

Aus dem
Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie
der Universitätsmedizin Rostock
Direktor: Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar

Antifibrotische Effekte von DBTC-Foxf1 siRNA-Formulierungen im murinen Modell der cholestatischen Leberfibrose



Inauguraldissertation

zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von
Malte Thomas Brensel, geboren am 08.04.1988 in Witten

Dortmund 2019

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00002867

Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar
Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie
Universitätsmedizin Rostock

Prof. Dr. med. Georg Lamprecht
Zentrum für Innere Medizin, Medizinische Klinik II
Universitätsmedizin Rostock

Prof. Dr. med. Markus M. Lerch
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin A
Universitätsmedizin Greifswald

Jahr der Einreichung: 2019

Jahr der Verteidigung: 2020

Inhalt

1	Abkürzungsverzeichnis	5
2	Zusammenfassung	10
3	Einleitung	11
3.1	Leberfibrose	11
3.1.1	Epidemiologie	11
3.1.2	Ätiologie	12
3.1.3	Klinik	13
3.1.4	Pathogenese	15
3.1.5	Hepatische Sternzellen	17
3.1.6	Foxf1	20
3.1.7	Therapieansätze	21
3.2	DBTC-Formulierungen	23
3.3	siRNA	25
3.4	Fragestellung und Ziel der Arbeit	28
4	Material und Methoden	29
4.1	Versuchstiere	29
4.2	Versuchsaufbau	29
4.2.1	Intrahepatische Verteilung der DBTC-Cy3 siRNA	29
4.2.2	Therapeutischer Ansatz mittels DBTC-Foxf1 siRNA	31
4.2.3	Mortalitätsstatistik	32
4.3	Praktisches Vorgehen	32
4.3.1	Anästhesie	32
4.3.2	Gallengangsligatur	33
4.3.3	Intravenöse Injektion der DBTC-Formulierungen	34
4.3.4	Entnahme von Blut und Gewebe	35
4.4	Untersuchungstechniken	35
4.4.1	Intravitale Fluoreszenzmikroskopie	35
4.4.2	Immunfluoreszenz	36
4.4.3	Vollblutanalysen	37
4.4.4	Plasmaanalysen	37
4.4.5	Histologische Analysen	38
4.4.6	Western Blot	40
4.4.7	RT-PCR	41
4.4.8	Fluidigm Analyse	42
4.4.9	Datenverarbeitung und Statistik	42

5	Ergebnisse	43
5.1	Zustand der Tiere	43
5.2	Intrahepatische Verteilung von DBTC-Cy3	43
5.2.1	Intravitale Fluoreszenzmikroskopie	43
5.2.2	Immunfluoreszenz	45
5.3	Therapeutischer Ansatz mittels DBTC-Foxf1 siRNA	48
5.3.1	Blutbild	48
5.3.2	Foxf1-Silencing	48
5.3.3	Leberschaden	49
5.3.4	Leberfibrose	52
5.4	Mortalitätsstatistik	58
6	Diskussion	59
6.1	Diskussion von Material und Methoden	59
6.2	Diskussion der Ergebnisse	64
6.3	Zusammenfassung und Schlussfolgerung	69
7	Thesen zur Dissertation	71
8	Literaturverzeichnis	73
9	Danksagung	86
10	Selbstständigkeitserklärung	87

1 Abkürzungsverzeichnis

AAD	Adeno-assoziierte Dependoparvoviren
Abcg2	Gen, kodiert für ATP-binding cassette sub-family G member 2
Acta2	Gen, kodiert für alpha smooth muscle actin
Actb	Gen, kodiert für beta-actin
AGO	Argonautenproteine
ALP	Alkalische Leukozytenphosphatase
ALT	Alanin-Aminotransferase
ALD	Alcoholic liver disease – Alkoholische Lebererkrankung
ApoB	Apolipoprotein B
APRI	AST to Platelet Ratio Index
ASR	Altersstandardisierte Sterblichkeitsraten
AST	Aspartat-Aminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
Atu027 / Atu111	Zellspezifische Transportsysteme
α -SMA	Alpha smooth muscle actin
Balb/c	Maus-Inzuchtstamm
BDL	Bile duct ligation – Gallengangsligatur
Bili-T	Totales Bilirubin
Bili-D	Direktes (konjugiertes) Bilirubin
Birc5	Gen, kodiert für Baculoviral IAP repeat-containing protein 5
CCl ₄	Tetrachlorkohlenstoff
CCN1	Cellular Communication Network Factor 1
Cd34	Gen, kodiert für CD34-Antigen
cDNA	Complementary DNA – komplementäre DNA
CEUS	Contrast enhanced ultrasound – kontrastmittelverstärkter Ultraschall
Clec11a	Gen, kodiert für C-type lectin domain family 11 member A
Col1a1 / Col3a1	Gene, kodieren für Kollagene
Col3a1	Gen, kodiert für Collagen alpha-1(III) chain
CT	Computertomographie
Cxcr4	Gen, kodiert für C-X-C chemokine receptor type 4
Cy3	Cyanin 3
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DBTC	Zellspezifisches Lipoplex Transportsystem

Abkürzungsverzeichnis

DCR	Dicer (Ribonuklease)
Dkk3	Gen, kodiert für Dickkopf-related protein 3
DNA	Desoxyribonucleid acid – Desoxyribonukleinsäure
DS	Sodium dodecyl sulfate
$\Delta\Delta$ CT	Delta-delta-Cycle of threshold-Methode
ECL	Enhanced chemiluminescence
ECM	Extracellular matrix – Extrazelluläre Matrix
Edn1	Gen, kodiert für Endothelin-1
EDTA	Ethylendiamintetraacetat – Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor – Epidermaler Wachstumsfaktor
EMT	Epithelial-mesenchymal transition – Epithelial-mesenchymale Transition
Eng	Gen, kodiert für Endoglin
ERCP	Endoskopische retrograde Cholangiopankreatikographie
ET-1	Endothelin-1
Flt3	Gen, kodiert für Receptor-type tyrosine-protein kinase FLT3
Foxf1	Forkhead Box f1-Transkriptionsfaktor (murin)
FOXF1	Forkhead Box F1-Transkriptionsfaktor (human)
Fzd2	Gen, kodiert für Frizzled-2
Gapdh	Gen, kodiert für Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
IMHE	Institute for Health Metrics and Evaluation
Gdf2	Gen, kodiert für Growth/differentiation factor 2
Gfap	Gen, kodiert für Glial fibrillary acidic protein
GFAP	Glial fibrillary acidic protein – Saures Gliafaserprotein
GLDH	Glutamatdehydrogenase
Gli2	Glioma-Associated Oncogene Family Zinc Finger 2
γ -GT	Gamma-Glutamyltransferase
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H&E	Hämatoxylin & Eosin (-Färbung)
Hb	Hämoglobin
HCC	Hepatocellular carcinoma – hepatozelluläres Karzinom
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure
HGF	Hepatocyte growth factor – Hepatozyten-Wachstumsfaktor
Hhip	Hedgehog interacting protein
HIV	Human immunodeficiency virus

Abkürzungsverzeichnis

Hkt	Hämatokrit
HMGB1	High-Mobility-Group-Protein B1
HRP	Horseradish peroxidase – Meerrettichperoxidase
HRS	Hepatorenales Syndrom
HSC	Hepatic stellate cell – hepatische Sternzelle
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenös
IL-6	Interleukin 6
INR	International Normalized Ratio
IQTIG	Institut für Qualitätssicherung und Transparenz im Gesundheitswesen
Itgb1	Gen, kodiert für Integrin β -1
IVM	In-Vivo-Microscopy – Intravitalmikroskopie
JunD	Transkriptionsfaktor der JUN Familie
KG	Körpergewicht
Kit	Gen, kodiert für Mast/stem cell growth factor receptor Kit
Ldb2	Gen, kodiert für LIM domain-binding protein 2
Ldb3	Gen, kodiert für LIM domain-binding protein 3
Lgr5	Gen, kodiert für Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5
Lhx2	Gen, kodiert für LIM/homeobox protein LHX2
Luci	Luciferase
Mcam	Gen, kodiert für Cell surface glycoprotein MUC18
miRNA	MicroRNA
Mki67	Gen, kodiert für Proliferation marker protein Ki-67
MMP	Matrix-Metalloproteinase
Mmp10	Gen, kodiert für matrix metalloproteinase-10
mRNA	Messenger RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
Msi1	Gen, kodiert für RNA-binding protein Musashi homolog 1
n	Untersuchungseinheiten
N ₂ O	Distickstoffmonoxid
NaCl	Natriumchlorid
NAFLD	Non-alcoholic fatty liver disease – nichtalkoholische Fettlebererkrankung
Nanog	Gen, kodiert für Homeobox protein NANOG

Abkürzungsverzeichnis

NASH	Non-alcoholic steatohepatitis – Nicht-alkoholische Steatohepatitis
Nes	Gen, kodiert für Nestin
Ngfr	Gen, kodiert für Nerve growth factor receptor
NGFR	Nerve growth factor receptor – Nervenwachstumsfaktor-Rezeptor
NGF	Nerve growth factor – Nervenwachstumsfaktor
NO	Stickstoffmonoxid
Notch1	Gen, kodiert für Neurogenic locus notch homolog protein 1
Notch3	Gen, kodiert für Neurogenic locus notch homolog protein 3
Nt5e	Gen, kodiert für 5'-nucleotidase
O ₂	Sauerstoff
O ₂ ⁻	Hyperoxid
p.t.	Post treatment – nach Behandlung
p53	Tumorsuppressorgen
PBC	Primary biliary cirrhosis – primäre biliäre Zirrhose
PBS	Phosphate-buffered saline – phosphatgepufferte Salzlösung
Pdgfb	Gen, kodiert für Platelet-derived growth factor subunit B
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PEG	Polyethylenglycol
PET	Polyethylenterephthalat
Pitx2	Gen, kodiert für Pituitary homeobox 2
piRNA	PIWI interacting RNA
PIWI	P-element induced wimpy testis
PKN3	Proteinkinase 3
Pou5f1	Gen, kodiert für POU domain, class 5, transcription factor 1
Pparg	Gen, kodiert für Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
PPAR-γ	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
Prom1	Gen, kodiert für Prominin-1
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
PTK-2	Protein tyrosine kinase 2
Rac1	Gen, kodiert für Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RISC	RNA induced silencing complex
RNA	Ribonucleid acid – Ribonukleinsäure
ROCK	Rho-associated protein kinase

Abkürzungsverzeichnis

ROS	Reactive oxygen species – reaktive Sauerstoffspezies
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
Shh	Gen, kodiert für Sonic hedgehog protein
siRNA	Small interfering RNA
siFoxf1	Therapiegruppe (erhielt DBTC-Foxf1 siRNA)
siLuci	Kontrollgruppe (erhielt DBTC-Luci siRNA)
Slain1	Gen, kodiert für SLAIN motif-containing protein 1
SMAD	Zusammengesetzt aus SMA ("small" worm phenotype) und Drosophila MAD ("Mothers Against Decapentaplegic")-Proteinfamilie, welche Signale von TGF- β weiterleitet
Smad6	Gen, kodiert für Mothers against decapentaplegic homolog 6
Smad7	Gen, kodiert für Mothers against decapentaplegic homolog 7
Sox9	Gen, kodiert für Transcription factor SOX-9
Tcf4	Gen, kodiert für Transcription factor 4
Tgfb2	Gen, kodiert für Transforming growth factor beta-2
TGF- β	Transforming growth factor β
Tie-2	Tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 2
TIMP	Tissue inhibitor of matrix-metalloproteinases
Timp1	Gen, kodiert für Metalloproteinase inhibitor 1
TNF	Tumornekrosefaktor
UV	Ultraviolett
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WHO	World Health Organisation

2 Zusammenfassung

Lebererkrankungen und deren gravierende Folgen stellen sowohl für Patienten und Angehörige als auch für behandelnde Ärzte und das Gesundheitssystem eine zunehmende Herausforderung dar. Eine zentrale Rolle in der Pathogenese von Lebererkrankungen nimmt hierbei die Fibrosierung der Leber ein. Bei steigender Prävalenz stehen heutzutage, abhängig von der Ursache der Erkrankung, weiterhin nur eingeschränkt therapeutische Optionen zur Verfügung. Häufig bleibt als *Ultima Ratio* nur eine Lebertransplantation, für die bei strenger Regulation und begrenzter Verfügbarkeit von Spenderorganen leider nicht jeder Patient infrage kommt. Die Erforschung neuer Therapiemöglichkeiten ist daher von größter Wichtigkeit.

Ein wesentlicher Schritt in der Entstehung der Leberfibrose ist die Aktivierung hepatischer Sternzellen (HSC), an der verschiedenste Signalwege und Mechanismen, wie die veränderte Expression von Transkriptionsfaktoren, beteiligt sind. So ist für den Transkriptionsfaktor forkhead box f1 (Foxf1) bekannt, dass dessen verstärkte Expression aktivierend auf HSC wirkt, wodurch das Foxf1-Gen ein potentiell Ziel antifibrotischer Therapieoptionen darstellt. In dieser Arbeit wurde daher mit dem Konzept der Gen-Interferenz durch small interfering RNA (siRNA) untersucht, ob ein Foxf1-Silencing in den HSC zu antifibrotischen Effekten führt. Hierzu erfolgte die intravenöse Applikation von siRNA gegen Foxf1 mit Hilfe eines lipidbasierten Transportsystems (DBTC) in Mäusen mit einer Gallengangsligatur (BDL). Die Gabe der DBTC-Foxf1 siRNA bzw. der DBTC-Luci siRNA (Kontrolle) erfolgte 48 h vor der BDL und danach alle 72 h bis zum finalen Zeitpunkt an Tag 14 nach BDL.

Es konnte zunächst mittels intravitaler und histologischer Fluoreszenzmikroskopie gezeigt werden, dass Cyanin 3 (Cy3)-markierte DBTC Komplexe nach systemischer Applikation in die Leber gelangen und die HSC transfizieren. Weiterhin führte die Behandlung mit Foxf1 siRNA zum Knock-down von Foxf1 an Tag zwei nach BDL und resultierte im Vergleich zur Kontrollgruppe in einer signifikant geringeren Bildung von fibrotischem Bindegewebe sowie verminderten nekrotischen Bereichen an Tag 14 nach BDL.

Der Transkriptionsfaktor Foxf1 stellt somit ein potentiell Target für eine antifibrotische Therapie dar. Weiterhin sind die DBTC Komplexe als ein überaus geeignetes Transportmittel für ein HSC-spezifisches Targeting und Gen-Silencing im Rahmen der multiplen Möglichkeiten des pharmakologischen Bereiches der RNA-Interferenz anzusehen.

3 Einleitung

3.1 Leberfibrose

3.1.1 Epidemiologie

Die durch chronische Schädigung der Leber entstehende Leberfibrose sowie das Stadium der Leberzirrhose stellen ein weltweites gesundheitliches Problem dar. Leberzirrhose und andere Erkrankungen der Leber zeigten in den letzten Jahren eine zunehmende Prävalenz und führten im Jahr 2017 zu 1,3 Millionen Todesfällen weltweit (Institute for Health Metrics and Evaluation (IMHE) 2019 (a,b), Abbildung 1). Hierbei existieren starke Variationen zwischen den einzelnen Ländern mit beispielsweise höheren altersstandardisierten Sterblichkeitsraten (ASR) in Russland (26,5/100.000 Einwohner) und niedrigen ASR zum Beispiel in Norwegen (3,1/100.000 Einwohner). Deutschland zeichnet sich in Europa sowie auch im internationalen Vergleich im Mittelfeld ab, mit einer ASR von 9,8/100.000 Einwohner (World Health Organisation (WHO) 2019 (a), Datenerhebung jeweils von 2015).

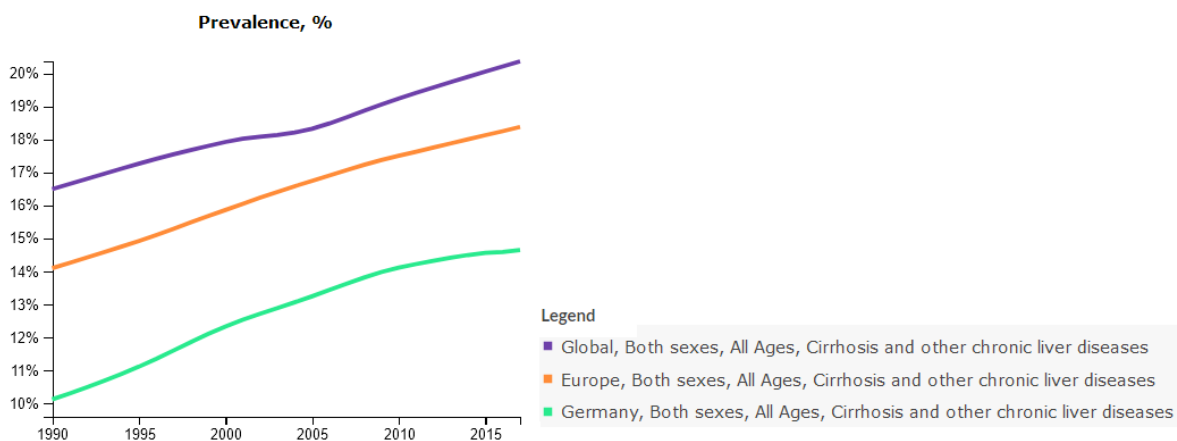


Abbildung 1: Prävalenz von Zirrhose und anderen chronischen Lebererkrankungen im zeitlichen Verlauf (IMHE 2019 (a)).

Für das Jahr 2017 sind 15.872 Sterbefälle in den deutschen Krankenhäusern bei Patienten mit der Diagnose „Krankheiten der Leber“ verzeichnet (Statistisches Bundesamt 2019 (a)). Im Jahr 2017 wurden in Deutschland 89.613 Menschen aufgrund einer Erkrankung der Leber stationär behandelt, wobei knapp die Hälfte unter der Diagnose alkoholische Lebererkrankung gelistet wurde. Das Verhältnis von Männern zu Frauen betrug hierbei ca. 1,5:1 und bezogen auf die alkoholische Lebererkrankung ca. 3:1. Der Anteil an stationär behandelten Patienten mit infektiöser Genese (Diagnose „Chronische Hepatitis, andernorts nicht klassifiziert“) war mit 259 Patienten hingegen verhältnismäßig gering (Statistisches Bundesamt 2019 (b)).

Leberkarzinome, von denen das aus einer Leberzirrhose resultierende Leberzellkarzinom (HCC) ca. 75-85 % ausmacht, stellen das weltweit am sechsthäufigsten vorkommende Karzinom und die vierthäufigste, karzinombedingte Todesursache dar (Bray *et al.* 2018).

3.1.2 Ätiologie

Verschiedenste Einflussfaktoren können das Entstehen eines Leberschadens, einhergehend mit fibrotischem und zirrhotischem Umbau fördern. Neben selteneren Ursachen, beispielsweise durch Kupferablagerungen bei Morbus Wilson oder Autoimmundefekten wie bei der primären biliären Zirrhose (PBC), stellen der chronische Alkoholkonsum (ca. 40 %) und virale Hepatitiden B, C und D (ca. 55 %) die häufigsten Ursachen für das Entstehen einer Leberzirrhose dar (Herold 2016).

Chronische virale Hepatitiden, vor allem Hepatitis B und C, sind weltweit der häufigste Grund für die Entstehung einer Leberzirrhose und eines Leberzellkarzinoms (Perz *et al.* 2006). Sollte zur Hepatitis C Infektion eine Ko-Infektion mit Human immunodeficiency virus (HIV) vorliegen, ist die Wahrscheinlichkeit einer Fibrosierung der Leber zusätzlich erhöht (Friedman 2008 (a)). Dem Leberzellkarzinom liegt weltweit in 80-90 % der Fälle eine Leberzirrhose zugrunde, wobei Hepatitis C Viruserkrankungen die größte Assoziation aufweisen (Fattovich 2004). Auch Patienten mit fortgeschrittener Leberfibrose ohne Vorliegen einer Zirrhose weisen ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines HCC auf (Yoon *et al.* 2016).

Da bei etwa 15 % aller alkohol-assoziierten Todesfälle ursächlich eine Leberzirrhose vorliegt (Rehm *et al.* 2009), ist der chronische Alkoholkonsum mit hohen Alkohol-pro-Kopf-Raten (WHO 2019 (b)) besonders in der westlichen Welt von Bedeutung. Diese Problematik besteht auch in Deutschland, wo der pro-Kopf Konsum von reinem Alkohol für 2016 mit 10,9 l angegeben wurde (WHO 2019 (b)). 38.993 Patienten wurden im Jahr 2017 mit der Diagnose „Alkoholische Leberkrankheit“ stationär behandelt (Statistisches Bundesamt 2019 (b)).

Ein weiterer, in den letzten Jahren stark an Bedeutung zunehmender Einflussfaktor für das Entstehen einer Leberfibrose ist die nichtalkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD), bei der es durch Akkumulation von Triglyzeriden in der Leber zur Schädigung des Gewebes kommt. Die Fettleber kann in eine nichtalkoholische Steatohepatitis (NASH) übergehen. Die größten Risikofaktoren für die NAFLD stellen Fettleibigkeit und Insulinresistenz dar (Preiss und Sattar 2008). Durch zunehmendes Auftreten von Adipositas in der Bevölkerung, insbesondere in den Industrieländern, hat die Rate an NAFLD drastisch zugenommen (Tefay *et al.* 2018) und wird mit einer weltweiten Prävalenz von ca. 25 % angegeben (Younossi *et al.* 2016). In den USA ist die NAFLD die häufigste Ursache für Lebererkrankungen (Ahmed *et al.* 2015) und auch bei

adipösen Kindern und Jugendlichen, welche bis zu 34 % eine NAFLD aufweisen (Anderson *et al.* 2015), stellt sie heutzutage eine Ursache für Leberzirrhose dar.

3.1.3 Klinik

Die Symptome bei Patienten mit Lebererkrankungen können je nach Ursache und auch interindividuell sehr unterschiedlich sein. Häufig wird über Schwäche, Müdigkeit, Konzentrationsmangel und Gewichtsverlust geklagt. Aufgrund des Leberkapselschmerzes bei Organvergrößerung können Schmerzen im rechten Oberbauch auftreten. In der körperlichen Untersuchung lässt sich die Leber vergrößert und mit stumpfem, unebenem Rand tasten. Bei fortgeschrittenem zirrhotischen Umbau ist sie hingegen verkleinert (Piper 2013). Die Milz kann aufgrund des erhöhten Druckes in der Pfortader und Vena lienalis vergrößert sein. Weiterhin können sich aufgrund des erhöhten Pfortaderdruckes portocavale Anastomosen in Rektum (Hämorrhoiden), Ösophagus (Ösophagusvarizen), Magenfundus sowie umbilical (*caput medusae*) eröffnen. Besonders die Ösophagusvarizen stellen hierbei eine gefährliche Komplikation dar, da es zu Rupturen kommen kann, welche oft nicht rechtzeitig beherrscht werden und innerhalb kürzester Zeit zum tödlichen Blutverlust führen können. Bei jeder Varizenblutung besteht ein Mortalitätsrisiko von 30 % sowie ein erhöhtes Risiko für eine Rezidivblutung innerhalb eines Jahres von 70 % (Perri und Khosravani 2016).

Aufgrund der eingeschränkten Funktion der Leber wird u.a. auch vermindert Albumin synthetisiert. Hierdurch, sowie durch bei Patienten mit Leberzirrhose häufig bestehender Mangelernährung, entsteht ein Eiweißmangel. Der kolloidosmotische Druck fällt ab und in dessen Folge sowie durch den erhöhten portalvenösen Druck kommt es zur Transsudation in die Bauchhöhle (Aszitesbildung). Dies kann bei hoher Transsudatmenge zur Einschränkung der Zwerchfellausdehnung und somit zur Beeinträchtigung der Atmung führen. Weiterhin besteht bei Vorliegen von Aszites die Gefahr einer spontanen bakteriellen Peritonitis, welche eine Krankenhausmortalität von 10-50 % aufweist (Gerbes *et al.* 2011). Durch Abgabe der Flüssigkeit aus dem Blutvolumen kann es in Verbindung mit der Erweiterung venöser Gefäße (venöses pooling) im Rahmen der Pfortaderstauung sowie einer generellen Vasodilatation durch Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) zu Hypovolämien und Hypotonien kommen. Durch die relative Hypovolämie kommt es zur Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems mit renaler Vasokonstriktion, verminderter Nierendurchblutung und -funktion sowie Anstieg der Nierenretentionsparameter (Hepatorenales Syndrom - HRS) (Wilhelm 2013). Eine hierdurch erzielte Natrium- und Wasserretention kann den bereits bestehenden Aszites verstärken (Piper 2013).

Ebenso ist die Entgiftung von Ammoniak über die Harnstoffbildung und dessen Ausscheidung über die Nieren gestört. Ammoniak wird in den Astrozyten im Rahmen der Glutaminsynthese metabolisiert. Der vermehrte Anfall von Glutamin führt zur Erhöhung des kolloidosmotischen Druckes in den Astrozyten, wodurch diese anschwellen und sekundär reaktive Sauerstoffspezies produziert werden. Durch portocavale Anastomosen wird das funktionelle Leberparenchym umgangen und der Vorgang zusätzlich verstärkt (Suraweera *et al.* 2016). Dies kann zur hepatischen Enzephalopathie führen, wobei es v.a. zu Störungen des Bewusstseins, der Persönlichkeit und der neuromuskulären Funktion kommt (Auswahl): Störung von Tag-Nacht-Rhythmus, Persönlichkeitsveränderungen, Stimmungsschwankungen, Verwirrtheit und Orientierungsverlust, Tremor, Reflexabschwächung, Somnolenz und zuletzt Dezerebration und Koma (Wilhelm 2013).

Den ersten Hinweis auf eine Lebererkrankung liefert häufig eine laborchemische Blutuntersuchung mit erhöhten Leber- und Cholestaseparametern. Das Routinelabor umfasst hierfür u.a. AST (Aspartat-Aminotransferase), ALT (Alanin-Aminotransferase), ALP (Alkalische Leukozytenphosphatase), γ -GT (Gamma-Glutamyltransferase), Glutamat-Dehydrogenase (GLDH) sowie direktes (Bili-D) und gesamtes (Bili-T) Bilirubin. Bei fortgeschrittener Leberschädigung zeigen sich zudem häufig Blutbildveränderungen, wie zum Beispiel eine reduzierte Thrombozytenzahl bei Hypersplenie und verminderter Thrombopoietinbildung, eine eingeschränkte Blutgerinnung anhand von vermindertem Quick- bzw. erhöhtem International Normalized Ratio (INR)-Wert sowie ein verminderter Gesamteiweiß- und Albuminspiegel (Herold 2016).

Diagnostisch ist neben der klinischen Symptomatik und den Laborwerten die Bildgebung und hierbei zunächst insbesondere die Darstellung der pathologischen Veränderungen im Ultraschall zielführend (Karanjia *et al.* 2016). Es können u.a. je nach Stadium eine vergrößerte Leber, Parenchymveränderungen bis zum knotigen Umbau bei Zirrhose, eine veränderte Gefäßarchitektur, erweiterte Gallengänge oder Steinleiden dargestellt werden. Auch eine Vergrößerung der Milz durch portalvenösen Rückstau sowie das Vorhandensein und Ausmaß von Aszites sind sonografisch gut zu diagnostizieren. In den letzten Jahren zunehmend Einzug in den klinischen Alltag findende Verfahren stellen der kontrastmittelgestützte Ultraschall (CEUS) und die Elastographie dar: Mittels Applikation von Schwefelhexafluorid-Mikrobläschen (SonoVue®) als Ultraschall-Kontrastmittel können durch dynamische Analyse der Mikrozirkulation Raumforderungen bezüglich ihrer Malignität beurteilt werden. Auch bei Interventionen wie Biopsien oder Drainagen kann CEUS angewandt werden (Jung und Clevert 2018). Aufgrund der zunehmenden Geschwindigkeit von Schallwellen in weniger elastischem Gewebe und zunehmender Steifigkeit der Leber bei Fibrose und Zirrhose können durch Analyse der Ausbreitungsgeschwindigkeit von Schallwellen mittels Elastographie Rückschlüsse auf die Elastizität des

Lebergewebes gezogen und somit insbesondere höhere Fibrosestadien und Zirrhose diagnostiziert werden (Sandrin *et al.* 2003, Knop 2018). Da beide Verfahren jedoch von den gesetzlichen Krankenkassen aktuell nicht zusätzlich vergütet werden, kommen sie in der Praxis in nur sehr geringem Maße zum Einsatz (Ärzteblatt 2017, Worlicek und Börner 2017). Generell ist die Ultraschalluntersuchung jedoch in hohem Maße vom Untersucher und dem benutzten Gerät abhängig (Leitlinienprogramm Onkologie 2013).

Weitere mögliche bildgebende Verfahren zur Darstellung von Leberfibrose/Zirrhose sind die Computertomographie (CT) und Magnetresonanztomographie (MRT). Mittels MR-Angiografie/-Cholangiografie lassen sich Gefäße bzw. Gallengänge darstellen. Dies ermöglicht außerdem eine sichere Alternative gegenüber der konventionellen Diagnostik der Gallengänge mittels ERCP (endoskopische retrograde Cholangiopankreatikografie), welche eine höhere Komplikationsrate mit z.T. schwerwiegenden Folgen aufgrund höherer Invasivität aufweist. Endoskopisch können Ösophagus- bzw. Fundusvarizen nachgewiesen und ggf. therapiert werden. Um die Schädigung und das Ausmaß der Fibrose/Zirrhose oder verdächtige Raumforderungen zu beurteilen, kann eine Ultraschall- oder CT-gestützte Biopsie des Lebergewebes mit anschließender histologischer Untersuchung durchgeführt werden (Leitlinienprogramm Onkologie 2013). Hierdurch können beispielsweise Krankheitsstadien (Fibrose/Zirrhose) oder maligne Gewebe identifiziert und differenziert werden. Die Biopsie von Lebermetastasen kann beispielsweise Hinweise auf den Primärtumor geben und somit in direkten therapeutischen Konsequenzen resultieren. Da die Biopsie jedoch auch mit nicht unerheblichen Risiken (Blutung, Schmerzen, Verletzung umgebender Strukturen etc.) verbunden ist, finden vermehrt nicht-invasive Methoden wie die o.g. transiente Elastografie oder Serummarker-Modelle wie zum Beispiel der AST to Platelet Ratio Index (APRI) Anwendung (Karanjia *et al.* 2016).

3.1.4 Pathogenese

Der Prozess der Fibrosierung in der Leber ist im eigentlichen Sinne ein Wundheilungsprozess, um im Rahmen o.g. Einflussfaktoren geschädigte Bereiche von intaktem Lebergewebe abzusichern und dort regenerative Prozesse zu fördern (Friedman 2008 (a)). Im Verlauf einer Lebererkrankung kommt es zur parenchymalen Schädigung mit Untergang von Hepatozyten, chronischer Inflammation mit Infiltration von Entzündungszellen und Freisetzung von Mediatoren wie beispielsweise reaktive Sauerstoffspezies (ROS), Transforming Growth Factor β (TGF- β) und Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) (Novo *et al.* 2014). ROS wie zum Beispiel Hydroperoxid (O_2^-) oder Wasserstoffperoxid (H_2O_2) werden unter anderem von geschädigten Hepatozyten, aktivierten Entzündungszellen (Kupferzellen, Makrophagen und Neutrophilen) oder beschädigten Mitochondrien freigesetzt (Parola und Robino 2001). TGF- β , u.a. von

Thrombozyten, Makrophagen oder Endothelzellen freigesetzt, wird als eines der wichtigsten Zytokine im Rahmen von Leberschädigungen angesehen, da es stark pro-fibrogen wirkt (Friedman 2008 (b)). Während physiologischerweise die höchste TGF- β Expression in Endothelzellen und Kupfferzellen vorliegt, führen fibrogene Stimuli auch zur erhöhten Expression von TGF- β in aktivierten HSC und es folgt eine autokrine und parakrine HSC-Stimulation (Inagaki und Okazaki 2007).

