

Molekulare Mechanismen der Leberfibrogenese als Grundlage für neue Therapiestrategien der chronischen Hepatitis

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Pharmazie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

**Ingo Strack
aus Siegen**

Marburg/Lahn, 2009

Vom Fachbereich Pharmazie

der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am

_____ angenommen.

Erstgutachter: Frau PD Dr. M. Odenthal

Zweitgutachter: Frau Professor Dr. M. Petersen

Tag der mündlichen Prüfung am: 05.10.2009

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VIII
1. EINLEITUNG	1
1.1 Chronische Lebererkrankungen	1
1.2 Virale Hepatitiden	1
1.2.1 Die chronische Hepatitis B-Virus-Infektion.....	1
1.2.2 Die chronische Hepatitis C-Virus-Infektion.....	2
1.3 Die Alkoholische Lebererkrankung (ALE).....	3
1.4 Die Nicht-Alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD)	4
1.5 Die autoimmunen Lebererkrankungen.....	5
1.5.1 Die Autoimmunhepatitis (AIH)	5
1.5.2 Primär biliäre Autoimmunerkrankungen.....	6
1.5.2.1 Die Primäre Biliäre Zirrhose (PBC)	6
1.5.2.2 Die Primäre Sklerosierende Cholangitis (PSC)	6
1.6 Das MDR2-/- Mausmodell, ein Modell einer primären sklerosierenden Cholangitis	8
1.7 Die Leberfibrose und deren Mechanismen	9
1.8 Der zentrale Zelltyp der Leberfibrogenese: Die hepatischen Sternzellen.....	11
1.9 Die Rolle von vasokonstriktorisches Faktoren und des Sympathikus in der Fibrogenese.....	13
1.10 Die Rolle von microRNAs in der Genexpression.....	14
1.11 Zielsetzung	17

2. MATERIAL UND METHODEN	18
2.1 Material	18
2.1.1 Lösungen und Medien	19
2.1.1.1 Lösungen und Puffer für die Bakterienkultur	19
2.1.1.2 Lösungen und Puffer in der Zellkultur	20
2.1.1.3 Sonstige Lösungen	22
2.1.2 Reagenzzusammenstellungen	23
2.1.3 Oligonukleotide	23
2.1.4 Vektoren	26
2.1.5 Bakterienstämme	26
2.1.6 Software	26
2.2 Methoden	27
2.2.1 Tierexperimenteller Teil	27
2.2.1.1 Versuchstiere	27
2.2.1.2 Tierhaltung	27
2.2.1.3 Futter	27
2.2.1.4 Mauskollektiv und Therapieschema	28
2.2.1.5 Töten der Tiere und Organentnahme	28
2.2.2 RNA-Extraktion aus Gewebe und Zellen	29
2.2.2.1 Lyse von nativem Gewebe	29
2.2.2.2 Lyse von Zellen	29
2.2.2.3 RNA-Isolierung aus Gewebelysaten	29

2.2.2.4 RNA-Isolierung aus mikrodisektioniertem Gewebe	29
2.2.2.5 RNA-Isolierung aus paraffineingebettetem Gewebe.....	30
2.2.2.6 RNA-Isolierung aus Zelllysaten und Geweben zur miRNA-Bestimmung.....	30
2.2.2.7 Konzentrationsbestimmung und Qualitätsbeurteilung von RNA und DNA	31
2.2.2.8 Durchführung einer LNA-basierten Microarray-Analyse ...	31
2.2.3 Reverse Transkription und Real-Time PCR	31
2.2.3.1 Reverse Transkription von mRNA in cDNA.....	32
2.2.3.2 Reverse Transkription von RNA aus mikrodisektioniertem Gewebe.....	32
2.2.3.3 Reverse Transkription zur Bestimmung von miRNA-Transkripten	33
2.2.4 Real-Time PCR	34
2.2.4.1 Der Real-Time PCR-Ansatz unter Verwendung einer TaqMan®-Sonde.....	37
2.2.4.2 Die Real-Time PCR unter Verwendung von SYBR®Green	38
2.2.4.3 Anfertigen einer Standardreihe.....	40
2.2.4.4 Normalisierung der Real-Time PCR.....	40
2.2.5 Die Lasermikrodisektion.....	40
2.2.5.1 Vorbereitung der Proben	41
2.2.5.2 Lasermikrodisektion nativer Kryo-Gewebeproben	41
2.2.6 Proteinbiochemische Methoden	42
2.2.6.1 Hydroxyprolin-Bestimmung	42

2.2.7 Histologische Begutachtung.....	42
2.2.7.1 Aufbereitung des Probenmaterials.....	42
2.2.7.2 Immunhistologische Färbungen.....	43
2.2.7.3 Bestimmung des Fibrorestadiums, Entzündungsgrades und der Gallengangsproliferation.....	44
2.2.8 Bakterienkultur.....	44
2.2.8.1 Herstellung kompetenter <i>E.coli</i> Bakterien	44
2.2.8.2 Transformation.....	45
2.2.8.3 Mini-Präparation von Plasmid-DNA.....	45
2.2.8.4 Midi-Präparation von Plasmid-DNA.....	46
2.2.8.5 Phenolaufreinigung und Fällung von DNA nach Maniatis.	46
2.2.8.6 Restriktion	47
2.2.8.7 Ligation von DNA-Fragmenten	47
2.2.8.8 Dimerisierung von Oligonukleotiden.....	48
2.2.8.9 Gelaufftrennung von DNA-Fragmenten.....	48
2.2.8.10 Extraktion von DNA aus Agarosegelen.....	49
2.2.9 Zellkultur	49
2.2.9.1 Allgemein.....	49
2.2.9.2 Zelllinien.....	49
2.2.9.3 Kultivierung der Zellen	49
2.2.9.4 Passagieren der Zellen	50
2.2.9.5 Bestimmung der Zellzahl.....	50
2.2.9.6 Kryokonservierung und Auftauen der Zellen	50

2.2.9.7 Transfektion immortalisierter Zelllinien	51
2.2.9.8 Isolierung primärer hepatischer Sternzellen	51
2.2.9.9 Transfektion von primären hepatischen Sternzellen	52
2.2.9.10 Immunzytologische Färbungen	53
2.2.9.11 Dualer Luciferase Reporter Assay.....	53
3. ERGEBNISSE	55
3.1 Fibroseentwicklung in MDR2-knockout-Tieren nach β-Adrenozeptor-Blockade	55
3.1.1 Entzündliche und fibrotische Veränderungen nach Cholestase im MDR2-knockout-Modell	55
3.1.2 Auswirkung der β-Blockade auf den Blutdruck der MDR2-/- Mäuse	62
3.1.3 Einfluss der Behandlung mit β-Blockern auf die Entzündung während der PSC von MDR2-/- Mäusen	62
3.1.4 Einfluss der β-Blocker Behandlung auf die Fibrogenese	64
3.1.5 Einfluss der β-Blocker Behandlung auf die Gallengangsproliferation.....	69
3.1.6 Einfluss der β-Blocker Behandlung auf die Expression von profibrogenen und vasokonstriktorisches Mediatoren.....	71
3.1.6.1 Profibrogene Mediatoren.....	71
3.1.6.2 Profibrogene und vasokonstriktorisches Mediatoren	71
3.1.6.3 Mikrodissektion von Arealen aus Portalfeld und Lappchen	72
3.2 Die Rolle der microRNAs in der Leberfibrogenese	77
3.2.1 Untersuchung der miRNA-122 im experimentellen BDO-Modell und in einem Hepatitis C Patientenkollektiv.....	77
3.2.1.1 miRNA-122 Expression im BDO-Modell der Ratte.....	77

3.2.1.2 Untersuchung der leberspezifischen miRNA-122 im humanen Hepatitis C Patientenkollektiv	82
3.2.2 Die differentielle microRNA Expression während der myofibroblastischen Differenzierung und Fibrogenese	84
3.2.2.1 Differentielle microRNA Expression während der myofibroblastischen Differenzierung	84
3.2.2.2 Untersuchung der während der myofibroblastischen Transdifferenzierung differenziell regulierten microRNAs in <i>in vivo</i> Modellen	92
3.2.2.2.1 MicroRNA Expression in der experimentellen Fibrose nach Gallengangsverschluss.....	93
3.2.2.2.2 MicroRNA Expression in Patienten mit Leberfibrose nach Hepatitis C Infektion	94
3.2.4 Sequenzhomologien der miRNA-125b und deren Zieldomänen in verschiedenen Spezies	94
3.2.5 Homologe Funktion von miRNA-125b zur <i>lin-4</i> Funktion.....	95
3.2.5.1 Hohe miRNA-125b Abundanz in hepatischen Sternzellen durch miR-125b-Mimik.....	97
3.2.6 <i>lin-28</i> : Eine Zieldomäne für miRNA-125b in Wirbeltieren	98
3.2.6.1 Homologie der miRNA-125b Bindestelle in den 3'-untranslatierten <i>lin-28</i> Bereichen verschiedener Spezies.....	98
3.2.6.2 miRNA-125b bindet an die 3'UTR von <i>lin-28</i> Transkripten	99
3.2.6.3 Gegenläufige Expression von miRNA-125b und <i>lin-28</i> während der myofibroblastischen Transdifferenzierung von hepatischen Sternzellen.....	101
3.2.6.4 Expression von Mitgliedern der <i>let-7</i> Familie während der myofibroblastischen Transdifferenzierung von hepatischen Sternzellen	102
4. DISKUSSION	103
4.1 Die β -Blockade als mögliche Therapieform der Leberfibrose.....	103

4.1.1 Hemmung der Fibrose durch die β -Blockade.....	105
4.1.2 Das Renin-Angiotensin-System als ein möglicher Angriffspunkt der β -Adrenozeptor-Blockade bei einer Leberfibrose	107
4.1.3 Einfluss der Propranolol-Behandlung auf das Endothelin- System	108
4.1.4 Möglichkeiten und Grenzen einer Fibrosetherapie durch eine β -Blockade.....	109
4.2 Die differentielle microRNA-Expression als Grundlage neuer strategischer Ansätze in der Leberfibrogenese bei chronischer Hepatitis	110
4.2.1 Die Induktion von miRNA-125b in der frühen Phase der myofibroblastischen Differenzierung hepatischer Sternzellen.....	114
4.2.2 Die Bedeutung der miRNA-125b als <i>lin-4</i> Homolog des Nematoden <i>C. elegans</i> in hepatischen Sternzellen	115
5. ZUSAMMENFASSUNG	119
6. LITERATURVERZEICHNIS	125
7. ANHANG.....	132
8. DANKSAGUNG	144
9. TABELLARISCHER LEBENSLAUF.....	146

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

%[v/v]	Volumenprozent
%[w/v]	Gewichtsprozent
°C	Grad Celsius
α -SMA	alpha-Smooth-Muscle-Actin
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
Abb.	Abbildung
ALT	Alanin-Aminotransferase
Amp	Ampicillin
Angio	Angiotensinogen
AST	Aspartat-Aminotransferase
AT-1 R	Angiotensin-Rezeptor Typ 1
bp	base pair (Basenpaar)
BSA	Bovine Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
<i>C.elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
cDNA	complementary DNA
COL1A1	Procollagen 1A1
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonucleinsäure)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
E ₂₆₀ /E ₂₈₀	Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 oder 280nm
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykotetraessigsäure
ET-1	Endothelin-1
ET-R-A	Endothelin-Rezeptor A

ET-R-B	Endothelin-Rezeptor B
FAM	6-FAM-phosphoramidit ((3',6'-Dipivaloylfluoresceinyl)-6-carboxamidohexyl)-1-O-(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)-phosphoramidit)
FCS	Fetal Calf Serum
g	Gramm
GBSS	Gey's Balanced Salt Solution
eGFP	enhanced Green Fluorescent Protein
h	Stunde
HBSS	Hank's Buffered Salt Solution
HEPES	(N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'[2-ethane sulfonic acid])
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
HSC	Hepatic Stellate Cell (hepatische Sternzelle)
H&E	Hämatoxylin & Eosin
kb	Kilobasen
kg	Kilogramm
l	Liter
LB-Medium	Luria Bertanie-Medium
M	molar
mg	Milligramm
min	Minute
miR	microRNA
miRNA	microRNA
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	messenger RNA
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
PBS	Phosphat Buffered Saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PEG	Polyethylenglykol
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)

RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuclease
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Natriumdodecylsulfat)
sek	Sekunde
siRNA	silencing RNA
TAMRA	Tetramethyl-6-Carboxyrhodamin
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-Buffered Saline
TBST	Tris-Buffered Saline Tween20
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TGF- β	Transforming Growth Factor-beta
TNF- α	Tumor Necrosis Factor-alpha
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
U	Unit (Einheit)
u.	und
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt

1. EINLEITUNG

1.1 Chronische Lebererkrankungen

Chronische Lebererkrankungen können eine Vielzahl verschiedener Ursachen haben, diese beinhalten Virusinfektionen, Alkohol- und Drogenabusus sowie metabolische und autoimmune Erkrankungen [1, 2]. Unabhängig von der Ursache sind sie zumeist mit der Akkumulation und Umstrukturierung von extrazellulärer Matrix (ECM) vergesellschaftet. Dieser Prozess wird als Fibrose bezeichnet und ist die Wundheilungsantwort des Körpers auf die chronische Leberschädigung. Es ist der Versuch des Körpers den geschädigten Bereich einzugrenzen bzw. abgestorbenes Gewebe zu ersetzen. Das Endergebnis ist ein nodulärer Umbau der Leberarchitektur, die Leberzirrhose [3]. Obwohl die Leber über Jahre versucht, sich zu regenerieren und gestörte Funktionen zu kompensieren, kommt es wegen ihrer zentralen Rolle im Stoffwechsel bei der Leberzirrhose zu vielfältigen Ausfällen und Folgestörungen. Die Leberzirrhose gehört in den westlichen Ländern zu den zehn häufigsten Todesursachen und ist mit hohen klinischen Kosten und volkswirtschaftlichem Schaden verbunden [1]. Zur Behandlung chronischer Lebererkrankungen bzw. einer Leberfibrose steht bis zum heutigen Zeitpunkt keine spezifische Therapie zur Verfügung. Durchgeführte Behandlungen konzentrieren sich bislang auf die Ausschaltung der schädigenden Noxe.

1.2 Virale Hepatitiden

Die Hepatitis B- und Hepatitis C-Virus-Infektion ist weltweit die Hauptursache für chronische Lebererkrankungen und Leberversagen.

1.2.1 Die chronische Hepatitis B-Virus-Infektion

Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation WHO haben 2 Milliarden Menschen eine Hepatitis B-Virus- (HBV) Infektion durchgemacht und 350 bis 400 Millionen Menschen haben eine chronische HBV Infektion. Die Wahrscheinlichkeit einer chronischen HBV Infektion ist stark vom Alter zur Zeit der Infektion abhängig. Kinder im Alter von einem Jahr entwickeln zu 90%, zwischen ein und vier Jahre zu 30% bis

50% und Erwachsene zu 25 % eine chronische HBV Infektion [4, 5]. Der Hepatitis B-Virus ist ein DNA-Virus aus der Familie der Hepadnaviridae. Die doppelsträngige DNA kodiert für vier spezifische Proteine. Von dem Virus sind acht Genotypen bekannt, am weitesten verbreitet sind jedoch die Genotypen A, B und C [6]. Es wird angenommen, dass weltweit 30% der Fälle von Leberzirrhose und 53% der Fälle von hepatozellulären Karzinomen auf chronische Hepatitis B-Virus-Infektionen zurückzuführen sind [7]. Die Hepatitis B Prävalenz variiert stark zwischen den Kontinenten. Hohe Infektionsraten finden sich in China und anderen Teilen Asiens (bis 10%), während in Nordamerika und Westeuropa die Rate unter 1% liegt [5]. Patienten mit akuter Hepatitis B klagen zumeist über Abgeschlagenheit, Appetitlosigkeit, Beschwerden im rechten Oberbauch oder Grippe-ähnliche Symptome, später kommt es zur Gelbsucht. In der akuten Phase sind die Leberenzyme ALT und AST stark erhöht. Die chronische Hepatitis B verläuft oft asymptomatisch und wird häufig zufällig diagnostiziert. Auch die Leberenzymwerte können normal sein. Das charakteristischste histologische Zeichen einer Hepatitis B Infektion ist der Milchglas- Hepatozyt [6]. Die Therapie einer akuten HBV Infektion erfolgt nur symptomatisch, während bei der chronischen Infektion eine antivirale Therapie mit PEG-Interferon und Nukleosid-Analoga durchgeführt wird [4, 8].

1.2.2 Die chronische Hepatitis C-Virus-Infektion

Die Infektion mit dem Hepatitis C-Virus (HCV) gehört zu den Hauptursachen einer akuten Hepatitis sowie von chronischen Lebererkrankungen, einschließlich Zirrhose und hepatozellulären Karzinomen [9]. Es handelt sich bei dem Virus um einen kleinen, behüllten RNA-Virus aus der Familie der Flaviviridae. Von dem Hepatitis C-Virus sind sechs Genotypen und mehr als 50 Subtypen bekannt. Die Genotypen zeichnen sich durch eine unterschiedliche geographische Verbreitung aus. In Westeuropa und Nordamerika sind die Genotypen 1 bis 3 weit verbreitet. Genotyp 2 zeigt eine weltweite Verbreitung, während in Afrika sowie im mittleren Osten Genotyp 4 und in Südostasien Genotyp 6 dominant sind [10]. Mit dem Hepatitis C-Virus sind weltweit geschätzte 170 Millionen Menschen chronisch infiziert. Dies entspricht einer Infektionsrate von ca. drei Prozent der Weltbevölkerung [11]. 80-90% aller Hepatitis C-Infektionen zeigen einen chronischen Verlauf. In ca. 10-20% der Fälle entwickeln

die Patienten nach ca. 20-25 Jahren eine Leberzirrhose, von der 1 bis 5% der Fälle zu einem hepatozellulären Karzinom (HCC) führen [9].

Auch die Hepatitis C Prävalenz variiert stark zwischen den Kontinenten. In Afrika (5,3%), dem östlichen Mittelmeerraum (4,6%) und dem Westpazifik (3,9%) liegt sie deutlich höher als in Europa (1,03%) und Nordamerika (1,7%) [9]. In Deutschland beträgt die Prävalenz 0,4 %, aufgrund der hohen Zahl an chronisch verlaufenden Erkrankungen wird die Zahl der Virusträger auf 400000 geschätzt [12].

Da die meisten Patienten mit akuter Hepatitis C-Infektion asymptomatisch sind, wird eine chronische HCV Infektion oft erst nach Jahren zufällig entdeckt. Als diagnostische Tests werden der HCV-ELISA gegen HCV-Antikörper, ein Immunoblot zur Bestätigung eines positiven ELISAs und die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) auf vorhandene Virus-RNA durchgeführt [9]. Die Durchführung einer Leberbiopsie ist die wesentliche Maßnahme in der diagnostischen Abklärung einer chronischen Hepatitis C.

Ziel der antiviralen Therapie ist ein anhaltendes virales Ansprechverhalten auf die Therapie, definiert als nicht durch PCR detektierbare Serum-RNA-Viruspiegel, also die Elimination des Hepatitis C-Virus. Die Standardbehandlung der chronischen Hepatitis C ist eine Kombinationstherapie aus PEG-Interferon und Ribavarin [13].

1.3 Die Alkoholische Lebererkrankung (ALE)

Ursache dieser Lebererkrankung ist der übermäßige, chronische Konsum von Alkohol. Dieser führt zu einer Reihe von Leberveränderungen. Nahezu 100% aller starken Trinker entwickeln eine Steatose, bei 10-35% kommt es zur Entwicklung einer Steatohepatitis und 8-20% entwickeln eine Zirrhose. Von diesen wiederum werden ca. 15% ein hepatozelluläres Karzinom entwickeln. Alkohol ist in der westlichen Welt der häufigste Grund einer Leberzirrhose. Die Mortalitätsrate einer ALE liegt bei ca. 5-6%. Durch den übermäßigen Alkoholkonsum kommt es zu einer Aktivierung von intrahepatischen Makrophagen, die eine Reihe von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen, darunter TNF- α , freisetzen und so zur Aktivierung von hepatischen Sternzellen beitragen. Ein weiteres Merkmal ist die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies durch die Atmungskette, das ethanol-metabolisierende Enzym Cytochrom P4502E1 und durch aktivierte Phagozyten. Ein Eckpfeiler der Behandlung einer ALE ist die absolute Alkoholabstinenz. Weitere

Behandlungen erfolgen durch Gabe von Glukokortikoiden und Pentoxifyllin sowie durch anti-TNF- α Therapie. Obwohl oxidativer Stress bei der ALE eine große Rolle spielt, zeigt die Behandlung mit Antioxidantien keinen positiven Effekt. Bei einer fortgeschrittenen Leberzirrhose stellt die Lebertransplantation bei entsprechenden Selektionskriterien eine Option dar. [14-16]

1.4 Die Nicht-Alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD)

Die nicht-alkoholische Fettlebererkrankung wird nach klinischen Gesichtspunkten durch die Abwesenheit von übermäßigem Alkoholkonsum in der Patientenanamnese abgegrenzt. Die NAFLD zeichnet sich durch makrovesikuläre Fettakkumulation von mehr als 5% der Hepatozyten aus. Die Prävalenz der NAFLD ist mit 20-30% in einer zufällig ausgewählten Bevölkerungsgruppe in westlichen Ländern sehr hoch. Eine kleine Anzahl (2-3%) der Individuen entwickelt die nächste Stufe der Erkrankung, eine nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH). Diese zeichnet sich, neben der Steatose, durch Schädigung der Hepatozyten und Entzündung mit variabel ausgeprägten Fibrosegraden aus. Die Progression der NAFLD zur NASH erhöht deutlich das Risiko der Entwicklung einer Leberzirrhose. Zwei Risikofaktoren der Fettakkumulation in der Leber sind Fettleibigkeit und Insulinresistenz. Die Prävalenz einer NAFLD steigt mit dem Gewicht oder body mass index (BMI) des Individuums. Die Prävalenz einer NASH steigt überproportional bei fettleibigen Personen, hier zeigten 15-20% der Individuen eine NASH. Unterscheidungen der verschiedenen Stadien der Fettlebererkrankungen sind nur durch histologische Untersuchungen nach Leberbiopsie möglich. Die Erkrankung verläuft zu Beginn in 80% der Fälle asymptomatisch und wird zumeist im Rahmen einer körperlichen Routine- oder laborchemischen Untersuchung entdeckt. Unspezifische auftretende Krankheitszeichen einer NAFLD sind Abgeschlagenheit, Ermüdung, Übelkeit und uncharakteristische Schmerzen im rechten Oberbauch. Zur Behandlung der NAFLD / NASH gibt es zurzeit keine zugelassene medikamentöse oder chirurgische Therapie. Der Fokus liegt auf einer Reduktion des Gewichtes und der Fettaufnahme durch erhöhte körperliche Aktivität und eine fettreduzierte Diät sowie in der Minimierung des Diabetesrisikos [17, 18].

1.5 Die autoimmunen Lebererkrankungen

Zu den autoimmunen Lebererkrankungen gehören die Autoimmunhepatitis (AIH) und die primär biliären Autoimmunerkrankungen.

1.5.1 Die Autoimmunhepatitis (AIH)

Bei der Autoimmunhepatitis handelt es sich um eine chronisch-entzündliche Lebererkrankung unbekannter Etiologie, die bei Kindern und Erwachsenen jeden Alters auftreten kann. Jedoch sind die meisten Patienten mit AIH weiblich. Die Diagnosestellung erfolgt mit einer Punkteskala der internationalen Autoimmunhepatitisgruppe durch differentialdiagnostischen Ausschluss anderer chronischer Lebererkrankungen und durch Erhebung laborchemischer und serologischer Parameter. Auch die histologische Sicherung durch eine Leberbiopsie wird hierfür benötigt. Charakteristika einer AIH sind der wechselnde, spontane Verlauf der Aktivität, in den meisten Fällen eine starke Erhöhung der Aminotransferase und eine deutliche Erhöhung der Serumglobuline, insbesondere der γ -Globuline. Ein Hauptkennzeichen der AIH ist das Auftreten von zirkulierenden Autoantikörpern, wie antinukleäre Antikörper (ANA), glatte Muskulatur-Antikörper (SMA) und lösliche Leberantigen / Leber-Pankreas-Autoantikörper (SLA/LP). Auch Autoantikörper gegen Leber- / Nierenmikrosomen (LKM) und Leberzytosol-Typ 1 Antikörper können nachgewiesen werden. Ein Auftreten von antimitochondrialen Antikörpern (AMA) kann auch bei einigen Patienten beobachtet werden, so dass eine Überlappung mit der Primären Biliären Zirrhose (PBC) in Betracht gezogen werden muss. Die AIH zeigt ein gutes Ansprechen auf immunsupprimierende Medikamente. Als „gold standard“ einer AIH Therapie wird deshalb eine Kombination aus Kortikosteroiden und Azathioprin angesehen. Eine unbehandelte, schwere AIH besitzt eine hohe Mortalitätsrate von 50% nach 3-5 Jahren nach Diagnosestellung [19, 20].

1.5.2 Primär biliäre Autoimmunerkrankungen

Die primär bilären Autoimmunerkrankungen werden unterteilt in die Primäre Biliäre Zirrhose (PBC) und die Primäre Sklerosierende Cholangitis (PSC).

1.5.2.1 Die Primäre Biliäre Zirrhose (PBC)

Die PBC ist eine chronische, langsam progressive Autoimmunerkrankung der Leber, die in 90% der Fälle Frauen betrifft. Die Krankheit tritt gewöhnlich in der fünften Lebensdekade auf, ein Auftreten bei Personen unter 25 ist ungewöhnlich. Erste auftretende Symptome sind Abgeschlagenheit und Pruritus. Die Mehrheit der Patienten ist bei Diagnosestellung allerdings asymptomatisch. Die Diagnose der PBC erfolgt aufgrund von drei Kriterien: Anwesenheit von antimitochondrialen Autoantikörpern im Serum, erhöhte Leberenzymwerte über mehr als sechs Monate sowie durch eine Leberbiopsie mit erkennbaren histologischen Veränderungen, die mit der Krankheit einhergehen. Die PBC zeichnet sich durch portale Entzündung und immun-vermittelte Zerstörung der intrahepatischen Gallengänge aus. Der Verlust an Gallengängen führt zu einer verminderten Sekretion an Gallenflüssigkeit und Retention von toxischen Substanzen in der Leber. Dies wiederum führt zu einer weiteren Schädigung der Leber mit dem Endstadium der Leberzirrhose und eventuellem Leberversagen. Mittel der Wahl bei der Behandlung der PBC ist die lebenslange Behandlung mit Ursodeoxycholsäure (UCDA) ab der Diagnosestellung. Eine Lebertransplantation erfolgt, wenn die medikamentöse Behandlung nicht mehr erfolgreich ist. Die Fünfjahresüberlebensrate liegt bei 85%. Unbehandelt liegt die Lebenserwartung für eine PBC bei zwölf Jahren [21-23].

