

# **Untersuchungen zur Rolle der langen nicht-codierenden RNA *NEAT1* in Zellkultur- und *in vivo*-Modellen der metabolischen Dysfunktionsassoziierten Lebererkrankung (MASLD)**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg,

vorgelegt von

Frau Lisa Ahne

verteidigt am 12.12.2025





Erstgutachter: Prof. Dr. Sonja M. Keßler

Zweitgutachter: Prof. Dr. Gabriele Stangl

Drittgutachter: Prof. Dr. Pavel Strnad



# I. Inhaltsverzeichnis

<b>I.</b>	<b><i>Inhaltsverzeichnis</i></b> .....	<b><i>I</i></b>
<b>II.</b>	<b><i>Abkürzungsverzeichnis</i></b> .....	<b><i>VI</i></b>
<b>III.</b>	<b><i>Abbildungsverzeichnis</i></b> .....	<b><i>IX</i></b>
<b>IV.</b>	<b><i>Tabellenverzeichnis</i></b> .....	<b><i>XI</i></b>
<b>V.</b>	<b><i>Zusammenfassung</i></b> .....	<b><i>XII</i></b>
<b>1.</b>	<b><i>Einleitung</i></b> .....	<b><i>1</i></b>
<b>1.1</b>	<b>MASLD</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>Die lange nicht-codierende RNA (lncRNA) <i>NEAT1</i></b> .....	<b>4</b>
1.2.1	lncRNAs allgemein .....	4
1.2.2	Eigenschaften von <i>NEAT1</i> .....	6
<b>1.3</b>	<b><i>NEAT1</i> in MASLD</b> .....	<b>8</b>
<b>1.4</b>	<b>Modellierung von MASH: Die Methionin-Cholin-defiziente Diät</b> .....	<b>8</b>
<b>1.5</b>	<b>Zielsetzung</b> .....	<b>10</b>
<b>2.</b>	<b><i>Material und Methoden</i></b> .....	<b><i>11</i></b>
<b>2.1</b>	<b>Material</b> .....	<b>11</b>
2.1.1	Puffer und Medien .....	11
2.1.2	Geräte und Software .....	13
<b>2.2</b>	<b>Tierexperimente</b> .....	<b>14</b>
2.2.1	<i>NEAT1</i> in MASH (MCD-Diät) .....	14
2.2.2	MCD-Diät mit Kupferzell-Depletion .....	19
2.2.3	HFD-Diät .....	19
<b>2.3</b>	<b>Isolation primärer muriner Leberzellen</b> .....	<b>19</b>
2.3.1	Kollagenisierung der Zellkulturschalen .....	19
2.3.2	Perfusion der Leber .....	19
2.3.3	Hepatozytenisolierung .....	20
2.3.4	Kultivierung der Primärzellen .....	21
<b>2.4</b>	<b>Zellkultur</b> .....	<b>21</b>
2.4.1	Zelllinien .....	21
2.4.2	Kultivierung .....	22

## Inhaltsverzeichnis

2.4.3 Subkultivierung.....	22
2.4.4 Kryokonservierung .....	22
2.4.5 Bestimmung der Viabilität und Zellzahl.....	22
2.4.6 Mykoplasmen PCR.....	23
<b>2.5 Zellkulturversuche- Transfektionen .....</b>	<b>24</b>
2.5.1 <i>NEAT1</i> -Knockdown .....	24
2.5.2 siRNA-HuR/ELAVL1-Knockdown .....	28
2.5.3 HuR/ELAVL1 Überexpression.....	29
2.5.4 TTP/ZFP36 Überexpression .....	29
<b>2.6 Zellkulturversuche- Substanzbehandlungen .....</b>	<b>30</b>
2.6.1 <i>In Vitro</i> MASLD Modelle .....	30
2.6.2 EZH2-Inhibitor GSK126 .....	31
2.6.3 Actinomycin D-Assay .....	32
<b>2.7 Co-Kultur .....</b>	<b>33</b>
<b>2.8 Bakterienkultur .....</b>	<b>33</b>
2.8.1 Kompetente Bakterien .....	33
2.8.2 Klonierung von DNA-Fragmenten.....	33
2.8.3 Transformation.....	34
<b>2.9 Plasmide.....</b>	<b>34</b>
2.9.1 Plasmid-Analyse.....	34
2.9.2 <i>NEAT1</i> -Knockout-Plasmide (CRISPR Cas).....	35
2.9.3 HuR/ELAVL1-Überexpressionsplasmid .....	35
2.9.4 TTP/ZFP36-Überexpressionsplasmid .....	35
2.9.5 qPCR-Standard-Plasmide .....	36
<b>2.10 DNA-Isolierung .....</b>	<b>36</b>
2.10.1 Isolierung bakterieller DNA .....	36
2.10.2 Bestimmung der DNA-Konzentrationen .....	36
2.10.3 Isolierung von DNA aus Zelllinien .....	36
<b>2.11 Agarosegelelektrophorese.....</b>	<b>37</b>
2.11.1 Auftrennung und Visualisierung von DNA .....	37
2.11.2 Auftrennung und Visualisierung von RNA .....	37
<b>2.12 RNA-Isolierung and reverse Transkription.....</b>	<b>38</b>
2.12.1 RNA-Isolierung.....	38
2.12.2 DNA-Verdau.....	39
2.12.3 Bestimmung der RNA-Konzentration .....	39

## Inhaltsverzeichnis

2.12.4 Alu-PCR .....	40
2.12.5 RNA-Integrität.....	41
2.12.6 Reverse Transkription.....	42
<b>2.13 qPCR .....</b>	<b>43</b>
2.13.1 Versuchsdurchführung .....	43
2.13.2 Quantifizierung .....	44
2.13.3 Primer-Sequenzen .....	44
2.13.4 Standardreihen .....	47
<b>2.14 Western Blot.....</b>	<b>48</b>
2.14.1 Probenvorbereitung .....	48
2.14.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	49
2.14.3 Blotting .....	50
2.14.4 Immundetektion .....	50
<b>2.15 Leberhistologie und quantitative Bewertungssysteme .....</b>	<b>50</b>
2.15.1 Immunhistochemie F4/80 .....	52
<b>2.16 Lipidom- Analyse des Fettsäureprofils.....</b>	<b>53</b>
2.16.1 Zellkultur.....	53
2.16.2 Tierversuch .....	53
2.16.3 Lipidomanalyse: LINEX <sup>2</sup> .....	54
2.16.4 Lipidomanalyse: MoSBi.....	54
<b>2.17 Hydroxyprolin .....</b>	<b>56</b>
<b>2.18 RNA-Immunpräzipitation (RIP) .....</b>	<b>56</b>
<b>2.19 Mikroskopie.....</b>	<b>57</b>
2.19.1 Stellaris™ RNA Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung und Immunfluoreszenz.....	57
2.19.2 Nilrot-Färbung .....	58
<b>2.20 RNA-Sequenzierung und Datenanalyse .....</b>	<b>59</b>
2.20.1 Tierversuch .....	59
2.20.2 Zellkultur.....	60
2.20.3 Datenanalyse: Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) .....	60
<b>2.21 Statistik.....</b>	<b>61</b>
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>62</b>
<b>3.1 NEAT1 in MASLD und MASH.....</b>	<b>62</b>
3.1.1 Humane Leberbiopsien.....	62
3.1.2 Humane <i>in vitro</i> MASLD Modelle .....	63

## Inhaltsverzeichnis

3.1.3 Murine <i>in vivo</i> MASLD Modelle .....	67
3.1.4 Murines <i>in vitro</i> MASLD Modell.....	69
<b>3.2 Die Rolle von <i>NEAT1</i> in MASH (MCD-Diät) .....</b>	<b>69</b>
3.2.1 <i>Neat1</i> -Expression .....	70
3.2.2 Allgemeine Effekte der Diät und Serumparameter .....	71
3.2.3 Steatose- <i>Neat1</i> -KO verändert die hepatische Lipidzusammensetzung .....	78
3.2.4 Inflammation- Reduzierte Entzündungsaktivität in den Lebern von <i>Neat1</i> -KO-Mäusen nach MCD-Diät .....	100
3.2.5 Fibrose- <i>Neat1</i> -KO mildert die Ausbildung einer Leberfibrose bei MCD-Diät durch verminderte Kollagenablagerung .....	104
3.2.6 Signalweg <i>Neat1</i> - Ezh2- Smad7- Ctgf.....	109
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>115</b>
<b>4.1 Die Rolle von <i>NEAT1</i> in MASLD und MASH.....</b>	<b>115</b>
4.1.1 <i>In vivo</i> und <i>in vitro</i> MASLD Modelle .....	115
4.1.2 Effekte der MCD-Diät .....	118
4.1.3 Steatose und Lipidom.....	120
4.1.4 Inflammation .....	121
4.1.5 Fibrose .....	123
4.1.6 Signalweg <i>Neat1</i> - Ezh2- Smad7- Ctgf.....	124
<b>5. Schlussfolgerung und Fazit .....</b>	<b>126</b>
<b>6. Limitationen und Ausblick .....</b>	<b>127</b>
6.1 Eingeschränktes MASLD-Modell .....	127
6.2 Mangel an translationalen Modellen .....	127
6.3 Signalweg Analyse .....	127
6.4 Geschlechtsspezifische Unterschiede.....	127
6.5 Therapeutisches Potential von lncRNAs.....	128
<b>7. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>129</b>
<b>8. Anhang .....</b>	<b>139</b>
I. <b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>139</b>
II. <b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>139</b>
III. <b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>140</b>
<b>8.1 Methoden .....</b>	<b>141</b>

## Inhaltsverzeichnis

<b>8.2 Humane <i>in vitro</i> MASLD Modelle .....</b>	<b>149</b>
<b>8.3 Murine <i>in vitro</i> Modelle .....</b>	<b>155</b>
<b>8.4 <i>NEAT1</i> in MASH (MCD-Diät) .....</b>	<b>157</b>
<b>8.5 Untersuchung der Regulation von <i>NEAT1</i> durch RNA-bindende Proteine (RBP) .....</b>	<b>184</b>
8.5.1 Einleitung.....	184
8.5.2 RNA-Immunpräzipitationen von HuR/ELAVL1 und TTP/ZFP36.....	185
8.5.3 Knockdown- und Überexpressionsexperimente .....	187
8.5.4 RNA-Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (RNA-FISH) .....	190
8.5.5 Diskussion .....	198
<b>9. Lebenslauf .....</b>	<b>200</b>
<b>10. Publikationen.....</b>	<b>202</b>
10.1 Publikationen in Fachzeitschriften: .....	202
10.2 Vortrag und Poster.....	202
<b>11. Erklärung zur Verwendung generativer künstlicher Intelligenz (KI) und KI-gestützter Technologien: Eigenständigkeitserklärung &amp; werkzeugorientierte Dokumentation.....</b>	<b>203</b>
<b>12. Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>204</b>
<b>13. Danksagungen .....</b>	<b>205</b>



## II. Abkürzungsverzeichnis

[v/v]	Volumenprozent
μ	micro (10 <sup>-6</sup> )
A	Ampere
<i>ad</i>	lat.: bis zu
<i>ad libitum</i>	lat.: nach Belieben
ALT	Alanin-Aminotransferase
ANOVA	Varianzanalyse (engl.: analysis of variance)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AST	Aspartat-Aminotransferase
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	komplementäre DNA (engl.: copy DNA)
Ct	Zyklusschwellenwert (engl.: cycle threshold)
Ccl2	CC-Chemokin-Ligand-2
Ccn2	Engl.: cellular communication network factor 2
Chrebp	Engl.: carbohydrate responsive element binding protein
clo	Clodronat-Liposomen
Col1a1	Engl.: collagen, type I, alpha 1
Col1a2	Engl.: collagen, type I, alpha 2
Col3a1	Engl.: collagen, type III, alpha 1
Cpt1a	Carnitin-Acyltransferase 1 (engl.: carnitine palmitoyl transferase)
Ctgf	Engl.: connective tissue growth factor
ctrl	Kontrolle (engl.: control)
CRISPR	Engl.: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
ddH <sub>2</sub> O	Bidestilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DG	Diglyceride
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: deoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (engl.: ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid)
Elovl6	Fettsäure-Elongase (engl.: ELOVL fatty acid elongase 6)
Emr1	Engl.: egf-like module containing, mucin-like, hormone receptor like 1 (F4/80)
et al.	Lat.: et altera (dt.: und andere)

## Abkürzungsverzeichnis

FAME	Fettsäuremethylester (engl.: fatty acid methyl ester)
Fasn	Fettsäuresynthase (engl.: fatty acid synthase)
FCS	Fetales Kälberserum (engl.: fetal calf serum)
FFA	Freie Fettsäuren (engl.: free fatty-acids)
FW	Vorwärts (engl.: forward)
× <i>g</i>	Erdbeschleunigung
g	Gramm
H <sub>2</sub> O	Wasser
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl) -1-piperaziny) -ethansulfonsäure
HFD	Hoch-Fett-Diät (engl.: High-fat-diet)
Hmgcr	HMG-CoA-Reduktase (engl.: 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase)
I.E.	Internationale Einheit
IL	Interleukin
<i>in vitro</i>	Lat.: im Glas
<i>in vivo</i>	Lat.: im Lebendigen
l	Liter
KHK-A	Ketohexokinase-A
KO	„außer Gefecht setzen“ / abschalten (engl.: knockout)
LB	Engl.: lysogeny broth
LINEX	Lipid Network Explorer
LPS	Lipopolysaccharid(e)
m	milli (10 <sup>-3</sup> )
M	Molar
MASLD	Metabolische Dysfunktion-assoziierte steatotische Lebererkrankung (engl.: metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease)
MASH	Metabolische Dysfunktion-assoziierte Steatohepatitis (engl.: metabolic dysfunction-associated steatohepatitis)
Mcp-1	Monozyten-chemotaktisches Protein 1
mRNA	Boten-RNA (engl.: messenger RNA)
Mobi H <sub>2</sub> O	Wasser für molekularbiologische Zwecke
MW	Molekulargewicht (engl.: molecular weight)
n	nano (10 <sup>-9</sup> )
n	Anzahl der Versuche oder Tiere (engl.: numbers)
NAFLD	Nichtalkoholische Fettlebererkrankung (engl.: non-alcoholic fatty liver disease)
NASH	Nichtalkoholische Steatohepatitis (engl.: non-alcoholic steatohepatitis)
NF-κB	Engl.: nuclear factor kappa B
PA	Phosphatidsäure / Palmitinsäure
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl.: phosphate buffered saline)
Pen/Strep	Penicillin-Streptomycin

## Abkürzungsverzeichnis

PFA	Paraformaldehyd
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
qPCR	quantitative Echtzeit Polymerase Kettenreaktion (engl.: quantitative real time polymerase chain reaction)
RBP	RNA-bindendes Protein
REV	Rückwärts (engl.: reverse)
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: ribonucleic acid)
RRM	Engl.: RNA recognition motif
RT	Raumtemperatur
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	Engl.: tris-buffered saline
TBST	TBS-Puffer mit Tween 20
TG	Triglyceride
TGF- $\beta$	Transformierender Wachstumsfaktor $\beta$
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
U	Enzymeinheit (engl.: unit)
U/m	Umdrehungen pro Minute
V	Volumen
VLDL	Engl.: very-low-density lipoprotein
WT	Wildtyp

### III. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Unterklassifizierung der steatotischen Lebererkrankung.....	1
Abbildung 2: Progression von steatotischen Lebererkrankungen (adaptiert von Lekakis & Papatheodoridis, 2024) .....	3
Abbildung 3: Einschätzung des Vorkommens von RNA-Klassen (Walter, 2024) .....	5
Abbildung 4: Paraspeckle Organisation und Lokalisation (Mattick et al., 2023) .....	7
Abbildung 5: Verlauf der MCD-Diät .....	9
Abbildung 6: Aufteilung muriner Leberlappen.....	18
Abbildung 7: Anatomische Lage der Gefäße während der Hepatozyten-Isolierung .....	20
Abbildung 8: Strukturformel der Antisense LNA™-Gapmere (Lim und Yokota, 2020) .....	24
Abbildung 9: <i>NEAT1</i> -CRISPR-Cas-Knockout Strategie (Koyama et al., 2020) .....	26
Abbildung 10: Zonen eines Leberläppchens und Distribution der Steatose .....	52
Abbildung 11: Schematische Darstellung des MoSBI Algorithmus (Rose et al., 2022) .....	55
Abbildung 12: <i>NEAT1</i> -Expression humaner Leberbiopsien .....	62
Abbildung 13: Humane <i>in vitro</i> MASLD Modelle .....	64
Abbildung 14: Humane <i>in vitro</i> MASLD-Modelle.....	65
Abbildung 15: <i>Neat1</i> -Expression in Mausmodellen von MASLD und Leberentzündung.....	68
Abbildung 16: Schematische Darstellung der experimentellen Aufarbeitung des Hauptexperiments <i>NEAT1</i> in MASH (MCD-Diät).....	69
Abbildung 17: <i>Neat1</i> -Expressionsanalyse.....	70
Abbildung 18: Gewichtsverlauf während der MCS- und MCD-Diät .....	71
Abbildung 19: Gewichtsveränderungen durch MCS- und MCD- Fütterung .....	72
Abbildung 20: Makroskopische Beobachtungen der Lebern von WT- und KO-Mäusen nach Fütterung mit der MCD-Diät oder der Kontrolldiät MCS.....	73
Abbildung 21: Relatives Lebergewicht .....	74
Abbildung 22: Serumlevel ALT und AST .....	75
Abbildung 23: Serumparameter.....	76
Abbildung 24: Vergleich von pathologisch relevanten Genen in MASLD und MASH bei Mensch und Maus (Vacca et al., 2024) .....	77
Abbildung 25: H&E Färbung der Leberschnitte .....	79
Abbildung 26: Histologische Analyse der Steatose .....	80
Abbildung 27: Lipidkategorien .....	81
Abbildung 28: Lipidklassen des Lipidoms als prozentualer Anteil vom Gesamtlipidom .....	82
Abbildung 29: Lipidom Lipidklassen Analyse.....	83
Abbildung 30: MoSBI (Diät).....	85
Abbildung 31: MoSBI (Genotypen MCD).....	86
Abbildung 32: LINEX <sup>2</sup> .....	87
Abbildung 33: Unterschiede im Gesamtlipidom zwischen WT- und KO-MCD .....	90
Abbildung 34: Analyse der Lipidklassen TG und DG .....	91

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 35: Analyse der Lipidklassen FC und Cer .....	92
Abbildung 36: Analyse der Triglycerid-Spezies .....	93
Abbildung 37: Analyse der Triglycerid-Spezies .....	94
Abbildung 38: Expressionsanalyse lipogener Gene.....	96
Abbildung 39: Expressionsanalyse lipogener Gene.....	98
Abbildung 40: Expressionsanalyse lipogener Gene.....	99
Abbildung 41: Expression inflammatorischer Gene .....	100
Abbildung 42: Histologie - Inflammation.....	101
Abbildung 43: Histologie - Lobuläre Inflammation .....	102
Abbildung 44: Expression der Makrophagenmarker Emr1/F4/80 und Clec4f.....	103
Abbildung 45: Immunhistochemischer Nachweis von F4/80 .....	104
Abbildung 46: Histologische Untersuchung der Fibrose .....	105
Abbildung 47: Histologische Bewertung der Fibrose.....	106
Abbildung 48: Expressionsanalyse der Kollagene .....	108
Abbildung 49: Hydroxyprolin-Assay .....	109
Abbildung 50: GSEA (Hallmark).....	110
Abbildung 51: Entschlüsselung des Signalwegs.....	112
Abbildung 52: <i>NEAT1</i> - <i>EZH2</i> - <i>SMAD7</i> - <i>CTGF</i> -Achse.....	114

## IV. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Puffer und Medien .....	11
Tabelle 2: Geräte .....	13
Tabelle 3: Software .....	13
Tabelle 4: Gruppenübersicht des <i>Neat1</i> -MASH Tierversuchs .....	15
Tabelle 5: Pipettieransatz für die Genotypisierungs-PCR.....	17
Tabelle 6: Primer Genotypisierungs-PCR.....	17
Tabelle 7: Zelllinien .....	21
Tabelle 8: Pipettieransatz für die Mykoplasmen-PCR .....	23
Tabelle 9: Primer Mykoplasmen PCR.....	23
Tabelle 10: LNA <sup>TM</sup> -Gapmere und Kontrollen .....	25
Tabelle 11: Pipettieransatz für die CRISPR-Cas KO PCR.....	27
Tabelle 12: Primer CRISPR-Cas KO PCR.....	27
Tabelle 13: siRNA-Sequenzen.....	28
Tabelle 14: siRNA HuR/ELAVL1.....	28
Tabelle 15: Plattenschema Actinomycin D-Assay .....	32
Tabelle 16: Pipettieransatz Alu-PCR .....	40
Tabelle 17: Pipettieransatz cDNA-Synthese .....	42
Tabelle 18: Temperatureinstellungen für die cDNA-Synthese.....	42
Tabelle 19: Pipettieransatz qPCR .....	43
Tabelle 20: Primer-Sequenzen für die Spezies <i>Mus musculus</i> (Taxid:10090).....	45
Tabelle 21: Primer-Sequenzen für die Spezies Mensch (Taxid:9606) .....	46
Tabelle 22: Pipettieransatz Sammel-und Trenngel der SDS-PAGE.....	49
Tabelle 23: Bewertungssystem der histologischen Untersuchung .....	51
Tabelle 24: Stellaris <sup>TM</sup> RNA FISH Sonden.....	58
Tabelle 25: Antikörper .....	58

## V. Zusammenfassung

MASLD ist die häufigste Lebererkrankung der Welt und die Fallzahlen steigen rasant. Die Progression kann oft bis zu dem hepatozellulären Karzinom fortschreiten, da sowohl Biomarker für eine Früh- und Differentialdiagnostik als auch effiziente Behandlungsmöglichkeiten fehlen. LncRNAs, insbesondere *NEAT1*, werden als potenzielle diagnostische Marker diskutiert. Ziel dieser Arbeit war daher die Untersuchung der Rolle von *NEAT1* in MASLD und der progressiven Form MASH.

Die Expression von *NEAT1* ist in MASLD und MASH erhöht. In dem durch die MCD-Diät induzierten MASH-Modell konnten die Schlüsselkomponenten von MASH, Steatose, Inflammation und Fibrose gut abgebildet werden. Der Knockout von *NEAT1* veränderte die hepatische Lipidzusammensetzung und konnte die induzierte Inflammation und Fibrose abmildern. Es kam zu einer starken Entzündungsreaktion, die durch eingewanderte Immunzellen visualisiert werden konnte. Die Entzündungsreaktion war in den KO-Tieren sowohl histologisch als auch auf Transkriptebene signifikant verringert. Daneben induzierte *NEAT1* die Genexpression fibrogener Regulatoren, die in Zusammenhang mit einer erhöhten Kollagenakkumulation stehen. In den histologischen Untersuchungen zeigte sich eine deutlich geringer ausgeprägte Fibrose unter *NEAT1*-Knockout. Hier war das Level des inhibitorischen Smad7 Proteins erhöht. Es ist davon auszugehen, dass *NEAT1* über die Stabilisierung von EZH2 in der SMAD7 Promotorregion, dessen Aktivität über epigenetische Methylierungen verringert. So könnten durch den fehlenden, inhibitorischen SMAD-Effekt des TGF- $\beta$  Signalwegs, die *CTGF* mRNA Spiegel ansteigen und über eine Aktivierung von hepatischen Sternzellen mehr Kollagen und folglich extrazelluläre Matrix produziert werden.

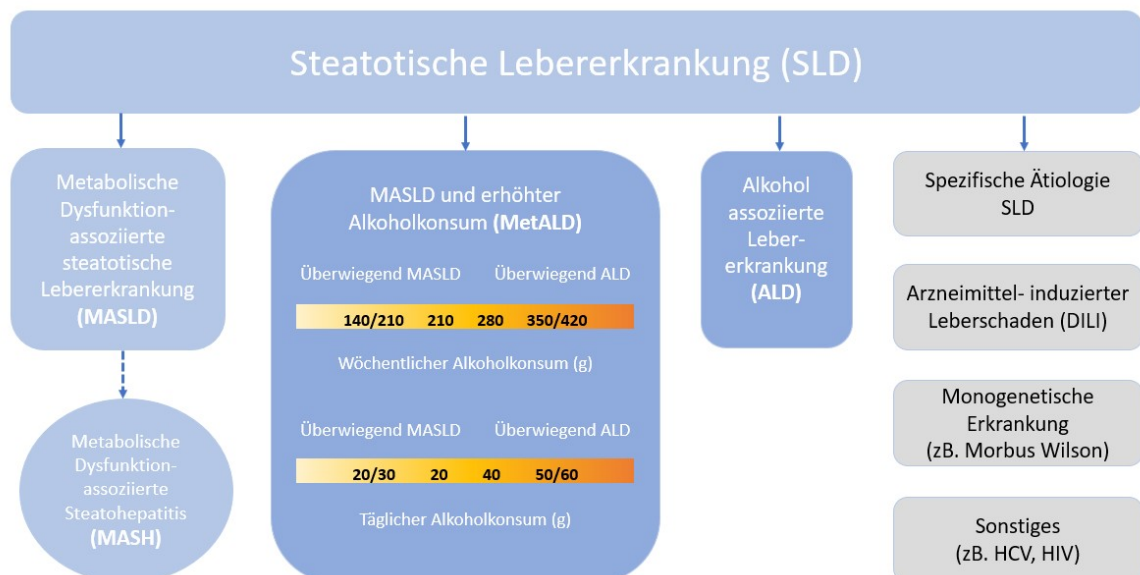
Zusammenfassend stellt diese Arbeit *NEAT1* als neuen Angriffspunkt für diagnostische und therapeutische Ansätze bei Behandlung der MASH-Progression heraus.

# 1. Einleitung

## 1.1 MASLD

Die metabolische Dysfunktion-assoziierte steatotische Lebererkrankung (engl.: metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease, MASLD) ist weltweit die häufigste Lebererkrankung mit einer derzeitigen Prävalenz von 38% aller Erwachsenen. Bis 2040 wird sogar mit einem dramatischen Anstieg auf über 55% gerechnet (Le et al., 2022) (Younossi, Kalligeros, et al., 2024). Die Hauptrisikofaktoren sind durch Fehl- und Überernährung hervorgerufene abdominelle Adipositas, Insulinresistenz und Fettstoffwechselstörungen (Benedict & Zhang, 2017).

Lange wurde das Krankheitsbild der Fettleber mit zugehöriger Progression als nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (engl.: non-alcoholic-fatty liver disease, NAFLD) bezeichnet. Im Rahmen einer internationalen Konsensuskonferenz wurde 2023 eine neue Nomenklatur und Krankheitsklassifikation eingeführt, bei der anstelle von NAFLD nun MASLD unter dem Schirmbegriff der steatotischen Lebererkrankungen (engl.: steatotic liver disease, SLD) geführt wird. Dieser Begriff umfasst unterschiedliche Ätiologien der Fettleber, darunter MASLD, MetALD (MASLD mit erhöhtem Alkoholkonsum), alkoholassoziierte Lebererkrankung (engl.: alcoholic liver disease, ALD) sowie genetisch, viral oder medikamentös bedingte Steatosen (siehe Abbildung 1).



**Abbildung 1: Unterklassifizierung der steatotischen Lebererkrankung.**

Abgebildet sind die Klassifizierungen der steatotischen Lebererkrankung mit den zugehörigen Unterkategorien der verschiedenen Ätiologien. Dazu gehören MASLD, MASH, MetALD, ALD sowie spezielle Ätiologien. (Eigene Darstellung in Anlehnung an (Rinella et al., 2024).

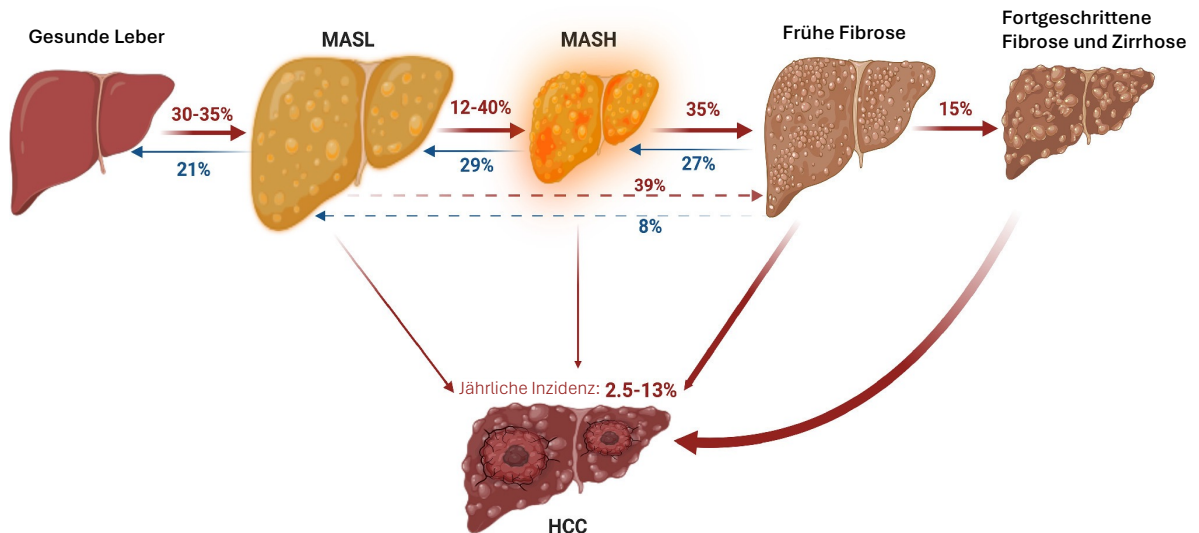


MASLD wird definiert als Lebersteatose in Verbindung mit mindestens einem von fünf kardiometabolischen Risikofaktoren (engl.: cardiometabolic risk factor, CMRF) und keiner anderen erkennbaren Ursache. MASLD gilt als die hepatische Manifestation des metabolischen Syndroms, welches durch Adipositas, Insulinresistenz, Dyslipidämie und Bluthochdruck gekennzeichnet ist (Marchesini et al., 2003; Huang, 2009). Die Progression zur Steatohepatitis wird als metabolische Dysfunktion-assoziierte Steatohepatitis (MASH) bezeichnet. Der Krankheitsverlauf von MASLD ist progredient und beginnt mit einer Steatose in den Hepatozyten, die mit einem Anteil von mehr als 5% steatotischer Hepatozyten definiert ist (Bedossa et al., 2012). Diese steatotischen Hepatozyten beinhalten mikro- oder makrovesikuläre Ansammlungen von Lipiden, bei denen es sich vorwiegend um Triglyceride handelt. Diese Lipidakkumulation kann zum einen auf einen erhöhten Zufluss freier Fettsäuren, eine erhöhte hepatischen De-novo-Lipogenese oder einen verminderten Abbau, Metabolismus oder Abtransport zurückzuführen sein.

In dem Verlauf von MASLD kann es neben der Lipidakkumulation zu inflammatorischen Ereignissen kommen. Diese können zum Teil per Lipotoxizität durch Lipide - vor allem Diglyceride, Ceramide, Cholesterin und gesättigte freie Fettsäuren - hervorgerufen oder verstärkt werden. Wichtige Zytokine im hepatischen Entzündungsmilieu sind TNF- $\alpha$ , IL6 und IL1 $\beta$ . Sie werden von eingewanderten Makrophagen oder leberansässigen Makrophagen, den Kupffer-Zellen, sezerniert und treiben so das Entzündungsgeschehen voran. Andauernde Entzündungsprozesse führen in der Leber zur Aktivierung von hepatischen Sternzellen (engl.: hepatic stellate cells, HSC), auch Ito-Zellen genannt. Diese differenzieren daraufhin zu fibrogenen Myofibroblasten, die ebenfalls Zytokine sezernieren aber auch extrazelluläre Matrix-Proteine wie Kollagene. Die sezernierten Zytokine halten die Aktivität der HSCs aufrecht und verstärken den Prozess. Große Mengen von Matrixproteinen führen letztendlich zu einer Fibrose.

Eine Fibrose kennzeichnet einen kritischen Punkt im Verlauf einer MASLD. Hier findet ein fließender Übergang zu MASH statt. Die bisher als reversibel einstuftbare Erkrankung entwickelt sich nun oft zu einer irreversiblen Erkrankung mit meist autonom progressivem Verlauf. Die Fibroseprogression manifestiert sich später in einer Leberzirrhose, die sich in Funktionseinschränkungen der Leber äußert. Eine Lebertransplantation und ein erhöhtes Risiko für das Auftreten eines hepatozellulären Karzinoms (engl.: hepatocellular carcinoma, HCC) können die Folge sein (siehe Abbildung 2).

## Einleitung



**Abbildung 2: Progression von steatotischen Lebererkrankungen (adaptiert von Lekakis & Papatheodoridis, 2024)**

Dargestellt ist die Progression der steatotischen Lebererkrankungen bis zu ihrem Endstadium HCC. Die roten Pfeile kennzeichnen die prozentuale Progression, die blauen Pfeile kennzeichnen die Regression.

Die klinische Diagnostik von MASLD erfolgt derzeit überwiegend mittels nicht-invasiver Verfahren wie Sonographie (Ultraschall), Elastographie (spezieller Ultraschall zur Messung der Gewebe-Elastizität) und serumbasierter Scores (NAFLD Fibrosis Score (NFS), Fibrosis-4 (FIB-4)) (Roeb et al., 2022). Weiterhin können Magnet-Resonanz-basierte (MR) Verfahren (MR-T (Tomographie), MR-S (Spektroskopie)) durchgeführt werden, um Fett in der Leber zu quantifizieren. Diese Methoden ermöglichen eine Einschätzung der Lebersteatose und -fibrose, erlauben jedoch keine klare Differenzierung zwischen MASLD und der inflammatorisch-fibrotischen Verlaufsform MASH. Bei Hinweisen auf ein fortgeschrittenes Krankheitsstadium ist schließlich eine Leberbiopsie indiziert, um eine Fibrose sicher nachzuweisen oder auszuschließen.

Als blutbasierte Marker im Zuge der Diagnostik dienen zurzeit nur die in den empfohlenen Serumtests und Scores (NFS, FIB-4) vorkommenden Marker Aspartat-Aminotransferase (AST), Alanin-Aminotransferase (ALT), die Thrombozytenzahl und Albumin. Eine Differenzialdiagnostik zur prognostisch wichtigen Unterscheidung zwischen MASLD und MASH ist mit blutbasierten Markern bisher nicht etabliert (Roeb et al., 2022). Dies verdeutlicht, dass die derzeit verfügbaren Laborparameter unspezifisch sind und häufig erst im fortgeschrittenen Stadium pathologische Veränderungen zeigen. Eine frühe Diagnostik oder Risikostratifizierung auf molekularer Ebene ist bislang nicht etabliert. Die daraus resultierende diagnostische Lücke unterstreicht den Bedarf an molekularen Biomarkern, die eine frühzeitige Detektion und präzisere Risikostratifizierung ermöglichen.

Trotz der hohen Prävalenz von MASLD gibt es in Europa bislang keine zugelassene medikamentöse Pharmakotherapie. Die Behandlung beschränkt sich weitgehend auf Lebensstilinterventionen, wie Gewichtsreduktion und Ernährungsumstellung, deren Wirksamkeit stark von der Patientenadhärenz abhängt (Roeb et al., 2022). Mit der Zulassung des THR- $\beta$ -Agonisten Resmetirom durch die amerikanische Arzneimittelbehörde FDA im Jahr 2024 wurde im amerikanischen Raum erstmals ein gezielter Therapieansatz für MASH mit Fibrose zugelassen (Keam, 2024). Der Wirkstoff verbessert den Lipidstoffwechsel durch Aktivierung hepatischer Schilddrüsenhormonrezeptoren und konnte in klinischen Studien eine Reduktion der intrahepatischen Triglyceride und eine Abschwächung fibrotischer Veränderungen zeigen.

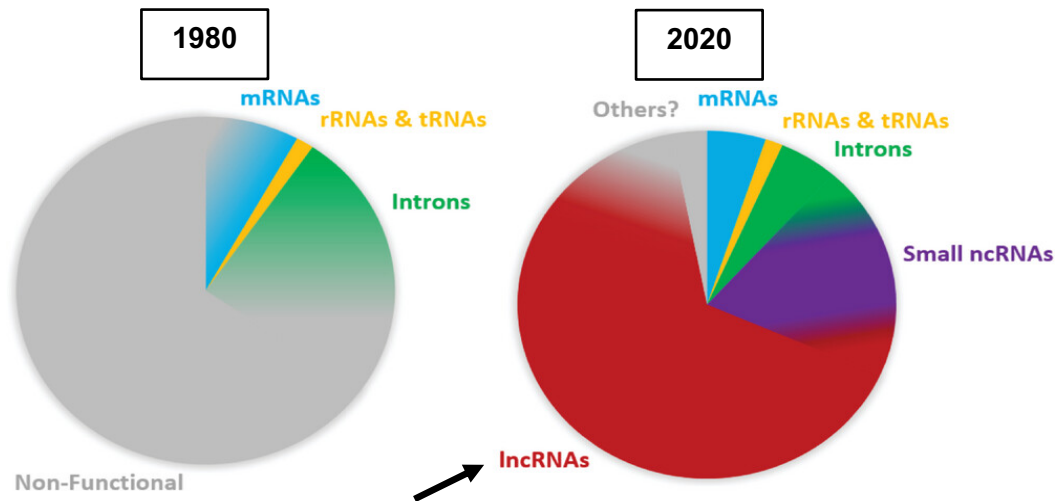
Vor dem Hintergrund unspezifischer diagnostischer Marker und weiterhin limitiert verfügbarer Therapien besteht daher ein hoher Bedarf an der Identifikation neuer molekularer Regulatoren und Zielstrukturen. Diese könnten künftig als biologische Marker zur Frühdiagnostik oder als Angriffspunkt für neuartige Therapien dienen. In diesem Zusammenhang rücken insbesondere lncRNAs zunehmend in den Vordergrund der Forschung, da sie eine zentrale Rolle in der Genregulation und Pathogenese zahlreicher Erkrankungen einnehmen.

## **1.2 Die lange nicht-codierende RNA (lncRNA) *NEAT1***

### **1.2.1 LncRNAs allgemein**

Eine nicht-codierende RNA, die in verschiedenen pathophysiologischen Kontexten zunehmend in den Fokus rückt, ist die lange nicht-codierende RNA (lncRNA) *NEAT1*. Lange Zeit galten nicht-codierenden RNAs als biologisch irrelevante Nebenprodukte der Transkription, als „transkriptionelles Rauschen“. Entsprechend wurde ihre Nomenklatur durch das definiert, was sie nicht leisten können: die Codierung für Proteine. Mit dem Human Genome Project und der Entwicklung moderner Transkriptomanalysen wandelte sich dieses Bild grundlegend. Es wurde deutlich, dass der größte Teil des eukaryotischen Genoms aktiv transkribiert wird, ohne zur Proteinbiosynthese beizutragen (siehe Abbildung 3).

Die nicht-codierenden Transkripte werden nach der aktuellen Konsenserklärung (Mattick et al., 2023) in drei Hauptgruppen eingeteilt. Darunter bilden eine Gruppe mit über 500 nt die lncRNAs. LncRNAs können zudem anhand ihres genomischen Ursprungs klassifiziert werden. Dabei bezeichnet man Transkripte aus eigenständigen, nicht überlappenden Genloci als lange intergene nicht-kodierende RNAs (lincRNAs). Unter diese Kategorie fällt auch *NEAT1*. Weitere lncRNA-Klassen umfassen Antisense-Transkripte, intronische RNAs sowie promotorassoziierte oder von Pseudogenen abgeleitete Transkripte.



**Abbildung 3: Einschätzung des Vorkommens von RNA-Klassen (Walter, 2024)**

Einschätzung basierend auf dem Human Genome Project. Entwicklung damals (1980) und heute (2020) (Walter, 2024) (Mattick, 2023).

Allgemein unterliegen lncRNAs einer organ- und zelltypspezifischen Expression und sind im Vergleich zu mRNAs nur wenig konserviert. Dieser vermeintliche Nachteil reflektiert jedoch ihre funktionelle Spezialisierung, denn lncRNAs agieren über konservierte Sekundärstrukturen, nicht über lineare Sequenzmotive. Zudem ermöglichen sie eine unmittelbare regulatorische Wirkung ohne den Umweg über Translation, ein Merkmal, das sie besonders für schnelle zelluläre Anpassungsprozesse prädestiniert (Wang & Chang, 2011).

Ein weiterer funktioneller Parameter ist ihre Stabilität. Die Halbwertszeit von lncRNAs variiert, von weniger als 30 Minuten bis über 48 Stunden, stark und liegt im Mittel bei etwa 5 Stunden (Clark et al., 2012). Ihre Stabilität hängt von subzellulärer Lokalisation, RNA-Prozessierung und Sekundärstruktur ab. Eine kurze Halbwertszeit kann vorteilhaft sein, um schnelle Reaktionen auf zelluläre Veränderungen zu ermöglichen, wie etwa bei der stressinduzierten Bildung von Paraspeckles, die wesentlich von der lncRNA *NEAT1* abhängen. Azam et al. (2024) veranschaulichten diese Dynamik nach LPS-Stimulation in Makrophagen. Diese zeigten eine rasche Induktion von Paraspeckles innerhalb von 30 Minuten, die bereits nach 2 Stunden durch nukleäre Exosom-vermittelte Degradation von *NEAT1* wieder abgebaut waren. Diese Befunde verdeutlichen, wie stark die biologische Funktion von *NEAT1* mit ihrer feinregulierten Stabilität und zeitlich abgestimmten Expression verknüpft sein können. Als funktionell vielseitige und dynamisch regulierte lncRNA ist *NEAT1* ein zentraler Kandidat für die Untersuchung von RNA-gestützten Regulationsmechanismen. Im Folgenden werden Aufbau und molekulare Eigenschaften von *NEAT1* näher betrachtet.

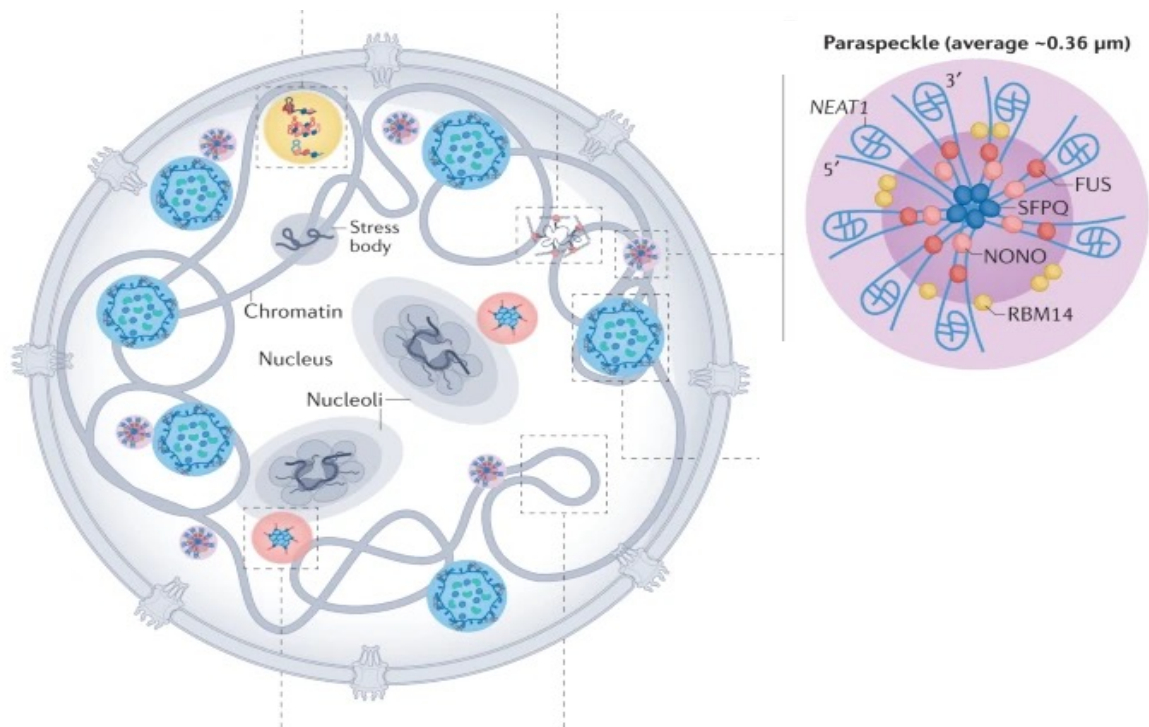
### 1.2.2 Eigenschaften von *NEAT1*

*NEAT1* ist eine lncRNA, die exklusiv und organspezifisch in Säugetieren vorkommt. Der offizielle Name von *NEAT1* lautet Nuclear Paraspeckle Assembly Transcript 1. Die Abkürzung hingegen stammt von seiner Entdeckung als Nuclear Enriched Abundant Transcript 1 (*NEAT1*) gemeinsam mit *NEAT2* (heute *MALAT1*) (Hutchinson et al., 2007). Erstmals erwähnt wurde *NEAT1* in der Charakterisierung der Transkripte des *MEN1*-Lokus (Guru et al., 1997). Dieser Genlocus auf Chromosom 11 bildet eine eigenständige (intergene) Transkriptionseinheit. Ausgehend von diesem Genlocus werden zwei lncRNA Isoformen sowie eine miRNA (miR-612) von der RNA-Polymerase II transkribiert. Die beiden Isoformen besitzen den gleichen Promotor, weisen keine Introns auf und können unterschieden werden in eine kürzere (*NEAT1\_v1*) und eine längere (*NEAT1\_v2*) Isoform (Guru et al., 1997; Sunwoo et al., 2009). In älterer Literatur werden die beiden Isoformen noch als *MEN-ε* (*NEAT1\_v1*) und *MEN-β* (*NEAT1\_v2*) beschrieben (Guru et al., 1997). Die Kürzere der beiden Isoformen *NEAT1\_v1* ist 3756 nt lang, polyadenyliert und kongruent mit dem 5'-Bereich von *NEAT1\_v2*. Die lange Isoform *NEAT1\_v2* ist 22743 nt lang, nicht polyadenyliert und wird nach neusten Erkenntnissen nur dann abgelesen, wenn die Spaltung und Polyadenylierung von *NEAT1\_v1* verhindert wird (Naganuma et al., 2012; Fox & Lamond, 2010; Ingram & Fox, 2024). *NEAT1\_v2* wird an ihrem 3' Ende durch RNase P prozessiert und bildet daraufhin zum einen die lange lncRNA, die über Sekundärstrukturen (Triple-Helix-Struktur (Brown et al., 2012)) stabilisiert wird, als auch ein kleines 59 nt langes tRNA-ähnliches Molekül (menRNA), welches ins Zytoplasma transloziert (Wilusz et al., 2009; Sunwoo et al., 2009; Brown et al., 2012; Gast et al., 2022).

Die funktionelle Relevanz von *NEAT1* zeigt sich besonders deutlich in der Organisation von Paraspeckles. *NEAT1*, insbesondere die lange Isoform *NEAT1\_v2*, ist essenziell für die Bildung und strukturelle Integrität von Paraspeckles (Clemson et al., 2009; Sasaki et al., 2009; Sunwoo et al., 2009; Mao et al., 2011). Paraspeckles sind membranlose Kernkörperchen, die aus einem RNA-Protein-Komplex bestehen (Fox et al., 2002). Sie sind zwischen 360 nm und 1,5 µm groß, haben eine zylindrische Form (Yamazaki et al., 2021) und befinden sich in nukleären Interchromatinraum (Souquere et al., 2010; Yamazaki et al., 2018). *NEAT1\_v2* fungiert dabei als zentrales Strukturgerüst, indem circa 50 Transkripte das Rückgrat der Paraspeckles bilden. Zu den essenziellen RNA-bindenden Proteinen (RBP) zählen unter anderen SFPQ und NONO (Fox et al., 2018) (siehe Abbildung 4).

Insbesondere unter Stressbedingungen oder immunologischen Stimuli kommt es zu einer schnellen Induktion von Paraspeckles, weshalb sie auch als stress-responsive membranlose Organellen (MLOs) klassifiziert werden (Hirose et al., 2014; Azam et al., 2024). Andererseits konnte bereits gezeigt werden, dass in ungestressten Zellen die Anzahl von Paraspeckles, beispielsweise über die epigenetische m6A Markierungen von *NEAT1* und somit dessen Stabilität vermindert ist (Qin et al., 2023; Ingram & Fox, 2024).

Funktionell regulieren Paraspeckles zum einen posttranskriptionell Gene, indem sie RNA mit A-zu-I-Editierung im Zellkern zurückhalten (Prasanth et al., 2005; Zhang & Carmichael, 2001). Zum anderen sequestrieren sie regulatorische Proteine und beeinflussen so die Genexpression und zelluläre Prozesse (Imamura et al., 2014; Hirose et al., 2014). Außerdem sind Paraspeckles an miRNA-Sequestrierungen beteiligt und spielen eine Rolle bei der Kontrolle von Apoptose, Inflammation, Onkogenese, viralen Infektionen und neurodegenerativen Erkrankungen (Jiang et al., 2017; Fox & Lamond, 2010; Pisani & Baron, 2019).



**Abbildung 4: Paraspeckle Organisation und Lokalisation (Mattick et al., 2023)**

(Links) Schematische Darstellung der Paraspeckle-Lokalisation im Zellkern. (Rechts) *NEAT1* sequestriert zahlreiche Paraspeckle-Proteine, um einen sphäroidalen Kernkörper mit organisierter Kern-Schale-Struktur (dunkel- bzw. hellviolett) zu bilden. Die mittlere Region von *NEAT1* ist im Zentrum der Paraspeckles lokalisiert, während die Regionen am 3'-Ende und am 5'-Ende in der Peripherie zu finden sind. Verschiedene Paraspeckle-Proteine wie NONO, fused in sarcoma (FUS) und SFPQ werden von *NEAT1* in der Kernregion oder in der Schalenregion wie RNA-binding motif protein 14 (RBM14) eingebettet (Mattick et al., 2023).

### 1.3 *NEAT1* in MASLD

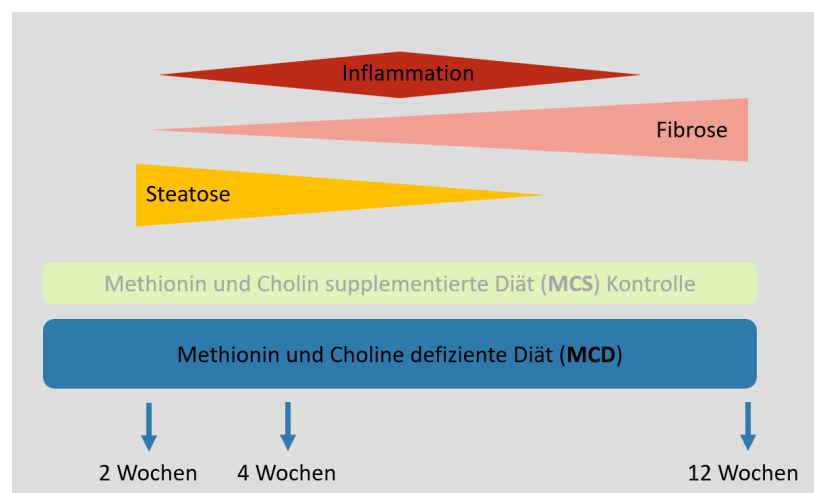
*NEAT1* wurde zuerst im Kontext von Krebserkrankungen identifiziert und funktionell charakterisiert. In verschiedenen Tumorentitäten, darunter auch dem hepatozellulären Karzinom (HCC), wurde eine Überexpression von *NEAT1* beschrieben, die mit gesteigerter Zellproliferation und Metastasierung assoziiert war (Guo et al., 2015; Chakravarty et al., 2014). (Adriaens et al., 2016) konnten zeigen, dass *NEAT1* die Chemoresistenz in verschiedenen Krebsmodellen verstärkt. Aufbauend darauf untersuchten Keßler et al. (2019) die Paraspecklebildung gezielt in chemoresistenten HCC-Zelllinien und fanden sowohl eine signifikant erhöhte *NEAT1*-Expression als auch eine Anreicherung des Paraspeckle-Proteins PSPC1 (Kessler et al., 2019). Abschließend konnte durch Studien gezeigt werden, dass eine Ausschaltung von *NEAT1* zu einer verstärkten Apoptose und verminderten Proliferation in HCC-Zellen führt (Fang et al., 2017; Liu et al., 2017).

In den letzten Jahren verlagerte sich der Fokus der Forschung zunehmend auf nicht-maligne Lebererkrankungen, insbesondere auf MASLD und dessen progressive Verlaufsform MASH, in denen entzündliche und metabolische Stimuli ebenfalls zu einer Hochregulation von *NEAT1* zu führen scheinen. Erste Studien zeigten, dass die Expression von *NEAT1* durch die Fütterung einer Hochfettdiät (HFD) erhöht war (Chen et al., 2019; Wang, 2018). Die Autoren zeigten zudem in einem *in vitro*-Modell, dass die Ausschaltung von *Neat1* die Lipidakkumulation in Rattenleberfibroblasten verhindern konnte (Wang, 2018). Daneben schwächte der Knockdown von *Neat1* die CCl<sub>4</sub>-induzierte Fibrogenese in einem Modell für Leberfibrose ab (Yu et al., 2017). Diese Arbeiten zeigen zwar die Involvierung von *NEAT1* in MASLD und MASH, beruhen aber überwiegend auf *in vitro*-Studien oder transienten Knockdown-Ansätzen. Ein umfassender funktioneller Nachweis mittels genetischem Knockout-Modell, insbesondere unter Berücksichtigung der inflammatorisch-fibrotischen Krankheitsprogression fehlt bislang.

### 1.4 Modellierung von MASH: Die Methionin-Cholin-defiziente Diät

Vor dem Hintergrund der limitierten Datenlage wird in der vorliegenden Arbeit erstmals systematisch untersucht, welche funktionellen Auswirkungen ein vollständiger *Neat1*-Knockout auf die Pathogenese von MASH hat. Hierzu wurde die MCD-Diät, als ein etabliertes *in vivo*-Diätmodell verwendet, die die zentralen Merkmale der Krankheitsprogression von MASH, Steatose, Inflammation und Fibrose, innerhalb kurzer Zeit zuverlässig abbildet (siehe Abbildung 5). Bereits nach zwei Wochen ist eine Lebersteatose messbar, die zu einer Entzündung fortschreitet (Weltman et al., 1996), im Verlauf eine Steatohepatitis auslöst (Kirsch et al., 2003) und langfristig zu Fibrose mit weiteren Folgepathologien führt (Dobosy et al., 2008).

In der MCD-Diät wird den Mäusen durch die artifizielle Diät zum einen Methionin und Cholin vorenthalten und zum anderen ein höherer Gehalt an Fett im Vergleich zu Normalfutter gefüttert. Ein Mangel an Methionin und Cholin beeinträchtigt die Synthese von Phosphatidylcholin, da beide zu dessen essenziellen Vorstufen gehören. Phosphatidylcholin ist wiederum ein essenzieller Bestandteil von Lipoproteinen sehr geringer Dichte (engl.: very low density lipoprotein, VLDL), sodass die VLDL-Produktion in der Leber verringert wird (Vance & Vance, 1985); (Yao & Vance, 1988). Da VLDL das Hauptexport-Lipoprotein für Triglyceride ist, führt das, in Verbindung mit dem höheren Fettgehalt des Futters, zu einer intrahepatischen Akkumulation von Triglyceriden. Die daraus entstehende Lipidüberladung der Hepatozyten löst eine Kaskade pathophysiologischer Prozesse aus, darunter Steatose in Verbindung mit Lipotoxizität, vermehrter oxidativer Stress, mitochondriale Dysfunktion, Zellschädigung sowie Immunzellaktivierung (Rinella et al., 2008). Diese Faktoren fördern die Produktion proinflammatorischer Zytokine und begünstigen eine entzündliche Umgebung, welche die Progression zu einer fibrotischen Umgestaltung des Lebergewebes unterstützt. In der Folge entsteht ein Phänotyp, der die charakteristischen Merkmale der MASH widerspiegelt (Itagaki et al., 2013).



**Abbildung 5: Verlauf der MCD-Diät**

Schematische Darstellung der Ausprägung der Steatose, Inflammation und Fibrose unter MCD-Diät.

Die Wahl der MCD-Diät als Krankheitsmodell basiert nicht nur auf ihrer Fähigkeit, zentrale pathophysiologische Merkmale von MASH zuverlässig zu induzieren, sondern auch auf ihrer molekularen Nähe zur humanen Erkrankung. In einer vergleichenden Transkriptomanalyse zeigten Teufel et al. (2016), dass unter verschiedenen Mausmodellen die MCD-Diät die stärkste Übereinstimmung in der Genexpressionssignatur mit humanen MASLD- und MASH-Leberproben aufwies (Teufel et al., 2016). Diese Konvergenz wurde in einer aktuellen systematischen Analyse durch Vacca et al. (2024) erneut bestätigt (Vacca et al., 2024).



## 1.5 Zielsetzung

Zusammenfassend ergibt sich vor dem dargestellten Hintergrund die Relevanz, dass aufgrund der enorm steigenden Prävalenz von MASLD, in Verbindung mit fehlenden Biomarkern für die Diagnostik und stark limitierten Therapieoptionen, ein erheblicher Forschungsbedarf besteht. Dies manifestiert sich in der oft unbemerkten Progression zu MASH und letztendlich zum HCC, welche sich in den letzten Jahren verachtfachen konnte (Younossi, Stepanova, et al., 2024; Phoolchand & Khakoo, 2024). *NEAT1* ist in HCC überexprimiert und nach neusten Erkenntnissen auch in MASLD und MASH vertreten. Inwiefern *NEAT1* zur Progression von MASLD beiträgt, und welche molekularen Mechanismen vorliegen ist bisher allerdings nur unzureichend verstanden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die pathophysiologische Rolle von *NEAT1* in einem Modell der metabolischen Dysfunktion-assoziierten Steatohepatitis zu klären.

Im Hinblick auf die Charakterisierung von *NEAT1* und seine Rolle bei MASH wurden die folgenden Aspekte untersucht:

- 1) Die Expression von *NEAT1* in verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Modellen von MASLD und MASH
- 2) Effekte des *NEAT1*-Knockouts auf die pathologischen Schlüsselkomponenten von MASH: Steatose, Inflammation und Fibrose
- 3) Potenzielle molekulare Signalwege von *NEAT1*
- 4) Regulation von *NEAT1* durch RNA-bindende Proteine (Anhang)

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Puffer und Medien

Tabelle 1: Puffer und Medien

Puffer und Medien	Bestandteile
Anodenpuffer 10 x	60,6 g Tris Base 7-10 ml HCl (bis pH 8,9) H <sub>2</sub> O ad 500 ml
Kathodenpuffer 10 x	30,3 g Tris Base 44,8 g Tricine 2,5 ml 10% SDS stock H <sub>2</sub> O ad 500 ml
Fixierungs-Puffer	1 ml 37% Formaldehyd 9 ml PBS
Gel-Puffer 3 x	3 M Tris HCl für pH 8,45 15 ml 10% SDS H <sub>2</sub> O ad 500 ml
Kollagenaselösung	HBSS 25 mM HEPES 25 µg/ml Liberase™ Research Grade
LB-Medium	5 g NaCl 5 g Hefeextrakt 3,5 g Soja-Pepton 3,5 g Fleisch-Pepton 3,5 g Trypton
PBS 1 x	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,4
PBST	PBS + 0,1% Tween 20
Perfusionspuffer	HBSS (ohne Ca <sup>2+</sup> , ohne Mg <sup>2+</sup> ) 0,5 mM EDTA 25 mM HEPES

## Material

Puffer und Medien	Bestandteile
Pufferlösung	HBSS 25 mM HEPES
RIPA-Puffer	Tris-HCl 50 mM NaCl 150 mM NP-40 1% (oder Triton X-100 1%) Natriumdeoxycholat 0,5% SDS 0,05% 1 mM EDTA
Transferpuffer 10 x	Glycin 1,5 M Tris 250 mM HCl auf pH 8,3 H <sub>2</sub> O ad 1000 ml
Transferpuffer 1 x	100ml 10x Transferpuffer 100ml Methanol H <sub>2</sub> O ad 1000 ml
TBS-Puffer 10 x	0,5 M Tris 1,5 M NaCl pH 7,5
TBST 10 x	10 x TBS + 1% Tween 20

## 2.1.2 Geräte und Software

**Tabelle 2: Geräte**

Gerät	Hersteller
Prime Thermal Cycler (5PRIMEG/02)	Bibby Scientific Ltd
Bio-Rad CFX Duet Real-Time PCR Cycler	Bio-Rad Laboratories
Mupid-One Elektrophorese-System	Nippon Genetics
BD Accuri C6 Plus Flow Cytometer (FACS)	Becton, Dickinson and Company
STEDYCON Abberior	Abberior
Olympus IX83	Olympus
Leica Fluoreszenzmikroskop DMI8	Leica Microsystems
UV-Transilluminators Eagle Eye II	Stratagene
Spektrometer (DeNovix DS-11FX)	DeNovix Inc
Electronic Balance FX-200-EC	A&D Instruments LTD.
Mixy Professional (Motorbetriebener Homogenisator)	FastGene®, Nippon Genetics

**Tabelle 3: Software**

Software	Version	Hersteller
OriginPro 2019	9.6.0.172	OriginLab, Northampton, MA, USA
Bio-Rad CFX Maestro	2017 (1.1)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
GraphPadPrism 10	10.4.1	GraphPad Software, Boston, MA, USA
Microsoft 365 for Mac	16.83 ff.	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Endnote	21.5	Alfasoft GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
SnapGene	8.1.0	GSL Biotech LLC, Boston, MA, USA
INTAS GDS touch II	1.1.5.4.	INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
STEDYCON Gallery	7.1.5.3	Abberior GmbH, Göttingen, Deutschland

## **2.2 Tierexperimente**

### **2.2.1 *NEAT1* in MASH (MCD-Diät)**

#### **2.2.1.1 Genehmigung und geltendes Recht**

Alle Arbeiten mit den Tieren wurden gemäß den Vorgaben des geltenden deutschen Tierschutzgesetzes vom 20.12.2022, der Tierschutz-Versuchstierordnung vom 11.8.2021, sowie der Leitlinien zum Wohlergehen von Versuchstieren der europäischen Union (2010/63/EU) durchgeführt. Genehmigt wurde das Tierexperiment vom Landesverwaltungsamt Sachsen-Anhalt, Referat 203 Verbraucherschutz, Veterinärangelegenheiten unter dem Aktenzeichen 203.m-42502-2-1696 MLU.

#### **2.2.1.2 Tierhaltung**

Die Tiere wurden in Ventilationskäfigen unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen bei einer Raumtemperatur von  $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ,  $55 \pm 15\%$  relativer Luftfeuchtigkeit und einem Tag-/Nachtzyklus von 12 Stunden gehalten. In der Regel wurden die Tiere in Gruppen von bis zu fünf Tieren pro Käfig gehalten, wobei es in seltenen Ausnahmefällen zu Einzelhaltungen kam, wenn bedingt durch das Geschlecht oder die Diät keine anderen Optionen möglich waren. Als Nahrung erhielten die Mäuse vor Versuchsbeginn Haltungsfutter (Altromin, Lage, Deutschland, Katalognr.: 1324-10mm Pellets) im Folgenden auch als Normalfutter (NF) bezeichnet, sowie autoklaviertes Leitungswasser ad libitum.

#### **2.2.1.3 Diät**

Die Mäuse erhielten je nach Gruppe für 3 Wochen die experimentelle Diät, Methionin-Cholin-defiziente (MCD) Diät (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland, Katalognr.: E15653-94) oder die Kontroll-Diät, Methionin-Cholin supplementierte (MCS) Diät (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland, Katalognr.: E15654-04). Das Futter setzte sich aus den angegebenen Hauptnährstoffen zusammen und bestand aus einer kristallinen Aminosäuremischung anstelle von intaktem Protein, das im Falle der MCD-Diät, kein Methionin und Cholin enthielt (siehe Tabelle A 1). Autoklaviertes Wasser und Futter standen den Tieren ad libitum zur Verfügung. Das Körpergewicht, sowie Allgemeinzustand, Spontanverhalten und Hunching-Score wurden täglich dokumentiert.

### 2.2.1.4 Gruppeneinteilung

Für das Tierexperiment wurden Mäuse mit drei verschiedenen Genotypen verwendet. Zum einen wurden Wildtyp-Mäuse des Stammes C57BL/6JRj, ursprünglich von Janvier Labs, Frankreich erworben, verwendet. Sowie heterozygote *Neat1*<sup>+/-</sup> Mäuse und homozygote knockout *Neat1*<sup>-/-</sup> Mäuse, etabliert und erhalten von Prof. Dr. Shinichi Nakagawa Hokkaido University, Sapporo, Japan. Alle im Experiment verwendeten Mäuse stammen aus eigener Nachzucht. Für das Tierexperiment wurden männliche und weibliche Mäuse gleicher Anzahl im Alter von 10 bis 12 Wochen in sechs Gruppen randomisiert (siehe Tabelle 4).

**Tabelle 4: Gruppenübersicht des *Neat1*-MASH Tierversuchs**

Gruppe	Genotyp	Hintergrundstamm	Diät	Anzahl	♀	♂
1	Wildtyp	C57BL/6JRj	MCS	14	7	7
2	Wildtyp	C57BL/6JRj	MCD	14	7	7
3	<i>Neat1</i> <sup>+/-</sup> (Heterozygot)	C57BL/6JRj	MCS	14	7	7
4	<i>Neat1</i> <sup>+/-</sup> (Heterozygot)	C57BL/6JRj	MCD	14	7	7
5	<i>Neat1</i> <sup>-/-</sup> (Knockout)	C57BL/6JRj	MCS	14	7	7
6	<i>Neat1</i> <sup>-/-</sup> (Knockout)	C57BL/6JRj	MCD	14	7	7
7	Wildtyp	C57BL/6JRj	NF	10	5	5
8	<i>Neat1</i> <sup>+/-</sup> (Heterozygot)	C57BL/6JRj	NF	10	5	5
9	<i>Neat1</i> <sup>-/-</sup> (Knockout)	C57BL/6JRj	NF	10	5	5

### 2.2.1.5 *Neat1*<sup>-/-</sup>-knockout-Mäuse

Die Erzeugung der *Neat1*<sup>-/-</sup>-knockout Mäuse wurde von Shinichi Nakagawa durchgeführt und diese wurden für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt (Nakagawa et al., 2011). Im Folgenden soll die von Nakagawa et al. (2011) verwendete experimentelle Herangehensweise bei der Erzeugung der *Neat1*<sup>-/-</sup>-knockout Mäuse in Kurzform dargelegt werden.

Ein Targeting-Vektor wurde erstellt, indem DNA-Fragmente von *Neat1* in den Vektor DT-ApA/LacZ/NeO subkloniert wurden (siehe Tabelle A 2). Der Targeting-Vektor besteht aus homologen Armen (siehe linker Arm (KO Vektor LA) und rechter Arm (KO Vektor RA) Abbildung A 1), einem positivem (Neomycin (NeO); Resistenz gegen G418; ermöglicht Auswahl der Zellen, die den Vektor integriert haben) und negativem Selektionsmarker (Diphtherietoxin A-Fragment (DT-A) gegen nicht-homologe Integration), einem Reportergen LacZ-Gen (ermöglicht das Nachverfolgen der Genexpression) sowie Polyadenylierungssignalen (pA). Weiterhin ist NeO flankiert von FRT-Sequenzen, welche die spätere Entfernung durch FLP-Rekombinasen ermöglichen (siehe Tabelle A 2).

Der linearisierte Vektor wurde anschließend in embryonale TT2-Stammzellen elektroporiert (Yagi et al., 1993). G418-resistente Klone wurden mittels PCR und Southern-Blot auf erfolgreiche homologe Rekombination überprüft. Die genetisch veränderten embryonalen TT2-Stammzellen wurden dann in Blastozysten von Mäusen injiziert, um chimäre Mäuse zu erzeugen. Die chimären Mäuse wurden mit C57BL/6-Weibchen gepaart, um heterozygote Tiere (*Neat1*lacZ/Neo/+) zu erzeugen. Anschließend wurden sie mit dem Stamm Gt (ROSA)26Sortm1(FLP1) Dym (Jackson Laboratory) gepaart, um die PGK-Neo-Kassette zu entfernen. Die resultierenden heterozygoten Mäuse (*Neat1*lacZ/+) wurden auf dem genetischen Hintergrund von C57BL/6 gezüchtet.

Obwohl nur ein Teil des *Neat1*\_v2-Locus ersetzt wird, führt die Insertion des lacZ-Gens mit PolyA-Signal direkt hinter dem gemeinsamen Transkriptionsstartpunkt (TSS) zum frühzeitigen Transkriptionsabbruch und somit zum Funktionsverlust beider Isoformen, *Neat1*\_v1 und *Neat1*\_v2.

### 2.2.1.6 Genotypisierung

Die Expression von *Neat1* in Mäusen wurde mit zwei verschiedenen Analysemethoden untersucht. Zum einen wurde die genomische DNA aus einem Gewebestück des Ohres mittels PCR und Agarosegel analysiert (siehe Abbildung A 2), zum anderen wurde die aus einem Leberstück isolierte RNA und die daraus revers- transkribierte cDNA mittels qPCR quantifiziert.

Im Alter von circa drei Wochen wurden die Mäuse aufgrund ihrer Geschlechtsreife von den Elterntieren getrennt und in diesem Zuge mittels einer Ohrstanzung eindeutig einer Identifikation (ID) zugeordnet. Das Ohrgewebe wurde für die Genotypisierung verwendet. Es wurde in 100 µl einer gepufferten Verdauungslösung mit Proteinase K (20 mg/ml) für mindestens eine Stunde bei 55°C unter Schütteln erhitzt. Im Anschluss wurde die Proteinase K bei 95°C für 15 Minuten inaktiviert. 4 µl wurden aus dem Überstand entnommen und dienten als DNA-Matrize für die im Folgenden beschriebene PCR-Reaktion.

**Tabelle 5: Pipettieransatz für die Genotypisierungs-PCR**

	LacZ-PCR	<i>Neat1</i> -PCR
Inhalt	Volumen [µl]	Volumen [µl]
DNA-Template	4	4
10x DreamTaq Puffer	2	2
Primer <i>Neat1</i> FW (10 µM)	0,5	0,5
Primer <i>Neat1</i> REV (10 µM)	-	0,5
Primer LacZ REV (10 µM)	0,5	-
dNTPs (10 mM)	0,25	0,25
DreamTaq DNA Polymerase (5 U/µl)	0,5	0,5
DMSO	0,75	0,75
H <sub>2</sub> O	13,5	12,9

**Tabelle 6: Primer Genotypisierungs-PCR**

Primer	FW 5' - 3'	REV 5' - 3'
<i>Neat1</i>	CTAGTGGTGGGGAGGCAGT	AGCAGGGATAGCCTGGTCTT
LacZ		GCCATTCAGGCTGCGCAACTG

Die PCR-Zyklusbedingungen umfassten einen anfänglichen Denaturierungsschritt bei 94°C für 5 Minuten gefolgt von 35 Zyklen, bestehend aus Denaturierung bei 94°C für 30 Sekunden, Hybridisierung bei 64°C für 30 Sekunden und Elongation bei 72°C für 30 Sekunden und eine abschließende Verlängerung bei 72°C für 5 Minuten in einem Prime Thermal Cycler (Bibby Scientific Ltd, UK, Produktnr.:5PRIMEG/02).

Die PCR-Produkte wurden mittels Agarosegelelektrophorese analysiert. Das Produkt der *Neat1*-PCR ist 210 bp groß, das Produkt der LacZ PCR ist 315 bp groß. Wenn beide PCRs ein Produkt hervorbringen, lässt sich auf einen heterozygoten Genotyp rückschließen. Wenn ausschließlich eine Bande in der *Neat1*-PCR nachzuweisen ist, handelt es sich um einen homozygoten Genotyp des Wildtyps. Im Falle einer ausschließlich positiven Bandenpräsenz in der LacZ-PCR kann ein homozygoter Genotyp des *Neat1*<sup>-/-</sup>-Knockouts angenommen werden (siehe Abbildung A 2). In jedem PCR-Ansatz wurden stets eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle mitgeführt, um die Ergebnisse adäquat interpretieren zu können.

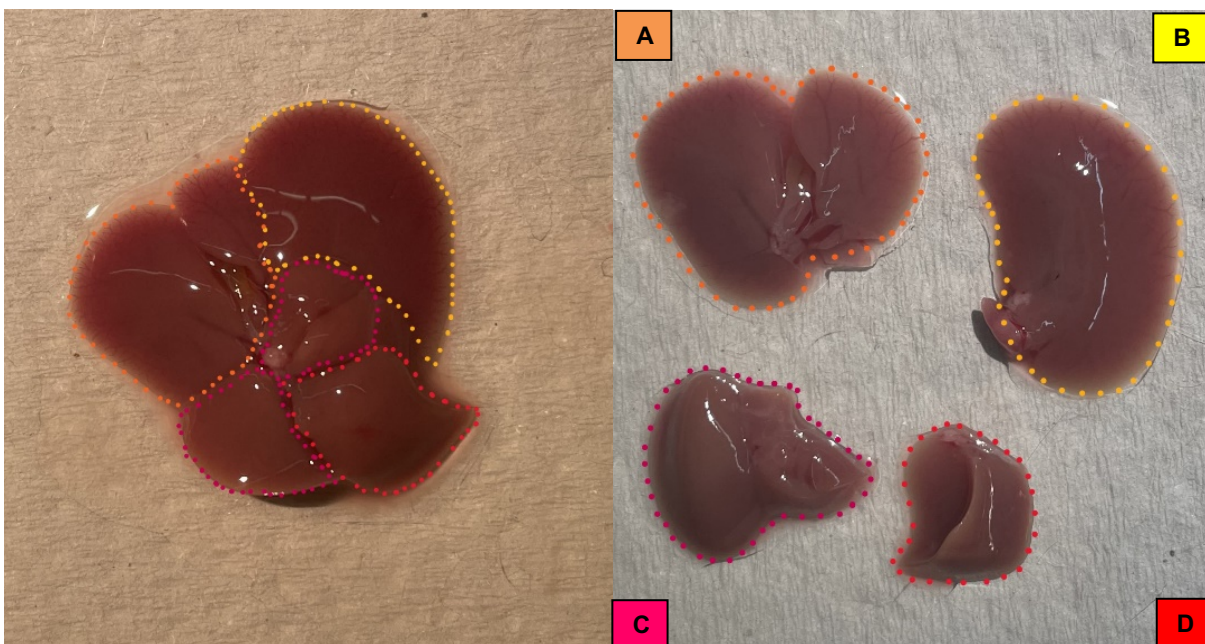


### 2.2.1.7 Entnahme der Organe und des Serums

Im Anschluss an den dreiwöchigen Fütterungszeitraum erfolgte die Tötung der Mäuse durch CO<sub>2</sub>-Begasung. Im Anschluss wurde durch kardiale Inzision Blut zur Serumgewinnung entnommen.

Um das Serum zu erhalten, wurde das Vollblut 30 Minuten lang bei Raumtemperatur in einem Sarstedt Micro-Probengefäß mit Serum-Gel (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland, Katalognr.: 41.1500.005) inkubiert und anschließend 10 Minuten bei 6.000 U/m zentrifugiert, bevor der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und bei -80°C gelagert wurde.

Die Leber wurden herausgeschnitten, gewogen und in PBS gewaschen. Die Leberlappen wurden aufgeteilt und jeweils in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert (siehe Abbildung 6). Dabei wurden Lobus hepatis lateralis sinister und Lobus hepatis medialis dexter zerteilt und eine Leberhälfte in 4% (v/v) PBS-gepuffertem Formaldehyd fixiert. Diese Proben wurden im Labor von Prof. Dr. Johannes Haybäck in Paraffin eingebettet und untersucht.



**Abbildung 6: Aufteilung muriner Leberlappen**

- A)** Mittlerer Leberlappen (Lobus hepatis medialis sinister/dexter) **B)** Linker Leberlappen (Lobus hepatis lateralis sinister) **C)** Rechter und kleiner quadratischer Leberlappen (Lobus hepatis lateralis dexter + Lobus quadratus) **D)** Kaudaler Leberlappen (Lobus caudatus)

### **2.2.2 MCD-Diät mit Kupfferzell-Depletion**

Für Expressionsanalysen wurden Lebergewebe von Mäusen (DBA2/Bl6/J-Hintergrund) verwendet, da diese aus einer vorherigen Studie verfügbar waren (Kessler et al., 2014). Diese wurden von der Arbeitsgruppe Prof. Kiemer der pharmazeutischen Biologie der Universität Saarbrücken in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Zuvor wurden die Mäuse im Alter von drei Wochen entweder mit einer MCD-Diät oder der Kontrolldiät MCS drei Wochen lang gefüttert. Eine Depletion der Kupfferzellen wurde durch intraperitoneale Injektion von Clodronat (Clo) oder durch Injektion leerer Liposomen zwei Tage vor Beginn der MCD- oder Kontrolldiät herbeigeführt und alle fünf Tage wiederholt. Nach Erhalt der Lebergewebe wurde von diesen die RNA isoliert.

### **2.2.3 HFD-Diät**

Für Expressionsanalysen wurden von PD Dr. Barbara Schreier des Julius-Bernstein-Institut für Physiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Lebergewebe von männlichen Mäusen mit C57Bl6J-Hintergrund zur Verfügung gestellt. Diese wurden zuvor in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert, nachdem diese von für einen Zeitraum von 18 Wochen eine Hochfettdiät (engl.: high fat diet, HFD) oder Standardfutter als Kontrolle erhielten. Nach Erhalt der Lebergewebe wurde von diesen die RNA isoliert.

## **2.3 Isolation primärer muriner Leberzellen**

Für die Isolierung der Hepatozyten aus der Leber wurde eine angepasste Kollagenase-Perfusions-Technik verwendet (Seglen, 1976; Adriaens et al., 2016; Charni-Natan & Goldstein, 2020).

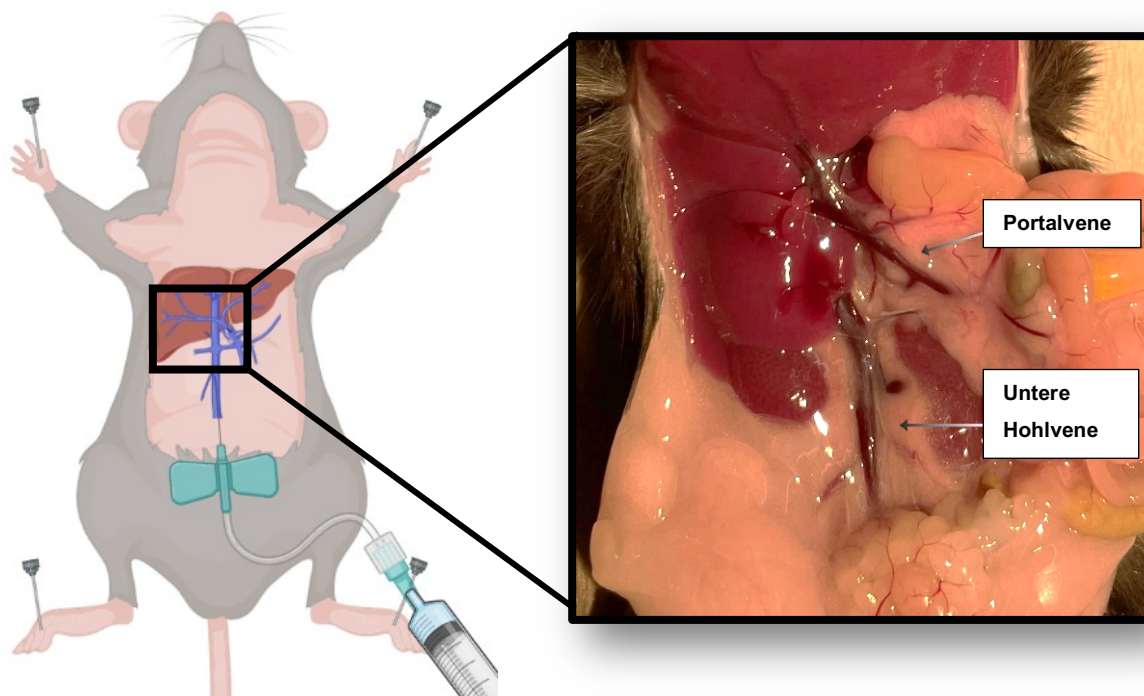
### **2.3.1 Kollagenisierung der Zellkulturschalen**

Um die Adhärenz der isolierten Hepatozyten an die Kulturgefäße zu optimieren, wurden diese mit 0,1 ml/cm<sup>2</sup> einer Kollagenlösung (10 µg/ml Kollagen) für mindestens 10 Stunden bei 37°C unter sterilen Bedingungen inkubiert. Das überschüssige Kollagen wurde abgesaugt und die Kulturgefäße anschließend mit PBS gewaschen.

### **2.3.2 Perfusion der Leber**

Die Maus wurde durch CO<sub>2</sub>-Begasung getötet, das Fell in der Bauchregion mit 70% (v/v) Ethanol desinfiziert und anschließend U-förmig aufgeschnitten. Die Eingeweide wurden vorsichtig zur Seite bewegt, um die Portalvene sowie die untere Hohlvene freizulegen (siehe Abbildung 7). Für die retrograde Perfusion wurde eine Schmetterlingskanüle Venofix A, 23G (B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland, Katalognr.: 4056353) in die untere Hohlvene eingeführt und zunächst 3 ml Heparin (100 I.U./ml) injiziert. Die

Perfusionslösungen wurden auf 42°C vortemperiert, da in dem Schlauchsystem die Temperatur schnell absinkt. Um Blut und zirkulierende Zellen aus der Leber herauszuwaschen wurde die Portalvene durchtrennt und, ebenfalls über die untere Hohlvene, 20 ml Perfusionspuffer perfundiert. Währenddessen wurde mehrmals für 10 Sekunden die Portalvene mit einer Pinzette abgeklemmt, um auch kleinere, periphere Lebergefäße zu erreichen. Im Anschluss wurde 10 ml Kollagenaselösung (HBSS, 25 mM HEPES, Liberase™ Research Grade 25 µg/ml) ebenfalls mit einer Abklemmung über 10 Sekunden pro Minute perfundiert. Zuletzt wurde die Leber unter Entfernung der Gallenblase entnommen und in 10 ml Pufferlösung (HBSS, 25 mM HEPES) auf Eis transportiert. In einer 10 cm-Zellkulturschale wurde die Leber anschließend mit Pinzetten vorsichtig eröffnet und die Zellen mit einem Zellschaber herausgelöst.



**Abbildung 7: Anatomische Lage der Gefäße während der Hepatozyten-Isolierung**

### 2.3.3 Hepatozytenisolierung

Um die Hepatozyten von anderen Zellpopulationen zu trennen, wurden jeweils 5 ml Zellsuspension durch ein 70 µm Zellsieb in ein 50 ml Röhrchen gefiltert. Die Zellkulturschale wurde mit 10 ml Plattier-Medium, zusammengesetzt aus DMEM (Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland, Katalognr.: 10313021) mit 10% FCSi (Biowest SAS France, Nuaillé, Frankreich, Katalognr.: S1400-500) und 1% Pen/Strep (Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland, Katalognr.: 15070063), gewaschen und erneut durch das Zellsieb filtriert. Diese Zellsuspension wurde für 2 Minuten

bei 50 x g bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in der Dichtezentrifugationslösung Percoll (Santa Cruz Biotechnologies, Oregon, USA, Katalognr.: sc-500790A) aufgenommen. Die Lösung wurde für 10 Minuten bei 200 x g bei 4°C zentrifugiert. In dem danach erhaltenen Zellpellet waren die lebenden Hepatozyten enthalten. Das Zellpellet wurde in 20 ml Plattier-Medium resuspendiert und für 2 Minuten bei 50 x g bei 4°C zentrifugiert und das Zellpellet erneut in 20 ml Plattier-Medium resuspendiert.

### 2.3.4 Kultivierung der Primärzellen

Die Viabilität der Zellen wurde nach der Isolierung mit Trypanblau (Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland, Katalognr.: 15250061) überprüft. Im gleichen Zug wurde die Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und die Hepatozyten in den Kollagen-beschichteten-Zellkulturflaschen in Plattier-Medium ausplattiert. Drei Stunden nach dem Ausplattieren wurde das Medium gewechselt und die Primärzellen für einen Zeitraum von ein bis zwei Tagen bei 37 °C und 5% (v/v) CO<sub>2</sub> in Primär-Medium zusammengesetzt aus William's E Medium (Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland, Katalognr.: 12551032) mit 1% Glutamin (Biowest SAS France, Nuaille, Frankreich, Katalognr.: X0551-100) und 1% Pen/Strep kultiviert.

## 2.4 Zellkultur

### 2.4.1 Zelllinien

Für die vorliegende Arbeit wurden die Zelllinien HepG2 (DSMZ, Braunschweig, Germany, Katalognr.: ACC180), Huh7 (Cyton, Eppelheim, Deutschland, Katalognr.: 300156) und THP-1 (DSMZ, Braunschweig, Germany, Katalognr.: ACC16) verwendet.

**Tabelle 7: Zelllinien**

Zelllinie	Spezies	Gewebe	Krankheit	Zelltyp	Wachstumseigenschaften
<b>HepG2</b>	Homo sapiens	Leber	Hepatoblastom	Hepatozyt	Adhärent
<b>Huh7</b>	Homo sapiens	Leber	Hepatozelluläres Karzinom	Hepatozyt	Adhärent
<b>THP-1</b>	Homo sapiens	Blut	Akute monozytäre Leukämie	Monozyt	Nicht adhären / Suspension

### **2.4.2 Kultivierung**

Kultiviert wurden die Zelllinien, mit RPMI 1640 Medium, GlutaMAX™ Supplement Medium (Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland, Katalognr.: 61870-010) mit 10% (v/v) zugesetztem FCS (Biowest SAS France, Nuaillé, Frankreich, Katalognr.: S1400-500), bei 37°C und 5% (v/v) CO<sub>2</sub> in einem wasserdampfgesättigten Brutschrank, in Zellkulturflaschen. Auf antibiotische Zusätze wurde verzichtet.

### **2.4.3 Subkultivierung**

Sobald die adhärennten Zellen Konfluenz erreichten hatten, wurden sie mit 1 x PBS gewaschen und durch Behandlung mit Trypsin/EDTA-Lösung aus den Kulturflaschen gelöst. Nach circa 5 bis 10 Minuten wurde der Trypsin-Verdau mit dem 2-fachen Volumen Medium gestoppt. Die Suspension wurde homogenisiert und entsprechende Aliquote der Zellsuspension wurden in neue Kulturgefäße gegeben. Nicht adhärennte Zellen wurden circa alle drei bis vier Tage abzentrifugiert, in 1 x PBS gewaschen, resuspendiert und entsprechende Aliquote der Zellsuspension in neue Kulturgefäße gegeben.

### **2.4.4 Kryokonservierung**

Die Kryo-Gefäße wurden mit Zelllinie, Passage, Datum, Zellzahl und Experimentator gekennzeichnet. Zunächst wurden die adhärennten Zellen mit 1 x PBS gewaschen und durch Behandlung mit Trypsin/EDTA-Lösung aus den Kulturflaschen gelöst. Nach circa 5 bis 10 Minuten wurde der Trypsin-Verdau mit dem 2-fachen Volumen Medium gestoppt und eine, durch Zellzählung, definierte Anzahl von Zellen zentrifugiert. Als Einfriermedium wurde FCS mit 10% (v/v) DMSO versetzt. Darin wurden die Zellen resuspendiert und 2 Millionen Zellen pro Kryo-Gefäße in dem Gefrierbehälter Mr. Frosty™ bei -80°C weggefroren. Am nächsten Tag erfolgte die Umlagerung der Zellen von -80°C auf -150°C für die dauerhafte Lagerung. Um die Zellen wieder aufzutauen, wurde das Kryo-Gefäß unverzüglich im Wasserbad bei 37°C angetaut und die Zellsuspension in eine, mit Medium vor inkubierte, T-25 Zellkulturflasche überführt. Nach 24 Stunden wurde das Medium gewechselt.

### **2.4.5 Bestimmung der Viabilität und Zellzahl**

Zur gleichzeitigen Bestimmung der Viabilität und der Anzahl der Zellen wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Dazu wurden 10 µl der Zellsuspension 1:1 mit Trypanblau 0,4% (Thermo Fisher Scientific, Gibco™, New York, USA, Katalognr.: 15250061) verdünnt. Trypanblau ist ein Farbstoff, der selektiv abgestorbene oder perforierte Zellen dunkelblau färbt, indem er die Zellmembran dieser Zellen passieren kann. Bei Bedarf wurde auf diese Weise zusätzlich zur Zellzahlbestimmung das prozentuale Verhältnis lebender zu toten Zellen ermittelt.

### 2.4.6 Mykoplasmen PCR

Um die Abwesenheit von Mykoplasmen zu überprüfen, wurde regelmäßig eine PCR durchgeführt. Dafür wurden 200 µl Medienüberstand aus Zellkulturen entnommen, die zu 90% konfluent waren und keine antibiotischen Zusätze enthielten. Diese Überstände wurden gesammelt und bis zur PCR bei -20°C gelagert. Zur Probenvorbereitung wurden die Überstände vor der PCR 5 Minuten lang bei 95°C unter Schütteln erhitzt, zentrifugiert und dem PCR-Gemisch als Matrice hinzugefügt.

**Tabelle 8: Pipettieransatz für die Mykoplasmen-PCR**

Inhalt	Volumen [µl]
DNA-Vorlage (Überstand)	3
10x DreamTaq Puffer	3
Primer FW (10 µM)	0,25
Primer REV (10 µM)	0,25
dNTPs (10 mM)	0,25
DreamTaq DNA Polymerase (5 U/µl)	0,25
H <sub>2</sub> O	ad 30

**Tabelle 9: Primer Mykoplasmen PCR**

Primer	FW 5'- 3'	REV 5'- 3'
Mykoplasmen	GGCGAATGGGTGAGTAACACG	CGGATAACGCTTGCGACCTATG

Die PCR-Zyklusbedingungen bestanden aus einem anfänglichen Denaturierungsschritt bei 94°C für 5 Minuten gefolgt von 36 Zyklen, bestehend aus Denaturierung bei 94°C für 30 Sekunden, Hybridisierung bei 55°C für 2 Minuten und Elongation bei 72°C für 1 Minute und eine abschließende Verlängerung bei 72°C für 5 Minuten auf einem Prime Thermal Cycler (Produktnr.:5PRIMEG/02, Bibby Scientific Ltd, Vereinigtes Königreich).

Die PCR-Produkte wurden durch Agarosegelelektrophorese nachgewiesen, wobei die RNA als Mykoplasmen-frei galt, wenn kein Produkt im Gel sichtbar war. Eine erfolgreich durchgeführte PCR-Reaktion wurde durch eine 500 bp-Bande auf dem Agarosegel angezeigt. Positiv- und Negativkontrollen wurden in jedem PCR-Ansatz mitgeführt.