Diese Mechanismen resultieren in der Aktivierung von HSC, welche dann zu pro-fibrogenen Myofibroblasten differenzieren und in großen Mengen extrazelluläre Matrix (ECM) produzieren (Hernandez-Gea und Friedman 2011). Die Aktivierung der HSC wird zusätzlich auf molekularer Ebene durch aktivierende und hemmende Transkriptionsfaktoren gesteuert (Friedman 2008 (a)). Im Gegensatz zur früher angenommenen Theorie, dass alle Myofibroblasten ihren Ursprung in den HSC haben, weiß man heute, dass diese außerdem aus portalen mesenchymalen Zellen (Beaussier *et al.* 2007), Knochenmarkzellen (Kisseleva *et al.* 2006) sowie durch epitheliale zu mesenchymale Umwandlung (EMT) aus Hepatozyten (Zeisberg *et al.* 2007) entstehen können (Friedman 2008 (a)). Die EMT von Hepatozyten während fibrotischer Prozesse ist jedoch in letzter Zeit in Frage gestellt worden, da diese in murinen Modellen nicht nachgewiesen werden konnte (Chu *et al.* 2011). Neben den HSC sind auch weitere Zellen im Rahmen der Leberschädigung beteiligt. So setzen Kupfferzellen und geschädigte Hepatozyten ebenfalls Chemokine frei und bewirken eine Rekrutierung von weiteren Makrophagen aus zirkulierenden Monozyten (Marra und Tacke 2014). Im Rahmen der Leberfibrose aktivierte Makrophagen können je nach Stadium sowohl pro-fibrogen, beispielsweise durch Freisetzung von TGF- β (Karlmark 2009), als auch anti-inflammatorisch durch Expression von Matrix-Metalloproteinasen (MMP) (Fallowfield *et al.* 2007) wirken. Sinusoidale Endothelzellen können, je nach ihrem durch Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-stimulierten Differenzierungszustand, sowohl aktivierend auf die HSC wirken, als auch die Reversion von aktivierten zu ruhenden HSC fördern (DeLeve 2015).

In der gesunden Leber fließt das nährstoffreiche und sauerstoffreiche Blut aus Portalvene und Leberarterie über die Sinusoide zur Zentralvene. Durch das fenestrierte Sinusendothel findet über den Disse-Raum ein Austausch zwischen dem sinusoidalen Blut und den Hepatozyten statt. Bei einer Leberschädigung führt die Ablagerung von ECM im Disse-Raum u.a. zur verminderten Fenestrierung der sinusoidalen Endothelzellen und zur sogenannten Kapillarisierung der Sinusoide (Schaffner *et al.* 1963), sodass der metabolische Austausch zwischen Blut und Hepatozyten stark eingeschränkt ist. Weiterhin kann aufgrund der Fibrosierung entlang der Sinusoide mit Ausbildung von Bindegewebsstraßen das portalvenöse Blut nicht mehr in die Zentralvene abfließen und der intrahepatische Blutdruck steigt (Reynaert *et al.* 2008). Die portale Hypertension wird zusätzlich durch verminderte Freisetzung von Stickstoffmonoxid

(NO) sowie erhöhte Freisetzung von Endothelin-1 (ET-1) verstärkt (Garbuzenko *et al.* 2016). In Folge dessen bilden sich Umgehungskreisläufe in Form von portosystemischen Shunts aus. Diese Prozesse führen letztendlich zur zunehmenden Funktionseinschränkung des Organs mit oben genannten systemischen Folgen.

Physiologisch besteht die ECM der Leber hauptsächlich aus Kollagen Typ IV, Heparansulfat und Lamininen. Diese Zusammensetzung wird durch die Produktion von großen Mengen an Kollagen I und III durch aktivierte HSC massiv verändert. Je nach Art der Schädigung kommt es zu unterschiedlicher Lokalisation der Fibrosierung. So ist beispielsweise bei chronischer Hepatitis oder primär biliärer Cholangitis ein periportal Schaden typisch, wohingegen bei Abflussstörungen der Lebervenen, zum Beispiel durch das Budd-Chiari-Syndrom, eine zentri-lobuläre Fibrose resultieren kann. Bei alkoholinduzierter Lebererkrankung sowie der NASH ist die Fibrosierung eher sinusoidal ausgeprägt, wodurch es zu der typisch maschendrahtartigen Fibrose um die Hepatozyten kommt (Hernandez-Gea und Friedman 2011).

Besteht die schädigende Einwirkung über einen längeren Zeitraum, geht die Fibrosierung in das Stadium der Leberzirrhose über, resultierend in einem knotigen Umbau der Leber (Abbildung 2) und in einem Funktionsverlust der Hepatozyten endend (Friedman 2003).



Abbildung 2: Gesunde (links) und zirrhotische (rechts) menschliche Leber.

Links: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/6f/Human_Hepar.jpg?uselang=de

Rechts: http://vmrz0100.vm.ruhr-uni-bochum.de/spomedial/content/e866/e2442/e7818/e7952/e8045/e8071/e8073/zirrrose1_ger.jpg (Abrufdatum jeweils 12.01.2019)

3.1.5 Hepatische Sternzellen

Die HSC sind mesenchymale Zellen der Leber mit verschiedenen Funktionen, wie zum Beispiel der Speicherung von Vitamin A oder auch der Phagozytose apoptotischer Hepatozyten (Canbay *et al.* 2003, Friedman 2008 (b)). Die erste Beschreibung der HSC geht auf Karl Wilhelm von Kupffer zurück, welcher 1876 Vitamin A enthaltende Einschlüsse in dieser Zellform

nachweisen konnte. 1882 wurde dies durch Rothe bestätigt und er beschrieb erstmals die „Sternzelle“. Eine Abgrenzung zu den Makrophagen der Leber (Kupfferzellen) gelang damals jedoch noch nicht, sodass auch die Funktion der Zellen zunächst nicht eindeutig war. Es erfolgten anschließend weitere Untersuchungen, welche zur vielfältigen Namensgebung dieser Zellart beitrugen. So wurden die HSC von Zimmermann als „hepatische Pericyten“, von Ito als „Fettspeicherzellen oder Itozellen“ oder von Suzuki als „Interstitialzellen“ beschrieben (Friedman 2008 (b)).

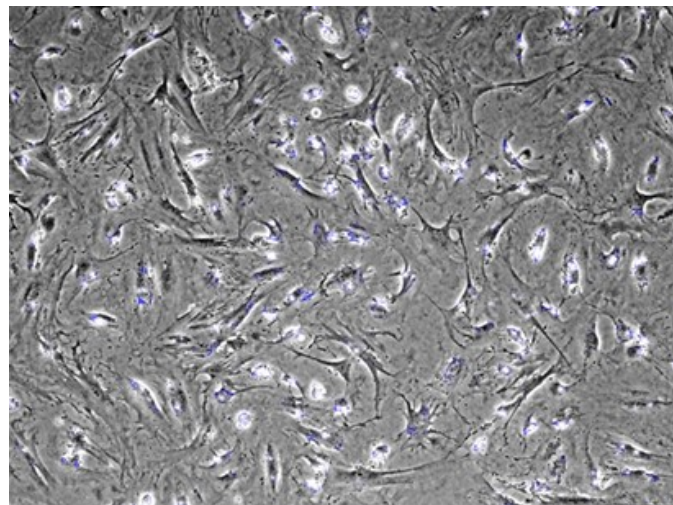


Abbildung 3: Phasenkontrastaufnahme primärer hepatischer Sternzellen. 7 Tage Kultivierung von HSC auf Plastikoberfläche mit Darstellung der Vitamin A-Autofluoreszenz nach Anregung mit ultraviolettem (UV)-Licht in blau. Bild mit freundlicher Genehmigung von Dr. Kerstin Abshagen.

Lokalisiert sind die HSC im Disse-Raum zwischen Hepatozyten und Endothelzellen. Neben der Aufrechterhaltung des hepatischen Mikromilieus durch Synthese und Modulation der ECM ist die Speicherung von Vitamin A eine wichtige Eigenschaft dieser Zellen. In Säugetieren ist bis zu 80 % des im gesamten Organismus enthaltenen Vitamin A in Fetttropfchen der HSC gespeichert (Blomhoff und Blomhoff 2006). So kann die Autofluoreszenz von Vitamin A nach UV-Epiillumination zur mikroskopischen Darstellung der HSC genutzt werden (Abbildung 3, 4.4.1). Der Begriff der „Sternzelle“ ist auf das Aussehen der Zellen zurückzuführen, welches durch lange zytoplasmatische Ausläufer geprägt ist (Abbildung 3). Hierdurch umfasst die räumliche Ausprägung einer HSC häufig mehrere Sinusoide mit Kontakt zu zahlreichen Hepatozyten (Geerts 2001). Es konnte gezeigt werden, dass diese Ausläufer auch an der chemotaktischen Signalkaskade der HSC-Aktivierung beteiligt sind (Melton und Yee 2007). Im Rahmen der bei Zirrhose auftretenden portalen Hypertension scheinen die HSC aufgrund ihrer Kontraktilität und den Reaktionen auf vasoaktive Substanzen wie Endothelin oder Angiotensin

II ein wichtiges Element der Regulation des vaskulären Tonus darzustellen (Reynaert *et al.* 2008).

Wie bereits unter 3.1.4 beschrieben, induzieren verschiedene Stimuli die Aktivierung der HSC. Dieser Prozess kann in drei Phasen eingeteilt werden: Initiation und Perpetuation, gefolgt von Resolution bei nachlassendem pathogenem Stimulus (Friedman 2000). Die Initiation der HSC-Aktivierung erfolgt hauptsächlich durch parakrine Stimuli benachbarter Zellen wie Hepatozyten, Makrophagen, Endothelzellen, Immunzellen oder Thrombozyten. Hierbei wirken unter anderem freigesetzte Mediatoren wie TGF- β , PDGF, VEGF, ROS und Interleukine aktivierend auf die HSC (Tsuchida und Friedman 2017). TGF- β nimmt hierbei eine zentrale Rolle ein und führt in den HSC über eine Phosphorylierung von SMAD-Proteinen zu einer erhöhten Transkription von Kollagen (Breitkopf *et al.* 2006). Auch der Hedgehog-Signalweg ist an der Aktivierung von HSC beteiligt. So produzieren ruhende HSC beispielsweise den Hedgehog-Inhibitor Hhip (Hedgehog interacting protein), wohingegen dieser bei Aktivierung herunterreguliert und gleichzeitig das Hedgehog-Zielgen Gli2 (Glioma-Associated Oncogene Family Zinc Finger 2) vermehrt exprimiert wird (Choi *et al.* 2009). Weiterhin wird die Aktivierung der HSC wesentlich durch die Expression aktivierender Transkriptionsfaktoren wie Foxf1 (Kalinichenko *et al.* 2003) oder JunD (Smart *et al.* 2006) bzw. einer verminderten Expression inhibierender Faktoren wie Lhx2 (Wandzioch *et al.* 2004) reguliert. Während sinusoidale Endothelzellen physiologischerweise der Aktivierung von HSC über VEGF-vermittelter NO-Produktion entgegenwirken, wird dieser Effekt durch die Kapillarisation der Endothelzellen bei Leberschädigung und die damit einhergehende verminderte NO-Produktion aufgehoben (Deleve *et al.* 2008). Auch die bei Fibrosierung resultierende mechanische Versteifung des Gewebes hat eine stimulierende Wirkung auf die HSC. So konnte beispielsweise eine HSC-aktivierende Wirkung durch Applikation von mechanischem Druck (Görtzen *et al.* 2015) oder Kultivierung in versteifendem Matrixgel (Caliari *et al.* 2016) nachgewiesen werden.

Die Phase der Perpetuation, d.h. das Aufrechterhalten des Aktivierungszustandes, ist durch verschiedene Mechanismen gekennzeichnet: vermehrte Proliferation, Chemotaxis und Kontraktilität der HSC, verstärkte Fibrogenese, Matrix-Zersetzung sowie Verlust der Retinoid-Speicher und Freisetzung von pro-inflammatorischen Chemokinen sowie Zytokinen (Friedman 2008 (b)). Infolge der Transformation zu Myofibroblasten-ähnlichen Zellen kommt es zur überschießenden Produktion v.a. von Kollagen I und III, was zur drastischen Veränderung der Zusammensetzung des Bindegewebes führt. Durch stimulierende Wirkung von Kollagen I, Integrin-gebundener Kinase (ILK), MMP sowie auch direkt durch die erhöhte Festigkeit der veränderten ECM resultiert eine weitere Aktivierung der HSC im Sinne eines *circulus vitiosus* (Yang *et al.* 2003, Friedman 2008 (a)). Ein Ungleichgewicht zwischen den matrixabbauenden

MMP und deren Inhibitoren (tissue inhibitor of matrix-metalloproteinases - TIMP) in Richtung der TIMP trägt zur Progression der Gewebefibrosierung bei (Arthur 2000, Friedman 2008 (b)). Aktivierte HSC zeichnen sich durch eine erhöhte Expression von Desmin und alpha smooth muscle actin (α -SMA) (Schmitt-Gräff *et al.* 1991) aus, wobei α -SMA den zuverlässigsten Marker für diese Zellen darstellt (Friedman 2008 (b)). Ein weiteres typisches Charakteristikum aktivierter HSC ist der zunehmende Retinoid-Verlust (Friedman *et al.* 1993), wobei gezeigt werden konnte, dass es nicht zum vollständigen Verlust der Vitamin A Speicher kommt, sondern diese bei gleichbleibender Anzahl lediglich schrumpfen (Jophlin *et al.* 2018).

Bei Nachlassen des krankhaften Stimulus kann das Stadium der Resolution bzw. die Regeneration des Lebergewebes resultieren. Hierbei regenerieren sich die Hepatozyten, Myofibroblasten werden deaktiviert und die Fibrose bildet sich durch Degeneration der Matrix zurück (Tacke und Trautwein 2015). Die aktivierten HSC können im Rahmen der Resolution in Apoptose, Seneszenz oder in eine Reversion zu ruhenden HSC übergehen. Für die aktivierten HSC stellen zum Beispiel der durch Entzündungszellen oder regenerierende Hepatozyten freigesetzte Nervenwachstumsfaktor (NGF) sowie ein direkter zellulärer Kontakt mit Makrophagen pro-apoptotische Stimuli dar (Ramachandran *et al.* 2015). Ein Zustand der Seneszenz und somit eine Rückbildung der Fibrose kann durch Ansammlung von ROS in aktivierten HSC aufgrund erhöhter Cellular Communication Network Factor 1 (CCN1)-Produktion durch Hepatozyten bei hepatischer Schädigung getriggert werden (Kim *et al.* 2013). HSC, welche vom aktivierten zurück in den Ruhezustand übergehen (Reversion), zeigen zwar einen ähnlichen Phänotyp wie ruhende HSC, sie weisen jedoch auch eine schnellere Reaktion auf erneute Schädigung gegenüber den zuvor noch nicht aktivierten HSC auf (Kisseleva *et al.* 2012).

3.1.6 Foxf1

Foxf1 ist ein Transkriptionsfaktor, welcher zur Familie der Forkhead-Box-Proteine gehört. Das Gen für FOXF1 liegt beim Menschen auf Chromosom 16 im Locus 16q24.1. Allen Proteinen dieser Familie ist eine charakteristische DNA-bindende Domäne mit einer Länge von etwa 100 Aminosäuren gleich (Dharmadhikari *et al.* 2015). Die Namensgebung der forkhead („Gabelkopf“)-Gruppe ist auf deren erste Beschreibung bei Drosophila-Embryonen zurückzuführen, welche bei Mutationen im forkhead-Gen eine veränderte Form des Skelettschädels aufwiesen (Jürgens und Weigel 1988). Es wurde gezeigt, dass Foxf1 während der Embryogenese im Septum transversum sowie im viszeralem Mesoderm exprimiert wird und dadurch an der embryonalen Entwicklung von Lunge, Ösophagus, Trachea und Darmrohr beteiligt ist (Mahlpuu *et al.* 2001 (a)). Bei Mutation oder Deletion des Foxf1 Gens zeigen Mäuse verschiedene Entwicklungsstörungen: So starben Foxf1^{-/-} Mäuse vor Tag zehn der embryonalen Entwicklung

aufgrund von Schädigungen im extraembryonalen Mesoderm (Mahlapuu *et al.* 2001(b)). Hingegen wiesen Foxf1-haploinsuffiziente Tiere (Foxf1^{+/-}) strukturelle Abnormalitäten der Gallenblase, Hypoplasie, neonatale Blutungen der Lunge, Schädigungen des Darmrohrs mit Atresie und Einengung des Ösophagus sowie ösophago-tracheale Fisteln auf (Kalinichenko *et al.* 2001 und 2002, Mahlapuu 2001 *et al.* (b)). Interessanterweise beschränkt sich in der Leber die Expression von Foxf1 ausschließlich auf HSC (Kalinichenko *et al.* 2003). Auch wenn Foxf1^{+/-} Mäuse keine strukturelle Leberschädigung aufwiesen, ließ sich nach einem durch Tetrachlorkohlenstoff (CCl₄) induzierten Leberschaden eine defekte Aktivierung der HSC mit verminderter Bildung von Kollagen und α -SMA beobachten (Kalinichenko *et al.* 2003).

Des Weiteren wurde Foxf1 mit der Entstehung von verschiedenen Malignomen assoziiert, wobei nach aktueller Datenlage das FOXF1 Gen funktionell sowohl als Tumorsuppressorgen als auch Protoonkogen genannt wird (Dharmadhikari *et al.* 2015). So wurde FOXF1 beispielsweise als Tumorsuppressor bei Brustkrebs (Lo *et al.* 2010), als möglicher Tumormarker bei kolorektalem Karzinom und als Zielgen des Tumorsuppressorgens p53 beschrieben (Dharmadhikari *et al.* 2015). Im Gegensatz dazu zeigte sich eine veränderte Expression von FOXF1 u.a. bei Brustkrebs, Basalzellkarzinom, Medulloblastom, Rhabdomyosarkom, nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (Dharmadhikari *et al.* 2015) sowie Adenokarzinom des Ösophagus (Becker *et al.* 2015).

3.1.7 Therapieansätze

Da die Leberfibrose und -zirrhose Folge verschiedenster Ursachen sind, stellt die Behandlung der Grunderkrankung derzeit den wirkungsvollsten Therapieansatz dar. So ist bei alkoholinduzierten sowie durch andere exogene Noxen verursachten Lebererkrankungen die Eliminierung der Noxe verlaufsentscheidend. Bei Alkoholabusus können zum Beispiel Substanzen wie Disulfiram oder Acamprosat, welche unangenehme Symptome bei Alkoholgenuss verursachen oder die Sucht verringern können, die Compliance verbessern (Rosato *et al.* 2015). Bei Virushepatitis wird eine antivirale Therapie eingeleitet und bei Autoimmunhepatitis mit Immunsuppressiva behandelt. Liegen Stoffwechselerkrankungen als Ursache zu Grunde, wird zum Beispiel bei Hämochromatose das leberschädigende Eisen durch Aderlässe oder Chelatoren bzw. bei Morbus Wilson das Kupfer durch Penicillamin entfernt (Herold 2016).

Neben der spezifischen Therapie der Grunderkrankung haben sich verschiedene Allgemeinmaßnahmen etabliert. Hierzu zählen selbstverständlich die Alkoholabstinenz sowie der Verzicht auf potentiell lebertoxische Substanzen. Hierunter fallen auch zahlreiche Medikamente. Insbesondere Antibiotika und Antimykotika können eine Leberschädigung verursachen (Wilhelm 2013). Es hat sich einerseits gezeigt, dass eine Proteinrestriktion zur Prophylaxe der

hepatischen Enzephalopathie sinnvoll sein kann, andererseits weisen Patienten mit Leberzirrhose jedoch aufgrund von Mangelernährung und erhöhtem Proteinumsatz auch einen erhöhten Proteinbedarf auf. Insgesamt wird von den Patienten jedoch eine normale Proteinzufuhr ohne Restriktion gut toleriert (Nguyen und Morgan 2014). Daher sollte supportiv, je nach Ernährungszustand des Patienten, eine entsprechend ausreichende Zufuhr von Proteinen und Kalorien erfolgen, um Komplikationen wie Aszites, spontan bakterieller Peritonitis oder dem hepatorenalen Syndrom vorzubeugen (Nguyen und Morgan 2014, Huynh *et al.* 2015, Herold 2016). So konnte gezeigt werden, dass eine zusätzliche Zufuhr von verzweigtkettigen Aminosäuren die Ausprägung einer hepatischen Enzephalopathie bei Leberzirrhose oder sogar die Progression zum HCC verhindern kann (Hayaishi *et al.* 2011, Nguyen und Morgan 2014). Zusätzlich sollten in diesem Rahmen auch andere Mangelzustände wie Vitaminmangel (A, D, E, K, Thiamin etc.) durch entsprechende Substitution behandelt werden (Herold 2016).

Bei Nachweis von Ösophagus- oder Magenfundusvarizen kann bei ausgeprägtem Befund die endoskopische Therapie mittels Gummibandligatur erfolgen oder der Versuch unternommen werden, den portalvenösen Hochdruck medikamentös durch nichtselektive Betarezeptorenblocker zu senken (Roeb *et al.* 2015)

Da es bisher keine kurative Therapie der Leberfibrose/Zirrhose gibt, bleibt als *Ultima Ratio* bei Fortschreiten der Erkrankung und Versagen der genannten konservativen Therapieoptionen nur die Lebertransplantation. Im Jahr 2017 wurden in Deutschland 760 postmortale sowie 63 Lebendspende-Lebertransplantationen durchgeführt (Eurotransplant 2018 (a)). 2017 warteten 1044 Patienten auf eine Lebertransplantation (Eurotransplant 2018 (b)), wovon 310 Menschen auf der Warteliste verstarben (Eurotransplant 2018 (c)). Das 3-Jahres-Überleben nach Lebertransplantation (2014) betrug 2017 76,87 % (IQTIG 2018). Um die mögliche Wartezeit auf ein Transplantat zu verlängern oder auch die Notwendigkeit einer Transplantation abzuwenden, können verschiedene Leberersatzverfahren zum Einsatz kommen. Es wird hierbei zwischen zellbasierten sowie zellfreien Systemen unterschieden. Durch zellfreie Systeme wie dem Molecular-Adsorbent-Recirculating-System (MARS®) oder dem Prometheus®-Verfahren, welche in der Funktion ähnlich eines Nierenersatzverfahrens (Dialyse) sind, können mittels einer semipermeablen Membran beispielsweise Bilirubin, Gallensäuren oder Kreatinin aus dem Blutkreislauf entfernt werden. Zellgebundene Systeme, bei denen theoretisch die gesamte Leberfunktion durch Hepatozyten (zum Beispiel vom Schwein) ersetzt wird, erreichten in Studien gute Ergebnisse, sind jedoch für einen klinischen Einsatz im Alltag aufgrund der hohen Kosten derzeit nicht verfügbar (Fuhrmann *et al.* 2014).

Eine Therapieoption, welche direkt in den Prozess der Fibrosierung eingreift und speziell in der Leber antifibrotisch wirkt, stand zum Zeitpunkt dieser Arbeit klinisch nicht zur Verfügung (Fallowfield 2015, Yoon *et al.* 2016).

3.2 DBTC-Formulierungen

Die DBTC-Formulierungen stellen das in dieser Arbeit verwendete Transportsystem für therapeutische siRNA dar. Die Lipoplexe wurden von der Firma Silence Therapeutics GmbH (London, UK) synthetisiert und uns für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Silence Therapeutics GmbH ist ein Unternehmen, welches Forschung in der Arzneimittelentwicklung, insbesondere im Bereich der Modulation von Genexpression durch siRNA oder microRNA (miRNA) sowie in der Entwicklung von entsprechenden Vektoren betreibt. Aktuelle Projekte umfassen zum Beispiel geplante klinische Studien zur β -Thalassämie oder dem myelodysplastischem Syndrom (Silence Therapeutics GmbH 2019). Die systemische Applikation einer durch Silence Therapeutics GmbH an Quark Pharmaceuticals auslizenzierten siRNA (AtuRNAi™) - Teprasiran - wird bereits in klinischen Studien bei verzögerter Nierentransplantatfunktion und akuter Niereninsuffizienz durch Inhibition des p53-Gens erfolgreich eingesetzt (Silence Therapeutics GmbH 2019, Quark Pharmaceuticals 2019).

Von der Firma wurden bereits verschiedene Transportsysteme mit unterschiedlicher Organ-/ bzw. Zellspezifität entwickelt und getestet. Hierzu zählt unter anderem Atu027, welches im Rahmen von Studien zum Pankreaskarzinom Anwendung fand (Aleku *et al.* 2008).

Die in dieser Studie verwendeten DBTC-Formulierungen stellen ein leberspezifisches Transportsystem dar, bestehend aus multiplen Atu-RNAi™ gegen Foxf1, welche in mehreren Doppellipidschichten eingeschlossen sind (Abbildung 4). Die Atu-RNAi™ wurde von Silence Therapeutics modifiziert und durch abwechselnde 2'-O-methyl-Modifikationen stabilisiert, wodurch die Protektion gegen Nukleasen erhöht wird (Czauderna 2003). Es besteht aus kationischen, PEGylierten- (PEG - Polyethylenglykol) sowie Co-Lipiden. Durch die kationischen Ladungen werden die negativ geladenen siRNA Moleküle in nanostrukturierten Komplexen (Lipoplexe) gebunden und zusätzlich vor Ribonukleasen geschützt (Fehring *et al.* 2014). Die exakte Zusammensetzung und Wirkungsweise dieses Lipidsystems ist nur Silence Therapeutics GmbH bekannt.

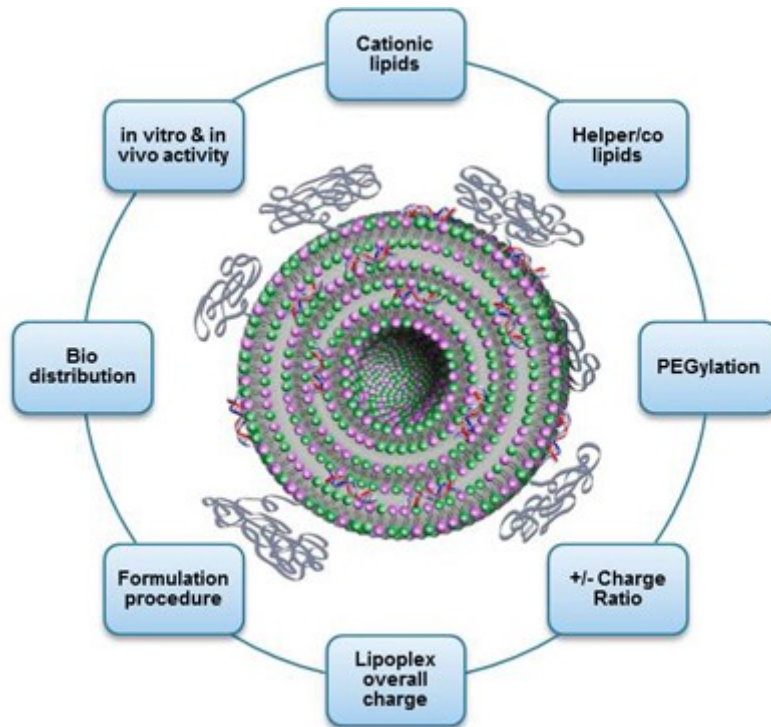


Abbildung 4: Schematischer Aufbau der Lipoplex-Formulierungen (Silence Therapeutics 2016, <http://silence-therapeutics-com.s3.amazonaws.com/app/uploads/2014/09/Lipoplex-final-1.png>)

Die synthetische siRNA kann aufgrund ihres hohen molekularen Gewichts und dem stark anionischen Verhalten die Zellmembran durch passiven Transport schlecht passieren (Fehring *et al.* 2014). Im Vergleich zu „nackter“ siRNA wurde bereits gezeigt, dass die zelluläre Aufnahme von siRNA mittels kationischer Lipoplex-Transportsysteme erhöht und auch der Übergang von siRNA aus endosomalen Vesikeln ins Zytoplasma bei Vorhandensein von Lipoplexen verbessert ist (Santel *et al.* 2006). Durch die PEGylierung wird die Dauer der Blutzirkulation verlängert, da Phagozytose und vermutlich toxische Effekte vermindert werden (Santel *et al.* 2006, Fehring *et al.* 2014).

Kationische Lipidformulierungen wurden zuerst 1989 im Rahmen von *in vivo*-Gentransfektionen in murinen Lungen eingesetzt (Brigham *et al.* 1989). Die zelluläre Aufnahme der kationischen Lipide und Freisetzung der Nukleinsäuren wurde 1996 von Zelphati *et al.* als Endozytose beschrieben. Barron *et al.* (1999) stellten den kationischen Anteil der Lipoplexe als aktive Komponente zur Transfektion dar und vermuteten eine direkte Interaktion mit der Zellmembran.

Durch die spezifische Größe sowie Oberflächenladung werden die DBTC-Lipoplexe nach systemischer (intravenöser) Applikation speziell von Leberzellen, inklusive der HSC aufgenommen. Die Leber- bzw. Organspezifität der DBTC-Lipoplexe wurde in Vorversuchen nach systemischer Applikation bei Mäusen untersucht. Die höchste Konzentration der siRNA konnte in

der Leber nachgewiesen werden, während in der Milz nur geringe Mengen detektiert wurden (Abbildung 5). In anderen Organen, wie zum Beispiel der Lunge, waren lediglich unter 1 % der initialen Dosis nachweisbar (Abshagen *et al.* 2015 (b), Abbildung 5). Zur Verifizierung der funktionellen Transportfähigkeit der DBTC siRNA-Formulierungen wurden Mäuse mit siRNA gegen verschiedene leberzellspezifische Zielgene behandelt und anschließend die intrahepatische Expression dieser Zielgene analysiert. Hierbei wurde zwischen Endothelzellen (tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 2 - Tie-2), Hepatozyten (Apolipoprotein B - ApoB9) und HSC (Glial fibrillary acidic protein - GFAP) unterschieden sowie eine siRNA gegen das ubiquitär vorkommende Gen für Protein Tyrosine Kinase 2 (PTK-2) eingesetzt. Die Expression dieser leberzellspezifischen Gene konnte durch Applikation der jeweils spezifischen siRNA in der Leber signifikant vermindert werden, wobei die Expression von PTK-2 in Lunge, Herz und Nieren unbeeinträchtigt blieb, was die Leberspezifität der DBTC-Lipoplexe beweist (Abshagen *et al.* 2015 (b)). Daher kann durch die Verwendung einer siRNA gegen das HSC-spezifische Gen Foxf1 eine HSC-spezifische Modulation erreicht werden (3.3).

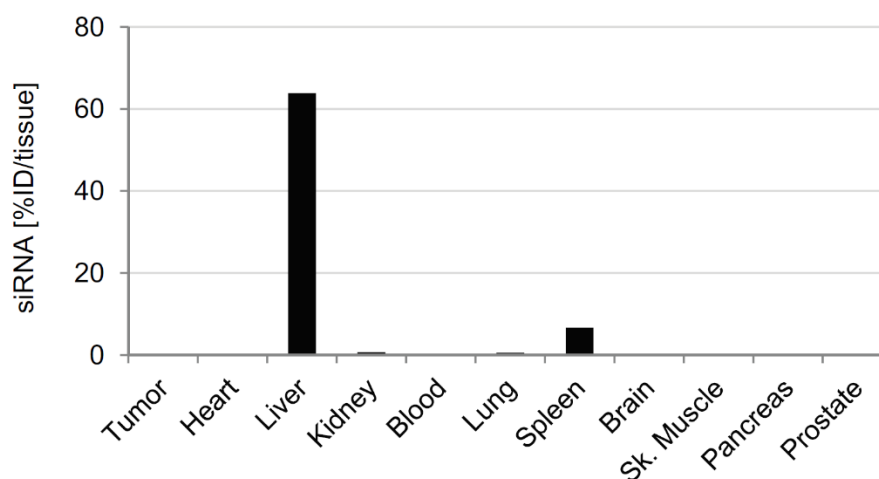


Abbildung 5: Nachweis eines leberspezifischen Deliveries der DBTC-Formulierungen. Den Mäusen wurde eine einmalige Dosis DBTC Proteinkinase 3 (PKN3)-siRNA appliziert. Dargestellt sind die jeweiligen Konzentrationen von PKN3-siRNA in bestimmten Organen/Geweben als Prozentsatz der initial applizierten Konzentration, wobei der größte Anteil an siRNA im Lebergewebe detektiert wurde. (Abshagen *et al.* 2015 (b)).

