erneut bei 1000 rpm, RT, mit Bremse für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Anschließend wurde zum Pellet 1 ml Trizol hinzugefügt, das Ganze gut gemischt, 15 Sekunden gevortext, für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und bei -80°C eingefroren.

RNA-Extraktion

Um nun die Genexpression auf Ebene der mRNA zwischen gesunden Kontrollen und NAFLD-Patienten bzw. vor und nach der Stimulation mit LPS vergleichen zu können, wurde die RNA aus den PBMCs extrahiert.

Zur Extraktion der RNA wurde peqGOLD TriFast™ (Trizol) verwendet. Die darin enthaltene Guanidinisothiocyanatlösung führt zur Inaktivierung der RNasen (Ribonukleasen) und zur Lyse

Methoden

der Zellen. Phenol, ein weiterer Bestandteil von peqGOLD Trifast™ (Trizol), dient zur Entfernung der Proteine. Mittels der anschließenden Zugabe von Chloroform wird die Lösung in drei Phasen aufgeteilt, wobei sich in der obersten, wässrigen Phase die RNA befindet und abgenommen werden kann (65).

a) PBMCs zur direkten RNA-Extraktion

Nach dem Zählen der PBMCs unter Punkt „Auftauen der PBMCs“ wurde das entsprechende Volumen mit rund 500 000 Zellen in 1.5 ml-Eppis überführt und bei 1000 rpm, RT, für 5 min mit Bremse abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, 500 µl PBS zum Zellpellet hinzugefügt und die Suspension erneut bei 1000 rpm, RT, mit Bremse für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Anschließend wurde zum Pellet 1 ml Trizol hinzugefügt, das Ganze gut gemischt, 15 Sekunden gevortext, für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und bei -80°C eingefroren. Die Eppis wurden für die RNA-Extraktion zu gegebenem Zeitpunkt wieder aufgetaut.

b) PBMCs aus dem Stimulationsexperiment

Die mit 1 ml Trizol eingefrorenen PBMCs wurden aufgetaut.

Weitere Durchführung nach a) und b):

Es wurden 200 µl Chloroform hinzugefügt, für 15 Sekunden gevortext, 10 min bei RT inkubiert und 10 min zentrifugiert (12000 rcf, 4°C). Alle weiteren Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die obere Phase wurde in ein 1.5 ml-Eppi überführt, 500 µl Isopropanol hinzugefügt, 30 Sekunden gevortext, 15 min auf Eis inkubiert und wieder 10 min zentrifugiert (12000 rcf, 4°C). Danach wurde der Überstand vorsichtig in ein Becherglas gekippt und das Pellet 2x mit 75% Ethanol gewaschen: Es wurde 1 ml 75 % Ethanol zugegeben, kurz gevortext (bis das Pellet schwamm), 8 min zentrifugiert (7500 rcf, 4°C) und der Überstand vorsichtig abgekippt. Dieser Vorgang wurde ein zweites Mal durchgeführt. Anschließend wurden die Eppis zur Trocknung der Pellets unter dem Abzug verkehrt für ca. 10 min auf Filterpapier gestellt. Dann wurden 10 µl DNase (Desoxyribonuklease)- und RNase-freies Wasser mit Filtertips zupipettiert und die Eppis für 10 min in den PocketBloc Thermomixer gestellt (55°C, 300 rpm). Danach wurde die RNA sofort auf Eis gestellt und bei -80°C gelagert.

cDNA-Synthese

Der erste Schritt ist der DNase-Verdau, um eventuell vorhandene DNA der Probe zu entfernen. Der zweite Schritt stellt dann die eigentliche cDNA-Synthese dar (65). Dafür wurde das Enzym Reverse Transkriptase aus dem *avian myoblastosis virus* (AMV) verwendet. Es handelt sich dabei um eine DNA-Polymerase, die DNA- oder RNA-abhängig DNA synthetisiert, RNase H-Aktivität besitzt und deren Arbeitsoptimum bei 42°C liegt (65). Diese synthetisiert aus der mit

Primern gebundenen RNA den komplementären DNA Strang. Anschließend wird der RNA-Strang abgebaut (RNase H-Aktivität) und der dazugehörigen Doppelstrang der DNA gebildet (66).

Durchführung auf Eis: Je 8 µl der isolierten, in DNase- und RNase-freiem Wasser gelösten RNA wurden in ein Tube pipettiert.

a) DNase-Verdau:

Dafür wurden an unterschiedlichen Stellen des Randes der Tubes je 1 µl RQ1 RNase-Free DNase 10x Reaction Buffer und 1 µl RQ1 RNase-Free DNase pipettiert. Anschließend wurden die Tubes für wenige Sekunden mit der Minizentrifuge abzentrifugiert, damit die Substanzen nach unten gelangten und sich mit der Probe mischten. Es folgte eine 30-minütige Inkubation bei 37°C im Thermocycler. Danach wurde je 1 µl RQ1 DNase Stop Solution abermals an eine andere Stelle des Tube-Randes pipettiert und für 10 min bei 65°C im Thermocycler inkubiert, um die DNase zu inaktivieren.

b) cDNA-Synthese:

Der Mastermix für die cDNA-Synthese wurde nach Tabelle 3 hergestellt:

Tabelle 3: Mastermix (cDNA-Synthese) je Probe

Substanz	Volumen
MgCl ₂ (25 mM)	4 µl
Reverse Transkriptase Puffer	2 µl
dNTP Mix (10 mM)	2 µl
RNAsin	0.5 µl
Random Primer	1 µl
AMV Reverse Transkriptase (15 U)	0.6 µl

Die Tubes wurden kurz zentrifugiert, 10.1 µl Mastermix in jedes Tube pipettiert und die cDNA-Synthese erfolgte im Thermocycler nach dem Verfahren in Tabelle 4:

Tabelle 4: cDNA-Synthese

Zeit	Temperatur
10 min	25°C
15 min	42°C
5 min	95°C
5 min	4°C

Methoden

Am Schluss wurden 80 µl DNase- und RNase-freies Wasser pro Tube hinzugefügt, kurz abzentrifugiert und die cDNA bei - 20°C gelagert bzw. mit der PCR fortgefahren.

RTq-PCR

Die aus der RNA der PBMCs der Probanden synthetisierte cDNA diente als *template* für die PCR. Mittels folgender drei Schritte wird bei der PCR DNA synthetisiert:

- 1) Denaturierung: Durch eine hohe Temperatur werden die Doppelstränge der *template*-DNA (cDNA) getrennt.
- 2) Annealing: Die niedrigere Temperatur im 2. Schritt lässt das Hybridisieren der hinzugefügten Primer an die *template*-DNA zu.
- 3) Elongation: Schließlich wird beim Temperaturoptimum der DNA-Polymerase der komplementäre Strang zur *template*-DNA durch dieses Enzym synthetisiert.

Diese 3 Schritte stellen einen Zyklus dar, in dem die vorhandene DNA verdoppelt wird (65). (Bei der gewählten Methode fanden Annealing und Elongation innerhalb eines Schrittes statt.)

Ziel ist es, über die in der PCR vervielfachte DNA Rückschlüsse auf die in den Zellen vorhandene RNA und somit auf die exprimierten Gene ziehen zu können. Daher wurde eine quantitative Echtzeit-PCR (RTq-PCR) durchgeführt. Dabei wird die Fluoreszenz eines Farbstoffes, die bei seiner Bindung an doppelsträngige DNA entsteht, gemessen. Vergleiche zwischen verschiedenen Proben können durch die benötigte Anzahl der Zyklen für dieselbe halbmaximale Konzentration gezogen werden (66).

Folgende Schritte wurden auf Eis durchgeführt: Zuerst wurde der Mastermix nach Tabelle 5 hergestellt.

Tabelle 5: Mastermix (PCR) je Probe:

Substanz	Volumen
SYBR-Green (iTaq)	10 µl
PCR H ₂ O	5.5 µl
Primer forward	1 µl
Primer reverse	1 µl

Als Primer wurden jeweils die spezifischen *forward* und *reverse* Primer für die Gene *18S*, *MyD88*, und *TLR-1-10* verwendet. Die Konzentration der Primer betrug 3 pmol/µl.

In jedes Tube wurden 17.5 µl Mastermix pipettiert und 2.5 µl der cDNA bzw. 2.5 µl PCR H₂O für die NTCs (*no template controls*) hinzugefügt. Die Reaktionsgefäße wurden kurz abzentrifugiert

und in den PCR-Cycler gestellt. Anschließend wurde die PCR nach dem Programm in Tabelle 6 durchgeführt.

Tabelle 6: PCR-Programm

	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	30 sec	1 x
Denaturierung	95°C	5 sec	50 x
Annealing & Elongation	64°C	30 sec	
Schmelzkurve	95°C	10 sec	1 x
	65°C	5 sec	
	95°C		

Die Daten wurden mit CFX Manager™ Software Version 3.1 ausgewertet und mit der C_T -Methode ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) auf das Referenzgen (*18S rRNA*) bezogen.

3.6 Bestimmung biochemischer Parameter in Blutproben bzw. im PBMC-Zellkulturüberstand von NAFLD-Patienten und gesunden Kontrollen

Nitrit/Nitrat-Assay

Der gesamte Nitrit/Nitrat-Gehalt im Plasma wurde mittels *OxiSelect™ In Vitro Nitric Oxide (Nitrite/Nitrate) Assay Kit (Fluorometric)* nach Anleitung des Hersteller Cell Biolabs, Inc. gemessen. Dafür wurden die Plasmaproben 1:5 verdünnt. Bei dem Kit handelt es sich um einen Fluoreszenz-Assay, der die quantitative Messung von NO durch die Bestimmung der oxidierten Produkte NO_3^- (Nitrat) und NO_2^- (Nitrit) ermöglicht. Mittels Nitratreduktase wird NO_3^- zu NO_2^- umgewandelt. Schließlich wird der gesamt NO_2^- -Gehalt anhand des Fluoreszenzfarbstoffs 2,3-Naphthalendiamin gemessen. Durch das Einsetzen der im Microplate Reader gemessenen Extinktion in die Standardgerade wurde die Konzentration der Proben nach Abziehen des Blanks berechnet.

Peptidoglykan-ELISA

Die Menge an Peptidoglykan im Plasma wurde mittels *Human Peptidoglycan ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) Kit* nach Anleitungen des Herstellers Abbexa Ltd. bestimmt. Es wurde eine 1:50 Verdünnung der Plasmaproben vorgenommen. Die Methode basiert auf der Technologie des Sandwich-ELISAs welche in Abbildung 5 dargestellt ist.

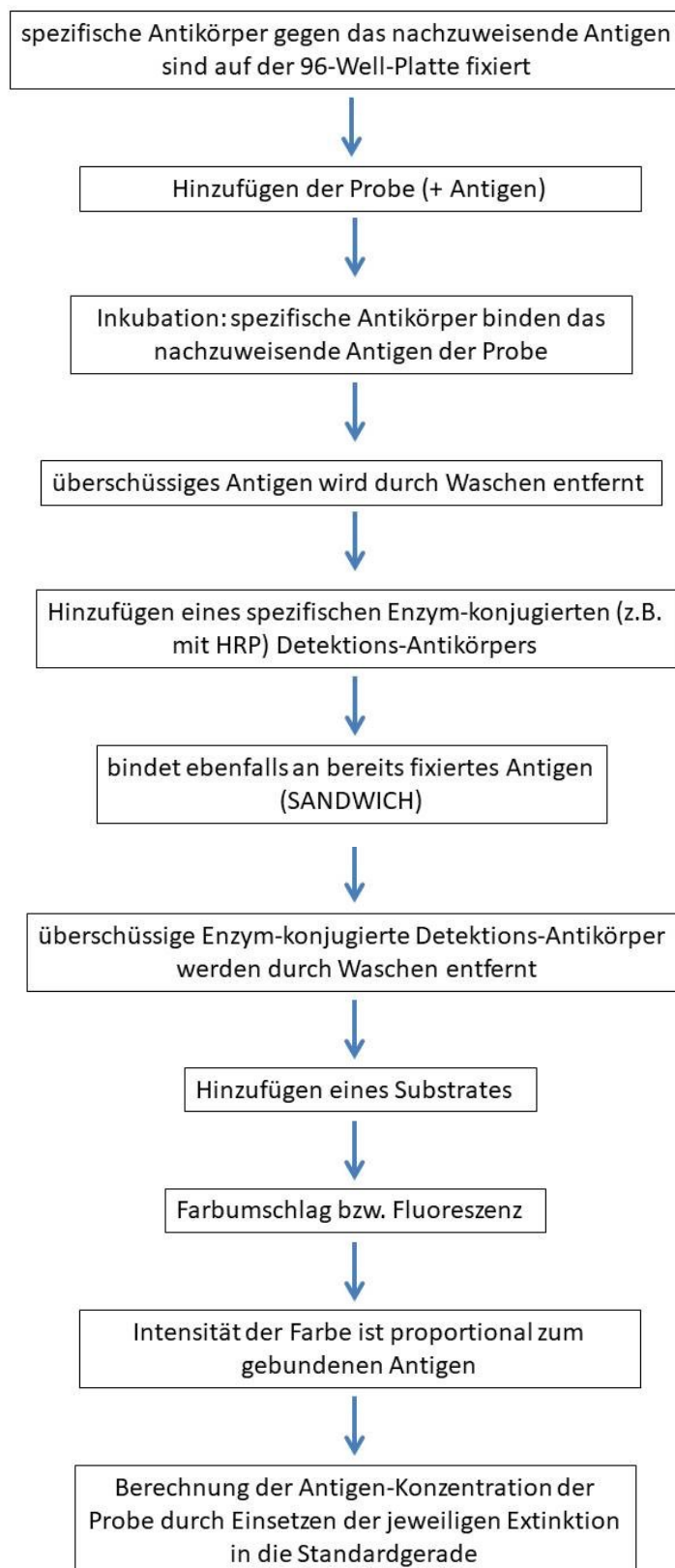


Abbildung 5: Sandwich-ELISA-Technik (nach Hornbeck et al., 2001 (67)). Der Sandwich-ELISA als Methode zur Quantifizierung von Substanzen. HRP = *horseradish peroxidase*.

hs-CRP-ELISA

Der Gehalt an hs-CRP im Serum wurde mittels *Human high sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) ELISA Kit* nach Anleitung des Herstellers Cusabio Technology LLC detektiert. Es handelt sich hierbei um einen Sandwich-ELISA (siehe Abbildung 5). Für die Durchführung wurden die Proben 1:1050 verdünnt.

LBP-ELISA

Die Menge an LBP im Plasma wurde anhand des *LBP (Human) ELISA Kit* nach Anleitung des Herstellers Abnova Corporation gemessen. Es handelt sich abermals um einen Sandwich-ELISA, dessen Prinzip in Abbildung 5 erklärt wird. Es wurde eine 1:1600 Verdünnung der Proben vorgenommen.

IL-6-ELISA

Mit dem *Human IL-6 Quantikine HS ELISA Kit* wurde die Menge an IL-6 im Zellkulturüberstand des Stimulationsexperimentes mit PBMCs nach Angaben des Herstellers R&D SYSTEMS®, a biotechne® brand, gemessen. Hierfür wurden die unstimulierten Proben 1:1000 und die stimulierten Proben (LPS) 1:2000 verdünnt (der Verdünnungsfaktor 1:2, der sich durch die Durchführung nach Protokoll ergibt, ist schon miteinbezogen). Auch hier ist das Prinzip ein Sandwich-ELISA (siehe Abbildung 5).

TNF- α -ELISA

Zur Quantifizierung der Menge an TNF- α , die im Zellkulturüberstand des Stimulationsexperiments mit PBMCs enthalten war, wurde der *Human TNF-alpha High Sensitivity ELISA* nach Anleitungen des Herstellers BioVendor durchgeführt. Dafür wurden die unstimulierten Proben 1:10 und die stimulierten Proben 1:200 verdünnt (der durch die Befolgung des Protokolls entstehende Verdünnungsfaktor 1:2 ist hier schon miteinberechnet). Der Ablauf des TNF- α ELISAs ist in Tabelle 7 beschrieben.

Tabelle 7: Ablauf des TNF- α ELISA

anti-human-TNF- α Antikörper sind auf der Well-Platte befestigt
→ binden TNF- α der Proben
Biotin-konjugierter anti-human TNF- α -Antikörper wird hinzugefügt
→ bindet an das nun fixierte TNF- α der Proben
Inkubation
Waschschritt → Entfernung von überschüssigen Biotin-konjugierten anti-human-TNF- α -Antikörpern
Streptavidin-HRP (<i>horseradish peroxidase</i>) wird hinzugefügt
→ bindet an Biotin-konjugierte anti-human-TNF- α -Antikörper
Inkubation
Waschschritt → Entfernung von überschüssiger Streptavidin-HRP
Amplifikationsreaktion (basierend auf der PerkinElmer Life Science' TSA (Tyramide Signal Amplification) Technologie)
Amplifikationsreagenz I (Biotinyl-Tyramide) wird hinzugefügt
→ Biotinyl-Tyramide wird durch HRP in ein freies Radikal umgewandelt
→ bindet kovalent an jegliches Protein
Inkubation
Waschschritt → Entfernung von überschüssigem Biotinyl-Tyramide
Amplifikationsreagenz II (Streptavidin-HRP) wird in die Wells pipettiert
Streptavidin-HRP bindet an eine Stelle am Biotin, die durch die Biotinyl-Tyramide-Reaktion entstanden ist
Inkubation
Waschschritt → Entfernung von überschüssiger Streptavidin-HRP
Durch die Wirkung der beiden Amplifikationsreagenzien ist nun mehr HRP (Amplifikation) für die Reaktion mit dem Substrat vorhanden
Zugabe der Substrat-Lösung
Reaktion von HRP mit dem Substrat → färbiges Produkt ist proportional zur TNF- α -Konzentration der Proben
Zugabe von Säure → stoppt die Reaktion
Messung der Extinktion bei 450 nm
Einsetzen der gemessenen Extinktionen in die Standardgerade → Berechnung der TNF- α Konzentrationen der Proben

3.7 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mithilfe des Programms GraphPad Prism 7. Dabei diente der Test nach Grubbs' zur Identifikation von Ausreißern innerhalb der Gruppen, welche aus der Analyse ausgeschlossen wurden. Für den Vergleich der NAFLD-Patienten mit den gesunden Kontrollen wurde der t-Test für ungepaarte Stichproben (normalverteilte Daten) bzw. der Mann-Whitney-U-Test (nicht-normalverteilte Daten) verwendet. Zur Analyse der Ergebnisse aus dem Stimulationsexperiment wurde der t-Test für gepaarte Stichproben (PBMCs des gleichen Probanden unstimuliert und stimuliert mit LPS) (normalverteilte Daten) bzw. der Wilcoxon-Test (nicht-normalverteilte Daten) durchgeführt. Dargestellt sind die Werte als Mittelwerte (MW) $\pm$ Standardfehler (SEM = *standard error of mean*). Eine statistische Signifikanz wurde mit einem p-Wert < 0.05 definiert, während ein p-Wert < 0.1 einen Trend kennzeichnete.