1.5.2.2 Die Primäre Sklerosierende Cholangitis (PSC)

Die PSC ist ein chronisch-cholestatiches Syndrom unbekannter Etiologie. Sie gehört wie die PBC auch zu den sogenannten autoimmunen primären biliären Leberkrankheiten, obgleich keine spezifischen Immunmarker (antimitochondriale Antikörper AMA) wie bei der PBC im Blut des Patienten nachzuweisen sind. Bei einem Teil der Patienten lassen sich aber antinukleäre Antikörper nachweisen. Bei

der PSC kommt es zu krankhaften Veränderungen sowohl der in der Leber gelegenen als auch an außerhalb der Leber gelegenen abführenden Gallenwegen [24]. Ein Befall der Gallenblase ist eher selten. Im fortgeschrittenen Stadium greift die Erkrankung auf das Lebergewebe über. Es kommt zu fibrosierender, inflammatorischer Zerstörung der Gallengänge mit typischer zwiebelschalenartiger Bindegewebsablagerung um die Gallengänge. Die PSC verläuft häufig in Schüben mit dem Endstadium der Leberzirrhose. 5-10% der Patienten mit Primärer Sklerosierender Cholangitis entwickeln zusätzlich noch ein cholangiozelluläres Karzinom [25]. Die PSC findet man mit einer Prävalenz von 1-4 pro 100 000 Einwohner, wobei ca. 70% der betroffenen Personen Männer sind. Das Durchschnittsalter der Patienten mit PSC liegt bei 25-40 Jahren, allerdings können sowohl Kinder und Jugendliche als auch ältere Menschen an einer PSC erkranken [26]. Die durchschnittliche Überlebensdauer vom Zeitpunkt der Diagnosestellung liegt bei ca. 10-12 Jahren und einer Fünfjahresüberlebensrate von ca. 70%. Mit einer Häufigkeit von 80-90% ist die PSC mit einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung (inflammatory bowel disease, IBD) vergesellschaftet. In 15-20% der Fälle ist diese Erkrankung Morbus Crohn, in ca. 80% der Fälle Colitis ulcerosa [24, 26]. Symptome einer PSC sind unklare Oberbauchbeschwerden, Abgeschlagenheit, Juckreiz und Ikterus. Allerdings verläuft die Erkrankung in 30% der Fälle asymptomatisch. Die Diagnosestellung der PSC erfolgt mit Hilfe von Laborwerten. Die Patienten zeigen eine erhöhte Blutsenkungsgeschwindigkeit, deutliche Anstiege der alkalischen Phosphatase (AP) und Gammaglutamyltranspeptidase (γ -GT) sowie des Serumbilirubins. Die Diagnose wird weiterhin gestützt durch die endoskopisch retrograde Cholangio-Pankeaticographie (ERCP), mit deren Hilfe lassen sich die typischen Veränderungen an extra- und intrahepatischen Gallengängen darstellen. Die ERCP ist der „gold standard“ der PSC Diagnose [27]. Zusätzlich wird jedoch noch eine Leberbiopsie zur Bestimmung des Fibrorestadiums und des Entzündungsgrades benötigt. Um die Progression der Lebererkrankung und Entstehung der Leberzirrhose zu verhindern, wurden viele Medikamente mit unterschiedlichen Wirkmechanismen in klinischen Studien getestet. Bis heute ist bei der PSC Behandlung die Gabe von hohen Dosen Ursodesoxycholsäure (UDCA) das Mittel der Wahl. Die Behandlung mit UCDA führt zu einer Senkung der AP und γ -GT Werte sowie des Bilirubins. Die Behandlung von vorhandenen Gallengangsstenosen erfolgt durch Ballondilatation im Rahmen einer ERCP [28]. Sollte sich aufgrund

verschiedener Ursachen die PSC nicht mehr medikamentös und endoskopisch behandeln lassen, bleibt als letztes Mittel der Wahl die Lebertransplantation. 6% aller durchgeführten Lebertransplantationen werden aufgrund einer PSC durchgeführt, mit einer Dreijahresüberlebensrate von 80% [29].

1.6 Das MDR2^{-/-} Mausmodell, ein Modell einer primären Sklerosierenden Cholangitis

Bei dem MDR2^{-/-} Mausmodell handelt es sich um ein Modell, bei dem das MDR2-Gen, das sogenannte Multi-Drug-Resistance Gen, durch Einklonierung einer Neomycin-Kassette zerstört wurde [30]. Das MDR2-Gen der Maus entspricht dem humanen MDR3-Gen [31]. Das Gen kodiert für ein P-Glykoprotein, eine Flippase, in der kanalikulären Membran von Hepatozyten [32]. Dieses Transportprotein gehört zu der ATP-binding cassette (ABC) Transporterfamilie, weshalb dieses Modell auch oftmals als Abcb4^{-/-} Modell bezeichnet wird [33]. Das Transportprotein sorgt für den Transport von Phosphatidylcholin (Lecithin) in die Gallenflüssigkeit. Ein Knockout des MDR2-Gens und somit ein Fehlen des Transporters, führt zu völliger Abwesenheit von Phosphatidylcholin in der Gallenflüssigkeit [34]. Das Fehlen von Phosphatidylcholin hat die Konsequenz, dass es nicht mehr zur Bildung von gemischten Mizellen aus Phosphatidylcholin und Cholesterol kommt, die die Gallensalze einschließen [35]. Die Mizellenbildung schützt in der gesunden Leber die Cholangiozyten des Gallengangsepithels vor den detergenten Eigenschaften der Gallensalze. Ein Fehlen der Mizellen führt zur Schädigung der Cholangiozyten durch die Gallensalze, veränderten tight junctions und zu durchlässigen Gallengängen. Folgen sind eine starke Entzündungsreaktion im Portalfeld, extra- und intrahepatische Verengungen und Dilatationen sowie Proliferation der Gallengänge und eine typische zwiebelschalenartige, periduktale Fibrose [35]. Im weiteren Verlauf der Erkrankung kommt es zur weiteren Ausbreitung der Fibrose mit Brücken- und Septenbildung. Im Alter von ca. 15 Monaten entwickeln die Tiere ein hepatozelluläres Karzinom [36]. Die mikroskopischen und makroskopischen Eigenschaften dieses Modells sind gut mit den morphologischen Charakteristika einer Primären Sklerosierenden Cholangitis (PSC) beim Menschen vergleichbar [31].

1.7 Die Leberfibrose und deren Mechanismen

Unabhängig von der Art der Schädigung, ob ausgelöst durch Virusinfektion, Alkohol- und Drogenabusus oder genetisch bedingt, ist die Leberfibrose eine Wundheilungsantwort des Körpers auf die chronische Schädigung und geht mit der Ablagerung von extrazellulären Matrixproteinen einher. Das Endstadium der Fibrose, die Zirrhose, gleich welcher Etiologie, zeichnet sich durch den Umbau der Leberarchitektur mit der Ausbildung von Septen aus. Diese Veränderungen verschlechtern die Leberfunktion und können zu portaler Hypertension führen [1, 37]. Während der Fibrogenese kommt es zu einer dramatischen Veränderung in der Qualität, Quantität und Verteilung der ECM. Eine zirrhotische Leber enthält sechsmal mehr Kollagen und Proteoglykane als eine gesunde Leber. Es kommt vor allem zu einer Umverteilung bei dem abgelagerten Kollagen. Kollagen mit geringer Dichte, wie Kollagen IV, wird durch die fibrillären Kollagene des Typs I und III ersetzt. Aber auch das Ungleichgewicht zwischen Synthese und Abbau spielt eine entscheidende Rolle. Der Matrixabbau erfolgt durch Matrixmetalloproteinasen (MMPs), diese können durch tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) gebunden und inhibiert werden. In der fibrotischen Leber kommt es zu einer dramatischen Hochregulation der TIMP mRNA und des Proteingehalts, während die Level der MMPs nahezu gleich bleiben [38]. Eine Ausnahme bildet hierbei MMP-2, deren Expression während der Fibrogenese zunimmt. Diese Matrixmetalloproteinase ist an der Degradation von normaler ECM beteiligt und sorgt so zusätzlich für den Umbau der Leberarchitektur [39]. Das Muster, das eine Fibrose beim Fortschreiten der Krankheit ausbildet, wird in erster Linie durch die Art der Schädigung bestimmt. Es können zwei verschiedene Formen unterschieden werden. Zum einen die portal-basierenden Fibrosen, wie sie bei chronischen viralen Hepatitiden und chronischen cholestatischen Erkrankungen vorkommen, zum anderen die zentral-basierende Fibrose, wie sie z.B. bei einer Steatohepatitis beschrieben wird. Desweiteren lassen sich die Septen je nach Ausbildung in verschiedene Kategorien unterteilen, porto-portale Septen wie bei cholestatischen Lebererkrankungen oder porto-zentrale Septen bei viralen Hepatitiden sowie zentral-portale Septenbildung bei alkoholischen Lebererkrankungen [37]. Verschiedenste Stimuli sind an der Initiation einer Leberfibrose beteiligt, zu diesen gehören oxidativer Stress, Hypoxie, Entzündungs- und Immunantworten sowie Apoptose und Steatose. Die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in geschädigten Mitochondrien der Hepatozyten, aktivierten

Entzündungszellen oder Produkten des Cytochrom P450 Systems [40, 41] führt zu Apoptose von Hepatozyten, stimuliert Kupfferzellen zur Produktion von profibrogenen Mediatoren und regt die hepatischen Sternzellen zur Proliferation an [42]. Entzündungsreaktionen sind dabei sowohl an der Initiation als auch an der Aufrechterhaltung der Fibrose beteiligt. Eine weitere wichtige Rolle bei der Initiation der Fibrose spielt die Apoptose. Sie ist ein allgemeines Merkmal chronischer Leberschädigungen [43]. Der Untergang von Hepatozyten führt zur Bildung von Apoptosekörperchen, die phagozytiert werden. Nach der Phagozytose durch Kupfferzellen kommt es zur Ausschüttung des proinflammatorischen Zytokins TNF- α [44]. Nach Phagozytose durch hepatische Sternzellen reagieren diese mit Ausschüttung von ROS und Hochregulation von TGF- β sowie Kollagen I [45].

Der Prozess der Leberfibrogenese resultiert vor allem aus der Proliferation und Ablagerung von myofibroblastischen Zellen, aber auch andere Zellen wie Fibroblasten sind an der Fibrogenese beteiligt. Die myofibroblastischen Zellen stammen von verschiedenen Populationen ab. Lokale Quellen in der Leber sind hepatischen Sternzellen und portale mesenchymale Zellen, aber auch von außerhalb der Leber eingewanderte Fibrozyten sind beteiligt. Zellen, die durch epitheliale-mesenchymale Transdifferenzierung entstanden sind, tragen ebenfalls zur Fibrogenese bei. Eine gemeinsame Eigenschaft dieser Zellen ist die Expression von α -smooth muscle actin als Marker. Die zentrale Rolle in der Fibroseentwicklung bei den meisten chronischen Schädigungen nehmen jedoch die hepatischen Sternzellen ein [37]. Die beschriebenen Vorgänge sind in Abb. 1 dargestellt.

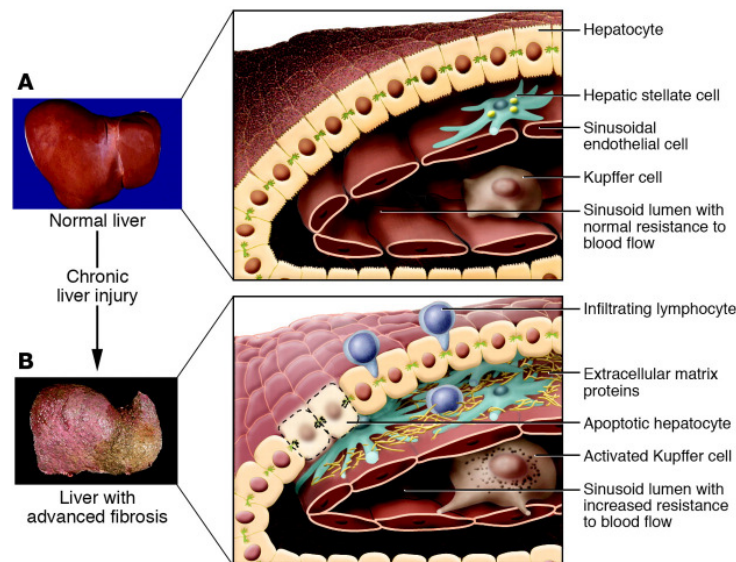


Abb. 1 Veränderungen der Leberarchitektur von der normalen Leber (A) hin zur zirrhotischen Leber (B). Durch chronische Schädigung kommt es zur Einwanderung von Entzündungszellen ins Parenchym, Aktivierung von Kupfferzellen und Apoptose von Hepatozyten. Die Freisetzung von fibrogenen Mediatoren führt zur Aktivierung von hepatischen Sternzellen und Ablagerung von extrazellulären Matrixproteinen [1].

1.8 Der zentrale Zelltyp der Leberfibrogenese: Die hepatischen Sternzellen

Bei den meisten Formen der Leberfibrose spielen hepatische Sternzellen die entscheidende Rolle. Ausgenommen sind die autoimmunen Lebererkrankungen wie z.B. die PSC. Bei ihnen sind Myofibroblasten und Fibroblasten die wichtigsten Zellen. Die hepatischen Sternzellen, auch bekannt als Itozellen, Lipozyten, perisinusoidale Zellen oder Fettspeicherzellen, machen bis zu 15% der in der Leber vorhandenen Zellen aus [2]. In der gesunden Leber sind sie im perisinusoidalen Disséschen Raum lokalisiert und sind der Hauptspeicherort für Vitamin A [46]. Bei einer Schädigung der Leber transdifferenzieren die hepatischen Sternzellen in einen myofibroblastischen Zelltyp. Dieser Vorgang wird als Aktivierung bezeichnet [47]. Die oben beschriebenen Stimuli initiieren diese Aktivierung. Die Folge der Aktivierung ist erhöhtes Ansprechen auf parakrine Stimuli durch Hochregulation von Plasmamembranrezeptoren und eine verstärkte Proliferation der hepatischen Sternzellen. Die Aufrechterhaltung der Aktivierung der hepatischen Sternzellen (Perpetuation) erfolgt dann sowohl über autokrine als auch parakrine Mechanismen und kann in verschiedene teilweise gleichzeitig ablaufende Ereignisse eingeteilt werden.

- (1) Vitamin A Verlust: Aktivierte hepatische Sternzellen zeichnen sich durch einen Verlust ihrer Vitamin A Speicherkapazität aus. Es ist nicht geklärt, ob dieser Vorgang eine Voraussetzung für eine Aktivierung der Sternzellen darstellt.
- (2) Proliferation: Der potenteste proliferative Faktor ist der platelet-derived growth factor (PDGF). Bei einer Leberschädigung kommt es sowohl zu einer autokrinen PDGF Produktion als auch zu einer Hochregulation der PDGF-Rezeptoren. Aber auch weitere Faktoren wie fibroblast growth factor (FGF) und vascular endothelial growth factor (VEGF) spielen bei der Proliferation der hepatischen Sternzellen eine Rolle.
- (3) Chemotaxis und Migration: Die zielgerichtete Einwanderung von hepatischen Sternzellen verstärkt deren Akkumulation im geschädigten Gewebe. Wichtige Botenstoffe der Chemotaxis sind PDGF und das monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1).
- (4) Matrixumbau: Aktivierte hepatische Sternzellen exprimieren alle notwendigen Komponenten für einen Matrixumbau. Sie sind die Hauptquelle für die Expression der Matrixmetalloproteinase-2, exprimieren aber auch TIMP-1 und TIMP-2 und tragen so zu einem schnellen ECM-Umbau bei.
- (5) Zytokinausschüttung und Leukozyteneinwanderung: Die Ausschüttung pro-inflammatorischer, profibrotischer und promitogener Zytokine ist ein wichtiger Faktor um die Aktivierung der hepatischen Sternzellen aufrechtzuerhalten. Nahezu alle Prozesse sind durch die Zytokinausschüttung autokrin gesteuert. Die Ausschüttung vom MCP-1 führt zur vermehrten Einwanderung von Entzündungszellen und verstärkt so zusätzlich die EMC Produktion durch deren TGF- β und PDGF Freisetzung.
- (6) Fibrogenese: TGF- β ist der wichtigste Mediator in der Leberfibrogenese. Von Entzündungszellen sezerniertes TGF- β induziert die eigene TGF- β Produktion der Sternzellen und unterhält so deren Aktivierung und fördert die Produktion von ECM, besonders von Kollagenen
- (7) Kontraktilität: Die Kontraktilität der hepatischen Sternzellen leistet einen hohen Beitrag zur Verengung der Sinusoide und führt zu vermindertem Blutfluss und erhöhtem portalem Widerstand. Der Hauptmediator zur Kontraktion der hepatischen Sternzellen ist Endothelin-1. In aktivierten hepatischen Sternzellen sind sowohl die Expression von Endothelin-1 als auch die Expression des Endothelin-Converting-

Enzymes-1 (ECE1) hochreguliert. Desweiteren ist Endothelin-1 ein potenter Mediator der Sternzellen-Proliferation. [1-3, 37].

Die zuvor beschriebenen Vorgänge sind in Abb. 2 zusammenfassend dargestellt.

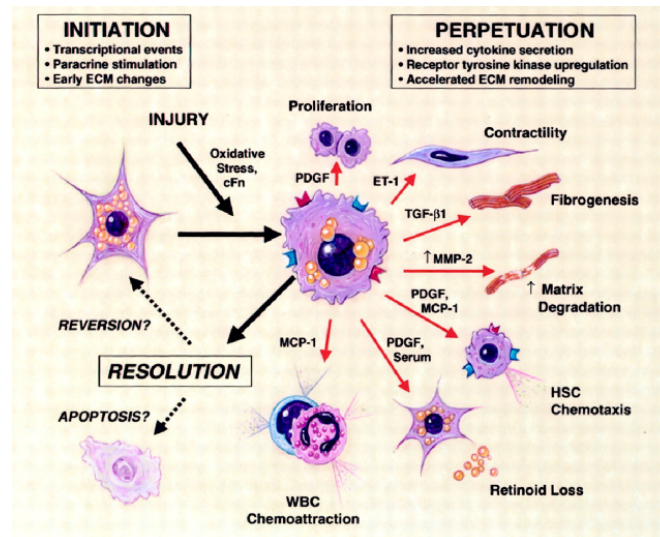


Abb. 2 Phenotypische Veränderungen der hepatischen Sternzellen nach Leberschädigung. Nach Initiation der Aktivierung z.B. durch ROS kommt es zum Übergang vom Vitamin A-reichen, ruhenden Zustand in einen proliferativen, fibrogenen, kontraktilen myofibroblastischen Zustand und Sekretion der dargestellten Mediatoren [2].

1.9 Die Rolle von vasokonstriktorisches Faktoren und des Sympathikus in der Fibrogenese

Neben proinflammatorischen Zytokinen und profibrogenen Mediatoren sind auch vasokonstriktorisches Mediatoren an den myofibroblastischen Transdifferenzierungsprozessen und der Fibrogenese beteiligt. Dies sind sowohl das zuvor erwähnte Endothelin-1 (zusammengefasst in [48-50]) als auch das Angiotensin II, der Haupteffektor des Renin-Angiotensin-Systems (RAS) [51]. In der klassischen Rolle dient das RAS als endokrines System der Aufrechterhaltung des arteriellen Blutdrucks. Angiotensin II entsteht dabei durch Spaltung des Präkursorproteins Angiotensinogen. Dieses wird in der Leber hauptsächlich von Hepatozyten synthetisiert, in den Blutstrom abgegeben und durch Renin und das Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) über das Zwischenprodukt Angiotensin I gespalten. Das entstandene Angiotensin II bindet an AT-1 Rezeptor und induziert so eine Vasokonstriktion der Gefäße [52, 53]. Die Hauptquelle von Angiotensinogen in der Leber ist der Hepatozyt, aber auch Kupferzellen und Gallengangsepithelzellen

produzieren geringe Mengen Angiotensinogen [53]. Das Angiotensin-Converting-Enzym und AT-1 Rezeptoren werden in der gesunden Leber hauptsächlich von vaskulärem Endothel exprimiert, sind aber auch auf Hepatozyten und Gallengangsepithelzellen zu finden [53]. In der geschädigten Leber, nach Aktivierung von hepatischen Sternzellen, exprimieren diese alle Komponenten des RAS, wie Angiotensinogen, Renin, ACE und AT-1 Rezeptoren [54].

Das sympathische Nervensystem ist einer der Hauptregulatoren der Renin-Sekretion des systemischen RAS. Die Aktivierung des sympathischen Nervensystems führt zur Freisetzung von Renin aus den juxtaglomerulären Zellen der Niere. Diese Regulation erfolgt über β 1-Adrenozeptoren [55]. Die Verminderung der Renin-Sekretion durch Blockade des sympathischen Nervensystems mit dem unselektiven β -Blocker Propranolol könnte so zu einer Hemmung der RAS-Kaskade und zu einem erniedrigten Angiotensin I- bzw. Angiotensin II-Spiegel führen. Somit könnte die Propranolol-Behandlung zu verminderter profibrotischer und proinflammatorischer Aktivität in der Leber führen und zu einem milderem Verlauf einer Leberfibrose beitragen.

Des Weiteren hat das sympathische Nervensystem direkten Einfluss auf hepatische Sternzellen und die Progression sinusoidaler Fibrosen. Frühe Zellkulturarbeiten der Arbeitsgruppe Diehl *et al.* zeigen die Expression von Adrenozeptoren auf hepatischen Sternzellen sowie den wachstumsfördernden Effekt des Neurotransmitters Noradrenalin auf diese Zellen [56]. Auch *in vivo* konnte von der Arbeitsgruppe in verschiedenen Tiermodellen sinusoidaler Fibrosen der proliferative und fibroseinduzierende Effekt des sympathischen Nervensystems gezeigt werden [57]. Eine chemische Sympathektomie hingegen führte im Tetrachlorkohlenstoff-induzierten sinusoidalen Fibrosemodell zu einer deutlichen Reduktion der fibrotischen Bereiche und der Kollagensynthese [58].

1.10 Die Rolle von microRNAs in der Genexpression

In früheren Arbeiten [1, 2, 59] konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von hepatischen Sternzellen nicht nur mit dem Verlust von Vitamin A, vermehrter Proliferation und Migration einhergeht, sondern auch, wie bereits in Kapitel 1.8 dargestellt, mit einem veränderten Genexpressionsprofil verbunden ist, das durch ein fibrogenes Wachstumsfaktoren- und Signalmuster gekennzeichnet ist. Die initialen

Faktoren, die zu einem veränderten Expressionsprofil führen, sind jedoch nur ansatzweise bekannt.

Eine wichtige Rolle in der Regulation der Gene auf post-transkriptioneller Ebene spielen die microRNAs (miRNAs). [60]. Diese sind unter anderem an der Regulation des Zelluntergangs und der Proliferation, der Differenzierung und Entwicklung, dem Metabolismus, Immunantworten, viralen Infektionen sowie der Karzinogenese beteiligt [61]. MicroRNAs sind zwischen 19 und 22 Nukleotide umfassende, einzelsträngige, endogene und nicht-kodierende RNA-Moleküle. Die ersten microRNA, *lin-4* und *let-7*, wurden 1991 im Nematoden *Caenorhabditis elegans* beschrieben [62]. Sie spielen bei der Larvenentwicklung von *C. elegans* eine entscheidende Rolle und regulieren Lin-14 und Lin-28 bzw. werden von ihnen reguliert [62-64]. Mittlerweile wurden miRNAs in über 80 Spezies identifiziert. In der miRBase-Datenbank (<http://microrna.sanger.ac.uk>) sind derzeit über 850 humane microRNAs gelistet. Die Synthese der meisten microRNAs erfolgt durch eine RNA-Polymerase II als lange primäre miRNA-Transkripte (pri-miRNA), die über 1000 Nukleotide lang sein können und eine Haarnadelstruktur ausbilden. Im Kern werden die pri-miRNAs durch die RNase III Drosha zu ca. 70-100 Nukleotide langen precursor-miRNAs (pre-miRNA) prozessiert und anschließend durch Exportin-5 aus dem Kern ausgeschleust. Die weitere Prozessierung durch Dicer, ebenfalls eine RNase III, führt zur reifen, 19-22 Nukleotide langen microRNA. Die reife microRNA kann nun in den RNA-induced silencing complex (RISC) inkorporiert werden und an die 3'UTR der Ziel-mRNA binden. Der Mechanismus der mRNA Regulation ist abhängig von der Komplementarität mit der microRNA und der mRNA. Eine vollständig komplementäre Bindung der microRNA führt zur Degradation der mRNA, während die limitierte Bindung der sogenannten seed-Region (7-8 Nukleotide) zu einer Blockade der mRNA-Translation an den Ribosomen führt [60, 61, 65]. Der Vorgang der microRNA Prozessierung und der microRNA-Funktion ist schematisch in Abb. 3 zusammengefasst.