3.3 siRNA

Die siRNA gehört zu den nicht-kodierenden RNAs und dabei neben miRNAs und PIWI interacting RNAs (piRNAs) zur Unterfamilie der kleinen (ca. 20-30 Basenpaare langen) nicht-kodierenden RNAs (Kobayashi und Tomari 2016). Der Funktionsweise der siRNA liegt folgendes Prinzip zugrunde (Abbildung 6): Die zunächst als Doppelstrang vorliegende RNA wird durch Bindung an Dicer (DCR), einer Ribonuklease, auf eine Länge von ca. 21 Nuklotiden gespalten

(Tang 2005, Hirose *et al.* 2014). Die siRNA wird an verschiedene Proteine der Subfamilie AGO gebunden, welche zur Familie der Argonauten (Ago)-Proteine gehören (Kobayashi und Tomari 2016). Diese Bindung an Ago-Proteine (Loading) ist Adenosintriphosphat (ATP)-abhängig. DCR kann das Loading unterstützen, wobei es in Säugetieren für diesen Vorgang nicht essentiell ist, im Gegensatz zum Loading bei Fliegen (Hirose 2014). Die an Ago-Proteine gebundene Doppelstrang RNA wird aufgewunden und die Basenpaare trennen sich, sodass der Nicht-Zielstrang („passenger strand“) entfernt wird und der Zielstrang der siRNA verbleibt. Der Komplex aus Zielstrang und Ago wird dann als RNA induced silencing complex (RISC) bezeichnet (Kobayashi und Tomari 2016). RISC führt nun den siRNA-Zielstrang an die dazu komplementäre Ziel-messenger RNA (mRNA) (Tang 2005). Durch Bindung der siRNA im RISC an die mRNA wird diese durch Endonukleasen, genannt „slicer“, des Proteins Ago2 des RISC aufgespalten (Hirose *et al.* 2014). Somit wird die Translation dieser mRNA an den Ribosomen und letztendlich die Herstellung des entsprechenden Proteins verhindert (Abbildung 6).

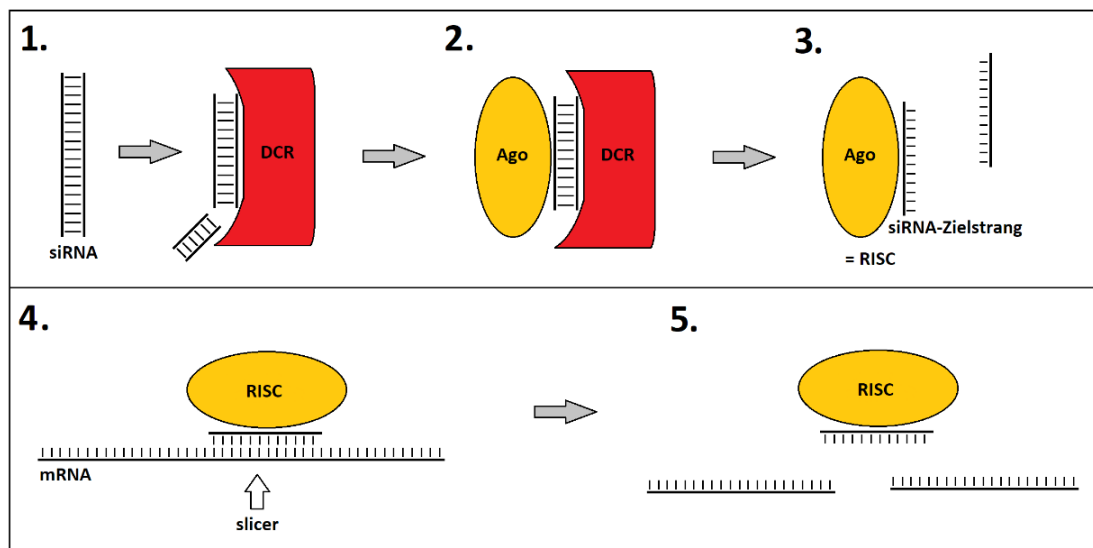


Abbildung 6: Vereinfachte Darstellung der Funktionsweise von siRNA. 1. siRNA wird von der Ribonuklease Dicer (DCR) gebunden und auf eine Länge von ca. 21 Basenpaaren gespalten. 2. Argonauten-Proteine (Ago) binden an die siRNA. 3. Der Doppelstrang der siRNA wird aufgewunden, die Basenpaarungen aufgespalten und der Zielstrang verbleibt nun im sogenannten RNA induced silencing complex (RISC). 4. RISC bindet an die zum Zielstrang komplementäre mRNA. Durch Endonukleaseaktivität (slicer) des RISC wird die mRNA aufgespalten (5.) und die Translation des entsprechenden Proteins verhindert.

Die Funktion der RNA Interferenz dient in vielen eukaryotischen Zellen vor allem der Verteidigung gegen fremde RNA (Kobayashi und Tomari 2016). Möglichkeiten der RNA Interferenz haben sich in den letzten Jahren zu einem großen Feld der Grundlagenforschung etabliert. So ist es theoretisch möglich, die Expression jedes, durch Translation einer spezifischen mRNA

hergestellten Proteins, zu vermindern (Hirose *et al.* 2014) und somit posttranskriptionell in die Genexpression einzugreifen. Aktuell werden mittels dieser Methode, neben der Erforschung von Genfunktionen, verschiedenste therapeutische Ansätze in einer Vielzahl von Zielzellen erprobt. So konnten z.B. durch Applikation von High-Mobility-Group-Protein B1 (HMGB1) siRNA in den Glaskörper von Ratten im Rahmen der diabetischen Retinopathie retinale Zellschäden reduziert werden (Jiang und Chen 2017). Scherman *et al.* (2017) beschrieben klinische Studien für insgesamt 18 verschiedene Erkrankungen, u.a. bei okulären, metabolischen oder genetischen Erkrankungen seit Beginn der Durchführung klinischer Studien für siRNA im Jahr 2004. In einer klinischen Phase I Studie an Patienten mit soliden Tumoren (u.a. von Brust, Pankreas, Kolon) konnte durch die Applikation von Atu027 die Progression verhindert und zum Teil eine Remission erreicht werden (Schultheis *et al.* 2016). Auch in weiteren klinischen Studien, unter anderem zur Therapie von Morbus Crohn, Makuladegeneration, rheumatoider Arthritis oder Hepatitis C, findet RNA-Interferenz Anwendung (Badrealam *et al.* 2015). Eine der größten Schwierigkeiten und Gegenstand aktueller Forschungen ist es, einen optimalen Vektor zu finden, der die siRNA sicher an ihren Zielort verbringt und dort freisetzt, ohne dass diese dabei beschädigt oder abgebaut wird (Badrealam *et al.* 2015).

3.4 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Da es derzeit keine kurativen Behandlungsmöglichkeiten bei Leberfibrose gibt, war es Ziel dieser tierexperimentellen Studie, einen antifibrotischen Therapieansatz zu testen. Hierbei sollte im murinen Modell der BDL-induzierten Leberschädigung das therapeutische Potential von DBTC-Foxf1 siRNA evaluiert werden.

Die dieser Arbeit zugrundeliegenden Versuche wurden durchgeführt, um folgende Fragen zu beantworten:

1. Wie verteilen sich die DBTC-Lipoplexe nach systemischer Applikation in der gesunden und fibrotischen Leber der Maus?
2. Werden die DBTC-Lipoplexe auch von HSC aufgenommen?
3. Kommt es durch die repetitive Gabe von DBTC-Foxf1 siRNA zu einer Herunterregulation der hepatischen Foxf1 mRNA Expression?
4. Welche Auswirkungen hat die Applikation von DBTC-Foxf1 siRNA auf den Leberschaden und das Ausmaß der Leberfibrose zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach BDL?
5. Verlängert die Gabe von DBTC-Foxf1 siRNA das Überleben von Mäusen mit BDL-induziertem Leberschaden?

4 Material und Methoden

4.1 Versuchstiere

Vor dem Hintergrund des übergeordneten Ziels der Arbeit, eine potentielle Therapieoption für Lebererkrankungen beim Menschen zu erforschen, war die Notwendigkeit für Untersuchungen an Versuchstieren gegeben. Die Analyse der Auswirkungen von DBTC-Foxf1 siRNA hätte in einem *in vitro* Modell nicht adäquat vollzogen werden können, da hierbei die komplexen Interaktionen eines lebenden Organismus nicht in vollem Umfang nachgestellt werden. Die Auswahl der Versuchstiere fiel auf Mäuse des Inzuchtstammes Balb/c (Charles River Laboratories, Sulzfeld), da zum einen für Mäuse bereits viele Methoden, wie zum Beispiel die BDL etabliert sind (Marques *et al.* 2012, Eipel *et al.* 2013, Abshagen *et al.* 2015 (a)), zum anderen für diese Tiere eine Reihe spezifischer Antikörper existieren. Für den Balb/c-Stamm ist weiterhin eine relativ hohe Gesamtmenge an HSC bekannt, weshalb dieser u.a. auch für die Gewinnung von primären HSC genutzt wird (Mederacke *et al.* 2015). Die Tiere waren zu Beginn der Versuche ca. 12-14 Wochen alt und hatten ein Körpergewicht von 25-30 g. Vor und während der Untersuchungen wurden die Mäuse in einem klimatisierten Raum (22°C bis 24°C, ca. 60 % Luftfeuchtigkeit) bei einem 12 h Tag-Nacht-Rhythmus in der zentralen Versuchstierhaltung des Rudolf-Zenker-Instituts für Experimentelle Chirurgie der Universitätsmedizin Rostock gehalten. Während des gesamten Zeitraums wurden die Tiere mit Standardlaborfutter (Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) und Wasser *ad libitum* versorgt.

Die Tierversuche wurden nach Genehmigung vom Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern (LALLF M-V/TSD/7221.3-1.1-062/12) entsprechend dem nationalen Tierschutzgesetz, der EU-Richtlinie 2010/63/EU sowie der Nutzerordnung der Zentralen Versuchstierhaltung der Universitätsmedizin Rostock durchgeführt.

4.2 Versuchsaufbau

4.2.1 Intrahepatische Verteilung der DBTC-Cy3 siRNA

Mittels *in vivo* Fluoreszenzmikroskopie (IVM) (4.4.1) wurde untersucht, wie sich die DBTC-Lipoplexe nach intravenöser Applikation in einer gesunden bzw. einer fibrotischen Leber verteilen und ob sie speziell von HSC aufgenommen werden. Da Vitamin A eine Autofluoreszenz unter UV-Anregungslicht aufweist, können so durch die entstehenden Signale HSC identifiziert werden (Reetz *et al.* 2013). Durch Markierung der siRNA mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cyanin 3 (Cy3) und Anregung der Leber mit Licht im grünen Wellenlängenbereich von ca. 560 nm ist es möglich, siRNA-DBTC transfizierte Zellen sichtbar zu machen. Durch Kollokalisierung der

Cy3-Fluoreszenz mit Vitamin A-positiven Signalen konnten somit transfizierte HSC identifiziert werden.

Die intravitalmikroskopische Analyse erfolgte in verschiedenen Versuchsgruppen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach i.v. Applikation (Tabelle 4-1).

Um die Verteilung der DBTC-Lipoplexe in gesunden Lebern zu untersuchen, wurde die Leber von jeweils zwei gesunden Mäusen eine bzw. vier Stunden nach intravenöser Gabe von DBTC-Cy3 siRNA (0,23 mg/ml siRNA und 3,712 mg/ml Lipid, Silence Therapeutics GmbH, London, UK) intravitalmikroskopisch untersucht. Zwei weitere Tiere mit Pufferlösung ohne Lipoplexe (Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure (HEPES) + 9 % Sucrose) wurden eine Stunde nach Injektion mikroskopiert und dienten als Kontrolle. Um die Verteilung der Lipoplexe in fibrotischen Lebern zu beurteilen, wurden je vier Tiere 14 Tage nach BDL eine bzw. vier Stunden nach Gabe der markierten Lipoplexe untersucht. Zwei Tiere, ebenfalls 14 Tage nach BDL, bekamen die Pufferlösung verabreicht und wurden eine Stunde nach Injektion mikroskopiert. Da an Tag 14 nach BDL eine starke Schädigung/Fibrosierung und folglich eine schlechtere Durchblutung der Leber vorlag, wurde die intrahepatische Verteilung der Lipoplexe zusätzlich zu einem früheren Fibrosestadium an Tag fünf nach BDL untersucht.

Nach Beendigung der IVM-Analyse wurde den Mäusen das Lebergewebe für nachfolgende Immunfluoreszenz-Untersuchungen entnommen, um zusätzlich *ex vivo* die Transfektionseffizienz zu beurteilen.

Versuchsgruppe	Ohne BDL	5 d nach BDL	14 d nach BDL
DBTC-Cy3 siRNA (1 h p.t.)	2	3	4
DBTC-Cy3 siRNA (4 h p.t.)	2	2	4
Puffer (1 h p.t.)	2	1	2

Tabelle 4-1: Anzahl der Mäuse in den jeweiligen Versuchsgruppen zur Untersuchung der intrahepatischen Verteilung der DBTC-Lipoplexe. Die intravitalmikroskopische Analyse der Leber erfolgte 1 h bzw. 4 h nach Applikation der Cy3-markierten Lipoplexe bzw. 1 h nach Puffer Injektion, in gesunden (ohne BDL) sowie fibrotischen Lebern 5 d und 14 d nach BDL.

4.2.2 Therapeutischer Ansatz mittels DBTC-Foxf1 siRNA

Um zu überprüfen, ob die systemisch applizierte DBTC-Foxf1 siRNA eine therapeutische Wirkung auf die Ausprägung einer BDL-induzierten cholestatischen Leberfibrose hat, wurden zwei Untersuchungsgruppen erstellt. Die Therapiegruppe erhielt DBTC-Foxf1 siRNA (siFoxf1), wohingegen die Kontrollgruppe mit DBTC-Luci siRNA (siLuci) behandelt wurde. Die Luciferase siRNA stellt hierbei ein Placebo dar, da das Luciferase Gen bei Mäusen nicht exprimiert wird und somit auch keine komplementäre mRNA für die entsprechende siRNA vorhanden ist. Diese Gruppe war notwendig, um potentielle Effekte durch die Lipoplexe *per se* zu untersuchen bzw. auszuschließen.

Den Tieren beider Gruppen wurden zwei Tage vor BDL sowie im weiteren Verlauf als Erhaltungsdosis alle drei Tage nach BDL DBTC-Foxf1 siRNA bzw. DBTC-Luci siRNA über die Vena jugularis verabreicht. Die Dosis betrug hierbei 2,3 mg/kg Maus, welche einer in Aqua ad injectabilia (Braun, B. Braun Melsungen AG) gelösten Menge von 0,1 ml/10 g KG Maus entsprach. Zu den finalen Untersuchungszeitpunkten zwei, fünf und 14 Tage nach BDL wurde den Mäusen Blut, Leber- und Lungengewebe für nachfolgende Untersuchungen entnommen (Abbildung 7). Pro Gruppe und Zeitpunkt wurden jeweils 7-12 Tiere untersucht. Die Analyse von Leberschaden und -fibrose erfolgte anhand laborchemischer, histologischer und molekularbiologischer Parameter (Tabelle 4-2).

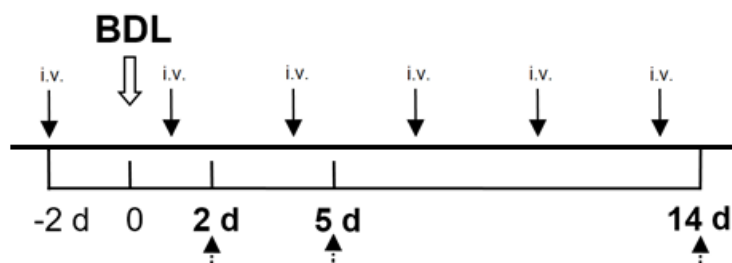


Abbildung 7: Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufes des therapeutischen Ansatzes. Die BDL erfolgte an Tag 0 (breiter Pfeil nach unten) und die i.v. Gabe (schwarze Pfeile nach unten) der DBTC-Foxf1 siRNA bzw. DBTC-Luci siRNA 48 h vor BDL und anschließend alle 72 h nach BDL als Erhaltungsdosis. Die finalen Untersuchungen (Pfeile nach oben) wurden an den Tagen 2, 5 und 14 nach BDL durchgeführt.

Histologie	H&E (Galleninfarkte), Sirius Red (fibrotischer Umbau)
Blutbild	Erythrozyten-, Leukozyten-, Thrombozytenzahl
Laborchemie	AST, ALT, GLDH, AP, direktes/indirektes Bilirubin
Westernblot/PCR	α -SMA, GAPDH
Konventionelle/Fluidigm RT-PCR	Foxf1, PTEN, TIMP, MMP, Kollagen1 α

Tabelle 4-2: Übersicht über die Untersuchungsmethoden und -parameter.

4.2.3 Mortalitätsstatistik

Mit der Durchführung einer Mortalitätsstudie sollte evaluiert werden, ob die siRNA-vermittelte Inhibierung von Foxf1 einen benefiziellen Effekt auf das Überleben der Versuchstiere ausübt. Hierzu wurden insgesamt 20 Balb/c-Mäuse randomisiert in die zwei Behandlungsgruppen (siFoxf1 und siLuci) eingeteilt und einer BDL unterzogen. Die Applikation der Lipoplexe erfolgte, wie im therapeutischen Ansatz, zwei Tage vor BDL und alle drei Tage nach BDL. Die Tiere wurden mehrmals täglich beobachtet und anschließend die Zeitspanne des Überlebens in Tagen dokumentiert. Die Aufzeichnung erfolgte den Anforderungen entsprechend für Schätzungen der Überlebensraten nach Kaplan-Maier. Der Tod der Tiere wurde als Eintritt des erwarteten Ereignisses gewertet. Nach 49 Tagen war kein zusätzlicher Datengewinn zu erwarten und die restlichen Tiere wurden unter Einhaltung der entsprechenden Tierschutzbedingungen euthanasiert. Die erhobenen Daten wurden in Microsoft Excel tabellarisch dokumentiert und mittels Sigmaplot ausgewertet.

4.3 Praktisches Vorgehen

4.3.1 Anästhesie

Die Gallengangsligatur sowie die intravenöse Applikation der Lipoplexe bzw. Pufferlösung erfolgten in tiefer Gasnarkose mit Hilfe des Inhalationsnarkosegerätes Sulla 808 (Dräger, Drägerwerk AG & Co. KGaA, Lübeck). Das Gasgemisch bestand aus dem volatilen Anästhetikum Isofluran (Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim), Distickstoffmonoxid (N_2O) zur Analgesie sowie Sauerstoff (O_2). Zur Einleitung der Narkose wurden die Tiere einzeln in eine Einleitungskammer aus Plexiglas verbracht. Dort wurden auf einer Seite die Gase eingespeist, auf der Gegenseite erfolgte die Absaugung. Nachdem die Tiere sediert waren, wurden sie auf eine Wärmeplatte mit $37,5^\circ C$ überführt und mit Pflasterstreifen (Leukosilk® S, BSN medical, Hamburg) an den Vorder- und Hinterpfoten fixiert. Hier wurde die Narkose durch eine Gasmaske mit äußerer Absaugvorrichtung fortgeführt. Um ein Austrocknen der Augen während der Eingriffe zu verhindern, wurde den Tieren Augensalbe (Bepanthen®, Bayer Vital GmbH, Leverkusen) aufgetragen. Der Gasfluss betrug zur Narkoseeinleitung $1,2 \text{ L/min } O_2$ und $2,4 \text{ L/min } N_2O$ mit 5 % Isofluran und zur Aufrechterhaltung der Narkose $0,4 \text{ L/min } O_2$ und $0,8 \text{ L/min } N_2O$ mit 1,5 % Isofluran. Bei stark beeinträchtigten Tieren nach BDL musste die Dosis individuell angepasst werden, mit oft geringerem Isofluran- und höherem O_2 -Anteil, da sich bei diesen Tieren bereits in niedriger Dosierung rasch eine Atemdepression zeigte.

Für die Intravitalmikroskopie und die finale Entnahme von Blut und Gewebe wurden die Mäuse intraperitoneal (i.p.) narkotisiert. Die Tiere wurden zuerst gewogen und anschließend ein Gemisch aus Ketamin (Betapharm GmbH & Co. KG, Vechta, Deutschland; 90 mg/kg KG) und

Xylazin (Rompun®, Bayer Vital GmbH, Bayer Health Care, Deutschland; 7 mg/kg KG) in einer Menge von 0,01 ml/10 g KG appliziert. Es konnte somit eine ausreichende Narkose durch die stark analgetische und hypnotische Wirkung von Ketamin und die muskelrelaxierende und sedierende Wirkung von Xylazin erreicht werden. War die Narkose in seltenen Fällen nicht ausreichend, wurde mit einer Lösung aus Ketamin 10 % und Natriumchlorid (NaCl) 0,9 % im Verhältnis 1:5 nachdosiert, bis die erforderliche Narkosetiefe erreicht wurde.

4.3.2 Gallengangsligatur

Die Mäuse wurden nach elektrischer Rasur des Bauches und Desinfektion mit Povidon-Iod (Betaisodona®, Mundipharma GmbH, Limburg) median laparotomiert. Daraufhin wurde der Ductus choledochus unter Sicht durch ein Auflicht-Stereomikroskop (LEICA M651, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) im Ligamentum hepatoduodenale auf der Vena portae aufgesucht, präpariert und an drei Stellen (2x proximal und 1x distal) mit einem Polyethylenterephthalat (PET)-Faden Polyester-S grün 5/0 (Catgut GmbH, Markneukirchen) ligiert. Anschließend wurde der Gallengang zwischen der mittleren und der distalen Ligatur durchtrennt (Abbildung 8 d). Die Ligaturen erfolgten an drei Stellen, um zum einen durch die zwei proximalen Ligaturen eine Cholestase zur Leber hin zu gewährleisten sowie durch die distale Ligatur Ausreten von Pankreassekret oder Darminhalt in den Bauchraum zu verhindern. Nach intraabdomineller Gabe von 0,2 ml 0,9 % NaCl zum Ausgleich eines möglichen intraoperativen Flüssigkeitsverlustes erfolgte der Verschluss der unteren Hautschicht mit Prolene® 6.0 (Johnson & Johnson Medical GmbH, Ethicon Deutschland, Norderstedt) und der oberen Hautschicht mit Prolene® 5.0. Zum Schutz der Wunde wurde ein Sprühverband (OPSITE™, Smith & Nephew GmbH, Hamburg) aufgetragen. Nach Beendigung der Gasnarkose erfolgte die Wärmepflege der Tiere mittels Rotlichtlampe, bis ein ausreichender und stabiler Wachzustand festgestellt werden konnte. Postoperativ bekamen die Tiere zur Analgesie Metamizol (Novaminsulfon-ratiopharm®; Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) in der Dosierung von 500 mg/100 ml Wasser über die Trinkflaschen verabreicht, welche täglich erneuert wurden.

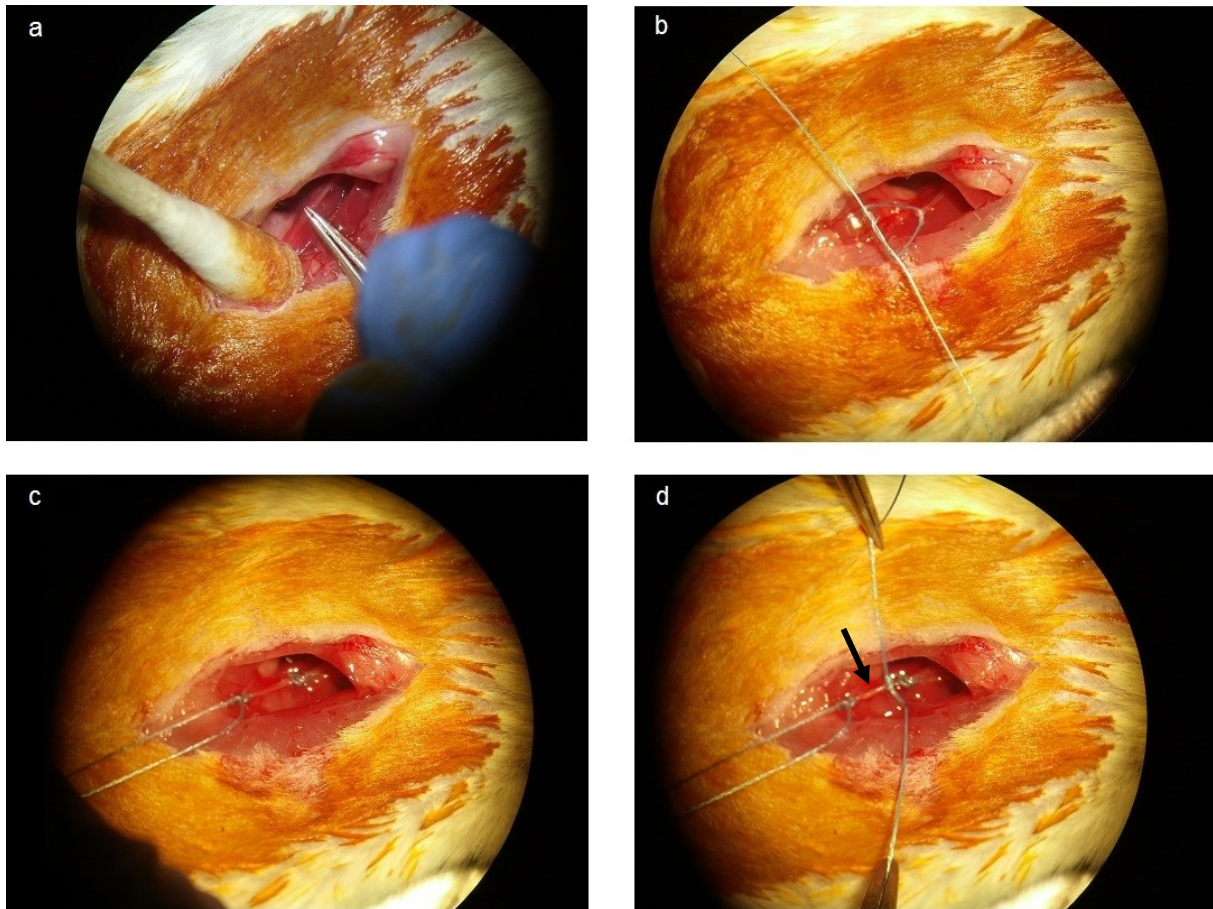


Abbildung 8: Intraoperative Aufnahmen mittels Stereomikroskop: a) Aufsuchen und Darstellen des Ductus choledochus auf der Vena portae; b) Setzen der distalen Ligatur; c) Setzen der ersten proximalen Ligatur; d) Setzen der zweiten proximalen Ligatur; Im Anschluss wird der Ductus choledochus zwischen den proximalen und der distalen Ligatur durchtrennt (Pfeil).

4.3.3 Intravenöse Injektion der DBTC-Formulierungen

Nach dem Wiegen der Tiere, Narkotisierung und elektrischer Rasur des lateralen Halsbereiches wurde 70 % Ethanol zur Desinfektion der Haut und dem besseren Auffinden der Vena jugularis unter der Haut aufgetragen. Daraufhin wurde die Haut über der Vene durch einen 5 mm langen Schnitt eröffnet und das Gefäß etwas freipräpariert. Da die i.v. Injektionen alle drei Tage erfolgten, wurden abwechselnd die rechte und linke Vena jugularis verwendet.

Es erfolgte die langsame Injektion der Lipoplex-Lösung (0,23 mg/ml siRNA und 3,712 mg/ml Lipid, Silence Therapeutics GmbH, London, UK) in einem Volumen von 0,1 ml/10 g Maus. Nach Blutstillung durch zwei Minuten langes Auflegen eines Wattestäbchens (PAUL HARTMANN AG, Heidenheim) wurden die Hautnaht mit Prolene® 6.0 und eine Wärmepflege wie nach der Gallengangsligatur durchgeführt.

4.3.4 Entnahme von Blut und Gewebe

Zum jeweiligen Endzeitpunkt wurden die Tiere intraperitoneal narkotisiert (4.3.1) und nach Rasur und Desinfektion großzügig laparotomiert. Die Bauchorgane wurden mit Wattestäbchen nach lateral bewegt, um Sicht auf die Vena cava inferior zu erlangen. Diese wurde mit einer 26 Gauge Kanüle (Braun, B. Braun Melsungen AG) punktiert und die individuell größtmögliche Menge an Blut aspiriert (0,4-1 ml Vollblut, je nach Zustand und Größe der Maus) und in Mikrovetten (Microvette® 500 K3E EDTA, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) überführt. Nun wurde die Leber entnommen, indem ihr Bandapparat sowie die Gefäße Arteria hepatica propria, Vena portae und Vena cava inferior abgetrennt wurden. Die Gallenblase wurde inzisiert, entleert und das Feuchtgewicht der Leber bestimmt. Die Leber wurde in 0,9 % NaCl getaucht, um Blut und Gallenflüssigkeit zu entfernen, und anschließend mit einem Skalpell zerteilt. Der linkslaterale Leberlappen wurde für histologische Untersuchungen in 4 % Formalin fixiert, der linke mediale Leberlappen wurde für Gefrierschnitte in einem Einbettmedium (Tissue-Tek®, Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen) durch Flüssigstickstoff eingefroren und bei -20°C gelagert. Nach Entfernung der Gallenblase wurde das restliche Lebergewebe zerteilt und für molekularbiologische Untersuchungen in Mikro-Schraubröhren (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) ebenfalls in Flüssigstickstoff eingefroren und bis zur Analyse bei -80°C gelagert. Zuletzt erfolgte nach Eröffnung des Thorax die Entnahme der Lungen. Die Lungenhili wurden durchtrennt und die kollabierten Lungen ebenfalls für etwaige molekularbiologische Untersuchungen schockgefroren und bei -80°C gelagert.

4.4 Untersuchungstechniken

4.4.1 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

Die intrahepatische Verteilung der DBTC-Formulierungen wurde mittels *in vivo* Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Hierfür wurden die Mäuse nach Applikation der Cy3-markierten Lipoplexe bzw. der Pufferlösung (4.2.1) narkotisiert (4.3.1) und nach Rasur und Desinfektion großzügig laparotomiert. Der linkslaterale Leberlappen wurde dann auf eine aus handelsüblicher Knete geformte Unterlage ausgelagert. Hierzu wurden die angrenzenden Bandstrukturen durchtrennt, der Leberlappen mit Hilfe von Wattestäbchen vorsichtig gedreht und verlagert, sodass die ventrale Seite auf der Unterlage aus Knete zu liegen kam. So konnte die nun möglichst plane, dorsale Seite nach Auflegen eines Deckglases betrachtet werden. Dabei wurde die dorsale Seite nicht berührt, um selbst kleinste Verletzungen zu vermeiden. Anschließend wurde der ausgelagerte Bereich unter einem Fluoreszenzmikroskop (AxioTech Vario 100, Carl Zeiss AG, Oberkochen) mittels Epi-Illumination im Grünlicht- und UV-Filter betrachtet. Im Grünlicht-Filter konnten die mit Cy3-markierten Lipoplexe identifiziert werden, durch die UV-

Autofluoreszenz des in den HSC gespeicherten Vitamin A erfolgte die Lokalisation der HSC. Da die Vitamin A-Autofluoreszenz unter UV-Licht schnell verblasst, wurden visuell gut darstellbare Bereiche zuerst durch den Grünlichtfilter ausgewählt und anschließend dasselbe Gesichtsfeld im UV-Filter betrachtet. Es wurden jeweils in 100- und 200-facher Vergrößerung Aufnahmen angefertigt. Die Mikroskopiebilder wurden mit einer schwarz-weiß Video-Kamera (PIEPER GMBH, Schwerte) digitalisiert und mit einem Videorekorder aufgezeichnet. Anschließend wurden die Video-Dateien off-line mit Hilfe des computer-assistierte Bildanalyse-Programms Cap-Image (Cap-Image, Dr. Zeintl, Heidelberg, Deutschland) analysiert. Um Co-Lokalisationen und somit transfizierte HSC zu identifizieren, wurden die Einzelbilder der Cy3- und Vitamin A-Fluoreszenz desselben Gesichtsfeldes übereinandergelegt.

