

# **Die Rolle der microRNA-29 während der Leberfibrogenese**

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von  
**Monika Kwiecinski**  
aus Cosel

Köln 2011

Berichtersteller:

PD Dr. Roswitha Nischt

Prof. Dr. Matthias Hammerschmidt

Tag der mündlichen Prüfung:

23. Mai 2011

*Wunder stehen nicht im Gegensatz zur Natur,  
sondern im Gegensatz zu dem,  
was wir über die Natur wissen.*

---

St. Augustin  
(Apostel von England und  
erster Erzbischof von Canterbury)

All denen, die mich begleitet haben

**INHALTSVERZEICHNIS..... I-III**

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1	<b>MicroRNAs .....</b>	<b>1</b>
1.1.1	Mechanismus der Biogenese von microRNAs.....	1
1.1.2	Pathogenetische Bedeutung von miRNAs .....	3
1.2	<b>Leberfibrose.....</b>	<b>5</b>
1.2.1	Zusammensetzung der ECM während der Leberfibrogenese .....	6
1.2.2	Die myofibroblastische Zelldifferenzierung von hepatischen Sternzellen.....	7
1.2.3	Rolle von fibrogenen Zytokinen bei der Entstehung der Leberfibrose .....	8
1.2.4	Rolle des HGF - TGF- $\beta$ Antagonismus in der Leberfibrogenese.....	10
1.3	<b>Zielsetzung der Arbeit.....</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>13</b>
2.1	<b>Material.....</b>	<b>13</b>
2.1.1	Chemikalien, Plastikwaren und sonstige Materialien .....	13
2.1.2	Herstellung von Lösungen und Puffern .....	13
2.1.3	Software .....	14
2.1.4	Zelllinien.....	14
2.1.5	DNA Konstrukte .....	15
2.1.6	Antikörper.....	16
2.1.7	Oligonukleotide.....	17
2.2	<b>Methoden .....</b>	<b>20</b>
2.2.1	Bakterienkultur .....	20
2.2.1.1	Medien, Antibiotika und <i>E.coli</i> Stämme .....	20
2.2.1.2	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> zur Transformation .....	21
2.2.1.2.1	Transformation kompetenter <i>E.coli</i> .....	21
2.2.2	Molekularbiologische Methoden .....	21
2.2.2.1	Plasmid-Minipräparation.....	21
2.2.2.2	Plasmid-Midipräparation.....	22
2.2.2.3	Phenol/Chloroform-Extraktion.....	22
2.2.2.4	Präzipitation von Nukleinsäuren.....	23
2.2.2.5	Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration .....	23
2.2.2.6	DNA-Verdau mittels Restriktionsendonukleasen.....	23
2.2.2.7	Dephosphorylierung restringierter Plasmid-DNA .....	23
2.2.2.8	Herstellung von glatten DNA-Enden.....	24
2.2.2.9	Ligation von DNA-Fragmenten.....	24
2.2.2.10	Dimerisierung von Oligonukleotiden .....	24
2.2.2.11	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten.....	24
2.2.2.12	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	24
2.2.2.13	RNA-Isolierung aus Zelllysaten .....	25
2.2.2.14	RNA-Isolierung aus Gewebe.....	25
2.2.2.15	RNA Isolierung aus Zellkulturüberständen und Vesikellösungen.....	25
2.2.3	PCR (Polymerase-Kettenreaktion).....	26
2.2.3.1	DNA-Sequenzierung .....	26
2.2.3.2	Amplifizierung der 3'-UTR von Transkripten mittels PCR .....	27
2.2.3.3	Reverse Transkriptase PCR.....	27
2.2.3.4	Real Time PCR.....	27

2.2.4	Zellkultur .....	28
2.2.4.1	Kultivierung von Zelllinien .....	28
2.2.4.2	Bestimmung der Vitalität und Zellzahl .....	28
2.2.4.3	Passagieren der Zellen .....	29
2.2.4.4	Kryokonservierung von Zellen .....	29
2.2.4.5	Transfektion .....	30
2.2.4.6	Stimulierung .....	30
2.2.4.7	Hepatische Sternzellisolierung .....	31
2.2.4.8	Isolierung von Vesikeln aus Zellkulturüberständen .....	32
2.2.4.9	Anfärben von Lysosomen .....	33
2.2.4.10	Herstellung von rekombinanten Adenoviren Typ 5 .....	33
2.2.5	Proteinbiochemie .....	35
2.2.5.1	ELISA .....	35
2.2.5.2	Western-Blot Analyse .....	35
2.2.5.2.1	Proteinisolierung und Konzentrationsbestimmung aus Zelllysaten .....	35
2.2.5.2.2	Elektrophoretische Proteinauftrennung .....	36
2.2.5.2.3	Strippen .....	37
2.2.5.3	Dualer Luziferase Reporter Assay .....	37
2.2.5.4	Bestimmung des Hydroxyprolinegehalts .....	37
2.2.5.5	Bestimmung von Entzündung und Fibrose im Lebergewebe .....	38
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>39</b>
<b>3.1</b>	<b>Regulation der Kollagenexpression durch miR-29 in HSC .....</b>	<b>39</b>
3.1.1	Identifizierung von miR-29 Bindungsstellen in der 3'-UTR von Kollagen I und IV mRNAs .....	42
3.1.2	Inhibierung der Kollagen I und IV Expression durch miR-29 in hepatischen Sternzellen .....	46
<b>3.2</b>	<b>Rolle der miR-29 in der Regulation der fibrogenen Mediatoren IGF-I, VEGF-A und der Mitglieder der PDGF-Familie .....</b>	<b>48</b>
3.2.1	Bindung der miR-29 an IGF-I, VEGF-A und Mitglieder der PDGF-C .....	49
3.2.2	Kontrolle der Synthese der fibrogenen Mediatoren durch miR-29 .....	51
<b>3.3</b>	<b>Repression der miR-29a und miR-29b Expression während der Fibrogenese in einem Rattenmodell nach Gallengangsockklusion .....</b>	<b>53</b>
<b>3.4</b>	<b>miR-29 und ihre Zieltranskripte während der Differenzierung primärer HSC .....</b>	<b>58</b>
<b>3.5</b>	<b>Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die miR-29 Expression und deren Zieltranskripte in HSC ...</b>	<b>61</b>
3.5.1	Die c-Met Expression in myofibroblastischen HSC .....	61
3.5.2	Bestimmung der Expression von Kollagenen, fibrogenen Mediatoren und miR-29 während der Fibrogenese, induziert durch die profibrogenen Mediatoren TGF- $\beta$ und PDGF-BB sowie den antifibrogenen Mediator HGF .....	63
<b>3.6</b>	<b>Vesikeltransport der miR-29 als Regulationsmechanismus der HSC .....</b>	<b>66</b>
3.6.1	Transportmechanismus der miRNA mittels Vesikeln .....	66
<b>3.7</b>	<b>Konstruktion eines adenoviralen Vektors zur zelltypspezifischen Expression von miR-29a in Myofibroblasten .....</b>	<b>69</b>
3.7.1	Zelltypspezifische Expression von miR-29a .....	72

<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>75</b>
4.1	MiR-29 als zentraler Repressor der Fibrogenese .....	75
4.2	MiR-29 beeinflusst die profibrogenen Zellkommunikation.....	78
4.3	Konstruktion einer adenoviralen miR-29a Expressionskassette unter Kontrolle des $\alpha$ -SMA Promotors zur zelltypspezifischen Reduktion profibrogenen Faktoren .....	82
4.4	Das Auftreten extrazellulärer miR-29 während der Fibrogenese.....	84
4.5	Funktionsschema der miR-29a während der Leberfibrogenese .....	85
<b>5</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>87</b>
<b>6</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>94</b>
6.1	Abkürzungsverzeichnis.....	94
6.2	Klonierungsstrategie .....	96
<b>7</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>97</b>
<b>8</b>	<b>ABSTRACT .....</b>	<b>99</b>
	<b>ERKLÄRUNG.....</b>	<b>101</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 MicroRNAs

MicroRNAs und ihr Einfluss auf verschiedene Organismen stellen eines der jüngsten Forschungsgebiete der molekularen Genetik dar, wobei die Relevanz und Tragweite ihrer Auswirkungen erst jetzt in den Vordergrund vieler Studien treten.

Die Entdeckung der microRNAs geht ins Jahr 1993 zurück, als bei dem Gen *lin-4*, welches in die zeitliche Larvenentwicklung von *C. elegans* involviert ist, beobachtet wurde, dass es nicht für ein Protein kodiert, sondern zu zwei kurzen RNA-Molekülen prozessiert wird (Lee et al. 1993). Diese *lin-4* RNAs weisen eine teilweise Komplementarität zu mehreren Sequenzbereichen in dem 3'-untranslatierten Bereich (3'-UTR) des *lin-14* Gens auf (Wightman et al. 1991; Lee et al. 1993). Bereits 1991 wurde vermutet, dass der Sequenzbereich in der 3'-UTR für die Repression des *lin-14* Proteins von entscheidender Bedeutung ist (Wightman et al. 1991).

Diese Art der Regulation von heterochronen Genen wurde für lange Zeit als ein spezifischer Mechanismus der Nematoden angesehen. Auch nach der Entdeckung von *let-7*, einem Gen welches ebenfalls für ein kurzes RNA Molekül in *C. elegans* kodiert, glaubte man nicht an einen generellen Regulationsmechanismus, da es wie bei *lin-4* in denselben heterochronen Regulationsweg involviert ist. Erst als im Jahr 2000 homologe *let-7* Gene und deren komplementäre Binderegionen in der 3'-UTR des Zieltranskripts *lin-14* im Genom der Fliege *Drosophila melanogaster*, in Säugern sowie Menschen entdeckt wurden (Pasquinelli et al. 2000; Slack et al. 2000), wurde eine neue Klasse von kleinen regulatorischen RNAs, die als microRNAs betitelt wurden, begründet (Lagos-Quintana et al. 2001; Lau et al. 2001; Lee and Ambros 2001).

### 1.1.1 Mechanismus der Biogenese von microRNAs

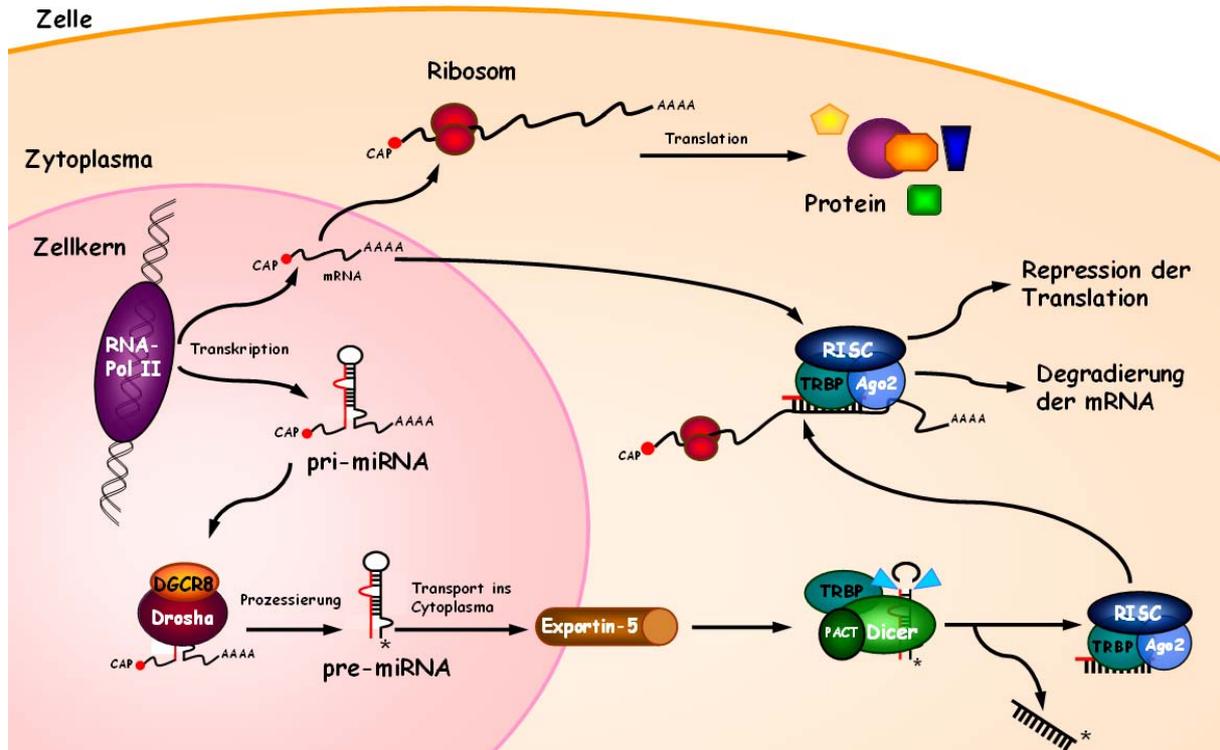
MicroRNAs (miRNAs) sind endogene, nicht kodierende, einzelsträngige RNA-Moleküle mit einer Länge von 18-24 Nukleotiden (nt). Sie inhibieren posttranskriptionell die Proteinsynthese durch eine komplementäre Interaktion mit der 3'-UTR ihrer Zieltranskripte (zusammengefasst in Abbildung 1). Prozessiert werden die jeweiligen miRNAs entweder monocistronisch aus einem eigenen Gen, polycistronisch durch Transkription mehrerer

miRNAs in einem Cluster von demselben Promotor aus oder intronisch, wobei eine miRNA aus dem Intron eines Protein-kodierenden Gens gemeinsam mit dem Protein synthetisiert wird (Filipowicz et al. 2008). Die miRNA Gene werden von der RNA-Polymerase II transkribiert und, wie bei Protein-kodierenden miRNAs, mit einer 5'-terminalen 7-Methylguanosin-Kappe sowie einem 3'-terminalen Poly-A Schwanz versehen. Die ~100 Nukleotid lange primäre-miRNA (pri-miRNA) besitzt einen haarnadelartig gefalteten Abschnitt. Dieser Abschnitt wird bei der weiteren Prozessierung durch den Mikroprozessorkomplex, bestehend aus dem RNase III Enzym Droscha und dem doppelsträngigen RNA-bindenden Protein DGCR8, in die Vorläufer-miRNA (pre-miRNA), gekennzeichnet durch einen 2nt Überhang am 3'-Ende sowie einem Phosphat am 5'-Ende, umgesetzt (Lee et al. 2003). Die 60-70nt lange pre-miRNA wird mit Hilfe des Rezeptorproteins Exportin-5 aus dem Nukleus ins Zytoplasma transportiert (Cullen 2004).

Im Zytoplasma erkennt die RNase III Endonuklease Dicer die pre-miRNA und spaltet diese in eine 18-24 nt lange Duplex RNA (Bernstein et al. 2001). Die Bindung von Ago2, einem Protein der Argonaute (Ago) Familie, an Dicer führt zur Bildung eines Lade-Komplexes für den „RNA induzierenden Stilllegungskomplex“ (RISC), wobei die doppelsträngige miRNA auf Ago2 übertragen wird (Maniataki and Mourelatos 2005).

Bei Säugern sind 4 Ago Proteine bekannt, die einen Bestandteil des RISC darstellen (Filipowicz et al. 2008). Die Prozessierung der Vorläufer-miRNA zur reifen miRNA, durch Dicer und RISC, stellt somit einen dynamischen Prozess dar, bei dem nach der Übertragung der miRNA die Trennung der doppelsträngigen RNA erfolgt. Meist fungiert der Strang als reife miRNA, dessen 5'-Terminus am thermodynamisch weniger stabilen Ende liegt, während der Gegenstrang gespalten wird (Tomari et al. 2004). Die reife miRNA kann in den RISC Komplex inkorporieren und mit Zieltranskripten interagieren.

Eine Interaktion von miRNAs mit mRNAs kommt bei einer vollständigen Komplementarität der „seed“-Region, einem 6-7 nt langen Bereich am 5'-Terminus der miRNA, zu einer Binderegion in der 3'-UTR der Zieltranskripte zustande (Doench and Sharp 2004; Krek et al. 2005; Lewis et al. 2005). Die Inhibierung der Translation der Zieltranskripte kann bei miRNAs jedoch auf unterschiedliche Weise erfolgen. So kann die Interaktion zur Repression der Translation führen, aber auch eine Destabilisierung der mRNA durch eine Deadenylierung bewirken. Alle Ago Proteine sind in der Lage die Translation zu inhibieren, jedoch ist nur Ago2 dazu befähigt, eine RNA zu spalten (Filipowicz et al. 2008).



**Abbildung 1: MicroRNA Biogenese.** miRNA Gene werden von der RNA-Polymerase III zur pri-miRNA transkribiert und besitzen sowohl einen Poly-A Schwanz am 3'-Ende, als auch eine 7-Methylguanidin-Kappe am 5'-Ende. Durch die RNase III Drosha wird die pri-miRNA zur 60-70bp langen pre-miRNA prozessiert und durch Exportin-5 ins Zytoplasma transportiert. Durch das RNaseIII Enzym Dicer wird die pre-miRNA in eine 18-24bp lange Duplex-miRNA geschnitten. Nach Entwindung und Trennung wird die reife, einsträngige miRNA in den RISC eingebaut und kann an ihre Zieltranskripte binden. Die Aktivität der Zieltranskripte wird, abhängig vom Grad der Komplementarität, nach Interaktion mit der miRNA entweder durch Repression oder Degradierung inhibiert. Pri-miRNA = primäre miRNA, pre-miRNA = Vorläufer miRNA, RISC = RNA induzierender Stilllegungskomplex, DGCR8 = *Di George Syndrome Critical Region Gene 8*, TRBP = *Transactivating response RNA-binding protein*.

### 1.1.2 Pathogenetische Bedeutung von miRNAs

MiRNAs sind in verschiedene Zellprozesse wie z.B. die Proliferation, Apoptose, Differenzierung, Embryonalentwicklung und Onkogenese involviert (Ambros 2003; Brennecke and Cohen 2003; Xu et al. 2003). Sie besitzen eine hohe Relevanz wegen der Fähigkeit als endogene Regulatoren die Genexpression zu beeinflussen. Auf Grund dessen stellt die Identifizierung von miRNAs und ihren Zieltranskripten einen wichtigen Punkt für das Verständnis der regulatorischen Abläufe in der Zelle dar.

Für die Ermittlung von Zieltranskripten, aber auch deren miRNAs, wird mittlerweile auf verschiedene Genomdatenbanken wie Targetscan (<http://www.targetscan.org> (Creighton et al. 2008)) und Pictar (<http://pictar.mdc-berlin.de> (Krek et al. 2005)) zurückgegriffen. Für die Voraussage einer potentiellen Zielsequenz werden verschiedene Kriterien mit einbezogen. So erfolgt die Ermittlung eines Zieltranskripts über die Stärke der evolutionären Konserviertheit

zwischen „seed“- und Binderegion. Hohe Konserviertheiten dieser Sequenzbereiche sprechen für eine biologische Funktion auf Grund der Fähigkeit, dem selektiven Druck stand gehalten zu haben. Eine zusätzliche Komplementarität der flankierenden Regionen erhöht abermals die Wahrscheinlichkeit einer positiven Interaktion und optimiert die thermodynamische Stabilität der Bindung. Die Sekundärstruktur übt ebenfalls Einfluss auf die Zugänglichkeit und somit auch auf die Interaktionswahrscheinlichkeit aus (Bartel 2009).

Das Vorkommen und die Wirkungsweise einer miRNA kann innerhalb eines Organismus stark variieren. Veränderungen des endogenen Gleichgewichts von miRNAs sind häufig mit dem Auftreten verschiedener Erkrankungen assoziiert. Dies ist in sofern nicht verwunderlich, da über 1100 humane miRNAs (<http://microrna.sanger.org>, Stand März 2011) bereits identifiziert wurden und diese schätzungsweise ein Drittel aller Gene zu beeinflussen vermögen. Hinzu kommt, dass etwa 50% aller annotierten miRNAs in Genomregionen, die als „*fragile sites*“ bezeichnet werden lokalisiert sind. Das Brechen dieser Regionen führt zur Deregulation von miRNAs und damit zur Veränderung von u.a. Proliferations- und Apoptoseabläufen und wird vermehrt mit verschiedenen Krebserkrankungen assoziiert (Calin et al. 2004). So wurde beobachtet, dass bei bestimmten Lungenkrebskrankungen die miRNA let-7 vermindert vorzufinden ist. Da let-7 die Expression des Onkogens RAS zu regulieren vermag, ist bei einer Reduktion dessen Repressorfunktion inhibiert, wodurch die Krebsentstehung begünstigt wird (Takamizawa et al. 2004; Johnson et al. 2005). Die miR-122, welche hauptsächlich von Hepatozyten produziert wird und als leberspezifische miRNA bekannt ist, wird häufig erniedrigt in hepatozellulären Karzinomen (HCCs) und in Leberkarzinomzellen vorgefunden (Gramantieri et al. 2007; Bai et al. 2009; Fornari et al. 2009). Mitunter stellen die zwei Faktoren „*Serum response factor*“ und der insulinähnliche Wachstumsfaktor 1 Rezeptor, welche die Tumorgenese begünstigen (Bai, Nasser et al. 2009), aber auch das in den Zellzyklus involvierte Zyklin G1 (Gramantieri, Ferracin et al. 2007) Zieltranskripte der miR-122 dar.

In der chronisch lymphatischen Leukämie, die meist durch Deletion eines bestimmten chromosomalen Abschnitts ausgelöst wird, wurde eine veränderte Expression des miR-15a/16-1 *Clusters* festgestellt (Cimmino et al. 2005). Eine Deregulation der miR-29 konnte ebenfalls während der chronisch lymphatischen Leukämie (Pekarsky, Santanam et al. 2006), aber ebenso in Lungen- (Fabbri et al. 2007) und Prostatakarzinomen (Porkka et al. 2007) beobachtet werden. Zusätzlich wurde neben den Malignomen auch in Erkrankungen wie der Typ 2 Diabetes ein vermehrtes Auftreten der miR-29 erfasst, die mit der Hemmung der

insulinvermittelten Glukoseaufnahme in die Adipozyten in Verbindung gebracht wird (He et al. 2007).

In der chronischen Leberfibrose sind bis heute wenige miRNAs und deren Funktionen charakterisiert worden. So konnte z.B. in einer Arbeit von Marquez et al. (Marquez et al.) gezeigt werden, dass eine positive Korrelation zwischen der Leberfibrose und miR-21, sowie eine negative zwischen der Fibrose und der leberspezifischen miR-122 vorliegt. Zudem wurde herausgefunden, dass miR-21 das Signal von TGF- $\beta$  durch die Inhibierung von SMAD7, einem Inhibitor des durch TGF- $\beta$  aktivierten SMAD Signaltransduktionsweges verstärkt (Marquez et al. 2010) und selbst durch die Unterstützung der TGF- $\beta$  rezeptorspezifischen Signalübermittler SMAD2/3 verstärkt exprimiert wird (Davis et al. 2008).

Ebenfalls wurde in einer Arbeit von Murakami et al. eine positive Korrelationen zwischen dem Fibroseverlauf und den vier miRNAs miR-199, miR-199\* sowie miR-200a und miR-200b beschrieben (Murakami et al. 2011).

In einer anderen Studie konnte durch die Erstellung eines miRNA-Expressionsprofils eine erhöhte Expression von miR-27a/27b in aktivierten hepatischen Sternzellen aus der Ratte gezeigt werden. Eine *in vitro* Inhibierung von miR-27a/b hatte eine Deaktivierung und Redifferenzierung der HSC zur Folge, begleitet von einer erhöhten Fettakkumulation und erniedrigten Proliferation, da das miR-27a/b Zieltranskript, der Retinoid X Rezeptor alpha, exprimiert werden konnte (Ji et al. 2009).

Somit könnte die Ermittlung der Expression von miRNAs während der Leberfibrogenese und deren Regulationsfunktionen zu neuen Erkenntnissen in der Leberfibrose beitragen.

## 1.2 Leberfibrose

Durch chronische Schädigungen der Leber werden Wundheilungsprozesse aktiviert, bei denen durch die übermäßige Vermehrung der extrazellulären Matrix eine Vernarbung des Lebergewebes erfolgt. Dieser Prozess wird als Leberfibrogenese bezeichnet und beruht auf einem Ungleichgewicht zwischen Abbau und Synthese von extrazellulären Bindegewebsbestandteilen. Die häufigsten Ursachen für Leberfibrosen sind neben toxischen (chronische alkoholtoxische Hepatitis) und infektiösen (chronische Hepatitis B- und C-Virusinfektionen) auch cholestatische (Mucoviszidose) und metabolische (Morbus Wilson) Erkrankungen. Die Leberzirrhose stellt das irreparable Endstadium der Leberfibrose dar (Friedman 1993; Reeves and Friedman 2002).

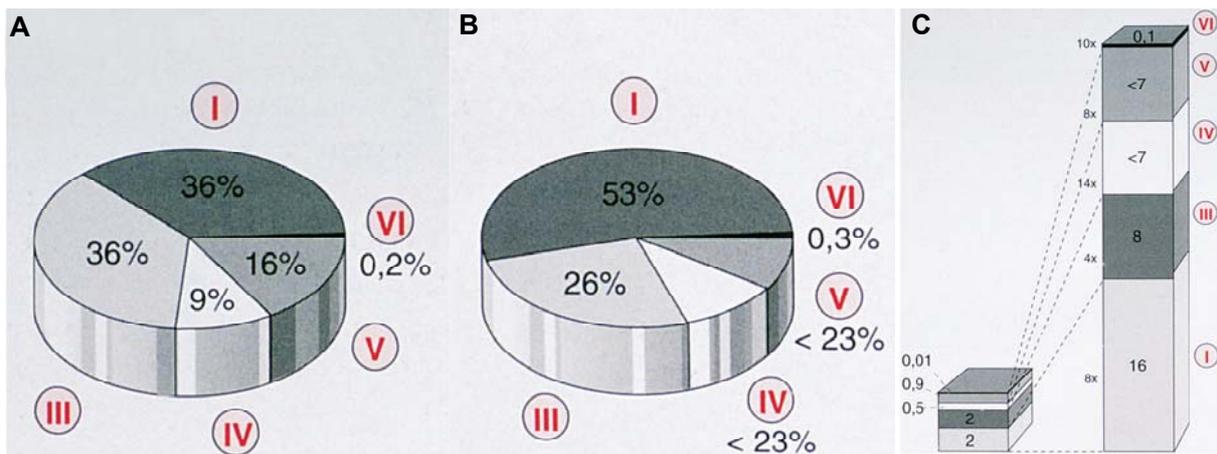
1.2.1 Zusammensetzung der ECM während der Leberfibrogenese

Im Laufe der Fibrogenese erfährt die Leber qualitative und quantitative Veränderungen im Aufbau ihrer extrazellulären Matrixbestandteile. Durch die Zunahme des Bindegewebes und der Ablagerung von extrazellulären Matrixproteinen erhöht sich der Gesamtgehalt der kollagenen und nicht-kollagenen Bestandteile um das 3-5fache des Ursprungswertes (Friedman 1993).

Es kommt zur drastischen Verschiebung des Verhältnisses der Kollagen Typen I – VI. Dabei weist die zirrhotische Leber einen achtfach höheren Anteil an Kollagen I auf als eine gesunde Leber und stellt mit über 50% den größten Kollagentypen einer Leberzirrhose dar (s. Abb. 2). Die stärkste Kollagenzunahme erfährt das Kollagen IV (s. Abb. 2B): es macht nicht nur 23% des Gesamtkollagens aus, sondern weist, im Vergleich zu einer gesunden Leber, auch ein 14fach höheres Kollagengewicht auf (s. Abb. 2C)(Gressner and Weiskirchen 2006).

Hinsichtlich der Tatsache, dass Kollagen IV von allen Kollagenen die größte Deposition erfährt, nimmt es neben Kollagen I eine bedeutsame Rolle in der Leberfibrogenese ein.

An der Proliferation, Verdichtung und Umstrukturierung der extrazellulären Matrix (ECM) sind neben den Proteasen, welche die Degradierung der ursprünglichen ECM einleiten, vor allen Dingen die aktiven hepatischen Sternzellen (HSC) beteiligt (Gressner and Bachem 1990; Arthur et al. 1992; Friedman 1993). Eine Degradierung der neuen, fibrillenreichen Matrix wird durch Proteaseinhibitoren verhindert.



**Abbildung 2 : Kollagenprofil der Leber**

Die Gegenüberstellung der Prozentmenge von Kollagen I-VI in einer normalen Leber (A) und einer zirrhotischen Leber (B) zeigt, dass die Gesamtmenge von Kollagen I um 20%, Kollagen IV um 14%, Kollagen V um 7% und Kollagen VI um 0,1% in der zirrhotischen Leber zunimmt. Lediglich Kollagen III zeigt in der Gesamtmenge einen Verlust von 10% in der zirrhotischen Leber. Der Vergleich des Kollagen Typ I-VI Nassgewichtes in einer normalen zur zirrhotischen Leber weist eine 14fach höhere Kollagen Typ IV (<7mg/g), eine zehnfach höhere Kollagen Typ VI (0,1mg/g), eine achtfach höhere Kollagen Typ I (16mg/g) und V (<7mg/g) und eine vierfach höhere Kollagen Typ III (8mg/g) Menge in der zirrhotischen Leber auf (Gressner and Weiskirchen 2006).

Die von geschädigten Hepatozyten freigesetzten profibrogenen Mediatoren, aber auch von aktivierten Kupffer-Zellen sezernierten proinflammatorische Zytokine führen durch parakrine Stimulierung zur hepatischen Sternzellaktivierung (Friedman and Arthur 1989; Gressner 1991; Gressner and Bachem 1995; Friedman 1999). Die Aktivierung der hepatischen Sternzellen stellt den zentralen pathophysiologischen Prozess der Leberfibrogenese dar (Aterman 1986; Ramadori 1991).

### 1.2.2 Die myofibroblastische Zelldifferenzierung von hepatischen Sternzellen

Die sinusoidalen hepatischen Sternzellen, die auch als Itozellen, Lipocyten oder Fettspeicherzellen bekannt sind, weisen im ruhenden Zustand eine geringe proliferative Aktivität auf. Sie haben einen Anteil am Gesamtlebervolumen von ungefähr 1,4% und machen 15% aller Leberzellen aus. In der gesunden Leber speichern sie 80% des körpereigenen Vitamin A (Wang 1999; Friedman 2000; Gressner and Weiskirchen 2006).

Die HSC sezernieren in der gesunden Leber im geringen Maße Basalmembrankomponenten, die im Disse'schen Raum abgelagert werden. Zusätzlich werden Faktoren synthetisiert, die für den Abbau der ECM verantwortlich sind. Durch die Freisetzung von Proteasen, welche die Aufgabe der Matrixdegradierung übernehmen und Proteaseinhibitoren, die für die Hemmung des Matrixabbaus verantwortlich sind, gewährleisten die HSC die Homöostase der extrazellulären Matrix im Disse'schen Raum (Friedman 1990; Gressner and Bachem 1990; Arthur et al. 1992; Iredale et al. 1992; Leyland et al. 1996).

Bedingt durch die Schädigung der Hepatozyten erfolgt durch fibrogene Stimulierung eine morphologische und funktionelle Veränderung der HSC. Diese hat zur Folge, dass die HSC zu proliferierenden, fibrogenen und Myofibroblasten-ähnlichen Zellen transdifferenzieren und ein Verlust ihrer retinoidspeichernden Fettvakuolen auftritt (Gressner and Zerbe 1987; Zerbe and Gressner 1988; Gressner and Bachem 1995; Friedman 1999; Gressner et al. 2002). Diese aktiven HSC zeichnen sich ferner durch die zunehmende Expression des Zytoskelettproteins *alpha-Smooth-Muscle-Actin* ( $\alpha$ -SMA) aus, das sie zur Kontraktilität befähigt. Aktive HSC weisen als Hauptkollagenproduzenten der Leberfibrose eine ausgeprägte Bindegewebsproduktion sowie einen heterogenen Intermediärfilamentenbestand mit Desmin und Vimentin auf (Johnson et al. 1991; Alpers et al. 1992; Friedman 1993; MacPherson et al. 1993; Gressner 1996; Kapanci et al. 1997).

Eine weitere Antwort der aktivierten HSC ist die umfangreiche Synthese von inflammatorischen und profibrogenen Mediatoren, welche die fibrogenen Prozesse durch autokrine Stimulationen zusätzlich verstärken (Gressner 1992; Numaguchi et al. 1994; Friedman 1999; Pinzani and Marra 2001; Ramadori and Armbrust 2001).

### **1.2.3 Rolle von fibrogenen Zytokinen bei der Entstehung der Leberfibrose**

Neben den unterschiedlichen inflammatorischen und fibrogenen Zytokinen stellt der *Transforming Growth Factor-β* (TGF-β) den zentralen Mediator der Leberfibrose dar (Czaja et al. 1989). TGF-β wird einer großen Zytokinfamilie zugeordnet, zu denen u. a. auch *bone morphogenetic factor proteins* (BMPs), Activine, Inhibine und der *growth differentiation factor 5* (GDF5) angehören (Saharinen et al. 1999; Miyazono et al. 2005). Neben den profibrogenen Eigenschaften übt TGF-β auch Einfluss auf die Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Embryonalentwicklung, Immunreaktion, Wundheilung, Entzündungsreaktionen und die Angiogenese aus (Massague 1998; Blobe et al. 2000).

In Säugetieren sind drei Isoformen vorzufinden TGF-β1, TGF-β2 und TGF-β3 (Taipale et al. 1998). Nahezu alle Zellen können TGF-β in Form eines inaktiven Vorläuferproteins synthetisieren, das überwiegend als latenter TGF-β Komplex (LTBP-LAP-TGF-β) vorliegt (Gong et al. 1998; Roth et al. 1998), bestehend aus einer N-terminalen Region (LAP), die kovalent mit dem „*latent TGF binding protein*“ (LTBP) assoziiert ist, und einer C-terminalen Region, die das später aktive TGF-β darstellt (Gentry et al. 1988; Roth et al. 1997; Hyytiainen et al. 1998). Die Aktivierung des TGF-β Zytokins erfolgt durch proteolytische Prozesse, die zu einer Lösung des TGF-β Dimers aus dem LTBP-LAP-TGF-β Komplex führen.

Es existieren drei verschiedene TGF-β Rezeptoren (TGF-β Rezeptor Typ I, Typ II, Typ III) (Cheifetz et al. 1992; Lopez-Casillas et al. 1993; Schlessinger et al. 1995; Miyazono 1997). Lediglich die ersten beiden Rezeptoren scheinen für die Signalübermittlung essentiell zu sein. Sie besitzen neben einer extrazellulären Domäne, die als Bindungsstelle für TGF-β-Signalmoleküle dient, einen transmembranen Bereich, der das Signal ins Zellinnere zur intrazellulären Domäne, der Serin/Threonin-Kinase weiterleitet (Wrana et al. 1994).

In Abwesenheit eines Liganden liegen TGF-β RI und TGF-β RII als Homodimere vor. Durch Bindung des aktiven TGF-β Signalmoleküls an den Rezeptor Typ II erfolgt die Interaktion und Bildung eines hetero-tetrameren Komplexes mit dem Rezeptor Typ I. Der aktive TGF-β-RII phosphoryliert den TGF-β-RI, wodurch es zur Aktivierung der TGF-β RI Serin/Threonin-Kinase kommt und diese ihrerseits die intrazellulär gelegenen „*receptor-*

*mediated SMADs*“ (R-SMADs), SMAD2 und 3 aktivieren kann (Chen and Weinberg 1995; Heldin et al. 1997; Massague and Chen 2000). Die aktiven R-SMADs lösen sich vom Rezeptorkomplex und interagieren mit dem cytoplasmatisch gelegenen „*common-mediated SMAD*“ (Co-SMAD), SMAD4. Der R/CO-Smad Komplex transloziert in den Zellkern und kann dort durch Interaktionen mit Transkriptionsfaktoren die Transkription entsprechender Zielgene aktivieren. Die I-SMADs, wie das Protein SMAD7, können ebenfalls an aktive TGF- $\beta$  RI binden und somit die R-SMAD Phosphorylierung hemmen (Massague 1996; Heldin et al. 1997; Whitman 1997; Kretzschmar and Massague 1998; Govinden and Bhoola 2003).

Die entscheidenden Auswirkungen des proinflammatorischen TGF- $\beta$  während der Fibrogenese sind die antiproliferativen Effekte auf Hepatozyten, die leberregenerierenden Prozessen entgegenwirken (Carr et al. 1986; Massague 1990). Darüber hinaus kommt es in HSC zu einer erhöhten Expression der ECM Proteine wie z.B. Kollagen, Fibronectin, Tenascin, Laminin und Proteoglycan (Ignotz and Massague 1986; Varga et al. 1987; Pearson et al. 1988). TGF- $\beta$  bewirkt jedoch auch eine Suppression des Matrixabbaus. Dieser kann durch die gesenkte Produktion von matrixdegradierenden Enzymen, wie den Kollagenasen, Stromelysinen und Plasminogen Aktivatoren, hervorgerufen werden. Jedoch kann auch durch die erhöhte Expression von Inhibitoren der matrixabbauenden Enzyme, zu denen der „Plasminogenaktivator-Inhibitor“ und „*Tissue Inhibitor of Metalloproteases 1*“ gerechnet werden, eine Suppression der Matrixproteine verursacht werden (Laiho et al. 1986; Edwards et al. 1987; Kerr et al. 1988).

Die Leberfibrogenese ist mit einem starken Anstieg der TGF- $\beta$  Expression verbunden. So konnten erhöhte TGF- $\beta$  Expressionen nicht nur in verschiedenen Tiermodellen mit experimentell induzierter Fibrose beobachtet, sondern auch durch klinische Daten belegt werden, die für eine übergeordnete Rolle von TGF- $\beta$  in der Leberfibrogenese sprechen (Czaja et al. 1989; Castilla et al. 1991; Brenner et al. 1993; Milani et al. 1994; Jonsson et al. 2001). Die Bedeutung von TGF- $\beta$  in fibrotischen Prozessen wurde zusätzlich durch Überproduktionen von TGF- $\beta$  in verschiedenen transgenen Mausmodellen unterstrichen (Sanderson et al. 1995; Ueberham et al. 2003).

Abgesehen von TGF- $\beta$  ist das HSC-aktivierende Zytokin *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF) als profibrogener Mediator der Organfibrose bekannt (Ramadori and Armbrust 2001). PDGF ist neben seiner Beteiligung in der Embryogenese, Wundheilung und Angiogenese dafür bekannt, die Proliferation von mesenchymalen Zellen zu fördern und als starkes Mitogen für HSC zu fungieren. Es sind fünf Isoformen von PDGF bekannt, die über

Disulfidbrücken als Dimere in Form von PDGF-AA, -AB, -BB, -CC und -DD auftreten. Durch Bindung von PDGF an die PDGF-Rezeptor-Tyrosinkinase erfolgt eine Dimerisierung und Phosphorylierung dieser Rezeptoren und die Aktivierung des Phosphoinositid-3-Kinase-Signalwegs. Infolge der überwiegenden PDGF- $\beta$ -Rezeptorsynthese in HSC, übt unter den PDGF Isoformen PDGF-BB den stärksten Effekt auf die HSC aus (Pinzani et al. 1995).

Neben den profibrogenen Zytokinen sind auch einige Mediatoren, wie der „*Hepatocyte Growth Factor*“ und das „*Bone Morphogenic Protein 7*“ dafür bekannt, durch Eingreifen in fibrotische Prozesse eine antifibrogene Wirkung auszuüben (Matsuda et al. 1997; Kinoshita et al. 2007).

#### 1.2.4 Rolle des HGF - TGF- $\beta$ Antagonismus in der Leberfibrogenese

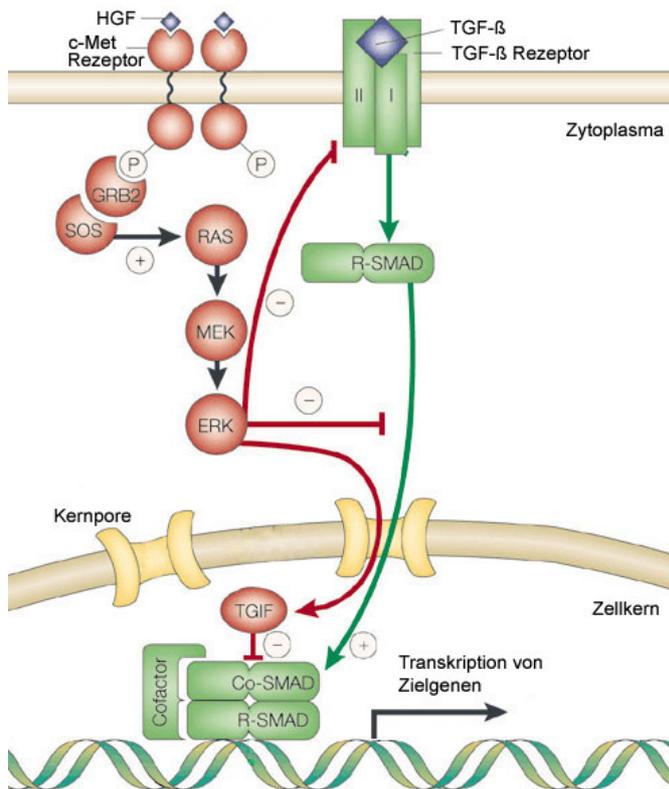
Der *Hepatocyte Growth Factor* (HGF) ist ein multifunktionseller Wachstumsfaktor mit mitogenen, motogenen, morphogenen und antiapoptotischen Eigenschaften. Es konnte gezeigt werden, dass HGF eine essentielle Rolle in der embryonalen Organentwicklung einnimmt, aber auch in der Wundheilung und Organregeneration von großer Bedeutung ist (Schmidt et al. 1995; Matsumoto and Nakamura 1996).

HGF wird als monomeres pro-HGF sezerniert und stellt den einzig bekannten Liganden der Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK) Met, einem Produkt des c-met Protoonkogens, dar (Bottaro et al. 1991). Nach enzymatischer Proteolyse bindet das aktive HGF an MET und leitet dadurch die Dimerisierung und Autophosphorylierung des Rezeptors ein. An die phosphorylierte RTK können Signal- und Adapterproteine, wie Grb2, SOS, Gab1, PI3K binden und die Signaltransduktionswege PI3K/Akt, Ras-Raf-MAPK und Stat3 induzieren (Graziani et al. 1993; Matsumoto et al. 1994; Ponzetto et al. 1994; Comoglio and Boccaccio 1996; Leshem et al. 2002).