4 Ergebnisse

Der Fokus der vorliegenden Arbeit galt dem Vergleich der mRNA-Expression von TLRs und MyD88 in PBMCs von NAFLD-Patienten und gesunden Kontrollen sowie der Messung der TLR4 und MyD88 mRNA-Expression und der Freisetzung von TNF α und IL-6 vor und nach der Stimulation der PBMCs mit LPS. Des Weiteren wurden die beiden Gruppen in Bezug auf anthropometrische, metabolische und klinisch-chemische Parameter sowie Körperzusammensetzung, Ernährung, Marker der intestinalen Permeabilität, NO (Nitrit/Nitrat) und CRP miteinander verglichen.

4.1 Charakteristika der Studienteilnehmer

Insgesamt wurden 10 gesunde Kontrollen und 21 Patienten mit NAFLD in die Auswertung eingeschlossen. Die Charakteristika der Studienteilnehmer sind in Tabelle 8 angeführt. Die Kontrollgruppe setzte sich aus 2 Männern und 8 Frauen zusammen, während 11 Männer und 10 Frauen die NAFLD-Gruppe ausmachten. Im Alter und der Größe unterschieden sich die beiden Gruppen nicht. Die NAFLD-Patienten wiesen jedoch einen signifikant höheren BMI (+34%), Taillenumfang (+42%), systolischen und diastolischen Blutdruck (+14% bzw. +11%) sowie eine signifikant höhere Waist-to-Hip-Ratio (+26%) und ein signifikant höheres Gewicht (+35%) auf.

Tabelle 8: Charakteristika der Studienteilnehmer

		Kontrollen	NAFLD
Anzahl der Studienteilnehmer		10	21
Geschlecht	männlich	n = 2	n = 11
	weiblich	n = 8	n = 10
Alter (Jahre)		47 $\pm$ 1	51 $\pm$ 3
Größe (m)		1.69 $\pm$ 0.01	1.70 $\pm$ 0.02
Gewicht (kg)		65.7 $\pm$ 2.7	88.5 $\pm$ 3.6*
BMI (kg/m²)		22.9 $\pm$ 0.7	30.6 $\pm$ 1.3*
Taillenumfang (cm)		75 $\pm$ 3	106 $\pm$ 4*
Waist-to-Hip-Ratio		0.76 $\pm$ 0.02	0.95 $\pm$ 0.02*
Systolischer Blutdruck (mmHg)		122 $\pm$ 3	139 $\pm$ 4*
Diastolischer Blutdruck (mmHg)		81 $\pm$ 2	90 $\pm$ 2*

NAFLD = nicht-alkoholbedingte Fettlebererkrankung; BMI = Body Mass Index. Die Werte sind als MW $\pm$ SEM dargestellt. *signifikant unterschiedlich zu den Kontrollen ($p < 0.05$).

Klinisch-chemische Parameter der Studienteilnehmer

In Tabelle 9 sind die vom Zentrallabor bestimmten klinisch-chemischen Parameter der Probanden aufgelistet. Die Aktivität der ALT (+250%) und AST (+149%) war wie auch die Triglycerid- (+80%), LDL- (+46%), Gesamtcholesterin- (+22%), LDL-Cholesterin/HDL-Cholesterin- (+103%), Blutzucker- (+22%) und Harnsäurewerte (+38%) im Serum der NAFLD-Patienten signifikant höher als bei den gesunden Kontrollen mit Ausnahme des HDL-Wertes (-24%), der signifikant niedriger war als jener der Kontrollgruppe.

Während die Mittelwerte der Kontrollgruppe alle innerhalb des Referenzbereichs des Labors Dr. Greiner lagen, überstiegen die NAFLD-Mittelwerte die obere Grenze des Referenzbereichs von ALT, LDL-Cholesterin und Gesamtcholesterin (wobei jeweils die Einzelwerte von 12, 12 bzw. 16 NAFLD-Patienten über dem Referenzbereich lagen).

Tabelle 9: Klinisch-chemische Parameter der Studienteilnehmer und Referenzwerte[#]

	Kontrollen	NAFLD	Referenzwerte	
			Frauen	Männer
ALT (U/l)	17 ± 2	58 ± 8*	< 35	< 50
AST (U/l)	16 ± 1	41 ± 4*	< 35	< 50
Triglyceride (mg/dl)	69 ± 6	123 ± 9*	bis 190	bis 190
HDL-Cholesterin (mg/dl)	79 ± 3	59 ± 4*	> 45	> 35
LDL-Cholesterin (mg/dl)	101 ± 7	147 ± 9*	Primärprävention: <130	Primärprävention: <130
			Sekundärprävention: <100	Sekundärprävention: <100
Gesamtcholesterin (mg/dl)	191 ± 8	232 ± 10*	140-200	140-200
LDL-Cholesterin/HDL-Cholesterin(68)	1.3 ± 0.1	2.6 ± 0.2*	< 4	< 4
Blutzucker (mg/dl)	77 ± 4	94 ± 3*	60-110	60-110
Harnsäure (mg/dl)	4.2 ± 0.3	5.8 ± 0.4*	2.4-6.0	3.5-7.0

NAFLD = nicht-alkoholbedingte Fettlebererkrankung; ALT = Alanin-Aminotransferase; AST = Aspartat-Aminotransferase; HDL = *high density lipoprotein*; LDL = *low density lipoprotein*. (Kontrollen: n = 10, NAFLD-Patienten: n = 21). Die Werte sind als MW ± SEM dargestellt. *signifikant unterschiedlich zu den Kontrollen (p < 0.05). [#]Labor Dr. Greiner.

4.2 Körperzusammensetzung der NAFLD-Patienten und gesunden Kontrollen

Um die Körperzusammensetzung zwischen NAFLD-Patienten und gesunden Kontrollen vergleichen zu können, wurde eine Bioelektrische Impedanzanalyse (BIA) durchgeführt (siehe Kapitel 3.4). Bei der gesunden Kontrollgruppe waren nur Daten von 7 Frauen und einem Mann vorhanden, wobei die Werte des männlichen Probanden oft als Outlier identifiziert wurden, während bei der NAFLD-Gruppe Daten von 8 Frauen und 10 Männern ausgewertet wurden. Die NAFLD-Gruppe wies im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant höhere Werte in den Parametern fettfreie Masse (+27%), Körperfett in kg (+87%) und Körperfett in Prozent (+36%) sowie Körperfett/fettfreie Masse-Ratio (+55%) auf (siehe Tabelle 10). Zusätzlich war das Gesamtkörperwasser (+27%), die Körperzellmasse (+35%) sowie das extrazelluläre Wasser (+31%) bei den NAFLD-Patienten signifikant höher, während ein Trend der NAFLD-Gruppe zu einem höheren Phasenwinkel (+9%; $p=0.06$), einer höheren extrazellulären Masse (+16%; $p=0.07$), einem niedrigeren extrazelluläre Masse/Körperzellmasse-Index (-9%; $p=0.08$), einem höheren Zellanteil (+5%; $p=0.07$) und einem höheren intrazellulären Wasser (+19%; $p=0.06$) erkennbar war (siehe Anhang E, Tabelle 16).

Tabelle 10: Körperzusammensetzung der Studienteilnehmer

		Kontrollen	NAFLD
Anzahl der Studienteilnehmer		8	18
Geschlecht	männlich	n = 1	n = 10
	weiblich	n = 7	n = 8
Fettfreie Masse (FFM) (kg)		46.0 ± 1.2	58.7 ± 2.5*
Körperfett (%)		24.3 ± 2.2	33.1 ± 1.9*
Körperfett (kg)		15.7 ± 1.7	29.3 ± 2.3*
Körperfett (kg)/fettfreie Masse (kg)-Ratio		0.33 ± 0.04	0.51 ± 0.04*

NAFLD = nicht-alkoholbedingte Fettlebererkrankung. Die Werte sind als MW ± SEM dargestellt.

*signifikant unterschiedlich zu den Kontrollen ($p < 0.05$).

4.3 Ernährung von NAFLD-Patienten und gesunden Kontrollen

Es gab keinen signifikanten Unterschied bezüglich der mittleren Energie-, Makro- und Mikronährstoffaufnahme der beiden Gruppen, wobei aber ein Trend zu einer niedrigeren durchschnittlichen Ballaststoffzufuhr der NAFLD-Patienten festgestellt werden konnte (-19%; $p=0.08$) (siehe Tabelle 11 und Anhang F, Tabelle 17).

Bezüglich der Makronährstoffe erfüllten sowohl die Kontroll- als auch die NAFLD-Gruppe die DACH-Referenzwerte im Mittel nicht. Der Konsum an Fett war mit einem Mittelwert von 35.9 Energie-% bei den Kontrollen und 38.5 Energie-% bei den NAFLD-Patienten höher als die Empfehlung von 30 % der Gesamtenergieaufnahme. Die Proteinaufnahme der Kontrollen lag im Mittel +59% und die der NAFLD-Patienten +67% über den Referenzwerten (Empfehlung: 25-64 Jahre: 0,8 g Protein/kg Körpergewicht/d; ≥ 65 Jahre: 1 g Protein/kg Körpergewicht/d). Zusätzlich erreichten beide Gruppen im Durchschnitt den Richtwert der Kohlenhydrataufnahme von mindestens 50 % der Gesamtenergiezufuhr nicht (K: 47.1 Energie-%; NAFLD: 44.7 Energie-%). Weiterhin deckte die Kontrollgruppe mit einer mittleren Ballaststoffaufnahme von 27.2 g/d 91 % und die NAFLD-Gruppe mit 22.1 g/d 74 % des Richtwerts von 30 g Ballaststoffen pro Tag (69).

Tabelle 11: Energie- und Makronährstoffaufnahme von NAFLD-Patienten und gesunden Kontrollen

	Kontrollen	NAFLD
Energieaufnahme (kcal)	2174 $\pm$ 167	2205 $\pm$ 87
Eiweiß (g)	81.8 $\pm$ 7.9	87.0 $\pm$ 5.8
Eiweiß (%)	15.5 $\pm$ 0.8	15.5 $\pm$ 0.6
Fett (g)	88.3 $\pm$ 7.6	96.8 $\pm$ 6.0
Fett (%)	35.9 $\pm$ 1.3	38.5 $\pm$ 1.7
Kohlenhydrate (g)	246.5 $\pm$ 17.0	237.4 $\pm$ 9.8
Kohlenhydrate (%)	47.1 $\pm$ 1.4	44.7 $\pm$ 1.4
Ballaststoffe (g)	27.2 $\pm$ 2.0	22.1 $\pm$ 1.7
Saccharose (g)	47.2 $\pm$ 3.5	41.3 $\pm$ 3.2
Fruktose (g)	20.7 $\pm$ 3.0	18.7 $\pm$ 2.1
Gesamtfruktose (g) ^a	44.2 $\pm$ 2.8	43.9 $\pm$ 3.9
Glukose (g)	15.1 $\pm$ 2.2	15.6 $\pm$ 1.8
Gesamtglukose (g) ^b	38.7 $\pm$ 2.5	40.8 $\pm$ 3.8

NAFLD = nicht-alkoholbedingte Fettlebererkrankung. (Kontrollen: n = 10, NAFLD-Patienten: n = 21). Die Werte sind als MW $\pm$ SEM dargestellt. *signifikant unterschiedlich zu den Kontrollen ($p < 0.05$). ^afreie Fruktose und Fruktose aus Saccharose. ^bfreie Glukose und Glukose aus Saccharose.

4.4 Marker der intestinalen Permeabilität im Blut von NAFLD-Patienten und gesunden Kontrollen

Als Marker der intestinalen Permeabilität der Probanden wurden in deren Plasma Endotoxin mittel des Limulus-Tests sowie LBP und Peptidoglykan mittels Sandwich ELISA gemessen (siehe Kapitel 3.6). Die NAFLD-Patienten wiesen eine signifikant höhere Konzentration an Endotoxin (+89%) auf, während sich die Konzentration an LBP zwischen den Gruppen nicht unterschied (NAFLD: +3%). Bezüglich der Menge an Peptidoglykan im Plasma konnte wegen geringer Anzahl der Kontrollen (n=6, einschließlich eines Outliers) kein statistischer Vergleich vorgenommen werden, jedoch schien kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen vorhanden zu sein (NAFLD: +16%) (siehe Abbildung 6).

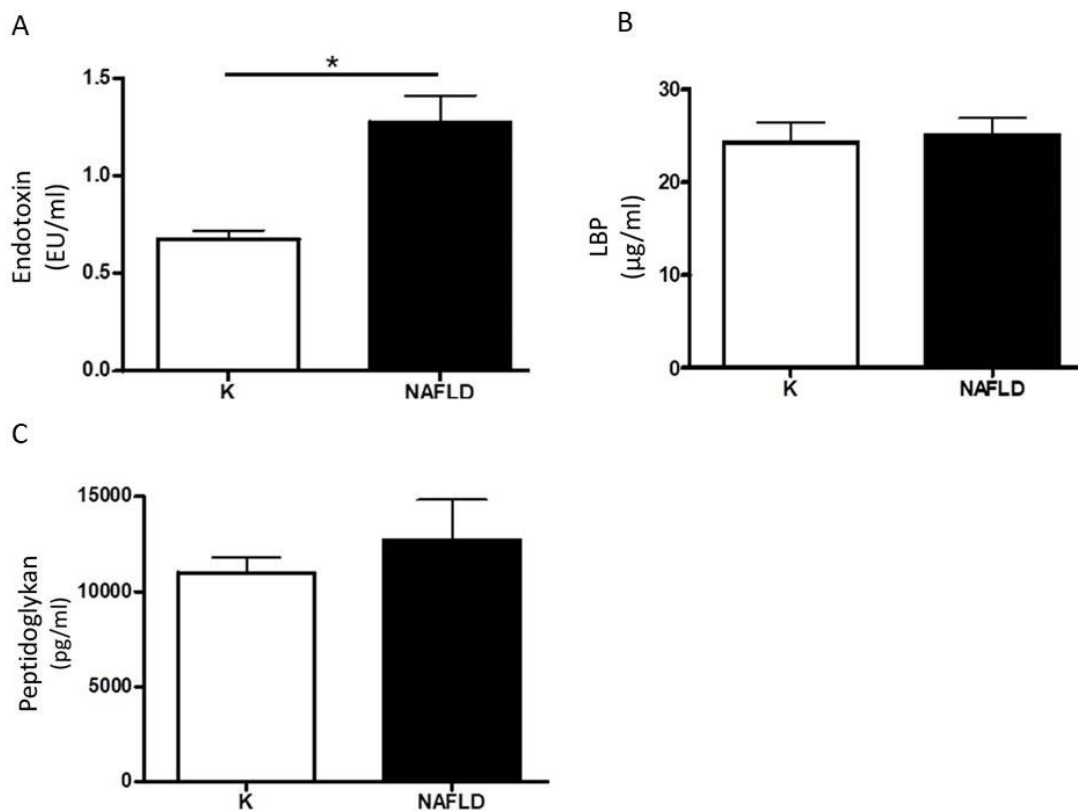


Abbildung 6: Endotoxin-, LBP- und Peptidoglykan-Spiegel im Plasma von NAFLD-Patienten und gesunden Kontrollen. A: Plasma-Endotoxingehalt (Kontrollen: n = 10; NAFLD-Patienten: n = 20); B: Plasma-LBP-Gehalt (Kontrollen: n = 9 ; NAFLD-Patienten: n = 20); C: Plasma-Peptidoglykangehalt (Kontrollen: n = 6; NAFLD-Patienten: n = 15). Die Werte sind als MW ± SEM dargestellt. *p < 0.05. NAFLD = nicht-alkoholbedingte Fettlebererkrankung; K = gesunde Kontrollen; LBP = Lipopolysaccharid-bindendes Protein.

4.5 Konzentration an hs-CRP und NO (Nitrit/Nitrat) im Blut von NAFLD-Patienten und gesunden Kontrollen

hs-CRP

Die Konzentration an hs-CRP im Serum der Probanden wurde mittels Sandwich-ELISA gemessen (siehe Kapitel 3.6). Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Der CRP-Wert war im Mittel in der NAFLD-Gruppe 5,4-mal so hoch wie jener der gesunden Kontrollen (NAFLD: +445%) (siehe Abbildung 7).

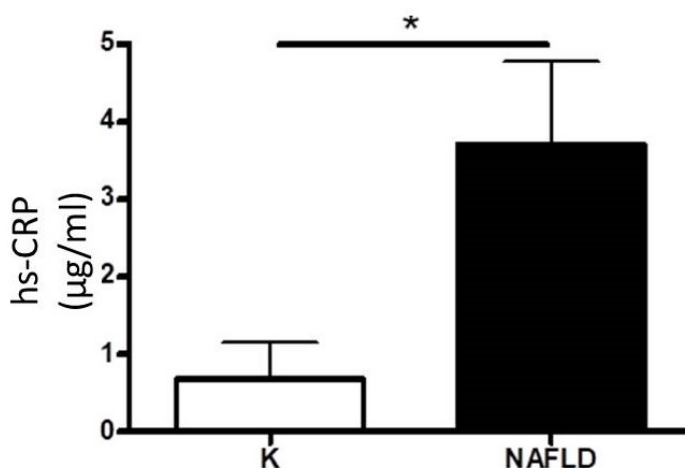


Abbildung 7: Hs-CRP-Spiegel im Serum von NAFLD-Patienten und gesunden Kontrollen.

(Kontrollen: n = 7; NAFLD-Patienten: n = 16). Die Werte sind als MW ± SEM dargestellt. *p < 0.05. NAFLD = nicht-alkoholbedingte Fettlebererkrankung; K = gesunde Kontrollen; hs-CRP = Hochsensitives C-reaktives Protein.