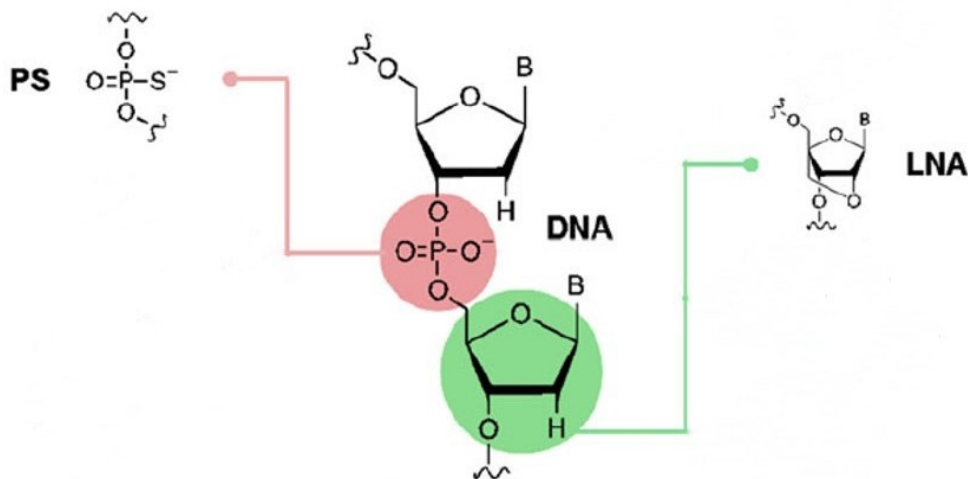
## 2.5 Zellkulturversuche- Transfektionen

### 2.5.1 *NEAT1*-Knockdown

Die gezielte Störung der Genexpression in Verbindung mit einer anschließenden Analyse des resultierenden Phänotyps erlaubt die Erschließung der Funktionsweise von Genen. Es existieren diverse Methoden zur Genomeditierung. RNA-Interferenz und Gapmere fungieren posttranskriptionell, während CRISPR-Cas per initialer Mutation wirkt. Die RNAi-Maschinerie ist größtenteils im Zytoplasma aktiv, weshalb für nukleäre Transkripte der im Nukleus lokalisierte, durch RNase H vermittelte Abbau der Gapmere effektiver ist. Des Weiteren kann die Transkription von lncRNAs selbst funktionelle Konsequenzen haben, weshalb die Reduzierung von lncRNAs auf posttranskriptioneller Ebene möglicherweise nicht immer ihren vollständigen Funktionsverlust-Phänotyp zeigt (Bassett et al., 2014; Boettcher & McManus, 2015).

#### 2.5.1.1 *NEAT1*-Antisense-LNA™-Gapmere

Gapmere sind synthetische, modifizierte Antisense-Oligonukleotide (AOs), die einen zentralen DNA-Teil enthalten, der den RNase-H-vermittelten RNA-Abbau aktiviert. Dieser Teil ist flankiert von modifizierten Oligonukleotiden, den sogenannten Locked Nucleic Acids (LNAs), sowie einem modifizierten Phosphorothioat (PS)-Rückgrat (siehe Abbildung 8). Die Modifikationen verbessern zum einen die Affinität der AOs zur Ziel-RNA sowie deren Resistenz gegenüber enzymatischer Degradierung.



**Abbildung 8: Strukturformel der Antisense LNA™-Gapmere (Lim und Yokota, 2020)**

Dargestellt ist die LNA-Gapmer Struktur in Haworth-Projektion (Lim und Yokota, 2020).

Der *NEAT1*-Knockdown wurde in 6-Well- oder 12-Well-Platten durchgeführt. Die Konzentration der Antisense LNA<sup>TM</sup>-Gapmere (QIAGEN, Hilden, Deutschland, Produktnummern und Sequenzen (siehe Tabelle 10) pro Well betrug 40 nM unter Verwendung des Transfektionsreagenzes INTERFERin® (Polyplus-Transfection, Illkirch, Frankreich, Katalognr.: 101000028), wie vom Hersteller empfohlen.

In diesem Zusammenhang wurden verschiedene Behandlungszeiträume sowie *NEAT1*-Antisense-LNA<sup>TM</sup>-Gapmer-Kombinationen getestet. Die Kombination aus *NEAT1*-Antisense-LNA<sup>TM</sup>-Gapmer 1 und 3 erwies sich bei einer Inkubationszeit von 48 Stunden als am effektivsten. Die Positivkontrolle und die Negativkontrolle hatten keinen Einfluss auf die Expression von *NEAT1*. Der *NEAT1*-Knockdown konnte mittels qPCR bestätigt werden.

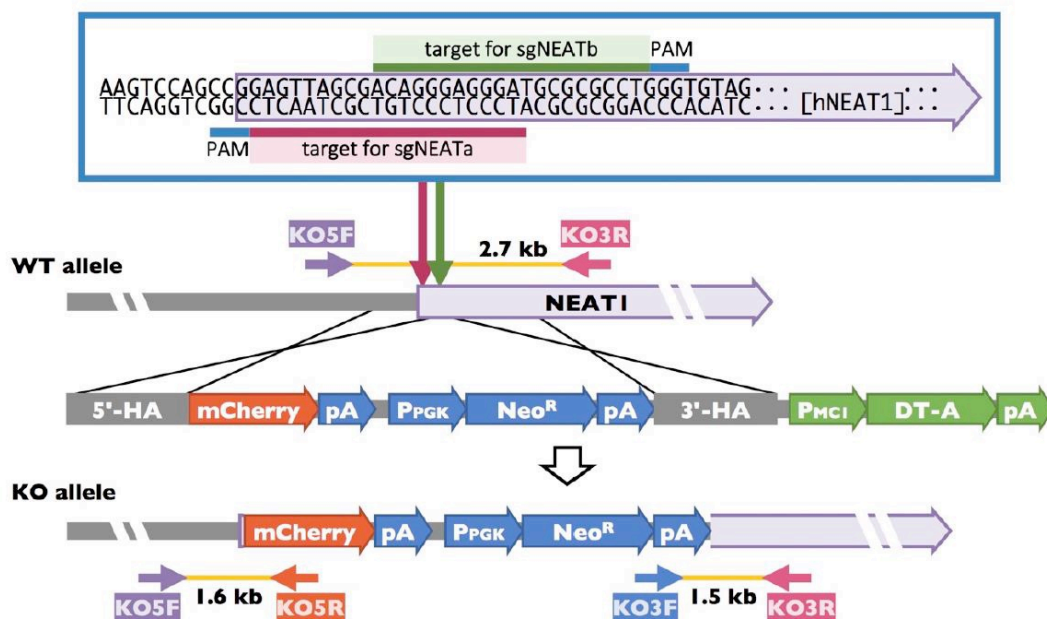
**Tabelle 10: LNA<sup>TM</sup>-Gapmere und Kontrollen**

Gapmer/Kontrolle	Sequenz 5' – 3'	Ziel	Produktnummer
Gapmer 1	CAAGGAAAGTCATCGC	<i>NEAT1_v2</i>	LG00778194
Gapmer 2	AATAGACGTGAGTGGA	<i>NEAT1_v2</i>	LG00778195
Gapmer 3	ATCGACCAAACACAGA	<i>NEAT1</i> (alle Transkripte)	LG00778196
Gapmer 7	TGTGGCATCAACGTTA	<i>NEAT1</i> (alle Transkripte)	LG00778200
Positivkontrolle	CGTTAACTAGGCTTTA	<i>MALAT1</i>	LG00000003-DDA
Negativkontrolle	AACACGTCTATACGC	-	LG00000002-DDA



### 2.5.1.2 *NEAT1*-Knockout (CRISPR-Cas)

Die bereits etablierten *NEAT1*-Knockout-Zellen wurden von Prof. Hiroyuki Tsuchiya (Faculty of Medicine, Tottori University, Tottori, Japan) in den Zelllinien Huh7 und HepG2 zur Verfügung gestellt. Nach initialen Untersuchungen wurde jedoch eine ausgeprägte Kontamination mit Mykoplasmen festgestellt. Daraufhin wurden die Plasmide für den *NEAT1*-Knockout zur Verfügung gestellt (siehe Abschnitt 2.9.2). Koyama et al. (2020) beschrieben das Konzept für den CRISPR-Cas basierten *NEAT1*-Knockdown (siehe Abbildung 9) (Koyama et al., 2020).



**Abbildung 9: *NEAT1*-CRISPR-Cas-Knockout Strategie (Koyama et al., 2020)**

Gezeigt sind die zwei verschiedenen sgRNAs (sgNEATa und sgNEATb). Sie zielen auf Stellen in der Nähe der Startstelle des *NEAT1*-Gens ab.

Die Plasmide psgNEAT1a (4) und psgNEAT1b (5) wurden jeweils mit dem Knock-in-Vektor pTarget-hNEAT1 (6) co-transfiziert. Die Zellzahl pro Well betrug  $2 \times 10^5$  HepG2-Zellen und wurde 24 Stunden im Voraus in 12-Well-Platten ausplattiert. Für die Transfektion wurden pro Well 0,75 µg psgNEAT1a (4) oder psgNEAT1b (5) mit 0,25 µg pTarget-hNEAT1 (6) in 50 µl OptiMEM (Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland, Katalog-Nr.: 31985062) verdünnt und 2 µl P3000 Reagenz zugegeben. Nach 3 Sekunden vortexen wurden 1,5 µl Transfektionsreagenz Lipofectamine™ 3000 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA, Katalog-Nr.: L3000015) in 50 µl OptiMEM verdünnt und der Plasmidansatz zugegeben. Der komplette Transfektionsansatz wurde für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und 100 µl tropfenweise in das Well pipettiert. Die Inkubation erfolgte über einen Zeitraum von 24 Stunden, anschließend wurde die

Transfektionseffizienz unter dem DMI8-Fluoreszenzmikroskop (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) analysiert. Die Zellen wurden mit Trypsin von der Platte abgelöst und in einer T25-Flasche mit dem Antibiotikum Geneticin™ (Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland, Katalog-Nr.: 10131035) selektiert, bis alle Zellen eine mCherry-Expression aufwiesen. Der Transfektionsprozess wurde in diesem Stadium wiederholt und die Zellen im Anschluss in einem Geneticin™-haltigen Medium (500 µg/ml) kultiviert. Der Erfolg des Knock-in-Prozesses konnte durch eine genomische DNA-PCR überprüft werden:

**Tabelle 11: Pipettieransatz für die CRISPR-Cas KO PCR**

	<b>WT-PCR</b>	<b>KO-PCR 5'</b>	<b>KO-PCR 3'</b>
<b>Inhalt</b>	<b>Volumen [µl]</b>	<b>Volumen [µl]</b>	<b>Volumen [µl]</b>
DNA-Template (100 ng/µl)	2	2	2
10X NZYTaq II Puffer	2,5	2,5	2,5
NZY MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,5	1,5	1,5
Primer KO5 FW (10 µM)	0,5	0,5	-
Primer KO5 REV (10 µM)	-	0,5	-
Primer KO3 FW (10 µM)	-	-	0,5
Primer KO3 REV (10 µM)	0,5	-	0,5
dNTPs (10 mM)	0,5	0,5	0,5
DMSO	1,25	1,25	1,25
NZYTaq II DNA Polymerase (5 U/µl)	0,5	0,5	0,5
H <sub>2</sub> O	15,75	15,75	15,75
Produktgröße	2713 bp	1631 bp	1518 bp

**Tabelle 12: Primer CRISPR-Cas KO PCR**

<b>Primer</b>	<b>FW 5' - 3'</b>	<b>REV 5' - 3'</b>
hNEAT-KO5	AGACTGATGGGGCAGATCCT	CCATGTTATCCTCCTCGCCC
hNEAT-KO3	AGGGGATCCGCTGTAAGTCT	ACCACGGTCCATGAAGCATT

Die PCR-Zyklusbedingungen umfassten einem anfänglichen Denaturierungsschritt bei 94°C für 3 Minuten gefolgt von 35 Zyklen, bestehend aus Denaturierung bei 94°C für 30 Sekunden, Hybridisierung bei 65°C für 30 Sekunden und Elongation bei 72°C für 90 Sekunden und eine abschließende Verlängerung bei 72°C für 5 Minuten in einem Prime Thermal Cycler (Produktnr.:5PRIMEG/02, Bibby Scientific Ltd, UK). Die PCR-Produkte wurden mittels Agarosegelelektrophorese analysiert. Das Produkt der WT-PCR ist 2713 bp groß, das Produkt der KO-5'-PCR ist 1631 bp groß und das Produkt der KO-3'-PCR ist 1518 bp groß.

## 2.5.2 siRNA-HuR/ELAVL1-Knockdown

Der RNAi vermittelte Knockdown wurde mit siRNA initiiert. Diese siRNA wurde mit siMAX Eurofins Genomics designed und zielt auf das RBP HuR/ELAVL1 (siehe Tabelle 13). Der HuR/ELAVL1-Knockdown wurde in 6-Well, 12-Well oder 24-Well-Platten durchgeführt. Die Konzentration der HuR/ELAVL1 siRNA betrug 20 nM pro Well (siehe Tabelle 14). Für den Transfektionsmix wurde die siRNA in serumfreien RPMI 1640 Glutamax vorgelegt und durch vorsichtiges auf- und abpipettieren vermischt. Anschließend wurde das Transfektionsreagenz INTERFERin® (Polyplus-Transfection, Illkirch, Frankreich, Katalognr.: 101000028) zugegeben, durch vortexen vermischt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit wurde das Medium der Well-Platten mit frischem Medium ersetzt. Der Transfektionsmix wurde im Anschluss der Inkubationszeit tropfenweise ins Well pipettiert und durch Schwenken der Platten vermischt. Den stärksten siRNA HuR-Knockdown erhielt man mit siRNA 1 nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden. Eine Negativkontrolle wurde stets mitgeführt und hatte keinen Einfluss auf die HuR/ELAVL1-Expression. Der HuR/ELAVL1-Knockdown wurde per qPCR bestätigt.

**Tabelle 13: siRNA-Sequenzen**

siRNA	Sequenz 5' – 3'	Ziel	Spezies
1	AAG UAG CAG GAC ACA GCU UGG	HuR/ELAVL1	Human / Murin
2	GAC GCC AAC UUG UAC AUC A	HuR/ELAVL1	Human
3	GUG AUC CGC GAC UUC AAC A	HuR/ELAVL1	Human
NC	UUU GUA AUC GUC GAU ACC C	Negativkontrolle	-

**Tabelle 14: siRNA HuR/ELAVL1**

	6-Well	12-Well	24-Well
siRNA (10µM)	5,4 µl	2 µl	1,2 µl
Serumfreies Medium	380 µl	140 µl	100 µl
INTERFERin®	6,75 µl	2,5 µl	1,5 µl
Volumen pro Well	2700 µl	1000 µl	600 µl

### **2.5.3 HuR/ELAVL1 Überexpression**

Für die Untersuchungen zur Überexpression von HuR/ELAVL1 wurden die Plasmide gemäß den Angaben des Herstellers mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamine™ 3000 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA, Katalog-Nr.: L3000015) in HepG2-Zellen eingebracht. In jeder der 12-Well-Platten wurden  $2 \times 10^5$  HepG2-Zellen in 1 ml Wachstumsmedium pro Well ausplattiert. Für jedes Well wurde eine Plasmid-DNA-Konzentration von 1 µg in einem Gesamtvolumen von 100 µl OptiMEM mit 1,5 µl Lipofectamine™ 3000 und 2 µl P3000 Reagenz gemischt und vor der Zugabe zu den HepG2-Zellen 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden für 24 oder 48 Stunden nach der Transfektion mit pZeoSV+HuR oder dem pZeoSV-HuR-Kontrollkonstrukt inkubiert und anschließend geerntet. Die Transfektionseffizienz wurde unter dem DMI8-Fluoreszenzmikroskop (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) analysiert und per qPCR überprüft.

### **2.5.4 TTP/ZFP36 Überexpression**

Zur Überexpression von TTP/ZFP36 wurden die Plasmide (siehe Abschnitt 2.9.4) gemäß den Angaben des Herstellers mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamine™ 3000 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA, Katalog-Nr.: L3000015) in HepG2-Zellen eingebracht. In jeder der 12-Well-Platten wurden  $2 \times 10^5$  HepG2-Zellen in 1 ml Wachstumsmedium pro Well ausplattiert. Für jedes Well wurde eine Plasmid-DNA-Konzentration von 1 µg in einem Gesamtvolumen von 100 µl OptiMEM mit 1,5 µl Lipofectamine™ 3000 und 2 µl P3000 Reagenz gemischt und vor der Zugabe zu den HepG2-Zellen 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden für 24 oder 48 Stunden nach der Transfektion mit TTP-Sense-Plasmid oder dem TTP-Antisense-Kontrollkonstrukt inkubiert und anschließend geerntet. Die Transfektionseffizienz wurde unter dem DMI8-Fluoreszenzmikroskop (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) analysiert und per qPCR überprüft.

## 2.6 Zellkulturversuche- Substanzbehandlungen

### 2.6.1 *In Vitro* MASLD Modelle

#### 2.6.1.1 Fettsäuren (Palmitinsäure und Ölsäure)

Die Behandlung mit Palmitinsäure (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland, Katalognr.: P0500-10G) und/oder Ölsäure (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland, Katalognr.: O1383-1G) erfolgte in 12-Well-Platten (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland, Katalognr.: 83.3921.005). Dazu wurden die Fettsäuren mit FFA-freiem BSA (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland, Katalognr.: A8806-5G) im Molekularverhältnis 6:1 komplexiert und sterilfiltriert. Am ersten Tag wurden  $2 \times 10^5$  HepG2-Zellen pro Well ausplattiert. Nach 24 Stunden wurde das Medium entfernt, einmal mit PBS gewaschen und 1 ml der in Medium vorbereiteten Substanz zu den Zellen gegeben sowie FFA-freies BSA als Kontrolle mitgeführt. Nach 24 Stunden Inkubation wurden die Platten dreimal mit PBS gewaschen und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

#### 2.6.1.2 Fettsäure + Cytokin (Ölsäure + TNF- $\alpha$ )

Die Behandlung mit 10 ng/ml Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland, Katalognr.: H8916-10UG) erfolgte in 12-Well-Platten (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland, Katalognr.: 83.3921.005). Am ersten Tag wurden  $2 \times 10^5$  HepG2-Zellen pro Well ausplattiert. Nach 24 Stunden wurde das Medium entfernt, einmal mit PBS gewaschen und 1 mM Ölsäure auf die Zellen gegeben. Die Inkubationszeit der Ölsäure betrug 24 Stunden und die Inkubationszeit von TNF- $\alpha$  2 Stunden. Im Anschluss wurden die Platten dreimal mit PBS gewaschen und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

#### 2.6.1.3 Fruktose-Behandlung

Die physiologische Konzentration von Fruktose beträgt circa 0,05 bis 0,5 mM, wobei 10 bis 25 mM als realistisch wirksame Konzentrationen *in vitro* gelten, ohne zu toxisch zu sein (Piras et al., 2020). Die Behandlung mit 20 mM Fruktose (AppliChem, Darmstadt, Deutschland, Katalognr.: 142728.1210) in bidest. H<sub>2</sub>O wurde gewählt und erfolgte in 12-Well-Platten (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland, Katalognr.: 83.3921.005). Am ersten Tag wurden  $2 \times 10^5$  HepG2-Wildtyp-Zellen oder HepG2-NEAT1-KO-Zellen pro Well ausplattiert. Die Inkubationszeit betrug eine Woche, wobei die Substanzlösung zweimal erneuert wurde. Am Ende der Inkubation wurden die Platten zweimal mit PBS gewaschen und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

#### **2.6.1.4 DMSO-Langzeitbehandlung**

Die Behandlung mit 1% (v/v) DMSO (Chemsolute, Th. Geyer GmbH & Co KG, Renningen, Deutschland, Katalognr.: 2308.0100) erfolgte in T25-Flaschen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland, Katalognr.: 83.3910.002). Die Inkubationszeit betrug einen Monat, wobei DMSO mit jeder Subkultivierung ins Medium gegeben wurde. Am Ende der Inkubation wurden die Zellen in 12-Well-Platten (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland, Katalognr.: 83.3921.005) ausgesät. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen, der gleichen Passage. Die Platten wurden nach 72 Stunden zweimal mit PBS gewaschen und bei -80°C eingefroren.

#### **2.6.2 EZH2-Inhibitor GSK126**

Histonmodifikationen spielen bei der Regulierung der Genexpression eine zentrale Rolle, indem sie die Chromatinstruktur und damit die Zugänglichkeit der DNA für Transkriptionsfaktoren und andere regulatorische Proteine beeinflussen. Die Methylierung an den Histonen H3K4, H3K36 und H3K79 wird im Allgemeinen mit Genaktivierung assoziiert, während die Methylierung an den Histonen H3K9 und H3K27 im Allgemeinen mit Genunterdrückung in Verbindung gebracht wird. Die Histon-Lysin-Methylierungen unterliegt einer dynamischen Regulation durch spezifische Methyltransferasen und Demethylasen. Enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit (EZH2) ist die katalytische Untereinheit des Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2), die die Trimethylierung von Histon H3-Lysin 27 (H3K27me3) an Zielpromotoren katalysiert, um die Transkription der zugehörigen Gene zu unterdrücken. GSK126 ist ein starker, hochselektiver Inhibitor von EZH2.

Die Behandlung von HepG2-Zellen ( $1,5 \times 10^5$  Zellen/12-Well-Platte) mit dem EZH2-Inhibitor GSK126 (MedChemExpress (MCE), Monmouth Junction, NJ, USA, Katalog-Nr.: HY-13470) wurde in 12-Well-Platten (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland, Katalog-Nr.: 83.3921.005) durchgeführt. Die Konzentration von GSK126 pro Well betrug 10  $\mu$ M bei einer Inkubationszeit von 48 Stunden und 72 Stunden. Am Ende der Inkubation wurden die Platten zweimal mit PBS gewaschen und bei -80°C eingefroren.

### 2.6.3 Actinomycin D-Assay

Actinomycin D (ActD) ist ein Transkriptionsinhibitor, der durch Interkalation in die DNA eine Hemmung der DNA-abhängigen RNA-Polymerase vermittelt. Diese Eigenschaft ermöglicht die Analyse der Stabilität und Halbwertszeit der RNA nach verschiedenen Zeitpunkten.

Der Actinomycin D-Assay wurde mit HepG2-Zellen in 24-Well-Platten mit einer Zellzahl von  $7,5 \times 10^4$  Zellen pro Well durchgeführt. Insgesamt wurden sechs 24-Well-Platten für sechs Actinomycin D-Inkubationszeiträume vorbereitet. 24 Stunden nach der Ausplattierung der Zellen wurden diese mit 20 nM siRNA HuR/ELAVL1 oder der unspezifischen siRNA-Kontrolle transfiziert und für 48 Stunden inkubiert (siehe Abschnitt 2.5.2). Im Anschluss erfolgte die Behandlung für 0 h, 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h und 8 h mit 0,01 mg/ml Actinomycin D (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA, Katalognr.: A9415-2MG) oder der DMSO-Kontrolle im Triplikat (siehe Tabelle 15). WT steht an dieser Stelle für HepG2-Zellen ohne siRNA-Transfektion. Am Ende der Inkubation wurden die Platten zweimal mit PBS gewaschen und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

**Tabelle 15: Plattenschema Actinomycin D-Assay**

24-Well-Platte	1	2	3	4	5	6
A	WT ActD	WT ActD	WT ActD	WT DMSO	WT DMSO	WT DMSO
B	siHuR ActD	siHuR ActD	siHuR ActD	siHuR DMSO	siHuR DMSO	siHuR DMSO
C	siKontrolle ActD	siKontrolle ActD	siKontrolle ActD	siKontrolle DMSO	siKontrolle DMSO	siKontrolle DMSO
D	-	-	-	-	-	-

## 2.7 Co-Kultur

Für das Co-Kultur Experiment wurde am ersten Tag  $4 \times 10^5$  HepG2-Zellen pro Well in 12-Well-Platten (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland, Katalognr.: 83.3921.005) ausplattiert. Parallel wurde in einer weiteren 12-Well-Platte 1,5 ml Medium vorgelegt und Zellkultureinsätze (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland, Katalognr.: 83.3931.041) eingesetzt. Diese wurden für einige Minuten mit dem Medium inkubiert, um eine vollständige Benetzung zu gewährleisten. Im Anschluss wurden  $2 \times 10^5$  THP-1-Zellen pro Insert hinzugefügt und diese für 24 Stunden mit 100 nM Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) differenziert. Am zweiten Tag wurde die Co-Kultivierung gestartet. Die Zellkultureinsätze mit den differenzierten THP-1 Zellen wurden dreimal mit 1 x PBS gewaschen, zu den HepG2-Zellen transferiert und 500 µl Medium hinzugefügt. In drei Zellkultureinsätze wurde zusätzlich 100 ng/ml LPS pipettiert. Am dritten Tag wurden die Überstände abgenommen und die Zellen dreimal mit 1 x PBS gewaschen und bei -80°C eingefroren.

## 2.8 Bakterienkultur

Die Bakterien wurden unter Standardbedingungen in einem mit Ampicillin versetzten LB-Medium (engl.: lysogeny broth) kultiviert oder zur Züchtung von Einzelklonen auf LB-Amp-Agarplatten ausgestrichen.

### 2.8.1 Kompetente Bakterien

Der Escherichia coli (E. coli) -Stamm TOP10 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA, Katalognr.: C404003) des Genotyps *F-mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80LacZΔM15 Δ LacX74 recA1 araD139 Δ(araleu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG* ist ein chemisch kompetenter Bakterienstamm, der als Wirtsorganismen für Plasmidamplifikationen verwendet wurde.

### 2.8.2 Klonierung von DNA-Fragmenten

Die DNA-Fragmente wurden zunächst durch Amplifikation per PCR erhalten und die Fragmentlänge in einem Agarosegel, mit der DNA-Leiter für den ultra-niedrigen Bereich (ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, USA, Katalognr.: 10597012), verifiziert. Mit dem GenJET Gel Extraktionskit (ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, USA, Katalognr.: K0691) wurden die DNA-Fragmente aus dem Agarosegel nach Angaben des Herstellers extrahiert (25 µl Elutionsvolumen) und die DNA-Konzentration bestimmt. Im Anschluss wurden die DNA-Fragmente in ein pGEM®-T-Vektor-System (Promega, Walldorf, Deutschland, Katalognr.: A3600) kloniert.



Der pGEM®-T Vektor ist ein linearisiertes Plasmid, das an beiden Enden ein einzelnes 3'-terminales Thymidin aufweist. Diese T-Überhänge verbessern die Effizienz der Ligation der DNA-Fragmente, indem sie die Rezirkularisierung des Vektors verhindern und einen Überhang für die DNA-Fragmente, die einen A-Überhang enthalten, bereitstellen. Für die Ligation wurden 15 bis 40 ng der extrahierten DNA verwendet und erfolgte nach Angaben des Herstellers.

### 2.8.3 Transformation

Im Anschluss an die Ligation erfolgte die Transformation der TOP10 E. coli Bakterien nach Angaben des Herstellers des pGEM®-T-Vektor-Systems (Promega, Walldorf, Deutschland, Katalognr.: A3600). 100 µl und 300 µl des Transformationsansatzes wurden auf LB-Amp-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Kolonien wurden am Folgetag gepickt und in einem Reaktionsgefäß mit 6 ml LB-Amp-Medium über Nacht bei 37°C geschüttelt.

## 2.9 Plasmide

### 2.9.1 Plasmid-Analyse

#### 2.9.1.1 Analytischer Verdau mit Restriktionsendonukleasen

Zur Überprüfung der rekombinanten Plasmide wurde ein analytischer Verdau mit Restriktionsendonukleasen durchgeführt. Die Auswahl geeigneter Restriktionsendonukleasen erfolgte anhand der Sequenz der Plasmide (Plasmid-Mappe). Diese spalten die dsDNA/Plasmide an einer spezifischen Sequenz von 4 bis 8 Basen, wodurch das Plasmid linearisiert oder fragmentiert wird. Das Volumen des Ansatzes betrug 30 µl, wobei 500 ng Plasmid-DNA in Wasser für molekularbiologische Zwecke, 0,5 µl Restriktionsenzym und 3 µl 10 x CutSmart-Puffer (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland, Katalognr.: B6004) enthalten waren. Der Ansatz wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde das Reaktionsgemisch auf einem 1% (m/v) Agarosegel bei 100 V für 45 Minuten laufen gelassen und anschließend analysiert.

#### 2.9.1.2 Sequenzierung

Die Plasmide wurden von Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland, Produkt: *Sanger-Sequenzierung von Plasmiden und PCR-Produkten in Tubes mit TubeSeq Supreme*) sequenziert.

### 2.9.2 *NEAT1*-Knockout-Plasmide (CRISPR Cas)

Die Plasmide psgNEAT1a, exprimiert SpCas9 und eine sgRNA, die auf humanes *NEAT1* abzielt (siehe Abbildung A 3), psgNEAT1b, exprimiert SpCas9 und eine weitere sgRNA, die auf humanes *NEAT1* abzielt und pTarget-hNEAT1, ein Knock-in-Vektor, der auf das humane *NEAT1*-Gen abzielt (siehe Abbildung A 4), wurden im Rahmen einer Kooperation von Prof. Hiroyuki Tsuchiya (Division of Medical Genetics and Regenerative Medicine, Faculty of Medicine, Tottori University, Japan) zur Verfügung gestellt. Nach Erhalt der Plasmide wurde das entsprechende Filterpapier in einem Reaktionsgefäß in 30 µl TE-Puffer für 30 min inkubiert. Anschließend wurde das Filterpapier entfernt und die Konzentration der Plasmide gemessen. Im Anschluss wurde ein analytischer Verdau mit Restriktionsenzymen durchgeführt (siehe Tabelle A 3). Die Überprüfung der Fragmentanzahl und -länge erfolgte im Agarosegel mit der GeneRuler-1-kb-Plus-DNA-Leiter (ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, USA, Katalognr.: SM1331).

### 2.9.3 HuR/ELAVL1-Überexpressionsplasmid

Die Plasmid-Konstrukte pZeoSV2+HuR, pZeoSV-HuR sowie pZeoSV2- wurden von der Arbeitsgruppe Prof. Kiemer (Pharmazeutische Biologie, Universität des Saarlandes, Deutschland) zur Verfügung gestellt und aus Glycerolstocks aufgearbeitet (siehe Abbildung A 5). Als antibiotischer Zusatz wurde Zeocin™ (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland, Katalog-Nr.: R25001) verwendet. Ein analytischer Verdau wurde mit dem Restriktionsenzym Hind III gemäß Abschnitt 2.9.1.1 durchgeführt. Die Überprüfung der Länge des linearisierten Plasmids im Vergleich zum Leervektor erfolgte im Agarosegel mit der GeneRuler-1-kb-Plus-DNA-Leiter (ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, USA, Katalognr.: SM1331).

### 2.9.4 TTP/ZFP36-Überexpressionsplasmid

Die Plasmid-Konstrukte pZeoSV2-TTP-S, pZeoSV2-TTP-AS sowie pZeoSV2 wurden von der Arbeitsgruppe Prof. Kiemer (Pharmazeutische Biologie, Universität des Saarlandes, Deutschland) zur Verfügung gestellt und aus Glycerolstocks mit Verwendung des Antibiotikums Zeocin™ (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland, Katalog-Nr.: R25001) aufgearbeitet. Im Anschluss wurde ein analytischer Verdau mit dem Restriktionsenzym Bamh I, welches das Sense-Plasmid in 2 Fragmente schnitt und das Antisense-Plasmid linearisierte, durchgeführt (siehe Abschnitt 2.9.1.1). Die Überprüfung der Fragmentanzahl und -länge erfolgte im Agarosegel mit der GeneRuler-1-kb-Plus-DNA-Leiter (ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, USA, Katalognr.: SM1331).

## **2.9.5 qPCR-Standard-Plasmide**

Die PCR-Produkte der Primer-Sequenzen (siehe Tabelle 20 + Tabelle 21), welche im Rahmen der Temperatur-Gradienten-qPCR-Analyse erhalten wurden, wurden gemäß Abschnitt 2.8.2 kloniert, um die Standards für die qPCR zu erstellen.

## **2.10 DNA-Isolierung**

### **2.10.1 Isolierung bakterieller DNA**

Zur Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen wurde das GeneJET Plasmid Miniprep Kit (ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, USA, Katalognr.: K0502/K0503) verwendet. Im ersten Schritt wurde der Bakterienansatz in mehreren Schritten für 3 Minuten bei 6000 U/min in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 250 µl Resuspensionslösung mit 2,5 µl RNase A resuspendiert. Dazu wurden 250 µl Lysierungslösung zugegeben und der Ansatz vorsichtig invertiert. Nach Zugabe der Neutralisierungslösung wurde sofort 6- bis 8-mal intensiv invertiert. Diese Suspension wurde für 5 Minuten bei 12000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das gleiche Volumen eiskaltes Isopropanol zugegeben. Der Ansatz wurde über die GeneJET-Spin-Säule gegeben und, wie in den Angaben des Herstellers beschrieben, gewaschen. Anschließend wurde er mit dem für 5 Minuten bei 60°C vorgewärmten Elutionspuffer eluiert.

### **2.10.2 Bestimmung der DNA-Konzentrationen**

Die Quantifizierung der DNA-Konzentration erfolgte mit dem Spektrometer (DeNovix DS-11FX, DeNovix Inc., Wilmington, DE, USA).

### **2.10.3 Isolierung von DNA aus Zelllinien**

Für die Isolierung von DNA wurde die entsprechende mit Trypsin von der Flasche gelöst und das Zellpellet mit 1 x PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in einer Verdauungslösung aus 30 µl Dream-Taq-Puffer, 6 µl Proteinase K (20 mg/ml), 1,5 ml RNase A und H<sub>2</sub>O ad 300 µl gelöst und für 2 Stunden bei 55°C geschüttelt. Im Anschluss wurde die Verdauungslösung für 15 Minuten bei 95°C inaktiviert und für 10 Minuten bei Raumtemperatur und maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit 30 µl 3 M Natrium-Acetat-Lösung sowie 660 µl Ethanol 96% (v/v) bei -20°C über Nacht inkubiert. Das Gemisch wurde mit maximaler Geschwindigkeit für 10 Minuten zentrifugiert und das Pellet zweimal mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen. Im letzten Schritt wurde das Pellet bei 37°C für mindestens 30 Minuten getrocknet und in 50 bis 100 µl H<sub>2</sub>O unter Schütteln für 10 Minuten bei 65°C gelöst.

## **2.11 Agarosegelelektrophorese**

### **2.11.1 Auftrennung und Visualisierung von DNA**

Die Agarosekonzentration des Gels wurde in Abhängigkeit von der Größe des DNA-Fragments zwischen 1% und 3% (m/v) gewählt und die Agarose (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland, Katalognr.: 3810.3) in 100 ml 1 x TAE-Puffer aufgekocht. Anschließend wurden 100 µl Ethidiumbromid-Lösung (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland, Katalognr.: HP47.1) zugegeben. Die DNA wurde mit dem TriTrack DNA-Ladefarbstoff (6 x) (ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, USA, Katalognr.: R1161) versetzt, auf das Agarosegel aufgetragen und bei 100 V in 1 x TAE-Puffer in einem Mupid-One Elektrophorese-System (Nippon Genetics, Düren, Deutschland Katalognr.: ON-MS) aufgetrennt. Zur Bestimmung der Größe der DNA wurde eine 300-bp-GeneRuler-Ultra-Low-Range-DNA-Leiter (ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, USA, Katalognr.: SM1213) oder eine GeneRuler-1-kb-Plus-DNA-Leiter (ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, USA, Katalognr.: SM1331) verwendet. Die Detektion der DNA-Banden erfolgte unter Verwendung eines UV-Transilluminators (Stratagene Eagle Eye II) sowie der Software INTAS GDS Touch 2.

### **2.11.2 Auftrennung und Visualisierung von RNA**

Alle verwendeten Bestandteile der Agarosegelelektrophorese wurden über Nacht in einer 0,1% (m/v) SDS-Lösung inkubiert und anschließend mit DEPC-Wasser gewaschen. 0,5 g Agarose wurde in 50 ml 1 x TAE-Puffer (hergestellt mit DEPC-Wasser) aufgekocht und mit 50 µl Ethidiumbromid-Lösung (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland, Katalognr.: HP47.1) versetzt. Die Konzentration der RNA wurde auf 3,5 µg/ 10 µl eingestellt und mit 2 µl TriTrack-DNA-Ladefarbstoff (6 x) (ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, USA, Katalognr.: R1161) für 15 Minuten bei 65°C denaturiert. Im sofortigen Anschluss wurden die Proben auf das Agarosegel aufgetragen und bei 100 V in 1 x TAE-Puffer (hergestellt mit DEPC-Wasser) für 30 Minuten aufgetrennt. Die Detektion der DNA-Banden erfolgte unter Verwendung eines UV-Transilluminators (Stratagene Eagle Eye II) sowie der Software INTAS GDS Touch 2.

## **2.12 RNA-Isolierung and reverse Transkription**

Zu Beginn der Untersuchungen wurde die RNA aus Zellen mittels des innuSOLV RNA-Reagenzes und nachfolgend mit dem High Pure RNA Isolation Kit isoliert. Die Isolierung der RNA aus Gewebe erfolgte initial mit dem innuSOLV RNA-Reagenz und nachfolgend mit dem DirectZol™ RNA Miniprep Kit.

### **2.12.1 RNA-Isolierung**

#### **2.12.1.1 RNA-Isolierung von Zellen mittels innuSOLV RNA-Reagenz**

Um die Gesamt-RNA zu isolieren, wurde für eine 12-Well-Platte 600 µl innuSOLV RNA-Reagenz (Analytik Jena, AJ Innuscreen, Berlin, Deutschland, Katalognr.: 845-SB-2090100) pro Well verwendet, um die Zellen von der Platte zu lösen. Die Zellsuspension wurde gevortext, für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und 200 µl Chloroform zugegeben. Die Mischung wurde für 15 Sekunden gevortext, 10 Minuten auf Eis inkubiert und für zweimal 8 Minuten bei 4°C und 12,0 x g zentrifugiert. Erwartungsgemäß waren drei differenzierbare Phasen im Reaktionsgefäß zu erkennen: eine untere rötliche Phenol-Chloroform-Phase, eine weißliche Interphase bestehend aus Proteinen und DNA und eine obere, klare wässrige Phase mit der enthaltenen RNA. Der wässrige Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die RNA wurde durch Zugabe von gleichem Volumen eiskaltes 100% Isopropanol bei -20°C über 2 bis 3 Stunden ausgefällt. Zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben für 10 Minuten bei 4°C und 21,0 x g zentrifugiert und die resultierenden Pellets zwei Mal mit eiskaltem 70% (v/v) Ethanol gewaschen, bei 37°C für 30 Minuten getrocknet und in Wasser für molekularbiologische Zwecke gelöst. Im letzten Schritt wurde die RNA für 15 Minuten bei 60°C unter leichtem Schütteln erhitzt und anschließend bei -20°C gelagert.

#### **2.12.1.2 RNA-Isolierung von Zellen mittels High Pure RNA Isolation Kit**

Die Isolation von RNA aus den verwendeten Zelllinien erfolgte mit dem High Pure RNA Isolation Kit (Roche, Deutschland, Katalognr.: 11828665001) und den dazugehörigen Puffern nach Angaben des Herstellers. Hierzu wurden Zellen in einer 12-Well-Platte kultiviert, dreimal mit 1 x PBS gewaschen und die Zellen anschließend bei -80°C eingefroren, bevor die RNA mithilfe des Kits isoliert wurde. Für eine kurze Lagerung wurde die RNA anschließend bei -20°C, für eine langfristige Lagerung bei -80°C eingefroren.

### **2.12.1.3 RNA-Isolierung von Lebergewebe mittels innuSOLV RNA-Reagenz**

Für die RNA-Isolierung aus Lebergewebe der Mäuse aus Abschnitt 2.2.2 und 2.2.3 wurde 100 µl innuSOLV RNA-Reagenz in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß vorgelegt. Anschließend wurden die bei -80°C gelagerten Lebergewebe für die folgende Prozedur auf Trockeneis gelagert. Mit einem Skalpell wurde ein circa 5 mg schweres Stück abgetrennt und zu dem innuSOLV RNA-Reagenz gegeben. Dieses wurde mit dem Gewebezerkleinerer Mixy Professional (FastGene® Nippon Genetics, Düren, Deutschland) homogenisiert, weitere 400 µl innuSOLV RNA-Reagenz hinzugegeben, gevortext und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. 200 µl Chloroform wurden zugegeben und nach gleicher Vorgehensweise fortgefahren wie in Abschnitt 2.12.1.1 beschrieben.

### **2.12.1.4 RNA-Isolierung von Lebergewebe mittels Direct-zol™ RNA Miniprep Kit**

Um die Gesamt-RNA aus den Lebergeweben der Mäuse aus Abschnitt 2.2.1 zu isolieren, wurde in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß 200 µl TRI Reagent® (Zymo Research Europe GmbH, Freiburg, Deutschland, Katalognr.: R2053) vorgelegt. Anschließend wurden die bei -80°C gelagerten Lebergewebe für die folgende Prozedur auf Trockeneis gelagert. Mit einem Skalpell wurde ein circa 5 mg schweres Stück abgetrennt und zu dem TRI Reagent® gegeben. Dieses wurde mit dem Gewebezerkleinerer Mixy Professional (FastGene® Nippon Genetics, Düren, Deutschland) homogenisiert, weitere 200 µl TRI Reagent® hinzugegeben, 10 Sekunden gevortext und 1 Minuten bei Raumtemperatur und 14,0 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und die RNA anschließend mithilfe des Kits nach Angaben des Herstellers isoliert. Das Elutionsvolumen betrug 50 µl.

### **2.12.2 DNA-Verdau**

Die Gesamt-RNA, die mittels des innuSOLV RNA-Reagenz extrahiert wurde (siehe 2.12.1.1 und 2.12.1.3), wurde nach Konzentrationsbestimmung einem DNA-Verdau unterzogen, um eine Kontamination mit genomischer DNA auszuschließen, da diese in der qPCR nicht von cDNA unterschieden werden kann. Verwendet wurde das DNA-free™ Kit (Ambion, Life technologies, USA, Katalognr.: AM1906) gemäß den Angaben des Herstellers.

### **2.12.3 Bestimmung der RNA-Konzentration**

Die Konzentration der isolierten RNA wurde mit einem Spektrophotometer DS-11 FX+ (DeNovix Inc., Wilmington, DE, USA) quantifiziert und RNA mit einem A260/A280-Verhältnis von mehr als 1,7 wurde für weitere Experimente verwendet. Niedrigere Werte können auf das Vorhandensein von Verunreinigungen wie Proteinen hinweisen.

## 2.12.4 Alu-PCR

Um die Abwesenheit von DNA in den, aus menschlichem Ursprung stammenden, RNA-Präparaten zu bestätigen, wurde eine PCR auf Alu-Elemente durchgeführt. Diese sind repetitive Sequenzen, die aufgrund einer Erkennungsstelle für das Restriktionsenzym Alu I ihren Namen erhielten (Houck et al., 1979). Sie gehören zu den, im menschlichen Genom am häufigsten vorkommenden, kurzen verteilten Nukleotidelementen (engl.: *short interspersed nucleotide elements*, SINE).

Die PCR wurde mit dem folgenden Primer durchgeführt:

5'-TCATGTCGACGCGAGACTCCATCTCAAA-3'

Als Positivkontrolle dienten 100 ng genomische DNA, isoliert aus der Zelllinie HepG2.

**Tabelle 16: Pipettieransatz Alu-PCR**

Inhalt	
RNA-Probe	100 ng
10 x Genescript Taq-Puffer	2,5 µl
Primer (50 µM)	0,5 µl
dNTPs (10 mM)	0,5 µl
Genescript DNA-Polymerase (5U/µl)	0,5 µl
H <sub>2</sub> O	ad 25 µl

Die PCR Zyklusbedingungen bestanden aus einem anfänglichen Denaturierungsschritt bei 94°C für 5 Minuten gefolgt von 30 Zyklen, bestehend aus Denaturierung bei 94°C für 60 Sekunden, Hybridisierung bei 56°C für 60 Sekunden und Elongation bei 72°C für 120 Sekunden und eine abschließende Verlängerung bei 72°C für 10 Minuten auf einem Prime Thermal Cycler (Produktnr.:5PRIMEG/02, Bibby Scientific Ltd, Vereinigtes Königreich)

Die PCR-Produkte wurden durch Agarosegelelektrophorese nachgewiesen, wobei die RNA als DNA-frei galt, wenn kein Produkt im Gel sichtbar war.

## **2.12.5 RNA-Integrität**

Das Vorhandensein von RNA zeigt die Expressionsaktivität der entsprechenden Gene an. Jedoch ist RNA aufgrund der hohen Aktivität von Ribonukleasen (RNasen) relativ instabil, da diese den Abbau der RNA entweder von den terminalen Enden der RNA durch Exoribonukleasen oder durch interne Spaltung durch Endoribonukleasen katalysieren. Das Ergebnis ist der Abbau der RNA und der Verlust ihrer Integrität. Ein Maß für die Integrität der RNA ist die RNA Integrity Number (RIN), ein numerischer Wert, der die Qualität der RNA beschreibt. Die RIN-Skala reicht von 1 bis 10, wobei ein RIN-Wert von 10 eine vollständig intakte RNA und ein RIN-Wert von 1 eine vollständig degradierte RNA beschreibt.

### **2.12.5.1 Bestimmung der RNA-Integrität**

Im Rahmen der RNA-Sequenzierung wurde zunächst die Integrität der RNA-Proben mit dem QSep (Nippon Genetics EUROPE, Düren, Deutschland) überprüft. Diese Untersuchung wurde von der Arbeitsgruppe Martin Simon (Molekulare Zellbiologie und Mikrobiologie, Bergische Universität Wuppertal) durchgeführt.

### **2.12.5.2 RNA-Gele**

Die Herstellung der RNA-Gele erfolgte gemäß Abschnitt 2.11.2. Für die Untersuchung der RNA-Integrität wurden 3,5 µg denaturierte Gesamt-RNA neben dem Marker auf ein mit Ethidiumbromid gefärbtes 1% (m/v) Agarosegel aufgetragen. Die Banden der 18S- und 28S-ribosomalen RNA (rRNA) sind in intakten RNA-Proben deutlich sichtbar und zeigen ein Verhältnis von 2:1 (28S:18S). Bei teilweise degradierter RNA ist eine Verschmierung zu beobachten, die keine scharfen rRNA-Banden oder kein 2:1-Verhältnis aufweist. Vollständig degradierte RNA erscheint als Verschmierung im niedrigmolekularen Bereich.



## 2.12.6 Reverse Transkription

Aus der isolierten RNA wurde mithilfe des High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, Katalognr.: 4368813) cDNA gewonnen. Für die cDNA-Synthese wurden 500 ng Gesamt-RNA eingesetzt und alle weiteren Komponenten (siehe Tabelle 17) hinzugefügt. Darüber hinaus wurde der RNase-Inhibitor RiboLock (Thermo Scientific Inc., Waltham, USA, Katalognr.: EO0382) verwendet, der eine Degradation der RNA bis zu 55°C verhinderte. Umgeschrieben wurde in einem Prime Thermal Cycler (Produktnr.:5PRIMEG/02, Bibby Scientific Ltd, Vereinigtes Königreich) mit den in Tabelle 18 genannten Temperatureinstellungen.

**Tabelle 17: Pipettieransatz cDNA-Synthese**

Inhalt	Volumen [µl]
RNA (50 ng/µl)	10
10 x RT Buffer	2
25 x dNTP Mix (100 mM)	0,8
10X RT Random Primer	2
MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50 U/µL)	1
RNase-Inhibitor RiboLock	0,25
H <sub>2</sub> O	3,95

**Tabelle 18: Temperatureinstellungen für die cDNA-Synthese**

Einstellungen	Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3	Schritt 4
Temperatur	25°C	37°C	85°C	4°C
Zeit	10 min	120 min	5 min	∞

Die resultierende cDNA wurde durch Zugabe von 180 µl Wasser (TH.GEYER, Renningen, Deutschland Katalognr.: 7711.0500) verdünnt und für die qPCR verwendet. Für eine langfristige Aufbewahrung wurde die cDNA bei -20°C gelagert.

## 2.13 qPCR

### 2.13.1 Versuchsdurchführung

Die qPCR wurde unter Verwendung des HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (Solis BioDyne, Tartu, Estland, Katalognr.: 08-25-00020) durchgeführt, um die in Tabelle 20 oder Tabelle 21 gelisteten Transkripte zu amplifizieren. Die Reaktionsmischungen (siehe Tabelle 19) wurden auf Eis zusammengestellt und 17 µl der Mischung wurden zu 3 µl der jeweiligen cDNA-Vorlage oder Standardplasmidlösung in einer 96-Well-Platte hinzugefügt. Die Auswertung der qPCR-Daten erfolgte mit der Bio-Rad CFX Maestro 1.1 Software 2017 (Bio-Rad Laboratories). Für Proben von Mäusen wurden die drei Haushaltsgene 18S ribosomale RNA (Rn18s), Peptidylprolylisomerase A (Ppia) und Caseinkinase 2, alpha prime polypeptide (Csnk2a2) mit dem Bio-Rad CFX Maestro Reference Gene Selection Tool ausgewertet. Für humane RNA-Proben wurden RNA 18S ribosomal N1 (RNA18SN1), Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) oder Aktin beta (ACTB) als Haushaltsgene verwendet. Proben von Mäusen wurden mit Hilfe des Bio-Rad CFX Maestro Gene Study mit Standards analysiert. Menschliche Proben wurden mit der  $\Delta\Delta CT$ -Methode analysiert. Zur Qualitätskontrolle wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Die Analyse der Proben und Standards erfolgte in technischen Triplikaten in dreifacher Ausführung.

**Tabelle 19: Pipettieransatz qPCR**

Inhalt	Volumen [µl]
cDNA-Probe (2,5 ng/µl)	3
5× HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus	4
Primer FW (10 µM)	0,5
Primer REV (10 µM)	0,5
H <sub>2</sub> O	12

Die qPCR Zyklusbedingungen bestanden aus einem anfänglichen Denaturierungsschritt bei 95°C für 12 Minuten gefolgt von 40 Zyklen, bestehend aus Denaturierung bei 95°C für 15 Sekunden, die Hybridisierung erfolgte bei den in der Gradienten-PCR festgestellten Temperaturen für 20 Sekunden und die Elongation bei 72 °C für 20 Sekunden sowie eine abschließende Schmelzkurve auf einem CFX96 Echtzeit-PCR-System (Bio-Rad, Hercules, California, USA).

### 2.13.2 Quantifizierung

Der relative Unterschied der Expression eines bestimmten Zielgens zwischen Kontrolle und der experimentellen Probe wurde mit der Livak-Methode, auch  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode genannt, berechnet (Livak & Schmittgen, 2001). Dabei wird der Schwellenwert-Zyklus (engl.: Cycle Threshold, Ct) zur Berechnung herangezogen.

1. Ct-Wert (Zielgen) auf Ct-Wert (Referenzgen) normalisieren:

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct (Zielgen)} - \text{Ct (Referenzgen)}$$

2.  $\Delta\text{Ct}$  der experimentellen Probe auf  $\Delta\text{Ct}$  der Kontrolle normalisieren:

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct (Experimentelle Probe)} - \Delta\text{Ct (Mittelwert Kontrolle)}$$

3. Expressionsverhältnis (engl.: fold change, FC):

$$2^{-\Delta\Delta\text{Ct}} = \text{normalisiertes Expressionsverhältnis}$$

(4. Normalisierung auf Kontrolle):

$$\text{Expressionsverhältnis} / \text{Expressionsverhältnis (Mittelwert Kontrolle)}$$

Alternativ wurde die relative Expression per Standard ermittelt. Dafür wurde der mit der Bio-Rad CFX Maestro 1.1 Software 2017 (Bio-Rad Laboratories) bestimmte St-Wert auf die Haushalts Gene normiert.

### 2.13.3 Primer-Sequenzen

Die verwendeten Primer wurden bei Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert. Sie wurden mit Primer BLAST auf Länge, GC-Gehalt, Spezies und Sequenzhomologien überprüft. Weiterhin wurde jedes Primer-Paar eingangs mit einer Gradienten-qPCR getestet und die Temperatur des höchsten Ct-Wertes als Hybridisierungs-Temperatur festgelegt.

Die Bezeichnung der *NEAT1*-Expression bezieht sich auf „Gesamt-*NEAT1*“, also die kombinierte Expression beider Isoformen (*NEAT1\_v1* und *NEAT1\_v2*). Da sich die Transkriptvarianten am 5'-Ende überlappen, erkennt das verwendete Primerpaar in diesem Bereich beide Isoformen gleichermaßen. Nur die lange Isoform *NEAT1\_v2* ist gesondert analysierbar und entsprechend als *NEAT1\_v2* gekennzeichnet.

**Tabelle 20: Primer-Sequenzen für die Spezies *Mus musculus* (Taxid:10090)**

Primer	FW 5'- 3'	REV 5'- 3'
Ppia	GGCCGATGACGAGCCC	TGTCTTTGGAACCTTTGTCTGC
Rn18s (18S)	AGGTCTGTGATGCCCTTAGA	GAATGGGGTTCAACGGGTTA
Acc1	CTTGGAGCAGAGAACCTTCG	ACTTCCCGACCAAGGACTTT
Col1a1	TGTGTGTTCCCTACTCAGCC	TGCTCTCTCCAAACCAGACG
Col1a2	CACCCCAGCGAAGAACTCAT	TCTCCTCATCCAGGTACGCA
Col3a1	ACGTAAGCACTGGTGGACAG	GGAGGGCCATAGCTGAACTG
Chrebp	CTGGGGACCTAAACAGGAGC	GAAGCCACCCTATAGCTCCC
Clec4f	CTTCGGGGAAGCAACAACCTC	CAAGCAACTGCACCAGAGAAC
Csnk2a2	GTAAAGGACCCTGTGTCAAAGA	GTCAGGATCTGGTAGAGTTGCT
Cpt1a	CTCAGTGGGAGCGACTCTTCA	GGCCTCTGTGGTACACGACAA
Ctgf	CTCCACCCGAGTTACCAATGACAA	CCAGAAAGCTCAAACCTTGACAGGC
Dgat2	ACTGGAACACGCCCAAGAAA	GTAGTCTCGGAAGTAGCGCC
Elovl6	ACAATGGACCTGTCAGCAAA	GTACCAGTGCAGGAAGATCAGT
Emr1	CTTTGGCTATGGGCTTCCAGTC	GCAAGGAGGACAGAGTTTATCGTG
Fasn	GGCTGCTACAAACAGACCAT	CACGGTAGAAAAGGCTCAGT
G6pc	AGGAAGGATGGAGGAAGGAA	TGGAACCAGATGGGAAAGAG
Hmgcoar	ATCCAGGAGCGAACCAAGAGAG	CAGAAGCCCCAAGCACAAAC
Hur/Elavl1	CCAGGCACAGAGAT TCAGTTTC	AGCATTGCCGGGGA CATTGA
Il-1 $\beta$	GAGAGCCTGTGTTTTCTCC	GAGTGCTGCCTAATGTCCC
Il-6	AAGAAATGATGGATGCTACCAAACCTG	GTACTIONCAGAAGACCAGAGGAAATT
Mcp-1	CCACTCACCTGCTGCTACTCAT	CTGCTGGTGATCCTCTTGT
Neat1	TGACAAAACCAGCAGACCC	CCACACCCAAATTACATACCAC
Neat1_v2	ACCTCTGTCACTTTGCCTTCA	TTCCCTCCCAGAGAGTTGACA
Nfkb1	CCTCCACGAGGCAGCACATA	GATAGCAGTGGGCTGTCTCCAGTAA
Nono p54	GGAGCTGCATAACCAAGAGGT	TTGTTCTCTCGCATCAGGGAAG
Ppar- $\alpha$	CCTTCCCTGTGAACTGACG	CCACAGAGCGCTAAGCTGT
Ppar- $\gamma$	AAGAAGCGGTGAACCACTGA	GGAATGCGAGTGGTCTTCCA
Pspc1	CACATGGAGCAGCCCTAACG	CTTTCGTGCAGGAGGTTTCG
Ptgs2/Cox2	TGACCCCCAAGGCTCAAATAT	TGAACCCAGGTCCTCGCTTA
Scd1	AGATCTCCAGTTCTTACACGACCAC	CTTTCATTTCAGGACGGATGTCT
Socs3	GCGAGAAGATTCCGCTGGTA	CCGTTGACAGTCTTCCGACA
Sfpq	GGGTGGTGGTGGAACAATGA	AAAGCGCTCAGTACGCATGT
Smad7	GTCCAGATGCTGTACCTTCCTC	GCGAGTCTTCTCCTCCAGTAT
Srebf1	GGCTCTGGAACAGACACTGG	GGCCCGGGAAAGTCACTGT
Srebf2	ACCTAGACCTCGCCAAAGGT	CGGATCACATTCCAGGAGA
Tgf- $\beta$ 1	ACCTGCCCCCTATATTTGGA	CGGGTTGTGTTGTTGTAGAG
Tnfa	CCATTCCTGAGTTCTGCAAAGG	AGGTAGGAAGGCCTGAGATCTTATC

**Tabelle 21: Primer-Sequenzen für die Spezies Mensch (Taxid:9606)**

Primer	FW 5'- 3'	REV 5'- 3'
RNA18SN1 (18S)	AGGTCTGTGATGCCCTTAGA	GAATGGGGTTCAACGGGTTA
ACTB ( $\beta$ -actin)	TGCGTGACATTAAGGAGAAG	GTCAGGCAGCTCGTAGCTCT
GAPDH	GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG	ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA
GAPDH RIP	TTCGACAGTCAGCCGCATCT	GCCCAATACGACCAAATCCGTT
CCNB1	ATGGTGAATGGACACCAACTCT	CATTCTTAGCCAGGTGCTGC
ELOVL6	CACTGTGAGCTGGAAAAGGGAG	GTGTGAAGTCAAACAGGGAGGG
FASN	ACTTCCCCAACGGTTCAGGTTC	GCGTCTTCCACACTATGCTCAG
IL-1 $\beta$	GGCTGCTCTGGGATTCTCTT	AGTCATCCTCATTGCCACTGTAA
IL-6	AGACAGCCACTCACCTCTTCAG	TTCTGCCAGTGCCTCTTTGCTG
IL-8	GAGAAGTTTTTGAAGAGGGCTGA	GCTTGAAGTTTCACTGGCATCT
HuR/ELAVL1	GGTGACATCGGGAGAACGAA	CCAAGCTGTGTCCTGCTACT
MALAT1	GTGCTACACAGAAGTGGATTC	CCTCAGTCCTAGCTTCATCA
c-MYC	AGCCACAGCATACATCCTGTCC	CTCGTCGTTTCCGCAACAAGTC
totalNEAT1	CCCCTTCTTCTCCCTTTAAC	CCTCTCTTCTCCACCATTAC
NEAT1_v2	TTTCAAAGGGAGCAGCAAGGG	ACGGCACAGGCAAATAAGACAC
NONO p54	TGTTTGGCCAGGTAGAGAGG	AAGGAGCCTTCACTGCATCT
PSPC1	GAAATCTGCCCACCGACATC	TGCAATTTCAAGCCAGGGTTC
SCD1	GCCAATTTCTCTCCACTGCTG	AAGTTCGCTCTTAGAAGCTGCC
SFPQ	GCAATTGAGGCAAGAGGAGG	CCATGTTCAATTGCTCCTCCG
TNF- $\alpha$	CTCACATACTGACCCACG	AAGAGGCTGAGGAACAAG
TTP/ZFP36	TCGCCACCCCAAATACAA	TTCGCTAGGGTTGTGGAT

### 2.13.4 Standardreihen

Zur Bestimmung der Effizienz der qPCR sowie zur Quantifizierung der Ziel-RNAs in der cDNA-Probe wurden Standards des in dem pGEM-T- oder pGEM-T-Easy-Vektorsystem klonierten PCR-Produkts neben den cDNA-Proben als Triplikat aufgetragen, um eine Standardkurve zu erstellen. Die Plasmide wurden wie in Abschnitt 2.10.1 beschrieben isoliert und verdünnt. Um die höchste Verdünnung der Standardreihe von 2000 attomol/μl herzustellen wurde das benötigte Volumen an Plasmid-DNA (Volumen v (Plasmid-DNA) [μl]) wie folgt berechnet:

1. Plasmidgröße [bp] = Vektorgröße [bp] + Insertgröße [bp]
2. Molare Masse M (Plasmid) [mg/mol] = Plasmidgröße [bp] \* 1000 \* 660 [(g/mol) /bp]  
#
3. Stoffmengenkonzentration c (Plasmid) [mol/l] = Massenkonzentration c (Plasmid-DNA) [ng/μl] / Molare Masse M (Plasmid) [mg/mol]
4. Stoffmengenkonzentration c (Plasmid) [attomol/μl] = Stoffmengenkonzentration c (Plasmid) [mol/l] \* ((10<sup>18</sup>) / (10<sup>6</sup>))

$$c(\text{Plasmid}) \cdot v(\text{Plasmid}) = c(\text{Standard}) \cdot v(\text{Standard}) \rightarrow v(\text{Plasmid}) = c(\text{Standard}) \cdot v(\text{Standard}) / c(\text{Plasmid})$$

5. Volumen v (Plasmid-DNA) [μl] = Stoffmengenkonzentration c (Standard) [attomol/μl] \* Gesamtvolumen v (Standard) [μl] / Stoffmengenkonzentration c (Plasmid) [attomol/μl]
6. Beispiel: Volumen v (Plasmid-DNA) [μl] = 2000 [attomol/μl] \* 1000 [μl] / Stoffmengenkonzentration c (Plasmid) [attomol/μl]

# Info: Molekulargewicht der DNA (ca. 660 g/mol) pro Basenpaar

Die höchste Konzentration der Standardreihe von 2000 attomol/μl wurde siebenmal verdünnt, sodass insgesamt acht Konzentrationen der Standardreihe zur Erstellung der Standardkurve dienen.

## **2.14 Western Blot**

### **2.14.1 Probenvorbereitung**

#### **2.14.1.1 Allgemeine Probenvorbereitung**

Die jeweiligen Zellen wurden auf Eis mit RIPA-Puffer unter Zugabe eines 7-fachen Proteaseinhibitors (Complete®, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland, Katalognr.: 04693124001) lysiert. Nach der Lyse wurden die Zelltrümmer für 10 Minuten bei 14.000 x g bei 4°C durch Zentrifugation entfernt. Die Bestimmung der Proteinmenge erfolgte mit dem Pierce™ BCA-Protein Assay Kit (Thermo Scientific Inc., Waltham, USA, Katalognr.: 23227) gemäß den Herstellerprotokollen und dem FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland, Katalognr.: 413-0505). Nach der Konzentrationsbestimmung wurden die Proben mit 10x Bolt™ Probenreduktionsmittel (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA, Katalognr.: B0004) und 4x Bolt™ LDS-Probenpuffer (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA, Katalognr.: B0007) versetzt und für 5 Minuten bei 95°C erhitzt.

#### **2.14.1.2 RIP-Probenvorbereitung**

Der RIP-Proben-Input bestand aus  $2 \times 10^7$  HepG2-Zellen, welche in 500 µl RIPA-Puffer lysiert wurden. Davon wurden 50 µl entnommen und mit 8 µl Ladepuffer versetzt. Die Proben aus der RNA-Immunpräzipitation wurden mit 40 µl Lysierungs-Puffer, ergänzt mit einer Proteaseinhibitormischung (Complete®, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland, Katalognr.: 04693124001) gemäß den Anweisungen des Herstellers versetzt und alle Proben für 10 Minuten bei 95°C erhitzt. Anschließend wurden die magnetischen Beads mit dem Magnet aus der Probe gezogen und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Bei Raumtemperatur wurde für 5 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und aus dem Überstand die Probe für die Gelelektrophorese mit einer Hamilton-Spritze entnommen und aufgetragen.

### 2.14.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Das Gel für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese besteht aus einem Sammelgel und einem Trenngel. Zuerst wurde das Trenngel angefertigt, mit Isopropanol überschichtet und für circa eine Stunde auspolymerisiert (siehe Tabelle 22). Im Anschluss wurde das Isopropanol entfernt, das Sammelgel angefertigt, vorsichtig auf das Trenngel gegossen und ebenfalls eine Stunde auspolymerisiert (siehe Tabelle 22). Der Kathodenpuffer (1 x) wurde zwischen die Gelschlitten gefüllt, der Anodenpuffer (1 x) außerhalb in die Elektrophorese-Kammer. Zur Bestimmung der Molekülmassen wurde der vorgefärbte Proteinmarker PageRuler™ Plus (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA, Katalognr.: 26619) verwendet. 5 µl Marker und jeweils 20 µl Probe wurden mit einer Hamilton-Spritze auf das Gel geladen und für 60 bis 120 Minuten bei 75 V, gefolgt von 2,5 Stunden bei 125 V, aufgetrennt. Die Gelvorbereitung und Elektrophorese wurden mit dem BioRad Mini PROTEAN-System (BioRad, Hercules, Kalifornien, USA) durchgeführt.

**Tabelle 22: Pipettieransatz Sammel-und Trenngel der SDS-PAGE**

<b>Trenngel (16%)</b>	<b>1 x</b>
Aqua dest.	1,38 ml
Puffer: 3 M Tris (pH 8,45 +1,5 g SDS) (3 x)	1,8 ml
30% Acrylamide Mix (Roti)	1,8 ml
Glycerol	0,42 ml
APS	18 µl
TEMED	1,8 µl

<b>Sammelgel (16%)</b>	<b>1 x</b>
Aqua dest.	1,8 ml
Puffer: 3 M Tris (pH 8,45 +1,5 g SDS) (3 x)	0,68 ml
30% Acrylamide Mix (Roti)	0,23 ml
APS	20 µl
TEMED	2 µl



### **2.14.3 Blotting**

Im Anschluss an die SDS-PAGE wurde das Gel auf einer Amersham™ Protran® Nitrozellulosemembran (Merck, Darmstadt, Deutschland, Katalognr.: 10600009) platziert und die Proteine mit dem Mini-Transblot-System (BioRad, Hercules, California, USA) unter Kühlung auf die Membran transferiert. Für die Übertragung wurde eine Stromstärke von 0,35 Ampere für einen Zeitraum von zwei Stunden bei Raumtemperatur gewählt. Um eine zu starke Erwärmung des Transferpuffers während des Laufs zu vermeiden, wurde dieser mit einem Magnetrührer gemischt. Im Anschluss wurde die Membran mit H<sub>2</sub>O gewaschen und mit 4% (m/v) Milchpulver in TBST 0,1% (v/v) für 1,5 Stunden bei 37°C blockiert.

### **2.14.4 Immundetektion**

Die primären Antikörper HuR/ELAVL1 (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Oregon, USA Katalognr.: sc-5261), TTP (1:5000, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA, Katalognr.: T5327), SMAD7 (1:1000, Abcam, Katalognr.: AB216428) oder GAPDH (1:2500, Sigma-Aldrich, Katalognr.: 5174S) wurden in 4% (m/v) Milchpulver in TBST verdünnt und die Membran über Nacht bei 4°C inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran 3-mal für 5 Minuten mit TBST 0,1% (v/v) gewaschen. Die speziesspezifischen sekundären Peroxidase-konjugierten Antikörper wurden 1:2500 (Anti-Maus) und 1:5000 (Anti-Kaninchen) in 4% (m/v) Milchpulver in TBS-T verdünnt und die Membran für 1 Stunde bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Zuletzt wurde die Membran 2-mal für 5 Minuten mit TBST 0,1% (v/v) und zuletzt für 5 Minuten mit TBST 0,3% (v/v) gewaschen. Für die Detektion der Chemilumineszenz wurde das SuperSignal™ West Pico Plus Chemilumineszenz-Substrat (Thermo Scientific Inc., Waltham, USA, Katalognr.: 34580) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Die Detektion erfolgte mit dem Octoplus QPLEX Analyzer (nhDiagnostics, Halle, Deutschland).

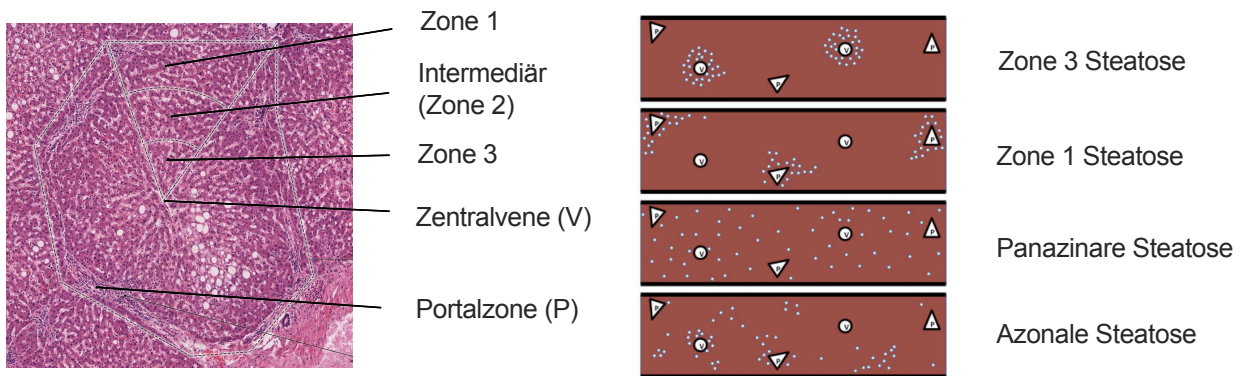
## **2.15 Leberhistologie und quantitative Bewertungssysteme**

Die histopathologische Untersuchung wurde im Rahmen einer Kooperation von zwei unabhängigen, verblindeten Prüfern, den Pathologen Prof. Dr. J. Haybaeck (Institut für Pathologie, Medizinische Universität Graz, Österreich) und Dr. A. Querimi (Institut für Pathologie, Neuropathologie und Molekularpathologie, Medizinische Universität Innsbruck, Österreich), mittels einer semiquantitativen Analyse der gefärbten Gewebeschnitte durchgeführt. Dafür wurden die in Paraformaldehyd konservierten Lebergewebeproben in Paraffin eingebettet, in 0,5 µm dicke Schnitte geschnitten und mit Hämatoxylin-Eosin (HE) angefärbt, um die histologischen Merkmale der Steatohepatitis zu erkennen, sowie mit Sirius-Rot sowie Masson-Trichrom, um die hepatische Kollagenablagerung und Fibrose zu beurteilen.

Die Schnitte wurden auf Steatose, Fibrose, portale oder lobuläre Entzündung und lobuläre Infiltration untersucht und die Ergebnisse gemäß der zugrunde liegenden Scoring-Kriterien klassifiziert (siehe Tabelle 23 und Abbildung 10).

**Tabelle 23: Bewertungssystem der histologischen Untersuchung**

Bewertungssystem	Spezifizierung	Score	Bedingung	Färbung
Steatose Grad	Mediovesikulär	Score 0	0% / Kein betroffenes Parenchym	HE
		Score 1	5-33% betroffenes Parenchym	
		Score 2	34-66% betroffenes Parenchym	
		Score 3	>66% betroffenes Parenchym	
Steatose	Mikrovesikulär	Score 0	0% / Kein betroffenes Parenchym	HE
		Score 1	5-33% betroffenes Parenchym	
		Score 2	34-66% betroffenes Parenchym	
		Score 3	>66% betroffenes Parenchym	
Distribution Steatose	Mediovesikuläre Verteilung	Score 0	Zone 3	HE
		Score 1	Zone 1	
		Score 2	Azonal	
		Score 3	Panazinar	
		Score 4	Intermediär	
Distribution Steatose	Mikrovesikuläre Verteilung	Score 0	Zone 3	HE
		Score 1	Zone 1	
		Score 2	Azonal	
		Score 3	Panazinar	
		Score 4	Intermediär	
Lobuläre Entzündung		Score 0	Kein Bereich	HE
		Score 1	<2 / 20x	
		Score 2	2-4 / 20x	
		Score 3	>4 / 20x	
Lobuläre Infiltration	Neutrophile Granulozyten	Score 0	Kein Bereich	HE
		Score 1	Wenige	
		Score 2	Viele	
Fibrose Stadium		Score 0	Keine Fibrose	Siriusrot und Masson Trichrom
		Score 1	Perisinusoidal	
		Score 2	Portal/ Periportal oder Septal	
		Score 3	Portal/Septal und Perisinusoidal	
		Score 4	Zirrhose	
Morphometrische Bewertung der Fibrose		Score 0	0%	Siriusrot und Masson Trichrom
		Score 1	<5%	
		Score 2	5-10%	
Morphometrische Bewertung der Steatose		Score 0	0%	H&E
		Score 1	<5%	
		Score 2	5-10%	
		Score 3	> 10%	



**Abbildung 10: Zonen eines Leberläppchens und Distribution der Steatose**

(Links) H&E Schnitt mit Zonenübersicht (Ross & Pawlina, 1979) (Rechts) Verteilungsmuster der Steatose bei MASLD. Die roten Rechtecke stellen stilisierte Leberbiopsien mit dreieckigen Portalbereichen (P) und runden Zentralvenen (V) dar. Die kleinen weißen Kreise bezeichnen steatotische Hepatozyten. Von oben nach unten: Steatose der Zone 3, Steatose der Zone 1, Panazinare Steatose und Azonale Steatose. Adaptiert von (Kleiner & Brunt, 2012)

### 2.15.1 Immunhistochemie F4/80

Der immunhistochemische Nachweis von F4/80, einem Makrophagenmarker in der Maus, erfolgte an Paraffinschnitten. Zuerst wurden die Paraffinschnitte mit einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert, gefolgt von einer Antigen-Demaskierung in 10 mM Natriumcitratpuffer (pH 6,0). Die endogene Peroxidaseaktivität wurde durch Inkubation der Schnitte mit 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> blockiert. Unspezifische Bindungen wurden mit 5% BSA in PBS für 1 Stunde bei Raumtemperatur blockiert. Anschließend wurde der primäre Antikörper F4/80 (Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA, Katalognr.: 70076) im Verhältnis 1:500 in Signal Stain Antibody Diluent (Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA, Katalognr.: 8112) über Nacht bei 4 °C in einer Feuchtkammer inkubiert. Nach dem Waschen mit PBST und PBS wurde das Polymer-basierte Detektionsreagenz Signal Stain Boost Detection Reagent HRP rabbit (Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA, Katalognr.: 8114) für 1 Stunde bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBST und PBS wurde die Immunreaktion mit DAB (Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA, Katalognr.: 8059) gemäß den Anweisungen des Herstellers sichtbar gemacht. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin (Morphisto GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland, Katalognr.: 11895) und die Schnitte wurden durch eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert. Schließlich wurden die Schnitte mit Entellan (Merck, Darmstadt, Deutschland, Katalognr.: 107960) eingebettet. Als Negativkontrollen dienten Schnitte, die ohne Primärantikörper inkubiert wurden. Die mikroskopischen Aufnahmen erfolgten mit dem Mikroskop Zeiss Axiovert 5 mit dem zugehörigen Softwarepaket Zeiss ZEN 3.9.

## **2.16 Lipidom- Analyse des Fettsäureprofils**

### **2.16.1 Zellkultur**

Für die Analyse des Lipidoms wurden  $2 \times 10^5$  HepG2-Zellen in 12-Well-Platten oder  $4 \times 10^5$  HepG2-Zellen in 6-Well-Platten ausgesät und 48 Stunden lang inkubiert. Anschließend wurde das Medium entfernt, die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und mit 0,2% (m/v) SDS lysiert. Das Lysat wurde in ein neues Röhrchen überführt und 1:1 mit Wasser verdünnt. Die Proteinkonzentration wurde mit einem Pierce™ BCA-Protein Assay Kit (Thermo Scientific Inc., Waltham, USA, Katalognr.: 23227) bestimmt. Die Lysate wurden auf Trockeneis nach Regensburg an die Arbeitsgruppe Prof. Gerhard Liebisch verschickt und dort im Rahmen einer Kooperation bearbeitet. Die Lipidom Analyse wurde als Triplikat durchgeführt und wird der Vollständigkeit halber im Folgenden beschrieben.

Für die quantitative Lipidomik wurden vor der Lipidextraktion interne Standards hinzugefügt. Eine Menge von 100 µg Protein wurde einer Lipidextraktion nach dem Protokoll von Bligh und Dyer unterzogen (Bligh & Dyer, 1959). Die Analyse der Lipide erfolgte durch direkte Fließinjektionsanalyse (FIA) mit einem Dreifach-Quadrupol-Massenspektrometer (FIA MS/MS) und einem hochauflösenden Hybrid-Quadrupol-Orbitrap-Massenspektrometer (FIA FTMS) (Liebisch et al., 2006; Liebisch et al., 2002; Horing et al., 2019; Horing et al., 2021; Horing et al., 2020). Die Lipidspezies wurden nach dem neuesten Vorschlag für die Kurzschreibweise von Lipidstrukturen, die aus der Massenspektrometrie abgeleitet werden, bezeichnet (Liebisch et al., 2020). Eine Übersicht der gemessenen Lipidklassen mit zugehöriger Messmethode findet sich in Tabelle A 4.

### **2.16.2 Tierversuch**

Die nach der Leberentnahme in flüssigem Stickstoff schockgefrorenen Leberstücke wurden bei -80°C gelagert. Ein Stück von 20 bis 40 mg wurde mit einem Skalpell abgeschnitten und in ein vorgewogenes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und sofort auf Trockeneis gelagert. Das Gewicht wurde auf der Sartorius-Feinwaage kontrolliert und bei Gewichtsabweichungen entsprechend korrigiert. Die Extraktion und Analyse der Proben wurden in der Arbeitsgruppe Prof. Gerhard Liebisch (Universitätsklinikum Regensburg) wie bereits in Köhler et al. (2022) beschrieben, durchgeführt (Köhler et al., 2022).

### 2.16.3 Lipidomanalyse: LINEX<sup>2</sup>

Die Lipidomdaten wurden mit der bioinformatischen Webanwendung Lipid Network Explorer (LINEX<sup>2</sup>) analysiert (Rose et al., 2023). Das Netzwerk wurde mit LINEX<sup>2</sup> auf der Grundlage des Lipidoms der DMSO-Zellen und ihrer Kontrolle beziehungsweise der WT- und KO-MCD Mäuse (n=14) berechnet. Im Upload-Fenster für Version 2 wurden folgende Einstellungen gewählt: Die Berechnungsoption „Umrechnung in LipidLynxX-Nomenklatur“ wurde angewählt. Für das DMSO-Netzwerk wurde der Reactome Organismus HSA (Mensch) gewählt, für die MCD-Mäuse der Reactome Organismus MMU (Maus). Alle weiteren Einstellungen entsprachen den jeweiligen Voreinstellungen.

Bei der Analyse und Interpretation von Lipidom-Veränderungen zwischen zwei Zuständen stellt LINEX<sup>2</sup> Lipidenzyme, die für Reaktionen zwischen Lipiden verantwortlich sind in den Mittelpunkt. Lipide bestehen in der Regel aus drei Lipidattributen: 1. einer Kopfgruppe, 2. einem Rückgrat und 3. einer Reihe von angehängten Fettsäuren. Die in LINEX<sup>2</sup> verwendeten Reaktionen wurden aus Datenbanken extrahiert, bei denen es zu Umwandlungen zwischen gängigen Lipidklassen kommt, die in der Regel auf Veränderungen in einem dieser drei Lipidattribute beruhen (Rose et al., 2023).

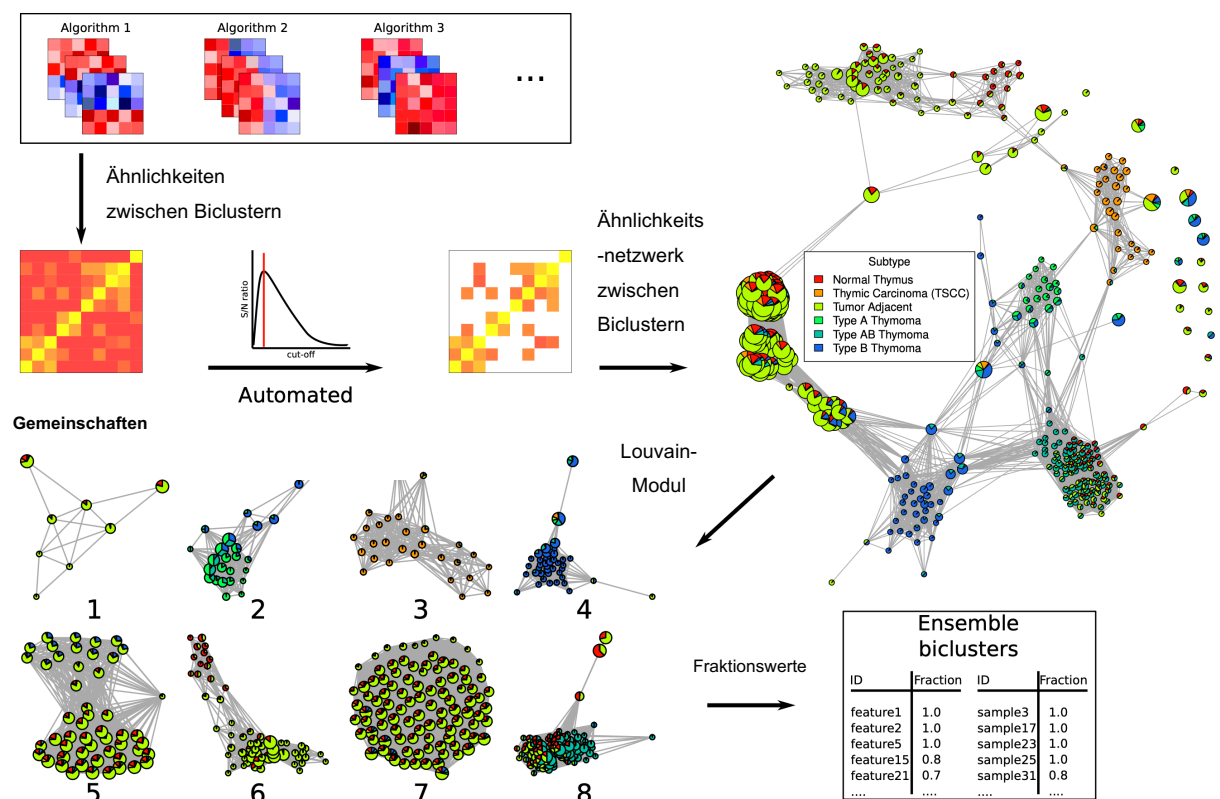
In den Netzwerken wurden folgende Einstellungen vorgenommen: Jeder Knoten steht für eine Lipidspezies, und jede Verbindungslinie zwischen einem Lipidpaar zeigt eine Reaktion an, die entweder eine Kopfgruppentransformation oder eine Veränderung der Fettsäure (FA) bewirken kann (Transformation von Lipiden auf Klassen- oder FA-Ebene). Die Farben der Knoten stellen die Fold Change (FC) zwischen WT- und KO-Mäusen dar, wobei Rot für eine höhere Lipidhäufigkeit und Blau für eine geringere Lipidhäufigkeit in KO-Mäusen steht. Die Knotengröße zeigt die negativen log<sub>10</sub> FDR-Werte der Lipide zwischen den beiden Bedingungen an.

Eine weitere Subanalyse der LINEX<sup>2</sup> Netzwerken erfolgt mit der Netzwerk-Anreicherung. Durch den Vergleich zweier Versuchsbedingungen sollen stark vernetzte molekulare Teilnetzwerke gefunden werden, die mit signifikanten Merkmalen angereichert sind. Mit diesem Teilnetzwerk wird eine mechanistische Hypothese für die beobachteten Dysregulationen vorgeschlagen.

### 2.16.4 Lipidomanalyse: MoSBI

Die Lipidomdaten wurden mit der bioinformatischen Webanwendung MoSBI analysiert (Rose et al., 2022). MoSBI steht für Molecular Signature Identification using Biclustering. Dabei handelt es sich um eine bioinformatische Methode, die einen Multi-Algorithmus-Biclustering-Ensemble-Ansatz verwendet, mit dem große molekulare Datensätze, wie dem Lipidom, analysiert werden können. Die so genannten „unüberwachten Algorithmen“ suchen unabhängig voneinander nach Mustern in den Daten und erstellen Biclustern.

Anschließend werden die Bicluster einem Prozess der Ähnlichkeitsbewertung und Filterung unterzogen. Bei einem Ensemble-Ansatz werden die Vorhersagen der verschiedenen Algorithmen kombiniert und in einem Bicluster-Netzwerk organisiert. In diesem Netzwerk werden die Bicluster als Knoten eines Algorithmus dargestellt. Die Größe eines Knotens gibt die Anzahl der in einem Bicluster enthaltenen Parameter an, die in diesem Fall entweder die Lipidklasse oder ein Versuchstier sind. Die Nähe der Knoten innerhalb des Netzes deutet auf Ähnlichkeiten zwischen den Biclustern hin. Das anschließende Louvain-Modul analysiert das Netzwerk und extrahiert Gemeinschaften mit ähnlichen Eigenschaften aus dem Netzwerk, die dann untersucht wurden (siehe Abbildung 11).



**Abbildung 11: Schematische Darstellung des MoSbi Algorithmus (Rose et al., 2022)**

Für den Daten-Upload für die NF-, MCS- und MCD-Analyse wurden die voreingestellten Farbcodes verwendet. Für die Analyse von WT-, HET- und KO-MCD Mäusen wurden Farben definiert. Die gewählten Algorithmen für die Bicluster-Berechnungen entsprachen den Standardeinstellungen (Fabia, isa2, QUBIC, Plaid, Bimax, CC, UniBic). Für die Gemeinschaften wurde eine Mindestgröße von 5 gewählt. Jede MoSbi-Analyse wurde dreimal durchgeführt. Die Web-Applikation MoSbi leitet den Prozess mit der UMAP-Berechnung der bereitgestellten Daten ein. Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) ist eine Technik zur Projektion hochdimensionaler Daten in eine niedrigere Dimension, wobei die Integrität der zugrunde liegenden Strukturen und Beziehungen erhalten bleibt.

## 2.17 Hydroxyprolin

Das Lebergewebe wurde mit PBS gewaschen und bis zur Analyse des Hydroxyprolingehalts (HYP) bei -80 °C gelagert. Das kolorimetrische Hydroxyprolin-Assay-Kit (Säurehydrolyse-Methode) (Elabsience, USA, Kat. Nr. E-BC-K062-S) wurde gemäß den Anweisungen des Herstellers verwendet. Kurz gesagt, 100 mg Lebergewebe wurden in 1 ml 6M HCl bei 95°C für 6 Stunden hydrolysiert. Nach Einstellung von pH-Wert und Volumen wurde 1 ml der Probe mit 10 mg Klärmittel entfärbt und 15 Minuten lang mit 1500 x *g* zentrifugiert. Anschließend wurden 400 µl des Überstandes 15 Minuten lang bei Raumtemperatur mit der oxidierenden Arbeitslösung und anschließend für 15 Minuten bei 60°C mit der chromogenen Arbeitslösung inkubiert. Die Proben wurden in Triplikaten auf eine 96-Well-Platte gegeben. Die Absorption wurde bei 562 nm mit einem Spektrometer gemessen, und der Hydroxyprolingehalt wurde anhand einer Standardkurve berechnet.

## 2.18 RNA-Immunpräzipitation (RIP)

Die RIP von HuR/ELAVL1-assoziiierter RNA wurde mit dem magnetischen SureBeads™-System (Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA, Katalognr.: 161-4011) durchgeführt. Die RIP von TTP/ZFP36-assoziiierter RNA wurde mit Magne™ Protein A Beads (Promega, Walldorf, Deutschland, Katalognr.: G8782) durchgeführt. Im ersten Schritt wurden 100 µl der Suspension der magnetischen Beads in 1,5 ml-Reaktionsgefäße vorgelegt und dreimal mit PBST gewaschen. Die Puffer wurden mit DEPC-Wasser hergestellt und mit RNaseOut (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA, Katalog-Nr.: 10777019) und der Proteaseinhibitor-Mischung Complete® ergänzt. Im Anschluss wurden die Beads für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit Antikörper-verdünnungen inkubiert. Die Konzentration des HuR/ELAVL1-Antikörpers oder der speziesspezifischen IgG-Kontrolle betrug 5 µg in 200 µl einer 150 mM NaCl-Lösung pro Probe. Nach der Inkubation wurden die Beads dreimal mit PBST gewaschen. In der Zwischenzeit wurde das Zelllysate vorbereitet. Für die Untersuchung von acht Proben sowie einer Input-Kontrolle wurden 10 x 10<sup>7</sup> HepG2-Zellen 5 Minuten lang bei 800 U/min zentrifugiert und mit kaltem PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in 4,5 ml RIPA-Puffer lysiert und für 10 Minuten bei 16.000 x *g* bei 4°C zentrifugiert. 500 µl des Überstandes wurden zu den Beads gegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur rotiert. Im Anschluss wurden die Beads dreimal mit PBST gewaschen und vor dem letzten Waschschrift in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt.

Die RNA-Isolation wurde mit dem High Pure RNA Isolation Kit (Roche, Deutschland, Katalognr.: 11828665001) durchgeführt. Im ersten Schritt wurden 200 µl PBS zu den Beads gegeben, gevortext, zentrifugiert und anschließend 400 µl Lysis-Puffer zugegeben. Die Suspension wurde über Nacht bei -20°C inkubiert. Anschließend wurden die Beads für 15

Minuten magnetisiert, der Überstand über die Säule gegeben und wie in Abschnitt 2.12.1.2 beschrieben fortgefahren. Die Aufarbeitung der Beads für den Western Blot ist in RIP-Probenvorbereitung Abschnitt 2.14.1.2 beschrieben.

## **2.19 Mikroskopie**

### **2.19.1 Stellaris™ RNA Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung und Immunfluoreszenz**

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) von RNA und die Immunfluoreszenz (IF) RNA-bindender Proteine (RBPs) wurden simultan gemäß den Angaben des Herstellers mit dem Stellaris™ RNA FISH Set in adhärenenten Zellen durchgeführt. Das Stellaris™ RNA FISH Set ist eine Methode zum Nachweis, zur Lokalisierung und Quantifizierung von RNAs in fixierten Zellen. Ein Satz Stellaris RNA-FISH-Sonden besteht aus einem Pool von bis zu 48 unterschiedlichen Sonden, die jeweils mit einem Fluorophor markiert sind, gemeinsam entlang eines RNA-Zieltranskripts binden und auf diese Weise das Fluoreszenzsignal verstärken.

Die Zellen wurden in 12-Well-Platten auf 15-mm-Deckgläsern ausplattiert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit 1 ml Fixierungs-Puffer (3,7% Formaldehyd in PBS) inkubiert. Anschließend wurde erneut zweimal mit PBS gewaschen und für mindestens 1 Stunde bei 4°C mit 70% (v/v) Ethanol permeabilisiert, gefolgt von einer Equilibrierung in Stellaris-Wasch-Puffer A (LGC, Biosearch Technologies, Teddington, Vereinigtes Königreich, Katalognr.: SMF-WA1-60-BS). Die RNA-Sonden (siehe Tabelle 24) und Antikörper (siehe Tabelle 25) wurden in dem Stellaris-Hybridisierungs-Puffer (LGC, Biosearch Technologies, Teddington, Vereinigtes Königreich, Katalognr.: SMF-HB1-10-BS) gemäß den Angaben des Herstellers verdünnt. Pro Deckglas wurden 50 µl des Hybridisierungs-Gemisches auf Parafilm aufgetragen und das Deckglas über Nacht in einer Feuchtkammer bei 37°C inkubiert. Das Deckglas wurde in eine 12-Well-Platte transferiert und mit, in Stellaris-Wasch-Puffer A verdünntem, Sekundärantikörper für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Lösung wurde verworfen und für weitere 30 Minuten mit Stellaris-Wasch-Puffer A verdünntem speziesspezifischen Sekundärantikörper und 500 ng/ml DAPI (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA, Katalognr.: D9542-1MG), bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde das Deckglas mit Stellaris-Wasch-Puffer B (LGC, Biosearch Technologies, Teddington, Vereinigtes Königreich, Katalognr.: SMF-WB1-20-BS) gewaschen und in 25 µl Abberior Mount Solid Antifade (Abberior, Göttingen, Deutschland, Katalognr.: MM-2013-1ML) auf einem Objektträger eingedeckelt.



