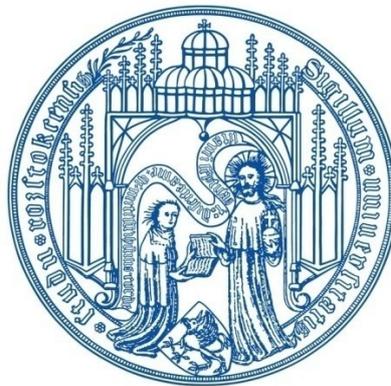


Aus dem  
Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie  
der Universitätsmedizin Rostock  
Direktorin: Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar

# **Leberspezifisches Silencing von Repin 1 in der steatotischen Leber**



Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin  
der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von  
Felix Fischer, geb. 26.11.1991 in Marl  
Rostock 2021  
Dekan: Prof. Dr. med. Emil Reisinger

Dekan: Prof. Dr. med. Emil Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar, Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie, Universitätsmedizin Rostock
2. Gutachter: PD Dr. med. habil. Sebastian Hinz, Hepatobiliäre Chirurgie und Transplantationschirurgie, Universitätsmedizin Rostock
3. Gutachter: Prof. Dr. med. Iyad Kabar, Klinik für Allgemeine Innere Medizin, Raphaelsklinik Münster, zuvor Universitätsklinikum Münster

Eröffnung des Promotionsverfahrens: 28.06.2021

Datum der Promotionsverteidigung: 26.01.2022

*In Dankbarkeit  
meinen Eltern*

**Inhalt**

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....                        | <b>7</b>  |
| <b>2</b> | <b>Zusammenfassung</b> .....                              | <b>9</b>  |
| <b>3</b> | <b>Einleitung</b> .....                                   | <b>11</b> |
| 3.1      | Nichtalkoholische Fettlebererkrankungen .....             | 11        |
| 3.1.1    | Definition .....  | 11        |
| 3.1.2    | Epidemiologie .....                                       | 12        |
| 3.1.3    | Ätiologie und Pathogenese .....                           | 13        |
| 3.1.4    | Diagnostik und Therapie .....                             | 15        |
| 3.2      | NASH-Fibrose-Tumor Mausmodell.....                        | 17        |
| 3.3      | Repin 1.....  | 18        |
| 3.4      | siRNA.....  | 21        |
| 3.5      | Lipoplex- Formulierungen.....                             | 23        |
| <b>4</b> | <b>Zielsetzung und zentrale Fragestellung</b> .....       | <b>25</b> |
| <b>5</b> | <b>Material und Methoden</b> .....                        | <b>26</b> |
| 5.1      | Versuchstiere .....                                       | 26        |
| 5.2      | Versuchsaufbau .....                                      | 27        |
| 5.3      | Praktisches Vorgehen .....                                | 29        |
| 5.3.1    | Gewicht- und Blutzuckermessung.....                       | 29        |
| 5.3.2    | Anästhesie.....   | 29        |
| 5.3.3    | Intravenöse Applikation der Lipoplex-Formulierungen ..... | 30        |
| 5.3.4    | Blut- und Gewebeentnahme .....                            | 31        |
| 5.4      | Untersuchungstechniken.....                               | 32        |
| 5.4.1    | Intravitalmikroskopie .....                               | 32        |
| 5.4.2    | Vollblutanalyse .....                                     | 34        |
| 5.4.3    | Plasmaanalyse .....                                       | 34        |
| 5.4.4    | Histologie.....   | 34        |
| 5.4.5    | Immunhistochemie.....                                     | 37        |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 5.4.6    | Multiplex-Zytokinanalyse.....  | 39        |
| 5.4.7    | Fettsäure-Profilng .....   | 39        |
| 5.4.8    | mRNA–Analytik .....  | 40        |
| 5.5      | Statistik .....  | 42        |
| <b>6</b> | <b>Ergebnisse .....</b>  | <b>43</b> |
| 6.1      | Allgemeinzustand der Tiere.....  | 43        |
| 6.2      | Studienabschnitt 1 - Intrahepatische Verteilung der Lipoplexe .....        | 43        |
| 6.3      | Studienabschnitt 2 - Repin1-Expressionskinetik nach siRNA-Behandlung ..... | 47        |
| 6.4      | Studienabschnitt 3 - Therapieansatz .....                                  | 48        |
| 6.4.1    | Repin1-Knockdown.....  | 48        |
| 6.4.2    | Körpergewicht & Leber-/Körpergewichts-Index .....                          | 48        |
| 6.4.3    | Blutzucker.....  | 50        |
| 6.4.4    | Plasma-Triglyzeride .....  | 51        |
| 6.4.5    | Vollblutanalyse .....  | 51        |
| 6.4.6    | NAFLD-Activity Score .....   | 54        |
| 6.4.7    | Lipidgehalt.....   | 55        |
| 6.4.8    | Lipidklassen.....  | 56        |
| 6.4.9    | Fettsäureprofilng .....  | 57        |
| 6.4.10   | Fettsäuretransporter .....   | 62        |
| 6.4.11   | CAE.....   | 63        |
| 6.4.12   | Zytokine.....  | 65        |
| 6.4.13   | Fibrose .....  | 67        |
| 6.4.14   | Proliferation .....  | 69        |
| <b>7</b> | <b>Diskussion .....</b>  | <b>71</b> |
| 7.1      | Material und Methoden.....   | 71        |
| 7.2      | Ergebnisse .....   | 75        |
| 7.3      | Zusammenfassung und Ausblick.....  | 85        |
| <b>8</b> | <b>Thesen zur Dissertation .....</b>                                       | <b>86</b> |

|           |   |            |
|-----------|---|------------|
| <b>9</b>  | <b>Literaturverzeichnis.....</b>                | <b>88</b>  |
| <b>10</b> | <b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....</b> | <b>100</b> |
| <b>11</b> | <b>Danksagung.....</b>                          | <b>103</b> |
| <b>12</b> | <b>Lebenslauf.....</b>                          | <b>104</b> |
| <b>13</b> | <b>Selbständigkeitserklärung.....</b>           | <b>105</b> |

## 1 Abkürzungsverzeichnis

|               |   |
|---------------|---|
| ALT           | Alaninaminotransferase  |
| CAE           | Chlorazetatesterase   |
| CD36          | cluster of differentiation 36                                 |
| CT            | Computertomographie   |
| Cy-3          | Cyanin 3  |
| DAMPS         | damage-associated molecular patterns                          |
| DAPI          | 4',6-Diamidin-2-phenylindol                                   |
| DEPC          | Diethyldicarbonat   |
| DHA           | Docosahexaensäure   |
| EMR1          | EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1 |
| ER            | Endoplasmatisches Retikulum                                   |
| EZM           | Extrazelluläre Matrix   |
| FFS           | freie Fettsäuren  |
| $\gamma$ -GT  | $\gamma$ -Glutamyltransferase                                 |
| GLDH          | Glutamatdehydrogenase   |
| GLUT          | Glukosetransporter  |
| HCC           | Hepatozelluläres Karzinom                                     |
| HE            | Hämatoxylin-Eosin-Färbung                                     |
| HFD           | Hochfettdiät  |
| IL            | Interleukin   |
| i.p.          | intraperitoneal   |
| IUPAC         | International Union of Pure and Applied Chemistry             |
| KG            | Körpergewicht   |
| MCP           | human monocyte chemoattractant protein-1                      |
| miRNA         | Mikro-Ribonukleinsäure  |
| mRNA          | Boten-Ribonukleinsäure  |
| NAFLD         | nichtalkoholische Fettlebererkrankung                         |
| NAS           | NAFLD-Activity-score  |
| NASH          | nichtalkoholische Steatohepatitis                             |
| NETs          | neutrophil extracellular traps                                |
| PBS           | Phosphat-gepufferter Salzlösung                               |
| PCNA          | proliferating cell nuclear antigen                            |
| PDGF- $\beta$ | platelet derived growth factor- $\beta$                       |
| PNPPLA3       | patatin-like phospholipase domain containing 3-Gen            |
| PPAR $\gamma$ | Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor $\gamma$          |
| PTEN          | phosphatase and tensin homolog                                |

## Zusammenfassung

---

|               |   |
|---------------|---|
| PUFA          | mehrfach-ungesättigte Fettsäuren                              |
| QTL           | quantitative trait locus                                      |
| Repin1        | replication initiator 1                                       |
| RHS           | Retikulohistiozytäre System                                   |
| RISC          | RNA-induced silencing complex                                 |
| RNAi          | RNA-Interferenz   |
| ROS           | reaktive Sauerstoffspezies                                    |
| RT-PCR        | Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion               |
| SD            | Standardabweichung  |
| SEM           | Standardfehler des Mittelwertes                               |
| siRNA         | small interfering-Ribonukleinsäure                            |
| Snap23        | synaptosomal-associated protein                               |
| SNARE         | soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor |
| SNP           | Einzelnukleotid-Polymorphismus                                |
| STZ           | Streptozotocin  |
| TGF- $\beta$  | transforming growth factor                                    |
| TNF- $\alpha$ | Tumornekrosefaktor- $\alpha$                                  |
| TTT           | Trinukleotid-Wiederholung                                     |
| UPR           | unfolded protein response                                     |
| Vamp4         | vesicle-associated membrane protein 4                         |
| Wt            | Wildtyp   |

### 2 Zusammenfassung

Die *nichtalkoholische Fettlebererkrankung* (NAFLD) stellt mit einer Inzidenz von ca. 30% innerhalb der westlichen Bevölkerung schon heute eine der wesentlichen Erkrankungen unserer, gegenwärtig in hohem Maße konsumorientierten, Gesellschaft dar. Der drastische Anstieg der Erkrankungsdichte wird sich in den nächsten Jahren weiter auf die sogenannten Schwellen- und Entwicklungsländer ausweiten und der daraus resultierende sozioökonomische Schaden wird sich weltweit vervielfachen. Bereits im Jahre 2016 verursachte der Formenkreis der NAFLD allein in den Vereinigten Staaten von Amerika Kosten von 103 Billionen US-\$, mit einer stetig steigenden Tendenz. Bis auf eine Anpassung des Lebensstils, welches eine konsequente Umstellung der Ernährungsgewohnheiten miteinschließt, gibt es aktuell keinen wirkungsvollen therapeutischen Ansatz, geschweige denn eine pharmakologische Therapie. Forschungsergebnisse aus den letzten Jahren konnten das polydaktyle Zinkfingerprotein *replication initiator 1* (Repin1) als Kandidatengen für die Ausbildung von Adipositas, Dyslipidämien und gestörter Glukosetoleranz charakterisieren. *In vivo* Versuche an leberspezifischen Repin1-defizienten Mäusen zeigten, dass eine verminderte hepatische Expression von Repin1 mit reduzierten Triglyzeridwerten, einem geringerem Gesamtkörperfettanteil und einer höheren Insulinsensitivität einhergeht. Diese für die Entstehung einer NAFLD bestimmenden Faktoren legen nahe, dass sich eine verminderte Expression von Repin1 auch positiv auf die Entstehung und Progression einer NAFLD auswirkt. Daher überprüft die vorliegende Studie die Wirksamkeit eines leberspezifischen Silencing des Zielgens Repin1 auf die Entwicklung einer Steatose im murinen STAM™ Mausmodell. Der leberspezifische Repin1-Knockdown wurde über eine *small interfering RNA* (siRNA)-basierte RNA-Interferenz realisiert. Die als Transportsystem für die siRNA genutzten Lipoplexe (CMD, Hepaplex2) zeigten dabei eine leberspezifische Anreicherung sowie eine gute Verträglichkeit ohne toxische Nebeneffekte. Ein suffizienter Knockdown des Zielgens Repin1 wurde über wiederholte Applikationen der Lipoplex-Formulierung in die V. jugularis alle 72 h und über einen Therapiezeitraum von 14 Tagen erzielt. Im Betrachtungszeitraum zeigten sich zwischen den Behandlungsgruppen keine signifikanten Unterschiede im Bereich der generalisierten Lipidakkumulation, dem NAS (NAFLD-Activity-scores) sowie dem Blutbild und Leber/Körpergewichts-Index. Nach zweiwöchiger Therapie ließ sich jedoch eine geminderte inflammatorische Aktivität innerhalb des Lebergewebes in den siRepin1-behandelten Versuchstieren nachweisen. Gegenüber den Kontrollgruppen, die mit Pufferlösung bzw. einer nonsense-RNA-Formulierung behandelt wurden, resultierte die siRNA-induzierte Repin1-Defizienz in einer signifikant verminderten Granulozyten- und Makrophageninfiltration sowie in einer reduzierten systemischen Konzentration der

## Zusammenfassung

---

proinflammatorischen Zytokine *human monocyte chemoattractant protein* (MCP), *Interleukin* (IL) -6, IL-1 $\beta$  und *Tumornekrosefaktor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ). Das als Fibrosemarker etablierte Kollagen-1 $\alpha$  zeigte sich sowohl in der histologischen Aufarbeitung als auch in der Expressionsanalytik innerhalb der mit siRepin1-behandelten Versuchstiere als quantitativ vermindert. Eine reduzierte hepatische Expression des Proliferationsmarkers *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) sowie die geringere Plasmakonzentration der *Glutamatdehydrogenase* (GLDH) lassen auf einen verminderten Leberschaden in den siRepin1-behandelten Tieren schließen.

Eine geringere Anreicherung der verwendeten Lipoplex-Formulierungen in verfettetem Lebergewebe weist darauf hin, dass der hier beschriebene Therapieansatz bei milden Ausprägungsformen der NAFLD bzw. am effektivsten in einem präventiven Ansatz zur Inhibition der NAFLD Progression eingesetzt werden könnte.

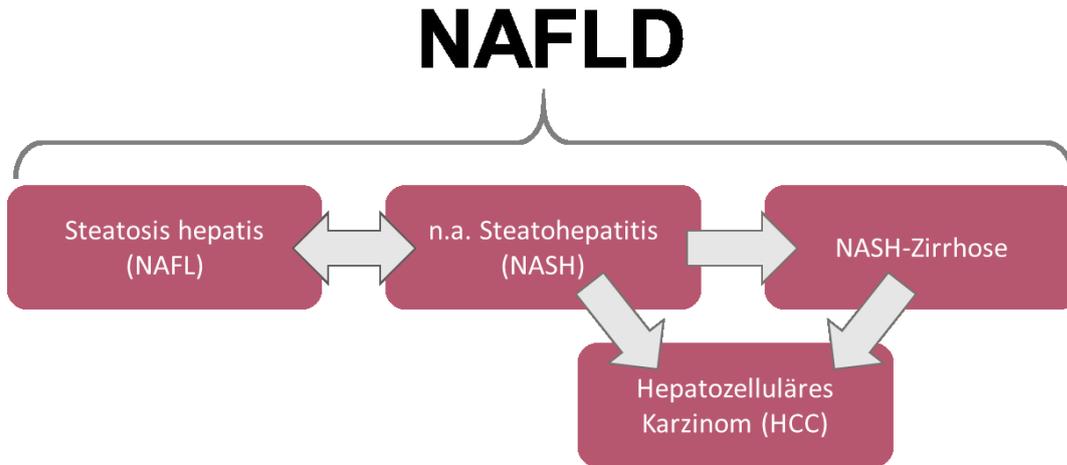
### 3 Einleitung

#### 3.1 Nichtalkoholische Fettlebererkrankungen

##### 3.1.1 Definition

Der Formenkreis der NAFLD ist durch eine makrovesikuläre Anreicherung von Triglyzeriden im Hepatozyten definiert. Dabei werden drei Ausprägungsformen unterschieden, die fließend ineinander übergehen können (Abb. 1).

Die einfache Fettleber oder Steatosis hepatis bildet das, in der Mehrzahl der Fälle symptomlose, Grundstadium der Erkrankung. Ab einer Gesamtfettmasse von  $\geq 5\%$  des Lebergewichts oder einer großlumigen Verfettung von  $\geq 50\%$  der Hepatozyten spricht man dabei von einer Steatosis hepatis (Herold, 2018). Der Übergang in die *nichtalkoholische Steatohepatitis* (NASH) wird durch das Auftreten entzündlicher Zellinfiltrate sowie durch andere histomorphologisch mit Zellschädigung korrelierenden Prozessen markiert. Da eine Abgrenzung zur alkoholischen Steatohepatitis histologisch nicht möglich ist, muss ein Alkoholkonsum von mehr als 20 g/d Alkohol ausgeschlossen sein. Statistisch gesehen entwickeln ca. 25 % der Patienten mit einer Steatosis hepatis eine NASH. Die mikronoduläre Leberzirrhose oder „Fettzirrhose“ kann sich als Endstadium dieser Erkrankung entwickeln. Chronische Inflammation und Untergang der Hepatozyten führen dabei zu einem Remodelling des Lebergewebes mit übermäßiger Einlagerung von Kollagen und insuffizienten Vaskularisierung. Das Fortschreiten der Erkrankung kann bis zu einem irreversiblen Funktionsverlust des Lebergewebes führen, der letzten Endes nur noch durch eine Transplantation therapiert werden kann (Herold, 2018; Classen Innere Medizin, 2010). Sowohl das Bestehen einer NASH, als auch die NASH-Zirrhose erhöhen das Risiko für die Entstehung eines *hepatozellulären Karzinoms* (HCC) dabei signifikant. In der westlichen Welt wird die NAFLD als der häufigste Grund für eine solche Tumorerkrankung angeführt (Brunt et al., 2015).



**Abb. 1:** Schematische Darstellung des Formenkreises der NAFLD. Reversibler (Steatosis hepatis/NASH) bzw. irreversibler Übergang (NASH/NASH-Zirrhose) zwischen den verschiedenen Stadien mit erhöhter Inzidenz für das Auftreten eines HCCs.

### 3.1.2 Epidemiologie

Mit einer Prävalenz von ca. 30 % unter der adulten Bevölkerung stellt die NAFLD die häufigste Lebererkrankung in großen Teilen der industrialisierten Welt dar (Herold, 2018). Dabei lassen sich deutliche Unterschiede zwischen verschiedenen ethnischen Gruppen feststellen. So ist auch unter Berücksichtigung des sozioökonomischen Status die Prävalenz der NAFLD in der lateinamerikanischen Bevölkerung gegenüber der afroamerikanischen deutlich erhöht (Browning et al., 2004). Die kaukasische Bevölkerung fügt sich zwischen diesen zwei Gruppen ein (Bambha et al., 2012). Welsh et al. zeigten bereits 2013, dass sich das Vorkommen einer NAFLD in der amerikanischen Bevölkerung in den vergangenen zwei Dekaden mehr als verdoppelt hat (Welsh et al., 2013). Anhand von Untersuchungen, die in Mecklenburg-Vorpommern durchgeführt wurden, bestätigten sich diese alarmierenden Zahlen auch für die deutsche Bevölkerung. Es wurden bei 38% der Männer sowie bei 22 % der Frauen sonographische Hinweise für eine Steatosis hepatis gefunden (Haring et al., 2009). Auch bei Kindern und jungen Erwachsenen nimmt die Erkrankungsdichte rasant zu. Genau wie in der erwachsenen Bevölkerung ist hier vor allem die ansteigende Prävalenz von Adipositas und Insulinresistenz ein Hauptfaktor. Eine Metaanalyse, basierend auf größtenteils in Amerika durchgeführten Studien zur NAFLD, zeigte bereits bei 7,6 % der untersuchten Kinder eine makrovesikuläre Verfettung des Lebergewebes (Anderson et al., 2015). Eine Studie des Texas Liver Institute in San Antonio kam zu der alarmierenden Erkenntnis, dass die NASH die am schnellsten wachsende Ursache für Lebertransplantationen in der jungen amerikanischen Bevölkerung ist. Im

beobachteten Zeitraum (2002-2012) verneunfachte sich die Anzahl von Lebertransplantationen aufgrund einer NASH und stieg auf einen Anteil von 4,46 % in der Altersgruppe 18 bis 40 Jahre an (Doycheva et al., 2017). In der amerikanischen Gesamtbevölkerung ist sie hinter der chronischen Hepatitis C die zweithäufigste Ursache für eine Transplantation und wird diese bei konstanter Entwicklung innerhalb der nächsten Dekade ablösen (Anstee et al., 2013). Die überwältigende Zahl an Betroffenen lässt erahnen, welche Belastung durch die NAFLD weltweit für die Gesundheitssysteme entstehen. So verursachen Schätzungen zur Folge in den vier europäischen Staaten Deutschland, Frankreich, Italien und Großbritannien, kumulativ 52 Millionen Patienten, jährliche Kosten von 35 Billionen €. Eingeschlossen sind hierbei nur die unmittelbar durch die Erkrankung und Therapie entstandenen Kosten. In den Vereinigten Staaten werden diese Werte sogar mit ca. 64 Millionen Erkrankten und jährlichen Kosten von 103 Billionen US-\$ noch übertroffen (Younossi et al., 2016).

### 3.1.3 Ätiologie und Pathogenese

Wie bei einem Großteil chronischer Erkrankungen werden die NAFLD und ihre Entstehung durch ein Zusammenspiel von vielen sowohl endogenen als auch exogenen Faktoren beeinflusst. Nachweislich gibt es starke Korrelationen zwischen dem Auftreten einer NAFLD und anderen Stoffwechselerkrankungen wie Diabetes mellitus, Adipositas und Dyslipidämien (Loomba et al., 2012). Bei Typ-2-Diabetikern konnte in einer auf sonographischen Untersuchungen basierenden Studie bei 69 % der Probanden eine NAFLD nachgewiesen werden (Leite et al., 2009). Vergleichbare Zahlen wurden bei Patienten mit diagnostizierter Dyslipidämie gefunden. Innerhalb dieses Patientenkollektivs wurde bei 50 % der Untersuchungen eine Steatose nachgewiesen (Assy et al., 2000). Als allgemeine Risikofaktoren gelten ebenfalls männliches Geschlecht (Ayonrinde et al., 2011), höheres Alter und ein hoher BMI (Gerber et al., 2012). Dabei scheint eine viszerale Adipositas mit Erhöhung des Bauch- und Hüftumfangs als prädiktiv besonders ungünstig (Bruno et al., 2014 & Alberti et al., 2005). Die NAFLD zeigt hohe Prävalenzen in Patienten, die bereits im Kindes- und Jugendalter mit einer „westlich orientierten“ Ernährung aufgewachsen sind. Dieses inkludiert verarbeitetes rotes Fleisch sowie Konsum von zuckerhaltigen Getränken und Fertiggerichten (Oddy et al., 2013). Studien zeigten ebenfalls, dass eine übermäßige Kalorienzufuhr in Form von Säuglingsnahrung anstelle von Muttermilch mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung einer NAFLD einhergeht (Ayonrinde et al., 2017). Neugeborene von Müttern mit hohem BMI und einem Gestationsdiabetes zeigten im ersten Monat nach ihrer Geburt deutlich erhöhte Lipidkonzentrationen innerhalb des Lebergewebes (Brumbaugh et al., 2013). Gleichzeitig

korreliert das Auftreten eines Schwangerschaftsdiabetes mit erhöhter Prävalenz einer NAFLD mütterlicherseits (Firneisz & Gábor, 2014). Die Entwicklung einer NAFLD besitzt unumstritten auch eine hereditäre Komponente. So kommt es zu einem gehäuften Auftreten zwischen Familienangehörigen ersten Grades (Schwimmer et al., 2009). Weiterführende Betrachtungen zeigten ebenfalls auf, dass die Häufung zwischen monozygoten Zwillingen, jene der dizygoten noch deutlich übertrifft (Makkonen et al., 2009). Ein weiterer auf die bestehende genetische Komponente hinweisender Aspekt ist die im Abschnitt 3.1.2 bereits erläuterte Ungleichverteilung innerhalb verschiedener ethnischer Gruppierungen. Begründet durch diese Beobachtungen rückt die Identifikation der für die NAFLD-Entwicklung relevanten Genvarianten immer weiter in den Fokus der Forschung. Die Genvariante, die bis dato am deutlichsten mit der Entwicklung und Progression einer NAFLD assoziiert ist, ist der *single nucleotide polymorphism* (SNP) rs7388409 im *patatin-like phospholipase domain containing 3-Gen* (PNPPLA3). Die Korrelation des von Romeo et al. (2008) identifizierten Genmarkers und einer schnell progredienten NAFLD wurde bereits in mehreren Studien bestätigt (Sookoian & Pirola, 2011). Die Funktion des PNPPLA3-Proteins sowie anderer als potenzielle Genmarker für die Fettlebererkrankung klassifizierter Genvarianten sind jedoch noch nicht abschließend geklärt.

Die Entstehung der NAFLD basiert immer auf einem Überangebot an Fettsäuren, wobei die erhöhte Speicherung im Lebergewebe letztendlich zu einer inflammatorischen Reaktion führt. Pathophysiologisch wird das Auftreten einer NAFLD über die „multiple-hit“ Theorie erklärt (Buzzetti et al., 2016). Die im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Faktoren aus dem Bereich Ernährung, Lebensführung und Genetik führen innerhalb des Organismus zu einem übermäßigen Angebot an *freien Fettsäuren* (FFS) und Cholesterin. Eine Co-Existenz von Adipositas und eine Insulin-Resistenz induzieren zusätzlich eine Adipozyten-Dysfunktion sowie eine gesteigerte Lipolyse. Über den geminderten Einfluss des Insulins wird außerdem eine gesteigerte de novo-Fettsäuresynthese innerhalb des Lebergewebes induziert (Bugianesi et al., 2010) und die  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren inhibiert (Postic, & Girard, 2008). Das Überangebot an Fetten führt zur Akkumulation dieser innerhalb der Leber, hauptsächlich über die Veresterung von Glycerol und FFS in Form von Triglyzeriden (Jacome-Sosa et al., 2014). Gleichzeitig kommt es bei einem konstanten Überangebot zu Akkumulation von Metaboliten wie Diacylglycerol, Cholesterin, Phospholipiden und Ceramiden (Cheung & Sanyal, 2008). In den Hepatozyten kommt es bei andauernder Aufnahme von Fetten schließlich zu einem lipidtoxischen Effekt (Schaffer, 2003). Nach heutigen Erkenntnissen ist diese Lipidtoxizität multifaktoriell vermittelt, wobei die Wirkungsweise der einzelnen Fettsäuren und Metaboliten noch diskutiert wird (Alkhoury et al., 2009). Das Missverhältnis zwischen Stoffwechsellkapazität und Einspeisung von Fettsäuren induziert schließlich eine zelluläre Stressreaktion. Die Lipidüberladung der

Zellorganellen führt dabei zum einen zum vermehrten Aufkommen von toxischen Stoffwechselprodukten und *reaktiven Sauerstoffspezies* (ROS) in den Mitochondrien (Begriche et al., 2006), zum anderen kommt es zur Akkumulation von ungefalteten Proteinen im *Endoplasmatischen Retikulum* (ER). Die als Reparaturmechanismus durch das ER eingeleitete *unfolded protein response Reaktion* (UPR) kann bei anhaltender Funktionsstörung die zelluläre Apoptose einleiten (Cusi, 2009). Neben Dysfunktionen in den Mitochondrien und im ER wird auch eine vermehrte Expression von Rezeptoren aus der Toll-Like- (Shi et al., 2006) und Todes-Rezeptor Familie (Feldstein et al., 2003; Malhi et al., 2007) diskutiert. Eine anhaltende inflammatorische Antwort und erhöhte Apoptoserate aktivieren mediatorvermittelt die hepatischen Sternzellen und initiieren somit den Fibrosierungsprozess.

### 3.1.4 Diagnostik und Therapie

Klinisch zeigt sich der Großteil der Patienten als asymptomatisch oder präsentiert unspezifische Symptome, wie Müdigkeit, Schlafstörungen oder Druckgefühl im rechten Oberbauch. Die klinische Diagnose der NAFLD ist dementsprechend schwierig zu stellen und häufig eine inzidentelle Entdeckung. Ein Großteil der Patienten wird durch eine vorübergehende Erhöhung der Transaminasen oder eine Dichteänderung des Lebergewebes während einer abdominalen Bildgebung auffällig (Angulo, 2002). Die erwähnte Erhöhung der Leberenzyme, *Alanin-Aminotransferase* (ALT), *Aspartat-Aminotransferase* (AST) und  *$\gamma$ -Glutamyltransferase* ( $\gamma$ -GT) ist dabei als Screening Parameter nur eingeschränkt geeignet, da es lediglich in 20 % der Fälle zu einer signifikanten Erhöhung im Blutplasma kommt (Browning, 2006). Diskutiert wird ebenfalls der Nutzen von laborchemischen Parametern wie dem Ferritinspiegel und der Transferrinsättigung, die jedoch wenig Spezifität aufweisen. Genetische Marker, wie der beschriebene SNP im PNPLA3-Gen, bildet aufgrund einer niedrigen Effektgröße auf die Erkrankungsschwere aktuell aber noch keine Grundlage in der Diagnosefindung (Romeo et al., 2008). Um die Wahrscheinlichkeit einer möglichen NAFLD kosten- und zeiteffizient zu quantifizieren, wurden in den letzten Jahren vielfältige Risiko-Scores entwickelt. Scoring-Systeme wie der NAFLD Fibrosis Score, der sich aus den Parametern BMI, Alter, Diabetes, AST, ALT, Anzahl an Thrombozyten und Albumin berechnet, liefern prädiktiv gute Übereinstimmungen mit dem Fortschritt einer NAFLD (Angulo et al., 2007). In Kombination mit bildgebenden Verfahren ermöglichen sie eine gute Risikoeinschätzung und können Patienten identifizieren, die weiteren diagnostischen Schritten zugeführt werden sollten. Das Diagnostikum der ersten Wahl bildet die Sonographie. Sie ist nicht invasiv, kostengünstig und zeichnet sich durch flächendeckende Verfügbarkeit aus.

Einschränkungen bezüglich der Sensitivität sind jedoch besonders bei milderer Formen der Steatose zu beobachten, wo der positive Vorhersagewert abnimmt (Machado & Cortez-Pinto, 2013). Ebenfalls auf Ultraschallwellen basierend, zeichnet sich das Verfahren der Elastometrie durch einen guten prädiktiven Wert in Bezug auf den Fibrosegrad des Lebergewebes aus. So bietet es die Möglichkeit, nicht invasiv zwischen einer NASH und einer bestehenden Fett-Zirrhose zu unterscheiden. Da sich die dichteabhängige Ausbreitung der Ultraschallwellen jedoch nicht innerhalb großvolumiger Fettdepots und Flüssigkeitsansammlungen detektieren lässt, kann das Verfahren bei stark adipösen Patienten nur eingeschränkt verwendet werden (Gaia et al., 2011). Als weiteres bildgebendes Verfahren lässt sich eine Dichteänderung des Lebergewebes ebenfalls mit Hilfe der *Computertomographie* (CT)-Diagnostik ermitteln. Die CT ist dabei ein gut reproduzierbares und objektives Verfahren, sollte aber aufgrund der hohen Strahlenbelastung nicht als Primärdiagnostikum eingesetzt werden. Bei allen bildgebenden Verfahren zeichnen sich die MR-Techniken durch die höchste Genauigkeit aus (Lee & Park, 2014). Aufgrund von hohen Kosten und geringer Verfügbarkeit sind diese Techniken jedoch noch nicht im klinischen Alltag angekommen und meist der Forschung vorbehalten. Da es mit Hilfe von Bildgebungsverfahren nicht möglich ist, zwischen einer Steatosis hepatis und einer entzündlichen NASH zu differenzieren, bildet noch heute die invasive Leberbiopsie den Goldstandard bei der Diagnose einer fortgeschrittenen NAFLD. Aufgrund möglicher Komplikationen sollte eine Indikation jedoch erst nach sorgfältiger Abwägung und ausgeschöpfter Primärdiagnostik erfolgen. Auch bei der histologischen Betrachtung der durch Biopsie gewonnenen Präparate wurden Scoring-Systeme entwickelt, um eine objektive Wertung zu ermöglichen und ein Fortschreiten der Erkrankung quantifizieren zu können (Santiago-Rolón et al., 2015). Aufgrund eines Fehlens von spezifischen Markern handelt es sich bei einer NAFLD auch immer um eine Ausschlussdiagnose. Bei suspekten Befunden muss die Beteiligung von chronifizierenden Leberkrankungen, genetischen Stoffwechselstörungen sowie Medikamenten- und Alkoholabusus als Auslöser für eine Steatohepatitis abgeklärt werden. Die hohe Koinzidenz zwischen einer NAFLD und dem metabolischen Syndrom rechtfertigt hier ebenfalls eine umfassende kardiovaskuläre Abklärung. Basierend auf der heutigen Studienlage wird ein flächendeckendes Screening nicht empfohlen, sollte aber unter Berücksichtigung von Faktoren wie Komorbiditäten, hier speziell das metabolische Syndrom, sowie eine möglicherweise vorhandene familiäre Vorbelastung des Patienten individuell evaluiert werden (S2k-Leitlinie: Nicht-alkoholische Fettlebererkrankungen, Roeb et al., 2015).

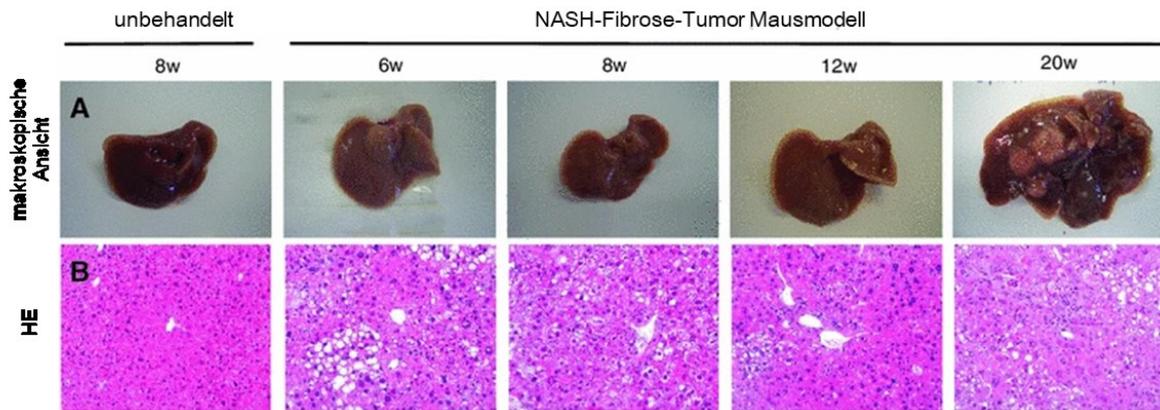
Begründet durch Ätiologie und Koinzidenz mit dem metabolischen Syndrom, bildet die Umstellung der Ernährung und des Lebensstils eine zentrale Rolle in der Therapie der NAFLD. So kann eine Gewichtsreduktion um 3-5 % des Körpergewichts bei adipösen

Patienten bereits nachweislich zu regredienter Verfettung der Hepatozyten führen und sich ab einem weiteren Gewichtsverlust von  $\geq 9$  % auch positiv auf die Nekroinflammation auswirken (Chalasani et al., 2012; Vilar-Gomez et al., 2015). Die Kombination mit sportlicher Aktivität zeigt sich hierbei als besonders effektiv (Promrat et al., 2010). Eine medikamentöse Behandlung der NAFLD wird von der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten aufgrund mangelhafter Datenlage aktuell nicht empfohlen. Derzeit befindet sich jedoch eine Vielzahl an medikamentösen Therapieansätzen in der Erprobung. Mehrere Studien konnten beispielsweise aufzeigen, dass das orale Antidiabetikum Pioglitazon Steatose und Inflammation verringern kann (Belfort et al., 2006). Da oxidativer Stress maßgeblich zur Leberzellschädigung beiträgt, wird Vitamin E als Antioxidans ebenfalls ein protektiver Effekt zugeschrieben. In der mehrjährig angelegten PIVENS-Studie zeigte sich bei den dauerhaft mit Vitamin E behandelten Probanden, im Vergleich zu der mit Placebo substituierten Kontrollgruppe, reduzierte Transaminasenspiegel, eine verminderte Steatose sowie Inflammation (Sanyal et al., 2010). Als ergänzendes Therapiekonzept im Stadium der fortgeschrittene NAFLD kann im weitesten Sinne auch die bariatrische Chirurgie gesehen werden. So zeigte Mathurin et al. (2009) in einer prospektiven Studie, dass stark adipöse NAFLD-Patienten von einem bariatrischen Eingriff profitieren können. Bereits nach einem Jahr wiesen sie sowohl eine signifikant geminderte Steatose als auch eine reduzierte Inflammation im Lebergewebe auf.

### 3.2 NASH-Fibrose-Tumor Mausmodell

Im vorliegenden Versuchsaufbau wurde das vom Stelic Institute & Co (Tokio, Japan) entwickelte Krankheitsmodell der STAM<sup>TM</sup> Mice genutzt. Dabei wird in dem von Fujii et al. (2013) erstbeschriebenen und im Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie etablierten Mausmodell (Liebig et al., 2018 & Abshagen et al., 2019) über die Applikation des  $\beta$ -Zellgiftes Streptozotocin (STZ) in Kombination mit einer hochfettreichen Ernährung eine aggressiv fortschreitende NAFLD provoziert (siehe Abschnitt 5.1). Die durch den Untergang der insulinproduzierenden Zellen ausgelöste diabetische Stoffwechsellage (Lenzen, 2008), gepaart mit einem Überangebot an Triglyzeriden, lässt die Versuchstiere dabei konsequent alle Stadien der nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung durchlaufen. Bereits nach einem Zeitraum von 6 Wochen *post partum* zeigt sich eine fulminante Steatosis hepatis, die sich über das Inflammationsstadium der NASH bis hin zu einer aufkommenden Fibrose und damit der NASH-Zirrhose in Woche 10 bis 12 entwickelt. Das Auftreten eines HCCs wird innerhalb der behandelten Mauspopulation vermehrt ab Woche 16 beobachtet (siehe Abb. 2). Aufgrund einer sehr guten Reproduzierbarkeit und schnellen

Progredienz der Erkrankung bietet dieses Mausmodell optimale Bedingungen für weiterführende Untersuchungen im Bereich der Pathophysiologie und Therapie der der NAFLD.



**Abb. 2:** A) Makroskopische Aufnahmen des Lebergewebes von STZ/HFD-behandelten Mäusen zu den charakteristischen Zeitpunkten 6, 8, 12 und 20 Wochen im Vergleich zu einem unbehandelten Tier im Alter von 8 Wochen. Deutlich zu erkennen ist die durch Fetteinlagerung bedingte Aufhellung des Leberparenchyms und die Bildung von neoplastischen Knoten im 20 Wochen-Stadium (Fujii et al., 2013). B) Histologische Aufarbeitung in Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) und selbiger Gruppenzuordnung. Deutliche Zunahme der Fetteinlagerung, vermehrtes zelluläres Ballooning und Vermehrung des bindegewebigen Anteils abhängig von der Behandlungsdauer (Fujii et al., 2013).

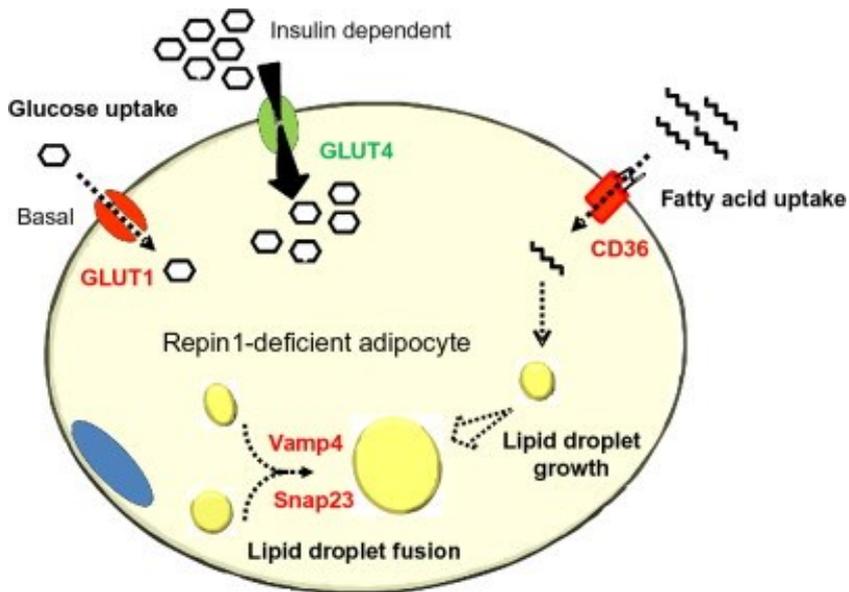
### 3.3 Repin 1

Repin1 wurde im Zuge von Untersuchungen des Dihydrofolatreduktase-Gens und den an dessen Replikation beteiligten Proteinen im chinesischen Streifenhamster entdeckt. Nach dessen Entdeckung im Jahre 1990 wurde das Protein zunächst unter dem Namen *replication initiation-region protein 60 kDa* (RIP 60) beschrieben (Dailey et al., 1990). Der Replikationsinitiator fungiert als polydaktyles Zinkfingerprotein mit 15 ubiquitär exprimierten  $C_2H_2$  Zinkfingermotiven, die in drei Clustern organisiert sind (Houchens et al., 2000) und dient innerhalb des Replikationszyklus sowohl als DNA bindendes als auch DNA biegendes Protein. Es heftet sich dabei an zwei ATT (Adenin/Thymin) - Sequenzen der ORi $\beta$ -Region an (Caddle et al., 1990). Da bisher über ein Plasmidreplikationsassay nur eine geringfügige replikationsfördernde Wirkung nachgewiesen wurde, besteht die Vermutung, dass Repin1 eher als Co-Faktor zur Identifikation des Replikationsstartpunktes dienen könnte (Houchens et al., 2000).