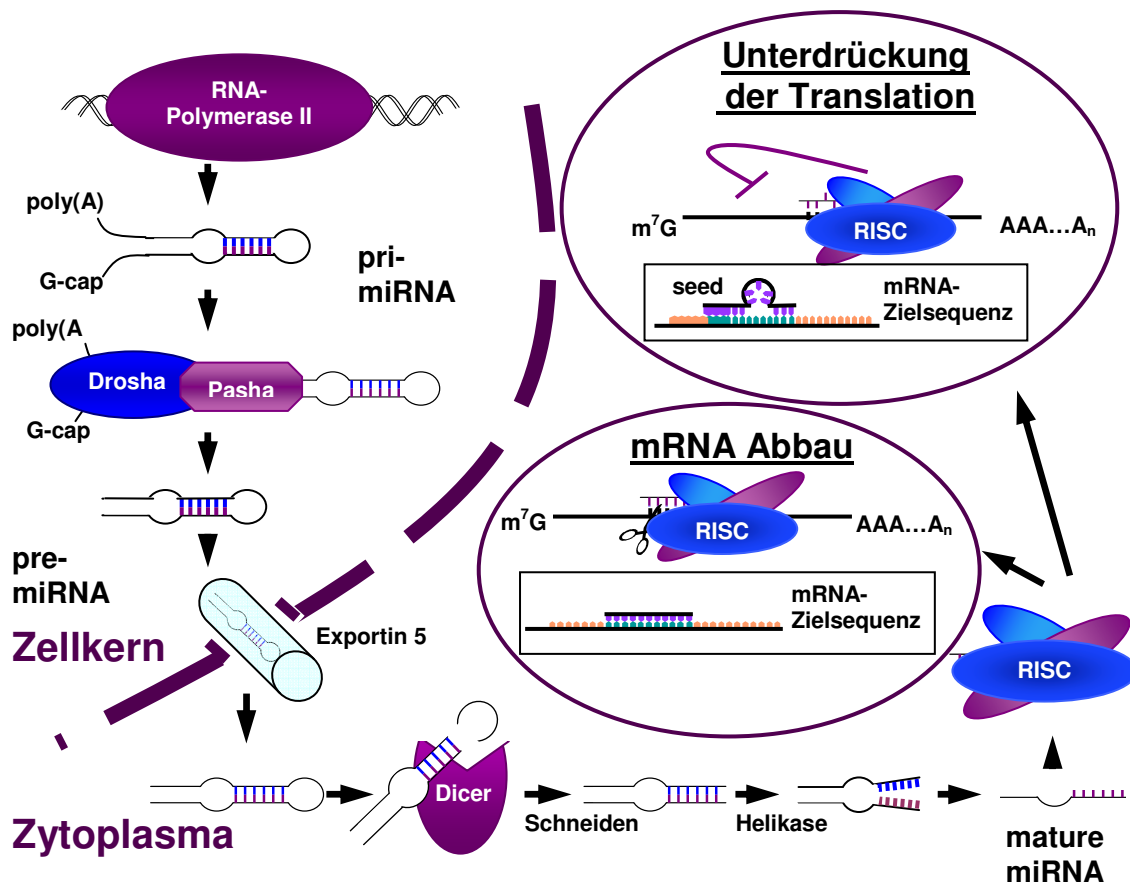


Abb. 3 Schematische Darstellung der microRNA Biogenese sowie der Mechanismen der post-transkriptionellen mRNA-Hemmung. Zusammengestellt aus [60, 61, 65].

Durch ihren großen Einfluss auf die Genregulation stellt die Beeinflussung der microRNA-Expression möglicherweise eine neue Therapieform zur Behandlung schwerer chronischer Krankheiten, auch in der Leberfibrogenese, dar. Ein Problem ist jedoch, dass die Bindung der microRNA an die mRNA nur von einer sehr kurzen Sequenz, der seed-Region (7-8 Nukleotide) abhängig ist, so dass eine mRNA von vielen verschiedenen microRNAs reguliert wird und eine microRNA viele verschiedene mRNAs reguliert.

1.11 Zielsetzung

Für die Behandlung einer chronischen Lebererkrankung steht bislang keine spezifische Therapie zur Verfügung. Therapieansätze beschränken sich lediglich auf das Ausschalten der schädigenden Noxe. In Vorarbeiten der jüngsten Vergangenheit konnte in einzelnen Studien der Einfluss des sympathischen Nervensystems auf die Progression der sinusoidalen Leberfibrose gezeigt werden. Da die PSC eine Erkrankung der Gallengänge mit schwerwiegenden Folgen wie der periportalen Leberfibrose und letztendlich des cholangiolären Karzinzinoms ist, sollte der Einfluß des sympathischen Nervensystems auf die sich nicht sinusoidal ausbreitende PSC überprüft werden.

Das Ziel der vorgelegten Arbeit war daher, die Auswirkungen von β -Adrenozeptor-Antagonisten als klassische Arzneimitteltherapie in einem nicht-sinusoidalen Fibrosemodell zu untersuchen. Zuerst sollte die periportale Fibrose in MDR2^{-/-} Mäusen charakterisiert und im nächsten Schritt die MDR2^{-/-} Mäuse mit dem unselektiven β -Blocker Propranolol behandelt werden. Die entnommenen Gewebeproben sollten mit Hilfe histologischer, molekularbiologischer und biochemischer Methoden auf mögliche Therapieerfolge und Änderungen in der Genexpression wichtiger Markergene und Mediatoren untersucht werden.

Da microRNAs durch post-transkriptionelle Hemmung von Transkripten massiv in die Regulation von Genen eingreifen, sollte in einem weiteren Ansatz die Rolle von microRNAs während der Fibrogenese untersucht werden. Dafür sollte der myofibroblastische Transdifferenzierungsprozess hepatischer Sternzellen als zentraler zellulärer Mechanismus der Leberfibrogenese herangezogen werden und ein divergentes microRNA Profil identifiziert werden. Divergent exprimierte microRNAs sollten anschließend auf ihre Expression *in vivo* im experimentellen Fibrosemodell und in einem charakterisierten humanen Gewebekollektiv chronischer Hepatitis C untersucht werden. Um die Rolle differentiell exprimierter microRNAs in der Leberfibrogenese zu charakterisieren, sollte von einer ausgewählten microRNA die transkriptionellen Zieldomänen gesucht werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

Alle verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht gesondert aufgeführt, von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Deisenhofen) und Roth (Karlsruhe) in *pro analysi* (p.A.) Qualität bezogen.

Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße wurden von der Firma Biozym (Hess. Oldendorf) oder der Firma Eppendorf (Hamburg) bezogen. 15 ml- bzw. 50 ml- Polypropylenröhrchen (nachfolgend als Falcons bezeichnet) sowie Petrischalen für die Bakterienkultur wurden von der Firma Greiner (Nürtingen) und der Firma Falcon (Heidelberg) geliefert. Verwendete Plastikwaren für die Zellkultur stammten von den Firmen Falcon oder TPP (Trasadingen, Schweiz).

Der Ansatz von Lösungen erfolgte, falls nicht anders vermerkt, mit deionisiertem Wasser aus einer Elga Purelab Anlage (ELGA Berkefeld, Celle).

Lösungen und Materialien wurden im Autoklaven (H+P Labortechnik, München) bei 121 °C und 1,2 bar in feuchter Hitze für 20 Minuten autoklaviert.

Glas- und Metallgeräte wurden vor der Verwendung fünf Stunden im Trockenschrank (Memmert, Schwabach) bei 180 °C gebacken.

Die verwendeten Oligonukleotide und Sonden wurden von den Firmen Eurofins MWG Operon (Ebersberg) und Metabion (Martinsried) synthetisiert und waren HPLC aufgereinigt.

Alle Zentrifugationsschritte wurden, falls nicht gesondert aufgeführt in einer Eppendorf Tischzentrifuge Typ 5417 (Hamburg) durchgeführt.

2.1.1 Lösungen und Medien

Die in Kapitel 2.1.1.1. bis 2.1.1.3 beschriebenen Lösungen und Medien wurden im Verlauf der Arbeiten verwendet.

2.1.1.1 Lösungen und Puffer für die Bakterienkultur

In der Bakterienkultur wurden folgende Lösungen und Puffer verwendet:

LB-Medium:	1% [w/v]	Bacto-Trypton (Fluka, Seelze)
	0,5% [w/v]	Bacto-Hefeextrakt (Difco, Sparks, USA)
	1% [w/v]	NaCl
		mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt

SOC-Medium:	2% [w/v]	Bacto-Trypton
	0,5% [w/v]	Bacto-Hefeextrakt
	10 mM	NaCl
	2,5 mM	KCl
	10 mM	MgSO ₄
	20 mM	Glucose

Antibiotika:	Stammlösung:	Arbeitskonzentration:
Ampicillin	100 mg/ml in H ₂ O	100 µg/ml Medium
Kanamycin	30 mg/ml in H ₂ O	30 µg/ml Medium

Kulturmedium:	LB-Medium mit Antibiotikum
---------------	----------------------------

Agar-Platten:	Kulturmedium mit 15 g/l Agar (Difco, Sparks, USA)
---------------	---

2xTSS:	20% [w/v]	PEG 8000
	10% [v/v]	DMSO in LB-Medium
	70 mM	MgCl ₂

1xTSS:	50%	2xTSS
	50%	LB-Medium
Dimerisierungspuffer:	TRIS	50 mM
	NaCl	300 mM
	EDTA	2 mM

2.1.1.2 Lösungen und Puffer in der Zellkultur

Nachstehende Lösungen und Puffer wurden in der Zellkultur eingesetzt:

1x PBS	7,4 g	NaCl
	1,42 g	Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O
	0,362 g	NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O
	ad 1000 ml	dH ₂ O
		pH7,4
Trypsinlösung	0,05% [w/v]	Trypsin (Invitrogen, Karlsruhe)
	0,5 mM	EDTA in PBS
FCS:	30 min bei 56 °C Hitze inaktiviert, Lagerung bei -20 °C	
Grundmedium:	Dulbecco's Modified Eagle's Medium high glucose:	
	4500 mg/l D-Glucose	
	584 mg/l L-Glutamin	
	110 mg/l Natriumpyruvat	
Kulturmedien:	Grundmedium mit unterschiedlichen Zusätzen an FCS:	
	0,5-10% [v/v] FCS	
Einfriermedium:	Grundmedium mit folgenden Zusätzen:	
	10% [v/v] FCS 5-10% [v/v] DMSO	
Transfektionsmedium:	Opti-Mem (Invitrogen, Karlsruhe)	

Trypanblau-Lösung: 0,4% (w/v) (Sigma, Deisendorf)

1x HBSS 100 ml 10x HBSS (Gibco, Karlsruhe)
ad 1000 ml dH₂O

Die in Tab. 1 angegebenen Lösungen wurden zur Isolierung von hepatischen Sternzellen verwendet.

Tab. 1 Gebrauchslösung zur Isolierung hepatischer Sternzellen

GBSS	1. Perfusionslösung	2. Perfusionslösung	
135 mM NaCl	300 ml GBSS	300 ml GBSS	
5 mM Glukose	+ 150 mg Pronase E	+ 120 mg Pronase E	
0,5 mM MgSO ₄	+ 120 mg Collagenase A	+ 120 mg Collagenase A	
1 mM MgCl ₂	+ 18 mg DNase grade		
2,7 mM NaHCO ₃	GBSS + 0,6 mM EGTA	GBSS + BSA	Optiprep-Puffer 40%
0,8 mM Na ₂ HPO ₄		500 ml GBSS	60% Optiprep + 1x HBSS (2:3)
0,1 mM KH ₂ PO ₄		+ 1,25 g BSA	
5 mM KCl			
5 mM HEPES			

1x TBS 10 mM Tris-HCl, pH 8.8
150 mM NaCl

Milchpulver-Lösung: 1x TBS
0,05% Tween-20
5% Magermilchpulver

DABCO-Mowiol-Lösung 2,4 g Mowiol 4-88 (Roth, Karlsruhe)
25 mg/ml DABCO (Roth, Karlsruhe)
6,0 g Glycerin
2,0 ml 0,2 M Tris-HCl (pH 8,5)
6,0 ml Wasser

2.1.1.3 Sonstige Lösungen

Nachstehende Lösungen wurden verwendet:

Proteinase K-Puffer	50 mM	Tris-HCl pH 7,4
	5 mM	EDTA pH 8
DNase-Mix	20 µl	Wasser
	1 µl	RNase-Inhibitor (40 U/µl) (Fermentas, St.Leon-Rot)
	1 µl	DNase (10 U/µl) (Roche Mannheim)
	1 µl	MgCl ₂
1x TAE	40 mM	Tris-Base
	20 mM	Eisessig
	1,25 mM	EDTA; pH 8,0
Ethidiumbromidlösung:	10 mg/ml	Amersham Biosciences (Uppsala, Schweden)
1x TE-Puffer:	10 mM	Tris-HCl pH 7,4
	1 mM	EDTA
	ad 1000 ml	Wasser
tRNA-Lösung (50 ng/µl):	5 µl	phenolextrahierte Hefe tRNA (10mg/ml) (Invitrogen, Karlsruhe)
	ad 1000 µl	DNase-freies Wasser

2.1.2 Reagenzzusammenstellungen

Es wurden die folgenden Reagenzzusammenstellungen verwendet:

BigDye Terminator Sequencing Kit v.3.1	Applied Biosystems (Foster City, USA)
Dual-Luciferase Reporter Assay System	Promega (Madison, USA)
Fast-Plasmid Mini Kit	Eppendorf (Hamburg)
Lipofectamine 2000	Invitrogen (Karlsruhe)
miRNEasy Kit	Qiagen (Hilden)
Nucleobond PC-100	Macherey & Nagel (Düren)
Nucleospin RNA II Kit	Macherey & Nagel (Düren)
Nucleospin RNA XS Kit	Macherey & Nagel (Düren)
Perfectprep Gel Cleanup Kit	Eppendorf (Hamburg)
Phase-Lock Gel Heavy 2,0 Kit	Eppendorf (Hamburg)
Puregene DNA Isolation Kit	Gentra (Minneapolis, USA)

2.1.3 Oligonukleotide

Es wurden die in Tab. 2 aufgelisteten Primer und Sonden in der PCR (siehe Kap. 2.2.4) verwendet.

Tab. 2 Primer und Sonden

Nr.	Zielsequenz	Spezies	Sequenz
26	β-Actin	Maus	CTA GAC TTC GAG CAG GAG ATG GC
28			GAA TGT AGT TTC ATG GAT GCC AC
29			FAM-CAG CCT TCC TTC CTG GGT ATG GAA TCC-TAMRA
127	HPRT	Maus	TCC TCC TCA GAC CGC TTT T
128			CCT GGT TCA TCA TCG CTA ATC
208	α-SMA	Maus	ACT CTC TTC CAG CCA TCT TTC A
209			ATA GGT GGT TTC GTG GAT GC
178	Angio- tensinogen	Maus	CGG AGG CAA ATC TGA ACA AC
179			TCC TCC TCT CCT GCT TTG AG
111	AT-1 R	Maus	TGA AGC CAG TAC CAG CTC TGC
113			GCT GTG AGT TAT CCA GAC AAA ATG
112			FAM-CTC TCC CAG CTC TGC TGC TCT CCC-TAMRA

1	ET-1	Maus	TAT TTT CCC GTG ATC TTC TCT CTG
2			CTC TGC ACT CCA TTC TCA GCT C
3			FAM-CTG TCT TGG GAG CCG AAC TCA GCA CC-TAMRA
40	ET-R-A	Maus	GAT CGC CCT TAG TGA GCA CCT
41			CGG TTC TTA TCC ATC TCA TCA TAT ACA
39			FAM-TGC TGG TTC CCT CTT CAC TTA AGC CG-TAMRA
4	ET-R-B	Maus	CTC CAC GCT GCT AAG AAT CAT C
5			GCA GTA GGT CTC CCA GAG CCA G
6			FAM-GCA ATG GTC CCA ATA TCT TGA TCG CCA GT-TAMRA
152	COL1A1	Maus	CAT GTT CAG CTT TGT GGA CCT
153			GCA GCT GAC TTC AGG GAT GT
154	TGF- β	Maus	TGG AGC AAC ATG TGG AAC TC
155			GTC AGC AGC CGG TTA CCA
174	TNF- α	Maus	CTG TAG CCC ACG TCG TAG C
175			TTG AGA TCC ATG CCG TTG
176	CTGF	Maus	TGA CCT GGA GGA AAA CAT TAA GA
177			AGC CCT GTA TGT CTT CAC ACT G
315	LIN-28	Maus	ACA TGC AGA AGC GAA GAT CC
316			CCT TGG CAT GAT GGT CTAG C
317	SOX-2	Maus	TGC TGC CTC TTT AAG ACT AGG G
318			TCG GGC TCC AAA CTT CTC T
319	OCT3/4	Maus	GTT GGA GAA GGT GGA ACC AA
320			CTC CTT CTG CAG GGC TTT C
321	KLF4	Maus	CGG GAA GGG AGA AGA CAC T
322			GAG TTC CTC ACG CCA ACG
323	Nanog	Maus	TTC TTG CTT ACA AGG GTC TGC
324			AGA GGA AGG GCG AGG AGA
325	c-Myc	Maus	CCT AGT GCT GCA TGA GGA GA
326			TCT TCC TCA TCT TCT TGC TCT TC
129	HPRT	Ratte	GAC CGG TTC TGT CAT GTC G
130			ACC TGG TTC ATC ATC ACT AAT CAC
182	Albumin	Ratte	GAT TTG GAG AGA GAG CCT TCA A
183			CTG CGA ACT CAG CAT TGG
186	CD31/PECAM	Ratte	CTC AGT CGG CTG ACA AGA TG
187			AGG CTT GCA TAG AGC AGC AT
184	CD68	Ratte	CTT TCT CCA GCA ATT CAC CTG
185			ACT GGC GCA AGA GAA GCA
329	CD163/ED2	Ratte	CTG GCG TGA CAT GTT CTG AT
330			ATC TCC ACC TCC ACC ATC C
271	LIN-28	Ratte	CCG GTG GAC GTC TTT GTG
272			AGT GAC GCG GAT GGA CTC TA

Die folgenden Oligonukleotide (Tab. 3) wurden zur Dimerisierung und Insertion in ein Plasmid verwendet.

Tab. 3 Oligonukleotide zur Dimerisierung und Insertion in ein Plasmid

Nr.	Name	Sequenz
1	LIN-28 3'UTR F	TCG AGC AGG TAC ATG AGC AAT CTC AGG GAT AGC
2	LIN-28 3'UTR R	GGC CGC TAT CCC TGA GAT TGC TCA TGT ACC TGC
3	LIN-28 3'UTR Mut F	TCG AGC AGG TAC ATG AGC AAT CGC AGA GAT AGC
4	LIN-28 3'UTR Mut R	GGC CGC TAT CTC TGC GAT TGC TCA TGT ACC TGC

Die in Tab. 4 aufgelisteten Oligonukleotide wurden zur RNA-Interferenz (RNAi) verwendet.

Tab. 4 Oligonukleotide zur Verwendung in der Zellkultur

Nr.	Name	Sequenz
1	miR-125b Mimik	UCC CUG AGA CCC UAA CUU GUG A
2	LNA-125b	FITC-TCA CAA GTT AGG GTC TCA GGG A
3	LNA-Scrambled	FITC-GTG TAA CAC GTC TAT ACG CCA
4	Luciferase-GL2-siRNA	CY3-CGU ACG CGG AUA ACU UCG ATT

miR-125b Mimik wurde von der Firma Thermo Scientific (Waltham, USA) bezogen, LNA-125b und LNA-Scrambled wurden von Exiqon (Vedbaek, Dänemark) geliefert und die Luciferase-GL2-siRNA wurde von Eurofins MWG Operon (Ebersberg) synthetisiert. Die Position der Locked-Nukleotide-Acids (LNA) in den Oligonukleotiden Nummer 2 und 3 wurde von der Herstellerfirma nicht angegeben.

2.1.4 Vektoren

Die in der folgenden Tab. 5 aufgeführten Vektoren wurden in dieser Arbeit verwendet.

Tab. 5 Verwendete Vektoren

Nr.	Name	Hersteller
1	psiCHECK-2	Promega (Madison,USA)
2	p125b-Sensor	Freundliche Gabe von G.Wulzyn, Institut für Zellbiologie und Neurobiologie, Charité, Berlin [66]

2.1.5 Bakterienstämme

Escherichia coli DH5 α : F- ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17*(rk-, mk+) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 tonA*

2.1.6 Software

Bei der Durchführung der vorliegenden Arbeit wurde die in Tab. 6 aufgelistete Software verwendet:

Tab. 6 Verwendete Software

Name	Version	Hersteller
DNASIS@MAX	2.0	Hitachi Software Engineering (Tokio, Japan)
Redasoft Plasmid	1.1	Redasoft (Toronto, Kanada)
NetPrimer	http://www.premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch/netprlaunch.html	Premier Biosoft (Palo Alto, USA)
CLC Sequence viewer	6.02	CLC bio (Aarhus, Dänemark)
MxPro	4.00	Stratagene (La Jolla, USA)
IQ5	2.0	Biorad (Hercules, USA)
DeVision G	2.0	Decon Science Tec (Hohengandern)
cell^P	2.5	Olympus Soft Imaging Solutions (Münster)
SPSS Statistics	17.0	SPSS Software (München)

2.2 Methoden

2.2.1 Tierexperimenteller Teil

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche erfolgten gemäß § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes nach Erteilung der Genehmigung zur Vornahme von Versuchen an lebenden Wirbeltieren für das Versuchsvorhaben 50.203.2-K22, 24/05, die am 19.07.2005 von der Bezirksregierung Köln erteilt und am 24.09.2006 erweitert wurde.

2.2.1.1 Versuchstiere

Bei den verwendeten Versuchstieren handelte es sich sowohl um männliche, als auch weibliche Balb/c MDR2-knockout-Mäuse [30]. Die MDR2^{-/-} Mäuse wurden zur Züchtung für diese Arbeit freundlicherweise von Professor Dr. Frank Lammert (Klinik für Innere Medizin II - Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar) zur Verfügung gestellt. Balb/c Wildtyp-Tiere wurden von der klinikseigenen Tierhaltung des Instituts für Physiologie der Universitätsklinik Köln bezogen.

Die zur Isolierung hepatischer Sternzellen verwendeten Wistar-Ratten wurden von der Firma Harlan Winkelmann (Borchen) bezogen. Es handelte sich dabei um männliche „retired breeder“ mit einem Gewicht von über 400 g.

2.2.1.2 Tierhaltung

Die Haltung und Zucht der Mäuse und Ratten erfolgte in einer Barrieretierhaltung am Institut für Pathologie der Uniklinik Köln. Die Tiere wurden in einem 12 Stunden Tag-Nachtzyklus bei einer Raumtemperatur von 21-22°C und einer Luftfeuchtigkeit von 65% gehalten. Die Versorgung mit Wasser und Futter erfolgte *ad libitum*.

2.2.1.3 Futter

Bei dem verabreichten Futter handelte es sich um die Standardhaltungsdiät 1620 für Nager der Firma Altromin (Lage). Die verwendete Spezialfuttermischung wurde ebenfalls von der Firma Altromin bezogen. Hierfür wurde der Standardhaltungsdiät

1620 zusätzlich 300 mg des β -Adrenozeptor-Antagonisten Propranolol-HCl pro Kilogramm Futter zugesetzt. Dies entspricht bei einem durchschnittlichen Mausegewicht von 25 g und einer durchschnittlichen Nahrungsaufnahme von 5 g pro Tag einer Dosis von 60 mg Propranolol-HCl pro Kilogramm Körpermasse. Zwecks besserer Unterscheidung des Spezialfutters vom Kontrollfutter wurde das Futter mit der Lebensmittelfarbe Chinolingelb gefärbt.

2.2.1.4 Mauskollektiv und Therapieschema

Für die nachfolgend durchgeführten Versuche der vorliegenden Arbeit wurden pro Versuchszeitpunkt mindestens 10 Tiere verwendet. Dabei wurde auf eine möglichst gleiche Anzahl männlicher und weiblicher Tiere geachtet. Die Therapie der mit Spezialfuttermischungen behandelten Tiere begann mit dem Absetzen der Jungtiere vom Muttertier an Tag 21. Die Behandlung der MDR2(-/-) Tiere erfolgte über einen Zeitraum von 3 und 6 Wochen sowie über 3, 5 und 8 Monate. Außerdem wurden weitere Therapien, welche 6 Wochen bzw. 12 Wochen nach dem Absetzen vom Muttertier begannen, über einen Zeitraum von 6 Wochen bzw. 14 Wochen durchgeführt.

2.2.1.5 Töten der Tiere und Organentnahme

Für die Durchführung der Organentnahme wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und Thorax sowie Abdomen eröffnet. Es wurden den Tieren Leber, Nieren, Herz und Blut zur Serumgewinnung entnommen. Zur weiteren histologischen Untersuchung wurden zwei Gewebebiopsien des rechten Leberlappens (Lobus dexter), eine Niere und das Herz in 4%iger Formalinlösung für 24 Stunden fixiert. Die weitere Bearbeitung der Organ- und Serumproben ist in 2.2.7.1 beschrieben. Desweiteren wurden Stücke der Leber und eine Niere für RNA-Isolierungen und proteinbiochemische Untersuchungen entnommen und umgehend in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei -70°C gelagert.

2.2.2 RNA-Extraktion aus Gewebe und Zellen

2.2.2.1 Lyse von nativem Gewebe

Die Homogenisierung des Gewebes erfolgte mit einem Precellis Shredder (Peqlab Biotechnologie, Erlangen). Dafür wurden ca. 30 mg Gewebe in ein 2 ml-Reaktionsgefäß mit Precellis Keramikkügelchen (Peqlab Biotechnologie, Erlangen) und einem Gemisch aus 350 µl RA1-Puffer (Macherey & Nagel, Düren) sowie 3,5 µl β-Mercaptoethanol gegeben. Anschließend wurde in zwei Zyklen à 20 Sekunden mit 5 Sekunden Pause bei 6500 Schwingungen homogenisiert. Das erhaltene Lysat wurde umgehend bei -70 °C tiefgefroren bzw. weiterverarbeitet (siehe Kap. 2.2.2.3)

2.2.2.2 Lyse von Zellen

Bei den zu lysierenden Zellen wurde zunächst das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen. Zur Gewinnung von RNA wurde auf Zellen 700 µl Qiazol (Qiagen, Hilden) gegeben und die Zellen mit einem Zellschaber von der Kulturschale gekratzt. Das Lysat wurde in ein Eppendorf-Gefäß überführt, gevortext und bis zur weiteren Aufreinigung bei -70 °C gelagert (siehe Kap. 2.2.2.6).

2.2.2.3 RNA-Isolierung aus Gewebelysaten

Die RNA-Isolierung aus den Gewebelysaten erfolgte mit Hilfe des NucleoSpin RNA II Kits nach Angaben des Herstellers. Kontaminierende DNA wurde durch einen DNase I-Verdau direkt auf der Silika-Membran entfernt. Die Elution der RNA erfolgte mit 60 µl RNase-freiem Wasser. Anschließend wurde die RNA bei -70 °C gelagert.

2.2.2.4 RNA-Isolierung aus mikrodisektioniertem Gewebe

Die RNA-Extraktion aus den mittels Lasermikrodisektion gewonnen gepoolten Gewebeproben erfolgte mit Hilfe des NucleoSpin RNA XS Kits von Macherey & Nagel (Düren) nach Angaben des Herstellers. Kontaminierende DNA wurde ebenfalls durch einen DNase I-Verdau auf der Silika-Membran entfernt.

Anschließend wurde die RNA mit 5 µl RNase-freiem Wasser eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C gelagert.