Nitrit/Nitrat

Mittels eines kommerziellen Assays wurde der Nitrit/Nitrat-Gehalt im Plasma der Probanden gemessen (siehe Kapitel 3.6). Der Nitrit/Nitrat-Wert der Kontrollgruppe war rund 1,4-mal so hoch wie jener der NAFLD-Gruppe (NAFLD: -31%). Der Unterschied war nicht signifikant, zeigte aber einen Trend an (p=0.09) (siehe Abbildung 8).

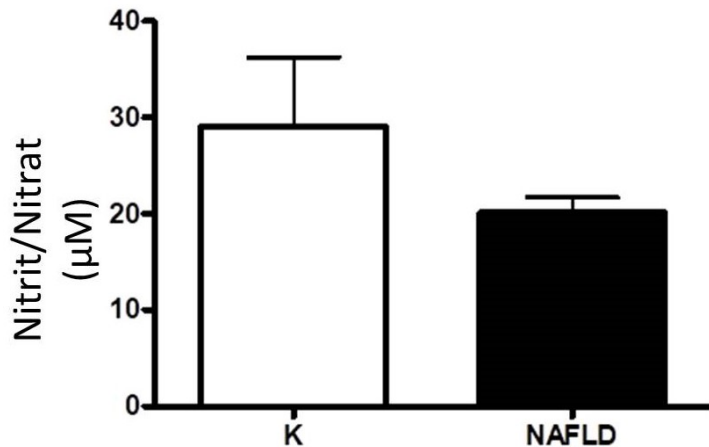


Abbildung 8: Nitrit/Nitrat-Spiegel im Plasma von NAFLD-Patienten und gesunden Kontrollen.

(Kontrollen: n = 6; NAFLD-Patienten: n = 15). Die Werte sind als MW $\pm$ SEM dargestellt. *p < 0.05. NAFLD = nicht-alkoholbedingte Fettlebererkrankung; K = gesunde Kontrollen.

4.6 Expression von TLRs und MyD88 mRNA in isolierten PBMCs der NAFLD-Patienten und gesunden Kontrollen

TLR mRNA-Expression in unstimulierten PBMCs

Ohne Stimulation mit LPS wurde nur bei TLR6 eine signifikant höhere mRNA-Expression in PBMCs von NAFLD-Patienten im Vergleich zu jenen von gesunden Kontrollen gefunden (NAFLD: +51%). Die mRNA Expression von TLR1, 2, 4, 7 und 8 war in den PBMCs der NAFLD-Patienten zwar um +36%, +37%, +22%, +25% und +12% höher als in jenen von gesunden Kontrollen, jedoch wurde das Signifikanzniveau nicht erreicht. Die mRNA-Expression von TLR5 und 10 war in den PBMCs von NAFLD-Patienten um -9% und -32% niedriger, wobei auch hier das Signifikanzniveau nicht erreicht wurde. Bei TLR3 und TLR9 lag die mRNA-Expression in beiden Gruppen unter der Nachweisgrenze (siehe Abbildungen 9 und 10).

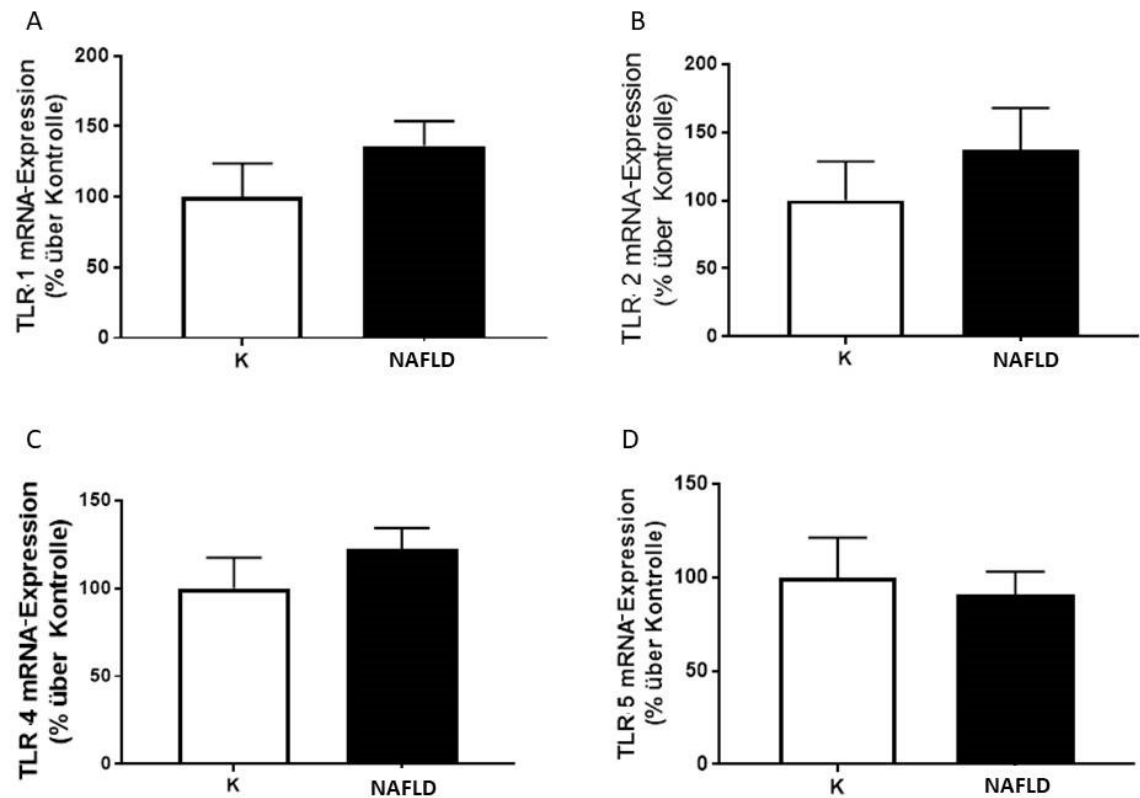


Abbildung 9: TLR1, 2, 4 und 5 mRNA-Expression in PBMCs von NAFLD-Patienten und gesunden Kontrollen. A: TLR1 mRNA-Expression; B: TLR2 mRNA-Expression d; C: TLR4 mRNA-Expression; D: TLR5 mRNA-Expression. (Kontrollen: n = 7; NAFLD-Patienten: n = 16). Die Werte sind als MW $\pm$ SEM dargestellt. *p < 0.05. TLR = Toll-like Rezeptor; NAFLD = nicht-alkoholbedingte Fettlebererkrankung; K = gesunde Kontrollen.

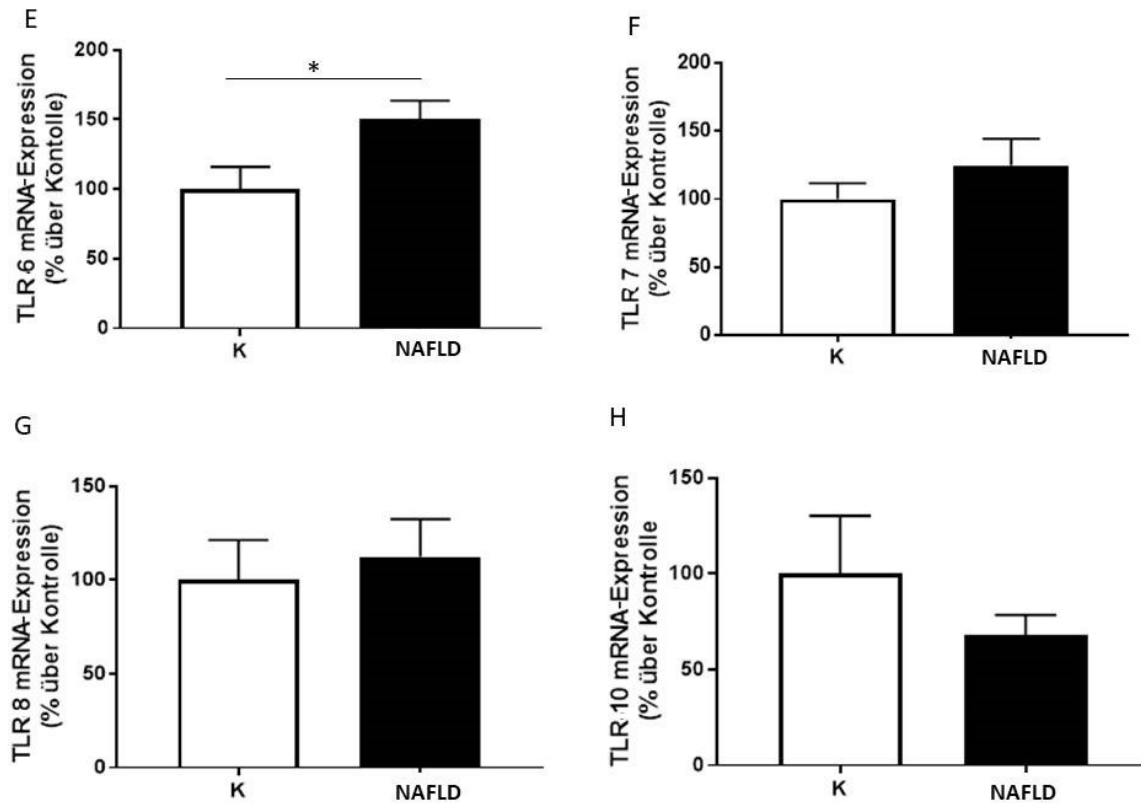


Abbildung 10: TLR6, 7, 8 und 10 mRNA-Expression in PBMCs von NAFLD-Patienten und gesunden Kontrollen. E: TLR6 mRNA-Expression; F: TLR7 mRNA-Expression; G: TLR8 mRNA-Expression; H: TLR10 mRNA-Expression. (Kontrollen: n = 7; NAFLD-Patienten: n = 16). Die Werte sind als MW ± SEM dargestellt. *p < 0.05. TLR = Toll-like Rezeptor; NAFLD = nicht-alkoholbedingte Fettlebererkrankung; K = gesunde Kontrollen.

MyD88 mRNA-Expression in unstimulierten PBMCs

Wie die Abbildung 11 zeigt, gab es keinen signifikanten Unterschied bei der mRNA-Expression von MyD88 in den unstimulierten PBMCs der beiden Gruppen (NAFLD: +13%; $p=0.49$).

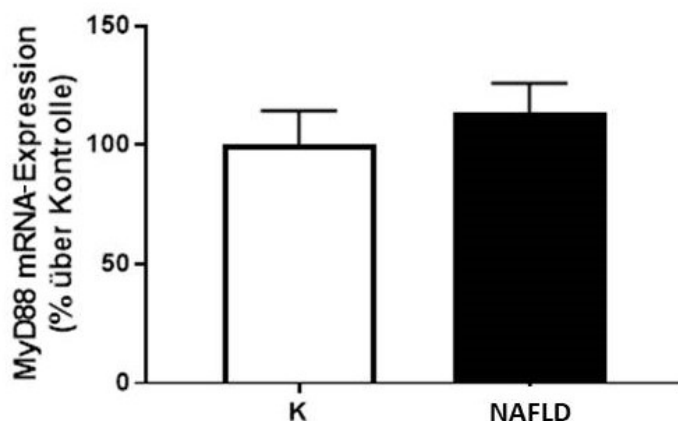


Abbildung 11: Vergleich der MyD88 mRNA-Expression in PBMCs von NAFLD-Patienten und gesunden Kontrollen. (Kontrollen: $n = 7$; NAFLD-Patienten: $n = 16$). Die Werte sind als $MW \pm SEM$ dargestellt. $*p < 0.05$. NAFLD = nicht-alkoholbedingte Fettlebererkrankung; K = gesunde Kontrollen; MyD88 = *myeloid differentiation primary response gene 88*.

4.7 Expression von TLR4 und MyD88 mRNA in isolierten, mit LPS stimulierten PBMCs der NAFLD-Patienten und gesunden Kontrollen

TLR4 mRNA-Expression in mit LPS stimulierten PBMCs

Nach der Stimulation der PBMCs mit LPS für 18 h wurde die mRNA-Expression von TLR4 mit der mRNA-Expression in den unstimulierten PBMCs der gleichen Person verglichen. Bei den NAFLD-Patienten wurde eine signifikante Verringerung der TLR4 mRNA-Expression durch LPS festgestellt (-57%), während die Anzahl der Kontrollen ($n=5$) zu gering war, um statistisch ausgewertet zu werden (K-LPS: -10%) (siehe Abbildung 12).

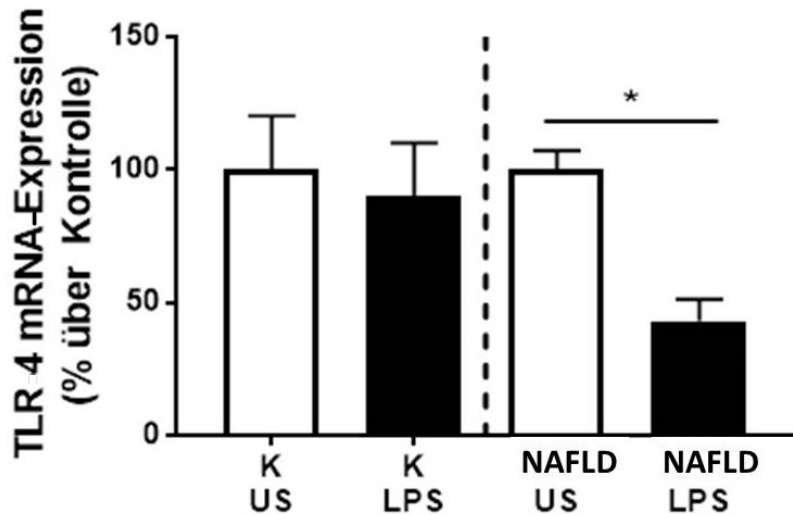


Abbildung 12: Vergleich der TLR4 mRNA-Expression mit und ohne LPS-Stimulation der PBMCs von NAFLD-Patienten und gesunden Kontrollen innerhalb der Gruppen. (Kontrollen: n = 5; NAFLD-Patienten: n = 13). Die Werte sind als MW $\pm$ SEM dargestellt. *p < 0.05. NAFLD = nicht-alkoholbedingte Fettlebererkrankung; K = gesunde Kontrollen; US = unstimuliert; LPS = stimuliert mit LPS.

MyD88 mRNA-Expression in mit LPS stimulierten PBMCs

Ebenso wurde nach der 18-stündigen Stimulation der PBMCs mit LPS die mRNA-Expression von MyD88 mit der mRNA-Expression in den unstimulierten PBMCs der gleichen Person verglichen. Wie Abbildung 13 zeigt, gab es bei den NAFLD-Patienten keinen signifikanten Unterschied, wobei jedoch ein Trend (p=0.06) zu einer geringeren Expression in den stimulierten PBMCs beobachtet wurde (NAFLD-LPS: -27%). Die Anzahl (n=5) der Kontrollgruppe war zu gering um statistisch ausgewertet zu werden, jedoch schien es keinen Unterschied bei der mRNA-Expression von MyD88 mit und ohne Stimulation mit LPS gegeben zu haben (K-LPS: -2%).

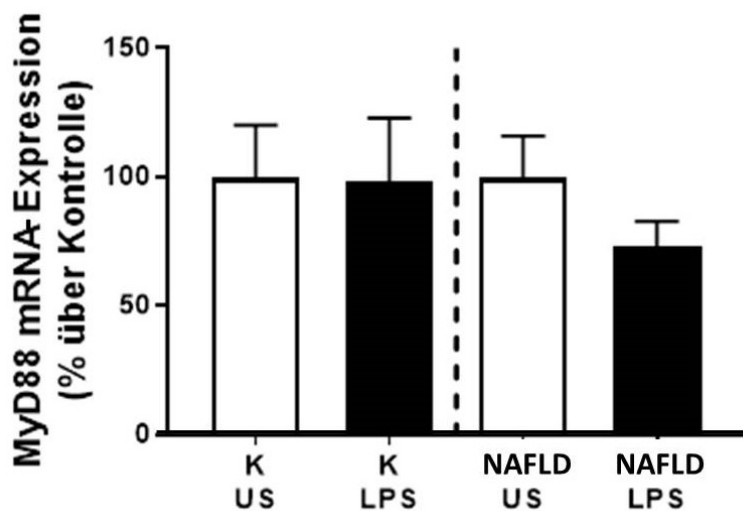


Abbildung 13: Vergleich der MyD88 mRNA-Expression mit und ohne LPS-Stimulation der PBMCs von NAFLD-Patienten und gesunden Kontrollen innerhalb der Gruppen. (Kontrollen: n = 5; NAFLD-

Patienten: n = 14). Die Werte sind als MW $\pm$ SEM dargestellt. *p < 0.05. NAFLD = nicht-alkoholbedingte Fettlebererkrankung; K = gesunde Kontrollen; US = unstimuliert; LPS = stimuliert mit LPS; MyD88 = *myeloid differentiation primary response gene 88*.

4.8 Proinflammatorische Zytokine im Zellkulturüberstand von PBMCs von NAFLD-Patienten und gesunden Kontrollen

IL-6 und TNF- α

Im Zellkulturüberstand des Stimulationsexperiments der PBMCs von NAFLD-Patienten und gesunden Kontrollen wurde die Menge der sezernierten proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- α mittels ELISA gemessen (siehe Kapitel 3.5 und 3.6). Wegen der geringen Anzahl an gesunden Kontrollen (n=5) konnte nur ein deskriptiver Vergleich aller vier Gruppen – Kontrollen unstimuliert, Kontrollen stimuliert mit LPS, NAFLD-Patienten unstimuliert, NAFLD-Patienten stimuliert mit LPS – vorgenommen werden.

Die Menge an IL-6 im Zellkulturüberstand der unstimulierten PBMCs der NAFLD-Patienten war um -38% geringer als die der unstimulierten PBMCs der Kontrollgruppe. Beim Vergleich der stimulierten PBMCs der beiden Gruppen, wies erneut die NAFLD-Gruppe weniger IL-6 auf (-49%). Auch der Faktor der Erhöhung der Sekretion von IL-6 durch die Stimulation mit LPS war bei den NAFLD-Patienten mit 12.7 geringer als jener der Kontrollgruppe mit 15.3 (siehe Abbildung 14).