Bereits im Jahre 1998 konnte durch Kovács und Klötting ein *quantitative trait locus* (QTL) kodierend für Körpergewicht, Triglyzeridspiegel, Gesamtcholesterol sowie Insulinwirkung auf Chromosom 4 der Ratte lokalisiert werden. 2007 wurde dann durch Versuche mit kongenen und subkongenen Ratten im selben QTL Repin1 als maßgeblich relevant für die

Ausbildung eines polygenetisch vererbten metabolischen Syndroms klassifiziert (Klötting et al., 2007). Dabei korrelierte die Länge einer spezifischen *Trinukleotid-Repeat* (TTT)-Sequenz innerhalb des Repin1-Gens positiv mit dem Körpergewicht, VLDL-Cholesterolemie und Seruminsulin. Im Tierversuch zeigten sich die höchsten Repin1 Expressionslevel im Lebergewebe und viszeralem Fettgewebe (Klötting et al., 2007). Interessanterweise konnten durch Ruschke et al. (2010) im menschlichen Organismus deutliche Zusammenhänge zwischen dem Repin1 Expressionslevel im viszeralen Fettgewebe und der Körperfettmasse nachgewiesen werden. Charakteristisch ist dabei das deutlich gesteigerte Expressionslevel während der Adipogenese.

Dieselbe Arbeitsgruppe zeigte ebenfalls, dass ein Repin1-Knockdown in 3T3L1-Adipozyten zu einer wesentlich reduzierten Aufnahme von Palmitat führte. Als mögliche Erklärung wird die zeitgleich bestehende Reduktion der Expressionslevel von cluster of differentiation 36 (CD36) angeführt. Dieses multifunktionelle Protein fungiert sowohl als Scavenger-Rezeptor in apoptotischen Zellen als auch als Kollagenrezeptor für Thrombozyten. Darüber hinaus ist CD36 maßgeblich am Transport langkettiger Fettsäuren beteiligt (Pepino et al., 2014). In Versuchen mit CD36-defizienten Mäusen wurden erhöhte Spiegel von Triacylglycerol, Cholesterolemie und freien Fettsäuren im Plasma gemessen (Febbraio et al., 1999), wobei eine erhöhte Expression zu einem Anstieg der intrazellulären Fettsäuren führte (Su & Abumrad, 2009). Darüber hinaus zeigten Studien, dass eine erhöhte Expression von CD36 mit einer Insulinresistenz (Handberg et al., 2006) sowie einer erhöhten systemischen Inflammation (Silverstein, 2009) assoziiert ist. Die bereits beschriebenen *in vitro* Versuche von Ruschke et al. zeigten ebenfalls eine Reduktion der Adipozytengröße und der enthaltenen Lipidtropfen infolge des Repin1-Knockdowns. Die Anzahl an intrazellulären Fetttropfen mit einer Größe von über 5 µm wurde um 85 % reduziert, wobei die Gesamtzahl an Zellen unverändert blieb. Diese Ergebnisse lassen sich über eine signifikant geminderte Expression der *N soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor* (SNARE)-Proteine, *vesicle-associated membrane protein 4* (Vamp4) und *synaptosomal-associated protein 23* (Snap23) erklären. Über Knockdown-Versuche konnte für diese Proteine eine bedeutende Stellung für die Formation und Fusion von intrazellulären Lipiden bewiesen werden (Boström et al., 2007). Des Weiteren besitzt Repin1 über Modulation der Expression von Glukosetransportern einen Einfluss auf den Glukosestoffwechsel. Ruschke et al. (2010) beschrieben in den Repin1-defizienten Adipozyten eine signifikant verminderte basale Aufnahme von Glukose. Dieses basierte einer reduzierten Expression des insulinunabhängigen *Glukosetransporter 1* (GLUT1). Gleichzeitig konnte eine erhöhte Insulinsensitivität über eine Steigerung der Expression des insulinabhängigen GLUT4 beobachtet werden (siehe Abb. 3).



**Abb. 3:** Repin1-defizienter 3T3L1-Adipozyt. Eine verminderte Expression von CD36, Vamp4 und Snap23 sorgt sowohl für eine reduzierte Aufnahme von Fettsäuren in die Zelle als auch für eine reduzierte Größe der Lipidtropfen. Eine geringere Expression von GLUT1 und erhöhte Expression von GLUT4 resultiert in einer verminderten Grundaufnahme von Glukose, bei erhöhter Insulinsensitivität. Die Zellgröße ist gegenüber Adipozyten mit regulärer Repin1-Expression vermindert (Heiker und Klötting, 2013).

Interessanterweise zeigten Mäuse mit einer leberspezifischen Repin1-Defizienz (LRep<sup>-/-</sup>) gegenüber Wildtypen ein signifikant verringertes Körpergewicht im Alter zwischen 28 und 40 Wochen (Ruschke et al., 2010). Die Gesamtkörperfettmasse blieb dabei über das erste Lebensjahr bis zur 80. Woche vermindert. Die Tiere zeichneten sich zusätzlich durch eine verbesserte Insulinsensitivität und verminderte Aufnahme von Fettsäuren in die Leber aus und zeigten trotz Fütterung einer Hochfettdiät eine weniger stark ausgeprägte Adipozyten-Hypertrophie und geringeres hepatozelluläres Ballooning (Kern et al., 2014).

*In vivo* Versuche an verschiedenen Repin1-defizienten Mäusen konnten in den letzten Jahren wiederholt aufzeigen, dass eine verminderte Expression von Repin1 mit reduzierten Triglyzeridwerten, weniger Gesamtkörperfett und einer höheren Insulinsensitivität einhergeht (Kunath et al., 2016).

Neben den bereits dargestellten Ergebnissen bildet ein in unserer Arbeitsgruppe durchgeführter Versuch mit Repin1-defizienten Knockout-Mäusen die Basis für den in dieser Arbeit dargestellten Therapieansatz. Dabei wurden die verwendeten Knockout-Tiere entsprechend in das im Abschnitt 3.2 erläuterte NASH-Fibrose-Tumor Mausmodell inkludiert und über einen Zeitraum von 20 Wochen beobachtet. Die Repin1-defizienten Tiere zeigten im Vergleich zu Wildtypen eine signifikant geminderte Lipidakkumulation sowie eine Reduktion der chronischen Inflammation und der Zellschädigung innerhalb des

Lebergewebes. Ein Repin1-Knockout führte zudem zu einem reduzierten Leber/Körpergewichts-Index und einer geminderten Tumorprävalanz (Abshagen et al., 2019).

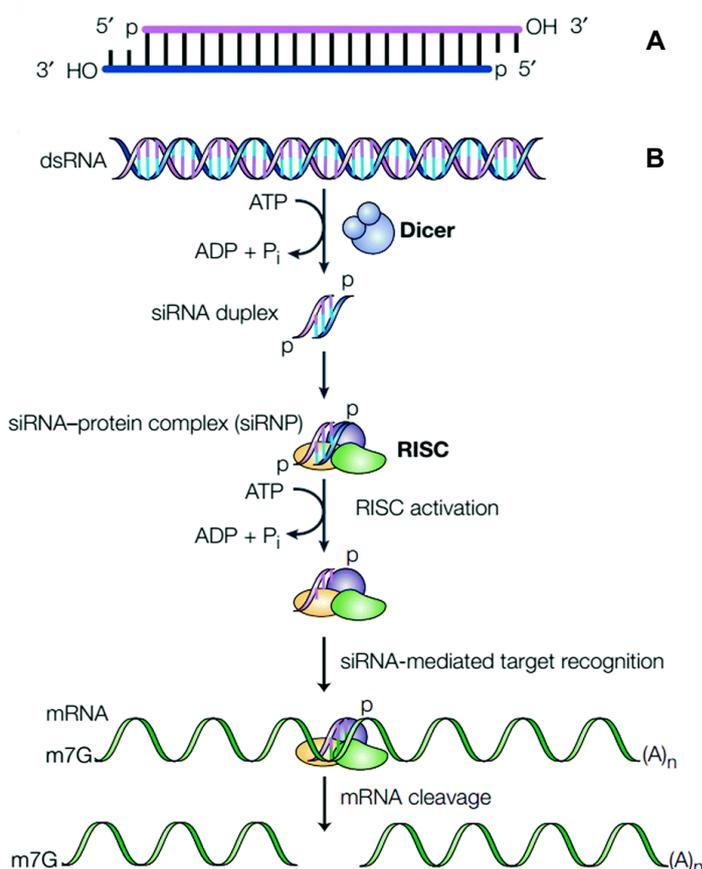
Neben den vielversprechenden Ergebnissen im Bereich der *in vitro*- und tierexperimentellen Testungen zeigen nun auch erste klinische Studien im Bereich der Humanmedizin den möglichen Einfluss von Repin1 auf die Entstehung und Progression der NAFLD. Patienten, bei denen eine durch Deletion von 12 Basenpaaren gekennzeichnete Variante des Repin1-Gens nachgewiesen wurde, zeigten im Vergleich zu Nicht-Deletionsträgern mit normalem Genotyp, einen reduzierten NAFLD-Activity-Score und eine geminderte Fibrosierung in entnommenen Leberbiopsien. Dabei führt die beschriebene Genvariation zur reduzierten *Boten-Ribonukleinsäure* (mRNA)-Aktivität und damit zu einem Funktionsverlust von Repin1 (Abshagen et al., 2020). Dieses unterstreicht die Betrachtung von Repin1 als Kandidatengen für die Ausbildung von Adipositas, Dyslipidämien, gestörter Glukosetoleranz und damit der NAFLD.

### 3.4 siRNA

Der Begriff der Genexpression charakterisiert die Umsetzung von der in DNA gespeicherten Information durch Transkription und Translation in Proteine. Durch Modulation der Genexpression wird eine Differenzierung von Zellen mit identischem Genom in verschiedene Zelltypen und Gewebe ermöglicht. So können die Expressionslevel der jeweiligen Proteine nicht nur der Zellidentität, sondern auch veränderten Stoffwechsellagen angepasst werden. Eine adaptierte Genexpression ist entscheidend für die Reaktion auf oxidativen Stress, toxische Substanzen oder Infekte. Darüber hinaus ist eine Veränderung der Genexpression ein zentraler Faktor bei der Entstehung von Neoplasien. Unter dem Begriff der Epigenetik werden die für die individuelle Genaktivität verantwortlichen Regulationsmechanismen zusammengefasst. Als übergeordnete Einteilung dienen hierbei Abweichungen der Chromatinstruktur auf der einen Seite und kovalente Modifikationen der DNA auf der anderen (Stryer Biochemie, 2018). Diese epigenetischen Regulationsmechanismen sind in der modernen Medizin ein beliebter Angriffspunkt für die Entwicklung von Therapieansätzen, die auf einer modifizierten Expression krankheitsrelevanter Gene basieren.

Einer der vielversprechendsten Ansätze ist die posttranskriptionell ansetzende *RNA-Interferenz* (RNAi). Dieser phylogenetisch alte in sämtlichen eukaryotischen Organismen existente Prozess (Cerutti & Casas-Mollano, 2006), wurde im Jahre 1998 erstmals im Fadenwurm *C. elegans* beschrieben (Fire et al., 1998). Andrew Fire und Craig Mello erhielten für ihre Arbeit im Jahre 2006 den Medizin-Nobelpreis. Aufgrund des hohen

therapeutischen Potenzials ist das Feld der RNAi seit einigen Jahren eines der meist behandelten Themen im Bereich der Biotechnologie und steht im Fokus weiterer Entwicklungen (Taroncher-Oldenburg & Marshall, 2007). Die RNA-Interferenz kann über zwei unterschiedliche Mechanismen erfolgen, die *Mikro-Ribonukleinsäure* (miRNA) vermittelte sowie die *small interfering-Ribonukleinsäure* (siRNA) vermittelte Interferenz (Stryer Biochemie, 2018). Die siRNA wird aus doppelsträngiger Vorläufer-RNA durch Ribonukleaseaktivität des Dicer-Enzymkomplexes synthetisiert. Sie ist ein 19 – 23 Basenpaare langes Ribonukleinsäuremolekül und führt an ihrem 3`-Ende einen Überhang aus 2 Nukleotiden. Die beschriebenen 3`-Enden tragen dabei freie Hydroxylgruppen, wobei die 5`-Enden phosphoryliert sind (siehe Abb.4 A). Nach vollendeter Prozessierung bindet das doppelsträngige siRNA-Molekül an den im Zytosol befindlichen *RNA induced silencing Komplex* (RISC-Komplex). Dessen katalytische Einheit, ein Protein der Argonauten Familie, spaltet die siRNA in Einzelstränge auf. Der ungebundene Strang wird daraufhin abgebaut. Unter Führung des verbliebenen Leitstranges bindet der aktivierte RISC-Komplex nun an die Ziel-mRNA. Bei bestehender Komplementarität erfolgt deren endonukleolytische Spaltung (siehe Abb.4 B). Die gespaltene mRNA kann somit nicht mehr als Matrize für die Proteinbiosynthese dienen und wird abgebaut (Meister & Tuschl, 2004). Auf diesem Wege greift die siRNA-vermittelte RNA-Interferenz in die Expression von Genen ein und erwirkt einen genspezifischen Knockdown.



**A** **Abb. 4:** Wirkmechanismus der siRNA vermittelten RNA-Interferenz.  
**B** A) Schematischer Aufbau eines siRNA-Moleküls.  
 B) Doppelsträngige Vorläufer-RNA wird über Prozessierung durch den Dicer Enzym-Komplex in ein siRNA-Molekül umgewandelt. Nach Einbau in den RISC und Trennung der Doppelstränge, katalysiert das Argonautenprotein 2 die Spaltung der Ziel-mRNA. (modifiziert nach Jinming et al., 2016).

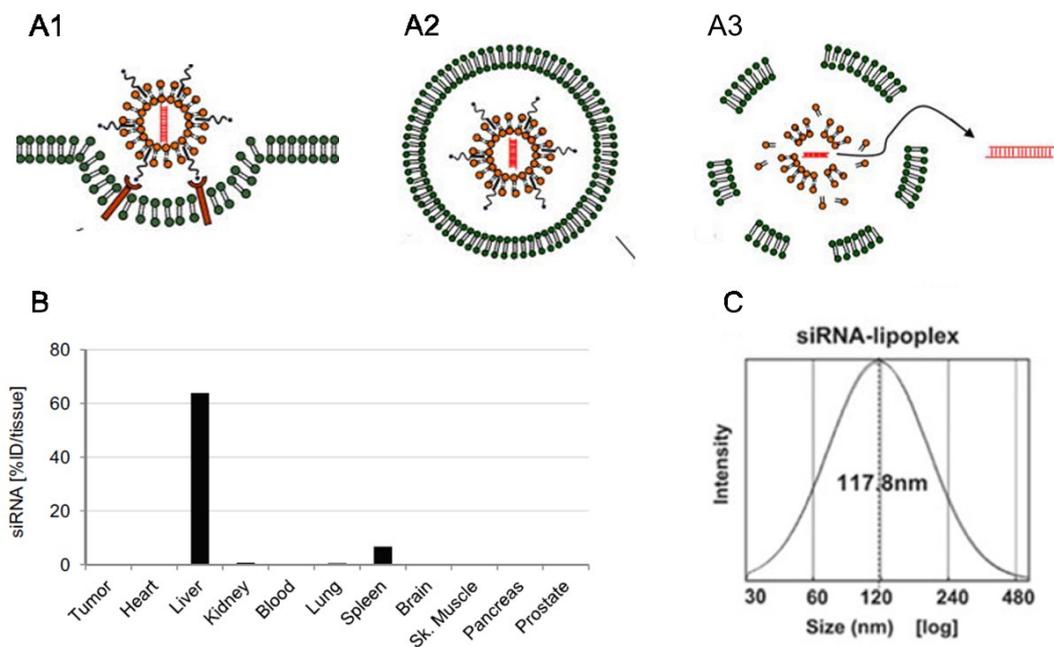
Die dargestellte siRNA-vermittelte Interferenz bietet einige Vorteile gegenüber der miRNA-vermittelten RNAi. Endogen eingebrachte miRNA wird zunächst über mehrere Zwischenstufen innerhalb des Zellkerns prozessiert, bevor sie sich an den Dicer-Komplex anlagert und den in Abb. 4 B erläuterten Spaltungsmechanismus auslöst (Meister & Tuschl, 2004). Dagegen wird siRNA als Dicer-Produkt erkannt und unter Umgehung der frühen RNAi-Schritte auf direktem Wege in den RISC geladen. Dabei verringert sich das Risiko für unerwünschte Interaktionen auf genregulatorischer Basis. Darüber hinaus bindet exogen synthetisierte siRNA durch ihre vollständige Komplementarität sehr spezifisch, sie ist vergleichsweise einfach in ihrer Entwicklung und besitzt kaum systemische Toxizität (Malhi et al., 2006).

Ein zentraler Aspekt und Ziel in der Arbeit mit chemisch synthetisierter siRNA ist die intrazelluläre Wirkung im gewünschten Zielorgan bzw. Zielzellen zu erreichen. Die siRNA-Moleküle sind durch die hohe Anzahl anionischer Bindungen ihres Phosphatrückgrats stark hydrophil. Zusätzlich besitzen sie eine Größe von über 10 kDa und sind dementsprechend nicht membrangängig. In den letzten Jahren wurden dahingehend vielfältige Transportformen entwickelt. Diese unterscheiden sich jeweils in ihrer Effizienz und Anwendbarkeit auf Zellen bzw. den Organismus. Neben physikalischen Methoden der siRNA Einschleusung, wie Mikroinjektionstechniken oder Elektroporation, gibt es Modelle, die zellpenetrierende Peptide in Konjugation mit siRNA-Molekülen nutzen. Einen anderen vielversprechenden Ansatz zur Einschleusung von siRNA bietet die Nutzung von lipidbasierten Transfektionsreagenzien. Diese kationischen Lipide können über elektrostatische Wechselwirkungen mit siRNA-Molekülen Komplexe formen. Über einen derartigen apomorphen Komplex können die Moleküle über Endozytose in die Zelle aufgenommen werden, gleichzeitig sind sie vor einer Beschädigung durch zelluläre Nukleasen geschützt (Kanasty et al., 2013).

### **3.5 Lipoplex-Formulierungen**

Um eine möglichst effiziente Transfektion der im vorliegenden Versuchsaufbau genutzten siRNA-Moleküle zu erreichen, wurden durch unseren Kooperationspartner Silence Therapeutics GmbH (Berlin, Deutschland) zwei aus kationischen Lipidverbindungen bestehende Transportsysteme entwickelt. Wie bereits im vorangegangenen Abschnitt beschrieben, schließen die als Lipoplexe bezeichneten Transportvesikel aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen negativ geladene siRNA in ihre Lipidhülle ein und vergrößern damit deren Plasmahalbwertszeit sowie die Penetrationsfähigkeit durch die Zellmembran. Durch Modifizierung der Molekülgröße und Anpassung der spezifischen Ladung kann eine hohe Organspezifität erreicht werden. Die durch Silence Therapeutics

zur Verfügung gestellten Lipidformulierungen „CMD78“ und „Hepaplex2“ besitzen eine Größe von ca. 100 nm sowie neutrale Ladungseigenschaften, die eine hohe Leberspezifität erwirken (Abb. 5 B und C) (Silence Therapeutics, 2015). Da es durch Silence Therapeutics im frühen Projektverlauf zu einer Weiterentwicklung der CMD78-Lipoplexe kam, erfolgte ein Teil der geplanten Untersuchungen zusätzlich auch mit den neuen „Hepaplex2“-Formulierungen. Diese wurden von Silence Therapeutics als potenter eingestuft, da sie u. a. eine höhere Leberspezifität aufweisen. Nach systemischer Applikation (5.3.3) und Anflutung im Lebergewebe wird die Lipoplex-Formulierung über Endozytose in die Zielzellen aufgenommen (Abb. 5 A1). Dort liegt der Liposomen-siRNA-Komplex gebunden innerhalb der Endosomen vor (Abb. 5 A2). Vermittelt über Wechselwirkungen zwischen den Lipiden der Endosomen- und Lipoplexmembran wird die siRNA schließlich freigesetzt (Abb. 5 A3) und gelangt somit ins Zytoplasma. Ein anderer Teil der Lipoplexe fusioniert auf direktem Weg mit der Zellmembran und setzt die siRNA in das Zytosol frei (Lu et al., 2009). Dort wird über den bereits erläuterten Mechanismus der RNA-Interferenz die Proteinbiosynthese des Zielgens inhibiert.



**Abb. 5:** Physikochemische Eigenschaften von siRNA-Lipoplexen. A) Schematischer Aufbau eines siRNA-Lipoplexes sowie Interaktion mit der Lipiddoppelmembran der Zielzelle (Tseng et al., 2009). A1) Endozytische Aufnahme in die Zielzelle. A2) siRNA-Formulierung im Endosomenkomplex. A3) Freisetzung der siRNA aus dem Endosomenkomplex in das Zytoplasma. B) Organspezifische Verteilung des Liposomen-siRNA-Komplexes *in vivo* (Silence Therapeutics., 2015). C) Molekülgröße eines Vorläufer-Lipoplexes (Silence Therapeutics., 2015).

## 4 Zielsetzung und zentrale Fragestellung

Ziel dieser Studie war es, in einem therapeutischen Ansatz zu überprüfen, ob sich die von der Leipziger Arbeitsgruppe um Klötting beschriebenen positiven systemischen Effekte einer Repin1-Defizienz auch bei der Ausprägung einer Steatosis hepatis beobachten lassen. Dabei stellt der Formenkreis der NAFLD, ausgezeichnet durch eine hohe Prävalenz innerhalb der Bevölkerung und eine starke Verlinkung mit verschiedensten Stoffwechselfpathologien, wie z.B. dem metabolischen Syndrom, die für diese Untersuchungen geeignete Erkrankung dar. So wird das etablierte NASH-Fibrose-Tumor Mausmodell, oder auch STAM<sup>TM</sup> Mausmodell, genutzt und das Stadium der Steatose näher betrachtet. Eine Repin1-Defizienz soll über ein siRNA-vermitteltes Silencing realisiert werden.

Um den positiven Effekt eines Repin1-spezifischen Silencings auf die Entwicklung der NAFLD zu charakterisieren, wurden eine Vielzahl an laborchemischen, histologischen, immunhistochemischen und molekularbiologischen Methoden angewendet.

Im Rahmen dieser Studie wurden folgende Fragestellungen untersucht:

1. Erfolgt eine leberspezifische Anreicherung der Liposomen-Formulierungen nach i.v. Injektion?
2. Wie verteilen sich die Lipoplexe in der steatotischen vs. gesunden Leber?
3. Kann durch die Applikation von CMD78/Hepaplex2-Repin1-siRNA ein Knockdown des Zielgens Repin1 im NASH-Fibrose-Tumor Mausmodell erzielt werden?
4. Wie wirkt sich eine repetitive Injektion der verwendeten Lipoplex-Formulierung auf die Versuchstiere aus?
5. Welchen Einfluss hat eine siRNA-vermittelte Repin1-Defizienz auf die Ausbildung einer Steatose im NASH-Fibrose-Tumor Mausmodell?
6. Bietet der verwendete Versuchsaufbau Potential für eine Therapie der NAFLD-Progression?

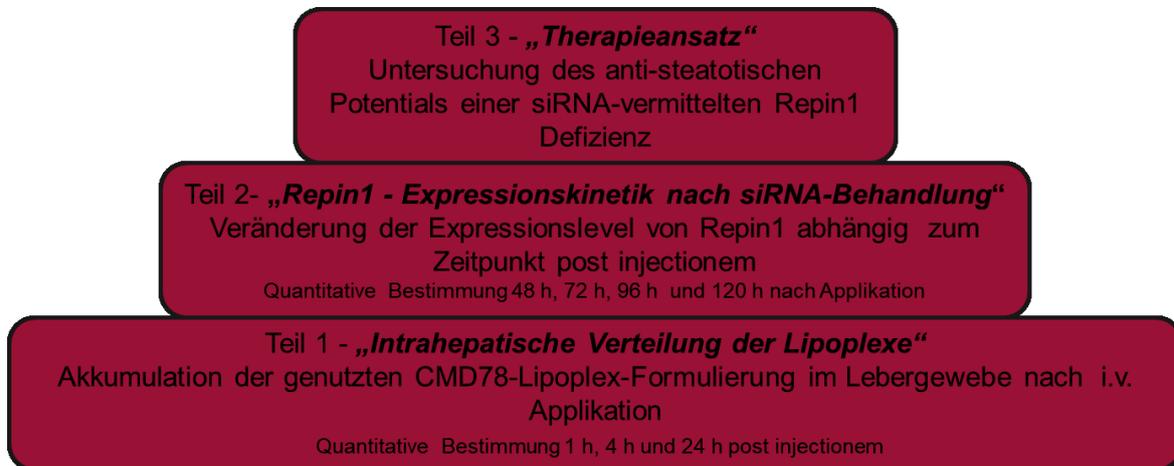
## 5 Material und Methoden

### 5.1 Versuchstiere

Bei den verwendeten Versuchstieren handelte es sich um männliche Mäuse des Inzuchtstammes C57BL/6J (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland). Die hausintern gezüchteten Tiere befanden sich durchgehend in vollklimatisierten Räumen (Temperatur 22 bis 24 °C, ca. 60 % Luftfeuchtigkeit) der Zentralen Versuchstierhaltung des Instituts für Experimentelle Chirurgie der Universitätsmedizin Rostock (Tierschutzbeauftragter PD Dr. Dietmar Zechner). Die Versuchstiere erhielten *Ad libitum* Wasser. Um die Versuchstiere in das im Abschnitt 3.2.1 beschriebene NASH-Fibrose-Tumor Mausmodell zu überführen, erfolgte an Tag 2 postnatal eine einmalige *intraperitoneale* (i.p.) Injektion von 200 mg STZ (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) gelöst in 10 ml Natriumcitrat (0.05 M, pH 4.5; Merck, Darmstadt, Germany). In einem Alter von 28 Tagen erfolgte dann die Trennung vom Muttertier und Umstellung auf eine kontinuierliche Hochfettdiät (Fettgehalt 60 kJ%; D12492; Ssniff, Soest, Germany) (Liebig et al., 2018). Zu diesem Zeitpunkt wurde auch mit der siRNA-Behandlung begonnen. Die Versuchstiere lebten in Gruppen von 2 bis 5 Tieren und einem 12 h Tag-/Nachtrhythmus. Alle Versuche erfolgten unter Genehmigung des Landesamtes für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern (LALLF M-V/TSD/7221.3-1.1-039/14) und unter Berücksichtigung der nationalen Tierschutzgesetze sowie der EU-Richtlinien 2010/63/EU.

## 5.2 Versuchsaufbau

Die angelegte Studie lässt sich, wie in Abbildung 6 dargestellt, in ein dreistufiges Modell gliedern.



**Abb. 6:** Studienaufbau: Leberspezifisches Silencing von Repin1 in der steatotischen Leber. 1) Untersuchung der intrahepatischen Akkumulation der Lipoplex-Formulierung in gesunden und steatotischen Versuchstieren. Quantitative Auswertung der Cy3-Fluoreszenz zu verschiedenen Zeitpunkten post injectionem mittels Intravitalmikroskopie sowie histologischer Aufarbeitung. 2) Bestimmung der optimalen Behandlungsintervalle durch Messung der Repin1 – Expressionskinetik. 3) Durchführung eines Therapieansatzes mittels repetitiver Injektionen der siRNA-Formulierung alle 72 h über eine Dauer von 14 Tagen. Analyse möglicher protektiver Effekte des Repin1-Knockdowns auf den Verlauf der NAFLD-Progression in NASH-Fibrose-HCC Versuchstieren.

Im ersten Teil der Versuchsreihe „*intrahepatische Verteilung der Lipoplexe*“ untersuchten wir die Akkumulation der genutzten Lipoplex-Formulierung im Lebergewebe. Um die Anreicherung der Lipoplexe in der Leber zu visualisieren, kam eine Cy3 markierte siRNA-Formulierung (ApoB-Cy3-CMD78; Silence Therapeutics) zur Anwendung. Diese wurde, wie in Abschnitt 5.3.3. beschrieben, in einer Konzentration von 2,3 mg/kg KG; 0,1 ml/10 g KG intravenös injiziert.

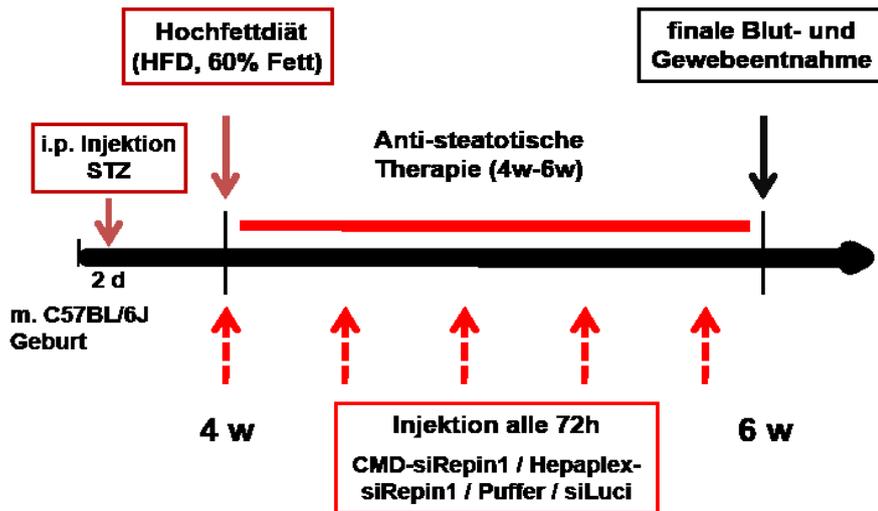
Die zeitabhängige Anreicherung der Cy3-siRNA-Lipoplexe wurde mittels Intravitalmikroskopie (siehe Abschnitt 5.4.1) jeweils 1 h, 4 h und 24 h *post injectionem* untersucht. Bei einer Gruppe von Tieren handelte es sich um gesunde Tiere im Alter von 6 Wochen (Wildtyp (n=3)). Um die Anreicherung der siRNA-Lipidformulierung auch in der steatotischen Leber zu untersuchen, erfolgte dieselbe Analyse mit STZ/HFD-behandelten Tieren ((Steatose (n=3-4)). Zur Kontrolle bzw. Detektion der Autofluoreszenz der Leber wurden pro Zeitpunkt und Gruppe zusätzlich Tiere untersucht, welche eine äquivalente Menge an Pufferlösung (Hepes/Sucrose, 2,3 mg/kg KG; 0,1ml/10 g KG) erhielten.

Im zweiten Teil „*Repin1 - Expressionskinetik nach siRNA-Behandlung*“ überprüften wir die Auswirkung der siRNA-Applikationen auf die Repin1-Expressionslevel in Abhängigkeit zur

Zeit nach Injektion. Um die Veränderung der hepatischen mRNA-Level von Repin1 nach Injektion zu untersuchen, wurde die von Silence Therapeutics bereitgestellte Lipoplex-Formulierung CMD-siRepin1 wie in Abschnitt 5.3.3. beschrieben intravenös (2,3 mg/kg KG; 0,1ml/10 g KG) in die Vena jugularis von adulten, STZ/HFD-behandelten Tieren injiziert. Im Anschluss erfolgte nach 48 h, 72 h, 96 h und 120 h *post injectionem* die Entnahme und Asservierung der Leber wie in Abschnitt 5.3.4 beschrieben (n=2 pro Zeitpunkt). Zusätzlich wurde Lebergewebe von STZ/HFD-Versuchstieren (n=2) analysiert, welche nicht mit siRNA behandelt wurden. Abschließend wurden die gewonnenen Gewebeproben von Silence Therapeutics aufbereitet und mittels *Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion* (RT-PCR) die Repin1 mRNA Expression bestimmt.

Im dritten Abschnitt „*Therapieansatz*“ untersuchten wir das therapeutische Potential eines Repin1-Silencing auf die Ausbildung einer Steatose in STZ/HFD-behandelten Tieren. Hierfür erfolgte eine randomisierte Verteilung der Versuchstiere in drei Gruppen. Die repetitive Behandlung der Tiere begann für die siRepin1 Therapiegruppe (n=7) sowie für die Kontrollgruppen ab der 4. Lebenswoche. Die Kontrollgruppen bildeten Tiere, welche mit einer nonsense-siRNA (siLuci) (n=7) oder reiner Pufferlösung (Puffer ((n=6)) behandelt wurden. Wie in Abbildung 7 erläutert, erfolgten die Injektionen alle 72 h über einen Zeitraum von 14 Tagen. Alle Tiere erhielten – siehe Mausmodell Abschnitt 3.2 - eine STZ-Injektion sowie eine Hochfettdiät ab dem ersten Tag der Behandlung. Gewicht und Blutzucker wurden während des gesamten Behandlungszeitraums regelmäßig dokumentiert. Nach Abschluss der 14-tägigen Therapie erfolgte die finale Blut- und Gewebeentnahme wie im Abschnitt 5.3.4 beschrieben.

Während der dritten Versuchsphase kam es seitens Silence Therapeutics zur Entwicklung einer neuen, potenteren Lipoplex-Formulierung. Aufgrund der erhofften Effizienzsteigerung, entschieden wir uns bei laufendem Versuch für eine Ergänzung der Studie mit der neuen Formulierung. Unterschieden wurde von diesem Punkt an die ursprüngliche CMD78-Lipoplex-Formulierung und die neuentwickelte Hepaplex2-Formulierung unter Beibehaltung der Versuchsgruppen und des Studiendesigns.



**Abb. 7:** Studienabschnitt 3 – Therapieansatz: beginnend mit der HFD am 28. Tag nach Geburt erhielten die Mäuse eine repetitive Injektion der siRNA/Pufferlösung alle 72 h über einen Zeitraum von 14 Tagen. Die finale Gewebeasservierung erfolgte nach Beendigung des zweiwöchigen Therapiezeitraumes.

### 5.3 Praktisches Vorgehen

#### 5.3.1 Gewicht- und Blutzuckermessung

Am ersten Tag der Therapie erfolgte bei den Versuchstieren unmittelbar vor der ersten Injektion routinemäßig die Kontrolle des Körpergewichtes und der Blutzuckerspiegel. Weitere Kontrollen erfolgten an den Tagen 3, 7, 10 und vor der finalen Blut- und Gewebeentnahme am Tag 14. Die Körpergewichtsmessung konnte mit Hilfe einer Feinwaage (Henry Schein VET GmbH, Hamburg) und einer Schale, in die das Versuchstier platziert wurde, durchgeführt werden. Die Blutzuckermessungen erfolgten mit einem automatischen Blutzuckermessgerät (Contour, Bayer Vital GmbH, Leverkusen). Zur Gewinnung der Blutprobe wurde das Versuchstier in eine Röhre aus Plexiglas überführt und dort fixiert. Die Blutprobe wurde durch vorsichtiges Einritzen des Schwanzes mit einer Skalpellklinge und leichtem Druck gewonnen. Der sich bildende Blutstropfen wurde anschließend mit dem Teststreifen des Messgerätes aufgenommen und auf seinen Blutzuckergehalt überprüft.

#### 5.3.2 Anästhesie

Um den bestmöglichen Grad an Hypnose und Analgesie für die Versuchstiere zu erzielen, kamen zwei unterschiedliche Narkoseverfahren zur Anwendung. Für die Injektion der

Lipoplex-Formulierungen bzw. Pufferlösung über die Vena jugularis erhielten die Tiere eine volatile Anästhesie. Zur Narkoseeinleitung wurden die Tiere in eine aus Plexiglas gefertigte Kammer überführt, in die das Gasgemisch bestehend aus Sauerstoff (0,8 l/min), Stickstoffmonoxid (1,6 l/min) und Isofluran (5 % vol.) eingeleitet wurde. Nach ca. 45 s Anflutungszeit trat bei den Tieren die Bewusstlosigkeit ein. Im Anschluss wurden die Versuchstiere auf eine Wärmeplatte (37 °C) überführt und die Narkose wurde in reduzierter Konzentration (O<sub>2</sub> 0,4 l/min; N<sub>2</sub>O 0,8 l/min und Isofluran 1,5 % vol.) aufrechterhalten. Dabei befand sich das Tier in Rückenlage und erhielt das Narkosegas über eine Kunststoffmaske, durch die sowohl Zufluss als auch Absaugung gewährleistet wurde. Vor der finalen Blut- und Gewebeentnahme sowie für die Durchführung der intravitalem Mikroskopie, die gleichbedeutend mit der Opferung des Versuchstieres war, wurde ein Gemisch aus Ketamin (10 %ig) und Xylazinhydrochlorid (2 %ig) in einem Verhältnis von 3 zu 1 zu einer Dosierung von 10 µl/ 10 g Körpergewicht genutzt. Die beschriebenen Narkosetoffe wurden mit Hilfe einer 1 ml Insulinspritze i.p. appliziert. Während beider Narkoseverfahren wurden die Bindehäute der Versuchstiere durch eine fetthaltige Augensalbe (Bepanthen, Bayer Vital GmbH, Leverkusen) geschützt.

### **5.3.3 Intravenöse Applikation der Lipoplex-Formulierungen**

Nach Sicherstellung einer vollständigen Narkose wurde das Tier in Rückenlage mit überstrecktem Hals auf einer Wärmeplatte fixiert (siehe 4.3.2.). Zur Freilegung der Injektionsstelle wurde das Fell mittels eines elektrischen Rasierers am Hals- und Brustbereich entfernt. Im Anschluss erfolgte eine lokale Desinfektion und sagitale Inzision von ca. 0,5 bis 1 cm Länge. Zur Lokalisation der Vena jugularis externa diente der superfiziell ersichtliche Puls der Arteria carotis communis. Mittels eines Stereomikroskops (Leica M651/M655, Leica Microsystems AG, Heerbrugg, Schweiz) mit entsprechender Sichtfeldvergrößerung erfolgte die stumpfe Präparation und Darstellung der *Vena jugularis*. Unter leichtem Aufspannen des Gefäßes wurde die Vene mit Hilfe einer 1 ml Insulinkanüle im 30 Grad Winkel in kaudaler Stichrichtung punktiert. Die im Vorfeld gelöste und gewichtsadaptierte Lipoplex-Formulierung bzw. Pufferlösung wurde unter dauerhafter mikroskopischer Aufsicht vollständig injiziert und der Abtransport innerhalb der Gefäßstruktur beobachtet. Im Anschluss wurde die von der Punktion verursachte Gefäßverletzung mit einem Stieltupfer komprimiert bis die Blutung sistierte. Die Inzision wurde im Folgenden mit Hilfe einer fortlaufenden Hautnaht verschlossen, wobei ein nicht resorbierbarer Faden (Prolene 5.0, Ethicon, Johnson & Johnson Medical, Norderstedt, Deutschland) verwendet wurde. Nach vollständigem Verschluss der Inzision erfolgten eine abschließende Hautdesinfektion und die Beendigung der volatilen Narkose. Während des

Aufwachvorganges befand sich das Versuchstier stets unter Wärmeapplikation durch eine Rotlichtlampe. Nach vollständigem Erwachen wurde das Versuchstier wieder in die chronische Tierhaltung überführt. Aufgrund der im Versuchsaufbau vorgesehenen repetitiven Injektionen wurde abwechselnd sowohl die rechte als auch die linke Vena jugularis punktiert. Bei wiederholter Injektion auf derselben Seite wurde die bestehende Wunde als Stelle für den erneuten Zugang genutzt.

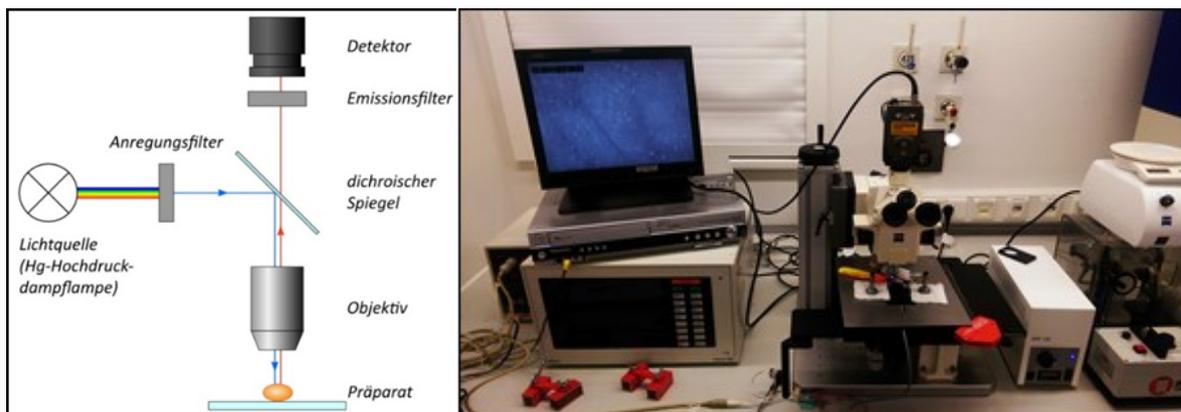
#### **5.3.4 Blut- und Gewebeentnahme**

Um nach Beendigung der Versuchsreihe finale Blut- und Gewebeproben zu gewinnen, wurden die Tiere, wie in Abschnitt 5.3.1 beschrieben, narkotisiert. Die Blutentnahme erfolgte mit einer dünnen Glaskapillare aus dem retrobulbär gelegenen Venenplexus. Dieser wurde mit langsam drehenden Bewegungen über den medialen Augenwinkel punktiert. Das gewonnene Vollblut wurde für die spätere Aufarbeitung und Analyse in Ca<sup>2+</sup>-EDTA-Röhrchen gesammelt. Für die Gewebeentnahme wurden die Versuchstiere in Rückenlage auf einer Wärmeplatte fixiert und das Fell der Abdominal- und Flankenregion durch Elektrorasur entfernt. Nach einer durchgeführten medianen Laparotomie erfolgte zusätzlich ein beidseitiger Flankenschnitt zur besseren Darstellung des Bauchraumes. Die präparierten Hautlappen wurden lateral auseinanderbewegt und unter leichter Spannung fixiert. Um die freiliegenden Abdominalorgane zu schützen, wurden in erwärmter physiologischer Kochsalzlösung getränkte Kompressen verwendet. Im Anschluss wurden die Darmschlingen mit Hilfe eines angefeuchteten Wattetupfers seitlich verschoben, um eine bessere Sicht sowohl auf die Leber, als auch das intraperitoneal gelegene Fett zu ermöglichen. Durch Zupfen mit einer stumpfen Pinzette erfolgte die Gewinnung von Fettgewebe, das wir sofort in Mikro-Schraubröhrchen überführten und mit flüssigem Stickstoff schockfrosten. Im weiteren Verlauf erfolgte die Mobilisation der Leber durch Absetzen der zu Magen, Duodenum, Bauchwand und Zwerchfell ziehenden Bandstrukturen. Durch sanften Zug wurde die Leber aus dem rechten Oberbauch gelöst, in eine Petrischale überführt und gewogen. Das Organ wurde im Anschluss mit zwei Skalpellklingen zerteilt und der linke Leberlappen für mindestens 24 h in 4%-iger, phosphatgepufferter Formalinlösung (Grimm med. Logistik, Torgelow) fixiert. Der abgelöste Lobus caudatus wurde in Gewebekleber (Tissue-Tek Cryomold, Sakura Finetek, USA) eingebettet, schockgefroren und bei -20°C asserviert. Das verbleibende Lebergewebe wurde fein zerkleinert und ebenfalls in Mikro-Schraubröhrchen überführt und schockgefroren. Sämtliche Schraubröhrchen wurden bis zur molekularbiologischen Aufarbeitung in speziellen Kühlkammern bei -80°C gelagert.