2.2.2.5 RNA-Isolierung aus paraffineingebettetem Gewebe

Die Isolierung von RNA aus paraffineingebettetem Gewebe erfolgte wie bei Dries *et al.* und Varnholt *et al.* beschrieben [67, 68]. Zur Entparaffinierung des Gewebes wurde dieses zunächst in einem Thermomixer (Eppendorf, Hamburg) auf 65 °C erwärmt. Anschließend wurde Xylol zugegeben und nochmals für 5 Minuten bei 65 °C geschüttelt. Nach Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und verworfen. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt. Danach erfolgten mehrere Waschschriffe mit 100%igem Ethanol. Zur Lyse des Gewebes wurde jede Probe mit 200 µl Proteinase K-Puffer und 500 µg/ml Proteinase K (Invitrogen, Karlsruhe) versetzt. Nach Inkubation des Ansatzes bei 65 °C über Nacht wurde die Reaktion durch Erhitzen auf 95 °C gestoppt. Anschließend erfolgte die Extraktion mit 200 µl Phenol/Chloroform. Aufgrund des hohen Gewebegehalts vieler Proben musste in den meisten Fällen eine zweimalige Behandlung mit Phenol/Chloroform durchgeführt werden. Die wässrige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt und mit je 200 µl eiskaltem Isopropanol, 20 µl Natriumacetat (2 M; pH 5,2) und 2 µl Glykogen (20 mg/ml) versetzt und mit Hilfe des Vortexers gemischt. Die Fällung der RNA erfolgte bei -20 °C über Nacht. Anschließend wurde der Ansatz zentrifugiert und mehrfach mit eiskaltem 70%igem Ethanol gewaschen. Das „Pellet“ wurde im Trockenschrank bei 37 °C getrocknet und in 25 µl DNase-Mix resuspendiert. Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei 37 °C wurde die Reaktion bei 95 °C gestoppt. Danach wurde noch 1 µl RNase-Inhibitor (Fermentas, St. Leon-Rot) hinzugegeben und die Proben bei -70 °C gelagert.

2.2.2.6 RNA-Isolierung aus Zelllysaten und Geweben zur miRNA-Bestimmung

Die RNA-Extraktion aus Zelllysaten und Geweben zur miRNA-Bestimmung wurde mittels eines miRNEasy-Kits der Firma Qiagen (Hilden) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Kontaminierende DNA wurde durch einen DNase I-Verdau direkt auf der Silika-Membran entfernt. Die Elution der RNA erfolgte mit 30 µl RNase-

freiem Wasser. Anschließend wurde die RNA bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert.

2.2.2.7 Konzentrationsbestimmung und Qualitätsbeurteilung von RNA und DNA

Die Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren erfolgte mittels eines Nanodrop ND-1000 Spektralphotometers (Peqlab Biotechnologie, Erlangen). Um eine mögliche Proteinverunreinigung zu beurteilen, wurde das Verhältnis der Absorptionen bei den Wellenlängen 260 und 280 nm gebildet. Nukleinsäurehaltige Lösungen gelten als rein, wenn der Quotient E_{260} / E_{280} zwischen 1,8 und 2,0 liegt. Zusätzlich wurde die RNA-Integrität durch einen auf Mikrofluidik-Technologie basierenden RNA Nano-Chip-Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) mittels 2100 Bioanalyzer der Firma Agilent (Santa Clara, USA) getestet.

2.2.2.8 Durchführung einer LNA-basierten Microarray-Analyse

Zur Durchführung eines LNA-basierten Microarrays wurden jeweils 2 μg Gesamt-RNA primärer hepatischer Sternzellen am Kulturtag 3 und Kulturtag 7 zu der Firma Exiqon (Vedbaek, Dänemark) gesendet. Dort wurde erneut eine Qualitätskontrolle mit Hilfe des Agilent Bioanalyzers vom Hersteller durchgeführt. Anschließend wurden die Proben mit CY3 und CY5 fluoreszenzmarkiert und wechselweise auf dem miRCURY™ LNA-Array Version 9.2 (Exiqon, Vedbaek, Dänemark) hybridisiert. Die Auswertung des Arrays wurde vom Hersteller durchgeführt und die Daten anschließend zugesendet.

2.2.3 Reverse Transkription und Real-Time PCR

Für die spätere Analyse der Transkriptlevel mittels Real-Time PCR wurden die extrahierten RNA-Proben durch eine Reverse Transkriptase-Reaktion in cDNA umgeschrieben.

2.2.3.1 Reverse Transkription von mRNA in cDNA

Die Reverse Transkription wurde mit Hilfe des High Capacity cDNA Archive Kits der Firma Applied Biosystems (Foster City, USA) nach Angaben des Herstellers mit folgendem Reaktionsansatz durchgeführt:

10µl Reaktionsansatz für maximal 1µg RNA:	
10x Puffer	1,0 µl
25x dNTP Mix	0,4 µl
10x Random Primer	1,0 µl
MultiScript RT	0,5 µl
RNA	x µl
RNase-freies H ₂ O	ad 10 µl

Bei größeren RNA-Einsatzmengen vergrößern sich die Ansätze entsprechend um ein Vielfaches.

Die Reaktionsansätze wurden in einem Cycler der Firma Biometra (Göttingen) bei 25 °C für 10 Minuten und anschließend bei 37 °C für 2 Stunden inkubiert:

Die Verdünnung der Proben auf die gewünschte Konzentration erfolgte mit phenolextrahierter tRNA aus Hefe (50 ng/µl) (Invitrogen, Karlsruhe).

2.2.3.2 Reverse Transkription von RNA aus mikrodisektioniertem Gewebe (siehe Kap. 2.2.2.4)

Die Umschreibung der erhaltenen RNA in cDNA wurde unter Verwendung der SuperScript III Reverse Transkriptase (Invitrogen, Karlsruhe) nach Herstellerangaben durchgeführt. Aufgrund des sehr geringen Elutionsvolumens bzw. der geringen RNA-Menge wurde auf eine vorherige Konzentrationsbestimmung verzichtet und das gesamte Volumen (5µl) in die Reverse Transkriptase-Reaktion eingesetzt, da diese für Gesamt-RNA-Konzentrationen von 10pg-5µg ausgelegt ist.

Somit wurden folgende Reaktionsansätze verwendet:

Reaktionsansatz I:	
Random Primer 10 μ M	0,2 μ l
RNA	5 μ l
dNTP Mix 10 mM	1 μ l
RNase-freies H ₂ O	ad 13 μ l

Der Reaktionsansatz I wurde für 5 Minuten auf 65°C erhitzt und danach für wenigstens 1 Minute auf Eis inkubiert.

Reaktionsansatz II:	
5X First-Strand Buffer	4 μ l
0,1 M DTT	1 μ l
RNase Inhibitor (40 U/ μ l)	1 μ l
SuperScript III RT	1 μ l

Anschließend wurde der Reaktionsansatz II hinzugefügt und bei 50°C für 30–60 Minuten inkubiert. Die Inaktivierung der Reaktion erfolgte bei 70°C für 15 Minuten. Alle Inkubationsschritte der Reaktionsansätze wurden auf einem Biometra-Cycler (Göttingen) durchgeführt. Die so erhaltenen Proben wurden unverdünnt in die Real-Time PCR eingesetzt.

2.2.3.3 Reverse Transkription zur Bestimmung von miRNA-Transkripten

Die Reverse Transkription wurde mit Hilfe des miScript Reverse Transcription Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dieser Mix enthält eine optimierte Mischung aus poly(A) Polymerase und reverser Transkriptase. Der zugehörige miScript RT Puffer enthält eine Mischung aus MgCl₂ dNTPs, oligo-dT Primer, random Primer für eine optimale Aktivität beider Enzyme. Die verwendeten oligo-dT Primer enthalten an ihrem 5'-Ende eine Universalsequenz, die als Ansatzpunkt für einen Universal-Primer in der PCR-Amplifikation dient (siehe Abb. 4).

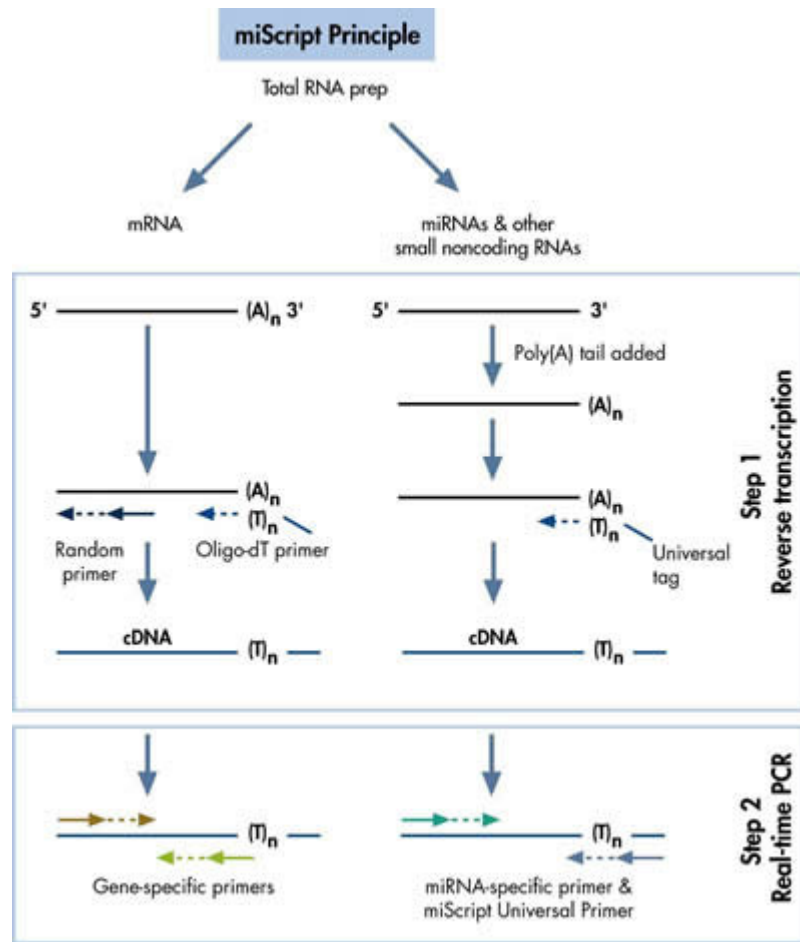


Abb. 4 miScript Prinzip. miRNAs und andere nichtcodierende RNAs werden polyadenyliert durch eine poly(A) Polymerase und anschließend durch eine Reverse Transkriptase-Reaktion mit Oligo-dT Primern in cDNA umgeschrieben. mRNAs werden durch eine reverse Transkriptase mit beidem, Oligo-dT and random Primern, umgeschrieben [69].

Die Reaktionsansätze zur Durchführung der cDNA-Synthese wurden nach Angaben des Herstellers vorbereitet. Zur Verdünnung der cDNA auf die gewünschte Konzentration wurde DNase-freies Wasser verwendet.

2.2.4 Real-Time PCR

Die Methode der Real-Time PCR beruht auf dem Prinzip der konventionellen Polymerase Kettenreaktion (PCR), erlaubt aber eine exakte quantitative Messung und graphische Darstellung der Amplifikatmenge über den gesamten Verlauf der PCR durch Messung von Fluoreszenzsignalen. Dabei nimmt die Fluoreszenz proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Die Real-Time-PCR kann zum einen mit DNA-spezifischen, fluoreszenzmarkierten Sonden (z.B. TaqMan®-Sonden)

oder durch den Zusatz eines DNA bindenden oder interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff z.B. SYBR®Green durchgeführt werden. Die sequenzspezifische TaqMan-Sonde besitzt an ihrem 5'-Ende ein kovalent gebundenes fluoreszierendes Reportermolekül und an ihrem 3'-Ende ein ebenfalls kovalent gebundenes Quencher-molekül. Die Sonde kann durch Licht mit einer dem Reportermolekül spezifischen Wellenlänge zur Fluoreszenz-Emission angeregt werden. Diese wird jedoch durch die räumliche Nähe zwischen Reporterfarbstoff und Quencherfarbstoff unterdrückt. (Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer, FRET). Während der Elongations-Phase der PCR-Reaktion kommt es aufgrund der 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase zu einer Spaltung der TaqMan-Sonde in ihre Einzelmoleküle. Durch die räumliche Trennung von Reporter- und Quencher-molekül und dessen fehlende inhibierende Wirkung, kommt es zur Fluoreszenzemission des Reportermoleküls (siehe Abb. 5). Beim Design der TaqMan®-Sonden sind einige Kriterien zu beachten. So sollte die Schmelztemperatur der Sonde ca. 10°C über der Schmelztemperatur der Primer liegen. Des Weiteren sollte die Sonde nicht mehr als 5-10 Nukleotide „downstream“ eines Primers an die Zielsequenz binden.

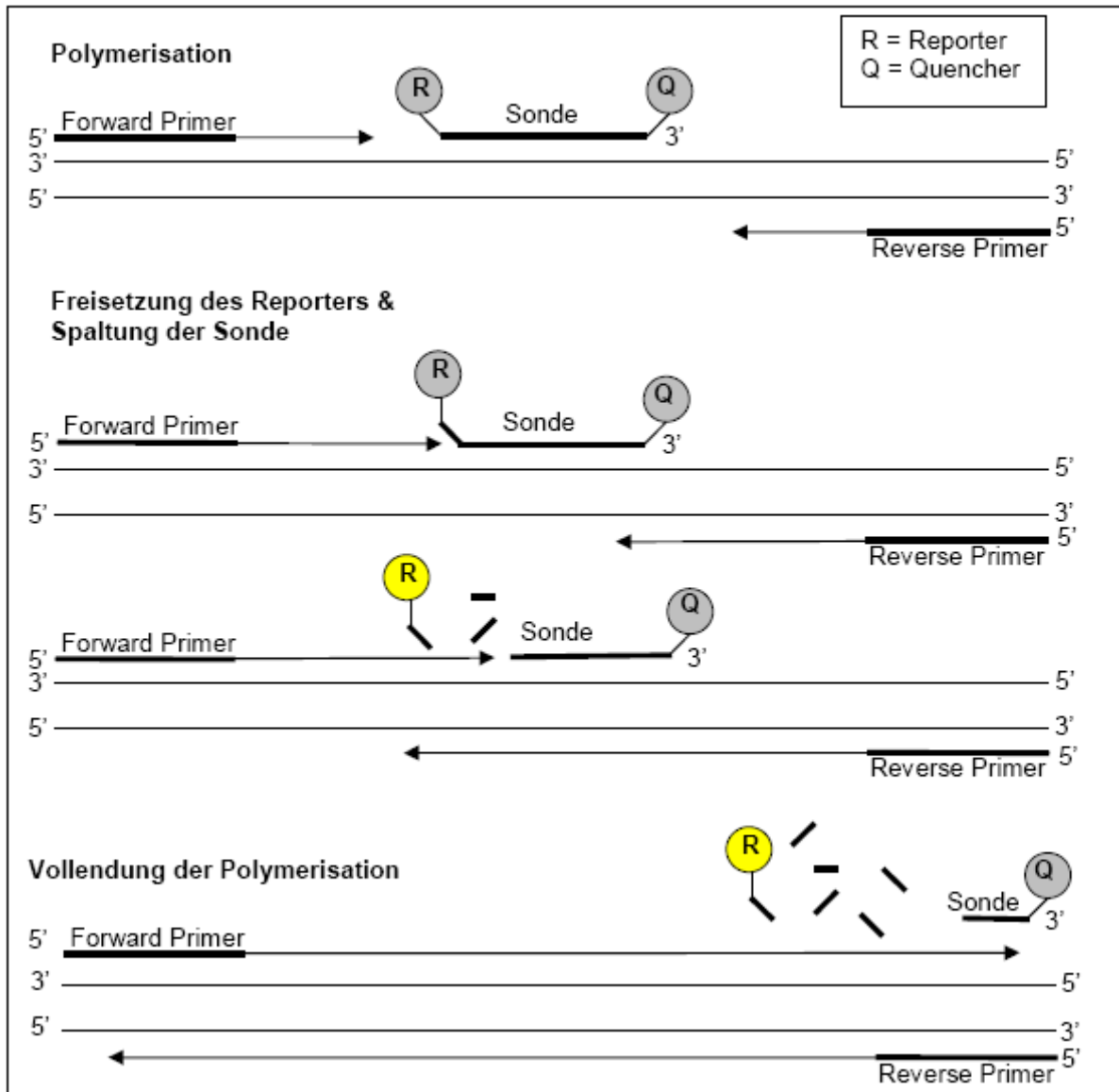


Abb. 5 Funktionsprinzip einer Real-Time PCR mittels TaqMan® Sonde [70]. Die Beschreibung des Prinzips erfolgt in Kapitel 2.2.4.

Bei der Methode der Real-Time PCR mit SYBR®Green, einem Cyanin-Farbstoff, wird die Eigenschaft des SYBR®Greens mit doppelsträngiger DNA zu interkalieren ausgenutzt. Der daraus resultierende DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplex absorbiert blaues Licht bei einer Wellenlänge $\lambda_{\max} = 494 \text{ nm}$ und emittiert grünes Licht bei $\lambda_{\max} = 521 \text{ nm}$. Aufgrund der unspezifischen Bindung an alle doppelsträngigen DNA-Moleküle, ist zur Spezifitätskontrolle der PCR das Erstellen einer Schmelzkurve im Anschluß der PCR zwingend erforderlich, um die Einheitlichkeit des PCR-Produktes anhand des Hybridisierungsverhaltens zu überprüfen (siehe Abb. 6).

Maßgeblich für die Auswertung einer Real-Time PCR ist der Ct-Wert („threshold cycle“ = Schwellenwert). Dieser gibt die Zyklenzahl an, bei der ein Anstieg der Reporter-Fluoreszenz über das Hintergrundrauschen zu verzeichnen ist. Durch den Vergleich mit einer Standardreihe (siehe 2.2.4.3) bekannter Konzentration kann auf den relativen Transkriptgehalt der unbekanntenen Proben geschlossen werden.

Alle Real-Time PCRs wurden auf dem Mx3000P Cycler der Firma Stratagene (La Jolla, USA) oder auf dem IQ5 Real-Time PCR Detection System von Biorad (Hercules, USA) durchgeführt. Jeder Reaktionsansatz wurde dabei als Triplet pipettiert.

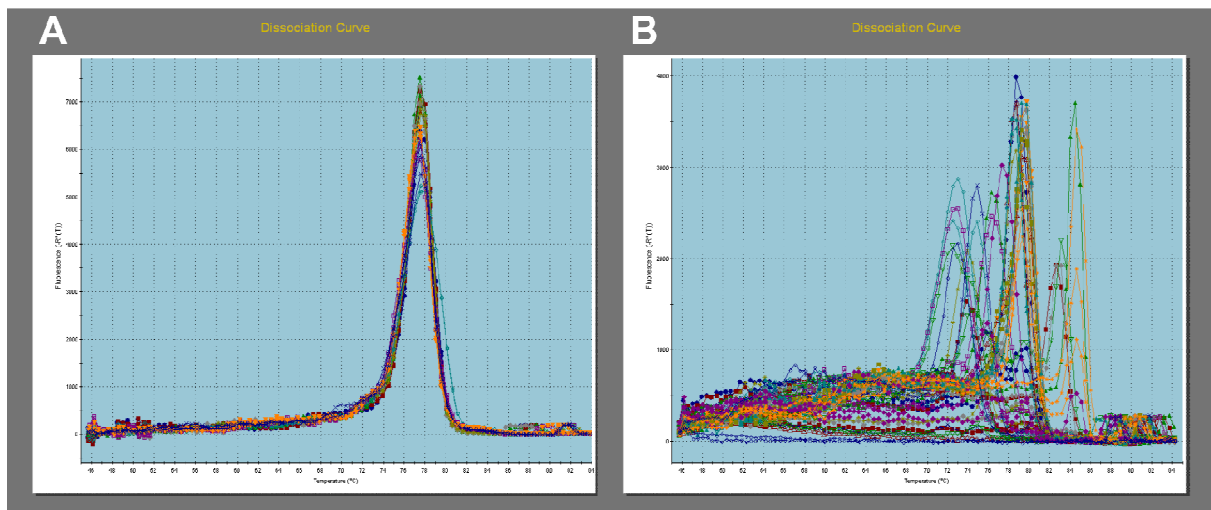


Abb. 6 Exemplarische Darstellung zweier Schmelzkurven mit spezifischen Amplifikaten A und unspezifischen PCR-Produkten und Primerdimeren B.

2.2.4.1 Der Real-Time PCR-Ansatz unter Verwendung einer TaqMan®-Sonde

Für die Real-Time PCR mit TaqMan®-Sonde wurde das Real MasterMix Probe Kit der Firma Eppendorf (Hamburg) nach Angaben des Herstellers verwendet. Alle Proben wurden in einem 20 µl Reaktionsansatz angesetzt, die Konzentration der eingesetzten cDNA betrug 10 ng/µl. Eine Ausnahme bilden die Proben beschrieben in 2.2.3.2, von diesen wurde je nach Zielgen 1-3 µl eingesetzt. Die verwendeten Primer wurden auf 10 µM und die Sonde auf 5 µM verdünnt.

Reaktionsansatz:	
Real-Time MasterMix	8,0 µl
Primer Forward	0,6 µl
Primer Reverse	0,6 µl
Sonde	0,8 µl
cDNA	1,0 µl
DNase-freies Wasser	9,4 µl

Folgendes Temperaturprofil wurde für die Real-Time PCR mit Sonden verwendet:

Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
95 °C	10 min	1x
95 °C	30 sek	50x
60 °C	60 sek	

2.2.4.2 Die Real-Time PCR unter Verwendung von SYBR®Green

Real-Time PCR Ansätze mit SYBR®Green wurden mit dem Power SYBR®Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, USA) durchgeführt und zwei verschiedene Ansätze verwendet. Die Bestimmung von miRNA erfolgte mit folgendem Ansatz:

Reaktionsansatz:	
Power SYBR®Green PCR Real-Time MasterMix	12,5 µl
Universal Primer 10x	1,0 µl
Spezifischer miRNA Primer 10x	1,0 µl
cDNA	1,0 µl
DNase-freies Wasser	9,5 µl

Temperaturprofil zur Bestimmung von miRNA:

Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
95 °C	10 min	1x
95 °C	15 sek	50x
55 °C	30 sek	
70 °C	45 sek	
45 °C-95 °C	Schmelzkurve	1x

Die verwendete Gesamt-cDNA wurde auf Empfehlung des Herstellers auf eine Konzentration von 2 ng/μl mit DNase-freiem Wasser verdünnt, die Verdünnung der Primer erfolgte mit autoklaviertem TE-Puffer.

Die Bestimmung der Transkriptlevel aller anderen Gene wurde mit folgendem Ansatz und einer cDNA Konzentration von 10 ng/μl durchgeführt.

Reaktionsansatz:	
Power SYBR®Green PCR Real-Time MasterMix	10 μl
Forward Primer 10 μM	0,8 μl
Reverse Primer 10 μM	0,8 μl
cDNA 10 ng/μl	1,0 μl
DNase-freies Wasser	7,4 μl

Es wurde folgendes Temperaturprofil verwendet:

Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
95 °C	10 min	1x
95 °C	30 sek	50x
58-64 °C*	30 sek	
70 °C	60 sek	
45 °C-95 °C	Schmelzkurve	1x

* Die Annealing-Temperatur wurde in Abhängigkeit vom Primerpaar gewählt.

2.2.4.3 Anfertigen einer Standardreihe

Die Erstellung einer Standardverdünnungsreihe erfolgte aus einer Mischung repräsentativer Proben des jeweiligen Kollektivs bekannter Konzentration (100 ng/ μ l). Je nach Gesamtvolumen wurde das gleiche Volumen an tRNA-Lösung zugefügt, so dass eine Ausgangsverdünnung V_0 mit einer Konzentration von 50 ng/ μ l vorlag. Aus dieser Ausgangsverdünnung V_0 wurde wie in Abb. 7 gezeigt, schrittweise mit tRNA verdünnt. Bei Standardreihen zur Bestimmung von miRNA wurde statt tRNA DNase-freies Wasser verwendet. Zwischen allen Verdünnungsschritten wurde kurz gevortext und zentrifugiert. Die Standardreihen wurden bei -20°C gelagert.

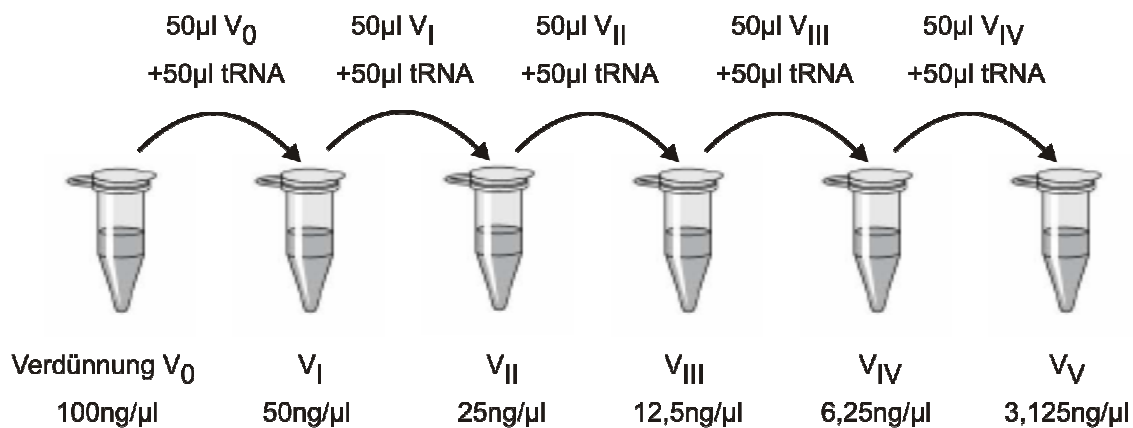


Abb. 7 Beispiel zur Herstellung einer Verdünnungsreihe

2.2.4.4 Normalisierung der Real-Time PCR

Die Normalisierung der Real-Time PCR erfolgte bei der Bestimmung von microRNA gegen RNU6B als sogenanntes „housekeeping“ Gen. Alle weiteren Real-Time PCRs wurden gegen den Transkriptspiegel des Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT)-Gens oder des β -Actin-Gens normalisiert.

2.2.5 Die Lasermikrodissektion

Die Lasermikrodissektion ermöglicht ein gezieltes, definiertes Herausschneiden von Probenbereichen (z.B. Zellareale, Zellen, Zellbestandteile) aus mikroskopischen

Präparaten. Das selektierte, ausgeschnittene Areal wird mit einem einzelnen Laserpuls, welchen man unterhalb des Mittelpunktes des mikrodissoziierten Präparates fokussiert, aus der Objektoberfläche herausgelöst und mehrere Millimeter entgegen der Schwerkraft in ein Auffanggefäß transportiert.