In der Leber trägt HGF zur Regulation der Leberzellproliferation bei. Er wird in der gesunden Leber ausschließlich von HSC produziert. Im Gegensatz zur akut geschädigten Leber ist in der chronischen Fibrose ein Verlust der HGF Expression durch die Umwandlung der HSC zu MFB ausgemacht worden (Schirmacher et al. 1992; Schirmacher et al. 1993). Jedoch konnte an verschiedenen Fibrosemodellen gezeigt werden, dass wiederholte Injektionen von HGF zur Besserung und sogar zur kompletten Resolution der Fibrose einer zirrhotischen Leber führen können. Gleichzeitig wurde beobachtet, dass HGF den TGF- $\beta$  Transkriptspiegel in den Modellorganismen senkt (Matsuda et al. 1995; Yasuda et al. 1996; Matsuda et al. 1997; Ueki

et al. 1999). Die antiinflammatorischen und antifibrogenen Eigenschaften des HGFs beruhen auf einem Antagonismus zu TGF- $\beta$ .

An renalen Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass HGF über das Met-Rezeptorsignal die Aktivierung des Ras-Mek-Erk Signalweges einleitet. Aktives Erk inhibiert daraufhin durch die Phosphorylierung einer spezifischen Region am SMAD2/3 dessen Translokation in den Zellkern. Die Inhibition der Translokation führt zur Unterbrechung der TGF- $\beta$  übermittelnden Zieltranskriptsynthese (Yang et al. 2003). An Mesangialzellen wurde hingegen gezeigt, dass das aktive Erk keinen Einfluss auf SMAD2/3 ausübt jedoch den SMAD-Korepressor-TGIF Interaktionsfaktor stabilisiert. Dieser verhindert zwar nicht die Translokation des SMAD, inhibiert jedoch die TGF- $\beta$  vermittelnde Promotoraktivierung der Zielgene (Dai and Liu 2004) (s. Abb. 3).



**Abbildung 3: Schematische Darstellung der Antagonismusfunktion von HGF und TGF- $\beta$**   
 Die Übermittlung der antagonistischen Wirkung von HGF auf TGF- $\beta$  beruht auf einer Aktivierung des Ras-Mek-Erk Signalweges. Das aktive Erk kann zum einen durch die Phosphorylierung der R-SMADs deren Translokation in den Zellkern unterbinden und zum anderen über die Stabilisierung des TGIF die promotor-aktivierende Wirkung der SMADs inhibieren, wodurch eine Unterbrechung der TGF- $\beta$  Signalübermittlung erfolgt.  
 GRB2=growth factor receptor bound protein 2, SOS=son of sevenless, RAS= Rat sarcoma, MEK= Mitogen-aktivierte Proteinkinase, ERK= extrazellulär signalregulierende Kinase, R-SMAD=Rezeptor-regulierende SMADs, Co-SMAD=Common-SMAD, TGIF= TG interacting factor. Abbildung entnommen und modifiziert nach (Massague 2000).

Die genaue Funktionsweise dieses Antagonismus in HSC konnte bisher nicht geklärt werden.

### 1.3 Zielsetzung der Arbeit

MiRNAs besitzen die Fähigkeit die Proteinexpression zu inhibieren und beeinflussen somit eine Vielzahl der zellbiologischen Prozesse. Das Ziel der vorgelegten Arbeit war es daher, eine miRNA zu identifizieren, welche durch mRNA-Interaktion das profibrogene Expressionsmuster zu reprimieren im Stande wäre und somit als eine antifibrogene miRNA in der Leberfibrose fungieren könnte.

Da hepatischen Sternzellen den zentralen Zelltyp der Leberfibrogenese darstellen und nach myofibroblastischer Differenzierung nicht nur die hauptmatrix-produzierenden Zellen sind sondern ebenfalls profibrogene Mediatoren sezernieren, sollten diese Zellen für die Untersuchungen verwendet werden. In einem ersten Schritt sollte über algorithmische Berechnungen eine miRNA ermittelt werden, die mit Kollagentranskripten interagieren und zusätzlich noch andere profibrogen-wirkende Zieltranskriptdomänen inhibieren könnte. Anschließend sollten hepatische Sternzellen mit künstlich synthetisierten miRNAs transfiziert und eine mögliche Interaktion mit der Binderegion in der 3'-UTR, sowie die Inhibierung der Proteinsynthese untersucht werden.

Um der Rolle der identifizierten miRNA in der Fibrogenese nachzugehen, sollte desweiteren ihre Expression in einem experimentellen Fibrosemodell untersucht werden. Hierzu sollten Leberproben aus Ratten verwendet werden, welche zuvor einer Gallengangsokklusion unterzogen wurden, was die Induktion einer Leberfibrose zur Folge hatte.

In einem weiteren Ansatz sollte der Frage nachgegangen werden, wie sich die Expression dieser miRNA und ihrer Zieltranskripte während der myofibroblastischen Differenzierung und unter dem Einfluss von profibrogenen und antifibrogenen Wachstumsfaktoren verhält. Darüber hinaus sollte eine adenovirale Expressionskassette erstellt werden, um in zukünftigen *in vivo* Studien eine antifibrogen-wirkende Myofibroblasten-spezifische miRNA Synthese zu ermöglichen.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Chemikalien, Plastikwaren und sonstige Materialien**

Standardchemikalien und Lösungen wurden, sofern nicht anders vermerkt, von den Firmen Roth (Karlsruhe, Deutschland), Sigma (Dreisendorf, Deutschland) und Merck (Darmstadt, Deutschland) in pro Analysis (p.A.) Qualität bezogen. Die verwendeten Pipettenspitzen stammten von der Firma Biozym (Oldendorf, Deutschland) sowie Labomedic (Bonn, Deutschland). Von den Firmen Eppendorf (Hamburg, Deutschland) und Biozym (Oldendorf, Deutschland) wurden alle Reaktionsgefäße erworben.

Alle für die Zellkultur benötigten Plastikwaren wurden von den Firmen TPP (Hörstel, Deutschland), Nunc (Wiesbaden, Deutschland) und Becton-Dickinson Laborware (Lincoln Park, NJ, USA) bezogen.

Vor der Verwendung von Lösungen sowie anderen Materialien wurden diese in einem Autoklaven bei 121°C, 1,2 bar und feuchter Hitze für 20 Minuten autoklaviert (Varioklav von H+P Labortechnik, Oberschleißheim, Deutschland). Glas- und Metallmaterialien wurden 5h im Backschrank (Mettler, Schwabach, Deutschland) bei 180°C sterilisiert.

#### **2.1.2 Herstellung von Lösungen und Puffern**

Alle Puffer und Lösungen wurden, falls nicht anders angegeben, mit vollentsalztem Wasser aus der Filteranlage Elga Purelab (Elga Berkefeld, Celle, Deutschland) angesetzt. Die Bezugsquellen oder Zusammensetzungen der verwendeten Puffer und Lösungen sind den jeweiligen Methoden zu entnehmen.

### 2.1.3 Software

In dieser Arbeit wurde folgende Software verwendet:

**Tab. 1: Verwendete Software**

Software	Version	Hersteller
DNASIS®MAX	2.0	Hitachi Software Engineering (Tikio, Japan)
Redasoft Plasmid	1.1	Redasoft (Toronto, Kanada)
NetPrimer	<a href="http://www.premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch/netprlaunch.html">http://www.premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch/netprlaunch.html</a>	Premier Biosoft (Palo Alto, USA)
MxPro	4.00	Stratagene (La Jolla, USA)
CFX Manager	1.6.541.028	BioRad (München, Deutschland)
Cell^P	2.5	Olympus Soft Imaging Solutions (Münster, Deutschland)
Ascent Software	2.6	Thermo Labsystems (Helsinki, Finnland)
SPSS Statistic	17.0	SPSS Software (München, Deutschland)
Revelation	3.2	Dynatech Laboratories (VA, USA)
Alpha Ease FC TM	4.0.0	Alpha Innotech Corporation (Alpha Innotec, Cell Biosciences, CA, USA)
DeVisionG	2.0	Decon Science Tec GmbH (Hohengandern, Deutschland))

### 2.1.4 Zelllinien

In dieser Arbeit wurden folgende Zelllinien verwendet:

**Tab. 2: Verwendete Zelllinien**

Zelllinien	Charakteristika	Spezies
HSC-T6	immortalisierte, myofibroblastische Zelllinie	Ratte (Vogel et al. 2000)
Pav-1	immortalisierte, myofibroblastische Zelllinie	Ratte [106]
A10	mesenchymalen Zelllinie aus glatten Muskelzellen der Arteria thoracica von Rattenembryonen	Ratte (Gibson et al. 1988)
HEK-293 Human Embryonic Kidney cells	hypotriploide Epithelzellen, die neben eben der humane-embryonalen-Nierenzell-DNA einen DNA-Teil des humanen Adenovirus Typ 5 enthält	Human (Graham et al. 1977)
HUH-7 Human Hepatoma cells	humane epitheliale Hepatomazellen	Human (Vecchi et al.)

## 2.1.5 DNA Konstrukte

Tab. 3: Verwendete Plasmide und Vektoren

Vektoren und Plasmide	Beschreibung/Merkmale
psiCHECK-2	RV Promega (Madison, USA)
psiCHECK-miR29a Sensor	RV mit Consensussequenz der miR-29a
psiCHECK-Col4A1-3'-UTR	RV mit der 3'-UTR Region aus Col4A1
psiCHECK-Col4A5-3'-UTR	RV mit der 3'-UTR Region aus Col4A5
psiCHECK-Col1A1-Rat	RV mit Binderegion für miR-29a aus der 3'-UTR Region von Col1A1 Rat
psiCHECK-Col1A1-Human	RV mit Binderegion für miR-29a aus der 3'-UTR Region von Col1A1 Human
psiCHECK-Col1A1-Mutante	RV mit mutierter Binderegion für miR-29a aus der 3'-UTR Region von Col1A1
psiCHECK-Col1A2	RV mit Binderegion für miR-29a aus der 3'-UTR Region von Col1A2
psiCHECK-Col1A2 Mutante	RV mit mutierter Binderegion für miR-29a aus der 3'-UTR Region von Col1A2
psiCHECK-Col4A1	RV mit Binderegion für miR-29a aus der 3'-UTR Region von Col4A1
psiCHECK-Col4A1 Mutante	RV mit mutierter Binderegion für miR-29a aus der 3'-UTR Region von Col4A1
psiCHECK-Col4A4	RV mit Binderegion für miR-29a aus der 3'-UTR Region von Col4A4
psiCHECK-Col4A4 Mutante	RV mit mutierter Binderegion für miR-29a aus der 3'-UTR Region von Col4A4
psiCHECK-Col4A5	RV mit Binderegion für miR-29a aus der 3'-UTR Region von Col4A5
psiCHECK-Col4A5 Mutante	RV mit mutierter Binderegion für miR-29a aus der 3'-UTR Region von Col4A5
psiCHECK-PDGF-C	RV mit Binderegion für miR-29a aus der 3'-UTR Region von PDGF-C
psiCHECK-PDGF-C Mutante	RV mit mutierter Binderegion für miR-29a aus der 3'-UTR Region von PDGF-C
psiCHECK-IGF-I	RV mit Binderegion für miR-29a aus der 3'-UTR Region von IGF-I
psiCHECK-IGF-I Mutante	RV mit mutierter Binderegion für miR-29a aus der 3'-UTR Region von IGF-I
psiCHECK-VEGF-A	RV mit Binderegion für miR-29a aus der 3'-UTR Region von VEGF-A
psiCHECK-VEGF-A Mutante	RV mit mutierter Binderegion für miR-29a aus der 3'-UTR Region von VEGF-A

psiCHECK-PDGF-RB	RV mit Binderegion für miR-29a aus der 3'-UTR Region von PDGF-RB
psiCHECK-PDGF-B	RV mit Binderegion für miR-29a aus der 3'-UTR Region von PDGF-B
pmiRNA-29a	Expressionsvektor mit microRNA-29a-Precursorkassette unter Kontrolle des CMV Promotors (System Biosciences, CA, USA)
pB-full-SMA-Cre	Klonierungsvektor mit Cre-Expressionskassette unter Kontrolle des $\alpha$ -SMA Promotors mit Transkriptionsverstärker
pmiRNA-full-SMA-29a	Klonierungsvektor mit microRNA-29a-Precursorkassette unter Kontrolle des $\alpha$ -SMA Promotors mit Transkriptionsverstärker
pShuttle	Adenoviraler Shuttle Vektor (Stratagene, La Jolla, USA)
pShuttle-full-SMA-29a	Adenoviraler Shuttle Vektor mit full-SMA-29a- Kassette
pAdEasy	Adenoviraler „backbone“- Vektor (Stratagene, La Jolla, USA)
pAd-full-SMA-29a	adenoviraler Vektor mit full-SMA-29a Expressionskassette

RV= Reportervektor

### 2.1.6 Antikörper

Tab. 4: Primäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Hersteller
anti-Kollagen $\alpha$ I	Kaninchen	Abcam, Cambridge, England
anti-Kollagen $\alpha$ IV	Kaninchen	Abcam, Cambridge, England
anti-Aktin	Kaninchen	Sigma, Dreisendorf, Deutschland
anti- PDGF-C	Ziege	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
anti-c-Met	Kaninchen	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland

Tab. 5: Sekundäre Antikörper

Antikörper	Hersteller
Alkalische Phosphatase- konjugiertes Ziegen anti-Kaninchen Immunglobulin	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
Peroxidase- konjugiertes Kaninchen anti-Ziege Immunglobulin	Dianova Hamburg, Deutschland

### 2.1.7 Oligonukleotide

Die in der Tabelle 6, 8 und 9 aufgelisteten Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) bezogen und für PCR (Polymerase-Kettenreaktion)-Ansätze oder zur Dimerisierung verwendet.

Für den Nachweis von Proteintranskripten wurden in der quantitativen *Real Time* PCR (qPCR) die in Tabelle 6 aufgelisteten Primer verwendet.

Tab. 6: Primer

Nummer	Oligonukleotid	Sequenz
129	HPRT-Ratte-F	GAC CGG TTC TGT CAT GTC G
130	HPRT-Ratte-R	ACC TGG TTC ATC ATC ACT AAT CAC
158	Col1A1-Ratte-F	CAT GTT CAG CTT TGT GGA CCT
159	Col1A1-Ratte-R	GCA GCT GAC TTC AGG GAT GT
297	Col1A2-Ratte-F	CTG CTC AGT ATT CTG ACA AAG GAG
298	Col1A2-Ratte-R	CTC CGA CAG CAC CAG GAG
299	Col4A1-Ratte-F	GCG AAG GGT GAT TGT GGT
300	Col4A1-Ratte-R	AAC CCT GGA AAG CCT CTC TC
301	Col4A5-Ratte-F	GAC CTC GGG GAC AAA AGG
302	Col4A5-Ratte-R	CCA GGA GGA CCT CTG ATT CC
385	PDGF-C –Ratte-F	GCG GAA GCG CAT CTA TAT CT
386	PDGF-C –Ratte-R	AAT GAA TAG GTC CTC AGA GTC CA
353	IGF-I –Ratte-F	CCA CCA TCA ACA ATG AGT ACA ACT AC
354	IGF-I –Ratte-R	CAC ACA CAC TTG GGC ACA TT
355	VEGF-A –Ratte-F	TTA AAC GAA CGT ACT TGC AGA TG
356	VEGF-A –Ratte-R	TCT AGT TCC CGA AAC CCT GA
357	PDGF-RB –Ratte-F	GCG GAA GCG CAT CTA TAT CT
358	PDGF-RB –Ratte-R	AAT GAA TAG GTC CTC AGA GTC CA
419	HGF-Ratte-F	CTT CTG CCG GTC CTG TTG
420	HGF-Ratte-R	TCT TCT CTT CTT CTG TCC TTC TGC
148	c-met-Ratte-F	CAA GAT TGT CAA CAA AAA CAA CG
149	c-met-Ratte-R	AGC CGA TTG AAT TTC TCA GC

Für den Nachweis von miRNA-Transkripten wurden in der qPCR die in Tabelle 7 aufgelisteten Primer verwendet.

**Tab. 7: Primer**

Oligonukleotid	Hersteller
miR-29a	Qiagen, Hilden, Deutschland
miR-29b	Qiagen, Hilden, Deutschland
SV40	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNU-6B	Qiagen, Hilden, Deutschland
UP	Qiagen, Hilden, Deutschland

Die in Tabelle 8 aufgeführten Oligonukleotide wurden für die Dimerisierung (s. 2.2.2.10) und Insertion in den psiCHECK™-2 Vektor eingesetzt.

**Tab. 8: Für Dimerisierung verwendete Oligonukleotide**

Oligonukleotid	Sequenz
miR29a S	TCG AGA ACC GAT TTC AGA TGG TGC TAA GAT CTA ACC GAT TTC AGA TGG TGC TAG C
miR29a A	GGC CGC TAG CAC CAT CTG AAA TCG GTT AGA TCT TAG CAC CAT CTG AAA TCG GTT C
Col1A1 S	TGG GAA GGA ATT TCT GGT GCT ATA GAA TCT
Col1A1 A	AGA TTC TAT AGC ACC AGA AAT TCC TTC CCA
Col1A1 mut S	TGG GAA GGA ATT TCT GTC GCT ATA GAA TCT
Col1A1 mut A	AGA TTC TAT AGC GAC AGA AAT TCC TTC CCA
Col1A2 S	TCG AGC GAC ACA AAG GTG CTA ATT AGT AGG C
Col1A2 A	GGC CGC CTA CTA ATT AGC ACC TTT GTG TCG C
Col1A2 mut S	TCG AGC GAC ACA AAG TTG ATA CTT AGT AGG C
Col1A2 mut A	GGC CGC CTA CTA AGT ATC AAC TTT GTG TCG C
Col4A1 S	TCG AGG CCG CCG TCA CAA CAT GGT GCT ACG C
Col4A1 A	GGC CGC GTA GCA CCA TGT TGT GAC GGC GGC C
Col4A1 mut S	TCG AGG CCG CCG TCA CAA CAT AGT GCG ACG C
Col4A1 mut A	GGC CGC GTC GCA CTA TGT TGT GAC GGC GGC C
Col4A4 S	TCG AGA ATG TTT GAA TTT TAT GGT GCT TAG C
Col4A4 A	GGC CGC TAA GCA CCA TAA AAT TCA AAC ATT C
Col4A4 mut S	TCG AGA ATG TTT GAA TTT TAC GGT ACT TAG C
Col4A4 mut A	GGC CGC TAA GTA CCG TAA AAT TCA AAC ATT C
Col4A5 S	TCG AGA AGT ATT CTT TTT CAT GGT GCT ACG C

Col4A5 A	GGC CGC GTA GCA CCA TGA AAA AGA ATA CTT C
Col4A5 mut S	TCG AGA AGT ATT CTT TTT CAT AGT GCG ACG C
Col4A5 mut A	GGC CGC GTC GCA CTA TGA AAA AGA ATA CTT C
PDGF-C S	TCG AGT ATT CTT TCT TGT ATG GTG CTA GAG TTA GAG C
PDGF-C A	GGC CGC TCT AAC TCT AGC ACC ATA CAA GAA AGA ATA C
PDGF-C S Mutante	TCG AGT ATT CTT TCT TGT ATG ATG CGA GAG TTA GAG C
PDGF-C A Mutante	GGC CGC TCT AAC TCT CGC ATC ATA CAA GAA AGA ATA C
IGF-I S	TCG AGA GTA CAA TGG TGC TAT TTT GTA GC
IGF-I A	GGC CGC TAC AAA ATA GCA CCA TTG TAC TC
IGF-I S Mutante	TCG AGA GTA CAA TGC TGA TAT TTT GTA GC
IGF-I A Mutante	GGC CGC TAC AAA ATA TCA GCA TTG TAC TC
VEGF-A S	TCG AGT ATC ATT TAT TTA TTG GTG CTA CTG TGC
VEGF-A A	GGC CGC ACA GTA GCA CCA ATA AAT AAA TGA TAC
VEGF-A S Mutante	TCG AGT ATC ATC TAT TTA TTG ATG CGA CTG TGC
VEGF-A A Mutante	GGC CGC ACA GTC GCA TCA ATA AAT AGA TGA TAC
PDGF RB S	TCG AGA TTT TAA TAT TAA ACC TGG TGC TTC TCA CTG C
PDGF RB A	GGC CGC AGT GAG AAG CAC CAG GTT TAA TAT TAA AAT C
PDGF B S	TCG AGG ATT CGG ACG GCC AAT GGT GCT TCC CTC GCG C
PDGF B A	GGC CGC GCG AGG GAA GCA CCA TTG GCC GTC CGA ATC C

Die folgenden Primer wurden zur 3'-UTR Amplifizierung von Kollagen IV verwendet:

**Tab. 9: Primer zur Amplifizierung der 3'-UTR von Kollagen IV**

Oligonukleotid	Sequenz	Temperatur
Col 4A1 F	ATG AGA AGA ACA TAG TGA TGC CC	59 °C
Col 4A1 R	TAA GAT ACA CAG CAA AGC TTA CAG G	59 °C
Col 4A5 F	TTC ACT CAC TCT CCC CAA CTT	58 °C
Col 4A5 R	GAG AAT AAT TCT TAC ATG GGA AGC	58 °C

Für die RNA Interferenz wurden die in Tabelle 9 aufgelisteten miRNA Agonisten (Ago-miRs) und die aufgeführte Kontrolle verwendet.

**Tab. 10: miRNA Agonisten und Kontrolle**

Oligonukleotid	Firma
miR-29a	Qiagen, Hilden, Deutschland
miR-29b	Qiagen, Hilden, Deutschland
SV40	Qiagen, Hilden, Deutschland
negative Kontroll-siRNA (nk-siRNA)	Applied Biosystems Ambion, Darmstadt, Deutschland

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Bakterienkultur

#### 2.2.1.1 Medien, Antibiotika und *E.coli* Stämme

**LB-Medium:** 1,0% [w/v] Tryptone Medium (Fluka, Steinheim)  
0,5% [w/v] Bacto-Hefeextrakt (Difco, USA)  
0,8% [w/v] NaCl  
1,0 mM NaOH (einstellen des pH-Werts mit NaOH auf pH 7,6)

**SOB-Medium:** 2,0% [w/v] Tryptone Medium  
0,5% [w/v] Bacto-Hefeextrakt  
10,0 mM NaCl  
2,5 mM KCl  
10,0 mM MgSO<sub>4</sub>

**SOC-Medium:** SOB-Medium mit 20mM Glucose

**Kulturmedium:** LB-Medium mit Zusatz des entsprechenden Antibiotikums

**Antibiotika:** Ampicillin - Stammlösung: 50mg/ml in H<sub>2</sub>O  
- Arbeitskonzentration: 100µg/ml  
Kanamycin - Stammlösung: 10mg/ml in H<sub>2</sub>O  
- Arbeitskonzentration: 30µg/ml

**Agar-Platten:** Kulturmedium mit 15g/l Bacto-Agar (Difco)

***E.coli* -Stämme** (Invitrogen, Karlsruhe; Stratagene, La Jolla, USA):

**DH5α:** F<sup>-</sup>  $\phi$ 80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>+</sup>)  
phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 tonA

**BJ5183:** endA1 sbcBC recBC galK met thi-1 bioT hsdR (Str<sup>r</sup>); (transformiert mit pAdEasy)

### 2.2.1.2 Herstellung kompetenter *E. coli* zur Transformation

Zu Beginn wurden die Zellen (DH-5 $\alpha$ , BJ 5183) in 5ml LB-Medium über Nacht bei 37°C und 180rpm (Bakterienschüttler, Thermoshake Gerhardt) kultiviert. 100 $\mu$ l dieser Übernachtskultur wurden in 50ml frischem LB-Medium angeimpft und für 2-4 Stunden bei 37°C, 170rpm inkubiert bis die logarithmische Wachstumsphase OD<sub>600</sub> = 0,4 erreicht wurde. Anschließend wurden die Zellen für 15 Minuten bei 5000rpm und 4°C zentrifugiert (Beckmann Modell J2-21 Centrifuge), das Bakterienpellet in 2,5ml LB resuspendiert und das gleiche Volumen 2xTSS zugegeben. Diese Bakteriensuspension wurde jeweils zu 150 $\mu$ l in vorgekühlte Eppendorf-Gefäße aliquotiert, in Stickstoff schockgefroren und bei -70°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

**2xTSS:**        20 % [w/v]    PEG 8000 (Sigma, Dreisendorf, Deutschland)  
                  10 % [v/v]    DMSO (Sigma, Dreisendorf, Deutschland)  
                  70    mM      MgCl<sub>2</sub> in LB  
                  pH 6,5

#### 2.2.1.2.1 Transformation kompetenter *E.coli*

Für eine Transformation wurden 10-20 $\mu$ l eines Ligationsansatzes oder 100-2000ng Plasmid-DNA mit 150 $\mu$ l aufgetauten kompetenten Zellen versetzt und für 30min auf Eis inkubiert. Nach einer zweiminütigen Hitzeentwicklung bei 42°C wurde den *E.coli* 1ml SOC-Medium zugesetzt und der Ansatz für eine Stunde bei 37°C in einem Schüttler (Laboshake Gerhardt, Königswinter, Deutschland) bei 180rpm inkubiert. Im Anschluss wurden 100-1000 $\mu$ l des Transformationsansatzes auf antibiotikumhaltige LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Weitere Analysen der einzelnen Klone erfolgten in der darauf folgenden Plasmid-Minipräparation (s. 2.2.2.1).

## 2.2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.2.1 Plasmid-Minipräparation

Für analytische Untersuchungen von Plasmid-DNA erfolgte eine präparative Plasmidisolierung nach alkalischer Lyse. Dafür wurde jeweils eine Bakterienkolonie mit 5ml Antibiotikum-versetzten LB-Medium angeimpft und über Nacht auf dem Bakterienschüttler (Gerhardt Thermoshake, Königswinter, Deutschland) bei 170rpm und 37°C kultiviert.

Anschließend wurden die Bakterien bei 14000rpm (Eppendorf Centrifuge 5417C, Hamburg, Deutschland) zentrifugiert und das Pellet mit 150µl eisgekühltem Puffer 1 resuspendiert. Nach Zugabe des gleichen Volumens Puffer 2 erfolgte die alkalische Lyse der Zelle. Die Zugabe von 150µl Puffer 3 führte zur Neutralisation des Lysates. Nach einer darauf folgenden Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit wurde der DNA-haltige Überstand mit 0,8-1xVolumen Isopropanol versetzt bei 13.000rpm zentrifugiert. Anschließend folgt die Dekantierung des Isopropanol und das Waschen der DNA mit dem 2xVolumen 70% EtOH. Nach dem Dekantieren des EtOH wurde das Pellet vollständig getrocknet und in 20µl dest. H<sub>2</sub>O aufgenommen.

<b>Puffer 1:</b>	50 mM	Tris-HCl
	10 mM	EDTA
	100 µg/ml	RNase
	pH 8.0	
<b>Puffer 2:</b>	200 mM	NaOH
	1%	SDS
<b>Puffer 3:</b>	2.8 M	KAc
	pH 5.1	

### 2.2.2.2 Plasmid-Midipräparation

Für die Isolierung größerer Plasmid-DNA Mengen erfolgte die Präparation mit dem „NucleoBond PC 100“ von Macherey Nagel (Düren, Deutschland) nach Angaben des Herstellers.

### 2.2.2.3 Phenol/Chloroform-Extraktion

Um Verunreinigungen aus wässrigen DNA-Lösungen zu entfernen, erfolgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion mit dem „Phase-Lock Gel Heavy 2,0“ Kit (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) nach Angaben des Herstellers. Anschließend erfolgte die Fällung der DNA aus den wässrigen Überständen (s. 2.2.2.4).

#### **2.2.2.4 Präzipitation von Nukleinsäuren**

Die Prozedur der DNA-Präzipitation und -Aufreinigung wurde nach dem Verfahren von Maniatis (Maniatis et al. 1982) durchgeführt. Zur Vorbereitung von DNA-Plasmiden für Transfektionen erfolgte die Präzipitation unter sterilen Bedingungen.

#### **2.2.2.5 Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration**

Die Quantifizierung der DNA- und RNA-Konzentration wurde mit Hilfe eines Nanodrop ND-1000 Spektralphotometers (Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland) durchgeführt. Eine mögliche Proteinverunreinigung konnte über den Quotienten  $OD_{260} / OD_{280}$  ermittelt werden. Eine gut aufgereinigte DNA-Lösung enthielt einen Quotienten von 1,8 – 2.

#### **2.2.2.6 DNA-Verdau mittels Restriktionsendonukleasen**

Für die Vorbereitung von Plasmiden für Ligationen oder zur analytischen Kontrolle wurden enzymatische Hydrolysen mittels einer oder mehrere Restriktionsendonukleasen durchgeführt. Alle in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme wurden von den Firmen Roche Boehringer (Mannheim, Deutschland), MBI Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland), Promega (Mannheim, Deutschland) und New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland) bezogen. Die enzymatische Hydrolyse von Plasmiden erfolgte nach Angaben des Herstellers.

#### **2.2.2.7 Dephosphorylierung restringierter Plasmid-DNA**

Um die Religation bei der Einklonierung eines Restriktionsfragmentes zu unterbinden, wurde die alkalische Phosphatase der Firma Roche (Mannheim, Deutschland) nach Angaben des Herstellers verwendet.

### **2.2.2.8 Herstellung von glatten DNA-Enden**

Das Auffüllen von DNA 5'-Überhängen und der Abbau von DNA 3'-Überhängen zu glatten Enden erfolgte mittels der T<sub>4</sub>-DNA-Polymerase von Roche (Boehringer Mannheim, Deutschland) nach Angaben des Herstellers.

### **2.2.2.9 Ligation von DNA-Fragmenten**

Die Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren erfolgt über eine kovalente Verknüpfung, die durch das Enzym T<sub>4</sub>-DNA-Ligase (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) ermöglicht wurde. Das molare Verhältnis von Vektor zu *Insert*-DNA lag bei überhängenden Enden zwischen 1:3 und 1:5 bei glatten Enden. Die Ligation erfolgte nach Angaben des Herstellers.

### **2.2.2.10 Dimerisierung von Oligonukleotiden**

Der Dimerisierungsvorgang von komplementären Oligonukleotiden wurde durch das Erhitzen gleich konzentrierter Oligonukleotidlösungen in 25mM TRIS pH 7.4, 150mM NaCl, und 1mM EDTA auf 95°C für 10 Minuten mit anschließendem langsamen Abkühlen eingeleitet.

### **2.2.2.11 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten**

Die Agarosegelelektrophorese erfolgte nach Maniatis (Sambrock et al. 1989) und wurde zur Analyse von Nukleinsäuren, Auftrennung und Präparation von Fragmenten benutzt.

### **2.2.2.12 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Zur Aufreinigung von gelelektrophoretisch aufgetrennter DNA (s. 2.2.4) wurden die entsprechenden Banden aus dem Agarosegel mit einem Skalpell unter UV-Licht herausgeschnitten. Die weitere Aufreinigung der DNA-Fragmente erfolgte mit Hilfe des „*Perfectprep Gel Cleanup*“-Kits der Firma Eppendorf (Hamburg, Deutschland) nach Herstellerangaben.

### 2.2.2.13 RNA-Isolierung aus Zelllysaten

Das Kulturmedium der zu lysierenden Zellen wurde zunächst abgesaugt, die Zellen zweimal mit 1xPBS gewaschen und pro 6-Loch mit 200µl Trizol Reagent (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) versetzt. Nach Abschaben und Überführen der Zellen in ein Reaktionsgefäß wurden die Löcher der 6-Lochplatte nochmals mit 200µl Trizol behandelt, um eventuell verbliebene Zellen abzutragen. Die Isolierung der RNA aus den Zelllysaten erfolgte nach den Angaben von Invitrogen. Die isolierte RNA wurde in 50µl RNase freiem Wasser gelöst und bei -70°C eingefroren.

### 2.2.2.14 RNA-Isolierung aus Gewebe

30mg Gewebe wurden mit Hilfe eines Precellis Shredder (PegLab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland) homogenisiert. Hierfür wurde das Gewebe mit Precellis Keramik-Kugeln (PegLab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland) und 800µl Qiazol (Qiagen, Hilden, Deutschland) versetzt und in zwei Zyklen von je 20 Sekunden mit 5 Sekunden Pause bei 6500 Schwingungen homogenisiert. Die Isolierung der RNA aus den Gewebelysaten erfolgte mit Hilfe des „miRNEasy“-Kit der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers. Eluiert wurde die isolierte RNA in 60µl RNase-freiem Wasser. Die Aufbewahrung erfolgte bei -70 °C.

### 2.2.2.15 RNA-Isolierung aus Zellkulturüberständen und Vesikellösungen

200µl der Zellüberstände oder 25µl einer Vesikelpräparation (s. 2.2.4.8) von Zellen wurden mit 2pmol SV40 versetzt und mit 800µl Qiazol (Quiagen, Hilden, Deutschland) überschichtet. Die weitere RNA-Isolierung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Gelöst wurde die isolierte RNA mit 10-20µl RNase freiem Wasser. Die Aufbewahrung erfolgte bei -70 °C.

**2.2.3 PCR (Polymerase-Kettenreaktion)**

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein *in vitro* Verfahren, das es ermöglicht, spezifisch definierte DNA-Abschnitte zu amplifizieren. Für die Amplifikation werden drei Reaktionsstadien bestehend aus Denaturierung, Anlagerung der Primer und Elongation in sich wiederholenden Zyklen durchlaufen.

**2.2.3.1 DNA-Sequenzierung**

Alle hier in der Arbeit durchgeführten DNA-Sequenzierungsreaktionen wurden nach der Kettenabbruch-Methode durch die Mitarbeiter des Servicelabors des „Cologne Center for Genomics“ analysiert. Die Sequenzierung wurde nach dem „Cycle-Sequencing“-Verfahren mit dem „BigDye Terminator-Sequencing“-Kit 3.1 (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) nach Angaben des Herstellers und des „Cologne Center for Genomics“ durchgeführt. Die PCR fand in einem Peltier Thermal Cycler PTC 200 (MJ Research, MA, USA) statt.

<b>Sequenzieransatz:</b>	BigDye Terminator Kit	2µl
	Puffer	4µl
	Oligonukleotidprimer	5pmol
	DNA	150-300ng
	H <sub>2</sub> O	ad 20µl

<b>Sequenzierprogramm:</b>	96°C	1 min	
	96°C	30 sec	← 45 x
	50°C	15 sec	
	60°C	4 min	
	60°C	10 min	

### 2.2.3.2 Amplifizierung der 3'-UTR von Transkripten mittels PCR

Zur Amplifikation von 3'-UTR wurden 10ng genomischer Ratten DNA verwendet, sofern in der 3'-UTR keine Introns vorlagen. Die Vorwärts- und Rückwärtsprimer (Tabelle 9) wurden in einer Konzentration von 0,5 $\mu$ M in die PCR eingesetzt und die 3'-UTR mit einem Phusion Enzym/Puffermix der Firma Finnzymes (Espoo, Finnland) nach Herstellerangaben in einem Peltier Thermal Cycler PTC 200 (MJ Research, MA, USA) amplifiziert.

### 2.2.3.3 Reverse Transkriptase PCR

Der Nachweis der Transkripte eines Gens oder einer miRNA erfolgte indirekt nach dem Umschreiben in cDNA. Die Umschreibung der isolierten RNA erfolgte mit dem „*miScript Reverse Transcription*“ Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben.

### 2.2.3.4 Real Time PCR

Zur Bestimmung des Transkriptspiegels wurde die cDNA in der *Real Time* Analyse durch die Zuhilfenahme des SSO Fast<sup>TM</sup> Eva Green Supermix (BioRad, München, Deutschland) in des *Real Time* PCR Cycler Mx3000P der Firma Stratagene (La Jolla, USA) und C1000<sup>TM</sup> Thermal Cycler (BioRad, München, Deutschland) bestimmt.

Im Gegensatz zur herkömmlichen PCR erlaubt die quantitative *Real Time* PCR (qPCR) eine Quantifizierung und graphische Darstellung der Amplifikatmenge während der gesamten PCR mittels Messung bestimmter Fluoreszenzsignale, die proportional zur Menge der PCR-Produkte zunehmen. Zur Erstellung der cDNA-Standardreihen wurde die cDNA von A10, Pav-1 und HSC-T6 Zellen in einer Verdünnungsreihe von 50-0,78ng verdünnt. Jeder Ansatz wurde im Triplet bestimmt. Für die mRNA-Normalisierung wurden die HPRT (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase)-Werte und für die miRNA-Normalisierung die RNU6B Spiegel der Proben herangezogen.

<b>Ansatz:</b>	1,0 $\mu$ l	cDNA (10ng bei Proteintranskripten) ( 2ng bei miRNA Transkripten)
	0,8 $\mu$ l	<i>sense</i> Primer (10 $\mu$ M)
	0,8 $\mu$ l	<i>antisense</i> Primer (10 $\mu$ M)
	10,0 $\mu$ l	Sybr Green
	20,0 $\mu$ l	ad H <sub>2</sub> O

**Real Time PCR Programm für Proteintranskripte:**

95 °C	10 min	
95 °C	15 sec	← 45 x
60-57 °C	60 sec	
50-95 °C	Schmelzkurve	

**Real Time PCR Programm für miRNA Transkripte:**

95 °C	10 min	
95 °C	30 sec	← 45 x
55 °C	45 sec	
70 °C	45 sec	
50-95 °C	Schmelzkurve	

**2.2.4 Zellkultur**

Alle durchgeführten Zellexperimente sowie Kulturarbeiten fanden unter sterilen Bedingungen statt. Die verwendeten Zelllinien wurden unter einer sterilen Sicherheitswerkbank von der Firma BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH (Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland) mit sterilen Lösungen sowie Glas- und Plastikwaren kultiviert

**2.2.4.1 Kultivierung von Zelllinien**

Die Zelllinien wurden in DMEM-Vollmedium in einem Begasungsbrutschrank von HERAcell (Hanau, Deutschland) bei 37°C, 100% relativer Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre kultiviert. Nach mikroskopischer Beurteilung (Mikroskop Nikon Eclipse TE 300) der Zellqualität und Zelldichte wurden die Zellen je nach Gegebenheit einem Medienwechsel unterzogen oder passagiert (2.3.1.4).

**2.2.4.2 Bestimmung der Vitalität und Zellzahl**

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe der Zählkammer nach Neubauer. Hierzu wurde die trypsinierte Zellsuspension in einem definierten Volumen Medium resuspendiert. Ein Aliquot wurde mit dem gleichen Volumen Trypanblau-Lösung (0,5% [w/v] Biochrom AG, Berlin, Deutschland) versetzt, um tote Zellen blau anzufärben, und auf die Neubauer-Zählkammer aufgetragen.

### 2.2.4.3 Passagieren der Zellen

Bei einer hohen Zelldichte erfolgte die Passagierung der Zellen auf neue Zellkulturplatten von Becton Dickinson. Dazu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 10% PBS gewaschen, um Serumreste zu entfernen, die das Trypsin inhibieren. Anschließend erfolgte die Zugabe einiger Tropfen Trypsin, um die adhärenen Zellen von der Kulturplatte zu lösen. Nach vollständiger Ablösung der Zellen (2-5 Minuten/37°C) wurde das Trypsin durch Zusatz von 2-3ml Kulturmedium inaktiviert und die Zellen resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf neue Kulturplatten (8cm Ø) verteilt und auf ein Medienvolumen von 10ml aufgefüllt.

<b>PBS:</b>	140mM 10mM	NaCl NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
<b>Trypsinlösung:</b>	0,05% [w/v] 0,5mM 1x	Trypsin (GibcoBRL, Eggenstein, Deutschland) EDTA PBS
<b>FCS:</b>	(Sigma, Dreisendorf, Deutschland) Hitzeinaktivierung für 30min bei 56°C Lagerung bei -20°C	
<b>Grundmedium:</b>	500ml 440mg 110mg	DMEM (Sigma, Dreisendorf, Deutschland) D-Glucose Sodium Pyruvate L Glutamine
<b>Kulturmedium:</b>	500ml 10% [v/v] bzw. 0,5%	Grundmedium DMEM FCS

### 2.2.4.4 Kryokonservierung von Zellen

Für die dauerhafte Lagerung von Zellen wurden diese bis zu einer Konfluenz von 80-90% angezogen, das Medium abgesaugt, die Zellen mit 10% PBS gewaschen und mit Trypsin gelöst. Nach der Resuspension in 3ml Kulturmedium erfolgte für 5min eine Zentrifugation bei 800rpm (Beckman GPR Centrifuge, Krefeld, Deutschland) in 15ml Falconröhrchen (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) bei 4°C. Das Medium wurde verworfen, das Zellpellet in 500µl Kulturmedium resuspendiert, in 1,8ml Kryoröhrchen aliquotiert sowie 1:1 mit DMEM + 20% DMSO versetzt. Nach Einfrieren der Zellen über eine Temperatursenkung von 1°C/Minute bei -70°C über 24 Stunden erfolgte die endgültige Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff.

Um kryokonservierte Zellen aufzutauen, wurden diese nach Entnahme aus dem flüssigen Stickstoff schnellstmöglich in einem 37°C Wasserbad (Dr. Hirtz & Co Laboreinrichtungen, Köln; Deutschland) aufgetaut. Die flüssige Zellsuspension wurde auf 9ml warmes Kulturmedium gegeben und in einer Kulturschale nach 12h Inkubation im Brutschrank bei 37°C durch einen Medienwechsel von DMSO-Resten entfernt.

**Einfriermedium:** 10% [v/v] FCS  
10% [v/v] DMSO (Sigma, Dreisendorf, Deutschland)  
in DMEM (Sigma, Dreisendorf, Deutschland)

#### 2.2.4.5 Transfektion

Für die Transfektion von Plasmid-DNA und microRNA in Zellen wurden die entsprechenden Zellen so ausgesät, dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion (12-24h nach Passagieren) eine Konfluenz von 85-95% aufwiesen. Die Transfektion wurde mit Lipofectamin 2000 und Opti-Mem (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) nach Angaben des Herstellers vorgenommen.

#### 2.2.4.6 Stimulierung

Für die Stimulierung der HSC-T6 Zellen mit rekombinantem humanen TGF-β1 (im weiteren Verlauf als TGF-β bezeichnet) bzw. PDGF-BB wurden die Zellen bis zu einer Konfluenz von 80% in 10%FCS+DMEM kultiviert. Anschließend erfolgte nach dreimaligem Waschen mit 1xPBS ein Aushungern der Zellen für 24 Stunden in 0,5% FCS+DMEM. Die Stimulierung wurde nach Zugabe von 2ng/ml TGF-β (R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland) bzw. 40ng/ml PDGF-BB (R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland) in 0,5%FCS DMEM für weitere 24 Stunden durchgeführt.

Für die HFG Stimulierung wurden die HSC-T6 Zellen bis zu einer Konfluenz von 70% wachsen gelassen und mit 40ng/ml rekombinantem humanen HGF (Dianova, Hamburg, Deutschland) in 10% FCS+DMEM, ohne vorheriges Aushungern, stimuliert.

Als Positivkontrolle der translationalen Inhibierung wurden Zellen nach 24 Stunden in 0,5%FCS DMEM für weitere 24 Stunden mit dem Translationshemmer Cycloheximid (Sigma, Dreisendorf, Deutschland) zu 1µg/ml behandelt.