4.4.2 Immunfluoreszenz

Zur weiteren Analyse der Verteilung der DBTC-Formulierungen und der Kolo-kalisation der Lipoplexe mit HSC wurde nach der *in vivo* Mikroskopie von gesunden sowie von Tieren fünf Tage nach BDL das Lebergewebe entnommen und histologisch aufgearbeitet. Mittels Mikrotom (Leica RM 2145, Wetzlar) erfolgte die Anfertigung von 5 µm dünnen Paraffinschnitten des Lebergewebes, welche auf Objektträger aufgebracht und in einem Brutschrank inkubiert wurden. Um Proteinverbindungen aufzulösen, welche die Antikörperbindung möglicherweise erschweren, wurden nach Entparaffinierung mittels Hitzebehandlung die Epitope freigelegt. Nun folgte, nach Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen, die Inkubation der Schnitte über Nacht mit einem primärem α-SMA-Antikörper (1:600, rabbit-anti-mouse, Abcam plc, Cambridge, UK). Die indirekte Immunfluoreszenz wurde daraufhin durch Inkubation mit dem sekundären Antikörper (goat-anti-rabbit-DyLight®488 1:100; Abcam) erreicht. Zur Darstellung der Zellkerne erfolgte die Behandlung mit dem DNA-Farbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI; 1:100; AppliChem, Darmstadt). Durch Färbung mit Sudan-Black (Santa-Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) konnte die Autofluoreszenz des Gewebes herabgesetzt und somit der Hintergrund reduziert werden.

Anschließend erfolgte die Betrachtung der Schnitte unter einem Fluoreszenzmikroskop (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) im 20x und 40x Objektiv. Durch verschiedene Anregungs- und Emissionsfilter konnten die Strukturen dargestellt werden. Die Wellenlängen der Anregungen/Emissionen betragen für Cy3 488/532nm (rot), für DyLight®488 493/518nm (grün) und für an dsDNA gebundenes DAPI 358/461nm (blau) (Abbildung 13, 14, 15).

Ähnlich der Auswertung der IVM konnte, nach Überlagerung der angefertigten Bilder, durch Kolo-kalisation der Cy3 markierten Lipoplexe und dem nun durch indirekte Immunfluoreszenz

dargestellten HSC-Marker α -SMA eine Transfektion der HSC durch die Lipoplexe verifiziert werden.

4.4.3 Vollblutanalysen

Die Blutproben wurden im automatischen Zellzähler (Sysmex KX-21, Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt) analysiert. Um eine Koagulation zu vermeiden, wurden diese bis zur Analyse in ständiger Bewegung auf einem Rollenmischer gelagert. Danach wurde das restliche Blut bei 3500 Umdrehungen/min zentrifugiert (Beckman CG-15, Beckman Coulter GmbH, Krefeld), das Plasma abpipettiert und bei -20°C für weitere Untersuchungen gelagert.

4.4.4 Plasmaanalysen

Die biochemische Analyse der Enzymaktivitäten von AST, ALT, ALP, GLDH sowie Bilirubin erfolgte mittels automatisierter photospektrometrischer Analyse mit dem cobas c111 analyzer und den entsprechenden Reagenzien (Roche, Mannheim, Deutschland) gemäß den Herstellerangaben.

Die ALT gilt als leberspezifisch, da sie hauptsächlich in den Hepatozyten vorkommt. Sie ist zum größten Teil (85 %) im Zytoplasma und zu einem geringen Teil (15 %) in den Mitochondrien der Hepatozyten lokalisiert (Halwachs-Baumann 2006). Die AST ist in diversen Organen (u.a. Leber, Nieren, Muskelgewebe) enthalten und ist bei Schädigungen der Leber im Blut häufig erhöht nachzuweisen. Im Gegensatz zur ALT ist das Enzym zu 85 % in den Mitochondrien und zu 15 % im Zytoplasma der Hepatozyten enthalten. Da das Enzym erst bei starker Schädigung der Leber aus den Mitochondrien freigesetzt wird, kann das Verhältnis von AST/ALT, der DeRitis Quotient, Hinweis auf die Schwere einer Lebererkrankung (DeRitis-Quotient >1) geben (Halwachs-Baumann 2006). Die GLDH ist ebenfalls ein mitochondriales Enzym und ähnlich wie die ALT relativ leberspezifisch. Durch Zerstörung von insbesondere zentroazinaeren Hepatozyten mit Schädigung der Mitochondrien kommt es zur Freisetzung der GLDH und somit zu erhöhten Blutwerten (Dörner 2009).

Die ALP setzt sich aus mehreren Unterformen (Knochen-ALP, Leber-ALP etc.) zusammen, wobei etwa die Hälfte davon in der Leber synthetisiert wird und bei Schädigung des Organs erhöht ist (Halwachs-Baumann 2006).

Bilirubin stellt das Abbauprodukt des Hämoglobins dar. Unterschieden werden indirektes (unkonjugiertes) Bilirubin, welches bei intrahepatischen Erkrankungen anfällt und direktes (konjugiertes) Bilirubin, welches nach Glukoronidierung in den Hepatozyten entsteht und bei posthepatischen Störungen wie Cholestase erhöht ist (Piper 2013).

4.4.5 Histologische Analysen

4.4.5.1 Hämatoxylin & Eosin

Nach Fixierung des linkslateralen Leberlappens in 4 % Formalin für 2-3 Tage und anschließender Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe erfolgte die Einbettung in Paraffin (Merck, Darmstadt). Mit Hilfe eines Mikrotoms (Leica RM 2145, Wetzlar) wurden 5 µm dünne Schnitte angefertigt und diese auf Objektträger aufgetragen. Die Objektträger mit den Präparaten wurden bei 65°C für 30 Minuten inkubiert, in absteigender Alkoholreihe entparaffiniert und mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. Im Anschluss erfolgte die erste Färbung mittels Hämalaun-Farbstoff (Merck KGaA, Darmstadt) für fünf Minuten. Hämatoxylin wird zu Hämatein oxidiert und als der basische Farbstoff Hämalaun von den anionischen Strukturen wie der DNA aufgenommen, wodurch zum Beispiel Zellkerne blau-violett imponieren. Nach erneutem Waschen mit Wasser und PBS wurden die Objektträger für 30 Sekunden in Eosin-Lösung (Merck KGaA, Darmstadt) gebracht und mit Wasser und PBS gewaschen. Eosin färbt die kationischen Strukturen wie beispielsweise zytoplasmatische und extrazelluläre Komponenten rot (Welsch 2006). Zuletzt wurden die Schnitte durch reinen Alkohol entwässert.

Anschließend erfolgte die Betrachtung der Schnitte im Lichtmikroskop (Olympus BX 51, OLYMPUS EUROPA SE & Co. KG, Hamburg) in 100x Vergrößerung. Hierbei wurden jeweils insgesamt 20 verschiedene Gesichtsfelder ausgewählt und mit einer Kamera (Color View II FW, OLYMPUS EUROPA SE & Co. KG, Hamburg) als Bilddatei festgehalten. Diese Bilder konnten im Anschluss mit Adobe Photoshop (Adobe Systems Software Ireland Limited, Dublin, Irland) mittels Markierung der nekrotischen Bereiche pro Bild und Zählung der jeweiligen Pixelzahl ausgewertet werden. Dies erfolgte manuell mittels „Lasso-Werkzeug“, womit Bereiche individuell frei Hand umschrieben und ausgewählt werden konnten (Abbildung 9). Anhand der Gesamtpixelzahl pro Bild konnte somit der Anteil der nekrotischen Areale am gesamten Lebergewebe berechnet werden. Randbereiche wurden nicht in die Berechnung einbezogen.

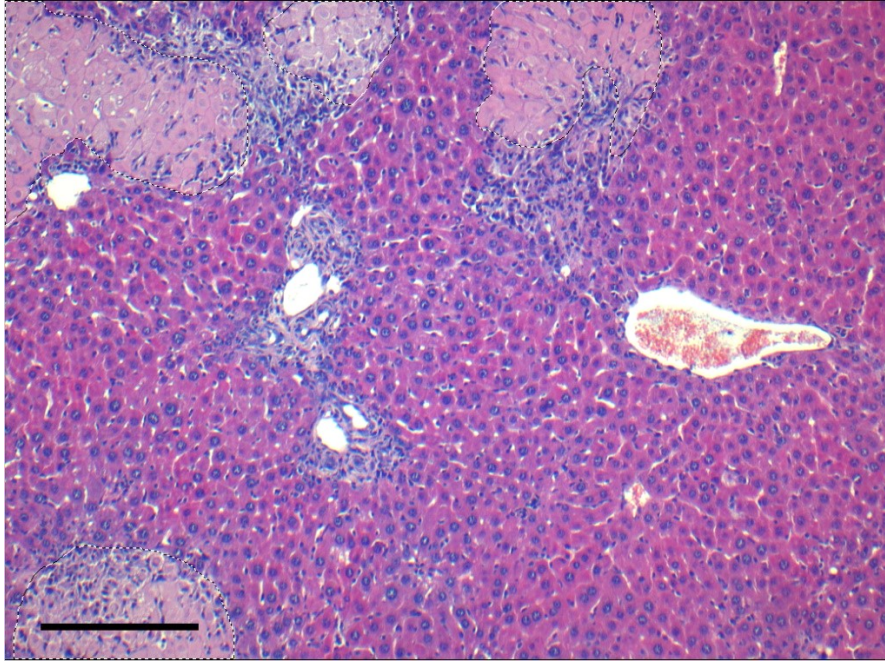


Abbildung 9: Exemplarischer Bildausschnitt eines mittels Adobe Photoshop bearbeiteten, H&E-gefärbten Leberschnittes. Gestrichelte Linien umgeben die per „Lasso-Werkzeug“ markierten, nekrotischen (hell rosa) Bereiche. Balken entspricht 200 μm .

4.4.5.2 Sirius Red

Die Färbung von Leberschnitten mit Sirius Red ist eine gut etablierte und aussagekräftige Methode zum Nachweis von extrazellulärer Matrix (Segnani *et al.* 2015, Abshagen *et al.* 2015 (a, b, c), Black 2018). Die Fixierung, Einbettung und das Schneiden des Lebergewebes erfolgten hierbei in gleicher Weise wie bei der Vorbereitung zur Hämatoxylin & Eosin (H&E)-Färbung (4.4.5.1). Die rötliche Färbung von Kollagen resultierte durch eine 60-minütige Inkubation der Objektträger in Pikro-Sirius Red Lösung (Sigma Aldrich, Schnellendorf) mit anschließendem Waschen und Dehydrieren durch reinen Alkohol wie bei 4.4.5.1.

Die mikroskopische Betrachtung sowie Aufnahmen der Bilder von jeweils 20 Gesichtsfeldern pro Präparat erfolgte wie zuvor bei der Analyse der nekrotischen Areale (4.4.5.1). Die Auswertung erfolgte ebenfalls mit Adobe Photoshop, wobei hierbei die fibrotischen Areale, erkennbar an der rötlichen Färbung des Kollagens, markiert wurden und in gleicher Weise, wie bei den H&E Schnitten, die Pixelzahl erfasst und deren Anteil am Lebergewebe bestimmt werden konnte. Dies konnte aufgrund der kräftigen Farbe der gefärbten Bereiche durch den Menüpunkt „Farbbereich“ erfolgen, wodurch Bereiche des Bildes mit dem gleichen oder ähnlichen Farbbereich ausgewählt werden können (Abbildung 10). Auch hier wurden Randbereiche nicht mit in die Auswertung einbezogen.

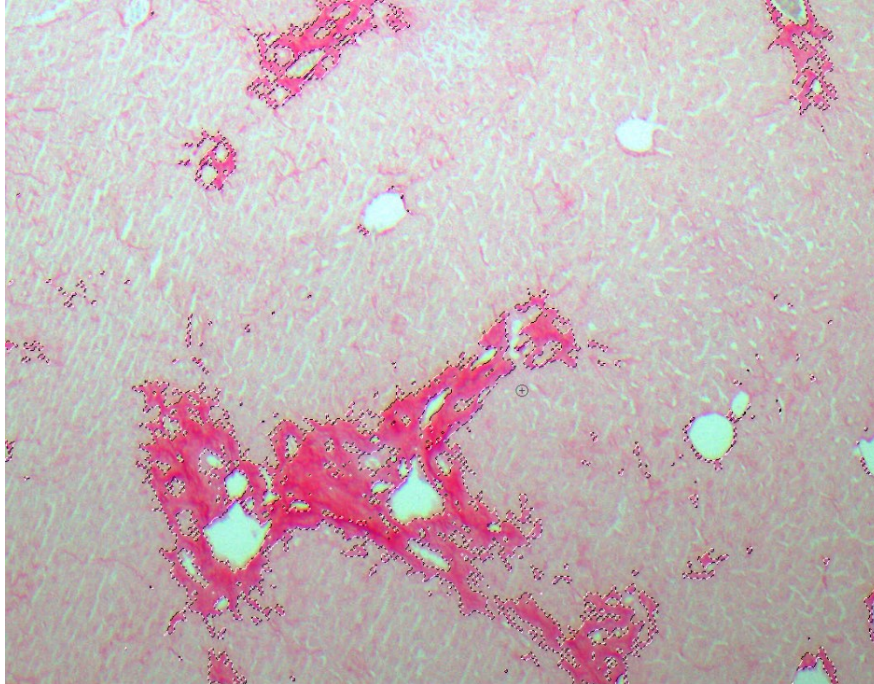


Abbildung 10: Exemplarischer Bildausschnitt eines mittels Adobe Photoshop bearbeiteten Sirius Red-gefärbten Leberschnittes. Gestrichelte Linien umgeben die per Auswahl „Farbbereich“ markierten, mit Sirius Red-gefärbten, Kollagen-haltigen Bereiche.

4.4.6 Western Blot

Mittels Western Blot erfolgte die quantitative Proteinanalyse des HSC-Markers α -SMA. Das Protein α -SMA wird im Rahmen der HSC-Aktivierung und -Kontraktion bei Fibrosierung der Leber gebildet (Friedman 2008 (a)) und gilt als der zuverlässigste Marker für Myofibroblasten (Novo 2014). Das schockgefrorene Lebergewebe wurde zunächst mittels Lysispuffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 % Nonidet P-40, 0,5 % Natriumdeoxycholat, 0,1 % Natriumdodecylsulfat (SDS), 10x Protease Inhibitor) lysiert. Nach Kühlung für 30 min auf Eis und anschließender Zentrifugation der Proben erfolgte die Auftrennung von jeweils 40 μ g Protein durch sodium dodecyl sulfate (SDS)-Gelelektrophorese sowie die anschließende Übertragung auf Nitrozellulose-Membranen (Amersham Biosciences, Freiburg). Die Anfärbung der Proteine erfolgte, nach Blockade von unspezifischen Proteinbindungsstellen mit bovinem Serumalbumin (BSA), über Nacht bei 4°C mit einem anti- α -SMA Primärantikörper (1:1000; Sigma-Aldrich Co.) sowie einem anti-Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) Antikörper (1:20000; Merck Millipore Chemicals GmbH, Schwalbach). Als Sekundärantikörper wurde ein Meerrettichperoxidase (HRP)-konjugierter anti-mouse Antikörper (α -SMA: 1:20.000; GAPDH: 1:40.000; Sigma-Aldrich Co.) verwendet. Durch Luminol-verstärkte Chemilumineszenz (ECL) mittels ECL Western blot reagents (Amersham Biosciences) wurde die Oxidation von Luminol durch die HRP katalysiert.

Die resultierenden Signale der Emission des oxidierten Luminols bei Rückkehr in den Grundzustand und somit die quantitative Expression von α -SMA und GAPDH wurden densitometrisch erfasst und mittels Quantity One Software (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) ausgewertet. Die Normalisierung der α -SMA Signale erfolgte gegen GAPDH als Housekeeping Protein.

Die quantitative Analyse der Foxf1-Proteinexpression konnte aufgrund nicht funktionierender Antikörper leider nicht erfolgen.

4.4.7 RT-PCR

Die reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) erfolgte zur quantitativen Analyse der Foxf1 mRNA Expression. Das zuvor in flüssigem Stickstoff schockgefrorene Lebergewebe (-80°C) wurde in einer Schwingmühle (MM 301, Retsch GmbH, Haan) durch Wolframcarbid-Kugeln homogenisiert (Qiagen, Hilden). Hieraus wurde die Gesamt-RNA mittels Invisorb Spin Tissue RNA Mini Kit (Invitek, Berlin) bzw. dem RNeasy Mini Kit in Kombination mit dem RNase free DNase Set zur Elimination von DNA (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA) gemäß den Herstellerangaben isoliert. Die Konzentration der RNA konnte mittels Nanodrop 2000 Spectrophotometer (PegLab Biotechnologie GmbH, Erlangen) ermittelt werden. Die RNA wurde nun in cDNA umgeschrieben. Hierfür erfolgte zunächst die Inkubation eines Oligomixes, bestehend aus 2 μg RNA, Diethyldicarbonat (DEPC) Wasser und Oligo(dT)18-Primer (Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland) bei 72°C für 10 Minuten im Mastercycler (Mastercycler gradient, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf). Im Anschluss wurde aus dem Oligomix, Puffer, Dithiothreitol (DTT), Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTP) - Mix (Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham MA, USA) und SuperScript™ II Reverse Transkriptase (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) ein Masteransatz hergestellt und dieser bei 42°C für 65 Minuten im Mastercycler erhitzt. Die RT-PCR erfolgte nach Standardprotokoll (30 min bei 48°C , 10 min bei 95°C , 40 Zyklen bei 95°C für jeweils 15 s sowie 1 min bei 60°C) durch den ABI PRISM 7700 Sequence Detector (Software: Sequence Detection System v1.6.3 (ABI)) oder das StepOnePlus™ Real Time PCR System (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, Massachusetts, USA) mit Sequenzen der jeweiligen Primer (Tabelle 4-3) in der Menge von 300 nM und den Sonden in der Menge von 100 nM (siehe auch Santel *et al.* 2006, Fehring *et al.* 2013, Abshagen *et al.* 2015 (b)). Als Housekeeping-Gen wurde Phosphatase and Tensin homolog (PTEN) zur internen Kontrolle verwendet.

Die Auswertung der erhaltenen threshold cycle (CT)-Werte erfolgte anhand der delta-delta-Cycle of treshold ($\Delta\Delta\text{CT}$)-Methode. Die CT-Werte wurden gegenüber PTEN normalisiert (ΔCT) und im Anschluss ΔCT der Proben von ΔCT der Positivkontrolle (mit Pufferlösung behandelte

Mäuse) subtrahiert ($\Delta\Delta\text{CT}$). Hierzu musste eine Primereffizienz von nahezu 100 % (d.h. 1,9-2,2) bestehen.

Gen	Primer	Sequenz (5' zu 3')
Foxf1	Vorwärts	GCAGCCATACCTTCACCAAAAC
	Rückwärts	ACATGCTGGGCGACTGTGA
	Sonde	AGAACTGCAAGGCATCCCTCGGTATCAC
PTEN	Vorwärts	CACCGCCAAATTTAACTGCAGA
	Rückwärts	AAGGGTTTGATAAGTTCTAGCTGT
	Sonde	TGCACAGTATCCTTTTGAAGACCATAACCCA

Tabelle 4-3: Primer-Sequenzen für die RT-PCR

4.4.8 Fluidigm Analyse

Die Fluidigm-Analyse bietet die Möglichkeit eine große Anzahl an Genen in wenig Probenmaterial gleichzeitig zu analysieren. Diese Untersuchungen wurden in Kooperation mit dem Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für Klinische Pharmakologie in Stuttgart durchgeführt. Es wurden dort 600 ng/12 μl totale RNA nach reverser Transkription durch die „microfluidic Fluidigm Biomark™ chip platform“ (Fluidigm Corporation, San Francisco, CA, USA) analysiert. Hierfür benutzten die Stuttgarter Kollegen vorgefertigte Genexpressions-Assays von Applied Biosystems (auch Abshagen *et al.* 2015 (b)). Die Auswertung erfolgte wie bei der RT-PCR mittels der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode und GAPDH als Housekeeping-Gen. Durch Auftreten von vereinzelten Fehlmessungen wurden insgesamt drei Läufe durchgeführt und die Ergebnisse z.T. gemittelt.

4.4.9 Datenverarbeitung und Statistik

Die erhobenen Daten wurden dokumentiert, in Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, USA) eingefügt und Mittelwerte, Standardabweichungen und Standardfehler der Mittelwerte berechnet. Die grafische Darstellung der Daten erfolgte als Balkendiagramme mittels SigmaPlot12 (Jandel Corp., San Rafeal, USA). Die Mortalität der Tiere wurde grafisch in Kaplan-Maier-Überlebenskurven dargestellt. Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels SigmaStat (Jandel Scientific, San Rafael, CA, USA). Die Unterschiede zwischen den Gruppen (siFoxf1 bzw. siLuci) wurden mittels zweiseitigem t-Test für verbundene Stichproben nach Student ermittelt, mit anschließender Bonferroni-Korrektur zur Reduzierung der Alpha-Fehler-Wahrscheinlichkeit. Bei $p < 0.05$ wurde eine statistische Signifikanz angenommen.

5 Ergebnisse

5.1 Zustand der Tiere

Nach Erwachen aus der Narkose erschienen die Tiere kurze Zeit desorientiert und körperlich geschwächt. Sie wurden während dieser Zeit aufgrund des postnarkotisch verminderten Energieumsatzes durch eine Wärmelampe vor Hypothermie geschützt. Nach einer Gasnarkose überwandern sie diesen Zustand nach subjektivem Eindruck schneller als nach der intraperitonealen Narkose, insgesamt waren die Tiere jedoch innerhalb kurzer Zeit wieder vollständig wach, tranken und fraßen problemlos. Den im Anschluss an die Laparotomie bzw. die Hautinzision zur intravenösen Injektion auftretenden Schmerzen wurde durch die Zugabe von je vier Tropfen = 100 mg Metamizol (Novalgin®, Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt) pro 100 ml Trinkwasser vorgebeugt. Das mit Analgetikum versetzte Trinkwasser wurde aus hygienischen Gründen, sowie um einen Wirkungsverlust des Medikaments zu verhindern, täglich erneuert. Die Mehrheit der Tiere zeigte sich prä- wie postoperativ subjektiv vollkommen gleichwertig aktiv und ohne Anzeichen von Schmerzen. Tiere, welche bereits vor der Terminierung verstarben, fraßen weniger und waren sichtbar weniger aktiv. Bei Obduktionen einiger verstorbener Tiere konnte das Versagen der Ligatur nachgewiesen werden, was vermutlich über eine folgende Peritonitis zum Tode führte.

5.2 Intrahepatische Verteilung von DBTC-Cy3

5.2.1 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

Um die Verteilung der verwendeten DBTC Lipoplexe innerhalb der Leber zu beurteilen, wurde im ersten Studienabschnitt Tieren mit einer gesunden bzw. fibrotischen Leber fluoreszenzmarkierte Lipoplexe (DBTC-Cy3 siRNA) systemisch verabreicht. Die *in vivo* Analyse der Lebern zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion zeigte unterschiedliche Verteilungsmuster. Während sich nach einer Stunde vermehrt intravasale sowie ubiquitäre Signale entlang der Sinusoide, insbesondere an deren Rand im Bereich des Disse-Raumes, beobachten ließen, veränderte sich die Verteilung vier Stunden nach Injektion. Es waren weniger Cy3-Fluoreszenzsignale zu beobachten, welche nun punktuell akkumulierten (Abbildung 11 b). Durch die Kolo-kalisation dieser Signale mit denen der Vitamin A-Autofluoreszenz (UV-Filter) konnte die Transfektion der HSC mit den Lipoplexen identifiziert werden (Abbildung 12).

Trotz einer veränderten Mikrozirkulation sowie erschwerten Mikroskopie-Bedingungen in den fibrotischen Lebern konnten auch bei den kranken Tieren Kolo-kalisationen der Cy3-Fluoreszenz mit der Vitamin A-Autofluoreszenz von HSC beobachtet werden (Abbildung 12).

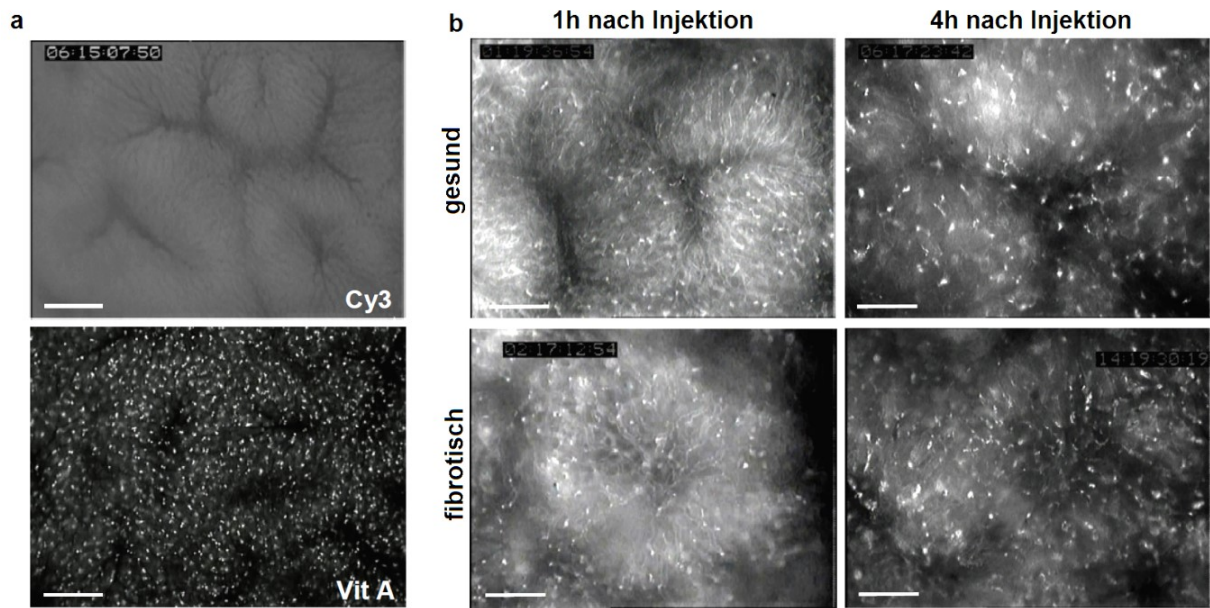


Abbildung 11: Intravitalmikroskopische Aufnahmen der Leber. (a) gesunde Leber 1 h nach i.v. Injektion der Pufferlösung im Grünlichtfilter (oben, normale Gewebefluoreszenz) und UV-Filter (unten, Vitamin A-Autofluoreszenz); Balken entsprechen 200 μm ; (b) hepatische Cy3-Fluoreszenz 1 h bzw. 4 h nach i.v. Injektion der Cy3-markierten Lipoplexe in eine gesunde Leber (obere Reihe) und fibrotische Leber 5 d nach BDL (untere Reihe); Balken entsprechen 100 μm .

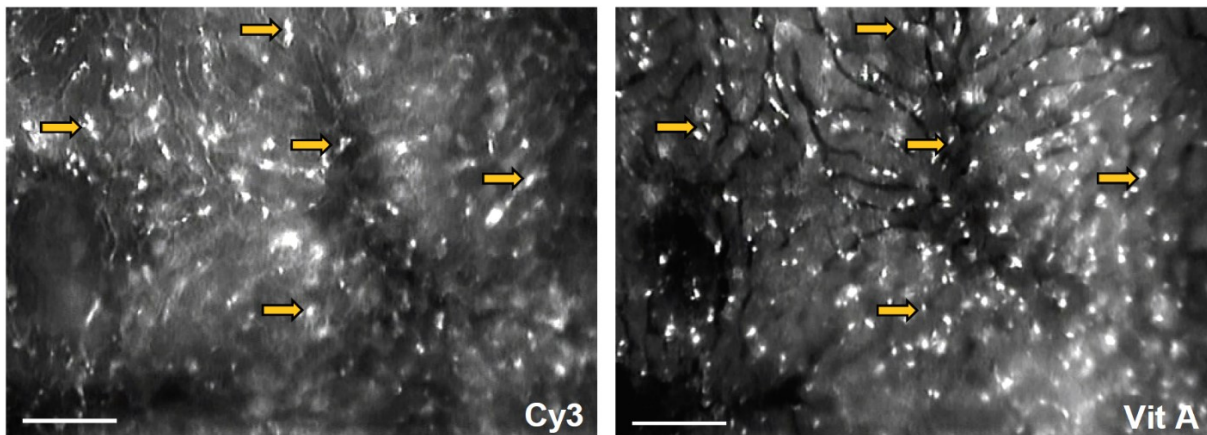


Abbildung 12: Intravitalmikroskopische Aufnahmen der Cy3- und Vitamin A-Fluoreszenz einer fibrotischen Leber (5 d nach BDL) 4 h nach i.v. Injektion von DBTC-Cy3 siRNA. Die Pfeile markieren exemplarisch Cy3-positive Signale, welche mit Vitamin A-positiven Fluoreszenzsignalen kolokalisieren, was auf eine erfolgreiche Transfektion von HSC mit den DBTC-Lipoplexen hinweist. Balken entsprechen 100 μm .

5.2.2 Immunfluoreszenz

Zur Verifizierung dieser Beobachtungen wurden von den Lebern Schnittpräparate angefertigt und mittels Immunfluoreszenz untersucht. Hierbei ließ sich das unterschiedliche Verteilungsmuster der Lipoplexe eine und vier Stunden nach Injektion der Lipoplexe sowie zwischen gesunden und fibrotischen Lebern bestätigen.

So zeigten sich eine Stunde p.t. die Cy3-Signale der DBTC-Formulierungen besonders entlang der Gefäßstraßen des Lebergewebes sowie im Bereich der Sinusoide (Abbildung 13 b). Zusätzlich wurde die α -SMA Expression zur Darstellung der HSC (Abbildung 13 c), sowie DAPI als Kernfärbung (Abbildung 13 a) betrachtet. Nach Überlagerung der einzelnen Fluoreszenzbilder (Cy3/DAPI/ α -SMA) waren bereits nach einer Stunde Kollokationen von HSC und den Lipoplexen erkennbar (Abbildung 13 d). Im Vergleich dazu kam es vier Stunden p.t. zu einem veränderten Cy3-Fluoreszenzmuster. Die Cy3-Fluoreszenzsignale ließen sich nun weniger intravasal, sondern eher intrazellulär in der Nähe der Sinusoide beobachten. Da in der gesunden Leber kaum α -SMA exprimiert wird, konnte keine Aussage zur Kollokation mit den HSC gemacht werden. Ein ähnliches Cy3-Verteilungsmuster, jedoch mit etwas geringerer Fluoreszenzintensität war in den fibrotischen Lebern zu beobachten. Nach Überlagerung der einzelnen Fluoreszenzen konnten Kollokationen von Cy3 mit α -SMA, also mit aktivierten HSC, detektiert werden (Abbildung 14). Die intrahepatische Verteilung der DBTC-Lipoplexe war in fibrotischen Lebern 14 Tage nach BDL aufgrund ausgeprägter Schädigungen und des fibrotischen Umbaus des Lebergewebes (Abbildung 15) und damit einhergehenden Mikrozirkulationsstörungen sehr eingeschränkt. Vor allem in den fibrotischen Arealen war nahezu keine Cy3-Fluoreszenz zu detektieren.