Der Gehalt an TNF- α im Zellkulturüberstand war ebenfalls bei den PBMCs der NAFLD-Patienten sowohl unstimuliert (-88%) als auch stimuliert (-35%) niedriger als bei den jeweiligen PBMCs der Kontrollgruppe. Die TNF- α -Sekretion erhöhte sich jedoch durch die Stimulation mit LPS bei den NAFLD-Patienten um einen höheren Faktor (NAFLD: 232.4; K: 42.5). Nur die beiden Gruppen „NAFLD unstimuliert“ und „NAFLD stimuliert mit LPS“ konnten aufgrund einer ausreichenden Anzahl an Probanden auf signifikante Unterschiede getestet werden. Durch die Stimulation mit LPS erhöhte sich bei den PBMCs der NAFLD-Patienten sowohl die Ausschüttung von IL-6 (NAFLD-LPS: +1170%) als auch jene von TNF- α (NAFLD-LPS: +23143%) signifikant (siehe Abbildung 14).

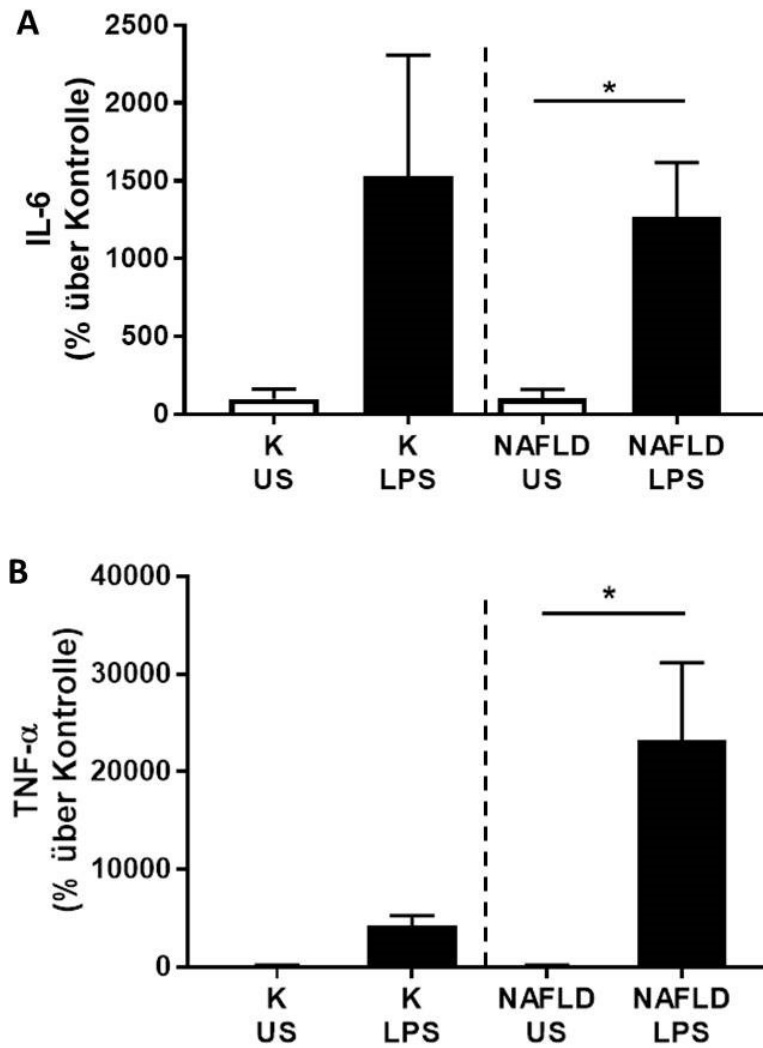


Abbildung 14: Vergleich der Sekretion von IL-6 und TNF- α mit und ohne LPS-Stimulation der PBMCs von NAFLD-Patienten und gesunden Kontrollen innerhalb der Gruppen. A: IL-6 Sekretion. B: TNF- α Sekretion. (Kontrollen: n = 5; NAFLD-Patienten: n = 14). Die Werte sind als MW $\pm$ SEM dargestellt. *p < 0.05. NAFLD = nicht-alkoholbedingte Fettlebererkrankung; K = gesunde Kontrollen; US = unstimuliert; LPS = stimuliert mit LPS; IL-6 = Interleukin-6; TNF- α = Tumornekrosefaktor-alpha.

5 Diskussion

Da die Prävalenz von Diabetes mellitus Typ 2 und Adipositas, welche zu den Hauptrisikofaktoren der NAFLD zählen (6), ansteigt, wachsen auch die Inzidenz und Prävalenz der NAFLD (53). So gilt die NAFLD derzeit als die häufigste chronische Lebererkrankung weltweit (1). Dennoch sind die molekularen Mechanismen, die der Entstehung und Progression der NAFLD zugrunde liegen, noch nicht vollends geklärt (28,29). Studien weisen jedoch darauf hin, dass neben Insulinresistenz, oxidativem Stress und proinflammatorischen Zytokinen (3) auch eine veränderte Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota sowie eine veränderte Funktion der Darmbarriere und erhöhte Endotoxin-Spiegel eine Rolle bei der Entwicklung der Erkrankung spielen (14,29,31–33). Über TLR4 und andere TLRs scheinen Toxine, die über die Darmbarriere gelangen, zur Pathogenese der NAFLD beizutragen (8,29,30). So konnte die eigene Arbeitsgruppe bereits sowohl in der Leber von NAFLD-Patienten als auch im Lebergewebe von Mäusen mit Fruktose-induzierter Fettleber eine veränderte TLR mRNA-Expression feststellen (28,38).

Um nun die Expression von TLRs und deren Signalweg in PBMCs zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit die mRNA-Expression von TLRs und MyD88 sowie die Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- α in PBMCs von NAFLD-Patienten mit gesunden Kontrollen verglichen. Weiterhin wurden die beiden Gruppen auf Unterschiede bezüglich Marker der intestinalen Permeabilität, NO und CRP im Blut untersucht.

5.1 Vergleich von metabolischen und klinisch-chemischen Parametern der NAFLD-Patienten und gesunden Kontrollen

In der NAFLD-Gruppe waren die Werte des systolischen und diastolischen Blutdrucks, der Harnsäure, der Triglyceride und der Nüchtern glukose höher sowie das HDL-Cholesterin im Vergleich zu den Kontrollen niedriger. All dies sind Kriterien, die der Definition des metabolischen Syndroms dienen (70), welches mit der NAFLD assoziiert wurde (1,2). Hierbei lagen jedoch alle Werte innerhalb des Referenzbereichs des Labors Dr. Greiner, nur der Blutdruck der NAFLD-Patienten fiel in die Kategorie Hypertonie, welche ein Teilkriterium des metabolischen Syndroms darstellt (70,71). Auch in andern Studien wiesen NAFLD-Patienten im Vergleich zu Personen ohne NAFLD einen höheren systolischen bzw. diastolischen Blutdruck, höhere Werte der Harnsäure, der Triglyceride und der Nüchtern glukose sowie erniedrigtes HDL-Cholesterin auf (72–74). Diese Ergebnisse wurden auch im Vergleich zu BMI-gematchten Kontrollen gefunden (75–79). Weiterhin deuten Untersuchungen auf eine Assoziation

zwischen Hypertonie und NAFLD hin (1,2). Dabei ist jedoch zu erwähnen, dass Hypertonie, Hypertriglyceridämie, Hyperurikämie und eine erhöhte Nüchtern glukose bzw. Diabetes als Ausschlusskriterien für die Kontrollgruppe galten.

Das Gesamtcholesterin und das LDL-Cholesterin der NAFLD-Gruppe lagen außerhalb des Referenzbereichs des Labors Dr. Greiner und waren höher als jene der Kontrollgruppe, was im Einklang mit der Assoziation zwischen Hyper-/Dyslipidämie und der NAFLD anderer Untersuchungen steht (1,2). So wiesen NAFLD-Patienten auch in anderen Studien höhere Werte an Gesamt- bzw. LDL-Cholesterin im Vergleich zu Kontrollen auf (72,80,81), wobei einige Untersuchungen mit BMI-gematchten Kontrollen keinen Unterschied dieser Werte zeigten (75,76,78,79). Der LDL-Cholesterin/HDL-Cholesterin-Quotient der NAFLD-Gruppe der vorliegenden Arbeit war ebenfalls höher als jener der Kontrollgruppe, lag jedoch im Normalbereich (68).

Auch die Mittelwerte der Transaminasen ALT und AST waren in der NAFLD-Gruppe höher als bei den Kontrollen. Dabei überstieg der Mittelwert der ALT-Aktivität den Referenzbereich des Labors Dr. Greiner (w: <35; m: <50). Der Mittelwert der AST-Aktivität befand sich zwischen den Grenzen des Referenzbereichs für Frauen und Männer (w: <35; m: <50). Auch in anderen Studien wiesen NAFLD-Patienten im Vergleich zu BMI-gematchten und nicht BMI-gematchten Kontrollen eine erhöhte ALT- (76,80,82) und AST-Aktivität (13,78) auf, wobei die AST-Aktivität im Normalbereich lag (13,78). Die NAFLD gilt zwar als die häufigste Ursache für erhöhte Leberenzyme (83), welche Anzeichen einer Leberschädigung sind (84), generell deuten Untersuchungen mit NAFLD-Patienten jedoch sowohl auf eine erhöhte Aktivität der Leberenzyme (80,82,85,86) als auch auf eine im Normalbereich (44,87–89) hin. Zusätzlich muss erwähnt werden, dass erhöhte ALT bzw. AST-Werte als Ausschlusskriterium für die Kontrollen galten.

5.2 Vergleich der Körperzusammensetzung der NAFLD-Patienten und gesunden Kontrollen

Mittels Bioelektrischer Impedanzanalyse (BIA) wurden die beiden Gruppen der vorliegenden Arbeit auf Unterschiede bezüglich Fettmasse und fettfreier Masse untersucht. Die NAFLD-Gruppe wies eine höhere Fettmasse (in % und kg) als die Kontrollgruppe auf, was im Einklang mit ihrem höheren BMI steht. So stellten auch Catalano et al. bei NAFLD-Patienten sowohl einen höheren BMI als auch einen höheren Prozentsatz an Fettmasse im Vergleich zu den Kontrollen fest (90). Eine weitere Studie deutet auf eine Assoziation zwischen dem BMI und dem Anteil an Gesamtkörperfett hin (91). In einer Untersuchung von Nishioji et al. hatten

jedoch NAFLD-Patienten sowohl mit einem BMI $< 25 \text{ kg/m}^2$ als auch mit einem BMI $\geq 25 \text{ kg/m}^2$ einen höheren Körperfettanteil verglichen mit Personen ohne NAFLD aus derselben BMI-Klasse, wobei der Körperfettanteil nur bei männlichen Personen mit einem BMI $< 25 \text{ kg/m}^2$ als unabhängiger Risikofaktor, eine NAFLD zu entwickeln, identifiziert wurde (92). In der vorliegenden Arbeit war zusätzlich die fettfreie Masse der NAFLD-Gruppe höher als jene der Kontrollen. Auch in einer Studie von Dasarathy et al. wiesen NAFLD-Patienten neben einer höheren Fettmasse und einem höheren BMI zusätzlich eine höhere fettfreie Masse auf. Die Fettmasse/fettfreie Masse-Ratio ergab jedoch eine höhere relative Fettmasse und eine niedrigere relative fettfreie Masse der NAFLD-Patienten im Vergleich zu den Kontrollen, weswegen die Daten laut den Autoren einen sarkopenischen Zustand und eine Dysregulation der Leber-Fettgewebe-Skelettmuskel-Achse der NAFLD-Patienten suggerieren (93). Die Fettmasse/fettfreie Masse-Ratio der vorliegenden Arbeit zeigte dieselben Ergebnisse. Auch adipöse Frauen hatten in einer Studie von Bredella et al. sowohl eine erhöhte Fett-Area als auch eine erhöhte Muskel-Area der Oberschenkel im Vergleich zu normalgewichtigen Frauen, wobei jedoch der Prozentsatz der Muskeln bei den adipösen Frauen geringer war und der Prozentsatz an Fett höher (94). Sarkopenie wurde neben den Risikofaktoren Insulinresistenz und Adipositas häufig mit der NAFLD assoziiert (95). So deutet auch eine Studie von Petta et al. auf einen Zusammenhang zwischen Sarkopenie und dem Schweregrad der Fibrose und Steatose in NAFLD-Patienten hin (95).

Zusammenfassend kann der höhere Körperfettanteil der NAFLD-Patienten der vorliegenden Arbeit einerseits mit dem höheren BMI der Gruppe zusammenhängen, andererseits aber auch generell mit dem Vorliegen einer NAFLD assoziiert sein (90–92). Weiterhin könnte die in Relation zur Fettmasse geringere relative Magermasse der NAFLD-Patienten eventuell auf einen sarkopenischen Zustand und eine Dysregulation der Leber-Fettgewebe-Skelettmuskel-Achse hinweisen (93). Dies muss jedoch in weiterführenden Studien geklärt werden.

5.3 Vergleich der Ernährung der NAFLD-Patienten und Kontrollen

In der vorliegenden Arbeit unterschieden sich die NAFLD- und die Kontrollgruppe weder in ihrer Gesamtenergiezufuhr, noch in ihrer Aufnahme an Makro- und Mikronährstoffen signifikant. Bei den NAFLD-Patienten war jedoch im Trend ($p=0.08$) die Ballaststoffaufnahme niedriger.

Die Rolle der Ernährung bei der Entwicklung der NAFLD ist noch nicht vollständig geklärt (13). Jedoch führt eine kalorienreiche Ernährungsweise zu Adipositas und Insulinresistenz, welche

bekannte Risikofaktoren der NAFLD darstellen (8). Weiterhin deuten Studien mit NAFLD-Patienten neben genereller Überernährung (9,10) auch auf eine erhöhte Aufnahme an bestimmten Makronährstoffen wie gesättigten Fetten (11,12) und Zuckern (12,13) hin. So wiesen BMI-gematchte NAFLD-Patienten bei Untersuchungen häufig einen erhöhten Konsum an zuckergesüßten Getränken auf (15,96,97). Besonders eine erhöhte Fruktoseaufnahme wurde bei NAFLD-Patienten des Öfteren beobachtet und wird als Risikofaktor, eine NAFLD zu entwickeln, diskutiert (14–16,20). Hierbei stellt einen möglichen Mechanismus die Erhöhung der Darmpermeabilität durch einen vermehrten Fruktosekonsum dar, was schließlich zu höheren Endotoxin-Spiegeln und dadurch zur Aktivierung des TLR4-abhängigen Signalweges auf Kupffer-Zellen führen kann (16,39). Auch in Tierstudien konnte nachgewiesen werden, dass eine Fruktose-reiche-Diät neben einer *high-fat*-Diät, eine NAFLD erzeugen kann (34,98,99). Bezüglich des Konsums an Ballaststoffen (11,12,100) und bestimmten Vitaminen (10–12) deuten Untersuchungen mit NAFLD-Patienten auf eine erniedrigte Aufnahme hin.

Dass in der vorliegenden Arbeit trotz höherem BMI der NAFLD-Gruppe kein Unterschied bei der täglichen Energieaufnahme der beiden Gruppen vorlag, steht unter anderem im Einklang mit einer weiteren Studie der eigenen Arbeitsgruppe (14). Hierbei unterschieden sich die NAFLD-Patienten ebenfalls trotz höherem BMI bezüglich der Energieaufnahme nicht von den Kontrollen (14). Dies könnte zum Teil durch eine geringere körperliche Aktivität erklärt werden (14). Der Trend ($p = 0.08$) der NAFLD-Gruppe zu einem niedrigeren Konsum an Ballaststoffen stimmt mit den Studien von Musso et al., Zolfaghari et al. und Papandreou et al., bei denen NAFLD-Patienten eine geringere Ballaststoffaufnahme vorwiesen, überein (11,12,100), während der nicht vorhandene signifikante Unterschied bei der Aufnahme an Makro- und Mikronährstoffen in Kontrast zu oben genannten Studien steht.

Bezüglich der Abweichung der eigenen Ergebnisse zu den erwähnten Studien ist anzumerken, dass die Ernährung der NAFLD-Patienten und der Kontrollen von zwei verschiedenen Personen an zwei verschiedenen Orten (Mainz und Wien) erhoben wurde, was zu einem Mangel an Vergleichbarkeit der Ergebnisse der beiden Gruppen miteinander geführt haben könnte. Neben der Abhängigkeit des 24-h-Recalls vom Erinnerungsvermögen und Einschätzungsvermögen von Portionsgrößen der Probanden, stellt auch das *Underreporting*, welches vor allem bei übergewichtigen und adipösen Personen, besonders in Bezug auf Energie und Lebensmittel mit hohem Gehalt an Fett bzw. einfachen Kohlenhydraten, auftritt, ein Problem der Methode dar (101,102). Außerdem war auf dem Flyer zur Rekrutierung der NAFLD-Patienten eine Information zu einem geringeren Fruktosekonsum angebracht, was die Nahrungsaufnahme der NAFLD-Patienten beeinflusst haben könnte.

Insgesamt weisen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit jedoch darauf hin, dass sich die Nahrungsaufnahme zwischen Patienten mit NAFLD und Kontrollen leicht unterscheidet.

5.4 Zusammenhang zwischen der NAFLD und der Konzentration an Markern der intestinalen Permeabilität im Blut

In der vorliegenden Arbeit war die Plasmakonzentration an Endotoxin bei den NAFLD-Patienten höher, während sich die Menge an LBP im Plasma der beiden Gruppen nicht unterschied. Auch bezüglich der Peptidoglykan-Konzentration im Plasma schien es zwischen den beiden Gruppen keinen Unterschied gegeben zu haben, wobei die Kontrollgruppe jedoch zu klein war, um statistisch ausgewertet zu werden.