**Tabelle 24: Stellaris™ RNA FISH Sonden**

Ziel-RNA	Sondenname	Katalognummer	Fluorophor
<i>GAPDH</i>	Human <i>GAPDH</i>	SMF-2019-1-BS	Quasar 670
<i>NEAT1_v2</i>	Human <i>NEAT1</i> 5' Segment	SMF-2036-1-BS	Quasar 570
<i>NEAT1</i> (alle Transkripte)	Human <i>NEAT1</i> Middle Segment	SMF-2037-1-BS	Quasar 570

**Tabelle 25: Antikörper**

Antikörper		Zielspezies (Spezies)	Katalognummer
HuR	Primär	Anti-Mensch (Maus)	sc-5261
PSPC1	Primär	Anti-Mensch (Kaninchen)	E7L8B mAb #65992S
SFPQ	Primär	Anti-Mensch (Kaninchen)	E9A7B mAb # 71992S
EZH2	Primär	Anti-Mensch (Kaninchen)	D2C9 XP® mAb #5246
Abberior STAR RED	Sekundär	Anti-Maus IgG (Ziege)	STRED-1001-100UG
Abberior STAR GREEN	Sekundär	Anti-Maus IgG (Ziege)	STGREEN-1001-100UG
Abberior STAR RED	Sekundär	Anti-Kaninchen IgG (Ziege)	STRED-1002-100UG
Abberior STAR GREEN	Sekundär	Anti-Kaninchen IgG (Ziege)	STGREEN-1002-100UG

## 2.19.2 Nilrot-Färbung

Für die Nilrot-Färbung wurden die Zellen mit Trypsin von der 12-Well-Platte abgelöst. Im Anschluss wurden die Zellen für 5 Minuten bei 1000 rpm bei 4°C zentrifugiert und der entstehende Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 1 ml PBS resuspendiert und in FACS-Röhrchen bis zur Messung auf Eis gelagert. Von Nilrot wurde eine 1 mM Stamm-Lösung in DMSO hergestellt. Davon wurden für den ersten Versuch (siehe Abschnitt 2.6.1.1) 1:1000 in Medium eingesetzt und für 15 Minuten inkubiert. Anschließend zweimal mit PBS gewaschen und in 1% PFA vermessen. Für den zweiten Versuch (siehe Abschnitt 2.6.1.3) wurden 0,6 µl Nilrot Stamm-Lösung in 1 ml PBS eingesetzt und nach 15 bis 20 Minuten Inkubation ohne zusätzlichen Waschschriff vermessen. Die Proben wurden mit dem FACS-Gerät BD Accuri C6 Plus Flow Cytometer (Becton, Dickinson and Company (BD), Franklin Lakes, NJ, USA Produkt Nummer: 660517) analysiert.

## 2.20 RNA-Sequenzierung und Datenanalyse

### 2.20.1 Tierversuch

Um die Gesamt-RNA aus den Lebergeweben der Mäuse zu sequenzieren, wurde wie in Abschnitt 2.12.1.4 beschrieben, die Gesamt-RNA isoliert und quantifiziert (siehe Abschnitt 2.12.3). Die folgende RNA-Sequenzierung wurde von der Arbeitsgruppe Prof. Martin Simon (Universität Wuppertal) und Sören Franzenburg (Universität Kiel) im Rahmen einer Kooperation durchgeführt. Die RNA-Sequenzierung wurde als Triplikat durchgeführt und wird der Vollständigkeit halber im Folgenden beschrieben.

Für die RNA-Sequenzierung wurde die Integrität der Gesamt-RNA mit einem QSep1 Bio-Fragment Analyzer (BiOptic Inc.) unter Verwendung von Standard-RNA-Kartuschen (Katalognummer C105110) überprüft. Die Bibliotheken (engl.: libraries) wurden mit dem NEBNext UltraExpress® RNA Library Prep Kit (NEB, Katalog-Nr. E3330S) in Kombination mit dem NEBNext® rRNA Depletion Kit v2 (NEB, Katalog-Nr. E7405) gemäß den Anweisungen für die Herstellung von ribodepletierten RNA-Bibliotheken aus einem Ausgangsmaterial von 100 ng Gesamt-RNA hergestellt. Zwölf PCR-Zyklen wurden für die Amplifikation verwendet, und die Reinigung der Bibliothek erfolgte gemäß den Anweisungen des Herstellers. Die Konzentrationsmessung der Bibliotheken wurde mit dem Qubit™ 1xdsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Katalog-Nr. Q33230) überprüft. Der Qsep1 Bio-Fragment Analyzer (BiOptic Inc.) mit einem Standard DNA Cartridge Kit (Katalog-Nr. C105201) wurde verwendet, um die Bibliothek auf Adaptor-Kontaminationen und Größenverteilungen zu prüfen. Die Bibliotheken wurden gemultiplext und mit der S4-Durchflusszelle auf einer Illumina NovaSeq 6000-Plattform (Illumina, San Diego, CA, USA) im 100-Bp-Paired-End-Sequenzierungsmodus sequenziert. Die Reads wurden demultiplexiert, mit FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) qualitätsgeprüft und mit Seqtk (<https://github.com/lh3/seqtk>) nach dem Zufallsprinzip auf ein Minimum von jeweils 50 Millionen Reads gesubsampled. Das Trimmen der Adapter und der Qualität wurde mit dem Software-Tool Trimalore (Version 0.6.5, [www.bioinformatics.babraham.ac.uk](http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk)) durchgeführt, das Cutadapt (Version 1.18, [www.cutadapt.readthedocs.io](http://www.cutadapt.readthedocs.io)) verwendet. Die Read-Paare wurden mit dem integrierten Mapper Bowtie2 in Geneious Prime 2024.0.7 auf das Mus Musculus-Genom (GRCm39) gemappt. Die Expressionswerte von annotierten Genen wurden mit der Funktion „calculate expression values“ von Geneious Prime 2024.0.7 berechnet.

## 2.20.2 Zellkultur

Für die RNA-Sequenzierung wurden HepG2 Wildtyp Zellen und Gapmer-behandelte HepG2-Zellen (siehe Abschnitt 2.5.1.1) als Triplikat in 12-Well-Platten ausplattiert. Anschließend wurde, wie in Abschnitt 2.12.1.2 beschrieben, die Gesamt-RNA isoliert und quantifiziert (siehe Abschnitt 2.12.3). Die folgende RNA-Sequenzierung wurde von der Arbeitsgruppe Prof. Martin Simon (Universität Wuppertal) und Sören Franzenburg (Universität Kiel) durchgeführt.

Von den Zellen wurde 1 µg Gesamt-RNA für die Vorbereitung der Gesamt-RNA-Bibliothek mit dem NEB Next Ultra II Directional RNA Library Prep Kit für Illumina f (New England Biolabs, Katalognummer E7760S) verwendet, und es wurden neun PCR-Zyklen für die Bibliotheksamplifikation und die Bibliotheksreinigung gemäß den Anweisungen des Herstellers gewählt. Ribosomale RNA wurde mit dem NEBNext® rRNA Depletion Kit v2 (NEB, Katalognummer E7405) abgereichert. Die Qualitätskontrolle der Bibliotheken und die Sequenzierung wurden wie oben beschrieben durchgeführt. Die Reads wurden dann wie beschrieben verarbeitet, und das Trimmen von Adaptersequenzen und Basen geringer Qualität erfolgte gemäß dem D-Plex mRNA-Seq Kit Manual mit Cutadapt. Die getrimmten Reads wurden mit dem TopHat mapper 85 plugin (V7.2.1) in Geneious Prime 2023.1.1 auf das menschliche Referenzgenom (Version hg38) gemappt. Die Expressionswerte der annotierten Gene wurden mit der Funktion „calculate expression values“ von Geneious Prime 2023.1.1 berechnet.

## 2.20.3 Datenanalyse: Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)

Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) ist eine Software (Version GSEA v4.3.3) zur Analyse von Genexpressionsdaten. Ausgehend von der RNA-Sequenzierung mit den Genexpressionsdaten der Einheit Transcripts per Million (TPM) wurde eine Normalisierung der TPM-Werte vor der Durchführung von GSEA angewendet, um eine Vergleichbarkeit zwischen den Proben zu ermöglichen. Dafür wurden die TPM-Werte  $\log_2(\text{TPM}+1)$  und anschließend Z-Score transformiert.

Für die GSEA-Analyse wurden die Einstellungen entsprechend Tabelle A 5 gewählt. Als Datenbank für molekulare Merkmale (engl.: molecular signatures database, MSigDB) wurde zum einen die Maus Hallmark (MH) Datenbank ausgewählt und für die detailliertere Analyse die M2 CP REACTOME Datenbank. Der GSEA-Algorithmus erstellt zunächst eine Rangliste der Gene, basierend auf der unterschiedlichen Expression der einzelnen Gene in Bezug auf die beiden Phänotypen (WT versus KO MCD). Anschließend wird die Rangliste verwendet, um zu bewerten, wie die Gene jedes Gensatzes über die Rangliste verteilt sind. Hierzu wird die Rangliste durchsucht und eine laufende Summenstatistik innerhalb eines

Anreicherungs-Scores (engl.: enrichment score, ES) erhöht, falls ein Gen zum Set gehört, und verringert, falls es nicht dazugehört. Anders als andere Gen-Ontologie (GO) Analyse Programme berücksichtigt GSEA nicht nur eine Teilmenge der Gene mit signifikanten Veränderungen der Genexpression, die über einem willkürlichen gesetzten Grenzwert in Bezug auf den Fold-Change oder Signifikanz (p-Wert) liegen, sondern die Veränderungen der Genexpression aller Gene in Bezug auf die Rangliste.

### **2.21 Statistik**

Die Datenanalyse und Statistik wurden mit der Software Microsoft Office (Microsoft 365 Version 16.95.1 (25031528)) und Graph Pad Prism 10 (Version 10.4.1(532)) durchgeführt. Die Normalverteilung der Daten wurde zunächst mithilfe des Shapiro-Wilk-Tests sowie des Kolmogorov-Smirnov-Tests überprüft. Bei Daten, die eine Normalverteilung aufwiesen, wurde je nach Anzahl der untersuchten Faktoren zwischen verschiedenen Analysemethoden unterschieden. Für normalverteilte Daten, die sich in einem Faktor unterschieden, wurde für die Ermittlung der statistischen Signifikanz ein ungepaarter, zweiseitiger Student's t-Test durchgeführt. Bei der Analyse von zwei Faktoren kam eine einseitige ANOVA zum Einsatz, während bei drei Faktoren eine zweiseitige ANOVA durchgeführt wurde, gefolgt von einem Tukeys post-hoc Test. Für nicht normalverteilte Daten wurde zunächst geprüft, ob durch eine log-Transformation eine Normalverteilung erreicht werden konnte. Anderenfalls wurden nicht parametrische Tests verwendet, wie dem Mann-Whitney-U-Test oder, für zweifaktorielle Daten, der Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunn's multiplen Vergleichstest.

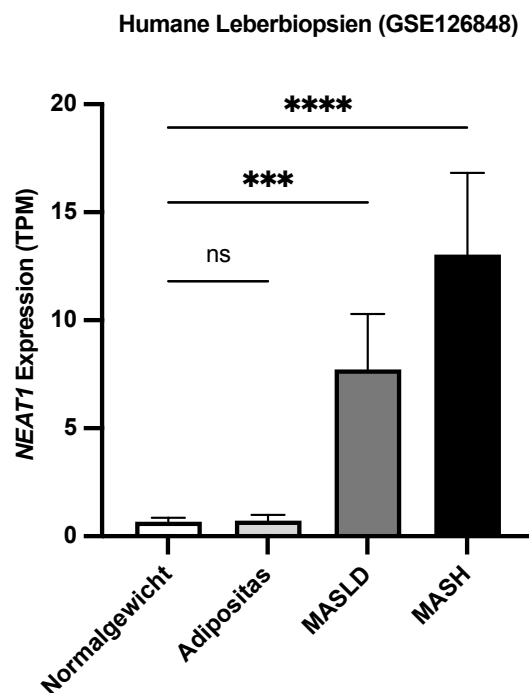
### 3. Ergebnisse

#### 3.1 *NEAT1* in MASLD und MASH

Um festzustellen, ob die *NEAT1*-Expression bei MASLD und MASH generell beeinträchtigt ist, wurden im ersten praktischen Teil dieser Arbeit verschiedene *in vivo*- und *in vitro*-Modellsysteme etabliert. Die *NEAT1*-Expression wurde anschließend in diesen Modellen, in bestehenden Daten und in öffentlich zugänglichen Datensätzen analysiert.

##### 3.1.1 Humane Leberbiopsien

Die Expressionsdaten des öffentlich zugänglichen Datensets GSE126848 (GeneOmnibus) wurden analysiert. Dieses Datenset umfasste humane Leberbiopsien von normalgewichtigen, adipösen, MASLD oder MASH-Patienten (Suppli et al., 2019). Die *NEAT1*-Expression war bei MASLD-Patienten signifikant hochreguliert. Auffällig war zudem ein progressiver Anstieg der *NEAT1*-Expression im Verlauf der Krankheitsentwicklung, mit den höchsten Expressionswerten bei MASH-Patienten (siehe Abbildung 12).



**Abbildung 12: *NEAT1*-Expression humaner Leberbiopsien**

Gezeigt ist die relative RNA-Expression von *NEAT1* gemessen mittels RNA-Sequenzierung in Transkripte pro Millionen (engl.: Transcripts per million, TPM) aus dem GEO Datenset GSE126848 von normalgewichtigen (n=14), adipösen (n=12), MASLD (n=15) oder MASH-Patienten (n=16). Die Daten werden als Säulendiagramm mit Mittelwert + SEM präsentiert. Nach dem Shapiro-Wilk Test und dem Kolmogorov-Smirnov Test sind die Daten nicht normalverteilt. Die Signifikanzanalyse wurde mit dem nichtparametrischen Kruskal-Wallis Test und anschließend dem Dunn's multiplen Vergleichstest durchgeführt. (\* =  $p \leq 0,05$ ; \*\* =  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$  \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ ).

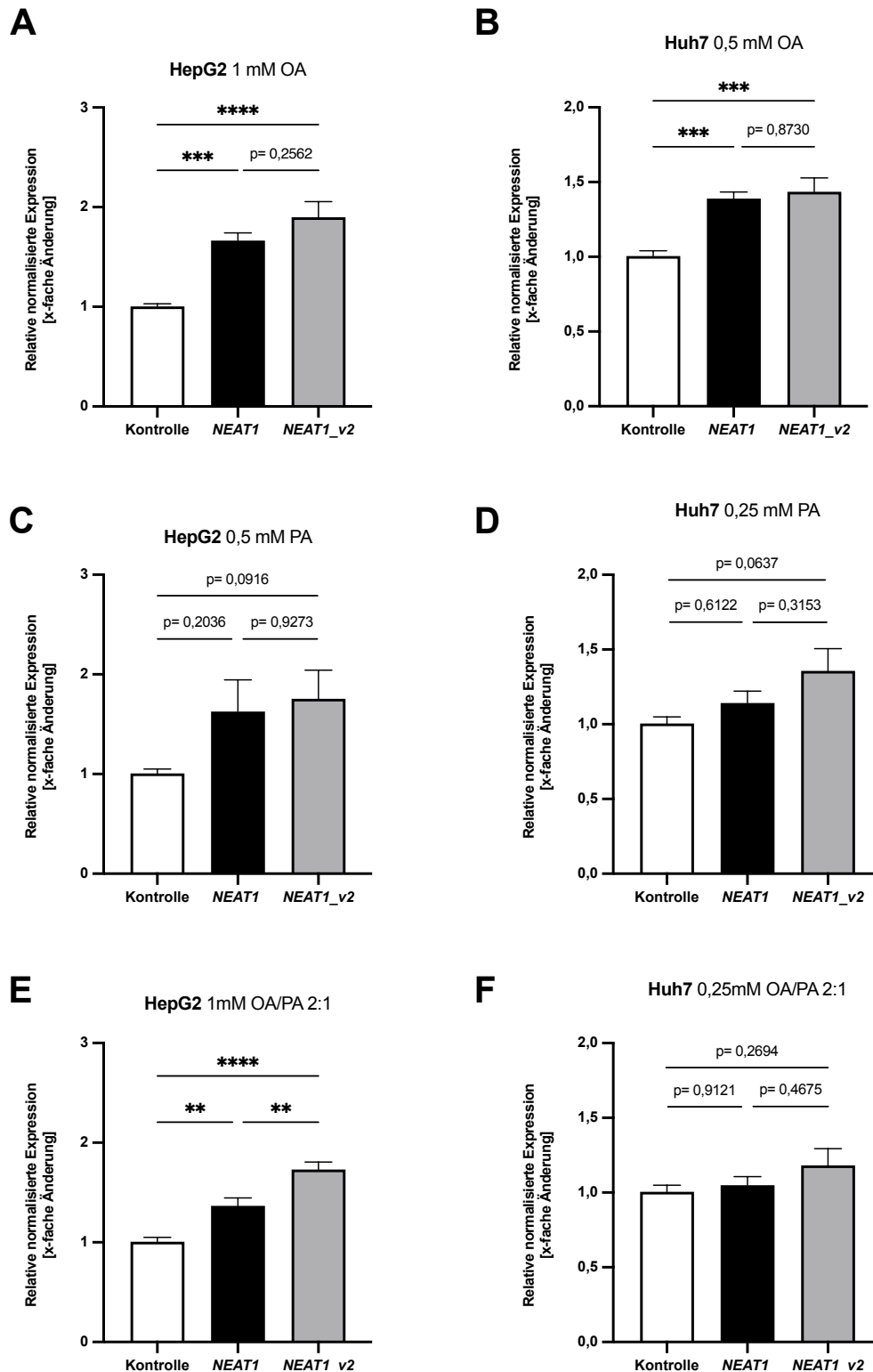
### 3.1.2 Humane *in vitro* MASLD Modelle

In den Leberzelllinien HepG2 und Huh7 wurden *in vitro* MASLD Modelle durch die Behandlung mit der ungesättigten Fettsäure Ölsäure (engl.: oleic acid, OA), der gesättigten Fettsäure Palmitinsäure (engl.: palmitic acid, PA) oder einer 2:1 Mischung aus OA und PA etabliert (siehe Abbildung 13). Die intrazelluläre Lipidakkumulation war sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch deutlich sichtbar (siehe Abbildung 14A). Eine verstärkte Lipideinlagerung in den OA-behandelten HepG2-Zellen wurde zudem mittels Nilrot-Färbung mit anschließender FACS-Analyse nachgewiesen (siehe Abbildung 14B). Die *NEAT1*-Expression war in allen Behandlungsgruppen tendenziell erhöht, wobei unter OA-Behandlung der stärkste und statistisch signifikante Anstieg zu verzeichnen war (siehe Abbildung 13A+B). Dieser Anstieg betraf sowohl die Gesamtexpression von *NEAT1* als auch die lange Isoform *NEAT1\_v2*. Zwischen der Gesamt-*NEAT1*-Expression und der der langen Isoform *NEAT1\_v2* konnte kein Expressionsunterschied festgestellt werden.

Um in dem, mit Fettsäuren erzeugten, steatotischen Modell auch ein einen inflammatorischen Stimulus zu setzen, um dem pathologischen Zustand von MASH näher zu kommen, wurden HepG2-Zellen neben Ölsäure, zusätzlich mit TNF- $\alpha$  behandelt. Die gewählten Inkubationszeiten und Konzentrationen führten allerdings zu keiner statistisch signifikanten Erhöhung der *NEAT1*-Expression (siehe Abbildung A 6A).

Ein Co-Kultur-Modell aus HepG2-Zellen und differenzierten, LPS-stimulierten THP-1-Zellen sollte die inflammatorische Komponente von MASH unter *in vivo*-ähnlichen Bedingungen nachbilden. Dazu wurde ein transwell-basiertes Co-Kultur-System etabliert, das eine parakrine Kommunikation zwischen den immunologisch aktivierten Makrophagen und den Hepatozyten ermöglicht (Padberg et al., 2020) (siehe Abbildung A 6B). In den THP-1-Zellen führte die LPS-Stimulation zu einer signifikanten Hochregulation der *NEAT1*-Expression, während in den HepG2-Zellen *NEAT1* tendenziell hochreguliert war, jedoch keine signifikante Veränderung der Expression nachweisbar war (siehe Abbildung A 6C+D).

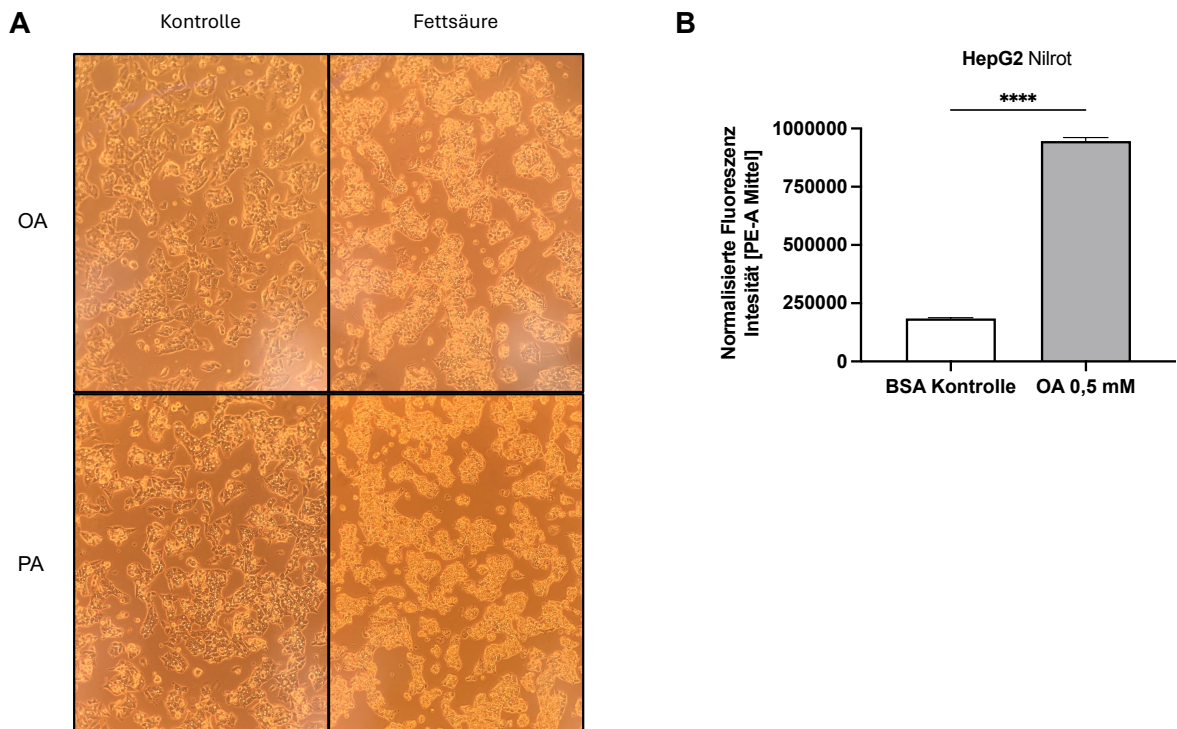
## Ergebnisse



### Abbildung 13: Humane *in vitro* MASLD Modelle

(A-F) Gezeigt sind die *NEAT1*-Expressionen, entweder Gesamt-*NEAT1* (alle Transkriptvarianten) oder *NEAT1\_v2* im Vergleich zur Kontrolle in HepG2- oder Huh7-Zellen nach 24-stündiger Behandlung der angegebenen Konzentration und Fettsäure. Die Analyse der Expression erfolgte mittels qPCR-Messung und ist dargestellt als x-fache Änderung zur Kontrolle. *18S* diente als Haushaltsgen. (A) n=4 (B-F) n=2. Die Daten werden als Säulendiagramm mit Mittelwert + SEM präsentiert. Die Statistik erfolgte mit ANOVA und Tukeys post hoc Test. \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\*p < 0,0001.

## Ergebnisse



**Abbildung 14: Humane *in vitro* MASLD-Modelle**

(A) Mikroskopische Aufnahme der HepG2-Zellen, die für 24 Stunden mit 1mM OA oder 0,5 mM PA behandelt wurden im Vergleich zur Kontrolle (Leica DMI8 Mikroskop, 10× Objektiv entspricht einer Originalvergrößerung von 100×). (B) FACS-Analyse der Nilrot-gefärbten HepG2-Zellen nach 0,5 mM OA-Behandlung im Vergleich zur BSA-Kontrolle. Die Daten werden als Säulendiagramm mit Mittelwert + SEM präsentiert. Die Statistik erfolgte mit einem ungepaarten t-Test. \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\* p < 0,0001.

Da aus der Literatur bekannt ist, dass der Überkonsum von Fruktose zur Entwicklung von MASLD beitragen kann (Ter Horst & Serlie, 2017), wurde die Inkubation mit 20 mM Fruktose für eine Woche an HepG2-Zellen getestet. Die *NEAT1*-Expression veränderte sich durch die Fruktose-Inkubation nicht, jedoch führte die Inkubation zu einer erhöhten Einlagerung von Lipiden, was mit dem Farbstoff Nilrot per FACS-Analyse nachgewiesen wurde (siehe Abbildung A 7).

In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass Dimethylsulfoxid (DMSO) hepatische Zelllinien in einen Primärzell-ähnlichen Phänotyp überführen können (Nikolaou et al., 2016). HepG2-Zellen, eine etablierte Hepatom-Zelllinie, wurden einer DMSO-Behandlung unterzogen. Die Behandlung der HepG2-Zellen mit DMSO erfolgte über einen Zeitraum von einem Monat. Dabei wurde DMSO in das Medium gegeben und mit jeder Subkultivierung erneuert. Durch diesen wiederholten Ansatz wurden die Zellen kontinuierlich stimuliert, was ihre Dedifferenzierung hin zu einem Zustand unterstützten sollte, der dem von primären Hepatozyten ähnelt.

In der Analyse zeigte sich, dass die Behandlung mit DMSO tendenziell eine Reduktion der *NEAT1*-Expression zur Folge hatte (siehe Abbildung A 8). Zusätzlich wurde ein Lipidom der



## Ergebnisse

DMSO-behandelten HepG2-Zellen angefertigt, um eine detailliertere Untersuchung der Lipidzusammensetzung und der daraus resultierenden metabolischen Veränderungen zu ermöglichen (siehe Abbildung A 9). Es zeigten sich signifikante Steigerung der Triglycerid (TG), der Cholesterinester (CE) sowie der Phosphatidylglycerol (PG)-Level in den DMSO-behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Signifikant geringere Level wiesen freies Cholesterin (FC), Phosphatidylinositol (PI), Phosphatidylserine (PS), Cardiolipin (CL), Lysophosphatidylcholin (LPC), Lysophosphatidylethanolamin (LPE), Phosphatidylcholinether (PCO) und Hexosylceramide (Hexcer) auf. Phosphatidylcholin (PC) und -ethanolamin (PE) zeigten eine nicht-signifikante Tendenz zur Abnahme.

Weiterhin wurden die Lipidom-Daten mit der LINEX<sup>2</sup> Webapplikation analysiert (siehe Abbildung A 10). Zu den häufigsten Reaktionstypen zählen die Fettsäure-Entfernung und Fettsäure-Modifikation. Aus dem Netzwerk geht hervor, dass die meisten TG-Spezies in den DMSO-behandelten Zellen erhöht sind. Auffällig ist TG48:0 als einzige im LINEX<sup>2</sup> Netzwerk erniedrigte TG-Spezies. Daraufhin wurden die gesättigten und ungesättigten TGs genauer analysiert. Während gesättigte TG-Spezies (Doppelbindung (DB) 0) in DMSO-behandelten Zellen abnahmen und einfach ungesättigte TGs (DB1) gleichblieben, nahmen die mehrfach ungesättigten TG mit steigender Anzahl an Doppelbindungen (DB2-DB8) zu (siehe Abbildung A 11).

### 3.1.3 Murine *in vivo* MASLD Modelle

Um herauszufinden, welches MASLD-Mausmodell für die Untersuchung von *Neat1* am besten geeignet ist, wurden verschiedene Fütterungsexperimente in Betracht gezogen. Aus vorherigen Studien standen Lebern von Mäusen zur Verfügung, dessen RNA extrahiert und die relative Expression von *Neat1* per qPCR gemessen wurde. Weiterhin wurden bereits vorhandene Expressionsdaten aus öffentlich zugänglichen Datensets ausgewertet.

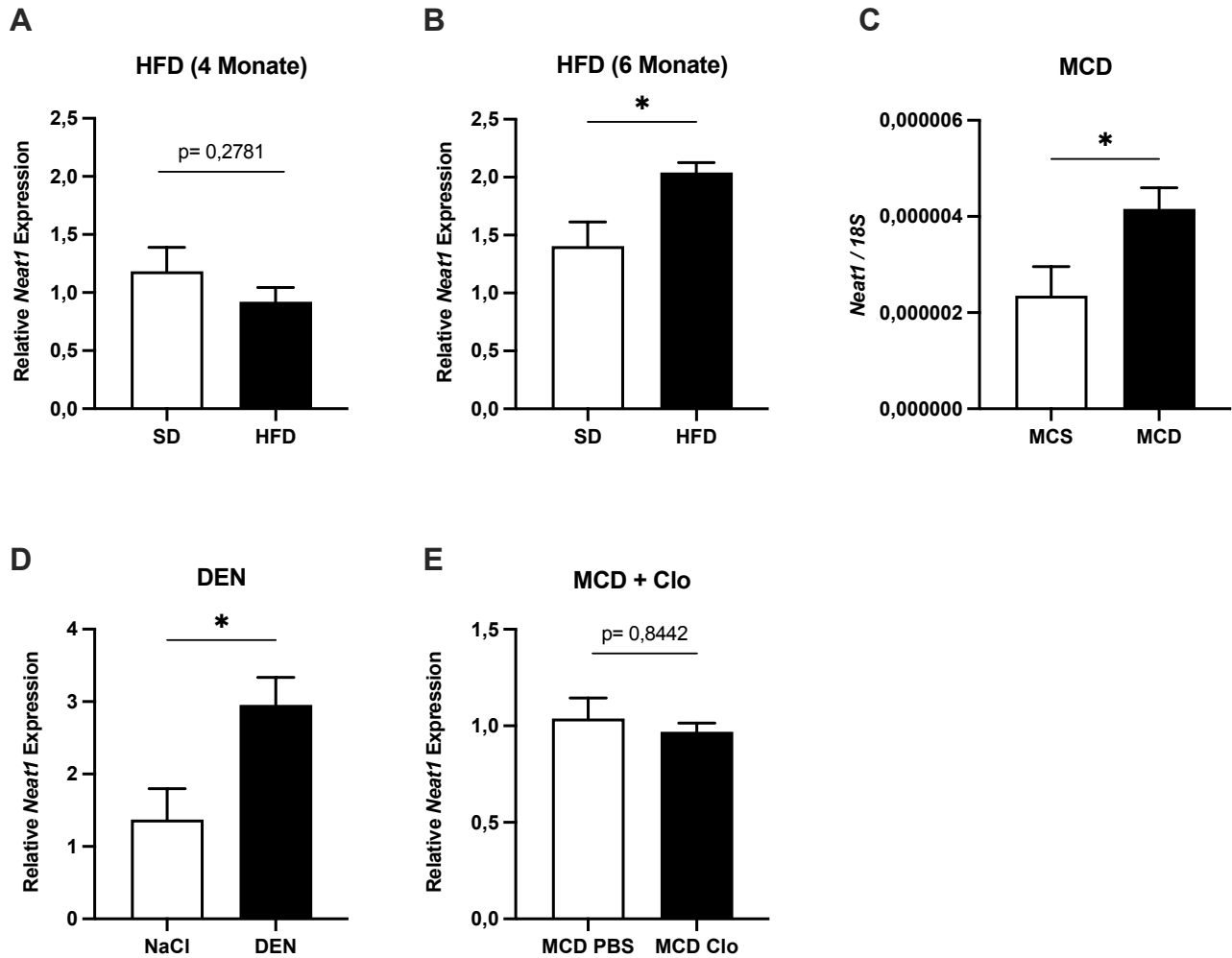
Die Mäuse der viermonatigen HFD-Diät (siehe Abschnitt 2.2.3) zeigten keinen signifikanten Unterschied in der Expression von *Neat1* in der Leber (siehe Abbildung 15A). Dahingegen zeigte eine Analyse des Datensets GDS2413 von männlichen C57BL/6NIA Mäusen, die für sechs Monate eine HFD-Diät erhielten (Baur et al., 2006), eine signifikante Erhöhung der *Neat1*-Expression Leber (siehe Abbildung 15B).

Bei Verwendung einer MCD-Diät über vier Wochen konnte gezeigt werden, dass die *Neat1*-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe (MCS) signifikant erhöht war (Simon et al., 2014) (siehe Abbildung 15C).

Weitere vorausgehenden Untersuchungen wiesen nach, dass entzündliche Ereignisse im Kurzzeit-DEN-Modell (einmalige intraperitoneale Injektion von 100 mg/kg Körpergewicht DEN in 0,9% NaCl mit 48 Stunden Inkubation) mit Veränderungen im Leberlipidprofil einhergehen, welche mit denjenigen in MASH-Modellen bei Mäusen vergleichbar sind (Kessler et al., 2015). Eine Analyse der *Neat1*-Expression zeigte einen signifikanten Anstieg im Vergleich zur Kontrolle Leber (siehe Abbildung 15D). Diese Ergebnisse bestätigten die Hypothese, dass *Neat1* vor allem bei entzündlichen Prozessen und der Progression zur Fibrose im Krankheitsbild MASH eine Rolle spielt.

Kupffer-Zellen sind die residenten Makrophagen der Leber und stellen einen integralen Bestandteil des angeborenen Immunsystems der Leber dar. Da die *Neat1*-Expression spezifisch unter entzündlichen Bedingungen erhöht ist, wurde untersucht, ob die Präsenz von Kupffer-Zellen einen relevanten Einfluss auf die *Neat1*-Expression hat. Daher wurde eine MCD-Diät in Kombination mit einer Depletion der Kupffer-Zellen durch die Injektion von Clodronat (Clo)-Liposomen durchgeführt (Kessler et al., 2014). Die Depletion von Kupffer-Zellen unter MCD-Diät führte zu keiner signifikanten Veränderung der *Neat1*-Expression im Vergleich zur Kontrolle (PBS-Injektion) (siehe Abbildung 15E).

## Ergebnisse



### Abbildung 15: *Neat1*-Expression in Mausmodellen von MASLD und Leberentzündung

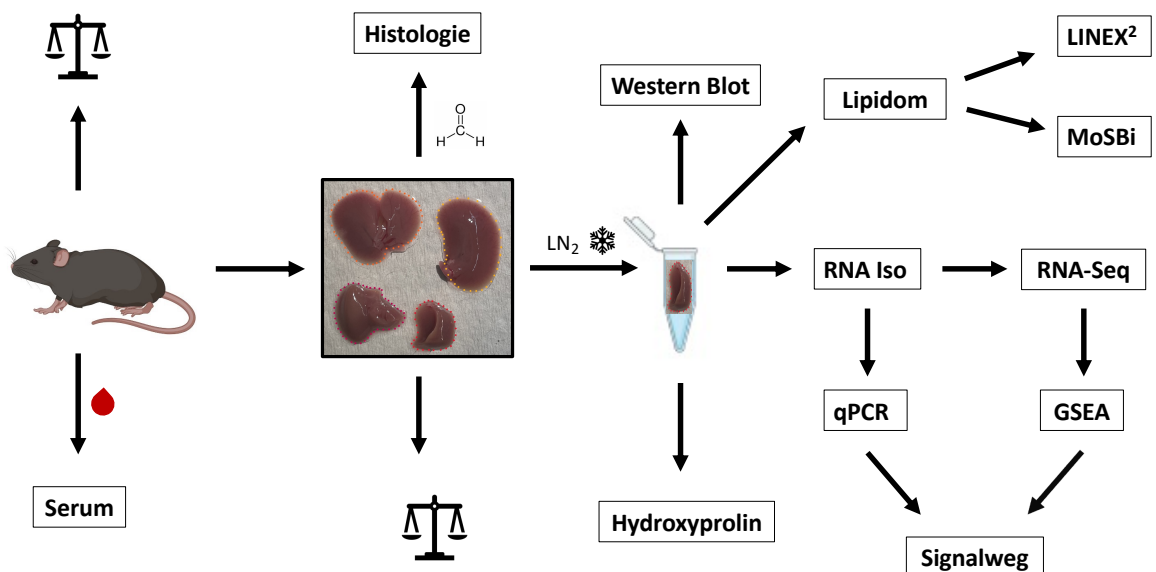
(A) Relative RNA-Expression von *Neat1* im Verhältnis zum Haushaltsgen *18S* gemessen per qPCR, in Mauslebern, nach einer Fütterungsdauer von 4 Monaten mit HFD oder Standard-Diät (SD) (n=10) (B) Relative RNA-Expression von *Neat1* nach Analyse der Microarray-Daten mittels Z-Score-Transformation des GEO-Datensets GDS2413 (n=5) in Mauslebern nach einer HFD- /SD-Fütterungsdauer von 6 Monaten. (C) Relative RNA-Expression von *Neat1* im Verhältnis zum Haushaltsgen *18S* in Lebern von Mäusen, nach 4 Wochen MCD-Diät (n=12) oder MCS-Kontrolle (n=10), per qPCR gemessen (Triplikate) (Simon et al., 2014). (D) Relative RNA-Expression von *Neat1* im Verhältnis zum Haushaltsgen *Csnk2a2*, in Mauslebern, nach intraperitonealer 100 mg/BW Diethylnitrosamin (DEN)- oder NaCl-Kontrollbehandlung (DEN n=6, NaCl-Kontrolle n=5) (Kessler et al., 2015) (E) Relative RNA-Expression von *Neat1* im Verhältnis zum Haushaltsgen *18S*, in Mauslebern, nach 3 Wochen MCD-Diät mit Injektion von entweder Clodronat-Liposomen, die zu einer Makrophagenabreicherung führen (MCD+Clo) oder PBS-Kontrollbehandlung (MCD+PBS) (n=9) (Kessler et al., 2014). Die Daten werden als Säulendiagramm mit Mittelwert + SEM dargestellt. Die Signifikanz wurde mit einem ungepaarten t-Test überprüft. (\* =  $p \leq 0,05$ ; \*\* =  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ ).

### 3.1.4 Murines *in vitro* MASLD Modell

Die Isolierung von primären murinen Hepatozyten wurde etabliert. Es gelang mit der Methode 10 bis 20 Millionen viable Hepatozyten zu isolieren (siehe Abbildung A 12). Die Kultivierung und Subkultivierung, sowie die Transfektion und Behandlung der Zellen wurde getestet. Um ein MASLD-Modell zu erzeugen, wurden die PMHs mit Ölsäure und Palmitinsäure behandelt. Makroskopisch sowie mikroskopisch konnte die Einlagerung der Fettsäuren in die PMHs beobachtet werden (siehe Abbildung A 13A). Im Anschluss wurde die Expression von *Neat1* analysiert. Während mit den getesteten Konzentrationen und Inkubationszeiten der Ölsäure keine signifikante Veränderung der *Neat1*-Expression erzielt werden konnte, führte die Behandlung mit Palmitinsäure zu einer signifikanten Erhöhung der *Neat1*-Expression (siehe Abbildung A 13B).

### 3.2 Die Rolle von *NEAT1* in MASH (MCD-Diät)

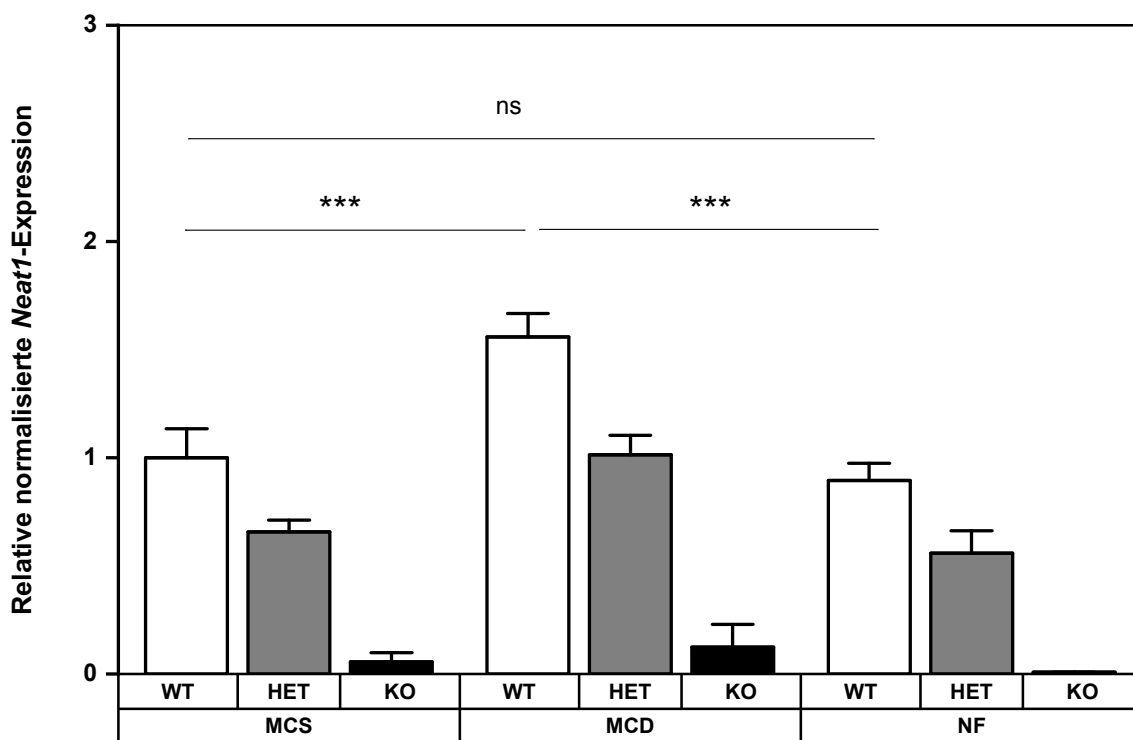
Die in den Vorversuchen gewonnenen Erkenntnisse der *in vivo* Vorversuche als auch ergänzende *in vitro* Daten bildeten die Grundlage für die Planung des Hauptexperiments. Während die Expressionsdaten der verschiedenen *in vivo* Modelle dazu dienten, ein geeignetes Modell auszuwählen, lieferten die *in vitro* Analysen zusätzliche Informationen zur pathophysiologischen Einordnung von *NEAT1*. Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde als Hauptexperiment eine MCD-Diät als Modell für MASH in Mäusen, mit unterschiedlicher *Neat1*-Expression (WT, HET, KO) sowie einem breiten Spektrum an Analysemethoden, gewählt (siehe Abbildung 16).



**Abbildung 16:** Schematische Darstellung der experimentellen Aufarbeitung des Hauptexperiments *NEAT1* in MASH (MCD-Diät)

### 3.2.1 *Neat1*-Expression

Die Expressionsanalyse von *Neat1* zeigte, dass die MCD-Diät sowohl zu einer signifikanten Erhöhung im Vergleich zur Kontrolldiät MCS als auch der NF-Kontrolle führte, während die Kontrolldiät MCS im Vergleich zum NF keine Effekte auf die *Neat1*-Expression hatte (siehe Abbildung 17). In allen Futtergruppen ist die erwartete Abstufung der *Neat1*-Expression von WT- zu HET- zu KO-Mäusen sichtbar. Die geschlechtergetrennte Analyse der Expression zeigte außerdem, dass männliche im Vergleich zu weiblichen Mäusen die Tendenz zur höheren *Neat1*-Expression hatten, was in HET-MCD Tieren sogar signifikant war (siehe Abbildung A 14).



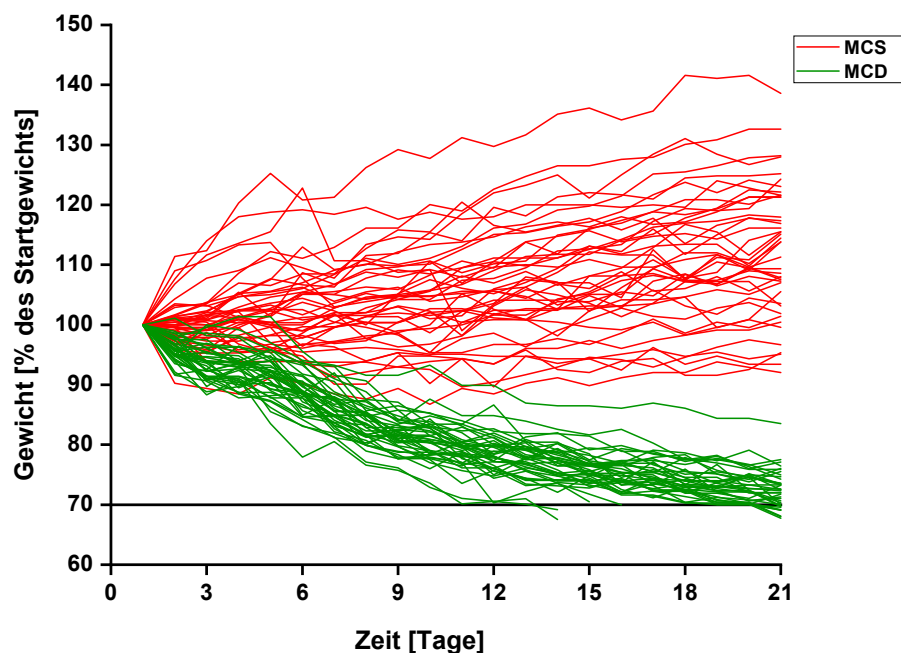
**Abbildung 17: *Neat1*-Expressionsanalyse**

Die Expression von *Neat1* von allen Futtergruppen (MCS, MCD, NF) und Genotypen (WT, HET, KO) wurde per qPCR mit Standard bestimmt und wird dargestellt als Verhältnis von *Neat1* zu den Haushaltsgenen *18S*, *Ppia* und *Csnk2a2*, normalisiert auf die Kontrollgruppe WT MCS. Die Daten werden als Säulendiagramm mit Mittelwert + SEM dargestellt (MCS, MCD n=14; NF n=10). Die Signifikanz wurde mit einer einseitigen ANOVA bestimmt. Tukeys post-hoc Test ns= nicht signifikant, \* =  $p \leq 0,05$ ; \*\* =  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ .

### 3.2.2 Allgemeine Effekte der Diät und Serumparameter

Aus der Literatur ist bekannt, dass Mäuse, denen Methionin und Cholin durch eine artifizielle Diät (MCD) vorenthalten werden, eine kachektische Verfassung entwickeln (Rizki et al., 2006). Dennoch hatten die Tiere der MCD-Diät während des Versuchs eine noch stärkere Reduktion des Körpergewichts als in der Versuchsplanung angenommen. Die zuvor definierten Kriterien, nach denen der Versuch beendet werden musste, falls mehr als 30% des Körpergewichts verloren gingen, wurden bereits nach einer Versuchsdauer von fast drei Wochen nahezu erreicht (siehe Abbildung 18). In der Konsequenz wurde die Dauer des Versuchs verkürzt, sodass dieser nach einer Gesamtdauer von drei Wochen, statt wie geplant vier Wochen, beendet wurde.

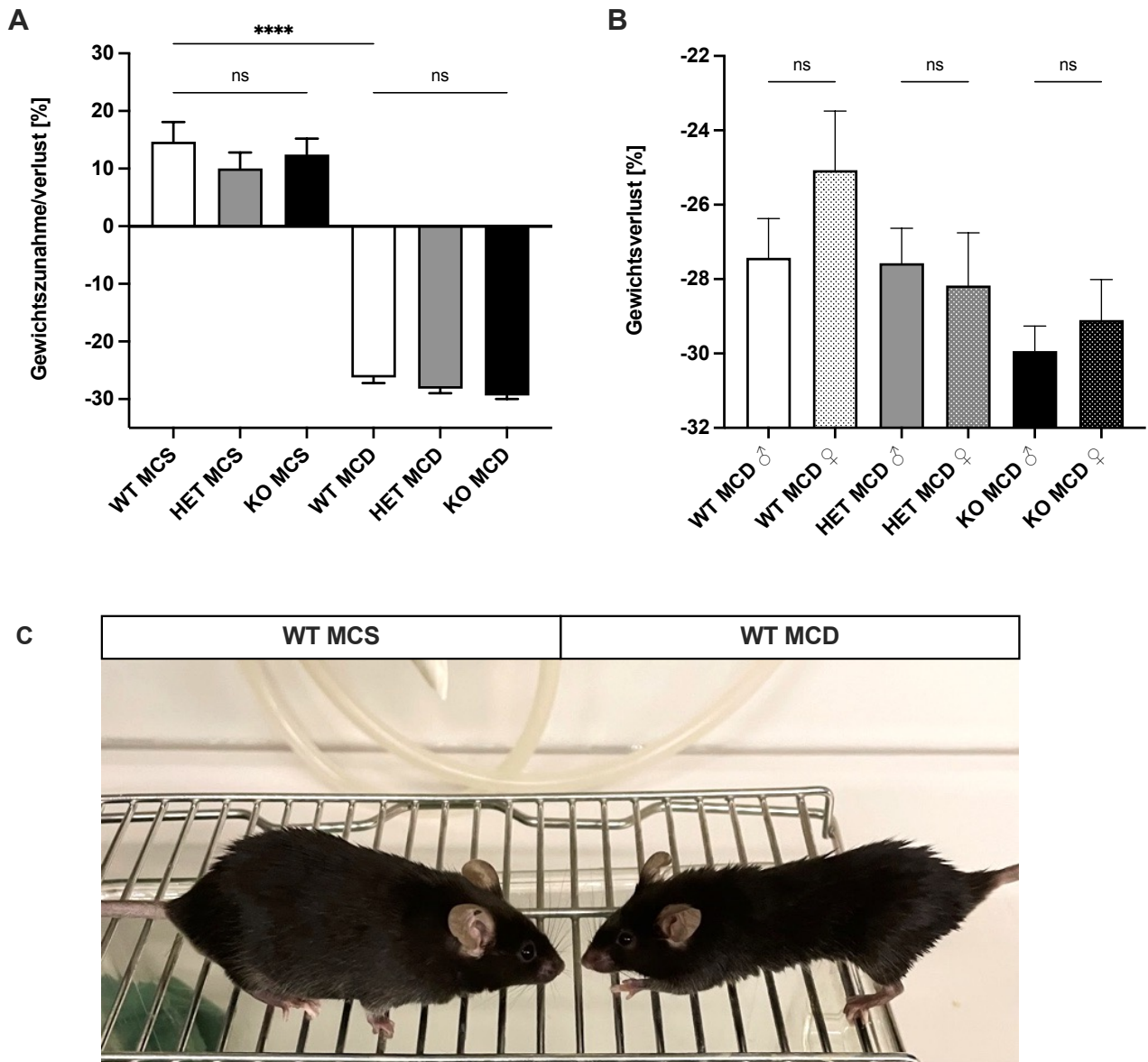
Gewichtsverlust ist ein typisches Merkmal der MCD-Diät und wurde bei Tieren aller Genotypen festgestellt. Zu Versuchsbeginn, im Alter von 10 bis 12 Wochen, wogen die männlichen Tiere  $27 \text{ g} \pm 2 \text{ g}$  und die weiblichen Tiere  $22 \text{ g} \pm 1 \text{ g}$ . Unter der MCD-Diät verloren die Tiere im Mittel 28% ihres anfänglichen Körpergewichtes, während die Tiere unter der Kontrolldiät MCS im Mittel 12% an Gewicht zulegten (siehe Abbildung 19A). Ein Trend zeigte, dass die weiblichen WT und KO-Mäuse weniger Gewicht verloren als die männlichen Tiere. Folglich waren männliche KO-Mäuse die am stärksten betroffene Untergruppe mit dem stärksten Gewichtsverlust (siehe Abbildung 19B). Abbildung 19C zeigt den visuellen Unterschied des Körperbaus von MCS zu MCD gefütterten Mäusen am Ende des Versuchs.



**Abbildung 18: Gewichtsverlauf während der MCS- und MCD-Diät**

Dargestellt ist der Gewichtsverlauf des Körpergewichts von MCS- und MCD-Mäusen prozentual zum Startgewicht. Das Gewicht wurde täglich ermittelt und über 21 Tage dokumentiert (n=42).

## Ergebnisse

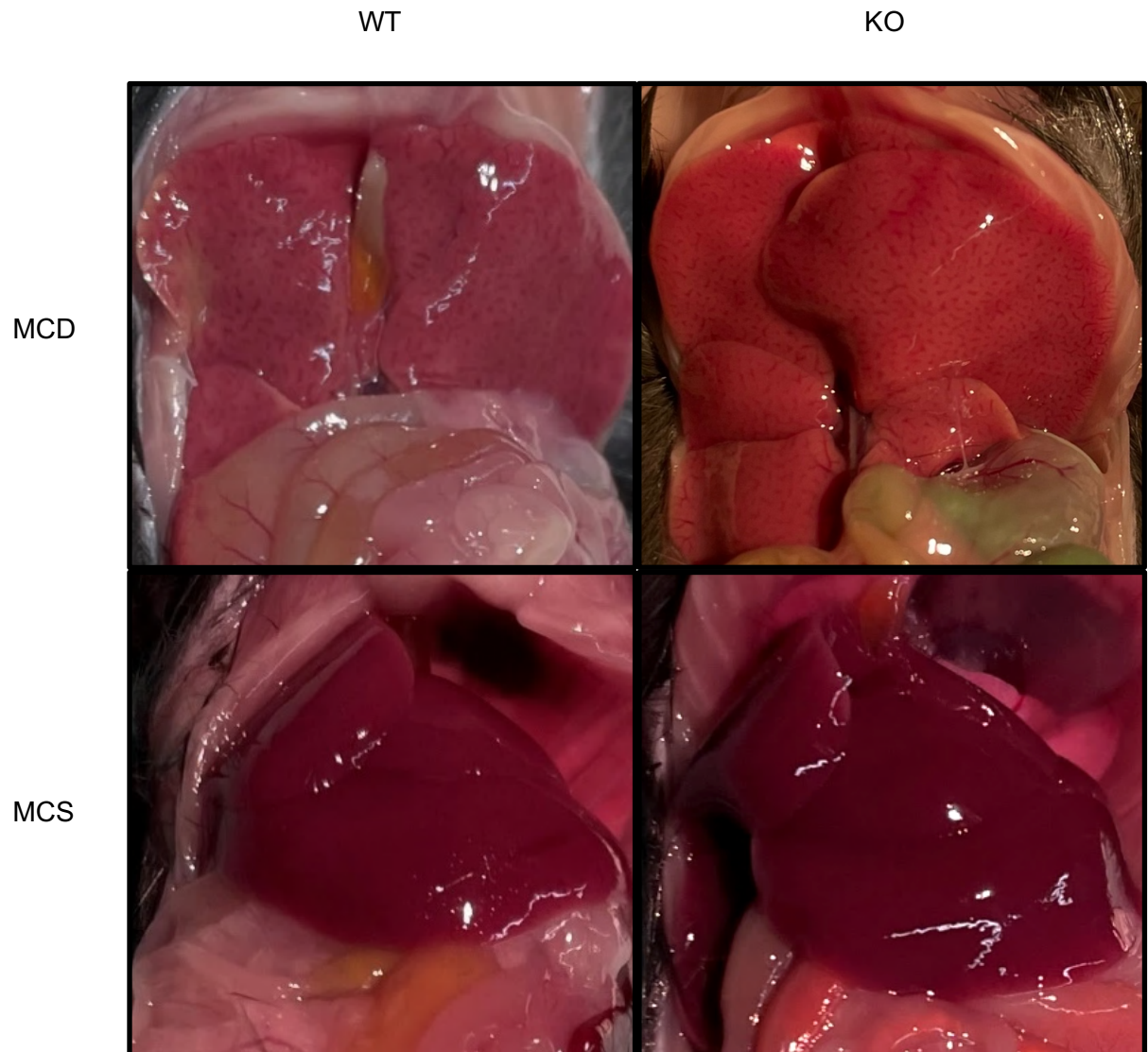


**Abbildung 19: Gewichtsveränderungen durch MCS- und MCD-Fütterung**

(A) Gewichtszunahme- oder verlust der Genotypen (WT, HET, KO) zu Versuchsende von MCS- und MCD-Mäusen. (B) Gewichtsverlust der MCD-Mäuse unterteilt nach Genotyp und Geschlecht. Die Daten werden als Säulendiagramm mit Mittelwert und SEM dargestellt (n=14). Die Signifikanz wurde mit einer einseitigen ANOVA bestimmt (Tukeys post-hoc Test ns= nicht signifikant, \* =  $p \leq 0,05$ ; \*\* =  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$  \*\*\*\* =  $p \leq 0,0001$ ). (C) Foto von WT-Mäusen, die 3 Wochen lang mit der Kontrolldiät MCS (links) oder der MCD-Diät (rechts) gefüttert wurden.

## Ergebnisse

Die Lebern wurden zunächst makroskopisch untersucht, um ihre Farbe und die baulichen Merkmale festzustellen. Die Mäuse aller Genotypen der Kontrolldiät MCS wiesen keine makroskopischen Anomalien auf. Die Lebern waren intensiv rot gefärbt, hatten eine glatte Oberfläche und waren von normaler Größe. Im Gegensatz dazu waren die Lebern der Tiere, die die MCD-Diät erhielten, vergleichsweise blass, leicht gelblich verfärbt und wiesen eine sichtbare Veränderung der Mikroarchitektur auf (siehe Abbildung 20).

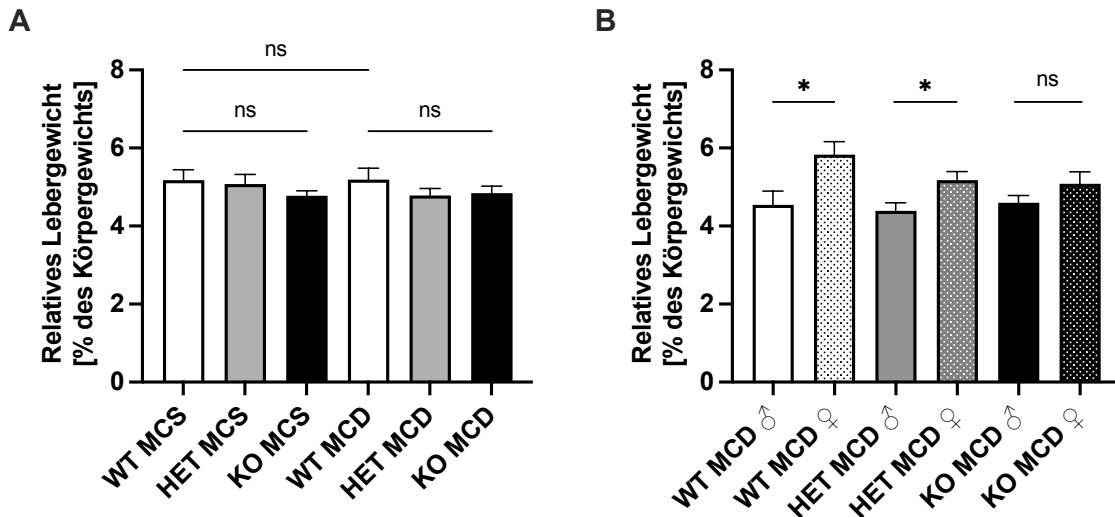


**Abbildung 20: Makroskopische Beobachtungen der Lebern von WT- und KO-Mäusen nach Fütterung mit der MCD-Diät oder der Kontrolldiät MCS**



## Ergebnisse

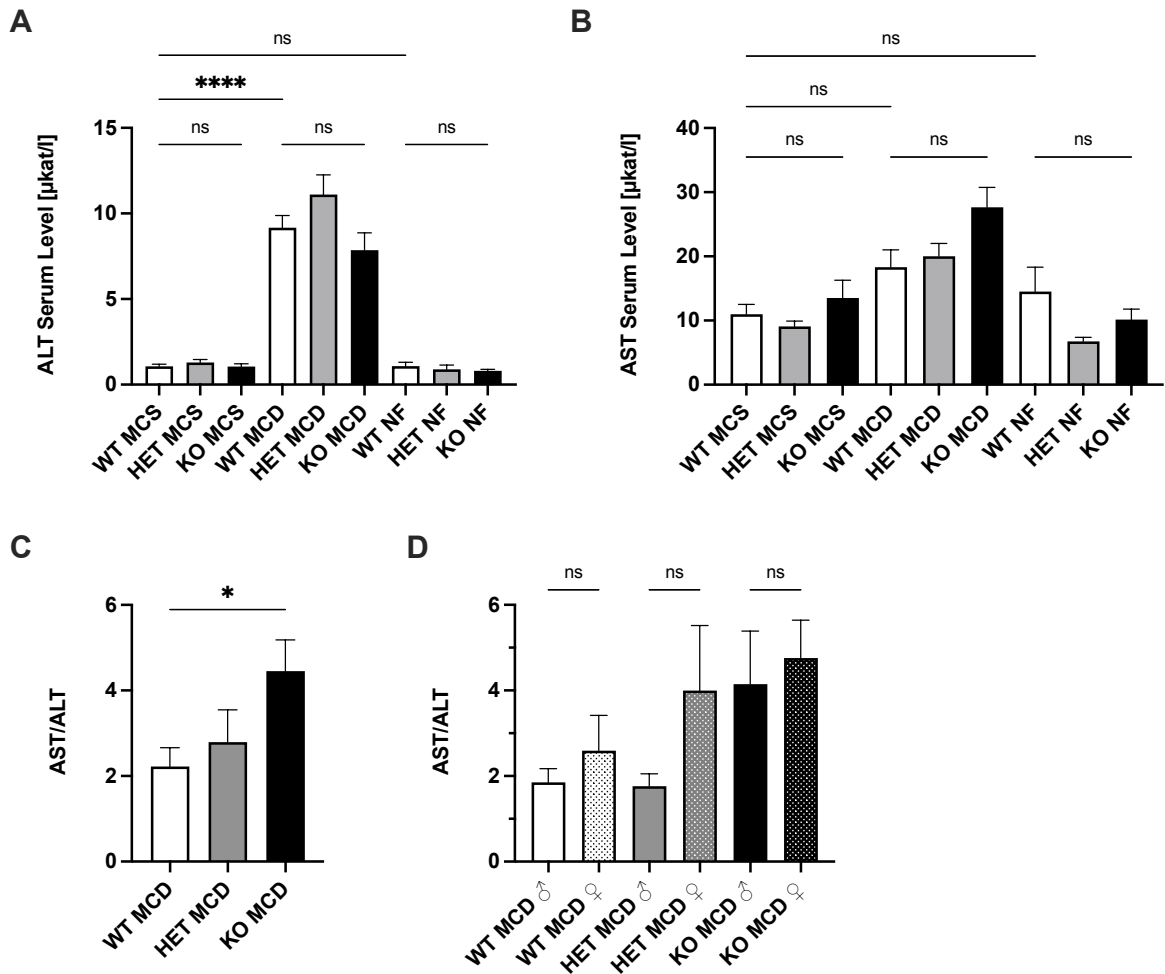
Das relative Lebergewicht prozentual zum Körpergewicht veränderte sich unter der MCD-Diät im Vergleich zur Kontrolldiät MCS nicht (siehe Abbildung 21A). Es ließ sich jedoch ein geschlechterspezifischer Trend erkennen, der sich in einem höheren relativen Lebergewicht der weiblichen Tiere im Vergleich zu den männlichen Tieren manifestierte (siehe Abbildung 21B).



**Abbildung 21: Relatives Lebergewicht**

(A) Dargestellt ist das relative Lebergewicht der Mäuse nach 3 Wochen Fütterung mit MCS oder MCD-Diät prozentual zum Körpergewicht (n=14). (B) Geschlechtsspezifische Auswertung des relativen Lebergewichts der mit MCS und MCD gefütterten Mäuse (% des Körpergewichts) (n=7). Die Robuste Regressions- und Ausreißerentfernungsmethode (ROUT) mit einem Q-Koeffizienten von 1% wurde durchgeführt, gefolgt von einer einseitigen ANOVA (Tukeys post-hoc Test ns= nicht signifikant, \* =  $p \leq 0,05$ ; \*\* =  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$  \*\*\*\* =  $p \leq 0,0001$ ) (B) Zweiseitige ANOVA (Tukeys post-hoc Test ns= nicht signifikant, \* =  $p \leq 0,05$ )

Im Vergleich zu den Kontrolldiäten konnte eine Erhöhung der im Serum gemessenen Transaminasen ALT und AST festgestellt werden (siehe Abbildung 22A+B). Dabei waren die leberspezifischeren ALT-Level unter MCD-Diät stärker erhöht als die AST-Level. Die ALT-Level der männlichen Tiere waren tendenziell höher als die der weiblichen Tiere, während es bei AST keinen geschlechterspezifischen Trend gab (siehe Abbildung A 15). Das Verhältnis zwischen AST und ALT stieg innerhalb der MCD-Diät von WT über HET zu KO an und war in weiblichen Mäusen tendenziell stärker ausgeprägt als in männlichen Tieren (siehe Abbildung 22C+D).

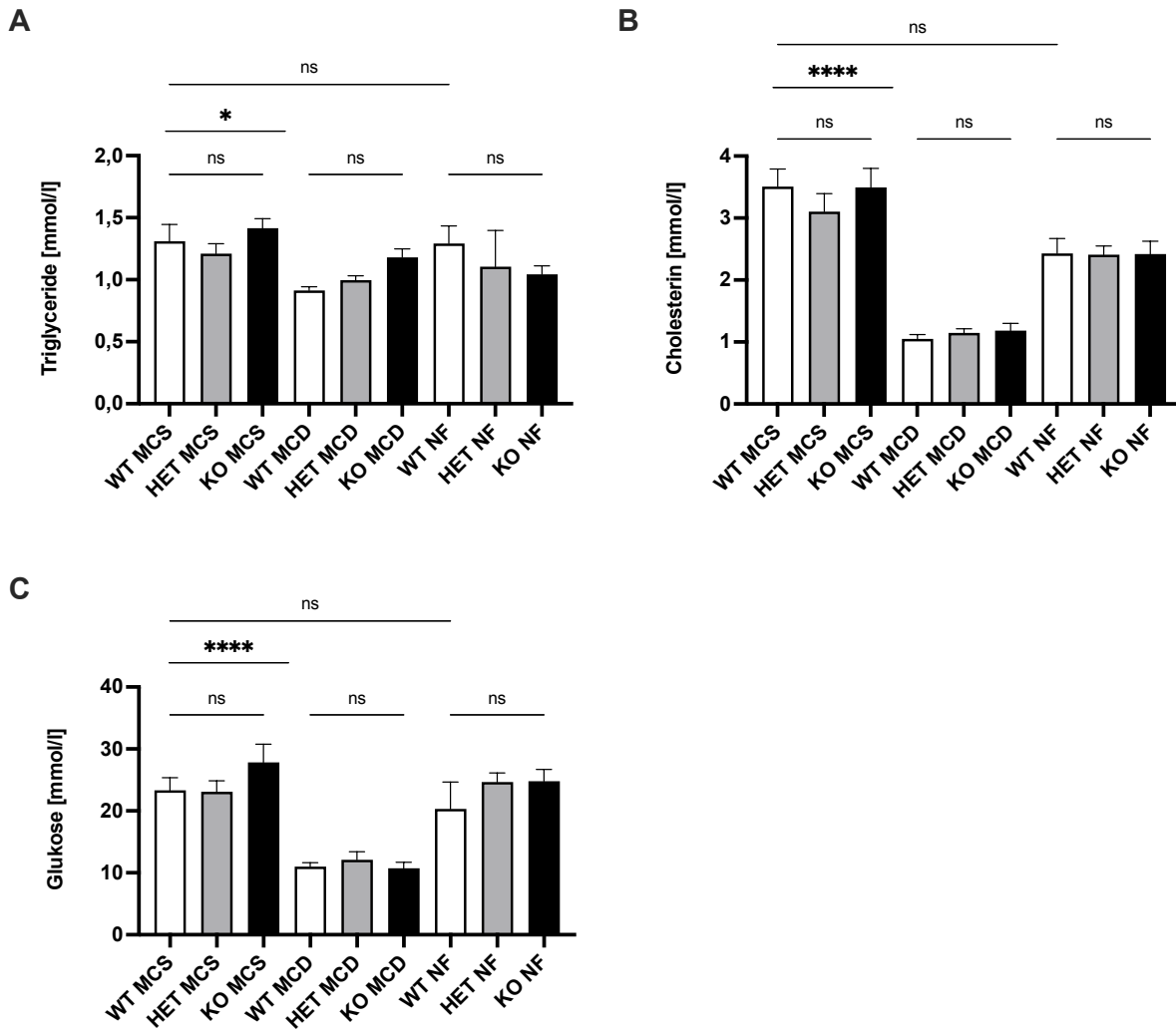


**Abbildung 22: Serumlevel ALT und AST**

Serumlevel von (A) Alanin-Aminotransferase (ALT), (B) Aspartat-Aminotransferase (AST), dem (C) AST/ALT-Verhältnis und (D) das geschlechtergetrenntes AST/ALT-Verhältnis von MCS, MCD oder NF gefütterten Mäusen (jeweils n=14, außer HET MCD n=13; WT NF n=5; HET NF n=4; KO NF=10). Die Ausreißerentfernungsmethode ROUT wurde mit einem Q-Koeffizienten von 1% durchgeführt, gefolgt von einer einseitigen ANOVA (Tukeys post-hoc Test ns= nicht signifikant, \* = p ≤ 0,05; \*\* = p ≤ 0,01; \*\*\* = p ≤ 0,001 \*\*\*\* = p ≤ 0,0001) (D) Zweiseitige ANOVA (Tukeys post-hoc Test ns= nicht signifikant, \* = p ≤ 0,05)

Des Weiteren konnten eine Abnahme der Serumparmeter Triglyceride und Cholesterin beobachtet werden, welche auf die Hypothese zurückzuführen ist, dass durch den Cholinmangel eine verminderte VLDL-Sekretion aus der Leber resultiert (siehe Abbildung 23A+B). Männliche KO-Mäuse hatten unter allen Fütterungsbedingungen tendenziell höhere Triglycerid-Level als die weiblichen KO-Tiere (siehe Abbildung A 15C). Auch bei Cholesterin hatten die männlichen Mäuse unter MCS- und NF tendenziell höhere Level als die weiblichen Mäuse (siehe Abbildung A 15D). Die Serumglukose nahm im Vergleich zur Kontrolldiät signifikant ab (siehe Abbildung 23C). Während unter MCS-Diät eher die männlichen Mäuse höhere Glukose-Level hatten, kehrte sich dieser Effekt unter MCD-Diät um, und die weiblichen Mäuse hatten im Trend die höheren Serumglukose-Level (siehe Abbildung A 15E).

## Ergebnisse

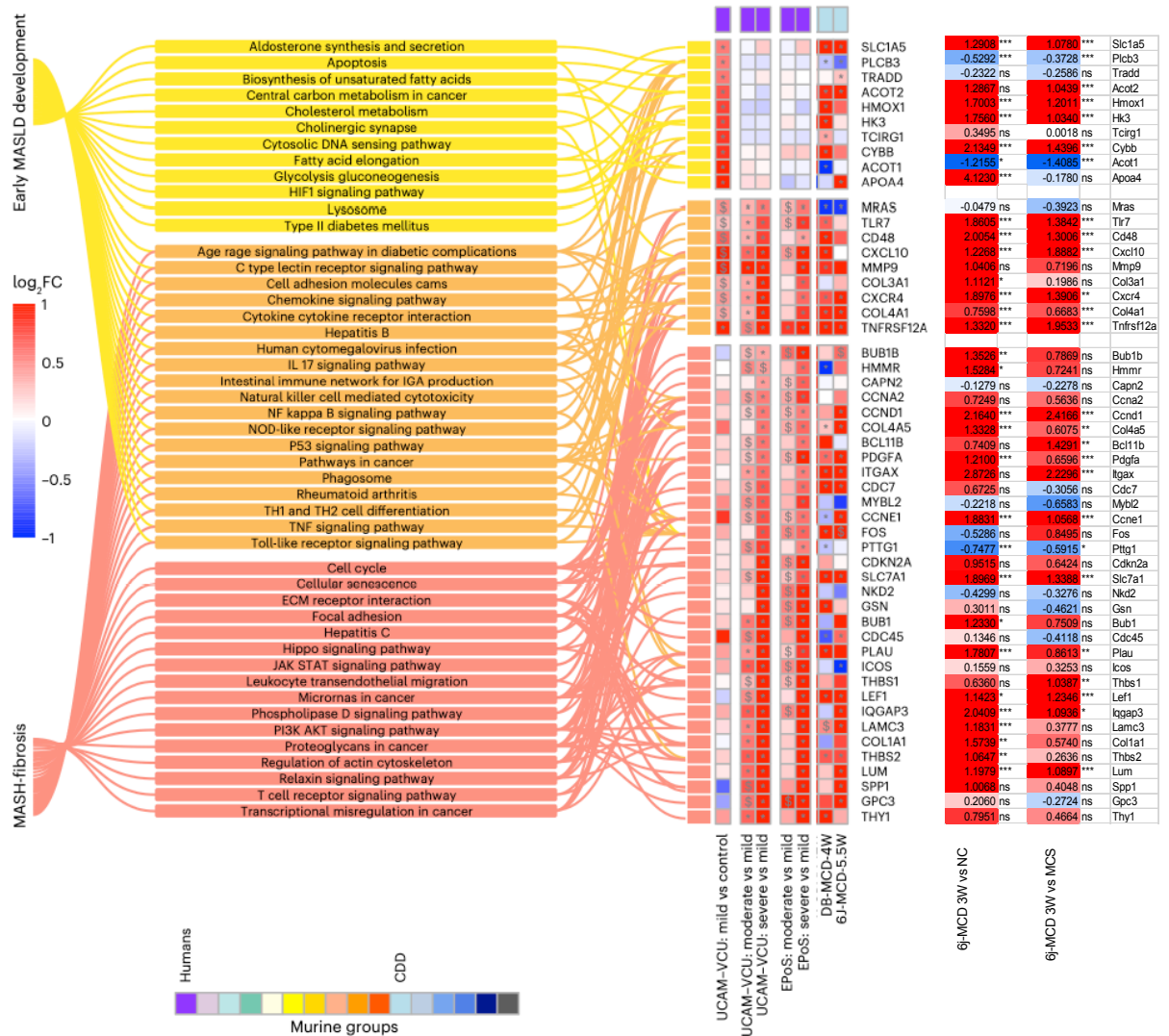


### Abbildung 23: Serumparameter

(A) Dargestellt sind die Serumlevel von Triglyceriden, (B) Cholesterin und (C) Glukose von MCS, MCD und NF gefütterten Mäusen (jeweils n=14, außer HET MCD n=13; WT NF n=5; HET NF n=4; KO NF=10). Die Daten sind als Säulendiagramm mit Mittelwert + SEM dargestellt. Die Ausreißerentfernungsmethode ROUT wurde mit einem Q-Koeffizienten von 1% durchgeführt, gefolgt von einer einseitigen ANOVA (Tukeys post-hoc Test ns= nicht signifikant, \* =  $p \leq 0,05$ ; \*\* =  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$  \*\*\*\* =  $p \leq 0,0001$ ).

Weiterhin wurden die von Vacca et al. (2024) herauskristallisierten Gene für die frühe MASLD-Entwicklung (engl.: early MASLD Development), MASLD-Progression, MASH-Progression und MASH-Fibrose in den RNA-Sequenzierungsdaten analysiert (Vacca et al., 2024) (siehe Abbildung A 17). Die Expressionsdaten stimmen mit den von Vacca et al. (2024) gemessenen Daten überein und zeigen eine gute Übereinstimmung mit den Expression-Leveln aus den humanen Leberproben (siehe Abbildung 24).

## Ergebnisse



**Abbildung 24: Vergleich von pathologisch relevanten Genen in MASLD und MASH bei Mensch und Maus (Vacca et al., 2024)**

Die Abbildung wurde adaptiert von Vacca et al. (2024) und mit eigenen Daten erweitert. Gezeigt werden pathologisch relevante Gene bei menschlichem und murinem MASLD. Diese stehen mit den verschiedenen Stadien der MASLD-Entwicklung oder -Progression in Verbindung. Die Datensätze von Mensch und Maus sind in einer farbigen Matrix dargestellt, die den log2FC zeigt. Die Symbole \* und \$ kennzeichnen die statistische Signifikanz (\$,  $P < 0,05$ ; \*, bereinigtes  $P < 0,05$  (Benjamini-Hochberg-Korrektur)). Wie die farbige Legende zeigt, wurden alle Modelle nach ihren Makro-Kategorien gruppiert (hier Mensch und MCD-Diät gezeigt und mit den eigenen Ergebnissen der RNA-Sequenzierung gegenübergestellt). Dabei ist links der Vergleich der MCD-Tiere im Vergleich zum Normalfutter (engl.: normal chow, NC) und rechts im Vergleich zur MCS-Kontrolle. Die farbige Matrix zeigt ebenfalls den log2FC und die statistische Signifikanz wurden mit einem Student's t-Test ermittelt ns= nicht signifikant, \* =  $p \leq 0,05$ ; \*\* =  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ .

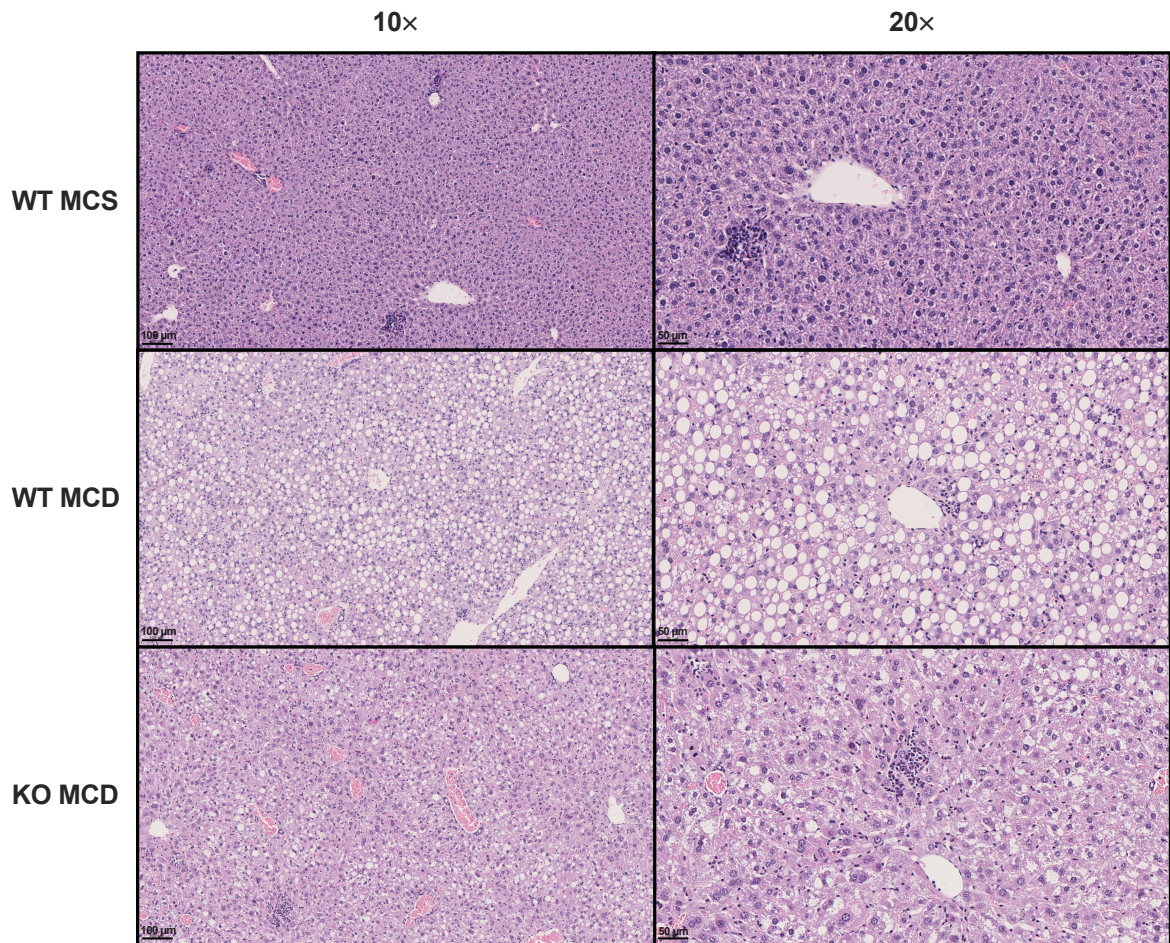
### **3.2.3 Steatose- *Neat1*-KO verändert die hepatische Lipidzusammensetzung**

#### **3.2.3.1 Histologische Analyse**

Bei der histologischen Untersuchung wurde zunächst eine Hämatoxylin- und Eosin- (H&E) Färbung durchgeführt (siehe Abbildung 25). Anhand dieser Färbung wurde der Steatosegrad analysiert und anhand der Parenchymbeteiligung sowohl mediovesikulär als auch mikrovesikulär bewertet. Es zeigte sich, dass die MCD-Tiere eine stärker ausgeprägte mediovesikuläre Steatose entwickelten, während die mikrovesikuläre Steatose keinen Unterschied zwischen MCD- und Kontrolldiät MCS aufwies (siehe Abbildung 26A+C). Des Weiteren wurde die Distribution der Steatose untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Steatose in allen Genotypen unter der MCD-Diät hauptsächlich azonal lokalisiert war. Daneben tendierten WT- und HET-Mäuse sowohl in der medio- als auch mikrovesikulären Distribution zur intermediären Lokalisation, KO-Mäuse zeigten eine Tendenz zur panazinaren Lokalisation (siehe Abbildung 26B+D). In Bezug auf die morphometrische Beurteilung der Steatose fiel auf, dass bei den MCD-Mäusen erwartungsgemäß prozentual mehr Parenchymfläche betroffen war als bei den MCS-Mäusen (siehe Abbildung 26E). Zwischen den Genotypen konnte in Bezug auf den Steatosegrad kein Unterschied festgestellt werden. Interessanterweise zeigte sich jedoch in Bezug auf das Geschlecht, dass weibliche Mäuse einen höheren Steatosegrad aufwiesen als männliche Mäuse (siehe Abbildung A 18).

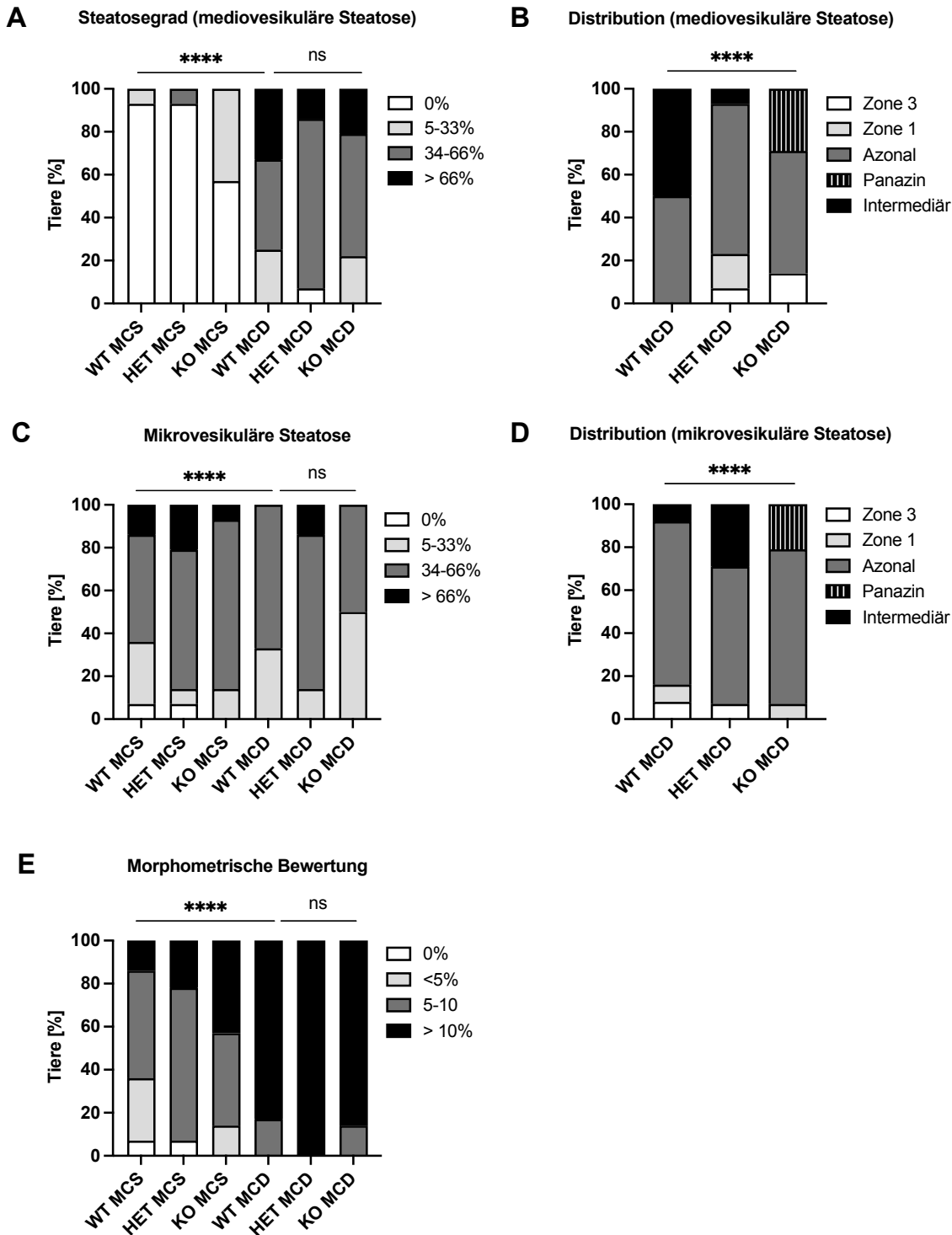


## Ergebnisse



### Abbildung 25: H&E Färbung der Leberschnitte

Repräsentative Bilder der H&E-Färbung von WT-MCS-, WT-MCD- und KO-MCD-Mäusen (10× und 20× Objektiven entspricht einer Originalvergrößerung von 100× und 200×). Der Maßstab ist jeweils unten links in den histologischen Aufnahmen verankert (100 µm bei 10× Bildern und 50 µm bei 20× Bildern).

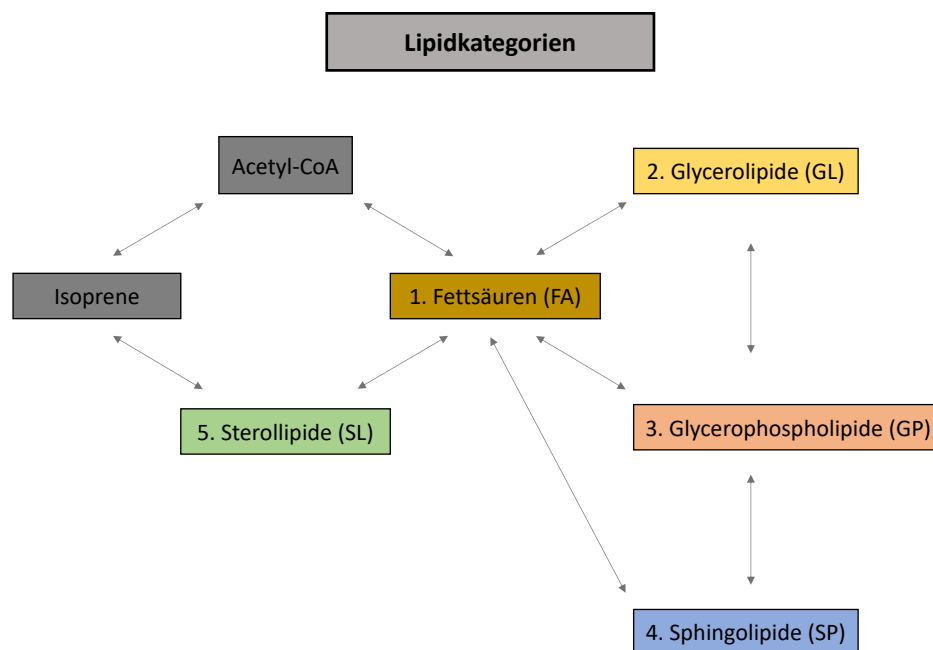


**Abbildung 26: Histologische Analyse der Steatose**

Histologische Auswertung der H&E-Färbung in Lebern von MCD- und MCS- (Kontrolle) gefütterten Mäusen (A) Steatosegrad (mediovessikulär; parenchymatöse Beteiligung) (jeweils n=14; WT MCD n=12) (B) Distribution der Steatose (mediovessikulär) (WT MCD n=12; HET MCD n=13; KO MCD n=14) (C) Mikrovesikuläre Steatose (jeweils n=14; WT MCS n=13; HET MCS n=13; WT MCD n=12) (D) Distribution der Steatose (mikrovesikulär) (WT MCD n=12; HET MCD n=14; KO MCD n=14) (E) Morphometrische Bewertung der Steatose beurteilt in % der Parenchymfläche (jeweils n=14; WT MCD n=12). Die Daten sind als gestapelte Kontingenzbalken dargestellt. Die Signifikanz wurde mit einem Fisher Test bestimmt \* =  $p \leq 0,05$ ; \*\* =  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$  \*\*\*\* =  $p \leq 0,0001$ .

### 3.2.3.2 Lipidom- Allgemeine Diäteeffekte

Um die spezifischen Unterschiede in der Lipidzusammensetzung nach MCD-Diät und zwischen den verschiedenen Genotypen zu identifizieren, wurde ein umfassendes Lipidom erstellt. Das Lipidom setzt sich aus fünf Lipidkategorien zusammen, den Fettsäuren, den Glycerolipiden, den Glycerophospholipiden, den Sphingolipiden und den Sterollipiden (siehe Abbildung 27). Diese Lipidkategorien sind weiter unterteilt in Lipidklassen wie zum Beispiel Triglyceride als Lipidklasse der Lipidkategorie Glycerolipide (siehe Abbildung A 19). Die Lipidklassen sind abschließend noch unterteilt in Lipidspezies, wie zum Beispiel TG54:4 (Tam et al., 2021) (siehe Abbildung A 19).