#### **2.2.4.7 Hepatische Sternzellisolierung**

Die primären hepatischen Sternzellen wurden aus Lebern von männlichen Wistar Ratten gewonnen. Für die Isolierung der hepatischen Sternzellen erfolgte nach Isofluranbetäubung zunächst eine intraperitoneal applizierte Betäubung der Ratten mit 60mg/kg Ketamin und 7,5mg/kg Xylazin. Anschließend wurde über das offene Abdomen ein Zugang in die Pfortader gelegt, über welche die erste Perfusion einer 200ml, 37°C warmen Perfusionslösung fließen konnte. Die Durchtrennung der Vena Cava führte zum Auslaufen der Perfusionslösung und sollte einen Überdruck und eine Schädigung in der Leber verhindern. Eine zweite Perfusion aus 150ml, 37°C warmer Enzymlösung I wurde zur Trennung des Zellverbandes in der Leber verwendet. Nach Entnahme und manueller Zerstückelung der Leber erfolgte für die weitere Lyse eine fünf minütige Inkubation in 100ml einer 37°C warmen Enzymlösung II bei 37°C und 200rpm. Größere, nicht lysierte Gewebestücke wurden mit Hilfe eines 100µm-Nylonnetzes ausgesiebt und die weitere Enzymlyse durch Zugabe von 100ml eiskaltem Suspensionspuffer unterbunden. Durch die Zentrifugation der Lebersuspension für 3-4 Minuten bei 50xg und 4°C konnten Parenchymzellen ausgefällt und der Überstand verwahrt werden. Nach erneuter Zugabe von 100ml Suspensionspuffer und 3 Minuten Zentrifugation bei 50xg und 4°C wurde der gewonnene Überstand mit dem vorherigen vereinigt, mit eiskaltem Suspensionspuffer auf 300ml aufgefüllt und für 10 Minuten bei 350 x g zentrifugiert. Die daraus gewonnenen Zellpellets, welche die mesenchymale Zellfraktion enthielten, wurden in 150ml eiskaltem Suspensionspuffer resuspendiert, erneut bei 350 x g zentrifugiert, die Überstände verworfen und zur Aufreinigung der hepatischen Sternzellen einem 40%igen Optiprep-Gradienten unterworfen. Um einen 11%igen Dichtegradienten zu erhalten wurde das mesenchymale Zellpellet in 20-30µl Suspensionspuffer mit der entsprechenden Menge 40%iger Optipreplösung (Sigma, Dreisendorf, Deutschland) gemischt, auf vier 15ml Falcons verteilt und mit je 2ml Suspensionspuffer überschichtet. Nach 20 Minuten Zentrifugation ohne

Bremse bei 950 x g konnten die HSC aus der dünnen mittleren Phase abgenommen werden und wurden zur Entfernung des Optipreps einmal mit dem Suspensionspuffer gewaschen. Die isolierten Zellen wurden unter Zugabe von 100U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin in 10% FCS haltigem RPMI Medium (Biochrom AG, Berlin Deutschland) kultiviert.

<b>GBSS:</b>	137 mM	NaCl
	5,0 mM	Glukose
	0,5 mM	MgSO <sub>4</sub>
	1,0 mM	MgCl <sub>2</sub>
	0,8 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	0,1 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	2,7 mM	NaHCO <sub>3</sub>
	5,0 mM	KCl
	5,0 mM	Hepes
<b>Perfusionslösung:</b>	1000 ml	GBSS
	125 mM	EGTA
<b>Enzymlösung I:</b>	300 ml	GBSS
	55 mg	Collagenase A (Roche, , Deutschland)
	70 mg	Pronase E (Merck, Deutschland)
	20 mg	DNase (Roche, Deutschland)
<b>Enzymlösung II:</b>	300 ml	GBSS
	35 mg	Collagenase A (Roche, , Deutschland)
	35 mg	Pronase E (Merck, Deutschland)
<b>Suspensionspuffer:</b>	1000 ml	GBSS
	1,5 mM	CaCl <sub>2</sub>
	2,5 g	BSA

#### 2.2.4.8 Isolierung von Vesikeln aus Zellkulturüberständen

Für die Isolierung von Vesikeln aus 250µl Kulturmedium wurde die „*ExoQuick™ Exosome Precipitation*“ Lösung (System Biosciences, CA, USA) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die isolierten Vesikel wurden in 25µl 1xPBS gelöst und bei -70°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

#### 2.2.4.9 Anfärben von Lysosomen

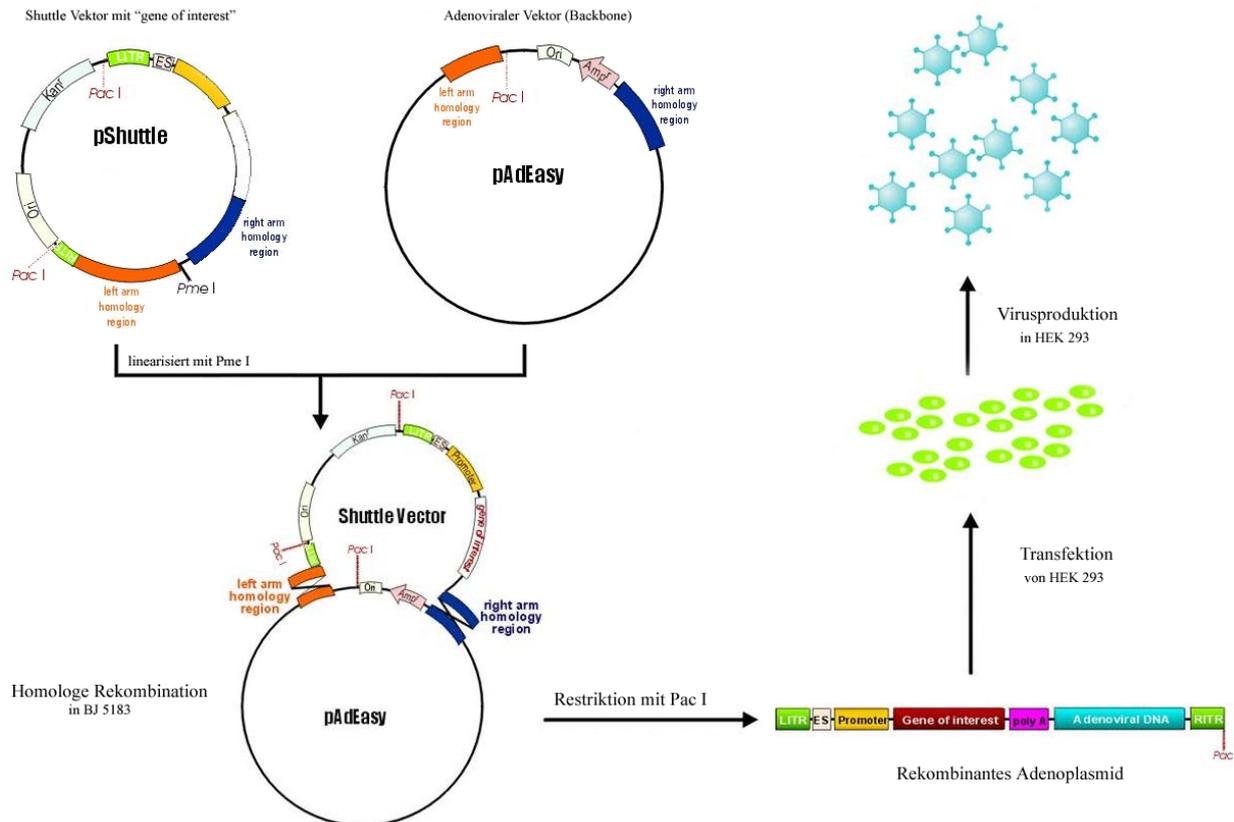
Für das Anfärben von Lysosomen wurde das „*Cell Navigator™ Lysosomal*“ Färbe-Kit (Biomol, Hamburg, Deutschland) nach Angaben des Herstellers zur Hilfe genommen.

#### 2.2.4.10 Herstellung von rekombinanten Adenoviren Typ 5

Die Rekombination eines Shuttle-Vektors mit einem adenoviralen „backbone“-Plasmid erfolgte nach dem AdEasy™ Adenoviral Vector System-Kit von Stratagene (La Jolla, USA). Das klonierte pShuttle-full-SMA-miR-29a Plasmid wurde mit dem Restriktionsenzym *PmeI* linearisiert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und aus dem Präparationsgel (s. 2.2.2.12) aufgereinigt.

Daran anschließend erfolgte die Transformation von je 2µg des linearisierten pShuttle-full-SMA-miR-29a) in rekombinationsaktive BJ5183-Zellen. Die positiven Rekombinanten wiesen nach der Minipräparation (s. 2.2.2.1.) und Restriktion mit dem Restriktionsenzym *PacI* ein 30kb sowie ein kleineres 3,0kb oder 4,5kb DNA-Fragment, abhängig vom Rekombinationsmechanismus, auf. Nach Transformation der positiven Rekombinanten in rekombinationsinaktive DH5α-Bakterien wurden diese in einer Midipräparation angezogen, mit *PacI* restringiert und einer Phenol-Chloroform-Extraktion (s. 2.2.2.3.) unterworfen. Für die Herstellung der Adenoviren erfolgte eine Transfektion von HEK-293 Zellen mit 8µg des pAdEasy-full-SMA-miR-29a Plasmids unter Zuhilfenahme von Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) nach Herstellerangaben.

Nach drei bis vier Tagen erfolgte die Expansion der transfizierten Zellen, unter Zugabe frischer HEK-293 Zellen auf neue 750ml Falcon-Kulturflaschen (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland). Das alte Medium wurde zusammen mit frischem Kulturmedium gleichmäßig auf Falcon-Flaschen aufgeteilt. Anschließend wurden die Zellen erneut für drei bis fünf Tage kultiviert. Die Gewinnung der Viren aus den geernteten und infizierten Zellen erfolgte mittels Zellaufschluss durch dreimalig abwechselndes Erhitzen (5 Minuten / 37°C im Wasserbad (Dr. Hirtz & Co Laboreinrichtungen, Köln; Deutschland)) und Herunterkühlen (Trockeneis-Methanol-Bad). Die weiteren Virusisolierungen wurden nach dem Protokoll von Stratagene (La Jolla, USA) durchgeführt. Die Lagerung der Viren erfolgte bei -70 °C.



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der Adenovirenkonstruktion.**

Nach Klonierung und Linearisierung des Shuttle-Vektors erfolgt eine Rekombination mit dem adenoviralen Vektor pAdEasy in BJ5183 Zellen. Anschließend wird das rekombinante Plasmid mit *PacI* linearisiert, aufgereinigt und in HEK293-Zellen transfiziert. In HEK293-Zellen erfolgt die Entwicklung der rekombinanten Adenoviren, die zu einem späteren Zeitpunkt geerntet werden können.

Die Bestimmung des Virentiters erfolgte mit dem IMAGEN<sup>TM</sup> Adenovirus Kit (DakoCytomation, Hamburg, Deutschland). Es wurde eine Verdünnungsreihe der Viruspräparation in folgenden Verdünnungstufen angelegt: Verdünnung  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  und  $10^{-8}$ . 10  $\mu$ l dieser Verdünnungen wurden jeweils in Parallelansätzen für die Infektion von HEK-293 Zellen einer 48-Lochkultur benutzt. Von der Zahl der virusinfizierten Zellen pro eingesetztem Volumen der Viruspräparation wurde auf die Zahl der infizierenden Einheiten in einer Viruspräparation geschlossen. Die infizierenden Einheiten wurden in IfE angegeben (vgl. Angaben in „Adeno-XTM Rapid Titer“ Kit (BD Biosciences, Clontech, Palo Alto, USA)).

Für die Infektion von Zellen mit dem pAd-full-SMA-miR-29a Virus wurden HSC-T6, Pav-1, A10 und HUH-7 Zellen auf eine 6-Lochplatte mit einer Zellanzahl ausplattiert, die einer 80%igen Konfluenz entsprach. Zwei Stunden nach Ausplattierung der Zellen erfolgte die Infektion mit dem Virus in unterschiedlichen Virenkonzentrationen.

## **2.2.5 Proteinbiochemie**

### **2.2.5.1 ELISA**

Für die „insulinähnlicher Wachstumsfaktor I“ (IGF-I) Proteinbestimmung in Zellkulturüberständen wurde das Quantikine Mouse IGF-I Immunoassay von R&D Systems (Wiesbaden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die VEGF-A Proteinkonzentration aus Zellkulturüberständen wurde mit dem Rat VEGF ELISA Kit von RayBiotech (Hölzel Diagnostika GmbH, Köln, Deutschland) nach Herstellerangaben bestimmt.

### **2.2.5.2 Western Blot Analyse**

Der Western Blot diente für den spezifischen Nachweis von Kollagen Typ I und IV  $\alpha$ -Ketten, PDGF-C und c-Met in den Zelllysaten.

#### **2.2.5.2.1 Proteinisolierung und Konzentrationsbestimmung aus Zelllysaten**

Die auf den 6-Lochplatten ausplattierten Zellen wurden dreimal mit 1xPBS gewaschen und mit 200 $\mu$ l frisch angesetztem „Radio-Immuno-Precipitation-Assay“ (Ripa) Puffer lysiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber von der Platte gelöst. Die Lyse erfolgte durch abwechselndes Überführen der Zellen von einem Stickstoffbad in ein 37°C Wasserbad (Dr. Hirtz & Co Laboreinrichtungen, Köln; Deutschland).

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration der Lysate wurde das Pierce BCA Protein Assay Kit (PerbioScience, Bonn, Deutschland) nach Herstellerangaben verwendet. Die photometrische Auswertung der Proteinmenge erfolgte mit dem Multiskan Ascent (Thermo Labsystems, Egelsbach, Deutschland) bei 570nm. Durch die Verwendung einer gleichbehandelten Eichreihe aus Rinderserumalbumin (BSA) konnten die jeweiligen Konzentrationen festgestellt werden.

### 2.2.5.2.2 Elektrophoretische Proteinauftrennung

Die SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde unter Zuhilfenahme des Bio-Rad Mini-PROTEAN Systems (Bio-Rad, München, Deutschland) durchgeführt. 10µg der Proteinproben wurden mit dem NuPAGE LDS Probenpuffer (4x) (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) versetzt und für 10 Minuten bei 70°C denaturiert. Anschließend wurden die Proteine mittels eines 4-12% Gradientengel (Bio-Rad, Münschen, Deutschland) aufgetrennt. Zusätzlich wurden 5µl SeeBlue Plus 2 (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) als Proteinmarker aufgetragen. Als Laufpuffer wurde der NuPAGE MOPS SDS Laufpuffer (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) verwendet.

Nach der elektrophoretischen Auftrennung des Proteingemisches wurden die Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran (Amersham Bioscience, Freiburg, Deutschland) überführt. Für den Transfer wurde der NuPAGE Transferpuffer (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Die Übertragung der Proteine erfolgte bei 30mV für 90 Minuten in einem senkrecht zum Gel gerichteten elektrischen Feld. Nach dem Transfer wurde die Membran für eine Stunde mit einem Blockingreagenz behandelt und anschließend mit einem primären Antikörper ü.N. bei 4°C inkubiert. Die Verdünnung der Antikörper erfolgte im Blockierungsreagenz. Die Membranen wurden nach viermaligem Waschen von jeweils 15 Minuten mit 1xTBST für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper beladen. Der sekundäre Antikörper wurde nach Angaben des Herstellers im Blockingreagenz verdünnt.

Nach erneutem viermaligen Waschen von jeweils 15 Minuten mit 1xTBST und zweimaligem Waschen von jeweils 15 Minuten mit 1xTBS erfolgte die Detektion mit dem Novex AP Chemilumineszenz Substrat CDP-Star (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) für alkalische Phosphatase bzw. Pierce ECL Western Blotting Substrat (Thermo Scientific, Bonn, Deutschland) für die Peroxidase nach Angaben des Herstellers. Die Detektion erfolgte mit dem Chemilumineszenzgerät Fluorchem ®FC2 Alpha Ease (Alpha Innotec, Cell Biosciences, CA, USA).

<b>Blockierungsreagenz</b>	10,0 %	Milchpulver
	1,0 %	PBS
	0,05 %	Tween 20

### 2.2.5.2.3 Strippen

Eine wiederholte Immundetektion einer bereits mit Primär- und Sekundärantikörper gebundenen Membran konnte nach der Ablösung von bereits gebundenen Antikörpern, Strippen genannt, vorgenommen werden. Dafür wurde die Membran für 10 Minuten bei RT und ständigem Schwenken in einem Stripp Puffer inkubiert und für 10 Minuten mit 1xPBST gewaschen.

<b>Stripp Puffer</b>	1 x TBST	10ml
	SDS	2%
	β-Mercaptoethanol	70μl

### 2.2.5.3 Dualer Luziferase Reporter Assay

Der Luziferase Assay wurde unter Verwendung des Dualen-Luziferase Reporter Assay von Promega (Madison, USA) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dafür wurden Zellen am Vortag so auf eine 24-Lochplatte ausgesät, dass sie am Tag der Transfektion eine Konfluenz von 90% aufwiesen und je nach Versuch mit 0,8μg (falls nicht anders vermerkt) Reporterplasmid und verschiedenen miRNA mimics (Endkonzentration 50nM, falls nicht anders vermerkt) transfiziert wurden. Die Lyse der Zellen erfolgte 24 Stunden nach Transfektion mit 150μl Lysispuffer aus dem Dualen-Luziferase Reporter Assay. Die Luziferaseaktivität der Zellen wurde in Duplexwerten zu je 30μl unter automatischer Zugabe der Reagenzien des Assays mit Hilfe eines MLX Microtiter Plate Luminometer (Dynatech Laboratories, VA, USA) festgestellt.

### 2.2.5.4 Bestimmung des Hydroxyprolinegehalts

Der Hydroxyprolinegehalt der Rattenleberproben wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Professor Dr. Steffen und Dr. Töx nach dem Verfahren von Woessner (Woessner 1961) und einer modifizierten Methode nach Stegemann und Stadler (Stegemann and Stadler 1967) bestimmt.

**2.2.5.5 Bestimmung von Entzündung und Fibrose im Lebergewebe**

Für die histologische Bestimmung der Entzündung und Fibrose der formalinfixierten Proben wurden diese im Autotechnikon (Sakura Finetek, Heppenheim, Deutschland) des Routineeingangslabor im Institut für Pathologie der Universitätsklinik zu Köln in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Die Gewebeprobe wurden anschließend in heißem Paraffin in Einbettkassetten (VWR, Darmstadt, Deutschland) eingebettet und nach Aushärtung unter Verwendung eines Schlittenmikrotoms (Leica, Nussloch, Deutschland) in 2-3µm dicke Schnitte separiert und zur weiteren Verwendung auf Objektträger (Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland) aufgezogen. Die Arbeiten und Färbungen der Schnitte mit Hämatoxylin-Eosin, Gomori und Elastica van Gieson Färbung erfolgte durch die freundliche Hilfe von Katharina Wendland (Institut für Pathologie der Universitätsklinik zu Köln).

Die Leberresektate des experimentellen Rattenmodells, bei dem durch Gallengangsokklusion (BDO) eine Leberfibrose ausgelöst wurde (Tox et al. 2007), wurden freundlicherweise von Dr. U. Töx (Abteilung Gastroenterologie und Hepatologie, Uniklinik Köln) für die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit zur Verfügung gestellt.

### 3 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, eine miRNA zu identifizieren, die durch Bindung an profibrogene Zieltranskripte die Entstehung einer Leberfibrose beeinflussen könnte. Im nächsten Schritt sollte dann die Funktion dieser antifibrogenen miRNA detailliert untersucht werden.

#### 3.1 Regulation der Kollagenexpression durch miR-29 in HSC

Um miRNAs zu identifizieren, welche die Synthese der Kollagen Typen I und IV beeinflussen, die in der fibrotischen Leber stark überexprimiert sind (Gressner and Weiskirchen 2006), wurde die Datenbank Miranda (<http://www.microrna.org> (John et al. 2004)) verwendet. Diese Datenbank ermöglicht durch einen Sequenzvergleich die Berechnung der Wahrscheinlichkeit einer Interaktion zwischen einer miRNA und dem potentiellen Zieltranskript. In die Wahrscheinlichkeitsrechnungen fließen Faktoren wie Anzahl und Konserviertheit der Bindungsstellen innerhalb der 3'-UTR sowie die Affinität der Interaktion ( $-\Delta E$ ) ein (Bartel 2009).

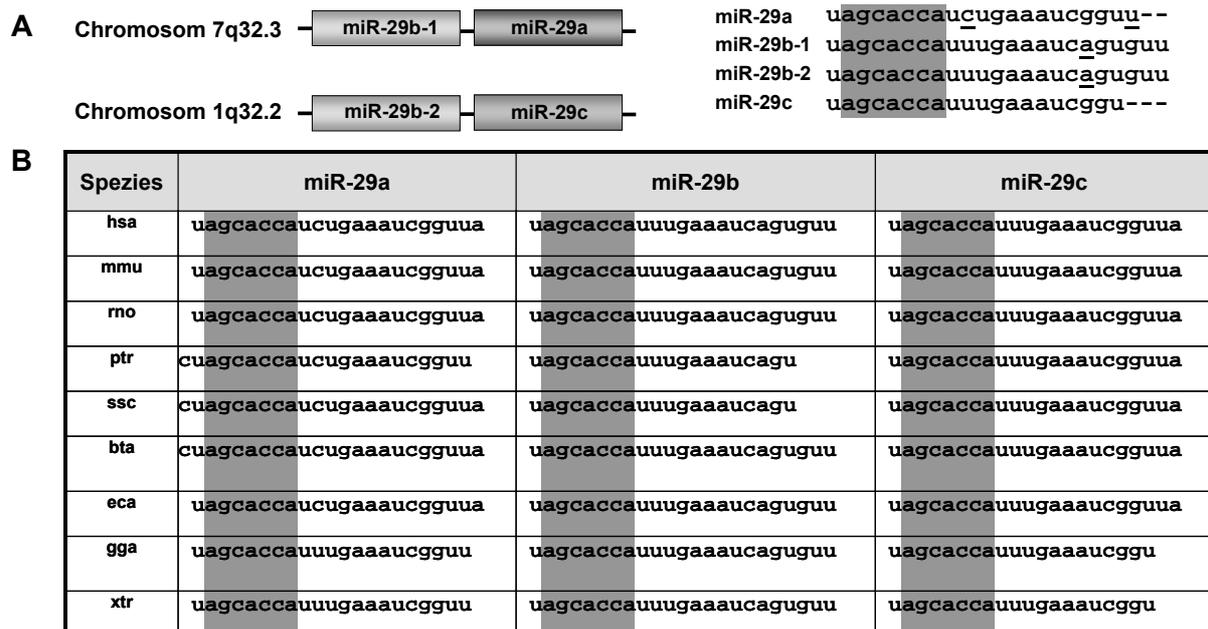
Die in Tabelle 11 aufgeführten Gene Col1A1 und Col1A2 kodieren für Kollagen Typ I, während Col4A1, Col4A2, Col4A3, Col4A4 Col4A5 und Col4A6 für Kollagen Typ IV kodieren. Aufgelistet wurden diejenigen miRNAs, welche mit mindestens vier der acht aufgeführten Kollagentranskripten interagieren könnten. Die Datenbankanalyse ergab, dass sowohl die let-7 Familie als auch 17 weitere miRNAs als mögliche Interaktionspartner der untersuchten Kollagentranskripte in Betracht kommen. Sechs miRNAs zeigten sogar eine potentielle Interaktionsfähigkeit mit fünf Kollagentranskripten. Die Sequenzrecherche ergab ebenfalls, dass besonders miR-186 ein hohes Potential zur Hemmung der Kollagensynthese aufweist, da für diese miRNA in der 3'-UTR eine potentielle Bindung von sieben Kollagentranskripten erkannt wurde. Allerdings wurde nur für miR-29a, miR-29b und miR-29c vorausberechnet, dass alle Gene, die für Kollagen I und IV kodieren, potentielle Zielsequenzen für diese miRNAs aufweisen (s. Tab. 11). Neben der möglichen Regulation der Kollagen I und IV Gene konnten zusätzlich Kollagentranskripte von Col3A1, Col6A3, COL5A3, Col2A1, Col7A1, Col19A1, Col5A2, Col22A1, Col15A1, Col4A3, Col5A1 und Col16A1 als Zielsequenzen der miR-29 ermittelt werden (<http://www.targetscan.org> (Creighton et al. 2008)).

Tabelle 11: Zusammenstellung potentieller miRNAs, welche die Kollagengene von Kollagen I und IV als mögliche Zieltranskripte aufweisen

miRNA*	Col1A1	Col1A2	Col4A1	Col4A2	Col4A3	Col4A4	Col4A5	Col4A6
hsa-let-7a	+	+	+					+
hsa-let-7b	+	+	+					+
hsa-let-7c	+	+	+					+
hsa-let-7d	+	+	+					+
hsa-let-7e	+	+	+					+
hsa-let-7f	+	+	+					+
hsa-let-7g	+	+	+					+
hsa-let-7i	+	+	+					+
hsa-miR-106a			+	+	+		+	
hsa-miR-106b			+	+	+		+	
hsa-miR-125a-5p		+	+		+	+		
hsa-miR-1297		+	+	+	+			
hsa-miR-17			+	+	+		+	
hsa-miR-202		+	+		+	+		
hsa-miR-20a			+	+	+		+	
hsa-miR-20b			+	+	+		+	
hsa-miR-26a		+	+	+	+			
hsa-miR-26b		+	+	+	+			
hsa-miR-326			+		+	+		+
hsa-miR-374a			+		+		+	+
hsa-miR-374b			+		+		+	+
hsa-miR-410			+			+	+	+
hsa-miR-544		+	+		+	+		
hsa-miR-93			+	+	+		+	
hsa-miR-98	+	+	+					+
<b><i>mehr als 4 potentielle Interaktionen mit der 3'-UTR von Col1 und Col4 Transkripten</i></b>								
hsa-miR-23a		+	+	+		+	+	
hsa-miR-23b		+	+	+		+	+	
hsa-miR-381	+	+	+		+			+
hsa-miR-495		+	+		+		+	+
hsa-miR-300	+	+	+		+			+
hsa-miR-590-3p		+	+		+	+	+	
hsa-miR-186	+	+	+	+	+		+	+
<b><i>potentielle Interaktion mit der 3'-UTR von allen Col1 und Col4 Transkripten</i></b>								
hsa-miR-29a	+	+	+	+	+	+	+	+
hsa-miR-29b	+	+	+	+	+	+	+	+
hsa-miR-29c	+	+	+	+	+	+	+	+

\* Die Ermittlung von miRNAs, die potentiell die Typ I und IV Kollagenexpression durch Bindung an die 3'-UTR der Kollagengene inhibieren (markiert durch ein +), erfolgte mit Hilfe der Miranda Datenbank (<http://www.microrna.org>) [115].

Die miR-29 Familie, bestehend aus den drei Mitgliedern miR-29a, miR-29b und miR-29c, wird jeweils im Cluster aus miR-29a und miR-29b1, lokalisiert auf Chromosom 7 sowie miR-29c und miR-29b2, lokalisiert auf Chromosom 1, exprimiert (s. Abb. 5A) (Eyholzer et al. 2010). Der Sequenzvergleich der miR-29-Familienmitglieder zeigt einen Unterschied von drei Basen zwischen der miR-29a und miR-29b1 und lediglich einer Base zwischen miR-29c und miR-29b2 auf (s. Abb. 5A). Weiterhin sind zwischen den Spezies starke Sequenzhomologien für miR-29 zu beobachten, wobei die „seed“-Region, über welche die Bindung an das Zieltranskript erfolgt, in allen untersuchten Spezies konserviert vorliegt (s. Abb. 5B). Ferner wurde die Konserviertheit auch bei den Binderegionen für miR-29a innerhalb der 3'-UTR von Kollagen-mRNAs aus unterschiedlichen Spezies beobachtet (Creighton et al. 2008). Die hohen Homologien könnten auf einen über die verschiedenen Spezies hinweg existierenden Regulationsmechanismus der miR-29 hindeuten. Auf Grund dieser *in silico* Analysen wurde im weiteren Verlauf der Arbeit miR-29 als aussichtsreichster Kandidat für die Hemmung der Kollagen I und IV Synthese angesehen.



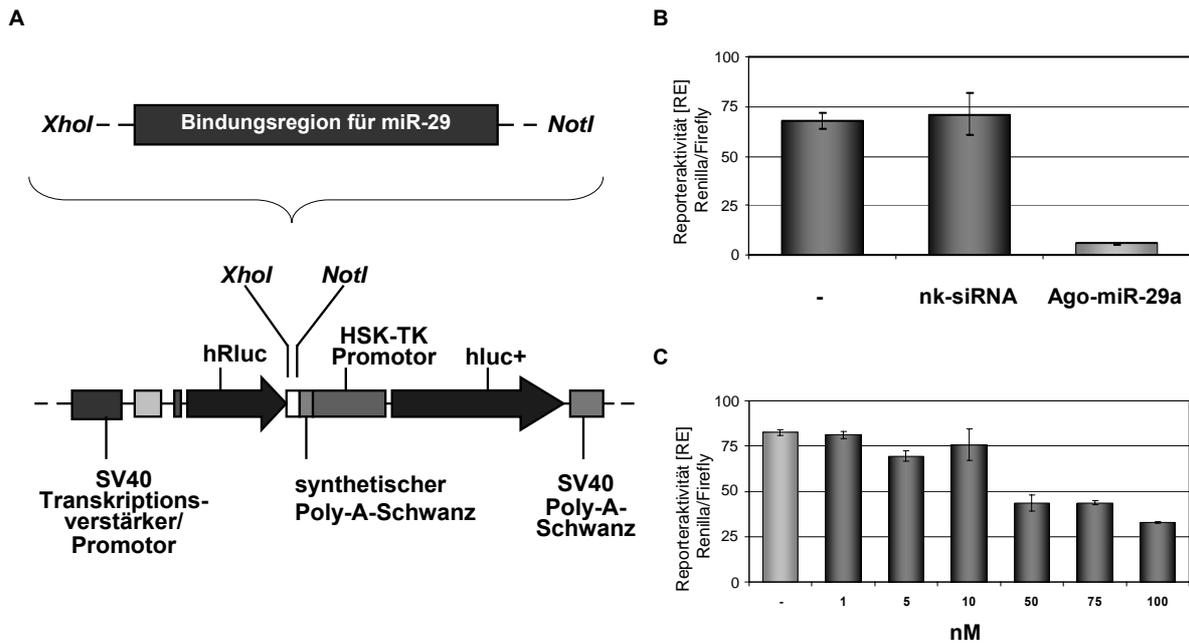
**Abbildung 5: Sequenzvergleich zwischen miR-29 und ihren „seed“-Regionen in unterschiedlichen Spezies.** Die Sequenz zwischen miR-29a und miR-29b weist drei Basen, zwischen miR-29a und miR-29c eine Base Unterschied auf, wobei miR-29a mit miR-29b-1 auf Chromosom 7 und miR-29b-2 und miR-29c auf Chromosom 1 lokalisiert sind. Der Sequenzabgleich zeigt zwischen den drei miR-29 Mitgliedern eine 100% konservierte „seed“-Region (grau unterlegt) (A). Die Gegenüberstellung der miR-29a, miR-29b und miR-29c weist zwischen den verschiedenen Spezies eine hohe Homologie der miR-Sequenzen und 100% Konserviertheit der „seed“-Region (grau unterlegt) auf (B). hsa=Homo sapiens; mmu=Mus musculus; rno=Rattus norvegicus; ptr=Pan troglodytes; ssc=Sus scrofa; bta=Bos taurus; eca=Equus caballus; gga=Gallus gallus; xtr=Xenopus tropicalis. Die Sequenzen der miR-29 wurden aus der miRBase Datenbank des Wellcome Trust Sanger Institute entnommen (<http://www.microrna.org>)

### 3.1.1 Identifizierung von miR-29 Bindungsstellen in der 3'-UTR von Kollagen I und IV mRNAs

Um die von der Datenbank „Miranda“ vorhergesagte Interaktion der miR-29a mit ihren Zieltranskripten zu bestätigen, wurde ein Reportersystem aufgebaut (Abb. 6A). Für dieses Reportersystem wurde die potentielle Bindungsstelle aus der 3'-UTR in das Renilla-Luziferasegen kloniert. Eine Interaktion dieser Bindungsstelle mit einer miRNA resultiert in einer Verringerung der Luziferaseaktivität. Das zweite Luziferasesegment Firefly dient der Normalisierung und wird unabhängig exprimiert. Die Reporteranalysen wurden unter Verwendung einer synthetischen miR-29a (Ago-miR-29a) durchgeführt.

Zunächst erfolgte die Überprüfung der Funktionalität der Ago-miR-29a. Dafür wurde die Konsensussequenz von miR-29a, hergestellt durch die Dimerisierung der zwei Oligonukleotide „miR-29a S“ und „miR-29a A“ (s. Tab. 8), über die eingebauten Schnittstellen *XhoI* und *NotI* in den Reportervektor psiCHECK<sup>TM</sup>-2 in das offene Leseraster der Reporterluziferase kloniert (s. Abb. 6A). Die anschließende Transfektion der humanen Hepatoma Zelllinie HUH-7 erfolgte jeweils in drei Ansätzen, wobei die HUH-7 Zellen mit dem miR-29a-Sensorbaustein allein und zusätzlich in Kotransfektion mit einer negativ kontrollierten siRNA (nk-siRNA) bzw. der Ago-miR-29a transfiziert wurden. Die nk-siRNA repräsentiert ein kurzes RNA Molekül mit einer validierten Sequenz, die keine Homologien zu den bekannten Säugetiergenen aufweist (nach Angaben des Herstellers Qiagen). Die Normalisierung erfolgte gegen die Fireflyaktivität. Wie in Abbildung 6B gezeigt, wurde nach der Kotransfektion des miR-29a-Sensorbausteins und der Ago-miR-29a eine im Vergleich zu den Kontrollen (Reporterplasmid alleine oder zusammen mit nk-siRNA) verminderte Luziferaseaktivität detektiert. Die nachweislich verminderte Luziferaseaktivität lässt auf eine Interaktion der Ago-miR-29a mit der Konsensussequenz schließen und bestätigt die Funktionalität der synthetischen miR-29a.

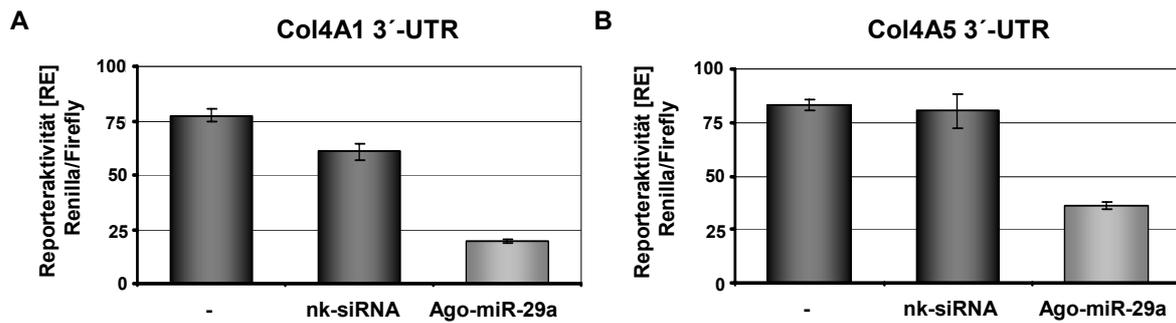
Im nächsten Schritt wurde eine dosisabhängige Wirkungskurve der Ago-miR-29a erstellt, um eine effiziente Konzentration für weitere Versuche zu ermitteln. Dafür wurden HUH-7 Zellen mit dem miR-29a-Sensorbaustein und Ago-miR-29a, im Bereich von 1-100nM, kotransfiziert. Die Normalisierung der ermittelten Renillalumineszenzwerte erfolgte gegen die Fireflylumineszenzwerte. Bei Konzentrationen von 1-10nM konnten sehr geringe Veränderungen der Reporterlumineszenz detektiert werden, während bei Konzentrationen ab 50-100nM eine stärkere Verminderung der Luziferaseaktivität beobachtet wurde (s. Abb. 6C). Die Resultate der dosisabhängigen Wirkungskurve zeigen, dass die Verwendung von 50nM eine geeignete Konzentration zur Durchführung von Transfektionsversuchen darstellt.



**Abbildung 6 : Luziferase Assay Analyse mit einem miR-29a-Sensorvektor und der Ago-miR-29a.**

Klonierungsschema für Reporterplasmide mit potentiellen Zielsequenzen für miR-29a. Nach Restriktion des psiCHECK-™2 Vektors mit *XhoI* und *NotI* erfolgte die gerichtete Ligation mit einer entsprechenden Binderegionsequenz für miR-29a, hergestellt durch die Dimerisierung zweier Oligonukleotide. Die Interaktion von miR-29a mit der Binderegion sollte durch eine verminderte Luziferaseaktivität festgestellt werden (A). HUH-7 Zellen wurden entweder mit dem miR-29a-Sensorkonstrukt alleine oder zusammen mit 50nM Ago-miR-29a oder mit 50nM nk-siRNA (B) bzw. mit unterschiedlichen Konzentrationen [nM] an Ago-miR-29a kotransfiziert (C). Nach 24 Stunden wurde die Luziferaseaktivität bestimmt. Die Renillalumineszenzwerte wurden gegen die Fireflylumineszenzwerte normalisiert. Dargestellt sind der Mittelwert mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. RE=Relative Einheiten, nk-siRNA = negative Kontroll-siRNA, hRluc = synthetisches Renillaluziferasegen, hLuc+ = synthetisches Fireflyluziferasegen, HSK-TK = Herpes Simplex Virus-Thymidinkinase.

Zur Überprüfung der Interaktion von miR-29a mit der 3'-UTR der potentiellen Zieltranskripte Col4A1 und Col4A5 wurden zunächst mit Hilfe der Primer „Col4A1 F“ und „Col4A1 R“ sowie „Col4A5 F“ und „Col4A5 R“ (s. Tab. 9) aus der genomischen Ratten-DNA der 3'-UTR Bereich von Col4A1 sowie Col4A5 amplifiziert. Über die *XhoI* und *NotI* Schnittstellen wurden die Amplifikate in den Reportervektor psiCHECK™-2 kloniert (s. Abb. 6A). Die 3'-UTR Reporterkonstrukte wurden in drei unabhängigen Ansätzen in HUH-7 Zellen transfiziert und 24 Stunden später die Luziferaseaktivität bestimmt. Nach der Kotransfektion von sowohl Ago-miR-29a mit dem Col4A1 3'-UTR Reporterkonstrukt, als auch mit dem Col4A5 3'-UTR Reporterkonstrukt (s. Abb. 7) wurde eine verminderte Lumineszenz im Vergleich zum 3'-UTR Reporterkonstrukt alleine sowie in Kotransfektion mit der nk-siRNA detektiert. Aus der niedrigen Reporteraktivität nach Kotransfektion mit Ago-miR-29a wurde geschlussfolgert, dass Ago-miR-29a an die potentielle Binderegion innerhalb der 3'-UTR von Col4A1 sowie Col4A5 bindet und die Translation beeinflusst.

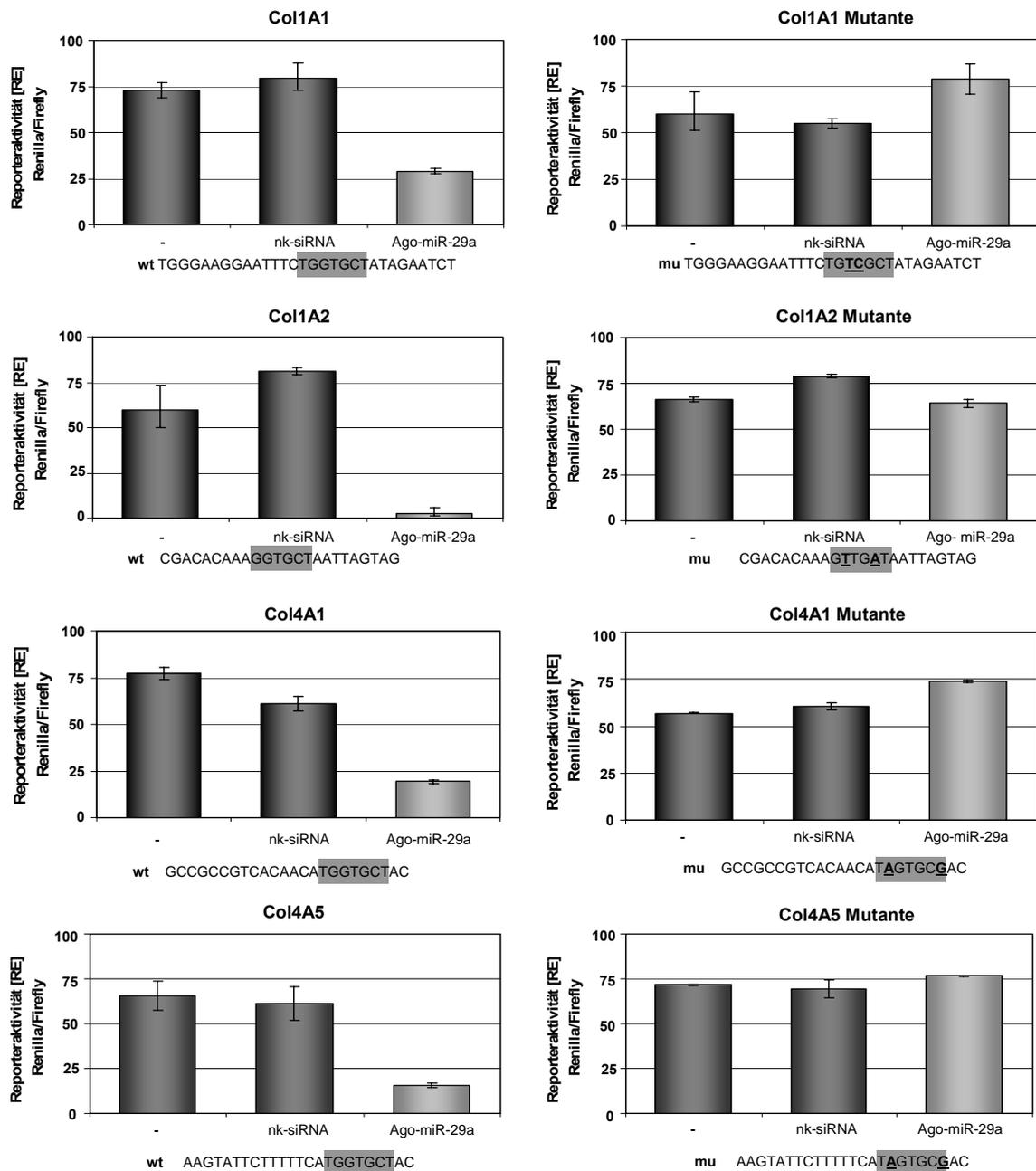


**Abbildung 7: Interaktion der Ago-miR-29a mit der Binderegion innerhalb der 3'-UTR von Col4A1 und Col4A5.**

Unter Verwendung der Primer „Col 4A1 F“ und „Col 4A1 R“ sowie „Col 4A5 F“ und „Col 4A5 R“ (s. Tab. 9) wurde aus der genomischen Ratten-DNA der 3'-UTR Bereich des Col4A1 (Genidentifikations-Nummer: NM\_001135009; Position: 5198-6579) sowie des Col4A5 (Genidentifikations-Nummer: XM\_343778; Position: 5575-6360) Gens amplifiziert und über die *XhoI* und *NotI* Schnittstelle in den Reportervektor psiCHECKTM-2 kloniert (s. Abb. 5A). Die Transfektion in HUH-7 Zellen erfolgte in drei Ansätzen: nur mit dem Reporterkonstrukt und in Kotransfektion mit 50nM einer nk-siRNA sowie der Ago-miR-29a. Nach der Zelllyse erfolgte die Detektion der Lumineszenz. Die Renillalumineszenzwerte wurden gegen die Fireflylumineszenzwerte normalisiert. Dargestellt sind der Mittelwert mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen. RE=Relative Einheiten, nk-siRNA = negative Kontroll-siRNA.