2.2.5.1 Vorbereitung der Proben

Die Vorbereitung der verwendeten Proben erfolgte wie nachfolgend beschrieben:

Es wurde Lebergewebe von sechs über einen Zeitraum von drei Monaten behandelten und sechs unbehandelte MDR2-/- Tieren gleichen Alters in Tissue Tek O.C.T. Compound (Sakura Finetek Europe, Leiden, Niederlande) eingebettet und auf einem Kryostaten (Leica Microsystems, Nussloch) in 6 µm dicke Gefrierschnitte geschnitten. Diese wurden auf Objektträger mit sterilisierter Polyethylenfolie aufgebracht (PALM Microlaser, Bernried). Anschließend wurden alle Gewebeschnitte mit Hämatoxylin nach Mayer in RNase-freien Lösungen angefärbt.

2.2.5.2 Lasermikrodissektion nativer Kryo-Gewebeproben

Das im Rahmen der Promotionsarbeit verwendete Lasermikrodissektionssystem stammt von der Firma PALM Microlaser (Bernried) und wurde über die mitgelieferte Software Palmwin (PALM Microlaser, Bernried) angesteuert und alle prozessrelevanten Parameter, wie Fokussierung und Energie des Lasers, wurden über diese eingestellt. Die verwendete Energie des Lasers richtete sich nach Beschaffenheit und Feuchtigkeit des verwendeten Präparats. Für die Lasermikrodissektion wurde ausschließlich das 20x Objektiv des Mikroskops verwendet.

Es wurden 10 Portalfelder und 10 Areale im Parenchym mit einem Durchmesser von 200µm aus den Schnitten herausgelasert und in Auffangkäppchen katapultiert (siehe Abb. 8). Diese wurden anschließend auf 0,5 ml Reaktionsgefäße gesetzt, 50 µl RA-1 Puffer (Macherey & Nagel, Düren) hinzugegeben, gevortext und bei 10000 UpM

zentrifugiert. Um die Gewinnung einer ausreichenden Menge an RNA sicherzustellen wurden die entsprechenden Proben der Tiere gepoolt.

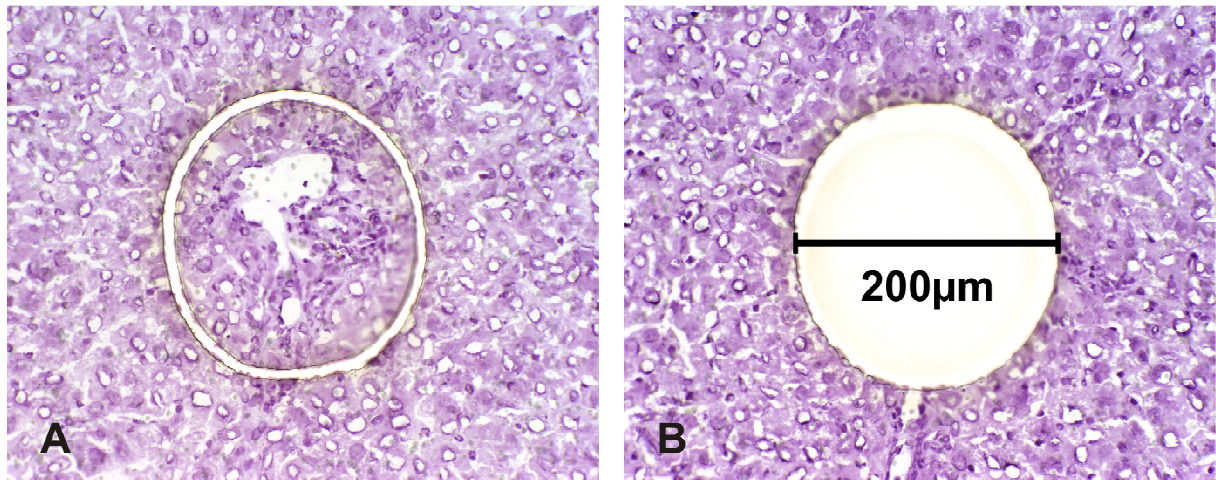


Abb. 8 Hämatoxylin gefärbter Leberschnitt. Mittels Lasermikrodissektion herausgeschnittenes Portalfeld mit einem Durchmesser von 200 μm vor dem Katapultieren (links) und nach dem Katapultieren (rechts)

2.2.6 Proteinbiochemische Methoden

2.2.6.1 Hydroxyprolin-Bestimmung

Die Bestimmung des Hydroxyprolingehaltes von Gewebeproben wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Professor Dr. Steffen und Dr. Töx nach dem Verfahren von Woessner [71] in einer modifizierten Methode nach Stegemann und Stadler [72] durchgeführt.

2.2.7 Histologische Begutachtung

2.2.7.1 Aufbereitung des Probenmaterials

Für die histologische Bestimmung des Fibrorestadiums und des Entzündungsgrades wurden die formalinfixierten Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe im Autotechnikon (Sakura Finetek Deutschland, Heppenheim) des Routineeingangsbereichs des Instituts für Pathologie der Universitätsklinik zu Köln entwässert. Es folgte die Einbettung mit heißem Paraffin in den dafür vorgesehenen Einbettkassetten (VWR, Darmstadt). Nach Aushärtung des Materials wurden freundlicherweise von Frau Katharina Wendland 2-3 μm dicke Gewebeschnitte auf

einem Schlittenmikrotom (Leica, Nussloch) zur weiteren Verwendung angefertigt und diese auf Objektträger (Menzel-Gläser, Braunschweig) aufgezogen. Ein Teil dieser Gewebeschnitte wurde zum Anfertigen von Hämatoxylin-Eosin- (HE), Gomori-, Siriusrot- und Chloracetatesterase-Färbungen verwendet. Diese Arbeitsschritte wurden ebenfalls im Routineablauf des Eingangslabors des Instituts für Pathologie der Universitätsklinik zu Köln durchgeführt.

2.2.7.2 Immunhistologische Färbungen

Es wurden immunhistologische Färbungen zur Darstellung von α -smooth muscle actin-positiven (α -SMA) Zellen, Makrophagen und B-Lymphozyten sowie Fibroblasten durchgeführt. Die verwendeten primären Antikörper, deren Verdünnung in der Immunhistologie und das vorhergehende Antigen-Retrieval-Verfahren sind in unten stehender Tab. 7 angegeben.

Die Färbung gegen α -SMA erfolgte mit einem alkalische Phosphatase-gelabelten Antikörper, die Anfärbung wurde mit FastRed (Dako, Hamburg) durchgeführt.

Die Antikörperdetektion wurde bei Einfachfärbungen durch das ABC Verfahren (Vector Laboratories, Burlingame, USA) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dafür wurde endogenes Biotin mit dem Avidin/Biotin Blocking Kit (Vector Laboratories, Burlingame, USA) geblockt.

Bei den immunhistologischen Färbungen wurde ich freundlicherweise von Frau Katharina Wendland unterstützt.

Tab. 7 Verwendete Antikörper in der Immunhistologie

Antikörper	Hersteller	Verdünnung	Antigendemaskierung
α -SMA	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)	1:60	-
F4/80	Serotec (Düsseldorf)	1:100	Trypsin
CD45	BD Biosciences (Heidelberg)	1:500	-
S100A4	DAKO (Hamburg)	1:1000	Mikrowelle Citratpuffer pH 6

2.2.7.3 Bestimmung des Fibrorestadiums, Entzündungsgrades und der Gallengangsproliferation

Die Auswertung der Gewebeschnitte im Bezug auf Fibrorestadium, Entzündungsgrad und Gallengangsproliferation wurde freundlicherweise von Frau Dr. Heike Varnholt blind durchgeführt. Entzündungsgrad und Fibrorestadium wurden nach dem vierstufigen Batts-Ludwig-System ausgewertet [73]. Der Umfang der Gallengangsproliferation wurde mit einem Einstufungssystem 0-3 bewertet wie von Farazi *et al.* beschrieben [74]. Die Kriterien sind in Tab. 8 zusammengefasst.

Tab. 8 Kriterien zur Bestimmung der Entzündung, Fibrose und Gallengangsproliferation

	0	1	2	3	4
Entzündungsgrad	Keine Entzündung	Minimale Aktivität und Interface Hepatitis, selten Apoptosekörperchen	Milde Aktivität und Interface Hepatitis, vereinzelte Apoptosekörperchen	Moderate Aktivität und Interface Hepatitis, zahlreiche Apoptosekörperchen	Starke Aktivität, konfluente Nekrose
Fibrorestadium	Keine Fibrose	Fibrous portal expansion	Wenige Brücken oder Septen	Zahlreiche Brücken oder Septen	Zirrhose
Gallengangsproliferation	Normale Anzahl von Gallengängen im Portalfeld	Wenige Gallengänge, limitiert auf periportale Bereiche	Zahlreiche periportale Gallengänge und entlang der fibrösen Septen	Signifikante, ubiquitäre Gallengangsproliferation	-

2.2.8 Bakterienkultur

Alle Bakterienkulturarbeiten wurden an einer Sterilwerkbank (Heto-Holten, Allerød, Dänemark) unter sterilen Bedingungen mit sterilen Lösungen durchgeführt. Verwendete Geräte wurden abgeflammt oder ausgeglüht.

2.2.8.1 Herstellung kompetenter *E.coli* Bakterien

Die Herstellung der kompetenten Bakterien erfolgte nach der Methode beschrieben durch Chung *et al.* [75]. Dazu wurden zunächst DH5 α *E.coli* Bakterien über Nacht in

5 ml LB-Medium bei 37°C und 200 UpM in einem Bakterienschüttler (Gerhardt, Königswinter) inkubiert. 200 µl dieser Übernachtskultur wurden in 100 ml LB-Medium überführt und wieder bei 37°C und 200 UpM inkubiert bis sie die logarithmische Wachstumsphase OD600 zwischen 0,3 und 0,4 erreicht hatten. Anschließend wurden die Zellen in einer Tischzentrifuge (Eppendorf, Hamburg) für 15 Minuten bei 5000 UpM zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 1/10 des Volumens der Kultur (10 ml) 1x TSS gelöst. Diese Zellsuspension wurde zu 150 µl-Aliquots pipettiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die anschließende Lagerung erfolgte bei -70°C.

2.2.8.2 Transformation

Für die Transformation von Bakterien mit DNA wurde zunächst der Ligationsansatz (siehe 2.2.8.7) oder bis zu 10 ng Plasmid-DNA zu 150 µl kompetenten DH5α-Bakterien geben, vorsichtig gemischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde für 90 Sekunden ein Hitzeschock bei 42°C durchgeführt und 600 µl SOC-Medium zugegeben. Schließlich wurden die Bakterien zum Aufbau der Antibiotikumresistenz für 1 Stunde bei 37°C und 200 UpM inkubiert. Danach wurden 100-600 µl der Bakteriensuspension auf die entsprechenden antibiotikumhaltigen Agar-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.8.3 Mini-Präparation von Plasmid-DNA

5 ml LB-Medium wurden mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C und 200 UpM auf dem Bakterienschüttler inkubiert. Anschließend wurden 2 ml dieser Kultur in ein steriles Gefäß überführt und bei 14000 UpM eine Minute zentrifugiert. Die nachstehend verwendeten Lösungen S₁-S₃ für die Mini-Präparation wurden aus dem Nucleobond PC-100-Kit von Macherey & Nagel entnommen. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen in 150 µl S₁-Puffer resuspendiert und nach weiterer Zugabe von 150 µl S₂-Puffer bei Raumtemperatur für 5 Minuten inkubiert. Anschließend wurden 150 µl S₃-Puffer zur Präzipitation der genomischen DNA und der Proteine zugegeben und vorsichtig gemischt. Es folgte wieder eine Inkubation für 5 Minuten auf Eis. Um Zelltrümmer und Proteinpräzipitate zu entfernen

wurde die Probe 5 Minuten bei 14000 UpM zentrifugiert. Die Plasmid-DNA im Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und mit 500 µl 100% Isopropanol versetzt. Darauf folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 5 Minuten bei 14000 UpM. Nach dem Abnehmen des Isopropanols wurde das erhaltene Pellet mit 200 µl 70%igem Ethanol gewaschen und erneut bei 14000 UpM für 5 Minuten zentrifugiert. Schließlich wurde das Pellet getrocknet und in 30 µl DNase-freiem Wasser gelöst.

Zur Isolierung von Plasmid-DNA mit größerer Reinheit, z.B. für Sequenzierreaktionen, wurde die DNA-Präparation mit Hilfe des Fast-Plasmid Mini Kits (Eppendorf, Hamburg) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.8.4 Midi-Präparation von Plasmid-DNA

Zur Isolierung größerer Mengen plasmidärer DNA wurden 100 ml LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C und 200 UpM inkubiert. Die Präparation der DNA wurde mit dem Nucleobond PC-100 Kit (Macherey & Nagel, Düren) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.8.5 Phenolaufreinigung und Fällung von DNA nach Maniatis

Die Aufreinigung von DNA erfolgte mit Phenol-Chloroform und dem Phase-Lock Gel Heavy 2,0 Kit (Eppendorf, Hamburg) nach Herstellerangaben. Zur Vorbereitung von Plasmid-DNA zur Transfektion wurde die anschließende Fällung unter sterilen Bedingungen durchgeführt, um weitgehende Keimfreiheit für den Einsatz in der Zellkultur zu gewährleisten. Die Fällung der DNA erfolgte durch Zusatz einer 2 M Na-Acetat-Lösung (pH 5,2) von 1/10 des Volumens der Ausgangslösung. Danach wurde eine Volumeneinheit Isopropanol zugesetzt und die DNA bei -20°C für 2 Stunden präzipitiert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit, der Überstand wurde dekantiert und das Pellets mit 70%igem Ethanol gewaschen. Nach dem Dekantieren des Ethanols wurde das DNA-Pellet bei 37°C getrocknet, in 30 µl autoklaviertem dest. H₂O aufgenommen und gelöst.

2.2.8.6 Restriktion

Alle im Rahmen der Klonierungsarbeiten verwendeten Restriktionsenzyme wurden von Roche (Mannheim), Fermentas (St. Leon-Rot) und New England Biolabs (Frankfurt) bezogen. Die enzymatische Hydrolyse der Plasmid-DNA wurde nach Angaben der Hersteller durchgeführt. Pro μg eingesetzter Plasmid-DNA wurde 1 Unit Enzym im vorgeschriebenen Restriktionspuffer verwendet und für mindestens 2 Stunden im jeweiligen Temperaturoptimum des Enzyms inkubiert. Bei der Durchführung eines Doppelverdaus ohne passenden Restriktionspuffer für beide Enzyme wurde nach der Restriktion mit dem ersten Enzym eine Fällung der Plasmid-DNA (siehe Kap.2.2.8.5) durchgeführt.

2.2.8.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Alle Ligationen wurden mittels T4-DNA Ligase der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) durchgeführt. Durch die Ligrationsreaktion erfolgt die kovalente Verknüpfung eines DNA-Inserts mit einem Plasmidvektor. Das eingesetzte Molaritätsverhältnis von DNA-Insert und Plasmidvektor betrug 1:3.

Die Durchführung der Ligation erfolgte in einem 10 μl -Ansatz:

Reaktionsansatz:	
T ₄ -Ligase	1 μl
10x Ligationpuffer	1 μl
Plasmidvektor	x μl
DNA-Insert	y μl
DNase-freies Wasser	ad 10 μl

Der Ligrationsansatz wurde zwischen 3 und 12 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne DNA-Insert.

2.2.8.8 Dimerisierung von Oligonukleotiden

Die von MWG Biotech (Ebersberg) bezogenen lyophilisierten Oligonukleotidmonomere wurden in H₂O gelöst und auf eine Endkonzentration von 100 µM verdünnt. Anschließend wurden die Oligonukleotide im Verhältnis 1:1 gemischt und in Dimerisierungspuffer pipettiert. Das Reaktionsgemisch wurde für 10 Minuten auf 95 °C erhitzt und langsam auf Raumtemperatur abgekühlt.

Dimerisationsansatz:	
Oligonukleotid 1 (100 µM)	20 µl
Oligonukleotid 2 (100 µM)	20 µl
Dimerisierungspuffer	40 µl

2.2.8.9 Gelaufreinigung von DNA-Fragmenten

Zur Analyse oder Präparation von DNA-Fragmenten wurden diese mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Auftrennung erfolgte mit Hilfe von 1-3%igen Agarosegelen. Zur Herstellung der Gele wurden 1-3 g Seakem Agarose (Biozym, Oldendorf) in 100 ml 1x TAE-Puffer eingerührt und durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Nach Abkühlen der Agaroselösung auf circa 50-60 °C wurden 6 µl Ethidiumbromidlösung hinzugegeben und der Ansatz in einen Gelschlitten gegossen. Nach Polymerisation des Gels wurde der Gelschlitten in eine mit 1x TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gesetzt und die aufzutrennenden DNA-Proben, die zuvor mit jeweils 0,25 Volumen Ladepuffer versetzt wurden, in die Geltaschen pipettiert. Die elektrophoretische Auftrennung der Fragmente erfolgte nun bei 100 Volt. Die aufgetrennten DNA-Banden wurden im UV-Licht auf einer UV-Kontaktlampe (Vetter GmbH, Wiesloch) sichtbar gemacht und mittels eines Geldokumentationssystems (Decon Science Tec, Hohengandern) dokumentiert. Als Standard dienten folgende Marker: GeneRuler 100bp plus Ladder, GeneRuler 1kb Ladder, pUC19-DNA/Msp sowie Lambda-DNA-*EcoRI-HindIII*, Marker 3 (Fermentas, St. Leon-Rot).

2.2.8.10 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel wurde nach gelelektrophoretischer Auftrennung mit Hilfe des Perfectprep Gel Cleanup Kit (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt. Die Bande des zu isolierenden DNA-Fragmentes wurde möglichst fein mit einem Skalpell unter UV-Licht aus dem Agarosegel herausgeschnitten und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die weitere Isolierung der DNA erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers.

2.2.9 Zellkultur

2.2.9.1 Allgemein

Alle Zellkulturarbeiten wurden an einer Sterilwerkbank (BDK, Gütersloh) unter sterilen Bedingungen mit sterilen Lösungen und Geräten durchgeführt.

2.2.9.2 Zelllinien

Folgende Zelllinien wurden für die vorliegende Arbeit verwendet:

Zelllinie	Typ	Spezies
HSC-T6	immortalisierte hepatische Sternzellen [76]	Ratte
HUH-7	humane Hepatoma-Zelllinie [77]	Mensch
HEK293	humane embryonale Nierenzelllinie [78]	Mensch
PAV-1	immortalisierte hepatische Sternzellen [79]	Ratte

2.2.9.3 Kultivierung der Zellen

Die Kultivierung aller Zelllinien erfolgte in einem Begasungsbrutschrank (Heraeus, Hanau) bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit. Alle Zellen wurden, falls nicht gesondert aufgeführt, in DMEM mit 10% FCS kultiviert, und es wurde regelmäßig ein Medienwechsel durchgeführt. Bei zu dichtem Wachstum mit einer Konfluenz von über 80% wurden die Zellen passagiert.

2.2.9.4 Passagieren der Zellen

Dazu wurde zunächst das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Mit Hilfe einer Pasteurpipette wurde ein dünner Film Trypsinlösung auf die Zellen gegeben und ca. 2 Minuten bei 37°C einwirken gelassen. Sobald das Ablösen der Zellen beobachtet werden konnte, wurde die Wirkung des Trypsins durch Zugabe von 1-2 ml Kulturmedium gestoppt und die Zellen entsprechend der gewünschten Dichte auf neue Kulturplatten übertragen.

2.2.9.5 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer. Aus der in einem definierten Volumen Medium aufgenommenen Zellsuspension wurde ein Aliquot steril entnommen und mit Trypanblaulösung (Sigma, Deisenhofen), welche abgestorbene Zellen blau anfärbt, 1:1 verdünnt. Ausgezählt wurden alle nicht gefärbten Zellen aus vier Großquadraten der Neubauer-Zählkammer, die jeweils 0,1 µl entsprechen.

2.2.9.6 Kryokonservierung und Auftauen der Zellen

Um Zellen längerfristig lagern zu können, wurden diese eingefroren. Dazu wurden Zellen mit einer Konfluenz von 80-90% einmal mit PBS gewaschen und anschließend trypsinisiert. Die Zellen wurden dann in frischem Kulturmedium resuspendiert und in 50-ml-Falcons für 5 Minuten bei 900 UpM in einer Beckman GPR Zentrifuge (Beckman Instruments, Glenrothes, UK) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen mit 3 ml Einfriermedium resuspendiert. Jeweils 1,5 ml der Zellsuspension wurde in 2-ml-Kryoröhrchen langsam durch Isolierung mit Schaumstoff eingefroren. Nachdem die Zellen für 24 Stunden bei -70°C gelagert wurden, erfolgte dann die endgültige Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff.

Das Auftauen kryokonservierter Zellen erfolgte möglichst schnell in einem Wasserbad bei 37°C. Die aufgetaute Zellsuspension wurde dann in eine Kulturschale überführt und mit frischem Medium auf 10 ml aufgefüllt. Um DMSO-Reste des

Einfriermediums zu entfernen, wurde am folgenden Tag ein Mediumwechsel durchgeführt.

2.2.9.7 Transfektion immortalisierter Zelllinien

Zur Durchführung von Transfektionen wurden die Zellen am Vortag trypsinisiert, so dass diese am Tag der Transfektion zu 90% konfluent waren. Die Transfektion erfolgte dann gemäß Angaben des Herstellers mit Lipofectamin 2000 in Opti-Mem (Invitrogen, Karlsruhe). Nach 6 Stunden erfolgte ein Medienwechsel auf das ursprüngliche Kulturmedium.

2.2.9.8 Isolierung primärer hepatischer Sternzellen

Die Isolierung hepatischer Sternzellen erfolgte aus der Leber von ca. 500-600 g schweren, männlichen Wistar-Ratten. Nach Betäubung der Ratte mit einer Mischung aus 60 mg/kg Ketamin und 7,5 mg/kg Xylazin, welches intraperitoneal appliziert wurde, wurde das Abdomen der Ratte geöffnet. Über einen Zugang in der Pfortader wurde dann die erste Perfusion mit 300 ml 37°C warmer GBSS+EGTA-Ca²⁺ Lösung durchgeführt. Um einen Überdruck und eine Schädigung der Leber zu verhindern, wurde zum Auslaufen der Perfusionslösung die Vena Cava durchtrennt. Nach dem Ausschwemmen von Blutresten aus der Leber durch die erste Perfusion, erfolgte die zweite Perfusion mit 150 ml 37°C warmer GBSS+Ca²⁺ mit Enzymen. Durch den Zusatz von Enzymen wurde der Zellverband der Leber gelöst. Nach dreißigminütiger Perfusion mit Perfusionslösung I wurde die Leber entnommen und diese zunächst von der Bindegewebskapsel befreit und anschließend mechanisch zerkleinert. Zur weiteren Lyse des Gewebes erfolgte eine Inkubation in 100 ml Perfusionslösung II für 10 Minuten bei 37°C und 200 UpM. Grobe Partikel der Lebersuspension wurden durch Filtration über ein 100 µm-Nylonnetz entfernt und die Enzyme durch Zugabe von 100 ml GBSS+Ca²⁺+BSA gestoppt. Parenchymzellen wurden anschließend für 2 Minuten (50xg) und 4°C pelletiert und die Überstände gesammelt. Die Pellets wurden erneut in 100 ml GBSS+Ca²⁺+BSA resuspendiert und nochmals für 3 Minuten bei 50xg und 4°C zentrifugiert. Die Überstände der beiden Zentrifugationsschritte wurden anschließend vereinigt. Die vereinigten Überstände wurden nun auf sechs 50 ml-

Falcons verteilt und für 10 Minuten bei 350xg zentrifugiert. Die Pellets, die die mesenchymale Zellfraktion enthielten, wurden erneut in 150 ml GBSS+Ca²⁺+BSA resuspendiert und erneut bei 350xg pelletiert. Anschließend wurden die Überstände abgenommen und verworfen. Zur Aufreinigung der hepatischen Sternzellen aus dem Pellet mesenchymaler Zellen wurde ein 40%iger Optiprep-Gradient verwendet. Dazu wurden die Zellpellets in einem geeigneten Volumen von ca. 20-30 ml GBSS+Ca²⁺+BSA resuspendiert und mit der entsprechenden Menge 40%iger Optipreplösung versetzt und gemischt, um einen 10,5%igen Dichtegradienten zu erhalten. Dieses Gemisch wurde in vier 15 ml-Falcons aufgeteilt und mit je 2 ml GBSS+Ca²⁺+BSA überschichtet. Dieser Gradient wurde dann für 20 Minuten bei 2170 UpM (950xg) ohne Bremse zentrifugiert. Anschließend wurden die hepatischen Sternzellen vorsichtig aus dem Toplayer abgenommen und zweimal in 50 ml GBSS+Ca²⁺+BSA zum Entfernen des Optipreps gewaschen. Die isolierten Zellen wurden in DMEM mit 10% FCS und unter Zusatz von 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin kultiviert. Ein Medienwechsel erfolgte am ersten Tag nach der Isolierung, anschließend jeden zweiten Tag.

Die Isolierung von humanen hepatischen Sternzellen aus Leberteilresektaten wurde nach dem gleichen Protokoll und mit den gleichen Lösungen wie bei der Isolierung von hepatischen Sternzellen der Ratte durchgeführt. Lediglich die Perfusion der Resektate erfolgte durch frei zugängliche Gefäße an den Schnittflächen.

Die Isolierung hepatischer Sternzellen aus der Leber der Maus erfolgte im Labor von Leo van Grunsven, Vrije Universiteit Brussel, Brüssel, Belgien. Die Zelllysate wurden zur weiteren Bearbeitung freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

2.2.9.9 Transfektion von primären hepatischen Sternzellen

Die Transfektion erfolgte ohne vorherige Trypsinierung in DMEM mit 0,5% FCS mit Lipofectamin (Invitrogen, Karlsruhe) nach Herstellerangaben. Sechs Stunden nach der Transfektion wurde das Transfektionsmedium gegen das ursprüngliche Kulturmedium ausgetauscht. Die Endkonzentration der bei der Transfektion verwendeten microRNA betrug 50 nM.

2.2.9.10 Immunzytologische Färbungen

Zur Färbung von primären hepatischen Sternzellen wurden diese mit einer Anzahl von 2×10^5 Zellen auf Lab-Teks (Nunc, Kampstrup, Dänemark) ausgesät und bis zum gewünschten Zeitpunkt inkubiert. Nach Abnehmen des Mediums wurden die Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen und für 10 Minuten mit einem Gemisch aus eiskaltem Methanol/Aceton (1:1 [v/v]) bei -20°C fixiert. Die Lagerung erfolgte bei -70°C bis zur weiteren Verwendung.