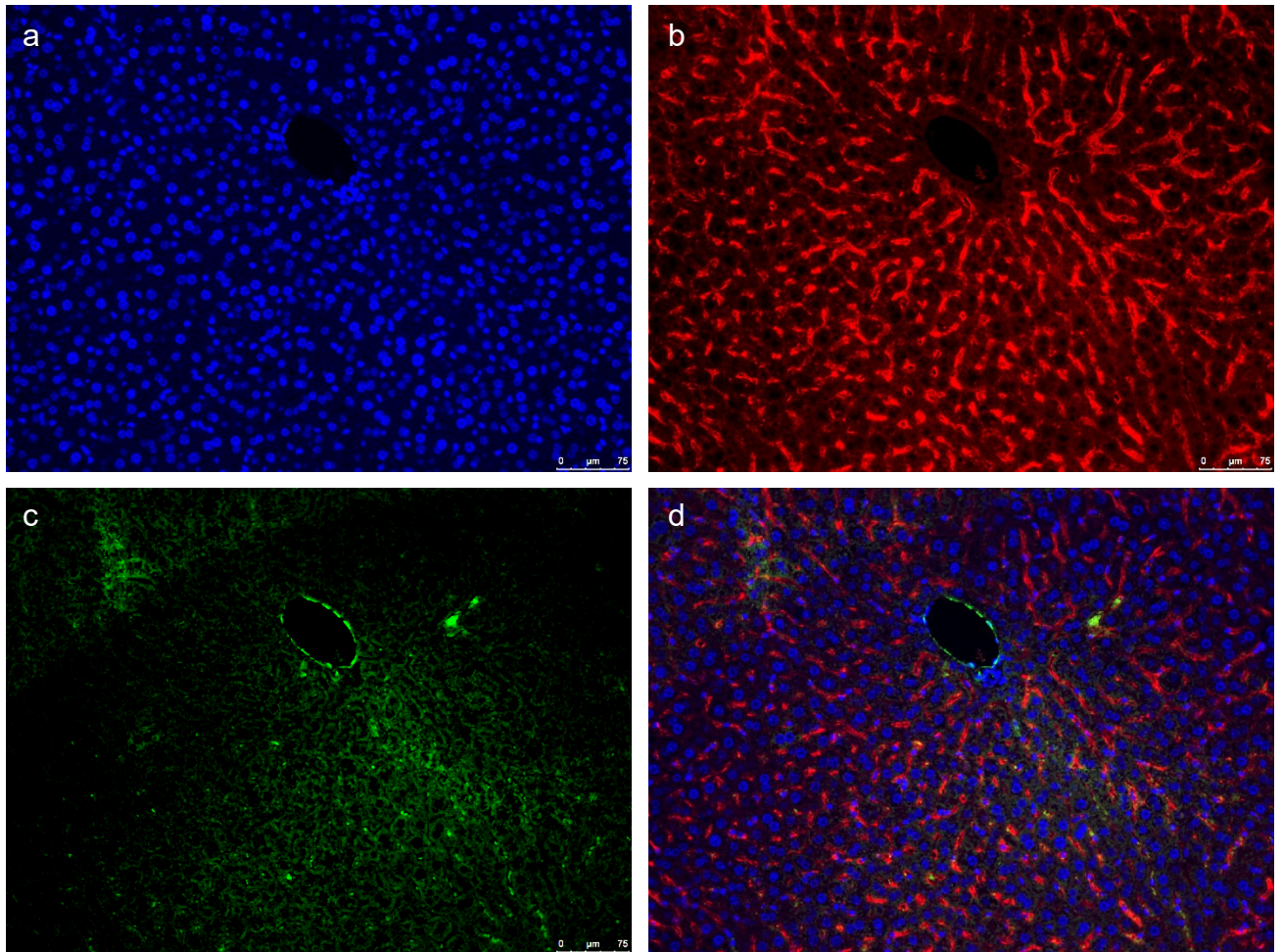


Abbildung 13: Immunfluoreszenzmikroskopie des Lebergewebes 1 h nach i.v. Injektion von Cy3-DBTC siRNA in gesunden Tieren. a) DAPI-Färbung (blau) – Zellkerndarstellung; b) Cy3-Fluoreszenz (rot) – Darstellung der markierten Lipoplexe; c) α -SMA-Fluoreszenz (grün) – HSC-Darstellung; d) Überlagerung der DAPI/Cy3/ α -SMA-Fluoreszenzen zur Darstellung möglicher Kolokalisationen von HSC mit den DBTC-Lipoplexen.

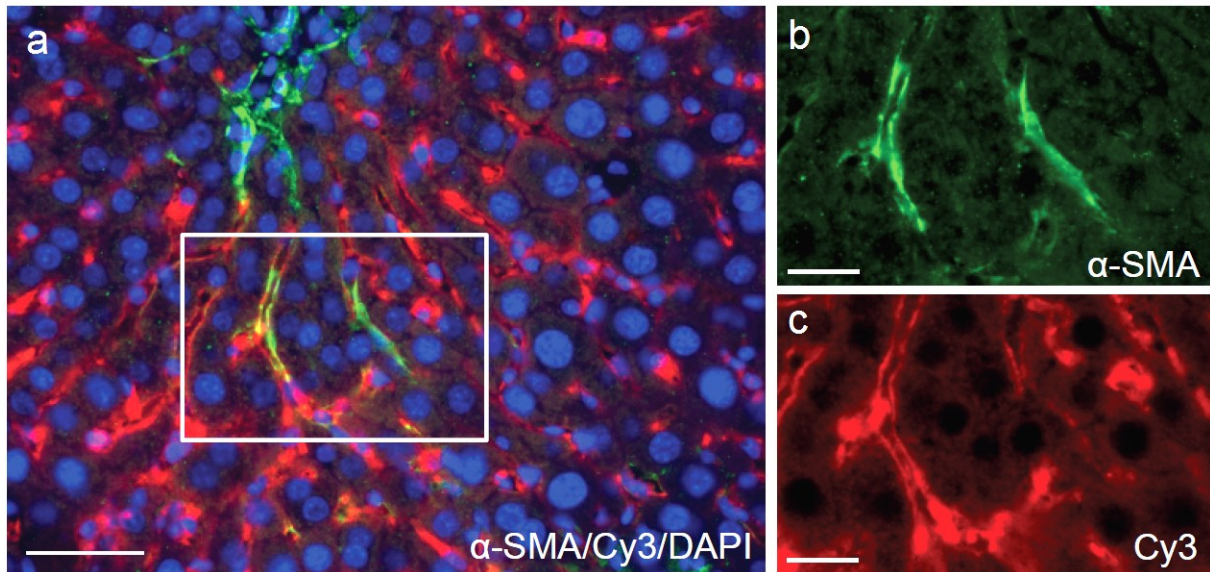


Abbildung 14: Immunfluoreszenzmikroskopie des Lebergewebes 4 h nach i.v. Injektion von Cy3-DBTC siRNA in Tieren 5 d nach BDL. a) Überlagerung der Cy3/ α -SMA/DAPI-Fluoreszenzen, Kolokalisation von markierten Lipoplexen und HSC (Rechteck – Bereich detailliert in b und c dargestellt); b) α -SMA-Fluoreszenz (grün) – HSC-Darstellung; c) Cy3-Fluoreszenz (rot) – Darstellung der markierten Lipoplexe; Balken entsprechen 50 μ m in a) und jeweils 20 μ m in b) und c).

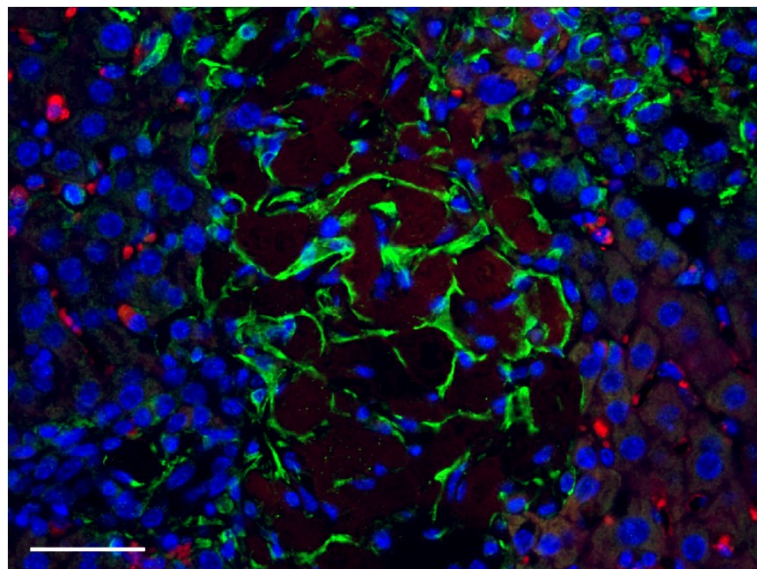


Abbildung 15: Immunfluoreszenzmikroskopie des Lebergewebes 4 h nach i.v. Injektion von Cy3-DBTC siRNA in Tieren 14 d nach BDL. Überlagerung der Einzelfluoreszenzbilder von Cy3/ α -SMA/DAPI; Balken entspricht 50 μ m; In nekrotischen Bereichen (dunkle Bereiche) ist eine verstärkte α -SMA Expression (grün) erkennbar.

5.3 Therapeutischer Ansatz mittels DBTC-Foxf1 siRNA

5.3.1 Blutbild

Zur Beurteilung möglicher Auswirkungen des Foxf1-Silencing auf die Zellreihen erfolgte die Analyse des Blutbildes. Mit Zunahme der Leberschädigung ließen sich im Verlauf nach BDL Veränderungen der Zellreihen sowie von Hämoglobin und Hämatokrit nachweisen (Tabelle 5-1).

In beiden Gruppen zeigten sich Erythrozytenzahl, Hämoglobinwert (Hb) und Hämatokrit (HKT) im Verlauf nach BDL vermindert. Der Hämoglobinwert fiel von initial 8,47 mmol/L (siFoxf1) bzw. 8,53 mmol/L (siLuci) an Tag zwei auf 7,15 mmol/L bzw. 7,10 mmol/L an Tag 14. Gleichermassen verhielt es sich in beiden Gruppen mit dem Hämatokrit (0,45 % an Tag 2 und 0,39 % an Tag 14) sowie den Erythrozytenzahlen (ca. $8,8 \cdot 10^{12}$ an Tag 2 und ca. $8,0 \cdot 10^{12}$ an Tag 14).

Die Thrombozytenzahlen ($\cdot 10^9$) fielen in beiden Gruppen nach BDL zunächst leicht ab, wobei es zum späten Zeitpunkt an Tag 14 zu einem deutlichen Anstieg kam.

Die Leukozytenzahlen ($\cdot 10^9/L$) stiegen im Verlauf in beiden Gruppen an, wobei sich hierbei der verhältnismäßig größte Anstieg der Zellreihen zeigte (Tag zwei: 5,87 [siFoxf1] / 6,32 [siLuci]), Tag 14: 16,86 [siFoxf1] / 14,91 [siLuci]).

Signifikante Unterschiede zwischen der siFoxf1- und siLuci Gruppe konnten jedoch nicht beobachtet werden, es zeigten sich lediglich geringe Unterschiede in der Thrombozyten- und Leukozytenzahl.

	Erythrozyten (*10 ¹²)	Hämoglobin (mmol/L)	Hämatokrit (%)	Thrombozyten (*10 ⁹ /L)	Leukozyten (*10 ⁹ /L)
2 d siFoxf1	8,84	8,47	0,45	835,60	5,87
2 d siLuci	8,87	8,53	0,45	901,90	6,32
5 d siFoxf1	8,04	7,53	0,40	741,14	8,63
5 d siLuci	8,44	8,03	0,43	802,00	7,03
14 d siFoxf1	8,07	7,15	0,39	1395,90	16,86
14 d siLuci	8,03	7,10	0,39	1446,22	14,91

Tabelle 5-1: Blutbild (Mittelwerte) der mit DBTC-Luci siRNA (siLuci) bzw. DBTC-Foxf1 siRNA (siFoxf1) behandelten Tiere 2, 5 und 14 d nach BDL. n = 7-12 pro Gruppe und Zeitpunkt.

5.3.2 Foxf1-Silencing

Um das Gen-Silencing durch die applizierte Foxf1 siRNA nachzuweisen, erfolgte die quantitative Bestimmung von Foxf1 mRNA im Lebergewebe mittels RT-PCR.

Während sich in der Kontrollgruppe (siLuci) kein Unterschied in der Foxf1 mRNA Expression im Verlauf nach BDL feststellen ließ, konnte in der siFoxf1-Gruppe eine signifikant geringere

Expression der Foxf1 mRNA im Vergleich zu siLuci an Tag zwei nach BDL beobachtet werden (Abbildung 16). An den Tagen fünf und 14 ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

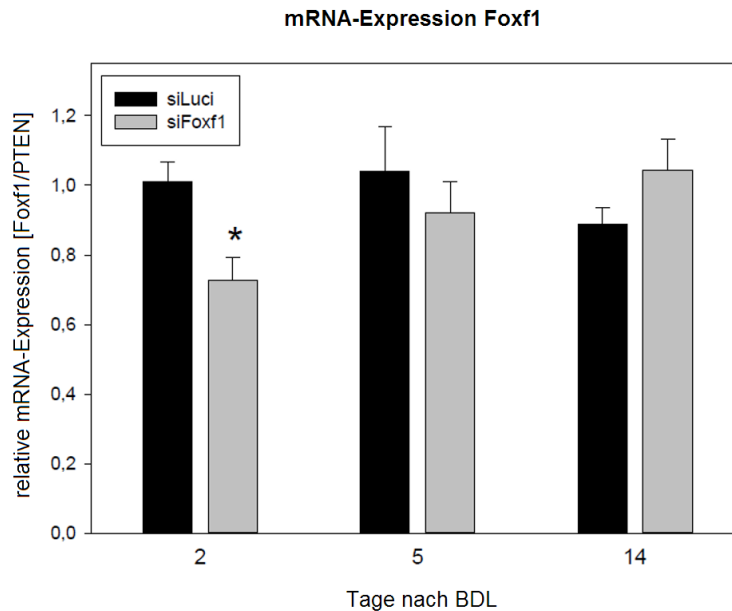


Abbildung 16: Quantitative RT-PCR-Analyse der relativen Foxf1 mRNA Expression in siLuci bzw. siFoxf1 behandelten Tieren 2, 5 und 14 d nach BDL. Mittelwert (MW) \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM); t-Test inkl. Bonferroni-Korrektur; *p < 0,05 vs. siLuci desselben Zeitpunktes; n = 7-12 pro Gruppe und Zeitpunkt.

5.3.3 Leberschaden

Zur Charakterisierung der Gewebeschädigung der Leber erfolgte die Bestimmung der Aktivitäten der Leberenzyme AST, ALT und GLDH im Blutplasma. In beiden Versuchsgruppen waren an Tag zwei sehr hohe Werte dieser Leberenzyme zu beobachten, welche im Verlauf der Erkrankung z.T. wieder stark abfielen.

Im Gegensatz dazu stieg die Konzentration von Bilirubin (total und konjugiert) und vor allem die Aktivität der ALP als Zeichen einer cholestatischen Leberschädigung über den Zeitraum von 14 d stark an. Bei allen untersuchten Parametern ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Behandlungsgruppen nachweisen (Abbildung 17).

Ergebnisse

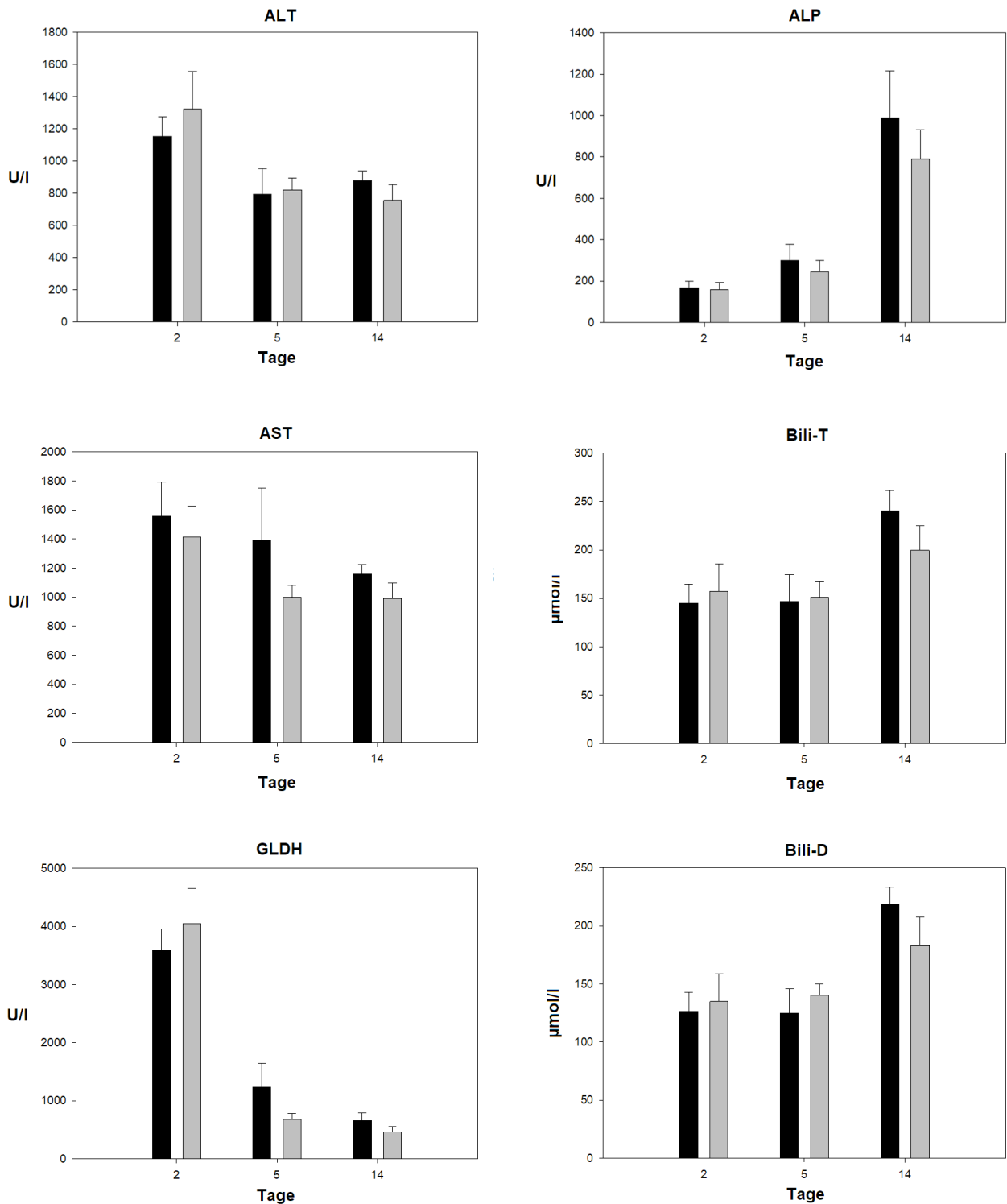


Abbildung 17: Leberschädigungsparameter von siLuci bzw. siFoxf1 behandelten Tieren 2, 5 und 14 d nach BDL. Balkenfarbe: Schwarz = siLuci; Grau = siFoxf1; MW \pm SEM; n = 7-12 pro Gruppe und Zeitpunkt.

Um das Ausmaß der hepatozytären Schädigung nach BDL und entsprechende Auswirkungen der Behandlung mit Foxf1 siRNA zu beurteilen, wurde histologisch der Anteil nekrotischer In-

farktbereiche (Abbildung 19) im Lebergewebe quantifiziert. In der Kontrollgruppe (siLuci) waren an Tag zwei und 14 nach BDL jeweils ca. 3 % des Lebergewebes nekrotisch, während an Tag fünf nur ca. 0,7 % nekrotische Fläche zu beobachten war. An den Tagen zwei und fünf war in den siFoxf1 Tieren der Anteil nekrotischer Fläche mit dem der Kontrollgruppe vergleichbar. Hingegen wies die siFoxf1-Gruppe zum späten Zeitpunkt nach BDL nur halb so viele Nekroseareale wie die Kontrollgruppe auf, was sich jedoch als nicht signifikant darstellte (Abbildung 18).

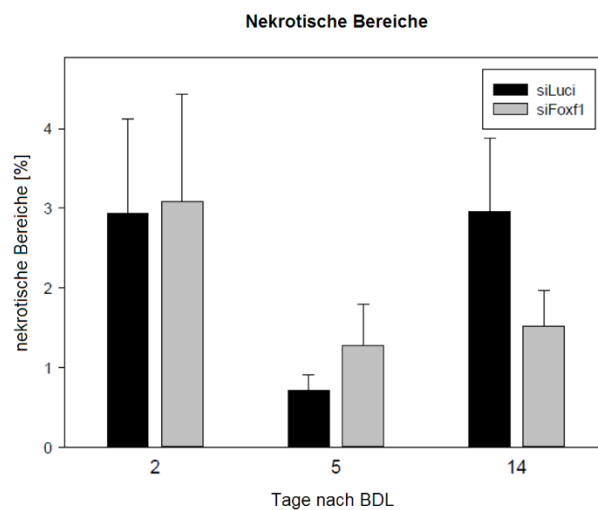


Abbildung 18: Quantitative Auswertung der nekrotischen Bereiche (Galleninfarkte) in H&E-gefärbten Leberschnitten in siLuci- und siFoxf1-behandelten Tieren 2, 5 und 14 d nach BDL. MW \pm SEM; n = 7-12 pro Gruppe und Zeitpunkt.

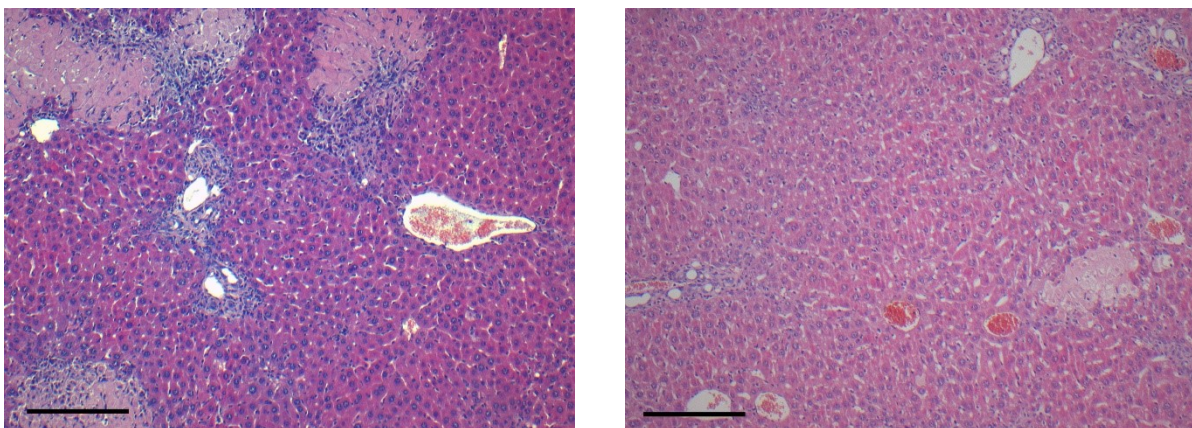


Abbildung 19: Repräsentative H&E gefärbte Leberschnitte 14 Tage nach BDL (Balken = 200 μ m). Links siLuci-, rechts siFoxf1-Gruppe. Vermindert angefärbte Zellen (leicht rosa) entsprechen nekrotischem Lebergewebe.

5.3.4 Leberfibrose

Die Beurteilung der Fibrosierung erfolgte durch die quantitative Auswertung Sirius Red-gefärbter Leberschnitte. Wie zu erwarten, nahm mit Progression der Leberschädigung die Menge an extrazellulärer Matrix zu, deutlich erkennbar an der stark erhöhten Sirius Red-positiven Fläche an Tag 14 nach BDL (Abbildung 20, 21).

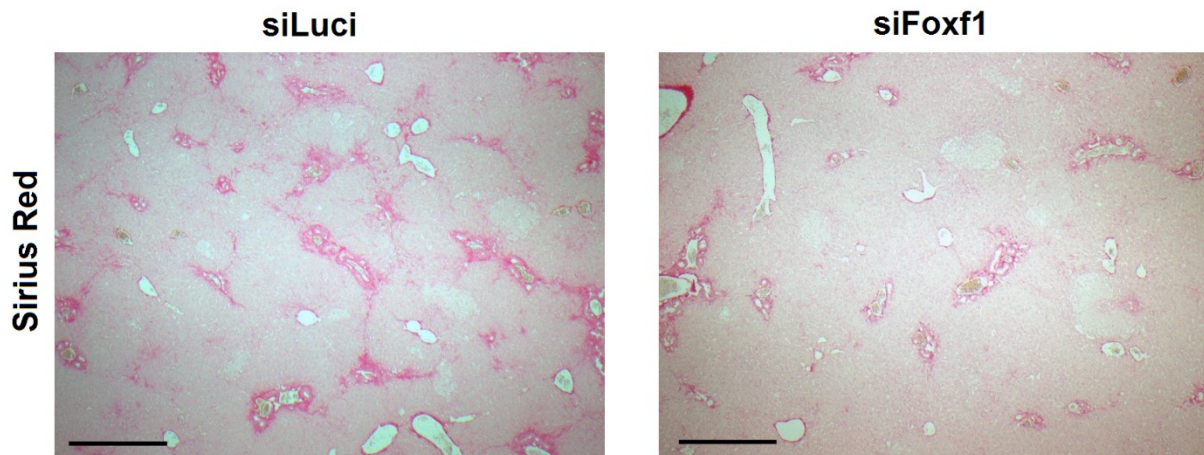


Abbildung 20: Repräsentative Sirius Red gefärbte Leberschnitte 14 Tage nach BDL. siLuci (links), siFoxf1 (rechts). Der Anteil extrazellulärer Matrix (rot angefärbt) ist deutlich geringer in der siFoxf1-Gruppe. (Balken = 500 μ m)

Interessanterweise war an Tag 14 nach BDL in den DBTC-Foxf1 siRNA behandelten Tieren die Fibrose geringer ausgeprägt als in den DBTC-Luci siRNA behandelten Tieren. Während in der Kontrollgruppe an Tag 14 ca. 3 % des Lebergewebes Sirius Red-positiv war, besaßen die siFoxf1-Therapietiere signifikant weniger Extrazellulärmatrix von nur ca. 1,8 % (Abbildung 20, 21).

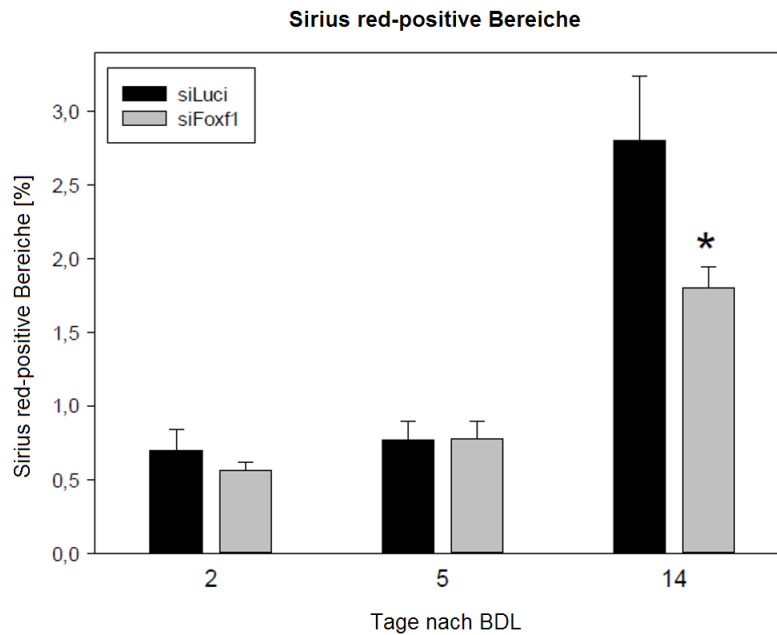


Abbildung 21: Quantitative Auswertung der fibrotischen Bereiche in der Leber nach Färbung mit Sirius Red zu verschiedenen Zeitpunkten nach BDL; MW \pm SEM; t-Test inkl. Bonferroni-Korrektur; *p < 0,05 vs. siLuci desselben Zeitpunktes; n = 7-12 pro Gruppe und Zeitpunkt.

5.3.4.1 Westernblot (α -SMA)

Die zusätzliche Analyse der hepatischen Proteinexpression des HSC-Markers α -SMA diente der näheren Charakterisierung der HSC-Aktivierung (Abbildung 22). Die Ergebnisse der Westernblot-Analyse ergaben für die Kontrollgruppe eine zunehmende Expression im Verlauf nach BDL mit fast viermal so hohen Werten an Tag 14 gegenüber Tag zwei. Zu den frühen Untersuchungszeitpunkten (Tag zwei auf Tag fünf) stiegen die Werte sowohl in der Foxf1- als auch der Kontrollgruppe auf etwa das Dreifache ohne deutlichen Unterschied zwischen den Gruppen. An Tag 14 konnte hingegen eine um die Hälfte reduzierte α -SMA Expression in der siFoxf1-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe gezeigt werden, wobei sich hierfür keine Signifikanz nachweisen ließ. Die quantitative Expression in der siFoxf1-Gruppe war an Tag 14 sogar geringer als an Tag fünf.

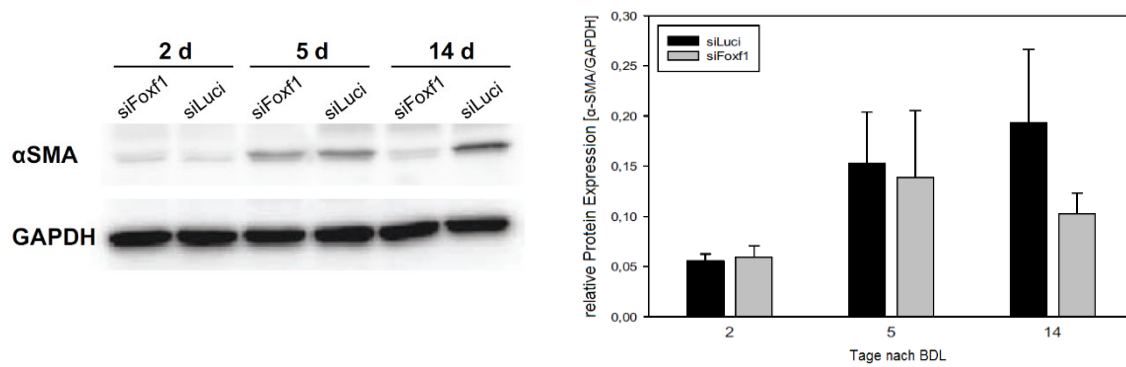


Abbildung 22: Westernblot-Analyse der hepatischen α -SMA Proteinexpression in DBTC-Foxf1 siRNA und DBTC-Luci siRNA behandelten Tieren 2, 5 und 14 d nach BDL (links) und quantitative Analyse der Proteinbanden (rechts). GAPDH wurde als Ladekontrolle sowie zur Normalisierung der Signale genutzt. MW \pm SEM; n = 7-12 pro Gruppe und Zeitpunkt.

5.3.4.2 Fluidigm

Mittels der Fluidigm Taqman RT-PCR wurde durch unseren Kooperationspartner Dr. Maria Thomas (Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für Klinische Pharmakologie in Stuttgart) die mRNA Expression von 48 verschiedenen fibrotischen Markern (siehe Abkürzungsverzeichnis) analysiert. Die Darstellung der Genexpressionsstärke erfolgte für den Mittelwert jedes Zeitpunktes und Gruppe u.a. mittels Farbdarstellung in einer „heatmap“ (Abbildung 23). So zeigten viele der Gene zu den späteren Untersuchungszeitpunkten fünf und 14 d eine erhöhte Expression, während bei anderen Genen die Expressionsstärke im Verlauf der Fibrosierung abnahm. Gene, welche u.a. an der Fibrosierung, HSC-Aktivierung und Zellkommunikation/Zellwachstum beteiligt sind, wie zum Beispiel Kollagene (Col1a1 und Col3a1), Aktin (Actb), Integrin (Itgb1), Endoglin (Eng) oder Rac Family Small GTPase 1 (Rac1) waren eher stärker exprimiert. Eine vergleichsweise geringe Expressionsstärke zeigte sich u.a. bei dem Gen für Matrix-Metalloproteinasen (Mmp10), welche im Rahmen einer HSC-Aktivierung herunterreguliert werden (3.1.5). Weiterhin zeigt sich insbesondere an Tag zwei für die meisten der 48 Gene eine geringere Expression in der siFoxf1-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auffällig war weiterhin eine an den Tagen fünf und 14 für die Mehrzahl der Gene erhöhte Expressionsstärke in der siFoxf1-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 23).