## 5.4 Untersuchungstechniken

### 5.4.1 Intravitalmikroskopie

Um die im ersten Teil des Abschnitts 4.2.1 erläuterte Anreicherung der verwendeten Lipoplex-Formulierung zu objektivieren, nutzten wir die Technik der intravitalen Auflichtfluoreszenz-Mikroskopie. Hierbei wird ein natürlich vorkommendes oder im Vorfeld appliziertes Fluorochrom mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt, welches im Anschluss energieärmere und damit langwelligere Photonen emittiert. Nach Austritt aus der Lichtquelle passiert der Lichtstrahl einen Filter, der die für das Fluorochrom spezifische Anregungswellenlänge vorselektiert. Im Anschluss passiert der Lichtstrahl einen dichroitischen Spiegel, dessen Grenzwellenlänge zwischen Absorptions- und Emissionswellenlänge liegt. Beim Auftreffen des Lichts auf den Fluoreszenzfarbstoff wird dieser angeregt und emittiert während des Rückfalls in den Grundzustand Photonen niedrigerer Energie. Durch die daraus erklärbare Wellenlängenverschiebung des Lichts und einem dem Detektor vorgeschalteten Sperrfilter tritt schließlich nur das vom Fluoreszenzfarbstoff emittierte Licht in den Strahlengang des Okulars (Abb.8).

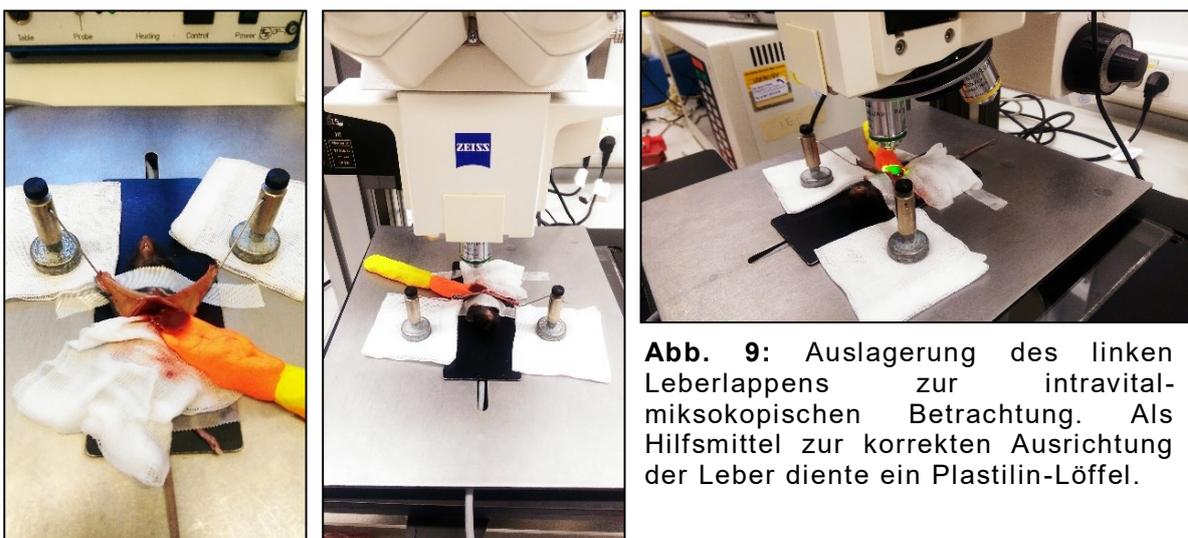


**Abb.8:** Auflichtfluoreszenz-Mikroskopie; links der schematische Aufbau (Niedermayr A, 2020); rechts die genutzte Versuchsausrüstung.

Die Untersuchungen zur intrahepatischen Verteilung der Lipoplexe wurden an einem Auflichtfluoreszenz-Mikroskop Typ Axiotech Vario der Firma Zeiss durchgeführt. Als Fluorochrom wurde Cyanin-3 verwendet, welches an eine nonsense-siRNA gekoppelt war. Als Transportmolekül diente die in Abschnitt 3.5 beschriebene Lipoplex-Formulierung CMD78. Nach erfolgter i.p. Anästhesie und i.v. Injektion (5.3.2 sowie 5.3.3) der Cy3-Lipoplexe, erfolgte die Lagerung auf einer beheizten Präparationsplatte. In Vorbereitung des anschließenden Eingriffs wurde das Bauchfell mit einem Schergerät der Firma Aesculap (GT410) entfernt. Anschließend erfolgten eine mediane Laparotomie sowie ein beidseitiger Flankenschnitt zur besseren Darstellung des Bauchraumes. Die präparierten

Hautlappen wurden lateral auseinanderbewegt und unter leichter Spannung fixiert. Um die freiliegenden Abdominalorgane zu schützen, wurden in erwärmter Kochsalzlösung getränkte Kompressen verwendet. Zur Mobilisation der Leber wurden zunächst die anhaftenden Ligamente sowie die Peritonealduplikatur durchtrennt. Nach einer Rotation in Längsrichtung unter Zuhilfenahme angefeuchteter Wattestäbchen wurde die Leber vorsichtig mit ihrer geschwungenen Oberseite auf einen mit Plastilin ausgekleideten Löffel gelegt. Die nun plan freiliegende Unterseite des linken Leberlappens wurde mit Kochsalzlösung benetzt und mit einem Deckglas belegt. Im Anschluss erfolgte die Überführung in den Strahlengang des Mikroskops (Axiotech Vario, Carl Zeiss Werk, Göttingen, Deutschland). Eine genaue Positionierung der Wärmeplatte, parallel zur Fokusebene, wurde unter Zuhilfenahme von Magneten und unter mikroskopischer Kontrolle erreicht (Abb. 9). Nach exakter Positionierung des linken Leberlappens zur Fokusebene konnten mit Hilfe eines spezifischen Filtersatzes (Filtersatz 09, Zeiss, Jena) mit den optischen Komponenten BP (450-490 nm), FT (510 nm) und LP (515 nm) sowie einem „Plan-Neofluar“ Objektiv (10x/0,3. & 20x/0,3, Zeiss, Jena) intravitalmikroskopische Bilder über Grünlicht-Epiillumination erstellt werden. Über eine Kamera-Apparatur (Super Dynamik II) der Firma Pieper, einen zwischengeschalteten Monitor (JVC, TM-15L1D) und einen DVD-Rekorder (Panasonic DMR-EX99V) wurden die Aufnahmen gesichtet und gespeichert. Die zeitliche Kategorisierung erfolgte durch einen Videozeitgenerator (Alpermann+ Velte, TCI 70R TV). Zur Auswertung und graphischen Aufarbeitung nutzten wir Adobe Photoshop CS6 (Adobe Systems, Delaware, USA).

Im Anschluss an die intravitalmikroskopische Untersuchung wurde das Lebergewebe für zusätzliche histologische Untersuchungen in 4 % igem Formalin asserviert.



**Abb. 9:** Auslagerung des linken Leberlappens zur intravitalmikroskopischen Betrachtung. Als Hilfsmittel zur korrekten Ausrichtung der Leber diente ein Plastilin-Löffel.

### 5.4.2 Vollblutanalyse

Die im Zuge der finalen Blut- und Gewebeentnahme gewonnenen Vollblutproben wurden vorerst in  $\text{Ca}^{2+}$ -EDTA-Röhrchen gelagert. Im Anschluss wurden diese zur Generierung eines Differentialblutbildes in den Blutzellzähler (Sysmex KX-21 N, Sysmex, Norderstedt) überführt. Zur näheren Betrachtung der myeloischen Zellreihe wurden Erythrozytenzahl, Hämoglobingehalt, Hämatokrit, Thrombozyten und Leukozytenzahl bestimmt. Aus der lymphatischen Zellreihe wurde die Gesamtzahl der Lymphozyten betrachtet. Das verbliebene Vollblut wurde zur weiteren Analyse in eine Zentrifuge (GS15 Zentrifuge, Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland) überführt und bei 4000 rpm und Zimmertemperatur für 10 min zentrifugiert. Das daraus gewonnene Plasma wurde im Anschluss als Überstand abpipettiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  für weitere Analysen asserviert.

### 5.4.3 Plasmaanalyse

Die auf eine Schädigung der hepatozellulären Integrität hinweisende enzymatische Aktivität der leberspezifischen Enzyme GLDH und ALT wurde durch automatisierte photospektrometrische Analyse (Hitachi 7004 Automatic Analyser, Boehringer, Mannheim, Deutschland) detektiert. Die Plasma-Konzentration der Triglyzeride wurde mit Hilfe eines Triglyzerid-Assays der Firma Cayman Chemical Company (Michigan, USA) nach Herstellerangaben bestimmt.

### 5.4.4 Histologie

Im Anschluss an die im Abschnitt 5.3.4 beschriebene Entnahme des Lebergewebes wurde der präparierte linke Leberlappen für mindestens 24 h in Formalin (4 %-ig, phosphatgepuffert) fixiert. Nach Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Proben in Paraffinwachs eingebettet (Merck, Darmstadt, Deutschland).

Bei jeder finalen Gewebeentnahme wurde zusätzlich der Lobus caudatus für eine spätere Aufarbeitung durch eine Lipid-Färbetechnik, wie in Abschnitt 5.3.4 beschrieben, kryokonserviert.

#### 5.4.4.1 Hämatoxylin-Eosin

Mit Hilfe eines Mikrotoms (Leica RM2145, Wetzlar, Deutschland) wurden  $4\ \mu\text{m}$  dünne Schnitte gefertigt und auf einem Objektträger fixiert. Die entparaffinierten und rehydratisierten Präparate wurden in Hämalaun-Lösung (Merck, Darmstadt, Deutschland) getaucht und nach 5-minütiger Inkubation unter fließendem Wasser und *Phosphat-*

*gepufferter Salzlösung* (PBS) gewaschen. Im nächsten Schritt folgte die Inkubation in einer Eosin-Lösung für eine Minute. Nach einem abschließenden Waschgang wurden die Präparate mit reinem Alkohol dehydriert, in ein Deckmedium (X-TRA-Kitt, Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland) eingebettet und mit einer Deckplatte versiegelt. Die Hämatoxylin-Eosin Präparate dienen zur Bestimmung des NAS.

#### 5.4.4.2 **Cy3-DAPI**

Um die hepatische Anreicherung der Cy3-Lipoplex-Formulierung zusätzlich zur intravitalmikroskopischen Analyse (vgl. 5.4.1) auch histologisch zu quantifizieren, wurden dieselben Proben histologisch aufgearbeitet. Der an die siRNA gekoppelte Cyanin-3 Farbstoff gehört zur Gruppe der Polymethin-Farbstoffe. Er besitzt eine spezifische Anregungswellenlänge von 550 nm und emittiert Licht der Wellenlänge 570 nm. Zur verbesserten Abgrenzbarkeit der Zellkerne wurden die Gewebsschnitte zusätzlich mit dem DNA-Farbstoff DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) behandelt. Dieser bindet an Adenin- und Thymidin-reichen Abschnitten doppelsträngiger DNA und besitzt in dieser Verbindung eine spezifische Absorption (350 nm) - bzw. Emissionswellenlänge (460 nm) (Tanious et. al.1992). Über dieses spezifische Emissionsspektrum gelingt die klare Abgrenzung zwischen DNA und der in vitalen Zellen ubiquitär vorkommenden RNA. Des Weiteren ermöglicht DAPI aufgrund seines spezifischen Emissionsspektrums die überlagerungsfreie Kombination mit anderen fluoreszierenden Stoffen. Zur Vorbereitung auf die Färbung wurden die Gewebsschnitte zunächst entparaffiniert und hydratisiert. Eine aus dem verwendeten DAPI-Farbstoff (DAPI BioChemica A1001, AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) und destilliertem Wasser bestehende Stammlösung (5 mg/ml) wurde zunächst in einem Verhältnis von 1:1000 mit PBS verdünnt. In der daraus entstandenen Arbeitslösung wurden die Präparate für 10 Minuten inkubiert. Nach Inkubation erfolgte ein Waschgang mit PBS und die Einbettung in ein spezifisches Fluoreszenz-Deckmedium (S3023, DAKO).

Sämtliche Präparate wurden lichtmikroskopisch unter 20-facher Vergrößerung und Anregung mit ultraviolettem Licht mit dem inversen Fluoreszenzmikroskop Leica DMI4000 B, (Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Deutschland) und dazugehöriger Software (Leica Application Suite) gesichtet und fotodokumentiert. Die Bilder ließen sich anschließend verblindet mittels der Bildbearbeitungssoftware Adobe Photoshop CS6 analysieren. Über individuell anpassbare Farbfiltereinstellungen wurden die durch Cy3 rötlich fluoreszierenden Anteile im Bild gesondert markiert und mit der Gesamtpixelanzahl in ein Verhältnis gesetzt. So konnte die Anreicherung in ein prozentuales Verhältnis zum

Gesamtlebergewebe gesetzt werden. Die automatisierte Analyse erfolgte in 20 Gesichtsfeldern pro Präparat. Nach Aufhebung der Verblindung erfolgten die Zuordnung zu den Versuchsgruppen und die Berechnung des arithmetischen Mittels.

#### **5.4.4.3 Oil-Red-O-Färbung**

Zur Darstellung der intrazellulären Lipide wurde der fettlösliche Azofarbstoff Oil-Red-O (Sigma Aldrich, Schnelldorf, Deutschland) verwendet. Das kryokonservierte Lebergewebe wurde mit Hilfe eines Mikrotoms (Leica) in 8 µm dünne Präparate geschnitten und an der Luft getrocknet. Eine anschließende Fixierung erfolgte in 4 %-igem Paraformaldehyd (ChemCruz, Dallas, TX) für 10 Minuten. Im nächsten Arbeitsschritt wurde das Präparat in 60 %-iger Isopropanol-Lösung geschwenkt und in der Arbeitsmischung, bestehend aus 0,5 g Oil-Red-O und 100 ml Isopropanol, inkubiert. Nach 15-minütiger Färbung wurde das Präparat in destilliertes Wasser getaucht und für eine Minute mit Hämalaun-Lösung gegengefärbt. Die Einbettung erfolgte mit X-TRA Kitt.

Für die quantitative Bestimmung der enthaltenden Lipide wurden sämtliche Präparate lichtmikroskopisch unter Nutzung einer 20-fachen Vergrößerung gesichtet (Olympus BX 51, Hamburg, Deutschland) und über eine zwischengeschaltete Kamera (Color View II FW Kamera, Color View, München, Deutschland) fotodokumentiert. Wie im vorausgehenden Abschnitt erläutert, wurden sämtliche Präparate mit Adobe Photoshop ausgemessen. Die durch den verwendeten Azofarbstoff deutlich rot angefärbten Lipide wurden durch einen automatischen Farbfilter markiert und die Pixelanzahl im Verhältnis zum Gesamtbild bestimmt. Pro Präparat wurden 20 Bildabschnitte ausgewertet.

#### **5.4.4.4 Sirius Red**

Um den Grad der Fibrosierung beurteilen zu können, wurde die etablierte Sirius-Red-Methode (James et al., 1986) zur Anfärbung kollagener Fasern genutzt. Nach Entparaffinierung der zuvor angefertigten Leberschnitte wurden diese für 1 h in einer 0,1%-igen Pikrinsäure-Sirius-Red-Lösung (Sigma Aldrich, Schnelldorf, Deutschland) inkubiert. Nach anschließender Waschung wurde zur besseren Abgrenzbarkeit der Zellkerne eine Kernfärbung mit Hämalaunlösung nach Mayer vorgenommen. Der abschließenden Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe folgte die Einbettung in X-TRA-Kitt. Die Schnitte wurden zur histomorphometrischen Aufarbeitung unter dem Mikroskop (20-fache Vergrößerung, Olympus BX51) betrachtet und, wie in den vorangegangenen Abschnitten erläutert, über die Bildbearbeitungssoftware Adobe Photoshop vermessen. Das Ausmaß

der Fibrose ließ sich in diesem Fall über die Menge der rot angefärbten Kollagenfasern bestimmen. Pro Präparat wurden 15 Gesichtsfelder analysiert.

#### **5.4.4.5 CAE**

Die hepatische Inflammation wurde histologisch über eine *Chloracetatesterase* (CAE) - Färbung objektiviert. Das in Granulozyten ab dem Promyelozyten-Stadium exprimierte Enzym Naphthol-AS-D-Chloracetatesterase wird hierbei mit einem Substrat-Farbstoff-Komplex der Firma Sigma Aldrich angefärbt. Zu Beginn des Färbeprozesses wurden die 4 µm dünnen Gewebsschnitte auf Objektträger aufgebracht, entparaffiniert und rehydratisiert. Anschließend wurde eine Arbeitslösung bestehend aus 10 mg Granatsalz (Fast Granat F876), gelöst in 100 ml PBS und 16 mg Naphthol AS-D Chlorazetat, mit 2 ml Dimethylsulfoxid (Merck) angemischt. Nachdem die Gewebsschnitte für 1 h inkubierten, folgten ein Waschgang in PBS und eine Gegenfärbung in Hämalan-Lösung nach Mayer. Abschließend wurden die Präparate in einem Deckmedium (Ultramount, DAKO) eingebettet. Die quantitative Bestimmung der Granulozyten erfolgte lichtmikroskopisch durch Auszählung (40-fache Vergrößerung, Olympus BX51, Hamburg, Deutschland). Pro Präparat wurden CAE-positive Zellen in 30 Hauptgesichtsfelder ausgezählt.

#### **5.4.4.6 NAFLD-Activity-Score**

In unserer Studie nutzten wir den NAS als zusätzliches Bewertungssystem, um die Entwicklung einer NAFLD zu dokumentieren. Dabei setzt sich der Gesamtscore aus drei histopathologisch bedeutenden Komponenten zusammen: Steatose (0-3 Pkt.), lobuläre Inflammation (0-3 Pkt.) und hepatozelluläres Ballooning (0-2 Pkt.). Der vollständige NAS (0-8 Pkt.) wird aus der Summe der Einzelwerte gebildet (Kleiner et al., 2005) und ermöglicht die histopathologische Bewertung des Krankheitsstadiums. Das Scoring erfolgte im verblindeten Modus jeweils von drei unabhängigen Betrachtern, wobei die Ergebnisse abschließend im arithmetischen Mittel zusammengefasst wurden.

#### **5.4.5 Immunhistochemie**

Eine immunhistochemische Analyse basiert auf einer Reaktion zwischen einem Antigen und einem spezifischen Antikörper. Dieser kann sowohl mono- als auch polyklonal sein. Die Detektion des dabei entstandenen Antigen-Antikörper-Komplexes kann auf direktem Wege durch einen gekoppelten Marker oder auch indirekt durch eine zwischengeschaltete

Reaktion sichtbar gemacht werden. Heutzutage wird am häufigsten ein enzymgekoppelter Sekundärantikörper verwendet, welcher an den zuvor gebildeten Komplex bindet und ein zugegebenes chromogenes Substrat umsetzt. So wird das durch den spezifischen Antikörper adressierte Antigen visualisiert und kann quantitativ analysiert werden.

#### 5.4.5.1 **PCNA**

Als Indikator für den erhöhten Zellumsatz und die stattfindende Regeneration wurde PCNA genutzt. Nachdem die erste Aufbereitung wie im allgemein histologischen Teil 5.4.4 erfolgte, wurden 4 µm dünne Gewebsschnitte angefertigt. Diese wurden auf poly-L-Lysin beschichtete Objektträger aufgebracht und anschließend getrocknet. Es folgte die Entparaffinierung in einer absteigenden Alkoholreihe und die Antigen-Demaskierung über Mikrowellen (DAKO Target Retrieval Solution, DAKO Cytomation, Hamburg, Deutschland). Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen und Peroxidase-Reaktionen wurde eine entsprechende Blockerlösung (DAKO Protein Block X0909, 3% mit abcam Maus Block ab6668, 1:10) genutzt. Im Anschluss fand die Inkubation mit dem Primärantikörper (Anti-PCNA antibody ab29, Abcam plc, Cambridge, UK; 1:1000) für 16 h unter Kühlung bei 4°C statt. Nach einem Waschvorgang wurde das Präparat unter Zugabe des Sekundärantikörpers (goat anti-mouse D0486, DAKO; 1:1000) für weitere 30 min inkubiert (Kopplung über modifizierte Glutaraldehyd-Methode nach Avrameas & Ternynck, 1971). Zum Abschluss erfolgte die Farbentwicklung durch Hinzufügen des Substrat-Chromogen-Systems (Permanent Red K0640, DAKO). Nach einer weiteren Spülung wurde eine Gegenfärbung mit Hämalun-Lösung (Merck, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt und die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert. Abschließend wurden die Objektträger mit X-TRA KITT eingedeckt.

Die immunhistochemisch aufgearbeiteten Präparate wurden verblindet mit einem Auflichtmikroskop (Axioskop 40, Zeiss) untersucht. In jedem histologischen Präparat wurden die PCNA-positiven Zellen in 40-facher Vergrößerung (Achromplan, numerische Apertur 0,65) in insgesamt 30 Gesichtsfelder ausgezählt. Abschließend wurde das arithmetische Mittel aus den für ein Präparat genommenen Gesichtsfeldern gebildet.

#### 5.4.5.2 **F4/80**

F4/80 als Vertreter der EGF-TM7 Rezeptorfamilie wurde bereits im Jahre 1981 durch Austyn und Gordon als zunächst spezifischer Oberflächenmarker von gewebsständigen Makrophagen innerhalb der Maus beschrieben. Nachfolgende Studien zeigten, dass F4/80

auch andere, nicht phagozytierende dendritische Zellen binden kann (Kurimoto et al. 1995). Dabei dient der murine F4/80 Antikörper heute als etablierter Marker für Monozyten und sessile Makrophagen in Mäusen. *EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1* (EMR1) stellt dabei das humane Homolog dar (Hamann et al., 2007) und wird in der Literatur häufig in synonymisierter Form verwendet.

Wie bereits beschrieben, erfolgte zunächst die histologische Aufbereitung und Gewinnung von 4 µm dünnen Gewebsschnitten mit Auftragen auf einen mit Poly-L-Lysin beschichteten Objektträger. Nach Entparaffinierung in absteigender Alkoholreihe folgte eine 16 stündige Inkubation mit dem polyklonalen Primärantikörper MCA-497 (Serotec, Oxford, UK, 1:10) bei 4°C. Im nächsten Schritt wurde die Konjugation mit einem Maus-Anti-Ratten-Immunglobulin (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA, 1:2000) vorgenommen sowie das Chromogen Fuchsin (Dako Cytomation, Hamburg, Germany) hinzugegeben. Eine Gegenfärbung erfolgte abschließend mittels Hämalaun, gefolgt von einer Dehydratation und Einbettung in X-TRA KITT. Die quantitative Analyse erfolgte im Anschluss analog zur PCNA Auswertung (siehe 5.4.5.1).

#### **5.4.6 Multiplex-Zytokinanalyse**

Um einen umfassenden Eindruck über das systemische inflammatorische Geschehen zu erhalten, wurde eine Multiplex-Zytokin-Analyse vom Blutplasma der Versuchstiere angefertigt. Die Analyse wurde von der Firma Bio-Rad Laboratories GmbH in Hamburg unter Leitung von Herrn Dr. M. Möller durchgeführt. Hierbei wurden die proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-6, TNF- $\alpha$ , die Wachstumsfaktoren *transforming growth factor - $\beta$*  (TGF- $\beta$ 1) und *platelet derived growth factor- $\beta$*  (PDGF- $\beta$ ) sowie MCP quantifiziert. Diese Faktoren stimulieren die Inflammation bzw. den hepatozellulären Fibrosierungsprozess.

#### **5.4.7 Fettsäure-Profiling**

Die detaillierte qualitative und quantitative Analyse der hepatischen Fettsäuren, Triglyzeride und Cholesterin wurde von unserem Kooperationspartner Dr. rer. nat. Dirk Dannenberger und seiner AG Lipidmetabolismus (Leibniz-Institut für Nutztierbiologie, Institut für Muskelbiologie und Wachstum, Dummerstorf) vorgenommen. Dabei kann eine detaillierte Analyse die hepatische Steatose sowohl objektiv quantifizieren und damit eine Überladung der Hepatozyten mit daraus resultierenden lipidtoxischen Effekten nachweisen (Schaffer, 2003) als auch ein Missverhältnis zwischen pro- und antiinflammatorischen Fettsäuren darstellen.

### 5.4.8 mRNA-Analytik

Um eine Aussage über die hepatischen Expressionslevel von Repin1 und CD36 treffen zu können, erfolgte zunächst eine Quantifizierung der mRNA. Über eine Kombination aus Reverser Transkription und Polymerase-Kettenreaktion ergibt sich die Möglichkeit, die Menge an mRNA zum Entnahmezeitpunkt zu bestimmen, bevor über den Translationsmechanismus ein entsprechendes Protein synthetisiert wird.

Im ersten Schritt der *Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion* (RT-PCR) wurden zunächst 30 mg des zuvor bei -80°C konservierten Lebergewebes unter Zuhilfenahme eines Dismembrators (Mikro-Dismembrator U, B. Braun Biotech International, Deutschland) homogenisiert und das dabei entstandene Lysat zentrifugiert. Der gewonnene Überstand wurde in eine Säule des Analysekits der Firma Qiagen (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland) überführt und die Isolation den Angaben des Herstellers folgend fortgesetzt. Das in diesem Prozess gewonnene Eluat wurde anschließend UV-spektrophotometrisch mit dem Nanodrop 2000 Spektrophotometer (PegLab Biotechnologie GmbH, Deutschland) vermessen und die RNA-Konzentration bestimmt. Eine angeschlossene Qualitätskontrolle der gewonnenen RNA wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese vorgenommen.

| Denaturierungsansatz<br>[10 min bei 72°C] |       | Ansatz zur cDNA-Gewinnung / Mastermix<br>[60 min bei 42°C] |      |
|---|-------|--|------|
| RNA                                       | 2 µg  | 5x First Strand Buffer                                     | 4 µl |
| DEPC-Wasser                               | 11 µl | 0,1 M DTT  | 2 µl |
| Oligo dT's                                | 1 µl  | 10mM dNTP's  | 1 µl |
|   |       | Superscript  | 1 µl |

**Tab. 1:** Auflistung der Pipettieransätze für die cDNA-Gewinnung

Um die nun erforderliche Umschreibung der isolierten RNA in komplementäre cDNA vorzunehmen, wurde zunächst ein Denaturierungsansatz mit 2 µg der isolierten RNA und Oligo(dT)18-Primern (Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland) gewählt (Tab. 1). Dieser wurde für insgesamt 10 min bei einer Temperatur von 72°C in einem Thermocycler erhitzt. Der daraus hervorgegangene RNA-Oligomix wurde anschließend ergänzend zum Mastermix, bestehend aus Reverser Transkriptase (Superscript II RNaseH, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), Pufferlösung, Dithiothreitol und einer Mischung aus Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTP Mix, Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham MA, USA) hinzugefügt. Es erfolgte eine erneute Inkubation im Thermocycler für 60 min bei 42°C (Tab. 1). Die gewonnene cDNA wurde nach 1:2 Verdünnung mit *Diethyldicarbonat* (DEPC)-

Wasser bei -20°C konserviert. Als notwendige Bedingung für die abschließende Quantitätsanalyse, in  $\Delta\Delta CT$ -Methode, wurden die für die RT-PCR genutzten Primer (Tab. 2) vor ihrer Verwendung auf deren Effizienz getestet und sichergestellt, dass sich diese bei nahezu 100% (d.h. 1,9-2,2) befand. Die abschließende PCR wurde mit dem Light Cycler 1.5 (Roche, Mannheim, Deutschland) und einem bei derselbigen Firma erhältlichen Mastermix-Kit (FastStart DNA MasterPlus SYBER Green1) durchgeführt. Das dazugehörige Ablaufprotokoll ist in der Tab. 3 dargestellt.

| Gen           | Primer             | Sequenz (5' zu 3')                                    |
|---------------|--------------------|---|
| <b>Repin1</b> | forward<br>reverse | GCCTTCTGTTGTGCCATCTGT<br>TCTCAGGCATCGTGCTTCTTCC       |
| <b>CD36</b>   | forward<br>reverse | GGTGATGTTTGTGCTTTTATGATTC<br>TGTAGATCGGCTTTACCAAAGATG |
| <b>GAPDH</b>  | forward<br>reverse | GAATTTGCCGTGAGTGGAGT<br>CGTCCCGTAGACAAAATGGT          |
| <b>F4/80</b>  | forward<br>reverse | CTTTGGCTATGGGCTTCCAGTC<br>GCAAGGAGGACAGAGTTTATCGTG    |

Tab. 2: Primer für die RT-PCR

| Zyklus                | Modus             | Zeit [min] | Temperatur [°C] |
|-----------------------|-------------------|------------|-----------------|
| <b>Denaturierung</b>  |                   | 10         | 95              |
| <b>Amplifikation</b>  | 40 Wiederholungen | 5<br>10    | 55<br>72        |
| <b>Schmelzkurve</b>   |                   | 0<br>0,25  | 95<br>65        |
| <b>kontinuierlich</b> |                   | 0          | 95              |
| <b>Kühlung</b>        |                   | 30         | 4               |

Tab. 3: Protokoll der RT-PCR Reaktion

Die in jedem PCR-Zyklus mitgeführten Positivkontrollen bestanden jeweils aus einem cDNA-Pool unbehandelter/gesunder Mäuse des Stammes C57BL/6J. Die Negativkontrolle bestand aus nukleasefreiem Wasser. Dem internen Standard folgend, wurde das Housekeeping Gen GAPDH als Referenzgen verwendet und sämtliche cDNA-Mengen an dieses angeglichen.

Die abschließende Datenanalyse erfolgte mit der Analysesoftware RelQuant von Roche. Dabei wurden die über die Software ausgegebenen  $C_T$ -Werte mit Hilfe der  $\Delta\Delta CT$ -Methode ausgewertet. Die Expression des Zielgens wurde in Relation zur mitgeführten Positivkontrolle gesetzt. Die erhaltenen Werte wurden anschließend ins Verhältnis zu den ermittelten Werten des Housekeeping-Gens GAPDH gesetzt.

## **5.5 Statistik**

Die erhobenen Rohdaten wurden zunächst zur besseren Übersicht und weiteren Aufarbeitung in ein Tabellenkalkulationsprogramm (Microsoft-Excel) übertragen. Aus den gesammelten Einzeldaten wurden für jede Gruppe der Mittelwert, die *Standardabweichung* (SD) und der *Standardfehler des Mittelwertes* (SEM) bestimmt. Die weitere statistische Aufarbeitung erfolgte mit Hilfe der Software SigmaStat (Jandel Corp., Scientific, San Rafael, CA, USA). Mit dessen Hilfe wurden die Daten mit einer einfaktoriellen ANOVA-Analyse (Methode nach Holm Sidak) aufgearbeitet und in Gruppen untereinander verglichen. Im Falle einer nicht vorliegenden Normalverteilung erfolgte ein ANOVA-on Ranks-Test (Methode nach Dunn). Ein signifikanter Unterschied galt als bewiesen, sobald die Irrtumswahrscheinlichkeit weniger als 5 % ( $p < 0,05$ ) betrug. Ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 1 % ( $p < 0,01$ ) bzw. weniger als 0,1 % ( $p < 0,001$ ) galt das Ergebnis als hoch- bzw. höchstsignifikant. Bei Vergleichen zwischen lediglich zwei Gruppen erfolgte die Berechnung mit Hilfe eines t-Tests für unverbundene Stichproben (Student's t-Test). Entsprechend der Korrektur des alpha-Fehlers nach Bonferroni wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,0167$  als statistisch signifikant angesehen.

Die graphische Aufarbeitung der numerischen Daten erfolgte mittels SigmaPlot 12.0 (Jandel Corp., San Rafael, CA, USA). Dabei wurden die gewonnenen Daten sowohl durch Balken- und Kurvendiagramm als auch in Form von Box-Plots dargestellt.

## 6 Ergebnisse

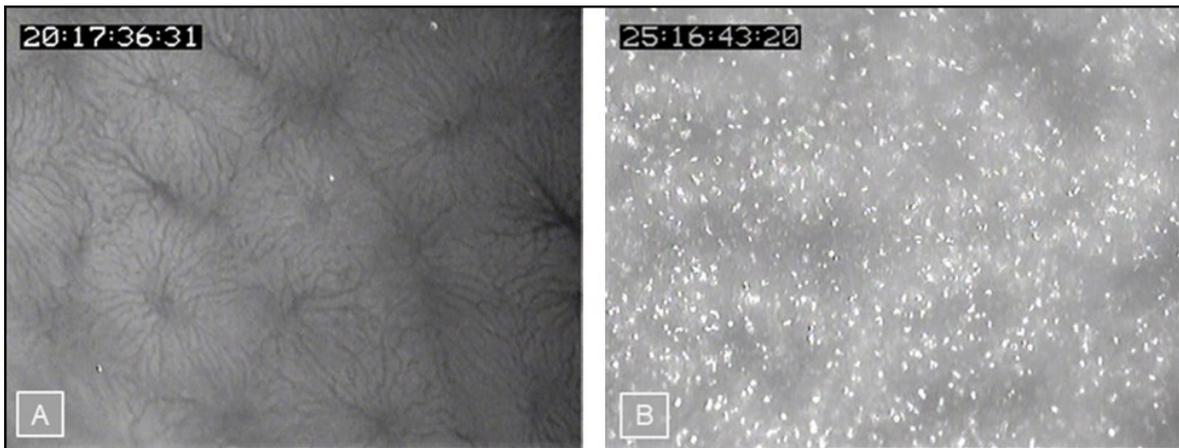
### 6.1 Allgemeinzustand der Tiere

Der Allgemeinzustand der Versuchstiere wurde täglich durch eine Visite sowie regelmäßige Messungen des Körpergewichtes und des Blutzuckers überprüft. Sowohl die siRNA-Therapie als auch der damit verbundene chirurgische Eingriff wurde von den Mäusen gut toleriert. *Post injectionem* zeigte sich eine kurzfristige Reduktion der körperlichen Aktivität, die sich jedoch bis zum Folgetag wieder vollkommen normalisierte. Im Laufe der Versuchsreihen verstarben drei Tiere während der siRNA-Applikation. Dabei kam es bei einem Versuchstier narkosebedingt zu einem kardiopulmonalen Arrest. Bei zwei weiteren Tieren führte eine Blutung aus der V. jugularis zum intraoperativen Versterben. Vor Beginn des dritten Studienabschnittes, am 28. Tag *post partum*, wurde das Körpergewicht sowie den Blutzucker evaluiert, um interindividuelle Abweichungen im Bezug zur Morbidität zu minimieren. Tiere, bei denen sich nach STZ-Injektion keine Hyperglykämie einstellte, wurden als „STZ-Versager“ aus dem weiteren Versuch ausgeschlossen.

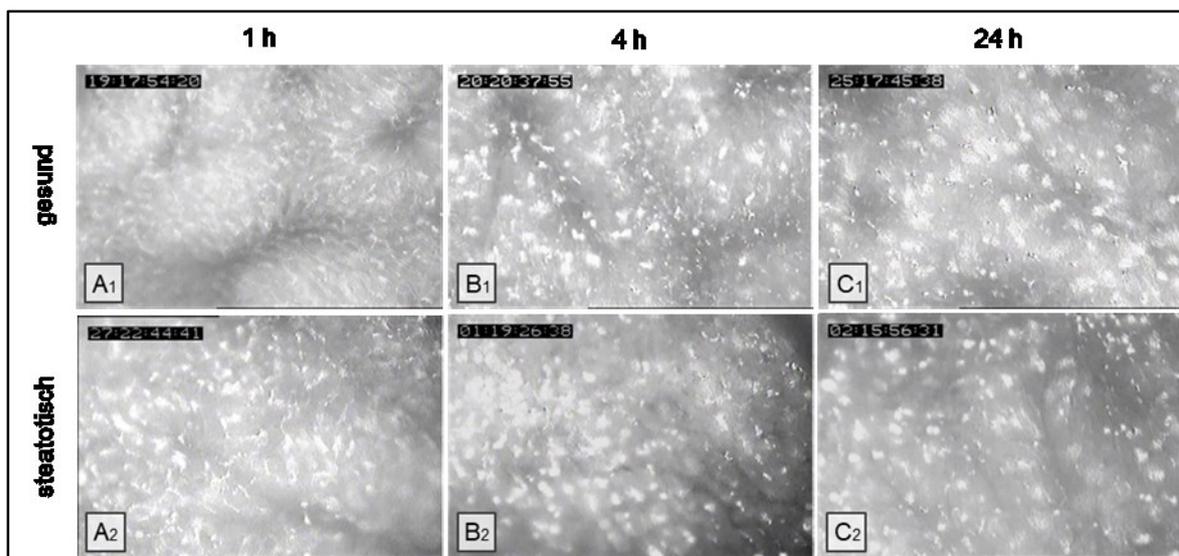
### 6.2 Studienabschnitt 1 - Intrahepatische Verteilung der Lipoplexe

Um die quantitative Anreicherung der von uns genutzten Carrier-Moleküle und somit auch der siRNA im Lebergewebe zu überprüfen, wurde zunächst die im Abschnitt 5.4.1 beschriebene Technik der intravitalen Auflichtfluoreszenz-Mikroskopie genutzt. Nach intravenöser Gabe der Cy3-markierten siRNA-Formulierung (ApoB-Cy3-CMD78; Silence Therapeutics) war bereits nach 1 h eine homogene Anreicherung innerhalb des gleichmäßig perfundierten Leberparenchyms zu beobachten (Abb. 10 B).

Im Vergleich zu unbehandelten Tieren zeigte sich in der Leber STZ/HFD-behandelter Mäuse eine verminderte Anreicherung der fluoreszierenden siRNA-Lipoplexe (Vergleich Abb. 11 Gruppe 1 und 2). Im zeitlichen Verlauf nach Injektion ließ sich sowohl für die unbehandelten „Wildtypen“ als auch für die STZ/HFD-Mäuse eine Veränderung im Verteilungsmuster der Lipoplexe darstellen. So zeigten die intravitalmikroskopischen Aufnahmen 1 h *post injectionem* zunächst eine Anreicherung innerhalb des sinusoidalen Systems, in dem der Blutfluss in Richtung Zentralvene drainiert. (Abb. 11 A1, A2). Nach 4 h bzw. 24 h *post injectionem* stellte sich eine konzentriertere Anreicherung innerhalb der Leberparenchymzellen dar, wobei die Fluoreszenz insgesamt reduziert war.

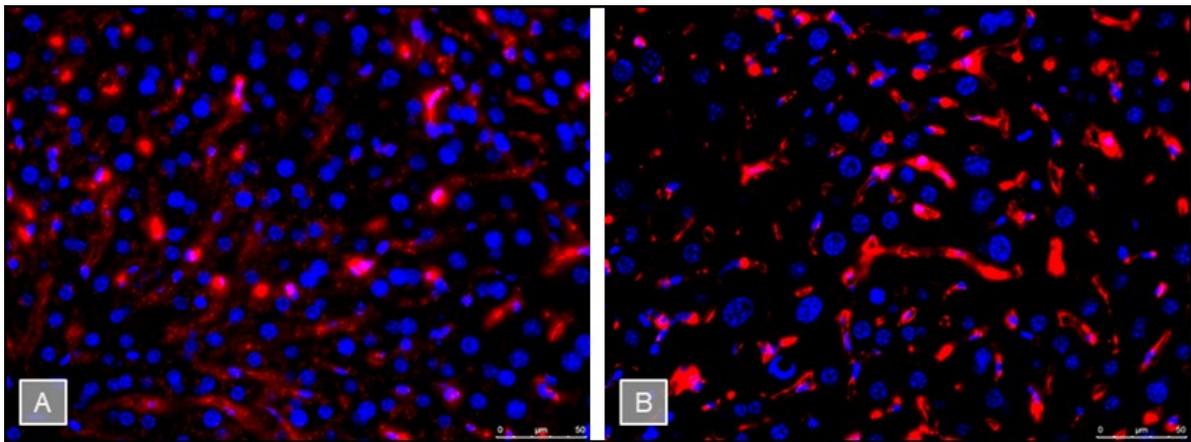


**Abb. 10:** Intravitalmikroskopische Aufnahme des Lebergewebes 1 h nach Injektion der Cy3-markierten Lipoplexe. (A) Intakte Leberperfusion bei Mikroskopie ohne spezifische Anregung (10-fache Vergrößerung) (B) Darstellung der im Lebergewebe akkumulierten siRNA-Lipoplex-Formulierung durch Anregung mit Licht der Wellenlänge 510 nm (10-fache Vergrößerung).