Die Interaktion zwischen einer miRNA mit ihrem potentiellen Zieltranskript erfolgt über die „seed“-Region und einen komplementären Abschnitt in der 3'-UTR des Zieltranskripts. Daher wurden im weiteren Verlauf Reporterkonstrukte generiert, die sich auf den 3'-UTR Bereich um die Binderegion beschränken.

Für die Untersuchung der Spezifität der miR-29 Interaktion mit der Binderegion aus Col1A1, Col1A2, Col4A1 und Col4A5 wurden die Interaktionsregionen zusätzlich mit zwei Punktmutationen versehen. Die Generierung der Binderegionen erfolgte über Dimerisierung von zwei spezifischen Oligonukleotiden. Die potentielle miR-29 Bindesequenz sowie die entsprechend mutierte Sequenz aus der 3'-UTR der mRNA von Col1A1, Col1A2, Col4A1, Col4A4 und Col4A5 wurde über *NotI* und *XhoI* Schnittstellen in den Reportervektor psiCHECK<sup>TM</sup>-2 kloniert. Anschließend wurden die Reportervektoren sowie ihre Mutanten einzeln und in Kotransfektion mit einer nk-siRNA oder der Ago-miR-29a in HUH-7 Zellen transfiziert und nach 24 Stunden die Luziferaseaktivität gemessen. Bei allen Reporterkonstrukten ohne Mutation wurde nach Kotransfektion mit Ago-miR-29a eine verminderte Lumineszenzaktivität detektiert, während das Konstrukt alleine und in Kotransfektion mit der nk-siRNA keine Veränderung der Aktivität zeigte. Die Reporterkonstrukte mit Mutationen wiesen ebenfalls keine Veränderung der Lumineszenzaktivität auf und erreichten Werte vergleichbar mit denen nach Transfektion mit dem Reporterplasmid alleine und in Kotransfektion mit der nk-siRNA (s. Abb. 8).



**Abbildung 8: Interaktion von miR-29a mit den Binderegionen aus der 3'-UTR von Col1A1, Col1A2, Col4A1 und Col4A5.** Zwei komplementäre Oligonukleotide (s. Tab. 8), welche die potentielle Binderegionen aus der 3'-UTR von Col1A1-, Col1A2-, Col4A1-, Col4A4-, und Col4A5 darstellen sowie ihre Mutanten (fett und unterstrichen dargestellt) wurden nach Dimerisierung über *XhoI* und *NotI* Schnittstellen in den psiCHECK™-2 Reportervektor kloniert (s. Abb. 6A). Die Reporterkonstrukte wurden einzeln und in Kotransfektion mit 50nM Ago-miR-29a bzw. 50nM einer nk-siRNA in HUH-7 Zellen transfiziert. Eine Interaktion der miR-29a mit einer Binderegion resultiert in einer verminderten Lumineszenzaktivität, die nach 24 Stunden detektiert werden konnte. Die Normalisierung der Renillalumineszenz erfolgte gegen die Fireflylumineszenz. Dargestellt sind der Mittelwert mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen. RE = Relative Einheiten, nk-siRNA = negative Kontroll-siRNA, wt = Wildtyp, mu = Mutante.

Diese Resultate bestätigen eine Interaktion zwischen der Ago-miR-29a mit den untersuchten Binderegionen aus den verschiedenen Kollagentranskripten, während es bei den mutierten Sequenzen zu keiner Reporterrepression kam. Somit konnte gezeigt werden, dass bei der Interaktion eine komplette Übereinstimmung der „seed“-Region und Bindungssequenz in der 3'-UTR von entscheidender Bedeutung ist.

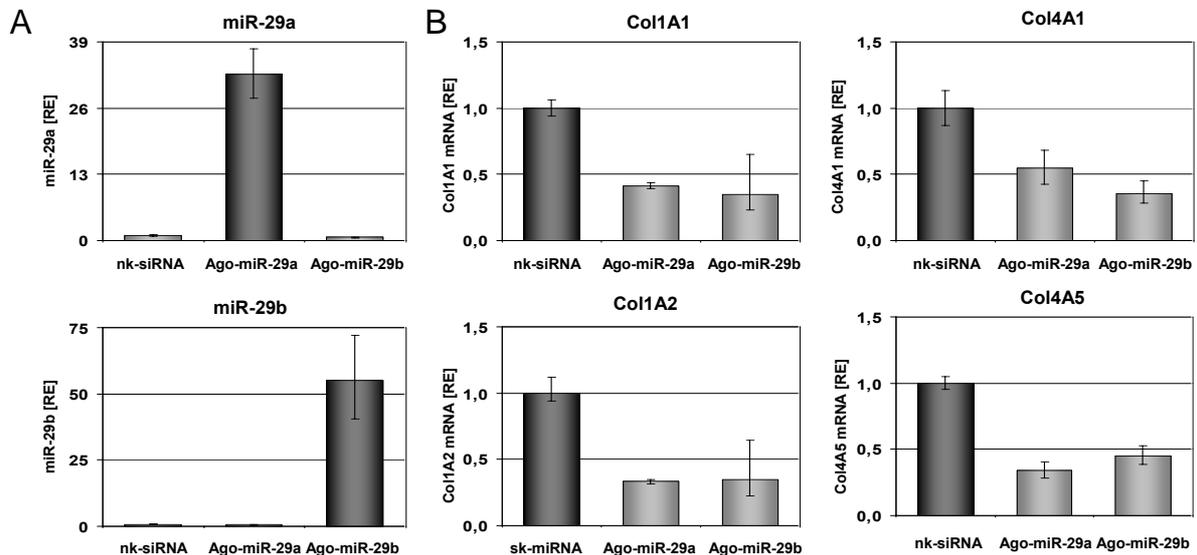
### 3.1.2 Inhibierung der Kollagen I und IV Expression durch miR-29 in hepatischen Sternzellen

Für die *in vitro* Untersuchung der potentiellen Repressorfunktion von miR-29 wurde die hepatische Sternzelllinie HSC-T6, welche die hauptmatrixproduzierenden Zellen in der Leberfibrose darstellen, verwendet. Nachdem die Bindung von miR-29a an die Binderegion der 3'-UTR von Col1A1, Col1A2, Col4A1 und Col4A5 nachgewiesen wurde, sollte im nächsten Schritt geprüft werden, ob die miR-29 Transfektion auch zur Hemmung der Kollagensynthese führt.

Eine mögliche Beeinflussung der mRNA Menge durch miR-29 wurde auf Transkriptebene mittels qPCR untersucht. Hierfür wurden HSC-T6 Zellen mit 50nM miR-29a, miR-29b und der nk-siRNA als Kontrolle transfiziert und für 24 Stunden inkubiert. Nach RNA-Isolierung und cDNA Synthese erfolgte die Quantifizierung der miR-29a, miR-29b, Col1A1, Col1A2, Col4A1 und Col4A5 Transkripte per qPCR. Als endogene Referenz in miRNA Quantifikationsstudien wird wegen der kleinen Größe und konstanten Expression in verschiedenen Geweben und Zelllinien überwiegend RNU6B verwendet (Wong et al. 2007), weswegen auch in dieser Arbeit die Normalisierung der miRNA gegen RNU6B erfolgte. Für die Normalisierung von mRNA Molekülen wurde das endogen konstitutiv exprimierende Gen Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) als Referenzgen verwendet (Gilsbach et al. 2006).

Die Zellen, die mit miR-29a bzw. miR-29b transfiziert wurden, zeigten in der qPCR eine hohe Transkriptmenge der jeweiligen miRNA, während in den Zellen die mit der nk-siRNA transfiziert wurden, sehr geringe miR-29a und miR-29b Mengen nachweisbar waren (s. Abb. 9A). Die Transkriptquantifizierung von Col1A1, Col1A2, Col4A1 und Col4A5 zeigte sowohl nach Transfektion mit miR-29a als auch miR-29b eine um mindestens den Faktor zwei geringere Menge auf, während nach Transfektion mit der nk-siRNA keine Veränderung zu beobachten war (s. Abb. 9B).

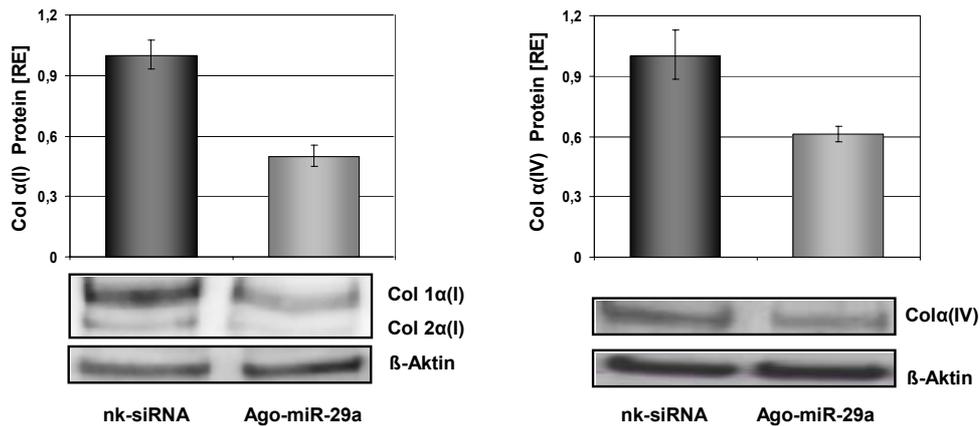
Die Resultate der miR-29a und miR-29b transfizierten Zellen sprechen für eine Repression der Kollagenexpression durch miR-29, da diese im Vergleich zu nk-siRNA transfizierten Zellen eine reduzierte Menge an Kollagentranskripten aufweisen (s. Abb. 9B).



**Abbildung 9: Repression der Kollagenexpression durch Ago-miR-29a und Ago-miR-29b.** HSC-T6 Zellen wurden mit 50nM Ago-miR-29a, Ago-miR29b bzw. einer nk-siRNA transfiziert, für 24 Stunden inkubiert und nach RNA-Isolierung und cDNA-Synthese mittels qPCR auf ihre miR-29a und miR-29b (A), sowie Col1A1, Col1A2, Col4A1 und Col4A5 (B) Expressionspiegel untersucht. Die Normalisierung der miR-29 erfolgte gegen RNU6B, die der Kollagentranskripte gegen HPRT. Dargestellt sind der Mittelwert mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen. RE=Relative Einheiten, nk-siRNA = negative Kontroll-siRNA.

Um auf Proteinebene eine mögliche Repression der Kollagensynthese nach miR-29a Behandlung zu untersuchen, wurden HSC-T6 Zellen mit 50nM Ago-miR-29a sowie einer nk-siRNA transfiziert und 24 Stunden später das Gesamtprotein der Zellen isoliert. 10µg des Proteinlysates wurden auf einem SDS-Polyacrylamidgel unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und nach dem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran die α-Ketten der Kollagen Typen I und IV immunologisch detektiert. Normalisiert wurde gegen β-Aktin, um unterschiedliche Proteinauftragung auszugleichen.

Nach Transfektion von HSC-T6 Zellen mit Ago-miR-29a wurde eine verminderte Menge der Kollagen Typ I und IV α-Ketten detektiert. Demgegenüber wiesen die HSC-T6 Zellen, die mit der nk-siRNA transfiziert wurden, eine höhere Menge der Kollagen I und IV α-Ketten auf (s. Abb. 10). Neben der Repression der Kollagenexpression auf Transkriptebene durch miR-29 konnte auch auf Proteinebene die Funktion der miR-29 als Kollagenregulator identifiziert werden.

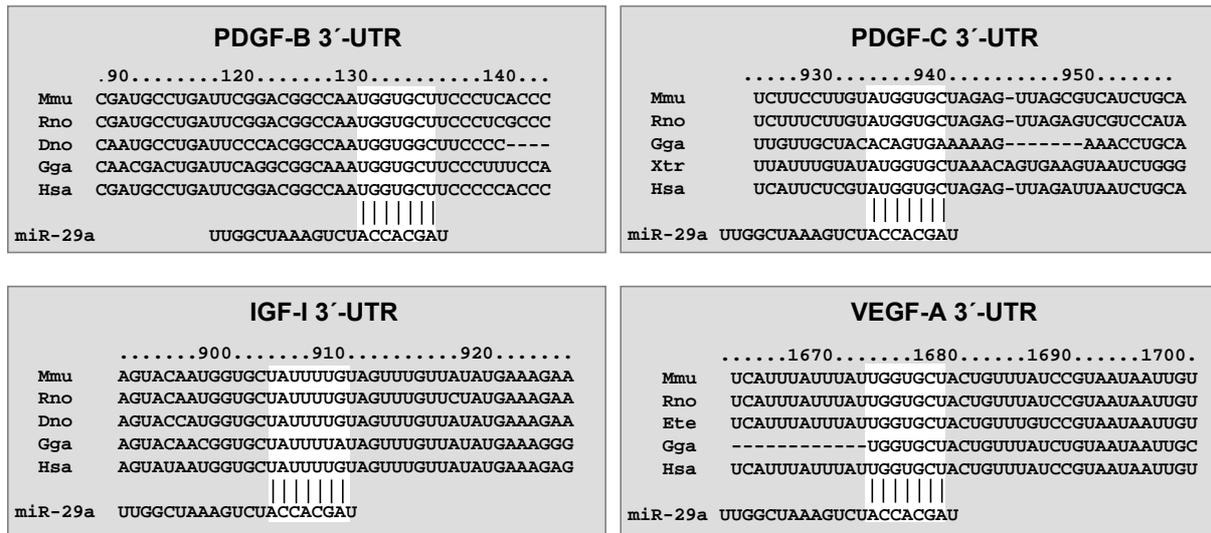


**Abbildung 10: Kollagen Proteinexpression in HSC-T6 Zellen nach Transfektion von Ago-miR-29a.** HSC-T6 Zellen wurden mit 50nM Ago-miR-29a und nk-siRNA transfiziert, 24 Stunden später wurden die Zellen lysiert und 10µg des Proteinlysates auf einem SDS-Polyacrylamidgel gelelektrophoretisch aufgetrennt. Nach der Übertragung auf eine Nitrozellulosemembran wurde Kollagen Typ  $\alpha$ (I) und  $\alpha$ (IV) mit den entsprechenden Antikörpern detektiert und im Tripletts densitometrisch analysiert. Dargestellt sind der Mittelwert mit Standardabweichung. Die Normalisierung erfolgte gegen  $\beta$ -Aktin. Zu sehen sind die Banden von Kollagen Typ I  $\alpha$ 1- und  $\alpha$ 2- Ketten mit einem Molekulargewicht von 95kDa und 91kDa sowie die  $\alpha$ -Ketten von Kollagen Typ IV bei 150kDa. Die Ergebnisse stehen repräsentativ für zwei unabhängige Experimente. RE=Relative Einheiten, nk-siRNA = negative Kontroll-siRNA.

### 3.2 Rolle der miR-29 in der Regulation der fibrogenen Mediatoren IGF-I, VEGF-A und der Mitglieder der PDGF-Familie

Die fibrogenen Prozesse, wie z.B. die Aktivierung von HSC, die daraufhin zu Myofibroblasten-ähnlichen Zellen transdifferenzieren und für die erhöhte Kollagensynthese verantwortlich sind, werden durch viele unterschiedliche, profibrogene Mediatoren ausgelöst und aufrechterhalten. Aktive HSC gehören selbst zu den Zellen, die profibrogene Mediatoren sezernieren können (Gressner 1992; Friedman 1999; Pinzani and Marra 2001; Ramadori and Armbrust 2001), weshalb sich die Frage stellte, ob unter den potentiellen Zieltranskripten der miR-29 auch profibrogene Mediatoren zu finden sind.

Unter Verwendung der Datenbank Targetscan (<http://www.targetscan.org/>) (Creighton et al. 2008) konnten neben den Kollagentranskripten zusätzlich die fibrogenen Mediatoren „Platelet-derived growth factor“ PDGF-C, PDGF-RB, PDGF-B sowie der insulinähnliche Wachstumsfaktor I (IGF-I) und der „vascular endothelial growth factor-A“ VEGF-A als Zieltranskripte für miR-29 ermittelt werden. Die *in silico* Untersuchungen zeigen, dass die Bindungsstellen für miR-29 in PDGF-B, PDGF-C, IGF-I und VEGF-A über verschiedene Spezies verteilt starke Homologien besitzen und somit eine wichtige Rolle einnehmen könnten (s. Abb.11).



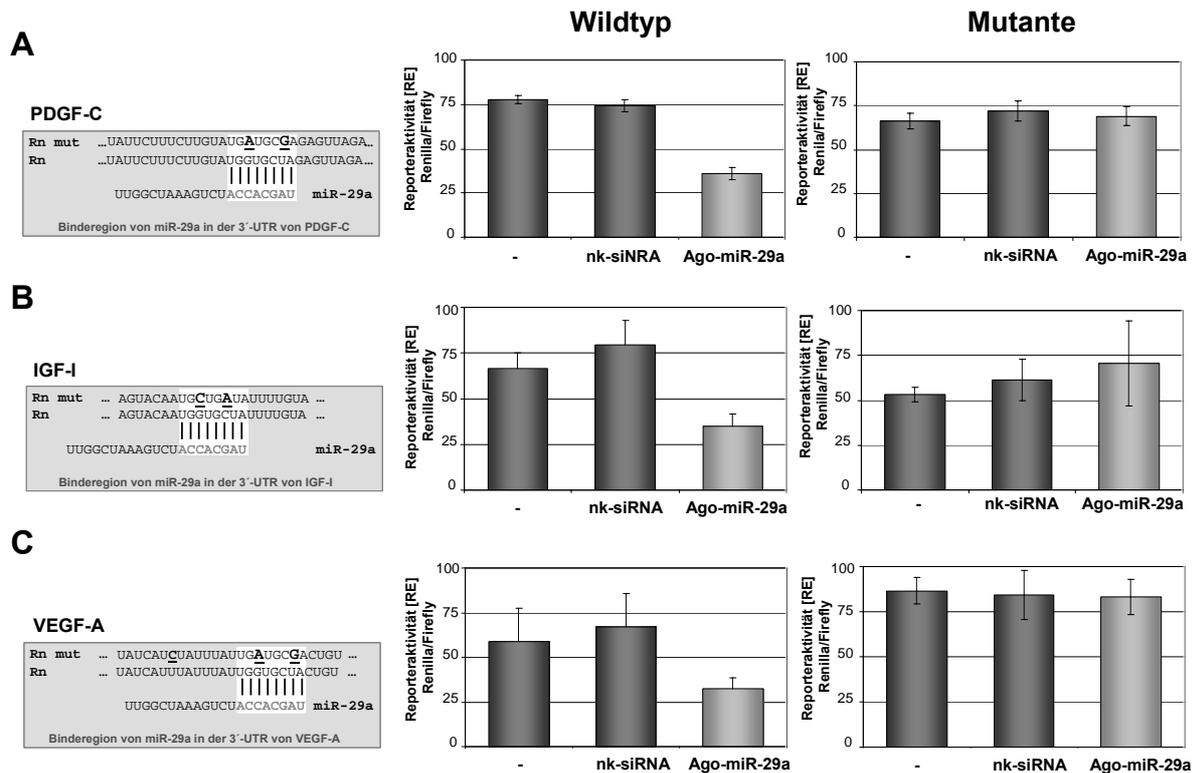
**Abbildung 11: Potentielle Binderegionen für die miR-29a in der 3'-UTR Sequenz der PDGF-B, PDGF-C, IGF-I und VEGF-A mRNA.** Der Sequenzvergleich der potentiellen miR-29a Binderegionen in der PDGF-B, PDGF-C, IGF-I und VEGF-A mRNA zeigt eine hohe Konserviertheit zwischen den Spezies Mmu (Mus musculus), Hsa (Homo Sapiens), Dno (Dasypus novemcinctus), Gga (Gallus Gallus) und Rno (Rattus norvegicus). Die „seed“-Region der miR-29a, die mit der Binderegion interagiert, ist weiß unterlegt. Die Sequenzen der potentiellen Binderegion in den 3'-UTRs wurden mit Hilfe der Datenbank „targetscan“ ermittelt (<http://www.targetscan.org/>) (Creighton et al. 2008).

### 3.2.1 Bindung der miR-29 an IGF-I, VEGF-A und Mitglieder der PDGF-C

Um eine Interaktion zwischen der miR-29a und den neuen Zieltranskripten zu ermitteln, wurden komplementäre Oligonukleotide mit der Sequenz der Binderegion aus der PDGF-B, PDGF-RB, PDGF-C, IGF-I und VEGF-A mRNA über Dimerisierung und Ligation in den psiCHECK<sup>TM</sup>-2 kloniert (s. Abb. 6A). Zusätzlich wurden Reporterkonstrukte kloniert, bei denen die Binderegionen zwei Punktmutationen enthält.

Die Reportervektoren mit der potentiellen miR-29 Bindesequenz aus der 3'-UTR der mRNA von PDGF-B, PDGF-RB, PDGF-C, IGF-I und VEGF-A sowie die entsprechend mutierte Sequenz wurden einzeln und in Kotransfektion mit einer nk-siRNA oder der Ago-miR-29a in HUH-7 Zellen transfiziert und nach 24 Stunden die Luziferaseaktivität gemessen. Die ermittelte Renillalumineszenzaktivität wurde gegen die Fireflylumineszenzaktivität normalisiert. Die Reporterkonstrukte mit den Bindungsstellen aus der PDGF-B und PDGF-RB mRNA zeigten bei allen drei Versuchsansätzen keine Erniedrigung der Luziferaseaktivität (Daten nicht dargestellt), während bei den Reporterkonstrukten mit den Bindungsstellen aus der PDGF-C, IGF-I und VEGF-A mRNA nach Kotransfektion mit Ago-miR-29a eine mindestens um den Faktor zwei erniedrigte Luziferaseaktivität detektiert wurde (s. Abb. 12A, B, C). Die Kotransfektion mit der nk-siRNA sowie alle drei Versuchsansätze

mit den mutierten Reporterkonstrukten wiesen keine veränderte Lumineszenzaktivität auf (s. Abb. 12). Somit konnte für die Bindungsstellen aus der 3'-UTR von der PDGF-C, IGF-I und VEGF-A mRNA eine Interaktion mit der miR-29 bestätigt werden, während sich für PDGF-BB und PDGF-RB keine Bindung belegen ließ.



**Abbildung 12: Bindung von miR-29a an die Bindestelle innerhalb der 3'-UTR von PDGF-C, IGF-I und VEGF-A Transkripten.** Komplementäre Oligonukleotide (s. Tab. 8), welche die potentielle Binderegion aus der 3'-UTR von PDGF-C, IGF-I und VEGF-A Transkripten enthielten, sowie deren Mutanten mit zwei Punktmutationen (fett und unterstrichen dargestellt) wurden nach Dimerisierung über die *XhoI* und *NotI* Schnittstellen in den psiCHECKTM-2 Vektor kloniert. Die Reporterkonstrukte wurden in drei verschiedenen Ansätzen in HUH-7 Zellen transfiziert und nach 24 Stunden die Luziferaseaktivität gemessen. Im ersten Ansatz wurde das Reporterkonstrukt alleine transfiziert, im zweiten Ansatz in Kotransfektion mit 50nM der nk-siRNA und im dritten Ansatz in Kotransfektion mit 50nM Ago-miR-29a. Die Renillalumineszenzwerte wurden gegen die konstant exprimierten Fireflymesswerte normalisiert. Dargestellt sind der Mittelwert mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen. Die Zielsequenzen wurden mit Hilfe der Datenbank „targetscan“ ermittelt (<http://www.targetscan.org> (Creighton et al. 2008)). Die „seed“-Region sowie die komplementäre Binderegion sind weiß unterlegt. RE=Relative Einheiten, nk-siRNA = negativ Kontroll-siRNA.

### 3.2.2 Kontrolle der Synthese der fibrogenen Mediatoren durch miR-29

Nachdem eine Interaktion der miR-29a mit der Bindungsregionen aus der 3'-UTR der PDGF-C, IGF-I und VEGF-A mRNA bestätigt wurde, konnte im nächsten Schritt die Expression dieser Zytokine unter miR-29 Einfluss untersucht werden.

Dafür wurden HSC-T6 Zellen mit 50nM miR-29a, miR-29b und einer nk-siRNA transfiziert und für 24 Stunden inkubiert. Nach der RNA-Isolierung und cDNA Synthese erfolgte die Quantifizierung der PDGF-C, IGF-I und VEGF-A Expression mittels qPCR. Für die Normalisierung der mRNA wurde das Referenzgen HPRT verwendet. Die Transkriptquantifizierung von PDGF-C zeigt in den mit miR-29a und miR-29b transfizierten HSC-T6 Zellen eine erniedrigte Menge an PDGF-C Transkripten auf. Desweiteren zeigten die IGF-I Transkripte nach Ago-miR-29a bzw. Ago-miR-29b Behandlung eine Erniedrigung, die nicht so ausgeprägt war wie bei PDGF-C. Beim VEGF-A Expressionsspiegel wurde nach Transfektion mit der miR-29a bzw. miR-29b ein Anstieg im Vergleich zu den nk-siRNA transfizierten Zellen gemessen.

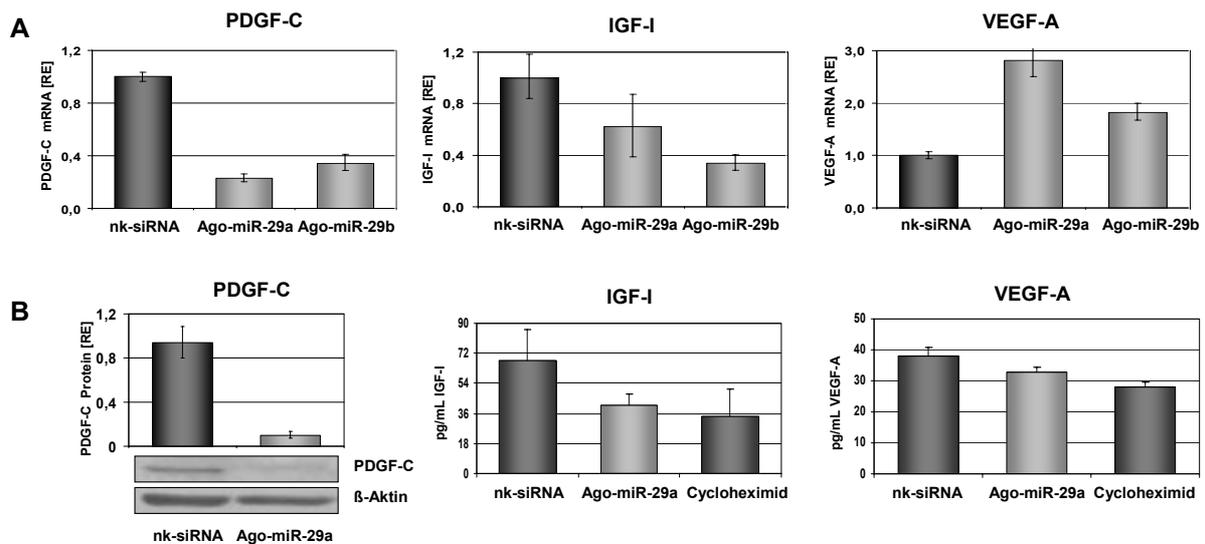
Die Resultate der Transkriptanalyse belegen eine durch miR-29a/b bedingte Repression der PDGF-C mRNA und der IGF-I mRNA. Für VEGF-A konnte keine repressive Wirkung durch miR-29a/b auf die Transkriptexpression gezeigt werden. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass miR-29 eine induzierende Wirkung auf die VEGF-A mRNA ausübt.

Neben der Regulierung der profibrogenen Zieltranskripte durch miR-29a und miR-29b wurde auch die Regulierung der Zieltranskripte auf Proteinebene analysiert. Um auf Proteinebene einen Nachweis für die Erniedrigung von PDGF-C zu erhalten, wurden HSC-T6 Zellen mit 50nM Ago-miR-29a sowie der nk-siRNA transfiziert und anschließend die Zellproteinlysate mittels Western Blot Analyse untersucht. Hierfür wurden jeweils 10µg des Proteinlysats auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und nach der gelelektrophoretischen Trennung auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Durch Verwendung eines anti-PDGF-C Antikörpers konnte die PDGF-C Proteinsynthese detektiert und gegen  $\beta$ -Aktin normalisiert werden. Gegenüber den nk-siRNA transfizierten HSC-T6 Zellen wurde bei den mit Ago-miR-29a transfizierten Zellen eine deutlich verminderte PDGF-C Proteinexpression detektiert (s. Abb. 12B). Somit konnte die bereits auf Transkriptebene detektierte Reduktion der PDGF-C Expression auch auf Proteinebene bestätigt werden.

Die Bestimmung von produzierten und sezernierten IGF-I und VEGF-A unter Einfluss der miR-29a erfolgte mit Hilfe eines ELISA aus dem Überstand von HSC-T6 Zellen. Hierfür wurden HSC-T6 Zellen mit 50nM Ago-miR-29a bzw. der nk-siRNA transfiziert. Als Positivkontrolle der translationalen Inhibierung wurden die Zellen mit 1µg/ml Cycloheximid

behandelt. Cycloheximid ist ein Antibiotikum, das die Proteinbiosynthese von Zellen inhibiert (Obrig et al. 1971). Die Messung des IGF-I Proteingehalts im Überstand zeigte nach miR-29a Behandlung eine geringere Menge als im Überstand von Zellen nach nk-siRNA Transfektion und entsprach nahezu der Konzentration von HSC-T6 Zellen, die mit Cycloheximid behandelt wurden (Abb. 12B). Bei der Messung der VEGF-A Menge im Überstand wurde zwischen den drei Ansätzen keine unterschiedliche Proteinexpression ermittelt (Abb. 12B).

Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass miR-29a an die Binderegion innerhalb der 3'-UTR der PDGF-C und IGF-I bindet (s. Abb. 12A & B) und dies in HSC-T6 Zellen zu einer Syntheseerniedrigung auf Transkript- und Proteinebene führt (s. Abb. 13 A & B). Obwohl miR-29a nachweislich auch an die Binderegion aus der 3'-UTR der VEGF-A mRNA binden kann (s. Abb. 12C), konnte in HSC-T6 Zellen sowohl auf Transkript- als auch auf Proteinebene keine Reduktion des VEGF-A Spiegels durch eine Ago-miR-29 Behandlung erreicht und somit VEGF-A als Zieltranskript in HSC-T6 ausgeschlossen werden (s. Abb. 13A & B).



**Abbildung 13: Expression von PDGF-C, IGF-I, und VEGF-A in HSC-T6 nach Transfektion mit miR-29.**

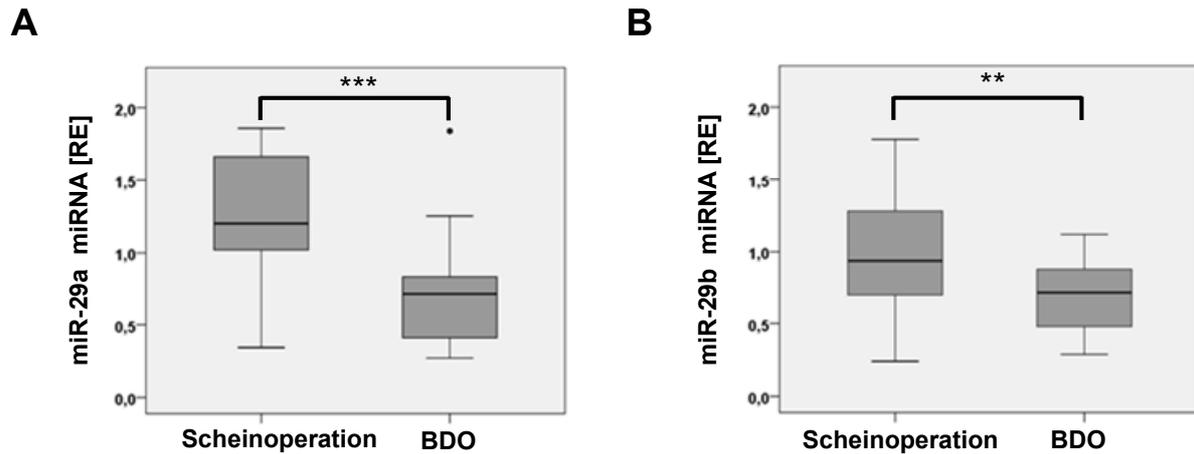
HSC-T6 Zellen wurden mit 50nM Ago-miR-29a, Ago-miR-29b bzw. nk-siRNA transfiziert und 24 Stunden die RNA aus den Zellen isoliert. Nach anschließender cDNA Synthese erfolgte die Bestimmung des Transkriptspiegels von PDGF-C, IGF-I und VEGF-A mittels qPCR (A). Die Normalisierung erfolgte gegen HPRT. Dargestellt sind der Mittelwert mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen. Für die Ermittlung der PDGF-C Proteinsynthese wurden HSC-T6 Zellen mit 50nM Ago-miR-29a sowie nk-siRNA transfiziert, nach 24 Stunden die Proteine isoliert und 10µg des Proteinlysates auf einem SDS-Polyacrylamidgel gelelektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Übertragen auf eine Nitrozellulosemembran wurden mit einem anti-PDGF-C Antikörper die PDGF-C Proteine detektiert und im Triplett densitometrisch analysiert. Die Normalisierung erfolgte gegen das β-Aktin Protein. Das Ergebnis stellt den Mittelwert mit der Standardabweichung dar und steht repräsentativ für 2 unabhängige Experimente. Für das immunologische Nachweisverfahren von IGF-I und VEGF-A wurde der Überstand von HSC-T6 Zellen, die mit 50nM miR-29a bzw. nk-siRNA transfiziert wurden, sowie der Überstand von Zellen, die 1µg/ml Cycloheximid ausgesetzt waren, im ELISA gemessen. Die Ergebnisse stellen den Mittelwert mit der Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten dar. RE=Relative Einheiten, nk-siRNA = negativ Kontroll- siRNA.

### 3.3 Repression der miR-29a und miR-29b Expression während der Fibrogenese in einem Rattenmodell nach Gallengangsokklusion

Um die Bedeutung der miR-29 für die Leberfibrose zu analysieren, wurde ein experimentelles Rattenmodell benutzt, bei dem durch Gallengangsokklusion (BDO) eine Leberfibrose ausgelöst wurde (Tox et al. 2007). Der operative Verschluss des Gallengangs in Ratten verursacht eine chronisch entzündliche Schädigung der Leber, die sich nach 4 Wochen zu einer Leberfibrose ausbildet. Es wurde ein Kollektiv aus männlichen Wistar Ratten untersucht, welches in zwei Gruppen unterteilt vorlag. Eine Gruppe enthielt 12 Tiere, die einer Scheinoperation unterzogen wurden und somit als Kontrollgruppe fungierten. Die andere Gruppe, bestehend aus 22 Tieren, wurde einer Gallengangsokklusion unterzogen. Die Eingriffe an den Wistar Ratten wurden von der Arbeitsgruppe Dr. U. Töx (Abteilung Gastroenterologie und Hepatologie, Uniklinik Köln) durchgeführt (Tox et al. 2007). Die Leberresektate wurden freundlicherweise für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zur Verfügung gestellt.

Für die Ermittlung des miR-29a und miR-29b Spiegels in der Leber wurde die RNA aus den Lebern von n=12 scheinoperierten Ratten sowie von n=22 Ratten nach Gallengangsokklusion isoliert und nach cDNA Synthese mittels qPCR analysiert. Die Normalisierung erfolgte gegen RNU6B. Der Expressionsvergleich der miR-29a im experimentellen Fibrosemodell zeigt in den BDO-Rattenlebern eine signifikante ( $***p < 0,001$ ) Erniedrigung um etwa den Faktor zwei gegenüber den scheinoperierten Tieren (s. Abb. 14A). Beim Vergleich des miR-29b Expressionsspiegel war nur eine geringe Reduktion ( $**p = 0,011$ ) in den Ratten nach BDO Behandlung gegenüber den scheinoperierten Tieren gemessen worden (s. Abb. 14B).

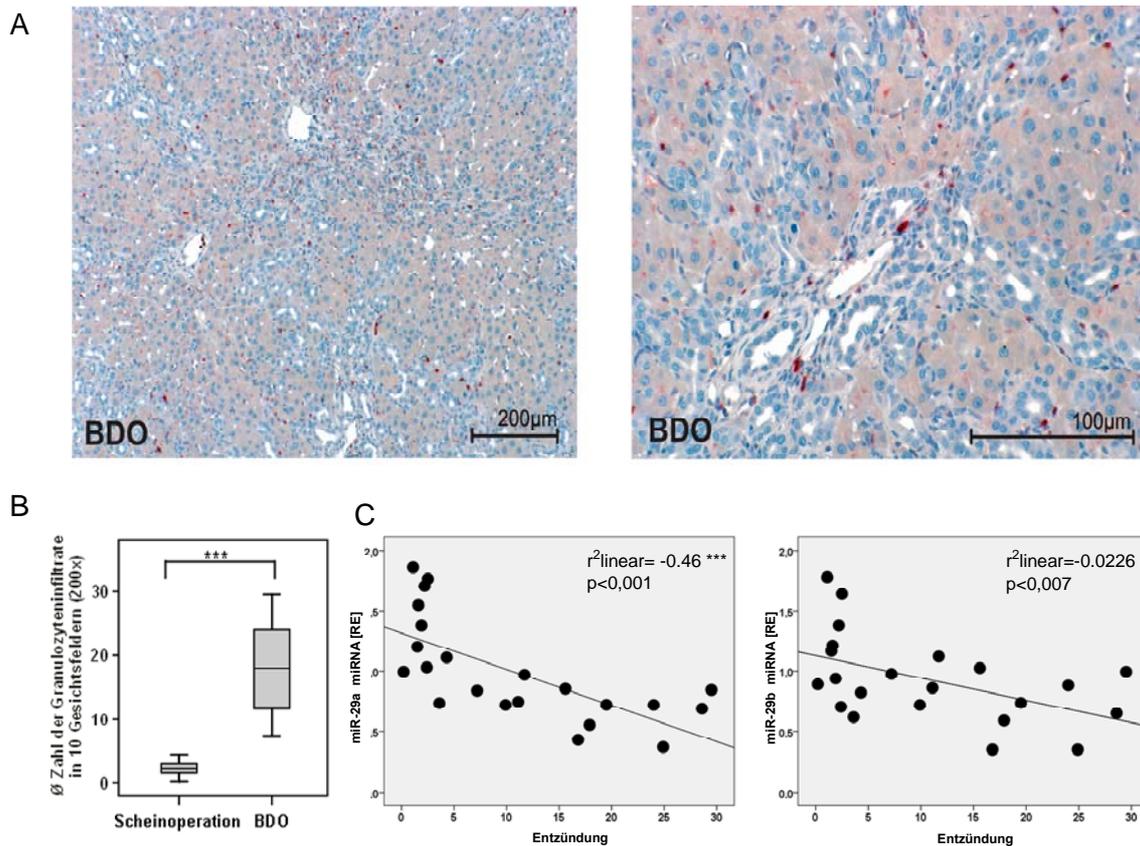
Bei den Untersuchungen wurde somit festgestellt, dass die experimentell induzierte Leberfibrose im BDO Rattenmodell zu einer Erniedrigung des miR-29a Transkriptspiegels führt.



**Abbildung 14: Expression von miR-29a und miR-29b in den Lebern von Ratten nach Gallengangsokklusion und Scheinoperation.**

Nach der Isolierung der RNA aus Rattenlebern nach Scheinoperation (n=12) bzw. Gallengangsokklusion (n=22) erfolgte eine cDNA Synthese mit anschließender quantitativer Bestimmung des miR-29a (A) sowie miR-29b (B) Spiegels. Die Normalisierung erfolgte gegen RNU6B. Die Signifikanz wurde mittels der einfaktoriellen ANOVA ermittelt. Die hohe statistische Signifikanz  $p=0,011$  ist mit \*\*, die sehr hohe statistische Signifikanz von  $p<0,001$  mit \*\*\* dargestellt. RE=Relative Einheiten, BDO=Gallengangsokklusion.