Ergebnisse

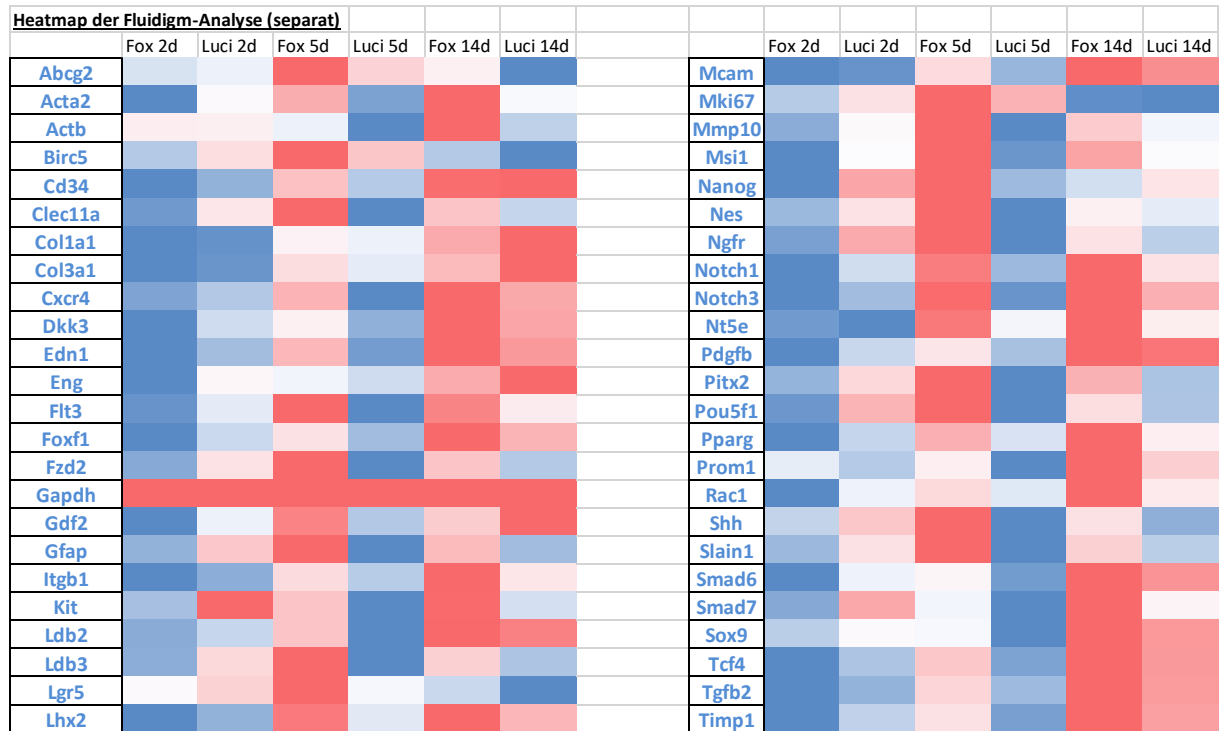


Abbildung 23: Darstellung der mRNA Expression von 48 Genen als Heatmap (Fluidigm-Analyse) in der siLuci- bzw. siFoxf1-Gruppe zu verschiedenen Zeitpunkten nach BDL. Das Farbspektrum von blau bis rot stellt separat pro Gen niedrigere Expressionen in dunkelblau und hohe Expressionen in dunkelrot dar.

Zusätzlich erfolgte die Darstellung ausgewählter Gene in Form von Balkendiagrammen (Abbildung 24). Abgebildet sind sowohl Marker für die Fibrosierung, wie Col1a1 (kodiert für Kollagen alpha-1(I) chain), Mmp10 (kodiert für Matrixmetalloproteinase-10) und Pdgfb (kodiert für Platelet-derived growth factor subunit B), als auch Marker der Aktivierung/Inhibierung der HSC wie Gfap (kodiert für Glial fibrillary acidic protein), Pparg (kodiert für Peroxisome proliferator-activated receptor gamma) und Ngfr (kodiert für Nerve growth factor receptor) (Abshagen *et al.* 2015 (b), Friedman 2008 (a), Hazra *et al.* 2004, Morini *et al.* 2005, Trim *et al.* 2000).

In der mit DBTC-Foxf1 siRNA behandelten Gruppe sind jeweils signifikant geringere Expressionen von Col1a1 (Tag 14) und Pdgfb (Tag zwei), eine erhöhte Expression von Mmp10 (Tag fünf) sowie signifikant erhöhte Expressionen von Pparg (Tage fünf und 14), Ngfr (Tag fünf) und Gfap (Tag fünf) erkennbar (Abbildung 24).

Während die Col1a1 mRNA Expression in der Kontrollgruppe über den gesamten Beobachtungszeitraum stetig anstieg, konnte dies in der siFoxf1-Gruppe nicht beobachtet werden. So war in der siFoxf1-Gruppe an Tag 14 nach BDL die mRNA Expression für Col1a1 signifikant geringer als in der siLuci-Gruppe (Abbildung 24 a).

Die mRNA Expression von Pparg zeigte sich in der Kontrollgruppe im Verlauf allenfalls leicht ansteigend, während bei siFoxf1 ein deutlicher Anstieg der Expression an den Tagen fünf und 14 mit jeweils signifikantem Unterschied zu siLuci nachweisbar war (Abbildung 24 b).

Bezüglich der Analyse von Mmp10, Ngfr und Gfap lässt sich in der Kontrollgruppe kein wesentlicher Unterschied in der Expression zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten erkennen, wobei diese im Verlauf für Mmp10 tendenziell zu- und für Ngfr und Gfap eher abnimmt. In der Therapiegruppe konnten hingegen für Mmp10, Ngfr und Gfap deutlich vermehrte Expressionen an den Tagen fünf und 14 nachgewiesen werden, wobei sich jeweils an Tag fünf die stärkste Expression mit signifikantem Unterschied zur Kontrollgruppe ergab (Abbildung 24 c, d, e).

Die Pdgfb Expression stieg im Verlauf von Tag fünf auf 14 in beiden Gruppen an, wobei zum frühen Zeitpunkt nach BDL an Tag zwei gegenüber siLuci eine signifikant verminderte Expression von Pdgfb in der siFoxf1-Gruppe gemessen werden konnte (Abbildung 24 f).

Ergebnisse

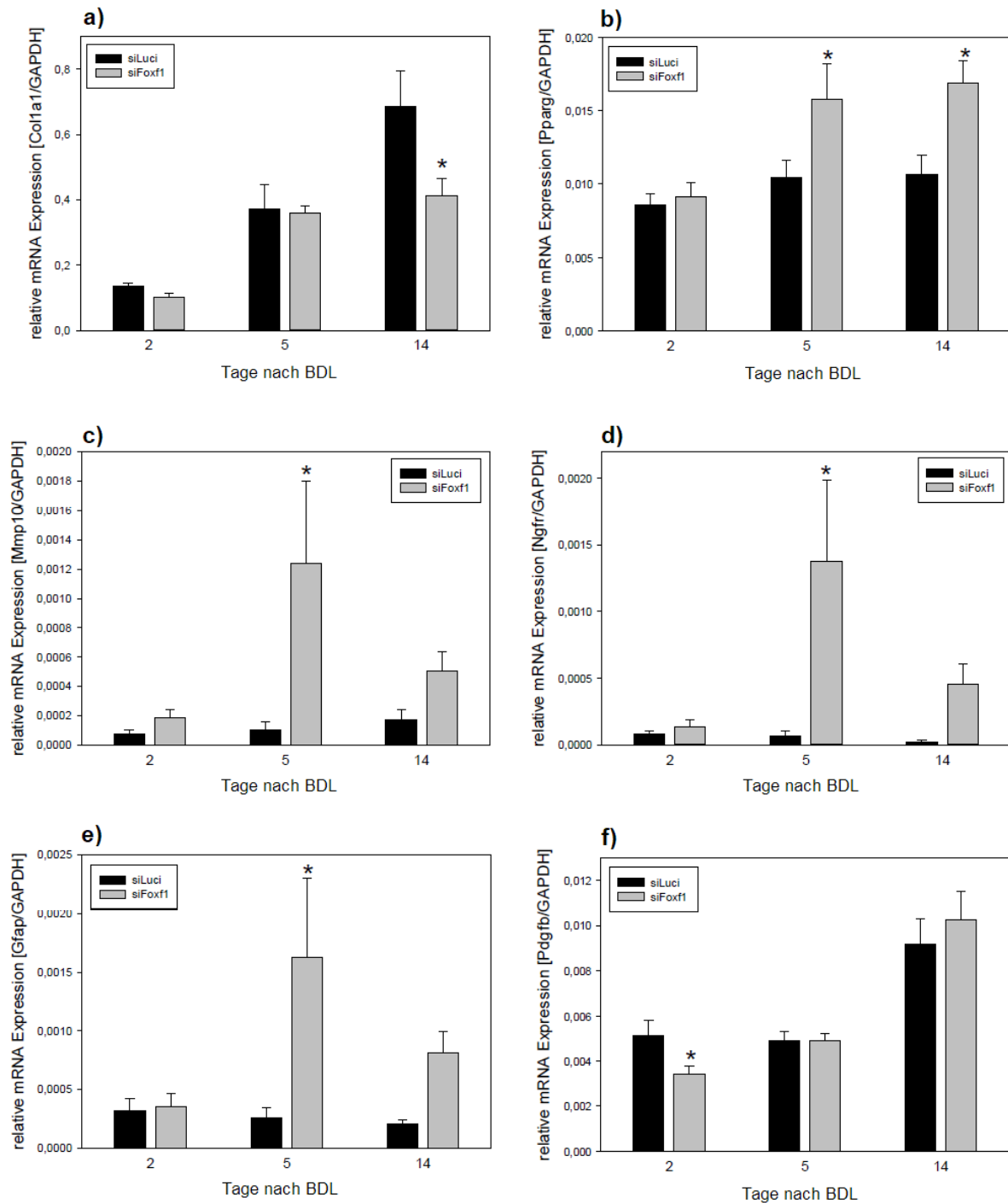


Abbildung 24: Quantitative Analyse der mRNA Expression ausgewählter Gene der siFoxf1- bzw. siLuci-Gruppen zu verschiedenen Zeitpunkten nach BDL mittels Fluidigm Taqman RT-PCR. z.T. Mittelwerte aus 3 Messungen. MW \pm SEM; t-Test inkl. Bonferroni-Korrektur; * $p < 0,05$ vs. siLuci desselben Zeitpunktes; $n = 7-12$ pro Gruppe und Zeitpunkt

5.4 Mortalitätsstatistik

Um zu überprüfen, ob sich die antifibrotischen Effekte der DBTC-Foxf1 siRNA auch auf die Sterblichkeit nach BDL auswirken, wurde zum Ende des Projektes eine Mortalitätsstudie über einen Beobachtungszeitraum von 49 Tagen durchgeführt. Die Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mittels Kaplan-Maier-Überlebenskurven in Sigmaplot. Bei beginnender gleicher Sterblichkeit in beiden Gruppen, kam es im Verlauf zur Divergenz der Überlebenskurven (Abbildung 25). In der mit Foxf1 siRNA-behandelten Gruppe verstarben die Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe insgesamt nach einer kürzeren Zeitspanne nach BDL. Nach 46 Tagen waren alle Tiere der Foxf1 siRNA-Gruppe verstorben, während in der Kontrollgruppe vier Tiere bis zu diesem Zeitpunkt überlebt hatten. Nach 49 Tagen war kein weiterer Datengewinn zu erwarten, sodass die Tötung von zwei verbliebenden Tieren der Kontrollgruppe, auch zur Linderung des Leidens der Mäuse, erfolgte und diese entsprechend als Zensur gelistet wurden. Eine sichere Aussage zu einem positiven oder negativen Effekt der Foxf1 siRNA auf das Überleben lässt sich aufgrund fehlender Signifikanz ($p = 0,09$) jedoch nicht treffen. Es ist anzumerken, dass in den ersten vier Tagen nach BDL mit jeweils vier Mäusen pro Gruppe verhältnismäßig viele Tiere im Vergleich zu den zuvor durchgeführten Versuchen nach BDL verstarben.

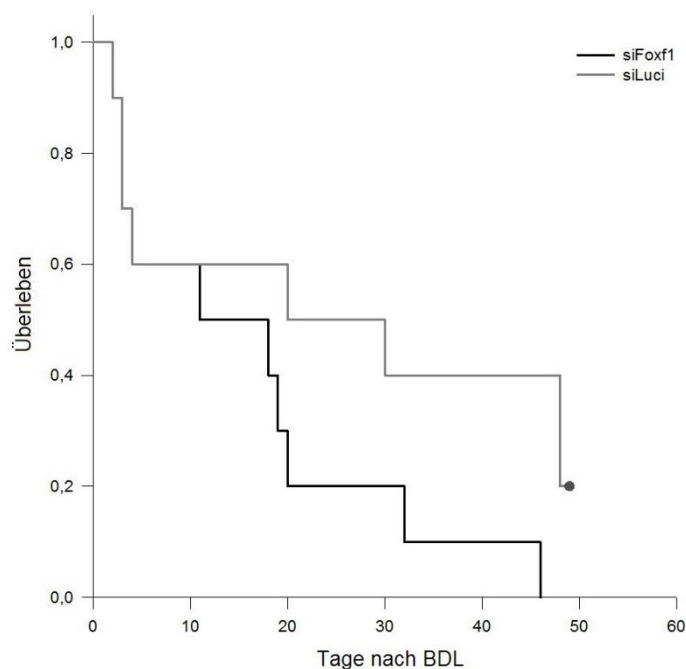


Abbildung 25: Kaplan-Maier Überlebenskurven der siFoxf1- bzw. siLuci-behandelten Tiere nach BDL über einen Zeitraum von 49 Tagen. n = 10 pro Gruppe; Zensur des Ereignisses durch Tötung (●).

6 Diskussion

6.1 Diskussion von Material und Methoden

Erkrankungen der Leber stellen ein hoch relevantes gesundheitliches Problem mit gravierenden Auswirkungen für die Betroffenen dar. Aufgrund der häufig jahrelangen und komplikationsreichen Verläufe ist außerdem ein mit diesen Krankheitsbildern verbundener, für das Gesundheitssystem relevanter, finanzieller Aspekt zu beachten. Für das Jahr 2015 gab das statistische Bundesamt für „Krankheiten der Leber“ Kosten für Deutschland in Höhe von 1,045 Milliarden Euro an (Statistisches Bundesamt 2019 (c)).

Die therapeutischen Optionen orientieren sich zum aktuellen Zeitpunkt vor allem an der Ursachenbekämpfung, wie dem Eliminieren einer externen Noxe, zum Beispiel Abstinenz bei alkoholinduzierter Leberschädigung oder der Eradikation von leberschädigenden Erregern, zum Beispiel antivirale Medikation bei Hepatitis-Viren (Weiskirchen *et al.* 2018). Als *Ultima Ratio* bleibt nur die Organtransplantation, für die jedoch strenge Regelungen existieren. Beispielsweise ist bei alkoholinduzierter Leberschädigung schon für die Aufnahme auf die Warteliste unter anderem eine völlige Alkoholabstinenz von mindestens 6 Monaten nachzuweisen (Bundesärztekammer 2017). Supportive Medikationen bezüglich des fortschreitenden Leberschadens und der Fibrosierung sind Gegenstand zahlreicher experimenteller und auch zum Teil klinischer Studien (Yoon *et al.* 2016). Da bisher keine antifibrotische Therapie erfolgreich in der Praxis etabliert werden konnte (Fallowfield 2015, Yoon *et al.* 2016), ist es wichtig, die Erforschung neuer Methoden zur Therapie von Lebererkrankungen voranzutreiben, um die therapeutischen Optionen zu verbessern und zu erweitern. Hierbei liegt der Fokus weiterhin auf den HSC, welche eine zentrale Funktion während der Fibrogenese einnehmen (Bansal und Chamroonkul 2019).

Auch wenn viele der antifibrotischen Studien vielversprechende Ergebnisse an (primären) HSC *in vitro* erzielten, so sind die Effekte *in vivo* häufig deutlich geringer ausgeprägt oder gar nicht zu beobachten. Durch *in vitro*-Modelle können molekulare Prozesse im Rahmen der Aktivierung der HSC gut reproduziert und mögliche therapeutische Optionen getestet werden. Hierbei kann zwischen primären und immortalisierten HSC unterschieden werden (Herrmann *et al.* 2007). Primäre HSC werden in der Regel aus lebenden Nagetieren isoliert und spiegeln die *in vivo* Bedingungen relativ gut wider. Auf einer Plastikoberfläche kultiviert, kommt es zur Aktivierung der primären HSC und zur Differenzierung zu ECM-produzierenden Myofibroblasten. Primäre HSC sind jedoch auch material- und kostenaufwändig und weisen nach Aktivierung eine begrenzte Lebensdauer auf (Herrmann *et al.* 2007, Yanguas *et al.* 2015). Immortalisierte Zelllinien stammen von Nagetieren oder Menschen, können unbegrenzt reproduziert werden und resultieren daher in einer geringeren Notwendigkeit für tierexperimentelle Modelle.

Für dynamische Prozesse wie Aktivierung und Differenzierung zu Myofibroblasten sind diese Zellreihen jedoch nicht geeignet (Herrmann *et al.* 2007). Weiterhin ist der menschliche Organismus in seiner Komplexität und dem Zusammenspiel von unterschiedlichen Geweben und Organsystemen, Kreisläufen und Signalkaskaden in einem *in vitro* Modell nicht adäquat nachzustellen. Substanzspezifische Eigenschaften wie Aufnahme, Halbwertszeiten oder Nebenwirkungen können daher nur *in vivo* sinnvoll analysiert werden, weshalb wir uns in dieser Arbeit für Studien an Versuchstieren entschieden.

Die Induktion einer Leberfibrose kann *in vivo* durch verschiedene Methoden erfolgen. Es werden hierbei chemische, nutritive und chirurgische Verfahren unterschieden. Bei chemischen Verfahren wird durch die intraperitoneale Gabe hepatotoxischer Substanzen eine Leberschädigung hervorgerufen. Beispiele hierfür sind Tetrachlorkohlenstoff (CCl₄), Thioacetamid oder Dimethylnitrosamin (DMN) und Diethylnitrosamin (DEN), welche alle in einer Leberfibrose und -zirrhose resultieren (Yanguas *et al.* 2015).

Am häufigsten wird hiervon das CCl₄-Modell angewandt, wobei in der Literatur dosis- und applikationsabhängig nach bis zu 18 Wochen der Nachweis von Leberzirrhose beschrieben wird (Marques *et al.* 2012). Es kann auch Alkohol als hepatotoxische Substanz im Tiermodell angewendet werden. Das Problem hierbei ist jedoch, dass Nagetiere nicht freiwillig Alkohol trinken und die menschliche alkoholische Lebererkrankung (ALD) nicht komplett nachempfunden werden kann, da Fibrorestadien ausbleiben (Yanguas *et al.* 2015).

In nutritiven/Diät-basierten Modellen wird bei Nagetieren eine nichtalkoholische Steatohepatitis (NASH) induziert. Hierzu zählen unter anderem die Methionin- und Cholin-defiziente Diät (MCD) und die high fat (HF) Diät. Fibrorestadien können hierbei erst relativ spät nach ca. 8-16 Wochen (MCD) bzw. 50 Wochen (HF) erreicht werden. Weiterhin unterscheiden sich die Bedingungen von humaner NASH durch beispielsweise das Fehlen einer Insulinresistenz und Adipositas bei MCD (Yanguas *et al.* 2015).

Die chirurgische Option stellt die hier beschriebene BDL mit Induktion einer cholestatischen Leberfibrose dar. Vorteil dieser Methode ist die verhältnismäßig kurze Zeit (1-4 Wochen) bis zur Ausprägung einer Zirrhose (Marques *et al.* 2012) bzw. Nachweis periportal/perisinusoidaler Fibrosierung nach 7-10 Tagen (Tag *et al.* 2015). Aufgrund der hohen Reproduzierbarkeit und der verhältnismäßig kurzen Dauer bis zum Erreichen der Leberfibrose/Zirrhose eignet sich die BDL vor allem für therapeutische Studien. Die durch BDL hervorgerufene Leberschädigung ist sehr ausgeprägt und nach Durchtrennen des Ductus choledochus nicht reversibel. Auch wenn die Art der Ursache durch Cholestase durchaus auf die humane Pathogenese (Gallensteine, Tumoren etc.) überführbar ist, ist dieses Modell vom klinischen Alltag zu differenzieren, bei dem die Eliminierung der Noxe, sofern möglich, häufig eine wichtige Therapiegrundlage darstellt. So kann beispielsweise bei einer cholestatischen Leberschädigung aufgrund von

Choledocholithiasis durch eine Steinextraktion im Rahmen einer ERCP die Abflussstörung behoben und die Noxe „Gallensäuren“ entfernt werden. In dem hier verwendeten BDL-Modell ist eine Eliminierung der Noxe jedoch nicht möglich, sodass die Leberschädigung stetig zunimmt. Auch ist die Ausbildung einer Leberzirrhose beim Menschen in der Regel langsam progredient und entsteht über Monate bis Jahre, im Gegensatz zu wenigen Tagen bis Wochen in den murinen Modellen. Dies gilt es bei der vergleichenden Projektion dieses Verfahrens und dessen Ergebnisse auf die humane Situation zu beachten. Eine mögliche Alternative, den Gallengang lediglich abzubinden und nicht zu durchtrennen, würde in der Praxis kein valides Ergebnis bringen, da sich der Knoten unbemerkt lösen könnte und der Abfluss wiederhergestellt wäre. Die Durchtrennung des Gallenganges in diesem Modell stellt daher eine sichere Variante der Schädigung dar, bei der die Irreversibilität des Eingriffes in Kauf genommen werden muss. Das BDL-Modell zur Induktion einer cholestatischen Leberfibrose ist gut etabliert und wird weltweit genutzt (Marques *et al.* 2006 und 2012, Tag *et al.* 2015). Insbesondere für die Durchführung des Verfahrens an Mäusen gibt es auch in der Experimentellen Chirurgie der Universität Rostock langjährige Erfahrungen (Sigal *et al.* 2010, Eipel *et al.* 2013, Abshagen *et al.* 2015 (a, b, c)).

Nachteilig wird jedoch häufig auf die verhältnismäßig hohe Mortalität dieses Modells durch Infektionen, Gallenleckagen oder Ruptur von Gallenwegen bzw. Gallenblase hingewiesen (Chang *et al.* 2005, Tag *et al.* 2015, Yanguas *et al.* 2015). Dies konnte auch in unserer Arbeit beobachtet werden, bei Verdacht auf gallige Peritonitis in einigen Obduktionen vorzeitig verstorbener Tiere. Weiterhin besteht eine hohe Variabilität in der Sterblichkeit nach totaler Gallengangsligatur: Aoki *et al.* (2016) beschrieben 70 % innerhalb einer Woche, wobei Tag *et al.* (2015) eine Mortalität von nur 5 % (bis zu 60 Tage nach BDL) beobachteten. In unserer Arbeit ergab sich in der Mortalitätsstudie innerhalb von sieben Tagen eine Sterblichkeit von 40 % (5.4). Dies liegt generell in dem in der Literatur beschriebenen Bereich, wobei anzumerken ist, dass durch die rezidivierenden Injektionen mit jeweils notwendigen Narkosen der zunehmend geschwächten Tiere eine Erhöhung der Mortalität nicht ausgeschlossen werden kann. Auch ist die Leberschädigung durch die BDL als sehr heterogen anzusehen, da die Gallenblase bei dieser Methode *in situ* belassen wird. So beschrieben Starkel und Leclercq (2011) in einer Übersichtsarbeit, dass durch eine interindividuell sehr große Variation der Gallenblasendilatation eine unterschiedlich ausgeprägte Gewebeschädigung resultieren kann. Weiterhin kann auch die Ausbildung eines Bilioperitoneums nach Gallenblasenperforation zu einem letalen Ausgang führen (Starkel und Leclercq 2011).

Aus der Notwendigkeit für *in vivo*-Studien ergeben sich äquivalent zum klinischen Alltag jedoch auch erhöhte Anforderungen an eine mögliche therapeutische Substanz. So wird die leberspezifische bzw. HSC-spezifische Aufnahme durch eine gestörte Mikrozirkulation (Friedman

2008 (a)), die akkumulierende ECM mit verminderter endothelialer Fensterung und den reduzierten Disse-Raum (Chen *et al.* 2019) beeinträchtigt. Folglich notwendige Dosiserhöhungen zum Erreichen einer adäquaten Wirkung gehen in der Regel auch mit vermehrtem Einfluss auf umgebende Zellen und Organe einher und erhöhen somit das Risiko für Nebenwirkungen. Diese systemischen Effekte können Hindernisse für klinische Studien bei zuvor vielversprechenden experimentellen Ansätzen darstellen. So wurden beispielsweise *in vitro* und *in vivo* erfolgreich antifibrotisch getestete monoklonale Antikörper gegen TGF- β aufgrund von Sicherheitsbedenken wegen möglicher Tumorinduktion bei systemischer TGF- β -Inhibierung bisher nicht in klinischen Studien angewandt (Bansal und Chamroonkul 2019). Auch der Rho-associated protein kinase (ROCK)-Inhibitor Y-27632, welcher *in vivo* eine Inhibierung von HSC sowie Reduktion von Leberfibrose zeigte (Murata 2001), kann als systemische Nebenwirkung eine schwere Hypotension verursachen (Hennenberg 2006), wodurch der klinische Nutzen limitiert wird (Bansal und Chamroonkul 2019). Daher ist zur Maximierung der therapeutischen Effizienz bei gleichzeitiger Reduktion von Nebenwirkungen die Etablierung zellspezifischer Delivery-Systeme in der Entwicklung therapeutischer Optionen dringend notwendig.

Um systemische Effekte zu minimieren und eine auf die Leber begrenzte Expression/Inhibition oder auch Modulation von Genen zu erreichen, kann ein Gentransfer über virale und nicht-virale Vektoren erfolgen. Dabei stellen virale Vektoren die aktuell am häufigsten genutzten Verfahren zum Gen-Transfer bei lebenden Organismen dar (Salazar-Montes *et al.* 2015). Im Rahmen von Studien zum leberspezifischen Targeting wurden bereits Adenoviren, adenoassoziierte Dependoparvoviren (AAD), Lentiviren, Papovaviren oder Hepatitis-B-Viren eingesetzt (Salazar-Montes *et al.* 2015). Arias *et al.* (2003) konnten beispielsweise über adenovirale Transduktion eines Transgens für TGF- β 1 antisense mRNA eine Reduktion der TGF- β -Synthese und der Fibrogenese *in vitro* sowie eine Verhinderung der α -SMA- und Kollagenproduktion bei BDL-induzierter Leberfibrose an Ratten erzielen. Durch AAD-vermittelte Produktion von Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF) erreichten Suzumura *et al.* (2008) eine Milderung der Leberfibrose sowie Suppression der HSC im CCl₄- und BDL-Modell bei Mäusen. Die Nutzung viraler Vektoren ist jedoch nicht risikofrei. Eine potentielle Gefahr der Gentransduktion stellt die Integration in das Genom mit Mutationen und möglichen kanzerogenen Folgen dar (Salazar-Montes *et al.* 2015). In klinischen Studien kam es unter der Behandlung mit viralen Vektoren zur Genotoxizität mit Auftreten von T-Zell-Leukämie oder Myelodysplasie (David und Doherty 2017). Obwohl es verschiedene Ansätze zur Reduktion der Toxizität, beispielsweise durch zellspezifische Promotoren, Suppression viraler Gene durch spezielle miRNA (Gürlevic *et al.* 2009) oder durch Nutzung von Chromatin-Isolatoren (Emery 2011) gibt, besteht immer ein Restrisiko, auch aufgrund nicht beeinflussbarer Faktoren wie dem Krankheitsstadium des Patienten oder Eigenschaften des jeweiligen Transgens (David und Doherty 2017).

Neben den viralen Vektoren stellen unter anderem DNA-Plasmide, Polyplexe oder Lipoplexe die Gruppe der nicht-viralen Vektoren dar (Salazar-Montes *et al.* 2015). Generell besteht auch die Möglichkeit „nackte“ siRNA ohne Transportsystem zu applizieren (Santel *et al.* 2006), jedoch wird diese auf dem Weg zur Zielzelle von Nukleasen angegriffen und renal eliminiert. Durch Modifikationen an Zuckerresten, wie dem Austausch von 2'-Hydroxy- mit 2'-Fluor- oder 2'-Methyl-Gruppen, konnte die Halbwertszeit verlängert bzw. die Thermostabilität von siRNA verbessert werden (Badrealam *et al.* 2015). Um eine vergleichbare zelluläre Aufnahme der nackten siRNA wie bei Applikation von siRNA in Transportsystemen zu erhalten, war bei Santel *et al.* (2006) jedoch eine 1000-fache Menge von siRNA notwendig. Weiterhin wurde gezeigt, dass ein Großteil der nackten siRNA intrazellulär in endosomalen/lysosomalen Vesikeln eingeschlossen bleibt, wohingegen Lipoplexe diese Vesikel wieder verlassen können (Santel *et al.* 2006). In dieser Arbeit wurde daher mit den DBTC-Komplexen ein leberspezifisches, Lipid-basiertes Deliverysystem für therapeutische siRNA verwendet (Silence Therapeutics GmbH, Berlin). Durch die Leberspezifität dieser Lipoplexe (3.2) werden systemische Effekte bzw. Nebenwirkungen in anderen Organen reduziert und eine auf die Leber begrenzte Genmodulation erreicht. Durch Auswahl des Zielgens *Foxf1*, welches nur in HSC exprimiert wird (3.1.6), ist die Genmodulation auf die HSC begrenzt. Eine zusätzliche PEGylierung der Lipoplexe dient der Stabilität und Reduktion systemischer Effekte. Polyethylenglykol ist ein synthetisches, wasserlösliches und inertes Polymer mit vielfältigen Anwendungsgebieten. So kommt es unter anderem in Zahnpasta, Haarwaschmittel oder auch im klinischen Alltag als Laxans (Macrogol) zum Einsatz. In der Pharmazie kann die Modifizierung von Arzneimitteln mit PEG beispielsweise eine Verlängerung der Halbwertszeit, erhöhte Wasserlöslichkeit und verminderte Inaktivierung durch Proteolyse bewirken (Turecek *et al.* 2016). Es wird vermutet, dass kationische Lipoplexe mit negativ geladenen Proteinen und anderen Strukturen im Serum interagieren und es konnte gezeigt werden, dass bei Mäusen nach intravenöser Applikation von Lipoplexen ohne PEG ein Gewichtsverlust eintrat, wohingegen PEGylierte Lipoplexe keinen Einfluss auf das Gewicht der Tiere hatten (Santel *et al.* 2006).

Mittels *in vivo* Fluoreszenzmikroskopie wurde die intrahepatische Verteilung der DBTC-Lipoplexe in gesunden und fibrotischen Lebern analysiert. Nach intravenöser Applikation von Cy3-markierten Lipoplexen konnte anhand der Vitamin A-Kolokalisation gezeigt werden, dass sich die DBTC-Formulierungen im Bereich der Sinusoide und der HSC nachweisen lassen und somit ein erfolgreiches HSC-Targeting detektiert wurde (5.2.1). Dies konnte auch *ex vivo* durch Immunfluoreszenzmikroskopie verifiziert werden (5.2.2). Gleichzeitig schienen aufgrund des Musters der Fluoreszenzsignale entlang der Sinusoide vor allem nichtparenchymale Zellen die Lipoplexe aufgenommen zu haben. Es ergaben sich jedoch nicht immer eindeutige Kolokalisationen von DBTC-Cy3 siRNA mit dem Vitamin A der HSC. Kupferzellen sind als Phagozyten

der Leber bekannt dafür, große Partikel wie Liposome aufzunehmen (Schroeder *et al.* 2010) und auch für PEGylierte Proteine und PEG selbst wurde eine Phagozytose durch Makrophagen nachgewiesen (Turecek *et al.* 2016). Zahlreiche Fluoreszenz-Signale im Bereich der Sinusoide lassen daher darauf schließen, dass ein großer Teil der Lipoplexe von den dort lokalisierten Kupferzellen phagozytiert wurde. Weiterhin konnten mit der Vitamin A-Autofluoreszenz lediglich die Vitamin A-Einschlüsse und wahrscheinlich nicht der gesamte Zellkörper der HSC mit ihren langen Ausläufern (Friedman 2008 (b)) in vollem Umfang dargestellt werden. Daher ist denkbar, dass auch nahe beieinanderliegende Signale von Vitamin A und Cy3 dieselbe Zelle markierten und somit auf eine erfolgreiche HSC-Transfektion hindeuteten.

Es ist bekannt, dass es mit fortschreitender Leberschädigung zu einer verminderten Durchblutung mit Mikrozirkulationsstörungen sowie einem erhöhten vaskulären Widerstand durch die Wirkung von Vasokonstriktoren und eine verminderte Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) kommt (Friedman 2008 (a); Garbuzenko *et al.* 2016). Dies ließ sich auch in der IVM erkennen, weshalb mit zunehmender Parenchymschädigung nach BDL deutlich weniger Lipoplexe in die Leber gelangen konnten. Die verminderte Aufnahme von DBTC-Komplexen in fibrotischen Lebern wurde in unserer Arbeitsgruppe in weiteren Untersuchungen quantifiziert. Während in gesunden Lebern eine totale Fläche der hepatischen Cy3-Fluoreszenz von 30.6 % analysiert wurde, zeigten fibrotische Lebern an Tag fünf nach BDL nur 6.3 % Cy3-positive Fläche. Zusätzliche *in vitro* Untersuchungen in primären HSC und der Zelllinie LX-2 zeigten eine effektive intrazelluläre Aufnahme der DBTC-Formulierungen in kultivierten HSC (Abshagen *et al.* 2015 (b)).