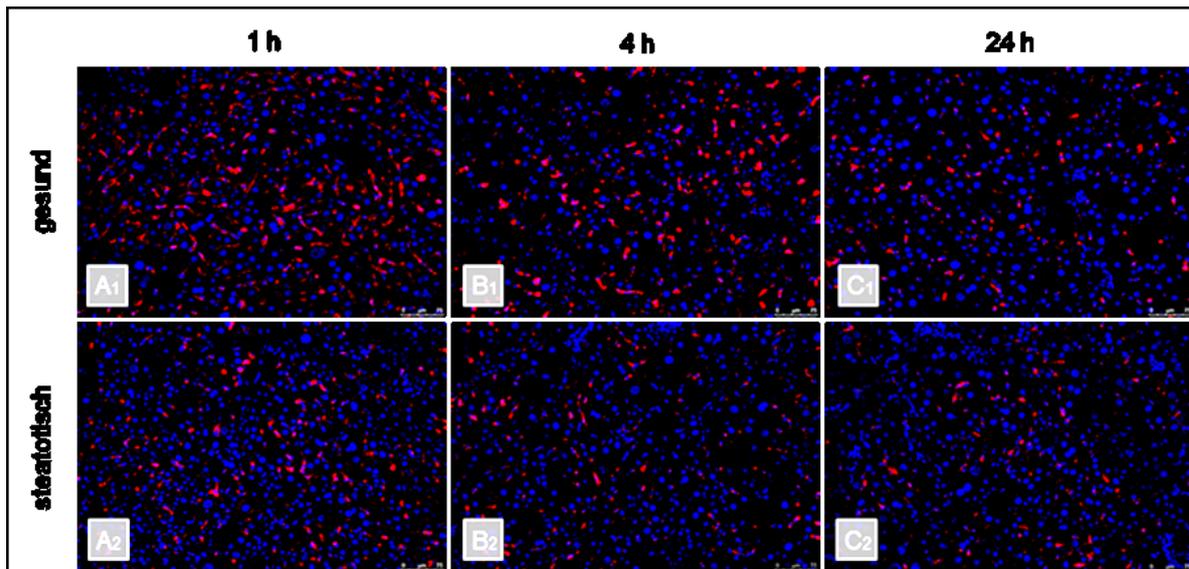


**Abb.11:** Repräsentative intravitalmikroskopische Aufnahmen zum Zeitpunkt 1 h, 4 h und 24 h nach Cy3-siRNA Injektion (20-fache Vergrößerung). Vergleich zwischen gesunden, unbehandelten Tieren (A1-C1) und STZ/HFD-behandelten Mäusen (A2-C2, 20-fache Vergrößerung).

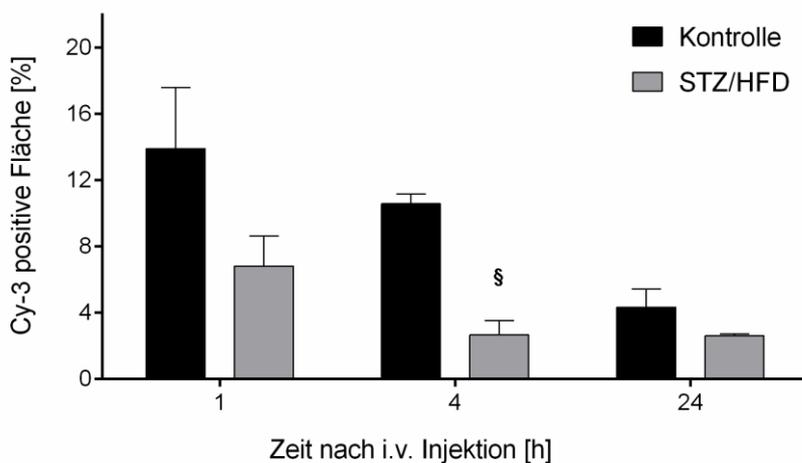
Diese Ergebnisse wurden zusätzlich durch eine histologische Aufarbeitung der gewonnenen Leberpräparate und Detektion der Cy3-Fluoreszenz bestätigt (Abb. 12, 13). Die quantitative Analyse der Cy3 markierten Fläche objektivierte die verminderte Anreicherung des Cy3-Farbstoffes im Leberparenchym von STZ/HFD-Mäusen. So zeigte sich zum Zeitpunkt 4 h *post injectionem* eine signifikante Reduktion ( $p < 0,0167$ ) der Cy3-positiven Fläche innerhalb des steatotisch veränderten Lebergewebes gegenüber den gesunden Kontrolltieren. Des Weiteren ließ sich eine deutliche Abnahme der Fluoreszenz in Abhängigkeit der Zeit nach Injektion beobachten (Abb. 13, 14).



**Abb. 12:** Repräsentative DAPI-gefärbte Leberschnitte von (A) Kontrolltieren und (B) Tieren des NASH-Fibrose-HCC Modells 4 h *post injectionem* der Cy3-markierten Lipoplexe (40-fache Vergrößerung).



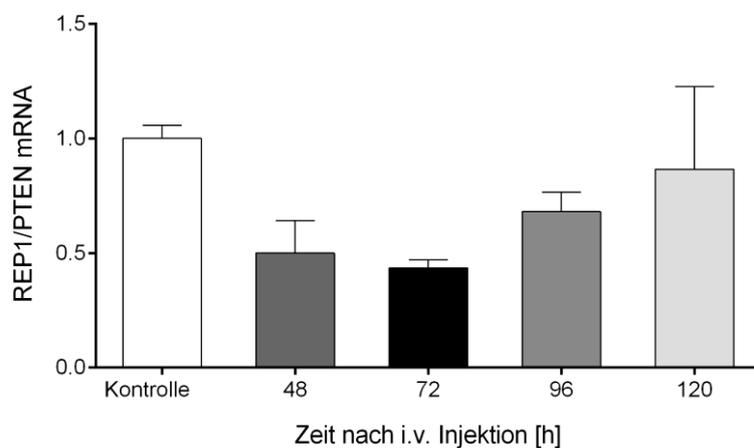
**Abb. 13:** Repräsentative DAPI-gefärbte Leberschnitte zum Zeitpunkt 1 h, 4 h und 24 h *post injectionem* der Cy3-markierten Lipoplexe (20-fache Vergrößerung). Vergleich zwischen gesunden/unbehandelten Tieren (A1-C1) mit Tieren aus dem NASH-Fibrose-HCC Modell (A2-C2, 20-fache Vergrößerung).



**Abb. 14:** Quantitative Analyse der Cy3-positiven Fläche zu den Zeitpunkten 1 h, 4 h und 24 h nach Injektion der Lipoplexe. Deutlich ist eine Reduktion der Fluoreszenzmarkierten Fläche in Abhängigkeit der Zeit nach Injektion sowie eine verminderte Anreicherung innerhalb des steatotischen Lebergewebes der STZ/HFD-Mäuse im Vergleich zu Kontrolltieren; MW±SEM; t-Test §<0,0167 gegen Kontrolle des gleichen Zeitpunktes; n=3 pro Zeitpunkt und Versuchsgruppe.

### 6.3 Studienabschnitt 2 - Repin1-Expressionskinetik nach siRNA-Behandlung

Um initial die Funktionalität der verwendeten siRNA-Behandlung zu untersuchen und dadurch die zeitliche Abfolge der repetitiven siRNA Injektionen zu definieren, wurde im zweiten Versuchsabschnitt eine Expressionkinetik von Repin1 erstellt. Mittels RT-PCR wurden die hepatischen Expressionslevel von Repin1 zu verschiedenen Zeitpunkten nach Applikation der CMD-siRepin1 Formulierung bestimmt. Um den gewünschten genregulierenden Effekt nachzuweisen sowie einen optimalen Zeitpunkt für die wiederholten siRNA Gabe zu bestimmen, erfolgte die Leberentnahme 48 h, 72 h, 96 h und 120 h *post injectionem*. Hierbei zeigte sich ein maximaler Knockdown von Repin1 72 h nach Applikation der Repin1 siRNA (Abb. 15). Das Expressionslevel von Repin1 konnte zu diesem Zeitpunkt im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle um 57 % des Kontrollwertes reduziert werden. Zu einem späteren Zeitpunkt normalisierte sich die mRNA-Expression des Zielgens wieder. 120 h nach Injektion der CMD-siRepin1 war der Knockdown mit einer nur 13 %igen Reduktion vom Kontrollwert annähernd aufgehoben (Abb. 15). Somit konnte ein siRNA-vermittelter Knockdown von Repin 1 erzielt und bestätigt werden. Ebenfalls wurde der optimale Zeitpunkt für eine wiederholte Injektion festgelegt, nämlich eine Gabe der siRNA alle 72 h bis zum Versuchsende.



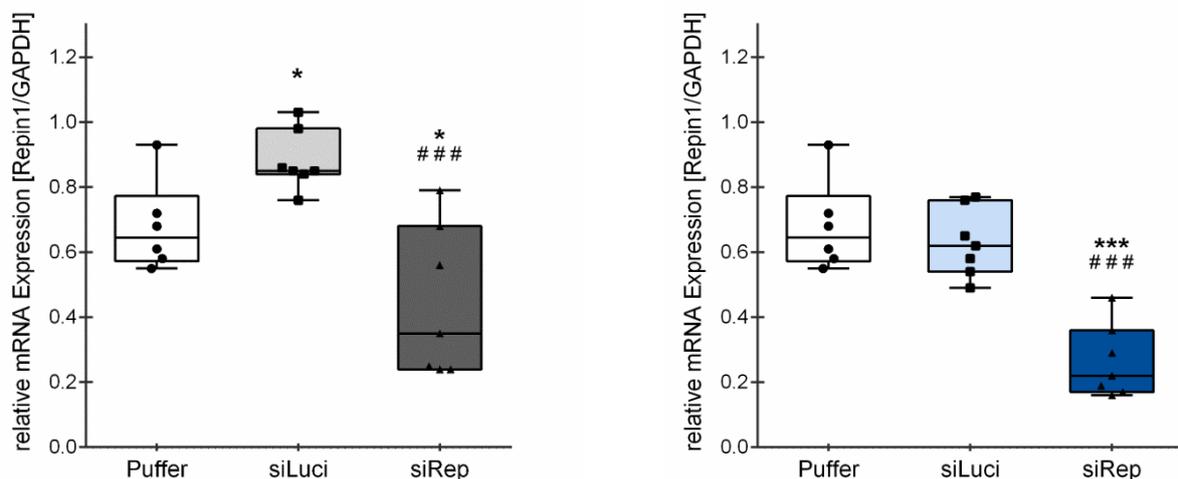
**Abb. 15:** Hepatische Repin1 mRNA Expressionslevel nach Injektion von CMD-siRepin1 zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren. Werte sind im Verhältnis zum Houskeeping Gen PTEN berechnet. MW $\pm$ SEM; n=2 pro Zeitpunkt und Versuchsgruppe.

## 6.4 Studienabschnitt 3 - Therapieansatz

### 6.4.1 Repin1-Knockdown

Nach Abschluss des in Absatz 5.2. beschriebenen dritten Studienabschnittes/Therapieansatzes wurden für jede Behandlungsgruppe und Lipoplex-Variante die hepatischen Expressionslevel von Repin1 zum Versuchsende bestimmt. Dabei zeigten die mit CMD-siRepin1-behandelten STZ/HFD-Versuchstiere einen signifikanten Knockdown der Repin1 mRNA im Vergleich zu den mit Pufferlösung als auch mit siLuci-behandelten Tieren (Abb. 16, links).

Die unter gleichem Therapieregime stehenden, mit der Hepaplex 2-siRepin1-Formulierung behandelten, Versuchstiere zeigten eine gegenüber beiden Kontrollgruppen (Puffer und siLuci) höchstsignifikante Abnahme der Repin1-mRNA Expression (Abb. 16 B, rechts).



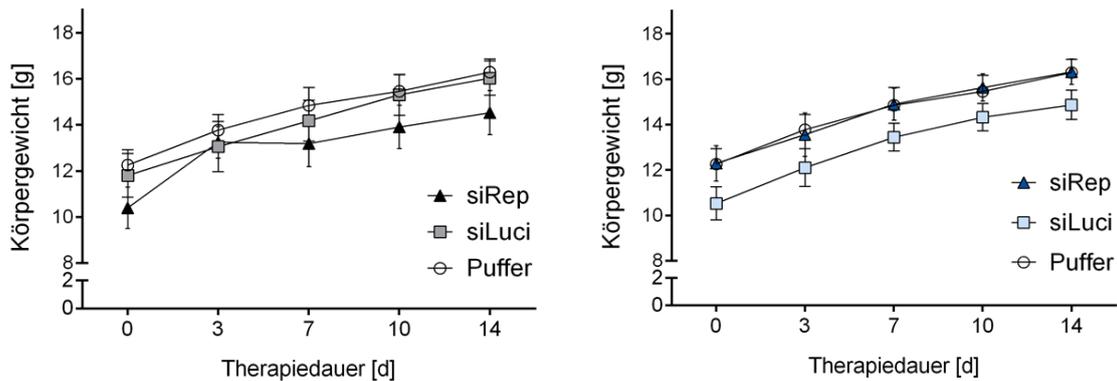
**Abb. 16:** Relative mRNA-Expression von Repin1 im Verhältniss zu GAPDH. Entnahme der Leber nach 14-tägiger siRNA- bzw. Puffer Behandlung von STZ/HFD-Mäusen alle 72 h. Links: Behandlung der Tiere mit der CMD- Formulierung. One way ANOVA, Holm-Sidak; \* $p < 0,05$  siREP vs. Puffer, siLuci vs. Puffer, ### $p < 0,001$  vs siLuci; Rechts: Behandlung der Tiere mit der Hepaplex 2-Formulierung; One way ANOVA; ### $p < 0,001$  vs siLuci, \*\*\* $p < 0,001$  vs Puffer. MW $\pm$ SEM; n=6 Puffer, n=7 siLuci und n=7 siRep.

### 6.4.2 Körpergewicht & Leber-/Körpergewichts-Index

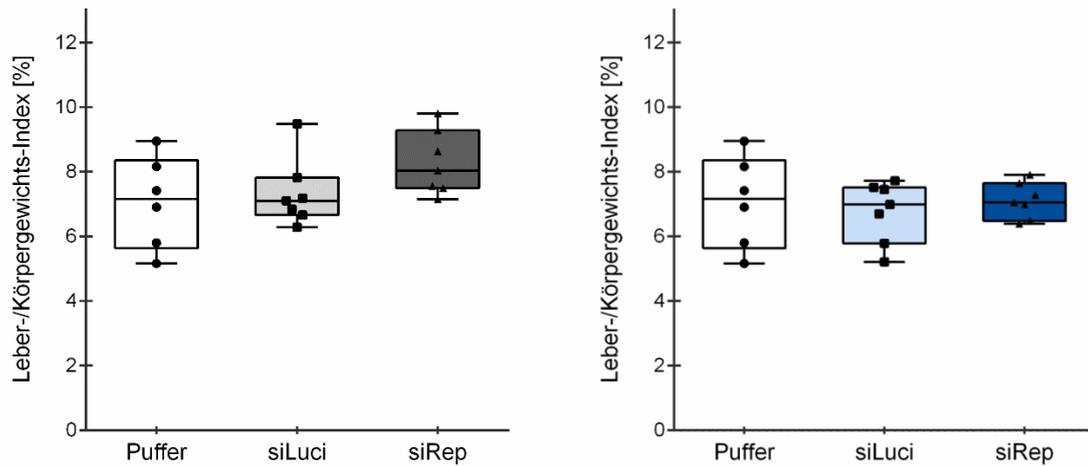
Um während der Therapiephase bei den STZ/HFD-Tieren Aussagen über den Gesundheitszustand und Metabolismus zu treffen, erfolgten, wie in Abschnitt 4.3.1 beschrieben, regelmäßige Kontrollen des Körpergewichtes sowie das Auswiegen der final entnommenen Leber. Das Verhältnis aus Körpergewicht zu Lebergewicht bildet den Leber-/Körpergewichts-Index und kann einen Hinweis auf eine pathologische Größenveränderung der Leber geben.

Zu Beginn des dritten Studienabschnittes lag das Körpergewicht der Versuchstiere zwischen 7,5 und 14,6 g. Im Therapiezeitraum von 14 Tagen, welcher gleichzeitig mit der Fütterung einer HFD verbunden war, kam es in allen Versuchsgruppen zu einer kontinuierlichen Gewichtszunahme. Dabei zeigten sich keine wesentlichen Differenzen zwischen den einzelnen Gruppen (Abb. 17). Einzig in der CMD-siRepin- behandelten Versuchsgruppe (Abb. 17, links) kam es nach einer deutlichen Gewichtszunahme zwischen Tag 0 und 3 zu einer Stagnation der Gewichtszunahme zwischen Tag 3 und 7. Im Folgenden kam es jedoch wieder zu einer konstant positiven Gewichtsentwicklung. Nach Beendigung des 14-tägigen Behandlungszeitraumes lag das Körpergewicht der Versuchstiere zwischen 11,4 g und 18,1 g.

Bei der Bestimmung des Leber-/Körpergewichts-Index zeigten sich keine signifikanten Unterschiede innerhalb der verschiedenen Versuchsgruppen. Der mittlere Leber-/Körpergewichts-Index lag dabei in allen Gruppen zwischen 7 und 8 % (Abb. 18).



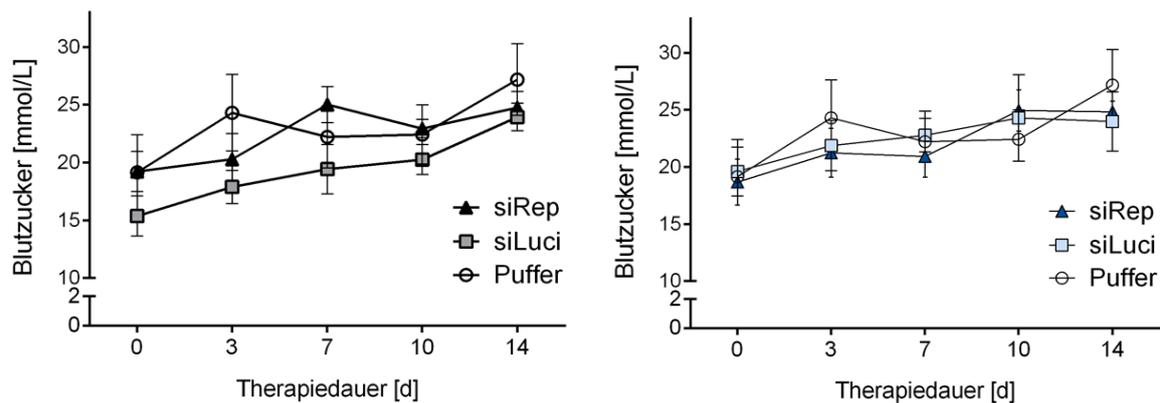
**Abb. 17:** Entwicklung des Körpergewichts von STZ/HFD-Mäusen nach 14-tägiger Behandlung mit siRepin1, siLuci und Pufferlösung. Links: CMD-siRNA-Formulierung. Rechts: Hepaplex 2-siRNA-Formulierung; MW±SEM; n=6 Puffer, n=7 siLuci und n=7 siRep.



**Abb. 18:** Leber-/Körpergewichts-Index von STZ/HFD-Mäusen nach 14-tägiger Behandlung mit siRepin1, siLuci und Pufferlösung. Links: CMD-siRNA-Formulierung. Rechts: Hepaplex 2-siRNA-Formulierung; MW±SEM; n=6 Puffer, n=7 siLuci und n=7 siRep.

### 6.4.3 Blutzucker

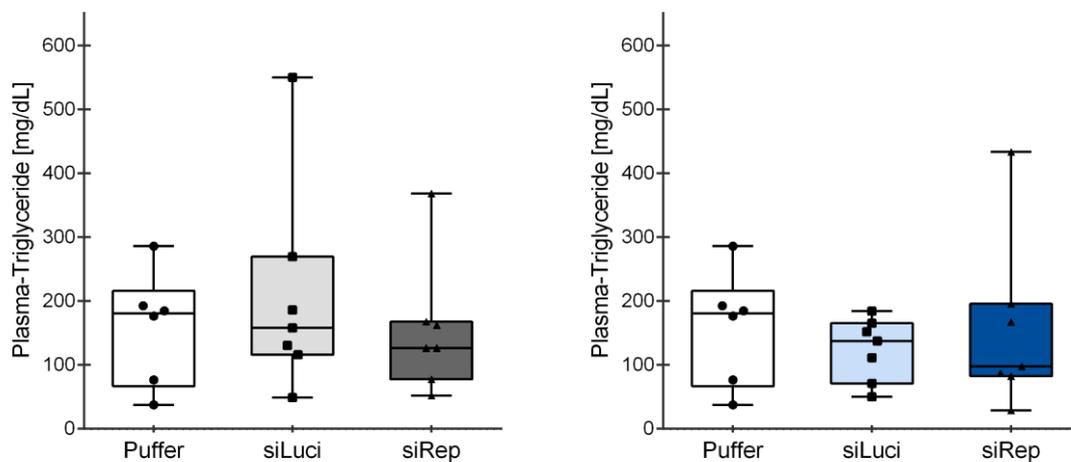
Wie im Abschnitt 5.3.1 erläutert, erfolgten während des gesamten dritten Studienabschnittes regelmäßige Kontrollen des Blutzuckers der Tiere. Die Versuchstiere präsentierten sich dabei durchgehend in diabetischer Stoffwechsellage. Im Therapiezeitraum von 14 Tagen kam es in beiden Versuchsreihen in allen Therapiegruppen zu einem Anstieg des mittleren Blutzuckerwertes im Bezug zum Ausgangswert ohne signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen (Abb. 19).



**Abb. 19:** Blutzuckerungsverlauf von STZ/HFD-Mäusen nach 14-tägiger Behandlung mit siRepin1, siLuci und Pufferlösung. Links: CMD-siRNA-Formulierung. Rechts: Hepaplex 2-siRNA-Formulierung; MW±SEM; n=6 Puffer, n=7 siLuci und n=7 siRep.

#### 6.4.4 Plasma-Triglyzeride

Nach der finalen Gewebe- und Blutentnahme wurde das Plasma der Versuchstiere auf dessen Gehalt an Triglyzeriden untersucht. Dabei zeigte sich bei beiden Versuchsreihen eine, bereits aus vorangegangenen Studien zum NASH-Fibrose-Tumor Mausmodell bekannte, modellbedingte Erhöhung der Plasma-Triglyzeridlevel (Abb. 20) im Vergleich zu unbehandelten Tieren, die Werte zwischen 20-40 mg/dl aufweisen. Bei Betrachtung der Therapiegruppen untereinander zeigten sich keine signifikanten Unterschiede, wobei jedoch eine große Streubreite innerhalb der einzelnen Gruppen bestand (Abb. 20).



**Abb. 20:** Plasma-Triglyzeridlevel von STZ/HFD-Mäusen nach 14-tägiger Behandlung mit siRepin1, siLuci und Pufferlösung. Links: CMD-siRNA-Formulierung. Rechts: Hepaplex 2-siRNA-Formulierung; MW±SEM; n=6 Puffer, n=7 siLuci und n=7 siRep.

#### 6.4.5 Vollblutanalyse

Um einen möglichen systemischen Einfluss der repetitiven siRNA-Applikationen sowie der mehrfachen chirurgischen Eingriffe zu untersuchen, erfolgte nach Beendigung der Therapie eine quantitative Analyse der korpuskulären Blutanteile. Dabei zeigten die von uns erhobenen Parameter keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Des Weiteren befanden sich die analysierten Parameter im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren durchweg in einem unauffälligen Bereich (Tab. 4).

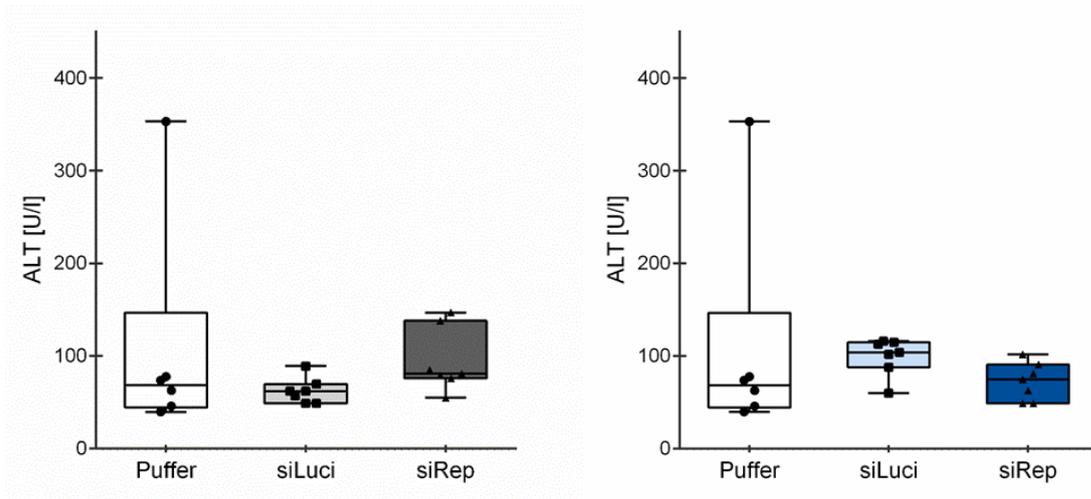
| CMD78   | WBC<br>(x10 <sup>9</sup> /L) | RBC<br>(x10 <sup>12</sup> /L) | HGB<br>(mmol/L) | HCT<br>(L/L) | PLT<br>(x10 <sup>9</sup> /L) |
|---------|------------------------------|-------------------------------|-----------------|--------------|------------------------------|
| Puffer  | 5,8 ± 1                      | 7,3 ± 1                       | 7,5 ± 0         | 0,4 ± 0      | 919,3 ± 30                   |
| siLuci  | 5,5 ± 1                      | 7,0 ± 1                       | 6,7 ± 1         | 0,4 ± 0      | 880,0 ± 102                  |
| siRepin | 6,3 ± 1                      | 6,6 ± 0                       | 6,7 ± 0         | 0,4 ± 0      | 919,6 ± 43                   |

| Hepaplex 2 | WBC<br>(x10 <sup>9</sup> /L) | RBC<br>(x10 <sup>12</sup> /L) | HGB<br>(mmol/L) | HCT<br>(L/L) | PLT<br>(x10 <sup>9</sup> /L) |
|------------|------------------------------|-------------------------------|-----------------|--------------|------------------------------|
| Puffer     | 5,8 ± 1                      | 7,3 ± 1                       | 7,5 ± 0         | 0,4 ± 0      | 919,3 ± 30                   |
| siLuci     | 8,2 ± 1                      | 7,0 ± 0                       | 7,0 ± 0         | 0,4 ± 0      | 984,3 ± 65                   |
| siRepin    | 8,5 ± 1                      | 8,2 ± 1                       | 8,2 ± 1         | 0,5 ± 0      | 810,0 ± 50                   |

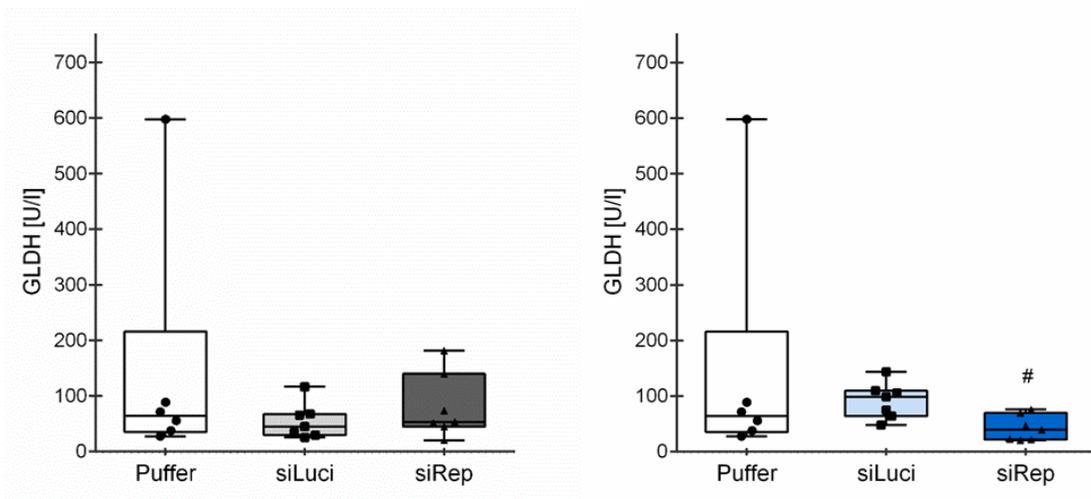
**Tab. 4:** Analyse der systemischen Blutzellzahlen von STZ/HFD-Mäusen nach 14-tägiger Behandlung mit siRepin1, siLuci und Pufferlösung. Oben: CMD-siRNA-Formulierung. Unten: Hepaplex 2-siRNA-Formulierung; Leukozytenzahl (WBC), Erythrozytenzahl (RBC), Hämoglobinwert (HGB), Hämatokrit (HCT) und Thrombozytenzahl (PLT). MW±SEM; n=6 Puffer, n=7 siLuci und n=7 siRep.

#### 6.4.5.1 ALT & GLDH

Die durch übermäßige Fetteinlagerung und oxidativen Stress bedingte Schädigung des Leberparenchyms wurde anhand der Aktivitäten der ALT sowie GLDH im Plasma untersucht. Dabei zeigte sich bei beiden Lipoplex-Varianten vor allem in der mit Pufferlösung behandelten Kontrollgruppe eine große interindividuelle Streuung der Werte (Abb. 21 und 22). Generell waren in allen Gruppen die Werte im Vergleich zu gesunden, unbehandelten Tieren (30-60 U/l, Abshagen et al. 2019) nur moderat erhöht. Während sich die ALT-Plasmakonzentration zwischen den Gruppen nicht wesentlich unterschied (Abb. 21), zeigte die mit Hepaplex 2-siRepin1 behandelte Versuchsgruppe die niedrigste GLDH-Aktivität im Plasma (Abb. 22). Hier ließen sich signifikant verminderte Werte gegenüber der Kontrollgruppe siLuci nachweisen (p=0,036).



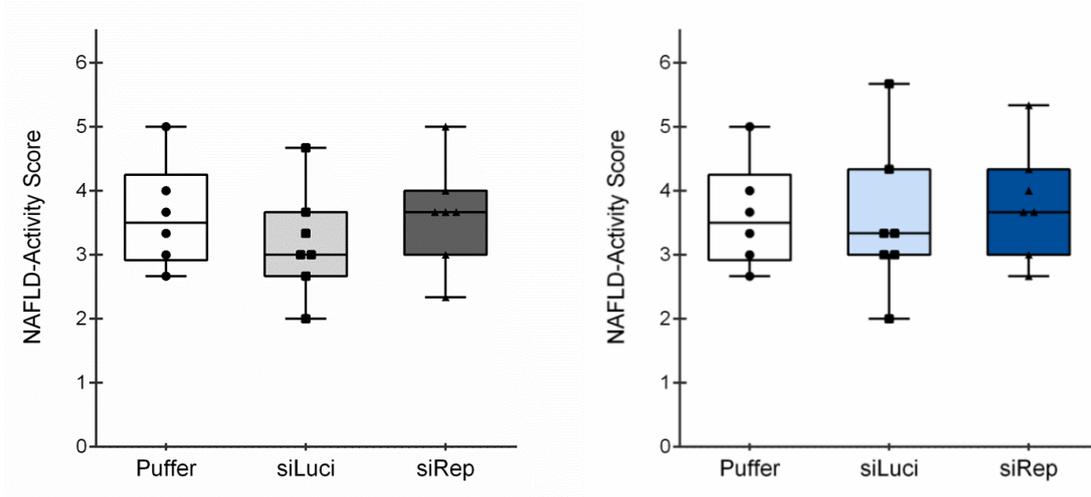
**Abb. 21:** Spektrophotometrische Analyse der ALT-Aktivität im Plasma von STZ/HFD-Mäusen nach 14-tägiger Behandlung mit siRepin1, siLuci und Pufferlösung. Links: CMD-siRNA-Formulierung. Rechts: Hepaplex 2-siRNA-Formulierung; MW±SEM; n=6 Puffer, n=7 siLuci und n=7 siRep.



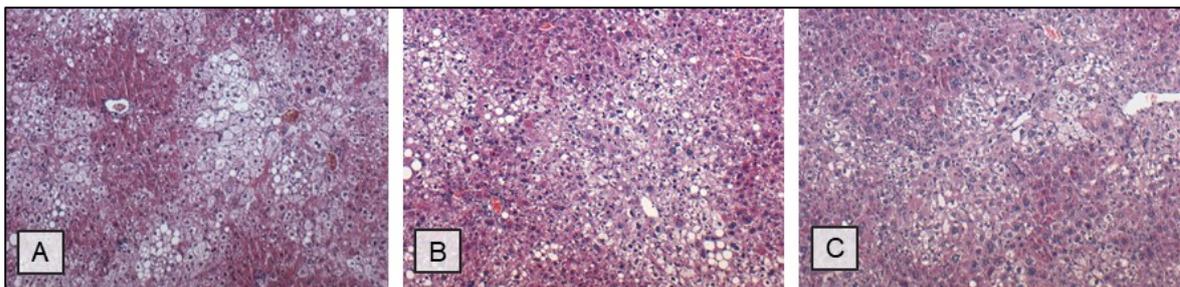
**Abb. 22:** Spektrophotometrische Analyse der GLDH-Aktivität im Plasma von STZ/HFD-Mäusen nach 14-tägiger Behandlung mit siRepin1, siLuci und Pufferlösung. Links: CMD-siRNA-Formulierung. Rechts: Hepaplex 2-siRNA-Formulierung. One way ANOVA, Dunns; #p<0,05 siREP vs. siLuci; MW±SEM; n=6 Puffer, n=7 siLuci und n=7 siRep.

### 6.4.6 NAFLD-Activity Score

Die Erhebung des NAS erfolgte verblindet sowie durch drei voneinander unabhängige Betrachter (siehe Abschnitt 5.4.4.6). Die Auswertung zeigte bei beiden Lipoplex-Varianten vergleichbare Ergebnisse zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen ohne signifikante Unterschiede (Abb. 22). Generell waren die erhobenen Werte mit denen bereits aus Vorstudien (Abshagen et al., 2019) bekannten Scores zum Zeitpunkt 6 Wochen *post partum* vergleichbar.



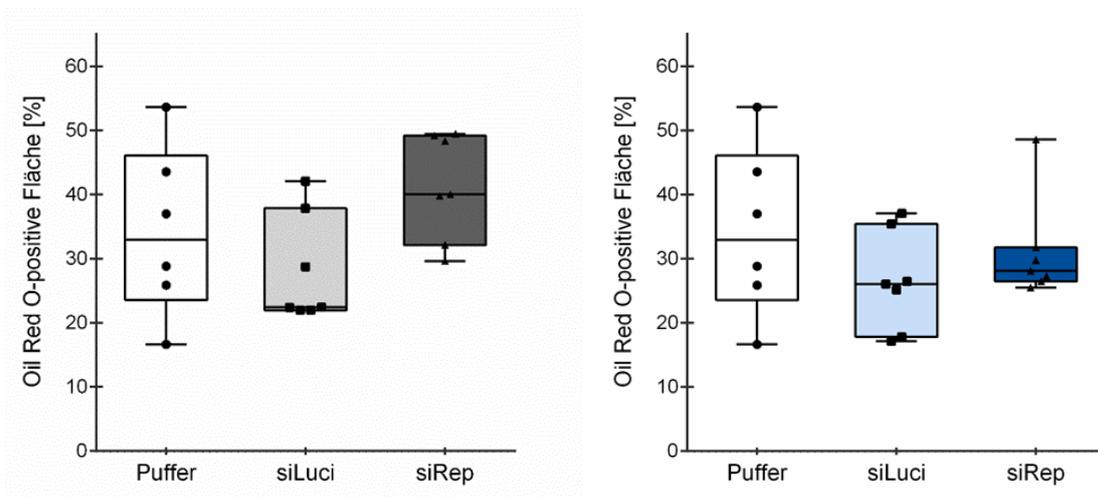
**Abb. 22:** NAFLD-Activity Score von STZ/HFD-Mäusen nach 14-tägiger Behandlung mit siRepin1, siLuci und Pufferlösung. Links: CMD-siRNA-Formulierung. Rechts: Hepaplex 2-siRNA-Formulierung; MW±SEM; n=6 Puffer, n=7 siLuci und n=7 siRep.



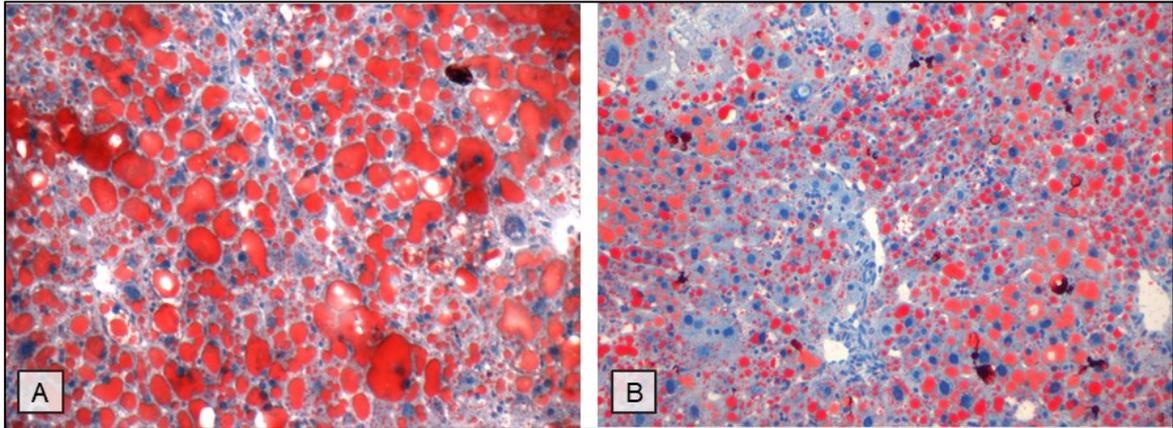
**Abb. 23:** Repräsentative Abbildungen HE-gefärbter Leberschnitte von Tieren, welche 14 Tage mit der Hepaplex 2-Formulierung behandelt wurden; Puffer (A), siLuci (B) und siRepin (C). 10- fache Vergrößerung.

### 6.4.7 Lipidgehalt

Um den intrahepatischen Lipidgehalt und das Verteilungsmuster der Lipide genauer zu untersuchen, folgte die Aufbereitung von kryokonserviertem Lebergewebe wie in Abschnitt 5.4.4.3 beschrieben. Die mit Adobe Photoshop durchgeführte quantitative Analyse Oil-Red-O-gefärbter Leberschnitte ergab in allen STZ/HFD-Tieren einen hohen Lipidgehalt in der Leber. Dabei konnten aber in beiden Versuchsreihen keine signifikanten Unterschiede im Lipidgehalt zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen (Abb. 24) detektiert werden. Bei detaillierter mikroskopischer Analyse der Leberschnitte zeigten sich jedoch interessanterweise deutliche interindividuelle Unterschiede in der Größe und Anzahl der Lipidansammlungen (Abb. 25 A und B), ohne eine eindeutige Zuordnung zu einer der Versuchsgruppe zuzulassen.



**Abb. 24:** Oil-Red-O positive Fläche im prozentualen Verhältnis zum gesamten Bildausschnitt des Präparates von STZ/HFD-Mäusen nach 14-tägiger Behandlung mit siRepin1, siLuci und Pufferlösung. Links: CMD-siRNA-Formulierung. Rechts: Hepaplex 2-siRNA-Formulierung; MW±SEM; n=6 Puffer, n=7 siLuci und n=7 siRep.



**Abb. 25:** Beispielhafte Abbildungen Oil-Red-O gefärbter Leberschnitte von STZ/HFD-Mäusen im Alter von 6 Wochen. Lipid-Mehranreicherung (A) im Vergleich zu (B). 10-fache Vergrößerung.