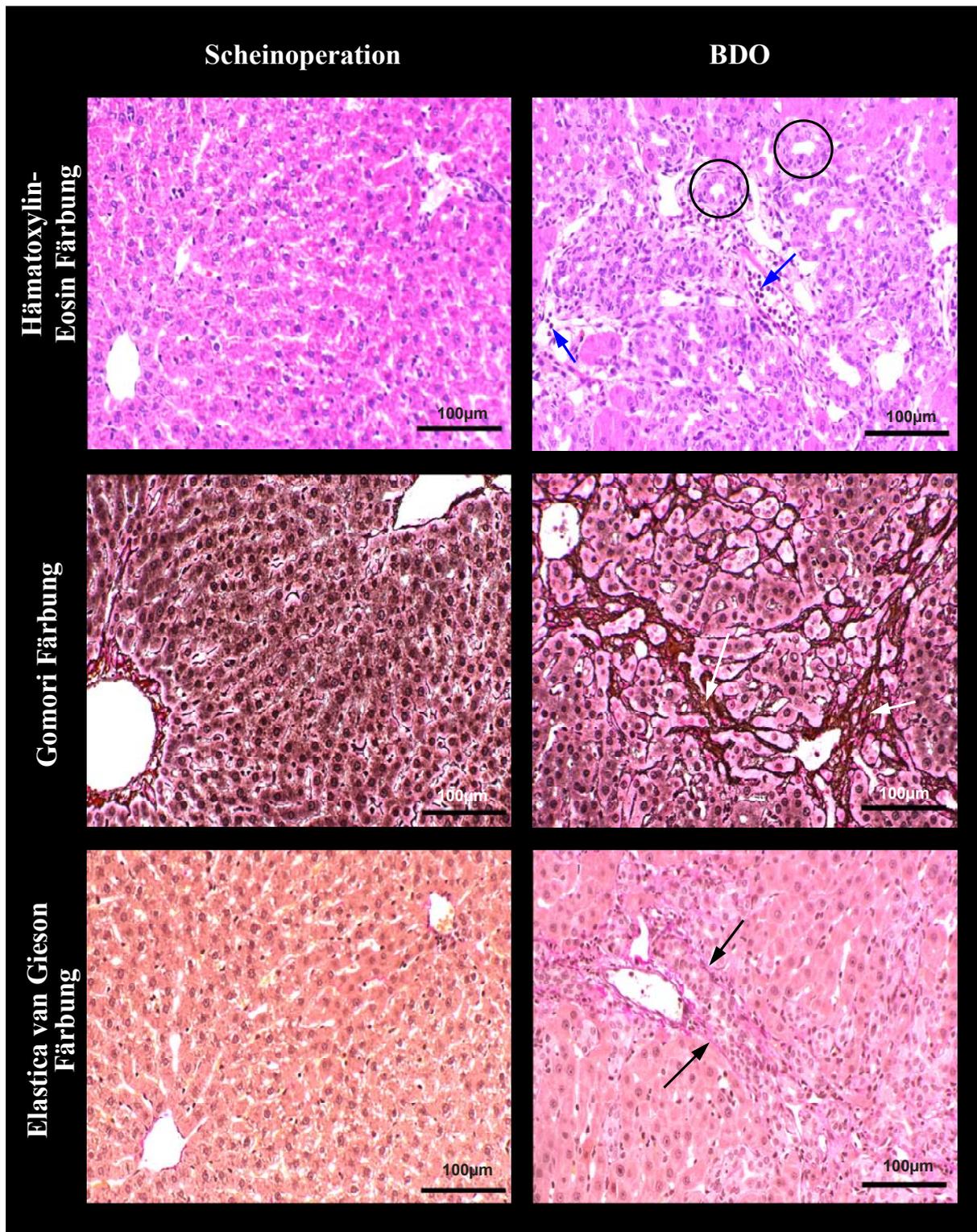
Um einen Überblick über die histopathologischen Veränderungen zu erhalten, sollte eine mögliche Entzündung der Rattenlebern untersucht werden. Chronische Leberfibrosen, die mit Zellnekrosen einhergehen, locken durch den entstehenden Zellzerfall Entzündungszellen, wie die Granulozyten, an. Um die Entzündung der Rattenlebern vier Wochen nach BDO zu untersuchen, wurden daher an Leberschnitten Chloracetat-Esterase Färbungen vorgenommen, um Granulozyten kenntlich zu machen (s. Abb. 15A). Die rot gefärbten Granulozyten konnten unter dem Lichtmikroskop ausgezählt werden. Hierbei wurden für die Auszählungen pro Versuchstier fünf Portalfelder sowie fünf periphere Regionen aus den einzelnen Lebern überprüft. Bei der quantitativen Analyse wurde eine signifikante Erhöhung ( $p<0,001$ ) der Entzündungszellen in den scheinoperierten Ratten, im Vergleich zu den gallengangsokkludierten Tieren, beobachtet (s. Abb. 15B). Die Daten der Granulozytenauszählung wurden freundlicherweise von Anna Brzoza (Institut für Pathologie der Universitätsklinik zu Köln) zur Verfügung gestellt.



**Abbildung 15: Chloracetat-Esterase-Analyse von Rattenlebern vier Wochen nach BDO.** Darstellung einer Chloracetat-Esterase-Färbung von Granulozyten (rot gefärbt) an einem Rattenleberschnitt vier Wochen nach BDO mit Entzündungszellinfiltration (A). Die Auswertungen der Granulozytenzählung aus zehn Gesichtsfeldern, mit jeweils fünf Portalfeldern und 5 peripheren Regionen, sind als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt (B). Aufstellung eines Streudiagramm zur Veranschaulichung der Korrelation zwischen der Granulozyteninfiltration und dem Expressionsspiegel der miR-29a bzw. miR-29b im Rattenmodell vier Wochen nach BDO (C). Die Signifikanz wurde mittels der einfaktoriellen ANOVA ermittelt. Eine sehr hohe Signifikanz ( $p < 0,001$ ) ist mit \*\*\* und eine hohe Signifikanz ( $p < 0,01$ ) mit \*\* gekennzeichnet. Beim linearen Regressionskoeffizienten ( $r^2$ ) ist mit  $r^2=0$  keine Korrelation vorhanden, während bei  $r^2=-1$  ein perfekt negativ korrelierender Zusammenhang vorliegt. BDO=Gallengangsockklusion, RE=Relative Einheiten.

Um festzustellen, ob es einen Zusammenhang zwischen der miR-29a bzw. miR-29b Expression und der Entzündung nach BDO gibt, wurde der Korrelationskoeffizient zwischen der miR-29a bzw. miR-29b Transkriptmenge und der Granulozyteninfiltration bestimmt (s. Abb. 15C). Dabei wurde eine negative Korrelation ( $r^2 = -0,46$ ) zwischen der miR-29a Expression und der Granulozytenanzahl ermittelt ( $p=0,001$ ). Je höher die Anzahl an Entzündungszellen in der Leber der untersuchten BDO Tiere war, desto niedriger war der Transkriptspiegel an miR-29a. Für die miR-29b konnte keine Korrelation ( $r^2 = -0,0226$ ) zur Granulozytenanzahl festgestellt werden ( $p= 0,007$ ) (s. Abb. 15C).

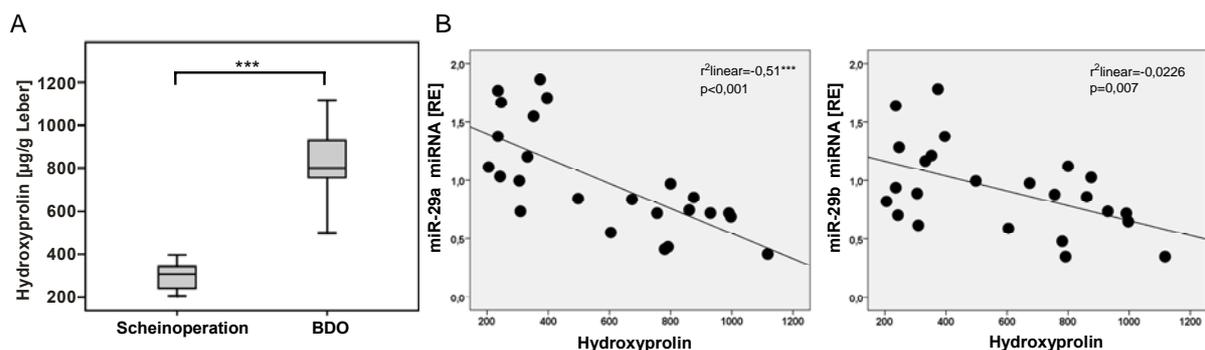
Um weitere pathologische Veränderung während der Leberfibrogenese zu untersuchen, wurden die Gewebeschnitte der Rattenlebern nach Scheinoperation bzw. BDO einer histochemischen Färbung mit Hämatoxylin-Eosin, Gomori und Elastica van Gieson unterzogen (s. Abb. 16).



**Abbildung 16: Histochemische Analyse einer BDO Rattenleber im Vergleich zu einer scheinoperierten Leber.** Formalin-fixiertes und Paraffin-eingebettetes Lebergewebe von Ratten vier Wochen nach BDO bzw. Scheinoperation wurde in 2-3µm dicke Gewebeschnitte geschnitten und mit Hämatoxylin-Eosin, Elastica van Gieson und Gomori gefärbt. BDO = Gallengangsockklusion. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen zeigen Entzündungszellinfiltration (blauer Pfeil), Kollagenfasern (schwarzer Pfeil), Gallengänge (schwarzer Kreis) und fibrotische Septen (weißer Pfeil).

Die Hämatoxylin-Eosin Färbung lieferte einen Überblick über die Struktur der gesunden und fibrotischen Rattenlebern. In gesunden Lebern wurde eine homologe Parenchymanordnung vorgefunden, während das Lebergewebe nach BDO Eingriff eine veränderte Leberarchitektur aufwies, bei denen keine bälkchenartige Anordnung der Hepatozyten von der Zentralvene ausgehend mehr vorlag. Zusätzlich war eine portale Entzündungszellinfiltration sowie ausgeprägte Proliferation des Gallengangepithels zu beobachten (s. Abb. 16 blauer Pfeil und schwarzer Kreis). Die Färbung mit Gomori erfolgte um die extrazelluläre Matrix (ECM), um insbesondere die Kollagenfasern im Lebergewebe der Versuchstiere hervorzuheben. Während bei den Ratten nach Scheinoperation keine Faservermehrung erkennbar war, zeigte die Leber einer Ratte nach Gallengangsligatur eine ausgeprägte, septale Ausbildung und Ablagerung der ECM (s. Abb. 16 weißer Pfeil). Für den Nachweis der Kollagendeposition erfolgte eine histochemische Färbung mittels Elastica van Gieson. Die so gefärbten Präparate zeigten in den BDO Geweben eine vermehrte Ansammlung von Kollagenfasern, die rot gefärbt erschienen (s. Abb. 16 schwarzer Pfeil).

Da Kollagen einen hohen Gehalt an Hydroxyprolin aufweist und sein Vorkommen auf Bindegewebe beschränkt ist, wird es als Indikator für die Kollagenablagerung verwendet. Für die Bestimmung des Kollagengehalts in Lebergewebsproben wird durch Säurehydrolyse Hydroxyprolin aus dem Bindegewebe gelöst und die Konzentration gemessen. Die Werte der Hydroxyprolinbestimmung wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Professor Dr. Steffen und Dr. Töx zur Verfügung gestellt.



**Abbildung 17: Bestimmung der Hydroxyprolinkonzentration und Korrelation zur miR-29a und miR-29b Expression im Lebergewebe des BDO Fibrosemodells.** Hydroxyprolin, ein Indikator für die Kollagendeposition, wurde durch Säurehydrolyse aus den Lebergewebsproben von Ratten nach BDO (n=22) und Scheinoperation (n=12) gelöst und dessen Gehalt bestimmt. Die ermittelten Werte sind in einer Kastengrafik dargestellt (A). Zur Veranschaulichung der Korrelation zwischen den Hydroxyprolinwerten und dem Expressionsspiegel der miR-29a bzw. miR-29b im Rattenmodell vier Wochen nach BDO wurden die Daten in einem Streudiagramm aufgestellt (B). Die Signifikanz wurde mittels der einfaktoriellem ANOVA ermittelt. Eine sehr hohe Signifikanz ( $p < 0,001$ ) ist mit \*\*\* gekennzeichnet. Beim linearen Regressionskoeffizienten ( $r^2$ ) ist mit  $r^2 = 0$  keine Korrelation vorhanden während bei  $r^2 = -1$  ein perfekt negativ korrelierender Zusammenhang vorliegt. BDO=Gallengangsokklusion, RE=Relative Einheiten.

Die Auswertung der Hydroxyprolinwerte der einzelnen Lebern in den Tieren nach BDO zeigte eine signifikante (\*\*\*) $p < 0,0001$ ) Erhöhung um mehr als den Faktor zwei im Vergleich zu Lebern nach einer Scheinoperation (s. Abb. 17A).

Bei der Auswertung des miR-29 Expressionsspiegels und der Hydroxyprolinwerte in der Leber der untersuchten BDO Tiere ergab sich eine negative Korrelation zwischen miR-29a und Hydroxyprolin ( $r^2 = -0,51$ ) mit einer Signifikanz von  $p < 0,001$ . Zwischen miR-29b und den Hydroxyprolinwerten der Versuchstiere ( $r^2 = -0,0236$ ,  $p = 0,007$ ) konnte keine Korrelation festgestellt werden (s. Abb. 17B).

Somit konnten diese Ergebnisse zeigen, dass in dem experimentellen Fibrosemodell eine negative Korrelation zwischen dem Kollagenaufkommen und der miR-29a Expression vorliegt.

### 3.4 MiR-29 und ihre Zieltranskripte während der Differenzierung primärer HSC

Die HSC stellen den wichtigsten, in die Leberfibrogenese involvierten, Zelltyp dar. Als Antwort auf die unterschiedlichsten Leberschädigungen durchlaufen die HSC eine phänotypische Transdifferenzierung zu kontraktile, proinflammatorischen und fibrogenen Myofibroblasten-ähnlichen Zellen, die vermehrt Kollagen und profibrogene Mediatoren sezernieren (Pinzani and Marra 2001; Ramadori and Armbrust 2001). Somit sind HSC für die Ausbildung der Leberfibrose von entscheidender Bedeutung. Durch das Ausplattieren von primären HSC auf Plastikzellkulturplatten wird eine myofibroblastische Veränderung, die der *in vivo* Transdifferenzierung entspricht, ausgelöst (Friedman et al. 1989). Daher wurden für die *in vitro* Untersuchung eines fibroserepräsentativen Systems HSC aus einer Ratte isoliert, auf Plastikzellkulturplatten ausgesät und an unterschiedlichen Tagen untersucht.

Die lichtmikroskopische Untersuchung der primären HSC zeigte am 3. Tag nach der Isolierung und Ausplattierung keine auffälligen morphologischen Veränderungen. Die für die HSC charakteristischen Fettvakuolen sind innerhalb der Zellen gut erkennbar (s. Abb. 18, 3.Tag). Am 5. Tag der Transdifferenzierung wurden die ersten phänotypischen Veränderungen sichtbar. Es war ein Verlust der retinoidspeichernden Fettvakuolen zu beobachten sowie eine langsam beginnende Erhöhung der Proliferationsrate. Eine schwache Ausbildung von Ausläufern war ebenfalls ersichtlich (s. Abb. 18, 5.Tag). Am 7. Tag zeigten die HSC eine Größenzunahme sowie starke Ausbildung von Ausläufern. Die Zellen zeigten weiterhin eine hohe Proliferationsrate (s. Abb. 18, 7.Tag).

In dem induzierten myofibroblastischen Transdifferenzierungssystem konnten über den gesamten Zeitraum die charakteristischen Veränderungen der primären HSC zu aktiven, Myofibroblasten-ähnlichen Zellen beobachtet werden.



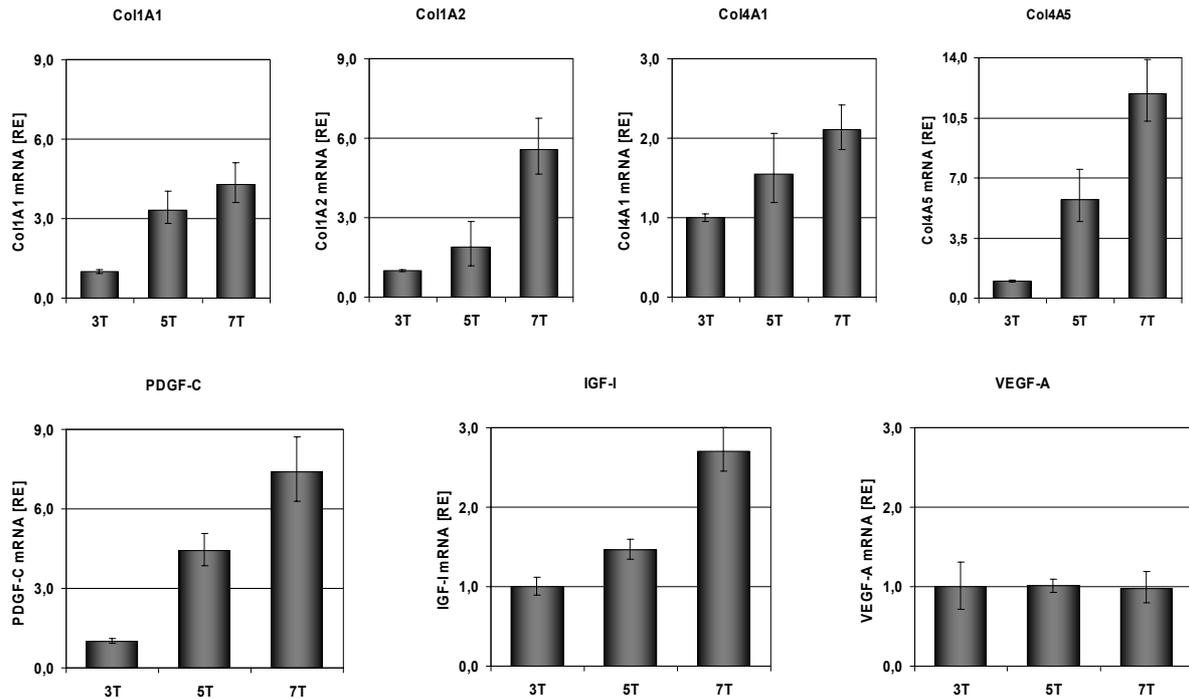
**Abbildung 18: Differenzierung primärer hepatischer Sternzellen.** Isolierte HSC aus einer Rattenleber wurden auf Plastikzellkulturschalen ausgesät und über einen Zeitraum von 7 Tagen untersucht. Die Phasenkontrastaufnahme der isolierten HSC zeigt die Morphologie der Zelle an Tag 3, 5 und 7.

Neben den phänotypischen Veränderungen der primären HSC zu aktiven HSC wurden die Veränderungen zusätzlich auf Transkriptebene mittels qPCR untersucht. Dafür erfolgte an Tag 3, 5 und 7 die Isolierung der Zell-RNA und anschließend eine cDNA Synthese. Untersucht wurden die Transkriptmengen von Col1A1, Col1A2, Col4A1 und Col4A5 sowie PDGF-C, IGF-I und VEGF-A.

Bis auf VEGF-A, dessen Expressionsmuster unverändert blieb, nahm mit der Kulturdauer von drei bis sieben Tagen der Transkriptgehalt von Col1A1, Col1A2, Col4A1 Col4A5, PDGF-C und IGF-I kontinuierlich zu (s. Abb. 19).

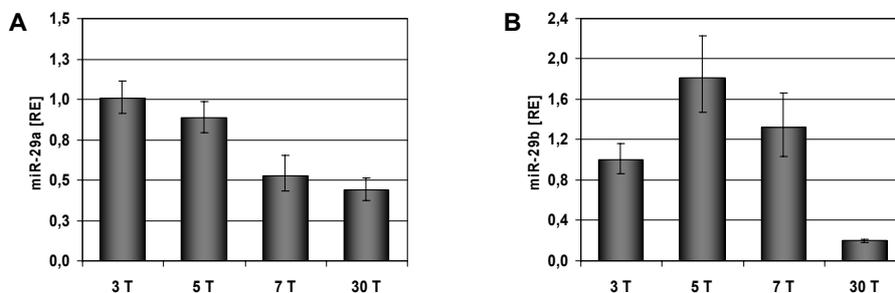
Diese Untersuchung zeigt, dass mit fortschreitender Differenzierung der HSC eine Zunahme aller miR-29 Zieltranskripte erfolgt.

Die Repressorfunktion der miR-29 auf die Expression von Col1A1, Col1A2, Col4A1 und Col4A5 sowie PDGF-C und IGF-I (s. Abb. 9 & 13) in den ausdifferenzierten HSC-T6 Zellen sowie die Zunahme der Zieltranskripte während der Differenzierung der HSC (s. Abb. 19) konnte zuvor gezeigt werden. Im weiteren Verlauf wurde daher das Expressionsverhalten der miR-29 im Transdifferenzierungssystem untersucht.



**Abbildung 19: Quantifizierung der Zieltranskripte von miR-29a während der Differenzierung von primären HSC aus der Ratte.** Primäre HSC wurden aus einer Rattenleber isoliert und auf Plastikzellkulturplatten ausgesät und am dritten, fünften und siebten Tag lysiert. Nach RNA-Isolierung und anschließender cDNA Synthese erfolgte die Messung des mRNA Spiegels von Col1A1, Col1A2, Col4A1 und Col4A5 sowie PDGF-C, IGF-I und VEGF-A mittels qPCR. Alle Werte wurden gegen HPRT normalisiert. Dargestellt sind der Mittelwert mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. RE=Relative Einheiten.

HSC aus der Rattenleber wurden nach der Isolierung auf Plastikzellkulturplatten ausgesät und nach dem dritten, fünften, siebten und dreißigsten Tag lysiert, die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels qPCR der Transkriptspiegel von miR-29a und miR-29b analysiert. Bei längerer Kulturhaltung der HSC wurde eine Abnahme der miR-29a Menge gemessen (s. Abb. 20A), während für miR-29b eine anfängliche Zunahme und erst später eine Abnahme detektiert wurde (s. Abb. 20B).



**Abbildung 20: Analyse der miR-29a und miR-29b Expression während der Differenzierung von primären HSC.** HSC wurden aus einer Rattenleber isoliert, auf Plastikzellkulturplatten ausgesät, am dritten, fünften, siebten und dreißigsten Tag lysiert und nach RNA-Isolierung und anschließender cDNA Synthese auf ihren miR-29a (A) sowie miR-29b (B) Spiegel mittels qPCR untersucht. Alle Werte wurden gegen RNU6B normalisiert. Die dargestellten Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert und die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. RE=Relative Einheiten

### 3.5 Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die miR-29 Expression und deren Zieltranskripte in HSC

Während der Leberfibrogenese spielen inflammatorische und profibrogene Zytokine eine wichtige Rolle. Den beiden Wachstumsfaktoren „*Transforming Growth Factor beta*“ (TGF- $\beta$ ) und „*Platelet-Derived Growth Factor*“ (PDGF) kommt dabei eine besonders entscheidende Bedeutung zu, da sie wichtige Mediatoren darstellen, durch deren Einfluss die Aktivierung von HSC zu Myofibroblasten-ähnlichen HSC erfolgt. Der „*Hepatocyte Growth Factor*“ (HGF) hingegen weist unter seinen unterschiedlichen Eigenschaften auch antiinflammatorische sowie antifibrogene Effekte auf, da er den profibrogenen Faktoren entgegenwirken kann. Allerdings konnte der genaue Mechanismus, der dem antagonistischen Effekt zwischen TGF- $\beta$  und HGF zu Grunde liegt, noch nicht geklärt werden.

Nachdem in der experimentellen Fibrose ein erniedrigter miR-29a Spiegel vorgefunden wurde, sollte untersucht werden, ob die miR-29 Expression unter der regulatorischen Kontrolle von profibrogenen Mediatoren steht.

#### 3.5.1 Die c-Met Expression in myofibroblastischen HSC

Hauptsächlich Zellen epithelialen Ursprungs sind zur c-Met Synthese befähigt (Takebayashi et al. 1995), folglich können nur diese Zellen mit HGF, dem einzigen Liganden des c-Met Rezeptors, stimuliert werden. Da jedoch gezeigt wurde, dass auch einige mesenchymale Zelltypen zur Synthese des c-met befähigt sind (Kmieciak et al. 1992; Mizuno et al. 1993; Beilmann et al. 1997) und es Hinweise darauf gibt, dass aktive HSC (Ikeda et al. 1998) dazu gehören, wurde mit Hilfe der qPCR analysiert, in welchem Ausmaß differenzierende HSC c-met Transkripte exprimieren können.

Dafür wurden HSC aus einer Rattenleber isoliert, auf Zellkulturschalen ausplattiert, drei, fünf und sieben Tage später die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. In der anschließenden qPCR Analyse wurden neben den HSC aus den drei Differenzierungszeitpunkten die HSC-T6 Zellen als Repräsentant für ausdifferenzierte HSC verwendet.

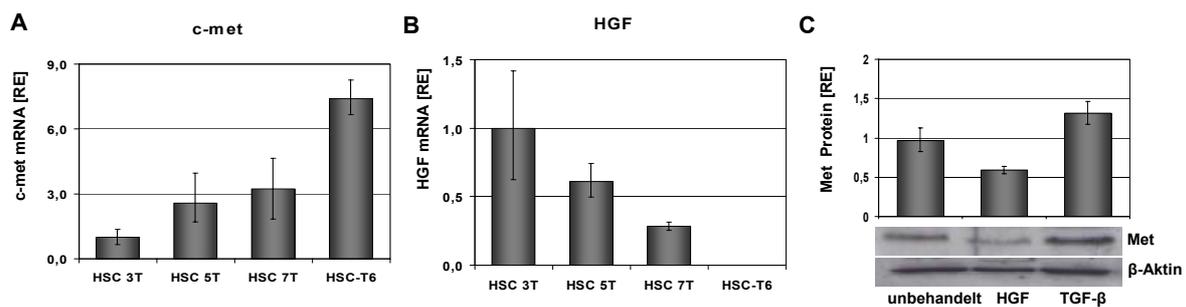
Das Expressionsprofil des c-met während der Transdifferenzierung zeigt einen Anstieg. Bei den ausdifferenzierten HSC-T6 liegt im Vergleich zu den HSC, die am dritten Tag isoliert wurden, eine fünffach höhere Expression vor (s. Abb. 21A). Neben dem c-met Transkriptspiegel wurde zusätzlich die Expression von HGF, dem einzigen Liganden des c-Met Rezeptors, während der Transdifferenzierung untersucht. Die qPCR ergab eine mit der

Differenzierung der HSC fortschreitende Abnahme des Expressionsspiegels (s. Abb. 21B). Somit zeigte die HGF-Expressionsanalyse der Zellen einen zur c-met Expression umgekehrt proportionalen Transkriptspiegel. Die HSC-T6 als vollständig ausdifferenzierter HSC Vertreter zeigten die geringste HGF Expression.

In einem Stimulierungsversuch wurde der Einfluss des fibrogenen Zytokins TGF- $\beta$  und antifibrogenen HGF auf die c-Met Synthese an HSC-T6 Zellen untersucht. Für die TGF- $\beta$  Stimulierung wurden die HSC-T6 Zellen für 24 Stunden mit 0,5%FCS-DMEM Medium ausgehungert und anschließend für 24 Stunden mit 2ng/ml rekombinantem TGF- $\beta$  stimuliert. Die HGF Stimulierung erfolgte ebenfalls für 24 Stunden, jedoch ohne vorheriges Aushungern der Zellen. Verwendet wurden 40ng/ml rekombinantes HGF. Anschließend wurden die Zellen lysiert, nach Proteinisolierung 10 $\mu$ g des Proteinlysates auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen, nach gelelektrophoretischer Auftrennung auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und mit einem anti-Met Antikörper das c-Met Protein detektiert.

Nach HGF Stimulierung wurde eine schwächere, nach TGF- $\beta$  eine stärkere c-Met Synthese im Vergleich zu unbehandelten HSC-T6 Zellen ermittelt. Die densitometrische Analyse wies eine signifikante, um 76% erhöhte Expression von c-Met zwischen TGF- $\beta$  und HGF stimulierten Zellen auf (s. Abb. 21 C).

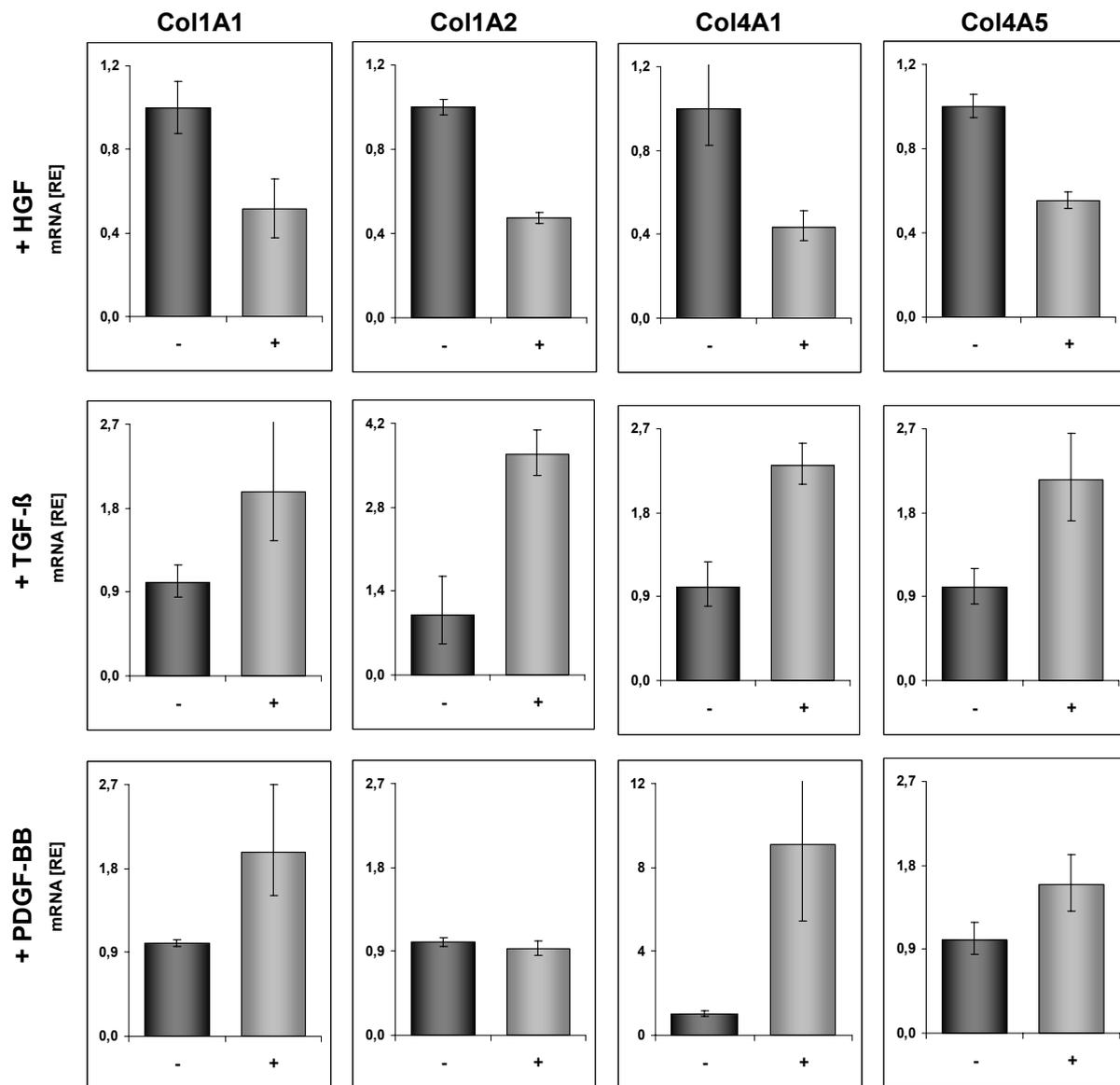
Die Daten zeigen, dass mit fortschreitender Differenzierung der HSC ein Verlust der HGF Expression einhergeht. Jedoch beginnen die HSC mit einer vermehrten Expression ihres Rezeptors, weshalb transdifferenzierte HSC in der Lage sind, auf einen HGF Stimulus zu reagieren.



**Abbildung 21: Expressionsanalysen von c-met und HGF in HSC.** HSC wurden aus einer Rattenleber isoliert und drei, fünf und sieben Tage auf Zellkulturplatten kultiviert. Die primären HSC sowie HSC-T6 Zellen wurden lysiert, die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben und mittels qPCR ihr c-met (A) und HGF (B) mRNA Spiegel untersucht. Die Normalisierung erfolgte gegen HPRT. Dargestellt sind der Mittelwert mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen. Die Stimulierung der HSC-T6 Zellen für 24 Stunden mit 2ng/ml TGF- $\beta$  erfolgte nach einem vorherigen, 24stündigen Aushungern der Zellen durch Kultivierung mit 0,5%FCS+DMEM Medium. Die Stimulierung der HSC-T6 Zellen mit 40ng/ml HGF erfolgte für 24 Stunden ohne vorheriges Aushungern der Zellen. Die Proteine der Zellen wurden isoliert und 10 $\mu$ g des Proteinlysates auf Polyacrylamidgelen aufgetragen und nach gelelektrophoretischer Trennung auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Detektion des c-Met Proteins erfolgte mit einem spezifischen anti-Met Antikörper. Die Normalisierung erfolgte gegen das  $\beta$ -Aktin Protein. Die densitometrische Analyse erfolgte im Triplett. Das Ergebnis stellt den Mittelwert der densitometrischen Analyse mit Standardabweichung dar und steht repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

**3.5.2 Bestimmung der Expression von Kollagenen, fibrogenen Mediatoren und miR-29 während der Fibrogenese, induziert durch die profibrogenen Mediatoren TGF- $\beta$  und PDGF-BB sowie den antifibrogenen Mediator HGF**

Um den *in vitro* Einfluss von TGF- $\beta$ , PDGF-BB und HGF auf die Genexpression von Col1A1, Col1A2, Col4A1 und Col4A5, PDGF-C, IGF-I, VEGF-A, HGF und TGF- $\beta$  in HSC-T6 Zellen zu überprüfen, wurden qPCR Analysen durchgeführt.

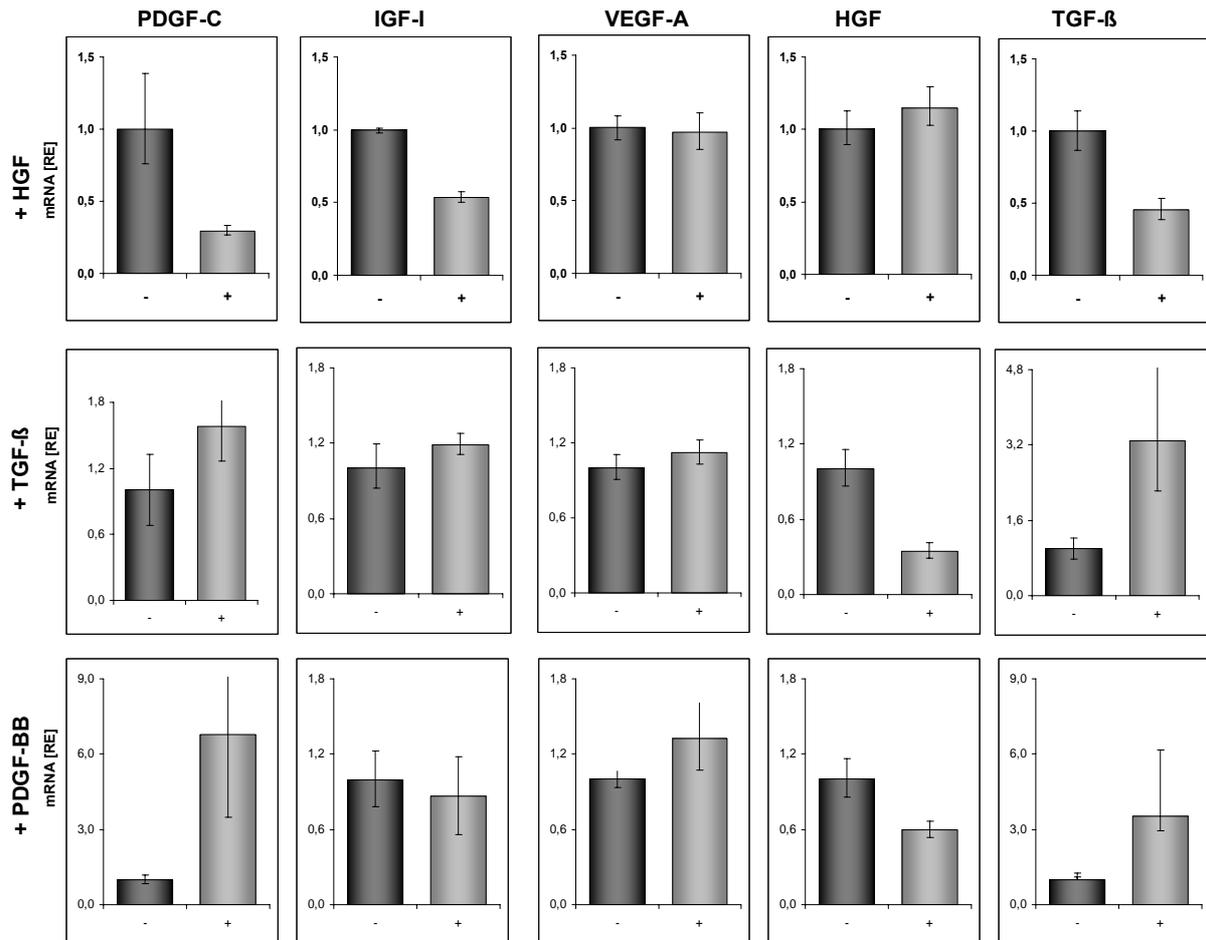


**Abbildung 22: Kollagentranskriptuntersuchung nach Stimulierung von HSC-T6 mit TGF- $\beta$ , PDGF-BB und HGF.** HSC-T6 Zellen wurden für 24 Stunden mit 40ng/ml HGF stimuliert bzw. für 24 Stunden mit 0,5%FCS+DMEM Medium ausgehungert und anschließend für 24 Stunden mit 2ng/ml TGF- $\beta$  oder 40ng/ml PDGF-BB stimuliert. Aus den Zelllysaten erfolgte die Isolierung der RNA, welche in cDNA umgeschrieben wurde. Mittels qPCR wurde der mRNA Spiegel von Col1A1, Col1A2, Col4A1 und Col4A5 quantifiziert. Die Normalisierung erfolgte gegen HPRT. Dargestellt sind der Mittelwert mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. RE = Relative Einheiten, unbehandelte Zellen = (-) , stimulierte Zellen = (+).

Zunächst wurden für die PDGF-BB und TGF- $\beta$  Stimulierung HSC-T6 Zellen für 24 Stunden im 0,5%FCS+DMEM Medium ausgehungert und anschließend für weitere 24 Stunden mit 2ng/ml TGF- $\beta$  und 40ng/ml PDGF-BB stimuliert. Die Stimulierung von HSC-T6 mit 40ng/ml HGF erfolgte ebenfalls für 24 Stunden, jedoch ohne vorheriges Aushungern der Zellen. Im Anschluss wurde aus den Zelllysaten die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und der Transkriptspiegel von Col1A1, Col1A2, Col4A1, und Col4A5 (s. Abb. 22), PDGF-C, IGF-I, VEGF-A, HGF und TGF- $\beta$  (s. Abb. 23) sowie miR-29a und miR-29b (s. Abb. 24) bestimmt. Die HSC-T6 Zellen, die mit HGF stimuliert wurden, wiesen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen für alle untersuchten Kollagentranskripte eine Reduktion von mindestens 45% auf. Nach TGF- $\beta$  Stimulierung wurde ein gegenteiliges Transkriptverhältnis gemessen. Alle Kollagengene wiesen nach TGF- $\beta$  Behandlung einen mindestens um den Faktor zwei erhöhten mRNA Spiegel auf. Ebenfalls wurde nach PDGF-BB Stimulierung ein Anstieg der Kollagengene gemessen, wobei Col1A2 als einziges Transkript nicht durch die Stimulierung beeinflusst wurde. Die Ergebnisse verdeutlichen den profibrogenen Effekt von TGF- $\beta$  und PDGF-BB sowie die antifibrogene Wirkung von HGF durch die Beeinflussung der Kollagenexpression.

Die weiteren Quantifizierungsanalysen mittels qPCR zeigten nach Behandlung von HSC-T6 Zellen mit HGF einen erniedrigten PDGF-C, IGF-I und TGF- $\beta$  mRNA Spiegel gegenüber unbehandelten Zellen. Die VEGF-A und HGF Transkriptmenge wurde durch HGF nicht beeinflusst. Die Zellen, die mit TGF- $\beta$  stimuliert wurden, zeigten einen tendenziell höheren Spiegel an PDGF-C und TGF- $\beta$  mRNA, jedoch eine Erniedrigung der HGF Transkripte. Sowohl die VEGF-A als auch IGF-I Transkriptmenge zeigte keine Veränderung unter TGF- $\beta$  Einfluss. Die PDGF-BB Stimulierung führte in HSC-T6 Zellen zu einer Erhöhung des PDGF-C und TGF- $\beta$  mRNA Spiegels, während der IGF-I und VEGF-A Transkriptgehalt vergleichbar mit dem von unstimulierten Zellen war. Hingegen war ein erniedrigter HGF Spiegel in den Zellen gemessen worden, die mit PDGF-BB stimuliert wurden.

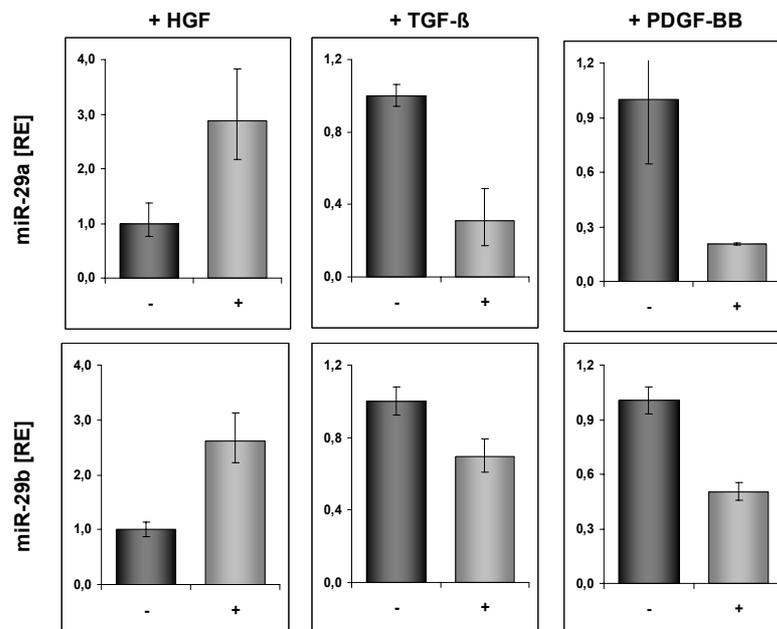
Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass VEGF-A durch keine der untersuchten Zytokine beeinflusst werden kann, wohingegen die Expression der profibrogenen Zytokine PDGF-C und TGF- $\beta$  durch die fibrogenen Mediatoren PDGF-BB und TGF- $\beta$  gefördert wird. Weiterhin üben die profibrogenen Zytokine PDGF-C und TGF- $\beta$  einen negativen Effekt auf das antifibrogene HGF aus, auf die IGF-I Expression haben sie allerdings keinen Einfluss. HGF seinerseits hat eine reprimierende Wirkung auf alle profibrogenen Zytokine, ausgenommen VEGF-A.



**Abbildung 23: Bestimmung des Transkriptspiegels von pro- und antifibrogenen Zytokinen nach Stimulierung von HSC-T6 mit TGF-β, PDGF-BB und HGF.** HSC-T6 Zellen wurden nach 24stündigem Aushungern in 0,5%FCS+DMEM Medium für weitere 24 Stunden mit 2ng/ml TGF-β oder 40ng/ml PDGF-BB stimuliert. Die 24stündige Stimulierung mit 40ng/ml HGF erfolgte ohne vorheriges Aushungern der Zellen. Die Zelllysate wurden nach RNA-Isolierung und cDNA Synthese mit Hilfe der qPCR auf die Zytokin-mRNA Spiegel von PDGF-C, IGF-I, VEGF-A, HGF und TGF-β untersucht. Die Normalisierung erfolgte gegen HPRT. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen. RE = Relative Einheiten, unbehandelte Zellen = (-), stimulierte Zellen = (+).