6.2 Diskussion der Ergebnisse

Aktuelle antifibrotische Therapieansätze können nach Yoon *et al.* (2016) in vier Bereiche eingeteilt werden:

- (1) Eliminierung oder Kontrolle der zugrundeliegenden Erkrankung
- (2) Antagonisierende Rezeptor-Liganden-Interaktionen und intrazelluläre Signalübertragung
- (3) Inhibierung der Fibrogenese
- (4) Förderung der Resolution der Fibrose

Der in dieser Studie untersuchte Therapieansatz durch Gen-Modulation von Foxf1 kann in die zweite Gruppe von Yoon *et al.* eingeordnet werden, mit möglichen Auswirkungen auf Prozesse der Gruppen drei und vier. Da die Aktivierung der HSC eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Leberfibrose einnimmt, stellt die Modulation von HSC-beeinflussenden Faktoren einen wesentlichen Aspekt in der Erforschung neuer antifibrotischer Therapien dar. Aufgrund der komplexen Aktivierungskaskade der HSC lassen sich verschiedenste antifibrotische Ansatzpunkte

ableiten (Tsuchida und Friedman 2017, Tacke und Weiskirchen 2018). Um in die Interaktion HSC-aktivierender Signalwege einzugreifen, wurden bisher verschiedene Ansätze verfolgt. So konnten beispielsweise mittels Antagonismus durch lösliche Rezeptoren (George *et al.* 1999, Borkham-Kamphorst 2004), Rezeptor-Interaktion über PDGF-Tyrosin-Kinase-Inhibierung (Gonzalo *et al.* 2007) oder Antagonismus per Protease Inhibitoren (Okuno *et al.* 2001) antifibrotische Ergebnisse erzielt werden. Die Möglichkeit der genetischen Interaktion (Arias *et al.* 2003, Lang *et al.* 2011) eröffnet hierbei, auch aufgrund der wachsenden Kenntnis über HSC-aktivierende Transkriptionsfaktoren (Friedman 2008 (b)), interessante Möglichkeiten.

Die Idee, Foxf1 als Zielgen für eine direkte Modulation der HSC-Aktivierung auszuwählen, basiert auf der von Kalinichenko *et al.* (2003) veröffentlichten Studie zu Foxf1. Kalinichenko *et al.* beschrieben Foxf1 als relevanten Faktor für Aktivierung und Proliferation der HSC, da Foxf1-haploinsuffiziente Mäuse (Foxf1^{+/-}) nach CCl₄-induzierter Leberschädigung eine geringere HSC-Aktivierung aufwiesen als der Wildtyp. Hingegen zeigten die Foxf1^{+/-} Tiere nach CCl₄-Applikation histologisch ausgeprägtere Lebernekrosen sowie vermehrt apoptotische Hepatozyten. Die geringere HSC-Aktivierung der Foxf1^{+/-} Mäuse gegenüber dem Wildtyp wurde weiterhin durch eine geringere Expression von Kollagen Typ I und α -SMA untermauert (Kalinichenko *et al.* 2003). Bei den Wildtyp-Tieren kam es jedoch zur vollständigen Regeneration des Lebergewebes, wohingegen die Foxf1^{+/-} Tiere Tag drei nicht überlebten. Die Sichtweise der HSC-Aktivierung im Rahmen der Regeneration erscheint zunächst kontrovers zu dem in dieser Arbeit untersuchten Ansatz, eine geringere Leberschädigung durch verminderte HSC-Aktivierung zu erreichen. Jedoch ist die Aktivierung der HSC sowohl an der Fibrosierung mit einhergehendem Leberschaden als auch an der Regeneration des Lebergewebes, insbesondere nach Weglassen des schädigenden Einflusses, beteiligt. Da die BDL jedoch wie bereits erwähnt zu kontinuierlich fortschreitender Schädigung führt, war die regenerative Funktion der HSC für uns von geringerer Bedeutung. Einen weiteren Grund für die Auswahl von Foxf1 als Zielgen stellte die bereits genannte Begrenzung der hepatischen Expression von Foxf1 auf die HSC dar (3.1.6), wodurch sich, in Zusammenhang mit den leberspezifischen DBTC-Komplexen die gewünschte Zellspezifität erreichen ließ.

Mithilfe des DBTC-siFoxf1 Systems konnte sowohl *in vivo* als auch *in vitro* (Abshagen 2015 (b)) ein signifikanter Knockdown der Foxf1 mRNA erzielt werden. Dies war nach systemischer Gabe in den BDL Tieren an Tag zwei zu beobachten, ließ sich jedoch an den Tagen fünf und 14 nach BDL nicht nachweisen. Aufgrund der oben genannten Ursachen, wie Mikrozirkulationsstörungen im fibrotischen Lebergewebe (Friedman 2008 (a), Garbuzenko *et al.* 2016) und dem damit einhergehenden schlechteren Delivery der Lipoplexe, ist eine reduzierte Wirksamkeit der siRNA bei zunehmender Leberschädigung denkbar. So konnte in einer anderen Studie unserer Arbeitsgruppe im Modell der chronischen CCl₄-Schädigung die Foxf1 Expression trotz

repetitiver Gabe der DBTC-Foxf1 siRNA zum Zeitpunkt einer etablierten Leberfibrose auch nicht beeinflusst werden (Abshagen *et al.* 2017). Weiterhin beschrieben Kalinichenko *et al.* (2003) für die Foxf1-haploinsuffizienten Mäuse eine kompensatorisch erhöhte Expression von Foxf1 in Leber und Lunge. Im Rahmen der Regeneration nach Schädigung sanken beim Wildtyp die Proteinlevel von Foxf1, wohingegen sie bei den haploinsuffizienten Tieren leicht anstiegen (Kalinichenko *et al.* 2003). Es kann daher vermutet werden, dass es in den mit Foxf1 siRNA-behandelten Tieren über die Zeit ebenfalls zu einer kompensatorischen Steigerung der Foxf1 Expression kam.

Interessanterweise resultierte der Foxf1 mRNA Knockdown an Tag zwei nach BDL in einer deutlich verminderten Aktivierung von HSC. Hinweisend hierfür war unter anderem die reduzierte Expression des HSC-Aktivierungsmarkers α -SMA an Tag 14 nach BDL. α -SMA gilt als klassischer und zuverlässigster Marker für Myofibroblasten und kann sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bei HSC-Aktivierung vermehrt nachgewiesen werden (Deminicis 2007, Novo 2014). Auch die Analysen der Expressionen multipler, an der HSC-Aktivierung beteiligter Gene bestätigten die antifibrotischen Effekte von Foxf1 siRNA. So konnten sowohl für die mRNA Expression von Gfap als auch für die von Pparg an den Tagen fünf (Gfap) bzw. fünf und 14 (Pparg) signifikant erhöhte Werte in der Behandlungsgruppe nachgewiesen werden. Das saure Gliafaserprotein (GFAP) gilt als Marker für ruhende bzw. nicht aktivierte HSC, wobei Gfap in Myofibroblasten hingegen wenig bis gar nicht exprimiert wird (Niki *et al.* 1996, Knittel *et al.* 1999). Auch für Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (PPAR- γ) wurde eine verminderte Aktivität im Rahmen der HSC-Aktivierung beschrieben (Galli *et al.* 2000) und es ist zusätzlich anzunehmen, dass eine verminderte PPAR- γ -Aktivität die HSC-Aktivierung fördert (Friedman 2008 (b)). Außerdem werden PPAR- γ antifibrotische Eigenschaften über eine Suppression des Kollagen 1 α Promoters zugeschrieben (Yavrom *et al.* 2005). Die vermehrten Expressionen von Gfap und Pparg sprechen daher, im Zusammenhang mit der verminderten Expression von Col1a1, ebenfalls für eine abgeschwächte HSC-Aktivierung durch DBTC-Foxf1 siRNA. Des Weiteren ging die reduzierte Expression von Foxf1 mRNA in der Behandlungsgruppe an Tag zwei mit einer signifikant verminderten Expression von Pdgfb einher. PDGF wird als das potenteste, proliferative Mitogen für HSC beschrieben (Wong *et al.* 1994) und gilt als früher Aktivierungsmarker für HSC (Friedman 2008 (b)). Weiterhin weist PDGF pro-fibrogene Eigenschaften auf und konnte sowohl bei akutem als auch bei chronischem Leberschaden nachgewiesen werden (Pinzani *et al.* 2002). Die verminderte Expression von Pdgfb zum frühen Zeitpunkt nach BDL bestätigt daher zusätzlich die Foxf1 siRNA vermittelte abgeschwächte Aktivierung der HSC.

Zusätzlich konnte der inhibitorische Effekt eines Foxf1-Knockdowns auf die HSC auch mittels *in vitro* Analysen verifiziert werden. So zeigten kultivierte, mit Foxf1 siRNA behandelte, primäre

HSC eine signifikant verminderte Proliferation sowie ein verringertes kontraktiles Verhalten (Abshagen *et al.* 2015 (b)).

Da HSC die Hauptproduzenten extrazellulärer Matrix darstellen (Mederacke *et al.* 2013), führte die reduzierte HSC-Aktivierung in den mit Foxf1 siRNA behandelten Tieren zu einer geringer ausgeprägten Leberfibrose als in den Kontrolltieren. Der in der Behandlungsgruppe signifikant verminderte Nachweis von fibrotischem Gewebe (Siuris Red) an Tag 14 korrelierte mit einer signifikant verminderten Expression von Col1a1, wodurch sich der antifibrotische Effekt von DBTC-Fox1 siRNA zeigt. Ergänzend zu den antifibrotischen Effekten bei verminderter HSC-Aktivierung, ergaben sich anhand der Genanalysen auch Hinweise auf regenerative Auswirkungen durch die Behandlung mit DBTC-Foxf1 siRNA. Es ist bekannt, dass ein fehlerhafter Abbau von Bindegewebsmatrix einen wichtigen Faktor für progressive Fibrose darstellt und Enzyme der MMP hierbei eine zentrale Rolle einnehmen (Friedman 2008 (b), Arthur 2000). Garcia-Irigoyen *et al.* (2014) konnten nach BDL an Mmp10 Knockout-Mäusen (Mmp10^{-/-}) vermehrt Nekrose, Fibrosierung sowie eine erhöhte Expression von α -SMA nachweisen. Auch das Überleben der Mmp10-defizienten Tiere nach partieller Hepatektomie war verkürzt. Mmp10 wurde daher von den Autoren eine relevante Rolle im Rahmen der Regeneration bei Leberschädigung zugesprochen (Garcia-Irigoyen *et al.* 2014). Die bei uns an Tag fünf gemessenen, signifikant erhöhten Werte für Mmp10 sprechen daher für eine verbesserte Regeneration der mit DBTC-Foxf1 siRNA behandelten Tiere durch Abbau von fibrotischem Gewebe. Weiterhin legt die signifikant erhöhte Expression von Ngfr in der Behandlungsgruppe an Tag fünf nach BDL eine von den HSC selbst induzierte HSC-Apoptose als protektiven Effekt zur Reduktion der Fibrosierung nahe. Der zur Tumornekrosefaktor (TNF)-Familie gehörige Rezeptor p75 (NGFR-Nerve Growth Factor Receptor) wird im Rahmen der Leberfibrose von aktivierten HSC exprimiert, während eine hepatozytäre Expression von NGF in fibrotischen Lebern bekannt ist (Trim *et al.* 2000, Oakley *et al.* 2003). Die Interaktion von NGF mit den NGFR der HSC führt über Caspase 3 zur Apoptose der HSC und kann somit zur Reduktion der Fibrosebildung beitragen (Oakley *et al.* 2003). Anhand der *in vitro* Analysen zu DBTC-Foxf1 siRNA (Abshagen 2015 (b)) sind die antifibrotischen Effekte im Tierversuch jedoch eher auf die verminderte HSC-Aktivierung als auf eine HSC-Apoptose zurückzuführen.

Neben der Reduktion von Fibrose stellt natürlich auch die Reduktion des Leberschadens eine wünschenswerte Konsequenz einer antifibrotischen Therapie dar. Diesbezüglich lässt sich anhand von laborchemischen und histologischen Untersuchungen aufgrund fehlender Signifikanzen zwar keine sichere Aussage treffen, jedoch lassen die Ergebnisse in Zusammenschau vermuten, dass bei den mit DBTC-Foxf1 siRNA behandelten Tieren ein geringerer Leberparenchymschaden vorlag. So zeigte sich histologisch zum späten Zeitpunkt (Tag 14) nach BDL

in der siFoxf1-Gruppe lediglich etwa die Hälfte (ca. 1,5 %) an nekrotischen Arealen im Vergleich zur Kontrollgruppe (ca. 3 %). Anzumerken ist hierbei, dass in der Literatur eine Varianz bezüglich des histologischen Nachweises von Nekrose nach BDL besteht. Georgiev *et al.* konnten 2008 beispielsweise einen Anstieg von nekrotischen Arealen von fast 10 % des untersuchten Gewebes an Tag zwei notieren, während Abshagen *et al.* (2015 (c)) ein Maximum von ca. 5 % an Tag 14, sowie generell eine hohe interindividuelle Variabilität nekrotischer Bereiche mit beispielsweise 0,9-12 % an Tag fünf beobachteten.

Der Anstieg der Cholestaseparameter Bilirubin und ALP deutete in beiden Gruppen auf eine verminderte Detoxifikationskapazität der Leber hin, wobei der hohe Anteil des direkten am gesamten Bilirubin die posthepatische Cholestase bestätigte (Halwachs-Baumann 2006). Dies spiegelte sich auch im klinischen Erscheinungsbild der Tiere wider, welche im Verlauf zunehmend gelbliche Verfärbung von Haut und Urin im Rahmen des cholestatischen Ikterus aufwiesen. Für die Enzyme ALT, AST und GLDH zeigte unsere Auswertung äquivalent zur Literatur im Verlauf fallende Werte mit jeweiligen Maxima an Tag zwei. Nach BDL können in der Phase der akuten Leberschädigung (innerhalb der ersten 30 h) die höchsten Werte von Leberenzymen gemessen werden (Abshagen *et al.* 2015 (c), Georgiev *et al.* 2008), wobei sich diese im Rahmen der chronischen Leberschädigung wieder nahezu normalisieren. Interessanterweise konnten für alle Enzyme bei den mit Foxf1 siRNA behandelten Tieren verminderte Absolutwerte im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden, wobei kritisch anzumerken ist, dass im Verlauf der Leberzirrhose ein „Ausbrennen“ mit verminderter Freisetzung von Enzymen aufgrund der bereits großen Menge an untergegangenen Zellen nicht ausgeschlossen werden kann.

Die Analyse des Blutbildes korrelierte anhand eines Hb-Abfalls, an Tag 5 reduzierter Thrombozytenzahlen sowie zunehmender Leukozytose generell mit dem Bild einer zunehmenden Leberschädigung. Wesentliche Unterschiede zwischen den Gruppen ergaben sich hierbei jedoch nicht.

Trotz der Beobachtung einer signifikant verminderten Fibrosierung durch die Gabe von DBTC-Foxf1 siRNA ließ sich kein Einfluss auf die Mortalität der Tiere nachweisen. Tendenziell ist sogar ein etwas kürzeres Überleben der DBTC-Foxf1 siRNA-behandelten Tiere erkennbar. Leberfibrose ist zunächst als Reaktion auf eine akute oder chronische Schädigung der Leber im Sinne eines Wundheilungsprozesses zu sehen (Hernandez-Gea und Friedman 2011, Aydin und Akçalı 2018). Da die Fibrosierung in der Behandlungsgruppe signifikant vermindert war, scheint möglicherweise auch eine Art Schutzmechanismus zu fehlen: Da es in diesem Modell zu einer extremen Leberschädigung aufgrund der stetig fortschreitenden Ursache (totaler Gallengangsverschluss mit massiver toxischer Gewebeschädigung durch Gallensekret) kam, ist davon auszugehen, dass eine physische Barriere durch fibrotisches Gewebe die Wirkung der

schädlichen Gallensäuren als Noxe auf die Hepatozyten abschwächt. Daher besteht die Möglichkeit, dass die Behandlung mit DBTC-Foxf1 siRNA im speziellen Rahmen des BDL-Modells keinen positiven Effekt auf das Überleben der Tiere hatte.

Ein möglicher Erklärungsansatz für die hohe Sterberate in beiden Gruppen zu Beginn der Mortalitätsstudie (40 % pro Gruppe in vier Tagen) im Vergleich zur Verteilungsstudie und therapeutischem Ansatz (insgesamt ca. 13 % in einer Woche) ist, dass die in der Mortalitätsstudie untersuchten Tiere einer anderen Balb/c-Zucht als die zuvor verwendeten Tiere entstammten und daher möglicherweise eine stärkere Reaktion auf die BDL zeigten. Ein anderer Unterschied war bei absolut gleicher praktischer Durchführung der BDL nicht ersichtlich, insbesondere da die Mortalitätsstudie im Anschluss an die anderen Versuche durchgeführt wurde und somit eine hohe praktische Erfahrung vorhanden war. Auch wird das Modell der hier durchgeführten totalen BDL aufgrund der zum Teil hohen Mortalität für Langzeitstudien als zu instabil beschrieben (Aoki *et al.* 2016).

Auch wenn sich in unserer Arbeit signifikante antifibrotische Effekte durch DBTC-Foxf1 siRNA-Formulierungen erzielen ließen, gilt für zukünftige Studien zu bedenken, dass aufgrund der verschiedenen Stadien der Leberfibrose mit zahlreichen Signalkaskaden, die Beeinflussung nur eines einzelnen Targetgens weniger zielführend sein könnte, als ein multimodaler antifibrotischer Therapieansatz (Yoon *et al.* 2016).

6.3 Zusammenfassung und Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit konnte erfolgreich gezeigt werden, dass mit den leberspezifischen DBTC-Formulierungen die Applikation von siRNA in HSC möglich ist. Durch die Gabe von DBTC-Foxf1 siRNA konnte eine signifikant verminderte mRNA Expression des Transkriptionsfaktors Foxf1 in den HSC zum frühen Zeitpunkt nach BDL nachgewiesen werden. Dies resultierte in den DBTC-Foxf1 siRNA-behandelten Tieren in einer verminderten HSC-Aktivität und folglich einer signifikant geringeren Fibrosierung an Tag 14 nach BDL, wodurch das antifibrotische Potential von Foxf1 siRNA aufgezeigt wird. Bei diesen Tieren ließ sich im Verlauf eine verminderte Leberschädigung mit einem geringeren Anteil nekrotischer Areale im Vergleich zur Kontrollgruppe vermuten. Das Überleben der BDL-Tiere konnte jedoch durch eine Therapie mit DBTC-Foxf1 siRNA trotz der antifibrotischen Wirkung nicht verlängert werden.

Zusammenfassend stellen die DBTC-Formulierungen ein effektives leberspezifisches Transportsystem für siRNA - und Foxf1 ein potentiell Zielgen für die Modulation der Aktivität von HSC dar. Durch Inhibierung von Foxf1 kann die Progression der Leberfibrose abgeschwächt werden, was für zukünftige und gegebenenfalls auch klinische Studien weitere therapeutische

Möglichkeiten eröffnen kann. Die Genmodulation mittels therapeutischer siRNA könnte daher in Zukunft eine Ergänzung der multimodalen Therapieoptionen bei Leberfibrose darstellen.

7 Thesen zur Dissertation

- Erkrankungen der Leber stellen ein weltweites und zunehmend relevantes gesundheitliches Problem dar.
- Therapieoptionen bei Lebererkrankungen beschränken sich hauptsächlich auf die Behandlung der Grunderkrankung, symptomatische Therapien oder Organtransplantation als *Ultima Ratio*. Eine wirksame antifibrotische Therapie ist aktuell nicht verfügbar.
- Die hepatischen Sternzellen (HSC) sind an der Bildung von Leberfibrose relevant beteiligt und deren Inhibierung führt zur Abschwächung der Fibrosierung.
- Der HSC-aktivierende Transkriptionsfaktor Foxf1 stellt ein mögliches Target für eine antifibrotische Therapieoption dar.
- Durch Applikation von siRNA lässt sich ein spezifisches Gen-Silencing erreichen, was multiple Therapieoptionen eröffnet.
- Das DBTC-System ermöglicht als lipidbasiertes Delivery-System eine leberspezifische Applikation von siRNA.
- DBTC wird nach systemischer Applikation von den HSC aufgenommen, was durch deren Vitamin A Kolokalisation in der Intravitalmikroskopie nachgewiesen werden konnte.
- Durch intravenöse Applikation von DBTC-Foxf1 siRNA konnte ein signifikanter Foxf1 mRNA Knockdown an Tag zwei im murinen BDL-Modell erreicht werden.
- Dieser Knockdown resultierte in einer histologisch gesicherten, signifikant verminderten Fibrosierung der Leber an Tag 14 nach BDL.
- Ein verminderter Leberschaden nach BDL durch DBTC-Foxf1 siRNA ist anhand der Ergebnisse von Leberenzymveränderungen, nekrotischen Arealen und Fluidigm-Gen-Analyse zu vermuten.
- Das Überleben der Tiere im murinen BDL-Modell konnte durch DBTC-Foxf1 siRNA nicht verlängert werden.

- Das DBTC-Delivery-System sowie Foxf1 siRNA stellen mögliche Optionen in der Erforschung neuer, multimodaler Therapieoptionen bei Leberschäden dar.

8 Literaturverzeichnis

Ärzteblatt. Gastroenterologen-Umfrage: Defizitäre Vergütung der Sonografie bleibt nicht ohne Folgen. <https://www.aerzteblatt.de/nachrichten/74361/Gastroenterologen-Umfrage-Defizitaere-Verguetung-der-Sonografie-bleibt-nicht-ohne-Folgen>. *Deutsches Ärzteblatt*. 05/2017.

Abshagen K (a), Senne M, Genz B, Thomas M, Vollmar B. Differential Effects of Axin2 Deficiency on the Fibrogenic and Regenerative Response in Livers of Bile Duct-Ligated Mice. *Eur Surg Res*. 2015 Dec;55(4):328-340.

Abshagen K (b), Brensel M, Genz B, Roth K, Thomas M, Fehring V, Schaeper U, Vollmar B. Foxf1 siRNA delivery to hepatic stellate cells by DBTC lipoplex formulations ameliorates fibrosis in livers of bile duct ligated mice. *Curr Gene Ther*. 2015;15(3):215-27.

Abshagen K (c), König M, Hoppe A, Müller I, Ebert M, Weng H, Holzhütter HG, Zanger UM, Bode J, Vollmar B, Thomas M, Dooley S. Pathobiochemical signatures of cholestatic liver disease in bile duct ligated mice. *BMC Syst Biol*. 2015 Nov 20;9:83.

Abshagen K, Rotberg T, Genz B, Vollmar B. No significant impact of Foxf1 siRNA treatment in acute and chronic CCl4 liver injury. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2017 Aug;242(14):1389-1397.

Ahmed A, Wong RJ, Harrison SA. Nonalcoholic Fatty Liver Disease Review: Diagnosis, Treatment, and Outcomes. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2015 Nov;13(12):2062-70.

Aleku M, Schulz P, Keil O, Santel A, Schaeper U, Dieckhoff B, Janke O, Endruschat J, Durieux B, Röder N, Löffler K, Lange C, Fechtner M, Möpert K, Fisch G, Dames S, Arnold W, Jochims K, Giese K, Wiedenmann B, Scholz A, Kaufmann J. Atu027, a liposomal small interfering RNA formulation targeting protein kinase N3, inhibits cancer progression. *Cancer Res*. 2008 Dec 1;68(23):9788-98.

Aoki H, Aoki M, Yang J, Katsuta E, Mukhopadhyay P, Ramanathan R, Woelfel IA, Wang X, Spiegel S4, Zhou H2, Takabe K5. Murine model of long-term obstructive jaundice. *J Surg Res*. 2016 Nov;206(1):118-125.

Arias M, Sauer-Lehnen S, Treptau J, Janoschek N, Theuerkauf I, Buettner R, Gressner AM, Weiskirchen R. Adenoviral expression of a transforming growth factor-beta1 antisense mRNA is effective in preventing liver fibrosis in bile-duct ligated rats. *BMC Gastroenterol*. 2003 Oct 18;3:29.

Arthur MJ. Fibrogenesis. II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;279:G245–G249.

Anderson EL, Howe LD, Jones HE, Higgins JP, Lawlor DA, Fraser A. The Prevalence of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Children and Adolescents: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*. 2015 Oct 29;10(10):e0140908.

Aydın MM, Akçalı KC. Liver fibrosis. *Turk J Gastroenterol*. 2018 Jan;29(1):14-21.

Badrealam K, Zubair S, Owais M. SiRNA nanotherapeutics _the panacea of diseases? *Curr Gene Ther*. 2015;15(2):201-14.

Bansal MB, Chamroonkul N. Antifibrotics in liver disease: are we getting closer to clinical use? *Hepatol Int.* 2019 Jan;13(1):25-39.

Barron LG, Uyechi LS, Szoka FC Jr. Cationic lipids are essential for gene delivery mediated by intravenous administration of lipoplexes. *Gene Ther.* 1999 Jun;6(6):1179-83.

Bashour FN, Teran JC, Mullen KD. Prevalence of peripheral blood cytopenias (hypersplenism) in patients with nonalcoholic chronic liver disease. *Am J Gastroenterol.* 2000 Oct;95(10):2936-9.

Beaussier M, Wendum D, Schiffer E, Dumont S, Rey C, Lienhart A, Housset C. Prominent contribution of portal mesenchymal cells to liver fibrosis in ischemic and obstructive cholestatic injuries. *Lab Invest* 2007;87:292–303.

Becker J, May A, Gerges C, Anders M, Veits L, Weise K, Czamara D, Lyros O, Manner H, Terheggen G, Venerito M, Noder T, Mayershofer R, Hofer JH, Karch HW, Ahlbrand CJ, Arras M, Hofer S, Mangold E, Heilmann-Heimbach S, Heinrichs SK, Hess T, Kiesslich R, Izbicki J, Hölscher AH, Bollschweiler E, Malfertheiner P, Lang H, Moehler M, Lorenz D, Müller-Myhsok B, Ott K, Schmidt T, Whiteman DC, Vaughan TL, Nöthen MM, Hackelsberger A, Schumacher B, Pech O, Vashist Y, Vieth M, Weismüller J, Neuhaus H, Rösch T, Ell C, Gockel I, Schumacher J. Supportive evidence for FOXP1, BARX1, and FOXF1 as genetic risk loci for the development of esophageal adenocarcinoma. *Cancer Med.* 2015;4(11):1700-4.

van Beuge MM, Prakash J, Lacombe M, Gosens R, Post E, Reker-Smit C, Beljaars L, Poelstra K. Reduction of fibrogenesis by selective delivery of a Rho kinase inhibitor to hepatic stellate cells in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011 Jun;337(3):628-35.

Black M, Milewski D, Le T, Ren X, Xu Y, Kalinichenko VV, Kalin TV. FOXF1 Inhibits Pulmonary Fibrosis by Preventing CDH2-CDH11 Cadherin Switch in Myofibroblasts. *Cell Rep.* 2018 Apr 10;23(2):442-458.

Blomhoff R, Blomhoff HK. Overview of retinoid metabolism and function. *Journal of Neurobiology* 2006 7:606–630.

Bolte C, Flood HM, Ren X, Jagannathan S, Barski A, Kalin TV, Kalinichenko VV. FOXF1 transcription factor promotes lung regeneration after partial pneumonectomy. *Sci Rep.* 2017 Sep 6;7(1):10690.

Borkham-Kamphorst E, Herrmann J, Stoll D, Treptau J, Gressner AM, Weiskirchen R. Dominant-negative soluble PDGF-beta receptor inhibits hepatic stellate cell activation and attenuates liver fibrosis. *Lab Invest.* 2004 Jun;84(6):766-77.

Bundesärztekammer, Richtlinien zur Organtransplantation gem. § 16 TPG. Richtlinie gemäß § 16 Abs. 1 S. 1 Nrn. 2 u. 5 TPG für die Wartelistenführung und Organvermittlung zur Lebertransplantation. www.bundesaerztekammer.de/organtransplantation. 2017.

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018 Nov;68(6):394-424.

Brigham KL, Meyrick B, Christman B, Magnuson M, King G, Berry LC Jr. In vivo transfection of murine lungs with a functioning prokaryotic gene using a liposome vehicle. *Am J Med Sci.* 1989 Oct;298(4):278-81.

Caliari SR, Perepelyuk M, Cosgrove BD, Tsai SJ, Lee GY, Mauck RL, Wells RG, Burdick JA. Stiffening hydrogels for investigating the dynamics of hepatic stellate cell mechanotransduction during myofibroblast activation. *Sci Rep.* 2016 Feb 24;6:21387.

Canbay A, Taimr P, Torok N, Higuchi H, Friedman S, Gores GJ. Apoptotic body engulfment by a human stellate cell line is profibrogenic. *Lab Invest* 2003;83:655–663.

Chen Z, Jain A, Liu H, Zhao Z, Cheng K. Targeted Drug Delivery to Hepatic Stellate Cells for the Treatment of Liver Fibrosis. *J Pharmacol Exp Ther.* 2019 Mar 18.

Choi SS, Omenetti A, Witek RP, Moylan CA, Syn WK, Jung Y, Yang L, Sudan DL, Sicklick JK, Michelotti GA, Rojkind M, Diehl AM. Hedgehog pathway activation and epithelial-to-mesenchymal transitions during myofibroblastic transformation of rat hepatic cells in culture and cirrhosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2009 Dec;297(6):G1093-106.

Chu AS, Diaz R, Hui JJ, Yanger K, Zong Y, Alpini G, Stanger BZ, Wells RG. Lineage tracing demonstrates no evidence of cholangiocyte epithelial-to-mesenchymal transition in murine models of hepatic fibrosis. *Hepatology* 2011; 53:1685-1695.

Czauderna F., Fechtner M., Dames S., Aygün H., Klippel A., Pronk G.J., Giese K., Kaufmann J. Structural variations and stabilising modifications of synthetic siRNAs in mammalian cells. *Nucleic Acids Research* 2003, Vol. 31, No. 11 2705-2716.

David RM, Doherty AT. Viral Vectors: The Road to Reducing Genotoxicity. *Toxicol Sci.* 2017 Feb;155(2):315-325.

Deleve LD, Wang X, Guo Y. Sinusoidal endothelial cells prevent rat stellate cell activation and promote reversion to quiescence. *Hepatology.* 2008 Sep;48(3):920-30.

DeLeve LD. Liver sinusoidal endothelial cells in hepatic fibrosis. *Hepatology.* 2015 May;61(5):1740-6.

De Minicis S, Seki E, Uchinami H, Kluwe J, Zhang Y, Brenner DA, Schwabe RF. Gene expression profiles during hepatic stellate cell activation in culture and in vivo. *Gastroenterology.* 2007 May;132(5):1937-46.

Dharmadhikari AV, Szafranski P, Kalinichenko VV, Stankiewicz P. Genomic and Epigenetic Complexity of the FOXF1 Locus in 16q24.1: Implications for Development and Disease. *Curr Genomics.* 2015;16(2):107-16.

Dörner, Klaus. Taschenlehrbuch Klinische Chemie und Hämatologie. ISBN-13: 978-3131297174. © Georg Thieme Verlag KG 2009.

Eipel C, Menschikow E, Sigal M, Kuhla A, Abshagen K, Vollmar B. Hepatoprotection in bile duct ligated mice mediated by darbepoetin- α is not caused by changes in hepatobiliary transporter expression. *Int J Clin Exp Pathol.* 2013;6(1):80-90.

Emery DW. The use of chromatin insulators to improve the expression and safety of integrating gene transfer vectors. *Hum Gene Ther.* 2011 Jun;22(6):761-74.