Wie erwähnt deuten verschiedene Studien auf eine Assoziation zwischen einer veränderten Darmbarriere, erhöhten Endotoxin-Spiegeln und der Entstehung der NAFLD hin (14,31–33). So wiesen NAFLD-Patienten in Studien der eigenen Arbeitsgruppe sowie in Studien von anderen erhöhte Konzentrationen an Endotoxin auf (13,33,103). Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Durch eine gestörte Darmbarriere können neben Endotoxin auch andere Bakterienbestandteile wie Peptidoglykan, ein Wandbestandteil gram-positiver Bakterien, ins Blut gelangen (36,37). Peptidoglykan stellt einen Liganden für TLR2 dar (104). In Studien der eigenen Arbeitsgruppe war die TLR2 mRNA-Expression sowohl im Lebergewebe von Mäusen mit Fruktose-induzierter Fettleber als auch in der Leber von NAFLD-Patienten im Vergleich zu den Kontrollen erhöht, was auf eine Rolle bei der Pathogenese der NAFLD hindeuten könnte (28,38). Wie erwähnt schien sich jedoch in der vorliegenden Arbeit die Menge an Peptidoglykan im Plasma zwischen den beiden Gruppen nicht zu unterscheiden. In Übereinstimmung gab es auch keinen Unterschied bei der mRNA-Expression von TLR2 in den PBMCs der Probanden (siehe Punkt 5.6). Zusätzlich hatte in einer Studie von Szabo et al. zwar die Gabe von LPS (TLR4-Ligand) bei Mäusen, die mit einer Methionin-Cholin-defizienten (MCD)-Diät, welche NASH verursacht, gefüttert wurden, eine erhöhte Leberschädigung und Induktion proinflammatorischer Zytokine zur Folge, jedoch nicht die Gabe von Peptidoglykan (TLR2-Ligand), verglichen mit der Kontrollgruppe (105). Generell ist die Datenlage zur Rolle von TLR2 und dessen Ligand bei der NAFLD widersprüchlich (siehe Punkt 5.6). Als weiterer Marker der intestinalen Permeabilität wurde die Menge an LBP im Plasma bestimmt. LBP ist an der Bindung von Endotoxin/LPS durch TLR4 beteiligt (21,40). So korrelierte in einer Studie der eigenen Arbeitsgruppe die Menge an Endotoxin stark mit der Konzentration an LBP im Plasma von NAFLD-Patienten (44). Darüber hinaus erwies sich LBP in einer weiteren Studie der

eigenen Arbeitsgruppe mit LBP-Knockout-Mäusen als kritischer Faktor bei der Entwicklung der NAFLD in Mäusen (29). Zusätzlich deuten Studien mit NAFLD-Patienten auf erhöhte LBP-Werte im Plasma bzw. Serum im Vergleich zu Kontrollen hin (42,43). So wiesen auch in einer Untersuchung der eigenen Arbeitsgruppe Kinder mit frühen Anzeichen einer NAFLD eine erhöhte Plasmakonzentration an LBP im Vergleich zu den Kontrollen auf (44). Im Kontrast dazu steht jedoch eine Studie von Shanab et al., bei der sich die Menge an LBP im Plasma von NASH-Patienten und Kontrollen nicht signifikant unterschied, was in Übereinstimmung mit der vorliegenden Arbeit steht (106).

Die Ergebnisse untermauern abermals die Vermutung, dass Endotoxin eine Rolle bei der Pathogenese der NAFLD spielt (33,103), wobei die Beteiligung von Peptidoglykan bzw. TLR2 und LBP noch nicht eindeutig geklärt ist und weiterer Untersuchungen bedarf.

5.5 Zusammenhang zwischen der NAFLD und der NO- und hs-CRP-Konzentration im Blut

In der vorliegenden Arbeit wies die NAFLD-Gruppe höhere Werte an hs-CRP im Serum sowie einen Trend zu einer niedrigeren Plasmakonzentration an Nitrit/Nitrat verglichen mit der Kontrollgruppe auf.

CRP zählt zu den Akut-Phase-Proteinen, stellt einen Marker für Entzündung sowie für endotheliale Dysfunktion dar und dient unter anderem zur Identifikation bakterieller Infektionen (50,107). Untersuchungen deuten auf eine Korrelation zwischen dem metabolischen Syndrom und Serum hs-CRP-Spiegeln, welche auch als Prädiktoren für kardiovaskuläre Events gelten, hin (108,109). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wiesen Patienten mit NAFLD, der hepatischen Manifestation des metabolischen Syndroms (7), auch in anderen Studien erhöhte Mengen an hs-CRP im Serum im Vergleich zu Kontrollen auf (46,110,111).

Zudem besteht die Vermutung, dass eine erhöhte Bildung von ROS, besonders von NO und anderen reaktiven Stickstoffspezies, eine Rolle bei der Entwicklung verschiedener Lebererkrankungen (z.B. NASH) spielt. So wird diskutiert, dass iNOS, welche zur Produktion von NO und anderen ROS beiträgt, an dem durch Endotoxin ausgelösten TLR4-abhängigen Signalweg und folgender Leberschädigung beteiligt ist (zur Übersicht siehe: (49)). Gleichzeitig ist NO aber ein wichtiger blutdrucksenkender Vasodilator (51) und stellt neben hs-CRP einen weiteren Marker für vaskuläre endotheliale Dysfunktion dar (50). Da NO eine sehr kurze Halbwertszeit besitzt, wird meist die Konzentration an Nitrit/Nitrat gemessen (50).

Untersuchungen von Jalali et al. und Node et al. weisen auf eine niedrigere Menge an Nitrit/Nitrat im Plasma von Patienten mit essentieller Hypertonie verglichen mit Kontrollen hin (50,52) und es scheint ein Zusammenhang zwischen Hypertonie und der NAFLD zu bestehen (1,2,19). Da der Mittelwert des Blutdrucks in der NAFLD-Gruppe der vorliegenden Arbeit sowohl höher als jener der Kontrollgruppe war und gleichzeitig in die Kategorie Hypertonie fiel, steht der Trend zu einer niedrigeren Nitrit/Nitrat-Konzentration der NAFLD-Patienten im Einklang mit den von Jalali et al. und Node et al. gezeigten niedrigeren Nitrit/Nitrat-Werten in Patienten mit Hypertonie (50,52).

Zusammenfassend deuten die erhöhten hs-CRP-Werte der NAFLD-Gruppe auf einen Entzündungszustand der Patienten hin (108,109). Da sowohl hs-CRP erhöht war, ein Trend zu einer niedrigeren NO-Konzentration bei den NAFLD-Patienten im Vergleich zu den Kontrollen bestand und diese Parameter Marker der vaskulären endothelialen Dysfunktion darstellen, könnten die Ergebnisse ein Anzeichen für eine veränderte endotheliale Funktion der NAFLD-Patienten sein (50). Es werden jedoch weitere Studien benötigt, um die Rolle von NO bei der NAFLD zu klären.

5.6 Zusammenhang zwischen der NAFLD und der mRNA-Expression von TLRs und MyD88 sowie der Sekretion von TNF- α und IL-6 in PBMCs

In der vorliegenden Arbeit wurden die mRNA-Expression von TLR1-10 und MyD88 in PBMCs von NAFLD-Patienten und Kontrollen untersucht sowie die mRNA-Expression von TLR4 und MyD88 und die Sekretion von TNF- α und IL-6 mit und ohne Stimulation der PBMCs mit LPS gemessen.

Einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen gab es bezüglich der mRNA-Expression nur bei jener von TLR6, welche bei den NAFLD-Patienten erhöht war. Zwar war die mRNA-Expression von TLR1, 2, 4, 7 und 8 der NAFLD-Patienten auch höher als jene der Kontrollen, jedoch wurde das Signifikanzniveau nicht erreicht. Zusätzlich lag die mRNA-Expression von TLR3 und TLR9 in beiden Gruppen unter der Nachweisgrenze und es war kein Unterschied bei der MyD88 mRNA-Expression zu finden.

Die mit LPS stimulierten PBMCs der NAFLD-Patienten wiesen eine signifikant geringere mRNA-Expression von TLR4 sowie einen Trend zu einer niedrigeren MyD88 mRNA-Expression verglichen mit ihren unstimulierten PBMCs auf. Durch die Stimulation mit LPS stieg die Sekretion an TNF- α und IL-6 in den PBMCs der NAFLD-Patienten signifikant an. Die absoluten Mengen der Zytokine im Zellkulturüberstand der PBMCs der NAFLD-Gruppe waren aber

sowohl mit als auch ohne Stimulation mit LPS niedriger als bei den Kontrollen, wobei die Kontrollgruppe zu klein war, um in Bezug auf TNF- α und IL-6 sowie TLR4 und MyD88 statistisch ausgewertet zu werden.

Mehrere Studien weisen darauf hin, dass die Pathogenese der NAFLD mit einer veränderten Darmbarriere und erhöhten Endotoxin-Spiegeln einhergeht (14,31–33). Durch eine gestörte Darmbarriere können Bakterienprodukte, welche Liganden für TLRs darstellen, über die Pfortader zur Leber gelangen (36,37). So wurde eine erhöhte Endotoxin-Translokation im Tiermodell mit einer Veränderung der TLR Expression sowie der TLR-abhängigen Signalkaskaden assoziiert (zur Übersicht siehe (28)). Endotoxin/LPS dient als Ligand von TLR4, welcher nach Aktivierung unter anderem MyD88 als Adaptermolekül rekrutiert und die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α und IL-6 verursacht (22,104). Sowohl Untersuchungen im Tiermodell der NAFLD als auch Humanstudien mit NAFLD-Patienten deuten auf eine Rolle von TLR4 und MyD88 bei der Pathogenese der Krankheit hin (28,38,39). Des Weiteren wurden TNF- α und IL-6 mit Entzündung, Insulinresistenz und Fibrose assoziiert (18,20,37).

So wiesen in einer Studie der eigenen Arbeitsgruppe sowohl Wildtyp- als auch TLR4-Mutant-Mäuse nach einer Fruktose-reichen Diät erhöhte Endotoxin-Spiegel im Pfortaderblut auf, was jedoch nur bei den Wildtyp-Mäusen zu erhöhten hepatischen MyD88 und TNF- α -Level sowie Anzeichen von Insulinresistenz (u.a. höhere Plasma-TNF- α -Level) führte (39). Außerdem hatten die TLR-4 Mutant-Mäuse eine geringere hepatische Lipidperoxidation und Triglyceridakkumulation in der Leber (39). Konsistent damit waren in einer Studie von Csak et al. in TLR4-Knockout-Mäusen die Entwicklung der NASH sowie die Fibrose der Leber nach Gabe einer MCD-Diät verglichen mit Mäusen des Kontroll-Genotyps geringer (112). Weiterhin wiesen bei einer Untersuchung von Miura et al. MyD88-defiziente Mäuse nach Gabe einer Cholin-defizienten Aminosäure-definierten (CDAA)-Diät (NASH-Modell) eine geringere Ausbildung einer Steatohepatitis, eine niedrigere hepatische Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-6, TNF- α , IL-1 α und IL-1 β sowie eine geringere Insulinresistenz im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen auf (113). Zusätzlich führte eine intraperitoneale Injektion von LPS bei Mäusen, die mit einer MCD-Diät (NASH-Modell) gefüttert wurden, zu einer erhöhten TNF- α Expression im Vergleich zu den Kontrollmäusen (114). Auch in einer Humanstudie waren die Level an TNF- α im Blut von adipösen NAFLD-Patienten nach dessen Stimulation mit LPS höher als bei den Kontrollen (115). Im Gegensatz dazu wiesen PBMCs von NASH-Patienten in einer Untersuchung von Shanab et al. nach der Stimulation mit LPS verglichen mit den Kontrollen keine höheren Level an TNF- α und IL-6 auf,

was mit Dysfunktion der PBMCs oder Toleranz gegenüber LPS wegen dauernder Exposition erklärt wurde (106). Studien der eigenen Arbeitsgruppe sowie anderer deuten dagegen auf höhere TNF- α - (45,46) und IL-6-Spiegel (44,48) im Blut von Patienten mit NAFLD hin.

Die im Vergleich zu den Kontrollen nicht erhöhten Level an TNF- α und IL-6 im Zellkulturüberstand der mit LPS stimulierten PBMCs der NAFLD-Patienten der vorliegenden Arbeit stimmen mit der Studie von Shanab et al. überein und könnten ebenfalls durch Toleranz erklärt werden, da die NAFLD-Gruppe, wie unter Punkt 5.4 erwähnt, höhere Endotoxin-Spiegel im Plasma aufwies, was zur Toleranz bzw. Desensibilisierung der PBMCs gegenüber LPS geführt haben könnte (106).

Andererseits ist zu der niedrigeren mRNA-Expression von TLR4 sowie dem Trend zu einer niedrigeren mRNA-Expression von MyD88 in den PBMCs der NAFLD-Patienten mit zeitgleichem Anstieg der TNF- α - und IL-6-Sekretion nach der Stimulation mit LPS zu sagen, dass die Protein-Ebene von MyD88 und TLR4 nicht untersucht wurde. So hatte bei einer Studie von Romics et al. das Priming mit *Propionibacterium acnes*, von welchem gezeigt wurde, dass es eine Sensibilisierung gegenüber LPS, die Expression von Zytokinen und Leberversagen verursacht, zwar erhöhte hepatische TLR4-Protein-Level, jedoch keine Erhöhung der mRNA-Expression von TLR4 in der Leber von Mäusen zur Folge (116). Zusätzlich könnte die Art des untersuchten Gewebes/der untersuchten Zellen eine Rolle spielen. So führte bei der Studie von Romics et al. die Stimulation mit LPS nach dem Priming mit *Propionibacterium acnes* zwar sowohl in der Leber von Mäusen als auch in Hepatozyten, jedoch nicht in Makrophagen zu erhöhter mRNA-Expression von MD2 und CD14, beides Korezeptoren von TLR4 (116).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten also zum einen auf eine mögliche Rolle der Toleranz von PBMCs von NAFLD-Patienten gegenüber LPS durch häufige Exposition bei der Aktivierung des TLR4-abhängigen Signalweges und der Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen hin (106). Unklar ist hierbei jedoch, ob es einen Unterschied zwischen Protein- und mRNA-Level von TLR4 und MyD88 gab und welche Rolle das untersuchte Gewebe bzw. die untersuchten Zellen spielen. Um dies zu klären, bedarf es weiterer Untersuchungen.

Weitere Studien im Tiermodell weisen auch auf eine Rolle von anderen TLRs neben TLR4 bei der Pathogenese der NAFLD hin. So gibt es einerseits Untersuchungen, die bei TLR2-Knockout-Mäusen auf einen protektiven Effekt der Abwesenheit von TLR2 gegenüber Steatose und Anzeichen der NASH hindeuten (117,118) und andererseits Studien, die auf eine Verstärkung der NASH in Abwesenheit von TLR2 hinweisen (105,119). Hinzukommend waren in Untersuchungen von Garcia-Martinez et al. und Miura et al. in TLR9-defizienten Mäusen die Entzündung und Steatose bzw. Fibrose nach Gabe einer *high-fat*-Diät bzw. CDAA-Diät im

Vergleich zu Wiltyp-Mäusen geringer, was auf eine Rolle von TLR9 bei der NAFLD hindeuten könnte (113,120). In einer Untersuchung der eigenen Arbeitsgruppe war jedoch kein Unterschied bei der TLR9 mRNA-Expression in der Leber von Mäusen mit Fruktose-induzierter Fettleber im Vergleich zur Kontrollgruppe zu sehen (38). Zusätzlich wiesen in dieser Studie die Mäuse mit Fruktose-induzierter Fettleber eine erhöhte hepatische mRNA-Expression von TLR1, 2, 3, 4, 6, 7 und 8 sowie von MyD88 auf (38).

Weniger Humanstudien zur Untersuchung der TLRs in Bezug auf die NAFLD existieren. In Studien der eigenen Arbeitsgruppe und anderer wiesen NAFLD-Patienten in der Leber und in CD14-positiven Zellen eine erhöhte TLR4 Expression im Vergleich zu Kontrollen auf (14,41,106). Dahingegen unterschied sich die Expression von TLR2 in den Untersuchungen von Shanab et al., Singh et al. und Arias Loste et al. zwischen NAFLD-Patienten und Kontrollen nicht, wobei in der Studie von Arias Loste et al. die Expression von TLR6 in NAFLD-Patienten erhöht war (41,106,121). Im Gegensatz dazu war bei einer Untersuchung der eigenen Arbeitsgruppe die mRNA-Expression von TLR2 neben der mRNA-Expression von TLR1, 3, 4 und 5 sowie von MyD88 in der Leber von NAFLD-Patienten im Vergleich zu Kontrollen erhöht, jedoch nicht jene von TLR6-10 (28).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, ob die unter anderem von der eigenen Arbeitsgruppe gezeigte Veränderung der Expression von TLRs im Lebergewebe von Mäusen mit Fruktose-induzierter Fettleber (38) sowie in der Leber von NAFLD-Patienten (28) auch in PBMCs von NAFLD-Patienten zu finden ist. Unterschiede der eigenen Arbeit zu früheren Ergebnissen können also einerseits auf die Differenz zwischen Mausmodell und Mensch zurückzuführen sein, andererseits auf die Verschiedenheit zwischen Leber und PBMCs.

So war in der oben genannten Studie von Arias-Loste et al. die Expression von TLR6 zwar im Lebergewebe von NAFLD-Patienten im Vergleich zu adipösen Kontrollen erhöht, dieser deutliche Unterschied in allen Arten der untersuchten PBMCs jedoch nur zwischen NASH- und Nicht-NASH-Patienten zu sehen (121). Zudem wiesen NASH-Patienten im Vergleich zu NAFL (nicht-alkoholbedingte Fettleber)-Patienten in einer Untersuchung von Sharifnia et al. eine höhere TLR4-mRNA Expression in der Leber auf (122). Dies deutet auf eine mögliche Rolle des untersuchten Gewebes bzw. der untersuchten Zellen sowie des NAFLD-Stadiums hin (121,122). Weiterhin wurde in der Arbeit von Shanab et al. zwar die Expression von TLRs in CD14-positiven Zellen, peripheren Monozyten, welche auch zu den PBMCs zählen (63), untersucht (106). Hierbei wurde aber die Expression via Messung der TLR-Proteine mittels Durchflusszytometrie und nicht die mRNA-Expression analysiert, was eventuell auch einen Unterschied der Ergebnisse erklären könnte (106). So waren in der Studie von Singh et al. zwar sowohl die TLR4-mRNA- sowie die TLR4-Protein-Level in NASH-Patienten erhöht, jedoch wurde

keine Korrelation zwischen den mRNA- und Protein-Leveln gefunden (41). Neben dem Gewebe und dem NAFLD-Stadium könnte also eventuell auch die Form (mRNA oder Proteine), in welcher die Expression der TLRs gemessen wurde, einen Einfluss haben (116,121,122).

Ein weiterer Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und der früheren Studie der eigenen Arbeitsgruppe zur Untersuchung von TLRs in der Leber von NAFLD-Patienten könnte sein, dass bei der früheren Studie einige Probanden der Kontroll- sowie der NAFLD-Gruppe Lebertumore aufwiesen (28).

Zusätzlich könnte auch die geringe Anzahl von Studienteilnehmern der vorliegenden Arbeit Grund dafür sein, dass die mRNA-Expression von TLR1, 2, 4, 7 und 8 in den PBMCs der NAFLD-Patienten zwar höher als jene der Kontrollen, dieser Unterschied jedoch nicht signifikant war.