#### 6.4.8 Lipidklassen

Die von unserem Kooperationspartner Dr. rer. nat. Dannenberger durchgeführten Lipidanalysen des Lebergewebes zeigten in den STZ/HFD-Tieren eine gesamtheitliche Erhöhung der intrahepatischen Lipide im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe (Tab. 5). Untersucht wurden neben dem hepatischen Gesamtfettanteil die Mengen an Phospholipiden, Cholesterin, Cholesterinestern, freien Fettsäuren und Triglyzeriden. Dabei zeigte sich der prozentuale Fettgehalt des Lebergewebes versuchsgruppenübergreifend um den Faktor 2-3 erhöht im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren. Der Anteil der im Lebergewebe enthaltenen Triglyzeride zeigte sich sogar um das 3-4 fache erhöht. Zwischen den Versuchsgruppen konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden (Tab. 5).

| <u>CMD78</u> | Fettgehalt (%) | PL (mg/g Leber) | CHO (mg/g Leber) | FFS (mg/g Leber) | TG (mg/g Leber) | CHO-E (mg/g Leber) |
|--------------|----------------|-----------------|------------------|------------------|-----------------|--------------------|
| Puffer       | 7,38 ± 1,24    | 12,59 ± 0,52    | 4,70 ± 0,31      | 5,21 ± 0,48      | 27,77 ± 3,22    | 5,21 ± 0,51        |
| siLuci       | 6,31 ± 0,27    | 12,82 ± 0,79    | 7,07 ± 0,57      | 5,28 ± 0,34      | 22,51 ± 1,43    | 6,79 ± 0,54        |
| siRepin      | 7,82 ± 0,70    | 14,72 ± 1,49    | 5,26 ± 1,01      | 6,18 ± 1,29      | 30,66 ± 3,20    | 6,46 ± 1,08        |

| <u>Hepaplex 2</u> | Fettgehalt (%) | PL (mg/g Leber) | CHO (mg/g Leber) | FFS (mg/g Leber) | TG (mg/g Leber) | CHO-E (mg/g Leber) |
|-------------------|----------------|-----------------|------------------|------------------|-----------------|--------------------|
| Puffer            | 7,38 ± 1,24    | 12,59 ± 0,52    | 4,70 ± 0,31      | 5,21 ± 0,48      | 27,77 ± 3,22    | 5,21 ± 0,51        |
| siLuci            | 6,52 ± 0,28    | 13,51 ± 1,72    | 4,82 ± 1,04      | 5,61 ± 1,17      | 23,30 ± 2,18    | 5,56 ± 1,02        |
| siRepin           | 8,03 ± 1,02    | 12,23 ± 1,81    | 5,31 ± 1,14      | 4,90 ± 1,21      | 29,96 ± 5,03    | 7,55 ± 0,67        |

| <u>Kontrolle</u> | Fettgehalt (%) | PL (mg/g Leber) | CHO (mg/g Leber) | FFS (mg/g Leber) | TG (mg/g Leber) | CHO-E (mg/g Leber) |
|------------------|----------------|-----------------|------------------|------------------|-----------------|--------------------|
| K468             | 2,99           | 9,31            | 3,80             | 4,61             | 7,41            | 4,16               |

**Tab.5:** Analyse der im Leberparenchym enthaltenen Lipidklassen von STZ/HFD-Mäusen nach 14-tägiger Behandlung mit siRepin1, siLuci und Pufferlösung. Zum Vergleich dient ein gesundes Kontrolltier (K468). Fettgehalt, Phospholipide (PL), Cholesterin (CHO), Freie Fettsäuren(FFS), Triglyzeride (TG), Cholesterinester(CHO-E). Oben CMD-siRepin-Formulierung. Unten Hepaplex 2; MW±SEM, n=6 Puffer, n=7 siLuci und n=7 siRep.

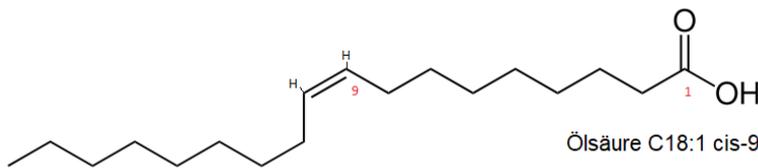
### 6.4.9 Fettsäureprofiling

Die spezifische Analyse der Fettsäuren erfolgte ebenfalls durch unseren Kooperationspartner Dr. rer. nat. Dannenberger und der Arbeitsgruppe Lipidmetabolismus des Leibnitz-Instituts für Nutztierbiologie in Dummerstorf.

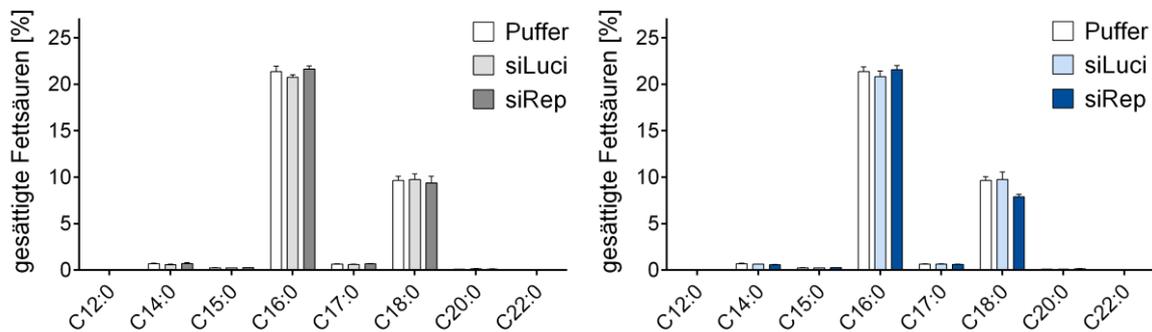
Es folgt zunächst eine Erläuterung zur Nomenklatur der nachstehenden Grafiken und allgemeinen Formelschreibweise der verschiedenen Fettsäuren: Die Kennzahl C beschreibt die Anzahl an Kohlenstoffatomen und definiert damit die Kettenlänge der jeweiligen Fettsäure. Diesem zugeordnet ist die Anzahl an Doppelbindungen, wobei der zuletzt stehende Nennwert die Position der ersten Doppelbindung innerhalb der Fettsäure beschreibt. Neben der Anzahl und Position der Doppelbindungen ist die Stellung der an die Doppelbindungen gebundenen Wasserstoffatome durch eine cis- oder trans-Konfiguration definiert. In der in pflanzlichen Fetten vorherrschenden cis-Stellung befinden sich die Wasserstoffatome auf der gleichen Seite; in trans-Stellung hingegen liegt eine diametrale Anordnung der Wasserstoffatome vor (Abb. 26). Die oben genannte Erläuterung bezieht sich dabei auf die durch die *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC)

genutzte Nomenklatur, bei der von der Carboxy-Gruppe aus gezählt wird. Im Falle der Omega-n-Fettsäuren hat sich dagegen die Zählweise beginnend vom „Omega-Ende“, gegenüberliegend der Carboxygruppe, durchgesetzt. Hier ist die Stellung der ersten Doppelbindung innerhalb der Grafiken dem Kennwert n nachstehend (Abb. 26).

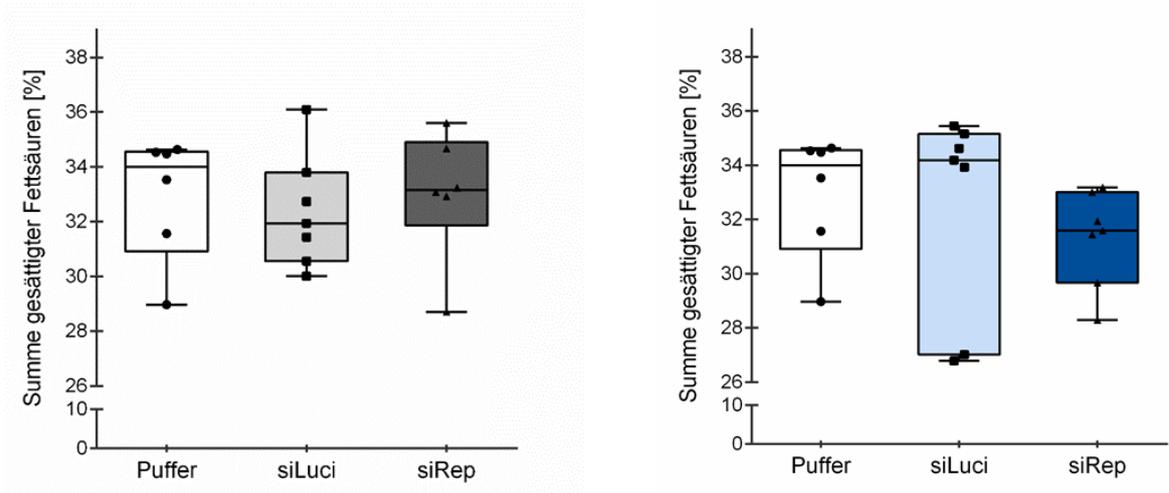
Die Analyse der gesättigten Fettsäuren ergab ein vermehrtes Vorkommen von Palmitinsäure (C16:0) und Stearinsäure (C18:0), ohne sich signifikant zwischen den einzelnen STZ/HFD-Versuchsgruppen zu unterscheiden (Abb. 27). Zu beobachten war jedoch eine leichte Reduktion der einfach gesättigten C18-Fettsäure in der mit siRepin-behandelten Versuchsgruppe (Hepaplex 2-Formulierung). In Betrachtung der Gesamtsummen aller gesättigten Fettsäuren zeigte sich dabei selbige Versuchsgruppe mit einer Reduktion des relativen Gehalts an gesättigten Fettsäuren (Abb. 28, rechts), was jedoch nicht signifikant war.



**Abb. 26:** Schematische Darstellung der einfach- ungesättigten Ölsäure

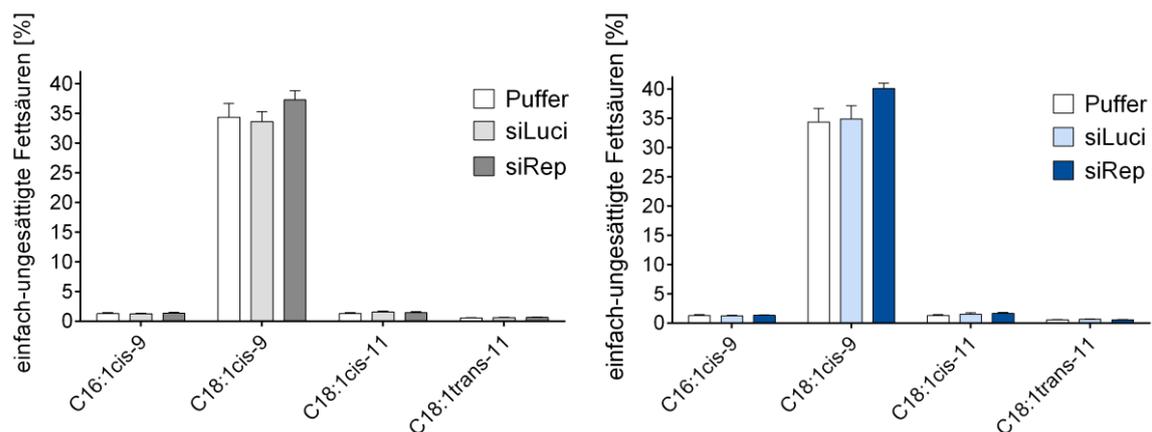


**Abb. 27:** Anteil der gesättigten Fettsäuren im Lebergewebe von STZ/HFD-Mäusen nach 14-tägiger Behandlung mit siRepin1, siLuci und Pufferlösung. Links: CMD-siRNA-Formulierung. Rechts: Hepaplex 2-siRNA-Formulierung; MW±SEM; n=6 Puffer, n=7 siLuci und n=7 siRep.

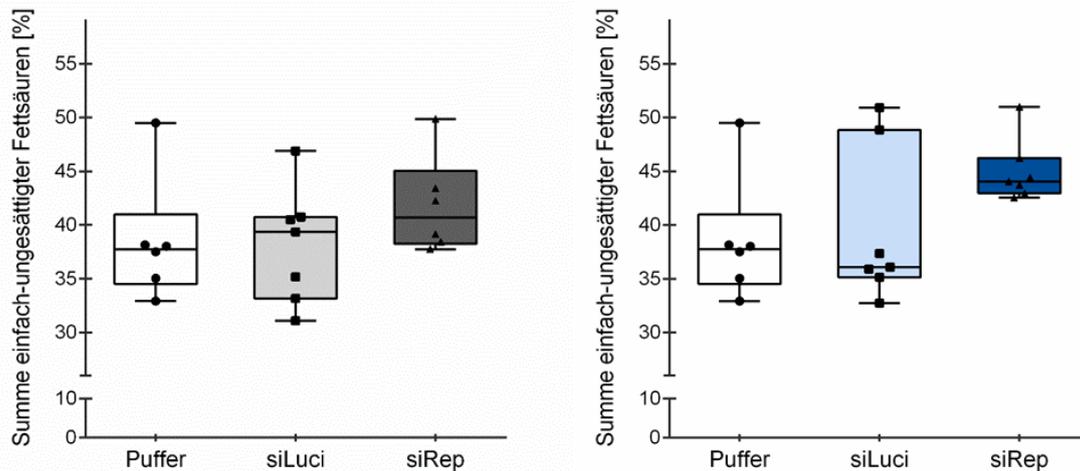


**Abb. 28:** Summe der gesättigten Fettsäuren im Lebergewebe von STZ/HFD-Mäusen nach 14-tägiger Behandlung mit siRepin1, siLuci und Pufferlösung. Links: CMD-siRNA-Formulierung. Rechts: Hepaplex 2-siRNA-Formulierung;  $MW \pm SEM$ ;  $n=6$  Puffer,  $n=7$  siLuci und  $n=7$  siRep.

Unter den einfach-ungesättigten Fettsäuren dominierte in allen STZ/HFD-Versuchsgruppen quantitativ die Ölsäure (C18:1cis-9) (Abb. 29). Bei Betrachtung der Gesamtsummen an einfach ungesättigten Fettsäuren (Abb. 30) fiel eine leichte Erhöhung des medianen Gesamtgehaltes an einfach ungesättigten Fettsäuren in den siRepin1-behandelten Tieren auf. Im Vergleich zu den mit Pufferlösung und siLuci behandelten Versuchstieren zeigte sich dieser Unterschied jedoch nicht als signifikant (Abb. 30).

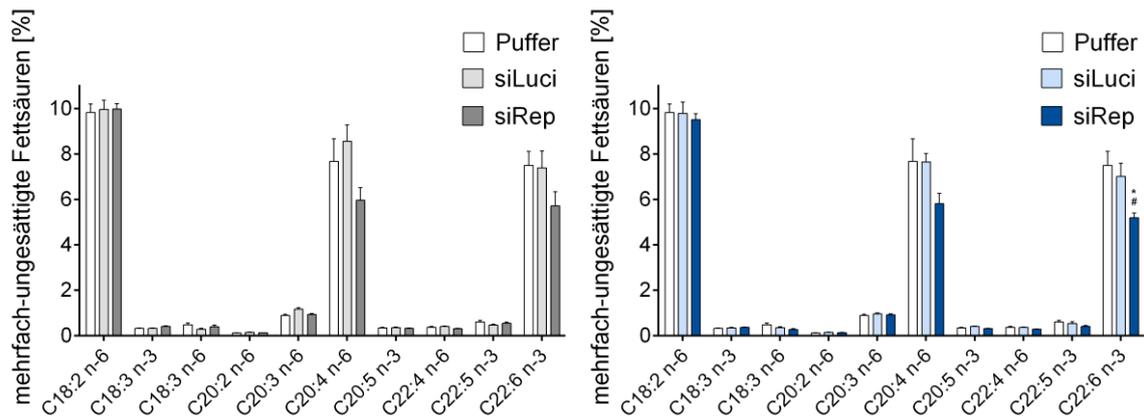


**Abb. 29:** Einfach-ungesättigte Fettsäuren im Lebergewebe von STZ/HFD-Mäusen nach 14-tägiger Behandlung mit siRepin1, siLuci und Pufferlösung. Links: CMD-siRNA-Formulierung. Rechts: Hepaplex 2-siRNA-Formulierung;  $MW \pm SEM$ ;  $n=6$  Puffer,  $n=7$  siLuci und  $n=7$  siRep.

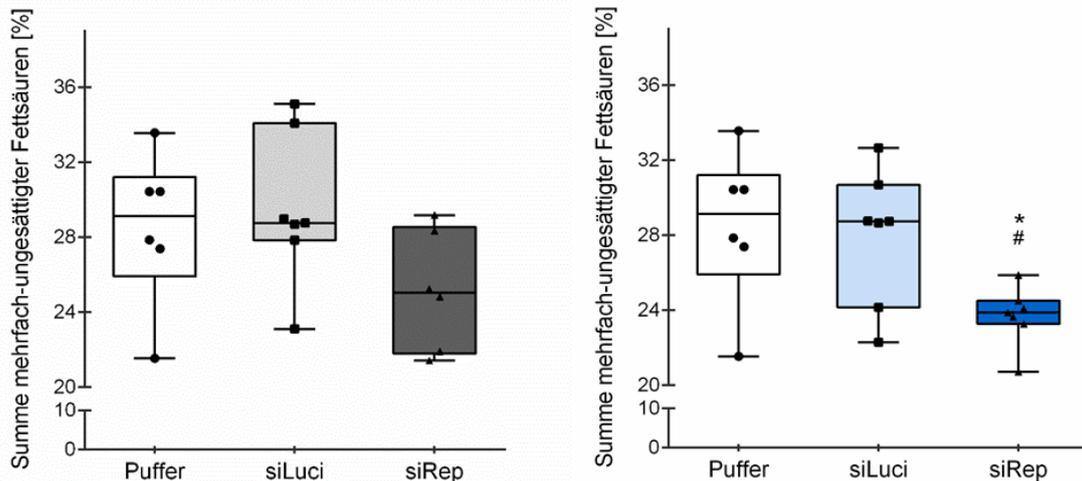


**Abb. 30:** Summe der einfach-ungesättigten Fettsäuren im Lebergewebe von STZ/HFD-Mäusen nach 14-tägiger Behandlung mit siRepin1, siLuci und Pufferlösung. Links: CMD-siRNA-Formulierung. Rechts: Hepaplex 2-siRNA-Formulierung;  $MW \pm SEM$ ;  $n=6$  Puffer,  $n=7$  siLuci und  $n=7$  siRep.

Im Bereich der *mehrfach-ungesättigten Fettsäuren* (PUFA) überwogen anteilig die Linolsäure (C18:2 n-6), die Arachidonsäure (C20:4 n-6) sowie die *Docosahexaensäure* (DHA, C22:6n-3) (Abb. 31). Unter Verwendung beider Lipoplex-Formulierungen zeigte sich jeweils für die siRep-Versuchsgruppe reduzierte Mengen an Arachidonsäure sowie DHA im Vergleich zur Puffer- und siLuci-Kontrollgruppe. Diese Reduktion war gegenüber beiden Kontrollgruppen für die Hepaplex2-behandelte Versuchsgruppe signifikant ( $p < 0,05$ ) (Abb. 31). Bei Betrachtung der Gesamtsumme der PUFA waren auch hier reduzierte Mengen in den siRepin1-Versuchsgruppen zu beobachten (Abb.32). Für die Hepaplex2-Formulierung war diese Reduktion der PUFA in den siRep-Tieren gegenüber den Kontrollgruppen siLuci und Puffer ebenfalls signifikant ( $p < 0,05$ ) (Abb.32).

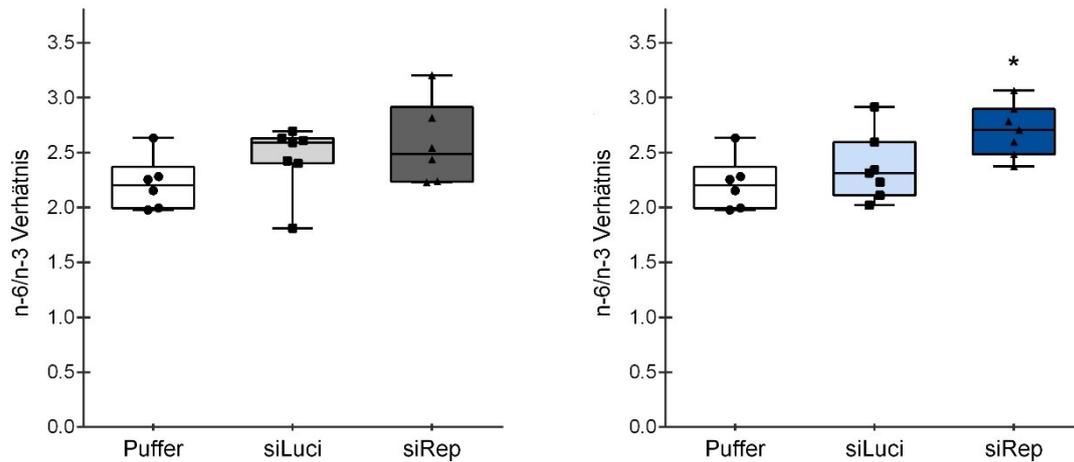


**Abb. 31:** Mehrfach- ungesättigte Fettsäuren im Lebergewebe von STZ/HFD-Mäusen nach 14-tägiger Behandlung mit siRepin1, siLuci und Pufferlösung. Links: CMD-siRNA-Formulierung. Rechts: Hepaplex 2-siRNA-Formulierung. One way ANOVA, Holm-Sidak; # $p < 0,05$  siREP vs. siLuci \* $p < 0,05$  siREP vs. Puffer;  $MW \pm SEM$ ;  $n = 6$  Puffer,  $n = 7$  siLuci und siRep.



**Abb. 32:** Summe der mehrfach-ungesättigten Fettsäuren im Lebergewebe von STZ/HFD-Mäusen nach 14-tägiger Behandlung mit siRepin1, siLuci und Pufferlösung. Links: CMD-siRNA-Formulierung. Rechts: Hepaplex 2-siRNA-Formulierung. One way ANOVA, Holm-Sidak; # $p < 0,05$  siREP vs. siLuci \* $p < 0,05$  siREP vs. Puffer;  $MW \pm SEM$ ;  $n = 6$  Puffer,  $n = 7$  siLuci und siRep.

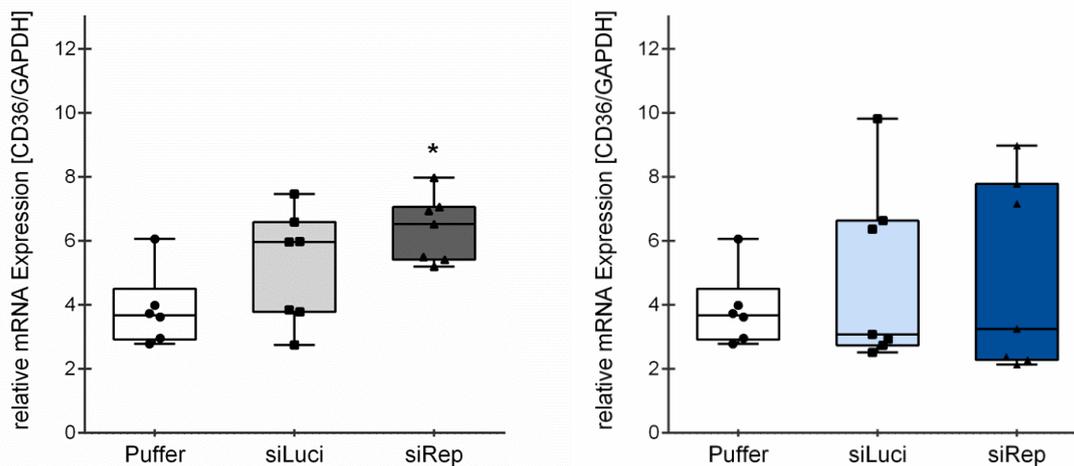
Das errechnete Verhältnis von Omega-6- zu Omega-3-Fettsäuren verschob sich in den siRep-Versuchsgruppen im Vergleich zu den Kontrollgruppen Puffer und siLuci in Richtung Omega-6 Fettsäuren. Unter Verwendung der Hepaplex2-Formulierung war diese Erhöhung des n-6/n-3-Verhältnisses signifikant gegenüber der Puffer-Kontrolle (Abb. 33).



**Abb. 33:** Verhältnis von n-6- zu n-3-Fettsäuren im Lebergewebe von STZ/HFD-Mäusen nach 14-tägiger Behandlung mit siRepin1, siLuci und Pufferlösung. Links: CMD-siRNA-Formulierung. Rechts: Hepaplex 2-siRNA-Formulierung. One way ANOVA, Holm-Sidak; \* $p < 0,05$  siREP vs. Puffer;  $MW \pm SEM$ ;  $n=6$  Puffer,  $n=7$  siLuci und siRep.

#### 6.4.10 Fettsäuretransporter

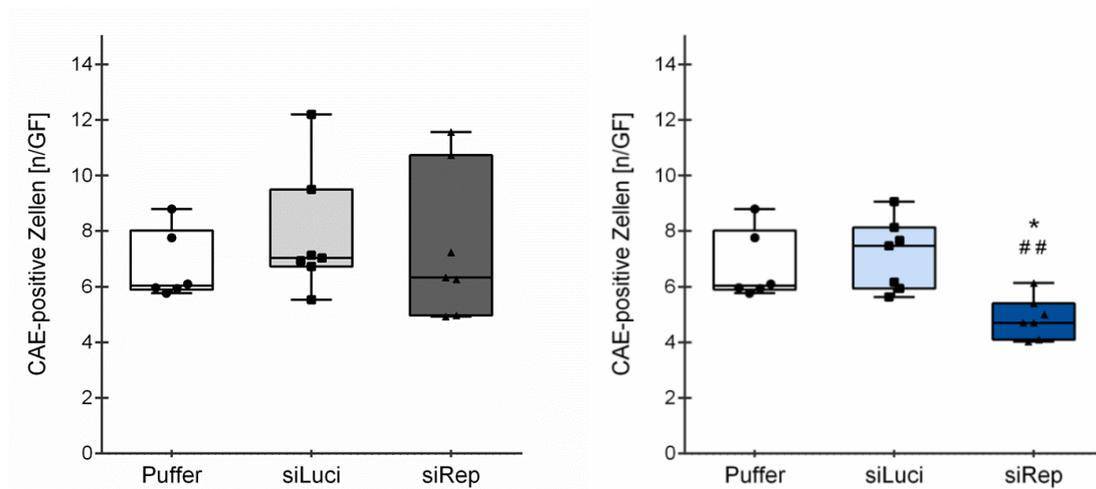
Die mRNA-Expressionslevel von CD36 waren in der mit CMD-Lipoplex behandelten siRepin1-Versuchsgruppe signifikant gegenüber der Puffer-Kontrollgruppe erhöht ( $p < 0,012$ ) (Abb. 34). Im Gegensatz dazu zeigten sich unter Nutzung der Hepaplex2-Formulierung keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen (Abb. 34).



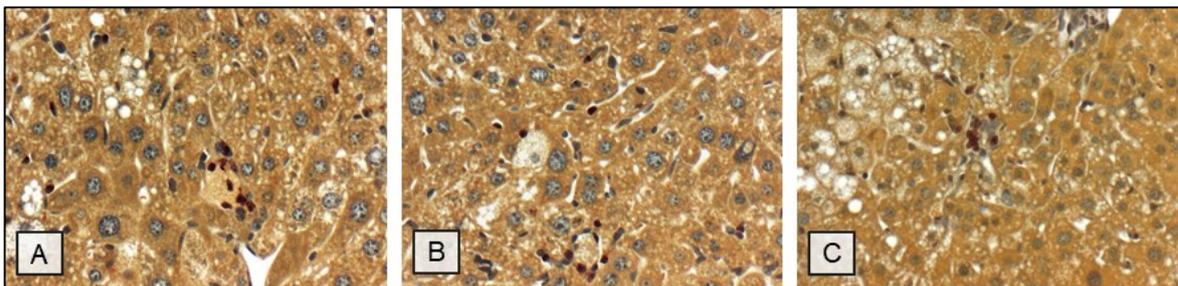
**Abb. 34:** Relative mRNA Expression von CD36 im Verhältniss zu GAPDH im Lebergewebe von STZ/HFD-Mäusen nach 14-tägiger Behandlung mit siRepin1, siLuci und Pufferlösung. Links: CMD-siRNA-Formulierung. Rechts: Hepaplex 2-siRNA-Formulierung. One way ANOVA, Holm-Sidak; \* $p < 0,05$  siREP vs. Puffer;  $MW \pm SEM$ ;  $n=6$  Puffer,  $n=7$  siLuci und siRep.

### 6.4.11 CAE

Die Beurteilung der Leukozyteninfiltration ins Leberparenchyms erfolgte über die Auszählung CAE-positiver Zellen. Dabei zeigte sich unter Verwendung der Hepaplex2-Formulierung eine signifikant geringere Anzahl von Granulozyten in der siRep-Versuchsgruppe im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Die beschriebene Reduktion gegenüber der Kontrollgruppe siLuci fiel dabei signifikant ( $p=0,016$ ) aus, die Reduktion gegenüber der Puffer-Gruppe sogar hochsignifikant ( $p=0,004$ ) (Abb.35).

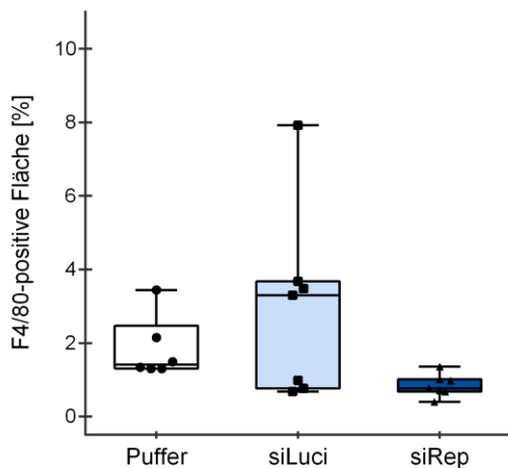


**Abb. 35:** CAE-positive Zellen im Lebergewebe von STZ/HFD-Mäusen nach 14-tägiger Behandlung mit siRepin1, siLuci und Pufferlösung. Links: CMD-siRNA-Formulierung. Rechts: Hepaplex 2-siRNA-Formulierung. One way ANOVA, Holm-Sidak; \* $p<0,05$  siREP vs. Puffer ## $p<0,01$  siREP vs. siLuci; MW $\pm$ SEM; n=6 Puffer, n=7 siLuci und siRep.

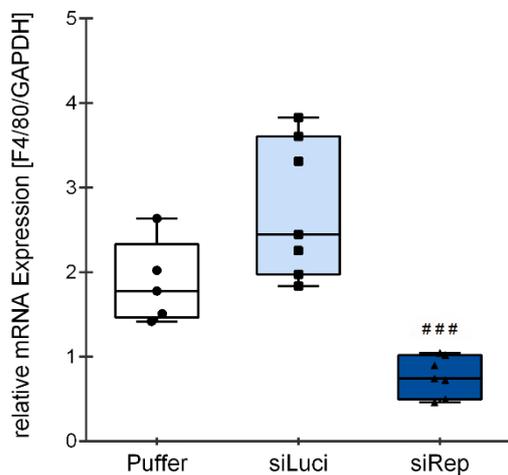


**Abb. 36:** Repräsentative Abbildung CAE-gefärbter Leberschnitte von Tieren, welche 14 Tage mit der Hepaplex 2-Formulierung behandelt wurden; Puffer (A), siLuci (B) und siRepin (C). 20- fache Vergrößerung.

Zur weiteren Charakterisierung der hepatischen Inflammation wurden die Makrophagen mittels des Antikörpers F4/80 quantifiziert (Abb. 36) sowie dessen hepatische mRNA-Expressionslevel mittels PCR bestimmt. Dabei zeigte die Versuchsgruppe siRep im Vergleich zu den Kontrollgruppen Puffer und siLuci histologisch eine deutliche Reduktion der F4/80-positiven Fläche (Abb. 37). Dies ließ sich auch in der PCR-Analyse bestätigen, wobei die mRNA-Expressionslevel von F4/80 in der siRep höchstsignifikant ( $p < 0,001$ ) gegenüber der siLuci- Kontrollgruppe erniedrigt waren (Abb. 38).



**Abb. 37:** F4/80 positive Fläche im prozentualen Verhältnis zum gesamten Bildausschnitt. Lebergewebe von STZ/HFD-Mäusen nach 14-tägiger Behandlung mit siRepin1, siLuci und Pufferlösung. Unter Verwendung der Hepaplex 2-siRNA-Formulierung; MW±SEM; n=6 Puffer, n=7 siLuci und n=7 siRep.

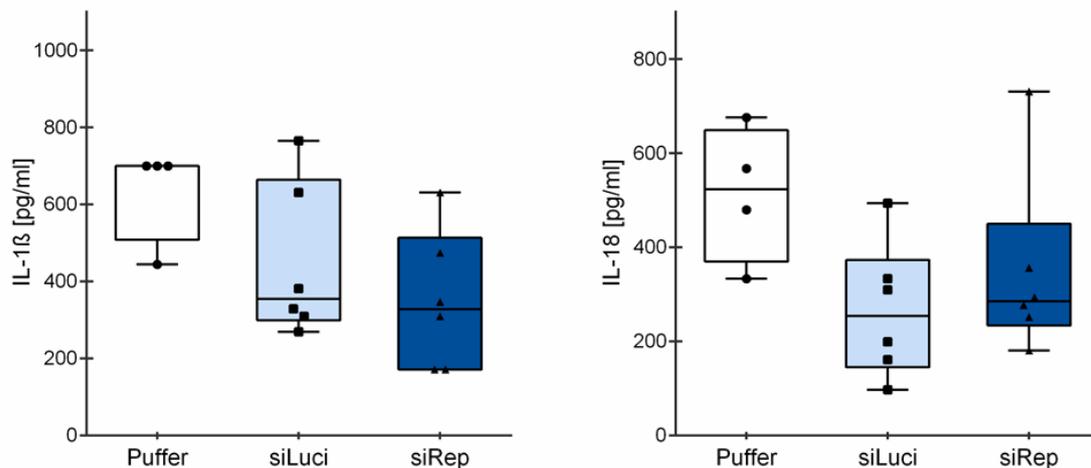


**Abb. 38:** Relative mRNA Expression von F4/80 im Verhältnis zu GAPDH im Lebergewebe von STZ/HFD-Mäusen nach 14-tägiger Behandlung mit siRepin1, siLuci und Pufferlösung. Unter Verwendung der Hepaplex 2-siRNA-Formulierung; Oneway ANOVA; Holm-Sidak, ### $p < 0,001$  siREP vs. siLuci; MW±SEM; n=6 Puffer, n=7 siLuci und n=7 siRep.

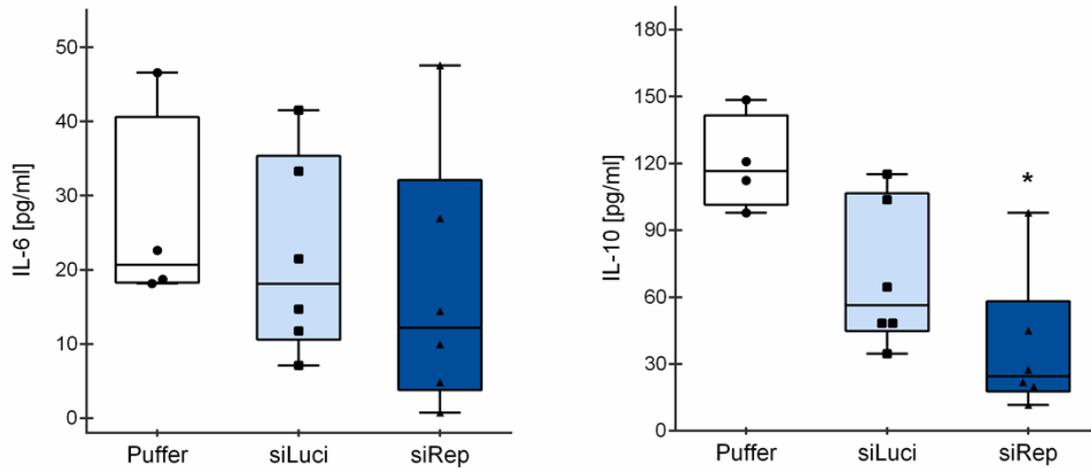
### 6.4.12 Zytokine

Die quantitative Auswertung systemischer Zytokinspiegel ergab leider große interindividuelle Streuungen innerhalb der jeweiligen Versuchsgruppen. Generell wurden im Vergleich zu den Kontrollgruppen für die siRep-Gruppe für nahezu allen analysierten Zytokinen niedrigere Werte detektiert.

So war das proinflammatorische IL-1 $\beta$  in der Versuchsgruppe siRep in leicht reduzierter Konzentration gegenüber den Kontrollgruppen Puffer und siLuci zu beobachten (Abb. 39 links). IL-18, das analog zu IL-1 $\beta$  zur IL-1-Superfamilie zugehörig ist, zeigte hingegen eine geringgradige Reduktion in der siLuci-Versuchsgruppe gegenüber den anderen beiden Gruppen (Abb. 39 rechts). IL-6 als Zytokin, das maßgeblich an der Regulation der hepatischen Synthese und Sekretion von Akute-Phase-Proteinen beteiligt ist (Heinrich et al., 1990), lag im Vergleich zu den Puffer- und siLuci-Tieren in den siRep-behandelten Tieren in verminderter Konzentration vor (Abb.40. links). Für IL-10, welches unter anderem die Bildung von TNF $\alpha$  sowie IL-1 $\beta$  hemmt und damit antiinflammatorisch wirkt (Waal et al., 1991), konnte sogar eine signifikant verminderte Plasmakonzentration in den siRep-Tieren im Vergleich zur Puffer-Kontrollgruppe detektiert werden ( $p < 0,05$ ) (Abb.40 rechts).

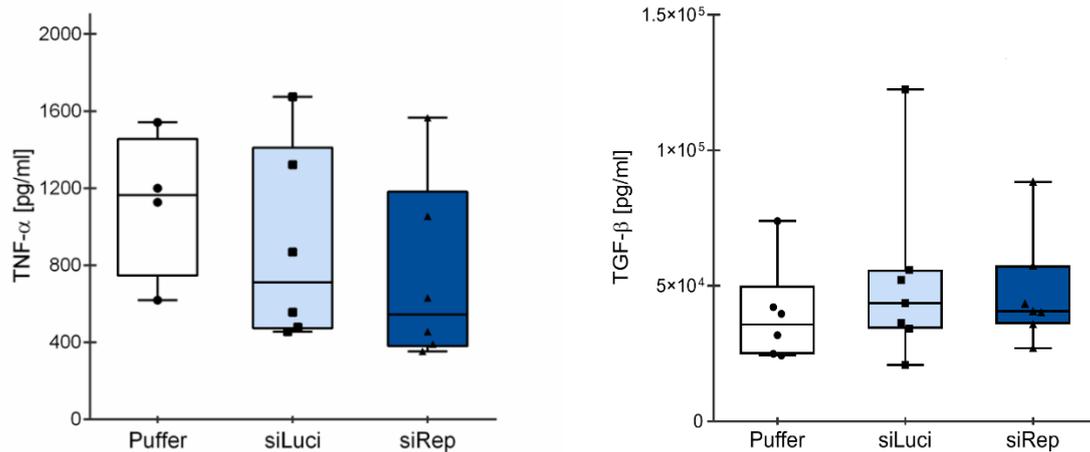


**Abb. 39:** Konzentration von IL-1 $\beta$  links und IL-18 rechts im Lebergewebe von STZ/HFD-Mäusen nach 14-tägiger Behandlung mit siRepin1, siLuci und Pufferlösung. Unter Verwendung der Hepaplex 2-siRNA-Formulierung; MW $\pm$ SEM; n=6 Puffer, n=7 siLuci und n=7 siRep.

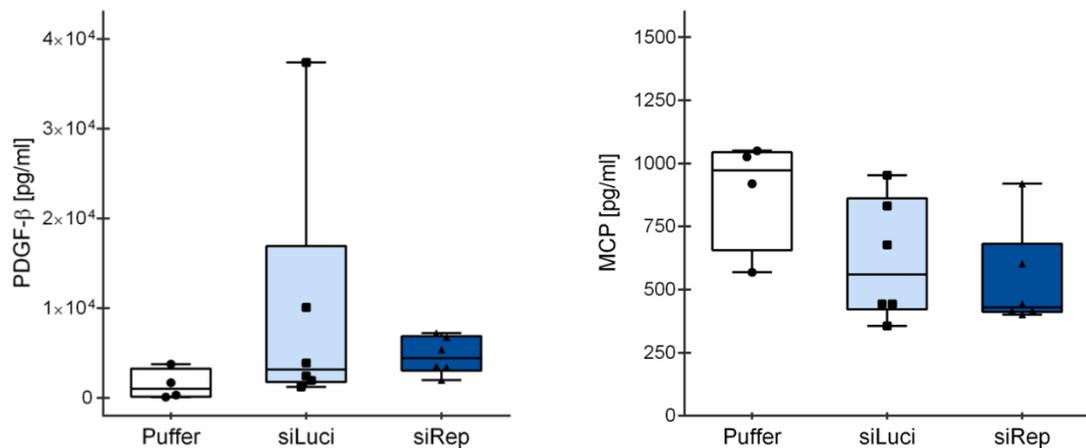


**Abb. 40:** Konzentration von IL-6 links und IL-10 rechts im Lebergewebe von STZ/HFD-Mäusen nach 14-tägiger Behandlung mit siRepin1, siLuci und Pufferlösung. Unter Verwendung der Hepaplex 2-siRNA-Formulierung. One way ANOVA, Dunns; \* $p < 0,05$  siRep vs. Puffer;  $MW \pm SEM$ ;  $n=6$  Puffer,  $n=7$  siLuci und  $n=7$  siRep.

Quantifiziert wurden ebenfalls die Zytokine TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  und PDGF- $\beta$ , welche eine zentrale Rolle innerhalb des hepatischen Fibrosierungsprozesses einnehmen (Schon & Weiskirchen, 2014), aktivierend auf die hepatischen Sternzellen wirken und die darauffolgende Produktion von *extrazellulärer Matrix* (EZM) verstärken (Gressner & Yagmur, 2003). Bei der Bestimmung der TNF- $\alpha$  Konzentration zeigte sich eine Reduktion der Plasmaspiegel in der Versuchsgruppe siRep gegenüber beiden Kontrollgruppen, ohne dabei ein signifikantes Niveau zu erreichen (Abb. 41, links). Die quantitative Messung der Plasmakonzentration von TGF- $\beta$  ergab vergleichbare Resultate in allen Versuchsgruppen ohne wesentliche Differenzen (Abb. 41, rechts). In Betrachtung der Konzentration von PDGF- $\beta$  zeigten sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen (Abb. 42, links). Das Zytokin MCP wirkt proinflammatorisch und fördert die Migration von Makrophagen und Monozyten ins Leberparenchym (Baeck et al., 2011). Die gemessenen Plasmaspiegel dieses Proteins zeigten sich in der Versuchsgruppe siRep gegenüber den Kontrollgruppen Puffer und siLuci als reduziert. Dabei gab es keinen signifikanten Unterschied (Abb. 42, rechts).