**Abbildung 27: Lipidkategorien**

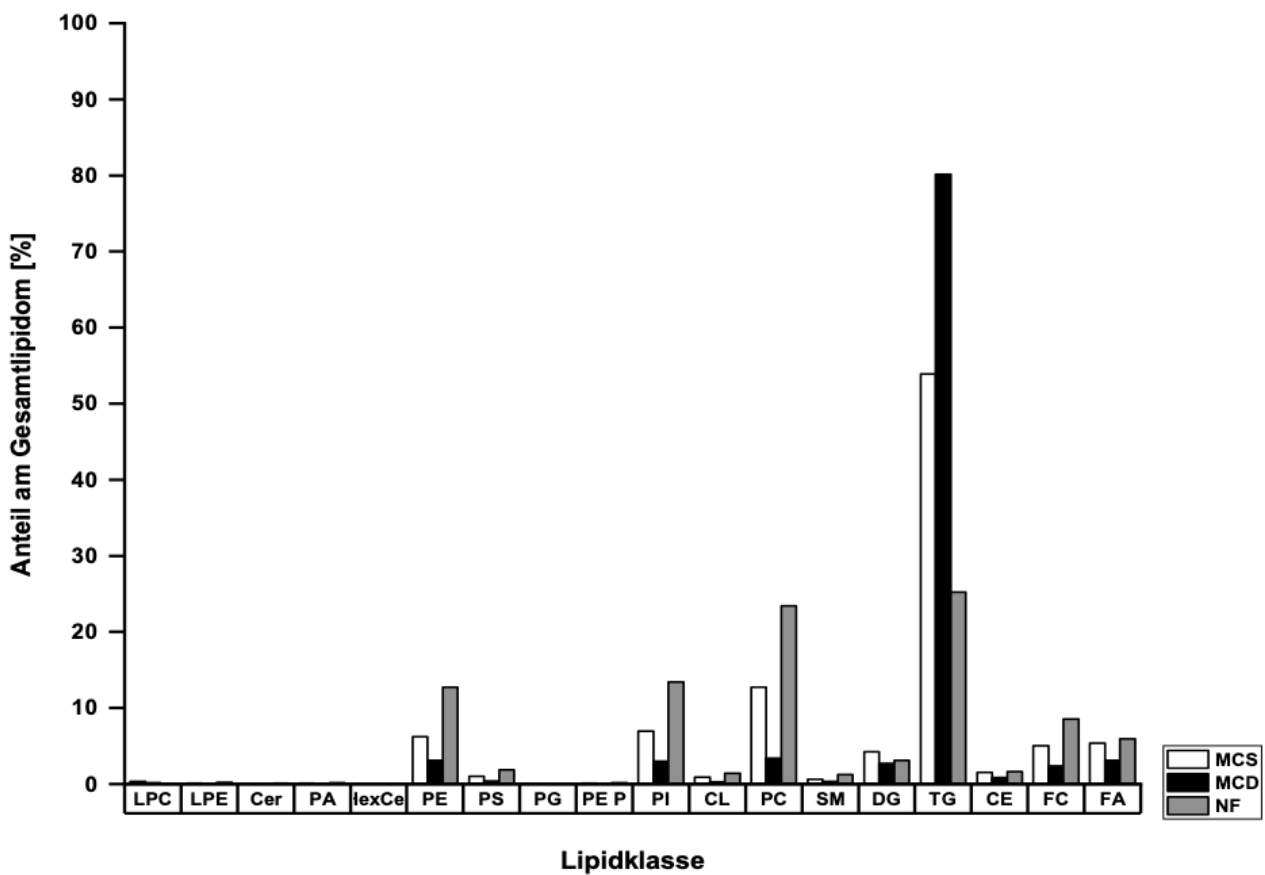
Schematische Darstellung der Lipidkategorien. Die Pfeile zeigen mögliche Umwandlungen zwischen den Lipidkategorien an.

Zunächst wurden die prozentualen Anteile der Lipidklassen der MCD-Diät und den Kontrolldiäten MCS und NF analysiert (siehe Abbildung 28; Gesamte Tabelle siehe Tabelle A 6). Den größten prozentualen Anteil am Gesamtlipidom der MCD-Diät stellten mit einem Mittelwert von 80% die Lipidklasse der Triglyceride (TG) dar. In der Folge sind die Phosphatidylcholine (PC), die Fettsäuren (FA), die Phosphatidylethanolamine (PE) sowie die Phosphatidylinositole (PI) zu nennen, die jeweils einen Anteil von 3% im Durchschnitt aufwiesen. Im Gegensatz dazu wies die Kontrolldiät MCS lediglich einen TG-Anteil von durchschnittlich 54% auf. Dieser TG-Anteil war dennoch deutlich höher als der des NFs mit einem TG-Anteil von nur 25%. Zudem war der Anteil der PCs unter MCS mit 13% deutlich höher als in der MCD-Diät, gefolgt von den PIs mit 7% und den PEs mit 6%. Des Weiteren



## Ergebnisse

konnte unter MCS ein doppelt so hoher Anteil an freiem Cholesterin (FC) sowie FAs im Vergleich zur MCD-Diät festgestellt werden, welcher 5% betrug. Die Diglyceride (DG) stellten mit 4% den nächsthöchsten Anteil am Gesamtlipidom der Kontrolldiät MCS dar und wiesen damit einen 1,5-fach größeren Anteil als in der MCD-Diät auf. Die Untersuchung einzelner Lipidklassen ergab signifikante Veränderungen zwischen MCD-Diät und den Kontrolldiäten MCS und NF (siehe Abbildung 29). Die Lipidklassen mit signifikanten Unterschieden waren TG, DG, FA, LPC, PA und PC. Davon waren die TG, DG und FA signifikant in der MCD-Diät erhöht, während LPC, PA und PC signifikant erniedrigt waren (siehe Abbildung 29). Bereits unter der Kontrolldiät MCS ist eine Steigerung der Lipidklassen TG, DG und der FAs im Vergleich zum NF festzustellen. Dies ist wahrscheinlich auf den doppelt so hohen Fettanteil im Futter zurückzuführen (siehe Tabelle A 1). Im Trend wies die Kontrolldiät MCS jedoch ein ähnliches Lipidniveau wie das NF auf.

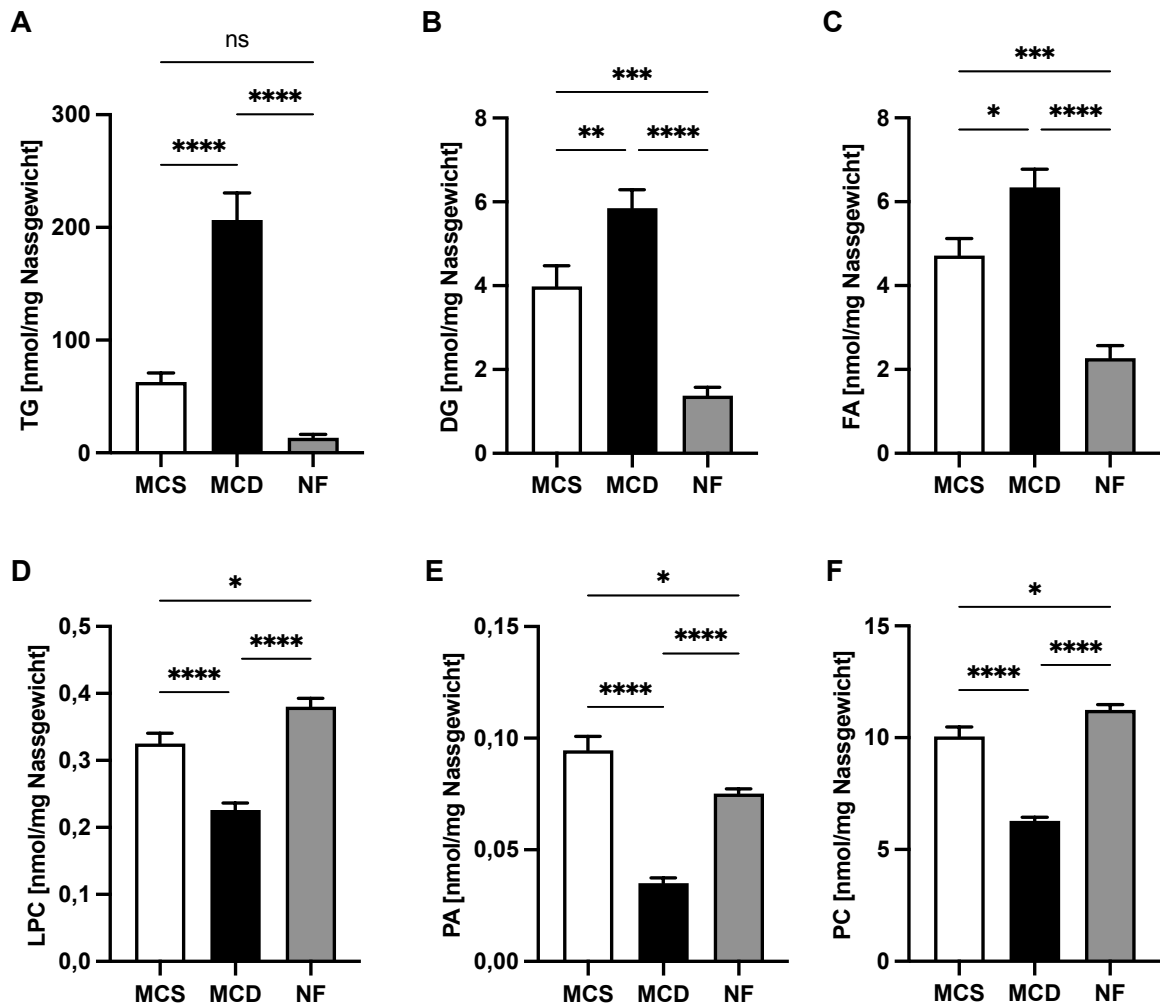


	LPC	LPE	Cer	PA	HexCer	PE	PS	PG	PEP	PI	CL	PC	SM	DG	TG	CE	FC	FA	Sum[%]
MCS	0,36	0,08	0,06	0,10	0,03	5,42	0,86	0,03	0,08	6,31	0,87	11,13	0,55	3,82	59,62	1,45	4,50	4,73	100
MCD	0,24	0,04	0,03	0,02	0,01	2,64	0,34	0,01	0,05	2,60	0,23	2,89	0,31	2,51	82,12	0,91	2,34	2,84	100
NF	0,09	0,20	0,14	0,16	0,04	13,01	1,81	0,06	0,17	13,73	1,42	24,40	1,29	2,75	25,45	1,65	8,28	4,61	100

**Abbildung 28: Lipidklassen des Lipidoms als prozentualer Anteil vom Gesamtlipidom**

Übersicht über die einzelnen Lipidklassen der WT-Mäuse von MCD-Diät oder den Kontrolldiäten MCS und NF als prozentualer Anteil am Gesamtlipidom. Die Daten werden als Säulendiagramm mit Mittelwert dargestellt (WT MCS n=14, WT MCD n=14, WT NF n=10). Die Tabelle zeigt im Farbschema der Lipidkategorien die prozentualen Werte.

## Ergebnisse



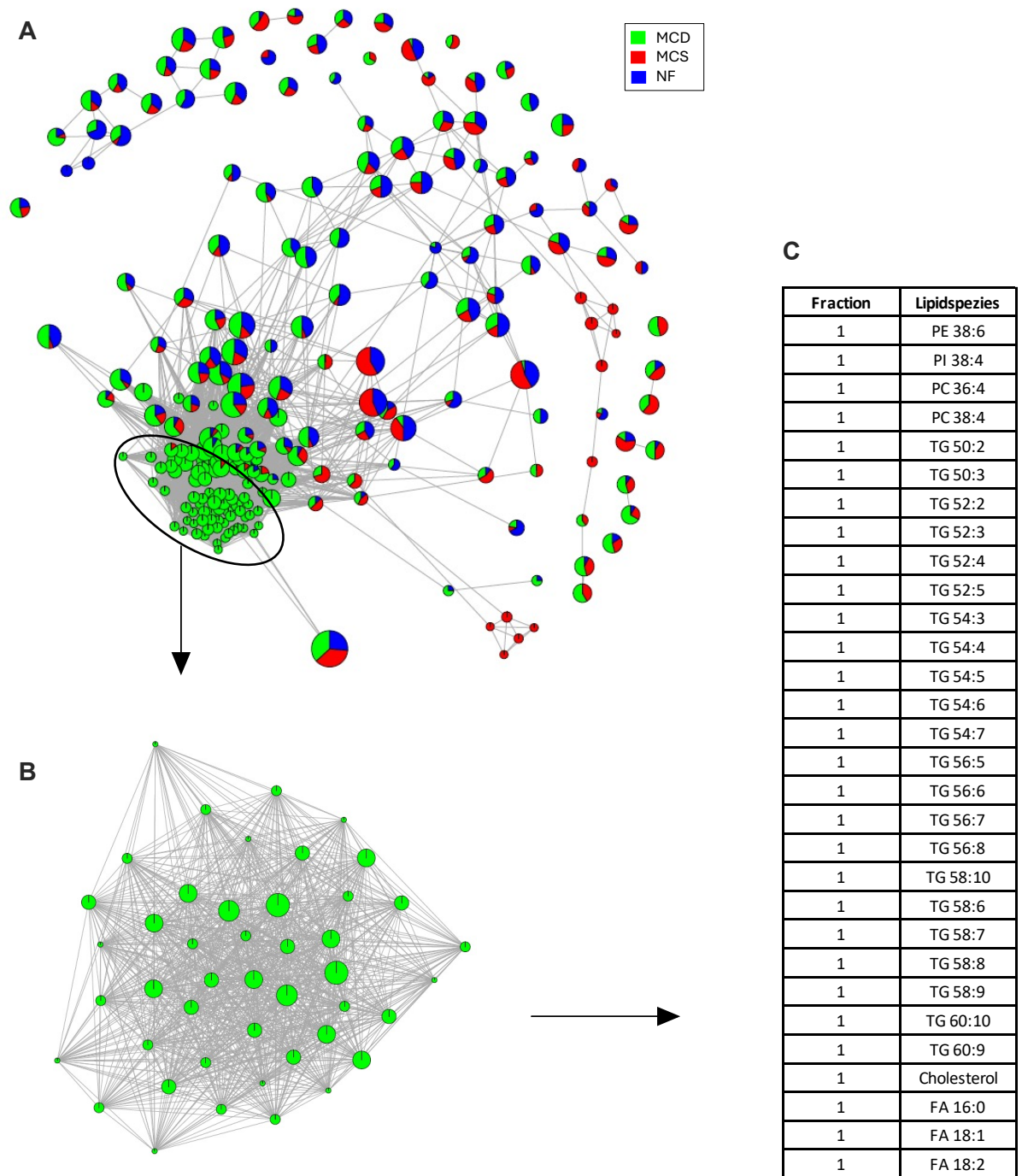
### Abbildung 29: Lipidom Lipidklassen Analyse

Dargestellt sind (A) Triglyceride (TG) (B) Diglyceride (DG) (C) Freie Fettsäuren (engl.: Fatty Acids, FA) (D) Lysophosphatidylcholin (LPC) (E) Phosphatidsäure (engl.: Phosphatidic acid) (PA) (F) Phosphatidylcholin (PC) in nmol/mg Nassgewicht des Lipidoms. Die Daten werden als Säulendiagramm mit Mittelwert + SEM dargestellt (WT MCS n=14, WT MCD n=14, WT NF n=10). Die Signifikanz wurde mit einer einseitigen ANOVA bestimmt (Tukeys post-hoc Test ns= nicht signifikant, \* =  $p \leq 0,05$ ; \*\* =  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$  \*\*\*\* =  $p \leq 0,0001$ ).

### 3.2.3.3 Bioinformatische Lipidom Analyse

Um einen objektiven Überblick über die Veränderungen der Lipidspezies zu erhalten, wurden die zwei bioinformatischen Methoden MoS<sub>Bi</sub> und LINEX<sup>2</sup> eingesetzt. Die Eingangsanalyse (UMAP) unterschied die MCD-Diät von den beiden Kontrolldiäten, welche in dem MoS<sub>Bi</sub>-Netzwerk jeweils eine größere Homogenität innerhalb der Gruppe aufwiesen (siehe Abbildung A 20). Die Ergebnisse der Algorithmen für die WT-Mäuse deuteten darauf hin, dass die MCD-Diät diverse Lipidspezies aufwies, die sich sowohl von der MCS- als auch NF-Kontrolldiät unterschieden, innerhalb der Gruppe aber homogen waren (siehe Abbildung 30A). In der vorliegenden Analyse wurden anschließend die Louvain-Gemeinschaften weiter analysiert, um mögliche Unterschiede in den Lipidsignaturen zwischen Tieren, der MCD-Diät und den Kontrolldiäten MCS und NF zu identifizieren. Nach mehreren Durchführungen kristallisierte sich eine Louvain-Gemeinschaft heraus (siehe Abbildung 30B). Diese wurde extrahiert und die Lipidspezies analysiert. Enthalten waren insbesondere Triglycerid Spezies mit hohem Fraktionswert, welcher angibt, wie stark eine einzelne Lipidspezies in einer Gemeinschaft vertreten ist (siehe Abbildung 30C; Gesamte Tabelle siehe Tabelle A 7). Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die deutlichsten Unterschiede zwischen MCD-Diät und den Kontrolldiäten in den Lipidklassen der Triglyceride, Cholesterin, einzelnen Fettsäuren und einzelnen Membran-Lipidspezies zu finden waren. Der hier beschriebene Ansatz wurde nicht nur mit den WT-Mäusen aller Futtergruppen durchgeführt, sondern auch mit allen Genotypen innerhalb der MCD-Diät (siehe Abbildung 31A). Bei diesem Vorgehen konnte die Louvain-Gemeinschaft 6 extrahiert werden (siehe Abbildung 31B). An dieser Stelle clustern die WT-Mäuse mit den HET-Mäusen zusammen, während die KO-Mäuse von dieser Gemeinschaft ausgeschlossen bleiben. Auch hier bilden Triglyceride die Spezies mit den höchsten Fraktionswerten (siehe Abbildung 31C; Gesamte Tabelle siehe Tabelle A 8). Das von LINEX<sup>2</sup> berechnete Netzwerk zeigt einen globalen Überblick über die Veränderungen des Lipidoms zwischen den WT-Mäusen und den KO-Mäusen der MCD-Diät. Anhand der blauen Knoten, die für einen negativen Fold Change stehen, zeigte sich, dass der Großteil der Lipidspezies in den KO-Mäusen herunterreguliert waren. Zu den stärksten herunterregulierten Lipidspezies gehörten unter anderen LPC16:1, TG48:0, TG48:1, TG48:2, TG48:3, TG50:1, TG50:2, TG50:3, TG50:4, TG58:3. Die am stärksten hochregulierten Lipidspezies waren PC40:7, PE40:7 und PS40:7 die über eine Kopfgruppenmodifikation in Verbindung stehen. Das Subnetzwerk der in der Analyse hervorgehoben Lipid-Spezies deutete auf potenziell beteiligte Enzyme bei deren Umwandlung hin zum Beispiel die Konversion von DG40:7 zu TG58:7 über Diacylglycerol-O-Acyltransferase 2 (DGAT2) (siehe Abbildung 32). In den RNA-Sequenzierungsdaten zeigte sich, dass *Dgat2* in den KO-MCD-Mäusen im Vergleich zu den WT-Tieren tendenziell geringer exprimiert war (siehe Abbildung A 28).

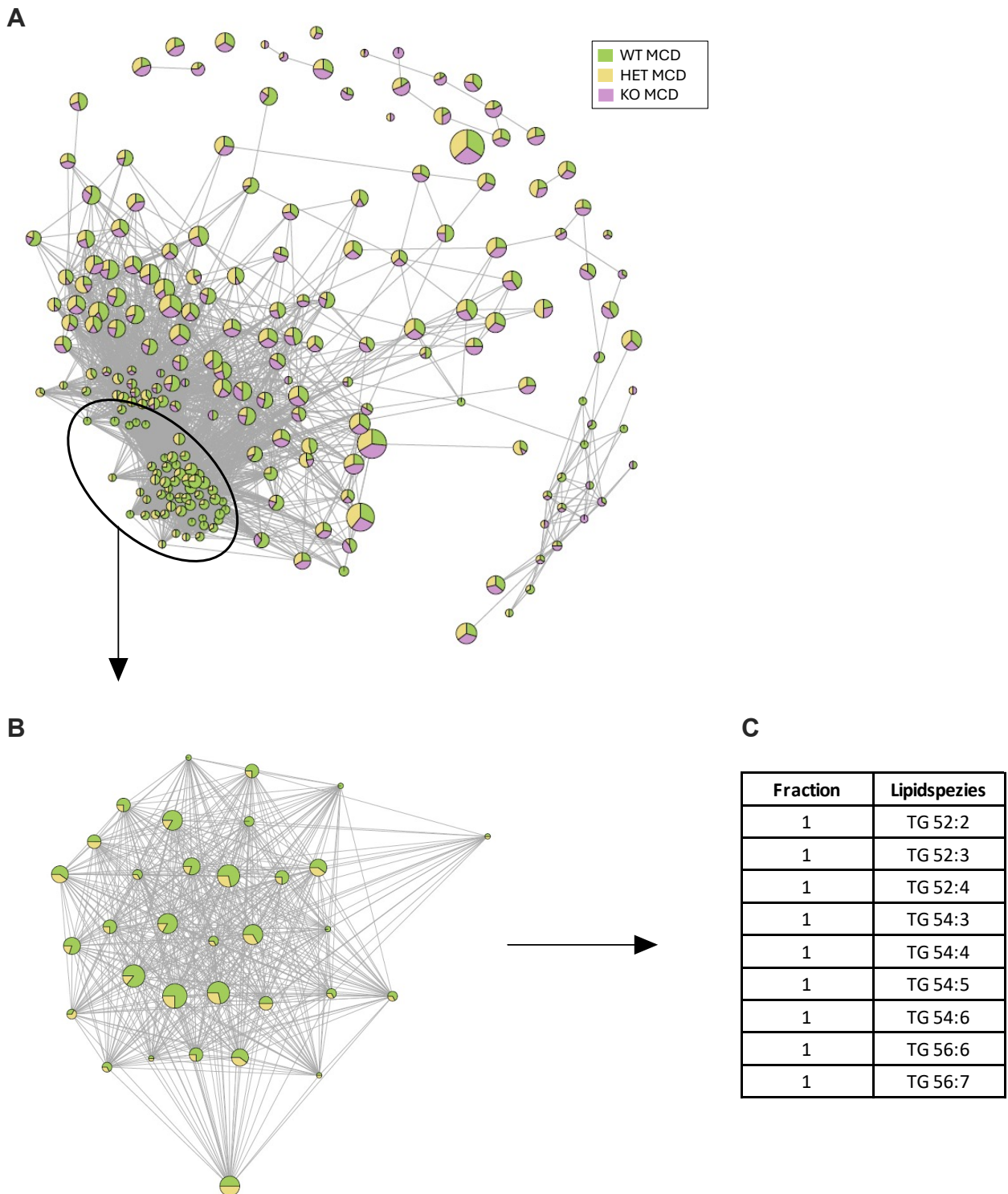
## Ergebnisse



### Abbildung 30: MoSBi (Diät)

Dargestellt ist ein MoSBi-Netzwerke auf Grundlage des Lipidoms der (A) WT-Mäuse der Gruppen MCD, MCS und NF. (B) Mittels Louvain-Modul wurde die Louvain-Gemeinschaft 5 extrahiert. (C) Die Lipidspezies mit dem höchsten Fraktionswert 1 (engl.: fraction) der Louvain-Gemeinschaften sind in der Tabelle dargestellt

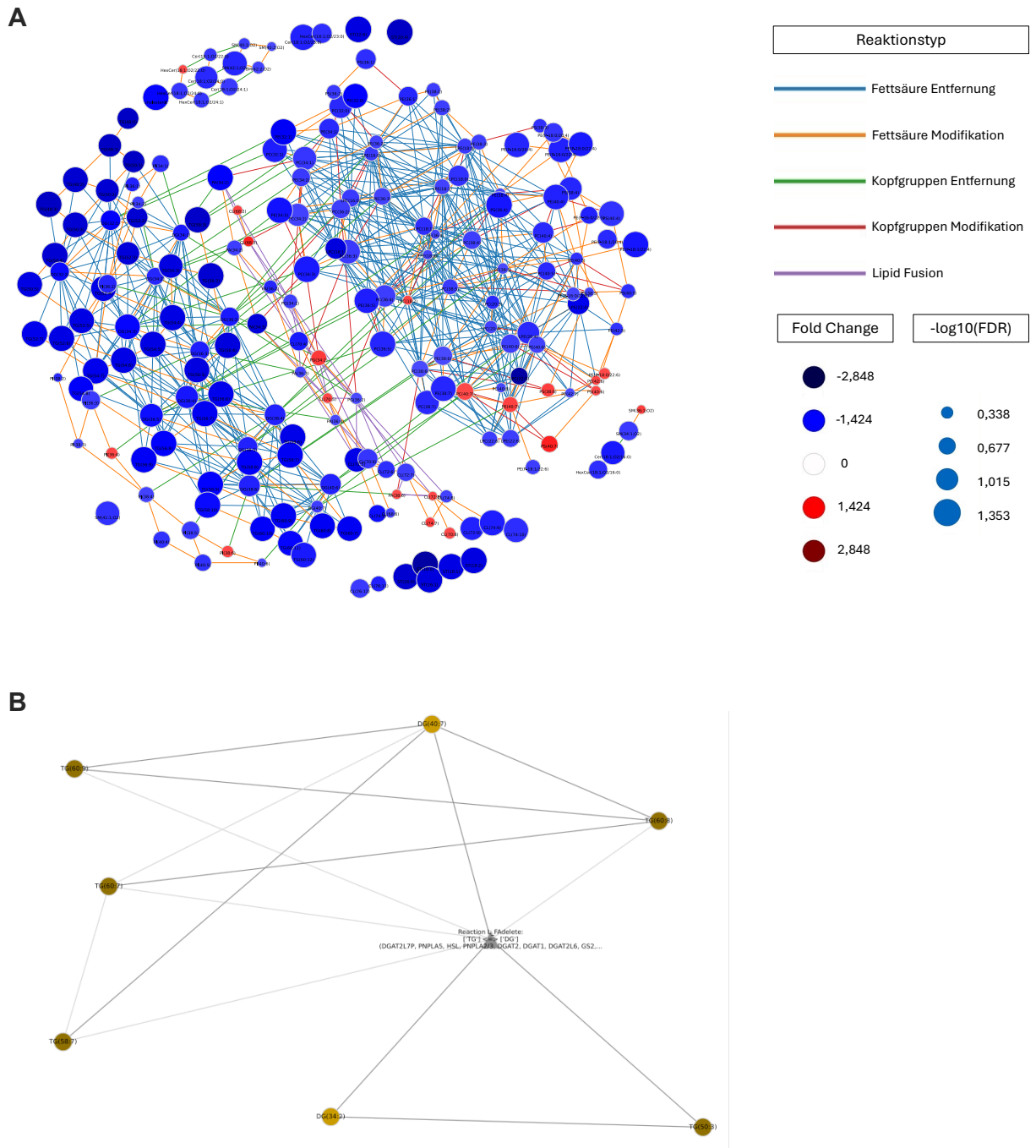
## Ergebnisse



### Abbildung 31: MoSBi (Genotypen MCD)

Dargestellt ist ein MoSBi-Netzwerke auf Grundlage des Lipidoms (A) der WT, HET und KO-Mäuse der MCD-Diät. (B) Mittels Louvain-Modul wurde die Louvain-Gemeinschaft 6 extrahiert. (C) Die Lipidspezies mit dem höchsten Fraktionswert 1 (engl.: fraction) der Louvain-Gemeinschaften sind in der Tabelle dargestellt

## Ergebnisse



**Abbildung 32: LINEX<sup>2</sup>**

(A) Gezeigt ist ein LINEX<sup>2</sup>-Netzwerk basierend auf den Lipidom-Daten von WT und KO-MCD Mäusen. Jeder Knoten stellt eine Lipidspezies dar und jede Verbindungslinie zwischen einem Lipidpaar eine Reaktion (Aufschlüsselung der Reaktionen in der Legende rechts). Die Knotenfarben stellen den Fold Change (FC) dar und die Knotengröße den  $-\log_{10}(\text{FDR})$ . (B) LINEX<sup>2</sup>-Subnetzwerk signifikanter Lipidspezies der Reaktion FA-Entfernung (engl.: FA delete) zwischen Triglyceriden und Diglyceriden mit Hinweis auf potenzielle enzymatische Beteiligung der angegeben Enzyme.



### 3.2.3.4 Spezifische Lipidom Analyse- Lipidklassen und -spezies

Mit den bioinformatischen Methoden konnte ein globaler Überblick über die Vielzahl an Lipidspezies gewonnen werden und den Trend aufzeigen, dass in KO-Mäusen insbesondere weniger Triglyceride vorkommen beziehungsweise angereichert sind als in WT-Mäusen (siehe Abbildung 33A). Das LINEX<sup>2</sup>-Netzwerk zeigte bereits, dass die Mehrzahl der signifikant veränderten Lipidspezies in KO-MCD Mäusen herunterreguliert war, während nur einige wenige Spezies eine Hochregulierung aufwiesen. Diese Beobachtung wird durch den Volcano-Plot von WT- und KO-MCD Mäusen bestätigt (siehe Abbildung 33B). Die Lipidklassen wurden auf Grundlage der MoSBI-Fraktionswerte (siehe Tabelle A 8) und LINEX<sup>2</sup>-Analysen überprüft und die Triglyceride als wiederkehrende, veränderte Lipidklasse evaluiert.

In ihrer Gesamtmenge (engl.: total sum) zeigen die Triglyceride eine signifikante Reduktion bei den KO-MCD Mäusen im Vergleich zu den WT-MCD Mäusen (siehe Abbildung 34A). Interessanterweise wurde auch ein geschlechtsspezifischer Unterschied beobachtet, wobei weibliche Mäuse in beiden Gruppen, WT- und KO-MCD, höhere Triglyceridwerte aufwiesen als die jeweiligen männlichen Mäuse (siehe Abbildung 34A1). Die Abnahme der Triglyceridmenge war dagegen insbesondere bei den männlichen KO-MCD Mäusen im Vergleich zu den WT-Männchen signifikant, während dieser Effekt bei den weiblichen Tieren nicht signifikant ausfiel (siehe Abbildung 34A1). Auch die Diglyceride wiesen eine signifikante Veränderung in Abhängigkeit von der Diät auf. Innerhalb der einzelnen Genotypen sowie im Vergleich zwischen den Geschlechtern zeigte sich hingegen lediglich ein Trend zu einer Abnahme der Gesamtmenge in den KO-Tieren, der jedoch nicht statistisch signifikant war (siehe Abbildung 34B).

Daneben zeigte sich bei KO-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen unter MCD-Diät ein Trend zur Abnahme des freien Cholesterins (siehe Abbildung 35A). Allerdings war diese Abnahme nur bei den männlichen KO-MCD Mäusen im Vergleich zu den WT-Männchen signifikant, während dieser Effekt bei den weiblichen Tieren nicht signifikant war (siehe Abbildung 35A1). Darüber hinaus waren die Ceramide, die für ihre lipotoxischen Eigenschaften bekannt sind (Amati, 2012); in Mäusen der MCD-Diät tendenziell angereichert (siehe Abbildung 35B). Auch hier zeigte sich, analog zu den Beobachtungen bei Triglyceriden und freiem Cholesterin, eine signifikante Abnahme der Ceramidmengen ausschließlich bei den männlichen KO-MCD Mäusen im Vergleich zu den männlichen WT-Tieren (siehe Abbildung 35B1), während bei weiblichen Tieren kein signifikanter Unterschied festgestellt wurde.

## Ergebnisse

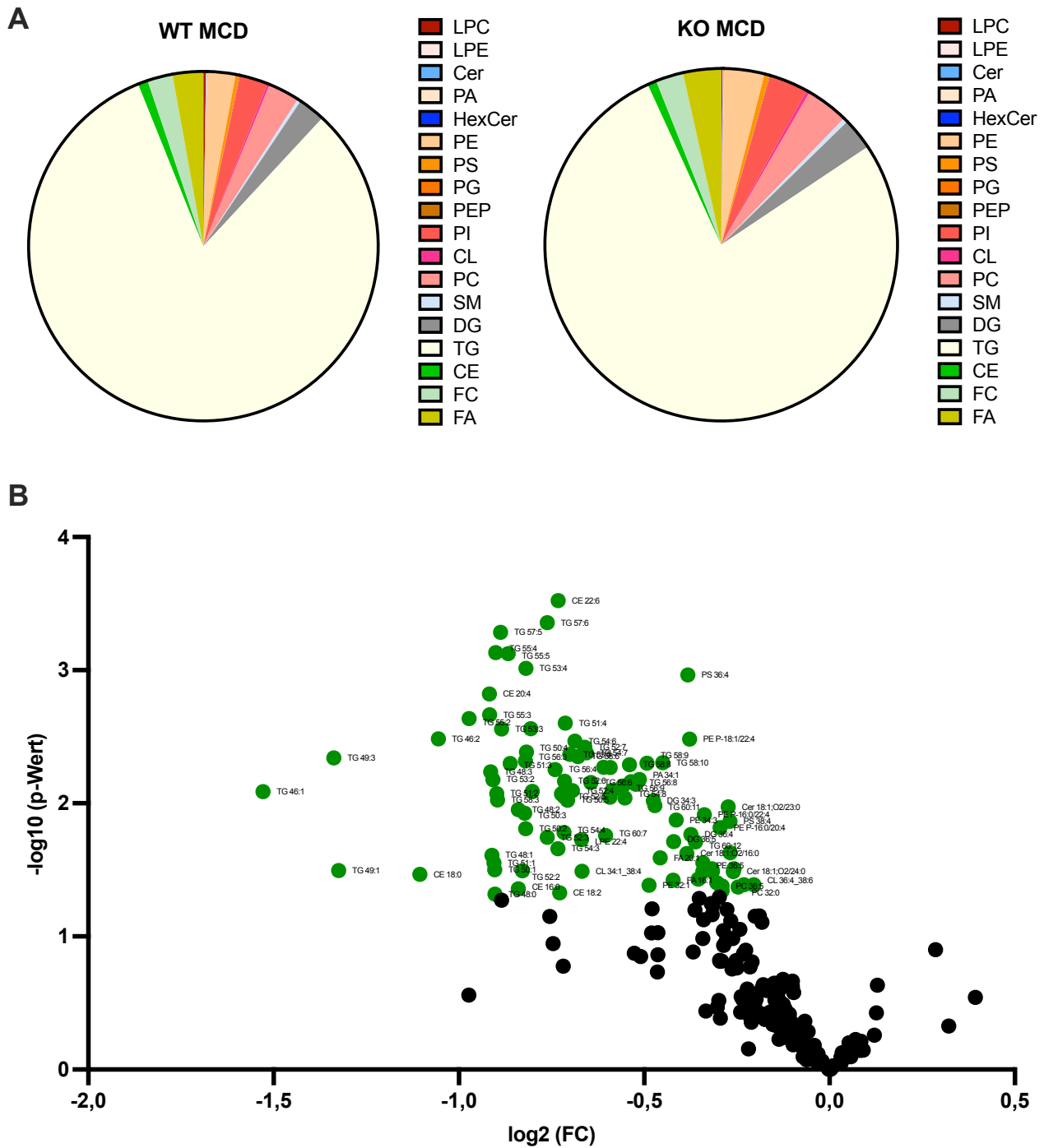
Darüber hinaus hob der Volcano Plot eine beträchtliche Anzahl von Lipidspezies hervor, die signifikante Veränderungen (Fold Change) aufwiesen (mit  $p < 0,05$ ). Besonders hervorzuheben waren dabei die Triglycerid-Spezies TG 46:1, TG 49:3 und TG 49:1, die sowohl statistisch signifikant als auch durch einen hohen Fold Change gekennzeichnet waren (siehe Abbildung 33B). Diese Analyse berücksichtigt jedoch nicht die absolute Häufigkeit dieser Lipidarten oder ihren Gehalt unter Kontrollbedingungen (MCS-Diät). So dargestellt zeigt TG 46:1 zwar die größte Veränderung zwischen WT- und KO-MCD innerhalb des Lipidoms, seine absolute Häufigkeit ist jedoch sehr gering (0,007 % in WT-MCD) und unter Kontrollbedingungen (WT-MCS) sogar höher (0,059 %). Dieses Beispiel unterstreicht die Notwendigkeit, bei der Bewertung von Lipidspezies neben dem Fold Change auch die absolute Menge zu berücksichtigen. Ein Blick auf die Quantitätsverteilung der Triglycerid-Spezies verriet, dass es sich bei den Summenklassen TGSumC52 > TGSumC54 > TGSumC50 > TGSumC56 um die am mengenmäßig häufigsten vorkommenden Triglycerid-Spezies handelte. Innerhalb dieser Summenklassen nehmen insbesondere die Spezies TG 52:2, TG 52:3 und TG 52:4 den mengenmäßig größten Anteil ein.

Vor diesem Hintergrund wurde eine gezielte Analyse ausgewählter Triglycerid-Spezies durchgeführt, bei der sowohl ihre absolute Menge als auch der mengenmäßige Unterschied zur Kontrollgruppe MCS berücksichtigt wurden. Dabei kristallisierten sich TG 52:4, TG 54:5, TG 56:6 und TG 58:8 heraus (siehe Abbildung 36 und Abbildung 37).

In Übereinstimmung mit den Beobachtungen zur Gesamtmenge der Triglycerid-Klasse zeigten auch die individuellen Triglycerid-Spezies eine signifikante Reduktion ausschließlich bei den männlichen KO-MCD Tieren im Vergleich zur WT-Gruppe. Zwar wiesen auch die weiblichen Tiere denselben Abwärtstrend auf, bei gleichzeitig tendenziell höheren absoluten Mengen, doch diese Unterschiede waren nicht signifikant.

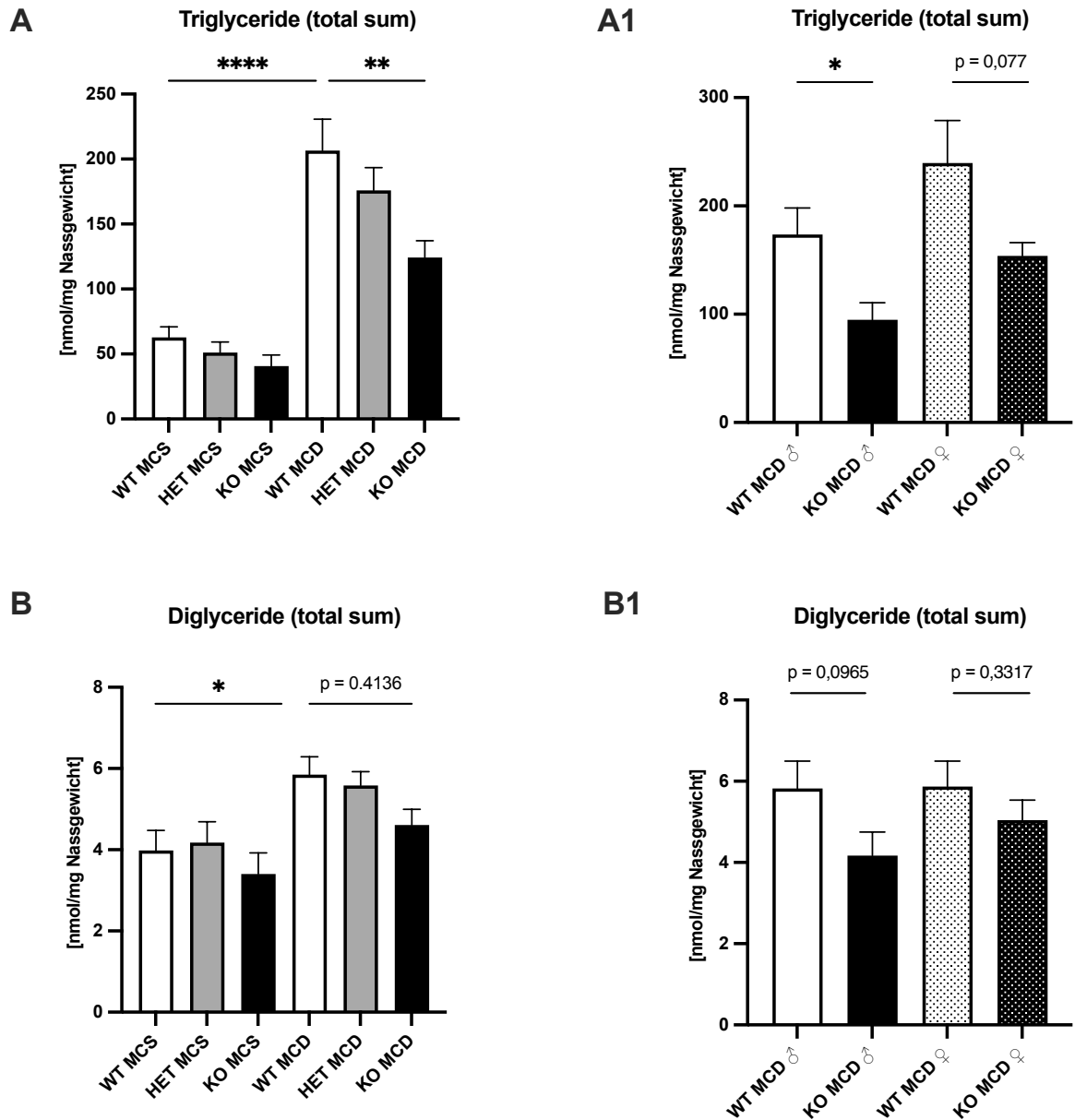


## Ergebnisse



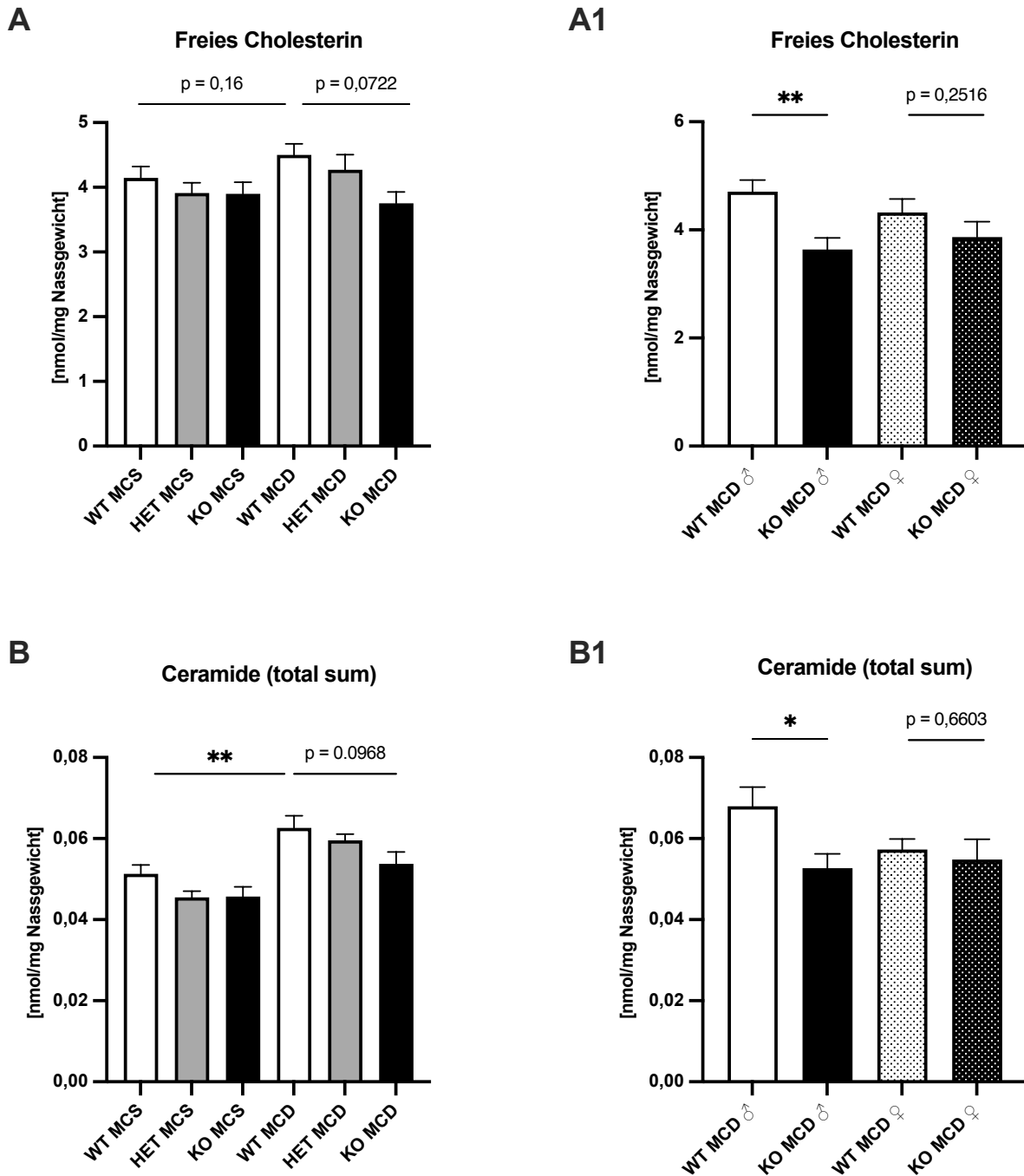
**Abbildung 33: Unterschiede im Gesamtlipidom zwischen WT- und KO-MCD**

(A) Dargestellt ist das Gesamtlipidom von WT- und KO-MCD Mäusen mit den anteiligen Lipidklassen als Kreisdiagramm. (B) Volcano Plot der signifikanten Veränderungen (Fold Change) von WT- und KO-MCD Mäusen.



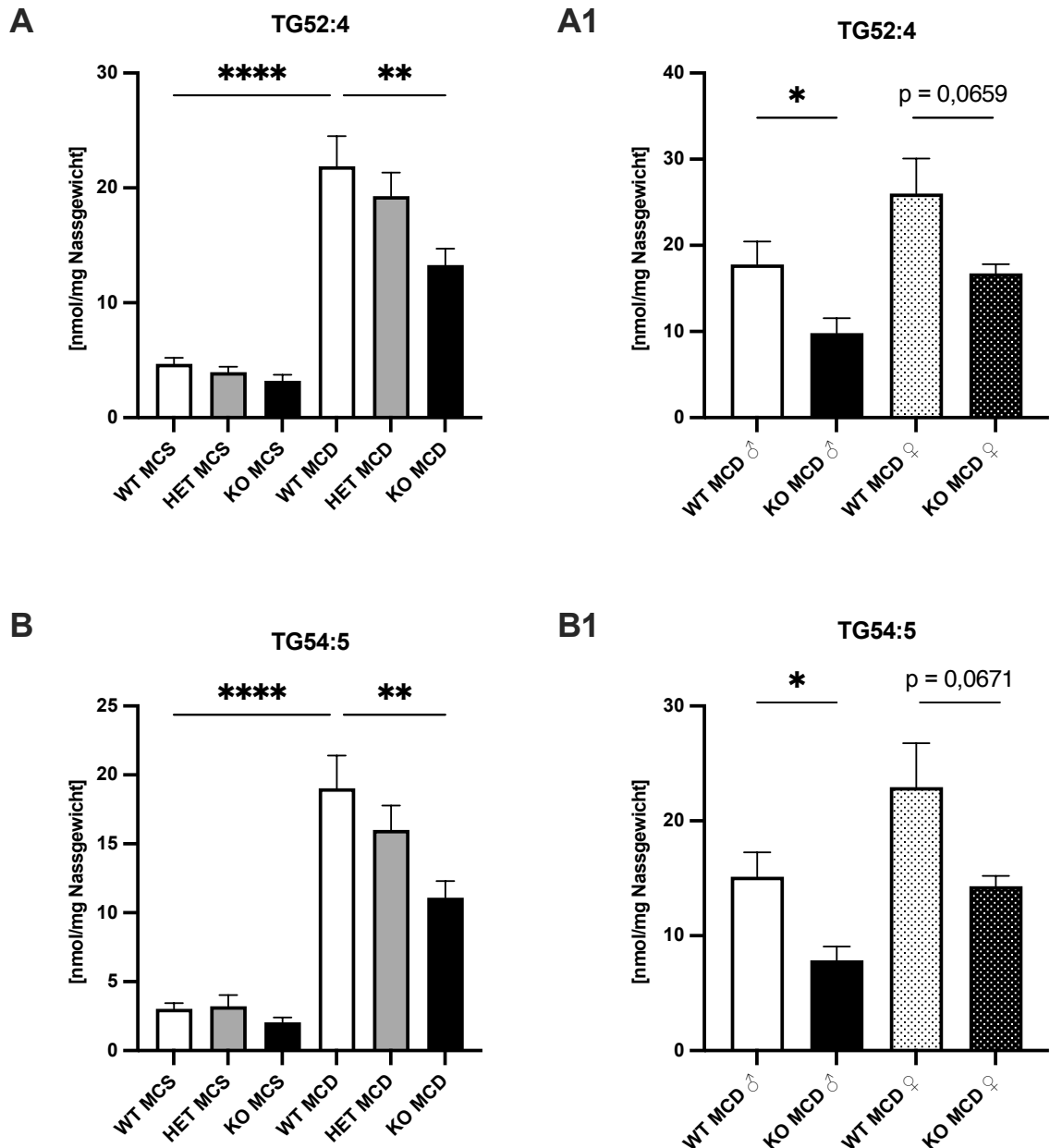
**Abbildung 34: Analyse der Lipidklassen TG und DG**

Dargestellt sind die Gesamtmengen (total sum) der A) Triglyceride (TG) B) Diglyceride (DG) in nmol/mg Nassgewicht auf Basis des Lipidoms. (A1) TG und (B1) DG sind entsprechende geschlechtergetrennte Analyse der WT- und KO-MCD Mäuse. Die Daten werden als Säulendiagramm mit Mittelwert + SEM dargestellt (WT MCS n=14, HET MCS n=14, KO MCS n=13, WT MCD n=14, HET MCD n=14, KO MCD n=12). Die Signifikanz wurde mit einem ungepaarten t-Test bestimmt ns= nicht signifikant, \* =  $p \leq 0,05$ ; \*\* =  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$  \*\*\*\* =  $p \leq 0,0001$ ).



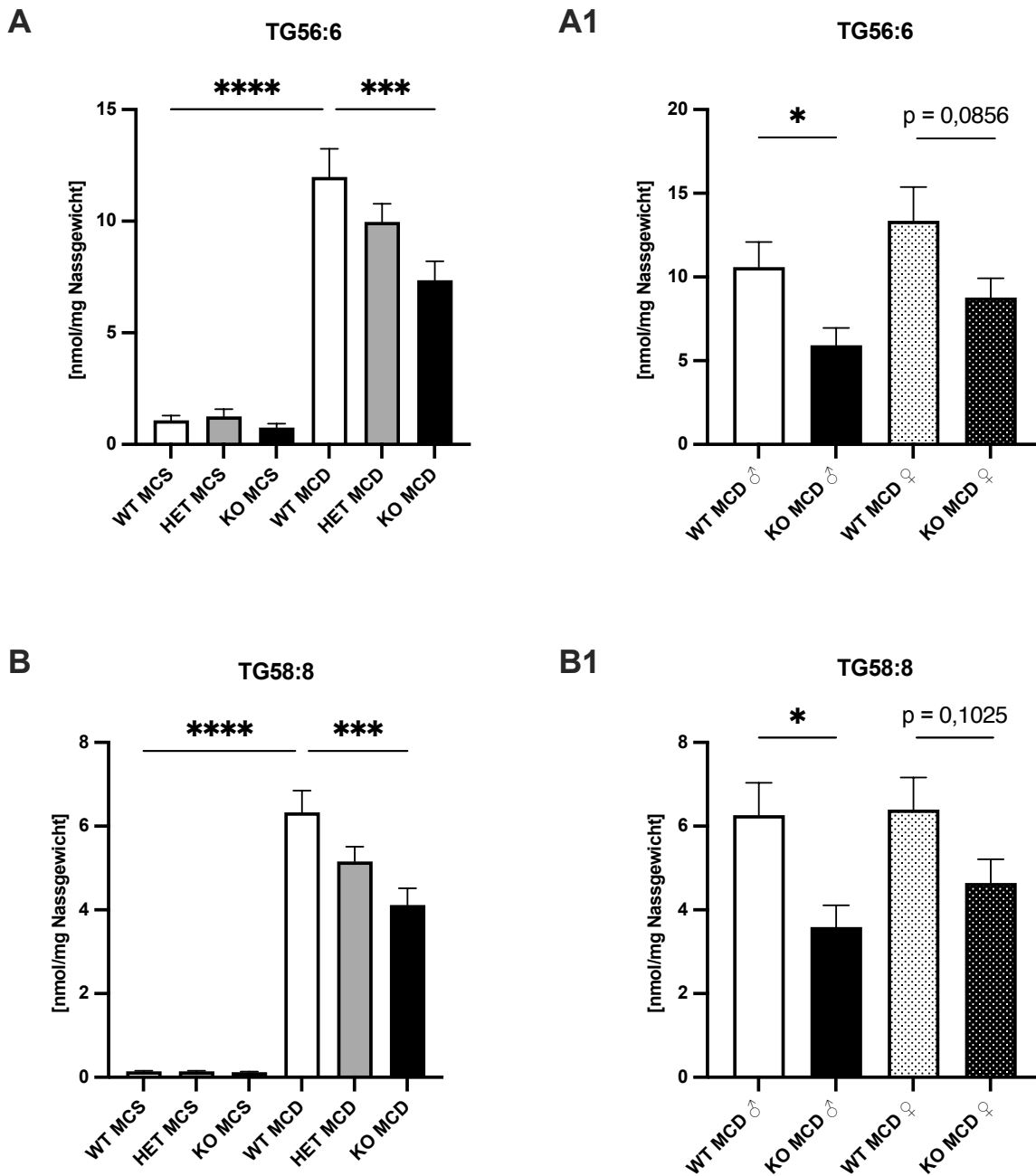
**Abbildung 35: Analyse der Lipidklassen FC und Cer**

Dargestellt sind die Gesamtmengen (total sum) des A) freien Cholesterins und der B) Ceramide in nmol/mg Nassgewicht auf Basis des Lipidoms. (A1) Freies Cholesterin und (B1) Ceramide sind entsprechende geschlechtergetrennte Analyse der WT- und KO-MCD Mäuse. Die Daten werden als Säulendiagramm mit Mittelwert + SEM dargestellt (WT MCS n=14, HET MCS n=14, KO MCS n=13, WT MCD n=14 (n=7 männlich; n=7 weiblich), HET MCD n=14, KO MCD n=12 (n=6 männlich; n=6 weiblich)). Die Signifikanz wurde mit einem ungepaarten t-Test bestimmt ns= nicht signifikant, \* =  $p \leq 0,05$ ; \*\* =  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$  \*\*\*\* =  $p \leq 0,0001$ ).



**Abbildung 36: Analyse der Triglycerid-Spezies**

Dargestellt sind die Triglycerid-Spezies (A) TG52:4 (B) TG54:5 in nmol/mg Nassgewicht auf Basis des Lipidoms. (A1) TG52:4 (B1) TG54:5 sind entsprechende geschlechtergetrennte Analyse der WT- und KO-MCD Mäuse. Die Daten werden als Säulendiagramm mit Mittelwert + SEM dargestellt (WT MCS n=14, HET MCS n=14, KO MCS n=13, WT MCD n=14, HET MCD n=14, KO MCD n=12). Die Signifikanz wurde mit einem ungepaarten t-Test bestimmt ns= nicht signifikant, \* = p ≤ 0,05; \*\* = p ≤ 0,01; \*\*\* = p ≤ 0,001 \*\*\*\* = p ≤ 0,0001.



### Abbildung 37: Analyse der Triglycerid-Spezies

Dargestellt sind die Triglycerid-Spezies (A) 56:6 und (B) TG58:8 in nmol/mg Nassgewicht auf Basis des Lipidoms. (A1) 56:6 und (B1) TG58:8 sind entsprechende geschlechtergetrennte Analyse der WT- und KO-MCD Mäuse. Die Daten werden als Säulendiagramm mit Mittelwert + SEM dargestellt (WT MCS n=14, HET MCS n=14, KO MCS n=13, WT MCD n=14, HET MCD n=14, KO MCD n=12). Die Signifikanz wurde mit einem ungepaarten t-Test bestimmt ns= nicht signifikant, \* =  $p \leq 0,05$ ; \*\* =  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$  \*\*\*\* =  $p \leq 0,0001$ .

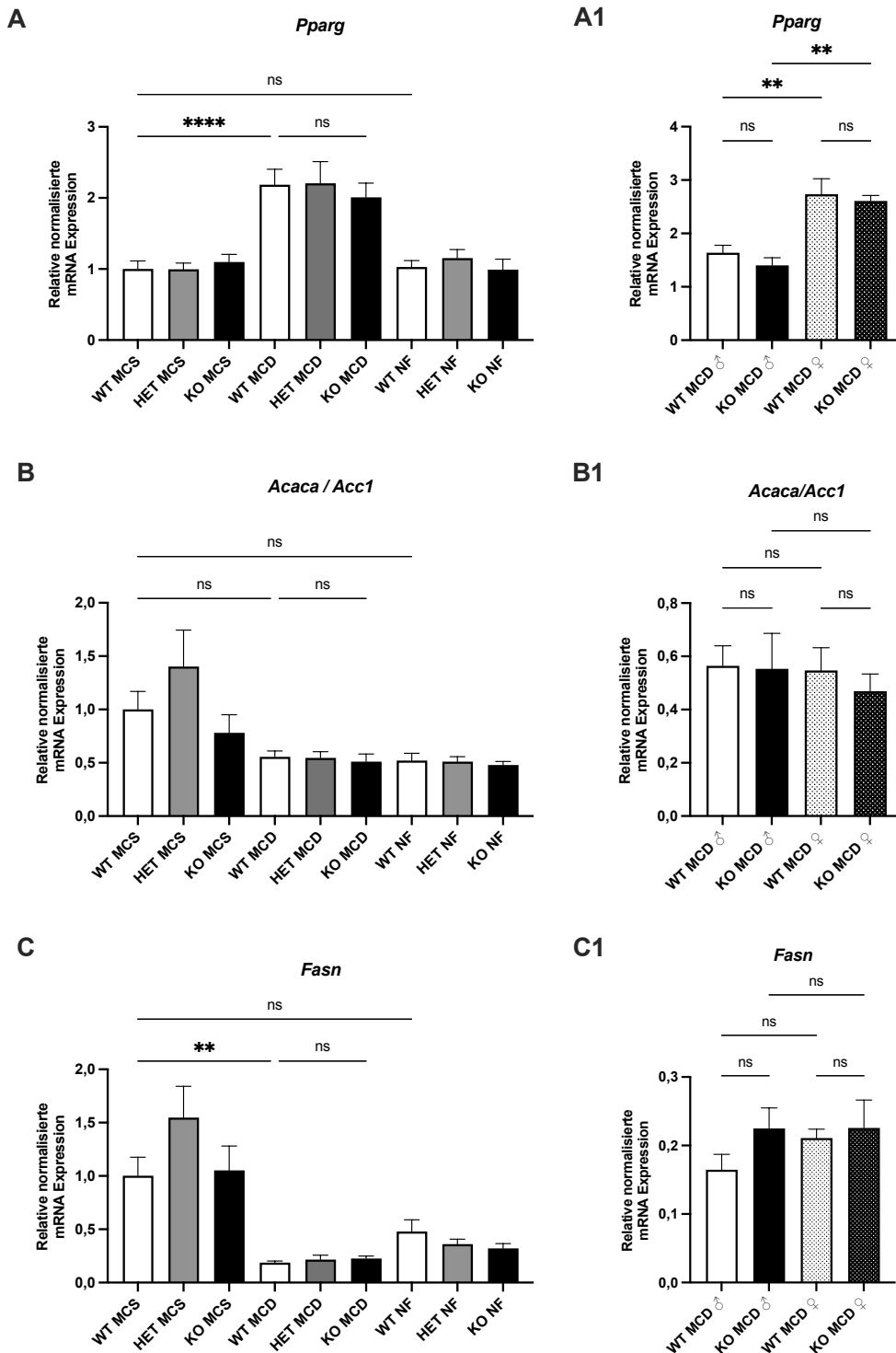
### 3.2.3.5 Expressionsanalyse lipogener Gene

Zusätzlich zu dem im Lipidom analysierten veränderten Lipidprofil wurden die Schlüsselenzyme des Lipidmetabolismus untersucht. In Kürze lässt sich festhalten, dass der Lipidmetabolismus in der Leber durch vier maßgeblich Mechanismen reguliert wird. Dazu gehören 1) die Lipidaufnahme durch FATP2 und 5, CD36 sowie Caveoline reguliert durch PPARG, 2) die De-novo-Lipogenese mit den Schlüsselenzymen ACC1, FASN, SCD1, ELOVL6 hauptsächlich reguliert durch die Transkriptionsfaktoren SREBPF1 und CHREBP, 3) der Abbau durch die Fettsäureoxidation im Mitochondrium, mit dem Schlüsselenzym für die Aufnahme CPT1A, reguliert durch PPARA, sowie 4) der Export durch VLDL-Partikel. Eine Übersichtstabelle zu den untersuchten Genen findet sich im Anhang (siehe Tabelle A 9).

Die Expression von *Pparg* war im Vergleich zur Kontrolldiät MCS stark erhöht, ist jedoch innerhalb der Genotypen konstant (siehe Abbildung 38A). Interessanterweise war *Pparg* in weiblichen Tieren der MCD-Diät, sowohl WT als auch KO, im Vergleich zu den männlichen Tieren signifikant erhöht (siehe Abbildung 38A1).

*Acaca/Acc1* ist für den ersten Schritt der De-novo-Lipogenese zuständig, indem es Acetyl-CoA zu Malonyl-CoA umwandelt. Die Expression von *Acaca/Acc1* ist in der MCD-Diät im Vergleich zur Kontrolldiät MCS leicht erniedrigt, allerdings nur im heterozygoten Genotyp signifikant, während zum NF keine Unterschiede erkennbar sind (siehe Abbildung 38B). Zwischen männlichen und weiblichen Tieren sind keine Unterschiede zu erkennen (siehe Abbildung 38B1).

Die Lipid-Assemblierung erfolgt durch das Multikomplex-Enzym Fettsäure-Synthase (*Fasn*). Die Expression von *Fasn* ist gegenüber der Kontrolldiät MCS stark erniedrigt gegenüber dem NF leicht erniedrigt (siehe Abbildung 38C). Zwischen männlichen und weiblichen Tieren sind keine Unterschiede zu erkennen (siehe Abbildung 38C1).



### Abbildung 38: Expressionsanalyse lipogener Gene

Die Expressionen von (A) *Pparg*, (B) *Acaca/Acc1* und (C) *Fasn* von allen Futtergruppen (MCS, MCD, NF) und Genotypen (WT, HET, KO) wurde per qPCR mit Standard bestimmt und wird dargestellt als Verhältnis der mRNA zu den Haushaltsgenen *18S*, *Ppia* und *Csnk2a2*, normalisiert auf die Kontrollgruppe WT MCS. Die Daten werden als Säulendiagramm mit Mittelwert + SEM dargestellt. Die Daten werden als Säulendiagramm mit Mittelwert + SEM dargestellt (WT MCS n=14, HET MCS n=14, KO MCS n=13, WT MCD n=14, HET MCD n=14, KO MCD n=12). (A1) *Pparg*, (B1) *Acaca/Acc1* und (C1) *Fasn* zeigt die geschlechtergetrennte Analyse (WT MCD n=7 männlich; n=7 weiblich; KO MCD n=6 männlich; n=6 weiblich). Die Signifikanz wurde mit einer einseitigen ANOVA bestimmt. Tukeys post-hoc Test ns= nicht signifikant, \* =  $p \leq 0,05$ ; \*\* =  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ .

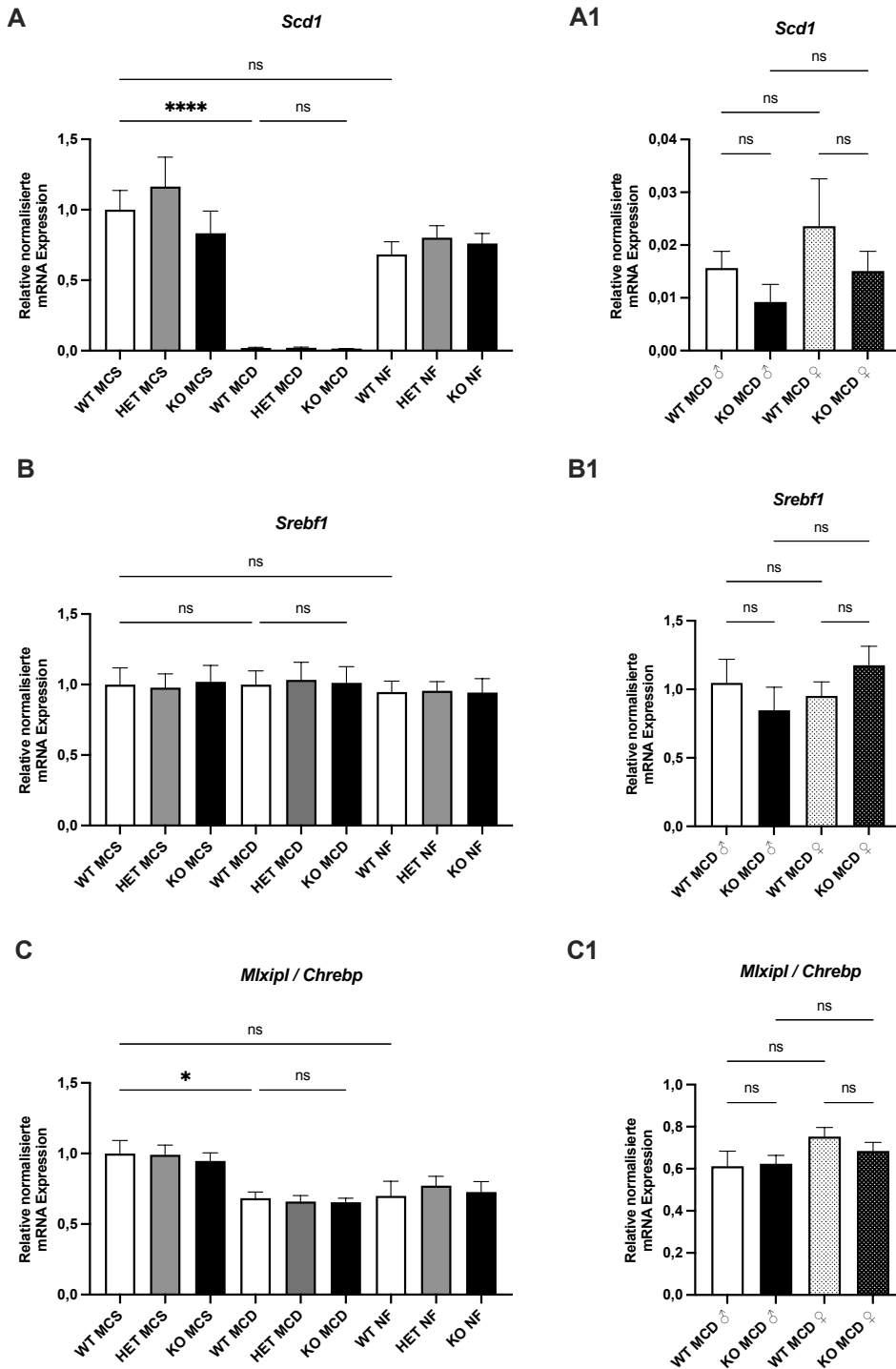
*Scd1* ist für die Desaturierung gesättigter Fettsäuren wie Palmitinsäure zu einfach ungesättigten Fettsäuren, den Hauptbestandteilen von Triglyceriden, verantwortlich. Die Expression von *Scd1* war in der MCD-Diät stark herunterreguliert und die KO-MCD Mäuse zeigten eine zusätzliche Erniedrigung der Expression gegenüber den WT-Tieren (siehe Abbildung 39A). Zwischen männlichen und weiblichen Tieren wurden keine signifikanten Expressionsunterschiede festgestellt, jedoch deutete sich ein Trend zu einer stärkeren Expression bei weiblichen Mäusen an (siehe Abbildung 39A1).

Die Regulation der De-novo-Lipogenese erfolgt unter anderem über die Transkriptionsfaktoren *Srebf1* und *Mlxipl/Chrepb*. Während *Srebf1* weder zwischen den Diäten noch zwischen den Genotypen Unterschiede aufwies, war *Mlxipl/Chrepb* unter der MCD-Diät signifikant gegenüber der Kontrollgruppe MCS reduziert, entsprach jedoch dem Niveau unter NF (siehe Abbildung 39B+C). Die geschlechtergetrennte Auswertung zeigte keine signifikanten Expressionsunterschiede (siehe Abbildung 39B1+C1). Bei *Mlxipl/Chrepb* gab es lediglich eine leichte Tendenz zur höheren Expression in weiblichen Mäusen.

Für den mitochondrialen Fettsäureabbau über die  $\beta$ -Oxidation ist *Cpt1a* erforderlich, welches den Transport der Fettsäuren ins Mitochondrium ermöglicht. Unter der MCD-Diät war die Expression von *Cpt1a* im Vergleich zu den Kontrolldiäten erhöht (siehe Abbildung 40A). Interessanterweise zeigte sich ein geschlechtsabhängiger Effekt innerhalb der KO-Gruppe. Während die *Cpt1a*-Expression in männlichen KO-Tieren erniedrigt war, war sie bei weiblichen KO-Tieren erhöht (siehe Abbildung 40A1). Die  $\beta$ -Oxidation wird von dem nukleären Rezeptor *Ppara* reguliert. Die *Ppara*-Expression lag in der MCD-Gruppe unterhalb der MCS-Kontrolle, jedoch oberhalb des Niveaus der NF-Gruppe (siehe Abbildung 40B). Weibliche Mäuse zeigten dabei tendenziell eine höhere *Ppara*-Expression als männliche Tiere (siehe Abbildung 40B1).

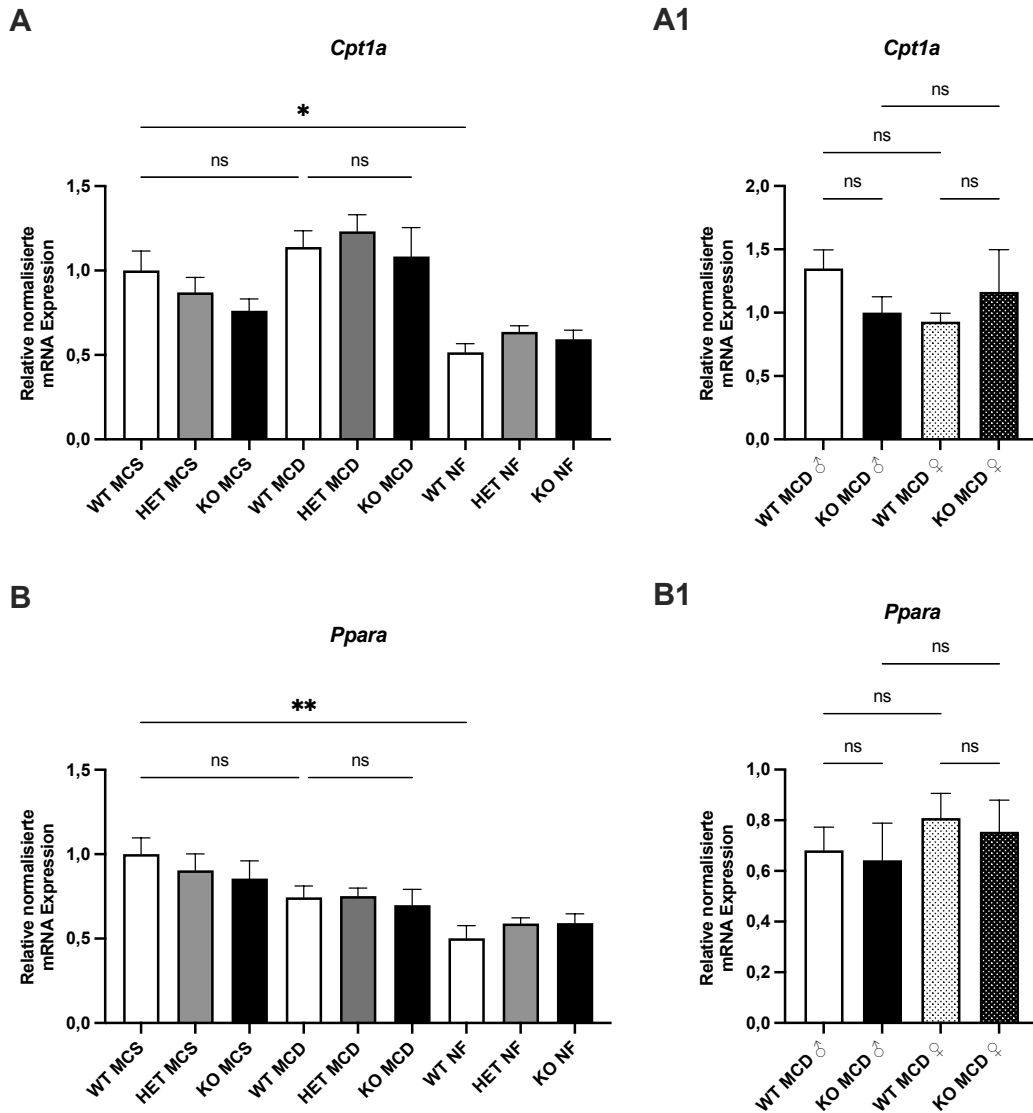


## Ergebnisse



### Abbildung 39: Expressionsanalyse lipogener Gene

Die Expressionen von (A) *Scd1*, (B) *Srebf1* und (C) *Mlxipl/Chrebp* von allen Futtergruppen (MCS, MCD, NF) und Genotypen (WT, HET, KO) wurde per qPCR mit Standard bestimmt und wird dargestellt als Verhältnis der mRNA zu den Haushaltsgenen *18S*, *Ppia* und *Csnk2a2*, normalisiert auf die Kontrollgruppe WT MCS. Die Daten werden als Säulendiagramm mit Mittelwert + SEM dargestellt. Die Daten werden als Säulendiagramm mit Mittelwert + SEM dargestellt (WT MCS n=14, HET MCS n=14, KO MCS n=13, WT MCD n=14, HET MCD n=14, KO MCD n=12). (A1) *Scd1*, (B1) *Srebf1* und (C1) *Mlxipl/Chrebp* zeigt die geschlechtergetrennte Analyse (WT MCD n=7 männlich; n=7 weiblich; KO MCD n=6 männlich; n=6 weiblich). Die Signifikanz wurde mit einer einseitigen ANOVA bestimmt. Tukeys post-hoc Test ns= nicht signifikant, \* =  $p \leq 0,05$ ; \*\* =  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ .



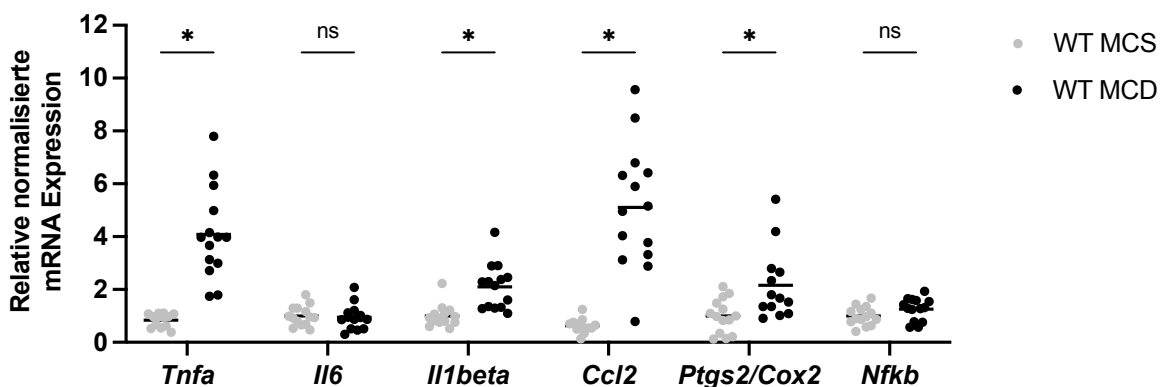
#### Abbildung 40: Expressionsanalyse lipogener Gene

Die Expressionen von (A) *Cpt1a* und (B) *Ppara* von allen Futtergruppen (MCS, MCD, NF) und Genotypen (WT, HET, KO) wurde per qPCR mit Standard bestimmt und wird dargestellt als Verhältnis der mRNA zu den Haushaltsgenen *18S*, *Ppia* und *Csnk2a2*, normalisiert auf die Kontrollgruppe WT MCS. Die Daten werden als Säulendiagramm mit Mittelwert + SEM dargestellt. Die Daten werden als Säulendiagramm mit Mittelwert + SEM dargestellt (WT MCS n=14, HET MCS n=14, KO MCS n=13, WT MCD n=14, HET MCD n=14, KO MCD n=12). (A1) *Cpt1a* und (B1) *Ppara* zeigt die geschlechtergetrennte Analyse (WT MCD n=7 männlich; n=7 weiblich; KO MCD n=6 männlich; n=6 weiblich). Die Signifikanz wurde mit einer einseitigen ANOVA bestimmt. Tukeys post-hoc Test ns= nicht signifikant, \* =  $p \leq 0,05$ ; \*\* =  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ .

### 3.2.4 Inflammation- Reduzierte Entzündungsaktivität in den Lebern von *Neat1*-KO-Mäusen nach MCD-Diät

Bei der Progression von MASLD zu der schwereren Form MASH spielen Entzündungsprozesse eine wichtige Rolle. Um zu überprüfen, ob die MCD-Diät entzündliche Prozesse ausgelöst hat, wurde die Expression entzündlicher Zytokine als Indikator für Leberentzündungen untersucht. Die Expression der entzündlichen Zytokine Tumornekrosefaktor-alpha (*Tnfa*), Interleukin-6 (*Il6*), Interleukin-1beta (*Il1beta*), des Chemokins CC-Chemokinligand 2 (*Ccl2/Mcp1*), Entzündungsmediator Prostaglandin-synthase-2 (*Ptgs2/Cox2*) sowie dessen gemeinsamer Transkriptionsfaktor *Nfkb1* (engl.: nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells 1) wurden analysiert.

*Tnfa*, *Il-1beta*, *Ccl2* und *Ptgs2/Cox2* ergaben eine signifikante Erhöhung in der MCD-Diät, während *Il-6* und *Nfkb1* keine Veränderungen zeigten (siehe Abbildung 41). Zwischen den Genotypen konnten keine Unterschiede festgestellt werden (siehe Abbildung A 29). Lediglich der Trend zur geringeren Expression in KO-Mäusen war in allen untersuchten inflammatorischen Markern erkennbar, mit der Ausnahme von *Il6*. Die geschlechtergetrennte Analyse der Expression zeigte ein ähnliches Expressionsmuster der einzelnen Zytokine. Auch hier waren nur Tendenzen erkennbar. *Ptgs2/Cox2* und *Nfkb1* tendierten zur höheren Expression in männlichen MCD-Mäusen während *Il6*, *Il1beta* und *Ccl2/Mcp1* in weiblichen Mäusen zur höheren Expression neigten (siehe Abbildung A 29).

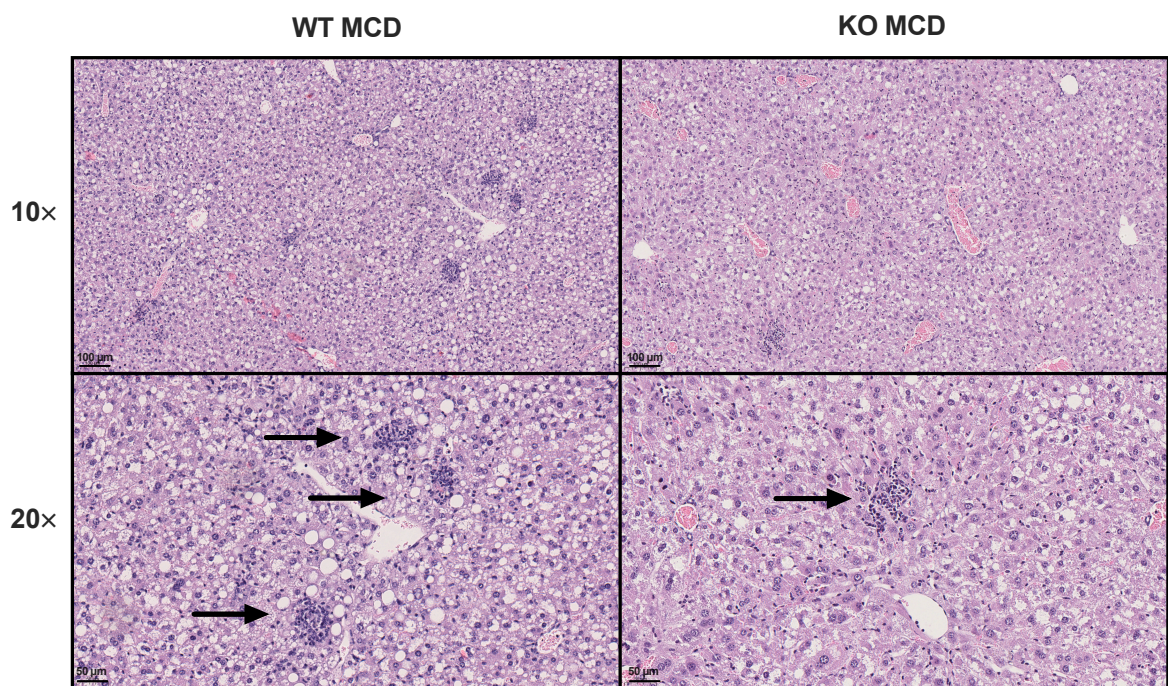


**Abbildung 41: Expression inflammatorischer Gene**

Gezeigt ist die mRNA-Expression inflammatorischer Marker von WT MCS- und MCD-Mäusen (n=14). Die Expression wurde per qPCR gemessen und ist ausgewertet mit dem Standard des jeweiligen Gens relativ zu den Haushaltsgenen *18S*, *Ppia* und *Csnk2a2* und zuletzt auf WT MCS normalisiert. Dargestellt sind die Einzelwerte und der Mittelwert. Die Signifikanz wurde mit einem multiplen t-Test und anschließend Bonferroni-Dunn Test überprüft. (ns= nicht signifikant; \* =  $p \leq 0,05$ )

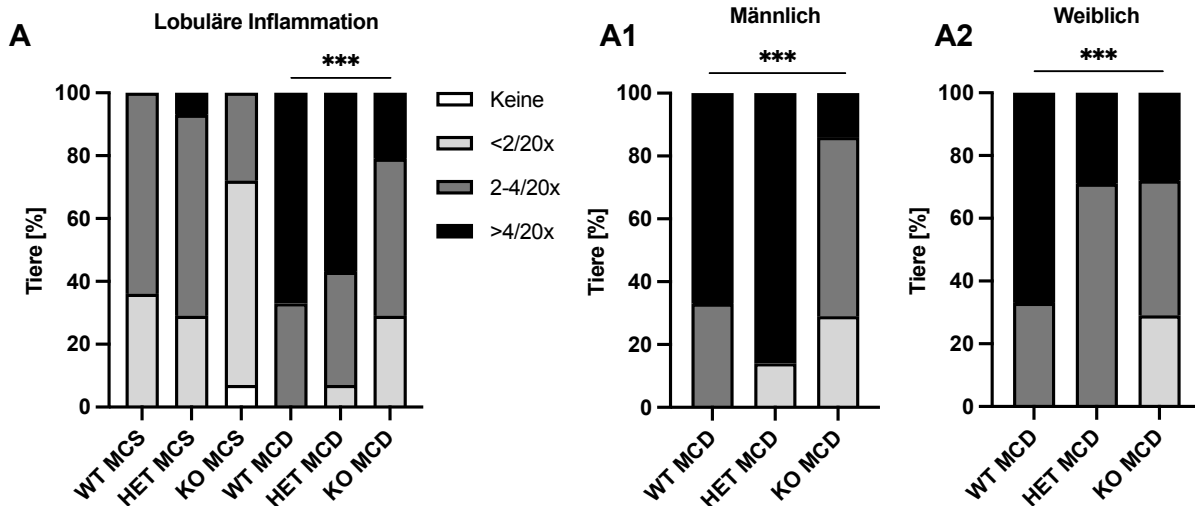
## Ergebnisse

Im Rahmen der histologischen Untersuchung wurde die lobuläre Inflammation, also die Entzündung innerhalb des Leberläppchens, unter Anwendung der vorgegebenen Scoring-Kriterien analysiert. Die Scoring-Kriterien basieren auf der Anzahl der akkumulierten entzündlichen Zellinfiltrate (Lymphozyten) in einem Sichtfeld von 20×, die mittels der H&E-Färbungen visualisiert wurden. Repräsentative H&E-Färbungen der Lebern von WT-MCD und KO-MCD Mäusen machten die signifikanten Unterschiede in der Anreicherung von entzündlichen Zellinfiltrate sichtbar. Diese waren in den Lebern von WT-MCD Mäusen stärker ausgeprägt als bei KO-MCD Mäusen (siehe Abbildung 42). Auch die quantitative histologische Analyse der Leberschnitte ergab, dass die MCD-Mäuse eine ausgeprägtere lobuläre Inflammation aufwiesen als die MCS-Kontrollen (siehe Abbildung 43A). Darüber hinaus war die lobuläre Inflammation in KO-MCD gegenüber WT-MCD signifikant verringert (siehe Abbildung 43A). Zusätzlich konnte festgestellt werden, dass es einen geschlechter-spezifischen Unterschied gab. Tendenziell waren männliche Mäuse stärker von lobulärer Inflammation betroffen als weibliche Mäuse (siehe Abbildung 43A1+2).



**Abbildung 42: Histologie- Inflammation**

Repräsentative H&E-Färbungen von Leberschnitten von WT- und KO-MCD Mäusen (10× und 20× Objektiven entspricht einer Originalvergrößerung von 100× und 200×). Die schwarzen Pfeile zeigen die lobulären Entzündungsherde mit akkumulierten Zellinfiltraten (Lymphozyten) an. Der Maßstab ist jeweils unten links in den histologischen Aufnahmen verankert (100 µm bei 10× Bildern und 50 µm bei 20× Bildern).



**Abbildung 43: Histologie- Lobuläre Inflammation**

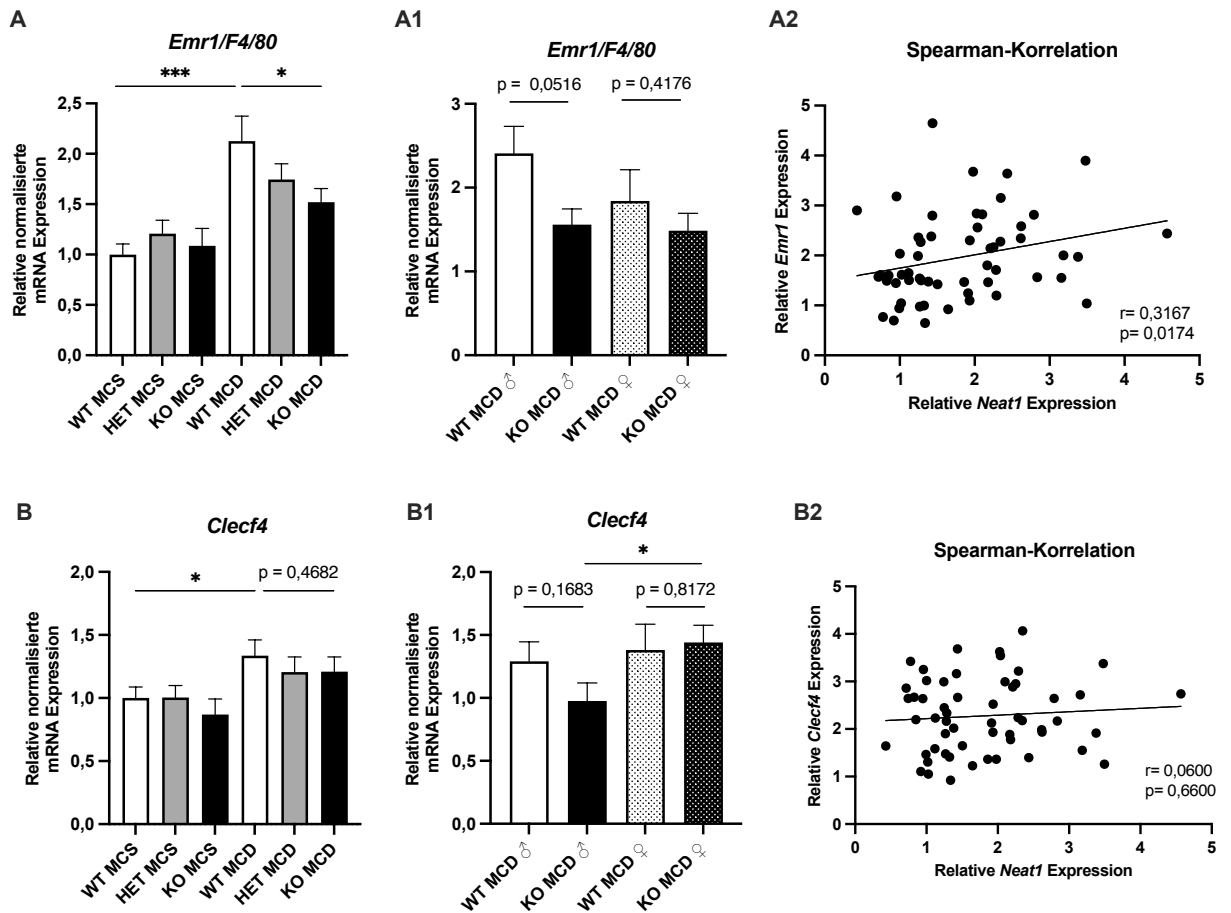
(A) Dargestellt ist der Prozentsatz der Tiere, die in die entsprechenden Scoring-Kriterien für die lobuläre Inflammation eingestuft wurden (jeweils n=14; WT MCS n=13; HET MCS n=13; WT MCD n=12; KO MCD n=12). A1 zeigt nur männliche- und A2 nur weibliche Mäuse (WT MCD n=6; HET MCD n=7; KO MCD n=6). Die Daten sind als gestapelte Kontingenzbalken dargestellt. Die Signifikanz wurde mit einem Fisher Test bestimmt \* =  $p \leq 0,05$ ; \*\* =  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$  \*\*\*\* =  $p \leq 0,0001$ .

Neben Lymphozyten spielen auch Makrophagen eine wichtige Rolle bei Entzündungsreaktionen sowie bei der Entwicklung von MASH (Leroux et al., 2012; Grunhut et al., 2018). Kupffer-Zellen sind dabei die leberansässige Makrophagenart. Daher wurde die Expression von *Emr1* (engl. Abkürzung für egf- like module containing, mucin-like, hormone receptor-like 1) auch bekannt als F4/80, einem allgemeinen Makrophagenmarker in der Maus sowie *Clec4f* (engl. Abkürzung für c-type lectin domain family 4, member f) einem Kupffer-Zell-spezifischen Marker untersucht. Die Expression von *Emr1/F4/80* war in KO-MCD Mäusen signifikant niedriger als in WT-MCD Mäusen (siehe Abbildung 44A). Die geschlechtergetrennte Analyse zeigt, dass männliche Mäuse eine höhere *Emr1/F4/80*-Expression aufweisen, als weibliche Mäuse (siehe Abbildung 44A1). Weiterhin wurde durch eine Spearman-Korrelationsanalyse eine positive Korrelation zwischen der Expression von *Emr1/F4/80* und *Neat1* festgestellt (siehe Abbildung 44A2).