Generell deuten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass TLRs auch in PBMCs eine Rolle bei der Pathogenese der NAFLD spielen. Es werden jedoch weitere Studien mit einem größeren Probandenkollektiv benötigt, um die Funktion der TLRs in PBMCs sowie eventuelle Unterschiede zu ihrer Funktion in der Leber in Bezug auf die NAFLD vollends zu klären. Hierbei sollte zusätzlich die Expression der TLR-Proteine gemessen und zwischen verschiedenen NAFLD-Stadien differenziert werden.

5.7 Fazit

Insgesamt weisen die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zusammen mit Studien anderer darauf hin, dass die Konzentration an Endotoxin bei NAFLD-Patienten erhöht ist (13,33,103). Jedoch scheint sich dies nicht in einer veränderten Expression von TLR4 in PBMCs widerzuspiegeln. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass die erhöhte Menge an Endotoxin zur Toleranz der PBMCs von NAFLD-Patienten in Bezug auf die LPS-vermittelte Aktivierung des TLR4-abhängigen Signalweges und der Sekretion der Zytokine IL-6 und TNF- α führen könnte (106). Weiterhin weisen die Ergebnisse auf eine Rolle von TLRs in PBMCs bei der Pathogenese der NAFLD hin. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch kein Hinweis auf eine Beteiligung der anderen untersuchten Marker der intestinalen Permeabilität, LBP und Peptidoglykan, bei der NAFLD gefunden. Die erhöhte Menge an CRP im Serum deutet auf einen Entzündungszustand der NAFLD-Patienten hin und könnte zusammen mit dem Trend zu einer niedrigeren NO-Plasmakonzentration ein Hinweis auf eine veränderte endotheliale Funktion der NAFLD-Patienten sein (50).

Weitere Studien mit einem größeren Probandenkollektiv werden benötigt, um die Rolle von TLRs und deren Signalweg in PBMCs bei der Pathogenese der NAFLD zu klären und den Unterschied im Vergleich zur deren Rolle in der Leber zu definieren, wobei die Expression

sowohl in Form von mRNA als auch als Proteine gemessen werden und zwischen verschiedenen Stadien der NAFLD differenziert werden sollte. Eine gleichzeitige direkte Bestimmung der intestinalen Mikrobiota mittels Sequenzierung der 16S ribosomalen RNA im Stuhl wäre sinnvoll, um diese auf einen möglichen Zusammenhang mit der Expression von TLRs zu analysieren. Zukünftige Untersuchungen werden zeigen, ob die Expression von TLRs als prognostischer Marker der NAFLD eingesetzt werden kann. Zusätzlich bedarf es weiterer Forschung was die Rolle von NO, LBP und Peptidoglykan bei der Pathogenese der NAFLD betrifft.

Zusammenfassung

Die nicht-alkoholbedingte Fettlebererkrankung (NAFLD) gilt mit steigender Prävalenz als die häufigste chronische Lebererkrankung weltweit. Neben Adipositas, Insulinresistenz und oxidativem Stress scheinen auch bestimmte Nährstoffe und genetische Faktoren eine Rolle bei der Erkrankung zu spielen. Zusätzlich wird diskutiert, dass eine veränderte Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota sowie eine veränderte Darmbarrierefunktion einen Einfluss auf die Entwicklung der NAFLD haben. Über eine geschädigte Darmbarriere können vermehrt bakterielle Toxine eindringen, über die Pfortader zur Leber gelangen und an TLRs binden. So wurden in NAFLD-Patienten sowohl erhöhte Endotoxin-Spiegel im peripheren Blut als auch eine Induktion verschiedener TLRs und deren Signalkaskaden in der Leber gefunden. Die genaue Pathogenese der Erkrankung ist jedoch noch nicht vollends geklärt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die mRNA-Expression von TLRs und MyD88 sowie die Sekretion proinflammatorischer Zytokine in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) von NAFLD-Patienten und altersgematchten, gesunden Kontrollen zu vergleichen. Des Weiteren sollten die beiden Gruppen auf Unterschiede bezüglich Marker der intestinalen Permeabilität (Endotoxin, LBP und Peptidoglykan) sowie des Gehalts an NO und CRP im Blut untersucht werden. Insgesamt wurden 21 NAFLD-Patienten und 10 gesunde Kontrollen in die Studie eingeschlossen. In den isolierten PBMCs der NAFLD-Patienten war die mRNA-Expression von TLR6 signifikant erhöht. Die mRNA-Expression von TLR1, 2, 4, 7 und 8 war leicht, jedoch nicht signifikant erhöht. Kein Unterschied war bei der MyD88 mRNA-Expression im Vergleich zu den Kontrollen zu sehen. Zudem wiesen die mit LPS stimulierten PBMCs der NAFLD-Patienten im Vergleich zu unstimulierten PBMCs der gleichen Person eine signifikant geringere TLR4 mRNA-Expression und im Trend eine niedrigere MyD88 mRNA-Expression auf ($p=0.06$). Die Sekretion von IL-6 und TNF- α der PBMCs der NAFLD-Patienten war mit und ohne Stimulation mit LPS nicht höher als jene der Kontrollen. Zusätzlich hatten die NAFLD-Patienten höhere Endotoxin-Plasmaspiegel und hs-CRP-Serumspiegel. Es fanden sich jedoch kein Unterschied bei der LBP-Konzentration im Plasma und ein Trend zu einer niedrigeren NO-Plasmakonzentration im Vergleich zu den Kontrollen. Auch die Peptidoglykan-Konzentration im Plasma schien sich zwischen den beiden Gruppe nicht zu unterscheiden.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass ähnlich wie in der Leber TLRs bei Patienten mit NAFLD auch in PBMCs induziert sind. Weiterhin scheinen bei den NAFLD-Patienten erhöhte Endotoxin-Spiegel zur Toleranz von PBMCs gegenüber LPS zu führen. Hinzukommend weisen die Ergebnisse der vorliegenden Studie auf eine veränderte

Zusammenfassung

endotheliale Funktion der NAFLD-Patienten hin. Es werden jedoch weitere Studien mit größerem Probandenkollektiv benötigt, um die Schlussfolgerungen aus der vorliegenden Arbeit bestimmen zu können.

Abstract

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is with increasing prevalence the most common chronic liver disease worldwide. Besides obesity, insulin resistance and oxidative stress, certain nutrients and genetic factors seem to have an impact on the disease. Furthermore, it is discussed that an altered intestinal microbiota composition as well as intestinal barrier function have an effect on the development of NAFLD. Through an altered intestinal barrier more bacterial toxins can translocate, get through the portal vein to the liver and bind to TLRs. Indeed, in NAFLD-patients higher peripheral blood levels of endotoxin as well as a hepatic induction of TLRs and their signaling cascades have been found. Still, the pathogenesis of NAFLD isn't fully understood yet. The aim of this master thesis was to compare mRNA-expression of TLRs and MyD88 as well as secretion of proinflammatory cytokines in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of NAFLD-patients with those of age-matched healthy controls. In addition, concentrations of markers for intestinal permeability (endotoxin, LBP and peptidoglycan) as well as of NO and CRP in blood samples of these two groups were analyzed. A total of 21 NAFLD-patients and 10 healthy controls were enrolled in the study. In PBMCs isolated from NAFLD-patients mRNA-expression of TLR6 was significantly higher. Expressions of TLR1, 2, 4, 7 and 8 mRNA were slightly but not significantly higher. There were no differences found regarding mRNA-expression of MyD88 compared to controls. Furthermore, PBMCs of NAFLD-Patients stimulated with LPS showed, compared to unstimulated PBMCs of the same person, a significantly lower TLR4 mRNA-expression and a trend towards lower mRNA-expression of MyD88 ($p=0.06$). Secretion of IL-6 and TNF- α by PBMCs of NAFLD-patients with and without stimulation with LPS was not higher than the one of controls. Moreover, NAFLD-patients showed higher endotoxin plasma and hs-CRP serum levels. However, no differences regarding LBP concentrations in plasma and a trend towards lower NO plasma concentrations compared to controls were found. Also peptidoglycan concentrations in plasma seemed not to differ between groups.

Taken together these results suggest that similar to the findings in liver, TLR expression is also altered in PBMCs of NAFLD-patients. Furthermore, in NAFLD-Patients elevated endotoxin levels seem to lead to tolerances of PBMCs towards LPS. In addition, results of the present study also suggest that endothelial function in NAFLD-patients is altered. Still, further studies with a higher number of participants are needed to determine the implications of the present study.

Literatur

1. Demir M, Lang S, Steffen H-M. Nonalcoholic fatty liver disease – current status and future directions. *J Dig Dis*. 2015;16(10):541-557. doi:10.1111/1751-2980.12291.
2. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*. 2016;64(1):73-84. doi:10.1002/hep.28431.
3. Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism*. 2016;65(8):1038-1048. doi:10.1016/j.metabol.2015.12.012.
4. Parker HM, Johnson NA, Burdon CA, Cohn JS, O'Connor HT, George J. Omega-3 supplementation and non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis. *J Hepatol*. 2012;56(4):944-951. doi:10.1016/j.jhep.2011.08.018.
5. Gorden DL, Myers DS, Ivanova PT, Fahy E, Maurya MR, Gupta S, Min J, Spann NJ, McDonald JG, Kelly SL, et al. Biomarkers of NAFLD progression: a lipidomics approach to an epidemic. *J Lipid Res*. 2015;56(3):722-736. doi:10.1194/jlr.P056002.
6. Ratziu V, Bellentani S, Cortez-Pinto H, Day C, Marchesini G. A position statement on NAFLD/NASH based on the EASL 2009 special conference. *J Hepatol*. 2010;53(2):372-384. doi:10.1016/j.jhep.2010.04.008.
7. Boppidi H, Daram SR. Nonalcoholic fatty liver disease: hepatic manifestation of obesity and the metabolic syndrome. *Postgr Med*. 2008;120(2):E01-7. doi:10.3810/pgm.2008.07.1800.
8. Wree A, Broderick L, Canbay A, Hoffman HM, Feldstein AE. From NAFLD to NASH to cirrhosis - new insights into disease mechanisms. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013;10(11):627-636. doi:10.1038/nrgastro.2013.149.
9. Wehmeyer M, Zyriax B, Jagemann B, Roth E, Windler E, Schulze Zur Wiesch J, Lohse A, Kluwe J. Nonalcoholic fatty liver disease is associated with excessive calorie intake rather than a distinctive dietary pattern. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95(23). doi:10.1097/MD.0000000000003887.
10. Hashemi Kani A, Alavian SM, Esmailzadeh A, Adibi P, Azadbakht L. Dietary quality indices and biochemical parameters among patients with non alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Hepat Mon*. 2013;13(7). doi:10.5812/hepatmon.10943.
11. Musso G, Gambino R, De Michieli F, Cassader M, Rizzetto M, Durazzo M, Fagà E, Silli B, Pagano G. Dietary habits and their relations to insulin resistance and postprandial lipemia in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2003;37(4):909-916. doi:10.1053/jhep.2003.50132.
12. Zolfaghari H, Askari G, Siassi F, Feizi A, Sotoudeh G. Intake of nutrients, fiber, and sugar in patients with nonalcoholic fatty liver disease in comparison to healthy individuals. *Int J Prev Med*. 2016;7:98. doi:10.4103/2008-7802.188083.
13. Nier A, Brandt A, Conzelmann IB, Özel Y, Bergheim I. Non-alcoholic fatty liver disease in overweight children: role of fructose intake and dietary pattern. *Nutrients*. 2018;10(9):1329. doi:10.3390/nu10091329.

14. Thuy S, Ladurner R, Volynets V, Wagner S, Strahl S, Königsrainer A, Maier K, Bischoff SC, Bergheim I. Nonalcoholic fatty liver disease in humans is associated with increased plasma endotoxin and plasminogen activator inhibitor 1 concentrations and with fructose intake. *J Nutr*. 2008;138(8):1452-1455. doi:10.1093/jn/138.8.1452.
15. Ouyang X, Cirillo P, Sautin Y, McCall S, Bruchette JL, Diehl AM, Johnson RJ, Abdelmalek F. Fructose consumption as a risk factor for non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. 2008;48(6):993-999. doi:10.1016/j.jhep.2008.02.011.
16. Spruss A, Bergheim I. Dietary fructose and intestinal barrier: potential risk factor in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *J Nutr Biochem*. 2009;20(9):657-662. doi:10.1016/j.jnutbio.2009.05.006.
17. Centis E, Marzocchi R, Di Domizio S, Ciaravella MF, Marchesini G. The effect of lifestyle changes in non-alcoholic fatty liver disease. *Dig Dis*. 2010;28(1):267-273. doi:10.1159/000282101.
18. Romero-Gómez M, Zelber-Sagi S, Trenell M. Treatment of NAFLD with diet, physical activity and exercise. *J Hepatol*. 2017;67(4):829-846. doi:10.1016/j.jhep.2017.05.016.
19. Younossi Z, Tacke F, Arrese M, Sharma B, Mostafa I, Bugianesi E, Wong V, Yilmaz Y, George J, Fan J, et al. Global perspectives on non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2018. doi:10.1002/hep.30251.
20. Alwahsh SM, Gebhardt R. Dietary fructose as a risk factor for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Arch Toxicol*. 2017;91(4):1545-1563. doi:10.1007/s00204-016-1892-7.
21. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*. 2010;11(5):373-384. doi:10.1038/ni.1863.
22. Kawasaki T, Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol*. 2014;5:461. doi:10.3389/fimmu.2014.00461.
23. Vénéreau E, Ceriotti C, Bianchi ME. DAMPs from cell death to new life. *Front Immunol*. 2015;6:422. doi:10.3389/fimmu.2015.00422.
24. Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Semin Immunol*. 2004;16(1):3-9. doi:10.1016/j.smim.2003.10.003.
25. Mencin A, Kluwe J, Schwabe RF. Toll-like receptors as targets in chronic liver diseases. *Gut*. 2009;58(5):704-720. doi:10.1136/gut.2008.156307.
26. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:335-376. doi:10.1146/annurev.immunol.21.120601.141126.
27. Janeway CA, Medzhitov R. Innate Immune Recognition. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:197-216. doi:10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359.
28. Kanuri G, Ladurner R, Skibovskaya J, Spruss A, Königsrainer A, Bischoff SC, Bergheim I. Expression of toll-like receptors 1-5 but not TLR 6-10 is elevated in livers of patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int*. 2015;35(2):562-568. doi:10.1111/liv.12442.
29. Jin CJ, Engstler AJ, Ziegenhardt D, Bischoff SC, Trautwein C, Bergheim I. Loss of lipopolysaccharide-binding protein attenuates the development of diet-induced non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in mice. *J Gastroenterol Hepatol*. 2017;32(3):708-715. doi:10.1111/jgh.13488.

30. Henao-Mejia J, Elinav E, Jin C, Hao L, Mehal WZ, Strowig T, Thaïss CA, Kau AL, Eisenbarth SC, Jurczak MJ, et al. Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. *Nature*. 2012;482(7384):179-185. doi:10.1038/nature10809.
31. Wigg A, Roberts-Thomson I, Dymock R, McCarthy P, Grose R, Cummins A. The role of small intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability, endotoxaemia, and tumour necrosis factor alpha in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Gut*. 2001;48(2):206-211. doi:10.1136/gut.48.2.206.
32. Miele L, Valenza V, La Torre G, Montalto M, Cammarota G, Ricci R, Masciana R, Forgione A, Gabrieli ML, Perotti G, et al. Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2009;49(6):1877-1887. doi:10.1002/hep.22848.
33. Volynets V, Küpper MA, Strahl S, Maier IB, Spruss A, Wagnerberger S, Königsrainer A, Bischoff S, Bergheim I. Nutrition, intestinal permeability, and blood ethanol levels are altered in patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Dig Dis Sci*. 2012;57(7):1932-1941. doi:10.1007/s10620-012-2112-9.
34. Sellmann C, Priebis J, Landmann M, Degen C, Engstler A, Jin C, Gärttner S, Spruss A, Huber O, Bergheim I. Diets rich in fructose, fat or fructose and fat alter intestinal barrier function and lead to the development of nonalcoholic fatty liver disease over time. *J Nutr Biochem*. 2015;26(11):1183-1192. doi:10.1016/j.jnutbio.2015.05.011.
35. Xin D, Zong-Shun L, Bang-Mao W, Lu Z. Expression of intestinal tight junction proteins in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatogastroenterology*. 2014;61(129):136—140.
36. Hausmann M, Kiessling S, Mestermann S, Webb G, Spöttl T, Andus T, Schölmerich J, Herfarth H, Ray K, Falk W, et al. Toll-like receptors 2 and 4 are up-regulated during intestinal inflammation. *Gastroenterology*. 2002;122(7):1987-2000. doi:10.1053/gast.2002.33662.
37. Miura K, Seki E, Ohnishi H, Brenner DA. Role of Toll-like receptors and their downstream molecules in the development of nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterol Res Pr*. 2010. doi:10.1155/2010/362847.
38. Wagnerberger S, Spruss A, Kanuri G, Volynets V, Stahl C, Bischoff SC, Bergheim I. Toll-like receptors 1-9 are elevated in livers with fructose-induced hepatic steatosis. *Br J Nutr*. 2012;107(12):1727-1738. doi:10.1017/S0007114511004983.
39. Spruss A, Kanuri G, Wagnerberger S, Haub S, Bischoff SC, Bergheim I. Toll-like receptor 4 is involved in the development of fructose-induced hepatic steatosis in mice. *Hepatology*. 2009;50(4):1094-1104. doi:10.1002/hep.23122.
40. Ding P, Jin L. The role of lipopolysaccharide-binding protein in innate immunity: a revisit and its relevance to oral/periodontal health. *J Periodontal Res*. 2014;49(1):1-9. doi:10.1111/jre.12081.
41. Singh R, Bullard J, Kalra M, Assefa S, Kaul AK, Vonfeldt K, Strom SC, Conrad RS, Sharp HL, Kaul R. Status of bacterial colonization, Toll-like receptor expression and nuclear factor-kappa B activation in normal and diseased human livers. *Clin Immunol*. 2011;138(1):41-49. doi:10.1016/j.clim.2010.09.006.