**Abb. 41:** Konzentration von TNF- $\alpha$  links und TGF- $\beta$  rechts im Lebergewebe von STZ/HFD-Mäusen nach 14-tägiger Behandlung mit siRepin1, siLuci und Pufferlösung. Unter Verwendung der Hepaplex 2-siRNA-Formulierung; MW $\pm$ SEM; n=6 Puffer, n=7 siLuci und n=7 siRep.

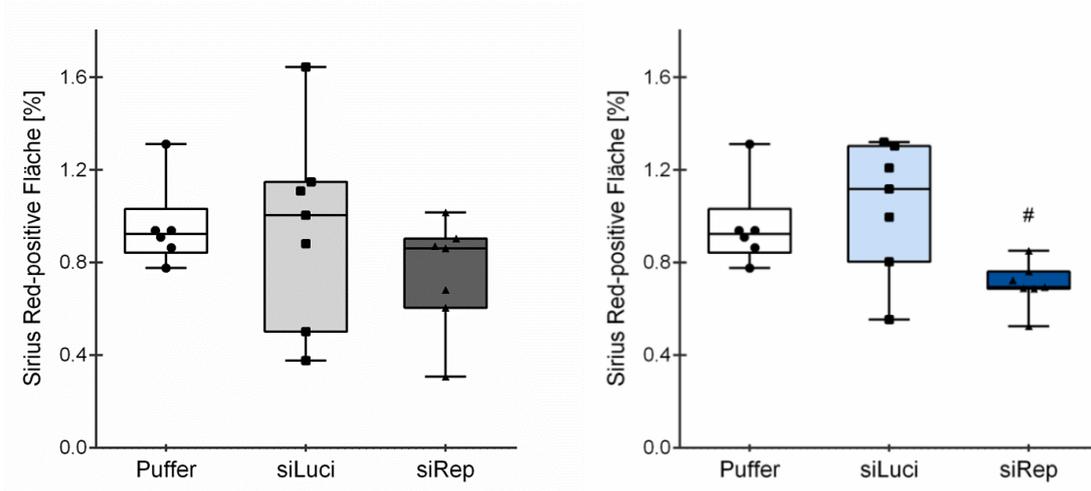


**Abb. 42:** Konzentration von PDGF- $\beta$  links und MCP rechts zum Zeitpunkt der finalen Gewebeasservierung am 14. Tag des dritten Studienabschnittes. Vergleich zwischen den entsprechenden Versuchsgruppen. Injektion mit Hepaplex 2-Formulierung; Median $\pm$ 25/75% Perzentil; Whiskers: Min/Max; n=6 Puffer, n=7 siLuci und siRep.

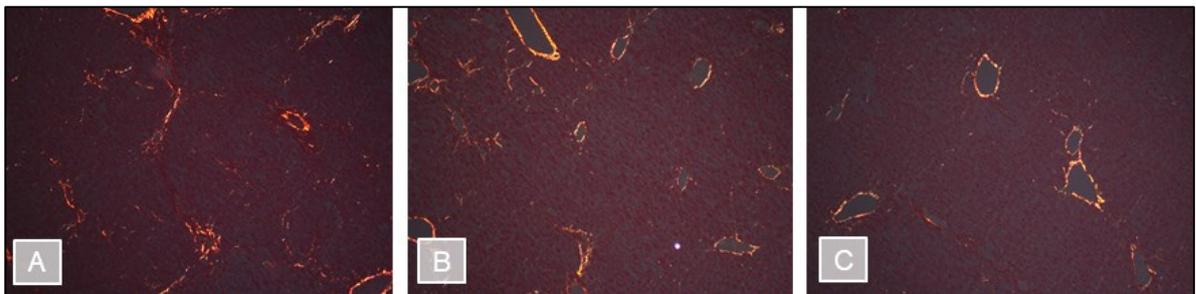
### 6.4.13 Fibrose

Charakterisiert ist die Leberfibrose als eine Zunahme des bindegewebigen Anteils am Gesamtlebergewebe mit daraus resultierenden Architekturstörungen. Diese können zu einem Funktionsverlust des Lebergewebes führen und bei chronischen Verläufen in eine Zirrhose übergehen. Der Umbau erfolgt über die vermehrte Bildung und Ablagerung von EZM innerhalb der Periportalfelder und Lebersinusoide. Hauptbestandteil der EZM bildet dabei Kollagen-1 $\alpha$  und lässt sich daher als etablierter Fibrosemarker verwenden. Die Analyse des Kollagenanteils im Leberparenchym erfolgte über die im Abschnitt 5.4.4.4 beschriebene Anfärbung und Quantifizierung des Kollagens mittels Sirius Red. Hier zeigte sich unter Verwendung beider Lipoplex-Formulierungen eine Reduktion der Sirius Red-

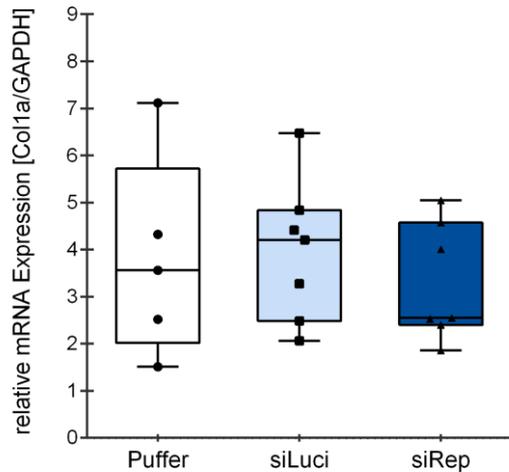
positiven Fläche in der siRep-behandelten Versuchsgruppe (Abb. 43 und Abb. 44). Diese Reduktion war unter Verwendung der Hepaplex2-Formulierung sogar signifikant gegenüber der Kontrollgruppe siLuci. Eine zusätzliche mRNA-Expressionsanalyse von Kollagen-1 $\alpha$  bestätigte dabei den histologisch beobachteten Effekt. Die reduzierte mRNA-Expression von Kollagen-1 $\alpha$  in der siRep-behandelten Versuchsgruppe war jedoch nicht signifikant gegenüber den Kontrollgruppen (Abb. 45).



**Abb. 43:** Sirius-Red positive Fläche im prozentualen Verhältnis zum gesamten Bildausschnitt. Lebergewebe von STZ/HFD-Mäusen nach 14-tägiger Behandlung mit siRepin1, siLuci und Pufferlösung. Links: CMD-siRNA-Formulierung. Rechts: Hepaplex 2-siRNA-Formulierung; MW $\pm$ SEM; n=6 Puffer, n=7 siLuci und n=7 siRep.



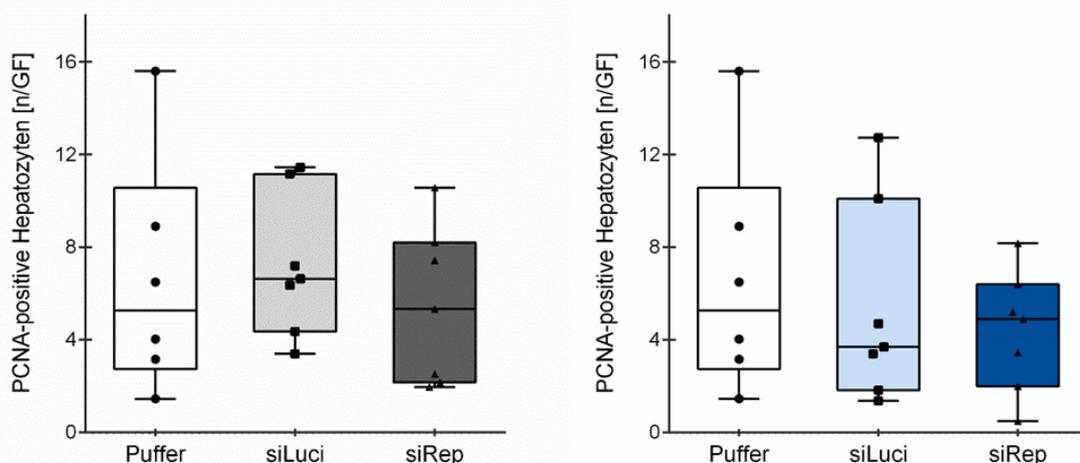
**Abb. 44:** Repräsentative Abbildung von Sirius Red gefärbter Leberschnitte von Tieren, welche 14 Tage mit der Hepaplex 2-Formulierung behandelt wurden; Puffer (A), siLuci (B) und siRepin (C). 10- fache Vergrößerung.



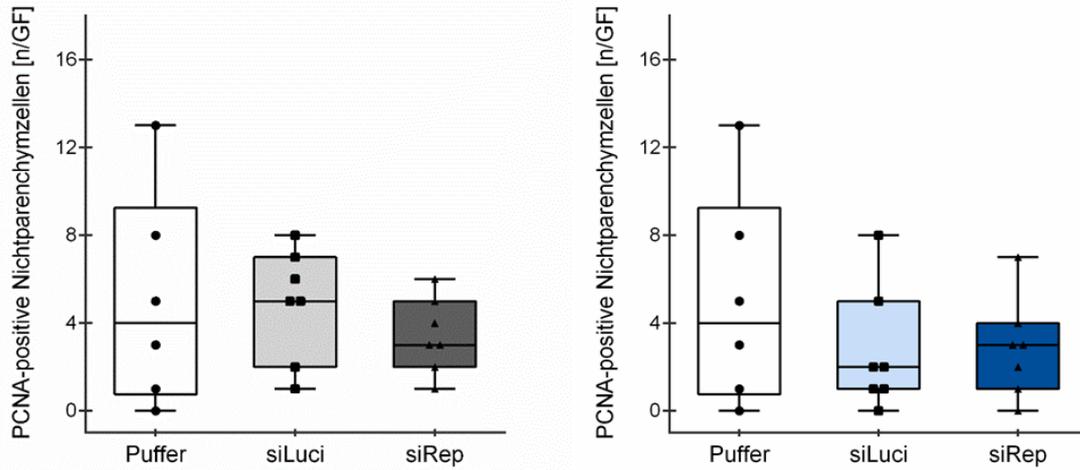
**Abb. 45:** Relative mRNA Expression von Col1a im Verhältniss zu GAPDH im Lebergewebe von STZ/HFD-Mäusen nach 14-tägiger Behandlung mit siRepin1, siLuci und Pufferlösung. Unter Verwendung der Hepaplex 2-siRNA-Formulierung; MW±SEM; n=6 Puffer, n=7 siLuci und n=7 siRep.

#### 6.4.14 Proliferation

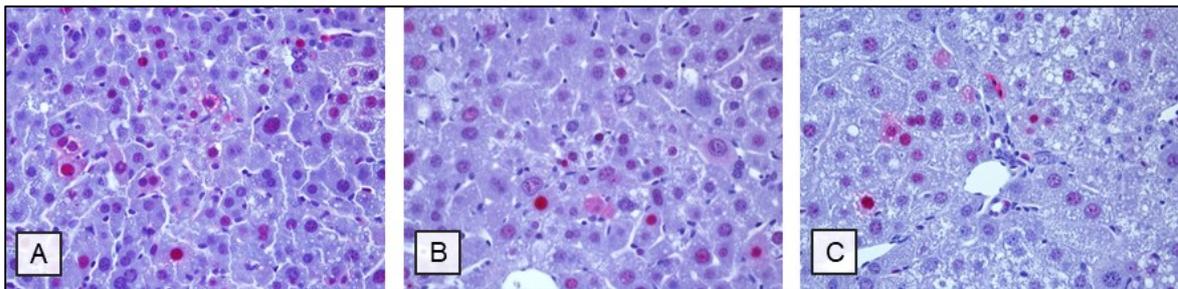
Aufgrund der cofaktoriellen Interaktion von PCNA mit der DNA-Polymerase gibt die Expression von PCNA einen verlässlichen Aufschluss über die zelluläre Proliferationsrate. Die lichtmikroskopische Auswertung der PCNA-positiven Leberparenchymzellen ergab dabei eine Reduktion in den siRep-behandelten Versuchstieren im Vergleich zu Puffer- und siLuci-Tieren, jedoch ohne Signifikanz (Abb. 46). In Betrachtung der Nichtparenchymzellen ließ sich diese Tendenz ebenfalls bestätigen (Abb. 47). Auch hier zeigten sich die Tiere der siRep-Gruppe mit einer geminderten Anzahl an PCNA-positiven Zellen. Die erhobenen Ergebnisse zeigten sich sowohl für die CMD- als auch für die Hepaplex 2-Formulierung. Abbildung 48 zeigt repräsentative Aufnahmen der immunhistochemischen Anfärbung von PCNA in der Leber.



**Abb. 46:** PCNA-positive Hepatozyten im Lebergewebe von STZ/HFD-Mäusen nach 14-tägiger Behandlung mit siRepin1, siLuci und Pufferlösung. Links: CMD-siRNA-Formulierung. Rechts: Hepaplex 2-siRNA-Formulierung; MW±SEM; n=6 Puffer, n=7 siLuci und n=7 siRep.



**Abb. 47:** PCNA-positive Nichtparenchymzellen im Lebergewebe von STZ/HFD-Mäusen nach 14-tägiger Behandlung mit siRepin1, siLuci und Pufferlösung. Links: CMD-siRNA-Formulierung. Rechts: Hepaplex 2-siRNA-Formulierung; MW±SEM; n=6 Puffer, n=7 siLuci und n=7 siRep.



**Abb. 48:** Repräsentative Abbildungen PCNA-markierter Leberschnitte von Tieren, welche 14 Tage mit der Hepaplex 2-Formulierung behandelt wurden; Puffer (A), siLuci (B) und siRepin (C). 40- fache Vergrößerung.

## 7 Diskussion

### 7.1 Material und Methoden

Unbestreitbar ist der Formenkreis der NAFLD mit einer aktuellen Inzidenz von ca. 30 % innerhalb der Bevölkerung westlicher Industrienationen (Herold, 2018) eine der weitverbreitetsten Erkrankungen der Neuzeit. In Anbetracht der engen Vergesellschaftung mit dem Metabolischen Syndrom und stetig ansteigender Inzidenz (Welsh et al., 2013) wird dieser Erkrankung weltweit ein unabsehbar wachsenderer sozioökonomischer Schaden zugeschrieben (Younossi et al., 2016). Schon jetzt bildet die NASH-Zirrhose bzw. das HCC, als klinisches Endstadium der NAFLD, die zweithäufigste Indikation zur orthotopen Lebertransplantation. Aufgrund der rapide ansteigenden Inzidenz wird sie in Zukunft sogar als die führende Indikation innerhalb der entwickelten Industrienationen gesehen; damit überholt sie den Hepatitis-C-Virus (Cholankeril et al., 2017). Obwohl diätische Maßnahmen und eine Umstellung des Lebensstiles durch Erhöhung der physischen Aktivität zu einem deutlichen Rückgang des pathologischen Umbaus des Lebergewebes führen kann (Cai et al., 2019), gibt es aktuell noch keine medikamentöse Therapie mit nachgewiesener Wirksamkeit und breiter klinischer Testung (Konerman et al., 2018). Die bereits bestehenden therapeutischen Ansätze zielen auf eine Reduktion der Steatose, der Lipidtoxizität, des oxidativen Stresses sowie einer Hemmung des fibrotischen Umbaus und der inflammatorischen Signalwege ab. Breit etablierte Agenzien aus dem Bereich der antidiabetischen Therapie konnten bis dato keine hinreichende Wirkung innerhalb der Pharmakotherapie der NAFLD zeigen (Ratzl et al., 2015). Beispielhaft kann das als Insulinsensitizer verschriebene Antidiabetikum Pioglitazon aus der Klasse der *Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptor  $\gamma$*  (PPAR  $\gamma$ ) - Liganden gesehen werden. In Studien konnten zwar positive Effekte im Sinne einer Reduktion von Inflammation, Steatose und Reduktion des hepatozellulären Ballooning erzielt werden (Mahady et al., 2011), der Einsatz wird jedoch von bekannten Nebenwirkungen wie Gewichtszunahme, Exsikose und Osteopenie limitiert wird. Wie im Einleitungsteil dargestellt, basiert der Formenkreis der NAFLD pathophysiologisch auf einem multifaktoriellen Zusammenspiel von Stoffwechselfathologien sowie in- und extrinsischen Faktoren (Buzzetti et al., 2016). Eine Anhäufung an teils toxischen, energiereichen Substraten führt schließlich zur Überlastung des hepatischen Metabolismus und zur Induktion von Inflammation, Fibrosierung und Instabilität des Genoms (Cusi, 2012). Komplexität und Multifaktorialität der Erkrankungsätiologie bilden dabei zentrale Hindernisse in der Erforschung wirkungsvoller Therapeutika.

Um eine therapeutische Wirkung bzw. den Einfluss des Zielgens Repin1 auf die NASH untersuchen zu können, galt es ein für unsere Fragestellung optimiertes Krankheitsmodell

zu identifizieren. Dabei lassen sich zunächst *in vitro* von *in vivo* Modellen abgrenzen. Die in ihrer Komplexität stark variierenden *in vitro* Modelle werden in verstärktem Maße eingesetzt, um potentiell therapeutische Agenzien auf Zytotoxizität zu testen. Dabei kann ein Spektrum bedient werden, das von einer einfachen Zellreihe bis hin zu mikrostrukturierten dreidimensionalen Zellkultur (Feaver et al., 2016) mit Nachahmung des sinusoidalen Blutflusses reicht (Oseini et al., 2018). Ansätze, bei denen Schnitte menschlicher Leber genutzt werden, können dabei Aufschluss über den Einfluss der genutzten Agenzien in die Proteinbiosynthese des Zielgewebes geben. Aufgrund bis dato fehlender Konservierungssysteme können diese Schnitte jedoch nur für wenige Tage genutzt werden und sind entsprechend schlecht verfügbar (Nakagawa et al., 2016). Aufgrund der vorbeschriebenen Ergebnisse, die über einen Repin1-Knockout in einem Mausmodell erzielt werden konnten (Kern et al., 2014) sowie einer breiten Verfügbarkeit von gut etablierten Mausmodellen zur Reproduktion einer NAFLD, ist die Anwendung eines solchen *in vivo* Modells naheliegend. Des Weiteren zeigt sich die Maus als außerordentlich widerstandsfähig und unkompliziert in ihrer Haltung und Aufzucht.

Die aktuell existierenden Mausmodelle zu Induktion einer NAFLD lassen sich dabei über die Art der Krankheitsinduktion unterscheiden und kategorisieren. Als Ansatz bieten sich hier Wege über Manipulation des Genoms, eine diätische Induktion der NASH und die Anwendung von toxischen bzw. karzinogenen Agenzien an. Dabei gibt es erwartungsgemäß ebenfalls Ansätze, die verschiedene Strategien der Krankheitsinduktion kombinieren. Das Genom adressierende Ansätze fokussieren sich dabei vor allem auf die Nutzung von Knockout-Tieren. Hier stellt beispielsweise der Knockout des Tumorsuppressorgens *phosphatase and tensin homolog* (PTEN) (Vinciguerra et al., 2008) oder die Deletion des Melanocortin-4-Rezeptors (Itoh et al., 2011) einen Weg zur Induktion einer NAFLD dar. Diätische Ansätze nutzen vor allem hochfettreiche Ernährungsformen (Hill-Baskin et al., 2009). Durch die Ergänzung von Methionin- und Cholin-freien Diäten kann die Lipidakkumulation innerhalb des Leberparenchyms noch deutlich erhöht werden. Diese Stoffe sind essentiell für die in der Leber stattfindende  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren sowie die Bildung von VLDL-Cholesterin. Ein Fehlen dieser Stoffe führt dementsprechend zu einer gesteigerten Lipidanreicherung (Toriguchi et al., 2014). Einen anderen diätischen Ansatz bietet die Ergänzung der fettreichen Ernährung durch Fruktose (Kohli et al., 2010). Im Bereich der Behandlung mit karzinogenen und toxischen Stoffen wird seit geraumer Zeit Diethylnitrosamin zur Induktion eines HCCs eingesetzt (Vesselinovitch & Mihailovich, 1983). Dass repetitive Gaben von Tetrachlorkohlenstoff zur progredient fortschreitenden Fibrosierung innerhalb des Lebergewebes führen, wird bereits seit längerer Zeit für die experimentelle Forschung ausgenutzt (Stowell et al., 1951). Im Laufe der Jahrzehnte wurden diese Protokolle entsprechend überarbeitet und vielfach kombiniert (Uehara et al.,

2014). Das in unserer Arbeitsgruppe durch Liebig et al. (2018) etablierte Krankheitsmodell „STAM™ Mice“ (Fujii et al., 2013) nutzt dabei eine Kombination aus einer HFD und einer Injektion des  $\beta$ -Zellgiftes STZ. Es konnte deutlich gezeigt werden, dass sich auf diesem Wege in den Mäusen eine progressiv fortschreitende NAFLD verlässlich induzieren lässt. Die so behandelten Mäuse entwickeln bereits 6 Wochen *post partum* eine Steatosis hepatis, die bis zur 20. Woche über eine fortschreitende Steatohepatitis zur einer fulminanten NASH-Zirrhose mit Ausbildung von Lebertumoren führt (Liebig et al., 2018). Als Vorteil gegenüber anderen Krankheitsmodellen werden der Pathophysiologie der NAFLD entsprechend alle Krankheitsphasen progredient in einem sehr kurzen Zeitraum von nur 20 Wochen durchlaufen. Damit bietet das Modell die Möglichkeit, Effekte von eingesetzten Agenzien/Therapeutika oder Zielstrukturen durch alle Ausprägungsformen und Stadien der NAFLD zu beobachten. Kritischer Punkt dieses Modells ist die pathophysiologisch korrekte Abbildung der diabetischen Stoffwechsellage. Aufgrund der einmaligen hochdosierten Applikation von STZ wird der Untergang der  $\beta$ -Zellen im Pankreas induziert und somit ein quantitativer Insulinmangel erzeugt (Tay et al., 2005). Folglich handelt es sich hier somit nicht um die für eine NAFLD pathognomonische Insulin-Resistenz. Ansätze, die über eine multiple Gabe von niedrig dosiertem STZ in Kombination mit einer HFD arbeiten, können zwar eine Insulinresistenz erzeugen (Srinivasan et al., 2005), sind allerdings aufgrund des benötigten Zeitintervalls und den multiplen Applikationen in dem gewählten Versuchsaufbau nicht umsetzbar. Des Weiteren wurde durch die Arbeitsgruppe um Fujii et al. (2013) beschrieben, dass weibliche Tiere weniger stark von erhöhten Blutglukosespiegeln sowie inflammatorischen und fibrotischen Prozessen betroffen sind. Dies lässt darauf schließen, dass unter anderem Östrogene als modulierende Faktoren innerhalb der Ausbildung einer NASH gesehen werden können (Fujii et al., 2013). Aufgrund dessen wurden innerhalb der hier beschriebenen Versuche ausschließlich männliche Tiere des Stammes C57BL/6J genutzt. Eine interindividuell abweichende Ausprägung der Morbidität zwischen den Versuchstieren lässt sich durch die komplexe Applikation von STZ i.p. und die damit verbundenen Unterschiede im Wirkspiegel erklären. Ebenfalls zu berücksichtigen ist die fastenabhängige Aufnahme von STZ über die Glut2-Transporter in die  $\beta$ -Zellen der Pankreas (Lenzen, 2008). Um eine bessere Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurden Tiere, die zum Zeitpunkt 14 d *post partum* keine diabetische Stoffwechsellage aufwiesen, als „STZ-Versager“ aus der Versuchsreihe exkludiert.

Die Anwendung von kationischen Lipoplexen als Carrier-Moleküle für die Repin1-spezifische siRNA-Applikation ergibt sich aus dem Bedarf nach einer verlängerten Halbwertszeit und einer zielgerichteten Aufnahme der siRNA ins Lebergewebe. Neben einer verstärkten Wirkung kann durch eine gezielte Aufnahme in die Leber das Risiko von ungewollten (systemischen) Nebeneffekten minimiert werden. Faktoren, die eine effiziente

Transfektion von freien siRNA-Molekülen verhindern, sind neben der durch Größe und Ladung der siRNA erschwerten Endozytose, dessen schnelle Exkretion über die Niere, die Aufnahme durch das Phagozytensystem sowie Bindung an Serumproteinen und Abbau durch im Serum zirkulierende Nukleasen (Alexis et al., 2008). Dabei wird eine Halbwertszeit von nicht modifizierter, ungebundener siRNA mit einem Zeitraum von wenigen Minuten bis zu maximal einer Stunde angegeben (Layzer et al., 2004). Des Weiteren können sich ungewünschte Nebeneffekte aus der ungerichteten Interaktion der eingebrachten siRNA mit anderen Transkriptionsprodukten ergeben. Auf Basis einer partiellen Übereinstimmung der Nukleotidsequenzen kann es zu einem ungewollten Eingriff in die Proteinbiosynthese anderer Gene kommen (Jackson et al., 2006). Darüber hinaus wird ein immunmodulatorischer Effekt mit Induktion von inflammatorischen und pro-apoptischen Vorgängen beschrieben (Marques & Williams, 2005). *Toll-like Rezeptoren* (TLR) der Klassen TLR7 und TLR8, auf Immunzellen wie Monozyten und Dendritischen Zellen befindlich, stimulieren die Ausschüttung von Zytokinen (Judge & MacLachlan, 2008; Sioud & Mouldy, 2005). Sowohl das Interesse als auch die Nutzung von kationischen Lipiden als Trägerstoffe für siRNA hat in den letzten Jahren rapide zugenommen. Dabei scheinen diese Lipidformulierungen gegenüber der im Abschnitt 3.4 dargestellten Applikationsformen aktuell als eine der vielversprechendsten Techniken. Im Vergleich zur Transfektion über virale Vektoren provozieren Liposomen eine weitaus geringere Immunreaktion, besitzen wenig Eigentoxizität und bieten die Möglichkeit größere Mengen an Molekülen zu transportieren (Samad et al., 2007). Des Weiteren kann durch Modifizierung der Molekülgröße und Anpassung der spezifischen Ladung eine hohe Spezifität des Zielgewebes erreicht werden (Park, 2002; Torchilin, 2014). Diesbezüglich konnte unsere Arbeitsgruppe bereits mit dem leberspezifischen siRNA Delivery System „DBTC“ vielversprechende Ergebnisse erzielen (Abshagen et al., 2015). In den Hepatischen Sternzellen konnte das Zielgen Foxf1 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* durch siRNA vermittelte Interferenz unterdrückt werden und so das Ausmaß der durch Gallengangsligatur-induzierten Leberfibrose reduziert werden (Abshagen et al., 2015). Um das antisteatotische Potential eines gezielten Repin1- Knockouts zu eruieren, erfolgte die wiederholte Injektion der siRNA-Lipoplex-Formulierungen gleichzeitig mit Beginn der durch das NASH-Fibrose-Tumor Modell vorgegebene HFD zum Tag 28 *post partum*. Wie in der Arbeit von Ruschke et al. (2010) *in vitro* beschrieben, zeigte sich vor allem in den ersten Tagen nach Induktion der Adipogenese ein signifikanter Anstieg der Repin1-mRNA, aufgrund dessen die repetitive siRNA Applikation bereits mit Beginn der HFD als sinnvoll erscheint. Den Therapiezeitraum begrenzt dabei die erforderliche mikrochirurgische Intervention alle 72 Stunden. Aufgrund zunehmender Vernarbung des Injektionsgebietes wird die Darstellung der V. jugularis und damit die gezielte Applikation zunehmend

erschwert. Eine höhere Anzahl an Versuchstieren konnte aufgrund der aufwendigen Inklusion in das Tiermodell, sowie der zeitintensiven mikrochirurgischen Behandlung nicht erzielt werden.

## 7.2 Ergebnisse

Der Einsatz der RNA-Interferenz unter Verwendung von siRNA, miRNA und Antisense-Oligonukleotiden bildet aktuell eine der vielversprechendsten und vielseitigsten Techniken, um bereits auf Ebene der Translation in die Proteinbiosynthese einzelner Zielgene einzugreifen. Hieraus ergeben sich potentiell unerschöpfliche Anwendungsmöglichkeiten für die Entwicklung neuer Therapeutika und Behandlungsmethoden. Der das Genom modulierende Ansatz durch exogen zugeführte RNA ermöglicht dabei ebenfalls ein Schritthalten der medikamentösen Therapie in Bezug zur mutationsbedingten Evolution verschiedener Pathogene, wie man es z.B. bei Krebszellen oder viralen Infektionen beobachtet. Dieses gilt als Alleinstellungsmerkmal und wurde im Jahre 2006 mit dem Medizin-Nobelpreis ausgezeichnet. Folglich erhält die Forschung zum RNA vermittelten Gen-Silencing zurzeit erhebliche Aufmerksamkeit. Dementsprechend befinden sich eine Vielzahl von Behandlungskonzepten für die verschiedensten Erkrankungen in der Testung (Chakraborty et al., 2017). Bevor exogen zugeführte RNA als Therapeutikum genutzt werden kann, muss jedoch eine Vielzahl von zellulären Abwehrmechanismen überwunden werden, die über Milliarden von Jahren zur Abwehr der von außen eindringenden "Fremd RNA" evolutionär gewachsen sind (Dowdy, 2017). Die zu Beginn der zellulären Evolution entstandene Lipiddoppelmembran macht es dabei beispielsweise unmöglich, doppelsträngige RNA ohne weitere chemische Modifikation oder Transportvehikel in das Zytosol einzuschleusen. Dieses ist durch die Größe der doppelsträngigen RNA von ca. 14 kDa und ihrer negativen Ladungseigenschaften eines der zentralen Hindernisse in der Anwendung von siRNA im Bereich der RNA-Interferenz (Juliano et al., 2014). Wie in Teil 3.4 beschrieben, gibt es verschiedenste Strategien, um die Halbwertszeit der therapeutischen RNA im Organismus zu verlängern und die Penetrationsfähigkeit in das Zytosol zu erhöhen. Auch wenn chemische Modifikationen die Stabilität erhöhen, die Rate von immunologischen Reaktionen auf das applizierte Agens reduzieren sowie die Ladungseigenschaften positiv beeinflussen, brauchen entsprechende Makromoleküle schlussendlich ein „Transfektionsvehikel“ zur Penetration der Lipiddoppelmembran. Dabei stellt das *Retikulohistiozytäre System* (RHS) -früher auch Retikuloendotheliales System- als Überbegriff für sämtliche Zellen des retikulären Bindegewebes, inklusive Phagozyten und Speicherzellen (wie z.B. die hepatischen Sternzellen), das für die Aufnahme der Liposomen aus dem Blutkreislauf entscheidende Gewebe dar (Poste et al., 1976). Als

primär mit dem RHS vergesellschaftete Organe gelten dabei die Leber, Milz, Nieren, Lunge und das Knochenmark sowie das Lymphsystem (Senior, 1987). Die Fähigkeit im Serum zirkulierende Fremdkörper, wie beispielweise applizierte Liposomen, auszusortieren und im Anschluss zu eliminieren, beruht zunächst auf dem für das RHS typische fenestrierte Endothel der Blutgefäße. Natürlicherweise stellt die Leber dabei das Organ mit der höchsten Aufnahmekapazität für im Serum zirkulierende Liposomen dar (Chrai et al., 2002). Aufgrund des diskontinuierlichen Endothels der Lebersinusoiden und der sich daraus ergebenden erleichterten Extravasation von Transfektionsreagenzien in den Disse-Raum, bietet sich die Adressierung des Leberparenchyms über eine intravenöse Applikation von Liposomen einer Größe zwischen 100 und 200 nm an (Coelho et al., 2013). Studien konnten bereits aufzeigen, dass eine intrakutane Applikation von Liposomen ebenfalls zu einer erfolgreichen Akkumulation der liposomalen Carrier im Lebergewebe führen kann. Die Penetrationsfähigkeit von subkutan applizierten RNA-Trägersubstanzen in den Blutkreislauf und damit in das gut perfundierte Zielgewebe ist dabei jedoch maßgeblich abhängig vom geringen Moleküldurchmesser und damit in der Transportkapazität aktuell deutlich limitiert (Chen et al., 2014).

Die in dieser Studie genutzten Lipoplex-Formulierungen der Firma Silence Therapeutics (Berlin) wurden ausschließlich zur i.v. Applikation konzipiert und so auf deren Wirksamkeit und Penetrationsfähigkeit in das Lebergewebe getestet. Vorausgegangene Versuche unserer Arbeitsgruppe hatten unter Nutzung einer vergleichbaren siRNA-Lipoplex-Formulierung (DBTC, Silence Therapeutics) bereits einen unspezifischen Knockdown außerhalb des Zielgewebes ausschließen können. Auch nach wiederholter i.v. Injektion der liposomalen Carrier konnte eine signifikante Hemmung des Zielgens ausschließlich im Lebergewebe nachgewiesen werden und es zeigte sich kein Einfluss auf andere Organsysteme, wie Herz, Lunge und Nieren (Abshagen et al., 2015).

Die i.v. Injektion über die Vena jugularis ermöglicht dabei eine gut reproduzierbare, sichere und aufgrund der Großlumigkeit des Gefäßes zügige Applikation und schnelle Verteilung der Lipoplexe im Organismus. Dieses bietet gegenüber anderen Applikationsorten, wie z.B. der kleinlumigeren Schwanzvene oder dem Peritoneum, die eben beschriebenen Vorteile (Diehl KH et al., 2001). Die erfolgreiche Anreicherung in der Leber konnte in Folge über eine intravitalmikroskopische Betrachtung von Cy3-markierten Lipoplexen sowie über eine histologische Aufarbeitung objektiviert werden. Dem physiologischen Blutfluss entsprechend zeigt sich zunächst eine Anreicherung der Carriermoleküle im Bereich des Sinusoidal-Systems. Die Perfusion der Lebersinusoiden erfolgt dabei aus terminalen Ästen der Vena interlobularis, gespeist aus der großkalibrigen Vena portae. Dabei erhalten die Vasa sinusoida ebenfalls einen Zufluss aus den Interlobularästen der Arteria hepatica propria. Nach abgeschlossenem Stoffaustausch drainiert das Blut über Äste in die Vena

hepatica zurück in Richtung des Herzens (Drenckhahn, 2008). Aufgrund der bereits erwähnten diskontinuierlichen Endothelauskleidung der Lebersinusoide, mit fehlender Basallamina, ist die Extravasation der applizierten Lipoplexe deutlich vereinfacht, woraus eine rasche Anflutung im Leberparenchym resultiert. Die Aufnahme in die Hepatozyten erfolgt endozytotisch vermittelt (Felgner et al., 1994). Neben der geläufigen Clathrin- (Mayor et al., 2007) und Caveola-assoziierten Endozytose (Lajoie & Nabi, 2010) sowie der Aufnahme über Makropinozytose (Kerr & Teasdale, 2009) wurden in den letzten Jahren noch eine Vielzahl an weiteren, Clathrin-unabhängigen Endozytoseformen beschrieben (Glebov et al., 2006). Sowohl die Verhältnismäßigkeit der verschiedenen endozytotischen Aufnahmemechanismen als auch die intrazelluläre Freisetzung wird aktuell noch diskutiert. Aufgrund von Wechselwirkungen zwischen den Lipiden der Endosomen- und der Lipoplexmembran sowie der intrazellulären pH-Wert Verschiebung kommt es zu einer Instabilität der Liposomen und in Folge zu einer Freisetzung der siRNA (Avital et al., 2016); anteilig fusionieren die Carriermoleküle ebenfalls auf direktem Weg mit der Lipiddoppelmembran der Zelle, wobei die geladene siRNA in das Zytosol freigesetzt wird (Lu et al., 2009).

Die im Teil 6.2 dargestellte Umverteilung der fluoreszenzmarkierten Lipoplexe aus dem sinusoidalen System in die Parenchymzellen in Abhängigkeit zur Zeit post injectionem basiert zum einen auf der intrazellulären Aufnahme der Liposomen, zum anderen auf Abbau und Abtransport des Fluoreszenzfarbstoffes bzw. der damit markierten Liposomen. Nach endozytotischer Aufnahme erfolgt die endosomale Freisetzung der Lipoplexe in das Zytosol oder die Weiterverteilung über verschiedene Bindungsproteine und durch den SNARE-Komplex vermittelt in weitere subzelluläre Kompartimente. Dabei wird ein großer Teil der Liposomen beispielsweise über die Überführung in Lysosome abgebaut (Gilleronet al., 2013). Deutliche Unterschiede in Bezug auf die quantitative Anreicherung der applizierten Lipoplex-Formulierung konnten zwischen gesunden und STZ/HFD-Tieren beobachtet werden. Die deutlich verminderte Anreicherung des Fluoreszenzfarbstoffes im steatotischen Lebergewebe und damit der Lipoplexe im Zielgewebe lässt sich über eine sowohl quantitativ, als auch qualitativ gestörte Leberperfusion erklären. Eine Vielzahl von Studien konnte belegen, dass es in steatotischem Lebergewebe zur Veränderung der Mikrozirkulation kommt. Das Ballooning der Hepatozyten führt dabei zu einer Kompression der Sinusoide, wobei eine verminderte Perfusion zu einer inadäquaten Oxygenierung führt (Schleicher et al., 2014) und somit wiederum fibrotische Prozesse verstärkt (Vanheule et al., 2008). In der durch Liebig et al. (2018) veröffentlichten Studie werden diese Beobachtungen auch für die in diesem Versuchsaufbau verwendeten STZ/HFD-Mäuse bestätigt. In Folge beeinflussen diese vaskulären Veränderungen die Leberfunktion und fördern das weitere Fortschreiten der NAFLD (Villeneuve et al., 1996). Diese Beobachtung

stützt die bereits erläuterte Entscheidung, die Applikation der siRNA- Formulierung zu Beginn der Krankheitsinduktion zu applizieren und lässt darauf schließen, dass ein möglicher Therapieeffekt mit Fortschreiten des fibrotischen Umbaus abnimmt.

Die Wirksamkeit der applizierten siRNA auf die Transkription des Zielgens Repin1 im Lebergewebe wurde mittels RT-PCR analysiert. Aufgrund der im Abschnitt 6.3 erhobenen Ergebnisse wurde der für die Lipoplex-Formulierung gewählte Applikationszeitpunkt in Studienabschnitt 3, wiederkehrend alle 72 h, festgelegt. Das optimale Zeitintervall wird dabei maßgeblich durch die Anflutungszeit der gewählten Formulierung in das Zielgewebe (siehe Abschnitt 6.2) sowie die Dauer der siRNA induzierten RNA-Interferenz bestimmt. In einer vergleichbaren Studie hatte die Arbeitsgruppe um Smekalova et al. (2019) repetitive Injektionen der mit siRNA beladenen Liposomen-Formulierungen alle 120 h wiederholt.

Die für den Studienabschnitt 3 erzielten und in Abschnitt 6.4.1 dargestellten Ergebnisse zeigen eine signifikante bzw. hochsignifikante Minderung der relativen mRNA Expression von Repin1 in den wiederholt mit CMD78/Hepaplex2-Formulierung behandelten Versuchstieren im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Der effektiv erreichte Knockdown des Zielgens liegt dabei kumulativ bei einer ca. 60 %igen Reduktion der mRNA (Hepaplex2). In Studien, die ebenfalls das Konzept des siRNA-vermittelten Knockdowns über Transfektion mit kationischen Lipidformulierungen nutzten, konnten vergleichbare Ergebnisse im Lebergewebe von C57BL/6J Mäusen erzielt werden. 2016 erzielte beispielsweise die Arbeitsgruppe um Brachs et al. (2016) in einem therapeutischen Ansatz eine 60 %ige Reduktion der mRNA des Cotransporters SLC13A5. Der Effekt eines Silencings der Dipeptidyl-peptidase 4, per siRNA-vermittelter RNA-Interferenz, wurde zuletzt durch Görgens et al. (2019) untersucht, wobei die Synthese der Ziel-mRNA um 60 bis 80 % reduziert werden konnte.

Die nach dem Studienprotokoll mit STZ und einer HFD behandelten männlichen Versuchstiere zeigten während des gesamten Behandlungszeitraumes eine hyperglykämie Stoffwechsellage. Der Leber/Körpergewichts-Index lag in allen Versuchsgruppen nach 14-tägiger Behandlung im Mittel zwischen 7 und 8 %, die Gewichtszunahme zeigte sich ebenfalls gleichförmig. Die Auswertung der Blutbilder konnte keine Unterschiede bezüglich der korpuskulären Anteile im Blut objektivieren. Die Mortalität innerhalb des Versuchsaufbaus wurde maßgeblich durch die chirurgische Intervention beeinflusst. Hier decken sich die Ergebnisse mit den Beobachtungen unserer Arbeitsgruppe in STZ/HFD-behandelten Repin1-defizienten Knockout-Mäusen zum Zeitpunkt 4-6 Wochen *post partum*. Signifikante Unterschiede in der Betrachtung der Mortalität durch Progression der NAFLD mit zunehmender Einschränkung der Leberfunktion und steigender Tumorprävalenz ergeben sich im NASH-Fibrose-Tumor Mausmodells erst 8 Wochen *post partum* (Abshagen et al., 2019).