Da miR-29 in der Lage ist, die Expression der Kollagenene (s. Abb. 9 & 10), aber auch von PDGF-C und IGF-I (s. Abb. 13) zu inhibieren und während der Transdifferenzierung eine Repression erfährt, wurde im weiteren Verlauf untersucht, ob die Expression von miR-29a und miR-29b durch pro- und antifibrogene Mediatoren beeinflusst wird. Wie Abbildung 24 darstellt, wurde bei der Quantifizierung der miR-29a bzw. miR-29b mittels qPCR nach Stimulierung der Zellen mit HGF ein erhöhter miRNA Spiegel im Vergleich zu den unbehandelten Zellen gemessen, während die Zellen, die mit TGF-β und PDGF-C stimuliert wurden, eine reduzierte Menge der miR-29a und miR-29b aufwiesen (s. Abb. 24).

Daraus kann geschlossen werden, dass fibrogene Mediatoren, die die Transdifferenzierung von HSC einleiten (Gressner 1992; Friedman 1999; Pinzani and Marra 2001; Ramadori and Armbrust 2001), zur Inhibierung der miR-29 Expression beitragen, wodurch die Repressorsfunktion auf die Kollagengene und fibrogenen Zytokine verloren geht und diese vermehrt synthetisiert werden können.



**Abbildung 24:** Die Veränderung der miR-29a und miR-29b Transkriptexpression auf Grund der Stimulierung von HSC-T6 Zellen mit TGF-β, PDGF-BB und HGF. Nach 24stündigem Aushungern der HSC-T6 Zellen in 0,5%FCS+DMEM Medium erfolgte eine Stimulierung mit 2ng/ml TGF-β oder 40ng/ml PDGF-BB für weitere 24 Stunden. Die 24stündige Stimulierung mit 40ng/ml HGF wurde unter nicht-aushungernden Bedingungen durchgeführt. Nach Zellyse, RNA-Isolierung und cDNA Synthese erfolgte die Quantifizierung der miR-29a bzw. miR-29b Transkriptmenge mittels qPCR. Normalisiert wurde gegen RNU6B. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen. RE = Relative Einheiten, unbehandelte Zellen = (-) , stimulierte Zellen = (+).

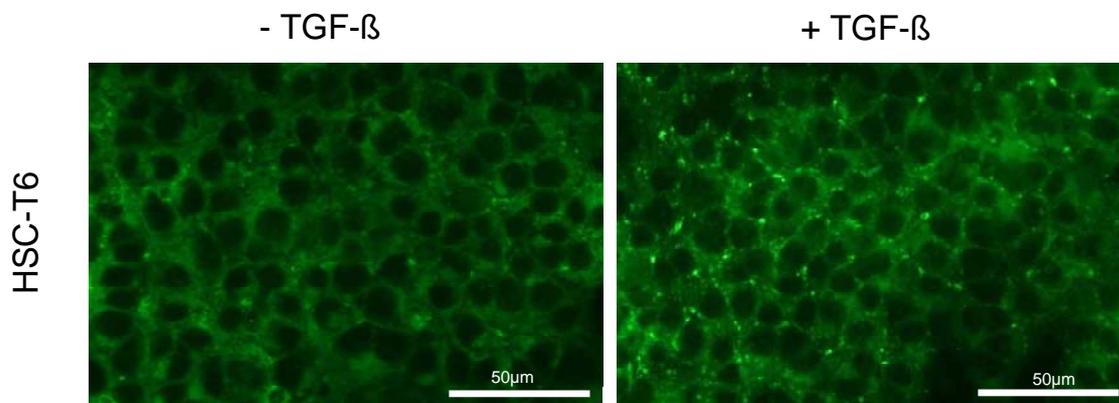
### 3.6 Vesikeltransport der miR-29 als Regulationsmechanismus der HSC

Nachdem bei einer Untersuchung von Exosomen aus dem Blutkreislauf neben mRNAs auch miRNAs vorgefunden wurden (Valadi et al. 2007), wurde die Vermutung aufgestellt, dass der miR-29 Verlust der Zellen durch ein Ausschleusen der miRNAs in Exosomen oder anderen Vesikeln erfolgen könnte. Auf Grund dieser Vermutung wurde im Rahmen dieser Dissertation das extrazelluläre Vorkommen von miR-29 untersucht.

#### 3.6.1 Transportmechanismus der miRNA mittels Vesikeln

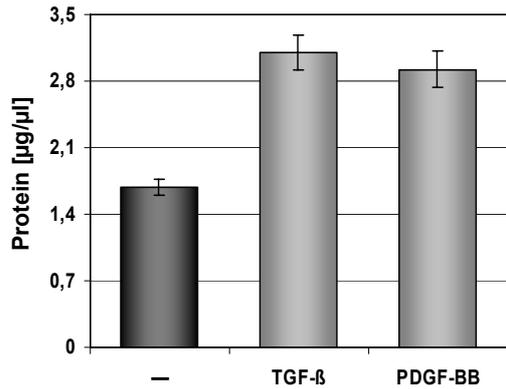
Um einen Nachweis für extrazellulär zirkulierende miRNAs nach profibrogenem Einwirken auf HSC zu erhalten, wurden zunächst Stimulierungsversuche mit TGF- $\beta$  vorgenommen und das Vesikelaufkommen untersucht.

Dafür wurden HSC-T6 Zellen für 24 Stunden in 0,5%FCS+DMEM Medium ausgehungert und anschließend für 24 Stunden mit 2ng/ml TGF- $\beta$  in 0,5%FCS+DMEM Medium stimuliert bzw. die Kontrollzellen ohne TGF- $\beta$  inkubiert. Das Anfärben der Vesikel erfolgte mit dem „Lysosomal Staining Kit“ (s. 2.2.4.9). Bei der fluoreszenzmikroskopischen Analyse der HSC-T6 Zellen die mit TGF- $\beta$  stimuliert wurden, konnten im Vergleich zu unstimulierten Zellen vermehrt Vesikel zwischen den Zellen beobachtet werden. (s. Abb. 25). Dies lässt vermuten, dass TGF- $\beta$  zu einer vermehrten Vesikelfreisetzung der Zellen führt.



**Abbildung 25: Untersuchungen der Lysosomenbildung von TGF- $\beta$  behandelten und unbehandelten HSC-T6 Zellen.** HSC-T6 Zellen wurden für 24 Stunden mit 0,5%FCS+DMEM Medium ausgehungert und anschließend für 24 Stunden mit 2ng/ml TGF- $\beta$  stimuliert bzw. ohne TGF- $\beta$  inkubiert. Mit dem „Lysosomal Staining Kit“ erfolgte die Anfärbung der Vesikel. Dargestellt sind die Dunkelfeldaufnahmen der HSC-T6 Zellen.

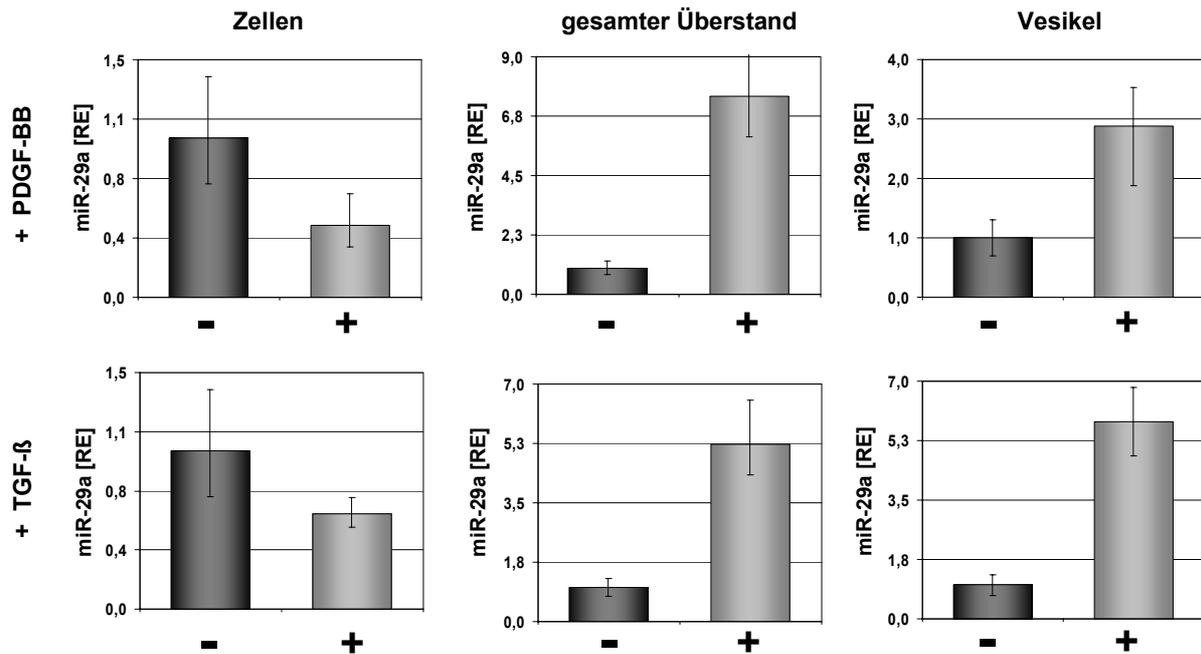
Zusätzlich wurde für die Bestimmung des Vesikelaufkommens das vesikuläre Proteinaufkommen gemessen. Dafür wurden aus dem Überstand von HSC-T6 Zellen nach Aushungern und Stimulierung mit 2ng/ml TGF- $\beta$  bzw. 40ng/ml PDGF-BB die Exosomen isoliert (s. 2.2.4.8). Mit der Bicinchoninsäure-Proteinbestimmungsmethode erfolgte die quantitative Bestimmung der isolierten Vesikelproteine. Hierbei konnte im Medium der HSC-T6 Zellen nach Stimulierung gegenüber dem Medium von unbehandelten Zellen ein vermehrtes Vesikelproteinaufkommen gemessen werden (s. Abb. 26). Diese Daten deuten darauf hin, dass nach Stimulierung vermehrt Exosome bzw. Proteine, welche in den Exosomen vorzufinden sind, synthetisiert werden.



**Abbildung 26: Proteinkonzentrationsbestimmung der isolierten Exosomen, aus dem Überstand von nicht-stimulierten sowie mit TGF-β und PDGF-BB stimulierten HSC-T6 Zellen.** HSC-T6 Zellen wurden zunächst für 24 Stunden mit 0,5% FCS+DMEM ausgehungert, und anschließend über einen Zeitraum von 24 Stunden nicht-stimuliert bzw. mit 2ng/ml TGF-β oder 40ng/ml PDGF-BB stimuliert. Die Exosomen wurden aus den Zellüberständen isoliert (s. 2.2.4.8) und mithilfe der Bicinchoninsäure die photometrische Quantifizierung der Proteinmenge vorgenommen. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. (-) = nicht-stimulierte HSC-T6 Zellen.

Um einen Nachweis zu erhalten, dass in den durch TGF-β und PDGF-BB vermehrt exprimierten Vesikeln eine Ausschleusung der miR-29 erfolgt, wurde aus dem Überstand der stimulierten Zellen sowie aus den isolierten Exosomen die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Als Kontrolle wurde die RNA ebenfalls aus den Zelllysaten isoliert und umgeschrieben. Bei der Quantifizierung der miR-29a mittels qPCR wurde in den Zellen, die mit TGF-β bzw. PDGF-BB stimuliert wurden, ein erniedrigter miR-29a Spiegel als in unbehandelten Zellen gemessen. Im Überstand sowie in den isolierten Vesikeln aus dem Überstand wurde nach Stimulierung mit PDGF-BB und TGF-β ein erhöhter Transkriptspiegel der miR-29a detektiert als im Medium und in den Vesikeln der unstimulierten Zellen (s. Abb. 27).

Diese Ergebnisse sprechen für die Möglichkeit der Erniedrigung des miR-29a Transkriptspiegels in den Zellen durch extrazelluläre Abgabe der miRNA ins Medium, bedingt durch fibrogene Stimulierung.

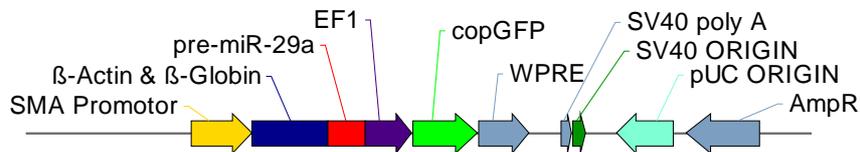


**Abbildung 27: Effekt der TGF- $\beta$  und PDGF-BB Stimulierung von HSC-T6 auf die intra- und extrazelluläre miR-29a Transkriptmenge.** HSC-T6 Zellen wurden mit 2ng/ml TGF- $\beta$  bzw. 40ng/ml PDGF-BB, wie in 2.2.4.6 angegeben, für 24 Stunden stimuliert, lysiert, mit SV40 versetzt und anschließend die RNA aus den Zellüberständen, den Medienüberständen bzw. aus den Vesikeln isoliert. Nach cDNA Synthese wurde der miR-29a Spiegel über qPCR detektiert. Die Zellen wurden gegen RNU6B normalisiert, die Überstände sowie Vesikel gegen zugesetztes SV40. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen. RE = Relative Einheiten, (-) = unbehandelte Zellen, (+) = stimulierte Zellen.

### 3.7 Konstruktion eines adenoviralen Vektors zur zelltypspezifischen Expression von miR-29a in Myofibroblasten

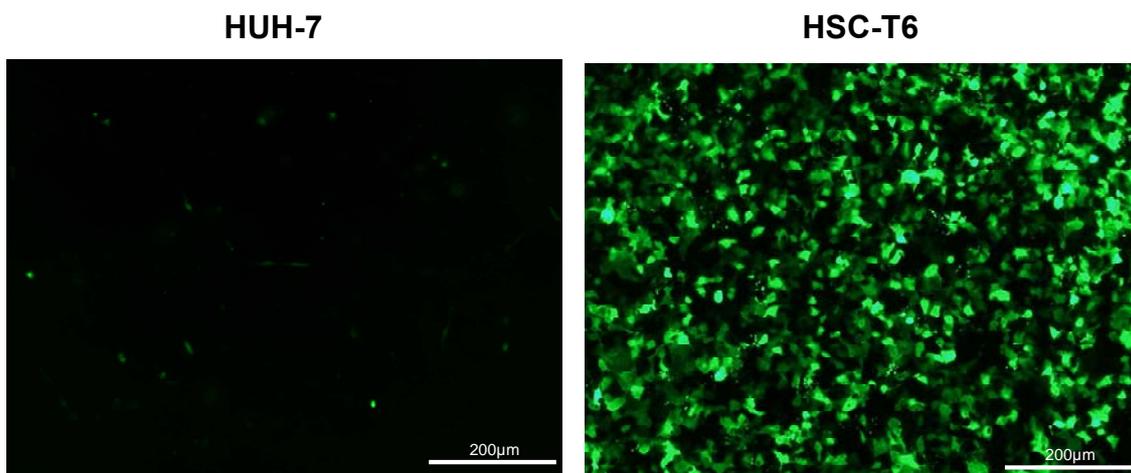
Eine gezielte Expressionssteigerung von miR-29 in myofibroblastischen HSC könnte zur Stabilisierung der inaktiven HSC sowie zu einer Reduktion der Kollagen- und Zytokinexpression durch aktive HSC beitragen und zur Behandlung einer Leberfibrose eingesetzt werden. Deswegen wurde ein Expressionssystem generiert, in dem der *Alpha-Smooth Muscle Actin* ( $\alpha$ -SMA) Promotor vor die Vorläufersequenz der miR-29a geschaltet war. Da die Expression von  $\alpha$ -SMA als sicherer Marker für die Differenzierung verschiedener Vorläuferzellen in Myofibroblasten gilt (Ramadori et al. 1990; Nouchi et al. 1991; Chaponnier and Gabbiani 2004), wurde für eine erhöhte und zelltypspezifische miR-29a Expression der Sequenzbereich +52 bis -713bp des  $\alpha$ -SMA-Gens, welcher an der Myofibroblasten-spezifischen Expressionskontrolle beteiligt ist (Odenthal and Jung 2000), als regulatorisches Steuerelement gewählt. Als Transkriptionsverstärker des  $\alpha$ -SMA Promotors wurde das  $\beta$ -Aktin Intron aus dem Huhn und das  $\beta$ -Globin aus dem Kaninchen zur zelltypspezifischen Expression der miR-29a verwendet. Für die Konstruktion des

pMIRNA-full-SMA-29a (s.Abb. 28) Plasmids wurde die im Anhang 6.2 dargestellte Klonierungsvorgehensweise erarbeitet.



**Abbildung 28: pMIRNA-full-SMA-29a Plasmid.** Der  $\alpha$ -SMA Promotor und die Transkriptionsverstärker  $\beta$ -Aktin und  $\beta$ -Globin wurden in den pMIRNA-29a Vektor kloniert, um eine in Myofibroblasten-spezifische miR-29a Expression zu ermöglichen. Klonierungsstrategie im Anhang 6.2 aufgeführt. copGFP = grün fluoreszierendes Protein-Gen, AmpR = Ampicillin Resistenzgen, SV40 poly A = Simian-Virus40 polyadenylierungs-Signal, WPRE = posttranskriptionell regulatorisches Element des Murmeltier Hepatitis Virus, EF1 = humaner Elongationsfaktor 1 $\alpha$  Promotor,  $\alpha$ -SMA = *Alpha-Smooth Muscle Actin*.

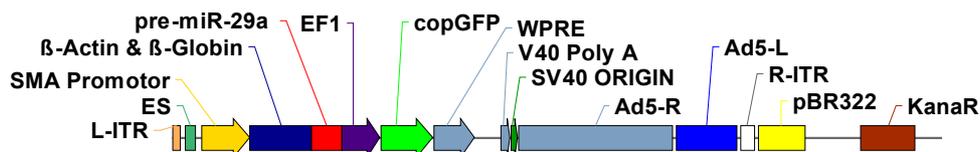
Für die Überprüfung der  $\alpha$ -SMA zelltypspezifischen Expression der miR-29a wurden 0,8 $\mu$ g des konstruierten Plasmides pMIRNA-full-SMA-29a in  $\alpha$ -SMA-positive HSC-T6 Zellen sowie in  $\alpha$ -SMA-negative Leberepithelzellen der Hepatomazelllinie HUH-7 transfiziert. Als Kontrolle für die Transfektionseffizienz diente das ebenfalls auf dem Plasmid kodierte Reporter-gen für das grün fluoreszierende Protein (GFP), welches durch den humanen EF1 $\alpha$  Promotor reguliert wurde. Das Reporterkonstrukt ermöglichte es, anhand der GFP Fluoreszenz die Transfektionseffizienz zu verfolgen. Wie Abbildung 29 entnommen werden kann, konnte nach der Transfektion von 0,8 $\mu$ g pMIRNA-full-SMA-29a eine Transfektionseffizienz von 10% in den HSC-T6 Zellen beobachtet werden, während bei der nicht myofibroblastischen Zelllinie HUH-7 eine nahezu 100%ige Effizienz vorzufinden war.



**Abbildung 29: Fluoreszenzaufnahme nach Transfektion des pMIRNA-full-SMA-29a Expressionsplasmids in HUH-7 und HSC-T6 Zellen.**  $\alpha$ -SMA-positive HSC-T6 Zellen sowie  $\alpha$ -SMA-negative HUH-7 Zellen wurden mit 0,8 $\mu$ g pMIRNA-full-SMA-29a transfiziert. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen die HSC-T6 und HUH-7 Zellen 24 Stunden nach Transfektion mit pMIRNA-full-SMA-29a bei einer Belichtungszeit von 714,3 Sekunden.

Insgesamt konnten diese Ergebnisse verdeutlichen, dass HSC-T6 eine für Plasmide schwer zu transfizierende Zelllinie ist. Um ein effizientes und aussagekräftiges System für eine vermehrte miR-29a Expression zu generieren, musste eine bessere Übertragung der Expressionskassette in die Zielzellen erfolgen.

Schon in vorherigen Arbeiten haben sich adenovirale Vektoren als geeignete Vektoren für schwer transfizierbare Zellen, wie es primäre HSC, aber auch die abgeleiteten HSC-Zelllinien HSC-T6 und Pav-1 sind, erwiesen (Weiskirchen et al. 2000). Deswegen wurde in weiteren Klonierungsarbeiten ein  $\alpha$ -SMA abhängiger, miR-29a exprimierender Adenovirus kreiert. Dafür wurde aus dem pMIRNA-full-SMA-29a Plasmid die Expressionskassette, bestehend aus dem  $\alpha$ -SMA Promotor in Kombination mit den Transkriptionsverstärker- Elementen, der Vorläufersequenz von miR-29a und dem Reportergen GFP, in einen adenoviralen pShuttle-Vektor kloniert (genauer Klonierungsvorgang im Anhang 6.2).



**Abbildung 30: pShuttle-full-SMA-29a Plasmid.** Die full-SMA-29a Expressionskassette, bestehend aus dem  $\alpha$ -SMA Promotor in Kombination mit den Transkriptionsverstärkern  $\beta$ -Actin und  $\beta$ -Globin, der Vorläufersequenz von miR-29a und dem Reportergen GFP, wurde für die Erstellung eines Adenovirus in den adenoviralen pShuttle Vektor kloniert. Genauere Klonierungsvorgehenweise im Anhang 6.2. copGFP = grün fluoreszierendes Protein-Gen, SV40 Poly A = Simian-Virus40 polyadenylierungs-Signal, WPRE = posttranskriptionell regulatorisches Element des Murmeltier Hepatitis Virus, EF1 = humaner Elongationsfaktor 1 $\alpha$  Promotor,  $\alpha$ -SMA = *Alpha-Smooth Muscle Actin*, KanaR = Kanamycin Resistenzgen, pBR322 = Replikationsursprung, Ad5 = Adenovirus Serotyp 5, Ad5-R = Homologieregion zum rechten Arm des Ad5, Ad-5-L = Homologieregion zum linken Arm des Ad5, ES = Verkapselungssignal, R-ITR = rechte Ad5 invertierte terminale Sequenzwiederholung, L-ITR = linke Ad5 invertierte terminale Sequenzwiederholung.

Für die Rekombination des pShuttle-full-SMA-miR-29a mit dem adenoviralen „backbone“-Plasmid pAdEasy wurden die rekombinationsaktiven BJ5183-Zellen verwendet, welche das adenovirale Plasmid pAdEasy bereits enthielten. Die erfolgreiche Rekombination des linearisierten pShuttle-full-SMA-29a Vektors mit der adenoviralen pAdEasy DNA wurde durch eine Restriktionsanalyse bestätigt (Daten nicht dargestellt). Das rekombinante Plasmid mit der adenoviralen pAdEasy DNA sowie der full-SMA-miR-29a Expressionskassette wurde anschließend in die adenoviral-replikationsfähigen HEK-293 Zellen transfiziert, da diese die deletierten Gene E1 und E3 aus dem Adenovirus Typ 5 im Genom tragen. Als Verfahrenskontrolle diente abermals die Fluoreszenz des Reportergens, anhand derer der Infektions- sowie Replikationsstatus der Virenpräparation verfolgt werden konnte und die

Virenamplifikation kontrolliert werden konnte. Nach fünfwöchiger Virenreplikation konnte bei der immunocytochemischen Titerbestimmung der gewonnenen Virussuspension ein Titerwert von  $1,87 \times 10^7$  virusinfizierten Zellen pro ml Präparation festgestellt werden.

### 3.7.1 Zelltypspezifische Expression von miR-29a

Zur Überprüfung der zelltypspezifischen, SMA-promotorgesteuerten miR-29a Expression durch den konstruierten adenoviralen Vektor pAd-full-SMA-29a wurden die glatte Muskelzelllinie A10 und die myofibroblastischen Zelllinien HSC, HSC-T6 sowie Pav-1, als mesenchymale,  $\alpha$ -SMA-positive Zellen verwendet. Als Negativkontrolle dienten die  $\alpha$ -SMA negativen Leberepithelzellen der Hepatomazelllinie HUH-7.

Diese Zellen wurden im Rahmen einer vorherigen Untersuchung (Kwiecinski 2007) auf ihren zelltypspezifischen Marker überprüft. Die Überprüfung der Expression des Intermediärfilamenten-Protein Vimentin erfolgte immunocytochemisch. Zusätzlich erfolgte mit einem anti-SMA Antikörper die Überprüfung der  $\alpha$ -SMA Expression in den verschiedenen Zelltypen. In A10, HSC-T6 und Pav-1 Zellen konnte Vimentin immunologisch nachgewiesen werden, während in HUH-7 Zellen das epithelspezifische Cytokeratin exprimiert wurde. Das  $\alpha$ -SMA Protein konnte sowohl in A10 aber auch in HSC-T6 und Pav-1 nachgewiesen werden, wohingegen die HUH-7 Zellen negativ für  $\alpha$ -SMA waren (Daten zusammengestellt in Tab. 12)

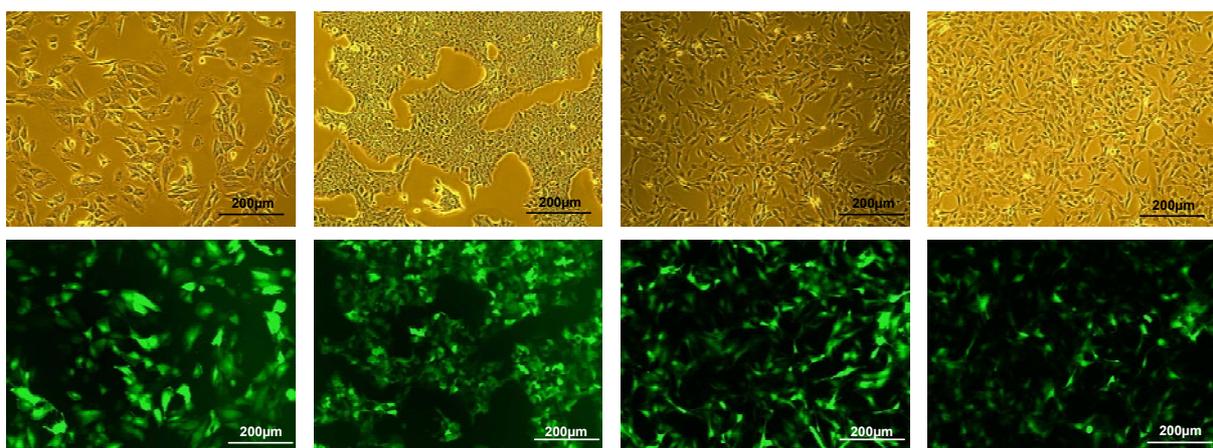
**Tabelle 12: Zellphysiologie und optimale Transduktions-Virusmenge von A10, HSC-T6, Pav-1 und HUH-7 Zellen**

Zelllinie	Zelltyp	Herkunft	Zytoskelettale Marker	Optimale Virusmenge für Transduktion (IfE/Z)
A10	mesenchymal	glatte Muskelzellen	Vimentin (+), SMA (+) Zytokeratin (-)	1200
HSC-T6	mesenchymal	HSC	Vimentin (+), SMA (+) Zytokeratin (-)	500
PAV-1	mesenchymal	HSC	Vimentin (+), SMA (+) Zytokeratin (-)	1200
HUH-7	epithelial	Hepatomazellen	Vimentin (-), SMA (-) Zytokeratin (+)	150

(+) = Protein wird exprimiert, (-) = Protein wird nicht exprimiert, IfE/Z= Infektionseinheit pro Zielzelle

In Vorexperimenten wurden A10, HSC-T6, Pav-1 und HUH-7 Zellen für 48 Stunden mit der gleichen Infektionseinheit (IfE) pro Zielzelle (IfE/Z) transduziert. Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung ergab in jeder Zelllinie eine unterschiedliche Fluoreszenzmessung des Reportergens GFP (Daten nicht dargestellt). Diese Experimente zeigten auf, dass jede Zelllinie gegenüber der gleichen Adenovirusmenge eine unterschiedliche Transduktionseffizienz aufweist. Um jedoch einen Vergleich der miR-29a Expression, welche durch den hergestellten pAd-full-SMA-miR-29a Adenovirus in den verschiedenen Zelltypen induziert wird, anstellen zu können, musste zunächst die einzusetzende Viruslast für jeden Zelltyp optimiert werden. Hierfür wurden A10, HSC-T6, Pav-1 und HUH-7 Zellen für 48 Stunden mit verschiedenen IfE/Z transduziert.

In Abbildung 31 sind die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen nach Transduktion mit der für die jeweiligen Zelllinien optimalen Virusmenge an pAd-full-SMA-29a dargestellt. Die effektivste Transduktionsdosis wurde bei den HUH-7 Zellen mit einer Menge von 150 IfE/Z erreicht (s. Abb. 31). Höhere Konzentrationen des Virus führten zu toxischen Auswirkungen. Sowohl A10 als auch Pav-1 Zellen wiesen erst nach Verwendung von 1200 IfE/Z eine nahezu 100%ige Transduktionseffizienz auf (s. Abb. 31). Bei den HSC-T6 Zellen zeigten geringere Virendosen als 300 IfE/Z keine Transduktionseffizienz, während eine Virenpartikeldichte von über 500 IfE/Z zum Verlust der Adhärenz und Absterben der Zellen führte. Die beste Transduktionseffizienz konnte bei Verwendung von 450 IfE/Z erzielt werden (s. Abb. 31).

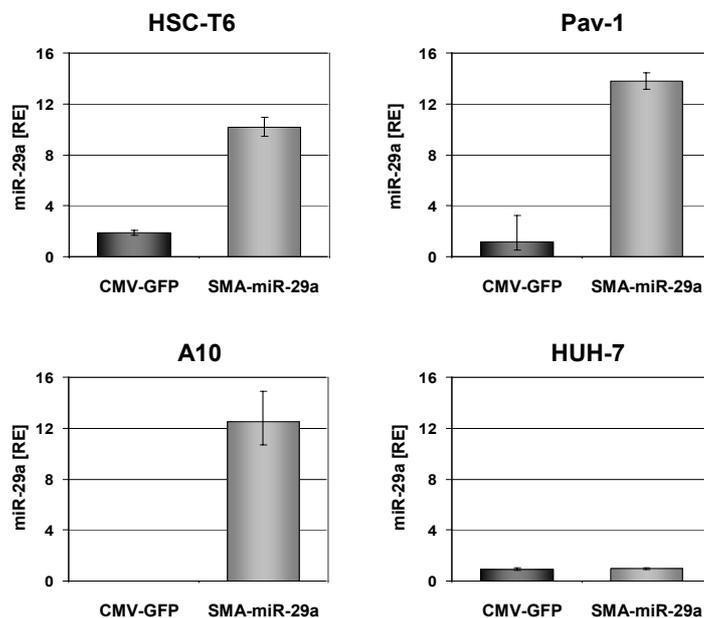


**Abbildung 31: Darstellung der effektivsten Transduktionsdosis nach zweitägiger Virusinkubation.** Darstellung der effektivsten Adenovirus-Transduktionsdosis für HUH-7, A10, HSC-T6 und Pav-1 Zellen. Bei den HUH-7 Zellen wies eine Virusmenge von 150 IfE/Z die beste Effizienz auf, während für die A10 und Pav-1 Zellen mit 1200 IfE/Z eine vergleichbare Transduktion erreicht werden konnte. Die ideale Menge für HSC-T6 Zellen betrug hingegen 450 IfE/Z.

Nach Ermittlung der effektivsten Transfektionsdosis wurden die HUH-7 mit 150 IfE/Z, die HSC-T6 mit 450 IfE/Z, die Pav-1 und A10 Zellen mit 1200 IfE/Z für 24 Stunden mit dem pAd-full-SMA-29a Adenovirus transduziert. Für die negative Kontrolle wurden die Zellen zusätzlich mit einem Virus transduziert, welches eine CMV gesteuerte GFP Expression einleitet, jedoch zu keiner miR-29a Expression befähigt ist. Anschließend erfolgte die Lysierung und RNA-Isolierung der Zellen. Nach cDNA Synthese wurde der miR-29a Spiegel mittels qPCR bestimmt.

Sowohl in den  $\alpha$ -SMA positiven A10 als auch in den HSC-T6 und Pav-1 pAd-full-SMA-miR-29a Adenovirus transduzierten Zellen konnte, im Vergleich zu den mit Kontrollvirus transduzierten Zellen, eine erhöhte miR-29a Transkriptmenge detektiert werden. Die epithelialen,  $\alpha$ -SMA negativen HUH-7 Zellen zeigten dagegen nach Transfektion mit dem pAd-full-SMA-miR-29a Virus einen gleich hohen miR-29a Transkriptspiegel wie nach Transduktion mit dem Kontrollvirus (s. Abb. 32).

Die Transduktionsuntersuchungen mit dem pAd-full-SMA-29a Adenovirus zeigten, dass ein erfolgreiches, zelltypspezifisches, miR-29a exprimierendes Übertragungssystem kreiert werden konnte.



**Abbildung 32: Nachweis einer zelltypspezifischen Expression von miR-29a in glatten Muskelzellen und Myofibroblasten.** Nach einer 48 stündigen Transduktion von HUH-7 mit 150 IfE/Z, HSC-T6 mit 450 IfE/Z, Pav-1 und A10 Zellen mit 1200 IfE/Z des pAd-full-SMA-29a Adenovirus, sowie einem Kontrollvirus, wurden die Zellysate, nach RNA-Isolierung und anschließender cDNA Synthese, mittels qPCR auf ihren miR-29a Transkriptspiegel untersucht. Alle Werte wurden gegen RNU6B normalisiert und stellen den Mittelwert mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten dar. RE=Relative Einheiten.

## 4 Diskussion

In der vorliegenden Dissertation wurde die miR-29 als antifibrotisch agierende miRNA identifiziert. Es konnte dargelegt werden, dass sie zum einen die Kollagenexpression in HSC inhibiert und zum anderen die fibrotische Zellkommunikation stark beeinflusst, indem sie die Synthese der profibrogenen Mediatoren PDGF-C und IGF-I unterdrückt. Die im Rahmen dieser Arbeit gezeigten Daten belegen, dass die Expression der miR-29 während des fibrogenen Prozesses unter einem zentralen Einfluss der antagonistisch wirkenden Mediatoren TGF- $\beta$  und HGF steht. Zudem konnte erstmals gezeigt werden, dass der TGF- $\beta$  Einfluss nicht nur zum miR-29 Verlust während der Leberfibrogenese und somit zur Aufhebung der inhibierten ECM-Synthese und der profibrogenen Zytokinexpression, sondern auch zur Sekretion von miR-29 führt.

### 4.1 MiR-29 als zentraler Repressor der Fibrogenese

Die *in silico* Analysen der vorliegenden Studie zeigen nicht nur, dass die miR-29 ein potentieller Regulator für sämtliche Kollagen I und IV Transkripte, die während der Leberfibrogenese am stärksten dereguliert vorzufinden sind, zu sein scheint, sondern zusätzlich noch die Kollagentranskripte von 14 anderen Kollagenen als potentielle Zielsequenzen erkennt. Für die Bedeutsamkeit der miR-29 Mitglieder in der Kollagensynthese spricht ebenfalls, dass die miR-29 untereinander sowie zwischen verschiedenen Spezies stark konserviert ist, aber auch die Bindungssequenzen in den 3'-UTRs der Kollagene hohe Homologien aufweisen.

Die Funktion der miR-29 als Kollagenrepressor wurde durch Bindungsstudien mit einem Reporterkonstrukt nachgewiesen. Die Spezifität dieser Interaktion konnte zusätzlich durch eine gezielte Mutation zweier Nukleotide in der Bindesequenz für miR-29a dargestellt werden. Die funktionelle Wirkung der miR-29a und miR-29b auf die Col1A1, Col1A2, Col4A1 und Col4A5 Transkripte wurde anschließend in *in vitro* Studien an Ratten HSC auf transkriptioneller und translationaler Ebene gezeigt. Kürzlich erschienene Studien bestätigen die Kollagenrepressorfunktion der miR-29 auch in humanen HSC (Ogawa et al. 2010) sowie HSC der Maus (Roderburg et al. 2010).

Neben den HSC wurde in anderen Untersuchungen eine inhibierende Wirkung der miR-29 auf die Expression von verschiedenen Kollagentypen in cardialen, osteoblastischen, epithelialen und medullaren Zellen beobachtet (Sengupta et al. 2008; van Rooij et al. 2008; Li et al. 2009; Liu et al. 2010). Zusätzlich konnte die repressive Wirkung der miR-29 auch bei anderen ECM Komponenten wie Fibrillin, Elastin und Laminin- $\gamma$ 1 nachgewiesen werden (Sengupta et al. 2008; van Rooij et al. 2008; Li et al. 2009; Liu et al. 2010).

Diese Daten zeigen, dass es sich bei der Regulierung der ECM durch die miR-29 nicht nur um einen zell-, sondern auch speziesübergreifenden Funktionsmechanismus handelt. MiR-29 ist somit die erste bekannte miRNA, die in der Lage ist eine Gruppe von Genen zu reprimieren und deren Hauptaktivität die Degradierung der ECM zu sein scheint.

Neben der Kollagenregulation wurde die miR-29 immer häufiger mit verschiedenen Arten von Malignomen wie Leukämie (Pekarsky et al. 2006; Garzon et al. 2009; Mraz et al. 2009; Stamatopoulos et al. 2009), aber auch mit Neoplasien wie Brustkrebs (Iorio et al. 2005) und Prostatakrebs (Porkka et al. 2007) in Verbindung gebracht. An Rhabdomyosarkomzellen (Wang et al. 2008) und Lungenkarzinomzellen (Fabbri et al. 2007) konnte gezeigt werden, dass unter miR-29 Einfluss die Ausbildung von Tumoren unterbunden wird. Dem anschließend kristallisierte sich durch erfolgreiche Zielsequenzermittlungen heraus, dass miR-29 nicht nur durch die Interaktion mit Zieltranskripten, die zur Tumorgenese beitragen, sondern auch durch Interaktion mit onkogenen Sequenzen wie „*leukemia/lymphoma 1*“ (Calin et al. 2007), „*myeloid cell leukemia sequence 1*“ (Mott et al. 2007) und „*cell division cycle 42*“ (Park et al. 2009) als Tumorsuppressor zu fungieren scheint.

Ferner wurde eine verminderte Expression von miR-29 auch in humanen hepatozellulären Karzinomen (HCC) beobachtet (Varnholt et al. 2008; Su et al. 2009; Ura et al. 2009), bei welchen in einer kürzlich erschienen Publikation die funktionelle Rolle als Negativregulator für die „*B-cell lymphoma 2*“ und „*myeloid cell leukemia sequence 1*“ Synthese gezeigt wurde (Xiong et al. 2010). Da HCCs häufig aus einer vorangehenden Zirrhose, die als Endstadium der Leberfibrose angesehen wird, hervorgehen, könnte die miR-29 ebenfalls eine essentielle Rolle bei dem Übergang der Leberzirrhose zur HCC Entwicklung einnehmen.

Die Expressionsanalyse des vorliegenden experimentellen Fibrosemodells, bei dem durch Gallengangsokklusion eine chronische Leberfibrose ausgelöst wurde, zeigte im Lebergewebe eine signifikante Abnahme des miR-29a und miR-29b Spiegels. Jedoch scheinen miR-29a und miR-29b in den Ratten nach BDO-Eingriff nicht demselben Expressionsprofil zu folgen, da bei der miR-29b keine der miR-29a entsprechend ausgeprägte Repression beobachtet werden konnte. Eine mögliche Erklärung für die schwache Abnahme der miR-29b könnte mit

ihrer Biogenese zusammenhängen, da miR-29a und miR-29b1 sowie miR-29b2 und miR-29c jeweils aus derselben pri-miRNA prozessiert werden. Wird von einer generellen Inhibierung der miR-29a und miR-29b1 pri-miRNA Prozessierung während der Fibrose ausgegangen, würde durch die Synthese der miR-29b2 und miR-29c pri-miRNA, die auf einem anderen Chromosom lokalisiert ist, der miR-29b Gehalt aufrechterhalten werden können, womit die geringe Reduktion erklärbar wäre.

Die Repression der miR-29 Synthese konnte auch an einem anderen Fibrosemodell gezeigt werden, bei der in Mäusen durch Tetrachlorkohlenstoff eine toxische Hepatozytenschädigung induziert und durch nekrotische und entzündliche Prozesse eine Leberfibrose verursacht wurde (Roderburg et al. 2010). Zusätzlich wurde der Verlauf der miR-29a in einer sich entwickelnden humanen Fibroseerkrankung anhand eines Leberkollektives von Patienten mit chronischer HCV Infektion untersucht. Die Lebergewebsproben zeigten eine deutliche Abnahme der miR-29a Expression im Vergleich zu den HCV-Leberproben, die noch keine Fibrose entwickelt hatten (persönliche Mitteilung von N. Elfimova, Institut für Pathologie der Universitätsklinik zu Köln). Bestätigend zu dem stark erniedrigten miR-29 Spiegel während der experimentellen Leberfibrogenese sowohl nach der hier gezeigten Cholestase durch BDO im Rattenmodell als auch nach chronischer Leberintoxikation im Mausmodell (Roderburg et al. 2010) waren die Unterschiede in den hepatischen miR-29 Spiegeln von Patienten nach chronischer HCV Infektion mit Fibrose versus ohne Fibrose ebenfalls signifikant (persönliche Mitteilung von N. Elfimova).

Die Ergebnisse der *in vitro* Transdifferenzierung primärer Ratten HSC bestätigten die Überlegung, dass mit fortschreitender Differenzierung eine Reduktion der miR-29a Synthese in HSC, passend zum Anstieg der Kollagentranskripte Col1A1, Col1A2, Col4A1 und Col4A5, auf Grund der fehlenden Repressorwirkung von miR-29 erfolgt.

Auch in anderen Publikationen konnte demonstriert werden, dass veränderte miRNA Mengen mit phänotypischen Veränderungen der HSC einhergehen (Guo et al. 2009; Ji et al. 2009). So wurde von Mann et al. gezeigt, dass die miR-132, die während der Transdifferenzierung herunterreguliert wird, eine Signalkaskade auslöst, die zur verstärkten Fibrotisierung der Zellen führt (Mann et al.).

#### 4.2 MiR-29 beeinflusst die profibrogenen Zellkommunikation

Auf Grund der Fähigkeit der profibrogenen Mediatoren TGF- $\beta$ 1 und PDGF-BB HSC zu aktivieren (Friedman and Arthur 1989; Gressner and Bachem 1995; Friedman 1999; Gressner et al. 2002), wurde die *in vitro* Beeinflussung der miR-29a Synthese durch die beiden Mediatoren untersucht. Die Stimulierungsversuche von HSC mit TGF- $\beta$  zeigten, dass TGF- $\beta$  seine eigene Expression stark induzieren kann. Dies geht einher mit bereits bekannten Daten aus unterschiedlichen Studien, die besagen, dass durch eine parakrine TGF- $\beta$  Stimulierung aktivierte HSC zur TGF- $\beta$  Synthese befähigt werden und ihrerseits durch autokrine Stimulierung zur TGF- $\beta$  Expressionssteigerung beitragen (Bachem et al. 1992; Gressner 1992; Ramadori and Armbrust 2001).