42. Vespasiani-Gentilucci U, Carotti S, Perrone G, Mazzarelli C, Galati G, Onetti-Muda A, Picardi A, Morini S. Hepatic Toll-like receptor 4 expression is associated with portal inflammation and fibrosis in patients with NAFLD. *Liver Int.* 2015;35(2):569-581. doi:10.1111/liv.12531.
43. Ruiz AG, Casafont F, Crespo J, Cayón A, Mayorga M, Estebanez A, Fernandez-Escalante JC, Pons-Romero F. Lipopolysaccharide-binding protein plasma levels and liver TNF- α gene expression in obese patients: evidence for the potential role of endotoxin in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Obes Surg.* 2007;17(10):1374-1380. doi:10.1007/s11695-007-9243-7.
44. Nier A, Engstler AJ, Maier IB, Bergheim I. Markers of intestinal permeability are already altered in early stages of non-alcoholic fatty liver disease: Studies in children. *PLoS One.* 2017;12(9). doi:10.1371/journal.pone.0183282.
45. Engstler AJ, Aumiller T, Degen C, Dürr M, Weiss E, Maier IB, Schattenberg JM, Jin CJ, Sellmann C, Bergheim I. Insulin resistance alters hepatic ethanol metabolism: studies in mice and children with non-alcoholic fatty liver disease. *Gut.* 2016;65(9):1564-1571. doi:10.1136/gutjnl-2014-308379.
46. Ajmal M, Yaccha M, Malik M, Rabbani M, Ahmad I, Isalm N, Abdali N. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) in patients of cardiovascular diseases and its association with hs-CRP and TNF- α . *Indian Heart J.* 2014;66(6):574-579. doi:10.1016/j.ihj.2014.08.006.
47. Meli R, Raso GM, Calignano A. Role of innate immune response in non-alcoholic fatty liver disease: metabolic complications and therapeutic tools. *Front Immunol.* 2014;5:117. doi:10.3389/fimmu.2014.00177.
48. Wieckowska A, Papouchado BG, Li Z, Lopez R, Zein NN, Feldstein AE. Increased hepatic and circulating interleukin-6 levels in human nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol.* 2008;103(6):1372-1379. doi:10.1111/j.1572-0241.2007.01774.x.
49. Spruss A, Kanuri G, Uebel K, Bischoff SC, Bergheim I. Role of the inducible nitric oxide synthase in the onset of fructose-induced steatosis in mice. *Antioxid Redox Signal.* 2011;14(11):2121-2135. doi:10.1089/ars.2010.3263.
50. Jalali MJ, Phadke MS. Assessment of endothelial dysfunction in health and disease; using various parameters. *Indian J Clin Biochem.* 2011;26(4):407-412. doi:10.1007/s12291-011-0140-4.
51. Klein AV, Kiat H. The mechanisms underlying fructose-induced hypertension: a review. *J Hypertens.* 2015;33(5):912-920. doi:10.1097/HJH.0000000000000551.
52. Node K, Kitakaze M, Yoshikawa H, Kosaka H, Hori M. Reduced plasma concentrations of nitrogen oxide in individuals with essential hypertension. *Hypertension.* 1997;30(3):405-408. doi:10.1161/01.HYP.30.3.405.
53. Loomba R, Sanyal AJ. The global NAFLD epidemic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2013;10(11):686-690. doi:10.1038/nrgastro.2013.171.
54. Rivera CA, Adegboyega P, van Rooijen N, Tagalicud A, Allman M, Wallace M. Toll-like receptor-4 signaling and Kupffer cells play pivotal roles in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol.* 2007;47(4):571-579. doi:10.1016/j.jhep.2007.04.019.
55. Elmadfa I, Leitzmann C. *Ernährung Des Menschen*. 5th ed. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart; 2015.

56. Feller S, Heiner B, Pischon T. Body Mass Index, Waist Circumference, and the Risk of Type 2 Diabetes Mellitus. *Dtsch Arztebl Int.* 2010;107(25):470-476. doi:10.3238/arztebl.2010.0470.
57. Strassburg A. Ernährungserhebungen Methoden und Instrumente. *Ernährungs Umschau.* 2010;57:422-430.
58. Tucker KL, Smith CE, Lai CQ, Ordovas JM. Quantifying Diet for Nutrigenomic Studies. *Annu Rev Nutr.* 2013;33(1):349-371. doi:10.1146/annurev-nutr-072610-145203.
59. Voss S, Charrondiere U, Slimani N, Kroke A, Riboli E, Wahrendorf J, Boeing H. EPIC-SOFT a European computer program for 24-hour dietary protocols. *Z Ernährungswiss.* 1998;37(3):227-233. doi:10.1007/s003940050021.
60. Mifflin MD, St Jeor ST, Hill LA, Scott BJ, Daugherty SA, Koh YO. A new predictive equation for resting energy expenditure in healthy individuals. *Am J Clin Nutr.* 1990;51(2):241-247. doi:10.1093/ajcn/51.2.241.
61. Zarowitz BJ, Pilla AM. Bioelectrical impedance in clinical practice. *DICP.* 1989;23(7-8):548-555. doi:10.1177/1060028089023007-803.
62. Data Input. Nutriguard-MS - Gebrauchsanleitung. [http://www.data-input.de/media/pdf_deutsch_2018/Gebrauchsanleitung_Nutriguard MS_2019.pdf](http://www.data-input.de/media/pdf_deutsch_2018/Gebrauchsanleitung_Nutriguard_MS_2019.pdf) (accessed: 21 May 2019).
63. Hougee S, Sanders A, Faber J, Graus YM, van den Berg WB, Garssen J, Smit HF, Hoijer MA. Decreased pro-inflammatory cytokine production by LPS-stimulated PBMC upon in vitro incubation with the flavonoids apigenin, luteolin or chrysin, due to selective elimination of monocytes/macrophages. *Biochem Pharmacol.* 2005;69(2):241-248. doi:10.1016/j.bcp.2004.10.002.
64. Langjahr M, Schubert A-L, Sommer C, Üçeyler N. Increased pro-inflammatory cytokine gene expression in peripheral blood mononuclear cells of patients with polyneuropathies. *J Neurol.* 2018;265(3):618-627. doi:10.1007/s00415-018-8748-4.
65. Mülhardt C. *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics.* 6th ed. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg; 2009.
66. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molekularbiologie Der Zelle.* 5th ed. Wiley-VCH, Weinheim; 2011.
67. Hornbeck P, Winston SE, Fuller SA. Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISA). *Curr Protoc Mol Biol.* 2001;11(2):1-22. doi:10.1002/0471142727.mb1102s15.
68. DGE. Cholesterinwerte im Griff. Presseinformation: Presse, DGE aktuell, 09/2010. <https://www.dge.de/presse/pm/cholesterinwerte-im-griff/> (accessed 21 May 2019).
69. Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE), Österreichische Gesellschaft für Ernährung (ÖGE), Schweizerische Gesellschaft für Ernährungsforschung (SGE), Schweizerische Vereinigung für Ernährung (SVE). *D-A-CH Referenzwerte Für Die Nährstoffzufuhr.* 2. Auflage, 3. aktualisierte Ausgabe. Neuer Umschau Buchverlag, Bonn; 2017.
70. Parikh RM, Mohan V. Changing definitions of metabolic syndrome. *Indian J Endocrinol Metab.* 2012;16(1):7-12. doi:10.4103/2230-8210.91175.

71. Narkiewicz K, Redon J, Zanchetti A, Böhm M, Christiaens T, Cifkova R, De Backer G, Dominiczak A, Galderisi M, Grobbee DE, et al. ESC Pocket Guidelines - Leitlinien für das Management der arteriellen Hypertonie. *Eur Heart J*. 2013;34(28):2159-2219. doi:10.1093/eurheartj/eh151.
72. Li Y, Xu C, Yu C, Xu L, Miao M. Association of serum uric acid level with non-alcoholic fatty liver disease: A cross-sectional study. *J Hepatol*. 2009;50(5):1029-1034. doi:10.1016/j.jhep.2008.11.021.
73. Church TS, Kuk JL, Ross R, Priest EL, Biltoff E, Blair SN. Association of cardiorespiratory fitness, body mass index, and waist circumference to nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2006;130(7):2023-2030. doi:10.1053/j.gastro.2006.03.019.
74. Sirota JC, McFann K, Targher G, Johnson RJ, Chonchol M, Jalal DI. Elevated serum uric acid levels are associated with non-alcoholic fatty liver disease independently of metabolic syndrome features in the United States: Liver ultrasound data from the National Health and Nutrition Examination Survey. *Metabolism*. 2013;62(3):392-399. doi:10.1016/j.metabol.2012.08.013.
75. Targher G, Bertolini L, Padovani R, Rodella S, Zoppini G, Zenari L, Cigolini M, Falezza G, Arcaro G. Relations between carotid artery wall thickness and liver histology in subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *Diabetes Care*. 2006;29(6):1325-1330. doi:10.2337/dc06-0135.
76. Hui JM, Hodge A, Farrell GC, Kench JG, Kriketos A, George J. Beyond insulin resistance in NASH: TNF-alpha or adiponectin? *Hepatology*. 2004;40(1):46-54. doi:10.1002/hep.20280.
77. Musso G, Gambino R, Durazzo M, Biroli G, Carello M, Fag E, Pacini G, De Michieli F, Rabbione L, Premoli A, et al. Adipokines in NASH: postprandial lipid metabolism as a link between adiponectin and liver disease. *Hepatology*. 2005;42(5):1175-1183. doi:10.1002/hep.20896.
78. Jarrar M, Baranova A, Collantes R, Ranard B, Stepanova M, Bennett C, Fang Y, Elariny H, Goodman Z, Chandhoke V, et al. Adipokines and cytokines in non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2008;27(5):412-421. doi:10.1111/j.1365-2036.2007.03586.x.
79. Chalasani N, Deeg MA, Crabb DW. Systemic levels of lipid peroxidation and its metabolic and dietary correlates in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol*. 2004;99(8):1497-1502. doi:10.1111/j.1572-0241.2004.30159.x.
80. Min H, Kapoor A, Fuchs M, Mirshahi F, Zhou H, Maher J, Kellum J, Warnick R, Contos MJ, Sanyal AJ. Increased hepatic synthesis and dysregulation of cholesterol metabolism is associated with the severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Cell Metab*. 2012;15(5):665-674. doi:10.1016/j.cmet.2012.04.004.
81. Otgonsuren M, Stepanova M, Gerber L, Younossi Z. Anthropometric and clinical factors associated with mortality in subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *Dig Dis Sci*. 2013;58(4):1132-1140. doi:10.1007/s10620-012-2446-3.
82. Mandal A, Bhattarai B, Kafle P, Khalid M, Jonnadula S, Lamicchane J, Kanth R, Gayam V. Elevated liver enzymes in patients with type 2 diabetes mellitus and non-alcoholic fatty liver disease. *Cureus*. 2018;10(11). doi:10.7759/cureus.3626.

83. Vernon G, Baranova A, Younossi ZM. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther.* 2011;34(3):274-285. doi:10.1111/j.1365-2036.2011.04724.x.
84. Hanley AJG, Williams K, Festa A, Wagenknecht LE, D'Agostino RB, Kempf J, Zinman B, Haffner SM. Elevations in markers of liver injury and risk of type 2 diabetes: the insulin resistance atherosclerosis study. *Diabetes.* 2004;53(10):2623-2632. doi:10.2337/diabetes.53.10.2623.
85. Younossi ZM, Reyes MJ, Mishra A, Mehta R, Henry L. Systematic review with meta-analysis: non-alcoholic steatohepatitis - a case for personalised treatment based on pathogenic targets. *Aliment Pharmacol Ther.* 2014;39(1):3-14. doi:10.1111/apt.12543.
86. Gulsen M, Yesilova Z, Bagci S, Uygun A, Ozcan A, Ercin CN, Erdil A, Sanisoglu SY, Cakir E, Ates Y, et al. Elevated plasma homocysteine concentrations as a predictor of steatohepatitis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 2005;20(9):1448-1455. doi:10.1111/j.1440-1746.2005.03891.x.
87. Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC, Grundy SM, Hobbs HH. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology.* 2004;40(6):1387-1395. doi:10.1002/hep.20466.
88. Sorrentino P, Tarantino G, Conca P, Perrella A, Terracciano ML, Vecchione R, Gargiulo G, Gennarelli N, Lobello R. Silent non-alcoholic fatty liver disease - a clinical-histological study. *J Hepatol.* 2004;41(5):751-757. doi:10.1016/j.jhep.2004.07.010.
89. Mofrad P, Contos MJ, Haque M, Sargeant C, Fisher RA, Luketic VA, Sterling RK, Shiffman ML, Stravitz RT, Sanyal AJ. Clinical and histologic spectrum of nonalcoholic fatty liver disease associated with normal ALT values. *Hepatology.* 2003;37(6):1286-1292. doi:10.1053/jhep.2003.50229.
90. Catalano D, Martines G, Tonzuso A, Pirri C, Trovato FM, Trovato GM. Protective role of coffee in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Dig Dis Sci.* 2010;55(11):3200-3206. doi:10.1007/s10620-010-1143-3.
91. Dwimartutie N, Setiati S, Oemardi M. The correlation between body fat distribution and insulin resistance in elderly. *Acta Med Indones.* 2010;42(2):66-73.
92. Nishioji K, Sumida Y, Kamaguchi M, Mochizuki N, Kobayashi M, Nishimura T, Yamaguchi K, Itoh Y. Prevalence of and risk factors for non-alcoholic fatty liver disease in a non-obese Japanese population, 2011 – 2012. *J Gastroenterol.* 2015;50(1):95-108. doi:10.1007/s00535-014-0948-9.
93. Dasarathy J, Periyalwar P, Allampati S, Bhinder V, Hawkins C, Brandt P, Khiyami A, McCullough A, Dasarathy S. Hypovitaminosis D is associated with increased whole body fat mass and greater severity of non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int.* 2014;34(6):118-127. doi:10.1111/liv.12312.
94. Bredella MA, Ghomi RH, Thomas BJ, Torriani M, Brick DJ, Gerweck A, Misra M, Klibanski A, Miller KK. Comparison of DXA and CT in the assessment of body composition in premenopausal women with obesity and anorexia nervosa. *Obesity.* 2010;18(11):2227-2233. doi:10.1038/oby.2010.5.
95. Petta S, Ciminnisi S, Di Marco V, Cabibi D, Cammà C, Licata A, Marchesini G, Craxì A. Sarcopenia is associated with severe liver fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2017;45(4):510-518. doi:10.1111/apt.13889.

96. Assy N, Nasser G, Kamayse I, Nseir W, Beniashvili Z, Djibre A, Grosovski M. Soft drink consumption linked with fatty liver in the absence of traditional risk factors. *Can J Gastroenterol*. 2008;22(10):811-816. doi:10.1155/2008/810961.
97. Abid A, Taha O, Nseir W, Farah R, Grosovski M, Assy N. Soft drink consumption is associated with fatty liver disease independent of metabolic syndrome. *J Hepatol*. 2009;51(5):918-924. doi:10.1016/j.jhep.2009.05.033.
98. Kanuri G, Bergheim I. In vitro and in vivo models of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Int J Mol Sci*. 2013;14(6):11963-11980. doi:10.3390/ijms140611963.
99. Nakamura A, Terauchi Y. Lessons from mouse models of high-fat diet-induced NAFLD. *Int J Mol Sci*. 2013;14(11):21240-21257. doi:10.3390/ijms141121240.
100. Papandreou D, Karabouta Z, Pantoleon A, Rousso I. Investigation of anthropometric, biochemical and dietary parameters of obese children with and without non-alcoholic fatty liver disease. *Appetite*. 2012;59(3):939-944. doi:10.1016/j.appet.2012.09.006.
101. Gemming L, Doherty A, Kelly P, Utter J, Ni Mhurchu C. Feasibility of a SenseCam-assisted 24-h recall to reduce under-reporting of energy intake. *Eur J Clin Nutr*. 2013;67(10):1095-1099. doi:10.1038/ejcn.2013.156.
102. Mendez MA, Popkin BM, Buckland G, Schroder H, Amiano P, Barricarte A, Huerta J, Quirós J, Sánchez M, González C. Alternative methods of accounting for underreporting and overreporting when measuring dietary intake-obesity relations. *Am J Epidemiol*. 2011;173(4):448-458. doi:10.1093/aje/kwq380.
103. Harte AL, da Silva NF, Creely SJ, McGee KC, Billyard T, Youssef-Elabd EM, Tripathi G, Ashour E, Abdalla MS, Sharada HM, et al. Elevated endotoxin levels in non-alcoholic fatty liver disease. *J Inflamm*. 2010;7(1):15. doi:10.1186/1476-9255-7-15.
104. Miura K, Ishioka M, Iijima K. The roles of the gut microbiota and Toll-like receptors in obesity and nonalcoholic fatty liver disease. *J Obes Metab Syndr*. 2017;26(2):86-96. doi:10.7570/jomes.2017.26.2.86.
105. Szabo G, Velayudham A, Romics L, Mandrekar P. Modulation of non-alcoholic steatohepatitis by pattern recognition receptors in mice: the role of toll-like receptors 2 and 4. *Alcohol Clin Exp Res*. 2005;29(11):140-145. doi:10.1097/01.alc.0000189287.83544.33.
106. Shanab A, Scully P, Crosbie O, Buckley M, O'Mahony L, Shanahan F, Gazareen S, Murphy E, Quigley E. Small intestinal bacterial overgrowth in nonalcoholic steatohepatitis: association with toll-like receptor 4 expression and plasma levels of interleukin 8. *Dig Dis Sci*. 2011;56(5):1524-1534. doi:10.1007/s10620-010-1447-3.
107. Papp M, Vitalis Z, Altörjay I, Tornai I, Udvardy M, Harsfalvi J, Vida A, Kappelmayer J, Lakatos P, Antal-Szalmas P. Acute phase proteins in the diagnosis and prediction of cirrhosis associated bacterial infections. *Liver Int*. 2012;32(4):603-611. doi:10.1111/j.1478-3231.2011.02689.x.
108. Kang E, Kim H, Ahn C, Park C, Cha B, Lim S, Kim K, Lee H. Relationship of serum high sensitivity C-reactive protein to metabolic syndrome and microvascular complications in type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pr*. 2005;69(2):151-159. doi:10.1016/j.diabres.2004.11.014.
109. Devaraj S, Valleggi S, Siegel D, Jialal I. Role of C-reactive protein in contributing to increased cardiovascular risk in metabolic syndrome. *Curr Atheroscler Rep*. 2010;12(2):110-118. doi:10.1007/s11883-010-0098-3.