Zur Durchführung der immunzytologischen Färbungen wurde zunächst für 30 Minuten mit einer 5%igen Milchpulver-Lösung geblockt. Anschließend wurde mit der Milchpulverlösung die spezifische Antikörperverdünnung hergestellt. Antikörper und die entsprechenden Verdünnungen sind Tab. 9 zu entnehmen. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte dann bei 4°C über Nacht. Nach der Inkubation wurde zunächst dreimal mit 1x PBS gewaschen. Wurde kein primärer Antikörper mit Fluoreszenzmarkierung verwendet, erfolgte eine weitere Inkubation für 2 Stunden mit einem sekundären fluoreszenzmarkierten Antikörper in Milchpulverlösung. Nach der Inkubation mit dem Zweitantikörper wurde wieder dreimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden anschließend für 5 Minuten mit DAPI-Lösung (100 mg/ml, Sigma, Heidelberg) zur Anfärbung der DNA inkubiert. Danach wurden die gefärbten Zellen mit DABCO-Mowiol-Lösung eingedeckelt. Die Lagerung der Lab-Teks erfolgte bei 4°C .

Tab. 9 Verwendete Antikörper für immunzytologische Färbungen

Antikörper	Markierung	Spezifität	Verdünnung	Hersteller
monoclonal Maus anti-SMA AK	-	Ratte, Mensch	1:100	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
monoclonal Maus anti-GFAP AK	CY3	Ratte, Mensch	1:200	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Cy2-konjugierter Ziege anti-Maus AK	CY2	Maus	1:200	Dianova (Hamburg)

2.2.9.11 Dualer Luciferase Reporter Assay

Die Durchführung des Luciferase Assays erfolgte mit Hilfe des Dual-Luciferase Reporter Assays (Promega, Madison, USA) nach Angaben des Herstellers. Hierfür wurden zunächst HSC-T6 Zellen auf einer 48-Well Platte kultiviert und je nach

Versuch mit 800 ng Reporterplasmid und verschiedenen microRNAs mit einer Endkonzentraion von 50 nM transfiziert. Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden wurden die Zellen mit 120 µl des mitgelieferten Lysepuffer lysiert und anschließend die Luciferaseaktivität unter automatischer Zugabe der beigefügten Reagenzien auf einem MLX Microtiter Plate Luminometer (Dynatech Laboratories, Chantilly, USA) gemessen.

3. ERGEBNISSE

In der vorgelegten Arbeit wurde der Einfluss der β -Adrenozeptor-Blockade durch Propranolol als klassische Arzneimitteltherapie auf die Progression der Leberfibrose an einem tierexperimentellen Modell untersucht. Desweiteren wurde der Frage nachgegangen, welchen Einfluss microRNAs auf das Expressionsmuster während der Fibrogenese haben, um diese als mögliche zukünftige therapeutische Ansatzpunkte nutzen zu können.

3.1 Fibroseentwicklung in MDR2-knockout-Tieren nach β -Adrenozeptor-Blockade

Für die Untersuchungen der Auswirkung der β -Adrenozeptor-Blockade auf fibrotische nicht-sinusoidale Lebererkrankungen wurde das MDR2^{-/-} Mausmodell herangezogen. Die MDR2^{-/-} Mäuse zeichnen sich durch die Entwicklung einer Cholangitis ab dem Alter von zwei bis drei Wochen aus [34] und haben bereits nach nur vier Wochen zwiebelschalenartige periduktale Fibrosen entwickelt [35]. Bevor eine Therapie an diesem Mausmodell durchgeführt wurde, wurden die Lebern auf Entzündung und Fibrose untersucht. Dabei lag ein besonderer Schwerpunkt auf dem Auftreten von matrixproduzierenden Zellen wie Fibroblasten und Myofibroblasten.

3.1.1 Entzündliche und fibrotische Veränderungen nach Cholestase im MDR2-knockout-Modell

Um die Entzündung und Fibrose im MDR2^{-/-} Mausmodell zu charakterisieren und einen Überblick über deren Ausmaß zu erlangen, wurden auf den Leberschnitten verschiedene Färbungen wie H&E, Chloracetat-Esterase-Färbung gegen Granulozyten sowie F4/80 und CD45 Antikörperfärbungen gegen Makrophagen bzw. B-Lymphozyten durchgeführt. Desweiteren wurde eine S100A4 Fibroblastenfärbung durchgeführt. Eine CD3 Antikörperfärbung gegen T-Zellen war aufgrund mangelnder Spezifität des Antikörpers erfolglos. In Abb. 9 dargestellt sind repräsentative Färbungen von Leberschnitten 3 Monate alter MDR2^{-/-} Mäuse. Es konnte eine starke Infiltration von Granulozyten und Makrophagen (A+B) in die fibrotischen

Bereiche, besonders um die sklerosierenden Gallengänge, nachgewiesen werden. In Abb. 9C ist die Infiltration von B-Lymphozyten im Bereich eines Galleninfarktes dargestellt, welcher vereinzelt bei den Tieren beobachtet werden konnte.

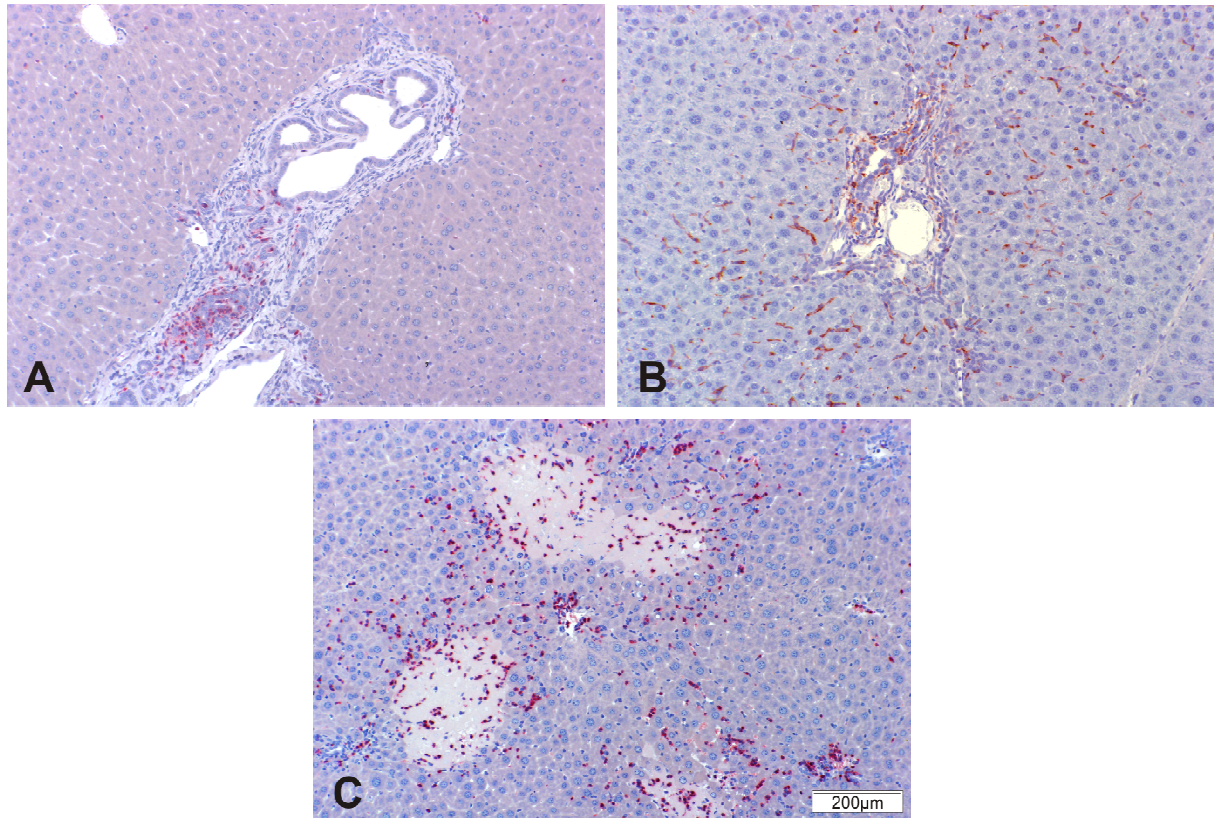


Abb. 9 Färbungen gegen verschiedene Entzündungszellen einer Leber eines 3 Monate alten MDR2^{-/-} Tieres. Dargestellt wurden Granulozyten durch eine Chloracetat-Esterase-Färbung (A), Makrophagen (B) sowie B-Lymphozyten (C) mittels F4/80 bzw. CD45 Antikörperfärbung

Auch auf den in Abb. 10 dargestellten H&E Färbungen der MDR2^{-/-} Mäuse ist die starke Infiltration von Entzündungszellen am Portalfeld und im weiteren Verlauf der Erkrankung auch in die periportalen Bereiche gut zu erkennen. Die angefertigten H&E Färbungen lassen auch gut die unterschiedlichen Stadien der Fibrose anhand von Matrixablagerungen erkennen.

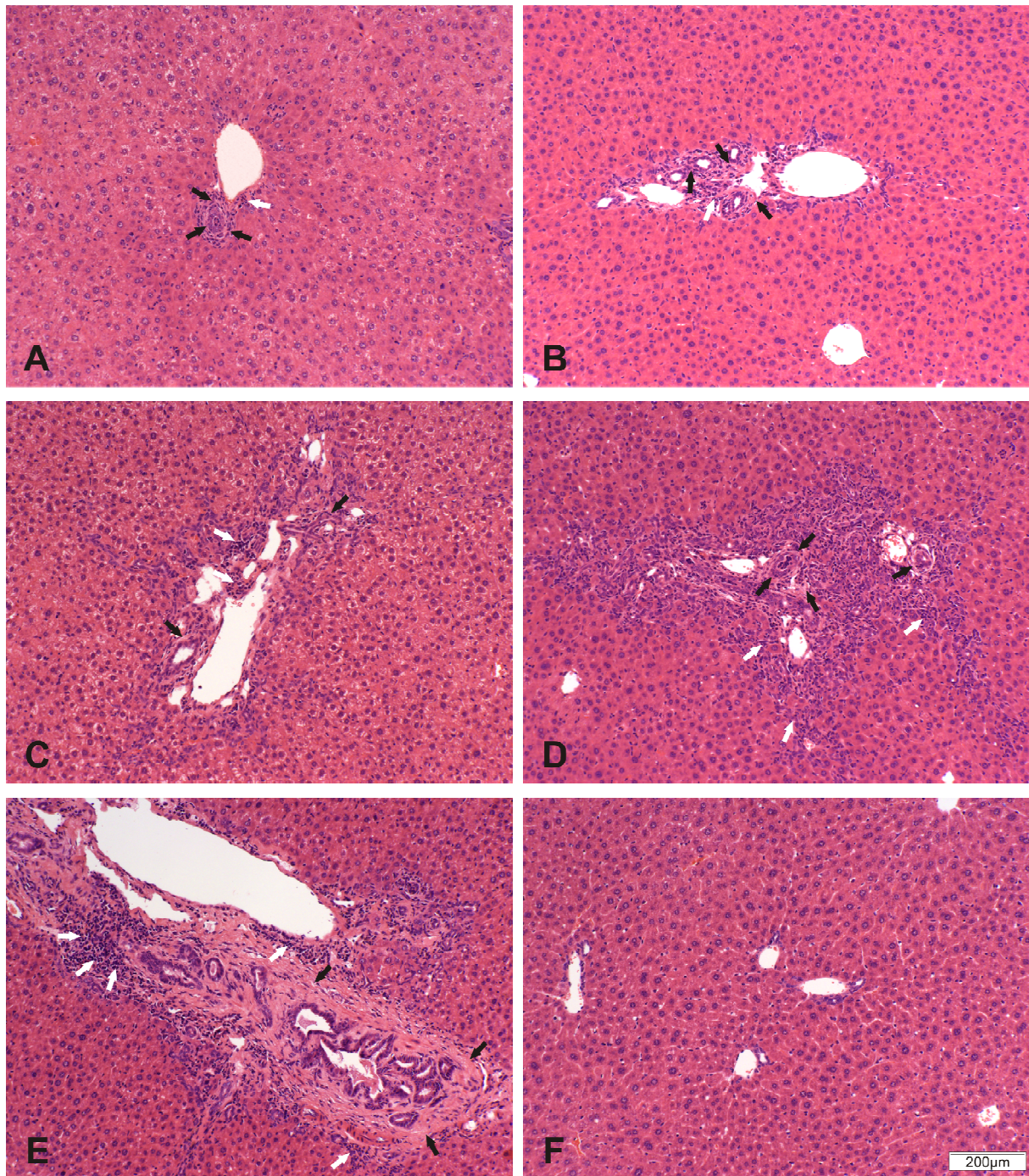


Abb. 10 Darstellung repräsentativer H&E Färbungen von Leberschnitten von MDR2^{-/-} Mäusen im Alter von 3 Wochen (A), 6 Wochen (B), 3 Monaten (C), 5 Monaten (D), 8 Monaten (E) sowie einer Wildtyp-Maus im Alter von 8 Monaten (F). Matrixablagerungen sind durch schwarze Pfeile und Entzündungszellinfiltrate durch weiße Pfeile gekennzeichnet.

Zur besseren Verdeutlichung der Fibrosestadien wurden allerdings die in der Abb. 11 dargestellten Gomori-Färbungen angefertigt. Diese zeigen die zunehmende Matrixablagerung und den Verlauf der Fibrose mit zunehmendem Alter der Tiere. Während im frühen Stadium von 3 Wochen (A) nur leichte Matrixablagerungen, beschränkt auf

die Portalfelder um die Gallengänge zu erkennen sind, waren im Alter von 3 Monaten (B) beginnende periportale Fibrosen mit Ausläufern ins Parenchym zu beobachten. Im Alter von 5 Monaten (C) zeigte sich bei nahezu allen Tieren eine deutliche periportale Fibrose mit starker Matrixablagerung und beginnende oder bereits vorhandene Septenbildung. Nach 8 Monaten (D) wiesen die Lebern der MDR2^{-/-} Mäuse alle periportale Fibrosen mit massivsten Matrixablagerungen auf. Außerdem wurden bei vielen Tieren Septen festgestellt. Es wurden ebenfalls stark proliferierte und dilatierte Gallengänge beobachtet.

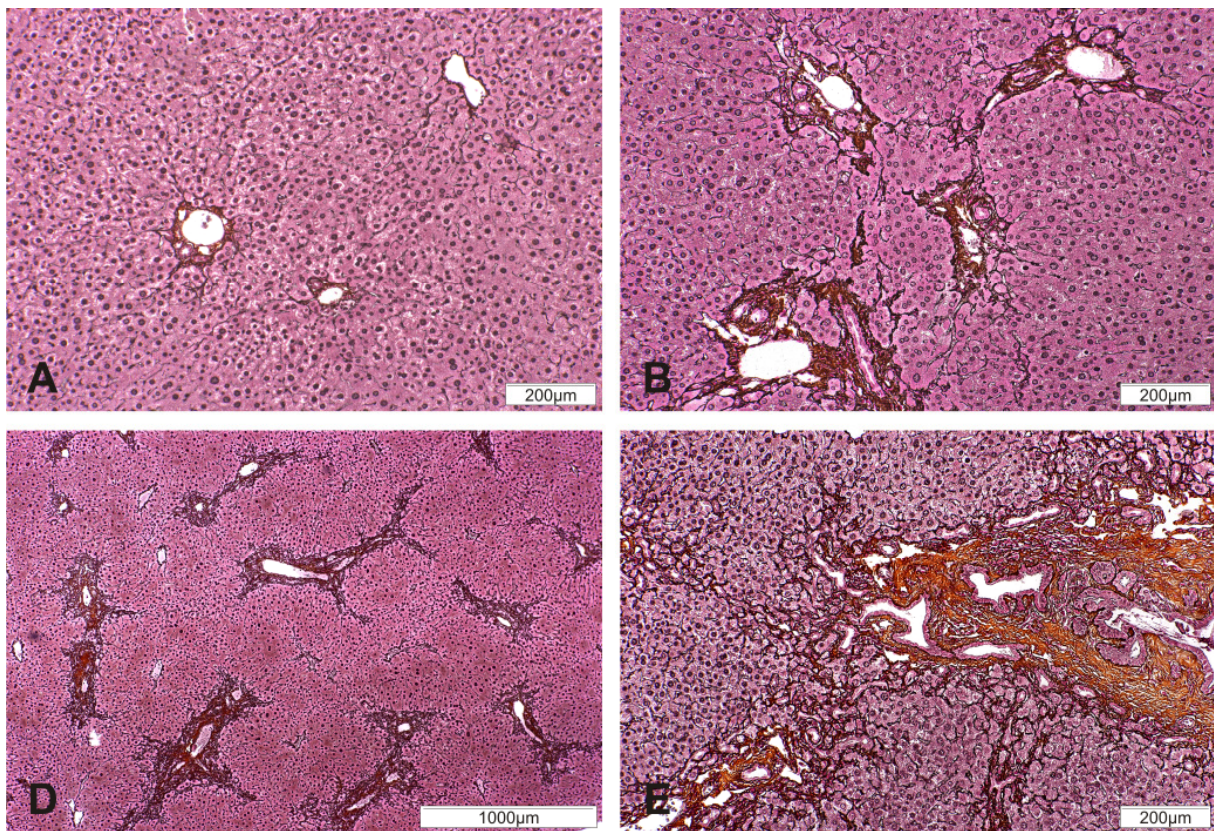


Abb. 11 Repräsentative Gomori-Färbung von MDR2^{-/-} Mäusen im Alter von 3 Wochen (A), 3 Monaten (B), 5 Monaten (C) und 8 Monaten (D). Durch die Gomori-Färbungen werden Kollagenablagerungen rostbraun bis dunkelbraun angefärbt.

Um die mögliche Beteiligung von aktivierten hepatischen Sternzellen, einem der Hauptproduzenten extrazellulärer Matrix in der Leber, an der Fibroseprogression im MDR2^{-/-} Modell abschätzen zu können, wurden Serienschritte von Mäusen im Alter von 6 Wochen, 3 Monaten und 5 Monaten angefertigt. Diese wurden Gomori- und gegen S100A4 sowie α -SMA gefärbt. Anhand der Gomori-Färbung lässt sich wieder der Verlauf der Fibrose, wie schon zuvor oben beschrieben, darstellen. Im Alter von

6 Wochen (Abb. 12A+J) zeigt sich eine portale Fibrose mit Kollagenablagerungen um die Gallengänge. Diese ist im Alter von 3 Monaten (Abb. 12B+K) in eine periportale Fibrose übergegangen, mit deutlicher Zunahme der Kollagenablagerung. Hier gut zu erkennen ist die Sklerosierung um die Gallengänge mit der typischen Ausbildung des Zwiebelschalenmusters. Nach 5 Monaten (Abb. 12C+L) ziehen sich deutliche Septen mit massiven Matrixablagerungen durchs Parenchym. Die immunhistologische Färbung gegen α -SMA (Abb. 12G-I und Abb. 12P-R) zeigte auf allen Schnitten die zu erwartende positive Färbung der Gefäße. Jedoch waren so gut wie keine weiteren Zellen, unabhängig vom Fibrorestadium und dem Alter des Tieres, in der abgelagerten Matrix α -SMA positiv. Lediglich in der Vergrößerung und in frühen Stadien (Abb. 12P+Q) waren einige positive Zellen um die sklerosierenden Gallengänge im Zwiebelschalenmuster zu erkennen. Die S100A4 Färbung (Abb. 12D-F und Abb. 12M-O) zeigte eine große Zahl S100A4 positiver Zellen und deutet auf eine starke Beteiligung von Fibroblasten an der Fibrose hin. Diese finden sich sowohl im frühen Fibrorestadium in den portalen Bereichen um die sklerosierenden Gallengänge als auch in späteren Stadien in der abgelagerten extrazellulären Matrix der Brücken und Septen.

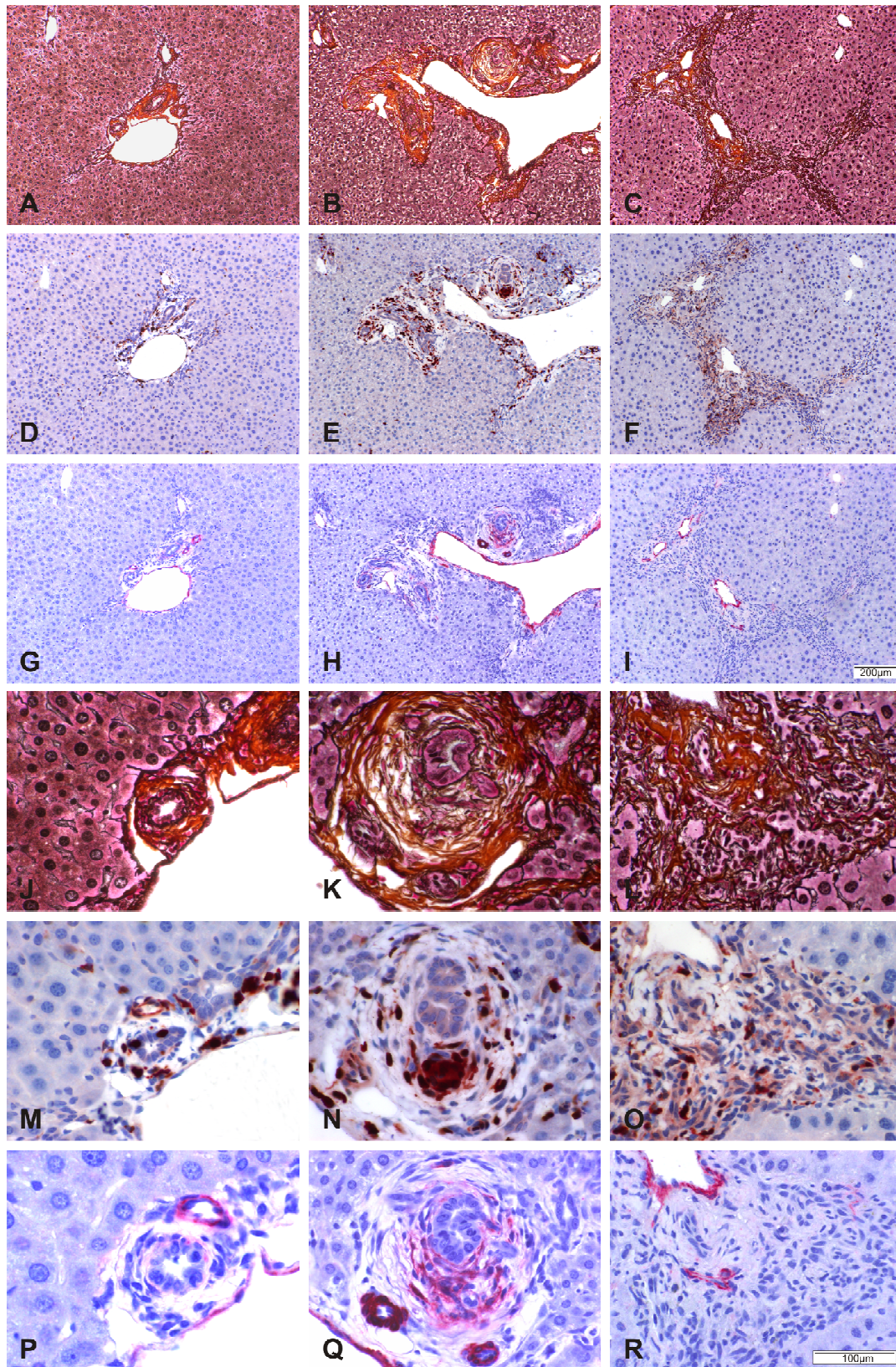


Abb. 12 Serienschritte in 100-facher Vergrößerung (A-I) sowie 400-fache Ausschnittvergrößerungen (J-R) der Lebern von 6 Wochen (links), 3 Monate (Mitte) und 5 Monate (rechts) alten MDR2^{-/-} Mäusen gefärbt nach Gomori (A-C und J-L) und S100A4 (D-F und M-O) sowie α -SMA-Antikörperfärbung (G-I und P-R). Bei den durch die S100A4 Färbungen braun angefärbten Zellen handelt es sich weitgehend um Fibroblasten, zunächst um die Gallengänge und später auch in den Brücken und Septen. Durch die α -SMA Färbung wurden sowohl wenige myofibroblastische Zellen um die Gallengänge als auch die Gefäße rot angefärbt.

Zusätzlich angefertigte S100A4 und CD45 Doppelfärbungen (Abb. 13) zeigten auch die Anwesenheit von einigen Fibrozyten in den fibrotischen Bereichen um die Portalfelder.

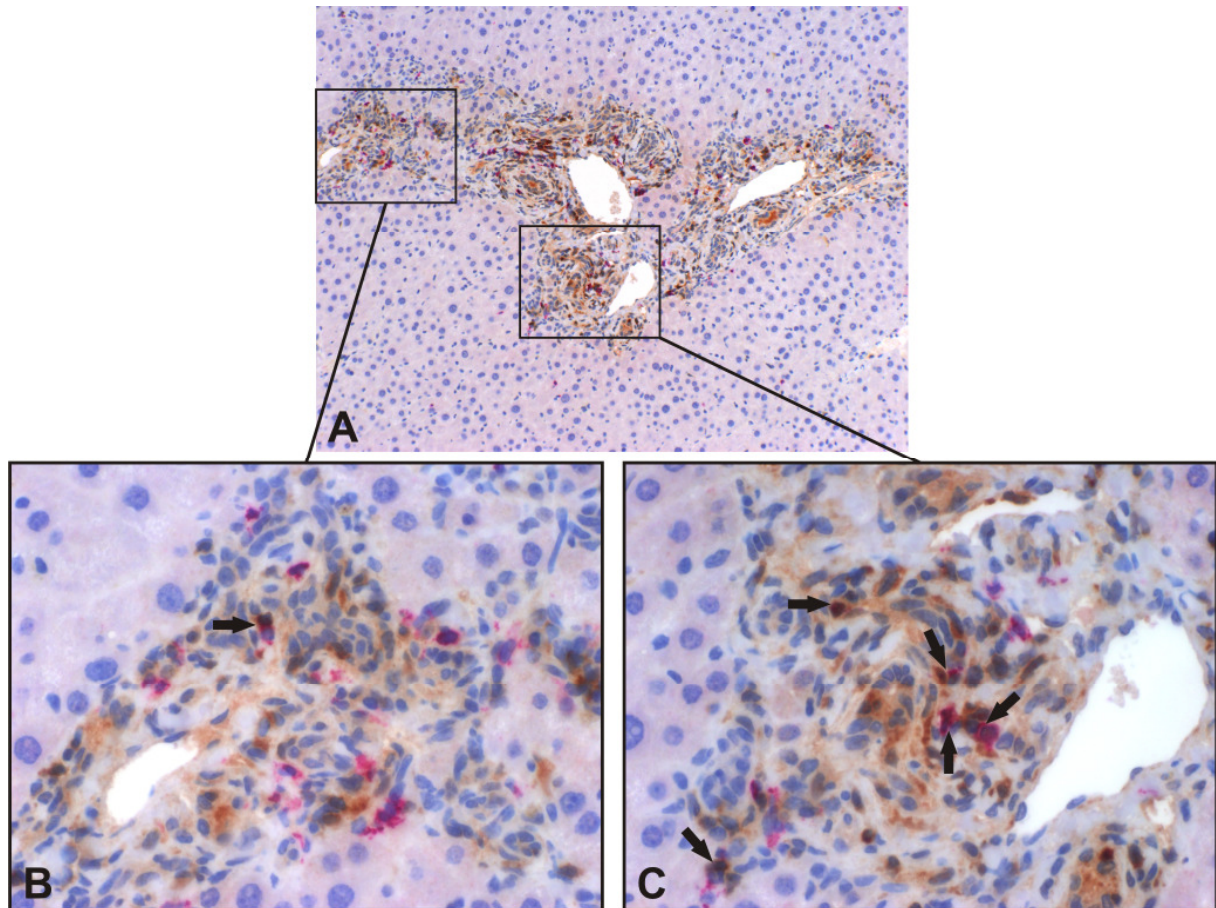


Abb. 13 Darstellung einer S100A4 und CD45 Antikörper-Doppelfärbung in 100-facher Vergrößerung (A) sowie 400-fache Ausschnittvergrößerungen (B+C). Die Pfeile markieren die doppeltpositiven Fibrozyten.