Unter TGF- $\beta$  Einfluss wurde zusätzlich ein erhöhtes Expressionsmuster der Kollagentranskripte Col1A1, Col1A2, Col4A1 und Col4A5 detektiert. Der TGF- $\beta$  induzierte Anstieg von Col1A2 mRNAs in HSC konnte bereits in der Vergangenheit gezeigt werden (Czaja et al. 1989; Igotz 1991). Da jedoch die fibrillären Kollagene vom Typ I und III als wichtige Kollagene der Fibrogenese gehandelt werden, ist die Untersuchung von Kollagen Typ IV in den Hintergrund gerückt. Obwohl schon dargestellt werden konnte, dass fibrotische Läsionen der Leber mit einem erhöhten Col1A1, Col1A2, Col4A1 sowie TGF- $\beta$  Transkriptspiegel assoziiert werden (Nakatsukasa et al. 1990), erfolgte bisher keine Untersuchung von HSC nach direkter Stimulierungswirkung von TGF- $\beta$  auf die Transkriptmenge des Kollagen Typ IV. Somit konnte in dieser Arbeit ein Zusammenhang zwischen der TGF- $\beta$  Stimulierung und der Transkripte von Kollagen Typ IV dargestellt werden.

Neben TGF- $\beta$  konnte in der vorliegenden Arbeit ebenfalls nach Stimulierung der HSC mit PDGF-BB eine deutliche Zunahme der Col1A1, Col4A1 und Col4A5 Transkripte beobachtet werden. Lediglich für Col1A2 wurde kein positiver Syntheseeffekt festgestellt. Eine mögliche Erklärung für die unveränderte Col1A2 Transkriptmenge könnte mit der Unfähigkeit von PDGF-BB zusammenhängen, CTF/NF-I Transkriptionsfaktoren anzuregen, welche für die Col1A2-Promotoraktivierung vonnöten sind (Rossi et al. 1988; Alevizopoulos and Mermod 1996).

Da die Kollagentranskripte unter der regulatorischen Kontrolle der profibrogenen Mediatoren TGF- $\beta$  und PDFG-BB stehen, wurde die antifibrogene Wirkung von HGF, einem physiologischen Gegenspieler von TGF- $\beta$ , auf HSC untersucht. Bei der Untersuchung von Met, dem physiologischen Promotor von HGF, wurde mit voranschreitender Differenzierung der HSC zu Myofibroblasten-ähnlichen HSC ein Anstieg des c-met Spiegels detektiert,

währenddessen, was auch die Studie von Schirmacher et al. belegen konnte (Schirmacher et al. 1992), eine HGF Transkriptreduktion auftrat.

Obwohl der HGF Rezeptor Met hauptsächlich von Zellen epithelialen Ursprungs synthetisiert wird (Takebayashi et al. 1995), konnten einige Studien die Expression des c-met Transkripts auch in endothelialen (Gherardi and Stoker 1991) und mesenchymalen Zellen wie den Chondrozyten oder hämatopoietischen Zellen nachweisen (Kmieciak et al. 1992; Mizuno et al. 1993; Beilmann et al. 1997). Die hier gemachten Beobachtungen während der Differenzierung zeigen eine ansteigende, mesenchymale c-met Expression in HSC passend zu jenen von Ikeda et al., bei denen die Expression zwischen aktivierten und inaktiven HSC untersucht und eine stark erniedrigte c-met Menge gemessen wurde (Ikeda et al. 1998). In der vorliegenden Studie wurde jedoch nicht nur die c-met Expression während der Differenzierung von HSC analysiert, sondern zusätzlich der Einfluss von HGF und seinen Antagonisten TGF- $\beta$  untersucht. Bedingt durch die HGF Stimulierung konnte eine verringerte c-met Expression festgestellt werden, während gegensätzlich dazu die TGF- $\beta$  Stimulierung einen erhöhten c-met Spiegel in HSC zufolge hatte.

Im Gegensatz zu TGF- $\beta$  zeigte die HGF Stimulierung in HSC eine dem TGF- $\beta$  entgegengesetztes, reprimiertes Expressionsprofil der Kollagentranskripte Col1A1, Col1A2, Col4A1 und Col4A5. Die antagonistische Wirkung von HGF wurde bereits *in vivo* durch eine Erniedrigung von TGF- $\beta$  an verschiedenen Rattenmodellen mit fibrotischen Lebern beschrieben (Matsuda et al. 1995; Yasuda et al. 1996; Matsuda et al. 1997; Ikeda et al. 1998). Gleichzeitig konnte eine durch HGF induzierte Suppression der Col1A2, Col3A1 und Col4A1 Transkripte sowie des TGF- $\beta$ , Desmin und  $\alpha$ -SMA Spiegels im Dimethylnitrosamin-induzierten Rattenmodell erwirkt werden (Yasuda et al. 1996).

Die Daten von van Rooij et al. konnten schon zuvor eine suppressive Wirkung von TGF- $\beta$  auf die miR-29 Synthese in myocardialen Fibroblasten zeigen (van Rooij et al. 2008). Die durchgeführten Analysen der stimulierten HSC ergaben ebenfalls, dass nicht nur unter TGF- $\beta$ , sondern auch PDGF-BB Einfluss eine Repression der miR-29a Synthese zu beobachten ist, während die HGF Stimulierung zur vermehrten Expression führt. Die Daten der vorliegenden Dissertation widersprechen einer von Ogawa et al. beschriebenen Wirkungslosigkeit von TGF- $\beta$ , in humanen HSC die Expression von miR-29 beeinflussen zu können (Ogawa et al. 2010). Eine kürzlich erschienene Publikation unterstützt jedoch die dargestellten Ergebnisse, da ebenfalls eine Suppression der miR-29 Synthese durch TGF- $\beta$  Einwirkung an HSC aus der Maus gezeigt werden konnte (Roderburg et al. 2010).

Bislang sind nur direkte Signalwege von TGF- $\beta$  bekannt, über welche die Kollagensynthese induziert wird. Diese beschränken sich bisweilen lediglich auf den molekularen Regulationsmechanismus der Col1A2 Genexpression. So konnte gezeigt werden, dass neben CTF/NF-1 (Alevizopoulos and Mermod 1996) auch über die Interaktion von Sp1 und SMAD3 mit der „TGF- $\beta$  responsive element“ (TbRE) Region am Col1A2 Promotor die Synthese von Col1A2 eingeleitet wird (Inagaki et al. 2001). Zusätzlich wurde gezeigt, dass die Col1A2 Expression auch durch eine TGF- $\beta$  bedingte Veränderung von regulatorischen Faktoren, welche die Fähigkeit besitzen, Histondeacetylasen-2 zu rekrutieren, eingeleitet werden kann (Fang et al. 2009). Die vorgelegte Studie weist erstmals auf einen indirekten Mechanismus hin, über den TGF- $\beta$  nicht nur die Col1A2 Expression, sondern auch die Col1A1, Col4A1 und Col4A5 Synthese durch eine Repression der miR-29 induziert.

Die antagonistische Wirkung von HGF zu TGF- $\beta$  kann dadurch erklärt werden, dass HGF die Synthese von miR-29, ein gemeinsames posttranskriptionelles Steuerungselement der Col1A1, Col1A2, Col4A1 und Col4A5 Transkription, in den HSC positiv beeinflussen kann. Eine weitere Erklärung für den Antagonismus zwischen HGF und TGF- $\beta$ , der auf einer entgegengesetzten Beeinflussung der R-SMADs beruht, wurde an renalen Fibroblasten vorgestellt (Yang et al. 2003). Die Synthese von ECM Proteinen erfolgt über eine TGF- $\beta$  vermittelte Aktivierung des SMAD Signalwegs (Dooley et al. 2001). Bei Yang et al. konnte jedoch gezeigt werden, dass das durch HGF aktivierte Erk1/2 die Akkumulation und Translokation des aktivierten SMAD2/3 in den Zellkern und somit gleichzeitig die ECM Synthese verhindert (Yang et al. 2003). Allerdings wurde von Schievenbusch et al. durch die Blockierung des SMAD Signalweges mittels RNA Interferenz dargestellt, dass nicht nur der inhibitorische Effekt von Erk1/2 auf die SMAD2/3, sondern auch der von HGF vermittelte Akt Signalweg involviert sein muss (Schievenbusch et al. 2009).

In dieser Arbeit wurde nicht nur der Einfluss der pro- und antifibrogen wirkenden Mediatoren PDGF-BB, TGF- $\beta$  und HGF auf die miR-29 Synthese gezeigt, sondern ebenfalls belegt, dass miR-29 selbst die Synthese von fibrogenen Mediatoren regulieren kann. Neben den bisher beschriebenen ECM Zieltranskripten wurden während der *in silico* Analyse die Gene PDGF-B, PDGF-C, PDGF-RI, IGF-I und VEGF-A, denen eine profibrogene Funktion durch die Beteiligung an der Aktivierung von HSC zugestanden wird, als Zieltranskripte der miR-29 ermittelt.

Durch die funktionellen Reporteranalysen konnte eine Bindungsaktivität der miR-29 an die Bindungsregion aus der 3'-UTR von PDGF-C, IGF-I und VEGF-A bestätigt werden. Der Nachweis der negativ regulatorischen Funktion der miR-29a auf die Expression von PDGF-C

und IGF-I wurde in *in vitro* Versuchen an HSC sowohl auf Transkript- als auch auf Proteinebene verifiziert. Diese neuen Zieltranskripte der miR-29 stellen starke profibrogene Mediatoren der Leberfibrogenese dar.

Auf Grund der Synthese von IGF-I durch Hepatozyten, aber auch durch HSC (Pinzani et al. 1990; Scharf et al. 1998) und Kupffer Zellen (Zindy et al. 1992) nimmt die Leber eine zentrale Rolle in der Homöostase von IGF ein (Baruch 2000). Da jedoch bei den Hepatozyten kein IGF-I Rezeptoraufkommen detektiert wird (Caro et al. 1988; Hartmann et al. 1990), übt IGF hauptsächlich einen Effekt auf HSC (Zindy et al. 1992; Scharf et al. 1998) und Kupfferzellen (Zindy et al. 1992) aus. *In vitro* Analysen konnten belegen, dass IGF-I die Proliferation von HSC und eine vermehrte Akkumulation der Kollagene fördert (Gentilini et al. 1998; Scharf et al. 1998; Svegliati-Baroni et al. 1999; Gentilini et al. 2000).

Das weitere funktionelle Transkriptgen PDGF-C zeichnet sich durch die verstärkte Synthese in myofibroblastischen HSC aus (Breitkopf et al. 2005). PDGF konnte während der Leberzirrhose durch eine vermehrte hepatische Expression und durch höhere, zirkulierende PDGF Spiegel als profibrogener Mediator klassifiziert werden (Pinzani et al. 1996; Zhang et al. 2003). Auch im transgenen Mausmodell wurden histomorphologische Veränderungen der Leber auf Grund der hepatischen Überexpression von PDGF-C beobachtet, die sich als Steatose äußerte, über die Steatohepatitis zur Fibrose ausbildete und letztendlich im HCC mündete (Campbell et al. 2005). Somit könnte der im HCC beobachtete miR-29 Verlust (Varnholt et al. 2008; Su et al. 2009; Ura et al. 2009) das erhöhte PDGF- und IGF-Aufkommen, als eine direkte Konsequenz der miRNA Deregulierung, erklären.

Somit beschränkt sich die Rolle der miR-29 während der Leberfibrose nicht nur auf die direkte Förderung der extrazellulären Matrixdeposition durch eine fehlende Repressorwirkung auf die Kollagentranskripte, sondern begünstigt auch indirekt durch mangelnde Inhibierung der PDGF-C und IGF-I Transkripte die fibrogenen Prozesse.

### 4.3 Konstruktion einer adenoviralen miR-29a Expressionskassette unter Kontrolle des $\alpha$ -SMA Promotors zur zelltypspezifischen Reduktion profibrogenen Faktoren

Der Verlust von miR-29a während der Differenzierung von HSC ist auf Grund ihres inhibierenden Einflusses auf die Kollagensynthese und die Produktion der fibrogenen Faktoren PDGF-C und IGF-I entscheidend für den Verlauf der Leberfibrogenese. Um den antifibrotischen Effekt von miR-29 zukünftig *in vivo* zu untersuchen, wurde ein Vektor kreiert, mit dem gezielt der Verlust der miR-29a Expression in HSC kompensiert werden kann. Da myofibroblastische HSC sich durch die Expression des Zytoskelettproteins *alpha-Smooth-Muscle-Actin* ( $\alpha$ -SMA) auszeichnen, wurde in dieser Dissertation der 5'-Genbereich des  $\alpha$ -SMA Gens zur gezielten miR-29a Expressionssteuerung ausgewählt.

Dieser 700bp lange Promotorabschnitt war bereits in der Vergangenheit erfolgreich von Odenthal und Jung *in vitro* in den verschiedenen  $\alpha$ -SMA-bildenden Zellen und *in vivo* gezielt in Myofibroblasten aktiviert worden und konnte dahinter geschaltete Gene regulieren (Odenthal and Jung 2000). Neben den aktivierenden Elementen besteht der  $\alpha$ -SMA-Promotorabschnitt auch aus inhibierenden Elementen (Carroll et al. 1988; Grayson et al. 1995; Jung et al. 1999). Da jedoch Untersuchungen an transgenen Reportermausen zeigen konnten, dass für eine Expression von  $\alpha$ -SMA *in vivo* ein weiteres CArG-Box Element aus dem ersten Intron benötigt wird (Mack and Owens 1999; Odenthal and Jung 2000), musste eine zusätzliche CArG-Box integriert werden. Das fehlende CArG-Box Element wurde in dieser Arbeit durch ein  $\beta$ -Actin-Intron ersetzt, da in früheren Arbeiten demonstriert werden konnte, dass auch ein genfremdes, CArG-haltiges Intron zur vollen *in vivo*-Promotorfunktion beiträgt (Odenthal and Jung 2000; Khimji 2004; Hirschfeld et al. 2009).

In der vorliegenden Arbeit konnte auf eigene Klonierungsvorarbeiten aus dem Labor Odenthal (Univeristätsklinikum Köln) zurückgegriffen (Kwiecinski 2007; Hirschfeld et al. 2009) und der  $\alpha$ -SMA -Promotor, in Verbindung mit den Transkriptionsverstärkern  $\beta$ -Aktin und  $\beta$ -Globin, für die Steuerung der miR-29 Expressionskassette verwendet werden. Der Expressionsvektor pMIRNA-full-SMA-29a, mit der Vorläufer-miRNA-Sequenz von miR-29a, wies starke Übertragungskomplikationen in die HSC mittels Transfektion auf. Dies könnte auf eine verstärkte Produktion von ECM Proteinen zurückgeführt werden, da auch bei Weiskirchen et al. diesbezüglich gezeigt wurde, dass die bindegewebsartige Abschirmung der HSC durch ECM Proteine als mechanische Barriere für das Transfektionsreagenz fungiert (Weiskirchen et al. 2000). Dieses Phänomen wurde in der Literatur auch bei primären und

differenzierten HSC beschrieben, die einen sehr geringen Transfektionserfolg aufwiesen (Weiskirchen et al. 2000; Nicholson et al. 2005).

In dieser Dissertation wurde für die Übertragung des DNA-Konstruktes, auf Grund seiner weitreichenden Etablierung in Zellkulturansätzen und der unkomplizierten Erstellung, das Adenovirus verwendet. Zusätzlich hat das adenovirale System die Fähigkeit, große Fremdgene zu initiieren und den Vorteil sowohl ruhende als auch sich teilende Zellen zu transduzieren, wodurch eine effektivere Transfektionsrate erreicht werden kann (Kozarsky and Wilson 1993; Ragot et al. 1997; Alemany et al. 1999).

Bedingt durch den Hepatropismus der Adenoviren (Kozarsky et al. 1994) konnte erst nach Ermittlung der optimalen Transduktionsdosis die Transkriptmenge von miR-29a festgestellt werden. Lediglich bei den  $\alpha$ -SMA positiven Zelllinien A10, Pav-1 und HSC-T6, nicht jedoch in HUH-7 bzw. bei Verwendung des Kontrollvirus war ein vermehrtes miR-29a Transkriptaufkommen detektierbar. In dieser Arbeit konnte somit ein Virus konstruiert werden, der durch die miR-29a Expressionskassette die Inhibierung der Translation von Kollagenen und profibrogenen Mediatoren einleiten könnte.

He et al. konnte ebenfalls *in vitro* zeigen, dass durch Verwendung eines adenoviralen Systems, bei dem über den ubiquitär aktiven CMV Promotor die Vorläufer-miRNA-Sequenz exprimiert wird, eine Überexpression der miR-29 erreicht werden kann (He et al. 2007). Von Krützfeldt et al. wurde ebenfalls gezeigt, dass eine erfolgreiche *in vivo* Infektion unter Verwendung von miRNA exprimierenden Adenoviren möglich ist (Krützfeldt et al. 2005).

Obwohl das adenovirale System für die *in vitro* Veranschaulichung der Funktionsfähigkeit der in dieser Arbeit etablierten, zelltypspezifischen miR-29a Expressionskassette am besten geeignet war, ist das Adenovirus durch seinen Tropismus zu Hepatozyten nur unzureichend für *in vivo* Studien geeignet. Jedoch könnte durch die Verwendung eines Fusionsproteins die Transfektionseffizienz von Myofibroblasten-ähnlichen HSC durch den adenoviralen Typ 5 (Ad5) Virus deutlich verbessert werden. In der Arbeit von Schoemaker et al. wurde ein solches Fusionsprotein durch die Kombination eines Einzelketten-Antikörper-Fragmentes, das Ad5 Fadenknöpfe erkennt und diese bindet, mit einem PDGF-Rezeptor- $\beta$  spezifischen Protein konstruiert. Da aktive HSC vermehrt PDGF- $\beta$  Rezeptoren synthetisieren, konnte eine spezifische *in vitro* Transduzierung induziert und zeitgleich ein drastisch reduzierter, adenoviral vermittelter Gentransfer in Hepatozyten beobachtet werden (Schoemaker et al. 2008).

#### 4.4 Das Auftreten extrazellulärer miR-29 während der Fibrogenese

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Stimulierungen von HSC mit PDGF-BB und TGF- $\beta$  eine vermehrte Vesikelbildung nach sich ziehen. Die darauffolgenden *in vitro* Versuche belegten, dass nach Stimulierung von HSC mit PDGF-BB und TGF- $\beta$  der zelluläre miR-29a Verlust ein verstärktes extrazelluläres miR-29a Aufkommen sowohl im Gesamtüberstand als auch in den isolierten Exosomen zufolge hatte. Diese Resultate sprechen für eine Sezernierung der miR-29 in Exosomen aus den HSC, hervorgerufen durch die Transdifferenzierung von HSC zu Myofibroblasten-ähnlichen Zellen bzw. Stimulierung von HSC mit profibrogenen Mediatoren. Obwohl nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Transkripterniedrigung von miR-29a in der Zelle nicht auch durch Abbauprozesse verursacht wird, muss parallel dazu ein Abtransport aus der Zelle erfolgen, der das extrazelluläre Auftreten erklärt.

Ein extrazelluläres Auftreten von miRNAs konnte von Mitchell et al. beobachtet werden, der im Blutkreislauf von Patienten mit Prostatakrebs vermehrt miR-141 vorfand (Mitchell et al. 2008). Einige weitere Publikationen berichten ebenfalls von zirkulierenden miRNAs die in Exosomen-ähnlichen Vesikeln, vor dem Abbau durch Endonukleasen geschützt, vorliegen (Gibbins et al. 2009) und über Exosomentransport andere Zellen beeinflussen können (Skog et al. 2008; Zomer et al. 2010).

Bei der Überprüfung des miR-29a Gehaltes in 85 Gewebe- und 56 Serumproben von HCV-Patienten konnte festgestellt werden, dass der Gehalt im Gewebe abhängig vom Grad der Fibrose eine signifikante Reduktion erfährt, währenddessen in den Serumproben ein signifikanter Anstieg mit zunehmendem Fibrosegrad zu beobachten ist (persönliche Mitteilung von N. Elfimova, Institut für Pathologie der Universitätsklinik zu Köln).

Der erhöhte miR-29a Gehalt könnte auch auf einen Untergang der HSC und dadurch bedingte Freisetzung der miRNAs in den Blutkreislauf hindeuten, dagegen spricht jedoch, dass aktive HSC zur vermehrten Proliferation neigen und die Hauptkollagenproduzenten darstellen. Somit würde der Untergang der HSC nicht nur einen höheren extrazellulären Gehalt an miR-29a bewirken, sondern auch eine verminderte Kollagenexpression nach sich ziehen und die Fibrogenese inhibieren. Zusätzlich müsste auch der Gehalt aller anderen miRNAs im Serum oder Überstand ansteigen, was nicht der Fall ist (verschiedene miRNAs überprüft, Daten nicht dargestellt).

In einer Arbeit von Wang et al. wurde ein erniedrigter miR-29a sowie miR-29b Gehalt in Gewebeproben aus der Leber von Mäusen nach akuter Acetaminophen Leberintoxikation detektiert. Demgegenüber zeigten die Plasmaproben dieser Mäuse einen gegenteiligen Effekt.

Durch den Vergleich der miR-29a Werte mit den Aminotransferase Werten wurde ausgeschlossen, dass das vermehrte miR-29a Aufkommen auf einen Untergang der Zellen zurückzuführen ist. So konnte auch an einem akuten Hepatitismodell belegt werden, dass der veränderte miRNA Serumgehalt nicht zwangsläufig durch eine Zerstörung der Zellen hervorgerufen werden muss (Wang et al. 2009).

Die Entdeckung der signifikant erhöhten miR-29a Konzentration, die im Serum von chronischen HCV Patienten auftritt, lässt der miR-29a eine zusätzliche Rolle als möglicher Indikator und nicht-invasiver Biomarker für chronische Lebererkrankungen zukommen. Erkrankungen wie die Leberfibrose aber auch der primäre Leberkrebs resultieren häufig in der Notwendigkeit einer invasiven Behandlungsmethode, da deren Symptomatik relativ spät und vor allem sehr unspezifisch auftritt. Nicht-invasive Marker sind ein wichtiges Hilfsmittel, Erkrankungen früher festzustellen und dadurch sowohl eine zeitigere Behandlung als auch eine bessere Prognose zu ermöglichen. Die Identifizierung von mircoRNAs im Blutserum stellt somit eine neue Möglichkeit dar, bessere und schneller detektierbare Marker für humane Erkrankungen zu finden. Auf Grund des Vorkommens von miRNAs in Serum und Plasma kann diesbezüglich ein neuer Forschungsbereich im Hinblick auf die Funktion der miRNAs geschaffen werden.

#### **4.5 Funktionsschema der miR-29a während der Leberfibrogenese**

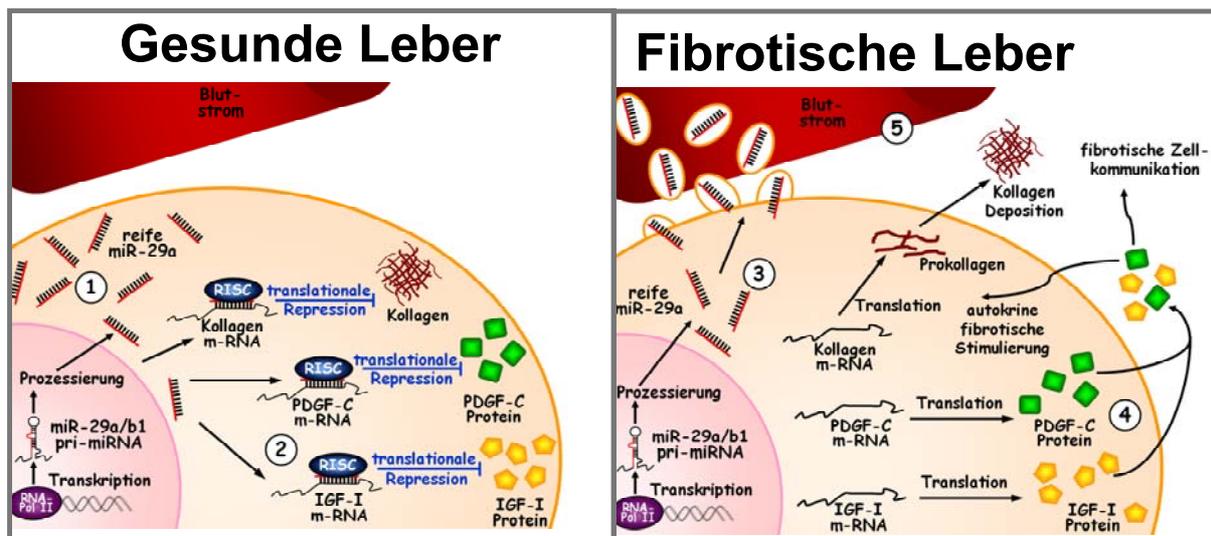
Im Zuge der Dissertation konnte die miR-29a als eine miRNA identifiziert werden, welche in die Prävention der Leberfibrose involviert ist (s. Abb. 33).

Da in der gesunden Leber eine geregelte miR-29a Synthese vorliegt (s. Abb. 33 (1)), ist eine Regulierung der Kollagen- sowie PDGF-C und IGF-I Synthese innerhalb der Zelle möglich (s. Abb. 33 (2)). Durch eine Noxen bedingte Schädigung der Leberzellen kommt es bei einer beginnenden Fibrose zu einer vermehrten Produktion von fibrogenen Mediatoren wie dem TGF- $\beta$  und dem PDGF-BB. Diese führen durch die Stimulierung und Aktivierung von HSC zu einer Syntheserepression (s. Abb. 33 (3)) und womöglich zu einem gezielten Ausschleusen der miR-29a in den Blutstrom (s. Abb. 33 (5)).

Da miR-29a seine Funktion als negativer Kollagenregulator nicht mehr ausüben kann, wird eine vermehrte Kollagensynthese durch die HSC begünstigt (s. Abb. 33 (4)). Ebenfalls führt das verminderte miR-29a Aufkommen zur vermehrten Expression von PDGF-C und IGF-I,

zwei Mediatoren, die ihrerseits fibrotische Prozesse einleiten, aufrechterhalten und verstärken können (s. Abb. 33 (4)).

Somit stellt die miR-29a eine wichtige Komponente für die Initiierung und Aufrechterhaltung der Leberfibrogenese dar. Die Tragweite der Daten dieser Dissertation liegt nicht nur in der Ermittlung einer miRNA, die während der Fibrogenese in HSC dereguliert vorliegt, und der Verifizierung ihrer durch Algorithmen vorhergesagten Zieltranskripte, sondern vielmehr im Beginn des Verständnisses und der Rolle der miR-29 im Prozess der Leberfibrogenese.



**Abbildung 33 : Schematische Darstellung der miR-29a Rollen während der Leberfibrogenese.**

Der hohe Expressionsgehalt von miR-29a (1) in ruhenden hepatischen Sternzellen trägt zu einem Gleichgewicht der PDGF-C, IGF-I und Kollagensynthese bei (2). Während der Leberfibrogenese kommt es u.a. durch profibrogene Mediatoren zur Transdifferenzierung von HSC zu aktiven, myofibroblastischen Zellen. Diese Zellen weisen einen erniedrigten miR-29a Gehalt auf, der durch eine erniedrigte Synthese sowie durch ein Ausschleusen der miR-29a in den Blutstrom gekennzeichnet ist (3). Die erniedrigte Menge des Repressors miR-29a trägt zur vermehrten Synthese von Kollagen, PDGF-C und IGF-I bei (4). miR = miRNA, pri-miRNA = primäre miRNA, RISC = RNA-induced silencing complex, IGF-I = insulinähnlicher Wachstumsfaktor I, PDGF-C = *platelet-derived growth factor-C*, VEGF-A = *vascular endothelial growth factor-A*.

## 5 Literaturverzeichnis

- Aleman, R., C. Gomez-Manzano, et al. (1999). "Gene therapy for gliomas: molecular targets, adenoviral vectors, and oncolytic adenoviruses." *Exp Cell Res* **252**(1): 1-12.
- Alevizopoulos, A. and N. Mermod (1996). "Antagonistic regulation of a proline-rich transcription factor by transforming growth factor beta and tumor necrosis factor alpha." *J Biol Chem* **271**(47): 29672-81.
- Alpers, C. E., K. L. Hudkins, et al. (1992). "Enhanced expression of "muscle-specific" actin in glomerulonephritis." *Kidney Int* **41**(5): 1134-42.
- Ambros, V. (2003). "MicroRNA pathways in flies and worms: growth, death, fat, stress, and timing." *Cell* **113**(6): 673-6.
- Arthur, M. J., A. Stanley, et al. (1992). "Secretion of 72 kDa type IV collagenase/gelatinase by cultured human lipocytes. Analysis of gene expression, protein synthesis and proteinase activity." *Biochem J* **287** ( Pt 3): 701-7.
- Aterman, K. (1986). "The parasinusoidal cells of the liver: a historical account." *Histochem J* **18**(6): 279-305.
- Bachem, M. G., D. Meyer, et al. (1992). "Activation of rat liver perisinusoidal lipocytes by transforming growth factors derived from myofibroblastlike cells. A potential mechanism of self perpetuation in liver fibrogenesis." *J Clin Invest* **89**(1): 19-27.
- Bai, S., M. W. Nasser, et al. (2009). "MicroRNA-122 inhibits tumorigenic properties of hepatocellular carcinoma cells and sensitizes these cells to sorafenib." *J Biol Chem* **284**(46): 32015-27.
- Bartel, D. P. (2009). "MicroRNAs: target recognition and regulatory functions." *Cell* **136**(2): 215-33.
- Baruch, Y. (2000). "The liver: a large endocrine gland." *J Hepatol* **32**(3): 505-7.
- Beilmann, M., M. Odenthal, et al. (1997). "Neoexpression of the c-met/hepatocyte growth factor-scatter factor receptor gene in activated monocytes." *Blood* **90**(11): 4450-8.
- Bernstein, E., A. A. Caudy, et al. (2001). "Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference." *Nature* **409**(6818): 363-6.
- Blobe, G. C., W. P. Schieman, et al. (2000). "Role of transforming growth factor beta in human disease." *N Engl J Med* **342**(18): 1350-8.
- Bottaro, D. P., J. S. Rubin, et al. (1991). "Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product." *Science* **251**(4995): 802-4.
- Breitkopf, K., C. Roeyen, et al. (2005). "Expression patterns of PDGF-A, -B, -C and -D and the PDGF-receptors alpha and beta in activated rat hepatic stellate cells (HSC)." *Cytokine* **31**(5): 349-57.
- Brennecke, J. and S. M. Cohen (2003). "Towards a complete description of the microRNA complement of animal genomes." *Genome Biol* **4**(9): 228.
- Brenner, D. A., L. Veloz, et al. (1993). "Stimulation of the collagen alpha 1 (I) endogenous gene and transgene in carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis." *Hepatology* **17**(2): 287-92.
- Calin, G. A., Y. Pekarsky, et al. (2007). "The role of microRNA and other non-coding RNA in the pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia." *Best Pract Res Clin Haematol* **20**(3): 425-37.
- Calin, G. A., C. Sevignani, et al. (2004). "Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(9): 2999-3004.
- Campbell, J. S., S. D. Hughes, et al. (2005). "Platelet-derived growth factor C induces liver fibrosis, steatosis, and hepatocellular carcinoma." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(9): 3389-94.
- Caro, J. F., J. Poulos, et al. (1988). "Insulin-like growth factor I binding in hepatocytes from human liver, human hepatoma, and normal, regenerating, and fetal rat liver." *J Clin Invest* **81**(4): 976-81.
- Carr, B. I., I. Hayashi, et al. (1986). "Inhibition of DNA synthesis in rat hepatocytes by platelet-derived type beta transforming growth factor." *Cancer Res* **46**(5): 2330-4.
- Carroll, S. L., D. J. Bergsma, et al. (1988). "A 29-nucleotide DNA segment containing an evolutionarily conserved motif is required in cis for cell-type-restricted repression of the chicken alpha-smooth muscle actin gene core promoter." *Mol Cell Biol* **8**(1): 241-50.
- Castilla, A., J. Prieto, et al. (1991). "Transforming growth factors beta 1 and alpha in chronic liver disease. Effects of interferon alfa therapy." *N Engl J Med* **324**(14): 933-40.
- Chaponnier, C. and G. Gabbiani (2004). "Pathological situations characterized by altered actin isoform expression." *J Pathol* **204**(4): 386-95.
- Cheifetz, S., T. Bellon, et al. (1992). "Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells." *J Biol Chem* **267**(27): 19027-30.
- Chen, F. and R. A. Weinberg (1995). "Biochemical evidence for the autophosphorylation and transphosphorylation of transforming growth factor beta receptor kinases." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(5): 1565-9.
- Cimmino, A., G. A. Calin, et al. (2005). "miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(39): 13944-9.

- Comoglio, P. M. and C. Boccaccio (1996). "The HGF receptor family: unconventional signal transducers for invasive cell growth." *Genes Cells* **1**(4): 347-54.
- Creighton, C. J., A. K. Nagaraja, et al. (2008). "A bioinformatics tool for linking gene expression profiling results with public databases of microRNA target predictions." *Rna* **14**(11): 2290-6.
- Cullen, B. R. (2004). "Transcription and processing of human microRNA precursors." *Mol Cell* **16**(6): 861-5.
- Czaja, M. J., F. R. Weiner, et al. (1989). "In vitro and in vivo association of transforming growth factor-beta 1 with hepatic fibrosis." *J Cell Biol* **108**(6): 2477-82.
- Dai, C. and Y. Liu (2004). "Hepatocyte growth factor antagonizes the profibrotic action of TGF-beta1 in mesangial cells by stabilizing Smad transcriptional corepressor TGIF." *J Am Soc Nephrol* **15**(6): 1402-12.
- Davis, B. N., A. C. Hilyard, et al. (2008). "SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation." *Nature* **454**(7200): 56-61.
- Doench, J. G. and P. A. Sharp (2004). "Specificity of microRNA target selection in translational repression." *Genes Dev* **18**(5): 504-11.
- Dooley, S., B. Delvoux, et al. (2001). "Transforming growth factor beta signal transduction in hepatic stellate cells via Smad2/3 phosphorylation, a pathway that is abrogated during in vitro progression to myofibroblasts. TGFbeta signal transduction during transdifferentiation of hepatic stellate cells." *FEBS Lett* **502**(1-2): 4-10.
- Edwards, D. R., G. Murphy, et al. (1987). "Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor." *Embo J* **6**(7): 1899-904.
- Eyholzer, M., S. Schmid, et al. (2010). "The tumour-suppressive miR-29a/b1 cluster is regulated by CEBPA and blocked in human AML." *Br J Cancer* **103**(2): 275-84.
- Fabbri, M., R. Garzon, et al. (2007). "MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(40): 15805-10.
- Fang, M., X. Kong, et al. (2009). "RFXB and its splice variant RFXBSV mediate the antagonism between IFNgamma and TGFbeta on COL1A2 transcription in vascular smooth muscle cells." *Nucleic Acids Res* **37**(13): 4393-406.
- Filipowicz, W., S. N. Bhattacharyya, et al. (2008). "Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?" *Nat Rev Genet* **9**(2): 102-14.
- Fornari, F., L. Gramantieri, et al. (2009). "MiR-122/cyclin G1 interaction modulates p53 activity and affects doxorubicin sensitivity of human hepatocarcinoma cells." *Cancer Res* **69**(14): 5761-7.
- Friedman, S. L. (1990). "Cellular sources of collagen and regulation of collagen production in liver." *Semin Liver Dis* **10**(1): 20-9.
- Friedman, S. L. (1993). "Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies." *N Engl J Med* **328**(25): 1828-35.
- Friedman, S. L. (1999). "Cytokines and fibrogenesis." *Semin Liver Dis* **19**(2): 129-40.
- Friedman, S. L. (2000). "Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury." *J Biol Chem* **275**(4): 2247-50.
- Friedman, S. L. and M. J. Arthur (1989). "Activation of cultured rat hepatic lipocytes by Kupffer cell conditioned medium. Direct enhancement of matrix synthesis and stimulation of cell proliferation via induction of platelet-derived growth factor receptors." *J Clin Invest* **84**(6): 1780-5.
- Friedman, S. L., F. J. Roll, et al. (1989). "Maintenance of differentiated phenotype of cultured rat hepatic lipocytes by basement membrane matrix." *J Biol Chem* **264**(18): 10756-62.
- Garzon, R., C. E. Heaphy, et al. (2009). "MicroRNA 29b functions in acute myeloid leukemia." *Blood* **114**(26): 5331-41.
- Gentilini, A., D. Feliers, et al. (1998). "Characterization and regulation of insulin-like growth factor binding proteins in human hepatic stellate cells." *J Cell Physiol* **174**(2): 240-50.
- Gentilini, A., F. Marra, et al. (2000). "Phosphatidylinositol-3 kinase and extracellular signal-regulated kinase mediate the chemotactic and mitogenic effects of insulin-like growth factor-I in human hepatic stellate cells." *J Hepatol* **32**(2): 227-34.
- Gentry, L. E., M. N. Lioubin, et al. (1988). "Molecular events in the processing of recombinant type 1 pre-pro-transforming growth factor beta to the mature polypeptide." *Mol Cell Biol* **8**(10): 4162-8.
- Gherardi, E. and M. Stoker (1991). "Hepatocyte growth factor--scatter factor: mitogen, motogen, and met." *Cancer Cells* **3**(6): 227-32.
- Gibbins, D. J., C. Ciaudo, et al. (2009). "Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity." *Nat Cell Biol* **11**(9): 1143-9.
- Gibson, T. R., A. D. Zyskind, et al. (1988). "Characterization of solubilized atrial natriuretic peptide receptors from rat olfactory bulb and A10 cultured smooth muscle cells." *J Neurosci* **8**(8): 3067-73.
- Giltsbach, R., M. Kouta, et al. (2006). "Comparison of in vitro and in vivo reference genes for internal standardization of real-time PCR data." *Biotechniques* **40**(2): 173-7.
- Gong, W., S. Roth, et al. (1998). "Isoforms and splice variant of transforming growth factor beta-binding protein in rat hepatic stellate cells." *Gastroenterology* **114**(2): 352-63.

- Govinden, R. and K. D. Bhoola (2003). "Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor-beta." *Pharmacol Ther* **98**(2): 257-65.
- Graham, F. L., J. Smiley, et al. (1977). "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5." *J Gen Virol* **36**(1): 59-74.
- Gramantieri, L., M. Ferracin, et al. (2007). "Cyclin G1 is a target of miR-122a, a microRNA frequently down-regulated in human hepatocellular carcinoma." *Cancer Res* **67**(13): 6092-9.
- Grayson, J., R. S. Williams, et al. (1995). "Synergistic interactions between heterologous upstream activation elements and specific TATA sequences in a muscle-specific promoter." *Mol Cell Biol* **15**(4): 1870-8.
- Graziani, A., D. Gramaglia, et al. (1993). "Hepatocyte growth factor/scatter factor stimulates the Ras-guanine nucleotide exchanger." *J Biol Chem* **268**(13): 9165-8.
- Gressner, A. M. (1991). "Liver fibrosis: perspectives in pathobiochemical research and clinical outlook." *Eur J Clin Chem Clin Biochem* **29**(5): 293-311.
- Gressner, A. M. (1992). "Hepatic fibrogenesis: the puzzle of interacting cells, fibrogenic cytokines, regulatory loops, and extracellular matrix molecules." *Z Gastroenterol* **30 Suppl 1**: 5-16.
- Gressner, A. M. (1996). "Transdifferentiation of hepatic stellate cells (Ito cells) to myofibroblasts: a key event in hepatic fibrogenesis." *Kidney Int Suppl* **54**: S39-45.
- Gressner, A. M. and M. G. Bachem (1990). "Cellular sources of noncollagenous matrix proteins: role of fat-storing cells in fibrogenesis." *Semin Liver Dis* **10**(1): 30-46.
- Gressner, A. M. and M. G. Bachem (1995). "Molecular mechanisms of liver fibrogenesis--a homage to the role of activated fat-storing cells." *Digestion* **56**(5): 335-46.
- Gressner, A. M. and R. Weiskirchen (2006). "Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets." *J Cell Mol Med* **10**(1): 76-99.
- Gressner, A. M., R. Weiskirchen, et al. (2002). "Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis." *Front Biosci* **7**: d793-807.
- Gressner, A. M. and O. Zerbe (1987). "Kupffer cell-mediated induction of synthesis and secretion of proteoglycans by rat liver fat-storing cells in culture." *J Hepatol* **5**(3): 299-310.
- Guo, C. J., Q. Pan, et al. (2009). "Changes in microRNAs associated with hepatic stellate cell activation status identify signaling pathways." *Febs J* **276**(18): 5163-76.
- Hartmann, H., F. Schmitz, et al. (1990). "Metabolic actions of insulin-like growth factor-I in cultured hepatocytes from adult rats." *Hepatology* **12**(5): 1139-43.
- He, A., L. Zhu, et al. (2007). "Overexpression of micro ribonucleic acid 29, highly up-regulated in diabetic rats, leads to insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes." *Mol Endocrinol* **21**(11): 2785-94.
- Heldin, C. H., K. Miyazono, et al. (1997). "TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins." *Nature* **390**(6659): 465-71.
- Hirschfeld, J., J. Maurer, et al. (2009). "Targeting myofibroblasts in model systems of fibrosis by an artificial alpha-smooth muscle-actin promoter hybrid." *Mol Biotechnol* **43**(2): 121-9.
- Hyytiainen, M., J. Taipale, et al. (1998). "Recombinant latent transforming growth factor beta-binding protein 2 assembles to fibroblast extracellular matrix and is susceptible to proteolytic processing and release." *J Biol Chem* **273**(32): 20669-76.
- Ignotz, R. A. (1991). "TGF-beta and extracellular matrix related influences on gene expression and phenotype." *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **1**(2): 75-84.
- Ignotz, R. A. and J. Massague (1986). "Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix." *J Biol Chem* **261**(9): 4337-45.
- Ikeda, H., S. Nagoshi, et al. (1998). "Activated rat stellate cells express c-met and respond to hepatocyte growth factor to enhance transforming growth factor beta1 expression and DNA synthesis." *Biochem Biophys Res Commun* **250**(3): 769-75.
- Inagaki, Y., T. Nemoto, et al. (2001). "Interaction between GC box binding factors and Smad proteins modulates cell lineage-specific alpha 2(I) collagen gene transcription." *J Biol Chem* **276**(19): 16573-9.
- Iorio, M. V., M. Ferracin, et al. (2005). "MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer." *Cancer Res* **65**(16): 7065-70.
- Iredale, J. P., G. Murphy, et al. (1992). "Human hepatic lipocytes synthesize tissue inhibitor of metalloproteinases-1. Implications for regulation of matrix degradation in liver." *J Clin Invest* **90**(1): 282-7.
- Ji, J., J. Zhang, et al. (2009). "Over-expressed microRNA-27a and 27b influence fat accumulation and cell proliferation during rat hepatic stellate cell activation." *FEBS Lett* **583**(4): 759-66.
- John, B., A. J. Enright, et al. (2004). "Human MicroRNA targets." *PLoS Biol* **2**(11): e363.
- Johnson, R. J., H. Iida, et al. (1991). "Expression of smooth muscle cell phenotype by rat mesangial cells in immune complex nephritis. Alpha-smooth muscle actin is a marker of mesangial cell proliferation." *J Clin Invest* **87**(3): 847-58.
- Johnson, S. M., H. Grosshans, et al. (2005). "RAS is regulated by the let-7 microRNA family." *Cell* **120**(5): 635-47.