110. Oruc N, Ozutemiz O, Yuce G, Akarca US, Ersoz G, Gunsar F, Batur Y. Serum procalcitonin and CRP levels in non-alcoholic fatty liver disease: a case control study. *BMC Gastroenterol.* 2009;9:16. doi:10.1186/1471-230X-9-16.
111. Mikolasevic I, Lukenda V, Racki S, Milic S, Sladoje-Martinovic B, Orlic L. Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) – a new factor that interplays between inflammation, malnutrition, and atherosclerosis in elderly hemodialysis patients. *Clin Interv Aging.* 2014;9:1295-1303. doi:10.2147/CIA.S65382.
112. Csak T, Velayudham A, Hritz I, Petrasek J, Levin I, Lippai D, Catalano D, Mandrekar P, Dolganiuc A, Kurt-Jones E, et al. Deficiency in myeloid differentiation factor-2 and toll-like receptor 4 expression attenuates nonalcoholic steatohepatitis and fibrosis in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2011;300(3):G433-G441. doi:10.1152/ajpgi.00163.2009.
113. Miura K, Kodama Y, Inokuchi S, Schnabl B, Aoyama T, Ohnishi H, Olefsky J, Brenner D, Seki E. Toll-like receptor 9 promotes steatohepatitis by induction of interleukin-1beta in mice. *Gastroenterology.* 2010;139(1):323-334. doi:10.1053/j.gastro.2010.03.052.
114. Kudo H, Takahara T, Yata Y, Kawai K, Zhang W, Sugiyama T. Lipopolysaccharide triggered TNF- α -induced hepatocyte apoptosis in a murine non-alcoholic steatohepatitis model. *J Hepatol.* 2009;51(1):168-175. doi:10.1016/j.jhep.2009.02.032.
115. Poniachik J, Csendes A, Diaz JC, Rojas J, Burdiles P, Videla LA, Maluenda F, Smok G, Rodrigo R, Videla L. Increased production of IL-1 α and TNF- α in lipopolysaccharide-stimulated blood from obese patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Cytokine.* 2006;33(5):252-257. doi:10.1016/j.cyto.2006.02.006.
116. Romics L, Dolganiuc A, Kodys K, Drechsler Y, Oak S, Velayudham A, Mandrekar P, Szabo G. Selective priming to Toll-like receptor 4 (TLR4), not TLR2, ligands by P. acnes involves up-regulation of MD-2 in mice. *Hepatology.* 2004;40(3):555-564. doi:10.1002/hep.20350.
117. Himes RW, Smith CW. Tlr2 is critical for diet-induced metabolic syndrome in a murine model. *FASEB J.* 2010;24(3):731-739. doi:10.1096/fj.09-141929.
118. Miura K, Yang L, Van Rooijen N, Brenner DA, Ohnishi H, Seki E. Toll-like receptor 2 and palmitic acid cooperatively contribute to the development of nonalcoholic steatohepatitis through inflammasome activation in mice. *Hepatology.* 2013;57(2):577-589. doi:10.1002/hep.26081.
119. Rivera CA, Gaskin L, Allman M, Pang J, Brady K, Adegboyega P, Pruitt K. Toll-like receptor-2 deficiency enhances non-alcoholic steatohepatitis. *BMC Gastroenterol.* 2010;10:52. doi:10.1186/1471-230X-10-52.
120. Garcia-Martinez I, Santoro N, Chen Y, Hoque R, Ouyang X, Caprio S, Shlomchik MJ, Coffman RL, Candia A, Mehal WZ. Hepatocyte mitochondrial DNA drives nonalcoholic steatohepatitis by activation of TLR9. *J Clin Invest.* 2016;126(3):859-864. doi:10.1172/JCI83885DS1.
121. Arias-Loste MT, Iruzubieta P, Puente Á, Ramos D, Santa Cruz C, Estébanez Á, Llerena S, Alonso-Martín C, San Segundo D, Álvarez L, et al. Increased expression profile and functionality of TLR6 in peripheral blood mononuclear cells and hepatocytes of morbidly obese patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Sci.* 2016;17(11):1878. doi:10.3390/ijms17111878.

122. Sharifnia T, Antoun J, Verriere TG, Suarez G, Wattacheril J, Wilson KT, Peek RM, Abumrad NN, Flynn CR. Hepatic TLR4 signaling in obese NAFLD. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2015;309(4):270-278. doi:10.1152/ajpgi.00304.2014.
123. Berg A, Bischoff SC, Colombo-Benkmann M, Ellrott T, Hauner H, Heintze C, Kanthak U, Kunze D, Stefan N, Teufel M, et al. Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur „Prävention und Therapie der Adipositas“. 2014. http://www.adipositas-gesellschaft.de/fileadmin/PDF/Leitlinien/S3_Adipositas_Praevention_Therapie_2014.pdf (accessed 21 May 2019).
124. Parikh RM, Mohan V. Changing definitions of metabolic syndrome. *Indian J Endocrinol Metab*. 2012;16(1):7-12. doi:10.4103/2230-8210.91175.

Anhang

Anhang A: Fragebogen zur Gesundheit und zum Alkoholkonsum

Probanden-ID: _____

Datum Interview: _____

Ort des Interviews: (1) Department für Ernährungswissenschaften
 (2) Allgemeines Krankenhaus der Stadt Wien (AKH)
 (3) Telefon
 (4) anderer Ort: _____

Leiden oder litten Sie an folgenden Beschwerden/Erkrankungen?

Schilddrüse	☐ ja	☐ nein
Herz-Kreislauf-System	☐ ja	☐ nein
Durchblutungsstörungen	☐ ja	☐ nein
Atmung/Lunge	☐ ja	☐ nein
Niere/Harnsystem	☐ ja	☐ nein
Magen-/Darmsystem	☐ ja	☐ nein
Nerven, Muskeln, Knochen, Gelenke	☐ ja	☐ nein
Diabetes	☐ ja	☐ nein
HIV	☐ ja	☐ nein
Hepatitis	☐ ja	☐ nein

sonstige Infektionen/Erkrankungen: _____

Ist Ihr Gewicht stabil? ☐ ja ☐ nein

Wie groß sind die Schwankungen? _____

Nehmen Sie regelmäßig Medikamente?

☐ ja ☐ nein

Haben Sie jemals eine Chemotherapie bekommen? ☐ ja ☐ nein

Wenn ja, wann und wie lange? _____

Waren Sie im Laufe des letzten Jahres in andere Länder verreist? ☐ ja ☐ nein

Wenn ja, wo und wie lange?

Haben Sie Nahrungsmittelallergien oder –unverträglichkeiten? ☐ ja ☐ nein

Wenn ja, wogegen?

Schlafen Sie ausreichend? ☐ ja ☐ nein

Allgemeine Lebensumstände

Rauchen Sie? ☐ ja ☐ nein

Haben Sie häufig Stress? ☐ ja ☐ nein

Wieviel trinken Sie an alkoholfreien Getränken täglich?

Trinken Sie Alkohol? ☐ ja ☐ nein

Wenn ja,

1. Wie oft nehmen Sie alkoholische Getränke zu sich?

- ☐ Nie
- ☐ 1 x im Monat oder weniger
- ☐ 2 - 4 x im Monat
- ☐ 2 - 4 x in der Woche
- ☐ 4 x oder mehr die Woche

2. Wenn Sie alkoholische Getränke zu sich nehmen, wie viel trinken Sie dann typischerweise an einem Tag?

- ☐ 1 oder 2
- ☐ 3 oder 4
- ☐ 5 oder 6
- ☐ 7 - 9
- ☐ 10 oder mehr

3. Wie oft trinken Sie 6 oder mehr Gläser Alkohol (= Standardgetränk) bei einer Gelegenheit?

- ☐ Nie
- ☐ Weniger als einmal im Monat
- ☐ Einmal im Monat
- ☐ Einmal in der Woche
- ☐ Täglich oder fast täglich

Ein alkoholisches Getränk (= Standardgetränk) entspricht:

- 0,33 l Bier (ca. 5 Vol.%)
- 0,125 (1/8) l Wein oder Sekt (ca. 12,5 Vol.%)
- 0,04 l Likör (ca. 30 Vol.%)
- 0,02 l Spirituosen (ca. 40 - 55 Vol.%)

Hepatitis-Ausschluss

Hatten Sie jemals eine Hepatitis A, B, oder C-Viruserkrankung?

Sind Sie gegen Hepatitis A oder B geimpft? Wenn ja, seit wann?

Wurden Sie in den letzten Jahren operiert?

Haben Sie jemals eine Bluttransfusion bekommen?

Waren Sie innerhalb des letzten Jahres außerhalb Österreichs verreist? Wenn ja, wo und wie lange?

Anhang B: Referenzwerte

1) BMI

Tabelle 12: WHO (World Health Organization)-Einteilung des Gewichts durch den BMI und zugehöriges Risiko für Folgeerkrankungen (nach Berg et al., 2014 (123))

Kategorie	BMI (kg/m ²)	Risiko für Folgeerkrankungen
Untergewicht	< 18,5	niedrig
Normalgewicht	18,5 – 24,9	durchschnittlich
Übergewicht	25 – 29,9	gering erhöht
Adipositas		
Adipositas Grad I	30 – 34,9	erhöht
Adipositas Grad II	35 – 39,9	hoch
Adipositas Grad III	≥ 40	sehr hoch

2) Taillenumfang

Tabelle 13: Zusammenhang zwischen dem Taillenumfang und dem Risiko für kardiovaskuläre und metabolische Komplikationen (nach Berg et al., 2014 (123))

Risiko für kardiovaskuläre und metabolische Komplikationen	Taillenumfang (cm)	
	Frauen	Männer
erhöht	≥ 80	≥ 94
deutlich erhöht	≥ 88	≥ 102

3) Waist-to-Hip-Ratio

Tabelle 14: WHO-Definition der Waist-to-Hip-Ratio bei zentraler Adipositas (nach Parikh and Mohan, 2012 (124))

Waist-to-Hip-Ratio (WHR) bei zentraler Adipositas	
Frauen	Männer
> 0,85	> 0,9

4) Blutdruck

Tabelle 15: Kategorien des Blutdrucks (nach Narkiewicz et al., 2013 (71))

Kategorie	Blutdruck (mmHg)		
	systolisch		diastolisch
Optimal	< 120	und	< 80
Normal	120-129	und/oder	80-84
Hochnormal	130-139	und/oder	85-89
Hypertonie Grad 1	140-159	und/oder	90-99
Hypertonie Grad 2	160-179	und/oder	100-109
Hypertonie Grad 3	≥ 180	und/oder	≥ 110
isolierte systolische Hypertonie	≥ 140	und	< 90

Anhang C

24 h Recall

Probanden-ID: _____

Datum Interview: _____ Visite: EU (1) (2) / V3 (1) (2) / V6 (1) (2) / V9 (1) (2)

Tag des Recalls: _____ Mo / Di / Mi / Do / Fr / Sa / So

Ort des Interviews: (1) Department für Ernährungswissenschaften
(2) Allgemeines Krankenhaus der Stadt Wien (AKH)
(3) Telefon
(4) anderer Ort: _____

Sind hauptsächlich Sie für die Planung und Zubereitung der Speisen in Ihrem Haushalt verantwortlich? ☐ ja ☐ nein _____

Nehmen Sie Nahrungsergänzungsmittel? ☐ ja ☐ nein

Liste der verzehrten Lebensmittel	Zeit	Mahlzeit	Beschreibung des LM	Menge	Ort

Mahlzeit: 1. Frühstück 2. Brunch 3. Mittag 4. Abendessen 5. Spätmahlzeit 6. Obst
7. Pause/Snack/alkoholische Getränke 8. Other (specify): _____

Bezugsort: 1. selbst gemacht 2. Restaurant/cafeteria/fast food shop/deli 3. Imbiss
4. Supermarkt 5. Arbeitsplatz 6. Day care 7. bei Freunden/Verwandten
8. Party/BBQ/banquet/special event 9. Other (specify): _____

[illegible]

Mahlzeit: 1. Frühstück 2. Brunch 3. Mittag 4. Abendessen 5. Spätmahlzeit 6. Obst
7. Pause/Snack/alkoholische Getränke 8. Other (specify): _____

Bezugsort: 1. selbst gemacht 2. Restaurant/cafeteria/fast food shop/deli 3. Imbiss
4. Supermarkt 5. Arbeitsplatz 6. Day care 7. bei Freunden/Verwandten
8. Party/BBQ/banquet/special event 9. Other (specify): _____

Anhang

1. Würden Sie sagen, dass die Menge, die Sie gestern verzehrt haben, normal, weniger als normal oder mehr als normal war?
(a) normal (b) weniger als normal (2) (c) mehr als normal (3)
2. Was war der Grund, dass es weniger als normal war?
 - a. Krankheit
 - b. Geldknappheit
 - c. unterwegs
 - d. soziale Aktivität/spezielle Mahlzeit
 - e. Urlaub
 - f. zu beschäftigt
 - g. keinen Hunger
 - h. auf Diät
 - i. Fastenzeit
 - j. gelangweilt
 - k. gestresst
 - l. andere Gründe: _____
3. Was war der Grund, dass es mehr als normal war?
 - a. unterwegs
 - b. soziale Aktivität/spezielle Mahlzeit
 - c. sehr hungrig
 - d. gelangweilt
 - e. gestresst
 - f. andere Gründe: _____
4. Wie würden Sie Ihr aktuelles Essverhalten beschreiben?
 - a. keine spezielle Diät, ich esse fast alles
 - b. Vegetarier
 - c. Veganer
 - d. anderes: _____

Vielen Dank!

Bemerkungen:

Anhang D: Fragen zur Durchführung des 24-h-Recalls

1. War der gestrige Tag für Sie ein normaler Tag oder gab es irgendeine Feier bzw. haben Sie irgendetwas Besonderes gemacht?
2. Wie oft essen Sie normalerweise pro Tag?
3. Wann sind Sie aufgestanden?
4. Haben Sie nach dem Aufstehen direkt etwas getrunken?
5. Wann und was haben Sie zum Frühstück gegessen?
6. Gab es dazu ein Getränk? (gezuckert, mit Milch)
7. Wann und wie sind Sie zur Arbeit gefahren – sind Sie dabei an einem Bäcker oder Ähnlichem vorbei gekommen und haben sich etwas gekauft?
8. Haben Sie in der Frühstückspause etwas zu sich genommen?
9. Wann und was haben Sie zu Mittag gegessen?
10. Was haben Sie dazu getrunken?
11. Hatten Sie einen Salat als Vorspeise oder einen Nachtisch?
12. Haben Sie einen Kaffee oder Espresso nach dem Essen getrunken? (gezuckert, mit Milch)
13. Haben Sie in der Zeit zwischen Mittag und Abendbrot etwas gegessen bzw. getrunken?
14. Hat ein Kollege etwas zu Essen mitgebracht?
15. Was haben Sie abends gegessen? – Haben Sie ein eigenes Rezept für das Gericht?
16. Haben Sie dazu etwas getrunken?
17. Wie verlief der Abend weiter? – Waren Sie aus oder bei Freunden oder sind Sie zu Hause geblieben?
18. Haben Sie beim Fernsehen noch etwas gegessen?
19. Haben Sie vor dem Schlafengehen noch etwas getrunken?
- ➔ Tag noch einmal wiedergeben und dann folgende Fragen:
20. Haben Sie am gestrigen Tag Kaugummi oder Bonbons gegessen?
21. Haben Sie zu Hause oder auf der Arbeit eine Naschschale?

Anhang E:

Tabelle 16: Körperzusammensetzung der Studienteilnehmer

		Kontrollen	NAFLD
Anzahl der Studienteilnehmer		8	18
Geschlecht	männlich weiblich	n = 1 n = 7	n = 10 n = 8
Phasenwinkel (°)		5.7 ± 0.2	6.2 ± 0.2
Gesamtkörperwasser (TBW) (l)		33.7 ± 0.9	43.0 ± 1.8*
Extrazelluläre Masse (ECM) (%)		23.9 ± 1.1	27.6 ± 1.2
Körperzellmasse (BCM) (kg)		23.1 ± 0.8	31.1 ± 1.4*
Extrazelluläre Masse/Körperzellmasse-Index		0.98 ± 0.04	0.90 ± 0.03
%-Zellanteil (%)		50.6 ± 0.9	53.0 ± 0.7
Intrazelluläres Wasser (ICW) (l)		20.8 ± 0.3	24.8 ± 0.9
Extrazelluläres Wasser (ECW) (l)		13.9 ± 1.1	18.2 ± 1.0*

NAFLD = nicht-alkoholbedingte Fettlebererkrankung. Die Werte sind als MW ± SEM dargestellt.

*signifikant unterschiedlich zu den Kontrollen (p < 0.05).

Anhang F

Tabelle 17: Mikronährstoffaufnahme von NAFLD-Patienten und gesunden Kontrollen

	Kontrollen	NAFLD	DACH-Referenzwerte m,w ≥ 25 Jahre(69)
Vitamin A-Äquivalent (µg)	1280 ± 211	1284 ± 180	800-1000
Vitamin E-Äquivalent (mg)	12.4 ± 1.2	11.1 ± 1.0	11-14
Vitamin B1 (mg)	1.3 ± 0.2	1.4 ± 0.1	1.0-1.2
Vitamin B2 (mg)	1.5 ± 0.1	1.5 ± 0.1	1.0-1.4
Vitamin B6 (mg)	1.5 ± 0.2	1.7 ± 0.1	1.2-1.5
Vitamin C (mg)	112.4 ± 19.0	104.0 ± 11.5	95-110
Folsäure (µg)	296.6 ± 45.4	257.6 ± 22.2	300
Natrium (mg)	3260 ± 422	3558 ± 230	1500
Kalium (mg)	3097 ± 242	3101 ± 162	4000
Calcium (mg)	939.6 ± 101.9	941.4 ± 71.3	1000
Magnesium (mg)	375.8 ± 26.1	354.0 ± 19.0	300-350
Phosphor (mg)	1369 ± 78	1421 ± 85	700
Eisen (mg)	12.9 ± 1.2	12.7 ± 0.6	10-15
Zink (mg)	11.7 ± 1.1	12.1 ± 0.9	7-10

NAFLD = nicht-alkoholbedingte Fettlebererkrankung. (Kontrollen: n = 10, NAFLD-Patienten: n = 21). Die Werte sind als MW ± SEM dargestellt. *signifikant unterschiedlich zu den Kontrollen (p < 0.05).