Eurotransplant (a). Liver transplants in Germany, by year, by donor type, by organ combination. *statistics.eurotransplant.org : 2052P_Germany_liver : 09.04.2018 : counting recipient transplants. Eurotransplant International Foundation 2018*

Eurotransplant (b). Active liver waiting list (at year-end) in Germany, by year, by organ combination. *statistics.eurotransplant.org : 3002P_Germany_liver : 03.04.2018 : only active organ needs are counted. Eurotransplant International Foundation 2018.*

Eurotransplant (c). Waiting list mortality in Germany, by year, by organ. *statistics.eurotransplant.org : 4512P_Germany : 25.04.2018 : Reported by year of death. Includes patients with active or non-active urgency at removal. Includes removals while waiting for living or deceased donor transplants. Eurotransplant International Foundation 2018.*

Fallowfield JA, Mizuno M, Kendall TJ, Constandinou CM, Benyon RC, Duffield JS, Iredale JP. Scar-associated macrophages are a major source of hepatic matrix metalloproteinase-13 and facilitate the resolution of murine hepatic fibrosis. *J Immunol. 2007 Apr 15;178(8):5288-95.*

Fallowfield JA. Future mechanistic strategies for tackling fibrosis - an unmet need in liver disease. *Clin Med (Lond). 2015;15 Suppl 6:s83-7.*

Fattovich G, Stroffolini T, Zagni I, Donato F. Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology 2004; 127:S35-50.*

Fehring V, Schaeper U, Ahrens K, Santel A, Keil O, Eisermann M, Giese K, Kaufmann J. Delivery of therapeutic siRNA to the lung endothelium via novel Lipoplex formulation DACC. *Mol Ther. 2014 Apr;22(4):811-20.*

Friedman SL, Wei S, Blaner WS. Retinol release by activated rat hepatic lipocytes: regulation by Kupffer cell-conditioned medium and PDGF. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 1993;264:G947-G952.*

Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem. 2000 Jan 28;275(4):2247-50.*

Friedman SL. Liver fibrosis -- from bench to bedside. *J Hepatol. 2003; 38 Suppl 1:S38-53.*

Friedman SL (a). Mechanisms of Hepatic Fibrogenesis. *Gastroenterology. 2008 May;134(6):1655-69.*

Friedman SL (b). Hepatic Stellate Cells: Protean, Multifunctional, and Enigmatic Cells of the Liver. *Physiol Rev. 2008;88(1):125-72.*

Fuhrmann V, Horvatits T, Drolz A, Rutter K. Extracorporeal therapy of patients with liver disease in the intensive care unit. *Med Klin Intensivmed Notfmed. 2014 May;109(4):246-51.*

Galli A, Crabb D, Price D, Ceni E, Salzano R, Surrenti C, Casini A. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma transcriptional regulation is involved in platelet-derived growth factor-induced proliferation of human hepatic stellate cells. *Hepatology. 2000 Jan;31(1):101-8.*

Garbuzenko DV, Arefyev NO, Belov DV. Mechanisms of adaptation of the hepatic vasculature to the deteriorating conditions of blood circulation in liver cirrhosis. *World J Hepatol. 2016 Jun 8;8(16):665-72.*

- Garcia-Irigoyen O, Carotti S, Latasa MU, Uriarte I, Fernández-Barrena MG, Elizalde M, Urtasun R, Vespasiani-Gentilucci U, Morini S, Banales JM, Parks WC, Rodriguez JA, Orbe J, Prieto J, Páramo JA, Berasain C, Ávila MA. Matrix metalloproteinase-10 expression is induced during hepatic injury and plays a fundamental role in liver tissue repair. *Liver Int.* 2014 Aug;34(7):e257-70.
- Geerts A. History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis.* 2001 Aug;21(3):311-35.
- George J, Roulot D, Kotliansky VE, Bissell DM. In vivo inhibition of rat stellate cell activation by soluble transforming growth factor beta type II receptor: a potential new therapy for hepatic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Oct 26;96(22):12719-24.
- Genz B, Thomas M, Pützer BM, Siatkowski M, Fuellen G, Vollmar B, Abshagen K. Adenoviral overexpression of Lhx2 attenuates cell viability but does not preserve the stem cell like phenotype of hepatic stellate cells. *Exp Cell Res.* 2014 Nov 1;328(2):429-43.
- Georgiev P, Jochum W, Heinrich S, Jang JH, Nocito A, Dahm F, Clavien PA. Characterization of time-related changes after experimental bile duct ligation. *Br J Surg.* 2008 May;95(5):646-56.
- Gerbes AL, Gülberg V, Sauerbruch T, Wiest R, Appenrodt B, Bahr MJ, Dollinger MM, Rössle M, Schepke M. S3-Leitlinie „Aszites, spontan bakterielle Peritonitis, hepatorenales Syndrom“. *Z Gastroenterol* 2011; 49: 749–779.
- Görtzen J, Schierwagen R, Bierwolf J, Klein S, Uschner FE, van der Ven PF, Fürst DO, Strassburg CP, Laleman W, Pollok JM, Trebicka J. Interplay of Matrix Stiffness and c-SRC in Hepatic Fibrosis. *Front Physiol.* 2015 Dec 2;6:359.
- Gonzalo T, Beljaars L, van de Bovenkamp M, Temming K, van Loenen AM, Reker-Smit C, Meijer DK, Lacombe M, Opdam F, Kéri G, Orfi L, Poelstra K, Kok RJ. Local inhibition of liver fibrosis by specific delivery of a platelet-derived growth factor kinase inhibitor to hepatic stellate cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007 Jun;321(3):856-65.
- Gowert NS, Klier M, Reich M, Reusswig F, Donner L, Keitel V, Häussinger D, Elvers M. Defective Platelet Activation and Bleeding Complications upon Cholestasis in Mice. *Cell Physiol Biochem.* 2017;41(6):2133-2149.
- Gürlevik E, Woller N, Schache P, Malek NP, Wirth TC, Zender L, Manns MP, Kubicka S, Kühnel F. p53-dependent antiviral RNA-interference facilitates tumor-selective viral replication. *Nucleic Acids Res.* 2009 Jul;37(12):e84.
- Halwachs-Baumann G. Labormedizin. *SpringerWienNewYork*, 2006.
- Hayaishi S, Chung H, Kudo M, Ishikawa E, Takita M, Ueda T, Kitai S, Inoue T, Yada N, Hagiwara S, Minami Y, Ueshima K. Oral branched-chain amino acid granules reduce the incidence of hepatocellular carcinoma and improve event-free survival in patients with liver cirrhosis. *Dig Dis.* 2011;29(3):326-32.
- Hazra S, Miyahara T, Rippe R, Tsukamoto H. PPAR Gamma and Hepatic Stellate Cells. *Comp Hepatol.* 2004; 3(Suppl 1): S7.

Hennenberg M, Biecker E, Trebicka J, Jochem K, Zhou Q, Schmidt M, Jakobs KH, Sauerbruch T, Heller J. Defective RhoA/Rho-kinase signaling contributes to vascular hypocontractility and vasodilation in cirrhotic rats. *Gastroenterology*. 2006 Mar;130(3):838-54.

Herrmann J, Gressner AM, Weiskirchen R. Immortal hepatic stellate cell lines: useful tools to study hepatic stellate cell biology and function? *J Cell Mol Med*. 2007 Jul-Aug;11(4):704-22.

Hernandez-Gea V, Friedman SL. Pathogenesis of Liver Fibrosis. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis*. 2011. 6:425-56.

Herold G. *et al*. Innere Medizin 2016. ISBN-13: 9783981466058. *Gerd Herold, Köln (2016)*.

Hirose T, Mishima Y, Tomari Y. Elements and machinery of non-coding RNAs: toward their taxonomy. *EMBO Rep*. 2014 May;15(5):489-507.

Huynh D, Selvanderan S, Harley H, Holloway R, Nguyen N. Nutritional care in hospitalized patients with chronic liver disease. *World J Gastroenterol*. 2015 Dec 7;21(45):12835-42.

Inagaki Y, Okazaki I. Emerging insights into Transforming growth factor β Smad signal in hepatic fibrogenesis. *Gut*. 2007 Feb; 56(2): 284–292.

Institute for Health Metrics and Evaluation (a). Seattle, United States. GBD Results Tool. 2019. Erstellt am 14.11.2019 unter: <http://ghdx.healthdata.org/gbd-results-tool?params=gbd-api-2017-permalink/20b6130bae387bfa37c2375e96742490>

Institute for Health Metrics and Evaluation (b). Seattle, United States. GBD Results Tool. 2019. Erstellt am 14.11.2019 unter: <http://ghdx.healthdata.org/gbd-results-tool?params=gbd-api-2017-permalink/85cfd40d0169266ec5ca0457a0f41236>

Institut für Qualitätssicherung und Transparenz im Gesundheitswesen (IQTIG). Bundesauswertung zum Erfassungsjahr 2017 Lebertransplantation Qualitätsindikatoren. https://iqtig.org/downloads/auswertung/2017/ltx/QSKH_LTX_2017_BUAW_V02_2018-08-01.pdf. Stand:01.08.2018.

Jiang S, Chen X. HMGB1 siRNA can reduce damage to retinal cells induced by high glucose in vitro and in vivo. *Drug Des Devel Ther*. 2017 Mar 15;11:783-795.

Jophilin LL, Koutalos Y, Chen C, Shah V, Rockey DC. Hepatic stellate cells retain retinoid-laden lipid droplets after cellular transdifferentiation into activated myofibroblasts. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2018 Nov 1;315(5):G713-G721.

Jung EM, Clevert DA. Kontrastmittelsonographie (CEUS) und Bildfusion zur Durchführung von Leberinterventionen. *Radiologe*. 2018 Jun;58(6):538-544.

Jürgens G, Weigel D. Terminal versus segmental development in the Drosophila embryo: the role of the homeotic gene fork head. *Roux's Arch. Dev. Biol*. 1988; 197, 345-354.

Kalinichenko, VV, Lim L, Stolz DB, Shin B, Rausa FM, Clark J, Whitsett JA, Watkins SC, Costa RH. Defects in pulmonary vasculature and perinatal lung hemorrhage in mice heterozygous null for the Forkhead Box f1 transcription factor. *Dev. Biol.*, 2001, 235, 489-506.

Kalinichenko VV, Zhou Y, Bhattacharyya D, *et al*. Haploinsufficiency of the mouse Forkhead Box f1 gene causes defects in gallbladder development. *J Biol Chem* 2002; 277: 12369-74.

- Kalinichenko VV, Bhattacharyya D, Zhou Y, Gusarova GA, Kim W, Shin B, Costa RH. Foxf1 +/- mice exhibit defective stellate cell activation and abnormal liver regeneration following CCl4 injury. *Hepatology* 2003; 37:107–117.
- Karanjia RN, Crossey MM, Cox IJ, Fye HK, Njie R, Goldin RD, Taylor-Robinson SD. Hepatic steatosis and fibrosis: Non-invasive assessment. *World J Gastroenterol.* 2016 Dec 7;22(45):9880-9897.
- Karlmarm KR, Weiskirchen R, Zimmermann HW, Gassler N, Ginhoux F, Weber C, Merad M, Luedde T, Trautwein C, Tacke F. Hepatic recruitment of the inflammatory Gr1+ monocyte subset upon liver injury promotes hepatic fibrosis. *Hepatology.* 2009 Jul;50(1):261-74.
- Kent G, Gay S, Inouye T, Bahu R, Minick OT, Popper H. Vitamin A containing lipocytes and formation of type III collagen in liver injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976;73:3719–3722.
- Kim KH, Chen CC, Monzon RI, Lau LF. Matricellular protein CCN1 promotes regression of liver fibrosis through induction of cellular senescence in hepatic myofibroblasts. *Mol Cell Biol.* 2013 May;33(10):2078-90.
- Kisseleva T, Uchinami H, Feirt N, Quintana-Bustamante O, Segovia JC, Schwabe RF, Brenner DA. Bone marrow-derived fibrocytes participate in pathogenesis of liver fibrosis. *J Hepatol* 2006;45:429–438.
- Kisseleva T, Cong M, Paik Y, Scholten D, Jiang C, Benner C, Iwaisako K, Moore-Morris T, Scott B, Tsukamoto H, Evans SM, Dillmann W, Glass CK, Brenner DA. Myofibroblasts revert to an inactive phenotype during regression of liver fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Jun 12;109(24):9448-53.
- Knittel T, Kobold D, Piscaglia F, Saile B, Neubauer K, Mehde M, Timpl R, Ramadori G. Localization of liver myofibroblasts and hepatic stellate cells in normal and diseased rat livers: distinct roles of (myo-)fibroblast subpopulations in hepatic tissue repair. *Histochem Cell Biol.* 1999 Nov;112(5):387-401.
- Knop V, Elastographie in der Routineanwendung Tipps für die Interpretation bei Anbietervielfalt. *Gastroenterologe* 2018; 13:264–271.
- Kobayashi H, Tomari Y. RISC assembly: Coordination between small RNAs and Argonaute proteins. *Biochim Biophys Acta.* 2016 Jan;1859(1):71-81.
- Lang Q, Liu Q, Xu N, Qian KL, Qi JH, Sun YC, Xiao L, Shi XF. The antifibrotic effects of TGF- β 1 siRNA on hepatic fibrosis in rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011 Jun 10;409(3):448-53.
- Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Diagnostik und Therapie des hepatozellulären Karzinoms, Langversion 1.0, AWMF, 2013. Registrierungsnummer: 032-053OL, <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.html> Abrufdatum 2017.
- Liu H, Chen Z, Jin W, Barve A, Wan YY, Cheng K. Silencing of α -complex protein-2 reverses alcohol- and cytokine-induced fibrogenesis in hepatic stellate cells. *Liver Res.* 2017 Jun;1(1):70-79.

Lo PK, Lee JS, Liang X, Han L, Mori T, Fackler MJ, Sadik H, Argani P, Pandita TK, Sukumar S. Epigenetic inactivation of the potential tumor suppressor gene FOXF1 in breast cancer. *Cancer Res.* 2010 Jul 15;70(14):6047-58.

Lo PK, Lee JS, Chen H, Reisman D, Berger FG, Sukumar S. Cytoplasmic mislocalization of overexpressed FOXF1 is associated with the malignancy and metastasis of colorectal adenocarcinomas. *Exp Mol Pathol.* 2013 Feb;94(1):262-9.

Mahlapuu M (a), Ormestad M, Enerbäck S, *et al.* The forkhead transcription factor Foxf1 is required for differentiation of extraembryonic and lateral plate mesoderm. *Development* 2001; 128: 155-66.

Mahlapuu M (b), Enerbäck S, Carlsson P. Haploinsufficiency of the forkhead gene Foxf1, a target for sonic hedgehog signaling, causes lung and foregut malformations. *Development* 2001; 128: 2397- 406.

Marques TG, Chaib E, da Fonseca JH, Lourenço AC, Silva FD, Ribeiro MA Jr, Galvão FH, D'Albuquerque LA. Review of experimental models for inducing hepatic cirrhosis by bile duct ligation and carbon tetrachloride injection. *Acta Cir Bras.* 2012 Aug;27(8):589-94.

Marra F, Tacke F. Roles for chemokines in liver disease. *Gastroenterology.* 2014 Sep;147(3):577-594.e1.

Mederacke I, Hsu CC, Troeger JS, Huebener P, Mu X, Dapito DH, Pradere JP, Schwabe RF. Fate tracing reveals hepatic stellate cells as dominant contributors to liver fibrosis independent of its aetiology. *Nat Commun.* 2013;4:2823.

Mederacke I, Dapito DH, Affò S, Uchinami H, Schwabe RF. High-yield and high-purity isolation of hepatic stellate cells from normal and fibrotic mouse livers. *Nat Protoc.* 2015 Feb; 10(2): 305–315.

Meier RPH, Meyer J, Montanari E, Lacotte S, Balaphas A, Muller YD, Clément S, Negro F, Toso C, Morel P, Buhler LH. Interleukin-1 Receptor Antagonist Modulates Liver Inflammation and Fibrosis in Mice in a Model-Dependent Manner. *Int J Mol Sci.* 2019 Mar 14;20(6).

Melton AC, Yee HF. Hepatic stellate cell protrusions couple platelet-derived growth factor-BB to chemotaxis. *Hepatology* 2007;45:1446–1453.

Mitchell O, Feldman DM, Diakow M, Sigal SH. The pathophysiology of thrombocytopenia in chronic liver disease. *Hepat Med.* 2016 Apr 15;8:39-50.

Morini S, Carotti S, Carpino G, Franchitto A, Corradini SG, Merli M, Gaudio E. GFAP expression in the liver as an early marker of stellate cells activation. *Ital J Anat Embryol.* 2005 Oct-Dec;110(4):193-207.

Murata T, Aii S, Nakamura T, Mori A, Kaido T, Furuyama H, Furumoto K, Nakao T, Isobe N, Imamura M. Inhibitory effect of Y-27632, a ROCK inhibitor, on progression of rat liver fibrosis in association with inactivation of hepatic stellate cells. *J Hepatol.* 2001 Oct;35(4):474-81.

Nguyen D, Morgan T. Protein restriction in hepatic encephalopathy is appropriate for selected patients: a point of view. *Hepatol Int.* 2014 Sep 1;8(2):447-51.

- Niki T, De Bleser PJ, Xu G, Van Den Berg K, Wisse E, Geerts A. Comparison of glial fibrillary acidic protein and desmin staining in normal and CCl₄-induced fibrotic rat livers. *Hepatology*. 1996 Jun;23(6):1538-45.
- Novo E, Cannito S, Paternostro C, Bocca C, Miglietta A, Parola M. Cellular and molecular mechanisms in liver fibrogenesis. *Arch Biochem Biophys*. 2014 Apr 15;548:20-37.
- Oakley F, Trim N, Constandinou CM, Ye W, Gray AM, Frantz G, Hillan K, Kendall T, Benyon RC, Mann DA, Iredale JP. Hepatocytes express nerve growth factor during liver injury: evidence for paracrine regulation of hepatic stellate cell apoptosis. *Am J Pathol*. 2003 Nov;163(5):1849-58.
- Okuno M, Akita K, Moriwaki H, Kawada N, Ikeda K, Kaneda K, Suzuki Y, Kojima S. Prevention of rat hepatic fibrosis by the protease inhibitor, camostat mesilate, via reduced generation of active TGF-beta. *Gastroenterology*. 2001 Jun;120(7):1784-800.
- Parola M, Robino G. Oxidative stress-related molecules and liver fibrosis. *J Hepatol*. 2001 Aug;35(2):297-306.
- Perri GA, Khosravani H. Complications of end-stage liver disease. *Can Fam Physician*. 2016 Jan;62(1):44-50.
- Perz JF, Armstrong GL, Farrington LA, Hutin YJ, Bell BP. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J Hepatol*. 2006; 45(4):529-38
- Piper W. Innere Medizin, 2. Auflage, 2013 überarbeitet (14. Dezember 2012). ISBN-13: 978-3642331077. Berlin [u.a.]: Springer Verlag, 2013
- Preiss D, Sattar N. Non-alcoholic fatty liver disease: an overview of prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment considerations. *Clin Sci (Lond)*. 2008; 115(5):141-50.
- Quark Pharmaceuticals, Inc. USA. http://quarkpharma.com/?page_id=21. Abrufdatum 29.01.2019.
- Reetz J, Genz B, Meier C, Kowtharapu BS, Timm F, Vollmar B, Herchenröder O, Abshagen K, Pützer BM. Development of Adenoviral Delivery Systems to Target Hepatic Stellate Cells In Vivo. *PLoS One*. 2013;8(7).
- Schroeder A, Levins CG, Cortez C, Langer R, Anderson DG. Lipid-based nanotherapeutics for siRNA delivery. *J Intern Med*. 2010 Jan;267(1):9-21.
- Smart DE, Green K, Oakley F, Weitzman JB, Yaniv M, Reynolds G, Mann J, Millward-Sadler H, Mann DA. JunD is a profibrogenic transcription factor regulated by Jun N-terminal kinase-independent phosphorylation. *Hepatology*. 2006 Dec;44(6):1432-40.
- Ramachandran P, Iredale JP, Fallowfield JA. Resolution of liver fibrosis: basic mechanisms and clinical relevance. *Semin Liver Dis*. 2015 May;35(2):119-31.
- Rehm J, Mathers C, Popova S, Thavorncharoensap M, Teerawattananon Y, Patra J. Global burden of disease and injury and economic cost attributable to alcohol use and alcohol-use disorders. *Lancet* 2009; 373:2223–33.

Reynaert H, Urbain D, Geerts A., Regulation of sinusoidal perfusion in portal hypertension. *Anat Rec (Hoboken)*. 2008 Jun;291(6):693-8.

Roeb E, Steffen HM, Bantel H, Baumann U, Canbay A, Demir M, Drebber U, Geier A, Hampe J, Hellerbrand C, Pathil-Warth A, Schattenberg JM, Schramm C, Seitz HK, Stefan N, Tacke F, Tannapfel A, Lynen Jansen P, Bojunga J. S2k Leitlinie: Nicht-alkoholische Fettlebererkrankungen. *Z Gastroenterol*. 2015 Jul;53(7):668-723.

Rosato V, Abenavoli L, Federico A, Masarone M, Persico M. Pharmacotherapy of alcoholic liver disease in clinical practice. *Int J Clin Pract*. 2015.

Salazar-Montes AM, Hernández-Ortega LD, Lucano-Landeros MS, Armendariz-Borunda J. New gene therapy strategies for hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol*. 2015 Apr 7;21(13):3813-25.

Sandrin L, Fourquet B, Hasquenoph JM, Yon S, Fournier C, Mal F, Christidis C, Ziol M, Poulet B, Kazemi F, Beaugrand M, Palau R. Transient elastography: a new noninvasive method for assessment of hepatic fibrosis. *Ultrasound Med Biol*. 2003 Dec;29(12):1705-13.

Santel A, Aleku M, Keil O, Endruschat J, Esche V, Fisch G, Dames S, Löffler K, Fechtner M, Arnold W, Giese K, Klippel A, Kaufmann J. A novel siRNA-lipoplex technology for RNA interference in the mouse vascular endothelium. *Gene Ther*. 2006 Aug;13(16):1222-34.

Scherman D, Rousseau A, Bigey P, Escriou V. Genetic pharmacology: progresses in siRNA delivery and therapeutic applications. *Gene Ther*. 2017 Mar;24(3):151-156.

Schultheis B, Strumberg D, Santel A, Vank C, Gebhardt F, Keil O, Lange C, Giese K, Kaufmann J, Khan M, Drevs J. First-in-human phase I study of the liposomal RNA interference therapeutic Atu027 in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol*. 2014 Dec 20;32(36):4141-8.

Schmitt-Gräff A, Krüger S, Bochard F, Gabbiani G, Denk H. Modulation of alpha smooth muscle actin and desmin expression in perisinusoidal cells of normal and diseased human livers. *Am J Pathol*. 1991 May;138(5):1233-42.

Segnani C, Ippolito C, Antonioli L, Pellegrini C, Blandizzi C, Dolfi A, and Bernardini N. Histochemical Detection of Collagen Fibers by Sirius Red/Fast Green Is More Sensitive than van Gieson or Sirius Red Alone in Normal and Inflamed Rat Colon. *PLoS One*. 2015; 10(12): e0144630.

Sigal M, Siebert N, Zechner D, Menschikow E, Abshagen K, Vollmar B, Eipel C. Darbepoetin- α inhibits the perpetuation of necro-inflammation and delays the progression of cholestatic fibrosis in mice. *Lab Invest*. 2010 Oct; 90(10):1447-56.

Silence Therapeutics GmbH, www.silence-therapeutics.com. Abrufjahr: 2019.

Starkel P, Leclercq IA. Animal models for the study of hepatic fibrosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2011 Apr;25(2):319-33.

Statistisches Bundesamt (a). Sterbefälle, Sterbeziffern (je 100.000 Einwohner, altersstandardisiert) (ab 1998). Gliederungsmerkmale: Jahre, Region, Alter, Geschlecht, Nationalität, ICD-10, Art der Standardisierung. Tabelle bezieht sich auf: Jahr: 2017, Region: Deutschland, Alter: Alle Altersgruppen, Geschlecht: Insgesamt, Nationalität: Alle Nationalitäten, Art der Standardisierung: Standardbevölkerung "Deutschland 2011" *Erstellt unter www.gbe-bund.de → Recherche nach Themen → Krankheiten/Gesundheitsprobleme → Verdauungsorgane - Chronische Leberkrankheit und -zirrhose → Sterbefälle, Sterbeziffern (ab 1998), hier: Krankheiten der Leber. Abrufdatum: 14.11.2019*

Statistisches Bundesamt (b). Diagnosedaten der Krankenhäuser ab 2000 (Eckdaten der vollstationären Patienten und Patientinnen). Gliederungsmerkmale: Jahre, Behandlungs-/Wohnort, ICD10. Tabelle bezieht sich auf: Region: Deutschland, ICD10: K70-K77 Krankheiten der Leber bzw. K70 Alkoholische Leberkrankheit bzw. K73 Chronische Hepatitis, anderenorts nicht klassifiziert, Art der Standardisierung: Standardbevölkerung "Deutschland 2011" *Erstellt unter www.gbe-bund.de → Recherche nach Themen → Krankheiten/Gesundheitsprobleme → Verdauungsorgane - Chronische Leberkrankheit und -zirrhose → Diagnosedaten der Krankenhäuser (Eckdaten der vollstationären Patienten und Patientinnen), hier: Krankheiten der Leber → Tabelle verändern - ICD10. Abrufdatum: 14.11.2019*

Statistisches Bundesamt (c). Krankheitskosten in Mio. € für Deutschland. Gliederungsmerkmale: Jahre, Alter, Geschlecht, ICD10. Tabelle bezieht sich auf: Alter: Alle Altersgruppen. *Erstellt unter www.gbe-bund.de → Ausgaben, Kosten, Finanzierung → Kosten → Kosten allgemein/sonstiges → Krankheitskosten nach Alter, Geschlecht, ICD10 (ab 2015) → K00-K93 Krankheiten des Verdauungssystems. Abrufdatum 14.11.2019*

Suraweera D, Sundaram V, Saab S. Evaluation and Management of Hepatic Encephalopathy: Current Status and Future Directions; *Gut Liver*. 2016 Jul 15;10(4):509-19.

Tacke F, Trautwein C. Mechanisms of liver fibrosis resolution. *J Hepatol*. 2015 Oct;63(4):1038-9.

Tacke F, Weiskirchen R. An update on the recent advances in antifibrotic therapy. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2018 Nov;12(11):1143-1152.

Tag CG, Sauer-Lehnen S, Weiskirchen S, Borkham-Kamphorst E, Tolba RH, Tacke F, Weiskirchen R. Bile duct ligation in mice: induction of inflammatory liver injury and fibrosis by obstructive cholestasis. *J Vis Exp*. 2015 Feb 10;(96).

Tang G. siRNA and miRNA: an insight into RISCs. *Trends Biochem Sci*. 2005 Feb;30(2):106-14.

Tesfay M, Goldkamp WJ, Neuschwander-Tetri BA. NASH: The Emerging Most Common Form of Chronic Liver Disease. *Mo Med*. 2018 May-Jun;115(3):225-229.

Trim N, Morgan S, Evans M, Issa R, Fine D, Afford S, Wilkins B, Iredale J. Hepatic stellate cells express the low affinity nerve growth factor receptor p75 and undergo apoptosis in response to nerve growth factor stimulation. *Am J Pathol*. 2000 Apr;156(4):1235-43.

Tsuchida T, Friedman SL. Mechanisms of hepatic stellate cell activation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017 Jul;14(7):397-411.

Turecek PL, Bossard MJ, Schoetens F, Ivens IA. PEGylation of Biopharmaceuticals: A Review of Chemistry and Nonclinical Safety Information of Approved Drugs. *J Pharm Sci.* 2016 Feb;105(2):460-475.

Wandzioch E, Kolterud A, Jacobsson M, Friedman SL, Carlsson L. Lhx2^{-/-} mice develop liver fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Nov 23;101(47):16549-54.

Wang J, Chu ES, Chen HY, Man K, Go MY, Huang XR, Lan HY, Sung JJ, Yu J. microRNA-29b prevents liver fibrosis by attenuating hepatic stellate cell activation and inducing apoptosis through targeting PI3K/AKT pathway. *Oncotarget.* 2015 Mar 30;6(9):7325-38.

Watanabe M, Murata S, Hashimoto I, Nakano Y, Ikeda O, Aoyagi Y, Matsuo R, Fukunaga K, Yasue H, Ohkohchi N. Platelets contribute to the reduction of liver fibrosis in mice. *J Gastroenterol Hepatol.* 2009 Jan;24(1):78-89

Weiskirchen R, Weiskirchen S, Tacke F. Recent advances in understanding liver fibrosis: bridging basic science and individualized treatment concepts. *F1000Res.* 2018 Jun 27;7.

Welsch U. Sobotta Lehrbuch Histologie, 2.A. Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, München (2006).

Wilhelm W. Praxis der Intensivmedizin, 2. Auflage. ISBN-13: 978-3642344329. Springer Verlag, 2013.

Wong L, Yamasaki G, Johnson RJ, Friedman SL. Induction of beta-platelet-derived growth factor receptor in rat hepatic lipocytes during cellular activation in vivo and in culture. *J Clin Invest.* 1994 Oct;94(4):1563-9.

World Health Organisation (WHO) 2019 (a). Mortality Database. ASDR per 100 000 - Diseases of the liver, both sexes <http://apps.who.int/healthinfo/statistics/mortality/whodpms/>. Select Parameters → Indicators: Age-standardized death rates per 100 000 world standard population - ASDR per 100 000 - Diseases of the liver, both sexes World Health Organization → Years - Last available → Tables – Table A. (WHO), 2019. Abrufdatum 14.11.2019.

World Health Organisation (WHO) 2019 (b). Recorded alcohol per capita consumption, from 2010, Updated May 2018. <http://apps.who.int/gho/data/node.gisah.A1039?lang=en&showonly=GISAH>. World Health Organization (WHO), 2019. Abrufdatum 14.11.2019.

Worlicek H, Börner N. Trotz allem eine geschätzte Methode. *Z Gastroenterol* 2017; 55(05): 518-520.

Yang C, Zeisberg M, Mosterman B, Sudhakar A, Yerramalla U, Holthaus K, Xu L, Eng F, Afdhal N, Kalluri R. Liver fibrosis: insights into migration of hepatic stellate cells in response to extracellular matrix and growth factors. *Gastroenterology* 2003; 124:147–159.

Yanguas SC, Cogliati B, Willebrords J, Maes M, Colle I, van den Bossche B, de Oliveira CPMS, Andraus W, Alves VAF, Leclercq I, Vinken M. Experimental models of liver fibrosis. *Arch Toxicol.* 2016 May;90(5):1025-1048.

Yavrom S, Chen L, Xiong S, Wang J, Rippe RA, Tsukamoto H. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma suppresses proximal alpha1(I) collagen promoter via inhibition of p300-facilitated NF- κ B binding to DNA in hepatic stellate cells. *J Biol Chem*. 2005 Dec 9;280(49):40650-9.

Yoon YJ, Friedman SL, Lee YA. Antifibrotic Therapies: Where Are We Now? *Semin Liver Dis*. 2016 Feb;36(1):87-98.

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 Jul;64(1):73-84.

Zeisberg M, Yang C, Martino M, Duncan MB, Rieder F, Tanjore H, Kalluri R. Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition. *J Biol Chem* 2007; 282:23337–23347.

9 Danksagung

Ich danke meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, Großeltern, meinem Bruder und meiner Verlobten, die mich stets mit vielen aufmunternden Worten und Taten unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau Dr. rer. nat. Kerstin Abshagen, deren praktischer, theoretischer und vor allem menschlicher Unterstützung ich mir stets sicher sein konnte.

Auch dem Team des Rudolf-Zenker-Instituts für experimentelle Chirurgie in Rostock sowie insbesondere der Institutsleiterin Frau Professor Dr. med. Brigitte Vollmar möchte ich für die Hilfe und die auch bei hoher Arbeitsbelastung stets sehr angenehme Zeit danken.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei Herrn Professor Dr. med. Wolfram Wilhelm, dem Chefarzt der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin am Klinikum Lünen, der mir durch geschickte Dienstplanung den einen oder anderen Tag zum Schreiben der Dissertation ermöglicht hat.

Auch wenn es ungewöhnlich klingen mag, gilt mein Dank zuletzt den verstorbenen Versuchstieren, welche für die medizinische Forschung ihr Leben ließen.

10 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Antifibrotische Effekte von DBTC-Foxf1 siRNA-Formulierungen im murinen Modell der cholestatischen Leberfibrose“ selbstständig angefertigt habe und mir darüber hinaus keine weitere Hilfe zuteilgeworden ist.

Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen wurden als solche gekennzeichnet.

Ich versichere, dass bei der Anfertigung der Dissertation keine anderen als die in der Arbeit genannten Hilfsmittel genutzt wurden.

Dortmund, den 25.11.2019

Malte Brensel