- Jonsson, J. R., A. D. Clouston, et al. (2001). "Angiotensin-converting enzyme inhibition attenuates the progression of rat hepatic fibrosis." Gastroenterology **121**(1): 148-55.
- Jung, D., Dienes HP, et al. (1999). "Transcriptional regulation of the alpha-smooth muscle actin gene in hepatic stellate cells and in smooth muscle cells." J. of Hepatology **30**(89).
- Kapanci, Y., A. M. Kurt, et al. (1997). "Phenotypic modulation of alveolar myofibroblasts in transplanted human lungs." Mod Pathol **10**(11): 1134-42.
- Kerr, L. D., N. E. Olashaw, et al. (1988). "Transforming growth factor beta 1 and cAMP inhibit transcription of epidermal growth factor- and oncogene-induced transin RNA." J Biol Chem **263**(32): 16999-7005.
- Khimji, S. (2004). "In vivo-Untersuchungen zur transkriptionellen Regulation durch den Promoter des Smooth Muscle alpha-Aktin-Gens." Promotionsarbeit: 1-107.
- Kinoshita, K., Y. Iimuro, et al. (2007). "Adenovirus-mediated expression of BMP-7 suppresses the development of liver fibrosis in rats." Gut **56**(5): 706-14.
- Kmieciak, T. E., J. R. Keller, et al. (1992). "Hepatocyte growth factor is a synergistic factor for the growth of hematopoietic progenitor cells." Blood **80**(10): 2454-7.
- Kozarsky, K. F., D. R. McKinley, et al. (1994). "In vivo correction of low density lipoprotein receptor deficiency in the Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit with recombinant adenoviruses." J Biol Chem **269**(18): 13695-702.
- Kozarsky, K. F. and J. M. Wilson (1993). "Gene therapy: adenovirus vectors." Curr Opin Genet Dev **3**(3): 499-503.
- Krek, A., D. Grun, et al. (2005). "Combinatorial microRNA target predictions." Nat Genet **37**(5): 495-500.
- Kretschmar, M. and J. Massague (1998). "SMADs: mediators and regulators of TGF-beta signaling." Curr Opin Genet Dev **8**(1): 103-11.
- Krutzfeldt, J., N. Rajewsky, et al. (2005). "Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'." Nature **438**(7068): 685-9.
- Kwiecinski, M. (2007). "Etablierung eines Vektorsystems zur konditionellen RNA Interferenz in hepatischen Myofibroblasten."
- Lagos-Quintana, M., R. Rauhut, et al. (2001). "Identification of novel genes coding for small expressed RNAs." Science **294**(5543): 853-8.
- Laiho, M., O. Saksela, et al. (1986). "Enhanced production and extracellular deposition of the endothelial-type plasminogen activator inhibitor in cultured human lung fibroblasts by transforming growth factor-beta." J Cell Biol **103**(6 Pt 1): 2403-10.
- Lau, N. C., L. P. Lim, et al. (2001). "An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*." Science **294**(5543): 858-62.
- Lee, R. C. and V. Ambros (2001). "An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*." Science **294**(5543): 862-4.
- Lee, R. C., R. L. Feinbaum, et al. (1993). "The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*." Cell **75**(5): 843-54.
- Lee, Y., C. Ahn, et al. (2003). "The nuclear RNase III *Drosha* initiates microRNA processing." Nature **425**(6956): 415-9.
- Leshem, Y., I. Gitelman, et al. (2002). "Preferential binding of Grb2 or phosphatidylinositol 3-kinase to the met receptor has opposite effects on HGF-induced myoblast proliferation." Exp Cell Res **274**(2): 288-98.
- Lewis, B. P., C. B. Burge, et al. (2005). "Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets." Cell **120**(1): 15-20.
- Leyland, H., J. Gentry, et al. (1996). "The plasminogen-activating system in hepatic stellate cells." Hepatology **24**(5): 1172-8.
- Li, Z., M. Q. Hassan, et al. (2009). "Biological functions of miR-29b contribute to positive regulation of osteoblast differentiation." J Biol Chem **284**(23): 15676-84.
- Liu, Y., N. E. Taylor, et al. (2010). "Renal medullary microRNAs in Dahl salt-sensitive rats: miR-29b regulates several collagens and related genes." Hypertension **55**(4): 974-82.
- Lopez-Casillas, F., J. L. Wrana, et al. (1993). "Betaglycan presents ligand to the TGF beta signaling receptor." Cell **73**(7): 1435-44.
- Mack, C. P. and G. K. Owens (1999). "Regulation of smooth muscle alpha-actin expression in vivo is dependent on CARG elements within the 5' and first intron promoter regions." Circ Res **84**(7): 852-61.
- MacPherson, B. R., K. O. Leslie, et al. (1993). "Contractile cells of the kidney in primary glomerular disorders: an immunohistochemical study using an anti-alpha-smooth muscle actin monoclonal antibody." Hum Pathol **24**(7): 710-6.
- Maniataki, E. and Z. Mourelatos (2005). "A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA." Genes Dev **19**(24): 2979-90.
- Maniatis, T., E. F. Fritsch, et al. (1982). "Purification of nucleic acids." Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, **1st Edition**: p. 458.

- Mann, J., D. C. Chu, et al. "MeCP2 controls an epigenetic pathway that promotes myofibroblast transdifferentiation and fibrosis." *Gastroenterology* **138**(2): 705-14, 714 e1-4.
- Marquez, R. T., E. Wendlandt, et al. (2010). "MicroRNA-21 is upregulated during the proliferative phase of liver regeneration, targets Pellino-1, and inhibits NF-kappaB signaling." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **298**(4): G535-41.
- Massague, J. (1990). "The transforming growth factor-beta family." *Annu Rev Cell Biol* **6**: 597-641.
- Massague, J. (1996). "TGFbeta signaling: receptors, transducers, and Mad proteins." *Cell* **85**(7): 947-50.
- Massague, J. (1998). "TGF-beta signal transduction." *Annu Rev Biochem* **67**: 753-91.
- Massague, J. (2000). "How cells read TGF-beta signals." *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**(3): 169-78.
- Massague, J. and Y. G. Chen (2000). "Controlling TGF-beta signaling." *Genes Dev* **14**(6): 627-44.
- Matsuda, Y., K. Matsumoto, et al. (1995). "Hepatocyte growth factor suppresses the onset of liver cirrhosis and abrogates lethal hepatic dysfunction in rats." *J Biochem* **118**(3): 643-9.
- Matsuda, Y., K. Matsumoto, et al. (1997). "Preventive and therapeutic effects in rats of hepatocyte growth factor infusion on liver fibrosis/cirrhosis." *Hepatology* **26**(1): 81-9.
- Matsumoto, K. and T. Nakamura (1996). "Emerging multipotent aspects of hepatocyte growth factor." *J Biochem* **119**(4): 591-600.
- Matsumoto, K., T. Nakamura, et al. (1994). "Hepatocyte growth factor/scatter factor induces tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase (p125FAK) and promotes migration and invasion by oral squamous cell carcinoma cells." *J Biol Chem* **269**(50): 31807-13.
- Milani, S., H. Herbst, et al. (1994). "Differential expression of matrix-metalloproteinase-1 and -2 genes in normal and fibrotic human liver." *Am J Pathol* **144**(3): 528-37.
- Mitchell, P. S., R. K. Parkin, et al. (2008). "Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(30): 10513-8.
- Miyazono, K. (1997). "TGF-beta receptors and signal transduction." *Int J Hematol* **65**(2): 97-104.
- Miyazono, K., S. Maeda, et al. (2005). "BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk." *Cytokine Growth Factor Rev* **16**(3): 251-63.
- Mizuno, K., O. Higuchi, et al. (1993). "Hepatocyte growth factor stimulates growth of hematopoietic progenitor cells." *Biochem Biophys Res Commun* **194**(1): 178-86.
- Mott, J. L., S. Kobayashi, et al. (2007). "mir-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis." *Oncogene* **26**(42): 6133-40.
- Mraz, M., S. Pospisilova, et al. (2009). "MicroRNAs in chronic lymphocytic leukemia pathogenesis and disease subtypes." *Leuk Lymphoma* **50**(3): 506-9.
- Murakami, Y., H. Toyoda, et al. (2011). "The Progression of Liver Fibrosis Is Related with Overexpression of the miR-199 and 200 Families." *PLoS One* **6**(1): e16081.
- Nakatsukasa, H., R. P. Everts, et al. (1990). "Transforming growth factor-beta 1 and type I procollagen transcripts during regeneration and early fibrosis of rat liver." *Lab Invest* **63**(2): 171-80.
- Nicholson, L. J., M. Philippe, et al. (2005). "RNA interference mediated in human primary cells via recombinant baculoviral vectors." *Mol Ther* **11**(4): 638-44.
- Nouchi, T., Y. Tanaka, et al. (1991). "Appearance of alpha-smooth-muscle-actin-positive cells in hepatic fibrosis." *Liver* **11**(2): 100-5.
- Numaguchi, S., M. Okuno, et al. (1994). "Modulation of collagen synthesis and degradation by retinoids and cytokines in 3T3 L1 preadipocytes." *Intern Med* **33**(6): 309-16.
- Obrig, T. G., W. J. Culp, et al. (1971). "The mechanism by which cycloheximide and related glutarimide antibiotics inhibit peptide synthesis on reticulocyte ribosomes." *J Biol Chem* **246**(1): 174-81.
- Odenthal, M. and D. Jung (2000). Gene expression, genome alteration and reporter expression in myofibroblasts and myofibroblast like cells. . *PCT Patent Application*: WO 02/04509: p. pp. 1-44.-44.
- Ogawa, T., M. Iizuka, et al. (2010). "Suppression of type I collagen production by microRNA-29b in cultured human stellate cells." *Biochem Biophys Res Commun* **391**(1): 316-21.
- Park, S. Y., J. H. Lee, et al. (2009). "miR-29 miRNAs activate p53 by targeting p85 alpha and CDC42." *Nat Struct Mol Biol* **16**(1): 23-9.
- Pasquinelli, A. E., B. J. Reinhart, et al. (2000). "Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA." *Nature* **408**(6808): 86-9.
- Pearson, C. A., D. Pearson, et al. (1988). "Tenascin: cDNA cloning and induction by TGF-beta." *Embo J* **7**(10): 2977-82.
- Pekarsky, Y., U. Santanam, et al. (2006). "Tcl1 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by miR-29 and miR-181." *Cancer Res* **66**(24): 11590-3.
- Pinzani, M., H. E. Abboud, et al. (1990). "Secretion of insulin-like growth factor-I and binding proteins by rat liver fat-storing cells: regulatory role of platelet-derived growth factor." *Endocrinology* **127**(5): 2343-9.
- Pinzani, M., A. Gentilini, et al. (1995). "Transforming growth factor-beta 1 regulates platelet-derived growth factor receptor beta subunit in human liver fat-storing cells." *Hepatology* **21**(1): 232-9.
- Pinzani, M. and F. Marra (2001). "Cytokine receptors and signaling in hepatic stellate cells." *Semin Liver Dis* **21**(3): 397-416.

- Pinzani, M., S. Milani, et al. (1996). "Expression of platelet-derived growth factor and its receptors in normal human liver and during active hepatic fibrogenesis." Am J Pathol **148**(3): 785-800.
- Ponzetto, C., A. Bardelli, et al. (1994). "A multifunctional docking site mediates signaling and transformation by the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor family." Cell **77**(2): 261-71.
- Porkka, K. P., M. J. Pfeiffer, et al. (2007). "MicroRNA expression profiling in prostate cancer." Cancer Res **67**(13): 6130-5.
- Ragot, T., P. Opolon, et al. (1997). "Adenoviral gene delivery." Methods Cell Biol **52**: 229-60.
- Ramadori, G. (1991). "The stellate cell (Ito-cell, fat-storing cell, lipocyte, perisinusoidal cell) of the liver. New insights into pathophysiology of an intriguing cell." Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol **61**(3): 147-58.
- Ramadori, G. and T. Armbrust (2001). "Cytokines in the liver." Eur J Gastroenterol Hepatol **13**(7): 777-84.
- Ramadori, G., T. Veit, et al. (1990). "Expression of the gene of the alpha-smooth muscle-actin isoform in rat liver and in rat fat-storing (ITO) cells." Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol **59**(6): 349-57.
- Reeves, H. L. and S. L. Friedman (2002). "Activation of hepatic stellate cells--a key issue in liver fibrosis." Front Biosci **7**: d808-26.
- Roderburg, C., G. W. Urban, et al. (2010). "Micro-RNA profiling reveals a role for miR-29 in human and murine liver fibrosis." Hepatology **53**(1): 209-18.
- Rossi, P., G. Karsenty, et al. (1988). "A nuclear factor 1 binding site mediates the transcriptional activation of a type I collagen promoter by transforming growth factor-beta." Cell **52**(3): 405-14.
- Roth, S., K. Michel, et al. (1998). "(Latent) transforming growth factor beta in liver parenchymal cells, its injury-dependent release, and paracrine effects on rat hepatic stellate cells." Hepatology **27**(4): 1003-12.
- Roth, S., J. Schurek, et al. (1997). "Expression and release of the latent transforming growth factor beta binding protein by hepatocytes from rat liver." Hepatology **25**(6): 1398-405.
- Saharinen, J., M. Hyytiainen, et al. (1999). "Latent transforming growth factor-beta binding proteins (LTBPs)--structural extracellular matrix proteins for targeting TGF-beta action." Cytokine Growth Factor Rev **10**(2): 99-117.
- Sambrock, J., E. M. Fritsch, et al. (1989). "Molecular Cloning: A Laboratory Manual." Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sanderson, N., V. Factor, et al. (1995). "Hepatic expression of mature transforming growth factor beta 1 in transgenic mice results in multiple tissue lesions." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(7): 2572-6.
- Scharf, J. G., T. Knittel, et al. (1998). "Characterization of the IGF axis components in isolated rat hepatic stellate cells." Hepatology **27**(5): 1275-84.
- Schievenbusch, S., I. Strack, et al. (2009). "Profiling of anti-fibrotic signaling by hepatocyte growth factor in renal fibroblasts." Biochem Biophys Res Commun **385**(1): 55-61.
- Schirmacher, P., A. Geerts, et al. (1993). "The role of Ito cells in the biosynthesis of HGF-SF in the liver." EXS **65**: 285-99.
- Schirmacher, P., A. Geerts, et al. (1992). "Hepatocyte growth factor/hepatopietin A is expressed in fat-storing cells from rat liver but not myofibroblast-like cells derived from fat-storing cells." Hepatology **15**(1): 5-11.
- Schlessinger, J., I. Lax, et al. (1995). "Regulation of growth factor activation by proteoglycans: what is the role of the low affinity receptors?" Cell **83**(3): 357-60.
- Schmidt, C., F. Bladt, et al. (1995). "Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development." Nature **373**(6516): 699-702.
- Schoemaker, M. H., M. G. Rots, et al. (2008). "PDGF-receptor beta-targeted adenovirus redirects gene transfer from hepatocytes to activated stellate cells." Mol Pharm **5**(3): 399-406.
- Sengupta, S., J. A. den Boon, et al. (2008). "MicroRNA 29c is down-regulated in nasopharyngeal carcinomas, up-regulating mRNAs encoding extracellular matrix proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(15): 5874-8.
- Skog, J., T. Wurdinger, et al. (2008). "Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers." Nat Cell Biol **10**(12): 1470-6.
- Slack, F. J., M. Basson, et al. (2000). "The lin-41 RBCC gene acts in the C. elegans heterochronic pathway between the let-7 regulatory RNA and the LIN-29 transcription factor." Mol Cell **5**(4): 659-69.
- Stamatopoulos, B., N. Meuleman, et al. (2009). "microRNA-29c and microRNA-223 down-regulation has in vivo significance in chronic lymphocytic leukemia and improves disease risk stratification." Blood **113**(21): 5237-45.
- Stegemann, H. and K. Stalder (1967). "Determination of hydroxyproline." Clin Chim Acta **18**(2): 267-73.
- Su, H., J. R. Yang, et al. (2009). "MicroRNA-101, down-regulated in hepatocellular carcinoma, promotes apoptosis and suppresses tumorigenicity." Cancer Res **69**(3): 1135-42.
- Svegliati-Baroni, G., F. Ridolfi, et al. (1999). "Insulin and insulin-like growth factor-1 stimulate proliferation and type I collagen accumulation by human hepatic stellate cells: differential effects on signal transduction pathways." Hepatology **29**(6): 1743-51.

- Taipale, J., J. Saharinen, et al. (1998). "Extracellular matrix-associated transforming growth factor-beta: role in cancer cell growth and invasion." *Adv Cancer Res* **75**: 87-134.
- Takamizawa, J., H. Konishi, et al. (2004). "Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival." *Cancer Res* **64**(11): 3753-6.
- Takebayashi, T., M. Iwamoto, et al. (1995). "Hepatocyte growth factor/scatter factor modulates cell motility, proliferation, and proteoglycan synthesis of chondrocytes." *J Cell Biol* **129**(5): 1411-9.
- Tomari, Y., C. Matranga, et al. (2004). "A protein sensor for siRNA asymmetry." *Science* **306**(5700): 1377-80.
- Tox, U., I. Scheller, et al. (2007). "Expression of angiotensin II receptor type 1 is reduced in advanced rat liver fibrosis." *Dig Dis Sci* **52**(8): 1995-2005.
- Ueberham, E., R. Low, et al. (2003). "Conditional tetracycline-regulated expression of TGF-beta1 in liver of transgenic mice leads to reversible intermediary fibrosis." *Hepatology* **37**(5): 1067-78.
- Ueki, T., Y. Kaneda, et al. (1999). "Hepatocyte growth factor gene therapy of liver cirrhosis in rats." *Nat Med* **5**(2): 226-30.
- Ura, S., M. Honda, et al. (2009). "Differential microRNA expression between hepatitis B and hepatitis C leading disease progression to hepatocellular carcinoma." *Hepatology* **49**(4): 1098-112.
- Valadi, H., K. Ekstrom, et al. (2007). "Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells." *Nat Cell Biol* **9**(6): 654-9.
- van Rooij, E., L. B. Sutherland, et al. (2008). "Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(35): 13027-32.
- Varga, J., J. Rosenbloom, et al. (1987). "Transforming growth factor beta (TGF beta) causes a persistent increase in steady-state amounts of type I and type III collagen and fibronectin mRNAs in normal human dermal fibroblasts." *Biochem J* **247**(3): 597-604.
- Varnholt, H., U. Drebber, et al. (2008). "MicroRNA gene expression profile of hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma." *Hepatology* **47**(4): 1223-32.
- Vecchi, C., G. Montosi, et al. (2010). "Huh-7: a human "hemochromatotic" cell line." *Hepatology* **51**(2): 654-9.
- Vogel, S., R. Piantedosi, et al. (2000). "An immortalized rat liver stellate cell line (HSC-T6): a new cell model for the study of retinoid metabolism in vitro." *J Lipid Res* **41**(6): 882-93.
- Wang, H., R. Garzon, et al. (2008). "NF-kappaB-YY1-miR-29 regulatory circuitry in skeletal myogenesis and rhabdomyosarcoma." *Cancer Cell* **14**(5): 369-81.
- Wang, K., S. Zhang, et al. (2009). "Circulating microRNAs, potential biomarkers for drug-induced liver injury." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(11): 4402-7.
- Wang, X. D. (1999). "Chronic alcohol intake interferes with retinoid metabolism and signaling." *Nutr Rev* **57**(2): 51-9.
- Weiskirchen, R., J. Kneifel, et al. (2000). "Comparative evaluation of gene delivery devices in primary cultures of rat hepatic stellate cells and rat myofibroblasts." *BMC Cell Biol* **1**: 4.
- Whitman, M. (1997). "Signal transduction. Feedback from inhibitory SMADs." *Nature* **389**(6651): 549-51.
- Wightman, B., T. R. Burglin, et al. (1991). "Negative regulatory sequences in the lin-14 3'-untranslated region are necessary to generate a temporal switch during *Caenorhabditis elegans* development." *Genes Dev* **5**(10): 1813-24.
- Woessner, J. F., Jr. (1961). "The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid." *Arch Biochem Biophys* **93**: 440-7.
- Wong, L., K. Lee, et al. (2007). "Endogenous Controls for Real-Time Quantification of miRNA Using TaqMan MicroRNA Assays." *Applied Biosystems Application Note*.
- Wrana, J. L., L. Attisano, et al. (1994). "Mechanism of activation of the TGF-beta receptor." *Nature* **370**(6488): 341-7.
- Xiong, Y., J. H. Fang, et al. (2010). "Effects of microRNA-29 on apoptosis, tumorigenicity, and prognosis of hepatocellular carcinoma." *Hepatology* **51**(3): 836-45.
- Xu, P., S. Y. Vernooy, et al. (2003). "The *Drosophila* microRNA Mir-14 suppresses cell death and is required for normal fat metabolism." *Curr Biol* **13**(9): 790-5.
- Yang, J., C. Dai, et al. (2003). "Hepatocyte growth factor suppresses renal interstitial myofibroblast activation and intercepts Smad signal transduction." *Am J Pathol* **163**(2): 621-32.
- Yasuda, H., E. Imai, et al. (1996). "Antifibrogenic effect of a deletion variant of hepatocyte growth factor on liver fibrosis in rats." *Hepatology* **24**(3): 636-42.
- Zerbe, O. and A. M. Gressner (1988). "Proliferation of fat-storing cells is stimulated by secretions of Kupffer cells from normal and injured liver." *Exp Mol Pathol* **49**(1): 87-101.
- Zhang, B. B., W. M. Cai, et al. (2003). "Diagnostic value of platelet derived growth factor-BB, transforming growth factor-beta1, matrix metalloproteinase-1, and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in serum and peripheral blood mononuclear cells for hepatic fibrosis." *World J Gastroenterol* **9**(11): 2490-6.
- Zindy, F., E. Lamas, et al. (1992). "Expression of insulin-like growth factor II (IGF-II) and IGF-II, IGF-I and insulin receptors mRNAs in isolated non-parenchymal rat liver cells." *J Hepatol* **14**(1): 30-4.
- Zomer, A., T. Vendrig, et al. (2010). "Exosomes: Fit to deliver small RNA." *Commun Integr Biol* **3**(5): 447-50.

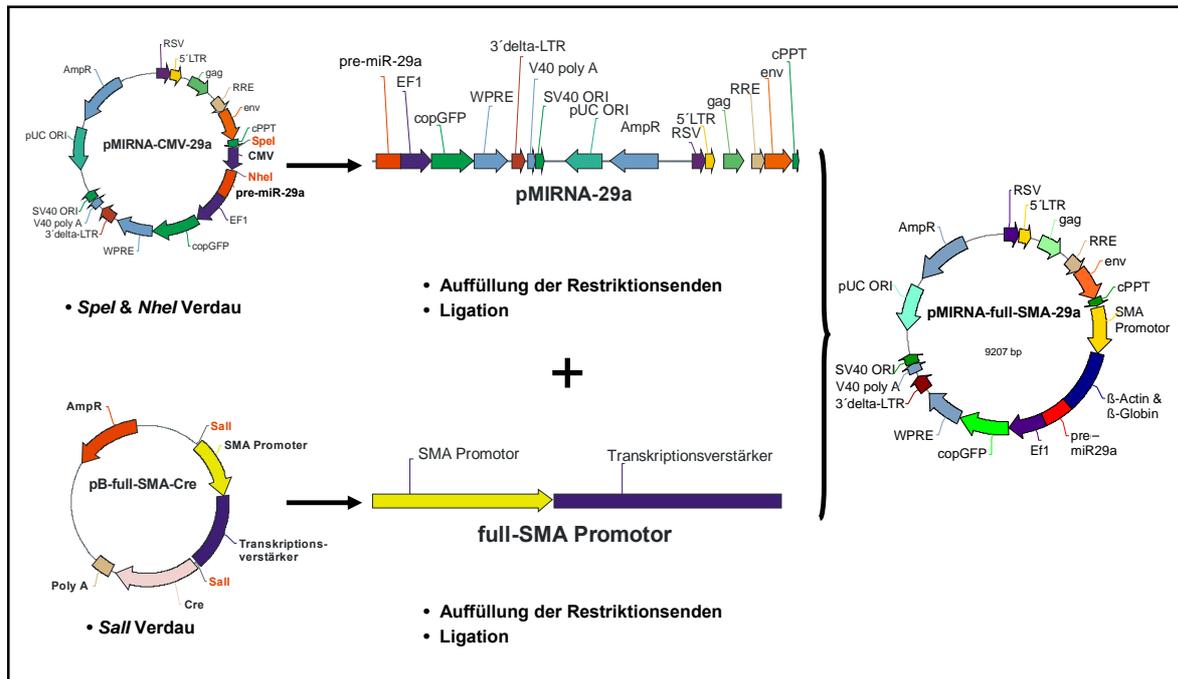
## 6 Anhang

### 6.1 Abkürzungsverzeichnis

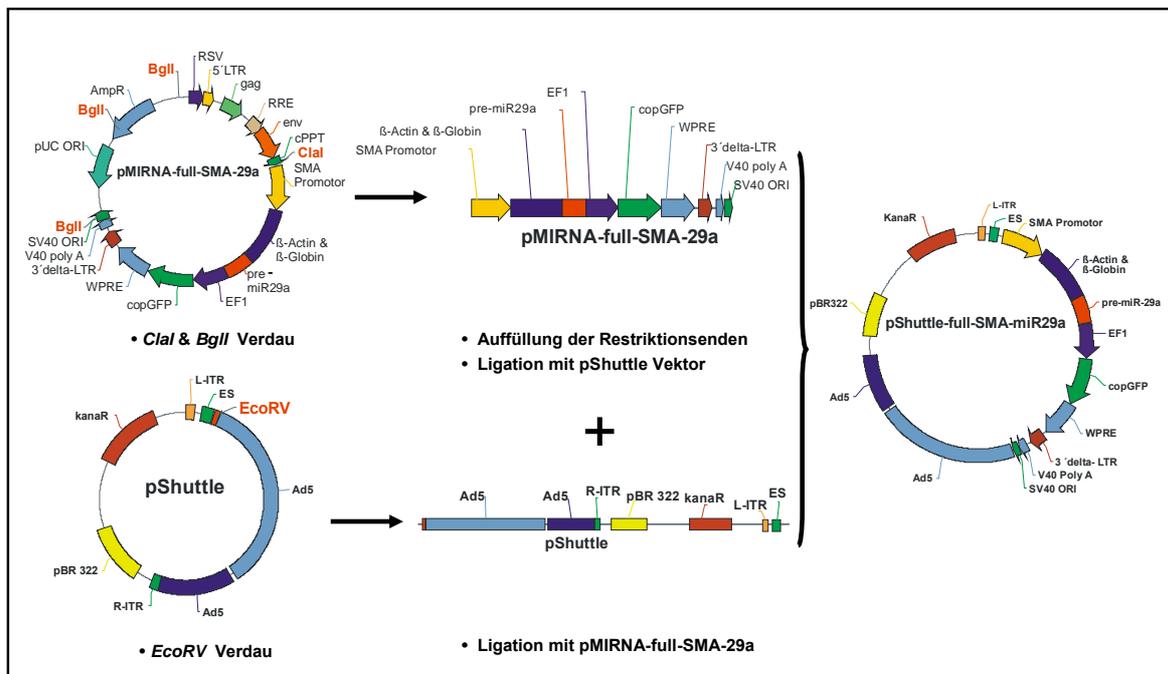
3'-UTR	3'-untranslatierter Bereich	HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
°C	Grad Celsius	<i>hsa</i>	<i>Homo sapiens</i>
α-SMA	<i>Alpha-Smooth-Muscle-Actin</i>	HSC	Hepatische Sternzelle
µg	Mikrogramm	g	Gramm
µl	Mikroliter	h	Stunde ( <i>hora</i> )
µM	Mikromolar	Ife/Z	Infektionseinheit pro Zielzelle
µm	Mikrometer	IGF	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor
AAV	Adeno-assoziierte Viren	KAc	Kaliumacetat
Abb.	Abbildung	kb	Kilobasen
ad	Auf (lat.)	kDa	Kilo-Dalton
Ad5	Adenovirus Typ 5	kg	Kilogramm
AK	Antikörper	l	Liter
Amp	Ampicillin	LB-Medium	<i>Luria Bertanie</i> Medium
ATP	Adenosintri-phosphat	M	Molar
BDO	Gallengangsockklusion	mA	Milliampere
bp	Basenpaare	max.	Maximal
BSA	Rinder Serum Albumin (Bovine Serum Albumin)	Mcl-1	<i>Myeloid Cell Leukemia Sequence</i>
<i>bta</i>	<i>Bos taurus</i>	MCS	Multiple Klonierungsstelle ( <i>multiple cloning site</i> )
bzw.	Beziehungsweise	MFB	Myofibroblasten-ähnliche Zellen
ca.	Circa	mg	Milligramm
CDC42	<i>Cell Division Cycle 42</i>	min	Minute
cDNA	<i>Complementary Deoxyribonucleic acid</i>	ml	Milliliter
cm <sup>2</sup>	Quadratzentimeter	mM	millimolar
CMV	Cytomegalievirus	mmu	<i>Mus musculus</i>
Co-SMAD	<i>Common-mediated SMAD</i>	mRNA	<i>messenger</i> RNA
C-Terminal	Carboxyterminal	miRNA	microRNA
d.h.	Das heißt	n	Anzahl
dH <sub>2</sub> O	Destilliertes Wasser	ng	Nanogramm
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium	nk-siRNA	Negativ Kontroll- siRNA
DMSO	Dimethylsulfoxid	nm	Nanometer
DNA	Desoxyribonukleinsäure	nt	Nukleotide
dno	<i>Dasytus novemcinctus</i>	N-Terminal	Aminoterminal
dNTP	2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat	nt	Nukleotide
ds	Doppelsträngige	OD	Optische Dichte
E1	<i>Early Gene 1</i>	ORF	Offenes Leseraster ( <i>open reading frame</i> )
<i>eca</i>	<i>Equus caballus</i>	Ori	Startpunkt der Replikation
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	p.A.	Pro Analysis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure	PBS	Phosphatgepuffertes Salz ( <i>phosphate buffered saline</i> )
et al.	und andere (lat.: <i>et alii</i> )	PBST	Phosphatgepuffertes Salz mit Tween 20
EtOH	Ethanol	PCR	Polymerasen-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
FCS	Fötale Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )	PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
GBSS	<i>Gey's balanced salt solution</i>	PDGF-RB	<i>Platelet-Derived Growth Factor Rezeptor β</i>
GFP	Grün fluoreszierendes Protein ( <i>green fluorescent protein</i> )	pH	<i>pondus hydrogenii</i>
<i>gga</i>	<i>Gallus gallus</i>	pmol	Pikomol
HCC	Hepatozelluläres Karzinom	pre-miRNA	Vorläufer miRNA
HCV	Hepatitis C Virus	pri-miRNA	Primäre miRNA
HEK-293	<i>Human embryonic kidney cells 293</i>	ptr	<i>Pan troglodytes</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	qPCR	Quantitativen <i>Real Time</i> PCR
HGF	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>	RE	Relative Einheiten

RIPA	Radio Immuno Precipitation Assay	TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>	TbRE	TGF- $\beta$ responsive element
RNA	Ribonukleinsäure	TBST	Tris gepuffertes salziges Tween
<i>rno</i>	<i>Rattus norvegicus</i>	Tcl-1	<i>leukemia/lymphoma 1</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minutes)	TEMED	Tetramethylethyldiamin
RPMI	Rooswell Park Memorial Institute	TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
R-SMAD	<i>receptor-mediated SMAD</i>	TGF- $\beta$	<i>Tissue Growth Factor <math>\beta</math></i>
RT	Raumtemperatur	Tris	Tris-(hydroxymethy-) aminomethan
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase	Tween 20	Polyoxyethylen-Sorbitanmonolaurat
RV	Reportervektor	u.a.	Unter anderem
s.	Siehe	ü.N.	Über Nacht
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat- Polyacrylamidgel	UV	Ultraviolett
siRNA	<i>silencing RNA</i>	v/v	Volumenprozent (volume per volume)
sek	Sekunde	V	Vol
SOC	Super Optimal Broth Nährmedium mit Glukose	VEGF-A	<i>Vascular Endothelial Growth Factor-A</i>
ssc	<i>Sus scrofa</i>	vgl.	Vergleiche
ssDNA	Einzelstrang-DNA	w / v	Gewichtsprozent ( <i>weight per volume</i> )
SV40	Simian-Virus 40	z. B.	Zum Beispiel
Tab.	Tabelle	<i>xtr</i>	<i>Xenopus tropicalis</i>

## 6.2 Klonierungsstrategie



**Abbildung 32: Klonierungsstrategie zur Konstruktion des pMIRNA-full-SMA-29a Plasmids.** Nach Restriktion des pB-full-SMA-Cre Plasmids mit *Sall* wurden die Überhänge der full- $\alpha$ -SMA-Promotorkassette aufgefüllt. Parallel dazu wurde mit *SpeI* und *NheI* der CMV Promotor aus dem pMIRNA-CMV-miR29a Plasmid restringiert und der Restvektor nach Auffüllung der Enden mit der full- $\alpha$ -SMA-Promotorkassette ligiert. Das neue Plasmidkonstrukt erhielt den Namen pMIRNA-full-SMA-29a.



**Abbildung 34: Klonierungsstrategie zur Konstruktion des pShuttle-full-SMA-29a Plasmids.** Nach Restriktion des pMIRNA-full-SMA-29a Plasmids mit *ClaI* und *BglII* wurden die Überhänge der Kassette aufgefüllt. Nach Linearisierung des pShuttle Vektors mit *EcoRV* erfolgte die Ligation mit der full- $\alpha$ -SMA-miR-29a Kassette.

## 7 Zusammenfassung

MicroRNAs (miRNAs) sind kleine, nicht kodierende RNA Moleküle, die posttranskriptionell durch komplementäre Bindung an den 3'-untranslatierten Bereich (3'-UTR) die Translation ihrer Zieltranskripte unterdrücken. Eine Deregulation von miRNAs wird mit veränderten Syntheseabläufen und diversen Erkrankungen in Verbindung gebracht. Auf Grund dessen wurde in der vorliegenden Arbeit eine miRNA ermittelt, welche in die grundlegenden Abläufe chronischer Lebererkrankungen involviert ist. Hepatische Sternzellen (HSC), die durch parakrine Stimulierung mit profibrogenen Zytokinen aktiviert werden und zu Myofibroblasten-ähnlichen Zellen differenzieren, stellen den zentralen Zelltyp der Leberfibrogenese dar. Die aktiven HSC zeichnen sich nicht nur durch eine vermehrte Synthese und Deposition von extrazellulären Matrixproteinen aus, sondern auch durch die Expression profibrogenen Mediatoren.

In der vorliegenden Arbeit wurde über *in silico* Analysen die miR-29 als möglicher Syntheserepressor der Kollagentranskripte Col1A1, Col1A2, Col4A1, Col4A5 sowie der profibrogenen Zytokine „*Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF) -C“, insulinähnlicher Wachstumsfaktor I (IGF-I) und „*Vascular Endothelial Growth Factor-A*“ (VEGF-A) identifiziert. Anschließend Bindungsstudien mit Plasmidkonstrukten, welche die potentielle Bindungssequenz der 3'-UTR der identifizierten Zieltranskripte in einem Reporter gen beinhalteten, belegten die miR-29 Interaktion durch erniedrigte Reporteraktivitäten. Durch die Behandlung von HSC mit miR-29 konnte anschließend die Repression sowohl der Kollagentypen I und IV als auch der profibrogenen Zytokine PDGF-C und IGF-I nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte in einem experimentellen Fibrosemodell, bei dem durch Gallengangsokklusion in Ratten eine Leberfibrose induziert wurde, gezeigt werden, dass eine signifikante Erniedrigung der antifibrogenen miR-29 vorlag. Die Analysen während der myofibroblastischen Differenzierung von primären HSC, die aus der Ratte isoliert wurden und in Kultur den myofibroblastischen Entwicklungsprozess durchliefen, zeigten ebenfalls einen abnehmenden miR-29 Spiegel. Daher kann die fehlende Inhibierung, sowohl der Kollagensynthese als auch der Produktion der Mediatoren PDGF-C und IGF-I während der Leberfibrogenese, durch die reduzierte miR-29 Expression in Myofibroblasten-ähnlichen HSC erklärt werden.

Nach Stimulierung der HSC mit dem fibrogenen Wachstumsfaktor „*Tissue Growth Factor- $\beta$* “ (TGF- $\beta$ ) und PDGF-BB erfolgte eine verstärkte Synthese der Kollagentypen I und IV, während der „*Hepatocyte Growth Factor*“ (HGF) eine Repression bewirkte. Dagegen wurde

unter dem Einfluss von TGF- $\beta$  und PDGF-BB eine Repression, durch HGF jedoch eine Induktion der miR-29 beobachtet. Die Regulation der miR-29 Expression unterliegt demzufolge diesen pro- und antifibrogenen Mediatoren.

Die TGF- $\beta$  und PDGF-BB vermittelte Abnahme der miR-29 in HSC wurde von einer deutlichen Sekretion der miR-29 in den Kulturüberstand begleitet. Durch Färbungen konnte belegt werden, dass HSC nach Stimulierung mit TGF- $\beta$  und PDGF-BB vermehrt Vesikel ausscheiden. Diese Vesikel enthielten erhöhte Mengen an miR-29. Die Regulation der miR-29a ist somit *in vitro* in HSC mit einem Anstieg extrazellulärer miR-29a durch ein vesikuläres Freisetzen aus den HSC verbunden. Abschließend wurde ein Myofibroblasten-spezifischer und miRNA-exprimierender Vektor hergestellt, der die gezielte Expression der antifibrogenen miR-29a in Myofibroblasten-ähnlichen HSC ermöglichte. Damit wurden die grundlegenden Voraussetzungen geschaffen, um die hier gezeigte antifibrogene Funktion der miR-29 in einem experimentellen Leberfibrosemodell *in vivo* zu untersuchen.

## 8 Abstract

MicroRNAs (miRNAs) are short, noncoding RNA molecules that posttranscriptionally regulate gene expression by targeting the 3'-untranslated region (3'-UTR) of mRNAs. Interaction of miRNA with the 3'-UTR results either in RNA degradation or in translational repression that affects various fundamental biological processes and different diseases. The aim of the present study was the identification of one miRNA which is involved in basic mechanisms of fibrogenesis. Activation of hepatic stellate cells (HSC) by profibrogenic growth factor stimulation leads to their transdifferentiation into activated myofibroblastic HSC. During liver fibrogenesis these activated HSC are the main cell type of matrix accumulation and profibrogenic growth factor secretion.

In this doctoral thesis work, algorithms of different databases identified miR-29 as a putative repressor of the collagen transcripts Col1A1, Col1A2, Col4A1, Col4A5 as well as the profibrotic cytokines "*Vascular Endothelial Growth Factor-A*" (VEGF-A), "*Platelet-Derived Growth Factor-C*" (PDGF-C), and "*Insulin-Like Growth Factor-I*" (IGF-I) mRNAs. In order to demonstrate miRNA binding and translational inhibition, reporter assays were performed. Reporter luciferase plasmids containing either the putative miR-29 binding sites from the 3'-UTR sequences of the target transcripts or corresponding binding sites with two point mutations were constructed. Thus, the interaction of miR-29 with the target sequence leads to repression of the luciferase activity. Indeed, reporter assays revealed that cotransfection of miR-29 causes repression of the reporter activity. Additionally, miR-29 treatment of HSC resulted in repression of Col1A1, Col1A2, Col4A1, Col4A5 transcripts, and profibrotic cytokines PDGF-C and IGF-I synthesis. Furthermore, miR-29 levels were reduced in an experimental rat model with liver fibrosis after bile duct occlusion. Additionally, during myofibroblastic differentiation of primary HSC isolated from rat livers and cultured on a plastic surface to induce myofibroblastic transition, decreasing miR-29 expression level was observed. Therefore the abolished inhibition of collagen, PDGF-C and IGF-I synthesis during liver fibrogenesis can be explained by the reduced miR-29 expression in myofibroblastic HSC. Stimulation of HSC with the fibrogenic mediators, "*Transforming Growth Factor- $\beta$* " (TGF- $\beta$ ) and "*Platelet-Derived Growth Factor BB*" (PDGF-BB), augmented whereas the antifibrogenic "*Hepatocyte Growth Factor*" (HGF) decreased the collagen type I and IV synthesis. In contrast, the influence of TGF- $\beta$  and PDGF-BB induced a repression whereas

---

HGF led to an induction of miR-29 expression. Therefore, regulation of miR-29 expression is the focus of the antagonism between TGF- $\beta$  and HGF.

Interestingly, the decrease of miR-29 in HSC, mediated by TGF- $\beta$  and PDGF-BB, was accompanied by highly elevated levels of miR-29 in the supernatant. A secretion of vesicles from HSC after TGF- $\beta$  and PDGF-BB stimulation was evidenced by negative staining. These vesicles contained high amounts of miR-29. Hence, regulation of miR-29 in HSC is suggested with an increase of extracellular miR-29a by vesicular release from HSC *in vitro*. Finally, for a myofibroblast-specific expression of the antifibrogenic miR-29, an adenoviral vector was created and successfully tested in activated HSC. Thus, the presented study provides a novel perspective to analyze the antifibrogenic function of miR-29 in an experimental liver fibrosis model *in vivo*.

## Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Frau PD Dr. Roswitha Nischt betreut worden.

Köln, im Juni 2011

.....  
(Monika Kwiecinski)

Teile der vorliegenden Dissertation sind unter folgenden Titeln veröffentlicht worden:

J. Hirschfeld, J. Maurer, D. Jung, **M. Kwiecinski**, A. K. Khimji, H.P. Dienes, J. W. U. Fries, M. Odenthal (2009). „Targeting Myofibroblasts in Model Systems of Fibrosis by an Artificial  $\alpha$ -Smooth Muscle-Actin Promoter Hybrid.” Mol Biotechnol.

**M. Kwiecinski**, A. Noetel, N. Elfimova, J. Trebicka, S. Schievenbusch, I. Strack, L. Molnar, M. von Brandenstein, U. Töx, R. Nischt, O. Coutelle, H. P. Dienes, M. Odenthal (2011). „Hepatocyte Growth Factor (HGF) Inhibits Collagen I and IV Synthesis in Hepatic Stellate Cells by miRNA-29 Induction.” PLoS One. (Paper invited for submission in a revised version).