Für die temporäre siRNA vermittelte RNA-Interferenz sowie die Applikation der Lipoplex-Formulierung konnte, bei ausgeklammerter chirurgischer Intervention, kein unmittelbarer Einfluss auf die Morbidität beobachtet werden. Seit Beginn der therapeutischen Anwendung von Liposomen als Transfektionsreagenzien wird über deren hypothetische Toxizität diskutiert. Dabei steht vor allem die Interaktion mit Plasmaproteinen, die die exogen zugeführten Liposomen opsonieren und somit eine Immunreaktion auslösen (Ishida et al., 2001), als auch die Aufsättigung und damit Überlastung der für eine zielgerichtete Immunreaktion essentiellen Makrophagen im Fokus der Beobachtungen (Szebeni & Moghimi, 2009). So ist beispielweise eine pseudoallergische Immunreaktion als *Complement activation-related pseudoallergy* (CARPA) beschrieben, die über das Komplementsystem durch Reaktion auf die mit Polyethylenglycol modifizierten Liposomen ausgelöst wird (Szebeni & Moghimi, 2009; Mohamed et al., 2019). Nach intravenöser Applikation der bereits zugelassenen Formulierungen Doxil®, Ambisome und DaunoXome® zeigten sich Patienten durch anaphylaktische Reaktionen, Schwellungen, Kopfschmerzen und kardiopulmonale Stressreaktionen als symptomatisch (Szebeni, 2005). Hierbei gilt jedoch zu beachten, dass es bei diesen in liposomaler Formulierung applizierten Therapeutika um hoch potente Wirkstoffe aus der Gruppe der Chemotherapeutika und Antimykotika handelt, die ohne liposomalen Einschluss, noch eine weitaus höhere Toxizität und ein ausgeprägteres Nebenwirkungsprofil aufweisen würden. Aufgrund des breiten Anwendungsgebietes liposomaler Trägersubstanzen in allen Bereichen der pharmazeutischen Entwicklung, ist in den letzten Jahren eine Vielzahl von Oberflächenmodifikationen entwickelt worden. Liposomen werden je nach Anwendungsgebiet mit kleinen Molekülen, Vitaminen, Peptiden, Proteinen, Antikörpern, Enzymen oder anderen Liganden versehen, um deren Stabilität, Penetrationsfähigkeit und Halbwertszeiten zu erhöhen und dabei mögliche Toxizität zu reduzieren (Khan et al., 2020). Dabei sind sie aus der modernen Medizin nicht mehr wegzudenken und bereits zugelassene liposomale Formulierungen finden breite klinische Anwendung. Ein aktuelles und vor allem prominentes Beispiel ist der gegen das Coronavirus "SARS-CoV-2" entwickelte und im Eilverfahren zugelassene mRNA-Impfstoff der Firmen BioNTech & Pfizer (BNT162b2, Mainz, Deutschland / New York, USA). Die applizierten mRNA-Sequenzen kodieren dabei für das virale S-Protein, welches nach Translation eine Immunreaktion und die Antikörperbildung im Organismus hervorruft. Als Shuttle dient, wie für einen Großteil der RNA-Wirkstoffe typisch, eine liposomale Trägersubstanz, die die mRNA in das Zytosol einschleust (Chung et al., 2020; Jackson et al., 2020).

Wie zu erwarten, kam es bei den STZ/HFD-Versuchstieren zu einer im Plasma objektivierbaren Hypertriglyzeridämie sowie zu einer quantitativen Erhöhung des Fettgehaltes im Leberparenchym. Die durch Ruschke et al. (2010) in Versuchen an Repin

1 defizienten Zellreihen nachgewiesene Reduktion von Adipozytengröße und der Anzahl an enthaltenen Lipidtropfen konnte nach 14-tägiger Behandlung nicht bestätigt werden. Die beobachtete Größenreduktion der 3T3L1-Adipozyten ist dabei vor allem auf die reduzierte Aufnahme von Palmitinsäure zurückgeführt worden. Diese zeigte sich in unserem Versuchsaufbau, wie in Abschnitt 6.4.8 ersichtlich, jedoch als quantitativ unverändert. Ebenfalls konnten keine generalisierte Aufnahmereduktion von Fettsäuren in das Lebergewebe sowie die daraus resultierende Reduktion des hepatozellulären Ballooning, wie von Kern et al (2014) an Knockout-Tieren dargestellt, beobachtet werden. Zwischen den Versuchsgruppen kam es auf Basis des nur temporären Repin1 Knockouts bis zur 6. Woche *post partum* zu keinem signifikanten Unterschied in der Lipidakkumulation. In Untersuchungen an STZ/HFD-behandelten Repin1-Mäusen zeigten sich signifikante Änderungen in Bezug auf den Fettstoffwechsel erst nach 8 Wochen *post partum*. So konnte in Repin1-defizienten C57BL/6J Mäusen, nach vierwöchiger HFD, eine signifikant geminderter Triglyzeridkonzentration im Plasma, bei gleichzeitig geminderter intrahepatischer Fettspeicherung beobachtet werden (Abshagen et al., 2019). Bei weiterer qualitativer Aufschlüsselung der intrahepatischen Fettsäuren zeigte sich zudem in der siRep1-Versuchsgruppe eine Erhöhung des Verhältnisses der Omega-6- zu Omega-3-Fettsäuren. Diese essentiellen Fettsäuren werden ausschließlich über die Nahrung zugeführt und können aufgrund der fehlenden Enzymausstattung nicht im Organismus von Säugetieren, einschließlich dem der Menschen, synthetisiert werden (Kang, 2003). Die bereits mehrfach thematisierte Umstellung der Ernährungsgewohnheiten innerhalb der industrialisierten Gesellschaften sowie ein exzessiver Einsatz von günstigen Omega-6-reichen Pflanzenölen in der Nahrungsmittelindustrie und Massentierzucht, führt dabei zu einer kontinuierlichen Verschiebung des Verhältnisses zuungunsten der antiinflammatorisch wirkenden Abkömmlinge der Omega-6-Fettsäuren. Dabei änderte sich dieses Verhältnis in den letzten Jahrhunderten von ca. 1,5:1 auf 15:1 (Simopoulos, 2008). Eine Vielzahl von Studien zeigt, dass das erwähnte Ungleichgewicht der Fettsäurezusammensetzung an der Pathogenese von kardiovaskulären Erkrankungen, der Entstehung von Neoplasien, Asthma und anderen Autoimmunerkrankungen beteiligt ist (Marventano et al., 2015).

In vorangegangenen Arbeiten, die den Einfluss von Repin1 auf Stoffwechselfathologien wie das metabolische Syndrom untersuchten, wurde wiederholt auf die Rolle von CD36 hingewiesen. Der multifunktionale Scavenger Rezeptor moduliert dabei Vorgänge wie Zelladhäsion, Signaltransduktion, Angiogenese, Thrombose und Apoptose (Silverstein & Febbraio, 2009). Neben den bereits genannten modulatorischen Funktionen wird CD36 jedoch seit den 90er Jahren auch als Regulator des Fettstoffwechsels angesehen. So konnte Endemann et al. bereits 1993 das Protein als Makrophagenrezeptor für LDL-

Cholesterin identifizieren; eine Vielzahl an darauffolgenden Studien verlinken CD36 mit der intrazellulären Aufnahme langkettiger Fettsäuren (Glatz & Luiken, 2018). Neueren Beobachtungen zufolge scheint CD36 als Fettsäuretransporter bzw. Membranrezeptor nicht nur die Aufnahme, sondern auch die intrazelluläre Verarbeitung von Fettsäuren zu beeinflussen. Dabei scheint dieser einen hemmenden Einfluss auf die Autophagozytose von Fettsäuren zu besitzen (Li et al., 2019) und somit deren Akkumulation zu begünstigen. Dieses führt über lipidtoxische Effekte (Schaffer, 2003) zur Induktion inflammatorischer Prozesse und Progression der NAFLD. In Studien mit Repin1-defizienten Zellreihen sowie Knockout-Tieren konnte interessanterweise eine reduzierte Expression von CD36 gemessen werden (Ruschke et al., 2010; Kunath et al., 2016). Hingegen konnte eine deutliche Zunahme der CD36 Expression in HFD-behandelten Mäusen (Liu et al., 2018) sowie im Lebergewebe von Patienten mit einer NAFLD nachgewiesen werden (Zhao et al., 2018). Gleichermäßen zeigten die STZ/HFD-Mäuse im Vergleich zu gesunden Kontrollen auch eine erhöhte CD36 Expression, welche jedoch entgegen unserer Erwartung nach Behandlung mit der CMD-siRepin-Formulierung signifikant erhöht war. Eine positive Korrelation im Sinne einer Erhöhung der Plasmatriglyzeride (Febbraio et al., 1999; Son et al., 2018) sowie einer signifikanten Änderung der intrazellulären Lipidkonzentrationen (Su & Abumrad, 2009) blieb jedoch aus. In Zusammenhang mit der detektierten Steigerung der CD36 Expression kann die erwähnte Verschiebung des Verhältnisses von Omega-6- zu Omega-3-Fettsäuren gesehen werden. Eine Verminderung dieses Verhältnisses scheint sich dabei hemmend auf die CD36 Synthese auszuwirken (Pietsch et al., 1995; Song et al., 2018). In den zitierten Arbeiten wird diesbezüglich jeweils über die pro- bzw. antiinflammatorischen Eigenschaften dieser Fettsäuren und damit die Aktivierung von PPAR  $\gamma$  als Induktor für CD36 argumentiert. Unter Berücksichtigung aller erhobenen Messwerte und der isolierten Erhöhung von CD36 in einer der Versuchsgruppen in Verbindung mit dem verminderten Gehalt an Omega-3 Fettsäuren, sehen wir dieses Ergebnis über interindividuelle Abweichungen der Nahrungsaufnahme sowie der Morbiditätsausprägung der im NASH-Fibrose-Tumor Mausmodell befindlichen Tiere begründet.

Als maßgeblich für das Fortschreiten der NAFLD ist die durch ein Überangebot an Fetten induzierte Stressreaktion im Leberparenchym. Die durch die überlasteten Zellorganellen freigesetzten ROS (Begriche et al., 2006), toxische Stoffwechselprodukte sowie die Akkumulation von ungefalteten Proteinen im ER (Mantzaris et al., 2011) führt dabei zu einer zellulären Dysfunktion und damit zu einer sterilen Inflammation und erhöhten Apoptoserate der Hepatozyten (Cusi, 2009). Die Freisetzung von *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) und die zusätzliche Überexpression verschiedener Rezeptoren aus der Toll-Like (Shi et al., 2006) und der Todes-Rezeptor Familie (Feldstein et al., 2003; Malhi et al., 2007)

initiiert dabei eine Vielzahl inflammatorischer Kaskaden, die bei einer dauerhaften Aktivierung zu überschießenden Zellheilungsvorgängen im Sinne eines Fibrosierungsprozesses beitragen. Wie mehrfach beschrieben, zeigt der Formenkreis der NAFLD dabei eine Art fließenden Übergang zwischen den Krankheitsstadien und mündet in einer Leberzirrhose mit erhöhter Prävalenz für Neoplasien. Der im hier vorliegenden Versuchsaufbau abgebildete Übergang zwischen einer asymptomatischen steatohepatitis und einer NASH ist dabei histologisch durch die Einwanderung von Entzündungszellen, wie Kupferzellen und neutrophilen Granulozyten, gekennzeichnet (Lefkowitz, 2005). Diese Zellen werden bereits in frühen Abschnitten der unspezifischen Immunantwort durch entsprechende Zytokinausschüttung und Freisetzung von DAMPS rekrutiert und migrieren aus der Blutbahn in das Lebergewebe. Dieses konnte in der vorliegenden Studie über eine entsprechende Mehranreicherung von Granulozyten im Leberparenchym der STZ/HFD-Mäuse nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich die beschriebene und für die NASH typische Granulozyteneinwanderung in der siRep Versuchsgruppe als signifikant vermindert im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Die durch den Repin1-Knockdown erzielte Reduktion der Chemotaxis kann dabei als Ausdruck für eine verminderte zelluläre Stressreaktion gesehen werden, die sich positiv auf die Chronifizierung des Inflammationsprozesses und damit protektiv auf ein Fortschreiten der NAFLD auswirken könnte. Die durch die Granulozyten freigesetzten ROS wird dabei auch eine genotoxische Wirkung zugeschrieben. Aufgrund einer Beschädigung der Telomere kommt es zu einer Chromosomeninstabilität und damit zu einer gesteigerten Tumorzinzidenz (Bergus-Nahrman et al., 2012). Dieser Effekt kann im NASH-Fibrose-Tumor Mausmodell bereits mit dem Auftreten des HCCs ab der 8. Woche post partum bestätigt werden. In Versuchen mit Repin1-defizienten Mäusen konnte dabei eine deutliche Reduzierung der Tumorzinzidenz nachgewiesen werden (Abshagen et al., 2019).

Aktuelle Studien arbeiten zusätzlich den Einfluss von *neutrophil extracellular traps* (NETs) auf Chronifizierung von Inflammationszuständen und Tumorzinzidenz heraus. Diese bilden ein antimikrobielles Netzwerk durch Granulozyten freigesetztes Protein und Chromatin aus (Brinkmann et al., 2004). Die Freisetzung von NETs scheint sowohl die Zuwanderung und Aktivierung von Makrophagen zu fördern als auch die Freisetzung von Zytokinen zu verstärken (Van der Windt et al., 2018). Die Arbeitsgruppe um Van der Windt konnte über eine Hemmung der NET-Freisetzung eine Reduktion der Makrophageninfiltration, der Zytokinspiegel und des NAS bei 8 Wochen alten Versuchstieren im STAM™ Mice Modells beobachten. Des Weiteren wurden die Freisetzung von NETs mit dem Fortschreiten verschiedener Autoimmunerkrankungen, wie beispielsweise Vaskulitiden, der rheumatoiden Arthritis und dem Lupus erythematosus assoziiert (Papayannopoulos, 2018).

Neben der thematisierten Aktivierung der gewebsständigen Kupferzellen kommt es zusätzlich zu einer Infiltration von Makrophagen, die sich aus Monozyten differenzieren, in das geschädigte Leberparenchym (Krenkel & Tacke, 2017). Die Makrophageninfiltration ins Leberparenchym der mit siRep-behandelten STZ/HFD-Tiere zeigte sich ebenfalls reduziert. Dabei lassen aktivierende Wechselwirkungen zwischen Granulozyten und Makrophagen sowie vergleichbare Mechanismen der Rekrutierung von einem synergistischen Prozess ausgehen. Eine Reduktion des proinflammatorischen Zytokins MCP, welches die Migration von Makrophagen und Monozyten im Leberparenchym fördert (Baeck et al., 2011), unterstreicht dabei den beobachteten Prozess und damit die verminderte inflammatorische Aktivität im Lebergewebe der siRep-behandelten STZ/HFD-Tiere. Kupferzellen und die aus Monozyten differenzierten und eingewanderten Makrophagen scheinen dabei eine entscheidende Rolle für die Homöostase zwischen Reparatur und Fibrosierung des Leberparenchyms einzunehmen (Reid et al., 2016). Eine Hemmung der hepatischen Makrophagenpopulation konnte in Studien einen positiven Einfluss auf die Insulinsensitivität, Inflammation und den Fibrosierungsprozess nachweisen (Lanthier, 2015). Die erwähnte Homöostase zwischen den verschiedenen Immunzellen und den bis dato noch nicht vollständig verstandenen inflammatorischen Kaskaden werden wesentlich durch die Freisetzung verschiedener Zytokine moduliert. In Betrachtung der in dieser Studie erhobenen Daten zeigt sich ein deutlicher Trend, ohne dabei in dem frühen Stadium der Entwicklung einer NASH mehrheitlich signifikante Ergebnisse zu liefern. Neben der bereits thematisierten Reduktion von MCP, in Zusammenhang mit der Reduktion der Makrophageninfiltration, zeigte sich ebenfalls eine reduzierte hepatische Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ , die ebenfalls von aktivierten Makrophagen sezerniert werden (Jindal et al., 2015). IL-10, als „antiinflammatorischer Gegenspieler“, zeigt sich bei reduzierter Inflammation und Makrophagenaktivität als signifikant gemindert. Neben Immunzellen und geschädigten Parenchymzellen werden Zytokine, wie IL-6 und TNF- $\alpha$ , auch vom Fettgewebe sezerniert (Hotamisligil et al., 1993), was die Verlinkung zwischen der NAFLD und dem Metabolischem Syndrom bekräftigt. Des Weiteren zeigen Patienten mit einer NASH im Gegensatz zu Patienten, die unter einer asymptotischen Steatosis hepatis leiden, eine signifikant erhöhte Expression von IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  (Gadd et al., 2014). Während der Progression von der NASH zur NASH-Zirrhose entwickelt sich aus der chronischen, sterilen Inflammation ein Fibrosierungsprozess, der maßgeblich durch TNF- $\alpha$  moduliert wird (Schon & Weiskirchen, 2014). Dieses wirkt u.a. aktivierend auf die hepatischen Sternzellen und verstärkt die Produktion von EZM (Gressner & Yagmur, 2003). Dabei kommt es bei der im Ruhezustand für die Speicherung und Verstoffwechslung von Vitamin A zuständige hepatischen Sternzelle (Blomhoff & Wake, 1991) zu einer Zytokin-vermittelten Transdifferenzierung in einen myofibroblasten-

ähnlichen Zustand. In aktiviertem Zustand ist sie für die Produktion von ca. 90% der extrazellulären Matrix verantwortlich (Seki & Schwabe, 2015). Die entsprechende Ablagerung von Glykoproteinen, Proteoglykanen und Kollagenen führt im Verlauf zur Ausbildung bindegewebiger Narben. Diese mindern im Verlauf die hepatische Stoffwechsellkapazität und führen über eine Erhöhung des intrahepatischen Widerstands zu einer portalen Hypertension (Bataller & Brenner, 2001). Daraus resultiert eine gesteigerte Mortalität der NAFLD Patienten exponentiell mit dem Fortschritt der Fibrosierung (Dulai et al., 2017). Interessanterweise konnte in den siRep-behandelten STZ/HFD-Tieren verminderte Level an Kollagen-1 $\alpha$ , dem Hauptbestandteil der EZM und Fibrosemarker, beobachtet werden. Die beschriebene Homöostase zwischen Reparatur und Proliferation kann über eine Quantifizierung des Proliferationsmarkers PCNA gewichtet werden (Eldrige et al., 1993). Neben erhöhtem Zellumsatz in Zusammenhang mit Apoptose und Nekrose kann eine erhöhte Aktivität Hinweise auf die Entstehung von Neoplasien wie beispielsweise eines HCCs liefern (Qin & Tang 2002). In Betrachtung der Kombination aus beobachteter Reduktion der Inflammation und einem reduzierten Gewebeschaden scheint sich der Therapieansatz über eine siRNA vermittelte RNAi von Repin1 vor allem unter Verwendung der Hepaplex2-Lipoplexe positiv auf die Progression der NAFLD auszuwirken.

### 7.3 Zusammenfassung und Ausblick

Die hier präsentierte Studie zeigt, dass ein Gen-Silencing über eine Liposomen-vermittelte RNA-Interferenz einen effektiven Weg zur gezielten Modulation der Proteinbiosynthese von potentiellen Therapiegenen in der Leber darstellt. Die wiederholte Applikation von siRepin1-Lipoplexen führte zu einer signifikant reduzierten Repin1 mRNA Expression von STZ/HFD-Mäusen. Während über einen 14-tägigen Therapiezeitraum inhibitorische Effekte auf Inflammation sowie Fibrogenese erzielt und so der Leberschaden reduziert werden konnte, hatte das leberspezifische Silencing von Repin1 keinen Einfluss auf die generalisierte Lipidakkumulation, den NAS sowie auf Parameter des Blutbildes und den Leber/Körpergewichts-Index.

Zusammenfassend bietet der gewählte Therapieansatz vielversprechende Ergebnisse, die eine Fortführung und den Ausbau des Studienansatzes wünschenswert machen. Die parallel in unserer Arbeitsgruppe erzielten Resultate in STZ/HFD-behandelten Repin1 Knockout-Tieren bestätigen dabei die positiven Effekte eines Repin1 Knockouts auf die Entstehung und Progredienz einer NAFLD (Abshagen et al., 2019). Die ausgeprägte Variation der Morbidität der STZ/HFD-Tiere sollte dabei über eine größere Versuchsgruppe relativiert werden. Die Möglichkeit einer i.p. Applikation der Lipoplexe würde dabei zu einer deutlichen Reduktion der Invasivität der Applikationsmaßnahme führen und damit eine Ausweitung des Versuchsprotokolls erleichtern. Die reduzierte Anreicherung der eingesetzten Lipoplex-Formulierung im steatotisch veränderten Lebergewebe legt nahe, dass der beschriebene Therapieansatz bei milden Ausprägungsformen der NAFLD oder präventiv am effektivsten eingesetzt werden kann.

Erste klinische Studien unterstreichen dabei den hier dargestellten protektiven Effekt einer Repin1-Defizienz für das Auftreten und die Progression einer NAFLD auch im menschlichen Organismus. Das per Biopsie gewonnene Leberparenchym von Patienten mit einer durch Deletion von Basenpaaren gekennzeichneten und damit in ihrer Aktivität geminderten Repin1-Variante zeigte einen reduzierten NAFLD-Activity-Score sowie eine geminderte Fibrosierung im Vergleich zu Nicht-Deletionsträgern (Abshagen et al., 2020). In Betrachtung der hier dargestellten Ergebnisse und Studien, stellt Repin1 einen genetischen Risikofaktor für die Ausbildung einer NAFLD dar und könnte über die gezielte Modulation eine Zielstruktur zur effektiven Behandlung oder Prävention der Erkrankung darstellen.

## **8 Thesen zur Dissertation**

- Der Formenkreis der NAFLD gehört zu den weitverbreitetsten Krankheiten innerhalb der Industrienationen und verursacht bei stark steigender Inzidenz einen massiven sozioökonomischen Schaden weltweit.
- Aufgrund der komplexen und multifaktoriellen Pathogenese der NAFLD, gibt es aktuell keine medikamentöse Therapie mit nachgewiesener Wirksamkeit und breiter klinischer Testung.
- Das in dieser Studie genutzte Krankheitsmodell der STAM<sup>TM</sup> Maus induziert über die Applikation des  $\beta$ -Zellgiftes Streptozotocin in Kombination mit einer hochfettreichen Ernährung eine aggressiv fortschreitende NAFLD. Dabei durchlaufen die Versuchstiere konsequent alle Stadien der nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung.
- Das polydaktyle Zinkfingerprotein Repin1 stellt als Kandidatengen für die Ausbildung von Adipositas, Dyslipidämien und einer gestörten Glukosetoleranz eine vielversprechende Zielstruktur zur Behandlung hepatischer Stoffwechselpathologien dar.
- Ein Knockdown des Zielgens Repin1 wurde durch Nutzung einer siRNA-basierten RNA-Interferenz realisiert.
- Die als Transportsystem für die siRNA genutzten Lipoplex-Formulierungen (CMD, Hepaplex2) zeigten eine leberspezifische Anreicherung sowie eine gute Verträglichkeit ohne toxische Nebeneffekte.
- Die wiederholte Applikation von siRepin1-Lipoplexen führte zu einer signifikant reduzierten hepatischen Repin1 mRNA Expression in STZ/HFD-behandelten Mäusen.
- Das leberspezifische Silencing von Repin1 hatte über den Untersuchungszeitraum keinen Einfluss auf die generalisierte Lipidakkumulation, den NAS sowie auf Parameter des Blutbildes und den Leber/Körpergewichts-Index.
- Bereits nach 14-tägiger Therapie zeigten sich inhibitorische Effekte auf die Inflammation, Fibrogenese sowie den Leberschaden.

- Eine verminderte Anreicherung der verwendeten Lipoplex-Formulierungen in steatotisch verändertem Lebergewebe im Vergleich zu gesundem Lebergewebe weist darauf hin, dass der Therapieansatz besonders bei milden Ausprägungsformen bzw. in einem präventiven Ansatz effektiv zur Inhibition der NAFLD-Progression eingesetzt werden könnte.
- Die parallel in unserer Arbeitsgruppe erzielten Resultate in Knockout-Tieren sowie klinische Testungen in humanem Lebergewebe bestätigen die hemmenden Effekte einer Repin1-Defizienz auf die Entstehung und Progredienz einer NAFLD.

## 9 Literaturverzeichnis

- Abshagen K; Berger C; Dietrich A; Schütz T; Wittekind C; Stumvoll M; Blüher M; Klötting N (2020): A Human REPIN1 Gene Variant: Genetic Risk Factor for the Development of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. In: *Clinical and translational gastroenterology* 11 (1), e00114.
- Abshagen K; Brensel M; Genz B; Roth K; Thomas M; Fehring V; Schaeper U; Vollmar B (2015): Foxf1 siRNA delivery to hepatic stellate cells by DBTC lipoplex formulations ameliorates fibrosis in livers of bile duct ligated mice. In: *Current gene therapy* 15 (3), S. 215–227.
- Abshagen K; Mense L; Fischer F; Liebig M; Schaeper U; Navarro G; Glass Ä; Frank M; Klötting N; Vollmar B (2019): Repin1 deficiency in liver tissue alleviates NAFLD progression in mice. In: *Journal of Advanced Research* 16, S. 99–111.
- Alberti KG; Zimmet P; Shaw J (2005): The metabolic syndrome--a new worldwide definition. In: *Lancet (London, England)* 366 (9491), S. 1059–1062.
- Alexis F; Pridgen E; Molnar LK; Farokhzad OC (2008): Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. In: *Molecular pharmaceutics* 5 (4), S. 505–515.
- Alkhoury N; Dixon LJ; Feldstein AE (2009): Lipotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease. Not all lipids are created equal. In: *Expert review of gastroenterology & hepatology* 3 (4), S. 445–451.
- Anderson EL; Howe LD; Jones HE; Higgins JP; Lawlor DA; Fraser A (2015): The Prevalence of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Children and Adolescents. A Systematic Review and Meta-Analysis. In: *PloS one* 10 (10), e0140908.
- Angulo P (2002): Nonalcoholic fatty liver disease. In: *The New England journal of medicine* 346 (16), S. 1221–1231.
- Angulo P; Hui JM; Marchesini G; Bugianesi E; George J; Farrell GC; Enders F; Saksena S; Burt AD; Bida JP; Lindor K; Sanderson SO; Lenzi M; Adams LA; Kench J; Therneau TM; Day CP (2007): The NAFLD fibrosis score. A noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 45 (4), S. 846–854.
- Anstee QM; Targher G; Day CP (2013): Progression of NAFLD to diabetes mellitus, cardiovascular disease or cirrhosis. In: *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* 10 (6), S. 330–344.
- Assy N; Kaita K; Mymin D; Levy C; Rosser B; Minuk G (2000): Fatty infiltration of liver in hyperlipidemic patients. In: *Digestive diseases and sciences* 45 (10), S. 1929–1934.
- Austyn JM; Gordon S (1981): F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. In: *European journal of immunology* 11 (10), S. 805–815.
- Avital YY; Grønbech-Jensen N; Farago O (2016): The thermodynamics of endosomal escape and DNA release from lipoplexes. In: *Physical chemistry chemical physics: PCCP* 18 (4), S. 2591–2596.
- Avrameas S; Ternynck T (1971): Peroxidase labelled antibody and Fab conjugates with enhanced intracellular penetration. In: *Immunochemistry* 8 (12), S. 1175–1179.
- Ayonrinde OT; Oddy WH; Adams LA; Mori TA; Beilin LJ; Klerk N de; Olynyk JK (2017): Infant nutrition and maternal obesity influence the risk of non-alcoholic fatty liver disease in adolescents. In: *Journal of hepatology* 67 (3), S. 568–576.
- Ayonrinde OT; Olynyk JK; Beilin LJ; Mori TA; Pennell CE; Klerk N de; Oddy WH; Shipman P; Adams LA (2011): Gender-specific differences in adipose distribution and adipocytokines influence adolescent nonalcoholic fatty liver disease. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 53 (3), S. 800–809.
- Baek C; Wehr A; Karlmark KR; Heymann F; Vucur M; Gassler N; Huss S; Klussmann S; Eulberg D; Luedde T; Trautwein C; Tacke F (2012): Pharmacological inhibition of the chemokine CCL2

- (MCP-1) diminishes liver macrophage infiltration and steatohepatitis in chronic hepatic injury. In: *Gut* 61 (3), S. 416–426.
- Bambha K; Belt P; Abraham M; Wilson LA; Pabst M; Ferrell L; Unalp-Arida A; Bass N (2012): Ethnicity and nonalcoholic fatty liver disease. In: *Hepatology* (Baltimore, Md.) 55 (3), S. 769–780.
- Bataller R; Brenner DA (2001): Hepatic stellate cells as a target for the treatment of liver fibrosis. In: *Seminars in liver disease* 21 (3), S. 437–451.
- Begriffe K; Igoudjil A; Pessayre D; Fromenty B (2006): Mitochondrial dysfunction in NASH. Causes, consequences and possible means to prevent it. In: *Mitochondrion* 6 (1), S. 1–28.
- Begus-Nahrman Y; Hartmann D; Kraus J; Eshraghi P; Scheffold A; Grieb M; Rasche V; Schirmacher P; Lee H-W; Kestler HA; Lechel A; Rudolph KL (2012): Transient telomere dysfunction induces chromosomal instability and promotes carcinogenesis. In: *The Journal of clinical investigation* 122 (6), S. 2283–2288.
- Belfort R; Harrison SA; Brown K; Darland C; Finch J; Hardies J; Balas B; Gastaldelli A; Tio F; Pulcini J; Berria R; Ma JZ; Dwivedi S; Havranek R; Fincke C; DeFronzo R; Bannayan GA; Schenker S; Cusi K (2006): A placebo-controlled trial of pioglitazone in subjects with nonalcoholic steatohepatitis. In: *The New England journal of medicine* 355 (22), S. 2297–2307.
- Berg, Jeremy M.; Tymoczko, John L.; Gatto, Gregory J.; Stryer, Lubert (2018): *Stryer Biochemie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Blomhoff R; Wake K (1991): Perisinusoidal stellate cells of the liver: important roles in retinol metabolism and fibrosis. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 5 (3), S. 271–277.
- Boström P; Andersson L; Rutberg M; Perman J; Lidberg U; Johansson BR; Fernandez-Rodriguez J; Ericson J; Nilsson T; Borén J; Olofsson S-O (2007): SNARE proteins mediate fusion between cytosolic lipid droplets and are implicated in insulin sensitivity. In: *Nat Cell Biol* 9 (11), S. 1286–1293.
- Boström P; Andersson L; Rutberg M; Perman J; Lidberg U; Johansson BR; Fernandez-Rodriguez J; Ericson J; Nilsson T; Borén J; Olofsson S-O (2007): SNARE proteins mediate fusion between cytosolic lipid droplets and are implicated in insulin sensitivity. In: *Nat Cell Biol* 9 (11), S. 1286–1293.
- Brachs S; Winkel AF; Tang H; Birkenfeld AL; Brunner B; Jahn-Hofmann K; Margerie D; Ruetten H; Schmoll D; Spranger J (2016): Inhibition of citrate cotransporter Slc13a5/mINDY by RNAi improves hepatic insulin sensitivity and prevents diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in mice. In: *Molecular Metabolism* 5 (11), S. 1072–1082.
- Brinkmann V; Reichard U; Goosmann C; Fauler B; Uhlemann Y; Weiss DS; Weinrauch Y; Zychlinsky A (2004): Neutrophil extracellular traps kill bacteria. In: *Science (New York, N.Y.)* 303 (5663), S. 1532–1535.
- Browning JD (2006): Statins and hepatic steatosis. Perspectives from the Dallas Heart Study. In: *Hepatology* (Baltimore, Md.) 44 (2), S. 466–471.
- Browning JD; Szczepaniak LS; Dobbins R; Nuremberg P; Horton JD; Cohen JC; Grundy SM; Hobbs HH (2004): Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States. Impact of ethnicity. In: *Hepatology* (Baltimore, Md.) 40 (6), S. 1387–1395.
- Brumbaugh DE; Tearse P; Cree-Green M; Fenton LZ; Brown M; Scherzinger A; Reynolds R; Alston M; Hoffman C; Pan Z; Friedman JE; Barbour LA (2013): Intrahepatic fat is increased in the neonatal offspring of obese women with gestational diabetes. In: *The Journal of pediatrics* 162 (5), 930-6.e1.

- Bruno Ad; Rodrigues MH; Alvares MC; Nahas-Neto J; Nahas EA (2014): Non-alcoholic fatty liver disease and its associated risk factors in Brazilian postmenopausal women. In: *Climacteric: the journal of the International Menopause Society* 17 (4), S. 465–471.
- Brunt EM; Wong VW-S; Nobili V; Day CP; Sookoian S; Maher JJ; Bugianesi E; Sirlin CB; Neuschwander-Tetri BA; Rinella ME (2015): Nonalcoholic fatty liver disease. In: *Nature reviews. Disease primers* 1, S. 15080.
- Bugianesi E; Moscatiello S; Ciaravella MF; Marchesini G (2010): Insulin Resistance in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. In: *CPD* 16 (17), S. 1941–1951.
- Buzzetti E; Pinzani M; Tsochatzis EA (2016): The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). In: *Metabolism: clinical and experimental* 65 (8), S. 1038–1048.
- Caddle MS; Dailey L; Heintz NH (1990): RIP60, a mammalian origin-binding protein, enhances DNA bending near the dihydrofolate reductase origin of replication. In: *Molecular and cellular biology* 10 (12), S. 6236–6243.
- Cai J; Zhang X-J; Li H (2019): Progress and challenges in the prevention and control of nonalcoholic fatty liver disease. In: *Medicinal research reviews* 39 (1), S. 328–348.
- Cassatella MA (1995): The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. In: *Immunology today* 16 (1), S. 21–26.
- Cerutti H; Casas-Mollano JA (2006): On the origin and functions of RNA-mediated silencing. From protists to man. In: *Current genetics* 50 (2), S. 81–99.
- Chakraborty C; Sharma AR; Sharma G; Doss CG; Lee S-S (2017): Therapeutic miRNA and siRNA: Moving from Bench to Clinic as Next Generation Medicine. In: *Molecular therapy. Nucleic acids* 8, S. 132–143.
- Chalasani N; Younossi Z; Lavine JE; Diehl AM; Brunt EM; Cusi K; Charlton M; Sanyal AJ (2012): The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease. Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 55 (6), S. 2005–2023.
- Chen S; Tam YY; Lin PJ; Leung AK; Tam YK; Cullis PR (2014): Development of lipid nanoparticle formulations of siRNA for hepatocyte gene silencing following subcutaneous administration. In: *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society* 196, S. 106–112.
- Cheung O; Sanyal AJ (2008): Abnormalities of lipid metabolism in nonalcoholic fatty liver disease. In: *Seminars in liver disease* 28 (4), S. 351–359.
- Cholankeril G; Wong RJ; Hu M; Perumpail RB; Yoo ER; Puri P; Younossi ZM; Harrison SA; Ahmed A (2017): Liver Transplantation for Nonalcoholic Steatohepatitis in the US: Temporal Trends and Outcomes. In: *Digestive diseases and sciences* 62 (10), S. 2915–2922.
- Chrai, S. S., Murari, R., & Ahmad, I. (2002): Liposomes. Part two: Drug delivery systems. In: *BioPharm* 15 (1).
- Classen, Meinhard; Diehl, Volker; Kochsiek, Kurt (Hg.) (2010): *Innere Medizin*. 6., komplett überarb. Aufl. München: Elsevier Urban & Fischer.
- Coelho T; Adams D; Silva A; Lozeron P; Hawkins PN; Mant T; Perez J; Chiesa J; Warrington S; Tranter E; Munisamy M; Falzone R; Harrop J; Cehelsky J; Bettencourt BR; Geissler M; Butler JS; Sehgal A; Meyers RE; Chen Q; Borland T; Hutabarat RM; Clausen VA; Alvarez R; Fitzgerald K; Gamba-Vitalo C; Nochur SV; Vaishnav AK; Sah DW; Gollob JA; Suhr OB (2013): Safety and efficacy of RNAi therapy for transthyretin amyloidosis. In: *The New England journal of medicine* 369 (9), S. 819–829.

- Cusi K (2009): Role of insulin resistance and lipotoxicity in non-alcoholic steatohepatitis. In: *Clinics in liver disease* 13 (4), S. 545–563.
- Cusi K (2012): Role of obesity and lipotoxicity in the development of nonalcoholic steatohepatitis: pathophysiology and clinical implications. In: *Gastroenterology* 142 (4), 711-725.e6.
- Dailey L; Caddle MS; Heintz N; Heintz NH (1990): Purification of RIP60 and RIP100, mammalian proteins with origin-specific DNA-binding and ATP-dependent DNA helicase activities. In: *Molecular and cellular biology* 10 (12), S. 6225–6235.
- Diehl KH; Hull R; Morton D; Pfister R; Rabemampianina Y; Smith D; Vidal JM; van de Vorstenbosch C (2001): A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. In: *Journal of applied toxicology: JAT* 21 (1), S. 15–23.
- Dowdy SF (2017): Overcoming cellular barriers for RNA therapeutics. In: *Nature biotechnology* 35 (3), S. 222–229.
- Doycheva I; Issa D; Watt KD; Lopez R; Rifai G; Alkhoury N (2017): Nonalcoholic Steatohepatitis is the Most Rapidly Increasing Indication for Liver Transplantation in Young Adults in the United States. In: *Journal of clinical gastroenterology*.
- Dulai PS; Singh S; Patel J; Soni M; Prokop LJ; Younossi Z; Sebastiani G; Ekstedt M; Hagstrom H; Nasr P; Stal P; Wong VW-S; Kechagias S; Hultcrantz R; Loomba R (2017): Increased risk of mortality by fibrosis stage in nonalcoholic fatty liver disease: Systematic review and meta-analysis. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 65 (5), S. 1557–1565.
- Eldrige SR; Butterworth BE; Goldsworthy TL (1993): Proliferating cell nuclear antigen: a marker for hepatocellular proliferation in rodents. In: *Environmental health perspectives* 101 Suppl 5, S. 211–218.
- Endemann G; Stanton LW; Madden KS; Bryant CM; White RT; Protter AA (1993): CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. In: *J. Biol. Chem.* 268 (16), S. 11811–11816.
- Feaver RE; Cole BK; Lawson MJ; Hoang SA; Marukian S; Blackman BR; Figler RA; Sanyal AJ; Wamhoff BR; Dash A (2016): Development of an in vitro human liver system for interrogating nonalcoholic steatohepatitis. In: *JCI insight* 1 (20), e90954.
- Febbraio M; Abumrad NA; Hajjar DP; Sharma K; Cheng W; Pearce SF; Silverstein RL (1999): A Null Mutation in Murine CD36 Reveals an Important Role in Fatty Acid and Lipoprotein Metabolism. In: *J. Biol. Chem.* 274 (27), S. 19055–19062.
- Feldstein AE; Canbay A; Guicciardi ME; Higuchi H; Bronk SF; Gores GJ (2003): Diet associated hepatic steatosis sensitizes to Fas mediated liver injury in mice. In: *Journal of hepatology* 39 (6), S. 978–983.
- Felgner JH; Kumar R; Sridhar CN; Wheeler CJ; Tsai YJ; Border R; Ramsey P; Martin M; Felgner PL (1994): Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. In: *J. Biol. Chem.* 269 (4), S. 2550–2561.
- Fire A; Xu S; Montgomery MK; Kostas SA; Driver SE; Mello CC (1998): Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. In: *Nature* 391 (6669), S. 806–811.
- Firneisz G (2014): Non-alcoholic fatty liver disease and type 2 diabetes mellitus. The liver disease of our age? In: *World journal of gastroenterology* 20 (27), S. 9072–9089.
- Fujii M; Shibazaki Y; Wakamatsu K; Honda Y; Kawauchi Y; Suzuki K; Arumugam S; Watanabe K; Ichida T; Asakura H; Yoneyama H (2013): A murine model for non-alcoholic steatohepatitis showing evidence of association between diabetes and hepatocellular carcinoma. In: *Medical molecular morphology* 46 (3), S. 141–152.