Der Kupfferzell-spezifische Marker *Clec4f* zeigte unter MCD-Diät zwar insgesamt eine signifikante Erhöhung der Expression, jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen (siehe Abbildung 44B). Interessanterweise war die Expression in weiblichen KO-MCD Mäusen signifikant höher als in den männlichen Tieren. Während sich in den KO-MCD Weibchen im Vergleich zu den WT-Tieren tendenziell eine erhöhte Expression zeigte, war diese in den KO-Männchen im Vergleich zu den WT-Männchen eher vermindert (siehe Abbildung 44B1). Die Spearman-Korrelationsanalyse bestätigte, dass es keine Korrelation zwischen der Expression von *Clec4f* und *Neat1* gibt (siehe Abbildung 44B2).

## Ergebnisse

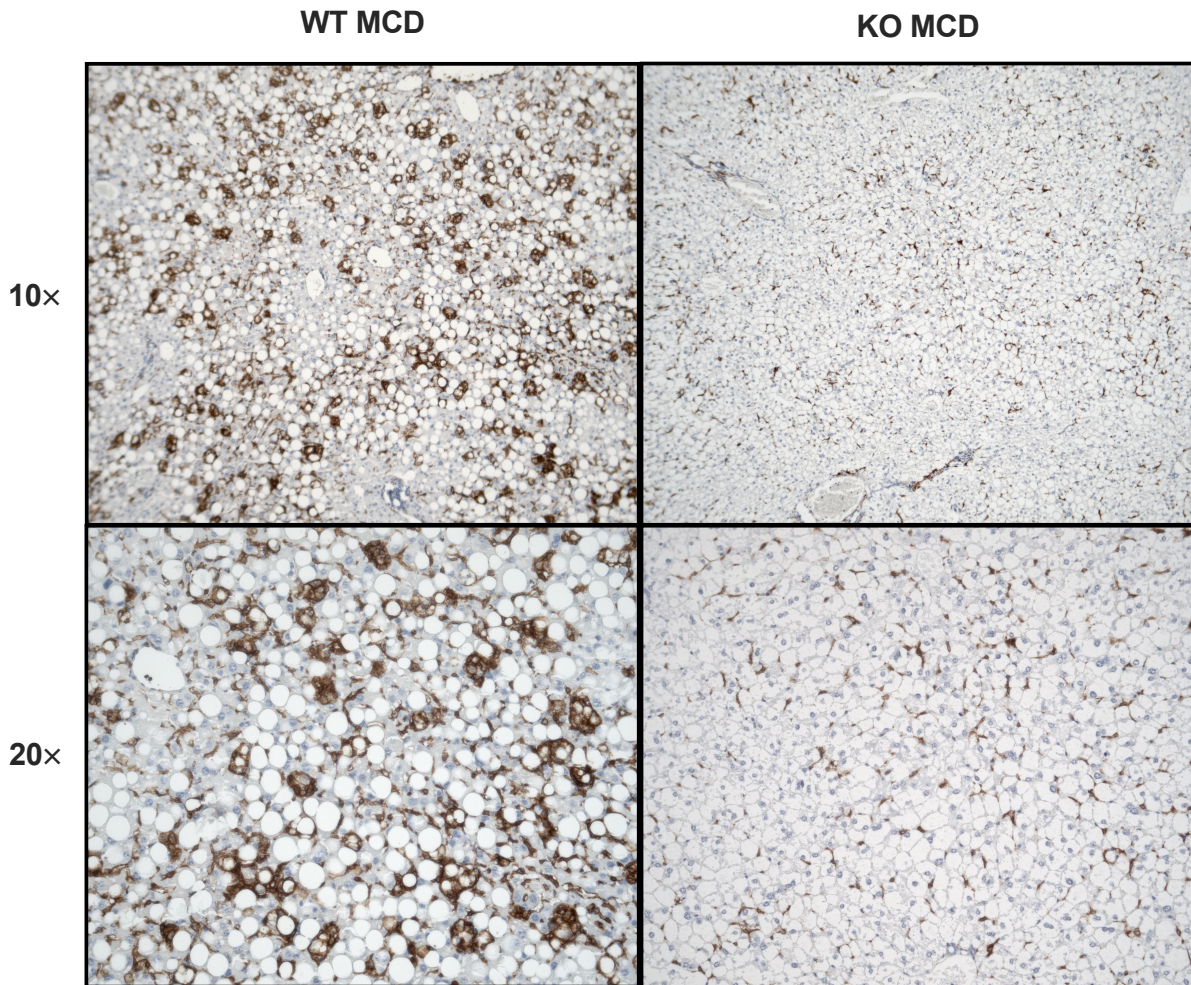
Anschließend wurde eine immunhistochemische Färbung gegen Marker Emr1/F4/80 durchgeführt, welche die deutlich erhöhten Werte in WT-MCD Mäusen bestätigten (siehe Abbildung 45).



**Abbildung 44: Expression der Makrophagenmarker Emr1/F4/80 und Clec4f**

Dargestellt sind die Expressionsanalysen der mRNA von (A) *Emr1/F4/80* und (B) *Clec4f* von allen Genotypen der MCD-Diät und MCS-Kontrolle. Diese wurden per qPCR mit Standard bestimmt und sind dargestellt als Verhältnis der mRNA zu den Haushaltsgenen *18S*, *Ppia* und *Csnk2a2*, normalisiert auf die Kontrollgruppe WT MCS. (WT MCS n=14, HET MCS n=14, KO MCS n=13, WT MCD n=14, HET MCD n=14, KO MCD n=12). Die Signifikanz wurde mit einem ungepaarten (t-Test bestimmt ns= nicht signifikant, \* = p ≤ 0,05; \*\* = p ≤ 0,01; \*\*\* = p ≤ 0,001 \*\*\*\* = p ≤ 0,0001). (A1) *Emr1/F4/80* und (B1) *Clec4f* sind entsprechende geschlechtergetrennte Analyse der WT- und KO-MCD Mäuse. Die Daten werden als Säulendiagramm mit Mittelwert + SEM dargestellt (WT MCD n=7 männlich; n=7 weiblich; KO MCD n=6 männlich; n=6 weiblich). Die Signifikanz wurde mit einem ungepaarten t-Test bestimmt (ns= nicht signifikant, \* = p ≤ 0,05; \*\* = p ≤ 0,01; \*\*\* = p ≤ 0,001 \*\*\*\* = p ≤ 0,0001). (A2) *Emr1/F4/80* und (B2) *Clec4f* mRNA Expression dargestellt als Spearman-Korrelation mit der Expression von *Neat1* der WT- und HET-Mäuse (n=28).





**Abbildung 45: Immunhistochemischer Nachweis von F4/80**

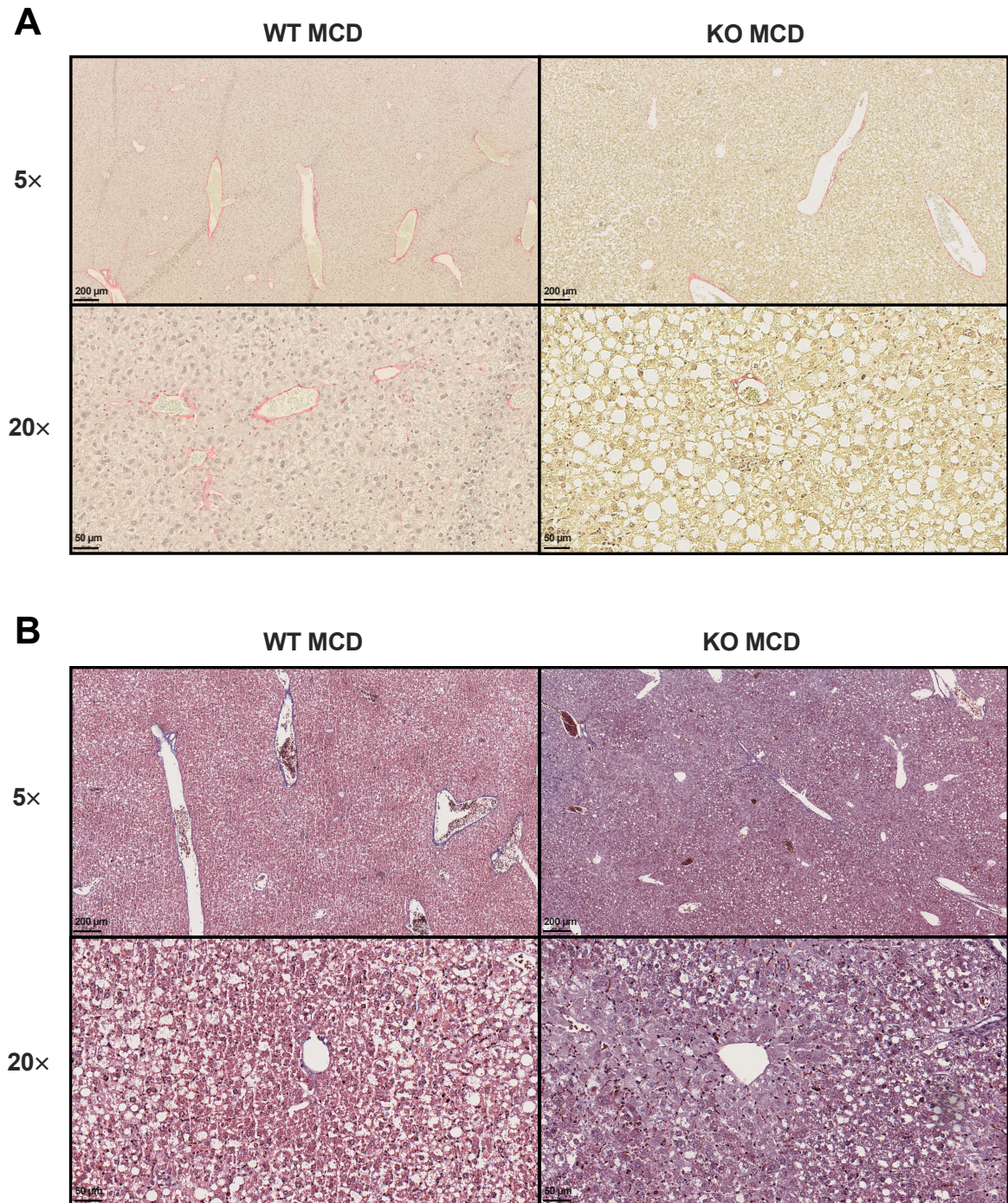
Repräsentative Aufnahmen der immunhistochemischen Färbung gegen F4/80 in Leberschnitten von WT- und KO-MCD Mäusen (10× und 20× Objektiven entspricht einer Originalvergrößerung von 100× und 200×).

### **3.2.5 Fibrose- *Neat1*-KO mildert die Ausbildung einer Leberfibrose bei MCD-Diät durch verminderte Kollagenablagerung**

#### **3.2.5.1 Histologische Analyse**

Für die histologische Untersuchung von Fibrose wurden die Leberschnitte mit zwei Färbungen präpariert (siehe Abbildung 46). Die erste Färbung erfolgte mit Siriusrot. Die zweite Färbung wurde mit Masson-Trichrom vorgenommen. Bei WT-Mäusen führte die MCD-Diät zu einer Fibrose der Stadien 1 und 2. Im Gegensatz dazu wiesen KO-MCD Mäuse eine signifikante Verringerung der Fibrose auf (siehe Abbildung 47A). Interessanterweise war die Fibrose bei männlichen Mäusen stärker ausgeprägt als bei weiblichen Mäusen, unabhängig vom Genotyp. Weibliche KO-Mäuse, die die MCD-Diät erhielten, entwickelten keine Fibrose (siehe Abbildung 47A2). Dieses Ergebnis spiegelte sich in der morphometrischen Bewertung der Fibrose, bei der die prozentual betroffene Parenchymfläche bewertet wurde, wider (siehe Abbildung 47B).



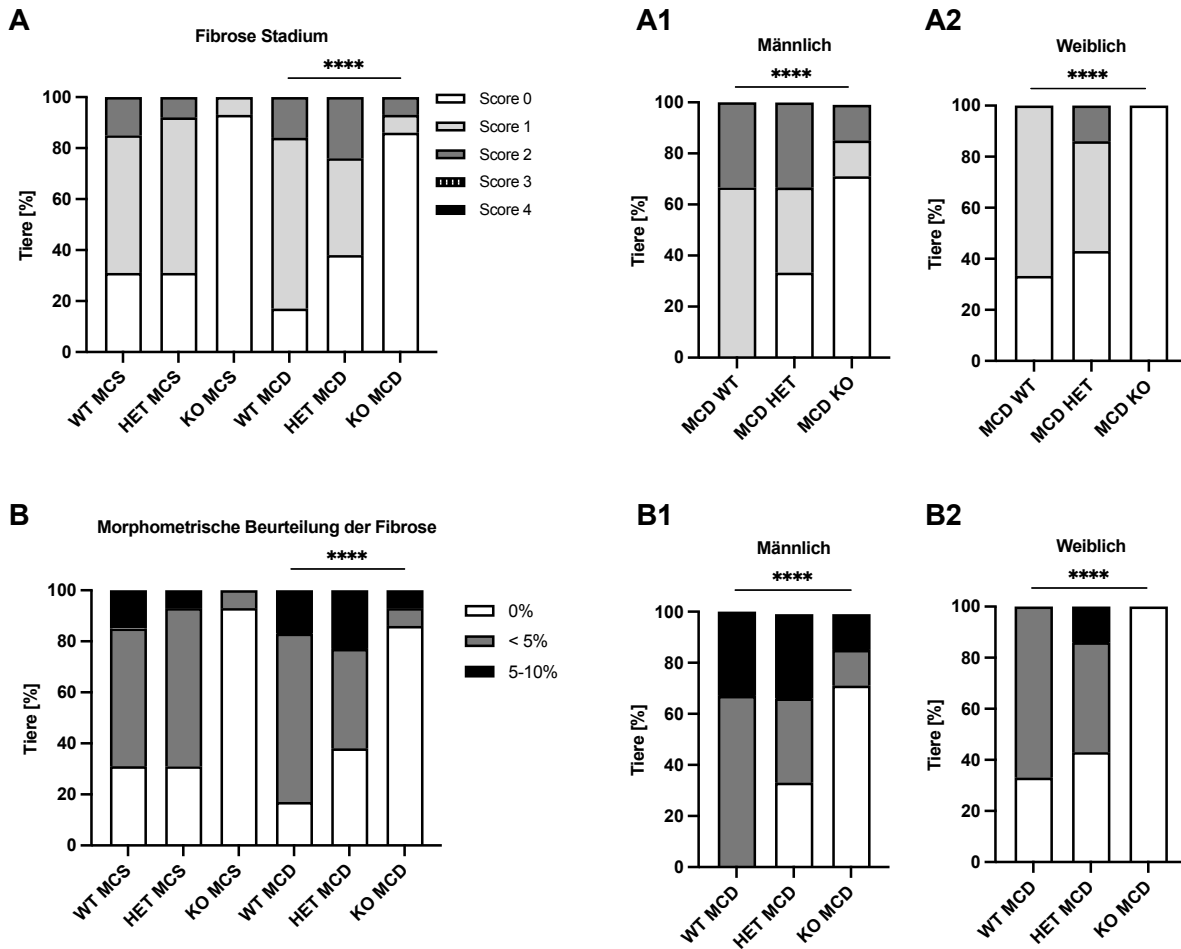


**Abbildung 46: Histologische Untersuchung der Fibrose**

Gezeigt sind repräsentative Bilder der histologischen Färbungen (A) Siriusrot und (B) Masson-Trichrom von WT- und KO-MCD Mäusen in den Vergrößerungen 5× und 20× (5× und 20× Objektiven entspricht einer Originalvergrößerung von 50× und 200×).



## Ergebnisse



**Abbildung 47: Histologische Bewertung der Fibrose**

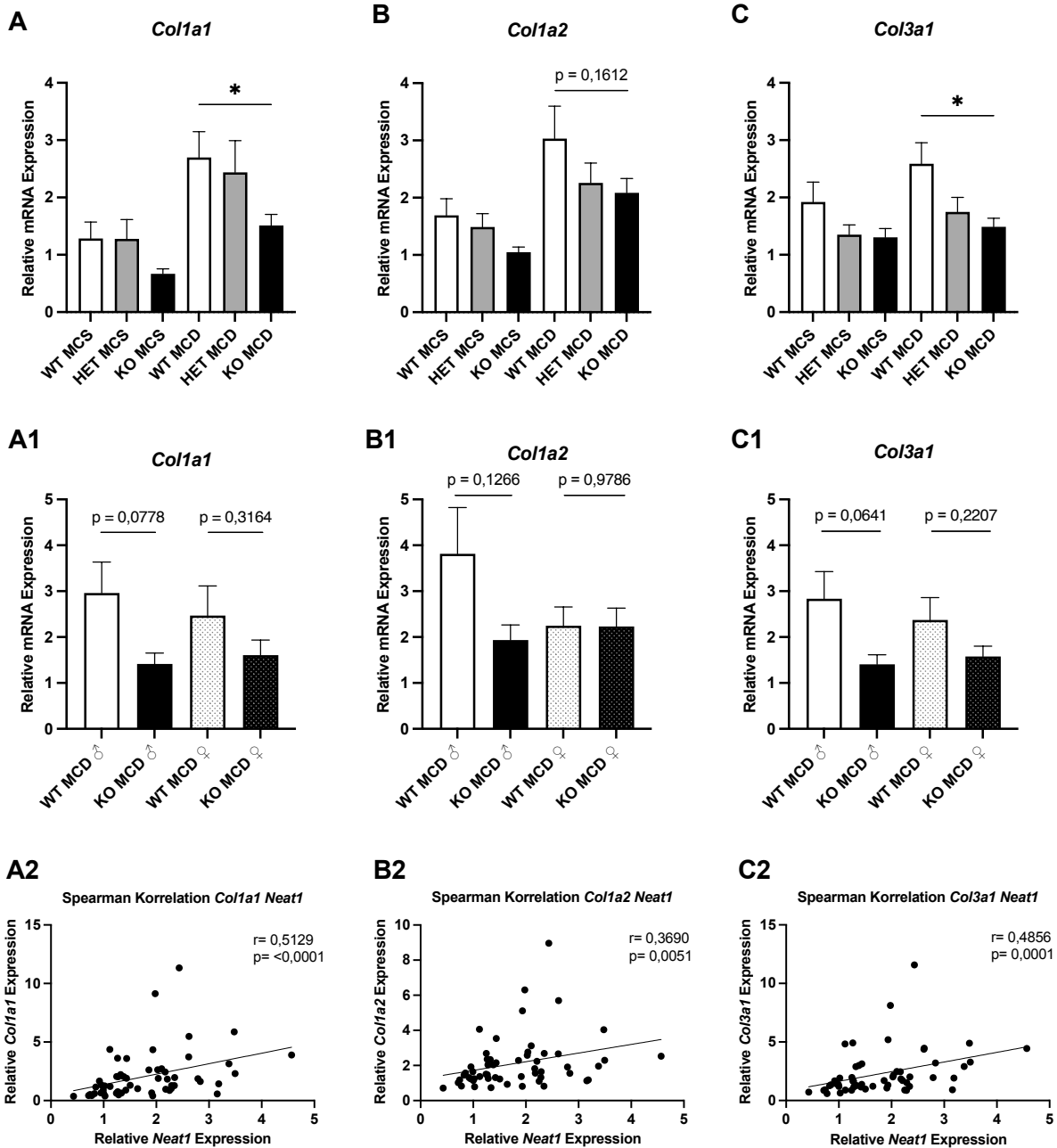
(A) Dargestellt ist der Prozentsatz der Tiere, die in die entsprechenden Scoring-Kriterien Fibrose eingestuft wurden (jeweils n=14; WT MCS n=13; HET MCS n=13; WT MCD n=12; KO MCD n=12). Die MCD-Mäusen sind differenziert in A1 männliche und A2 weibliche Mäuse (WT MCD n=6; HET MCD n=7; KO MCD n=6). (B) Die Morphometrische Beurteilung der Fibrose ist dargestellt als Prozentsatz der Tiere, die in die entsprechenden Scoring-Kriterien eingestuft wurden (jeweils n=14; WT MCS n=13; HET MCS n=13; WT MCD n=12; KO MCD n=12). Die MCD-Mäusen sind differenziert in B1 männliche und B2 weibliche Mäuse (WT MCD n=6; HET MCD n=7; KO MCD n=6). Die Daten sind als gestapelte Kontingenzbalken dargestellt. Die Signifikanz wurde mit einem Fisher Test bestimmt \* =  $p \leq 0,05$ ; \*\* =  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$  \*\*\*\* =  $p \leq 0,0001$ .

### 3.2.5.2 Kollagene

Kollagene gelten aufgrund ihrer Rolle als Hauptbestandteile der extrazellulären Matrix (ECM) als die wichtigsten Indikatoren für Fibrose. In der vorliegenden Studie wurden die Expressionswerte der beiden am häufigsten vorkommenden Kollagentypen, Col1 und Col3, mittels qPCR gemessen. *Col1a2* wies einen Trend zur verringerten Expression in den KO-MCD Mäusen auf, während die Expression von *Col1a1* und *Col3a1* signifikant verringert war (siehe Abbildung 48A-C). Aufgrund der histologischen Analyse, die zeigte, dass männliche Mäuse stärker von Fibrose betroffen waren als weibliche Mäuse, wurde die relative mRNA-Expression der Kollagene von WT- und KO-MCD Mäusen nach Geschlechtern aufgeschlüsselt (siehe Abbildung 48A1-C1). Daraus wird ersichtlich, dass männliche WT MCD Mäuse die Gruppe mit der höchsten Kollagen Expression sind. Zusätzlich konnten signifikant positive Korrelationen zwischen den exprimierten Kollagenen und *Neat1* nachgewiesen werden (siehe Abbildung 48A2-C2).

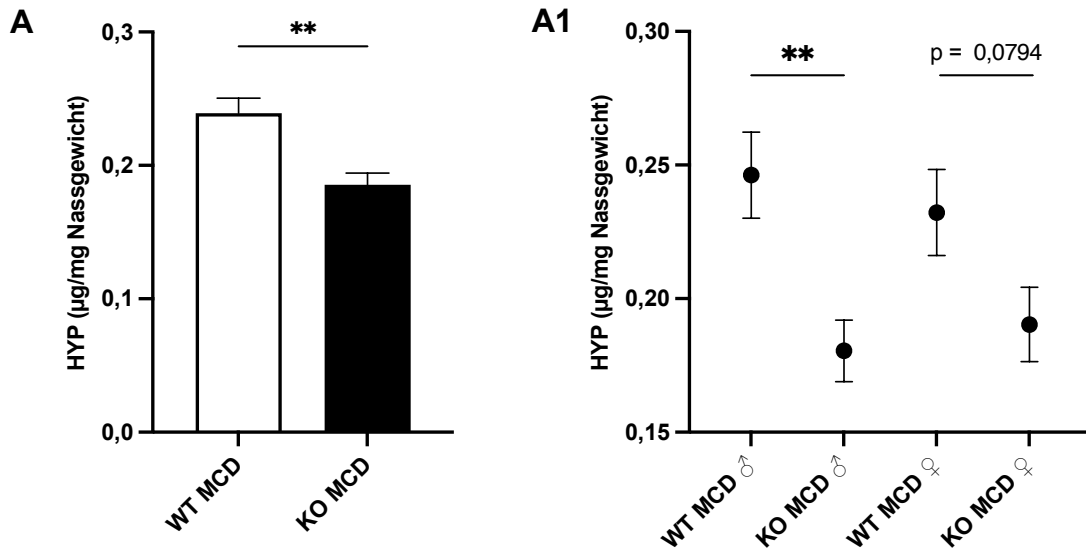
Ein weiterer Ansatz zur Quantifizierung des Kollagengehalts von Lebergewebe ist die Bestimmung der nicht-proteinogenen Aminosäure Hydroxyprolin, die fast ausschließlich und in einem konstanten Anteil im Kollagen vorkommt. Es wurde festgestellt, dass der Hydroxyprolin-Gehalt in WT-MCD Mäusen signifikant höher war als in KO-MCD Mäusen (siehe Abbildung 49A). Während der Unterschied des Hydroxyprolin-Gehalts zwischen männlichen WT und KO-MCD Mäusen stark signifikant ist, kommt es in den weiblichen Mäusen zwar zum gleichen Trend aber keinem statistisch-signifikanten Ergebnis (siehe Abbildung 49B). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Phänotyp der KO-MCD Mäuse eine mildere MASLD-Progression mit weniger Fibrose zeigt.

## Ergebnisse



### Abbildung 48: Expressionsanalyse der Kollagene

Expressionsanalysen der mRNA von (A) *Col1a1*, (B) *Col1a2* und (C) *Col3a1* von allen Genotypen der MCD-Diät und MCS-Kontrolle. Diese wurden per qPCR mit Standard bestimmt und sind dargestellt als Verhältnis der mRNA zu den Haushaltsgenen *18S*, *Ppia* und *Csnk2a2*, normalisiert auf die Kontrollgruppe WT MCS. (WT MCS n=14, HET MCS n=14, KO MCS n=13, WT MCD n=14, HET MCD n=14, KO MCD n=12). (A1) *Col1a1*, (B1) *Col1a2* und (C1) *Col3a1* sind die entsprechenden geschlechtergetrennten Analysen der WT- und KO-MCD Mäuse (WT MCD n=7 männlich; n=7 weiblich; KO MCD n=6 männlich; n=6 weiblich). Die Daten werden als Säulendiagramm mit Mittelwert + SEM dargestellt. Die Signifikanz wurde mit einem ungepaarten t-Test bestimmt (ns= nicht signifikant, \* = p ≤ 0,05; \*\* = p ≤ 0,01; \*\*\* = p ≤ 0,001 \*\*\*\* = p ≤ 0,0001). (A2) *Col1a1*, (B2) *Col1a2* und (C2) *Col3a1* mRNA Expression dargestellt als Spearman-Korrelation mit der Expression von *Neat1* der WT- und HET-Mäuse (n=28).



**Abbildung 49: Hydroxyprolin-Assay**

(A) Hydroxyprolingehalt von WT MCD (n = 14) und KO MCD Lebern (n = 12) sowie (A1) geschlechter-getrennte Analyse (WT MCD n=7 männlich; n=7 weiblich; KO MCD n=6 männlich; n=6 weiblich). Die Daten werden als Säulen- oder Punktdiagramm mit Mittelwert + SEM dargestellt. Die Signifikanzen wurden mit einem ungepaarten t-Test bestimmt \*p <0,05, \*\*p <0,01, \*\*\*p <0,001, \*\*\*\*p <0,0001.

### 3.2.6 Signalweg *Neat1*- *Ezh2*- *Smad7*- *Ctgf*

Um den verantwortlichen Mechanismus zu ergründen, durch den der Knockout von *Neat1* die Fibrogenese abmilderte, wurde eine RNA-Sequenzierung (RNA-Seq) durchgeführt. Die resultierenden Daten wurden mithilfe der Software Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) analysiert, um eine umfassende, objektive Auswertung zu ermöglichen. In einer GSEA-Heatmap werden die Expressionswerte als Farben dargestellt, wobei der Farbbereich den Bereich der Expressionswerte (rot=hoch, blau= niedrig) anzeigt.

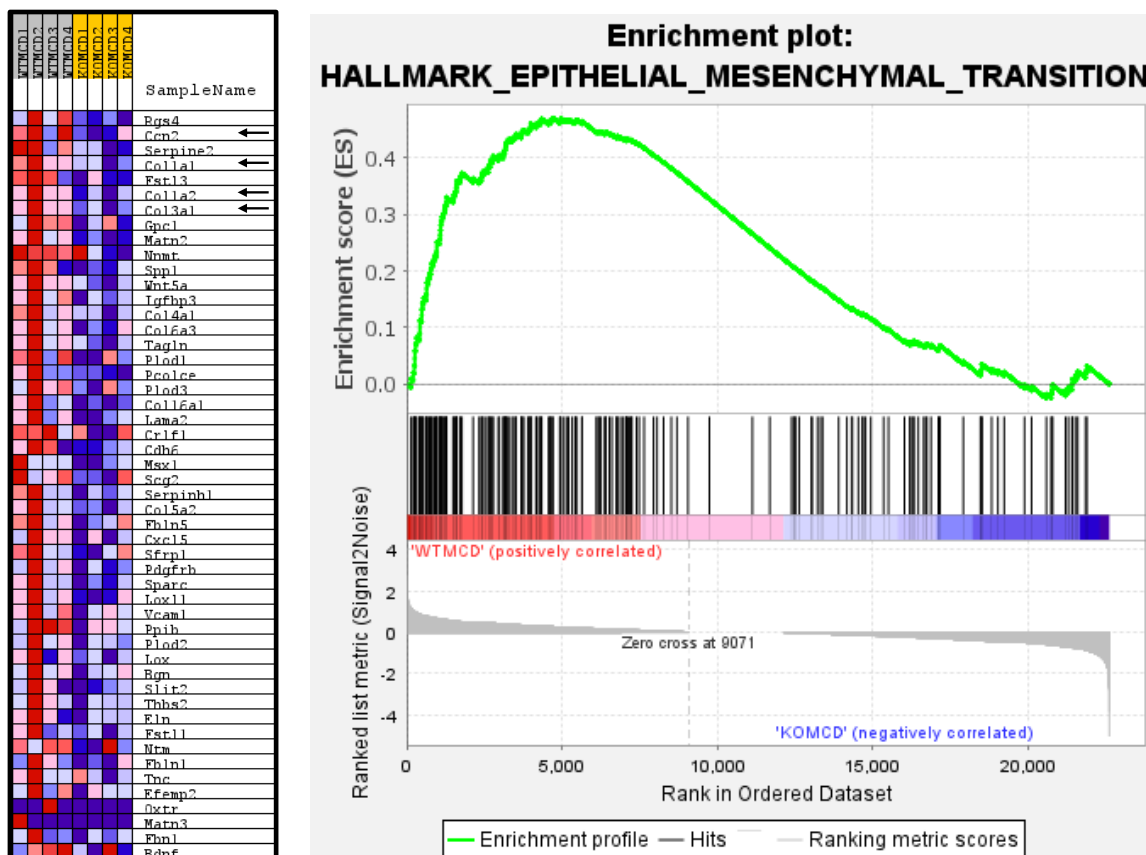
Die Heatmap der GSEA Hallmark Analyse zeigte starke Unterschiede in der Expression zwischen WT- und KO-MCD Mäusen von mehreren Genen, die mit Fibrose assoziiert sind. Besonders hervorzuheben sind die Gene *Ccn2* (*Ctgf*), *Col1a1*, *Col2a1* und *Col3a1* die in den entsprechenden Genotypen differenziell exprimiert waren (siehe Abbildung 50). Das Anreicherungsdiagramm (engl.: enrichment plot) mit dem Gen-Set des höchsten absoluten normalisierten Anreicherungsresultates (engl.: normalized enrichment score, NES) gehörte zum Hallmark epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) (siehe Abbildung 50). EMT ist ein Prozess, bei dem epitheliale Zellen, wie zum Beispiel Hepatozyten, phänotypische Veränderungen durchlaufen und mesenchymale Eigenschaften annehmen, einschließlich erhöhter Motilität und verstärktem fibrotischem Potenzial. Das EMT-Gen-Set umfasst Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM) sowie matrixassoziierte Proteine, die die ECM stabilisieren, die Kollagenvernetzung unterstützen und zur Verdichtung der

## Ergebnisse

ECM beitragen. Weiterhin umfasst das EMT-Gen-Set auch Gene des Umbaus der ECM, von Zell-Matrix-Interaktionen, von Entzündungen und oxidativen Stresses.

Eine zusätzliche GSEA-Analyse auf der Grundlage der Molecular Signatures Database (MSigDB) C2 Reactome identifizierte mehrere signifikant angereicherte Gen-Sets (siehe Tabelle A 10). Das Gen-Set Extracellular Matrix Organization zeigte sowohl die höchste Anzahl enthaltener Gene als auch einen der höchsten NESs, während Crosslinking of Collagen Fibrils den insgesamt höchsten NES aufwies (siehe Abbildung A 30A). Unter den am stärksten angereicherten Gen-Sets findet sich zudem das Gen-Set TGF-beta receptor signaling activates SMADs. Dieses Gen-Set spielt eine zentrale Rolle im Zusammenhang mit dem TGF- $\beta$ -Rezeptor-Signalweg und liefert Hinweise auf einen potenziellen Mechanismus.

Zusammenfassend bestätigen die Ergebnisse objektiv das Vorhandensein einer ausgeprägteren Fibrose bei WT-Mäusen auf Ebene des Transkriptoms und geben durch die angereicherten Gen-Sets Hinweise auf zugrunde liegende molekulare Mechanismen.



**Abbildung 50: GSEA (Hallmark)**

GSEA (Hallmark) von WT- und KO-MCD Mäusen (n=4). Gen-Set mit dem höchsten normalisierten Anreicherungsergebnis des Hallmarks EMT. Repräsentativ wird die Heatmap mit den Top 50 Genen (links), sowie der Enrichment plot präsentiert (rechts).

Der TGF- $\beta$ -Signalweg ist ein Schlüsselweg in der Fibrogenese. Allerdings war die Expression von *Tgfb* nur in den MCD-Mäusen signifikant zur Kontrolle MCS erhöht, während die Genotypen keine Unterschiede untereinander aufwiesen (siehe

Abbildung 51A). Während in den männlichen KO-MCD Mäusen *Tgfb* tendenziell gegenüber WT-MCD verringert war, kam es in den weiblichen KO-MCD Mäusen zu einer Erhöhung der *Tgfb*-Expression. In weiblichen KO-MCD Mäusen war die *Tgfb*-Expression sogar signifikant höher als in männlichen KO-MCD Mäusen (siehe

Abbildung 51A1).

Wie aus der GSEA-Analyse hervorging, war der an TGF- $\beta$  nachgeschaltete Bindegewebswachstumsfaktors *Ctgf* (engl. Abkürzung für connective tissue growth factor) zum einen in der MCD-Diät stark hochreguliert und zum anderen in den KO-MCD-Mäusen im Vergleich zu den WT-MCD-Mäusen herunterreguliert. Dieser Effekt konnte per qPCR bestätigt werden (siehe

Abbildung 51B). In weiblichen MCD-Mäusen war sowohl die basale *Ctgf*-Expression im Vergleich zu den männlichen MCD-Mäusen tendenziell verringert als auch der Unterschied des Expressionsniveaus von KO- im Vergleich zu WT-MCD-Mäusen verringert (siehe

Abbildung 51B1). Darüber hinaus wurde eine signifikante Korrelation zwischen *Neat1* und der *Ctgf*-Expression festgestellt (siehe

Abbildung 51D).

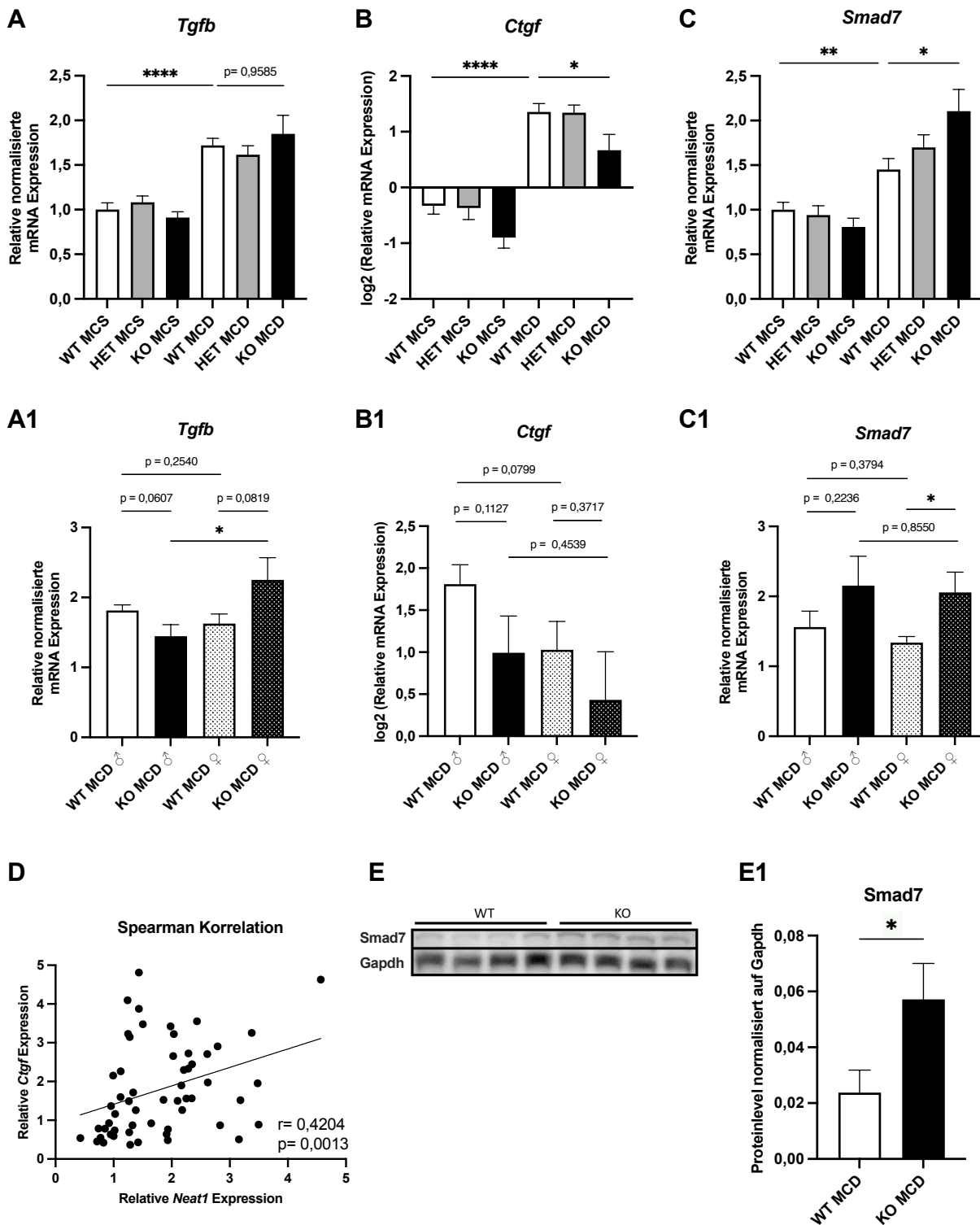
Die Aktivierung des TGF- $\beta$ -Rezeptors führt zu einer intrazellulären Signalkaskade, an der mehrere Smad-Proteine beteiligt sind und die schließlich zu einer profibrotischen Gentranskription führt. In diesem Zusammenhang inhibiert Smad7 die Assoziation, Phosphorylierung und Aktivierung der regulatorischen Smads (R-Smads) Smad2 und Smad3. Dadurch wird der Zusammenschluss von Smad2/3/Smad4-Komplexen gehemmt, wodurch die Initiierung des TGF- $\beta$ -Signalwegs und folglich die Expression des fibrotischen Treibers *Ctgf* verhindert wird. Die RNA-Seq-Daten zeigten, dass die Expression von *Smad7* in KO-MCD-Mäusen signifikant erhöht war, ein Befund, der anschließend durch qPCR validiert wurde (siehe

Abbildung 51C). In weiblichen Mäusen war dieser Expressionsunterschied sowohl stärker als auch signifikant (siehe

Abbildung 51C1). Darüber hinaus wurde mittels Western Blotting ein Anstieg der Smad7-Proteinmenge in MCD-gefütterten KO-Mäusen beobachtet (siehe

Abbildung 51E+E1).

## Ergebnisse



### Abbildung 51: Entschlüsselung des Signalwegs

Gezeigt sind die Expressionsanalysen der mRNA von (A) *Tgfb*, (B) *Ctgf* und (C) *Smad7* von allen Genotypen der MCD-Diät und MCS-Kontrolle. Diese wurden per qPCR mit Standard bestimmt und sind dargestellt als Verhältnis der mRNA zu den Haushaltsgenen *18S*, *Ppia* und *Csnk2a2*, normalisiert auf die Kontrollgruppe WT MCS. (WT MCS n=14, HET MCS n=14, KO MCS n=13, WT MCD n=14, HET MCD n=14, KO MCD n=12). (A1) *Tgfb*, (B1) *Ctgf* und (C1) *Smad7* sind die entsprechenden geschlechtergetrennten Analysen der WT- und KO-MCD Mäuse. Die Daten werden als Säulendiagramm mit Mittelwert + SEM dargestellt (WT MCD n=7 männlich;

## Ergebnisse

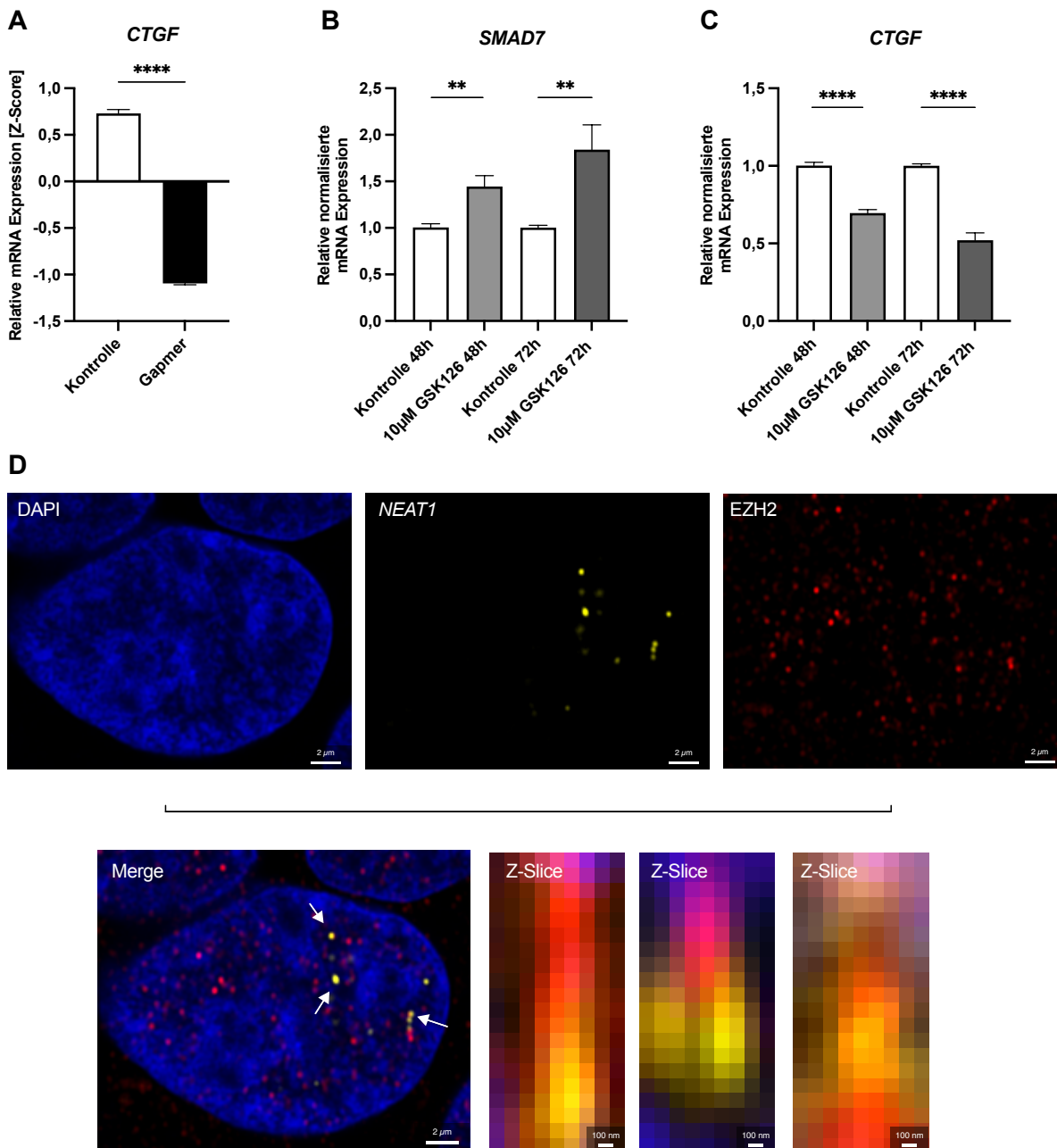
n=7 weiblich; KO MCD n=6 männlich; n=6 weiblich). Die Signifikanz wurde mit einem ungepaarten t-Test bestimmt (\* =  $p \leq 0,05$ ; \*\* =  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$  \*\*\*\* =  $p \leq 0,0001$ ). (D) *Ctgf* mRNA-Expression dargestellt als Spearman-Korrelation mit der Expression von *Neat1* der WT- und HET-Mäuse (n=28). (E) Repräsentativer Blot von WT- und KO-MCD Mäusen von Smad7 und dem Haushaltsgen Gapdh. (E1) Quantitative Analyse des Western Blots von Smad7 normalisiert auf Gapdh der WT- und KO-MCD Mäuse (n=10).

Um zu prüfen, ob die *NEAT1*-abhängige Regulierung von SMAD7 und CTGF in humanen Hepatozyten stattfindet, wurde *NEAT1* in HepG2-Zellen mittels Gapmeren ausgeschaltet und eine RNA-Sequenzierung durchgeführt. In den Zellen, in denen *NEAT1* ausgeschaltet wurde, war die Expression von *CTGF* signifikant herabgesetzt (siehe Abbildung 52A), was darauf hindeutet, dass in menschlichen Hepatozyten ein ähnlicher Signalprozess stattfindet.

Smad7 ist ein potenzielles Ziel für die Regulierung durch Ezh2 (engl. Abkürzung für enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit). Ezh2 ist die wichtigste enzymatische Komponente des Methylierungskomplexes PRC2 (engl. Abkürzung für Polycomb Repressive Complex 2), der Gene durch Histonmethylierung (H3K27me3) unterdrückt (Basta et al., 2023). Frühere Studien haben ausführlich gezeigt, dass Ezh2 durch *Neat1* im Gehirn und im Herzen sequestriert wird (Chen et al., 2018; Ge et al., 2022). Um die Wirkung von EZH2 auf SMAD7 in Hepatozyten zu bestätigen, wurde der EZH2-Inhibitor GSK126 (EZH2i) verwendet. Die Behandlung von HepG2-Zellen mit EZH2i führte zu einer signifikanten konzentrationsabhängigen Hochregulierung von *SMAD7*, begleitet von einer gleichzeitigen Herunterregulierung von *CTGF* (siehe Abbildung 52B+C). Schließlich wurde die Interaktion von *NEAT1* mit EZH2 durch kombinierte Immunfluoreszenz von EZH2 und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung von *NEAT1* bestätigt, die eine nukleäre Co-Lokalisierung von EZH2 und *NEAT1* in HepG2-Zellen zeigte (siehe Abbildung 52D).



## Ergebnisse



### Abbildung 52: *NEAT1*-*EZH2*-*SMAD7*-*CTGF*-Achse

(A) Relative *CTGF*-mRNA-Expression von HepG2-Zellen mit *NEAT1*-Knockdown durch Gapmere oder Kontrolle, gemessen durch RNA-Seq. (B) Relative *CTGF*- oder (C) *SMAD7*-mRNA-Expression von HepG2-Zellen nach Behandlung mit 10 µM *EZH2*-Inhibitor GSK126 für 48 oder 72 Stunden, gemessen per qPCR, dargestellt als relative normalisierte Expression zur unbehandelten Kontrolle mit Haushaltsgen *18S* (n=3 mit 3 Triplikaten). Die Daten werden als Säulendiagramm mit Mittelwert + SEM dargestellt. Die Signifikanz wurde mit einem ungepaarten t-Test bestimmt (\* =  $p \leq 0,05$ ; \*\* =  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$  \*\*\*\* =  $p \leq 0,0001$ ). (D) Co-Lokalisierung von *EZH2* und *NEAT1* in HepG2-Zellen, nachgewiesen durch Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) von *NEAT1*-Stellaris-Sonden (gelb) und Immunfluoreszenz von *EZH2* (rot), und Färbung des Zellkerns mit DAPI (Maßstab 2 µm). Die Pfeile zeigen die Co-Lokalisierung von *EZH2* und *NEAT1*, vergrößert durch Z-Slices (Maßstab 100 nm). Repräsentative Bilder wurden mit einem 100× Öl-Objektiv (entspricht einer Originalvergrößerung von 1000×) Olympus IX83 Abberior STEDYCON aufgenommen.

## 4. Diskussion

### 4.1 Die Rolle von *NEAT1* in MASLD und MASH

MASLD ehemals bekannt als NAFLD, stellt die weltweit am häufigsten auftretende chronische Lebererkrankung dar (Teng et al., 2023). MASLD ist die hepatische Manifestation des metabolischen Syndroms mit prognostizierte Prävalenz von 55,7% bis 2040 (Le et al., 2022; Younossi, Kalligeros, et al., 2024). Die Diagnose von MASLD gestaltet sich aufgrund des Fehlens spezifischer Symptome und Biomarker schwierig, was häufig zu einer unbeachteten Progression in die fortgeschrittene Form MASH mit Fibrose zu Zirrhose und zu HCC führen kann. Tatsächlich stellt gegenwärtig das MASLD-assoziierte HCC die am schnellsten zunehmende Ursache für HCC dar und ist zudem die am stärksten wachsende Indikation für eine Lebertransplantation. Zwischen den Jahren 2000 und 2016 stieg der Anteil signifikant von 2,1% auf 16,2% an (Younossi, Stepanova, et al., 2024; Phoolchund & Khakoo, 2024).

#### 4.1.1 *In vivo* und *in vitro* MASLD Modelle

Nachdem bekannt war, dass *NEAT1* eine Rolle in HCC spielt (Guo et al., 2015), wurde *NEAT1* erstmalig von Wang et al. (2018) auch mit MASLD in Verbindung gebracht. Sie zeigten, dass sowohl in Sprague-Dawley (SD) Ratten, denen eine HFD-Diät gefüttert wurde als auch in hepatischen Rattenzellen (BRL-3A), die mit Fettsäuren inkubiert wurden, die *Neat1*-Expression anstieg (Wang, 2018). Weitere Studien berichteten über eine erhöhte *NEAT1*-Expression in *in vitro* MASLD Modellen unter Verwendung von HepG2- oder Huh7-Zellen nach Behandlung mit freien Fettsäuren (Zhou & Qiu, 2022; Jin et al., 2022; Fu et al., 2019; Hu et al., 2022). Diese Befunde konnten in der vorliegenden Arbeit sowohl in HepG2-Zellen als auch in Huh7-Zellen nach verschiedenen FFA-Behandlungen bestätigt werden. TNF- $\alpha$  spielt eine zentrale Rolle bei der Entwicklung von MASLD und dem Fortschreiten zu MASH (Kakino et al., 2018). Der Versuch, das steatotische Modell durch zusätzliche TNF- $\alpha$ -Stimulation mit einer inflammatorischen Komponente zu erweitern, um dem pathophysiologischen Zustand der MASH näherzukommen, führte jedoch zu stark variablen und insgesamt uneindeutigen Ergebnissen. Dies lässt vermuten, dass Faktoren wie Dosis und Expositionsdauer von TNF- $\alpha$ , sowie weitere Faktoren wie die metabolische Vorbelastung der Zellen oder zusätzliche Stimuli entscheidend für eine Induktion von *NEAT1* sein könnten.

Um die inflammatorische Komponente von MASH näher an der *in vivo*-Situation zu untersuchen, kann ein transwell-basiertes Co-Kultur-Modell mit aktivierten Makrophagen und Hepatozyten eingesetzt werden (Padberg et al., 2020). Bei diesem Co-Kultur-Modell zeigte sich in dieser Arbeit eine erhöhte *NEAT1*-Expression in den Makrophagen, während

in HepG2-Zellen nur ein Trend erkennbar war. Die fehlende *NEAT1*-Induktion in HepG2-Zellen könnte ein Hinweis darauf sein, dass die parakrine Konzentration von Zytokinen im Transwell-System nicht ausreichend war oder dass die Analyse nach 24 Stunden kein adäquater Zeitpunkt ist, um bei einer indirekten Stimulation eine induzierte *NEAT1*-Expression zu detektieren. Perspektivisch könnte die Co-Kultur mit einer vorherigen Steatose-Induktion in den HepG2-Zellen kombiniert werden, um die pathophysiologische Antwort auf Transkriptebene zusätzlich zu stimulieren und mehrere Detektions-Zeitpunkte erfasst werden.

Ein hoher Fruktosekonsum und damit einhergehende verstärkte Fettablagerung in der Leber sowie Insulinresistenz sind hinlänglich bekannt (Le et al., 2009; Dominguez-Coello et al., 2020), soll nun aber auch die Entwicklung und Progression von MASLD fördern (Jensen et al., 2018; Li et al., 2024). Die Behandlung von HepG2-Zellen mit Fruktose wurde als mögliches *in vitro* MASLD Modell untersucht, wobei sich entgegen der Erwartung keine signifikante Veränderung der *NEAT1*-Expression zeigte, was schlussendlich auf die Wahl des zellulären Modells zurückzuführen sein könnte. HepG2-Zellen, eine Hepatom-Zelllinie, weisen im Vergleich zu primären Hepatozyten eine veränderte Stoffwechselaktivität auf, da sie primär die niedrigaktive hepatische Fruktokinase-Isoform KHK-A exprimieren, was ihre Fähigkeit zur effizienten Fruktoseverarbeitung einschränken könnte (Park et al., 2021; Li et al., 2016). Darüber hinaus wird *in vivo* die Entwicklung und Progression von MASLD durch ein Zusammenspiel aus lipotoxischen, oxidativen und entzündlichen Stimuli vorangetrieben und Studien zeigten, dass erst die Kombination von Fruktose mit freien Fettsäuren oder entzündlichen Mediatoren wie TNF- $\alpha$  zu Veränderungen auf Expressionsebene führt (Kanuri et al., 2011; Piras et al., 2020). Für die Etablierung eines funktionellen *in vitro* MASLD Modells erscheint es daher notwendig, zusätzliche metabolische und inflammatorische Stressoren sowie geeignetere Zellmodelle wie primäre Hepatozyten zu verwenden.

Obwohl primäre humane Hepatozyten aufgrund ihrer hohen physiologischen Relevanz das bevorzugte Modellsystem darstellen würden (Godoy et al., 2013), sind sie für den Laboralltag aufgrund limitierter Verfügbarkeit und hoher Kosten kaum praktikabel. Nikolaou et al. (2016) untersuchten, ob sich HepG2-Zellen, die aufgrund ihres malignen Ursprungs im Vergleich zu primären Hepatozyten typischerweise einen veränderten Stoffwechsel mit erhöhten Raten der De-novo-Lipogenese und Glykolyse (Pereira da Silva et al., 2009; Daniels et al., 2014) aufweisen, durch DMSO in Richtung eines primärzellähnlichen Phänotyps dedifferenzieren lassen (Nikolaou et al., 2016). Sie zeigten, dass das mRNA-Expressionsprofil von Leberfunktionsmarkern sowie den Lipid- und Glukosemetabolismus in Richtung eines primärzellähnlichen Musters verschiebt. DMSO-behandelte HepG2-Zellen zeigten signifikante Veränderungen im Lipidom, insbesondere eine Abnahme

gesättigter Triglyceride und eine Zunahme mehrfach ungesättigter Triglyceride. Diese Veränderungen sind konsistent mit der beobachteten Herunterregulierung zentraler Gene der De-novo-Lipogenese (SCD1, FASN, ACC1) und sprechen für eine funktionelle Reprogrammierung der Zellen in Richtung eines primärzellähnlichen hepatischen Phänotyps (Nikolaou et al., 2016). Die verringerte *NEAT1*-Expression nach DMSO-Behandlung unterstützt diese Interpretation, da HCC mit einer Überexpression von *NEAT1* assoziiert ist (Guo et al., 2015). Für weitere Versuche wäre interessant zu überprüfen, ob der TG-Anteil im Medium und damit der TG-Export und so der Lipidexport ansteigt, sowie weitere metabolische Untersuchungen, um die Funktionalität der DMSO-behandelten Zellen weiter zu charakterisieren.

*In vivo*-Experimente erfolgten in der bisherigen Literatur an Mäusen oder Ratten mittels HFD- oder MCD-Fütterung und transienter *Neat1*-Knockdown-Strategien (Wang, 2018; Sun et al., 2019; Chen et al., 2019; Zhang et al., 2020). Die genannten Studien wurden jedoch ausschließlich an männlichen Tieren durchgeführt, ohne eine äquivalente Geschlechterverteilung sicherzustellen. Ebenso existierten bislang keine funktionellen Untersuchungen, die einen vollständigen *Neat1*-Knockout mit der Induktion eines MASH-Phänotyps kombinierten. Folglich wurde in Vorversuchen die *Neat1*-Expression in verschiedenen *in vivo*-Modellen untersucht, um herauszufinden, welches Mausmodell für die Untersuchung von *Neat1* am besten geeignet ist. In dieser Arbeit konnte ein leichter Anstieg der *Neat1*-Expression in HFD-gefütterten Mäusen beobachtet werden, der jedoch erst nach einem Fütterungszeitraum von sechs Monaten signifikant ausfiel. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass sich im Verlauf der HFD-Diät initial eine Steatose entwickelt, die langfristig zu Inflammation führen kann, welche *Neat1* stärker induziert als eine Steatose allein. Van der Heijden et al. (2015) zeigten, dass eine durch HFD-Fütterung induzierte Fettleibigkeit bei Mäusen zwar frühzeitig zu einer Inflammation im Fettgewebe führt, jedoch erst in späteren Stadien zu entzündlichen Veränderungen in der Leber (van der Heijden et al., 2015). Bestätigend wurde in der vorliegenden Arbeit insbesondere unter inflammatorischen Bedingungen, wie dem DEN-Modell, das MASH-assoziierten Leberschäden ähnelt (Kessler et al., 2014), sowie unter MCD-Diät, die eine ausgeprägte Steatose mit Inflammation bis hin zur Fibrose verursacht, eine signifikante Steigerung der *Neat1*-Expression beobachtet.

Insgesamt lässt sich festhalten, dass ein funktionelles *in vitro* MASH-Modell auf einer Kombination aus metabolischen (FFA, Fruktose), inflammatorischen (TNF- $\alpha$ ) und gegebenenfalls immunologischen (Co-Kultur) Stimuli basieren sollte. Ebenso zeigt sich, dass die Auswahl geeigneter Zellmodelle, idealerweise primäre Hepatozyten, entscheidend ist. Eine gezielte Weiterentwicklung dieser Modelle könnte dazu beitragen, die Rolle von *NEAT1* in der Pathogenese von MASLD und MASH funktionell aufzuklären und *in vivo*

Modelle zu unterstützen oder zu ersetzen. Weiterhin validieren sowohl die bestehende Literatur als auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die zentrale Rolle von *Neat1* in der Pathogenese und Progression von MASLD. Aus den verschiedenen Modellen geht hervor, dass *Neat1* insbesondere unter inflammatorischen Bedingungen, wie der MCD-Diät, dem DEN-Modell und in MASH-Patienten, signifikant erhöht war.

### 4.1.2 Effekte der MCD-Diät

Basierend auf den Vorversuchen zur *Neat1*-Expression in den verschiedenen *in vivo* und *in vitro* Modellen wurde in dieser Arbeit ein MASH-Modell mittels MCD-Diät etabliert. Die Wahl fiel auf die MCD-Diät, da sie innerhalb kurzer Zeit sowohl inflammatorische als auch fibrotische Prozesse auslöst (Anstee & Goldin, 2006), an denen *Neat1* mutmaßlich beteiligt ist. Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine signifikante Hochregulation von *Neat1* unter MCD-Bedingungen nachgewiesen werden. Diese Beobachtung wird durch Ergebnisse von Zhang et al. (2020) gestützt, die parallel eine erhöhte *Neat1*-Expression in männlichen MCD-gefütterten Mäusen beschrieben (Zhang et al., 2020).

Allgemein führt die MCD-Diät aufgrund des Methionin- und Cholinmangels sowie erhöhten Fettgehalts zu einer hepatischen Triglycerid-Akkumulation, entzündlichen Prozessen und fibrotischer Umstrukturierung, zu einem insgesamt MASH-ähnlichen Phänotyp. Zudem verursacht sie einen eher MASH-untypischen ausgeprägten Gewichtsverlust infolge gesteigerter  $\beta$ -Oxidation und erhöhtem Energieverbrauch (Rinella et al., 2008; Itagaki et al., 2013; Rizki et al., 2006). Die Beobachtungen dieser Arbeit stimmen mit den bisherigen Daten aus der Literatur überein. Durch den starken Gewichtsverlust der MCD-gefütterten Mäuse musste die Dauer des Versuchs sogar von den geplanten vier Wochen auf drei Wochen verkürzt werden. Die am stärksten betroffene Untergruppe mit dem gravierendsten Gewichtsverlust waren männliche KO-Mäuse. Im Gegenzug wiesen diese Mäuse allerdings auch den geringsten Gehalt an Triglyceriden in der Leber auf, was die Hypothese von Rizki et al. (2006) bestätigt, dass der Gewichtsverlust und eine erhöhte  $\beta$ -Oxidation in Zusammenhang stehen. Um das zu bestätigen wäre es interessant in weiterführenden Experimenten funktionelle Enzyme der  $\beta$ -Oxidation wie der Acyl-CoA-Dehydrogenase (engl.: acyl-CoA dehydrogenase long chain, Acadl) zu untersuchen.

Bei allen Mäusen, die mit der MCD-Diät gefüttert wurden, konnte ein Anstieg der im Serum gemessenen Transaminasen ALT und AST festgestellt werden, was auf eine durch die Diät induzierte Leberschädigung hinweist und die in der Literatur beschriebenen Effekte (Kirsch et al., 2003) bestätigt. Das erhöhte AST/ALT-Verhältnis (De-Ritis-Quotient), mit dem höchsten Wert in den weiblichen KO-MCD-Mäusen, erscheint auf den ersten Blick widersprüchlich, da diese Gruppe die geringsten Fibrosebefunde aufwies. Bei genauer Betrachtung wird jedoch deutlich, dass die AST-Level über die Gruppen hinweg relativ stabil

blieben, während insbesondere bei den männlichen Tieren innerhalb der MCD-Diät ein stärkerer Anstieg der ALT-Werte zu beobachten war, ein Phänomen, was bereits von Kirsch et al. (2003) beobachtet werden konnte. Dies führte in diesen Gruppen zu einem niedrigeren AST/ALT-Verhältnis trotz ausgeprägter histologischer Veränderungen. Nach wie vor dient das AST/ALT-Verhältnis in Patienten jedoch nicht zur Differenzierung zwischen MASLD und MASH, da die patientenindividuellen Unterschiede zu stark sind (Mofrad et al., 2003; Roeb et al., 2022). Die Befunde dieser Arbeit bestärken diesen Ansatz, da sich in dem MCD-Modell zeigte, dass ein hohes AST/ALT-Verhältnis nicht zwingend mit fortgeschrittener Fibrose einhergeht.

Histologisch zeigte die MCD-Diät bei allen gefütterten Mäusen typische Merkmale eines MASH-ähnlichen Phänotyps, darunter eine ausgeprägte hepatische Steatose, entzündliche Veränderungen und Anzeichen beginnender Fibrose. Diese Veränderungen waren in ihrer Ausprägung gruppenabhängig unterschiedlich, zeigten jedoch ein übergreifendes Muster, das mit den in der Literatur beschriebenen Effekten der MCD-Diät einher ging (Rinella et al., 2008; Itagaki et al., 2013). Eine detaillierte Analyse der histologischen Merkmale in Bezug auf Steatoseverteilung, Entzündungsgrad und Fibrosetyp erfolgt in den folgenden Abschnitten.

Das MCD-Modell steht zunehmend in der Kritik, da es aufgrund des fehlenden Adipositas-Phänotyps und des nicht abgebildeten metabolischen Syndroms nur eingeschränkt auf den Menschen übertragbar ist. In aktuellen Studien gewinnen daher Modelle wie die High-Fat-High-Cholesterol-Diät (HFHCD) oder die Western-Diet zunehmend an Bedeutung, da sie metabolische Begleiterscheinungen besser nachbilden und eine höhere klinische Übertragbarkeit aufweisen. Dennoch konnte in einer Untersuchung zu den Expressionsmustern verschiedener muriner Modelle im Vergleich zu humanen MASLD- und MASH-Leberproben festgestellt werden, dass die stärkste Übereinstimmung an in gleicher Weise regulierter Gene unter MCD-Diät auftraten (Teufel et al., 2016). Dies wurde zu einem späteren Zeitpunkt im Rahmen einer umfangreichen Vergleichsstudie mit mehreren MASLD-Maus-Modellen bestätigt (Vacca et al., 2024). Die in Vacca et al. (2024) identifizierten Gene wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht. Unsere Ergebnisse zeigten eine hohe Übereinstimmung der Expressionsprofile mit denen der MCD-Modelle in der Originalpublikation, was darauf hindeutet, dass das MCD-Modell auf transkriptioneller Ebene eine geeignete Näherung für ein MASH-Modell darstellen kann.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die MCD-Diät innerhalb des Behandlungszeitraums die erwarteten Effekte hervorbrachte und mit den in der Literatur beschriebenen pathophysiologischen Veränderungen übereinstimmt. Dennoch ist davon auszugehen,

dass dieses Modell künftig an Relevanz verlieren wird, da es zentrale Merkmale der humanen MASLD, wie Adipositas und metabolisches Syndrom, nicht abbildet.

### 4.1.3 Steatose und Lipidom

Die initiale pathophysiologische Manifestation von MASLD ist die hepatische Steatose, welche aus einer Dysregulation des Lipidstoffwechsels resultiert. Histologische Analysen wiesen das Vorliegen einer Steatose durch die MCD-Diät nach. Mithilfe bioinformatischer Anwendungen wie MoSbi und LINEX<sup>2</sup> (Rose et al., 2022; Rose et al., 2023) konnten signifikante Unterschiede im Lipidom zwischen WT- und KO-Mäusen unter MCD-Diät festgestellt werden. Besonders betroffen waren Spezies der Triglyceride, aber auch Diglyceride, Ceramide sowie freies Cholesterin. Diese gehören zu den Lipidklassen, die als Schlüsselfaktoren in der Pathophysiologie von MASLD gelten. Studien konnten zeigen, dass *NEAT1* die Lipidakkumulation in Hepatozyten fördert (Hu et al., 2022; Chen et al., 2019). Diese Arbeit differenzierte die involvierten Lipidklassen weiter und analysierte deren geschlechtsspezifische Ausprägungen quantitativ.

Die umfassende makroskopische, histologische, molekulare und lipidomische Analyse zeigte, dass der stärkste Effekt des *Neat1*-Knockouts in der Modulation der Lipidzusammensetzung lag, insbesondere im Bereich der Triglyceride. Makroskopisch wie histologisch zeigte sich erwartungsgemäß eine ausgeprägte Steatose unter MCD-Diät, wobei insbesondere mediovesikuläre Veränderungen dominierten. Interessanterweise war die Verteilung der Steatose genotypabhängig. Während WT- und HET-Mäuse eine intermediäre Verteilung aufwiesen, war bei KO-Mäusen eine panazinare Verteilung präsent. Dies könnte auf eine lokale Regulation der Lipidaufnahme oder -verarbeitung hindeuten, möglicherweise infolge veränderter Genexpressionen von zonenspezifischen Faktoren in der Leber (Cunningham & Porat-Shliom, 2021). Trotz dieser unterschiedlichen Verteilungsmuster ließ sich kein signifikanter Unterschied im Gesamtscore des Steatosegrades zwischen den Genotypen feststellen, was für einen qualitativen, nicht jedoch quantitativen Einfluss von *Neat1* auf die Steatose sprechen könnte.

Bei den KO-Mäusen zeigten sich Tendenzen zur Reduktion von Ceramiden und freiem Cholesterin, zwei Lipidklassen, die mit lipotoxischer Zellschädigung, Insulinresistenz und inflammatorischen Prozessen assoziiert sind (Chavez & Summers, 2012; Amati, 2012). Der selektiv signifikante Effekt bei männlichen KO-Mäusen legt nahe, dass *Neat1* als pathophysiologischer Verstärker bei MASLD fungieren könnte, wobei sein Einfluss durch hormonelle oder epigenetische Kontexte moduliert wird. Möglicherweise modulieren geschlechtsspezifische Hormonachsen wie die Östrogen- oder Androgenrezeptor-Signalkaskaden die *Neat1*-abhängige Regulation des Lipidmetabolismus, wie bereits in anderen Geweben oder *in vitro* Modell gezeigt wurde (Chakravarty et al., 2014; Fu et al.,

2019). Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass die Prävalenz von MASLD in der erwachsenen Allgemeinbevölkerung bei Männern höher ist als bei Frauen (Lonardo et al., 2019).

Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Daten, dass *Neat1* einen Einfluss auf den Lipidmetabolismus in der Leber hat, wobei es zu geschlechtsabhängigen Effekten und selektiven Auswirkungen auf zentrale Lipidklassen und -spezies kommt. Diese Befunde ergänzen bisherige Arbeiten, die *Neat1* primär mit Lipogenese und Lipidakkumulation assoziierten und erweitern das Verständnis um lipidspezifische und bioinformatisch erfassbare Veränderungen. Unter Weiterentwicklung dieser Basis könnten in Zukunft möglicherweise gezielte therapeutische Ansätze auf eine veränderte *Neat1*-Aktivität abzielen, um Lipidfehlregulationen bei MASLD, insbesondere bei männlichen Patienten mit erhöhter TG-Last, zu korrigieren.

### 4.1.4 Inflammation

Entzündliche Prozesse stellen einen zentralen Treiber in der Pathogenese von MASLD und MASH dar (Mladenovic et al., 2024). Ein wesentliches Ergebnis dieser Arbeit war die Beobachtung, dass der *Neat1*-Knockout inflammatorische Prozesse in der Leber signifikant abschwächt. Die histopathologischen Untersuchungen zeigten eine deutliche Reduktion der lobulären Inflammation in KO-Mäusen, erkennbar an einer verminderten Anzahl entzündlicher Zellinfiltrate von Lymphozyten. Diese Befunde wurden durch die immunhistochemische F4/80-Färbungen gestützt, die ein erhöhtes Makrophagenaufkommen in den Lebern von MCD-gefütterten WT-Mäusen zeigten. Die histologischen Ergebnisse korrelierten mit der erhöhten *Emr1/F4/80*-Genexpression in den WT-MCD Mäusen, was die Aktivierung und Anreicherung von Makrophagen weiter bestätigte.

Obwohl die MCD-Diät keine ideale Methode zur Modellierung der Inflammationsentwicklung in MASH darstellt, zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass durch die MCD-Diät proinflammatorische Signalwege aktiviert wurden. In diesen spielt *Neat1* wahrscheinlich eine immunmodulatorische Rolle, insbesondere im Kontext der Immunzellaktivierung und -rekrutierung. Diese Annahme wird durch vorausgehende Studien gestützt. So zeigten beispielsweise Imamura et al. (2014), dass *Neat1* durch die Verlagerung des Paraspeckle-Proteins SFPQ, von der IL-8 Promotorregionen hin zu Paraspeckles, die Transkription proinflammatorischer Zytokine wie IL-8 verstärken kann (Imamura et al., 2014). Darüber hinaus wurde beschrieben, dass *Neat1* an der Aktivierung des NF $\kappa$ B-Signalwegs sowie an der Modulation der Zytokinexpression in verschiedenen Organen, einschließlich der Leber beteiligt sei (Pan et al., 2021; Xu et al., 2019).



Da die Expression von *Neat1* speziell unter entzündlichen Bedingungen zunimmt und Kupffer-Zellen ein integraler Bestandteil des angeborenen Immunsystems der Leber sind, sollte festgestellt werden, ob diese einen relevanten Einfluss auf die Expression von *Neat1* haben. Interessanterweise führte die gezielte Depletion von Kupffer-Zellen in MCD-gefütterten Mäusen nicht zu einer signifikanten Veränderung der *Neat1*-Expression, was darauf hindeutet, dass Kupffer-Zellen nicht die primäre Quelle der *Neat1*-Induktion in MASH sind. Vielmehr ist davon auszugehen, dass *Neat1* überwiegend in anderen Leberzelltypen, insbesondere Hepatozyten, exprimiert wird. Dennoch konnte kürzlich auch eine funktionelle Rolle von *Neat1* in Immunzellen von Azam et al. (2024) gezeigt werden, bei der ein *Neat1*-Knockout in Immunzellen mit einer Reduktion proinflammatorischer Zytokine wie Il-6, Cxcl1, Mip-2/Cxcl2 und Mcp1/Ccl2 einherging, welche Mediatoren bei der Rekrutierung von Neutrophilen und Lymphozyten sind. Interessanterweise verändern sich während der Entwicklung und Progression von MASH die hepatischen Makrophagen in der Zusammensetzung der Subpopulationen (Krenkel & Tacke, 2017). Aus Mausmodellen konnte bereits abgeleitet werden, dass die Zahl der Kupffer-Zellen abnimmt, wohingegen in großer Zahl Monozyten die Leber infiltrieren, die sich zu Makrophagen differenzieren (Baeck et al., 2012; Miura et al., 2012).

Im Vergleich zu Kupffer-Zellen exprimieren rekrutierte Makrophagen höhere Spiegel fibrogener Mediatoren. In verschiedenen experimentellen Fibrosemodellen führte dementsprechend die Hemmung der Monozyteninfiltration über genetische Deletion oder pharmakologische Inhibition Chemokin-vermittelter Signalwege zu einer verminderten Aktivierung hepatischer Sternzellen und einer reduzierten Leberfibrose (Krenkel & Tacke, 2017). Vor diesem Hintergrund erscheint *NEAT1* als therapeutisches Target besonders interessant, da das Ausschalten von *NEAT1* zu einer Reduktion der Makrophagenanzahl (F4/80-positiv) führt. Obwohl *NEAT1* nicht direkt die Zytokinspiegel beeinflusst und somit möglicherweise nicht primär die Monozytenrekrutierung hemmt, könnte die Reduktion der Makrophagenpopulation dennoch zur antifibrotischen Wirkung beitragen.

In dieser Arbeit konnte auf Expressionsebene des murinen Gesamtlebergewebes (alle Zelltypen) keine signifikante Abnahme von proinflammatorischen Zytokinen oder Chemokinen beobachtet werden. In den stärker betroffenen männlichen Mäusen gab es zwar den Trend der verringerten Expression, in den weiblichen Mäusen blieb die Expression der Zytokine jedoch unverändert, was den Effekt nivellierte. Basierend auf den Expressionsdaten war bei männlichen KO-Mäusen eine deutlichere Reduktion entzündlicher Veränderungen in der Leber zu erwarten, da sowohl proinflammatorische Zytokine als auch Makrophagenmarker stärker herunterreguliert waren. Dieser molekulare Befund zeigte sich tatsächlich in der histologischen Untersuchung, da die Zahl entzündlicher Infiltrate und F4/80 stärker reduziert war als in weiblichen Tieren. Auf Basis

dieser Daten lässt sich vermuten, dass *Neat1* durch die Modulation parakriner Signale aus Hepatozyten zur Rekrutierung und Aktivierung von Immunzellen, insbesondere Makrophagen und Lymphozyten, beiträgt.

#### 4.1.5 Fibrose

Ein zentraler prognostischer Faktor bei MASH ist die Entstehung und das Ausmaß der Leberfibrose, die in starkem Zusammenhang mit Morbidität und Mortalität der Patienten steht (Luthra & Sheth, 2025). Der Beginn der Fibrose markiert einen entscheidenden Wendepunkt in der Krankheitsprogression und kennzeichnet den Übergang von einer potenziell reversiblen Stoffwechselstörung zu einer schweren, irreversiblen Lebererkrankung.

Die Bedeutung von *Neat1* in der MASLD-assoziierten Fibrose wurde bereits in früheren Studien hervorgehoben. (Jin et al., 2019) und (Zhang et al., 2020) beschrieben eine erhöhte *Neat1*-Expression in verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Modellen, wobei eine pro-fibrotische Wirkung durch *Neat1* vermittelt wurde. Die Ergebnisse dieser Arbeit stehen mit der Literatur im Einklang. Sie zeigen, dass der Verlust von *Neat1* bei MCD-gefütterten Mäusen zu einer signifikanten Abschwächung der Leberfibrose führt. Die histologischen Analysen mittels Siriusrot- und Masson-Trichrom-Färbung belegen eine reduzierte Akkumulation von Kollagenfasern in den Lebern der *Neat1*-KO Mäuse, was zusätzlich durch die Hydroxyprolinmessung bestätigt wurde. Auf Transkriptebezug zeigten sich ergänzend verminderte Expressionslevel der Fibrosemarker *Col1a1* und *Col3a1* in KO-Mäusen. Diese Ergebnisse deuten auf die Relevanz von *Neat1* bei der Entstehung und Progression der Fibrose hin.

Ein bemerkenswerter Befund dieser Arbeit ist der geschlechtsspezifische Unterschied in der Fibroseausprägung. Männliche Mäuse entwickelten eine deutlich stärkere Fibrose als weibliche Tiere, unabhängig vom Genotyp. Dieses Ergebnis unterstützt frühere Arbeiten, die geschlechtsspezifische Unterschiede in der Progression von Lebererkrankungen beschrieben (Lonardo et al., 2019; Yang et al., 2014). Darunter eine Studie an 541 erwachsene Patienten mit MASH-Diagnose, in der sich herausstellte, dass Männer im Vergleich zu Frauen vor der Menopause ein höheres Risiko für eine schwerere Fibrose haben, während Frauen nach der Menopause eine ähnlich schwere Leberfibrose aufweisen wie Männer. Diese Ergebnisse lassen sich möglicherweise durch die schützende Wirkung von Östrogen gegen die Fibrogenese erklären (Yang et al., 2014). Die reduzierte Kollagenexpression in weiblichen KO-Mäusen, die trotz MCD-Diät keine Fibrose entwickelten, unterstreicht diese Hypothese.

#### 4.1.6 Signalweg *Neat1*- *Ezh2*- *Smad7*- *Ctgf*

Um den beobachteten phänotypischen Veränderungen auf molekularer Ebene nachzugehen, wurden potenziell involvierte Signalwege untersucht. Mit *Ctgf* und *Smad7* konnten zwei Proteine identifiziert werden, die dem TGF- $\beta$ -Signalweg zuzuordnen sind und sowohl im murinen als auch humanen *Neat1*-Knockout signifikant verändert waren. Die Expression von *Smad7* wird durch den Methylierungskomplex PRC2 reguliert, der die Histon-H3-Lysin-27-Trimethylierung (H3K27me3) im Bereich von Zielpromotoren, zum Beispiel von *Smad7*, vermittelt (Ge et al., 2022). *Neat1* kann die katalytische PRC2-Untereinheit *Ezh2* an der *Smad7*-Promotorregion stabilisieren (Ge et al., 2022). Die verminderte Promotoraktivität verringert die Expression von *Smad7*, wodurch dessen inhibierender Einfluss auf die TGF- $\beta$ -Signalübertragung entfällt. Daraus resultiert eine ungehemmte Aktivierung dieses Signalwegs, was wiederum die Expression des profibrotischen Fibrosemotulators *Ctgf* fördert. Dieser Zusammenhang wurde im hepatischen Kontext durch die Verabreichung eines EZH2-Inhibitors (EZH2i) an humane Hepatozyten funktionell bestätigt.

Parallel zu dieser Arbeit untersuchten zahlreiche Studien die Rolle von *Neat1* in der Leberfibrose unter Verwendung von CCl<sub>4</sub>-induzierten *in vivo* Modellen, die in erster Linie eine Fibrose widerspiegeln, die durch direkte hepatotoxische Schäden verursacht wird (Yu et al., 2017; Huang et al., 2021; Wang et al., 2021; Shu et al., 2022). Diese Arbeiten konzentrierten sich überwiegend auf *Neat1*-abhängige posttranskriptionelle Regulationsmechanismen über miRNA-Sponging (Jiang, 2023). Beispielsweise reguliert die *NEAT1*/miR-122/KLF6-Achse die Aktivität hepatischer Sternzellen und fördert die Produktion extrazelluläre Matrix (Yu et al., 2017). Huang et al. (2021) zeigten, dass eine *Neat1*-Ausschaltung die *Cytl3*-Expression über eine ceRNA-vermittelte Hemmung von miR-148a-3p und miR-22-3p verringert und so die Aktivierung hepatischer Sternzellen abschwächt. Auch die *Neat1*/miR-139-5p/ $\beta$ -catenin/SOX9/TGF- $\beta$ 1-Signalkaskade wurden als Mechanismus in der CCl<sub>4</sub>-induzierten Leberfibrose identifiziert (Wang et al., 2021).

Im Gegensatz dazu verlagerte diese Arbeit den Schwerpunkt auf epigenetische Mechanismen zur Transkriptionsregulation in Hepatozyten und beschreibt eine *Neat1*-abhängige Modulation des TGF- $\beta$ -Signalwegs über *Ezh2*-vermittelte Histonmodifikationen. Zudem wurde, im Vergleich zu den genannten Studien, ein vollständiger *Neat1*-Knockout in einem MCD-basierten MASH-Fibrose Modell verwendet und zusätzlich geschlechtsspezifische Unterschiede untersucht, anstatt ausschließlich männliche Versuchstiere zu verwenden. Dieser Ansatz bietet ergänzende Einblicke in die Art und Weise wie *Neat1* die Fibroseentwicklung beeinflussen kann.

Die Interaktion zwischen *Neat1* und Ezh2 wurde bereits in anderen Organen, Erkrankungen und Zielkontexten beschrieben. Beispielsweise zeigten Ge et al. (2022) den Regulationsmechanismus von *Neat1*/Ezh2/Smad7 in einem kardialen Fibrose-Modell (Ge et al., 2022). Auch in der Leber wurden *NEAT1* und EZH2, in einem Modell von akutem Leberversagen, im Zusammenhang mit der Regulation von *LATS2* (large tumor suppressor kinase 2) beschrieben (Wang et al., 2020). Hier führte die promotorassoziierte Hemmung von *LATS2* zur Inaktivierung von YAP1 und zur p73-vermittelten Apoptose. Allerdings beruhte diese Studie auf der fälschlich als Leberzellen identifizierten Zelllinie HL-7702 (LO2), die sich retrospektiv als HeLa-Derivat herausstellte (Shao & Chen, 2024).

Trotz der Unterschiede im Modell und dem mechanistischen Fokus stimmen die Ergebnisse dieser Arbeit mit bestehenden Forschungsergebnissen dahingehend überein, dass eine Reduktion von *Neat1* die Ablagerung von extrazellulärer Matrix verringert. Ein Effekt, der von anderen Autoren auf eine reduzierte Aktivierung hepatischer Sternzellen zurückgeführt wurde (Yu et al., 2017; Zhang et al., 2020). Die vorliegenden Daten erweitern dieses Verständnis jedoch dahingehend, dass *NEAT1* zusätzlich zur Aktivierung der Sternzellen, CTGF in den Hepatozyten induziert, was die Sternzellen wiederum auf parakrine Weise aktivieren kann und erweitert das Verständnis von *NEAT1*-induzierter Fibrogenese um eine interzelluläre, parakrine Komponente. Eine zeitgleich publizierte Studie von Shu et al. (2022) beschreibt exosomenvermittelte Effekte von *Neat1* über die miR-342/Sp1/TGF- $\beta$ 1/Smad-Signalkaskade und unterstützt die Hypothese der parakrinen Wirkung von *Neat1* auf die HSC-Aktivierung (Shu et al., 2022).

## 5. Schlussfolgerung und Fazit

Die vorliegende Arbeit liefert neue Erkenntnisse über die Rolle der langen nicht-codierenden RNA *NEAT1* in der Progression von MASLD, insbesondere im Hinblick auf die schwerere Verlaufsform MASH. In dem verwendeten Tiermodell konnten die pathophysiologischen Hauptmerkmale dieser Erkrankung Steatose, Inflammation und Fibrose nachweislich induziert und analysiert werden. Unter diesen Bedingungen zeigte sich, dass *Neat1* in der Leber überexprimiert wird. Ein gezielter Knockout von *Neat1* führte zu einer veränderten hepatischen Lipidzusammensetzung, was auf eine direkte Beteiligung dieser lncRNA an der Entwicklung der Steatose hindeutet. Die *Neat1*-Depletion bewirkte zudem eine signifikante Abschwächung der durch die Diät induzierten inflammatorischen Prozesse. Dies äußerte sich sowohl histologisch in einer verminderten Immunzellinfiltration als auch auf Transkriptebene. In Bezug auf die Fibroseentwicklung wurde beobachtet, dass *Neat1*-Knockout-Tiere eine erheblich geringere Ausprägung fibrotischer Veränderungen aufwiesen. Die histologischen Befunde zeigten eine reduzierte Akkumulation extrazellulärer Matrix, insbesondere von Kollagen. Gleichzeitig war zum einen das Niveau des inhibitorischen Smad7-Proteins in diesen Tieren erhöht und zum anderen das Niveau des profibrotischen Modulators Ctgf erniedrigt, was auf eine negative Regulation fibrogener Signalwege hinweist. Gesteuert wird dieser Signalweg wahrscheinlich durch die Sequestrierung von Ezh2 durch *Neat1*. Ezh2, ein epigenetischer Regulator, kann so in der Smad7-Promotorregion wirken und die Expression von Smad7 unterdrücken.

Insgesamt identifiziert diese Arbeit *NEAT1* als molekularen Regulator der Steatose-, Inflammations- und Fibroseprozesse bei MASH. Die durch die Untersuchung der *NEAT1*–EZH2–SMAD7–CTGF-Achse gewonnenen Erkenntnisse liefern ein vertieftes Verständnis der molekularen Mechanismen der Krankheitsprogression und weisen auf lncRNAs als mögliche diagnostische Marker und therapeutische Zielstrukturen hin. Besonders hervorzuheben ist auch der Befund signifikanter geschlechtsspezifischer Unterschiede im Krankheitsverlauf, was die Notwendigkeit unterstreicht, das biologische Geschlecht in künftigen Forschungsvorhaben und klinischen Leitlinien konsequent zu berücksichtigen. Diese Arbeit betont somit die funktionelle Relevanz von lncRNAs wie *NEAT1* in der Leberpathophysiologie und leistet einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung der molekularen Prozesse, die der Entstehung und Progression von MASLD und MASH zugrunde liegen.

## 6. Limitationen und Ausblick

### 6.1 Eingeschränktes MASLD-Modell

Die in dieser Studie verwendete MCD-Diät stellt kein ideales Modell zur Nachbildung der humanen MASLD dar, da sie wesentliche metabolische Komponenten wie Insulinresistenz und Adipositas nicht adäquat abbildet. Darüber hinaus wurde die MCD-Diät lediglich über einen Zeitraum von drei Wochen appliziert. Eine längere Fütterung wäre für das Fortschreiten der MASH-Progression wünschenswert gewesen, insbesondere im Hinblick auf den Aspekt, dass *NEAT1* mit apoptotischen Prozessen assoziiert ist, die möglicherweise erst bei längerer Krankheitsprogression sichtbar werden. Dies war jedoch aufgrund der Abbruchkriterien nicht realisierbar.

### 6.2 Mangel an translationalen Modellen

Die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen ist limitiert, da weder primäre humane Hepatozyten noch moderne Ex-vivo-Modelle (Velliou et al., 2024) zum Einsatz kamen. Weiterhin wären Versuche in einer humanen hepatischen Stellat-Zelllinie wie LX-2 förderlich, die herausgearbeiteten Hypothesen zu untermauern. Weiterhin sollten zukünftige Studien den Signalweg rund um *NEAT1* in humanrelevanten Systemen wie Leberorganoiden, PCLS (Precision-Cut Liver Slices) oder Liver-on-a-Chip-Modellen untersuchen, um eine höhere Relevanz für die klinische Forschung zu gewährleisten.

### 6.3 Signalweg Analyse

Die zugrunde liegenden Mechanismen, wie *NEAT1* zur beobachteten Pathophysiologie beiträgt, wurden bislang nur unzureichend beleuchtet. Weiterführende Untersuchungen zum Beispiel mittels RIP-Assays von EZH2 und Überexpressionsanalysen von *NEAT1* wären notwendig, um den zugrundeliegenden molekularen Mechanismus noch besser zu verstehen. Da *NEAT1* ein zentraler Bestandteil von Paraspeckles ist, sollten zukünftige Arbeiten verstärkt untersuchen, wie genau die Paraspeckle-Bildung in der Pathogenese von MASH involviert ist. Neue Technologien und Methoden, wie sie in Ingram et al. (2024) beschrieben sind, ermöglichen eine präzisere Analyse der molekularen Zusammensetzung und Dynamik von Paraspeckles.

### 6.4 Geschlechtsspezifische Unterschiede

Während bei männlichen Tieren signifikante Veränderungen nachweisbar waren, zeigten weibliche Tiere aufgrund hoher interindividueller Schwankungen oft keine signifikanten Ausprägungen. Ein möglicher Grund könnte in zyklusbedingten hormonellen Unterschieden liegen. Die Tiere wurden nicht hinsichtlich ihres Reproduktionszyklus synchronisiert, sodass

unterschiedliche Östrogenspiegel zu erhöhter Variabilität geführt haben könnten. Zukünftige Studien sollten eine hormonelle Charakterisierung der weiblichen Tiere einschließen, zum Beispiel durch Messung von Östrogen-, Progesteron- und anderen Steroidhormonspiegeln sowie qPCR-basierte Analysen hormonregulierter Gene. Ziel ist es, den Einfluss einzelner Hormone auf den Lipidmetabolismus und die Genexpression im Zusammenhang mit *NEAT1* zu untersuchen.

### **6.5 Therapeutisches Potential von lncRNAs**

Ein weiterführender Forschungsschwerpunkt könnte die Frage sein, ob *NEAT1* oder andere lncRNAs therapeutisch modulierbar sind. Es existieren erste Hinweise auf lncRNAs als mögliche therapeutische Targets in anderen Erkrankungen, deren Übertragbarkeit auf MASLD/MASH jedoch noch unklar ist (Arun et al., 2018; Nappi, 2024).