Zusammenfassend belegten die histologische und immunhistologische Charakterisierung eine Abwesenheit von myofibroblastischen hepatischen Sternzellen im perisinusoidalen Raum und ein geringes Auftreten von Myofibroblasten im Portalfeld. Damit eignete sich das MDR2^{-/-} Modell für die vorgesehenen Studien des Einflusses von β -Adrenozeptor-Antagonisten auf die Cholangitis und die folgende Fibrose während der Primären Sclerosierenden Cholangitis.

3.1.2 Auswirkung der β -Blockade auf den Blutdruck der MDR2^{-/-} Mäuse

Nach Charakterisierung der Fibroseentstehung und des Verlaufs in MDR2^{-/-} Mäusen wurden die Mäusen mit dem unselektiven β -Blocker Propranolol behandelt, um die Auswirkung auf die Fibrogenese zu untersuchen.

Um Veränderungen des Blutdruckes bei MDR2^{-/-} Mäusen nach Therapie mit Propranolol zu definieren, wurden zunächst Blutdruckmessungen an behandelten und unbehandelten MDR2^{-/-} Mäusen durchgeführt. Dabei wiesen die mit Propranolol behandelten MDR2^{-/-} Mäuse einen geringfügig niedrigeren mittleren systolischen Blutdruck auf als die unbehandelten Tiere ($p=0,05$). Im Durchschnitt lagen die Werte bei den Propranolol-behandelten Tieren bei 81,20 mmHg, bei den unbehandelten Tieren bei 91,83 mmHg.

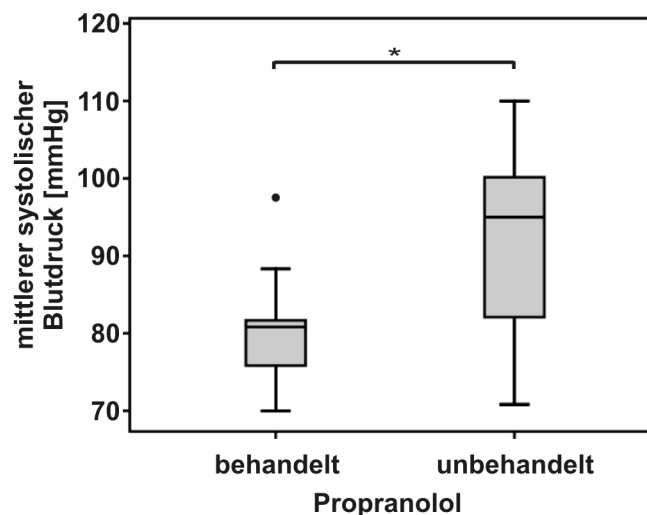


Abb. 14 Mittlerer systolischer Blutdruck Propranolol-behandelter und unbehandelter MDR2^{-/-} Mäuse. Die mit Propranolol behandelten Tiere (N=9) weisen einen geringfügig niedrigeren Blutdruck auf als unbehandelte Kontrolltiere (N=12) ($p<0,05$).

3.1.3 Einfluss der Behandlung mit β -Blockern auf die Entzündung während der PSC von MDR2^{-/-} Mäusen

Um einen möglichen Effekt der Propranololbehandlung auf die Entzündungsreaktionen in den Lebern der MDR2^{-/-} Mäuse einschätzen zu können, wurde zunächst der Entzündungsgrad in Leberpräparaten nach 3 und 6 Wochen sowie nach 3, 5 und 8 Monaten Behandlung im Vergleich zu Präparaten von Tieren bestimmt, die nicht behandelt wurden. Die Bestimmung erfolgte nach histologischer

Begutachtung unter Anwendung der Kriterien wie unter 2.2.7.3 beschrieben. Außerdem wurden infiltrierende Granulozyten durch Chloracetat-Esterase angefärbt (Abb. 9A) und Makrophagen (Abb. 9B) sowie B-Lymphozyten (Abb. 9C) immunhistologisch dargestellt. Die mit Propranolol behandelten MDR2^{-/-} Mäuse des Kollektivs wiesen eindeutig weniger Entzündungsreaktionen auf als die unbehandelten Tiere des Kollektivs ($p < 0,05$). Dieses zeigte sich über den gesamten Verlauf der Behandlung und äußerte sich sowohl in mehr Tieren ohne Entzündungsreaktionen im frühen Stadium als auch in weniger schweren Entzündungsreaktionen des Grades 2 und 3 in den späteren Stadien der Behandlung. Die Anzahl der behandelten und unbehandelten Tiere mit den entsprechenden Entzündungsgraden der Cholangitis ist in Abb. 15 und in 0 dargestellt. Eine detaillierte Aufschlüsselung der einzelnen Gruppen und Zeitpunkte findet sich im Anhang (Abb. 50 und Tab. 13).

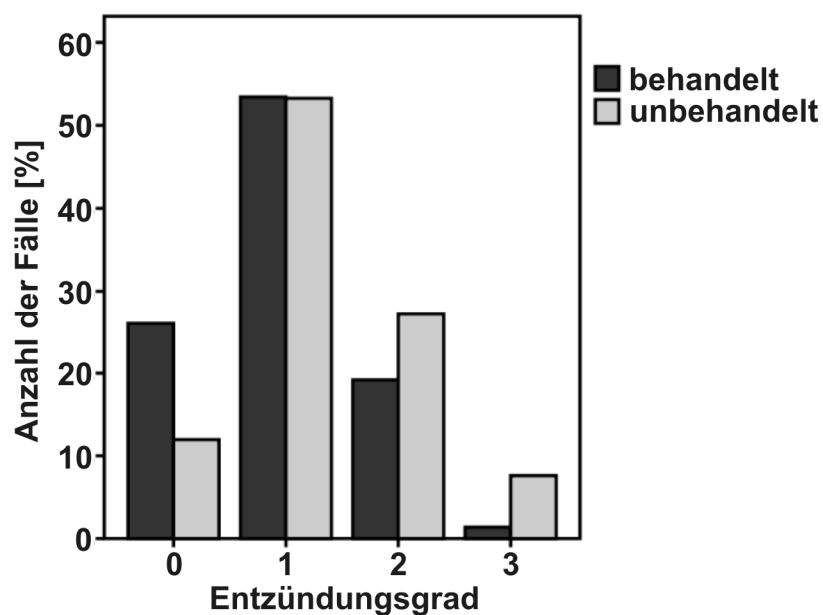


Abb. 15 Entzündliche Veränderungen im MDR2^{-/-} Modell der PSC nach Behandlung mit Propranolol im Vergleich mit unbehandelten Tieren ($p < 0,05$).

Tab. 10 Entzündungsgrad in Abhängigkeit von der Propranolol-Behandlung

		Behandlung		Gesamt	
		behandelt	unbehandelt		
Entzündungs- grad	0	Anzahl	19	11	30
		%	26,0%	12,0%	18,2%
	1	Anzahl	39	49	88
		%	53,4%	53,3%	53,3%
	2	Anzahl	14	25	39
		%	19,2%	27,2%	23,6%
	3	Anzahl	1	7	8
		%	1,4%	7,6%	4,8%
Gesamt		Anzahl	73	92	165
		%	100,0%	100,0%	100,0%
p<0,05					

3.1.4 Einfluss der β -Blocker Behandlung auf die Fibrogenese

Um die Auswirkungen einer β -Adrenozeptor-Blockade mit Propranolol auf die Fibrogenese abschätzen zu können, wurden zuerst die einzelnen Schnitte der Lebern nach Gomori und mit Sirius-Rot gefärbt und blind ausgewertet (siehe 2.2.7.3). In der unten gezeigten Abb. 16 sind in der linken Spalte repräsentative Aufnahmen von Sirius-Rot-gefärbten Leberschnitten der behandelten Tiere und in der rechten Spalte die der unbehandelten Tiere dargestellt. Es zeigte sich, dass nach 3 Wochen in einigen Tieren ohne Behandlung (Abb. 16B) leichte Ablagerungen von Kollagenfasern im Portalfeld um die Gallengänge nachzuweisen sind. Währenddessen waren bei den behandelten Tieren (Abb. 16A) kaum Veränderungen der Portalfelder bezüglich Fibrose zu erkennen. Nach 3 Monaten waren auch in den Lebern der behandelten Tiere (Abb. 16C) verstärkt Ablagerungen von Kollagenfasern vorhanden. Diese beschränkten sich jedoch weitgehend auf die Portalfelder mit nur geringer Ausbreitung in periportale Bereiche. In den Lebern der unbehandelten Mäuse (Abb. 16D) war nach 3 Monaten schon eine starke Ablagerung von Kollagenfasern, häufig auch mit dem oben beschriebenen Zwiebelschalenmuster um die zunehmend proliferierenden Gallengänge vorhanden. Auch eine wesentlich weitere Ausbreitung ins

Leberparenchym war zu erkennen. Im Alter von 5 Monaten zeigte sich bei den meisten Tieren, sowohl bei den mit Propranolol behandelten (Abb. 16E) als auch bei den unbehandelten Tieren (Abb. 16F) eine periportale Fibrose. Allerdings war bei den unbehandelten Tieren auch eine zunehmende Ausbildung von Septen zu finden. Im Alter von 8 Monaten ähnelte das Ausmaß und Bild der Fibrose der behandelten (Abb. 16G) Tiere immer mehr dem der unbehandelten Tieren (Abb. 16H). Beide Gruppen zeigten ausgeprägte periportale Fibrosen und massive Ablagerungen von Kollagenfasern um die Portalfelder und die teilweise sehr stark dilatierten und proliferierten Gallengänge. Nur die Ausbildung von Septen war in der unbehandelten Gruppe noch ausgeprägter.

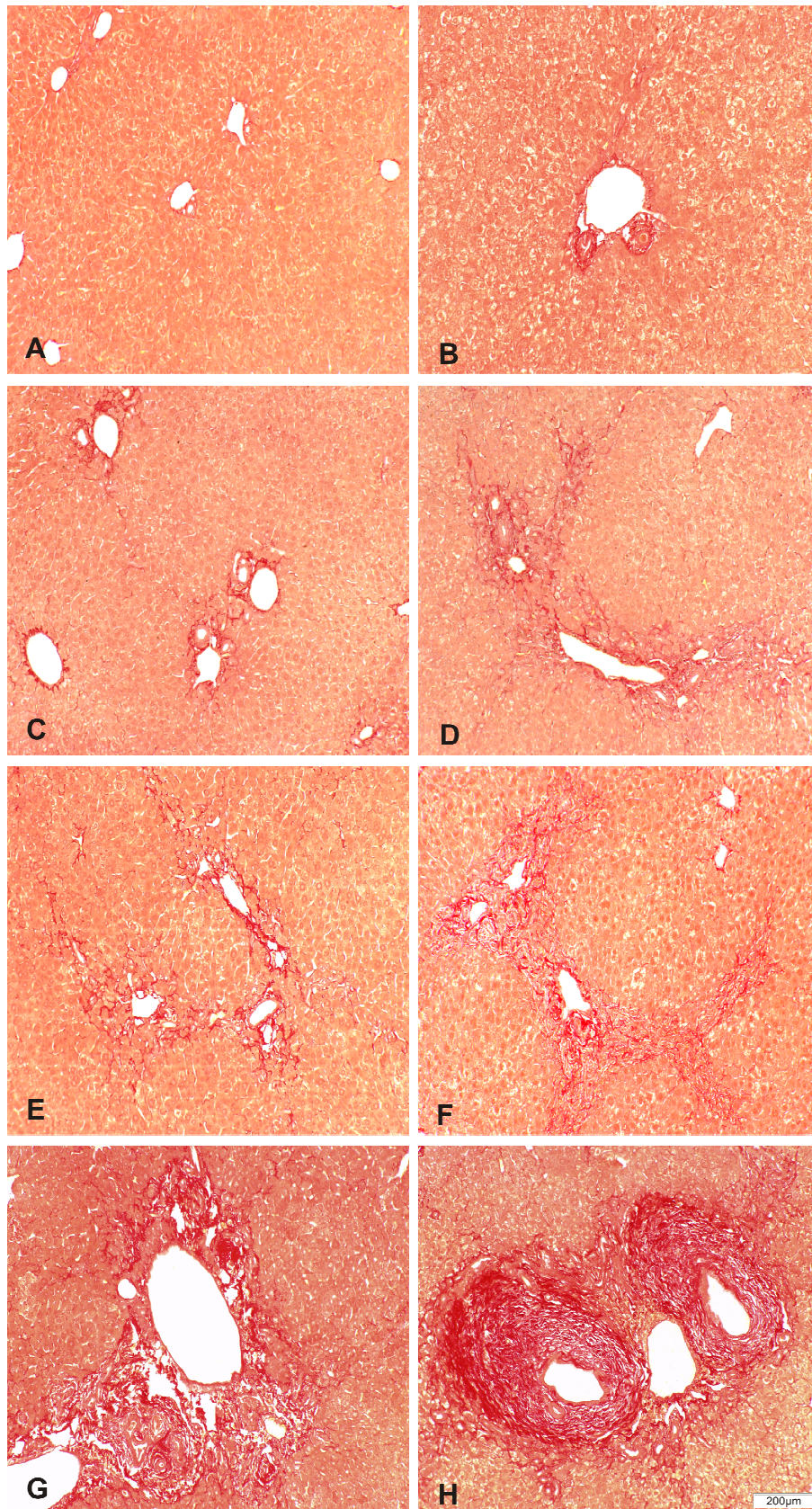


Abb. 16 Repräsentative Sirius-Rot Färbungen von behandelten MDR2^{-/-} Mäusen (A,C,E,G) und unbehandelten MDR2^{-/-} Mäusen (B,D,F,H) im Zeitverlauf. A+B 3 Wochen, C+D 3 Monate, E+F 5 Monate sowie G+H 8 Monate. Eine deutliche Zunahme der Kollagenablagerungen über einen Zeitraum von 8 Monaten und Entstehung einer periportal Fibrose bis hin zur Ausbildung von Septen sind zu erkennen.

Die durch die Auswertung der einzelnen Schnitte erhaltene Verteilung der Fibrorestadien ist in Tab. 11 und Abb. 17 zusammenfassend dargestellt. Nach Auswertung von 73 behandelten und 92 unbehandelten Tieren ergab sich durch die Behandlung der MDR2^{-/-} Mäuse eine Verminderung der Fibroseprogression. Dies zeigte sich zum einen an der höheren Anzahl an therapierten Tieren mit dem Fibrorestadium 0, zum anderen an dem weniger fulminanten Verlauf der Fibrose und der damit einhergehenden geringeren Anzahl an behandelten Tieren mit peribiliärer Sklerosierung, periportal Fibrose und Septenbildung, also Tieren mit Fibrorestadium 3. So zeigten 70% weniger Tiere den Übergang einer lokal begrenzten periportal Fibrose zur interportal Fibrose mit Septenbildung. Die erhaltenen Ergebnisse des Scorings waren signifikant ($p < 0,05$). Auch hier ist eine detaillierte Aufschlüsselung der einzelnen Gruppen und Zeitpunkte im Anhang zu finden (Abb. 51 und Tab. 14).

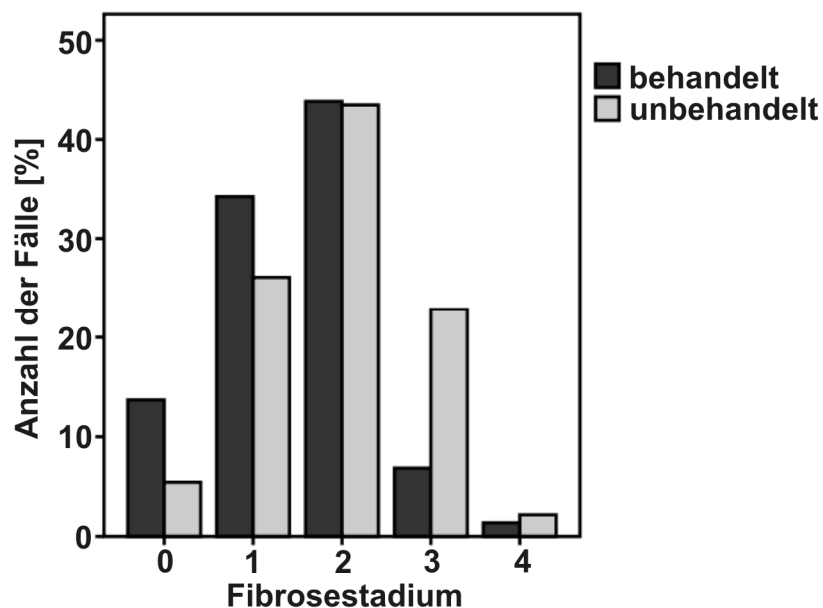
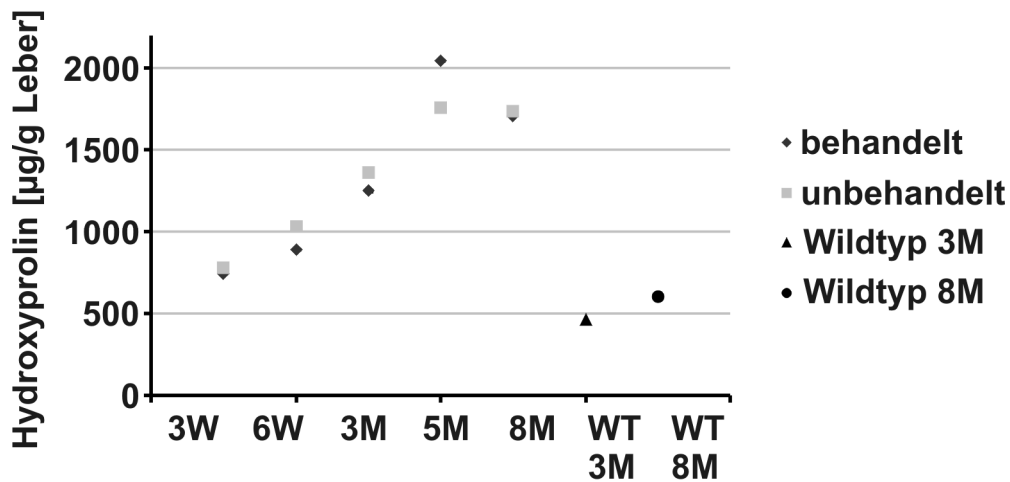


Abb. 17 Fibrorestadien in MDR2^{-/-} Mäusen mit und ohne Behandlung der PSC mit dem β -Adrenozeptor-Antagonisten Propranolol ($p < 0,05$).

Tab. 11 Fibrorestadium in Abhängigkeit von der Propranolol-Behandlung

		Behandlung		Gesamt
		behandelt	unbehandelt	
Fibrorestadium 0	Anzahl	10	5	15
	%	13,7%	5,4%	9,1%
1	Anzahl	25	24	49
	%	34,2%	26,1%	29,7%
2	Anzahl	32	40	72
	%	43,8%	43,5%	43,6%
3	Anzahl	5	21	26
	%	6,8%	22,8%	15,8%
4	Anzahl	1	2	3
	%	1,4%	2,2%	1,8%
Gesamt	Anzahl	73	92	165
	%	100,0%	100,0%	100,0%
				p<0,05

Zusätzlich zum Fibrorestadiums der Tiere wurde noch der Gehalt an Hydroxyprolin in den Lebern bestimmt. Die Aminosäure Hydroxyprolin kommt nahezu ausschließlich in Kollagenmolekülen vor. Die ermittelten Werte spiegeln so den Kollagengehalt des Präparates wider. Die Hydroxyprolinwerte der behandelten MDR2-/- Mäuse lagen an den ersten drei Untersuchungszeitpunkten (3 Wochen, 6 Wochen und 3 Monate) geringfügig unter denen der unbehandelten Mäuse. Nach 8 Monaten waren keine Unterschiede der Hydroxyprolinlevel in den beiden untersuchten Gruppen zu erkennen. Der Assay zeichnete sich insgesamt durch eine sehr große Streubreite der Hydroxyprolinwerte in den einzelnen Gruppen aus. Die Streuung war jedoch in der Gruppe der 5 Monate alten Tiere extrem groß, so dass die Werte für die behandelten Tiere über denen der unbehandelten Tiere lagen und auch höher als bei den 8 Monate alten Tieren waren. Ein Grund hierfür könnte in den großen individuellen Unterschieden der Mäuse des Modells zu finden sein. Eine weitere Ursache könnte darin bestehen, dass aufgrund der hohen Anzahl der Tiere und den weit auseinander liegenden Tötungszeitpunkten keine Parallelmessungen der Proben möglich waren.



Hydroxyprolingehalt [µg/g Leber]	Behandlung	
	behandelt	unbehandelt
3 Wochen	732,52	775,08
6 Wochen	888,92	1033,92
3 Monate	1250,40	1365,75
5 Monate	2045,70	1763,33
8 Monate	1708,62	1699,67
Wildtyp 3 Monate	---	462,00
Wildtyp 8 Monate	---	599,66

Abb. 18 Hydroxyprolingehalt der Lebern Propranolol-behandelter und unbehandelter MDR2^{-/-}-Mäuse an den Zeitpunkten 3, 6 Wochen, 3, 5 und 8 Monate sowie von Wildtyp-Mäusen im Alter von 3 und 8 Monaten.

3.1.5 Einfluss der β -Blocker-Behandlung auf die Gallengangsproliferation

Die Gallengangsproliferation wurde im Mauskollektiv, wie zuvor Entzündungsgrad und Fibrorestadium, anhand der histologischen Färbungen bestimmt (siehe 2.2.7.3). Die Gallengangsproliferation war dabei in den behandelten Tieren in einem frühen Stadium der Erkrankung, 3 Wochen bis 3 Monaten, schwächer ausgeprägt als in den unbehandelten Tieren. Im weiteren Verlauf der Erkrankung, besonders bei fünf und acht Monate alten Tieren, glich die Gallengangsproliferation der behandelten Tiere dem Ausmaß der Gallengangsproliferation der unbehandelten Tiere. Die Auswertung ist in Abb. 19 und Tab. 12 dargestellt, eine detaillierte Aufschlüsselung der Gruppen findet sich im Anhang (Abb. 52 und Tab. 15)

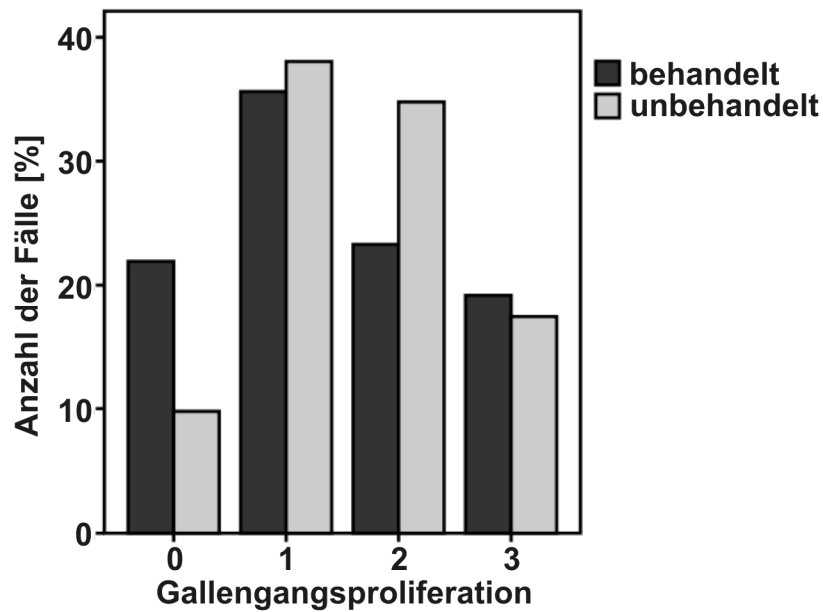


Abb. 19 Gallengangsproliferation im Modell der PSC bei Propranolol-behandelten und unbehandelten Tieren.

Tab. 12 Gallengangsproliferation in Abhängigkeit von der Propranolol-Behandlung

		Behandlung		Gesamt	
		behandelt	unbehandelt		
Gallengangs- proliferation	0	Anzahl	16	9	25
		%	21,9%	9,8%	15,2%
	1	Anzahl	26	35	61
		%	35,6%	38,0%	37,0%
	2	Anzahl	17	32	49
		%	23,3%	34,8%	29,7%
	3	Anzahl	14	16	30
		%	19,2%	17,4%	18,2%
Gesamt	Anzahl	73	92	165	
	%	100,0%	100,0%	100,0	
				n.s	

3.1.6 Einfluss der β -Blocker-Behandlung auf die Expression von profibrogenen und vasokonstriktorischen Mediatoren

3.1.6.1 Profibrogene Mediatoren

Um den Einfluss der β -Blockade auf die Fibrogenese im MDR2^{-/-} Modell evaluieren zu können, wurden mittels Real-Time PCR die Transkriptlevel von Procollagen 1A1, dem Hauptmatrixprotein der Fibrose, und TGF- β , dem zentralen Mediator der Fibrose, bestimmt.

Dabei ergab die in Abb. 20 dargestellte Auswertung keine Anhaltspunkte für einen Einfluss der PSC-Behandlung auf die Transkriptmenge von Procollagen 1A1. Auch die Transkriptlevel von TGF- β zeigten über den gesamten Zeitverlauf keinen Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten MDR2^{-/-} Tieren.