- Gadd VL; Skoien R; Powell EE; Fagan KJ; Winterford C; Horsfall L; Irvine K; Clouston AD (2014): The portal inflammatory infiltrate and ductular reaction in human nonalcoholic fatty liver disease. In: *Hepatology* (Baltimore, Md.) 59 (4), S. 1393–1405.
- Gaia S; Carezzi S; Barilli AL; Bugianesi E; Smedile A; Brunello F; Marzano A; Rizzetto M (2011): Reliability of transient elastography for the detection of fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease and chronic viral hepatitis. In: *Journal of hepatology* 54 (1), S. 64–71.
- Gerber L; Otgonsuren M; Mishra A; Escheik C; Biredinc A; Stepanova M; Younossi ZM (2012): Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is associated with low level of physical activity. A population-based study. In: *Alimentary pharmacology & therapeutics* 36 (8), S. 772–781.
- Gilleron J; Querbes W; Zeigerer A; Borodovsky A; Marsico G; Schubert U; Manygoats K; Seifert S; Andree C; Stöter M; Epstein-Barash H; Zhang L; Koteliensky V; Fitzgerald K; Fava E; Bickle M; Kalaidzidis Y; Akinc A; Maier M; Zerial M (2013): Image-based analysis of lipid nanoparticle-mediated siRNA delivery, intracellular trafficking and endosomal escape. In: *Nature biotechnology* 31 (7), S. 638–646.
- Glatz JF; Luiken JJ (2018): Dynamic role of the transmembrane glycoprotein CD36 (SR-B2) in cellular fatty acid uptake and utilization. In: *Journal of lipid research* 59 (7), S. 1084–1093.
- Glebov OO; Bright NA; Nichols BJ (2006): Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells. In: *Nat Cell Biol* 8 (1), S. 46–54.
- Görgens SW; Jahn-Hofmann K; Bangari D; Cummings S; Metz-Weidmann C; Schwahn U; Wohlfart P; Schäfer M; Bielohuby M (2019): A siRNA mediated hepatic dpp4 knockdown affects lipid, but not glucose metabolism in diabetic mice. In: *PloS one* 14 (12), e0225835.
- Gressner AM; Yagmur E (2003): Aspekte der Pathogenese, Therapie und Diagnostik der Leberfibrose/Pathogenetic, Therapeutic and Diagnostic Aspects of Hepatic Fibrosis. In: *LaboratoriumsMedizin* 27 (11/12), S. 423–430.
- Hamann J; Koning N; Pouwels W; Ulfman LH; van Eijk M; Stacey M; Lin H-H; Gordon S; Kwakkenbos MJ (2007): EMR1, the human homolog of F4/80, is an eosinophil-specific receptor. In: *European journal of immunology* 37 (10), S. 2797–2802.
- Handberg A; Levin K; Højlund K; Beck-Nielsen H (2006): Identification of the oxidized low-density lipoprotein scavenger receptor CD36 in plasma. A novel marker of insulin resistance. In: *Circulation* 114 (11), S. 1169–1176.
- Haring R; Wallaschofski H; Nauck M; Dörr M; Baumeister SE; Völzke H (2009): Ultrasonographic hepatic steatosis increases prediction of mortality risk from elevated serum gamma-glutamyl transpeptidase levels. In: *Hepatology* (Baltimore, Md.) 50 (5), S. 1403–1411.
- Heiker JT; Klötting N (2013): Replication initiator 1 in adipose tissue function and human obesity. In: *Vitamins and hormones* 91, S. 97–105.
- Heinrich PC; Castell JV; Andus T (1990): Interleukin-6 and the acute phase response. In: *The Biochemical journal* 265 (3), S. 621–636.
- Herold, Gerd (Hg.) (2018): *Innere Medizin 2018*. Dr. Gerd Herold. Köln: Gerd Herold.
- Hill-Baskin AE; Markiewski MM; Buchner DA; Shao H; DeSantis D; Hsiao G; Subramaniam S; Berger NA; Croniger C; Lambris JD; Nadeau JH (2009): Diet-induced hepatocellular carcinoma in genetically predisposed mice. In: *Human molecular genetics* 18 (16), S. 2975–2988.
- Hotamisligil GS; Shargill NS; Spiegelman BM (1993): Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance. In: *Science* (New York, N.Y.) 259 (5091), S. 87–91.

- Houchens CR; Montigny W; Zeltser L; Dailey L; Gilbert JM; Heintz NH (2000): The dhfr oribeta-binding protein RIP60 contains 15 zinc fingers. DNA binding and looping by the central three fingers and an associated proline-rich region. In: *Nucleic acids research* 28 (2), S. 570–581.
- Hung K-S; Lee T-H; Chou W-Y; Wu C-L; Cho C-L; Lu C-N; Jawan B; Wang C-H (2005): Interleukin-10 gene therapy reverses thioacetamide-induced liver fibrosis in mice. In: *Biochemical and biophysical research communications* 336 (1), S. 324–331.
- Ishida T; Harashima H; Kiwada H (2001): Interactions of liposomes with cells in vitro and in vivo: opsonins and receptors. In: *Current drug metabolism* 2 (4), S. 397–409.
- Itoh M; Suganami T; Nakagawa N; Tanaka M; Yamamoto Y; Kamei Y; Terai S; Sakaida I; Ogawa Y (2011): Melanocortin 4 Receptor–Deficient Mice as a Novel Mouse Model of Nonalcoholic Steatohepatitis. In: *The American Journal of Pathology* 179 (5), S. 2454–2463.
- Jackson AL; Burchard J; Schelter J; Chau BN; Cleary M; Lim L; Linsley PS (2006): Widespread siRNA "off-target" transcript silencing mediated by seed region sequence complementarity. In: *RNA (New York, N.Y.)* 12 (7), S. 1179–1187.
- Jacome-Sosa MM; Parks EJ (2014): Fatty acid sources and their fluxes as they contribute to plasma triglyceride concentrations and fatty liver in humans. In: *Current opinion in lipidology* 25 (3), S. 213–220.
- James J; Bosch KS; Zuyderhoudt FM; Houtkooper JM; van Gool J (1986): Histophotometric estimation of volume density of collagen as an indication of fibrosis in rat liver. In: *Histochemistry* 85 (2), S. 129–133.
- Jayaraman M; Ansell SM; Mui BL; Tam YK; Chen J; Du X; Butler D; Eltepu L; Matsuda S; Narayanannair JK; Rajeev KG; Hafez IM; Akinc A; Maier MA; Tracy MA; Cullis PR; Madden TD; Manoharan M; Hope MJ (2012): Maximizing the potency of siRNA lipid nanoparticles for hepatic gene silencing in vivo. In: *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 51 (34), S. 8529–8533.
- Jindal A; Bruzzi S; Sutti S; Locatelli I; Bozzola C; Paternostro C; Parola M; Albano E (2015): Fat-laden macrophages modulate lobular inflammation in nonalcoholic steatohepatitis (NASH). In: *Experimental and molecular pathology* 99 (1), S. 155–162.
- Judge A; MacLachlan I (2008): Overcoming the innate immune response to small interfering RNA. In: *Human gene therapy* 19 (2), S. 111–124.
- Juliano RL; Ming X; Carver K; Laing B (2014): Cellular uptake and intracellular trafficking of oligonucleotides: implications for oligonucleotide pharmacology. In: *Nucleic acid therapeutics* 24 (2), S. 101–113.
- Kanasty R; Dorkin JR; Vegas A; Anderson D (2013): Delivery materials for siRNA therapeutics. In: *Nature materials* 12 (11), S. 967–977.
- Kang JX (2003): The importance of omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cell function. The gene transfer of omega-3 fatty acid desaturase. In: *World review of nutrition and dietetics* 92, S. 23–36.
- Kern M; Kosacka J; Hesselbarth N; Bruckner J; Heiker JT; Flehmig G; Kloting I; Kovacs P; Matz-Soja M; Gebhardt R; Krohn K; Sales S; Abshagen K; Shevchenko A; Stumvoll M; Bluher M; Kloting N (2014): Liver-Restricted Repin1 Deficiency Improves Whole-Body Insulin Sensitivity, Alters Lipid Metabolism, and Causes Secondary Changes in Adipose Tissue in Mice. In: *Diabetes* 63 (10), S. 3295–3309.
- Kerr MC; Teasdale RD (2009): Defining macropinocytosis. In: *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 10 (4), S. 364–371.

- Khan AA; Allemailem KS; Almatroodi SA; Almatroudi A; Rahmani AH (2020): Recent strategies towards the surface modification of liposomes: an innovative approach for different clinical applications. In: *3 Biotech* 10 (4), S. 163.
- Kleiner DE; Brunt EM; van Natta M; Behling C; Contos MJ; Cummings OW; Ferrell LD; Liu Y-C; Torbenson MS; Unalp-Arida A; Yeh M; McCullough AJ; Sanyal AJ (2005): Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 41 (6), S. 1313–1321.
- Klötting N; Wilke B; Klötting I (2007): Triplet repeat in the Repin1 3'-untranslated region on rat chromosome 4 correlates with facets of the metabolic syndrome. In: *Diabetes Metab. Res. Rev.* 23 (5), S. 406–410.
- Kohli R; Kirby M; Xanthakos SA; Softic S; Feldstein AE; Saxena V; Tang PH; Miles L; Miles MV; Balistreri WF; Woods SC; Seeley RJ (2010): High-Fructose Medium-Chain-Trans-Fat Diet Induces Liver Fibrosis & Elevates Plasma Coenzyme Q9 in a Novel Murine Model of Obesity and NASH. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 52 (3), S. 934–944.
- Konerman MA; Jones JC; Harrison SA (2018): Pharmacotherapy for NASH. Current and emerging. In: *Journal of hepatology* 68 (2), S. 362–375.
- Kovács P; Klötting I (1998): Mapping of quantitative trait loci for body weight on chromosomes 1 and 4 in the rat. In: *Biochemistry and molecular biology international* 44 (2), S. 399–405.
- Krenkel O; Tacke F (2017): Liver macrophages in tissue homeostasis and disease. In: *Nature reviews. Immunology* 17 (5), S. 306–321.
- Kunath A; Hesselbarth N; Gericke M; Kern M; Dommel S; Kovacs P; Stumvoll M; Blüher M; Klötting N (2016): Repin1 deficiency improves insulin sensitivity and glucose metabolism in db/db mice by reducing adipose tissue mass and inflammation. In: *Biochemical and biophysical research communications* 478 (1), S. 398–402.
- Kurimoto I; Grammer SF; Shimizu T; Nakamura T; Streilein JW (1995): Role of F4/80+ cells during induction of hapten-specific contact hypersensitivity. In: *Immunology* 85 (4), S. 621–629.
- Lajoie P; Nabi IR (2010): Lipid rafts, caveolae, and their endocytosis. In: *International review of cell and molecular biology* 282, S. 135–163.
- Lanthier N (2015): Targeting Kupffer cells in non-alcoholic fatty liver disease/non-alcoholic steatohepatitis: Why and how? In: *World journal of hepatology* 7 (19), S. 2184–2188.
- Layzer JM; McCaffrey AP; Tanner AK; Huang Z; Kay MA; Sullenger BA (2004): In vivo activity of nuclease-resistant siRNAs. In: *RNA (New York, N.Y.)* 10 (5), S. 766–771.
- Lee CS; Stowell RE; Tzubo KK; Villsana A (1951): Histochemical and microchemical changes in experimental cirrhosis and hepatoma formation in mice by carbon tetrachloride. In: *Cancer research* 11 (5), S. 345–354.
- Lee SS; Park SH (2014): Radiologic evaluation of nonalcoholic fatty liver disease. In: *World journal of gastroenterology* 20 (23), S. 7392–7402.
- Lefkowitz JH (2005): Morphology of alcoholic liver disease. In: *Clinics in liver disease* 9 (1), S. 37–53.
- Leite NC; Salles GF; Araujo AL; Villela-Nogueira CA; Cardoso CR (2009): Prevalence and associated factors of non-alcoholic fatty liver disease in patients with type-2 diabetes mellitus. In: *Liver international: official journal of the International Association for the Study of the Liver* 29 (1), S. 113–119.
- Lenzen S (2008): The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. In: *Diabetologia* 51 (2), S. 216–226.

- Li J; Xue S; Mao Z-W (2016): Nanoparticle delivery systems for siRNA-based therapeutics. In: *J. Mater. Chem. B* 4 (41), S. 6620–6639.
- Li Y; Yang P; Zhao L; Chen Y; Zhang X; Zeng S; Wei L; Varghese Z; Moorhead JF; Chen Y; Ruan XZ (2019): CD36 plays a negative role in the regulation of lipophagy in hepatocytes through an AMPK-dependent pathway. In: *Journal of lipid research* 60 (4), S. 844–855.
- Liebig M; Hassanzada A; Kämmerling M; Genz B; Vollmar B; Abshagen K (2018): Microcirculatory disturbances and cellular changes during progression of hepatic steatosis to liver tumors. In: *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)* 243 (1), S. 1–12.
- Liu J; Yang P; Zuo G; He S; Tan W; Zhang X; Su C; Zhao L; Wei L; Chen Y; Ruan X; Chen Y (2018): Long-chain fatty acid activates hepatocytes through CD36 mediated oxidative stress. In: *Lipids in health and disease* 17 (1), S. 153.
- Loomba R; Abraham M; Unalp A; Wilson L; Lavine J; Doo E; Bass NM (2012): Association between diabetes, family history of diabetes, and risk of nonalcoholic steatohepatitis and fibrosis. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 56 (3), S. 943–951.
- Lu JJ; Langer R; Chen J (2009): A novel mechanism is involved in cationic lipid-mediated functional siRNA delivery. In: *Molecular pharmaceutics* 6 (3), S. 763–771.
- Machado MV; Cortez-Pinto H (2013): Non-invasive diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease. A critical appraisal. In: *Journal of hepatology* 58 (5), S. 1007–1019.
- Mahady SE; Webster AC; Walker S; Sanyal A; George J (2011): The role of thiazolidinediones in non-alcoholic steatohepatitis - a systematic review and meta analysis. In: *Journal of hepatology* 55 (6), S. 1383–1390.
- Maier MA; Jayaraman M; Matsuda S; Liu J; Barros S; Querbes W; Tam YK; Ansell SM; Kumar V; Qin J; Zhang X; Wang Q; Panesar S; Hutabarat R; Carioto M; Hettinger J; Kandasamy P; Butler D; Rajeev KG; Pang B; Charisse K; Fitzgerald K; Mui BL; Du X; Cullis P; Madden TD; Hope MJ; Manoharan M; Akinc A (2013): Biodegradable lipids enabling rapidly eliminated lipid nanoparticles for systemic delivery of RNAi therapeutics. In: *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* 21 (8), S. 1570–1578.
- Makkonen J; Pietiläinen KH; Rissanen A; Kaprio J; Yki-Järvinen H (2009): Genetic factors contribute to variation in serum alanine aminotransferase activity independent of obesity and alcohol. A study in monozygotic and dizygotic twins. In: *Journal of hepatology* 50 (5), S. 1035–1042.
- Malhi H; Barreyro FJ; Isomoto H; Bronk SF; Gores GJ (2007): Free fatty acids sensitise hepatocytes to TRAIL mediated cytotoxicity. In: *Gut* 56 (8), S. 1124–1131.
- Mantzaris MD; Tsianos EV; Galaris D (2011): Interruption of triacylglycerol synthesis in the endoplasmic reticulum is the initiating event for saturated fatty acid-induced lipotoxicity in liver cells. In: *The FEBS journal* 278 (3), S. 519–530.
- Marques JT; Williams BR (2005): Activation of the mammalian immune system by siRNAs. In: *Nature biotechnology* 23 (11), S. 1399–1405.
- Marventano S; Kolacz P; Castellano S; Galvano F; Buscemi S; Mistretta A; Grosso G (2015): A review of recent evidence in human studies of n-3 and n-6 PUFA intake on cardiovascular disease, cancer, and depressive disorders: does the ratio really matter? In: *International journal of food sciences and nutrition* 66 (6), S. 611–622.
- Mathurin P; Hollebecque A; Arnalsteen L; Buob D; Leteurtre E; Caiazzo R; Pigeyre M; Verkindt H; Dharancy S; Louvet A; Romon M; Pattou F (2009): Prospective study of the long-term effects of bariatric surgery on liver injury in patients without advanced disease. In: *Gastroenterology* 137 (2), S. 532–540.

- Mayor S; Pagano RE (2007): Pathways of clathrin-independent endocytosis. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 8 (8), S. 603–612.
- Meister G; Tuschl T (2004): Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. In: *Nature* 431 (7006), S. 343–349.
- Mohamed M; Abu Lila AS; Shimizu T; Alaaeldin E; Hussein A; Sarhan HA; Szebeni J; Ishida T (2019): PEGylated liposomes: immunological responses. In: *Science and technology of advanced materials* 20 (1), S. 710–724.
- Nakagawa S; Wei L; Song WM; Higashi T; Ghoshal S; Kim RS; Bian CB; Yamada S; Sun X; Venkatesh A; Goossens N; Bain G; Lauwers GY; Koh AP; El-Abtah M; Ahmad NB; Hoshida H; Erstad DJ; Gunasekaran G; Lee Y; Yu M-L; Chuang W-L; Dai C-Y; Kobayashi M; Kumada H; Beppu T; Baba H; Mahajan M; Nair VD; Lanuti M; Villanueva A; Sangiovanni A; Iavarone M; Colombo M; Llovet JM; Subramanian A; Tager AM; Friedman SL; Baumert TF; Schwarz ME; Chung RT; Tanabe KK; Zhang B; Fuchs BC; Hoshida Y (2016): Molecular Liver Cancer Prevention in Cirrhosis by Organ Transcriptome Analysis and Lysophosphatidic Acid Pathway Inhibition. In: *Cancer cell* 30 (6), S. 879–890.
- Niedermayr A: *Fluoreszenzmikroskopie. Methoden der Biophysik*. Hg. v. Georg-August-Universität Göttingen. Online verfügbar unter <https://lp.uni-goettingen.de/get/pdf/6741> (abgerufen 22.11.20).
- Oddy WH; Herbison CE; Jacoby P; Ambrosini GL; O'Sullivan TA; Ayonrinde OT; Olynyk JK; Black LJ; Beilin LJ; Mori TA; Hands BP; Adams LA (2013): The Western dietary pattern is prospectively associated with nonalcoholic fatty liver disease in adolescence. In: *The American journal of gastroenterology* 108 (5), S. 778–785.
- Oseini AM; Cole BK; Issa D; Feaver RE; Sanyal AJ (2018): Translating scientific discovery: the need for preclinical models of nonalcoholic steatohepatitis. In: *Hepatology international* 12 (1), S. 6–16.
- Papayannopoulos V (2018): Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. In: *Nature reviews. Immunology* 18 (2), S. 134–147.
- Park JW (2002): Liposome-based drug delivery in breast cancer treatment. In: *Breast cancer research: BCR* 4 (3), S. 95–99.
- Pepino MY; Kuda O; Samovski D; Abumrad NA (2014): Structure-function of CD36 and importance of fatty acid signal transduction in fat metabolism. In: *Annual review of nutrition* 34, S. 281–303.
- Pietsch A; Weber C; Goretzki M; Weber PC; Lorenz RL (1995): N-3 but not N-6 fatty acids reduce the expression of the combined adhesion and scavenger receptor CD36 in human monocytic cells. In: *Cell biochemistry and function* 13 (3), S. 211–216.
- Poste G; Papahadjopoulos D; Vail WJ (1976): Lipid vesicles as carriers for introducing biologically active materials into cells. In: *Methods in cell biology* 14, S. 33–71.
- Postic C; Girard J (2008): Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance. Lessons from genetically engineered mice. In: *The Journal of clinical investigation* 118 (3), S. 829–838.
- Promrat K; Kleiner DE; Niemeier HM; Jackvony E; Kearns M; Wands JR; Fava JL; Wing RR (2010): Randomized controlled trial testing the effects of weight loss on nonalcoholic steatohepatitis. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 51 (1), S. 121–129.
- Qin L-X; Tang Z-Y (2002): The prognostic molecular markers in hepatocellular carcinoma. In: *World journal of gastroenterology* 8 (3), S. 385–392.
- Ratzliff V; Goodman Z; Sanyal A (2015): Current efforts and trends in the treatment of NASH. In: *Journal of hepatology* 62 (1 Suppl), S65-75.

- Reid DT; Reyes JL; McDonald BA; Vo T; Reimer RA; Eksteen B (2016): Kupffer Cells Undergo Fundamental Changes during the Development of Experimental NASH and Are Critical in Initiating Liver Damage and Inflammation. In: *PloS one* 11 (7), e0159524.
- Romeo S; Kozlitina J; Xing C; Pertsemlidis A; Cox D; Pennacchio LA; Boerwinkle E; Cohen JC; Hobbs HH (2008): Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. In: *Nature genetics* 40 (12), S. 1461–1465.
- Ruschke K; Illes M; Kern M; Klötting I; Fasshauer M; Schön MR; Kosacka J; Fitzl G; Kovacs P; Stumvoll M; Blüher M; Klötting N (2010): Repin1 maybe involved in the regulation of cell size and glucose transport in adipocytes. In: *Biochemical and biophysical research communications* 400 (2), S. 246–251.
- Samad A; Sultana Y; Aqil M (2007): Liposomal drug delivery systems: an update review. In: *Current drug delivery* 4 (4), S. 297–305.
- Santiago-Rolón A; Purcell D; Rosado K; Toro DH (2015): A Comparison of Brunt's Criteria, the Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Activity Score (NAS), and a Proposed NAS Scoring that Includes Fibrosis in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Staging. In: *Puerto Rico health sciences journal* 34 (4), S. 189–194.
- Sanyal AJ; Chalasani N; Kowdley KV; McCullough A; Diehl AM; Bass NM; Neuschwander-Tetri BA; Lavine JE; Tonascia J; Unalp A; van Natta M; Clark J; Brunt EM; Kleiner DE; Hoofnagle JH; Robuck PR (2010): Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis. In: *The New England journal of medicine* 362 (18), S. 1675–1685.
- Schaffer JE (2003): Lipotoxicity. When tissues overeat. In: *Current opinion in lipidology* 14 (3), S. 281–287.
- Schleicher J; Guthke R; Dahmen U; Dirsch O; Holzhuetter HG; Schuster S (2014): A theoretical study of lipid accumulation in the liver-implications for nonalcoholic fatty liver disease. In: *Biochimica et biophysica acta* 1841 (1), S. 62–69.
- Schnabl B; Brenner DA (2014): Interactions between the intestinal microbiome and liver diseases. In: *Gastroenterology* 146 (6), S. 1513–1524.
- Schon H-T; Weiskirchen R (2014): Immunomodulatory effects of transforming growth factor- $\beta$  in the liver. In: *Hepatobiliary surgery and nutrition* 3 (6), S. 386–406.
- Schwimmer JB; Celedon MA; Lavine JE; Salem R; Campbell N; Schork NJ; Shieh-morteza M; Yokoo T; Chavez A; Middleton MS; Sirlin CB (2009): Heritability of nonalcoholic fatty liver disease. In: *Gastroenterology* 136 (5), S. 1585–1592.
- Seki E; Schwabe RF (2015): Hepatic inflammation and fibrosis: functional links and key pathways. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 61 (3), S. 1066–1079.
- Senior JH (1987): Fate and behavior of liposomes in vivo: a review of controlling factors. In: *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems* 3 (2), S. 123–193.
- Shi H; Kokoeva MV; Inouye K; Tzamelis I; Yin H; Flier JS (2006): TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. In: *The Journal of clinical investigation* 116 (11), S. 3015–3025.
- Silence Therapeutics (02.2015): investor presentation february 2015. Online verfügbar unter <https://www.silence-therapeutics.com/media/1264/february-2015-investor-presentation.pdf>.
- Silverstein RL (2009): Inflammation, atherosclerosis, and arterial thrombosis. Role of the scavenger receptor CD36. In: *Cleveland Clinic journal of medicine* 76 Suppl 2, S27-30.
- Silverstein RL; Febbraio M (2009): CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior. In: *Science signaling* 2 (72), re3.

- Simopoulos AP (2008): The omega-6/omega-3 fatty acid ratio, genetic variation, and cardiovascular disease. In: *Asia Pacific journal of clinical nutrition* 17 Suppl 1, S. 131–134.
- Sioud M (2005): Induction of inflammatory cytokines and interferon responses by double-stranded and single-stranded siRNAs is sequence-dependent and requires endosomal localization. In: *Journal of molecular biology* 348 (5), S. 1079–1090.
- Son N-H; Basu D; Samovski D; Pietka TA; Peche VS; Willecke F; Fang X; Yu S-Q; Scerbo D; Chang HR; Sun F; Bagdasarov S; Drosatos K; Yeh ST; Mullick AE; Shoghi KI; Gumaste N; Kim K; Huggins L-A; Lhakhang T; Abumrad NA; Goldberg IJ (2018): Endothelial cell CD36 optimizes tissue fatty acid uptake. In: *The Journal of clinical investigation* 128 (10), S. 4329–4342.
- Song Z; Xia H; Yang L; Wang S; Sun G (2018): Lowering the n-6/n-3 PUFAs ratio inhibits the formation of THP-1 macrophage-derived foam cell. In: *Lipids in health and disease* 17 (1), S. 125.
- Sookoian S; Pirola CJ (2011): Meta-analysis of the influence of I148M variant of patatin-like phospholipase domain containing 3 gene (PNPLA3) on the susceptibility and histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 53 (6), S. 1883–1894.
- Srinivasan K; Viswanad B; Asrat L; Kaul CL; Ramarao P (2005): Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening. In: *Pharmacological research* 52 (4), S. 313–320.
- Su X; Abumrad NA (2009): Cellular fatty acid uptake: a pathway under construction. In: *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 20 (2), S. 72–77.
- Szebeni J (2005): Complement activation-related pseudoallergy: a new class of drug-induced acute immune toxicity. In: *Toxicology* 216 (2-3), S. 106–121.
- Szebeni J; Moghimi SM (2009): Liposome triggering of innate immune responses: a perspective on benefits and adverse reactions. In: *Journal of liposome research* 19 (2), S. 85–90.
- Takeishi T; Hirano K; Kobayashi T; Hasegawa G; Hatakeyama K; Naito M (1999): The role of Kupffer cells in liver regeneration. In: *Archives of histology and cytology* 62 (5), S. 413–422.
- Tanious FA; Veal JM; Buczak H; Ratmeyer LS; Wilson WD (1992): DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) binds differently to DNA and RNA. Minor-groove binding at AT sites and intercalation at AU sites. In: *Biochemistry* 31 (12), S. 3103–3112.
- Targher G; Bertolini L; Padovani R; Rodella S; Tessari R; Zenari L; Day C; Arcaro G (2007): Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and its association with cardiovascular disease among type 2 diabetic patients. In: *Diabetes care* 30 (5), S. 1212–1218.
- Taroncher-Oldenburg G; Marshall A (2007): Trends in biotech literature 2006. In: *Nature biotechnology* 25 (9), S. 961.
- Tay Y-C; Wang Y; Kairaitis L; Rangan GK; Zhang C; Harris DC (2005): Can murine diabetic nephropathy be separated from superimposed acute renal failure? In: *Kidney international* 68 (1), S. 391–398.
- Tilg H; Diehl AM (2000): Cytokines in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. In: *The New England journal of medicine* 343 (20), S. 1467–1476.
- Torchilin VP (2014): Multifunctional, stimuli-sensitive nanoparticulate systems for drug delivery. In: *Nature reviews. Drug discovery* 13 (11), S. 813–827.
- Toriguchi K; Hatano E; Tanabe K; Takemoto K; Nakamura K; Koyama Y; Seo S; Taura K; Uemoto S (2014): Attenuation of steatohepatitis, fibrosis, and carcinogenesis in mice fed a methionine-choline deficient diet by CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein deficiency. In: *Journal of gastroenterology and hepatology* 29 (5), S. 1109–1118.

- Tseng Y-C; Mozumdar S; Huang L (2009): Lipid-based systemic delivery of siRNA. In: *Advanced drug delivery reviews* 61 (9), S. 721–731.
- Uehara T; Pogribny IP; Rusyn I (2014): The DEN and CCl<sub>4</sub> -Induced Mouse Model of Fibrosis and Inflammation-Associated Hepatocellular Carcinoma. In: *Current protocols in pharmacology* 66, 14.30.1-10.
- Van der Windt DJ; Sud V; Zhang H; Varley PR; Goswami J; Yazdani HO; Tohme S; Loughran P; O'Doherty RM; Minervini MI; Huang H; Simmons RL; Tsung A (2018): Neutrophil extracellular traps promote inflammation and development of hepatocellular carcinoma in nonalcoholic steatohepatitis. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 68 (4), S. 1347–1360.
- Vanheule E; Geerts AM; van Huysse J; Schelfhout D; Praet M; van Vlierberghe H; Vos M de; Colle I (2008): An intravital microscopic study of the hepatic microcirculation in cirrhotic mice models: relationship between fibrosis and angiogenesis. In: *International journal of experimental pathology* 89 (6), S. 419–432.
- Vesselinovitch SD; Mihailovich N (1983): Kinetics of diethylnitrosamine hepatocarcinogenesis in the infant mouse. In: *Cancer research* 43 (9), S. 4253–4259.
- Vilar-Gomez E; Martinez-Perez Y; Calzadilla-Bertot L; Torres-Gonzalez A; Gra-Oramas B; Gonzalez-Fabian L; Friedman SL; Diago M; Romero-Gomez M (2015): Weight Loss Through Lifestyle Modification Significantly Reduces Features of Nonalcoholic Steatohepatitis. In: *Gastroenterology* 149 (2), S 367-78.e5; quiz e14-5.
- Villeneuve JP; Dagenais M; Huet PM; Roy A; Lapointe R; Marleau D (1996): The hepatic microcirculation in the isolated perfused human liver. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 23 (1), S. 24–31.
- Vinciguerra M; Veyrat-Durebex C; Moukil MA; Rubbia-Brandt L; Rohner-Jeanrenaud F; Foti M (2008): PTEN down-regulation by unsaturated fatty acids triggers hepatic steatosis via an NF-kappaBp65/mTOR-dependent mechanism. In: *Gastroenterology* 134 (1), S. 268–280.
- Waal Malefyt R de; Abrams J; Bennett B; Figdor CG; Vries JE de (1991): Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes. An autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. In: *The Journal of experimental medicine* 174 (5), S. 1209–1220.
- Wanless IR; Lentz JS (1990): Fatty liver hepatitis (steatohepatitis) and obesity. An autopsy study with analysis of risk factors. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 12 (5), S. 1106–1110.
- Welsh JA; Karpen S; Vos MB (2013): Increasing prevalence of nonalcoholic fatty liver disease among United States adolescents, 1988-1994 to 2007-2010. In: *The Journal of pediatrics* 162 (3), 496-500.e1.
- West M; Savage Y (1988): Coping with stress in health visiting. In: *Health visitor* 61 (12), S. 366–368.
- Wilson CL; Jurk D; Fullard N; Banks P; Page A; Luli S; Elsharkawy AM; Gieling RG; Chakraborty JB; Fox C; Richardson C; Callaghan K; Blair GE; Fox N; Lagnado A; Passos JF; Moore AJ; Smith GR; Tiniakos DG; Mann J; Oakley F; Mann DA (2015): NFκB1 is a suppressor of neutrophil-driven hepatocellular carcinoma. In: *Nature communications* 6, S. 6818.
- Younossi ZM; Blissett D; Blissett R; Henry L; Stepanova M; Younossi Y; Racila A; Hunt S; Beckerman R (2016): The economic and clinical burden of nonalcoholic fatty liver disease in the United States and Europe. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 64 (5), S. 1577–1586.
- Zhao L; Zhang C; Luo X; Wang P; Zhou W; Zhong S; Xie Y; Jiang Y; Yang P; Tang R; Pan Q; Hall AR; Luong TV; Fan J; Varghese Z; Moorhead JF; Pinzani M; Chen Y; Ruan XZ (2018): CD36 palmitoylation disrupts free fatty acid metabolism and promotes tissue inflammation in non-alcoholic steatohepatitis. In: *Journal of hepatology* 69 (3), S. 705–717.

## 10 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

- Abb. 1 Schematische Darstellung der NAFLD und deren Unterformen
- Abb. 2 A) Makroskopische Aufnahmen des Lebergewebes innerhalb des NASH-Fibrose-Tumor Mausmodells zu verschiedenen Zeitpunkten  
B) Mikroskopische Ansicht der Leberpräparate in Hämatoxylin-Eosin-Färbung, zu selbigen Zeitpunkten
- Abb. 3 Schematische Darstellung der Defizienz von Repin1 auf einen 3T3L1-Adipozyten
- Abb. 4 A) Schematischer Aufbau eines siRNA-Moleküls  
B) Darstellung des Wirkmechanismus der siRNA vermittelten RNAi
- Abb. 5 A) Schematischer Aufbau eines siRNA-Lipoplexes  
B) Organspezifische Verteilung des Liposomen-siRNA-Komplexes in vivo  
C) Molekülgröße eines Vorläufer-Lipoplexes
- Abb. 6 Studienmodell: Leberspezifisches Silencing von Repin 1 in der steatotischen Leber
- Abb. 7 Graphische Darstellung des Studienteils III
- Abb. 8 Technische Darstellung der Auflichtfluoreszenz-Mikroskopie
- Abb. 9 Technische Umsetzung der Intravitalmikroskopie
- Abb. 10 A) Intravitalmikroskopische Aufnahme des perfundierten Lebergewebes  
B) Darstellung der im Lebergewebe akkumulierten RNA-Lipoplex-Formulierung durch Auflichtfluoreszenz
- Abb. 11 Intravitalmikroskopische Aufnahmen nach Applikation der RNA-Lipoplex-Formulierung zum Zeitpunkt 1h, 4h, und 24h post injectionem
- Abb. 12 Repräsentative DAPI-gefärbte Semidünnschnitte der Leber nach Applikation der RNA-Lipoplex-Formulierung
- Abb. 13 Repräsentative DAPI-gefärbte Semidünnschnitte nach Applikation der RNA-Lipoplex-Formulierung, zum Vergleich zwischen gesunden Tieren und Tieren aus dem NASH-Fibrose-HCC Modell
- Abb. 14 Quantitative Analyse der Anreicherung des CY-3 Farbstoffes im Lebergewebe zu verschiedenen Zeitpunkten post tranfectionem
- Abb. 15 Expressionslevel von Repin1 nach Injektion von CMD-siRepin1
- Abb. 16 Relativen mRNA Expression von Repin1 im Verhältniss zu GAPDH
- Abb. 17 Graphische Darstellung der Veränderung des Körpergewichts innerhalb des Therapiezeitraumes
- Abb. 18 Leber-/Körpergewichts-Index zum Zeitpunkt der finalen Gewebeasservierung
- Abb. 19 Graphische Darstellung des Blutzuckerverlaufs

- Abb. 20 Plasma-Triglyzeridlevel zum Zeitpunkt der finalen Gewebeasservierung
- Abb. 21. ALT-Aktivität im Plasma der Versuchstiere zum Zeitpunkt der finalen Gewebeasservierung
- Abb. 22 NAFLD-Activity Score zum Zeitpunkt der finalen Gewebeasservierung
- Abb. 23 HE gefärbte Leber-Semidünnschnitten zum Zeitpunkt der finalen Gewebeasservierung
- Abb. 24 Quantitative Darstellung der durch den Azofarbstoff Oil-Red-O markierten Gewebes zum Zeitpunkt der finalen Gewebeasservierung
- Abb. 25 Oil-Red-O gefärbte Leber-Semidünnschnitte
- Abb. 26 Schematische Darstellung der einfach- ungesättigten Ölsäure
- Abb. 27 Quantitative Aufschlüsselung verschiedener gesättigter Fettsäuren zum Zeitpunkt der finalen Gewebeasservierung
- Abb. 28 Summe der gesättigten Fettsäuren zum Zeitpunkt der finalen Gewebeasservierung
- Abb. 29 Quantitative Aufschlüsselung verschiedener einfach- ungesättigte Fettsäuren zum Zeitpunkt der finalen Gewebeasservierung
- Abb. 30 Summe der einfach-ungesättigten Fettsäuren zum Zeitpunkt der finalen Gewebeasservierung
- Abb. 31 Quantitative Aufschlüsselung verschiedener mehrfach- ungesättigter Fettsäuren zum Zeitpunkt der finalen Gewebeasservierung
- Abb. 32 Summe der mehrfach-ungesättigten Fettsäuren zum Zeitpunkt der finalen Gewebeasservierung
- Abb. 33 Verhältnis von n-6- zu n-3-Fettsäuren zum Zeitpunkt der finalen Gewebeasservierung
- Abb. 34 Relative mRNA Expression von CD36 im Verhältniss zu GAPDH. Entnahme nach 14 tägiger Behandlung
- Abb. 35. CAE-positive Zellen zum Zeitpunkt der finalen Gewebeasservierung
- Abb. 36 Repräsentative CAE gefärbte Leber-Semidünnschnitte
- Abb. 37 Quantitative Darstellung der durch den Antikörper F4/80 positiv markierten Fläche zum Zeitpunkt der finalen Gewebeasservierung
- Abb. 38 Relative mRNA Expression von F4/80 im Verhältniss zu GAPDH
- Abb. 39 Konzentration der Zytokine IL-1 $\beta$  (links) und IL-18 (rechts) zum Zeitpunkt der finalen Gewebeasservierung
- Abb. 40 Konzentration der Zytokine IL-6 (links) und IL-10 (rechts) zum Zeitpunkt der finalen Gewebeasservierung

|          |  |
|----------|--|
| Abb. 41  | Konzentration der Zytokine TNF- $\alpha$ (links) und TGF- $\beta$ (rechts) zum Zeitpunkt der finalen Gewebeasservierung      |
| Abb. 42  | Konzentration von der Zytokine PDGF- $\beta$ links und MCP rechts  |
| Abb. 43. | Quantitative Darstellung der durch Sirius-Red positiv markierten Fläche zum Zeitpunkt der finalen Gewebeasservierung         |
| Abb. 44  | Repräsentative Sirius Red gefärbte Leber-Semidünnschnitte  |
| Abb. 45  | Relative mRNA Expression von Col1a im Verhältniss zu GAPDH   |
| Abb. 46. | Quantitative Darstellung der durch PCNA positiv markierten Hepatozyten zum Zeitpunkt der finalen Gewebeasservierung          |
| Abb. 47. | Quantitative Darstellung der durch PCNA positiv markierten Nichtparenchymzellen zum Zeitpunkt der finalen Gewebeasservierung |
| Abb. 48  | Repräsentative PCNA markierte Leber-Semidünnschnitte   |
| Tab. 1   | Auflistung Ansätze für cDNA-Gewinnung  |
| Tab. 2   | Primer für die RT-PCR  |
| Tab. 3   | Protokoll RT-PCR Reaktion  |
| Tab. 4   | Analyse der im Blutserum enthaltenen systemischen Blutzellzahlen   |
| Tab. 5   | Analyse der im Gewebe asservierten Lipidklassen  |

## **11 Danksagung**

Für die Möglichkeit am Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie zu promovieren, möchte ich mich in erster Linie bei Frau Prof. Dr. med. Brigitte Volmar bedanken. Als Institutsdirektorin schafft sie mit einem großen Maß an Engagement und Kompetenz optimale Bedingungen für herausragende Forschung.

Gleichermaßen möchte mich bei meiner Betreuerin, Frau Dr. rer. nat. Kerstin Abshagen, bedanken. Als Hauptansprechpartnerin und Arbeitsgruppenleiterin begleitete sie mich durch alle Phasen der Promotion, wusste mich stets zu motivieren und stand mir bei jeglicher Art von Fragen und Problemen geduldig zur Seite.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern für die tatkräftige Unterstützung und Hilfestellung im jeweiligen Fachgebiet. Für die reibungslose technische Umsetzung gilt mein besonderer Dank Berit Blendow, Dorothea Frenz, Eva Lorbeer, Ilona Klammfuß, Mareike Degner, Maren Nerowski und Dr. rer. hum. Marie Liebig. Des Weiteren möchte ich mich für den professionellen und liebevollen Umgang mit meinen Versuchstieren bei allen Tierpflegern des Institutes bedanken.

Weiterhin danke ich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, Susanne und Hermann Fischer, die seit meinem „ersten Tag“ stets an meiner Seite standen und mich in meinem Handeln stärkten und förderten. Mein Dank gilt ebenfalls meinem Laborpartner und guten Freund Lars Mense, mit dem ich mich in das „Abenteuer“ der Promotion begab und mit dem ich die vielen Stunden im Institut teilte.

## 12 Lebenslauf

### Persönliche Daten

---

|               |                               |
|---------------|-------------------------------|
| Name          | Felix Fischer                 |
| Geburtsdatum  | 26.11.1991                    |
| Geburtsort    | Marl                          |
| Familienstand | ledig                         |
| Anschrift     | Herderstraße 8, 80639 München |

### Schulische Bildung

---

|                       |   |
|-----------------------|---|
| 01.08.2002-01.07.2011 | Besuch des Albert-Schweitzer-/Geschwister-Scholl-Gymnasiums in Marl (NRW)<br>Abschluss 2011: Abitur |
|-----------------------|---|

### Studium der Humanmedizin

---

|                         |   |
|-------------------------|---|
| vorklinischer Abschnitt | Georg-August-Universität Göttingen WS11-SS13<br>bestandener erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung<br>September 2013   |
| klinischer Abschnitt    | Universität Rostock WS 13- WS17<br>Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung/M2 und<br>Beginn des Praktischen Jahres November 2016<br>Abschluss des Medizinstudiums/M3 November 2017 |

### Promotion

---

|           |   |
|-----------|---|
| seit 2015 | Doktorand am Institut für Experimentelle Chirurgie<br>der Universität Rostock<br>Direktor: Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar<br>Thema: „Leberspezifisches Silencing von Repin1 in<br>der steatotischen Leber“ |
|-----------|---|

### Publikation

---

|      |  |
|------|--|
| 2019 | Abshagen K; Mense L; <u>Fischer F</u> ; Liebig M; et al.<br>(2019):<br><i>Repin1 deficiency in liver tissue alleviates NAFLD<br/>progression in mice. In: Journal of Advanced<br/>Research 16, S. 99–111</i> |
|------|--|

### Beruflicher Werdegang

---

|                 |  |
|-----------------|--|
| seit 01.03.2018 | Arzt in Weiterbildung für Orthopädie und<br>Unfallchirurgie<br>Krankenhaus der Barmherzigen Brüder München<br>CA. Prof. Dr.med. W. Plötz |
| seit 01.09.2020 | Beginn einjährige unfallchirurgische Rotation im<br>Kreisklinikum Ebersberg<br>CA Dr. med. A. Klaiber                                    |

### Sonstiges

---

|           |  |
|-----------|--|
| seit 2020 | Engagement in der Leichtathletik (Athlet und<br>Kampfrichter), ehemals Mitglied im Landeskader<br>NRW (400m Hürden), mehrfache Teilnahme an<br>nationalen Meisterschaften<br>Ärztliche Betreuung Koronarsportgruppe SV<br>Waldeck Obermenzing e.V. |
|-----------|--|

### **13 Selbständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Leberspezifisches Silencing von Repin1 in der steatotischen Leber“ selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt zu haben. Die den benutzten Werken sinngemäß oder wörtlich entnommene Stellen sind als solche gekennzeichnet. Darüber hinaus wurden keine Materialien oder Quellen verwendet, die nicht als solche kenntlich gemacht wurden.

Weiterhin versichere ich, dass diese Dissertation weder zum jetzigen noch zu einem früheren Zeitpunkt an der Universität Rostock oder einer anderen Hochschule zur Eröffnung eines Promotionsverfahrens eingereicht wurde.

München, den 27.05.2021

Felix Fischer