## 7. Literaturverzeichnis

- Adriaens, C., Standaert, L., Barra, J., Latil, M., Verfaillie, A., Kalev, P., Boeckx, B., Wijnhoven, P. W., Radaelli, E., Vermi, W., Leucci, E., Lapouge, G., Beck, B., van den Oord, J., Nakagawa, S., Hirose, T., Sablina, A. A., Lambrechts, D., Aerts, S.,...Marine, J. C. (2016). p53 induces formation of NEAT1 lncRNA-containing paraspeckles that modulate replication stress response and chemosensitivity. *Nat Med*, 22(8), 861-868. <https://doi.org/10.1038/nm.4135>
- Amati, F. (2012). Revisiting the diacylglycerol-induced insulin resistance hypothesis. *Obes Rev*, 13 Suppl 2, 40-50. <https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2012.01036.x>
- Anstee, Q. M., & Goldin, R. D. (2006). Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research. *Int J Exp Pathol*, 87(1), 1-16. <https://doi.org/10.1111/j.0959-9673.2006.00465.x>
- Arun, G., Diermeier, S. D., & Spector, D. L. (2018). Therapeutic Targeting of Long Non-Coding RNAs in Cancer. *Trends Mol Med*, 24(3), 257-277. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2018.01.001>
- Azam, S., Armijo, K. S., Weindel, C. G., Chapman, M. J., Devigne, A., Nakagawa, S., Hirose, T., Carpenter, S., Watson, R. O., & Patrick, K. L. (2024). The early macrophage response to pathogens requires dynamic regulation of the nuclear paraspeckle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 121(9), e2312587121. <https://doi.org/10.1073/pnas.2312587121>
- Baeck, C., Wehr, A., Karlmark, K. R., 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. *Gut*, 61(3), 416-426. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-300304>
- Bassett, A. R., Akhtar, A., Barlow, D. P., Bird, A. P., Brockdorff, N., Duboule, D., Ephrussi, A., Ferguson-Smith, A. C., Gingeras, T. R., Haerty, W., Higgs, D. R., Miska, E. A., & Ponting, C. P. (2014). Considerations when investigating lncRNA function in vivo. *Elife*, 3, e03058. <https://doi.org/10.7554/eLife.03058>
- Basta, M. D., Petruk, S., Mazo, A., & Walker, J. L. (2023). Fibrosis-the tale of H3K27 histone methyltransferases and demethylases. *Front Cell Dev Biol*, 11, 1193344. <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1193344>
- Baur, J. A., Pearson, K. J., Price, N. L., Jamieson, H. A., Lerin, C., Kalra, A., Prabhu, V. V., Allard, J. S., Lopez-Lluch, G., Lewis, K., Pistell, P. J., Poosala, S., Becker, K. G., Boss, O., Gwinn, D., Wang, M., Ramaswamy, S., Fishbein, K. W., Spencer, R. G.,...Sinclair, D. A. (2006). Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature*, 444(7117), 337-342. <https://doi.org/10.1038/nature05354>
- Bedossa, P., Poitou, C., Veyrie, N., Bouillot, J. L., Basdevant, A., Paradis, V., Tordjman, J., & Clement, K. (2012). Histopathological algorithm and scoring system for evaluation of liver lesions in morbidly obese patients. *Hepatology*, 56(5), 1751-1759. <https://doi.org/10.1002/hep.25889>
- Benedict, M., & Zhang, X. (2017). Non-alcoholic fatty liver disease: An expanded review. *World J Hepatol*, 9(16), 715-732. <https://doi.org/10.4254/wjh.v9.i16.715>
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*, 37(8), 911-917. <https://doi.org/10.1139/o59-099>
- Boettcher, M., & McManus, M. T. (2015). Choosing the Right Tool for the Job: RNAi, TALEN, or CRISPR. *Mol Cell*, 58(4), 575-585. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.04.028>
- Brown, J. A., Valenstein, M. L., Yario, T. A., Tycowski, K. T., & Steitz, J. A. (2012). Formation of triple-helical structures by the 3'-end sequences of MALAT1 and MENbeta noncoding RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(47), 19202-19207. <https://doi.org/10.1073/pnas.1217338109>
- Chai, Y., Liu, J., Zhang, Z., & Liu, L. (2016). HuR-regulated lncRNA NEAT1 stability in tumorigenesis and progression of ovarian cancer. *Cancer Medicine*, 5(7), 1588-1598. <https://doi.org/10.1002/cam4.710>



- Chakravarty, D., Sboner, A., Nair, S. S., Giannopoulou, E., Li, R., Hennig, S., Mosquera, J. M., Pauwels, J., Park, K., Kossai, M., MacDonald, T. Y., Fontugne, J., Erho, N., Vergara, I. A., Ghadessi, M., Davicioni, E., Jenkins, R. B., Palanisamy, N., Chen, Z.,...Rubin, M. A. (2014). The oestrogen receptor alpha-regulated lncRNA NEAT1 is a critical modulator of prostate cancer. *Nat Commun*, 5, 5383. <https://doi.org/10.1038/ncomms6383>
- Charni-Natan, M., & Goldstein, I. (2020). Protocol for Primary Mouse Hepatocyte Isolation. *STAR Protoc*, 1(2), 100086. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2020.100086>
- Chavez, J. A., & Summers, S. A. (2012). A ceramide-centric view of insulin resistance. *Cell Metab*, 15(5), 585-594. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.04.002>
- Chen, Q., Cai, J., Wang, Q., Wang, Y., Liu, M., Yang, J., Zhou, J., Kang, C., Li, M., & Jiang, C. (2018). Long Noncoding RNA NEAT1, Regulated by the EGFR Pathway, Contributes to Glioblastoma Progression Through the WNT/beta-Catenin Pathway by Scaffolding EZH2. *Clin Cancer Res*, 24(3), 684-695. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-0605>
- Chen, X., Tan, X. R., Li, S. J., & Zhang, X. X. (2019). LncRNA NEAT1 promotes hepatic lipid accumulation via regulating miR-146a-5p/ROCK1 in nonalcoholic fatty liver disease. *Life Sci*, 235, 116829. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116829>
- Clark, M. B., Johnston, R. L., Inostroza-Ponta, M., Fox, A. H., Fortini, E., Moscato, P., Dinger, M. E., & Mattick, J. S. (2012). Genome-wide analysis of long noncoding RNA stability. *Genome Res*, 22(5), 885-898. <https://doi.org/10.1101/gr.131037.111>
- Clemson, C. M., Hutchinson, J. N., Sara, S. A., Ensminger, A. W., Fox, A. H., Chess, A., & Lawrence, J. B. (2009). An architectural role for a nuclear noncoding RNA: NEAT1 RNA is essential for the structure of paraspeckles. *Mol Cell*, 33(6), 717-726. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.01.026>
- Cunningham, R. P., & Porat-Shliom, N. (2021). Liver Zonation - Revisiting Old Questions With New Technologies. *Front Physiol*, 12, 732929. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.732929>
- Daniels, V. W., Smans, K., Royaux, I., Chypre, M., Swinnen, J. V., & Zaidi, N. (2014). Cancer cells differentially activate and thrive on de novo lipid synthesis pathways in a low-lipid environment. *PLoS One*, 9(9), e106913. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106913>
- Dobosy, J. R., Fu, V. X., Desotelle, J. A., Srinivasan, R., Kenowski, M. L., Almassi, N., Weindruch, R., Svaren, J., & Jarrard, D. F. (2008). A methyl-deficient diet modifies histone methylation and alters Igf2 and H19 repression in the prostate. *Prostate*, 68(11), 1187-1195. <https://doi.org/10.1002/pros.20782>
- Dominguez-Coello, S., Carrillo-Fernandez, L., Gobierno-Hernandez, J., Mendez-Abad, M., Borges-Alamo, C., Garcia-Dopico, J. A., Aguirre-Jaime, A., & Leon, A. C. (2020). Decreased Consumption of Added Fructose Reduces Waist Circumference and Blood Glucose Concentration in Patients with Overweight and Obesity. The DISFRUTE Study: A Randomised Trial in Primary Care. *Nutrients*, 12(4). <https://doi.org/10.3390/nu12041149>
- Fang, L., Sun, J., Pan, Z., Song, Y., Zhong, L., Zhang, Y., Liu, Y., Zheng, X., & Huang, P. (2017). Long non-coding RNA NEAT1 promotes hepatocellular carcinoma cell proliferation through the regulation of miR-129-5p-VCP-IkappaB. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 313(2), G150-G156. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00426.2016>
- Fox, A. H., Lam, Y. W., Leung, A. K., Lyon, C. E., Andersen, J., Mann, M., & Lamond, A. I. (2002). Paraspeckles: a novel nuclear domain. *Curr Biol*, 12(1), 13-25. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(01\)00632-7](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(01)00632-7)
- Fox, A. H., & Lamond, A. I. (2010). Paraspeckles. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(7), a000687. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000687>
- Fox, A. H., Nakagawa, S., Hirose, T., & Bond, C. S. (2018). Paraspeckles: Where Long Noncoding RNA Meets Phase Separation. *Trends Biochem Sci*, 43(2), 124-135. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.12.001>
- Fu, X., Zhu, J., Zhang, L., & Shu, J. (2019). Long non-coding RNA NEAT1 promotes steatosis via enhancement of estrogen receptor alpha-mediated AQP7 expression in HepG2 cells. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 47(1), 1782-1787. <https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1604536>

- Gast, M., Nageswaran, V., Kuss, A. W., Tzvetkova, A., Wang, X., Mochmann, L. H., Rad, P. R., Weiss, S., Simm, S., Zeller, T., Voelzke, H., Hoffmann, W., Volker, U., Felix, S. B., Dorr, M., Beling, A., Skurk, C., Leistner, D. M., Rauch, B. H.,...Poller, W. (2022). tRNA-like Transcripts from the NEAT1-MALAT1 Genomic Region Critically Influence Human Innate Immunity and Macrophage Functions. *Cells*, 11(24). <https://doi.org/10.3390/cells11243970>
- Ge, Z., Yin, C., Li, Y., Tian, D., Xiang, Y., Li, Q., Tang, Y., & Zhang, Y. (2022). Long noncoding RNA NEAT1 promotes cardiac fibrosis in heart failure through increased recruitment of EZH2 to the Smad7 promoter region. *J Transl Med*, 20(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s12967-021-03211-8>
- Godoy, P., Hewitt, N. J., Albrecht, U., Andersen, M. E., Ansari, N., Bhattacharya, S., Bode, J. G., Bolleyn, J., Borner, C., Bottger, J., Braeuning, A., Budinsky, R. A., Burkhardt, B., Cameron, N. R., Camussi, G., Cho, C. S., Choi, Y. J., Craig Rowlands, J., Dahmen, U.,...Hengstler, J. G. (2013). Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME. *Arch Toxicol*, 87(8), 1315-1530. <https://doi.org/10.1007/s00204-013-1078-5>
- Grunhut, J., Wang, W., Aykut, B., Gakhal, I., Torres-Hernandez, A., & Miller, G. (2018). Macrophages in Nonalcoholic Steatohepatitis: Friend or Foe? *Eur Med J Hepatol*, 6(1), 100-109. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29930864>
- Guo, S., Chen, W., Luo, Y., Ren, F., Zhong, T., Rong, M., Dang, Y., Feng, Z., & Chen, G. (2015). Clinical implication of long non-coding RNA NEAT1 expression in hepatocellular carcinoma patients. *Int J Clin Exp Pathol*, 8(5), 5395-5402. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26191242>
- Guru, S. C., Agarwal, S. K., Manickam, P., Olufemi, S. E., Crabtree, J. S., Weisemann, J. M., Kester, M. B., Kim, Y. S., Wang, Y., Emmert-Buck, M. R., Liotta, L. A., Spiegel, A. M., Boguski, M. S., Roe, B. A., Collins, F. S., Marx, S. J., Burns, L., & Chandrasekharappa, S. C. (1997). A transcript map for the 2.8-Mb region containing the multiple endocrine neoplasia type 1 locus. *Genome Res*, 7(7), 725-735. <https://doi.org/10.1101/gr.7.7.725>
- Hirose, T., Virnicchi, G., Tanigawa, A., Naganuma, T., Li, R., Kimura, H., Yokoi, T., Nakagawa, S., Benard, M., Fox, A. H., & Pierron, G. (2014). NEAT1 long noncoding RNA regulates transcription via protein sequestration within subnuclear bodies. *Mol Biol Cell*, 25(1), 169-183. <https://doi.org/10.1091/mbc.E13-09-0558>
- Horing, M., Ejlsing, C. S., Hermansson, M., & Liebisch, G. (2019). Quantification of Cholesterol and Cholesteryl Ester by Direct Flow Injection High-Resolution Fourier Transform Mass Spectrometry Utilizing Species-Specific Response Factors. *Anal Chem*, 91(5), 3459-3466. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b05013>
- Horing, M., Ejlsing, C. S., Krautbauer, S., Ertl, V. M., Burkhardt, R., & Liebisch, G. (2021). Accurate quantification of lipid species affected by isobaric overlap in Fourier-transform mass spectrometry. *J Lipid Res*, 62, 100050. <https://doi.org/10.1016/j.jlr.2021.100050>
- Horing, M., Ekroos, K., Baker, P. R. S., Connell, L., Stadler, S. C., Burkhardt, R., & Liebisch, G. (2020). Correction of Isobaric Overlap Resulting from Sodiated Ions in Lipidomics. *Anal Chem*, 92(16), 10966-10970. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c02408>
- Houck, C. M., Rinehart, F. P., & Schmid, C. W. (1979). A ubiquitous family of repeated DNA sequences in the human genome. *J Mol Biol*, 132(3), 289-306. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(79\)90261-4](https://doi.org/10.1016/0022-2836(79)90261-4)
- Hu, M. J., Long, M., & Dai, R. J. (2022). Acetylation of H3K27 activated lncRNA NEAT1 and promoted hepatic lipid accumulation in non-alcoholic fatty liver disease via regulating miR-212-5p/GRIA3. *Mol Cell Biochem*, 477(1), 191-203. <https://doi.org/10.1007/s11010-021-04269-0>
- Huang, P. L. (2009). A comprehensive definition for metabolic syndrome. *Dis Model Mech*, 2(5-6), 231-237. <https://doi.org/10.1242/dmm.001180>
- Huang, W., Huang, F., Zhang, R., & Luo, H. (2021). LncRNA Neat1 expedites the progression of liver fibrosis in mice through targeting miR-148a-3p and miR-22-3p to upregulate Cyth3. *Cell Cycle*, 20(5-6), 490-507. <https://doi.org/10.1080/15384101.2021.1875665>

- Hutchinson, J. N., Ensminger, A. W., Clemson, C. M., Lynch, C. R., Lawrence, J. B., & Chess, A. (2007). A screen for nuclear transcripts identifies two linked noncoding RNAs associated with SC35 splicing domains. *BMC Genomics*, 8, 39. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-39>
- Imamura, K., Imamachi, N., Akizuki, G., Kumakura, M., Kawaguchi, A., Nagata, K., Kato, A., Kawaguchi, Y., Sato, H., Yoneda, M., Kai, C., Yada, T., Suzuki, Y., Yamada, T., Ozawa, T., Kaneki, K., Inoue, T., Kobayashi, M., Kodama, T.,...Akimitsu, N. (2014). Long noncoding RNA NEAT1-dependent SFPQ relocation from promoter region to paraspeckle mediates IL8 expression upon immune stimuli. *Mol Cell*, 53(3), 393-406. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.01.009>
- Ingram, H. B., & Fox, A. H. (2024). Unveiling the intricacies of paraspeckle formation and function. *Curr Opin Cell Biol*, 90, 102399. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2024.102399>
- Itagaki, H., Shimizu, K., Morikawa, S., Ogawa, K., & Ezaki, T. (2013). Morphological and functional characterization of non-alcoholic fatty liver disease induced by a methionine-choline-deficient diet in C57BL/6 mice. *Int J Clin Exp Pathol*, 6(12), 2683-2696. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24294355>
- Jensen, T., Abdelmalek, M. F., Sullivan, S., Nadeau, K. J., Green, M., Roncal, C., Nakagawa, T., Kuwabara, M., Sato, Y., Kang, D.-H., Tolan, D. R., Sanchez-Lozada, L. G., Rosen, H. R., Lanasa, M. A., Diehl, A. M., & Johnson, R. J. (2018). Fructose and sugar: A major mediator of non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology*, 68(5), 1063-1075. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.01.019>
- Jiang, L., Shao, C., Wu, Q. J., Chen, G., Zhou, J., Yang, B., Li, H., Gou, L. T., Zhang, Y., Wang, Y., Yeo, G. W., Zhou, Y., & Fu, X. D. (2017). NEAT1 scaffolds RNA-binding proteins and the Microprocessor to globally enhance pri-miRNA processing. *Nat Struct Mol Biol*, 24(10), 816-824. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3455>
- Jiang, X. (2023). The mechanisms and therapeutic potential of long noncoding RNA NEAT1 in fibrosis. *Clin Exp Med*, 23(7), 3339-3347. <https://doi.org/10.1007/s10238-023-01191-1>
- Jin, S. S., Lin, C. J., Lin, X. F., Zheng, J. Z., & Guan, H. Q. (2022). Silencing lncRNA NEAT1 reduces nonalcoholic fatty liver fat deposition by regulating the miR-139-5p/c-Jun/SREBP-1c pathway. *Ann Hepatol*, 27(2), 100584. <https://doi.org/10.1016/j.aohep.2021.100584>
- Jin, S. S., Lin, X. F., Zheng, J. Z., Wang, Q., & Guan, H. Q. (2019). lncRNA NEAT1 regulates fibrosis and inflammatory response induced by nonalcoholic fatty liver by regulating miR-506/GLI3. *Eur Cytokine Netw*, 30(3), 98-106. <https://doi.org/10.1684/ecn.2019.0432>
- Jonas, K., Calin, G. A., & Pichler, M. (2020). RNA-Binding Proteins as Important Regulators of Long Non-Coding RNAs in Cancer. *Int J Mol Sci*, 21(8). <https://doi.org/10.3390/ijms21082969>
- Kakino, S., Ohki, T., Nakayama, H., Yuan, X., Otabe, S., Hashinaga, T., Wada, N., Kurita, Y., Tanaka, K., Hara, K., Soejima, E., Tajiri, Y., & Yamada, K. (2018). Pivotal Role of TNF-alpha in the Development and Progression of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in a Murine Model. *Horm Metab Res*, 50(1), 80-87. <https://doi.org/10.1055/s-0043-118666>
- Kanuri, G., Spruss, A., Wagnerberger, S., Bischoff, S. C., & Bergheim, I. (2011). Role of tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) in the onset of fructose-induced nonalcoholic fatty liver disease in mice. *J Nutr Biochem*, 22(6), 527-534. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2010.04.007>
- Keam, S. J. (2024). Resmetirom: First Approval. *Drugs*, 84(6), 729-735. <https://doi.org/10.1007/s40265-024-02045-0>
- Kessler, S. M., Hosseini, K., Hussein, U. K., Kim, K. M., List, M., Schultheiss, C. S., Schulz, M. H., Laggai, S., Jang, K. Y., & Kiemer, A. K. (2019). Hepatocellular Carcinoma and Nuclear Paraspeckles: Induction in Chemoresistance and Prediction for Poor Survival. *Cell Physiol Biochem*, 52(4), 787-801. <https://doi.org/10.33594/0000000055>
- Kessler, S. M., Laggai, S., Barghash, A., Schultheiss, C. S., Lederer, E., Artl, M., Helms, V., Haybaeck, J., & Kiemer, A. K. (2015). IMP2/p62 induces genomic instability and an aggressive hepatocellular carcinoma phenotype. *Cell Death Dis*, 6(10), e1894. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.241>
- Kessler, S. M., Simon, Y., Gemperlein, K., Gianmoena, K., Cadenas, C., Zimmer, V., Pokorny, J., Barghash, A., Helms, V., van Rooijen, N., Bohle, R. M., Lammert, F., Hengstler, J. G., Mueller,

- R., Haybaeck, J., & Kiemer, A. K. (2014). Fatty acid elongation in non-alcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma. *Int J Mol Sci*, 15(4), 5762-5773. <https://doi.org/10.3390/ijms15045762>
- Kim, H. H., Kuwano, Y., Srikantan, S., Lee, E. K., Martindale, J. L., & Gorospe, M. (2009). HuR recruits let-7/RISC to repress c-Myc expression. *Genes Dev*, 23(15), 1743-1748. <https://doi.org/10.1101/gad.1812509>
- Kirsch, R., Clarkson, V., Shephard, E. G., Marais, D. A., Jaffer, M. A., Woodburne, V. E., Kirsch, R. E., & Hall Pde, L. (2003). Rodent nutritional model of non-alcoholic steatohepatitis: species, strain and sex difference studies. *J Gastroenterol Hepatol*, 18(11), 1272-1282. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1746.2003.03198.x>
- Kleiner, D. E., & Brunt, E. M. (2012). Nonalcoholic fatty liver disease: pathologic patterns and biopsy evaluation in clinical research. *Semin Liver Dis*, 32(1), 3-13. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1306421>
- Kohler, N., Horing, M., Czepukojc, B., Rose, T. D., Buechler, C., Krohler, T., Haybaeck, J., Liebisch, G., Pauling, J. K., Kessler, S. M., & Kiemer, A. K. (2022). Kupffer cells are protective in alcoholic steatosis. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 1868(6), 166398. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2022.166398>
- Koyama, S., Tsuchiya, H., Amisaki, M., Sakaguchi, H., Honjo, S., Fujiwara, Y., & Shiota, G. (2020). NEAT1 is Required for the Expression of the Liver Cancer Stem Cell Marker CD44. *Int J Mol Sci*, 21(6). <https://doi.org/10.3390/ijms21061927>
- Krenkel, O., & Tacke, F. (2017). Liver macrophages in tissue homeostasis and disease. *Nat Rev Immunol*, 17(5), 306-321. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.11>
- Lachiondo-Ortega, S., Delgado, T. C., Banos-Jaime, B., Velazquez-Cruz, A., Diaz-Moreno, I., & Martinez-Chantar, M. L. (2022). Hu Antigen R (HuR) Protein Structure, Function and Regulation in Hepatobiliary Tumors. *Cancers (Basel)*, 14(11). <https://doi.org/10.3390/cancers14112666>
- Le, K. A., Ith, M., Kreis, R., Faeh, D., Bortolotti, M., Tran, C., Boesch, C., & Tappy, L. (2009). Fructose overconsumption causes dyslipidemia and ectopic lipid deposition in healthy subjects with and without a family history of type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr*, 89(6), 1760-1765. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2008.27336>
- Le, M. H., Yeo, Y. H., Zou, B., Barnett, S., Henry, L., Cheung, R., & Nguyen, M. H. (2022). Forecasted 2040 global prevalence of nonalcoholic fatty liver disease using hierarchical bayesian approach. *Clin Mol Hepatol*, 28(4), 841-850. <https://doi.org/10.3350/cmh.2022.0239>
- Lekakis, V., & Papatheodoridis, G. V. (2024). Natural history of metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease. *Eur J Intern Med*, 122, 3-10. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2023.11.005>
- Leroux, A., Ferrere, G., Godie, V., Cailleux, F., Renoud, M. L., Gaudin, F., Naveau, S., Prevot, S., Makhzami, S., Perlemuter, G., & Cassard-Doulcier, A. M. (2012). Toxic lipids stored by Kupffer cells correlates with their pro-inflammatory phenotype at an early stage of steatohepatitis. *J Hepatol*, 57(1), 141-149. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.02.028>
- Li, C., Li, M., Sheng, W., Zhou, W., Zhang, Z., Ji, G., & Zhang, L. (2024). High dietary Fructose Drives Metabolic Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease via Activating ubiquitin-specific peptidase 2/11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 Pathway in Mice. *Int J Biol Sci*, 20(9), 3480-3496. <https://doi.org/10.7150/ijbs.97309>
- Li, X., Qian, X., Peng, L. X., Jiang, Y., Hawke, D. H., Zheng, Y., Xia, Y., Lee, J. H., Cote, G., Wang, H., Wang, L., Qian, C. N., & Lu, Z. (2016). A splicing switch from ketohexokinase-C to ketohexokinase-A drives hepatocellular carcinoma formation. *Nat Cell Biol*, 18(5), 561-571. <https://doi.org/10.1038/ncb3338>
- Liebisch, G., Binder, M., Schifferer, R., Langmann, T., Schulz, B., & Schmitz, G. (2006). High throughput quantification of cholesterol and cholesteryl ester by electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS). *Biochim Biophys Acta*, 1761(1), 121-128. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2005.12.007>

- Liebisch, G., Drobnik, W., Lieser, B., & Schmitz, G. (2002). High-throughput quantification of lysophosphatidylcholine by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Clin Chem*, 48(12), 2217-2224. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12446479>
- Liebisch, G., Fahy, E., Aoki, J., Dennis, E. A., Durand, T., Ejning, C. S., Fedorova, M., Feussner, I., Griffiths, W. J., Kofeler, H., Merrill, A. H., Jr., Murphy, R. C., O'Donnell, V. B., Oskolkova, O., Subramaniam, S., Wakelam, M. J. O., & Spener, F. (2020). Update on LIPID MAPS classification, nomenclature, and shorthand notation for MS-derived lipid structures. *J Lipid Res*, 61(12), 1539-1555. <https://doi.org/10.1194/jlr.S120001025>
- Liu, Z., Chang, Q., Yang, F., Liu, B., Yao, H. W., Bai, Z. G., Pu, C. S., Ma, X. M., Yang, Y., Wang, T. T., Guo, W., Zhou, X. N., & Zhang, Z. T. (2017). Long non-coding RNA NEAT1 overexpression is associated with unfavorable prognosis in patients with hepatocellular carcinoma after hepatectomy: A Chinese population-based study. *Eur J Surg Oncol*, 43(9), 1697-1703. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2017.06.013>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4), 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lonardo, A., Nascimbeni, F., Ballestri, S., Fairweather, D., Win, S., Than, T. A., Abdelmalek, M. F., & Suzuki, A. (2019). Sex Differences in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: State of the Art and Identification of Research Gaps. *Hepatology*, 70(4), 1457-1469. <https://doi.org/10.1002/hep.30626>
- Luthra, R., & Sheth, A. (2025). Understanding MASH: An Examination of Progression and Clinical Outcomes by Disease Severity in the TARGET-NASH Database. *Adv Ther*, 42(2), 1165-1195. <https://doi.org/10.1007/s12325-024-03085-4>
- Mao, Y. S., Sunwoo, H., Zhang, B., & Spector, D. L. (2011). Direct visualization of the co-transcriptional assembly of a nuclear body by noncoding RNAs. *Nat Cell Biol*, 13(1), 95-101. <https://doi.org/10.1038/ncb2140>
- Marchesini, G., Bugianesi, E., Forlani, G., Cerrelli, F., Lenzi, M., Manini, R., Natale, S., Vanni, E., Villanova, N., Melchionda, N., & Rizzetto, M. (2003). Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology*, 37(4), 917-923. <https://doi.org/10.1053/jhep.2003.50161>
- Mattick, J. S. (2023). A Kuhnian revolution in molecular biology: Most genes in complex organisms express regulatory RNAs. *BioEssays*, 45(9), e2300080. <https://doi.org/10.1002/bies.202300080>
- Mattick, J. S., Amaral, P. P., Carninci, P., Carpenter, S., Chang, H. Y., Chen, L. L., Chen, R., Dean, C., Dinger, M. E., Fitzgerald, K. A., Gingeras, T. R., Guttman, M., Hirose, T., Huarte, M., Johnson, R., Kanduri, C., Kapranov, P., Lawrence, J. B., Lee, J. T., ... Wu, M. (2023). Long non-coding RNAs: definitions, functions, challenges and recommendations. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 24(6), 430-447. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00566-8>
- Miura, K., Yang, L., van Rooijen, N., Ohnishi, H., & Seki, E. (2012). Hepatic recruitment of macrophages promotes nonalcoholic steatohepatitis through CCR2. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 302(11), G1310-1321. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00365.2011>
- Mladenec, K., Lenart, M., Marinovic, S., Polic, B., & Wensveen, F. M. (2024). The "Domino effect" in MASLD: The inflammatory cascade of steatohepatitis. *Eur J Immunol*, 54(4), e2149641. <https://doi.org/10.1002/eji.202149641>
- Mofrad, P., Contos, M. J., Haque, M., Sargeant, C., Fisher, R. A., Luketic, V. A., Sterling, R. K., Shiffman, M. L., Stravitz, R. T., & Sanyal, A. J. (2003). Clinical and histologic spectrum of nonalcoholic fatty liver disease associated with normal ALT values. *Hepatology*, 37(6), 1286-1292. <https://doi.org/10.1053/jhep.2003.50229>
- Mukherjee, N., Jacobs, N. C., Hafner, M., Kennington, E. A., Nusbaum, J. D., Tuschl, T., Blackshear, P. J., & Ohler, U. (2014). Global target mRNA specification and regulation by the RNA-binding protein ZFP36. *Genome Biol*, 15(1), R12. <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-1-r12>

- Naganuma, T., Nakagawa, S., Tanigawa, A., Sasaki, Y. F., Goshima, N., & Hirose, T. (2012). Alternative 3'-end processing of long noncoding RNA initiates construction of nuclear paraspeckles. *EMBO J*, 31(20), 4020-4034. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.251>
- Nakagawa, S., Naganuma, T., Shioi, G., & Hirose, T. (2011). Paraspeckles are subpopulation-specific nuclear bodies that are not essential in mice. *J Cell Biol*, 193(1), 31-39. <https://doi.org/10.1083/jcb.201011110>
- Nappi, F. (2024). Non-Coding RNA-Targeted Therapy: A State-of-the-Art Review. *Int J Mol Sci*, 25(7). <https://doi.org/10.3390/ijms25073630>
- Nikolaou, N., Green, C. J., Gunn, P. J., Hodson, L., & Tomlinson, J. W. (2016). Optimizing human hepatocyte models for metabolic phenotype and function: effects of treatment with dimethyl sulfoxide (DMSO). *Physiol Rep*, 4(21). <https://doi.org/10.14814/phy2.12944>
- Noh, J. H., Kim, K. M., Abdelmohsen, K., Yoon, J. H., Panda, A. C., Munk, R., Kim, J., Curtis, J., Moad, C. A., Wohler, C. M., Indig, F. E., de Paula, W., Dudekula, D. B., De, S., Piao, Y., Yang, X., Martindale, J. L., de Cabo, R., & Gorospe, M. (2016). HuR and GRSF1 modulate the nuclear export and mitochondrial localization of the lncRNA RMRP. *Genes Dev*, 30(10), 1224-1239. <https://doi.org/10.1101/gad.276022.115>
- Padberg, F., Hering, H., Luch, A., & Zellmer, S. (2020). Indirect co-cultivation of HepG2 with differentiated THP-1 cells induces AHR signalling and release of pro-inflammatory cytokines. *Toxicol In Vitro*, 68, 104957. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104957>
- Pan, S., Liu, R., Wu, X., Ma, K., Luo, W., Nie, K., Zhang, C., Meng, X., Tong, T., Chen, X., Wang, X., & Deng, M. (2021). LncRNA NEAT1 mediates intestinal inflammation by regulating TNFRSF1B. *Ann Transl Med*, 9(9), 773. <https://doi.org/10.21037/atm-21-34>
- Park, S. H., Helsley, R. N., Noetzli, L., Tu, H. C., Wallenius, K., O'Mahony, G., Boucher, J., Liu, J., & Softic, S. (2021). A luminescence-based protocol for assessing fructose metabolism via quantification of ketohexokinase enzymatic activity in mouse or human hepatocytes. *STAR Protoc*, 2(3), 100731. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2021.100731>
- Pereira da Silva, A. P., El-Bacha, T., Kyaw, N., dos Santos, R. S., da-Silva, W. S., Almeida, F. C., Da Poian, A. T., & Galina, A. (2009). Inhibition of energy-producing pathways of HepG2 cells by 3-bromopyruvate. *Biochem J*, 417(3), 717-726. <https://doi.org/10.1042/BJ20080805>
- Phoolchund, A. G. S., & Khakoo, S. I. (2024). MASLD and the Development of HCC: Pathogenesis and Therapeutic Challenges. *Cancers (Basel)*, 16(2). <https://doi.org/10.3390/cancers16020259>
- Piras, I. S., Gerhard, G. S., & DiStefano, J. K. (2020). Palmitate and Fructose Interact to Induce Human Hepatocytes to Produce Pro-Fibrotic Transcriptional Responses in Hepatic Stellate Cells Exposed to Conditioned Media. *Cell Physiol Biochem*, 54(5), 1068-1082. <https://doi.org/10.33594/000000288>
- Pisani, G., & Baron, B. (2019). Nuclear paraspeckles function in mediating gene regulatory and apoptotic pathways. *Noncoding RNA Res*, 4(4), 128-134. <https://doi.org/10.1016/j.ncrna.2019.11.002>
- Prasanth, K. V., Prasanth, S. G., Xuan, Z., Hearn, S., Freier, S. M., Bennett, C. F., Zhang, M. Q., & Spector, D. L. (2005). Regulating gene expression through RNA nuclear retention. *Cell*, 123(2), 249-263. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.033>
- Qin, X., Long, Y., Bai, X., Cao, L., Yan, H., Zhang, K., Wang, B., & Wu, X. (2023). The disordered C terminus of ALKBH5 promotes phase separation and paraspeckles assembly. *J Biol Chem*, 299(8), 105071. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.105071>
- Rinella, M. E., Elias, M. S., Smolak, R. R., Fu, T., Borensztajn, J., & Green, R. M. (2008). Mechanisms of hepatic steatosis in mice fed a lipogenic methionine choline-deficient diet. *Journal of Lipid Research*, 49(5), 1068-1076. <https://doi.org/10.1194/jlr.m800042-jlr200>
- Rinella, M. E., Lazarus, J. V., Ratziu, V., Francque, S. M., Sanyal, A. J., Kanwal, F., Romero, D., Abdelmalek, M. F., Anstee, Q. M., Arab, J. P., Arrese, M., Bataller, R., Beuers, U., Boursier, J., Bugianesi, E., Byrne, C. D., Narro, G. E. C., Chowdhury, A., Cortez-Pinto, H.,...group, N. N. c. (2024). A multisociety Delphi consensus statement on new fatty liver disease nomenclature. *Ann Hepatol*, 29(1), 101133. <https://doi.org/10.1016/j.aohep.2023.101133>

- Rizki, G., Arnaboldi, L., Gabrielli, B., Yan, J., Lee, G. S., Ng, R. K., Turner, S. M., Badger, T. M., Pitas, R. E., & Maher, J. J. (2006). Mice fed a lipogenic methionine-choline-deficient diet develop hypermetabolism coincident with hepatic suppression of SCD-1. *J Lipid Res*, 47(10), 2280-2290. <https://doi.org/10.1194/jlr.M600198-JLR200>
- Roeb, E., Canbay, A., Bantel, H., Bojunga, J., de Laffolie, J., Demir, M., Denzer, U. W., Geier, A., Hofmann, W. P., Hudert, C., Karlas, T., Krawczyk, M., Longerich, T., Luedde, T., Roden, M., Schattenberg, J., Sterneck, M., Tannapfel, A., Lorenz, P.,...Collaborators. (2022). Aktualisierte S2k-Leitlinie nicht-alkoholische Fettlebererkrankung der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS). *Z Gastroenterol*, 60(9), 1346-1421. <https://doi.org/10.1055/a-1880-2283> (Aktualisierte S2k-Leitlinie nicht-alkoholische Fettlebererkrankung der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) - April 2022 - AWMF-Registernummer: 021-025.)
- Rose, T. D., Bechtler, T., Ciora, O. A., Anh Lilian Le, K., Molnar, F., Kohler, N., Baumbach, J., Rottger, R., & Pauling, J. K. (2022). MosBi: Automated signature mining for molecular stratification and subtyping. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 119(16), e2118210119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2118210119>
- Rose, T. D., Kohler, N., Falk, L., Klischat, L., Lazareva, O. E., & Pauling, J. K. (2023). Lipid network and moiety analysis for revealing enzymatic dysregulation and mechanistic alterations from lipidomics data. *Brief Bioinform*, 24(1). <https://doi.org/10.1093/bib/bbac572>
- Ross, M. H., & Pawlina, W. (1979). *Histology: A Text and Atlas, with Correlated Cell and Molecular Biology, 6th Edition*. Lippincott. <https://books.google.de/books?id=P42YQgAACAAJ>
- Sasaki, Y. T., Ideue, T., Sano, M., Mituyama, T., & Hirose, T. (2009). MENepsilon/beta noncoding RNAs are essential for structural integrity of nuclear paraspeckles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(8), 2525-2530. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807899106>
- Schultheiss, C. S., Laggai, S., Czepukojc, B., Hussein, U. K., List, M., Barghash, A., Tierling, S., Hosseini, K., Golob-Schwarzl, N., Pokorny, J., Hachenthal, N., Schulz, M., Helms, V., Walter, J., Zimmer, V., Lammert, F., Bohle, R. M., Dandolo, L., Haybaeck, J.,...Kessler, S. M. (2017). The long non-coding RNA H19 suppresses carcinogenesis and chemoresistance in hepatocellular carcinoma. *Cell Stress*, 1(1), 37-54. <https://doi.org/10.15698/cst2017.10.105>
- Seglen, P. O. (1976). Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol*, 13, 29-83. [https://doi.org/10.1016/s0091-679x\(08\)61797-5](https://doi.org/10.1016/s0091-679x(08)61797-5)
- Shao, T., & Chen, Y. L. (2024). Stop using the misidentified cell line LO2 as a human hepatocyte. *J Hepatol*, 80(5), e200-e201. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2023.10.036>
- Shu, B., Zhang, R. Z., Zhou, Y. X., He, C., & Yang, X. (2022). METTL3-mediated macrophage exosomal NEAT1 contributes to hepatic fibrosis progression through Sp1/TGF-beta1/Smad signaling pathway. *Cell Death Discov*, 8(1), 266. <https://doi.org/10.1038/s41420-022-01036-y>
- Simon, Y., Kessler, S. M., Gemperlein, K., Bohle, R. M., Muller, R., Haybaeck, J., & Kiemer, A. K. (2014). Elevated free cholesterol in a p62 overexpression model of non-alcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol*, 20(47), 17839-17850. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i47.17839>
- Souquere, S., Beauclair, G., Harper, F., Fox, A., & Pierron, G. (2010). Highly ordered spatial organization of the structural long noncoding NEAT1 RNAs within paraspeckle nuclear bodies. *Mol Biol Cell*, 21(22), 4020-4027. <https://doi.org/10.1091/mbc.E10-08-0690>
- Sun, Y., Song, Y., Liu, C., & Geng, J. (2019). LncRNA NEAT1-MicroRNA-140 axis exacerbates nonalcoholic fatty liver through interrupting AMPK/SREBP-1 signaling. *Biochem Biophys Res Commun*, 516(2), 584-590. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.06.104>
- Sunwoo, H., Dinger, M. E., Wilusz, J. E., Amaral, P. P., Mattick, J. S., & Spector, D. L. (2009). MEN epsilon/beta nuclear-retained non-coding RNAs are up-regulated upon muscle differentiation and are essential components of paraspeckles. *Genome Res*, 19(3), 347-359. <https://doi.org/10.1101/gr.087775.108>
- Suppli, M. P., Rigbolt, K. T. G., Veidal, S. S., Heeboll, S., Eriksen, P. L., Demant, M., Bagger, J. I., Nielsen, J. C., Oro, D., Thrane, S. W., Lund, A., Strandberg, C., Konig, M. J., Vilsboll, T., Vrang,

- N., Thomsen, K. L., Gronbaek, H., Jelsing, J., Hansen, H. H., & Knop, F. K. (2019). Hepatic transcriptome signatures in patients with varying degrees of nonalcoholic fatty liver disease compared with healthy normal-weight individuals. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 316(4), G462-G472. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00358.2018>
- Tam, F. I., Gerl, M. J., Klose, C., Surma, M. A., King, J. A., Seidel, M., Weidner, K., Roessner, V., Simons, K., & Ehrlich, S. (2021). Adverse Effects of Refeeding on the Plasma Lipidome in Young Individuals With Anorexia Nervosa? *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 60(12), 1479-1490. <https://doi.org/10.1016/j.jaac.2021.02.014>
- Teng, M. L., Ng, C. H., Huang, D. Q., Chan, K. E., Tan, D. J., Lim, W. H., Yang, J. D., Tan, E., & Muthiah, M. D. (2023). Global incidence and prevalence of nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Mol Hepatol*, 29(Suppl), S32-S42. <https://doi.org/10.3350/cmh.2022.0365>
- Ter Horst, K. W., & Serlie, M. J. (2017). Fructose Consumption, Lipogenesis, and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Nutrients*, 9(9). <https://doi.org/10.3390/nu9090981>
- Teufel, A., Itzel, T., Erhart, W., Brosch, M., Wang, X. Y., Kim, Y. O., von Schonfels, W., Herrmann, A., Bruckner, S., Stickel, F., Dufour, J. F., Chavakis, T., Hellerbrand, C., Spang, R., Maass, T., Becker, T., Schreiber, S., Schafmayer, C., Schuppan, D., & Hampe, J. (2016). Comparison of Gene Expression Patterns Between Mouse Models of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Liver Tissues From Patients. *Gastroenterology*, 151(3), 513-525 e510. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.05.051>
- Vacca, M., Kamzolas, I., Harder, L. M., Oakley, F., Trautwein, C., Hatting, M., Ross, T., Bernardo, B., Oldenburger, A., Hjuler, S. T., Ksiazek, I., Linden, D., Schuppan, D., Rodriguez-Cuenca, S., Tonini, M. M., Castaneda, T. R., Kannt, A., Rodrigues, C. M. P., Cockell, S.,...Vidal-Puig, A. (2024). An unbiased ranking of murine dietary models based on their proximity to human metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD). *Nat Metab*, 6(6), 1178-1196. <https://doi.org/10.1038/s42255-024-01043-6>
- van der Heijden, R. A., Sheedfar, F., Morrison, M. C., Hommelberg, P. P., Kor, D., Kloosterhuis, N. J., Gruben, N., Youssef, S. A., de Bruin, A., Hofker, M. H., Kleemann, R., Koonen, D. P., & Heeringa, P. (2015). High-fat diet induced obesity primes inflammation in adipose tissue prior to liver in C57BL/6j mice. *Aging (Albany NY)*, 7(4), 256-268. <https://doi.org/10.18632/aging.100738>
- Vance, J. E., & Vance, D. E. (1985). The role of phosphatidylcholine biosynthesis in the secretion of lipoproteins from hepatocytes. *Can J Biochem Cell Biol*, 63(8), 870-881. <https://doi.org/10.1139/o85-108>
- Velliou, R. I., Giannousi, E., Ralliou, C., Kassi, E., & Chatzigeorgiou, A. (2024). Ex Vivo Tools and Models in MASLD Research. *Cells*, 13(22). <https://doi.org/10.3390/cells13221827>
- Walter, N. G. (2024). Are non-protein coding RNAs junk or treasure?: An attempt to explain and reconcile opposing viewpoints of whether the human genome is mostly transcribed into non-functional or functional RNAs. *BioEssays*, 46(4), e2300201. <https://doi.org/10.1002/bies.202300201>
- Wang, K. C., & Chang, H. Y. (2011). Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. *Mol Cell*, 43(6), 904-914. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.08.018>
- Wang, Q., Liu, L., Zhang, S., Ming, Y., Liu, S., Cheng, K., & Zhao, Y. (2020). Long noncoding RNA NEAT1 suppresses hepatocyte proliferation in fulminant hepatic failure through increased recruitment of EZH2 to the LATS2 promoter region and promotion of H3K27me3 methylation. *Exp Mol Med*, 52(3), 461-472. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0387-z>
- Wang, Q., Wei, S., Li, L., Bu, Q., Zhou, H., Su, W., Liu, Z., Wang, M., & Lu, L. (2021). miR-139-5p sponged by LncRNA NEAT1 regulates liver fibrosis via targeting beta-catenin/SOX9/TGF-beta1 pathway. *Cell Death Discov*, 7(1), 243. <https://doi.org/10.1038/s41420-021-00632-8>
- Wang, X. (2018). Down-regulation of lncRNA-NEAT1 alleviated the non-alcoholic fatty liver disease via mTOR/S6K1 signaling pathway. *J Cell Biochem*, 119(2), 1567-1574. <https://doi.org/10.1002/jcb.26317>



- Weltman, M. D., Farrell, G. C., & Liddle, C. (1996). Increased hepatocyte CYP2E1 expression in a rat nutritional model of hepatic steatosis with inflammation. *Gastroenterology*, 111(6), 1645-1653. [https://doi.org/10.1016/s0016-5085\(96\)70028-8](https://doi.org/10.1016/s0016-5085(96)70028-8)
- Wilusz, J. E., Sunwoo, H., & Spector, D. L. (2009). Long noncoding RNAs: functional surprises from the RNA world. *Genes Dev*, 23(13), 1494-1504. <https://doi.org/10.1101/gad.1800909>
- Xu, Y., Cao, Z., Ding, Y., Li, Z., Xiang, X., Lai, R., Sheng, Z., Liu, Y., Cai, W., Hu, R., Wang, H., & Xie, Q. (2019). Long Non-coding RNA NEAT1 Alleviates Acute-on-Chronic Liver Failure Through Blocking TRAF6 Mediated Inflammatory Response. *Front Physiol*, 10, 1503. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01503>
- Yagi, T., Tokunaga, T., Furuta, Y., Nada, S., Yoshida, M., Tsukada, T., Saga, Y., Takeda, N., Ikawa, Y., & Aizawa, S. (1993). A novel ES cell line, TT2, with high germline-differentiating potency. *Anal Biochem*, 214(1), 70-76. <https://doi.org/10.1006/abio.1993.1458>
- Yamazaki, T., Souquere, S., Chujo, T., Kobelke, S., Chong, Y. S., Fox, A. H., Bond, C. S., Nakagawa, S., Pierron, G., & Hirose, T. (2018). Functional Domains of NEAT1 Architectural lncRNA Induce Paraspeckle Assembly through Phase Separation. *Mol Cell*, 70(6), 1038-1053 e1037. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.05.019>
- Yamazaki, T., Yamamoto, T., Yoshino, H., Souquere, S., Nakagawa, S., Pierron, G., & Hirose, T. (2021). Paraspeckles are constructed as block copolymer micelles. *EMBO J*, 40(12), e107270. <https://doi.org/10.15252/emboj.2020107270>
- Yang, J. D., Abdelmalek, M. F., Pang, H., Guy, C. D., Smith, A. D., Diehl, A. M., & Suzuki, A. (2014). Gender and menopause impact severity of fibrosis among patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, 59(4), 1406-1414. <https://doi.org/10.1002/hep.26761>
- Yao, Z. M., & Vance, D. E. (1988). The active synthesis of phosphatidylcholine is required for very low density lipoprotein secretion from rat hepatocytes. *J Biol Chem*, 263(6), 2998-3004. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3343237>
- Younossi, Z. M., Kalligeros, M., & Henry, L. (2024). Epidemiology of Metabolic Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease. *Clin Mol Hepatol*. <https://doi.org/10.3350/cmh.2024.0431>
- Younossi, Z. M., Stepanova, M., Al Shabeeb, R., Eberly, K. E., Shah, D., Nguyen, V., Ong, J., Henry, L., & Alqahtani, S. A. (2024). The changing epidemiology of adult liver transplantation in the United States in 2013-2022: The dominance of metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease and alcohol-associated liver disease. *Hepatol Commun*, 8(1). <https://doi.org/10.1097/HC9.0000000000000352>
- Yu, F., Jiang, Z., Chen, B., Dong, P., & Zheng, J. (2017). NEAT1 accelerates the progression of liver fibrosis via regulation of microRNA-122 and Kruppel-like factor 6. *J Mol Med (Berl)*, 95(11), 1191-1202. <https://doi.org/10.1007/s00109-017-1586-5>
- Zhang, Z., & Carmichael, G. G. (2001). The fate of dsRNA in the nucleus: a p54(nrb)-containing complex mediates the nuclear retention of promiscuously A-to-I edited RNAs. *Cell*, 106(4), 465-475. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00466-4](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00466-4)
- Zhang, Z., Wen, H., Peng, B., Weng, J., & Zeng, F. (2020). Downregulated microRNA-129-5p by Long Non-coding RNA NEAT1 Upregulates PEG3 Expression to Aggravate Non-alcoholic Steatohepatitis. *Front Genet*, 11, 563265. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.563265>
- Zhou, W., & Qiu, K. (2022). The correlation between lncRNA NEAT1 and serum hepcidin in the peripheral blood of non-alcoholic fatty liver disease patients. *Am J Transl Res*, 14(4), 2593-2599. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35559416>

## 8. Anhang

### I. Inhaltsverzeichnis

<b>8.1 Methoden</b> .....	<b>141</b>
<b>8.2 Humane in vitro MASLD Modelle</b> .....	<b>149</b>
<b>8.3 Murine in vitro Modelle</b> .....	<b>155</b>
<b>8.4 NEAT1 in MASH (MCD-Diät)</b> .....	<b>157</b>
<b>8.5 Untersuchung der Regulation von NEAT1 durch RNA-bindende Proteine (RBP)</b> .....	<b>184</b>
8.5.1 Einleitung.....	184
8.5.2 RNA-Immunpräzipitationen von HuR/ELAVL1 und TTP/ZFP36 .....	185
8.5.3 Knockdown- und Überexpressionsexperimente .....	187
8.5.4 RNA-Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (RNA-FISH) .....	190
8.5.5 Diskussion.....	198

### II. Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung A 1: BLASTN homologe Arme des Targeting-Vektors</b> .....	<b>142</b>
<b>Abbildung A 2: Auswertung der Genotypisierung</b> .....	<b>143</b>
<b>Abbildung A 3: Plasmidkarte von psgNEAT1a</b> .....	<b>144</b>
<b>Abbildung A 4: Plasmidkarte des pTarget-hNEAT1</b> .....	<b>145</b>
<b>Abbildung A 5: Plasmidkarte von pZeoSV2</b> .....	<b>146</b>
<b>Abbildung A 6: <i>In vitro</i> MASLD Modell TNF-<math>\alpha</math> und Co-Kultur</b> .....	<b>149</b>
<b>Abbildung A 7: Fruktose-Behandlung von HepG2-Zellen</b> .....	<b>150</b>
<b>Abbildung A 8: NEAT1-Expression in DMSO-behandelten HepG2-Zellen</b> .....	<b>151</b>
<b>Abbildung A 9: Lipidom der DMSO-behandelten HepG2-Zellen</b> .....	<b>152</b>
<b>Abbildung A 10: LINEX<sup>2</sup> Netzwerk Lipidom DMSO</b> .....	<b>153</b>
<b>Abbildung A 11: TG-Analyse des Lipidom der DMSO-behandelten HepG2-Zellen</b> .....	<b>154</b>
<b>Abbildung A 12: Primäre murine Hepatozyten (PMH)</b> .....	<b>155</b>
<b>Abbildung A 13: Behandlung primärer muriner Hepatozyten</b> .....	<b>156</b>
<b>Abbildung A 14: Geschlechtergetrennte Analyse der <i>Neat1</i>-Expression</b> .....	<b>157</b>
<b>Abbildung A 15: Geschlechtergetrennte Analyse der Serumparameter</b> .....	<b>159</b>
<b>Abbildung A 16: Teil 1- Vergleich relevanter Gene zwischen Maus und Mensch in MASLD und MASH</b> .....	<b>160</b>
<b>Abbildung A 17: Teil 2- Vergleich relevanter Gene zwischen Maus und Mensch in MASLD und MASH</b> .....	<b>161</b>

Abbildung A 18: Histologische Analyse der Steatose .....	162
Abbildung A 19: Schematische Darstellung der Lipidkategorien (Tam et al., 2021).....	163
Abbildung A 20: UMAP-Berechnung der MoSbi-Analyse MoSbi Diät 1 .....	165
Abbildung A 21: MoSbi Netzwerk Diät 1 .....	168
Abbildung A 22: MoSbi Netzwerk Diät 2 .....	169
Abbildung A 23: MoSbi Netzwerk Diät 3 .....	170
Abbildung A 24: MoSbi Netzwerk Genotyp 1 .....	171
Abbildung A 25: MoSbi Netzwerk Genotyp 2 .....	172
Abbildung A 26: MoSbi Netzwerk Genotyp 3 .....	173
Abbildung A 27: Lipidspezies Analyse des Lipidoms .....	174
Abbildung A 28: Expressionsanalyse lipogener Gene auf Basis der RNA-Seq .....	175
Abbildung A 29: Expressionsanalyse inflammatorisch relevanter Gene .....	179
Abbildung A 30: GSEA Reactome.....	180
Abbildung A 31: Western Blot Smad7 .....	182
Abbildung A 32: Western Blot Gapdh .....	183
Abbildung A 33: HuR/ELAVL1- oder TTP-RIP in HepG2- oder Huh7-Zellen .....	186
Abbildung A 34: Expressionsanalysen nach Knockdown oder Überexpression von HuR/ELAVL1 und TTP .....	189
Abbildung A 35: Co-Lokalisation in HepG2 von SFPQ und <i>NEAT1</i> .....	191
Abbildung A 36: Co-Lokalisation HuR/ELAVL1 und <i>NEAT1</i> .....	192
Abbildung A 37: Co-Lokalisation in HepG2 von PSPC1 und <i>NEAT1</i> .....	193
Abbildung A 38: <i>NEAT1</i> -Signale in HepG2-Zellen mit Gapmer- <i>NEAT1</i> -Knockdown .....	194
Abbildung A 40: HuR/ELAVL1 und lncRNAs (Jonas et al., 2020) .....	195
Abbildung A 41: <i>NEAT1</i> -Signale in siRNA-HuR und HuR-OE behandelten HepG2-Zellen...	196
Abbildung A 42: Quantitative Analyse der <i>NEAT1</i> -Signale in HuR-Knockdown- oder HuR- überexprimierenden HepG2-Zellen.....	197

### III. Tabellenverzeichnis

Tabelle A 1: Inhaltsstoffe des Futters oder der Diät .....	141
Tabelle A 2: Aufschlüsselung des Targeting-Vektors der <i>Neat1</i> -KO Mäuse .....	142
Tabelle A 3: Übersicht Restriktionsenzym-Verdau .....	144
Tabelle A 4: Übersicht zu den Abkürzungen und Methoden des Lipidoms.....	147
Tabelle A 5: GSEA-Parameter und Einstellungen .....	148
Tabelle A 6: Prozentualer Anteil der Lipidklassen am Gesamtlipidom (aller Genotypen) ...	164
Tabelle A 7: MoSbi (Diät) Fraktionswerte .....	166
Tabelle A 8: MoSbi (Genotyp) Fraktionswerte.....	167
Tabelle A 9: Enzyme des Lipidstoffwechsels .....	176
Tabelle A 10: GSEA Reactom Ergebnisse (Top 10).....	181

## 8.1 Methoden

Tabelle A 1: Inhaltsstoffe des Futters oder der Diät

Umgesetzte Energie			
Inhaltsstoff	NF	MCS	MCD
Fett	11%	21%	22%
Protein	24%	15%	14%
Kohlenhydrate	65%	64%	64%

Rohnährstoffe			
Inhaltsstoff	NF	MCS	MCD
Rohasche	5,9%	3,3%	3,3%
Rohfaser	6,1%	3%	3%
Rohfett	4,1%	10%	10%
Rohprotein	19,2%	15,4%	15%
Sickstofffreie Extraktstoffe	66,3%	66,8%	67,3%

Fettsäuren	NF	MCS/MCD
C16:0	0,14%	1,09%
C17:0	-	0,01%
C18:0	0,5%	0,19%
C20:0	1,31%	0,03%
C16:1	-	0,01%
C18:1	0,26%	2,58%
C18:2	0,61%	5,53%
C18:3	0,08%	0,09%
C20:1	1,65%	-

**Tabelle A 2: Aufschlüsselung des Targeting-Vektors der *Neat1*-KO Mäuse**

Abkürzung	Name	Funktion
DT-A	Diphtheria Toxin A	Negativer Selektionsmarker
pA	Polyadenylierungssignal	Terminiert Transkription
LacZ	LacZ = Lactose-Operon; β-Galactosidase-Gen	Reporter-Gen
NeO	Neomycin-Resistenzgen	Positiver Selektionsmarker: Resistenz gegen das Antibiotikum G418.
HA	Homologe Arme	Flankieren das Target-Gen

### Methode

BLASTn → Datenbank: RefSeq Genome Database (refseq\_genomes)

→ Organismus: Mus musculus (taxid: 10090)

### Eingegebene Sequenz

- Linker Arm: TGTGGGTCTGTACCACTTGAGTTTCTAGTG (KO Vektor LA)
- Rechter Arm: CCATGGTGCAGTGCATCTAGGCCTAACTAT (KO Vektor RA)

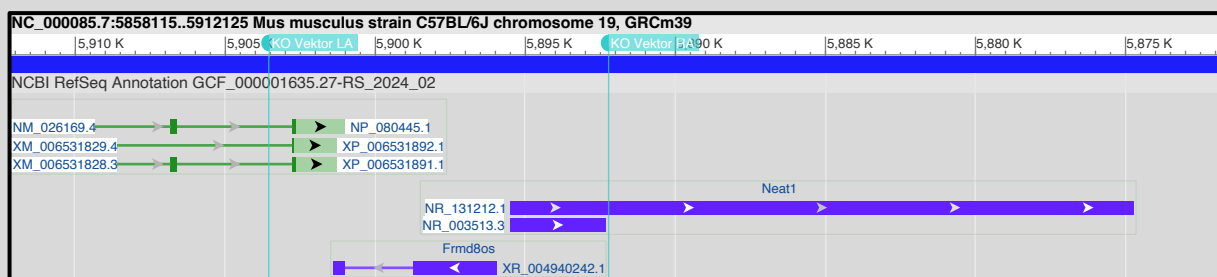
### Ergebnis

- Linker Arm= Dieser Arm liegt vor dem TTS des *Neat1*-Locus und stellt die Anlagerung im 5'-Bereich sicher

Mus musculus strain C57BL/6J chromosome 19, GRCm39; NCBI Reference Sequence:  
>NC\_000085.7: **5903470-5903520**

- Rechter Arm= Dieser Arm liegt nach dem lacZ/pA-Insertionspunkt, stromabwärts vom TSS, innerhalb des *Neat1*-Locus und stellt die Anlagerung im 3'-Bereich sicher.

Mus musculus strain C57BL/6J chromosome 19, GRCm39; NCBI Reference Sequence:  
NC\_000085.7: **5892238-5892288**



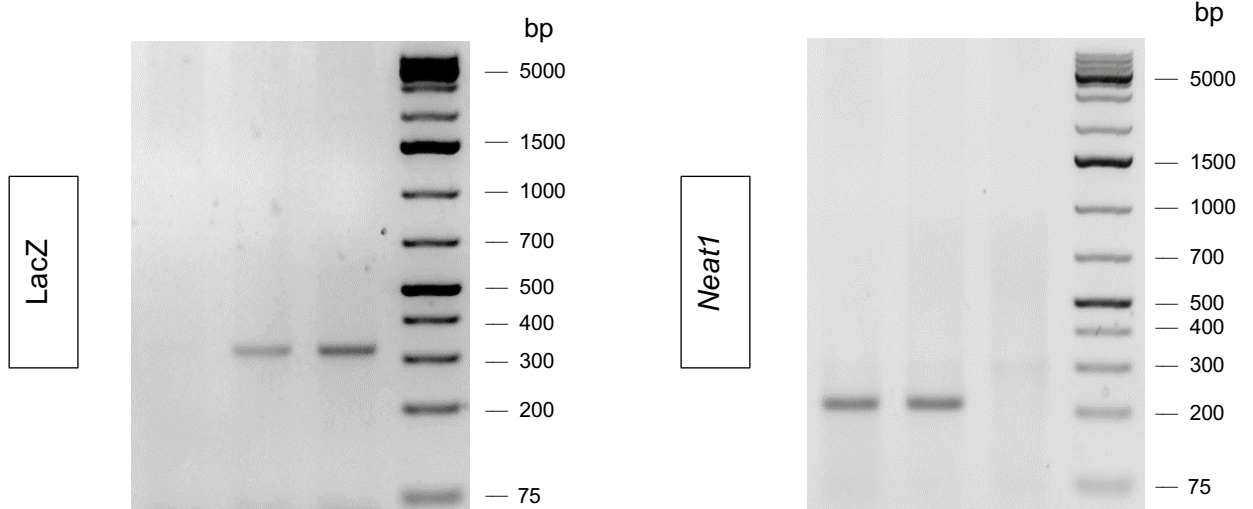
**Abbildung A 1: BLASTN homologe Arme des Targeting-Vektors**

Die homologen Arme des Targeting-Vektors dargestellt als türkise Linie innerhalb des Chromosoms 19. In violett sind die Gesamtlängen von *Neat1\_v1* und *Neat1\_v2* zu sehen.

## Anhang

Position	1	2	3	4
Probe	1010	1011	1012	M

Position	1	2	3	4
Probe	1010	1011	1012	M



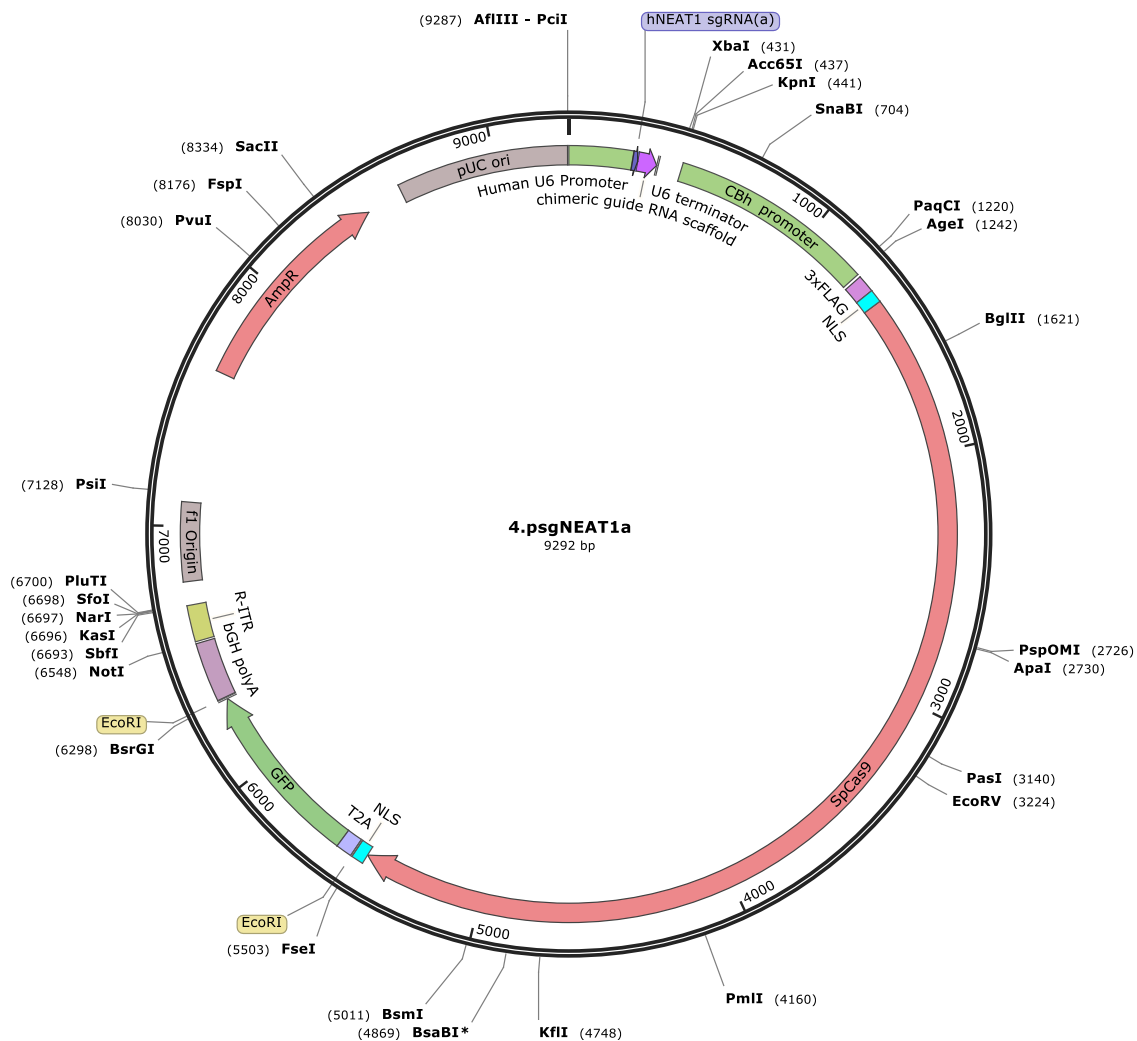
Auswertung der Genotypisierungs-PCR				
Position	Probe (ID)	LacZ (315 bp)	Neat1 (210 bp)	Genotyp
1	1010	-	+	Wildtyp
2	1011	+	+	<i>Neat1</i> <sup>+/-</sup>
3	1012	+	-	<i>Neat1</i> <sup>-/-</sup>

### Abbildung A 2: Auswertung der Genotypisierung

(Links) Agarosegel der LacZ-PCR (Rechts) Agarosegel der *Neat1*-PCR. Zusammenfassung und Auswertung der Gele mit Rückschluss auf den resultierenden Genotyp.

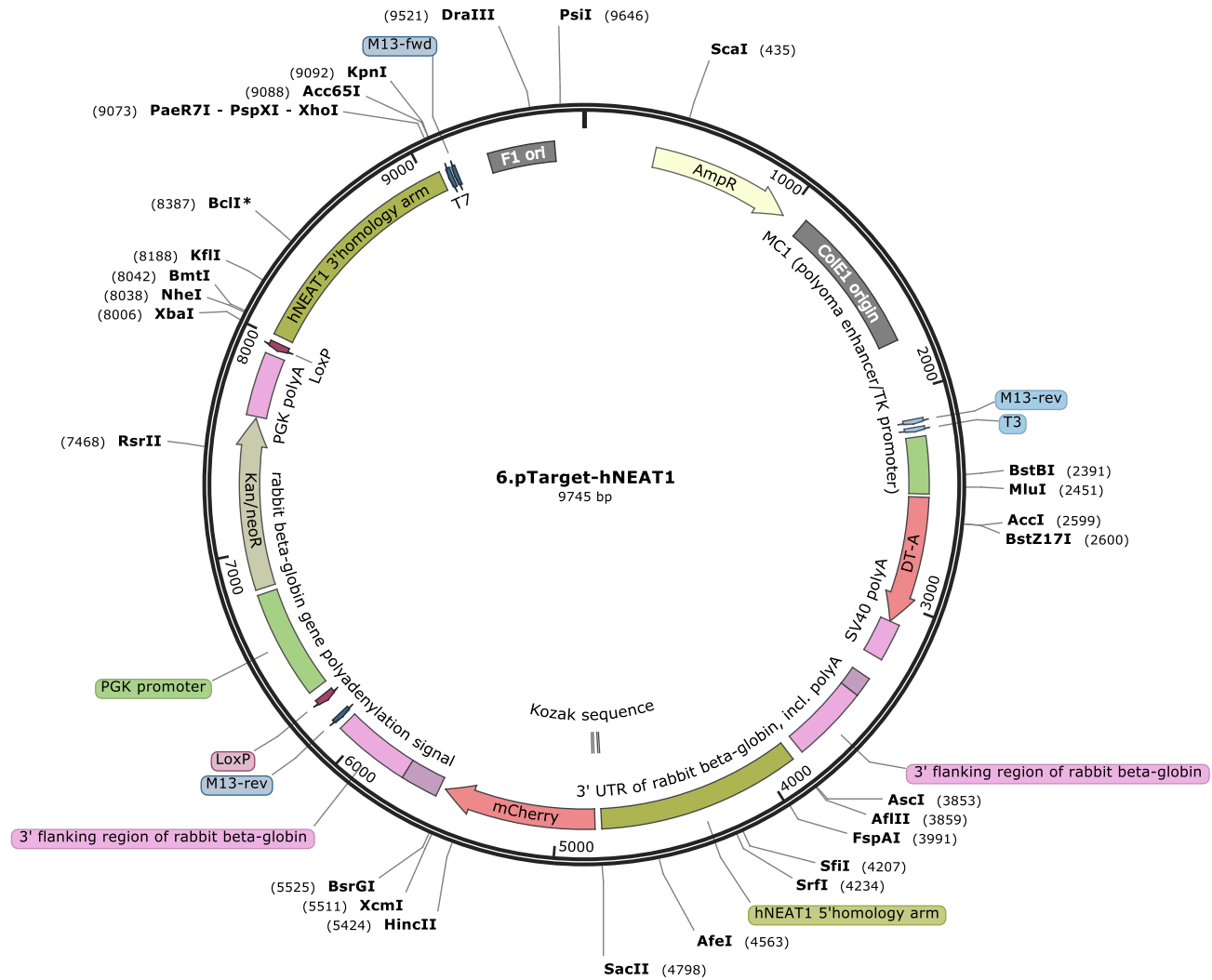
### Tabelle A 3: Übersicht Restriktionsenzym-Verdau

Plasmid	Restriktionsenzyme	Anzahl der Fragmente	Fragmentlängen
psgNEAT1a	Agel, EcoRV, NotI	3	3986bp, 3324bp, 1982bp
psgNEAT1b	Agel, EcoRI, NotI	4	4281bp, 3986bp, 783bp, 242bp
pTarget-hNEAT1	BamHI, XhoI	5	3169bp, 2815bp, 1452bp, 1336bp, 973bp



**Abbildung A 3: Plasmidkarte von psgNEAT1a**

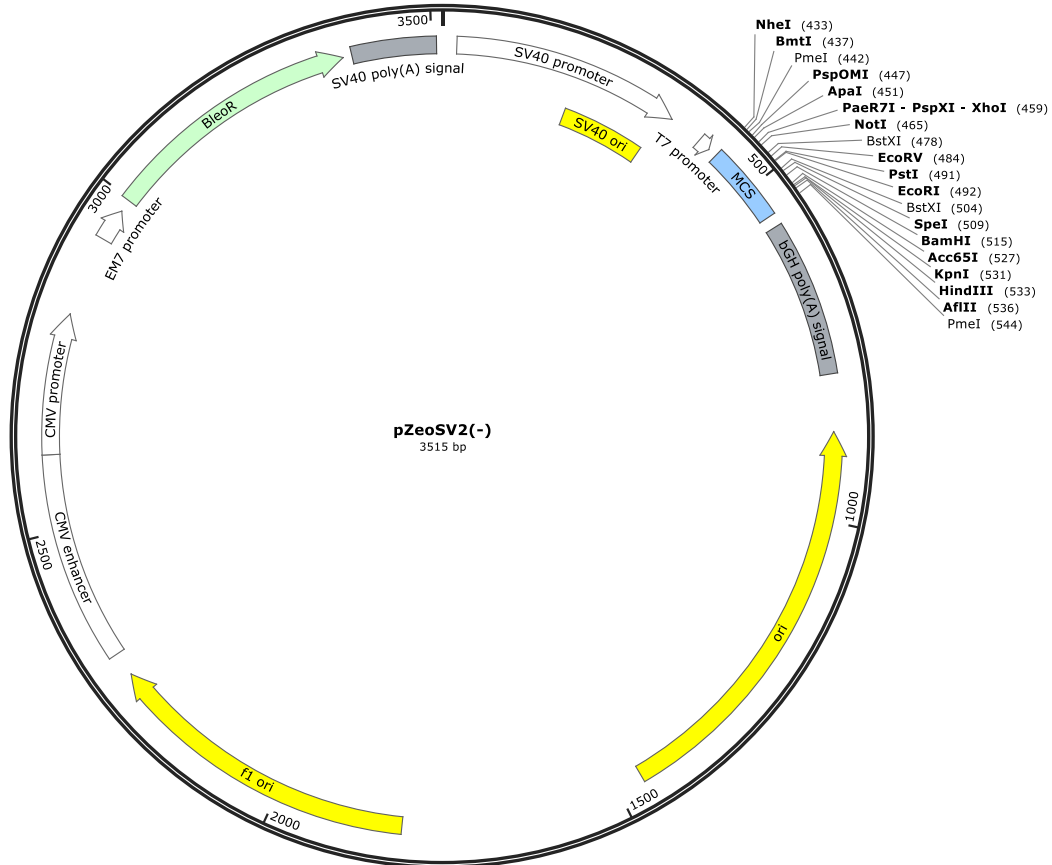
PsgNEAT1a exprimiert SpCas9 und eine sgRNA, die auf menschliches *NEAT1* abzielt.



**Abbildung A 4: Plasmidkarte des pTarget-hNEAT1**

Knock-in-Vektor, der auf das menschliche *NEAT1*-Gen abzielt.





**Abbildung A 5: Plasmidkarte von pZeoSV2**

Ausgangsvektor für HuR/ELAVL1 und TTP/ZFP36.

Tabelle A 4: Übersicht zu den Abkürzungen und Methoden des Lipidoms

Abkürzung	Lipidklasse	Lipidkategorie*	Methode**	Annahmen***
CE	Cholesteryl Ester	ST	FTMS	
Cer	Ceramide	SP	QQQ / FTMS	
CL	Cardiolipin	GP	FTMS	
DG	Diglyceride	GL	FTMS	
FA	Fatty Acid	FA	FTMS	
FC	Free Cholesterol	ST	FTMS(MSX)	
HexCer	Hexosylceramide	SP	QQQ	
LPA	Lysophosphatidic acid	GP	QQQ	1)
LPC	Lysophosphatidylcholine	GP	QQQ / FTMS	1)
LPE	Lysophosphatidylethanolamine	GP	QQQ / FTMS	1)
PA	Phosphatidic acid	GP	QQQ / FTMS	1)
PC	Phosphatidylcholine	GP	QQQ / FTMS	1)
PC O	Phosphatidylcholine-ether	GP	FTMS	
PE	Phosphatidylethanolamine	GP	QQQ / FTMS	1)
PE P	PE based plasmalogen	GP	QQQ	
PG	Phosphatidylglycerol	GP	QQQ / FTMS	1)
PI	Phosphatidylinositol	GP	QQQ / FTMS	1)
PS	Phosphatidylserine	GP	QQQ / FTMS	1)
SM	Sphingomyelin	SP	QQQ / FTMS	2)
TG	Triglyceride	GL	FTMS	

* Lipidkategorie		ST	Sterollipide
FA	Fett- Acyle	GL	Glycerolipide
SP	Sphingolipide	GP	Glycerophospholipide

**\*\* Methoden**

FTMS	Fourier-Transform-Massenspektrometrie mit einem Hybrid-Quadrupol-Orbitrap-Massenspektrometer (hohe Massenauflösung)
QQQ	Tandem-Massenspektrometrie mit einem Triple-Quadrupol-Massenspektrometer (niedrige Massenauflösung)

**\*\*\* Annahmen** (die folgenden Annahmen gelten für die QQQ-Analyse mit niedriger Massenauflösung)

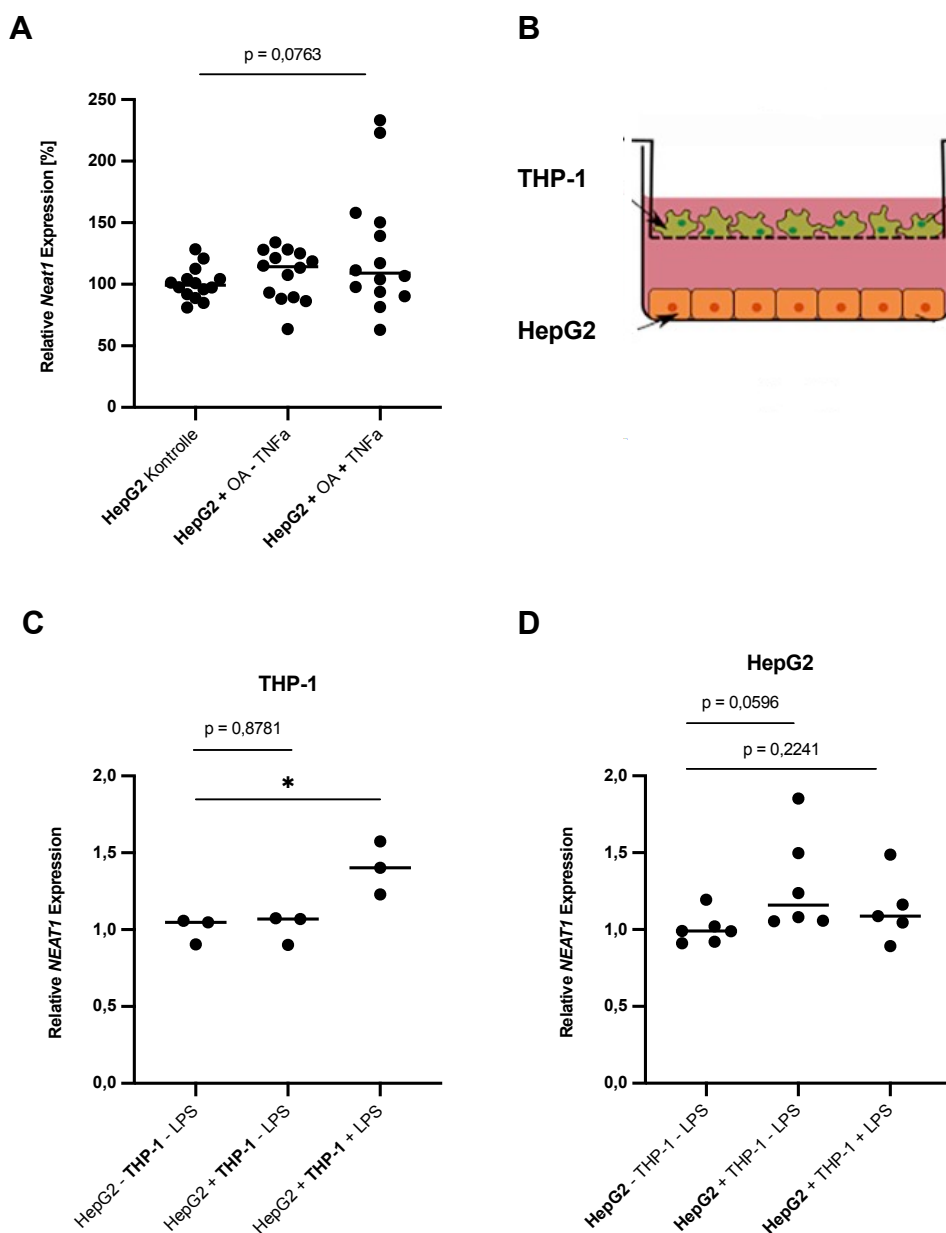
1) Die Beschriftung basiert auf der Annahme, dass nur geradzahlige Kohlenstoffketten vorhanden sind.

2) Die Beschriftung basiert auf der Annahme einer sphingoiden Base mit zwei Hydroxylgruppen.

**Tabelle A 5: GSEA-Parameter und Einstellungen**

GSEA-Parameter	Einstellung
Expression Data Set	WT MCD / KO MCD (n=4) RNA-Seq in TPM Normalisierung: $\log_2(\text{TPM}+1)$ + Z-Score
1. Gen Set Datenbank	Mh.all.v2024.1.Mm.symbols.gmt (Hallmark Gene Set mit 50 Gen Sets)
2. Gen Set Datenbank	M2.cp.reactome.v2024.1Mm.symbols.gmt (M2: curated gene sets CP: Canonical pathways: CP REACTOME Reactome Gen Sets mit 1289 Gen Sets)
Zahl der Permutationen	1000 (voreingestellt)
Phänotyp Label	WT MCD / KO MCD
Collapse	Collapse (voreingestellt)
Permutations Typ	Gen-Set
Chip Plattform	Mouse Collection Chips (MSigDB) Mouse_Ensemble_Gene_ID_MSigDB.v2024.1.Mm.chip

## 8.2 Humane *in vitro* MASLD Modelle

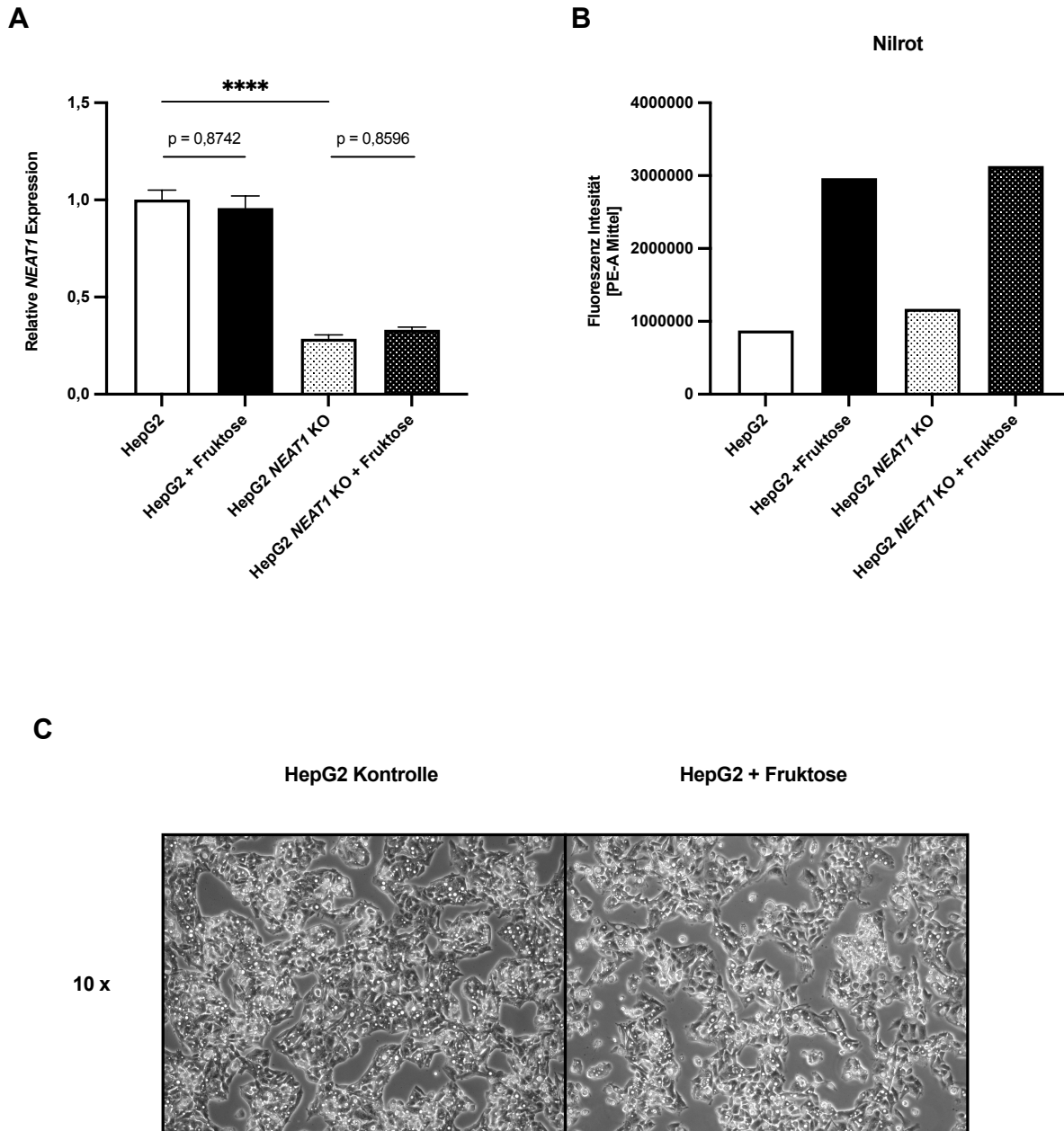


**Abbildung A 6: *In vitro* MASLD Modell TNF- $\alpha$  und Co-Kultur**

(A) Relative *NEAT1* Expression in HepG2 Zellen die für 24 h mit 1 mM OA und für 2 h mit 10 ng/ml TNF- $\alpha$  behandelt wurden im Vergleich zur Kontrolle gemessen per qPCR (n=4, Triplikat). Die Daten werden als Einzelwerte mit Mittelwert präsentiert. Die Signifikanz wurde mit einem ungepaarten Student's t-Test überprüft.

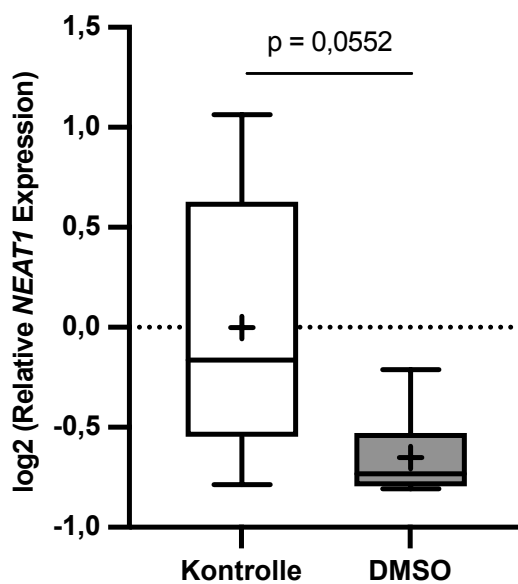
(B) Schematische Abbildung der Co-Kultur aus THP-1 Zellen und HepG2-Zellen in einem Transwell-System adaptiert von (Padberg et al., 2020) (C+D) Relative *NEAT1* Expression in (C) THP-1-Zellen oder (D) HepG2-Zellen, die in einer Co-Kultur kultiviert wurden, gemessen per qPCR (n=2, Triplikat). Die Daten werden als Einzelwerte mit Mittelwert präsentiert. Die Signifikanz wurde mit einem ungepaarten Student's t-Test überprüft.

\*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\* p < 0,0001.



### Abbildung A 7: Fruktose-Behandlung von HepG2-Zellen

(A) Relative *NEAT1* Expression in HepG2 Zellen oder HepG2-*NEAT1*-Knockout-Zellen (siehe Abschnitt 2.5.1.2) die mit 20 mM Fruktose über 1 Woche behandelt wurden im Vergleich zur Kontrolle. Die Daten werden als Säulendiagramm mit Mittelwert + SEM präsentiert. Die Statistik erfolgte mit ANOVA und Tukeys post hoc Test. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . (B) FACS-Analyse der Nilrot gefärbten HepG2-Zellen oder HepG2-*NEAT1*-Knockout-Zellen, die mit 20 mM Fruktose über 1 Woche behandelt wurden im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (C) Repräsentative Bilder der HepG2-Zellen, die für 48 Stunden mit 20 mM Fruktose behandelt wurden im Vergleich zur Kontrolle (Leica Mikroskop DMi8, 10× Objektiv Ph, entspricht einer Originalvergrößerung von 100× und 200×).

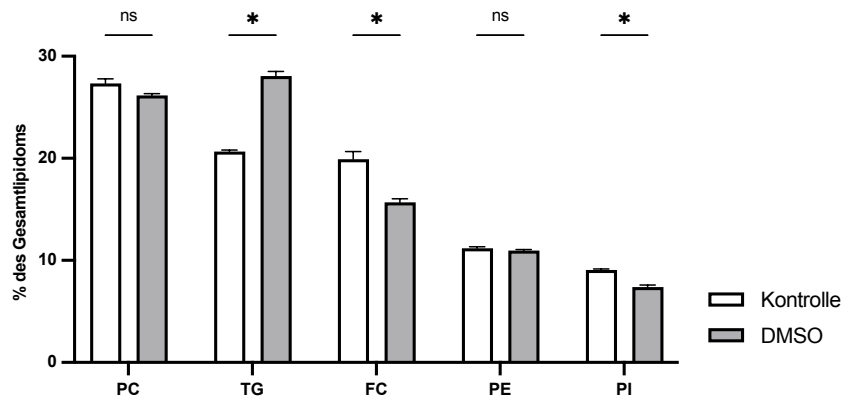


**Abbildung A 8: *NEAT1*-Expression in DMSO-behandelten HepG2-Zellen**

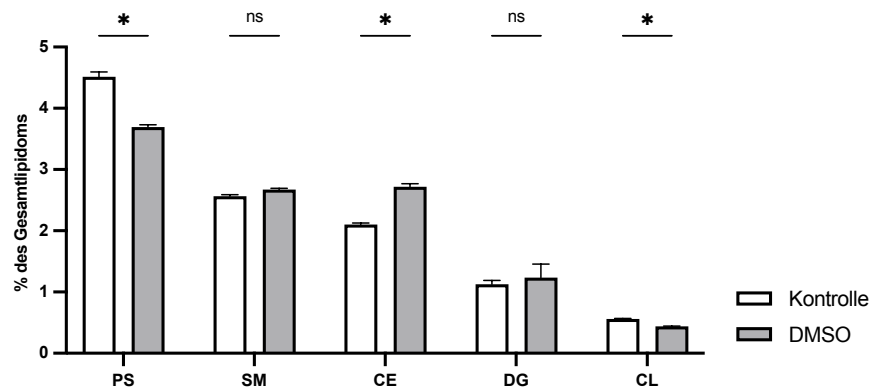
Die Daten sind nach Shapiro-Wilk nicht normalverteilt und wurden daher einer log2-Transformation unterzogen. Gezeigt ist die log2-transformierte relative *NEAT1*-Expression im Verhältnis zu *18S*, gemessen per qPCR (n=2, Triplikat). Dargestellt als Box-Whisker-Plot mit Mittelwert und 5-95 Perzentilen. Das Plus Symbol (+) kennzeichnet zusätzlich den Median. Die Signifikanz wurde mit einem ungepaarten, zweiseitigen Student's t-Tests überprüft.

## Anhang

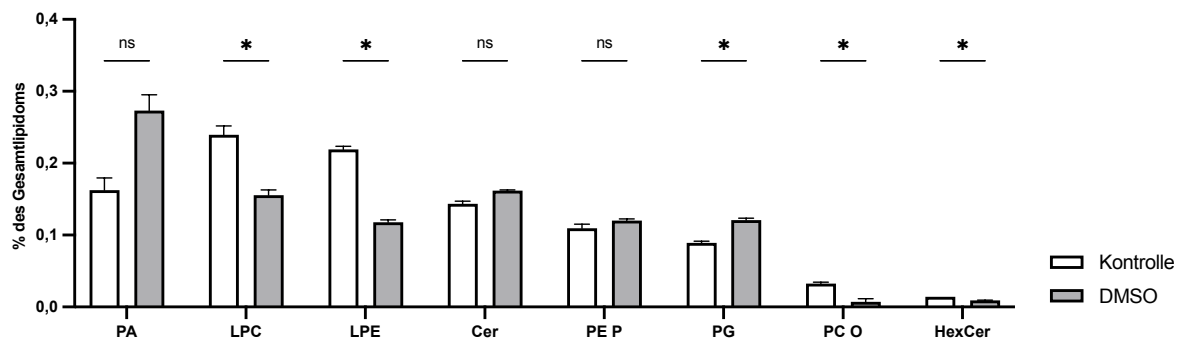
**A**



**B**



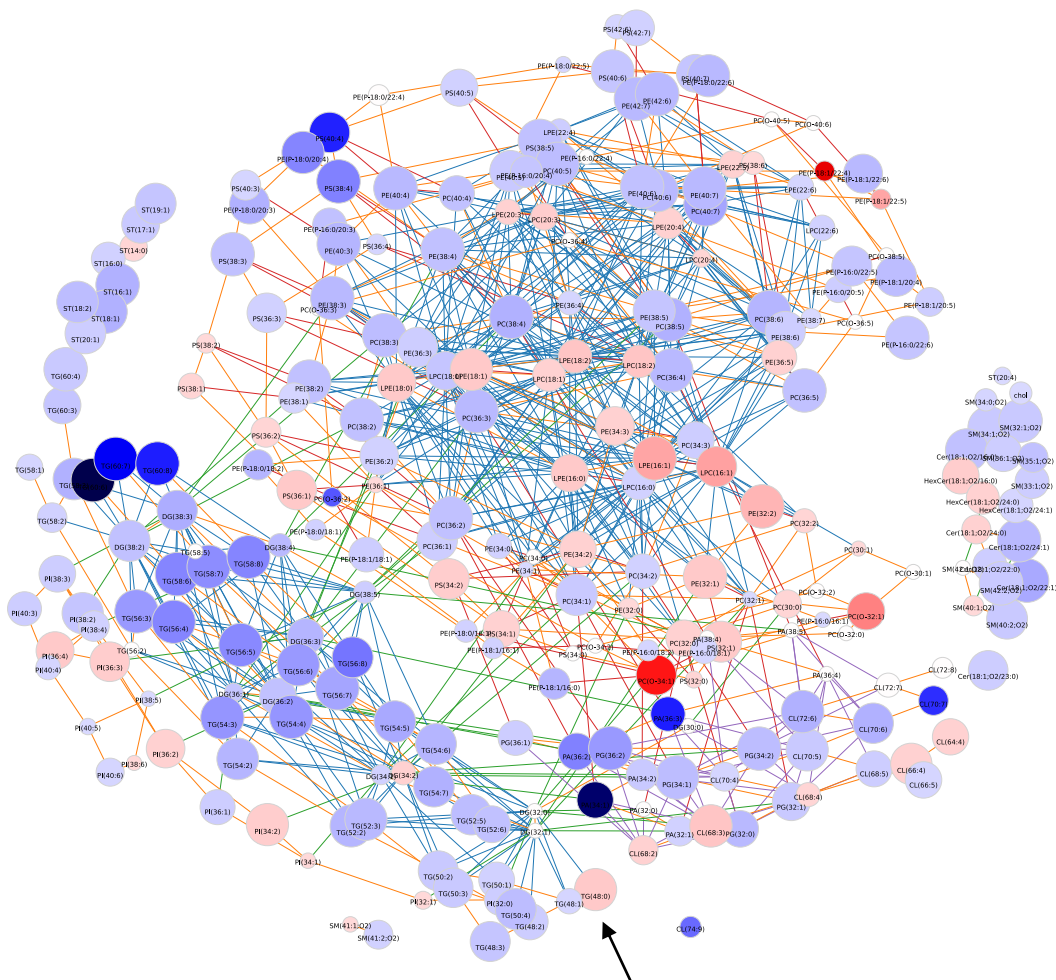
**C**



### Abbildung A 9: Lipidom der DMSO-behandelten HepG2-Zellen

Gezeigt sind die Lipidklassen des Lipidoms als prozentualer Anteil am Gesamtlipidom der DMSO-behandelten HepG2-Zellen im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle. Die Daten werden als Säulendiagramm mit Mittelwert + SEM präsentiert. Die Statistik wurde mit einem multiplen ungepaarten t-Test ermittelt ns= nicht signifikant, \* = signifikant mit  $p < 0,05$ .

## Anhang

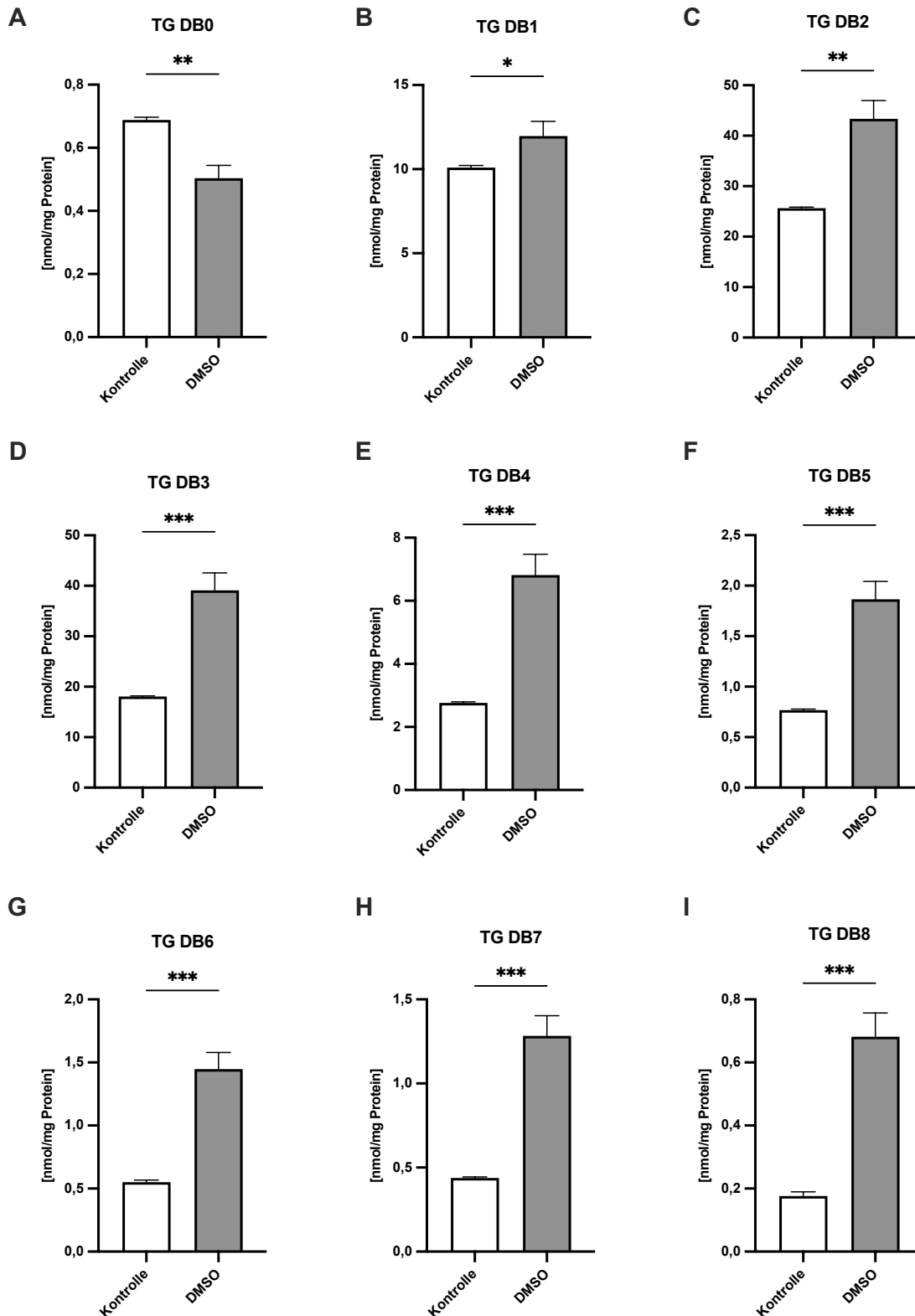


Reaktionstyp	Fold Change	$-\log_{10}(\text{FDR})$
FA Entfernung	-13,5	0,682
FA Modifikation	-6,75	1,364
KG Entfernung	0	2,045
KG Modifikation	6,75	2,727
Lipid Fusion	13,5	

**Abbildung A 10: LINEX<sup>2</sup> Netzwerk Lipidom DMSO**

Gezeigt ist ein LINEX<sup>2</sup>-Netzwerk basierend auf den Lipidom-Daten der DMSO-behandelten HepG2-Zellen im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle. Jeder Knoten stellt eine Lipidspezies dar und jede Verbindungslinie zwischen einem Lipidpaar eine Reaktion (Aufschlüsselung der Reaktionen in der Legende). Die Knotenfarben stellen den Fold Change (FC) dar und die Knotengröße den  $-\log_{10}(\text{FDR})$ . Eine blaue Knotenfarbe steht für ein höheres Lipid-Level in DMSO-behandelten HepG2-Zellen, eine rote Knotenfarbe für ein höhere Lipid-Level in der Kontrolle. Der schwarze Pfeil zeigt die Lipidspezies TG48:0 an.

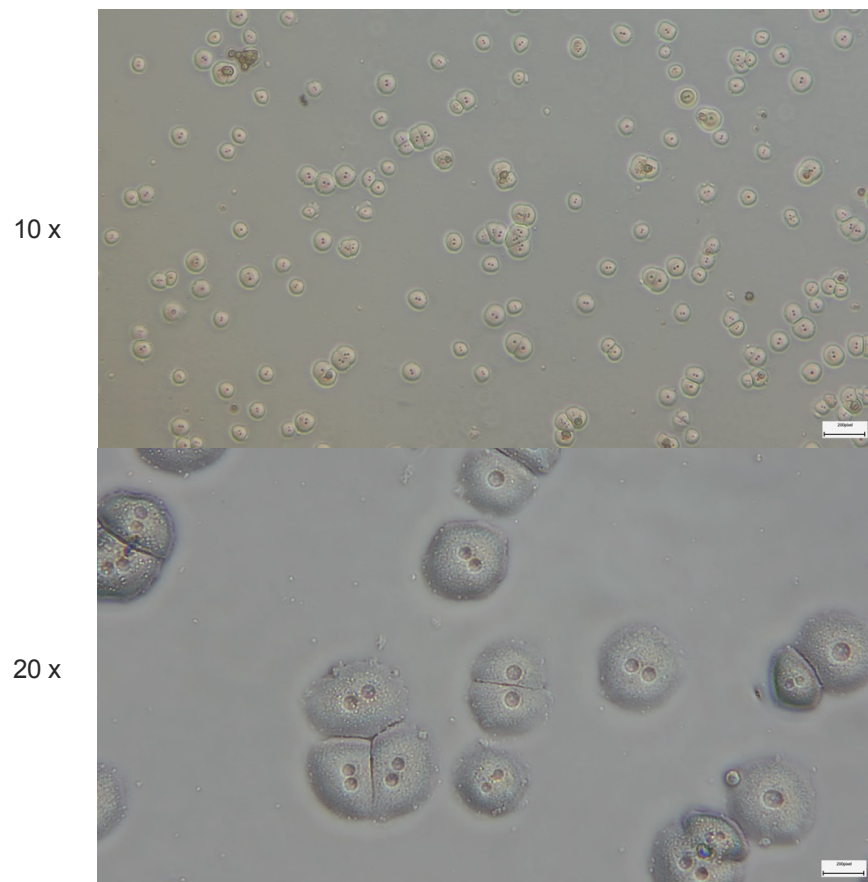




**Abbildung A 11: TG-Analyse des Lipidom der DMSO-behandelten HepG2-Zellen**

Gezeigt sind die TG-Spezies zusammengefasst in Gruppen der gesättigten TG-Spezies (Doppelbindung (DB) 0), einfach ungesättigten TG-Spezies (DB1) und mehrfach ungesättigten TG mit steigender Anzahl an Doppelbindungen (DB2-DB8). Die Daten werden als Säulendiagramm mit Mittelwert + SEM präsentiert. Die Statistik erfolgte mit einem ungepaarten, zweiseitigen Student's t-Tests ns= nicht signifikant, \*p <0,05, \*\*p <0,01, \*\*\*p <0,001, \*\*\*\* p <0,0001.

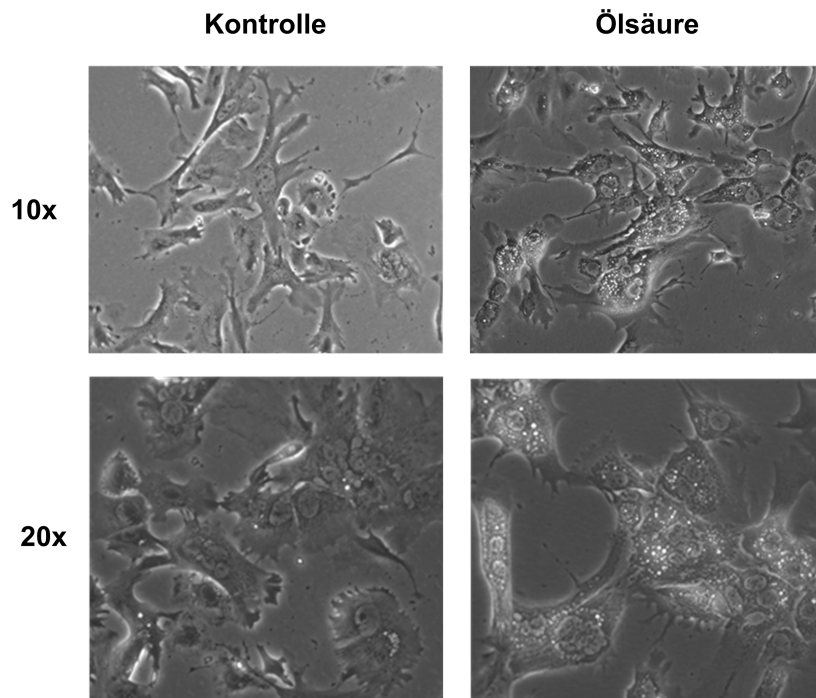
### 8.3 Murine *in vitro* Modelle



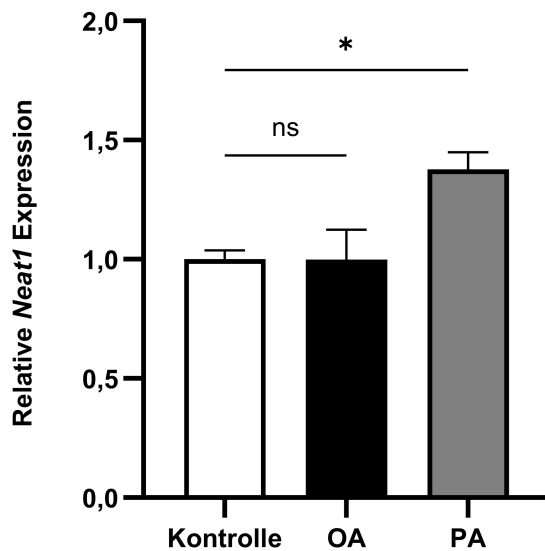
**Abbildung A 12: Primäre murine Hepatozyten (PMH)**

Gezeigt sind mikroskopische Aufnahmen von PMHs 3 Stunden nach dem Aussäen unmittelbar nach der Isolierung aus der Leber (Zeiss Mikroskop, 10× und 20× Objektiven entspricht einer Originalvergrößerung von 100× und 200×).

**A**



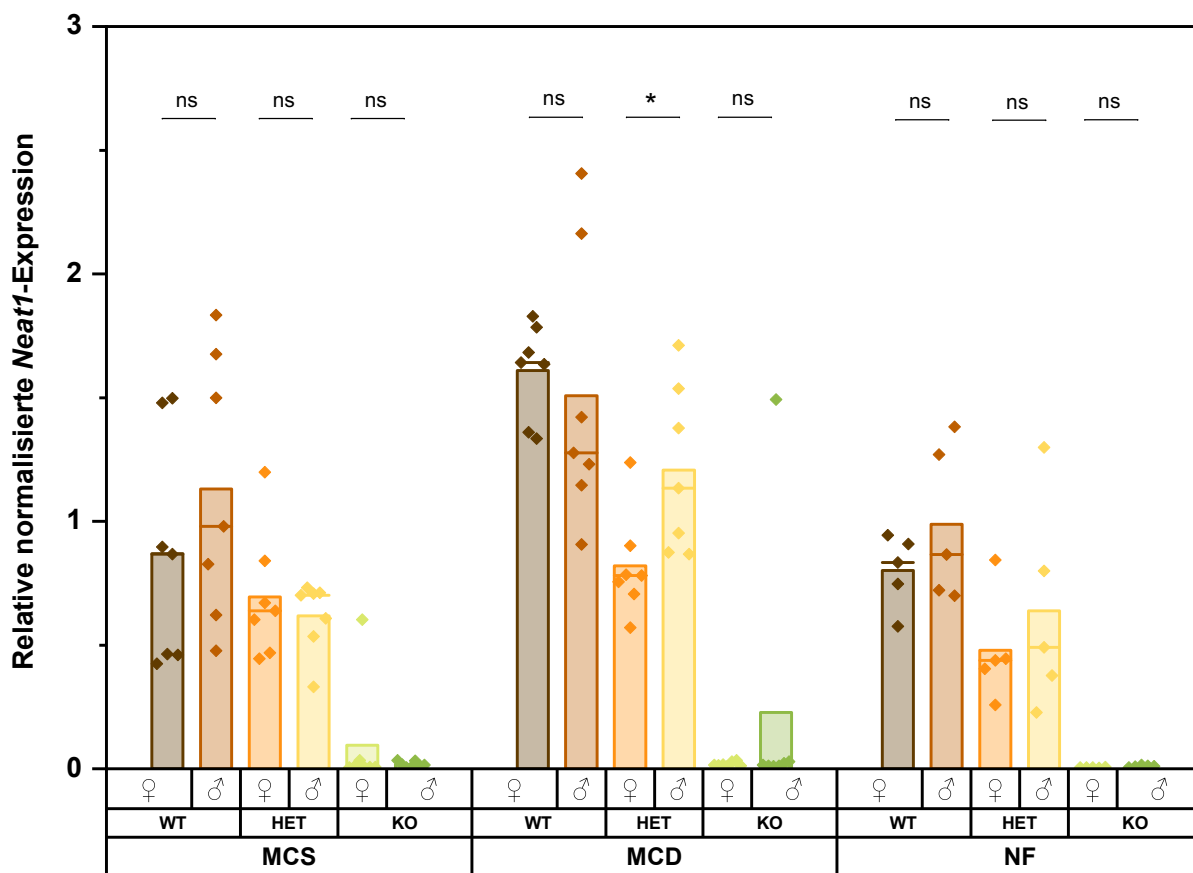
**B**



**Abbildung A 13: Behandlung primärer muriner Hepatozyten**

(A) Gezeigt sind repräsentative Bilder der PMHs nach Behandlung mit 0,5 mM Ölsäure im Vergleich zur Kontrolle (Leica Mikroskop, 10× und 20× Objektiven entspricht einer Originalvergrößerung von 100× und 200×). (B) Die relative Neat1-Expression der PMHs, mit 0,5 mM Ölsäure (OA) oder für 48 Stunden mit 0,5 mM Palmitinsäure (PA) behandelt wurden. Die Daten werden als Säulendiagramm mit Mittelwert + SEM präsentiert. Die Statistik erfolgte mit ANOVA und Tukeys post hoc Test. \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\*p < 0,0001.

## 8.4 *NEAT1* in MASH (MCD-Diät)

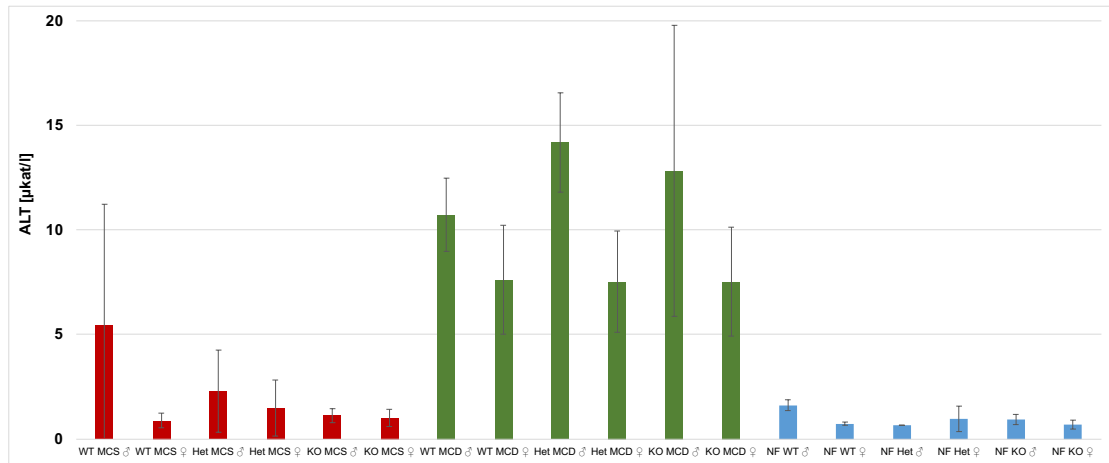


**Abbildung A 14: Geschlechtergetrennte Analyse der *Neat1*-Expression**

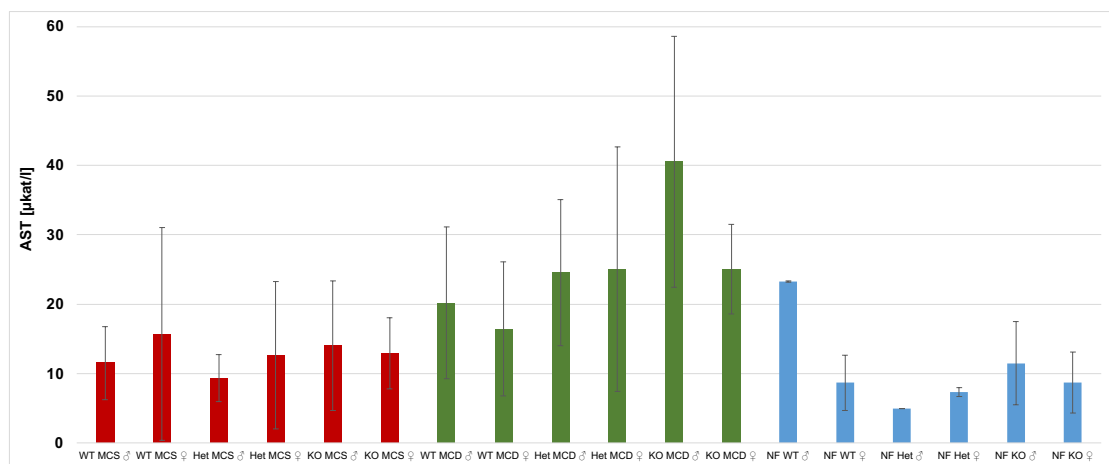
Die geschlechtergetrennte Analyse der Expression von *Neat1* von allen Futtergruppen (MCS, MCD, NF) und Genotypen (WT, HET, KO) wurde per qPCR mit Standard bestimmt und wird dargestellt als Verhältnis von *Neat1* zu den Haushaltsgenen *18S*, *Ppia* und *Csnk2a2*, normalisiert auf die Kontrollgruppe WT MCS. Die Daten werden als Einzelpunkte im Mittelwert-Säulendiagramm und Median dargestellt (MCS, MCD n=14 (weiblich n=7; männlich n=7); NF n=10 (weiblich n=5; männlich n=5)). Die Signifikanz wurde mit einem ungepaarten t-Test bestimmt (ns= nicht signifikant; \* =  $p \leq 0,05$ ; \*\* =  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$  \*\*\*\* =  $p \leq 0,0001$ ).

## Anhang

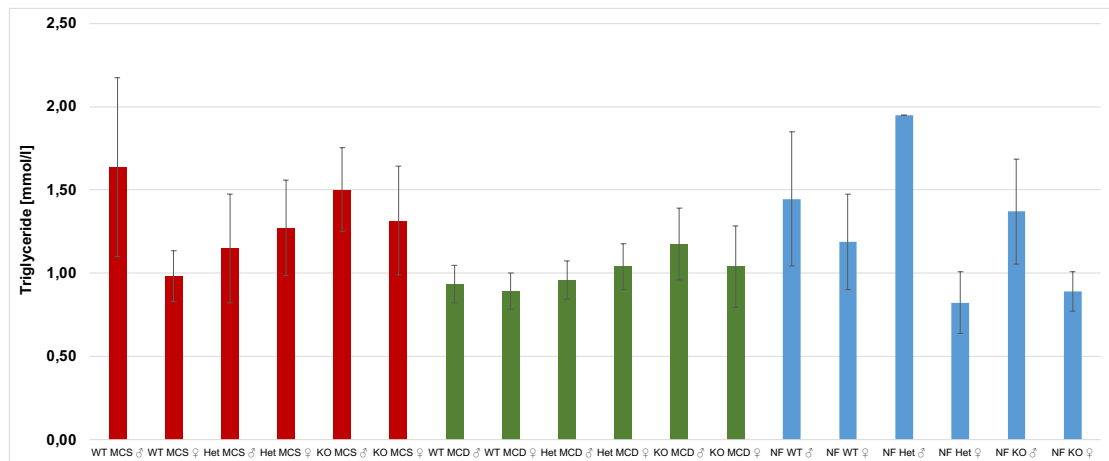
**A**



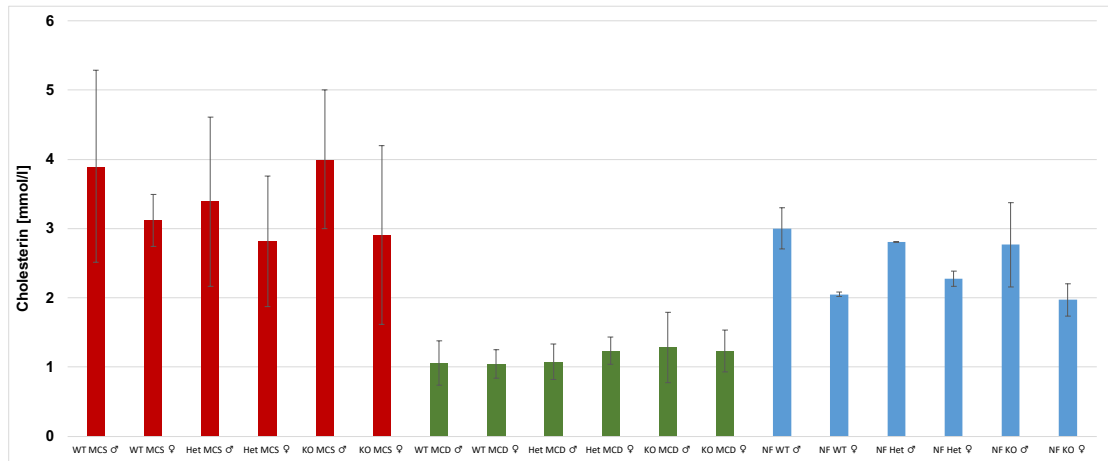
**B**



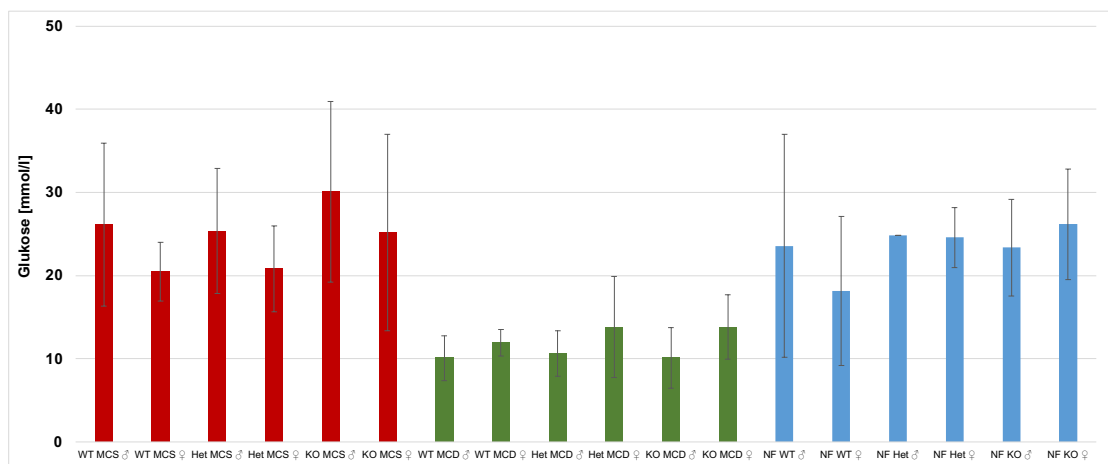
**C**



D



E

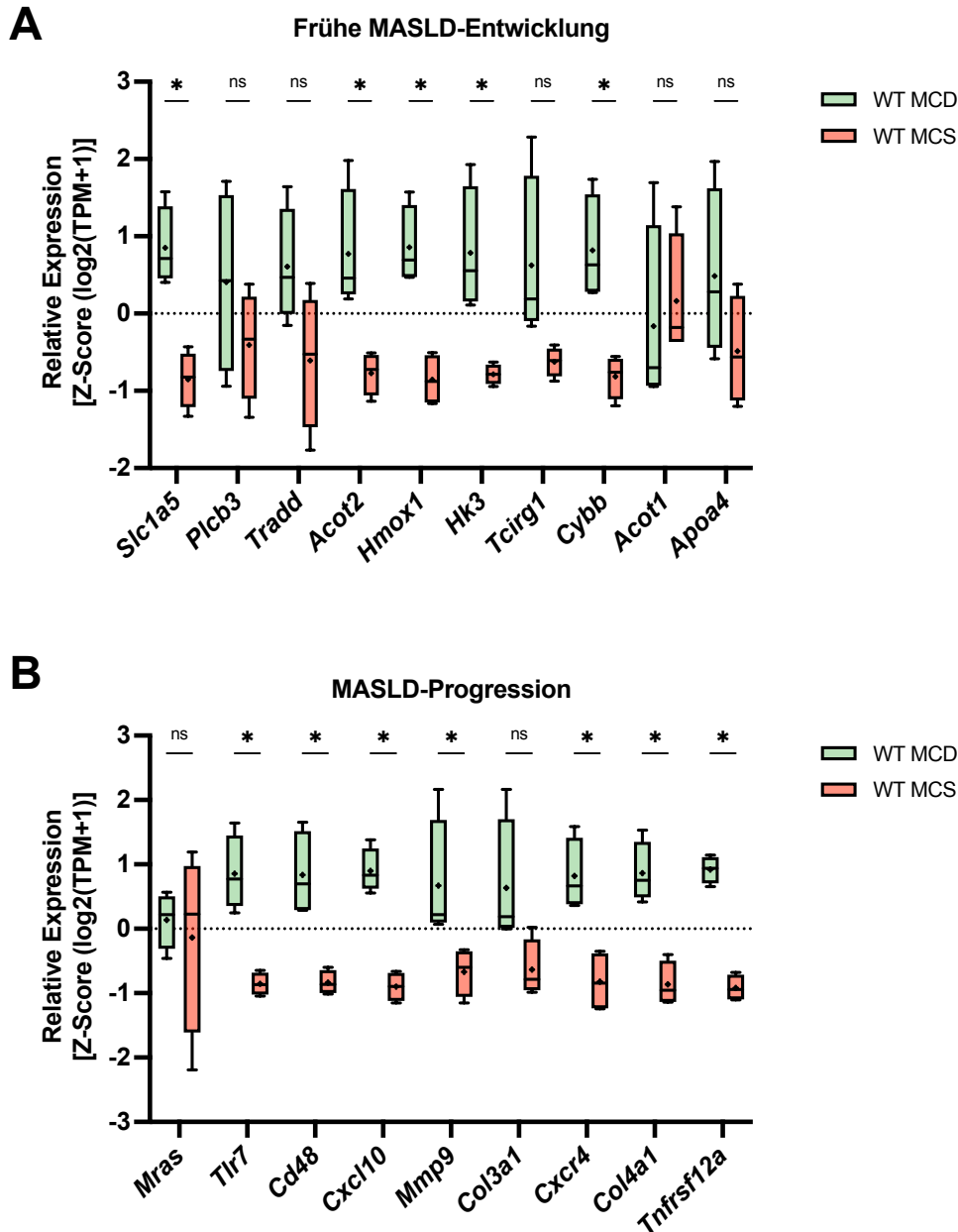


F

Genotyp	Diät	Geschlecht	n
WT	MCS	♂	7
WT	MCS	♀	7
HET	MCS	♂	7
HET	MCS	♀	7
KO	MCS	♂	7
KO	MCS	♀	6
WT	MCD	♂	7
WT	MCD	♀	7
HET	MCD	♂	7
HET	MCD	♀	6
KO	MCD	♂	6
KO	MCD	♀	6
WT	NF	♂	2
WT	NF	♀	3
HET	NF	♂	1
HET	NF	♀	3
KO	NF	♂	5
KO	NF	♀	5

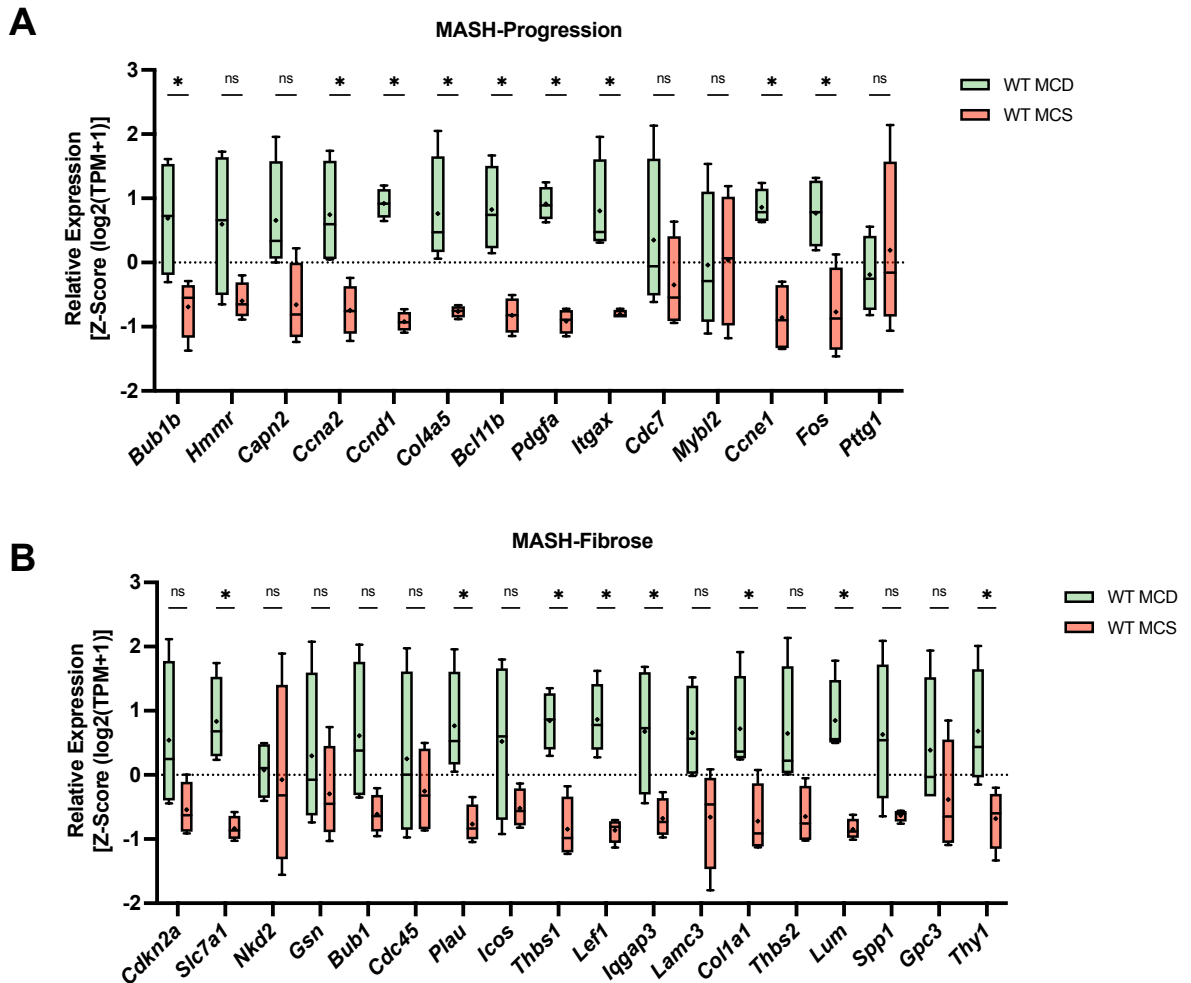
**Abbildung A 15: Geschlechtergetrennte Analyse der Serumparameter**

(A) ALT (B) AST (C) Triglyceride (D) Cholesterin (E) Glukose (F) Übersichtstabelle der von links nach rechts aufgetragenen Gruppe mit Genotyp, Diät, Geschlecht und n-Anzahl. Die Daten sind dargestellt als Balkendiagramm mit Mittelwert und Standardabweichung.



**Abbildung A 16: Teil 1- Vergleich relevanter Gene zwischen Maus und Mensch in MASLD und MASH**

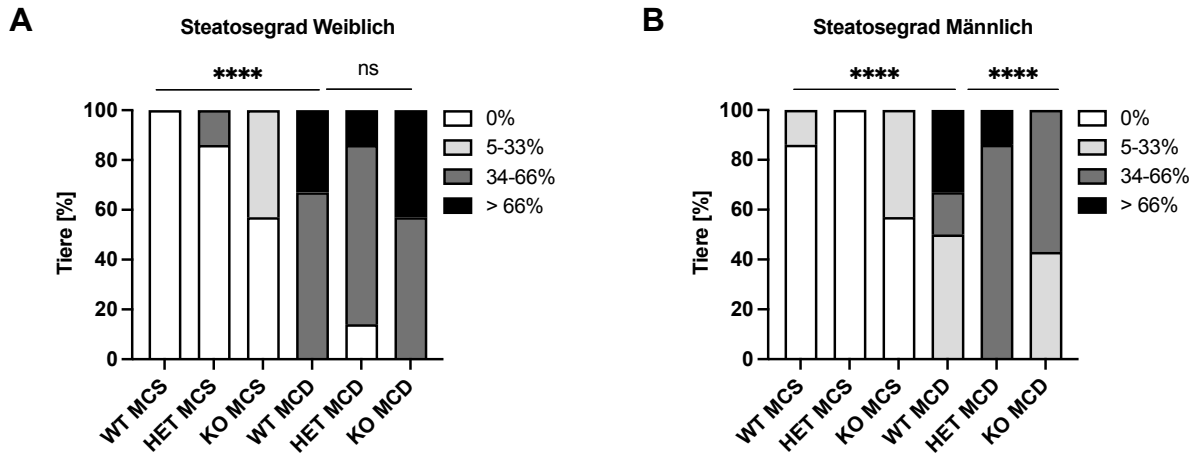
Die Abbildung zeigt die Veränderung pathologisch relevanter Gene bei humaner und muriner MASLD und MASH (Vacca et al., 2024), welche mit den verschiedenen Stadien der MASLD-Entwicklung oder -Progression in Verbindung stehen. Die Ergebnissen der RNA-Sequenzierung von WT-MCS und WT-MCD Mäusen werden verglichen. Relevante Gene der (A) frühen MASLD-Entwicklung (B) MASLD-Progression. Die Daten der relativen Expression (Z-Score) sind dargestellt als Box- und Whisker-Plot mit Median, Mittelwert (+) und 5 bis 95 Perzentilen. Die statistische Signifikanz wurden mit einem multiplen ungepaarten t-Test ermittelt ns= nicht signifikant, \* = signifikant mit  $p < 0,05$ .



**Abbildung A 17: Teil 2- Vergleich relevanter Gene zwischen Maus und Mensch in MASLD und MASH**

Die Abbildung zeigt die Veränderung pathologisch relevanter Gene bei humaner und muriner MASLD und MASH (Vacca et al., 2024), welche mit den verschiedenen Stadien der MASLD-Entwicklung oder -Progression in Verbindung stehen. Die Ergebnissen der RNA-Sequenzierung von WT-MCS und WT-MCD Mäusen werden verglichen. Relevante Gene der (A) MASH-Progression (B) MASH-Fibrose. Die Daten der relativen Expression (Z-Score) sind dargestellt als Box- und Whisker-Plot mit Median, Mittelwert (+) und 5 bis 95 Perzentilen. Die statistische Signifikanz wurden mit einem multiplen ungepaarten t-Test ermittelt ns= nicht signifikant, \* = signifikant mit  $p < 0,05$ .





### Abbildung A 18: Histologische Analyse der Steatose

Histologische Auswertung der H&E-Färbung in Lebern von MCD- und MCS- (Kontrolle) gefütterten Mäusen (A) Geschlechtergetrennter Steatosegrad (mediovessikulär) weibliche Mäuse (jeweils n=7; WT MCD n=6) (F) Geschlechtergetrennter Steatosegrad (mediovessikulär) männliche Mäuse (jeweils n=7; WT MCD n=6). Die Daten sind als gestapelte Kontingenzbalken dargestellt. Die Signifikanz wurde mit einem Fisher Test bestimmt  
 \* =  $p \leq 0,05$ ; \*\* =  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$  \*\*\*\* =  $p \leq 0,0001$ .

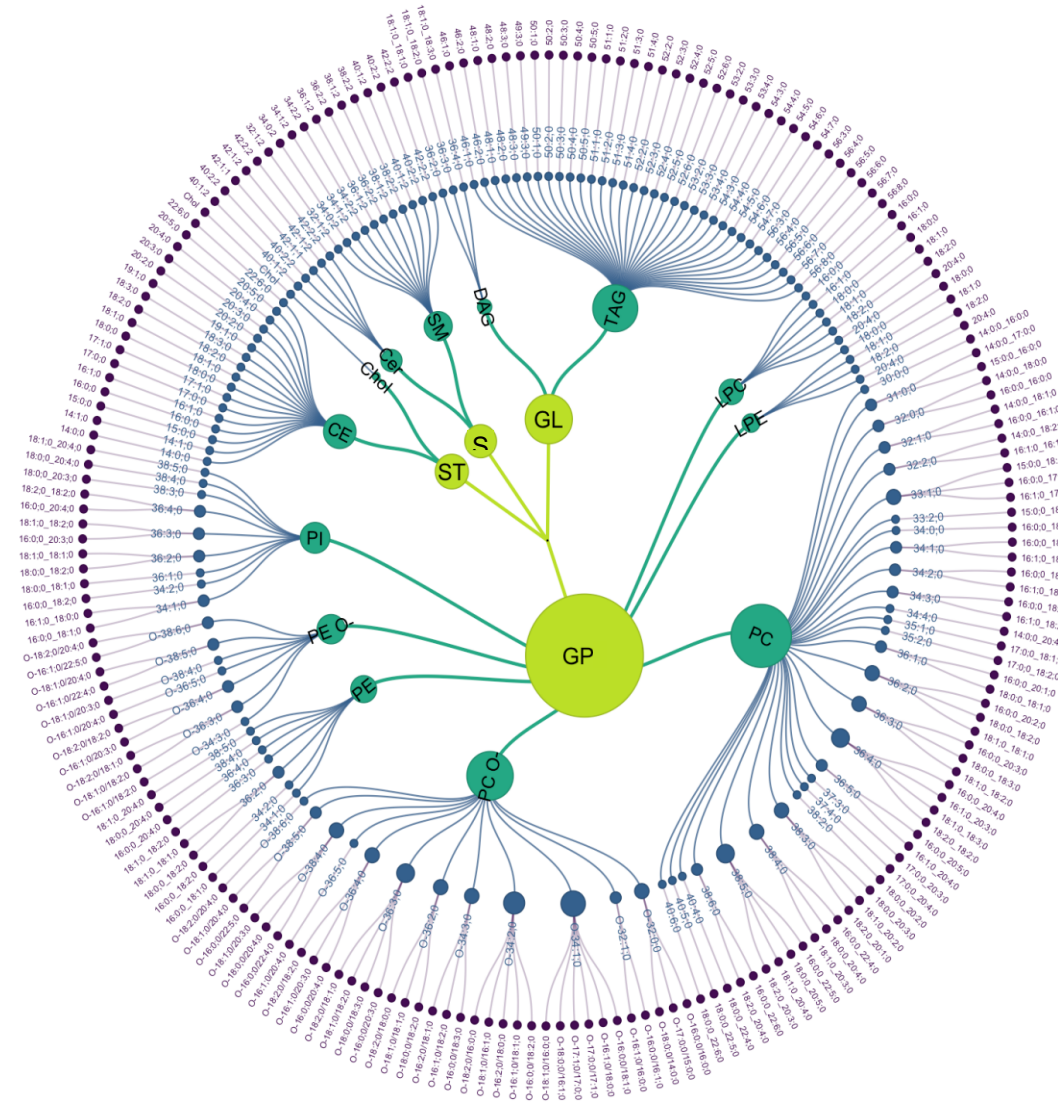


Abbildung A 19: Schematische Darstellung der Lipidkategorien (Tam et al., 2021)

# Anhang

**Tabelle A 6: Prozentualer Anteil der Lipidklassen am Gesamtlipidom (aller Genotypen)**

	LPC	LPE	Cer	PA	HexCer	PE	PS	PG	PE P	PI	CL	PC	SM	DG	TG	CE	FC	FA	Sum [%]
WT MCS	0,36	0,08	0,06	0,10	0,03	5,42	0,86	0,03	0,08	6,31	0,87	11,13	0,55	3,82	59,62	1,45	4,50	4,73	100
HET MCS	0,39	0,07	0,06	0,12	0,03	5,84	0,97	0,04	0,09	6,58	0,79	12,00	0,59	4,66	55,57	1,66	4,61	5,93	100
KO MCS	0,33	0,12	0,07	0,14	0,03	7,40	1,22	0,05	0,12	7,98	1,03	15,09	0,79	4,31	46,59	1,55	5,93	5,46	100
WT MCD	0,24	0,04	0,03	0,02	0,01	2,64	0,34	0,01	0,05	2,60	0,23	2,89	0,31	2,51	82,12	0,91	2,34	2,84	100
HET MCD	0,17	0,04	0,03	0,02	0,01	3,01	0,37	0,01	0,05	2,90	0,25	3,30	0,34	2,73	80,76	0,80	2,18	3,07	100
KO MCD	0,12	0,05	0,04	0,02	0,01	3,71	0,45	0,02	0,07	3,56	0,31	3,91	0,41	2,93	77,53	0,82	2,53	3,49	100
WT NF	0,09	0,20	0,14	0,16	0,04	13,01	1,81	0,06	0,17	13,73	1,42	24,40	1,29	2,75	25,45	1,65	8,28	4,61	100
HET NF	0,07	0,21	0,13	0,15	0,04	13,09	1,90	0,07	0,18	13,40	1,43	22,57	1,24	3,21	24,69	1,66	8,74	6,48	100
KO NF	0,06	0,19	0,12	0,16	0,04	12,00	1,86	0,06	0,17	13,05	1,35	23,31	1,17	3,29	25,56	1,69	8,53	6,69	100

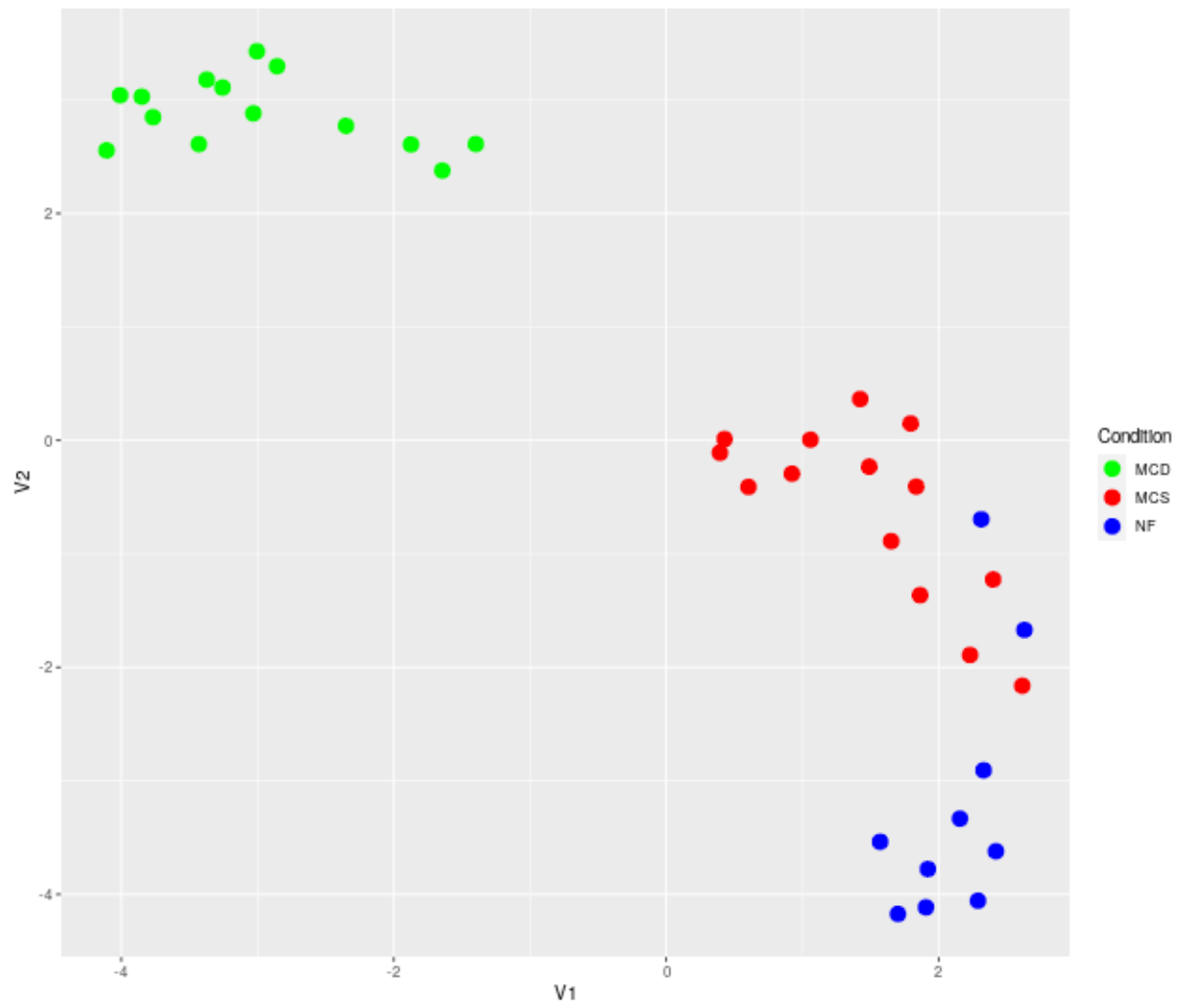


Abbildung A 20: UMAP-Berechnung der MoSBi-Analyse MoSBi Diät 1

## Anhang

**Tabelle A 7: MoSBI (Diät) Fraktionswerte**

MoSBI Analyse der WT-Mäuse der MCD, MCS und des NFs. Fraktionswerte der extrahierten Louvain-Gemeinschaften der MoSBI-Netzwerke mit angereicherten MCD-Fraktionen

MoSBI Diät 1 Gemeinschaft 5				MoSBI Diät 2 Gemeinschaft 2				MoSBI Diät 3 Gemeinschaft 2			
Typ	ID	Fraktion	Name	Typ	ID	Fraktion	Name	Typ	ID	Fraktion	Name
row	49	1,00	PE 38:6	row	173	1,00	TG 50:2	row	173	1,00	TG 50:2
row	90	1,00	PI 38:4	row	181	1,00	TG 52:2	row	174	1,00	TG 50:3
row	131	1,00	PC 36:4	row	182	1,00	TG 52:3	row	181	1,00	TG 52:2
row	133	1,00	PC 38:4	row	183	1,00	TG 52:4	row	182	1,00	TG 52:3
row	173	1,00	TG 50:2	row	184	1,00	TG 52:5	row	183	1,00	TG 52:4
row	174	1,00	TG 50:3	row	191	1,00	TG 54:3	row	184	1,00	TG 52:5
row	181	1,00	TG 52:2	row	192	1,00	TG 54:4	row	191	1,00	TG 54:3
row	182	1,00	TG 52:3	row	193	1,00	TG 54:5	row	192	1,00	TG 54:4
row	183	1,00	TG 52:4	row	194	1,00	TG 54:6	row	193	1,00	TG 54:5
row	184	1,00	TG 52:5	row	195	1,00	TG 54:7	row	194	1,00	TG 54:6
row	191	1,00	TG 54:3	row	203	1,00	TG 56:5	row	203	1,00	TG 56:5
row	192	1,00	TG 54:4	row	204	1,00	TG 56:6	row	204	1,00	TG 56:6
row	193	1,00	TG 54:5	row	205	1,00	TG 56:7	row	205	1,00	TG 56:7
row	194	1,00	TG 54:6	row	206	1,00	TG 56:8	row	206	1,00	TG 56:8
row	195	1,00	TG 54:7	row	213	1,00	TG 58:6	row	214	1,00	TG 58:7
row	203	1,00	TG 56:5	row	214	1,00	TG 58:7	row	215	1,00	TG 58:8
row	204	1,00	TG 56:6	row	215	1,00	TG 58:8	row	49	0,98	PE 38:6
row	205	1,00	TG 56:7	row	216	1,00	TG 58:9	row	90	0,98	PI 38:4
row	206	1,00	TG 56:8	row	230	1,00	cholesterol	row	131	0,98	PC 36:4
row	211	1,00	TG 58:10	row	49	0,98	PE 38:6	row	133	0,98	PC 38:4
row	213	1,00	TG 58:6	row	90	0,98	PI 38:4	row	195	0,98	TG 54:7
row	214	1,00	TG 58:7	row	131	0,98	PC 36:4	row	211	0,98	TG 58:10
row	215	1,00	TG 58:8	row	133	0,98	PC 38:4	row	213	0,98	TG 58:6
row	216	1,00	TG 58:9	row	174	0,98	TG 50:3	row	216	0,98	TG 58:9
row	217	1,00	TG 60:10	row	211	0,98	TG 58:10	row	217	0,98	TG 60:10
row	222	1,00	TG 60:9	row	217	0,98	TG 60:10	row	222	0,98	TG 60:9
row	230	1,00	cholesterol	row	222	0,98	TG 60:9	row	230	0,98	cholesterol
row	231	1,00	FA 16:0	row	231	0,98	FA 16:0	row	231	0,98	FA 16:0
row	234	1,00	FA 18:1	row	234	0,98	FA 18:1	row	234	0,98	FA 18:1
row	235	1,00	FA 18:2	row	235	0,98	FA 18:2	row	235	0,98	FA 18:2
row	202	0,80	TG 56:4	row	202	0,78	TG 56:4	row	202	0,78	TG 56:4
row	218	0,80	TG 60:11	row	218	0,78	TG 60:11	row	218	0,78	TG 60:11
row	221	0,76	TG 60:8	column	22	0,76	WT_MCD_8	row	221	0,74	TG 60:8
column	22	0,76	WT_MCD_8	row	221	0,74	TG 60:8	column	22	0,74	WT_MCD_8
row	152	0,69	DG 34:2	row	152	0,67	DG 34:2	row	152	0,67	DG 34:2
column	16	0,64	WT_MCD_2	column	16	0,65	WT_MCD_2	column	16	0,63	WT_MCD_2
row	47	0,60	PE 38:4	row	47	0,59	PE 38:4	column	23	0,61	WT_MCD_9
column	23	0,60	WT_MCD_9	column	23	0,59	WT_MCD_9	column	24	0,61	WT_MCD_10
column	24	0,60	WT_MCD_10	column	24	0,59	WT_MCD_10	row	47	0,59	PE 38:4
row	53	0,40	PE 40:6	row	172	0,41	TG 50:1	row	172	0,41	TG 50:1
row	172	0,40	TG 50:1	row	53	0,39	PE 40:6	row	53	0,39	PE 40:6
row	207	0,38	TG 56:9	row	207	0,37	TG 56:9	row	207	0,37	TG 56:9
row	155	0,36	DG 36:3	row	155	0,35	DG 36:3	row	155	0,35	DG 36:3
column	21	0,31	WT_MCD_7	column	21	0,30	WT_MCD_7	column	21	0,30	WT_MCD_7
column	27	0,27	WT_MCD_13	column	27	0,26	WT_MCD_13	column	27	0,28	WT_MCD_13
row	127	0,24	PC 34:2	row	127	0,24	PC 34:2	column	20	0,26	WT_MCD_6
column	20	0,24	WT_MCD_6	column	20	0,24	WT_MCD_6	row	127	0,24	PC 34:2
column	25	0,20	WT_MCD_11	column	25	0,20	WT_MCD_11	column	25	0,22	WT_MCD_11
row	175	0,18	TG 50:4	row	175	0,17	TG 50:4	row	175	0,17	TG 50:4
row	185	0,07	TG 52:6	row	185	0,07	TG 52:6	row	185	0,07	TG 52:6
column	17	0,07	WT_MCD_3	column	17	0,07	WT_MCD_3	column	17	0,07	WT_MCD_3
row	156	0,02	DG 36:4	row	156	0,02	DG 36:4	row	156	0,02	DG 36:4
row	226	0,02	CE 18:1	row	226	0,02	CE 18:1	row	226	0,02	CE 18:1
				column	2	0,02	WT_MCS_2	column	4	0,02	WT_MCS_4
				column	3	0,02	WT_MCS_3	column	12	0,02	WT_MCS_12
				column	10	0,02	WT_MCS_10	column	14	0,02	WT_MCS_14
				column	13	0,02	WT_MCS_13	column	31	0,02	WT_NFM_3

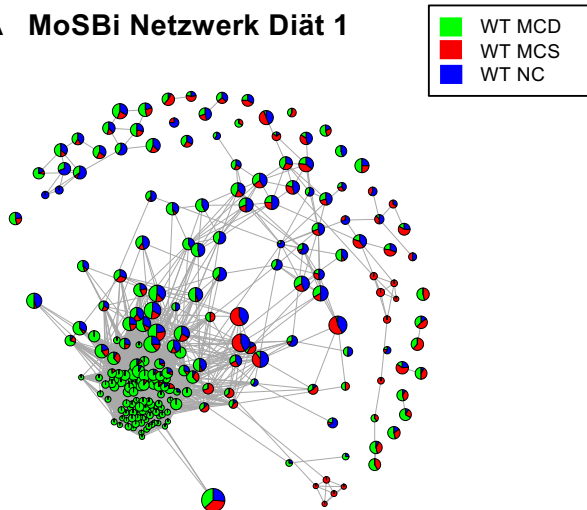
## Anhang

**Tabelle A 8: MoSBi (Genotyp) Fraktionswerte**

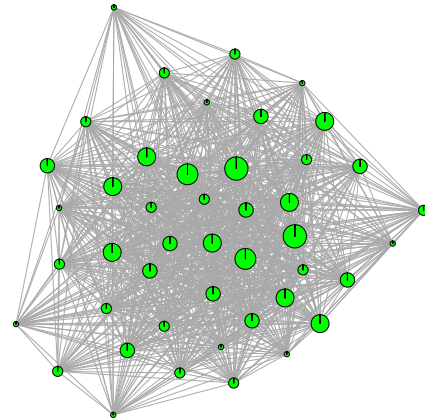
MoSBi Analyse der Genotypen WT-, HET- und KO-MCD. Fraktionswerte der extrahierten Louvain-Gemeinschaften der MoSBi-Netzwerke mit angereicherten WT- und HET-Fraktionen

MoSBi Genotyp 1 Gemeinschaft 6				MoSBi Genotyp 2 Gemeinschaft 5				MoSBi Genotyp 3 Gemeinschaft 6			
Typ	ID	Fraktion	Name	Typ	ID	Fraktion	Name	Typ	ID	Fraktion	Name
row	181	1,00	TG 52:2	row	181	1,00	TG 52:2	row	181	1,00	TG 52:2
row	182	1,00	TG 52:3	row	182	1,00	TG 52:3	row	182	1,00	TG 52:3
row	183	1,00	TG 52:4	row	183	1,00	TG 52:4	row	183	1,00	TG 52:4
row	191	1,00	TG 54:3	row	191	1,00	TG 54:3	row	191	1,00	TG 54:3
row	192	1,00	TG 54:4	row	192	1,00	TG 54:4	row	192	1,00	TG 54:4
row	193	1,00	TG 54:5	row	193	1,00	TG 54:5	row	193	1,00	TG 54:5
row	194	1,00	TG 54:6	row	194	1,00	TG 54:6	row	194	1,00	TG 54:6
row	204	1,00	TG 56:6	row	204	1,00	TG 56:6	row	204	1,00	TG 56:6
row	205	1,00	TG 56:7	row	205	1,00	TG 56:7	row	205	1,00	TG 56:7
row	49	0,97	PE 38:6	row	49	0,97	PE 38:6	row	49	0,97	PE 38:6
row	90	0,97	PI 38:4	row	90	0,97	PI 38:4	row	90	0,97	PI 38:4
row	133	0,97	PC 38:4	row	133	0,97	PC 38:4	row	133	0,97	PC 38:4
row	173	0,97	TG 50:2	row	173	0,97	TG 50:2	row	173	0,97	TG 50:2
row	184	0,97	TG 52:5	row	184	0,97	TG 52:5	row	184	0,97	TG 52:5
row	195	0,97	TG 54:7	row	195	0,97	TG 54:7	row	195	0,97	TG 54:7
row	202	0,97	TG 56:4	row	202	0,97	TG 56:4	row	202	0,97	TG 56:4
row	203	0,97	TG 56:5	row	203	0,97	TG 56:5	row	203	0,97	TG 56:5
row	206	0,97	TG 56:8	row	206	0,97	TG 56:8	row	206	0,97	TG 56:8
row	211	0,97	TG 58:10	row	211	0,97	TG 58:10	row	211	0,97	TG 58:10
row	213	0,97	TG 58:6	row	213	0,97	TG 58:6	row	213	0,97	TG 58:6
row	214	0,97	TG 58:7	row	214	0,97	TG 58:7	row	214	0,97	TG 58:7
row	215	0,97	TG 58:8	row	215	0,97	TG 58:8	row	215	0,97	TG 58:8
row	216	0,97	TG 58:9	row	216	0,97	TG 58:9	row	216	0,97	TG 58:9
row	217	0,97	TG 60:10	row	217	0,97	TG 60:10	row	217	0,97	TG 60:10
row	221	0,97	TG 60:8	row	221	0,97	TG 60:8	row	221	0,97	TG 60:8
row	222	0,97	TG 60:9	row	222	0,97	TG 60:9	row	222	0,97	TG 60:9
row	230	0,97	cholesterol	row	230	0,97	cholesterol	row	230	0,97	cholesterol
row	231	0,97	FA 16:0	row	231	0,97	FA 16:0	row	231	0,97	FA 16:0
row	234	0,97	FA 18:1	row	234	0,97	FA 18:1	row	234	0,97	FA 18:1
row	235	0,97	FA 18:2	row	235	0,97	FA 18:2	row	235	0,97	FA 18:2
column	10	0,97	WT_MCD_10	column	10	0,97	WT_MCD_10	column	10	0,97	WT_MCD_10
row	174	0,94	TG 50:3	row	174	0,94	TG 50:3	row	174	0,94	TG 50:3
row	131	0,91	PC 36:4	row	131	0,91	PC 36:4	row	131	0,91	PC 36:4
row	172	0,88	TG 50:1	row	172	0,88	TG 50:1	row	172	0,88	TG 50:1
row	207	0,79	TG 56:9	row	207	0,79	TG 56:9	row	207	0,79	TG 56:9
row	152	0,73	DG 34:2	row	152	0,73	DG 34:2	row	152	0,73	DG 34:2
column	27	0,67	Hetero_MCD_13	column	27	0,67	Hetero_MCD_13	column	27	0,67	Hetero_MCD_13
row	218	0,64	TG 60:11	row	218	0,64	TG 60:11	row	218	0,64	TG 60:11
row	155	0,61	DG 36:3	row	155	0,61	DG 36:3	row	155	0,61	DG 36:3
column	6	0,61	WT_MCD_6	column	6	0,61	WT_MCD_6	column	6	0,61	WT_MCD_6
column	8	0,61	WT_MCD_8	column	8	0,61	WT_MCD_8	column	8	0,61	WT_MCD_8
row	175	0,52	TG 50:4	row	175	0,52	TG 50:4	row	175	0,52	TG 50:4
row	127	0,36	PC 34:2	row	127	0,36	PC 34:2	row	127	0,36	PC 34:2
column	20	0,36	Hetero_MCD_6	column	20	0,36	Hetero_MCD_6	column	20	0,36	Hetero_MCD_6
row	47	0,33	PE 38:4	row	47	0,33	PE 38:4	row	47	0,33	PE 38:4
column	2	0,27	WT_MCD_2	column	2	0,27	WT_MCD_2	column	2	0,27	WT_MCD_2
row	185	0,24	TG 52:6	row	185	0,24	TG 52:6	row	185	0,24	TG 52:6
column	13	0,24	WT_MCD_13	column	13	0,24	WT_MCD_13	column	13	0,24	WT_MCD_13
column	7	0,21	WT_MCD_7	column	7	0,21	WT_MCD_7	column	7	0,21	WT_MCD_7
row	226	0,12	CE 18:1	row	226	0,12	CE 18:1	row	226	0,12	CE 18:1
row	156	0,09	DG 36:4	row	156	0,09	DG 36:4	row	156	0,09	DG 36:4
column	19	0,09	Hetero_MCD_5	column	19	0,09	Hetero_MCD_5	column	19	0,09	Hetero_MCD_5
column	26	0,09	Hetero_MCD_12	column	26	0,09	Hetero_MCD_12	column	26	0,09	Hetero_MCD_12
column	9	0,06	WT_MCD_9	column	9	0,06	WT_MCD_9	column	9	0,06	WT_MCD_9
row	227	0,03	CE 18:2	row	227	0,03	CE 18:2	row	227	0,03	CE 18:2
column	37	0,03	Hetero_MCD_15	column	37	0,03	Hetero_MCD_15	column	37	0,03	Hetero_MCD_15

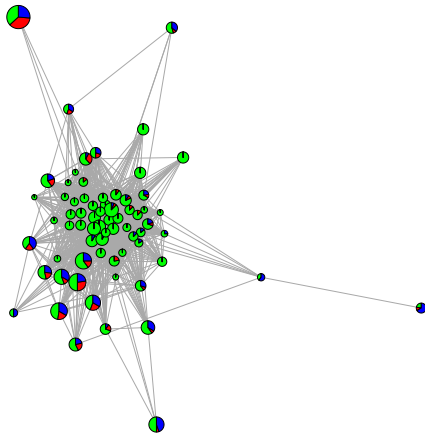
**A MoSbi Netzwerk Diät 1**



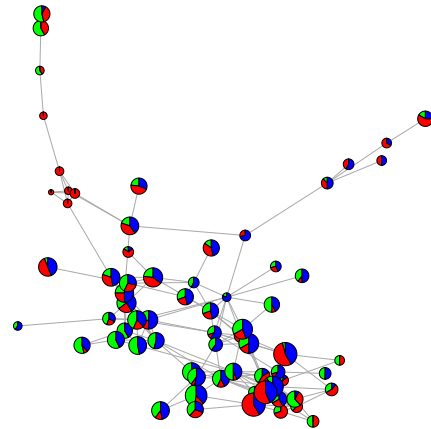
**B Abbildung: Community 5**



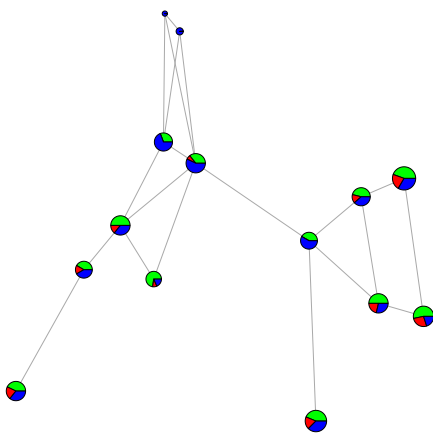
**C Community 1**



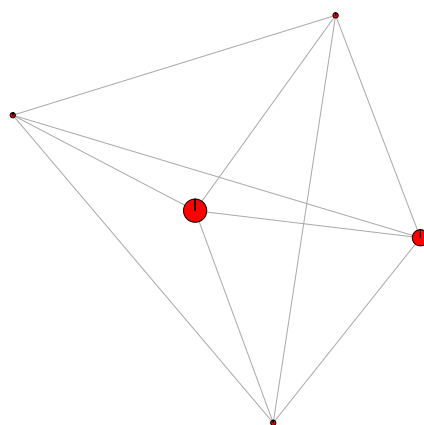
**D Community 2**



**E Community 3**

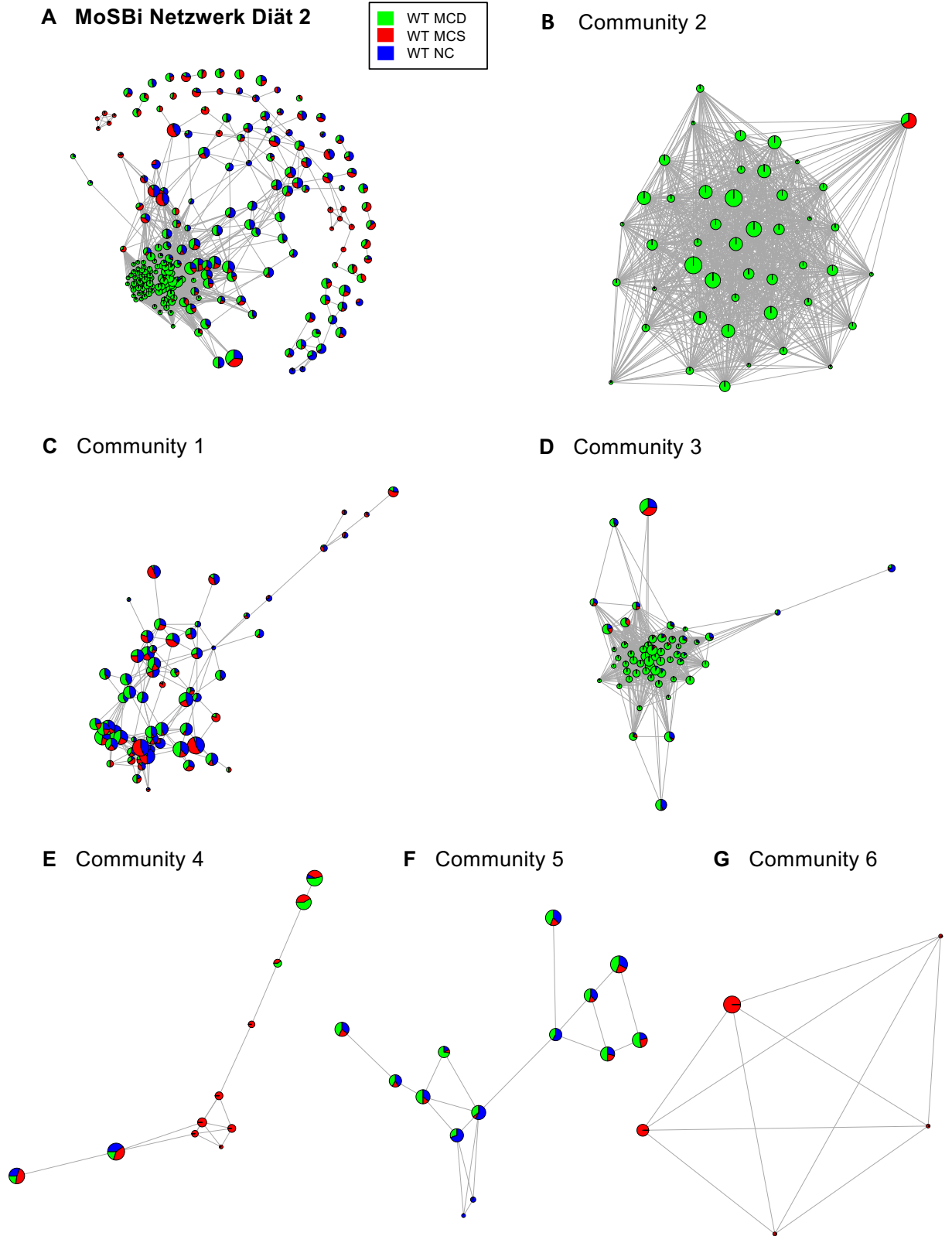


**F Community 4**



**Abbildung A 21: MoSbi Netzwerk Diät 1**

(A) MoSbi Netzwerk der WT-Mäuse der MCD, MCS oder des NFs mit (B-F) allen Louvain-Gemeinschaften (engl.: Community)

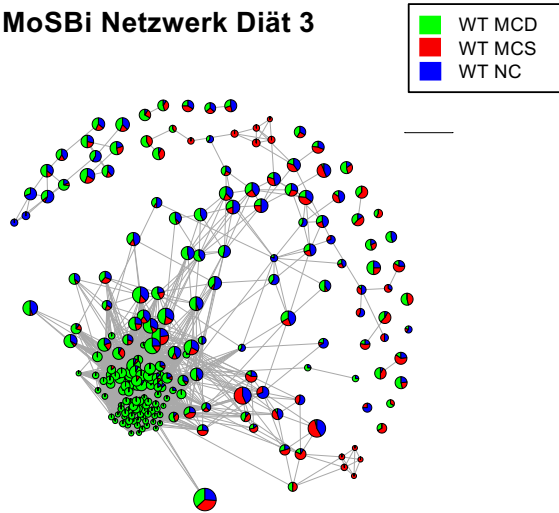


**Abbildung A 22: MoSbi Netzwerk Diät 2**

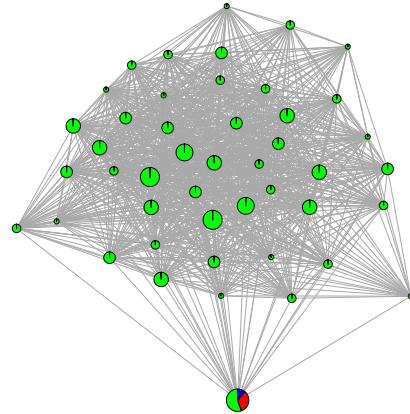
(A) MoSbi Netzwerk der WT-Mäuse der MCD, MCS oder des NFs mit (B-G) allen Louvain-Gemeinschaften (engl.: Community)



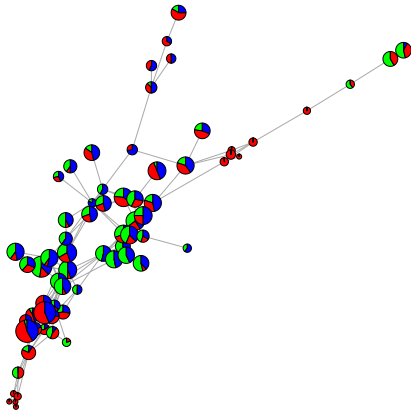
**A MoSBi Netzwerk Diät 3**



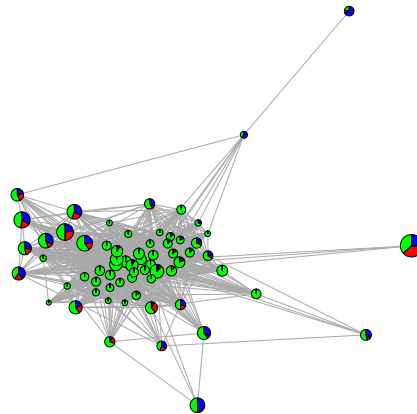
**B Community 2**



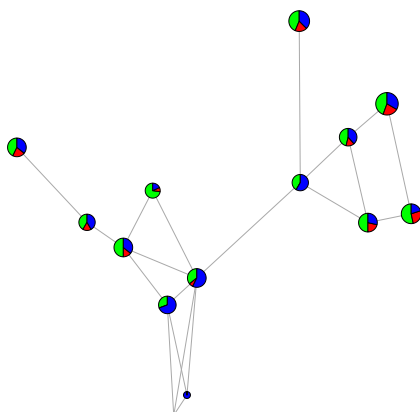
**C Community 1**



**D Community 3**



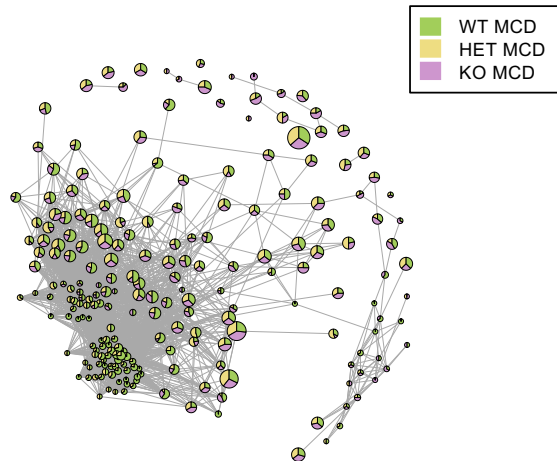
**E Community 4**



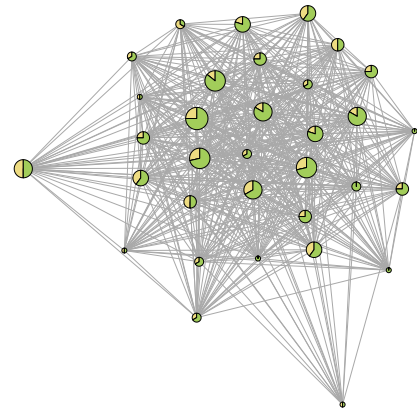
**Abbildung A 23: MoSBi Netzwerk Diät 3**

(A) MoSBi Netzwerk der WT-Mäuse der MCD, MCS oder des NFs mit (B-E) allen Louvain-Gemeinschaften (engl.: Community)

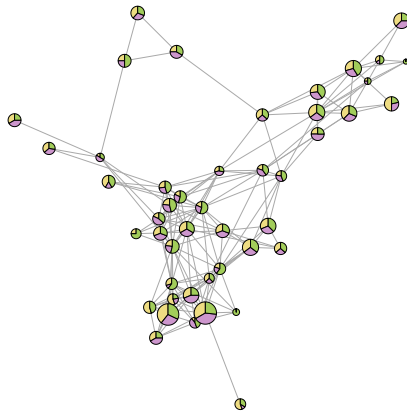
**A MoSBi Netzwerk Genotyp 1**



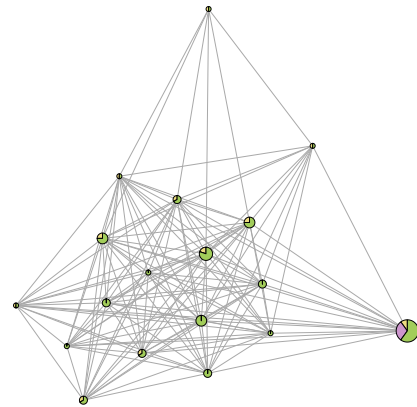
**B Abbildung: Community 6**



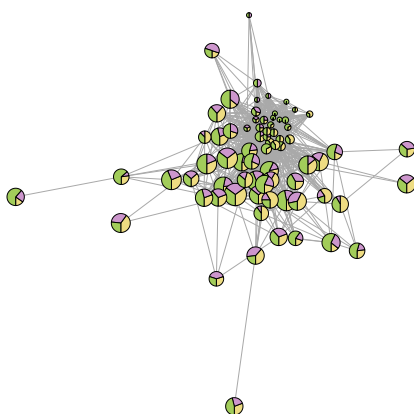
**C Community 1**



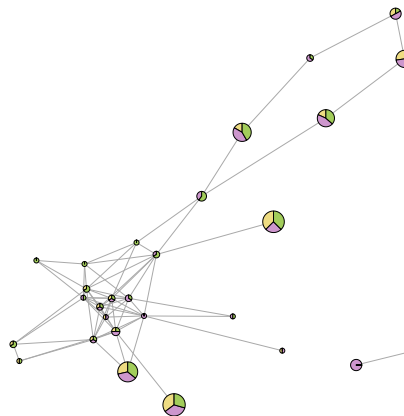
**D Community 2**



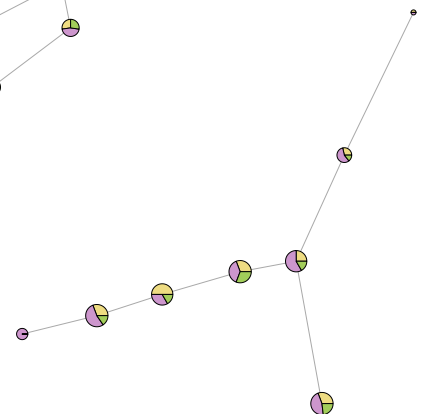
**E Community 3**



**F Community 4**



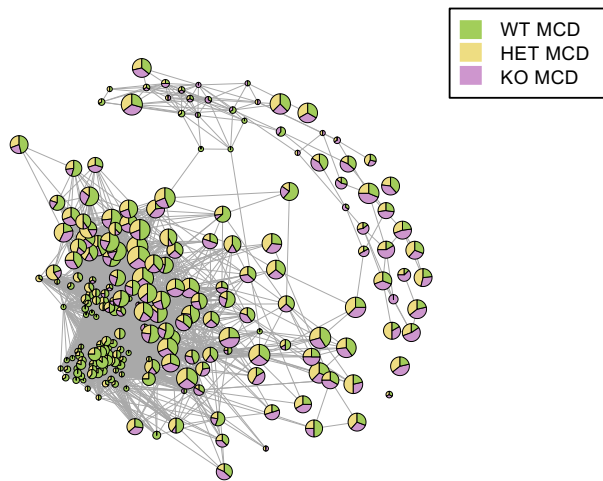
**G Community 5**



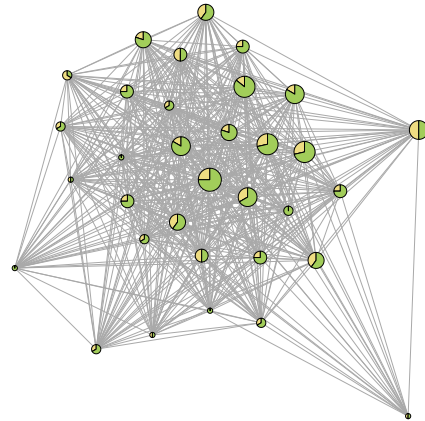
**Abbildung A 24: MoSBi Netzwerk Genotyp 1**

(A) MoSBi Netzwerk der WT-, HET- und KO-MCD Mäuse mit (B-G) allen Louvain-Gemeinschaften (engl.: Community)

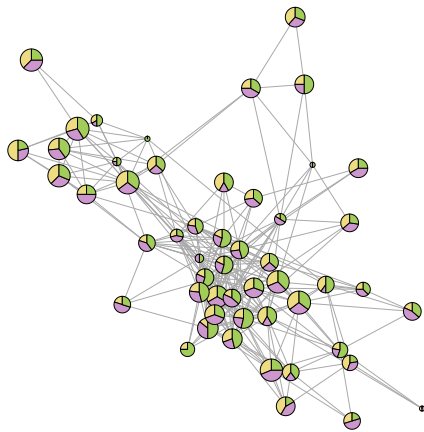
**A MoSBi Netzwerk Genotyp 2**



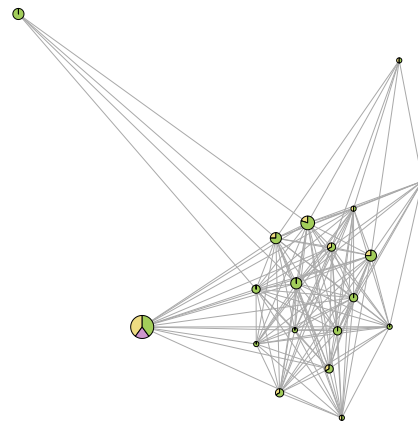
**B Community 5**



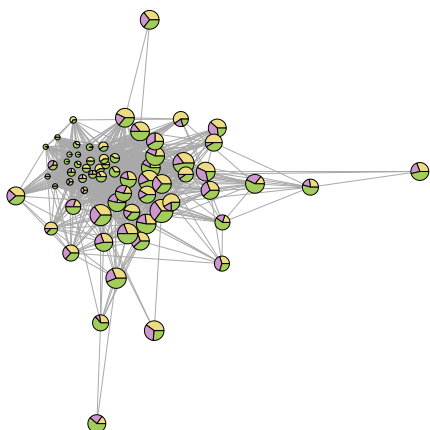
**C Community 1**



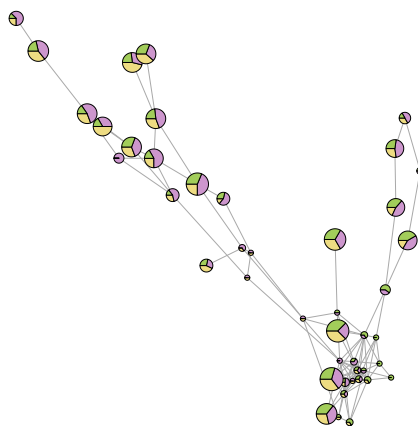
**D Community 2**



**E Community 3**



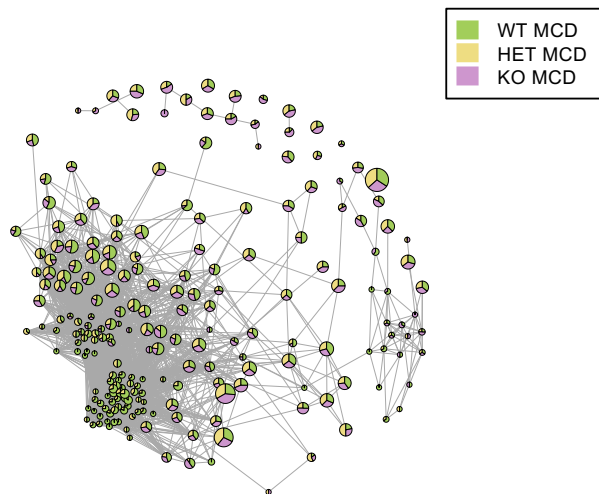
**F Community 4**



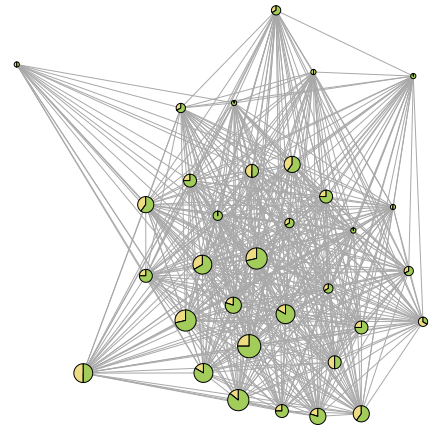
**Abbildung A 25: MoSBi Netzwerk Genotyp 2**

(A) MoSBi Netzwerk der WT-, HET- und KO-MCD Mäuse mit (B-F) allen Louvain-Gemeinschaften (engl.: Community)

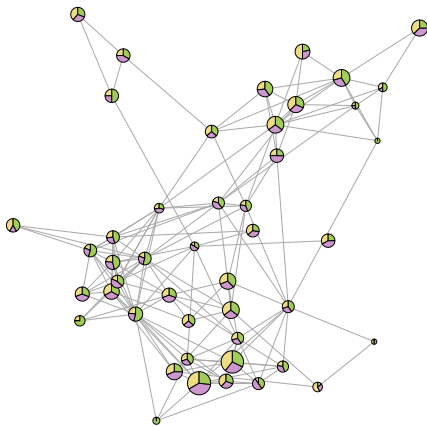
**A MoSBI Netzwerk Genotyp 3**



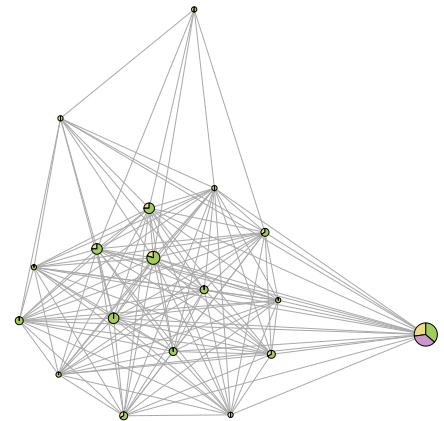
**B Community 6**



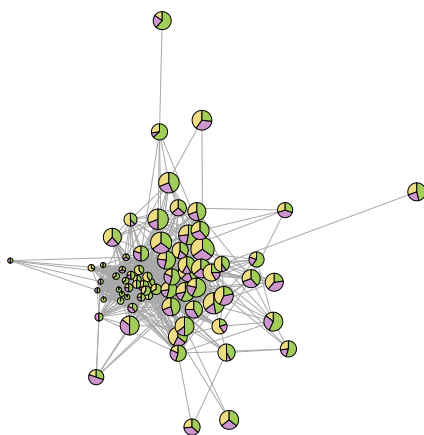
**C Community 1**



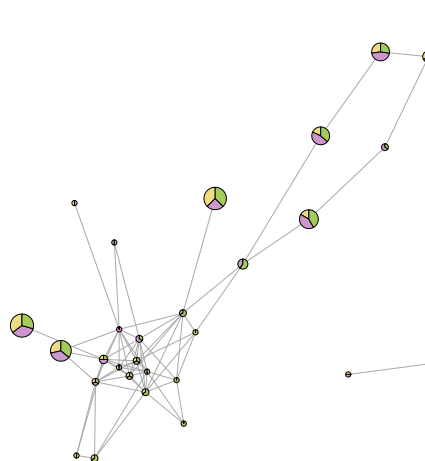
**D Community 2**



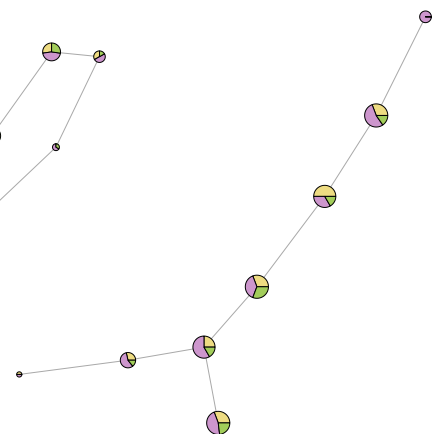
**E Community 3**



**F Community 4**

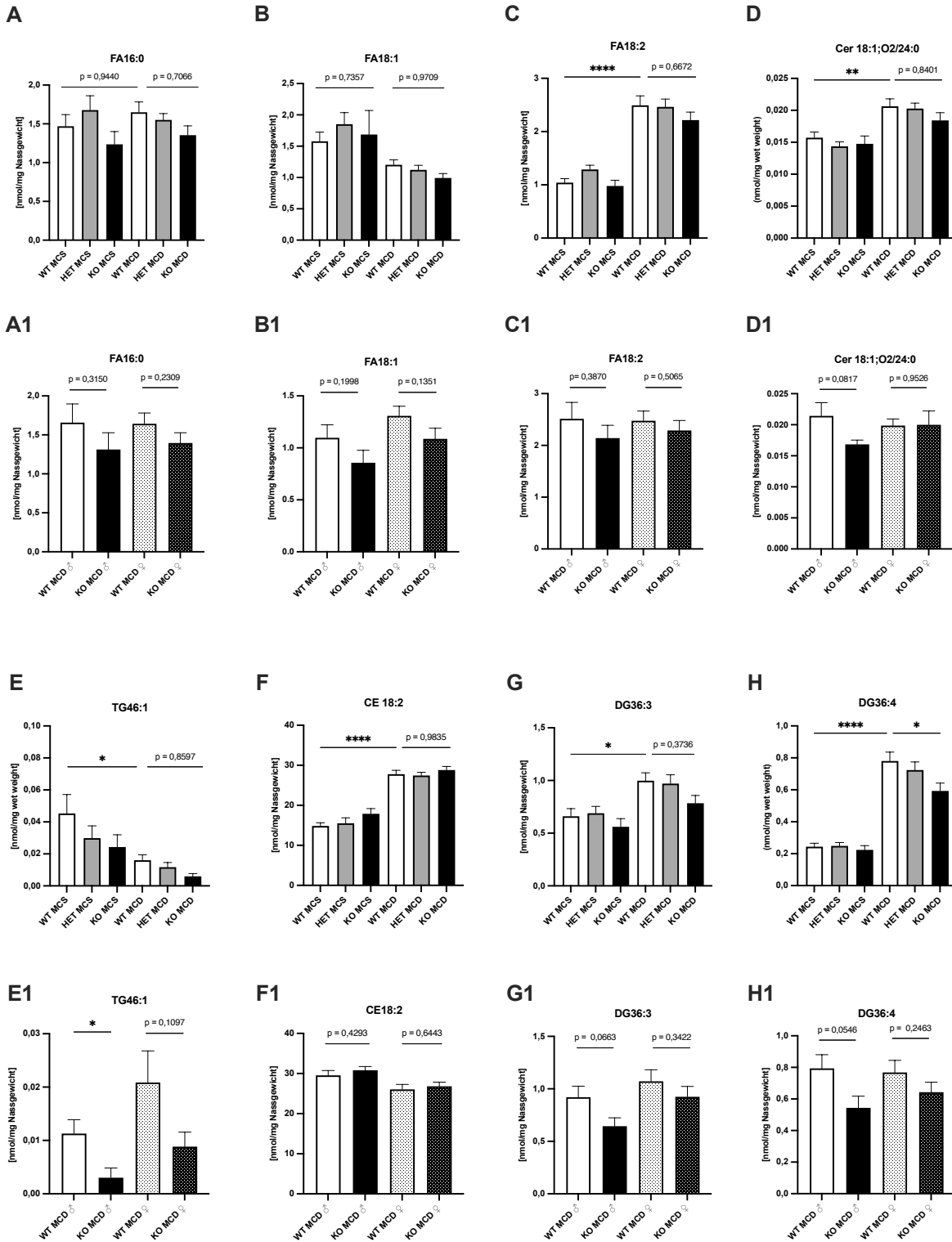


**G Community 5**



**Abbildung A 26: MoSBI Netzwerk Genotyp 3**

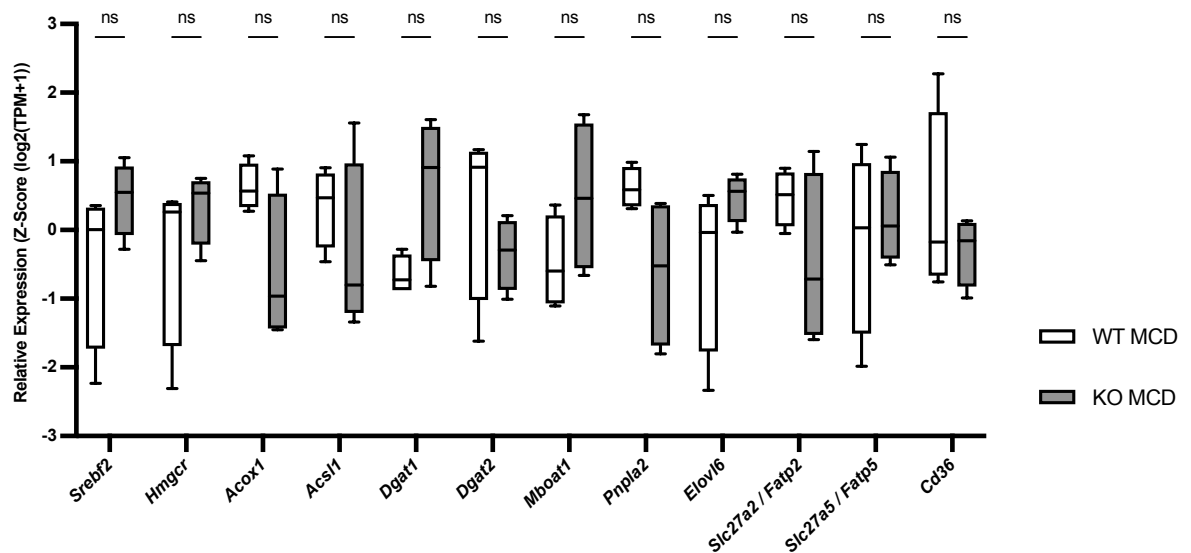
(A) MoSBI Netzwerk der WT-, HET- und KO-MCD Mäuse mit (B-G) allen Louvain-Gemeinschaften (engl.: Community)



**Abbildung A 27: Lipidspezies Analyse des Lipidoms**

Dargestellt sind die Lipidspezies (A) FA16:0, (B) FA18:1, (C) FA18:2, (D) Cer 18:1;O2/24:0, (E) TG46:1, (F) CE18:2, (G) DG36:3 und (H) DG36:4 in nmol/mg Nassgewicht auf Basis des Lipidoms. (A1) FA16:0, (B1) FA18:1, (C1) FA18:2, (D1) Cer 18:1;O2/24:0, (E1) TG46:1, (F1) CE18:2, (G1) DG36:3 und (H1) DG36:4 sind entsprechende geschlechtergetrennte Analyse der WT- und KO-MCD Mäuse. Die Daten werden als Säulendiagramm mit Mittelwert + SEM dargestellt (WT MCS n=14, HET MCS n=14, KO MCS n=13, WT MCD n=14, HET MCD n=14, KO MCD n=12). Die Signifikanz wurde mit einem ungepaarten t-Test bestimmt ns= nicht signifikant, \* =  $p \leq 0,05$ , \*\* =  $p \leq 0,01$ , \*\*\* =  $p \leq 0,001$ , \*\*\*\* =  $p \leq 0,0001$ .

## Anhang



### Abbildung A 28: Expressionsanalyse lipogener Gene auf Basis der RNA-Seq

Ergebnissen der RNA-Sequenzierung in TPMs log2 und Z-Score transformiert. Gezeigt sind die relativen Expressionen der angegebenen mRNAs von WT-MCD und KO-MCD Mäusen. Dargestellt als Box-Whisker-Plot mit Mittelwert (10-90 Perzentil Box und Min-Max Whisker). Die Statistik erfolgte mit einem ungepaarten t-Test ns= nicht signifikant, \* = signifikant mit  $p < 0,05$ .

**Tabelle A 9: Enzyme des Lipidstoffwechsels**

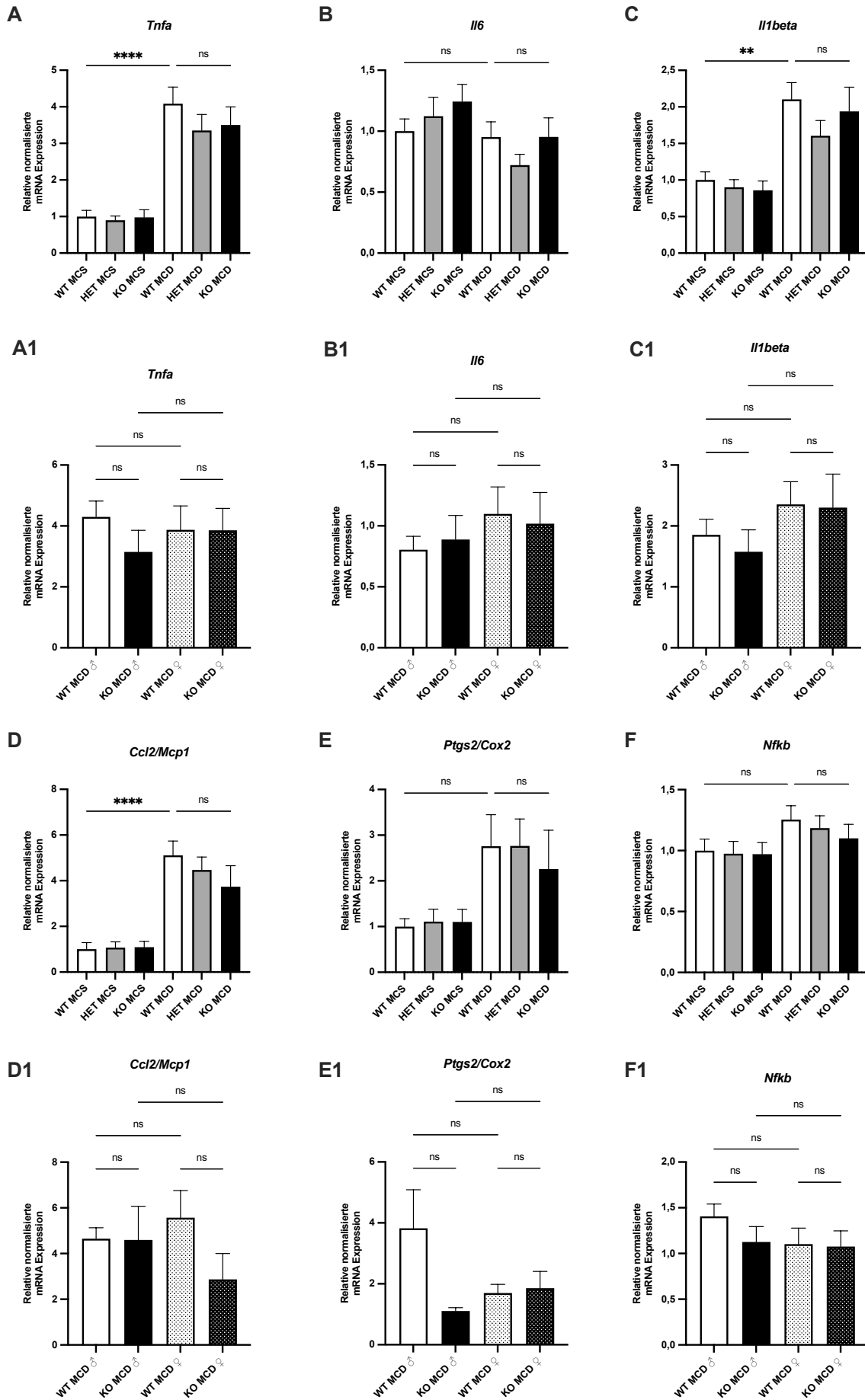
<b>Funktion</b>	<b>Offizielles Symbol</b>	<b>Offizieller Name</b>	<b>Synonym</b>
Lipid-Aufnahme			
Transportprotein für Fettsäuren-Aufnahme	SLC27A2	solute carrier family 27 member 2	FATP2 (Fatty acid transport protein 2)
Transportprotein für Fettsäuren-Aufnahme	SLC27A5	solute carrier family 27 member 5	FATP5 (Fatty acid transport protein 5)
Fettsäuretranslokase	CD36		
Fettsäuren-Aufnahme	CAV1	Caveolin-1	
De-novo-Lipogenese			
Katalysiert die Reaktion von Acetyl-CoA zu Malonyl-CoA	ACACA	Acetyl-CoA carboxylase alpha	ACC1
Katalysieren die Synthese von Palmitat aus Acetyl-CoA und Malonyl-CoA zu langkettigen gesättigten Fettsäuren	FASN	Fatty-acid-synthase	FAS
Katalysiert die Synthese von Ölsäure	SCD	Stearoyl-CoA desaturase	SCD1
Katalysiert den ersten und geschwindigkeitsbeschränkenden Schritt der Fettsäureelongation (verwendet Malonyl-CoA als Kohlenstoff-Donor)	ELOVL6	ELOVL fatty acid elongase 6	
Triglycerid Synthese			
Katalysiert die Umwandlung von Diacylglyceriden und Fettacyl-CoA in Triacylglyceride	DGAT1	Diacylglycerol O-acyltransferase 1	DGAT
Fettsäureoxidation			
CPT I ist das Schlüsselenzym für den Carnitin-abhängigen Transport von LCFAs durch die innere Mitochondrienmembran	CPT1A	Carnitine palmitoyltransferase 1A	

## Anhang

Lipid Metabolismus Regulation			
Transkriptionsfaktor, der die Expression von Genen reguliert, die an der Fettsäure- und Cholesterinsynthese	SREBF1	Sterol regulatory element binding transcription factor 1	SREBP1
Transkriptionsfaktor, der die Expression von Genen reguliert, die an der Cholesterinsynthese und -aufnahme beteiligt sind	SREBF2	Sterol regulatory element binding transcription factor 2	SREBP2
Transkriptionsfaktor, eine Rolle bei der Regulierung des Glukose- und Lipidstoffwechsels spielt. MLXIPL wird durch Glukose aktiviert und steuert die Expression von Genen, die an der Glykolyse, Lipogenese und Gluconeogenese beteiligt sind	MLXIPL	MLX interacting protein like	CHREBP (Carbohydrate Response Element Binding Protein)
Kernrezeptor, der die Genexpression im Lipid- und Glukosestoffwechsel beeinflusst	PPARA	Peroxisome proliferator-activated receptor alpha	PPARalpha
Transkriptionsfaktor, der eine wichtige Rolle im Fett- und Glukosestoffwechsel spielt	PPARG	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	PPARgamma



# Anhang



## Abbildung A 29: Expressionsanalyse inflammatorisch relevanter Gene

Dargestellt sind die Expressionsanalysen der mRNA von (A) *Tnfa*, (B) *Il6*, (C) *Il1beta*, (D) *Ccl2/Mcp1*, (E) *Ptgs2/Cox2* (F) *Nfkb* von allen Genotypen der MCD-Diät und MCS-Kontrolle. Diese wurden per qPCR mit Standard bestimmt und sind dargestellt als Verhältnis der mRNA zu den Haushaltsgenen *18S*, *Ppia* und *Csnk2a2*, normalisiert auf die Kontrollgruppe WT MCS. (WT MCS n=14, HET MCS n=14, KO MCS n=13, WT MCD n=14, HET MCD n=14, KO MCD n=12). Die Signifikanz wurde mit einem ungepaarten t-Test bestimmt (ns= nicht signifikant, \* =  $p \leq 0,05$ ; \*\* =  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$  \*\*\*\* =  $p \leq 0,0001$ ). (A1) *Tnfa*, (B1) *Il6*, (C1) *Il1beta*, (D1) *Ccl2/Mcp1*, (E1) *Ptgs2/Cox2* (F1) *Nfkb* sind die entsprechenden geschlechtergetrennten Analysen der WT- und KO-MCD Mäuse. Die Daten werden als Säulendiagramm mit Mittelwert + SEM dargestellt (WT MCD n=7 männlich; n=7 weiblich; KO MCD n=6 männlich; n=6 weiblich). Die Signifikanz wurde mit einem ungepaarten t-Test bestimmt (ns= nicht signifikant, \* =  $p \leq 0,05$ ; \*\* =  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$  \*\*\*\* =  $p \leq 0,0001$ ).

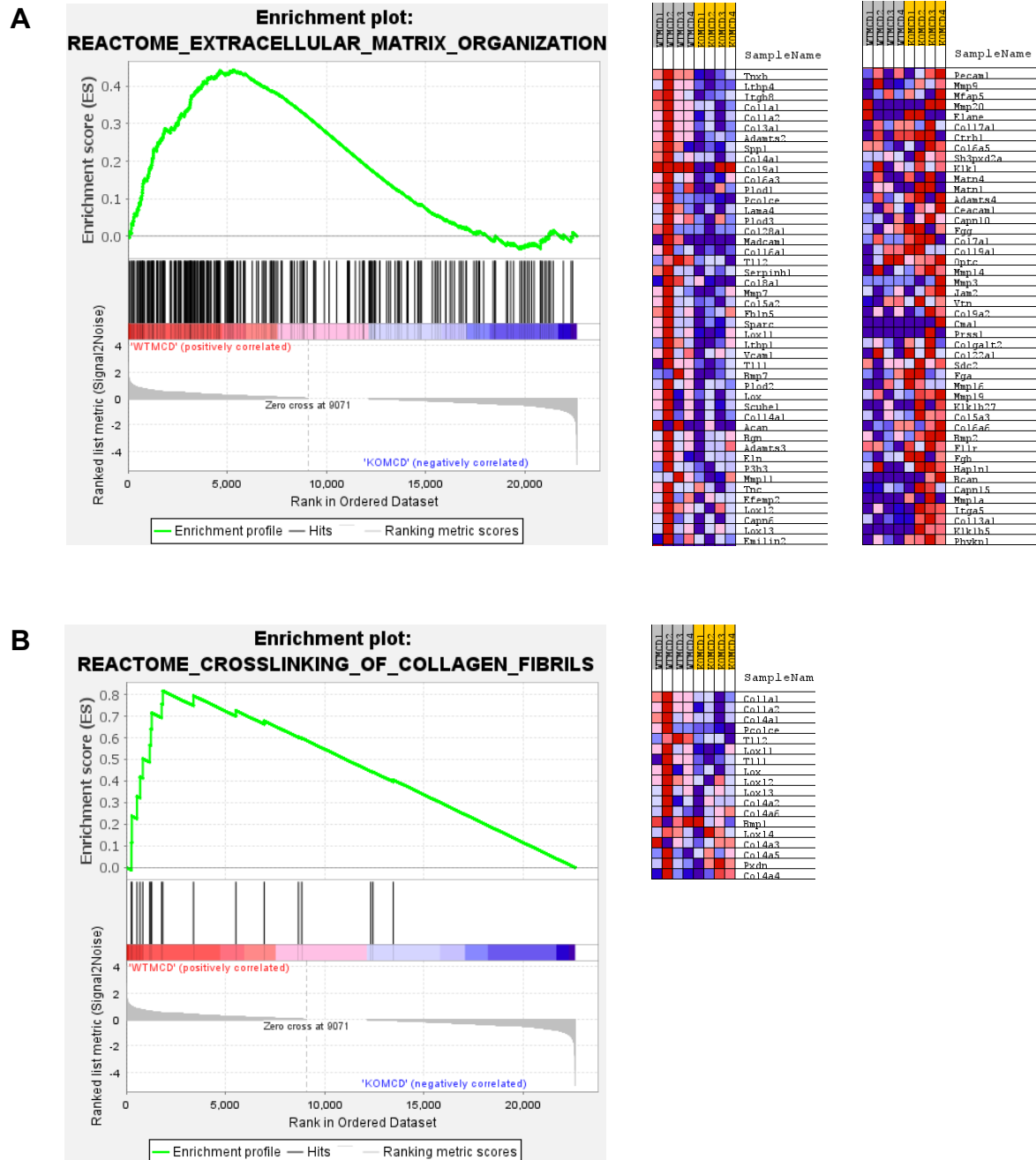


Abbildung A 30: GSEA Reactome

Gezeigt ist die GSEA (Reactome) von WT- und KO-MCD Mäusen (n=4). (A) Dargestellt ist das Gen-Set Extracellular Matrix Organization mit sowohl der höchsten Anzahl enthaltener Gene als auch einen der höchsten NESs. Repräsentativ wird die Heat Map sowie der Enrichment plot präsentiert. (B) Gen-Set Crosslinking of Collagen Fibrils mit dem insgesamt höchsten NES. Repräsentativ wird die gesamte Heat Map sowie der Enrichment plot präsentiert.

## Anhang

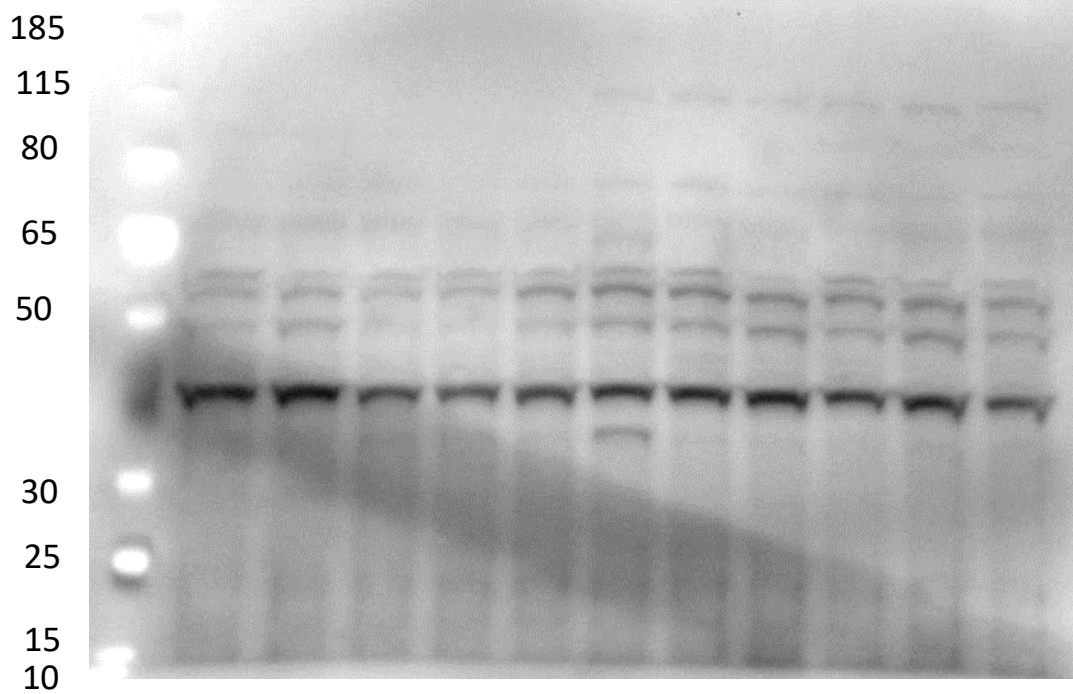
**Tabelle A 10: GSEA Reactom Ergebnisse (Top 10)**

Grün hervorgehoben sind die im Text erwähnten Gen-Sets mit ihren Besonderheiten

NAME	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX	LEADING EDGE
REACTOME_CROSSLINKING_OF_COLLAGEN_FIBRILS	18	0,82	2,19	0,00	0,0060	6	1843	tags=56%, list=8%, signal=60%
REACTOME_COLLAGEN_FORMATION	76	0,56	2,11	0,00	0,0056	11	3713	tags=47%, list=16%, signal=56%
REACTOME_MOLECULES_ASSOCIATED_WITH_ELASTIC_FIBRES	32	0,64	2,07	0,00	0,0048	14	3984	tags=66%, list=18%, signal=80%
REACTOME_ASSEMBLY_OF_COLLAGEN_FIBRILS_AND_OTHER_MULTIMERIC_STRUCTURES	50	0,59	2,05	0,00	0,0041	16	3713	tags=46%, list=16%, signal=55%
REACTOME_INHIBITION_OF_DNA_RECOMBINATION_AT_TELOMERE	61	0,56	2,05	0,00	0,0035	17	4594	tags=49%, list=20%, signal=62%
REACTOME_COLLAGEN_BIOSYNTHESIS_AND_MODIFYING_ENZYMES	61	0,56	2,02	0,00	0,0046	27	4196	tags=52%, list=19%, signal=64%
REACTOME_ELASTIC_FIBRE_FORMATION	39	0,61	2,01	0,00	0,0046	31	3507	tags=62%, list=16%, signal=73%
REACTOME_EXTRACELLULAR_MATRIX_ORGANIZATION	260	0,44	1,99	0,00	0,0053	41	5305	tags=47%, list=23%, signal=61%
REACTOME_NON_INTEGRIN_MEMBRANE_ECM_INTERACTIONS	32	0,58	1,85	0,00	0,0398	299	5643	tags=63%, list=25%, signal=83%
REACTOME_TGF_BETA_RECEPTOR_SIGNALING_ACTIVATES_SMADS	38	0,56	1,85	0,00	0,0362	0.3	5739	tags=63%, list=25%, signal=85%

## Anhang

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
PR	WT 1	WT 3	WT 4	WT 5	WT 6	KO 1	KO 2	KO 3	KO 4	KO 5	KO 6

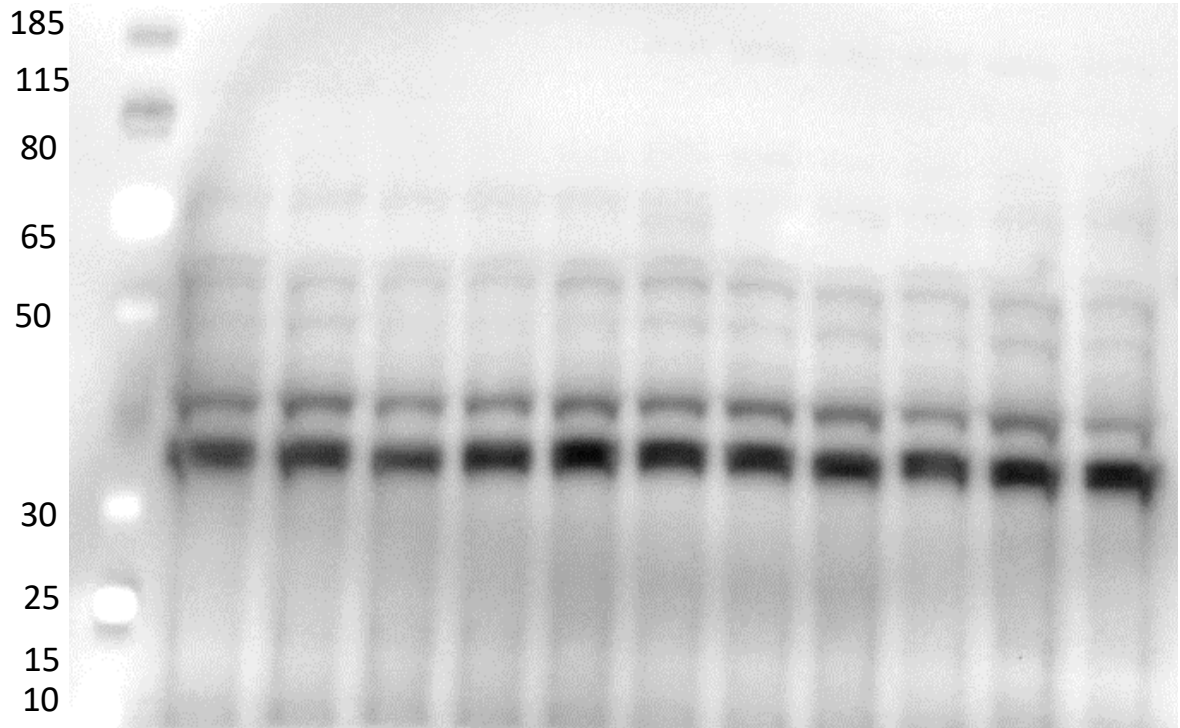


### Abbildung A 31: Western Blot Smad7

Repräsentativer ungeschnittener Western Blot von WT- und KO-MCD-Mäusen. Gezeigt ist die Protein-Expression von Smad7 (46kDa).

## Anhang

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
PR	WT 1	WT 3	WT 4	WT 5	WT 6	KO 1	KO 2	KO 3	KO 4	KO 5	KO 6



**Abbildung A 32: Western Blot Gapdh**

Repräsentativer ungeschnittener Western Blot von WT- und KO-MCD-Mäusen. Gezeigt ist die Protein-Expression von dem Haushaltsgen Gapdh (37kDa).

## 8.5 Untersuchung der Regulation von *NEAT1* durch RNA-bindende Proteine (RBP)

### 8.5.1 Einleitung

RNA-bindende Proteine (RBPs) sind an der posttranskriptionellen Regulation diverser Transkripte beteiligt. Sie können zum Beispiel lncRNAs über bestimmte Motive binden und auf diese Weise stabilisieren oder degradieren. Zu den häufigsten Motiven für die RBP-Bindung eines Transkripts gehören AU-reiche Elemente (AREs). HuR/ELAVL1 (engl. Abkürzung für ELAV like RNA binding protein 1), das Proteinprodukt des ELAV1-Gens, ist ein RBP, dass drei RNA-Erkennungsmotive (engl.: RNA recognition motif, RRM) enthält, über die es bevorzugt an AREs bindet.

AREs sind Signale für einen schnellen RNA-Abbau. Durch die Blockierung dieser Erkennungsstellen kann HuR/ELAVL1 seine RNA-Interaktionspartner stabilisieren (Jonas et al., 2020). Vorläufige Daten weisen darauf hin, dass HuR/ELAVL1 eine stabilisierende Wirkung haben könnte, während ZFP36 ring finger protein (TTP/ZFP36) zur Destabilisierung von *NEAT1* beitragen könnte. Zum Beispiel konnte in Ovarialkarzinomzellen gezeigt werden, dass *NEAT1* durch das RBP HuR/ELAVL1 gebunden und dadurch reguliert wird (Chai et al., 2016). Interessanterweise sind HuR/ELAVL1 und TTP/ZFP36 auch in der Pathophysiologie der Leber involviert. Die Expression von HuR/ELAVL1 ist sowohl bei humaner Steatohepatitis (GSE28619) als auch im MCD-Mausmodell hochreguliert, TTP/ZFP36 hingegen ist in Proben aus GEO-Datensätzen (GSE28619) von humaner Steatohepatitis vermindert (Schultheiss et al., 2017).

HuR/ELAVL1 und TTP/ZFP36 weisen eine große Überlappung von Target-RNAs auf, die durch HuR/ELAVL1 stabilisiert, durch TTP/ZFP36 hingegen abgebaut werden (Mukherjee et al., 2014). TTP/ZFP36 interagiert insbesondere mit AU-reichen Sequenzen, welche eine Teilmenge der U-reichen Sequenzen darstellen, mit denen HuR/ELAVL1 interagiert (Mukherjee et al., 2014). Eine In-silico-Analyse ergab, dass die *NEAT1\_v2*-Sequenz 61 UUUUU- und 21 AUUUA-Motive enthält, was darauf hindeutet, dass *NEAT1* eine Ziel-RNA von HuR/ELAVL1 und TTP/ZFP36 sein könnte.

Um die RBP-abhängige Regulation von *NEAT1* zu charakterisieren, wurden in humanen Leberkrebszellen RIPs mit anschließender qPCR durchgeführt, um die direkte Bindung von *NEAT1* an diese RBPs zu analysieren. Zusätzlich wurde die Stabilität von *NEAT1* unter veränderten Expressionsbedingungen von TTP/ZFP36 und HuR/ELAVL1 untersucht. Hierzu wurden Überexpressions- oder Knockdown-Experimente durchgeführt. Weiterhin wurden Kombinationen aus Knockdown-Experiment mit der Hemmung der Transkription durch Actinomycin D durchgeführt, um zu ermitteln, ob *NEAT1* durch die reduzierte Expression des RBPs weniger stabil ist.

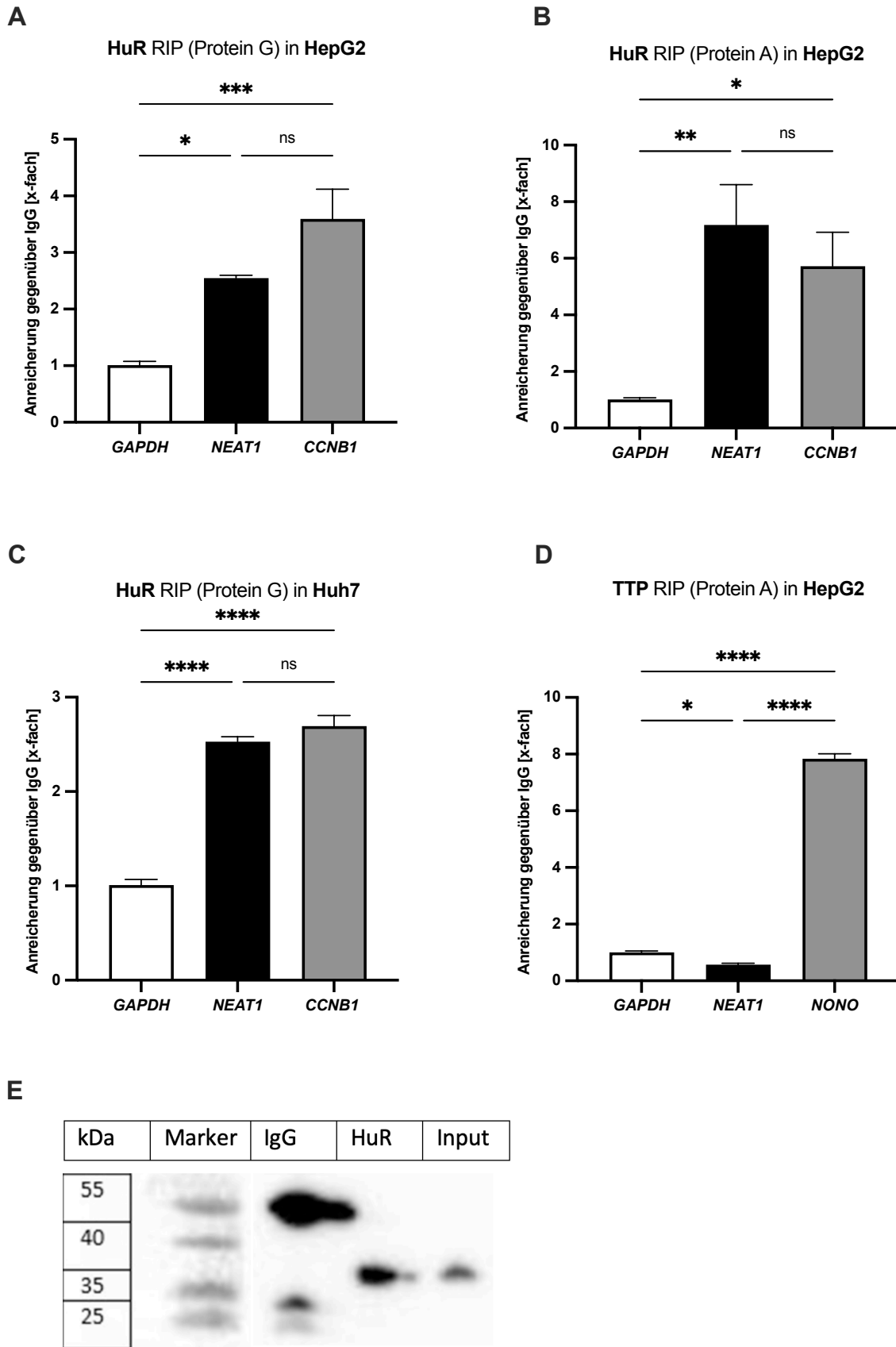
### **8.5.2 RNA-Immunpräzipitationen von HuR/ELAVL1 und TTP/ZFP36**

Die RIP-Experimente wurden für HuR/ELAVL1 in Huh7-Zellen und HepG2-Zellen mit Protein A oder Protein G gekoppelten magnetischen Beads durchgeführt. Die RIPs bestätigten, dass HuR/ELAVL1 an *NEAT1* in humanen Hepatozyten bindet. *NEAT1* war in HuR/ELAVL1-Immunpräzipitaten signifikant stärker angereichert als die Negativkontrolle GAPDH (siehe Abbildung A 33). Auch die Positivkontrolle Cyclin B1 (CCNB1) zeigte eine signifikant angereicherte Transkriptmenge im Vergleich zur Negativkontrolle. Eine erfolgreiche Bindung des HuR/ELAVL1-Antikörpers an die Protein A magnetischen Beads wurden per Western Blot überprüft (siehe Abbildung A 33E).

Das RIP-Experiment für TTP/ZFP36 wurde in HepG2-Zellen mit Protein A gekoppelten magnetischen Beads durchgeführt. Es zeigte sich jedoch keine Anreicherung von *NEAT1* in den TTP/ZFP36-Immunpräzipitaten (siehe Abbildung A 33D). Die Positivkontrolle Non-POU domain containing octamer binding (NONO) zeigte eine stark signifikante Anreicherung gegenüber der Negativkontrolle. Interessanterweise handelt es sich bei NONO um ein RBP, dass ebenfalls für den Aufbau von Paraspeckles essenziell ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass *NEAT1* an HuR/ELAVL1 bindet, während mit TTP/ZFP36 keine Interaktion beobachtet werden konnte.





**Abbildung A 33: HuR/ELAVL1- oder TTP-RIP in HepG2- oder Huh7-Zellen**

Gezeigt sind die RNA-Immunpräzipitationen von HuR/ELAVL1 oder TTP mit magnetischen Beads (Protein A oder Protein G-gekoppelt) in den Zelllinien HepG2 oder Huh7. (A) RNA-Immunpräzipitation von HuR/ELAVL1

mit Protein G-gekoppelten Beads in HepG2-Zellen. Gezeigt ist die x-fache Anreicherung von *NEAT1* gegenüber der IgG-Kontrolle (n=3). GAPDH und CCNB1 dienen als Kontrollen. (B) RNA-Immunpräzipitation von HuR/ELAVL1 mit Protein A-gekoppelten Beads in HepG2-Zellen. Gezeigt ist die x-fache Anreicherung von *NEAT1* gegenüber der IgG-Kontrolle (n=3). GAPDH und CCNB1 dienen als Kontrollen. (C) RNA-Immunpräzipitation von HuR/ELAVL1 mit Protein G-gekoppelten Beads in Huh7-Zellen. Gezeigt ist die x-fache Anreicherung von *NEAT1* gegenüber der IgG-Kontrolle (n=2). GAPDH und CCNB1 dienen als Kontrollen. (D) RNA-Immunpräzipitation von TTP mit Protein A-gekoppelten Beads in HepG2-Zellen. Gezeigt ist die x-fache Anreicherung von *NEAT1* gegenüber der IgG-Kontrolle (n=2). GAPDH und NONO dienen als Kontrollen. Die Daten werden als Säulendiagramm mit Mittelwert + SEM präsentiert. Die Signifikanz wurde mit einer ANOVA und Tukeys post hoc Test ermittelt (ns= nicht signifikant, \*p <0,05, \*\*p <0,01, \*\*\*p <0,001, \*\*\*\* p <0,0001). (E) Western Blot der RIP von HuR/ELAVL1 in HepG2-Zellen. Aufgetragen sind die IgG-Kontrolle, HuR/ELAVL1 und der Input (HepG2-Zellen).

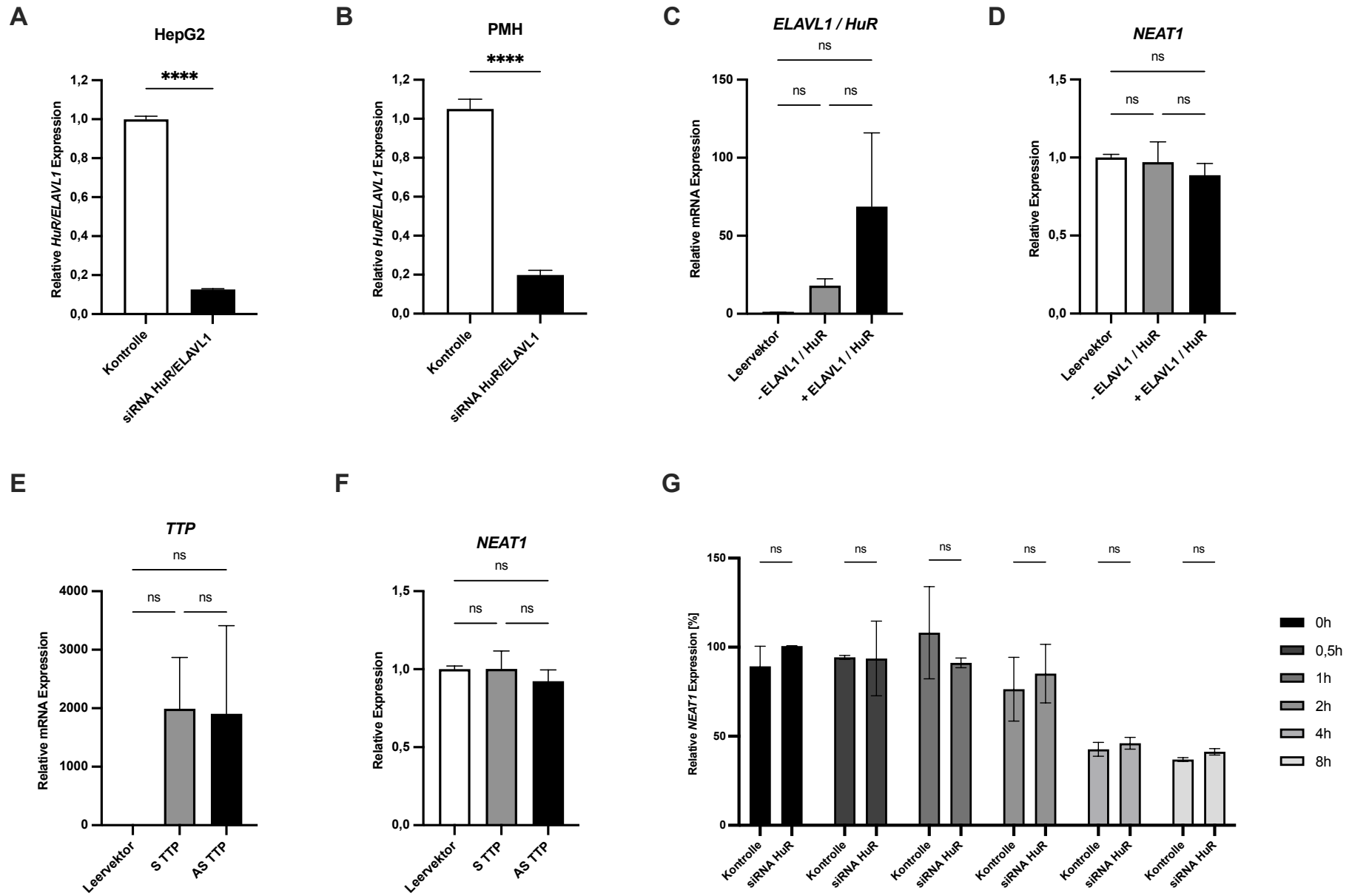
### 8.5.3 Knockdown- und Überexpressionsexperimente

Um die Expression von *NEAT1* unter veränderten Expressionsleveln der RBPs zu untersuchen wurde HuR/ELAVL1 mit einer siRNA herunterreguliert oder mit dem pZeo-HuR/ELAVL1 oder dem pZeo-TTP/ZFP36-Vektor überexprimiert.

In HepG2-Zellen konnte HuR/ELAVL1 auf circa 10 bis 15% Restexpression herunterreguliert werden (siehe Abbildung A 34A). Weiterhin wurden primäre murine Hepatozyten mit siRNA transfiziert, dessen Restexpression bei 15 bis 20% lag (siehe Abbildung A 34B). Die Expression von *NEAT1* blieb bei Knockdown von HuR/ELAVL1 auf dem gleichen Expressionslevel (Daten nicht gezeigt).

Die Transfektion mit dem pZeo-HuR/ELAVL1-Vektor führte zu einer circa 70-fachen Überexpression von HuR/ELAVL1 (siehe Abbildung A 34C), die Expressionen der *NEAT1*-Transkripte blieb jedoch auf dem gleichen Expressionslevel wie die Kontrolle (siehe Abbildung A 34D). Ebenso führte die circa 2000-fache Überexpression von TTP/ ZFP36 zu keiner veränderten Expression von *NEAT1* (siehe Abbildung A 34E+F).

Da keine der vermuteten de-/stabilisierenden Effekte von HuR/ELAVL1 oder TTP/ZFP36 nach Knockdown oder Überexpression auf qPCR-Ebene festgestellt werden konnten, wurde mit Actinomycin D die Transkription blockiert und auf diese Weise die *NEAT1*-Stabilität nach verschiedenen Zeitpunkten in siRNA HuR/ELAVL1 behandelten HepG2-Zellen im Vergleich zur Kontrolle gemessen. Der Hypothese nach müsste mit gesenktem HuR/ELAVL1-Level, *NEAT1* weniger stabilisiert werden können und deshalb schneller abgebaut werden als bei basalem HuR/ELAVL1 Expressionslevel (siRNA-Kontrolle). Es zeigte sich eine kontinuierliche Abnahme der *NEAT1*-Transkripte über die Zeit, jedoch unabhängig von der Anwesenheit von HuR/ELAVL1 (siehe Abbildung A 34G).



### **Abbildung A 34: Expressionsanalysen nach Knockdown oder Überexpression von HuR/ELAVL1 und TTP**

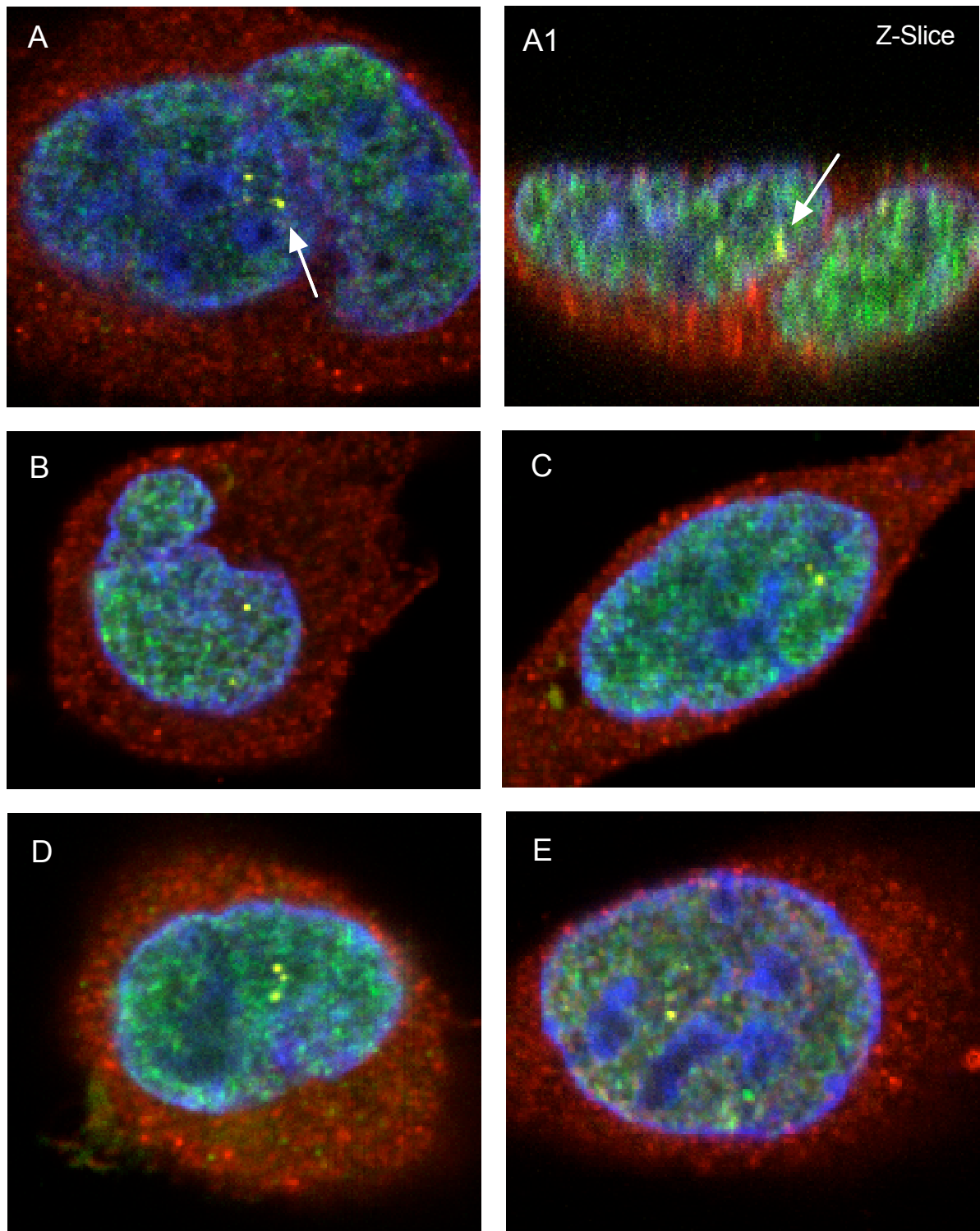
(A) Relative Expression der mRNA von HuR/ELAVL1, gemessen per qPCR, in HepG2-Zellen nach 48 h siRNA-Knockdown (siRNA HuR 1) normalisiert auf die unbehandelte Kontrolle (n=5, Triplikat). (B) Relative Expression der mRNA von HuR/ELAVL1, gemessen per qPCR, in primären murinen Hepatozyten (PMH) nach 48 h siRNA-Knockdown (siRNA HuR 1) normalisiert auf die unbehandelte Kontrolle (n=2, Duplikat). (C) Relative Expression von HuR/ELAVL1 und (D) *NEAT1* in HepG2-Zellen nach 48 h Überexpression mit dem Plasmid pZeoSV2+HuR, normalisiert auf die unbehandelte Kontrolle (n=2, Duplikat). (E) Relative Expression von TTP und (F) *NEAT1*, gemessen per qPCR, in HepG2-Zellen nach 48 h Überexpression mit dem Plasmid pZeoSV2-TTP, normalisiert auf die unbehandelte Kontrolle (n=2, Duplikat). (G) Relative Expression von *NEAT1* in HepG2-Zellen, gemessen per qPCR, die für 48 h mit siRNA HuR1 behandelt wurden oder der siRNA Kontrolle. Im Anschluss erfolgte die Behandlung für 0 h, 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h und 8 h mit 0,01 mg/ml Actinomycin D oder der DMSO-Kontrolle (n=2, Triplikat).

#### 8.5.4 RNA-Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (RNA-FISH)

Weiterhin wurden die Effekte der Bindung zwischen HuR/ELAVL1 und *NEAT1* nach siRNA Knockdown von HuR/ELAVL1 in Bezug auf Paraspeckles per Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) in HepG2-Zellen untersucht. Typischerweise zeigten HepG2-Zellen eine HuR/ELAVL1 Lokalisierung hauptsächlich im Cytoplasma. SFPQ hingegen war ausschließlich im Zellkern lokalisiert. Die Signale von *NEAT1* betrugen im Durchschnitt 0 bis 5 Signale pro Zellkern (siehe Abbildung A 35).

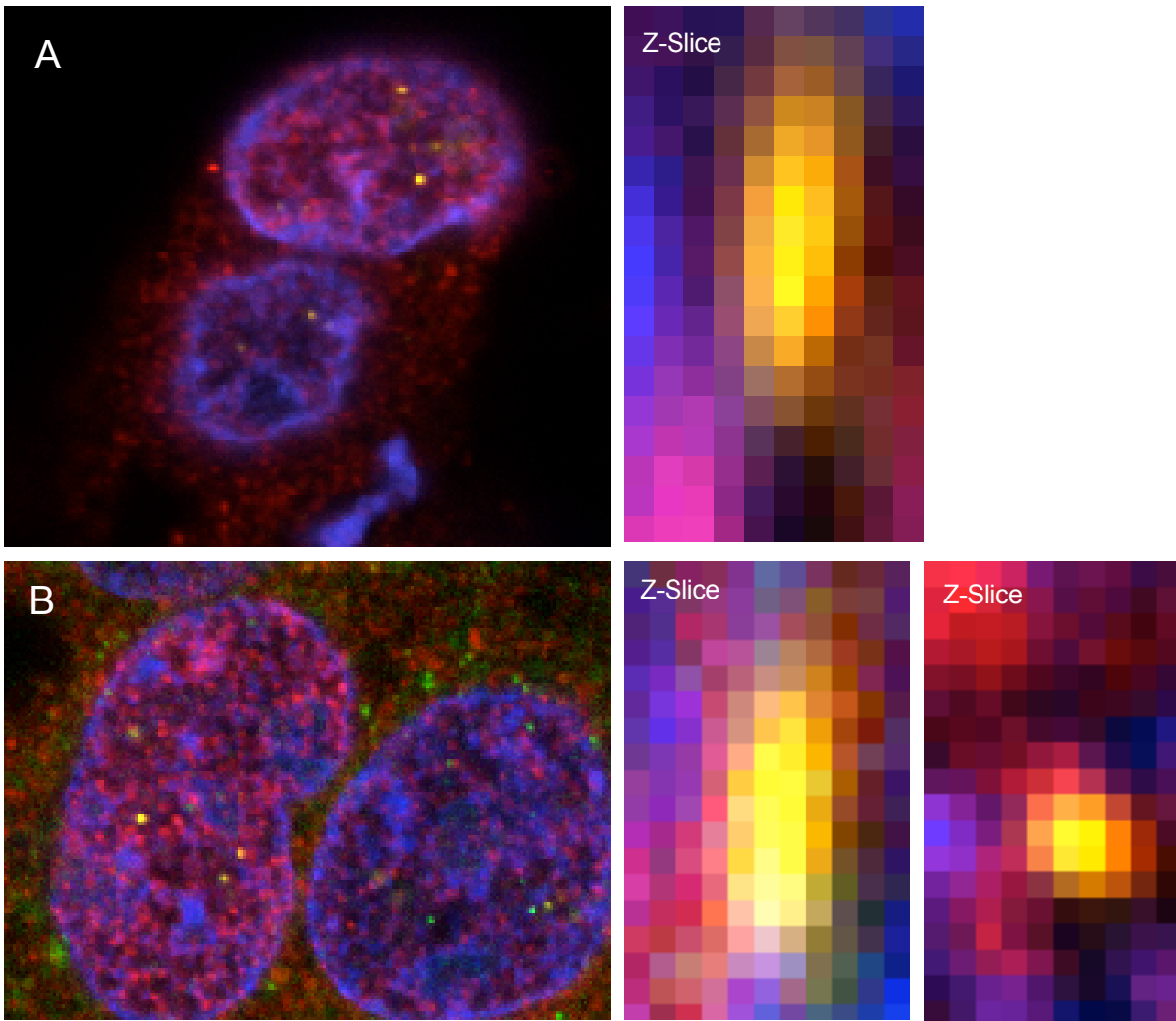
Eine Co-Lokalisierung zwischen *NEAT1* und SFPQ war mikroskopisch gut visualisierbar. Eine Co-Lokalisierung zwischen *NEAT1* und HuR/ELAVL1 lag in einigen Zellen vor, jedoch nicht in allen (siehe Abbildung A 36). Ebenfalls angefärbt wurde ein zweites Paraspeckle Protein, PSPC1. PSPC1 findet sich sowohl im Zellkern als auch im Cytoplasma (siehe Abbildung A 37). Eine Co-Lokalisierung mit *NEAT1* war mikroskopisch gut zu erkennen.

Weiterhin wurden HepG2-Zellen in denen *NEAT1* per Gapmeren runterreguliert untersucht. Es zeigten sich im Allgemeinen deutlich weniger und wenn unspezifische *NEAT1* Signale (siehe Abbildung A 38). Außerdem wurden HepG2-Zellen angeschaut, in denen HuR/ELAVL1 per pZeo-HuR/ELAVL1-Vektor überexprimiert ist. Es zeigten sich im Allgemeinen keine Unterschiede in HuR/ELAVL1, SFPQ oder *NEAT1* Intensität im Vergleich zu unbehandelten HepG2-Zellen.



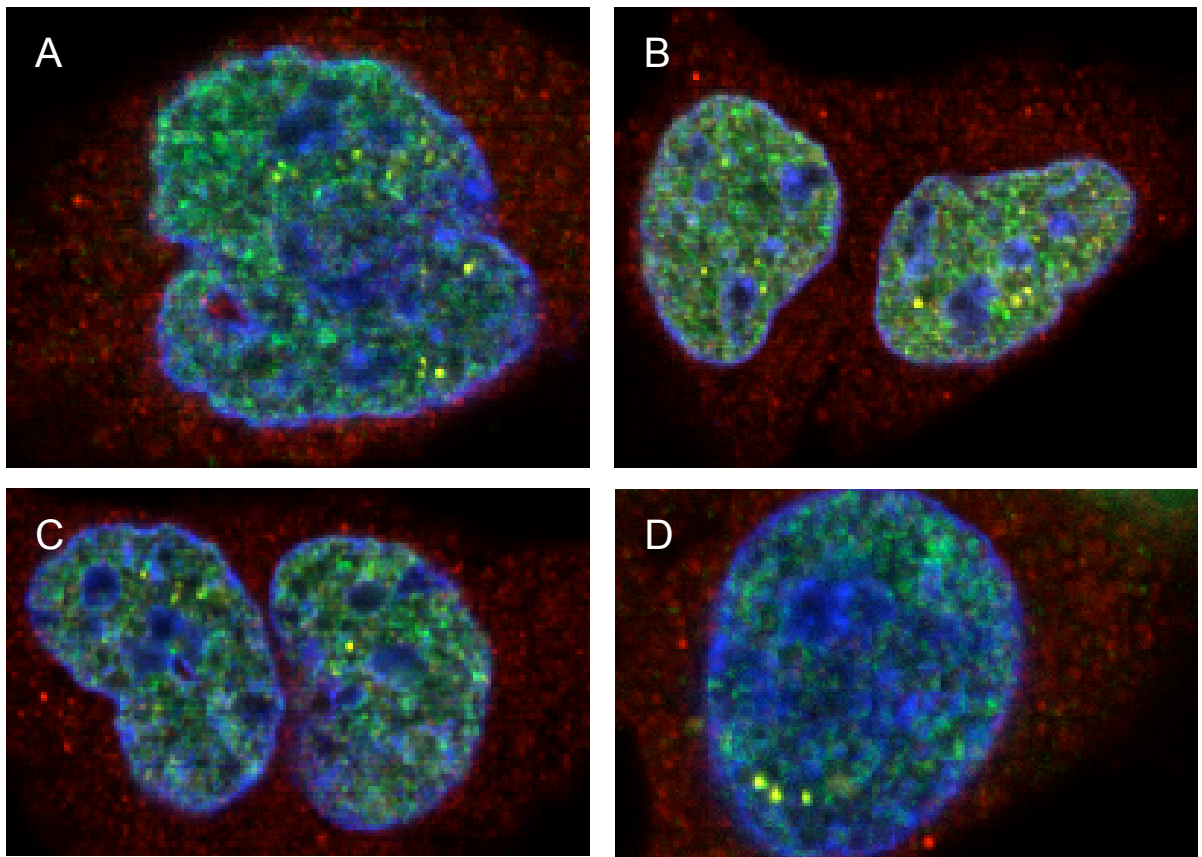
**Abbildung A 35: Co-Lokalisation in HepG2 von SFPQ und *NEAT1***

(A-E) Repräsentative Aufnahmen der Co-Lokalisation von SFPQ und *NEAT1* in HepG2 Zellen. Mikroskop: Olympus IX83 Abberior STEDYCON Objektiv: 100x (Öl) Farbschema DAPI= Blau, *NEAT1*= Gelb, SFPQ = Grün, HuR/ELAVL1= Rot.



**Abbildung A 36: Co-Lokalisaion HuR/ELAVL1 und *NEAT1***

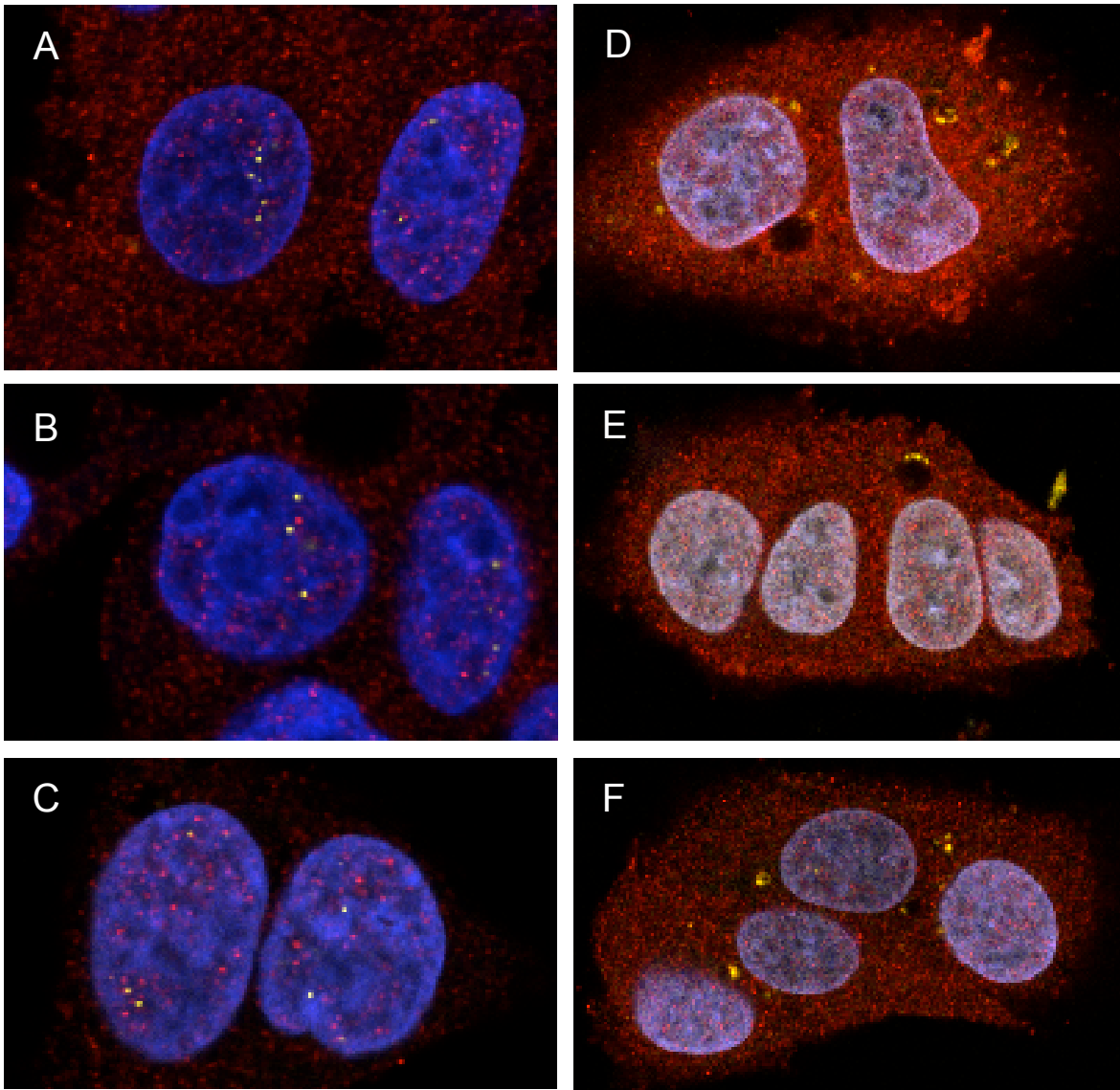
(A+B) Repräsentative Aufnahmen der Co-Lokalisation von HuR/ELAVL1 und *NEAT1* in HepG2 Zellen. Mikroskop: Olympus IX83 Abberior STEDYCON Objektiv: 100x (Öl) Farbschema DAPI= Blau, *NEAT1*= Gelb, HuR/ELAVL1= Rot.



**Abbildung A 37: Co-Lokalisation in HepG2 von PSPC1 und *NEAT1***

(A-D) Repräsentative Aufnahmen der Co-Lokalisation von PSPC1 und *NEAT1* in HepG2 Zellen. Mikroskop: Olympus IX83 Abberior STEDYCON Objektiv: 100x (Öl) Farbschema DAPI= Blau, *NEAT1*= Gelb, PSPC1= Grün, HuR/ELAVL1= Rot.

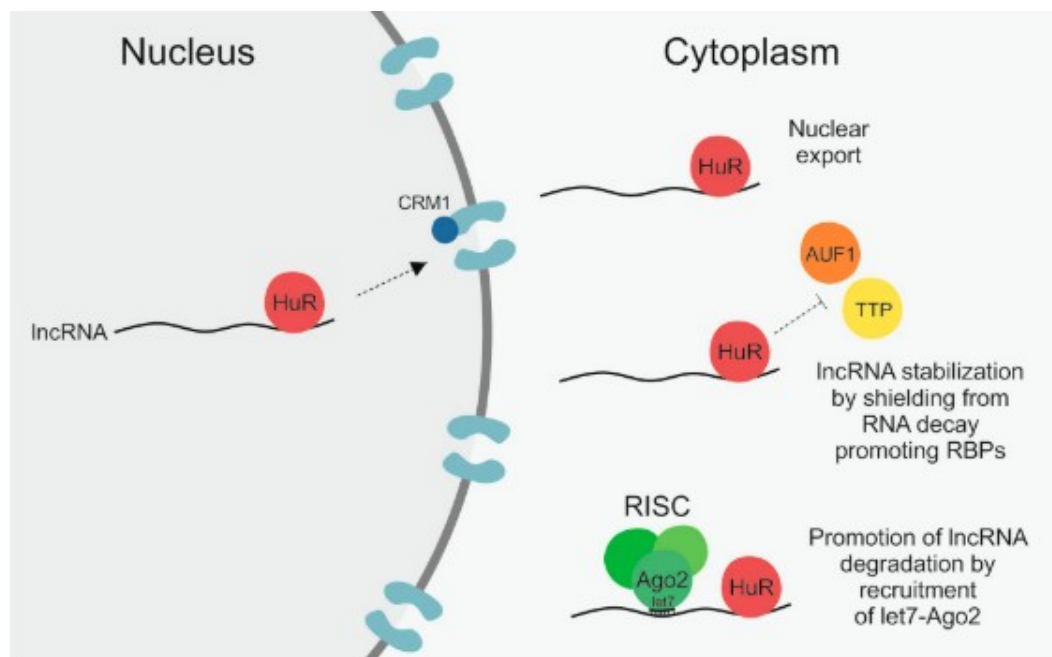




**Abbildung A 38: *NEAT1*-Signale in HepG2-Zellen mit Gapmer-*NEAT1*-Knockdown**

(A-C) Repräsentative Aufnahmen von *NEAT1* in HepG2 Zellen. (D-F) Repräsentative Aufnahmen von *NEAT1* in Gapmer behandelten *Neat1*-knockdown HepG2-Zellen. Mikroskop: Olympus IX83 Abberior STEDYCON  
Objektiv: 100x (Öl) Farbschema DAPI= Blau, *NEAT1*= Gelb, HuR/ELAVL1= Rot.

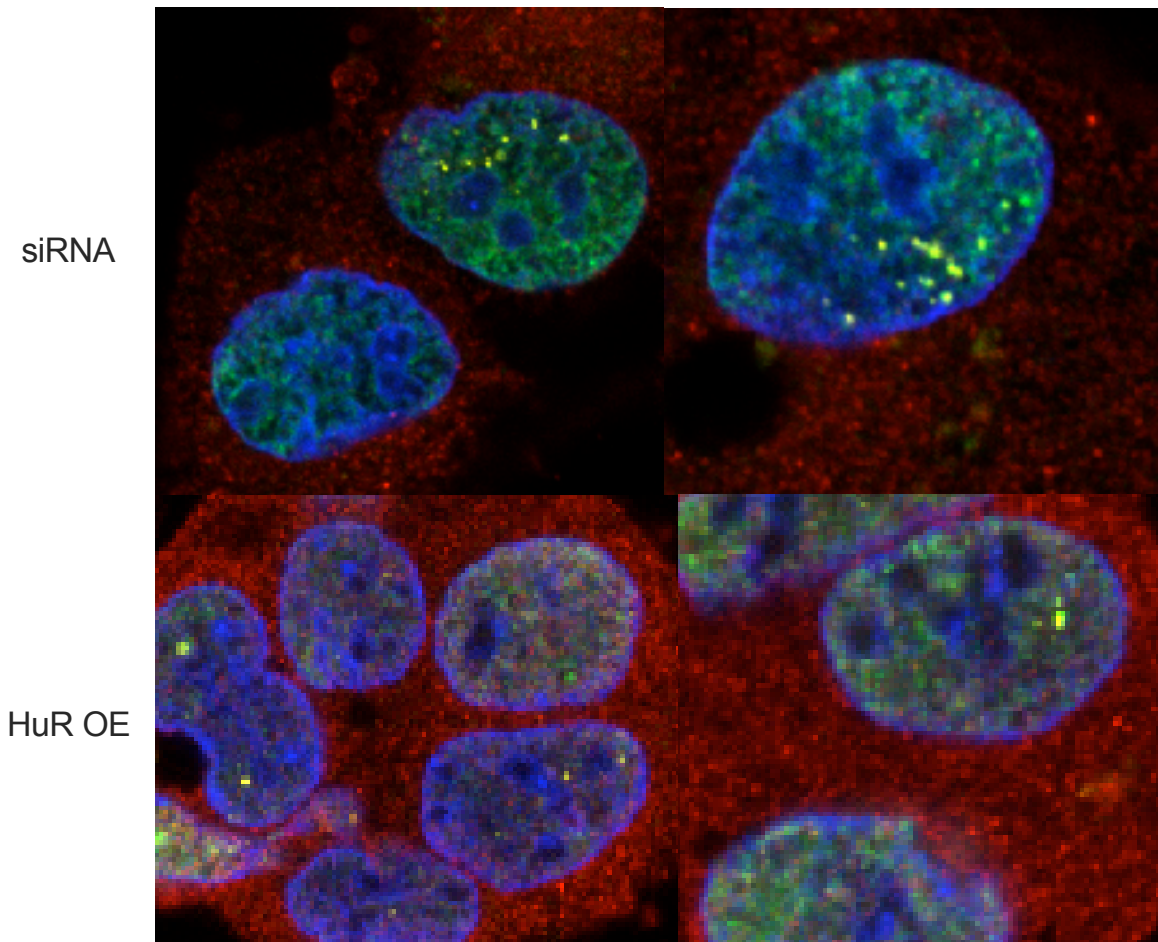
Nachdem die stabilisierende Funktion von HuR/ELAVL1 ausgeschlossen wurde, standen noch zwei weitere bisher bekannte Funktionen von HuR/ELAVL1 zur Debatte (siehe Abbildung A 39). Es ist auch möglich, dass der klassische Mechanismus von HuR/ELAVL1, andere RBPs zu blockieren, keine weitere Bedeutung hat, wenn der RNA-Interaktionspartner zusätzlich eine Bindungsstelle für let7 enthält, dessen Rekrutierung durch HuR/ELAVL1 begünstigt wird. Der HuR-let7-Ago2-vermittelte RNA-Abbau über RISC überwiegt höchstwahrscheinlich alle RNA-stabilisierenden Wirkungen von HuR/ELAVL1 (Jonas et al., 2020). Eine weitere Funktion von HuR/ELAVL1 könnte der nukleäre Export, gezeigt für die lncRNA RMRP, sein. Laut Noh et al. (2016) bindet HuR/ELAVL1 bereits im Zellkern an RMRP und erleichtert anschließend dessen nuklearen Export (Noh et al., 2016). HuR/ELAVL1 selbst kann als Reaktion auf verschiedene Reize zwischen dem Zellkern und dem Zytoplasma hin und her pendeln (Jonas et al., 2020). Der Export von HuR/ELAVL1 aus dem Zellkern erfolgt in Abhängigkeit von der Chromosomenerhaltung 1 (CRM1). CRM1 ist ein Mitglied der Importin- $\beta$ -Superfamilie, das den Kernexport von Proteinen erleichtert, an die es entweder direkt oder über Adapter binden kann, sowie von RNA, wobei in diesem Fall Adapterproteine notwendig sind. Noh et al. (2016) zeigten, dass nicht nur die Stummschaltung von HuR/ELAVL1 selbst in HEK293-Zellen, sondern auch von CRM1 zu einer signifikant verringerten zytoplasmatischen Menge an entstehendem RMRP führte.



**Abbildung A 39: HuR/ELAVL1 und lncRNAs (Jonas et al., 2020)**

Visualisiert sind verschiedene Interaktionsmöglichkeiten von HuR/ELAVL1 mit lncRNAs (Jonas et al., 2020).

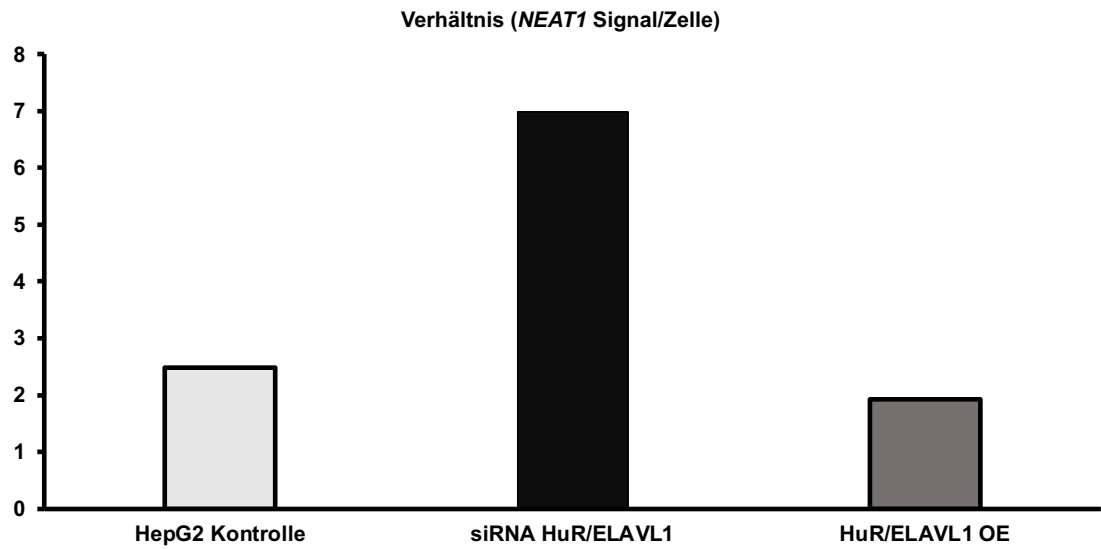
Demzufolge wurden per FISH die Menge an im Kern vorhandenen *NEAT1* in unbehandelten HepG2-Zellen sowie HepG2-Zellen nach siRNA-vermittelten HuR/ELAVL1-Knockdown analysiert. Es zeigen sich im Allgemeinen deutlich weniger HuR/ELAVL1-Signale (siehe Abbildung A 41). Ebenfalls verändert hat sich die Signalstärke von SFPQ und *NEAT1*. Es gibt es deutlich stärkere SFPQ sowie *NEAT1* Signale im Kern pro Zelle. Eine Erklärung hierfür wäre der fehlende Export ins Cytoplasma durch HuR/ELAVL1.



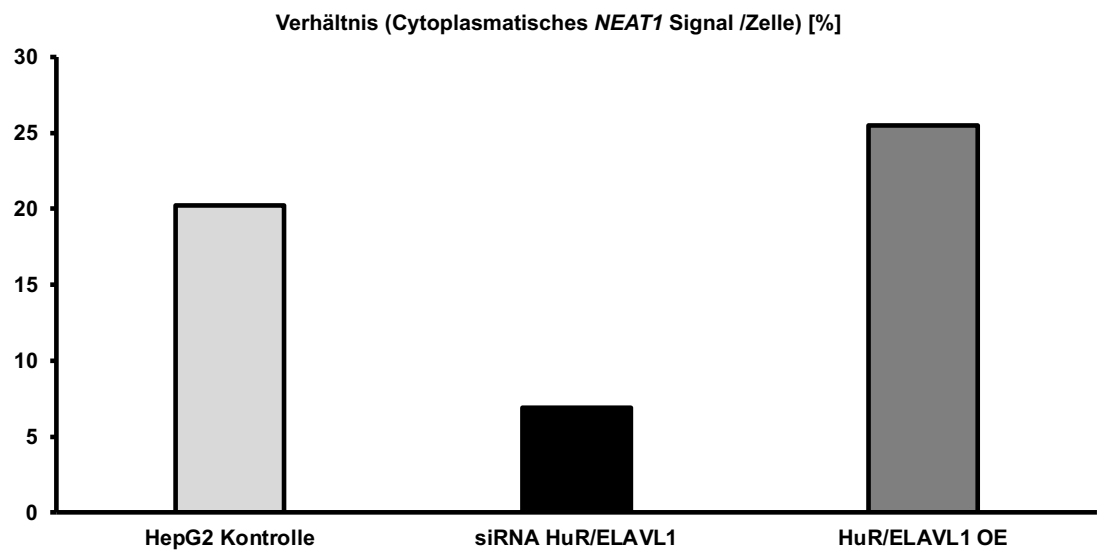
**Abbildung A 40: *NEAT1*-Signale in siRNA-HuR und HuR-OE behandelten HepG2-Zellen**

Repräsentative Aufnahmen von SFPQ, HuR/ELAVL1 und *NEAT1* in HepG2-Zellen nach siRNA-HuR/ELAVL1-Knockdown oder HuR Überexpression (OE) Mikroskop: Olympus IX83 Abberior STEDYCON Objektiv: 100x (Öl) Farbschema DAPI= Blau, *NEAT1*= Gelb, SFPQ = Grün, HuR/ELAVL1= Rot.

**A**



**B**



**Abbildung A 41: Quantitative Analyse der *NEAT1*-Signale in HuR-Knockdown- oder HuR-überexprimierenden HepG2-Zellen**

(A) Verhältnis der *NEAT1* Signale (Foci) pro Zelle in HepG2-Zellen nach siRNA-HuR-Knockdown, nach HuR/ELAVL1 Überexpression oder in der Kontrolle (Zellen: Kontrolle n=65; siRNA n=58; OE n=70) (B) Verhältnis der cytoplasmatisches *NEAT1* Signal (Foci) pro Zelle in HepG2-Zellen nach siRNA-HuR-Knockdown, nach HuR/ELAVL1 Überexpression oder in der Kontrolle (Zellen: Kontrolle n=65; siRNA n=58; OE n=70).

### 8.5.5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion zwischen *NEAT1* und verschiedenen RBPs in hepatischen Zellmodellen analysiert. Im Fokus standen dabei die RBPs HuR/ELAVL1 und TTP/ZFP36, deren mögliche Rolle in der posttranskriptionellen Regulation von *NEAT1* untersucht wurde. Frühere Studien, insbesondere im Kontext von Ovarialkarzinomzellen, haben HuR/ELAVL1 eine stabilisierende Wirkung auf *NEAT1* zugeschrieben (Chai et al., 2016). In HepG2- und Huh7-Zellen konnte im Rahmen dieser Arbeit die Bindung von HuR/ELAVL1 an *NEAT1* mittels RNA-Immunpräzipitation bestätigt werden, was für eine direkte Interaktion spricht. Für TTP/ZFP36 konnte hingegen keine signifikante Anreicherung von *NEAT1* in RIP-Experimenten festgestellt werden.

Trotz der nachgewiesenen Bindung führte weder die Überexpression noch der Knockdown von HuR/ELAVL1 zu einer Veränderung der *NEAT1*-Expression auf Transkript-Ebene. Auch unter Bedingungen einer Actinomycin D induzierten Transkriptionshemmung konnte kein Einfluss von HuR/ELAVL1 auf die Stabilität von *NEAT1* beobachtet werden. Diese Ergebnisse widersprechen den Beobachtungen aus anderen Zellmodellen, in denen eine zwei- bis dreifachen Erhöhung des *NEAT1*-Spiegels beobachtet wurde, nachdem die Zelltranskription durch ActD blockiert worden war (Chai et al., 2016). Ein möglicher Grund für diese Diskrepanz könnte in gewebespezifischen Unterschieden epithelialer Tumorzellen, der Ovarial- und hepatischen Karzinomzellen, liegen. Alternativ könnten posttranslationale Modifikationen von HuR/ELAVL1 eine Rolle spielen, die dessen Bindungsaffinität oder Funktionen modulieren (Lachiondo-Ortega et al., 2022).

Die Ergebnisse der RNA-FISH-Analysen lieferten jedoch einen Hinweis auf eine mögliche alternative Funktion von HuR/ELAVL1 in Bezug auf *NEAT1*. Nach siRNA-vermitteltem Knockdown von HuR/ELAVL1 zeigten sich verstärkte nukleäre Signale von *NEAT1*, begleitet von einer erhöhten Akkumulation des Paraspeckle-Proteins SFPQ im Zellkern. Diese Beobachtung könnte auf eine verminderte Exportfähigkeit von *NEAT1* hindeuten und legt nahe, dass HuR/ELAVL1 in hepatischen Zellen eher eine Rolle im nukleozytoplasmatischen Transport als in der Stabilisierung von *NEAT1* spielt. Ein ähnlicher Mechanismus wurde bereits für die lncRNA RMRP beschrieben, deren Export aus dem Zellkern über HuR/ELAVL1 und CRM1 vermittelt wird (Noh et al., 2016).

Darüber hinaus könnte die Funktion von HuR/ELAVL1 im Kontext von *NEAT1* auch durch konkurrierende regulatorische Mechanismen überlagert werden. So wurde gezeigt, dass HuR/ELAVL1 über eine Interaktion mit miRNAs wie let-7 die AGO2-abhängige Degradation bestimmter Transkripte fördern kann (Kim et al., 2009).

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass HuR/ELAVL1 zwar an *NEAT1* bindet, aber keine stabilisierende Funktion in hepatischen Zelllinien ausübt. Stattdessen könnten Exportmechanismen oder miRNA-abhängige Abbauprozesse im Vordergrund stehen. Diese Erkenntnisse erweitern das Verständnis der posttranskriptionellen Regulation von *NEAT1* in der Leber und unterstreichen die Zelltyp- und Kontextabhängigkeit der HuR/ELAVL1-Funktion. Weitere Untersuchungen, zum Beispiel zum Exportverhalten von *NEAT1* bei Inhibition von CRM1 oder zur Interaktion mit dem let-7/RISC-Komplex, könnten diese Hypothese weiter analysieren.

## 9. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Nachname, Vorname Ahne, Lisa

### Schulische Ausbildung

2001-2005 Herman-Schafft-Schule in Dennhausen  
2005-2013 Georg-Christoph-Lichtenberg-Gymnasium  
in Kassel, Abitur

### Studium

2013-2014 Westfälische Wilhelms-Universität Münster  
Studiengang: Chemie  
2014-2018 Philipps-Universität Marburg  
Studiengang: Pharmazie  
11/2018-05/2019 Pharmazeut im praktischen Jahr  
University of Utah in Salt Lake City (USA),  
AG Lim, Department of Pharmaceutics  
and Pharmaceutical Chemistry  
Thema: p53 im Hepatozellulären  
Karzinom  
05/2019-11/2019 Pharmazeut im praktischen Jahr  
B.Braun Melsungen AG, Abteilung  
Chemical and Analytical Development  
11/2019-05/2020 Pharmazeut im praktischen Jahr  
Hünstein-Apotheke in Baunatal-  
Großenritte  
2020 Approbation als Apothekerin

## **Berufliche Erfahrungen**

09/2016	Praktikum, Klinikum und Krankenhausapotheke in Kassel
05/2017-11/2018	Studentische Hilfskraft, Philipps- Universität Marburg, Tutorium für anorganische und allgemeine Chemie
09/2017	Praktikum, Philipps-Universität Marburg Institut für Pharmazie, AG Bünemann, Pharmakologie und Klinische Pharmazie Thema: Dimerisierung und Arrestin- Rekrutierung des GIP-Rezeptors
Seit 06/2020	Doktorandin, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Institut für Pharmazie, AG Keßler, Experimentelle Pharmakologie für Naturwissenschaften
Seit 07/2020	Apothekerin in der Halloren-Apotheke in Halle

## **Sprachkenntnisse**

Deutsch	Muttersprache
Englisch	Fließend in Wort und Schrift
Latein	Großes Latinum

---

Ort, Datum

---

Unterschrift



## 10. Publikationen

### 10.1 Publikationen in Fachzeitschriften:

- Lu P, Vander Mause ER, Redd Bowman KE, Brown SM, **Ahne L**, Lim CS. Mitochondrially targeted p53 or DBD subdomain is superior to wild type p53 in ovarian cancer cells even with strong dominant negative mutant p53. J Ovarian Res. 2019 May 15;12(1):45. doi: 10.1186/s13048-019-0516-2
- Bowman KER, **Ahne L**, O'Brien L, Vander Mause ER, Lu P, Wallis B, Evason KJ, Lim CS. p53-Bad\* Fusion Gene Therapy Induces Apoptosis In Vitro and Reduces Zebrafish Tumor Burden in Hepatocellular Carcinoma. MolPharm 2023Jan2;20(1):331340. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.2c00665. Epub 2022 Dec 9.
- **Ahne L**, Bauchspieß T, Drews F, Höring M, Köhler N, Qerimi A, Schatz C, Franzenburg S, Ludwig-Kraus B, Kiemer AK, Pauling JK, Liebisch G, Haybaeck J, Simon M, Nakagawa S, Keßler SM. Silencing lncRNA *NEAT1* mitigates metabolic dysfunction-associated steatohepatitis. Eingereicht
- **Ahne L**, Drews F, Simon M, Keßler SM. Revisiting the ELAVL1–*NEAT1* Axis: No Evidence for *NEAT1* Stabilization in Hepatocellular Carcinoma Models. In Arbeit

### 10.2 Vortrag und Poster

- **Ahne L**, Höring M, Qerimi A, Liebisch G, Haybäck J, Drews F, Simon M, Nakagawa S, Keßler SM. Silencing *Neat1* alleviates fibrosis in an *in vivo* model of metabolic dysfunction-associated steatohepatitis (MASH). Vortrag und Posterpräsentation an dem Keystone Kongress Fibrosis: Inflammation, Drivers, and Therapeutic Resolution, Whistler, BC, Kanada, 2024. Keystone Symposia Scholarship
- **Ahne L**, Barghash A, Nakagawa S, Kiemer AK, Keßler SM. Regulation of *NEAT1* in NAFLD by RNA-binding proteins. Posterpräsentation an dem EASL Kongress The International Liver Congress 2022 <sup>TM</sup>, London, Großbritannien, Journal of Hepatology, 2022; 77: S705.

## 11. Erklärung zur Verwendung generativer künstlicher Intelligenz (KI) und KI-gestützter Technologien: Eigenständigkeitserklärung & werkzeugorientierte Dokumentation

Ich erkläre hiermit, dass ich folgende KI-Programme für die Erstellung der vorliegenden Dissertation verwendet habe:

Programm	Link/Quelle	Verwendungszweck und Nutzungsbeschreibung
DeepL Write	<a href="https://www.deepl.com/de/write">https://www.deepl.com/de/write</a>	Ausdruck, Lesbarkeit, Rechtschreibung, Grammatik
DeepL	<a href="https://www.deepl.com/de/translator">https://www.deepl.com/de/translator</a>	Übersetzung
ChatGPT-4o	<a href="https://chatgpt.com/?model=gpt-4o">https://chatgpt.com/?model=gpt-4o</a>	Ausdruck, Lesbarkeit, Inspiration, Rechtschreibung und Grammatik, Gliederungsvorschläge

Die KI-Programme dienten lediglich als Werkzeuge, um die Texte sprachlich zu überarbeiten und einen verbesserten Lesefluss zu ermöglichen. Bezüglich jeder KI-Unterstützung habe ich geprüft, ob die Vorschläge inhaltlich korrekt sind, und sie eigenständig überarbeitet und integriert.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

## 12. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Dissertationsschrift selbständig ohne unzulässige Hilfe Dritter verfasst habe. Es wurden ausschließlich die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet, die wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen wurden als solche kenntlich gemacht. Ich versichere, dass ich mich zu keinem früheren Zeitpunkt um einen Doktorgrad beworben habe.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

### 13. Danksagungen

Zuallererst möchte ich mich bei meiner Doktormutter und absoluten Inspiration Prof. Dr. Sonja Keßler bedanken. Sie hat mir nicht nur jederzeit mit Rat und Tat beiseite gestanden, sondern mich auch mit Ihrer positiven Art und einzigartigen Motivation überhaupt dazu bewegt, die Reise an die Martin-Luther-Universität in Halle anzutreten. An diesem Schritt war auch PD Dr. Frank Erdmann nicht ganz unbeteiligt. Im Verlauf der Arbeit war er dann immer mit einem offenen Ohr, neuen Ideen und guten Erklärungen für mich da. Danke für deine stets kritischen Perspektiven und den tollen Austausch.

Herzlichen Dank an Frau Prof. Dr. Gabriele Stangl und Herr Prof. Dr. Pavel Strnad für die Übernahme der Gutachtertätigkeit dieser Arbeit.

Vielen Dank an Herr Prof. Johannes Haybäck und seine Kollegen für die Übernahme der Histologie des Tierversuchs mit den Färbungen und des Scorings der Leberschnitte.

Bei Herr Prof. Martin Simon und Frau Dr. Franziska Drews möchte ich mich für die Durchführung der RNA-Sequenzierung bedanken.

Für diverse Vorversuche und Protokolle sowie die gut konservierten Mäuselebern möchte ich Frau Prof. Alexandra Kiemer danken, diese Daten haben die Arbeit angestoßen und zum Ende schön abgerundet.

Vielen Dank auch Frau PD Dr. Barbara Schreier für die Mäuselebern der HFD-Diät.

Ein sehr großes Danke geht an Dr. Katherine Redd Bowmann, meine Betreuerin während des praktischen Jahres an der University of Utah. Es war eine fabelhafte, abwechslungsreiche und hochqualitative Ausbildung, die ich genießen durfte.

Im Labor war von Anfang an Sandra Kendzia als meine Laborkollegin und Leidensgenossin an meiner Seite. Irgendwer musste den Laden schließlich erstmal zum Laufen bringen und als Versuchskaninchen herhalten. Auch wenn der Start alles andere als leicht war, bin ich sehr froh, dass wir die Zeit nicht nur gut überstanden haben, sondern und auch eine richtig gute Zeit daraus gemacht haben.

Besonderer Dank gilt auch unserer Tierpflegerin Manuela Thiemiecke. Sie hat mir die Arbeit mit den Mäusen gezeigt und war stets liebevoll im Umgang mit den Tieren. Auch über die lange Dauer des Tierversuchs war sie stets engagiert und stand mir bis zuletzt mit tatkräftiger Unterstützung zur Seite.

Auch Jana Hirschfeld möchte ich für die Zusammenarbeit und Unterstützung ab der ersten Sekunde und für die schönen Western Blots zum Ende der Arbeit danken. Der lieben Nicole

Glaubitz danke ich für die Unterstützung mit den immunhistochemischen Färbungen, das war mir zu der Zeit eine große Hilfe.

Das Team erweiterte sich anfangs schnell um die wunderbare Kathrin Dietze und Beatrice Starke. Ihr seid meine Herzensmenschen und euer Humor ist nicht zu übertreffen. Ihr habt mir jeden Tag nicht nur ein Lächeln ins Gesicht gezaubert, sondern mich dazu gebracht, vor Lachen auf dem Boden zu liegen. Wenn man solche Kolleginnen hat, freut man sich bereits Sonntag schon wieder auf Montag. Danke für dieses Geschenk!

Aber fangen wir nochmal chronologisch an, da ich denke diese einzigartige Reise begann viel früher. Die Grundsteine legten meine Eltern, die mich von klein auf unterstützten und mir die Freiheit gaben, den Weg zu gehen, den ich gehen wollte. Jederzeit an meiner Seite war meine wunderbare Oma Christel Ahne, die mich mit Ihrer Energie, Positivität, Herzlichkeit und Lebensfreude enorm bestärkte und mir immer wieder Mut zusprach. Eigentlich hat das auch alles nur bis hier hin funktioniert, weil Oma mindestens einmal am Tag die Daumen für mich gedrückt hat.

Aber es gab weitere sehr wichtige Menschen in der wichtigsten Entwicklungs- und Entscheidungsphase meines Lebens. Liebe Heidi und Dr. Michael Rieß, ihr habt mir gezeigt, welche Wege und Möglichkeiten das Leben zu bieten hat. Die Entscheidung ein Studium zu machen und größere Träume zu haben, das habe ich euch zu verdanken. Liebe Dr. Aurelia Probst-Dimpfl und Prof. Dr. Thomas Dimpfl, ihr habt mir immer wieder Mut zugesprochen und die Leistungen des Studiums gewürdigt wie kein anderer. Ihr habt diese Zeit so leicht und schön für gemacht und mich in euer Familie aufgenommen, wie ein eigenes Kind.

Danke an meine große Schwester Natalie Ahne! Manchmal braucht es ein paar Schicksalsschläge, um zu wissen, was wirklich im Leben zählt, und den Fokus zu schärfen. Dass wir über so viele Umwege nun wieder an der gleichen Lebensgabel stehen, finde ich unglaublich schön und vereinend. Danke Dr. Ahne.

Aber zur Familie gehören auch meine engsten Schulfreunde Francesca, Lisa, Katrin und Maaïke, mit nun auch Lennart, Moritz, Leo & Emil und Nicki. Die Freundschaft zu euch ist unvergleichlich und war teilweise angefangen vor 20 Jahren so unglaublich stärkend und voller Liebe. Danke dafür.

Im Studium haben mich dann Laura, Jana, Sophia, Alex und Theresia begleitet. Auch ihr seid zu einem festen Bestandteil von meinem Leben geworden und habt mich in dieser wichtigen Zeit unterstützt. Unsere regelmäßigen Treffen und Urlaube waren ein unglaublich wichtigstes, wohltuendes Element. Insbesondere möchte ich an dieser Stelle nochmal Lory hervorheben. Du bist schnell nachgezogen und diese örtliche Nähe zu einem

Lieblingsmenschen hat mir unglaublich viel bedeutet. Du hast dir jederzeit meinen Kummer angehört, mich aufgemuntert und mir jederzeit deine ehrliche Meinung gesagt. Danke, dass du immer da warst!

Aber auch meinen tollen Freunde, die ich in meiner neuen Wahlheimat kennenlernen durfte, Anni, Lenni, Lukas, Tabea, Uma & Steffen, Susi & Martin, Manu & Enrico möchte ich von Herzen Danken. Ihr habt die anfangs fremde Stadt in eine wunderbare Heimat für mich verwandelt! Ihr wart jederzeit für mich da und habt mein Leben enorm bereichert.