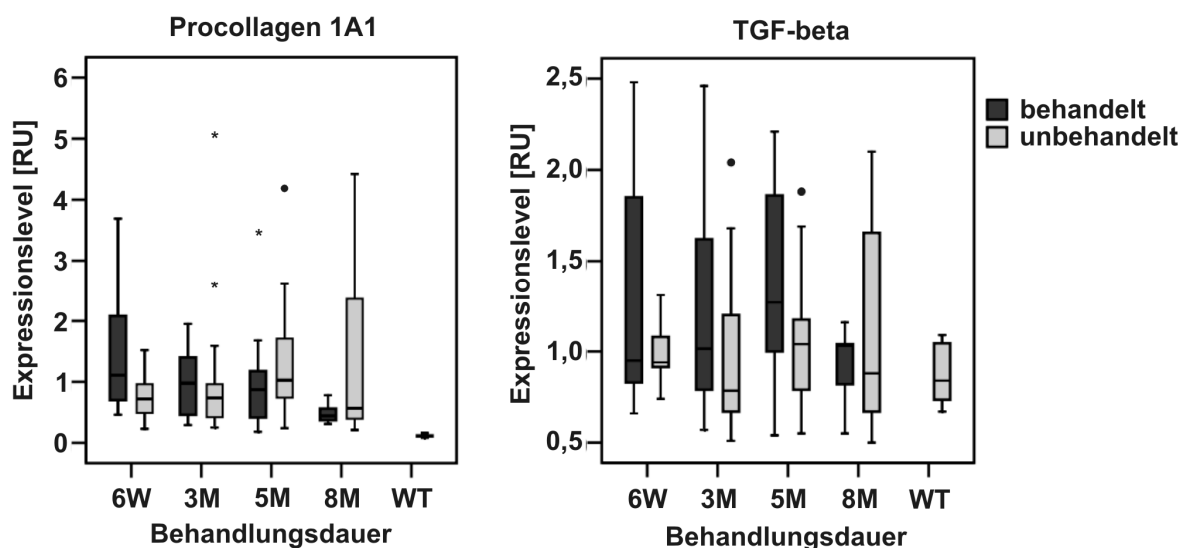


Abb. 20 Auswertung der Real-Time PCR aus Gesamtleberextrakt auf Expression von Procollagen 1A1 und TGF- β . Dargestellt sind die relativen Transkriptlevel der Propranolol behandelten und unbehandelten MDR2^{-/-} Mäuse über den Zeitverlauf (6 Wochen [W], 3, 5 und 8 Monate [M]) sowie der Wildtyp-Tiere [WT].

3.1.6.2 Profibrogene und vasokonstriktorische Mediatoren

Auch die Untersuchung der einzelnen Gesamtleberextrakte auf den profibrogenen und vasokonstriktorischen Mediator Endothelin-1 und seiner Rezeptoren A und B (Daten nicht gezeigt) sowie des AT-1 Rezeptors mittels Real-Time PCR erbrachten keine Hinweise auf einen Einfluss der β -Blockade auf die Fibrogenese (siehe Abb. 21). Auch über den gesamten Zeitverlauf schwankten die relativen Transkriptlevel

nur um einen Mittelwert. Lediglich bei der Transkriptmenge des Endothelin-Rezeptors B war eine leichte Abnahme über den Zeitverlauf zu verzeichnen, jedoch ohne Einfluss der Propranolol-Behandlung (Daten nicht gezeigt). Auch bei dieser PCR war eine große Streuung der einzelnen Werte mit vielen Ausreißern zu erkennen. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden keine weiteren PCRs mit den einzelnen Gesamtleberextrakten durchgeführt.

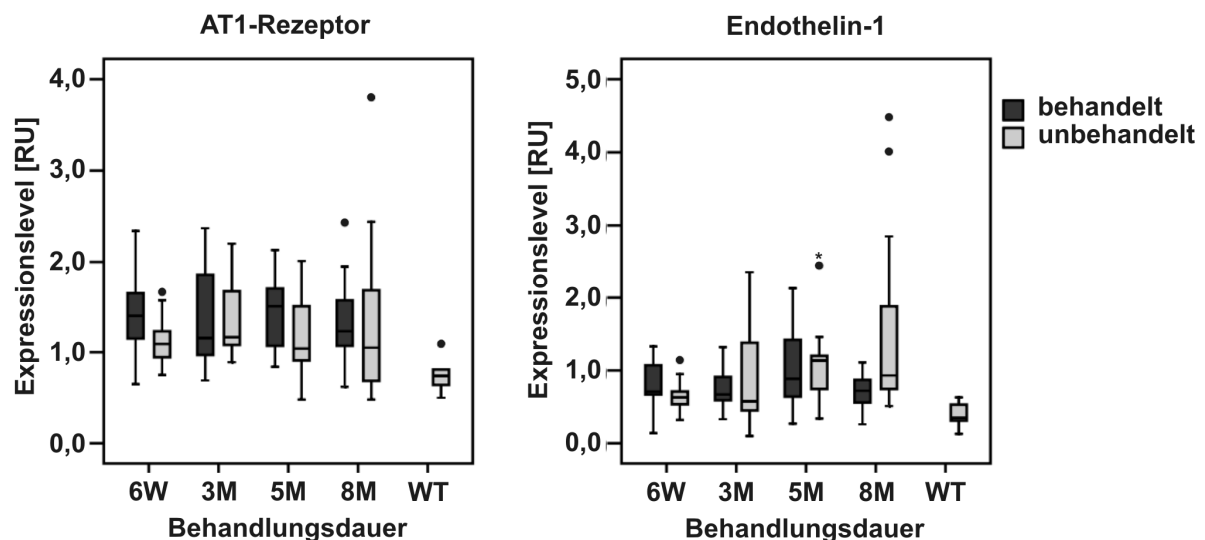


Abb. 21 Auswertung der Real-Time PCRs zur Bestimmung der Transkriptmengen des AT-1 Rezeptors und von Endothelin-1 nach einer Behandlungsdauer von 6 Wochen (6W), 3, 5 und 8 Monaten (3M, 5M und 8M) sowie bei Wildtyp-Mäusen (WT). Die Gruppenstärke der MDR2^{-/-} Tiere beträgt pro Gruppe n>10, für die Wildtyp-Tiere n=6.

3.1.6.3 Mikrodissektion von Arealen aus Portalfeld und Läppchen

Aufgrund der lokalen Ausprägung der Fibrose wurden zusätzlich Real-Time PCRs aus mikrodissoziiertem Gewebe von 3 Monate alten Tieren durchgeführt. Hierbei wurden die Transkriptlevel von Procollagen 1A1 und fibrogenen sowie vasokonstriktorisches Mediatoren im Portalfeld (Acinarzone I) sowie im Parenchym (Acinarzone II und III) von behandelten und unbehandelten MDR2^{-/-} Mäusen miteinander verglichen. Es wurden neben dem profibrogenen Mediator TGF- β auch die Wachstumsfaktoren connective tissue growth factor (CTGF) und tumor necrosis factor alpha (TNF- α) untersucht. Die Auswertung der Real-Time PCRs (siehe Abb. 22) zeigte deutliche Unterschiede in den Transkriptlevel zwischen behandelten und unbehandelten Tieren in den Portalfeldern sowie zwischen Portalfeldern und Parenchym. Die Transkriptlevel in den mikrodissoziierten Portalfeldern der

behandelten Tiere gegenüber den unbehandelten Tieren waren stark erniedrigt. So lag der Transkriptlevel von Procollagen 1A1 um 56%, TGF- β um 55%, CTGF um 54% und TNF- α um 51% niedriger als in den Portalfeldern unbehandelter Tiere. Hingegen zeigte sich im Parenchym der Acinarzone II und III kaum ein Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Tieren. Lediglich der Transkriptlevel von TNF- α war im Parenchym von unbehandelten Tieren mehr als verdreifacht, allerdings waren die Werte im Parenchym bis zu 95% niedriger als dem Portalfeld. Generell lagen die Transkriptlevel der Mediatoren im Portalfeld um ein Vielfaches höher als im Parenchym.

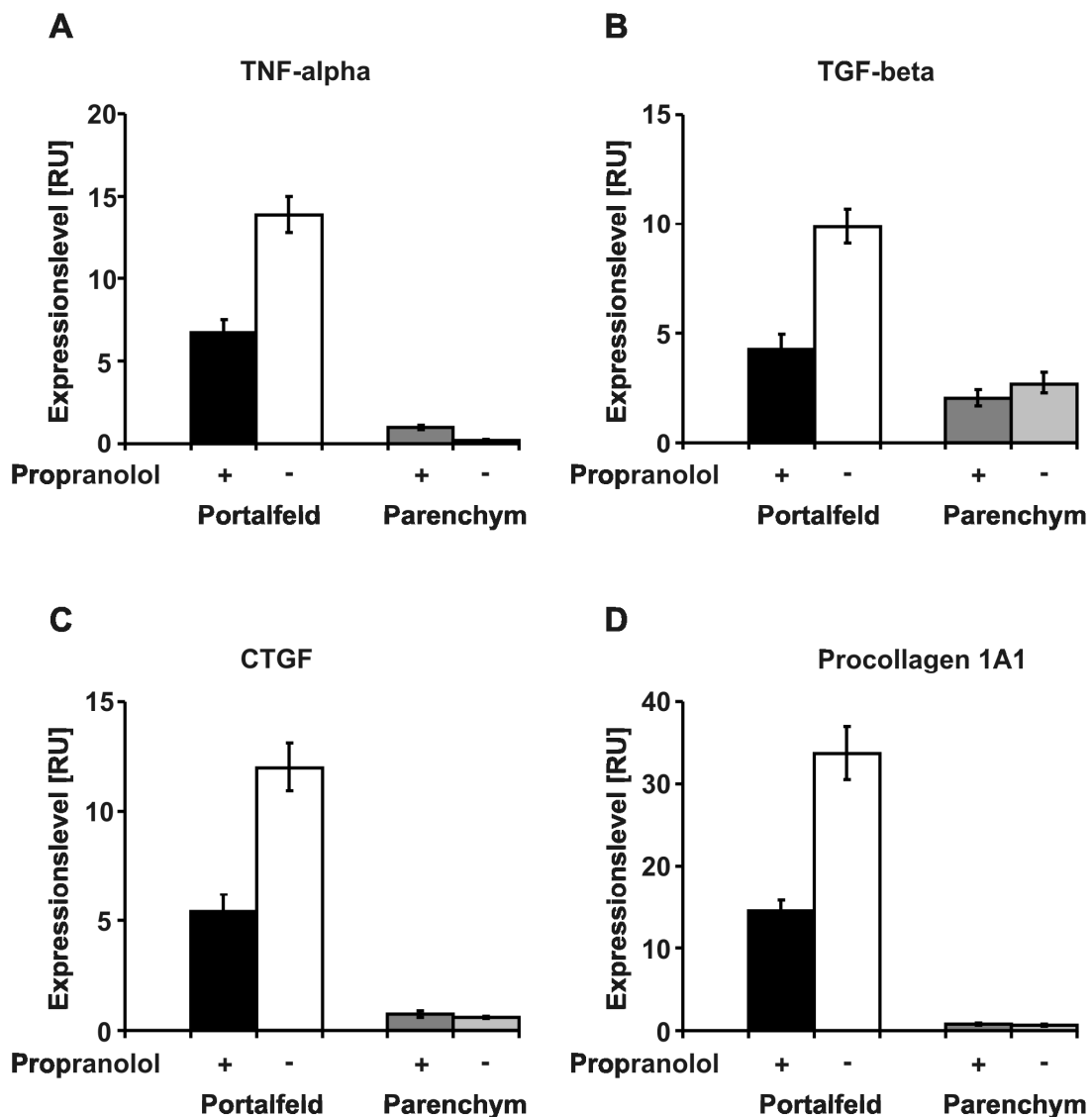


Abb. 22 Transkriptlevel von TNF- α (A), TGF- β (B), CTGF (C) und Procollagen 1A1 (D) in Portalfeld (Acinarzone I) und Parenchym der Acinarzone II und III behandelter und unbehandelter MDR2-/- Mäuse nach Lasermikrodissektion.

Desweiteren wurden auch die Transkriptlevel der profibrogenen und vasokonstriktorisches Mediatoren Angiotensinogen und Endothelin-1 und deren Rezeptoren untersucht (siehe Abb. 23).

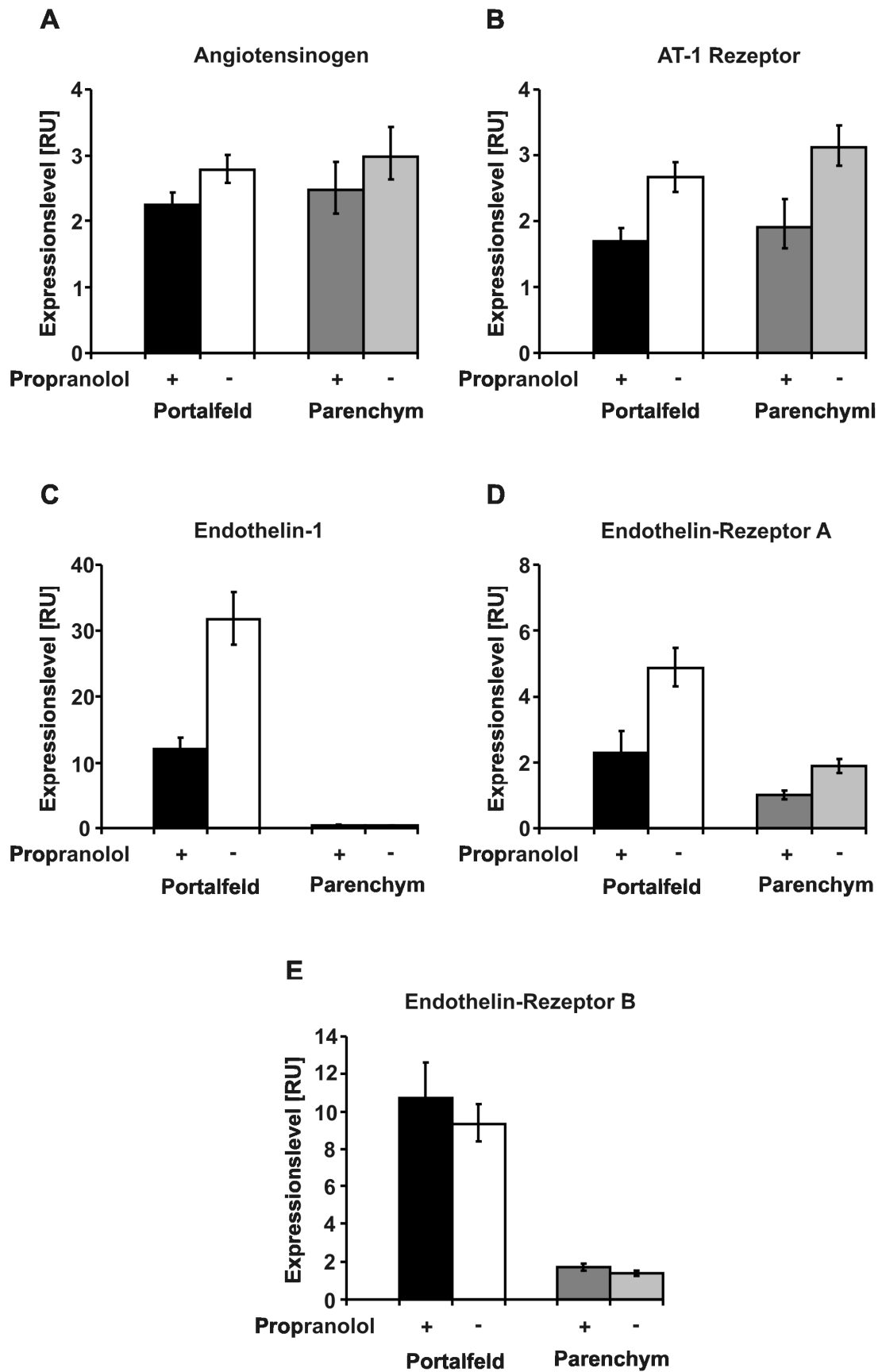


Abb. 23 Transkriptlevel der profibrogenen und vasokonstriktorisches Mediatoren Angiotensinogen (A) und Endothelin-1 (C) sowie deren Rezeptoren AT-1 (B), Endothelin-Rezeptor A (D) und Endothelin-Rezeptor B (E) im Portalfeld und Parenchym von Propranolol-behandelten und unbehandelten MDR2^{-/-} Mäusen.

Bei Angiotensinogen zeigten sich ähnliche Transkriptlevel im Portalfeld und im Parenchym sowie nur geringfügige Unterschiede von 20 bzw. 17% im Portalfeld bzw. Parenchym zwischen behandelten und unbehandelten Tieren. Auch die Transkriptlevel des AT-1 Rezeptors waren im Portalfeld und Parenchym nahezu identisch, allerdings gab es einen Unterschied von 37 bzw. 39% zwischen behandelten und unbehandelten Tieren. Im Gegensatz zu Angiotensinogen und AT-1 Rezeptor zeigten sich deutliche Unterschiede bei Endothelin-1 und den dazugehörigen Endothelin Rezeptoren A und B. So lagen die Transkriptlevel des Endothelin-Rezeptors A in den Portalfeldern um das 2,5-fache höher als im Parenchym. Die Transkriptlevel des Rezeptors waren außerdem bei den behandelten Tieren sowohl in den Portalfeldern als auch im Parenchym um 50% vermindert. Nur ein geringer Unterschied war bei der Betrachtung der Transkriptlevel des Endothelin-Rezeptors B zwischen behandelten und unbehandelten Tieren zu erkennen. Allerdings lagen die Transkriptlevel in den Portalfeldern um das ca. 6-fache höher als im Parenchym. Der größte Unterschied konnte bei der Betrachtung der Expressionslevel von Endothelin-1 beobachtet werden. Im Parenchym wurde Endothelin-1 nur in sehr geringem Maße exprimiert, und in den Portalfeldern lagen die Transkriptlevel um das bis zu 120-fache höher als im Parenchym. Der Endothelin-1 Transkriptlevel in den Portalfeldern der behandelten Tiere war hierbei um 66% erniedrigt gegenüber den unbehandelten MDR2^{-/-} Mäusen.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der Real-time PCR auf mikrodissoziiertem Material einen deutlichen Rückgang der Transkriptlevel von Procollagen 1A1 und der profibrogenen und vasokonstriktorisches Mediatoren in Propranol-behandelten MDR2^{-/-} Mäusen. Diese Ergebnisse untermauern und erklären die zuvor beschriebenen histologischen Verbesserungen bezüglich Entzündungsgrad und Fibrosestadium der Propranolol-behandelten Tiere des PSC Modells.

3.2 Die Rolle der microRNAs in der Leberfibrogenese

Wie in verschiedensten Arbeiten dargestellt, greifen microRNAs massiv durch post-transkriptionelle Hemmung in die Genregulation ein [60, 80]. Nachdem im vorherigen Teil bereits der positive Einfluss einer Propranololbehandlung auf die Leberfibrose in einem experimentellen PSC Modell gezeigt werden konnte, wurde in einem zweiten Ansatz der Einfluss der microRNAs auf die Expression fibrogener Mediatoren untersucht, um microRNAs als mögliche neue therapeutische Zieldomänen zur Behandlung einer Leberfibrose zu identifizieren. Da die Rolle von miRNA für fibrotische Erkrankungen noch völlig unbekannt ist, wurde als erstes das Auftreten von miRNA in Geweben mit Fibrose und ohne Fibrose verglichen. Für diesen Ansatz wurde nicht auf das MDR2^{-/-} Mausmodell zurückgegriffen, da in der PSC die lokale Begrenzung der Fibrose eine Mikrodissektion für molekulare Untersuchungen erforderlich macht. Daher wurden zwei andere Kollektive zusammen gestellt, um die Expression von leberspezifischen und fibroseassoziierten microRNAs untersuchen zu können. Es handelt sich dabei zum einen um ein experimentelles Gallengangverschlussmodell (bile duct occlusion – BDO) und zum anderen um ein Kollektiv von Patienten mit Hepatitis C Infektion.

3.2.1 Untersuchung der miRNA-122 im experimentellen BDO-Modell und in einem Hepatitis C Patientenkollektiv

Für diese primären Untersuchungen wurde zuerst die miR-122 ausgewählt. Bei dieser untersuchten microRNA handelt es sich um die am häufigsten vorkommende microRNA in der Leber [81]. miR-122 spielt eine wichtige Rolle im Cholesteroll-, Fettsäure- und Lipidmetabolismus [82]. Außerdem wurde gezeigt, dass miR-122 mit dem Hepatitis C Virusgenom interagiert und die virale Replikation in der Wirtszelle erleichtert [83]

3.2.1.1 miRNA-122 Expression im BDO-Modell der Ratte

Der operative Verschluss des Gallengangs führt bei den Ratten zu einer chronisch entzündlichen Schädigung der Leber, die nach vier Wochen in eine massive

Leberfibrose mündet. Um dieses Kollektiv zu erstellen, wurden männliche Wistar Ratten in zwei Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe, bestehend aus 12 Tieren, erhielt eine Schein-Operation (sham) und diente als Kontrollgruppe. Der zweiten Gruppe wurden 22 Tiere zugeteilt und einer BDO-Operation unterzogen. Dieses Kollektiv wurde mir freundlicherweise von der Arbeitsgruppe PD Dr. Ulrich Töx (Klinik für Gastroenterologie und Hepatologie am Abdominalzentrum der Uniklinik Köln) zur Verfügung gestellt.

Zur qualitativen und quantitativen Bestimmung des Entzündungsgrades der Rattenlebern wurden Chloracetat-Esterase-Färbungen angefertigt. Durch diese Methode werden Granulozyten angefärbt, so dass diese im Lichtmikroskop ausgezählt werden können (siehe Abb. 24).

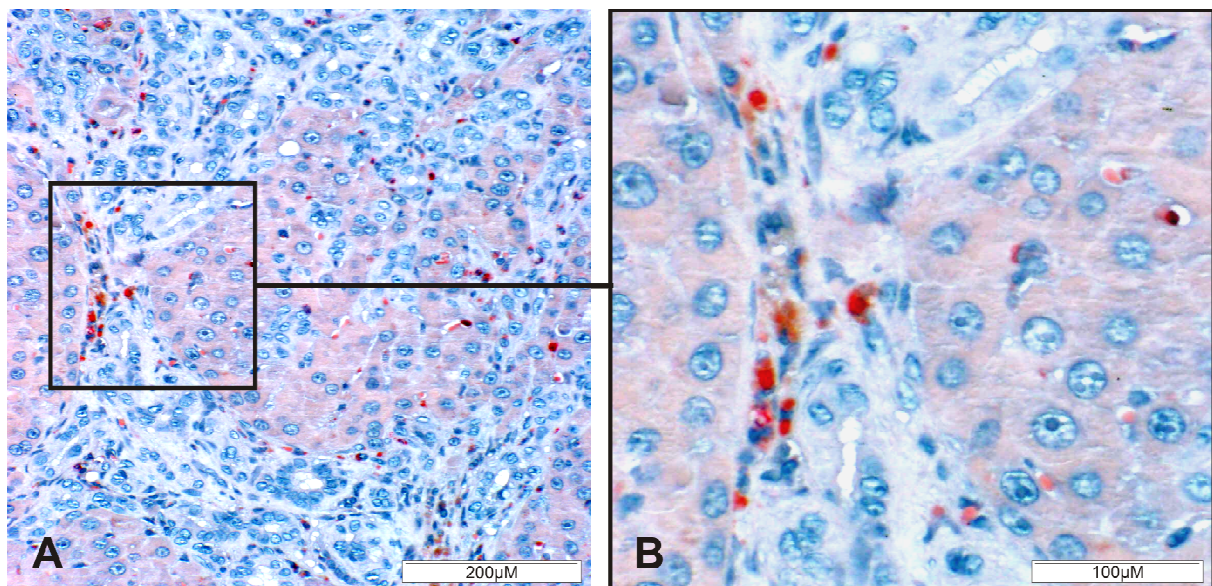


Abb. 24 Chloracetat-Esterase-Färbung einer Rattenleber vier Wochen nach Durchführung einer BDO in 200-facher (A) bzw. 400-facher Vergrößerung (B) (Rot angefärbt sind Granulozyten).

Pro Versuchstier wurden fünf Portalfelder und fünf periphere Bereiche der einzelnen Lebern morphometrisch untersucht und die Granulozytenzahl bestimmt. Die quantitative Auswertung der einzelnen Lebern ergab eine deutlich erhöhte Granulozytenzahl in den Tieren mit Gallengangsverschluss (Gruppe 2) im Vergleich zu den sham-operierten Tieren (Gruppe 1) ($p < 0,0001$). Dieser Unterschied ist in Abb. 25 in Form eines Boxplots dargestellt.

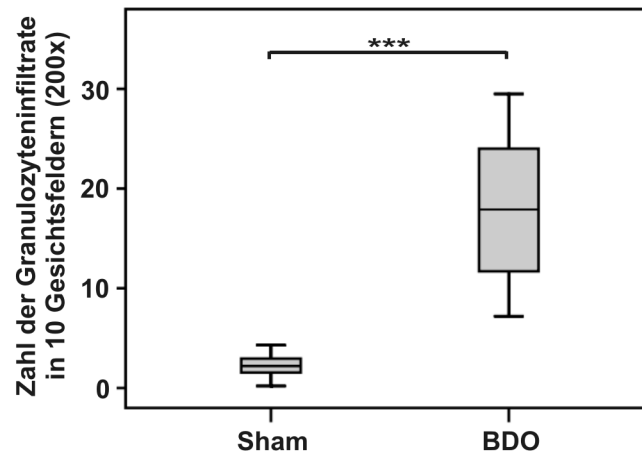


Abb. 25 Ergebnis der morphometrischen Auswertung der Chloracetat-Esterase-Färbung. Es wurden je 5 Gesichtsfelder (200x) im Portalfeld und im Parenchym ausgezählt. Die Granulozytenzahl in den Lebern der BDO-Tiere ist im Vergleich zu den sham-operierten Tieren um das 10-fache erhöht. Die Signifikanz $p < 0,0001$ ist mit *** gekennzeichnet.

Die Bestimmung des Fibrorestadiums der Lebern erfolgte mit Hilfe von Gomori-Färbungen. Diese zeigten die zu erwartenden Unterschiede zwischen den sham-operierten Tieren und jenen mit Gallengangsverschluss. In Abb. 26 ist die deutliche Septenbildung und Ablagerung von extrazellulärer Matrix in der Leber eines BDO-Tieres zu erkennen.

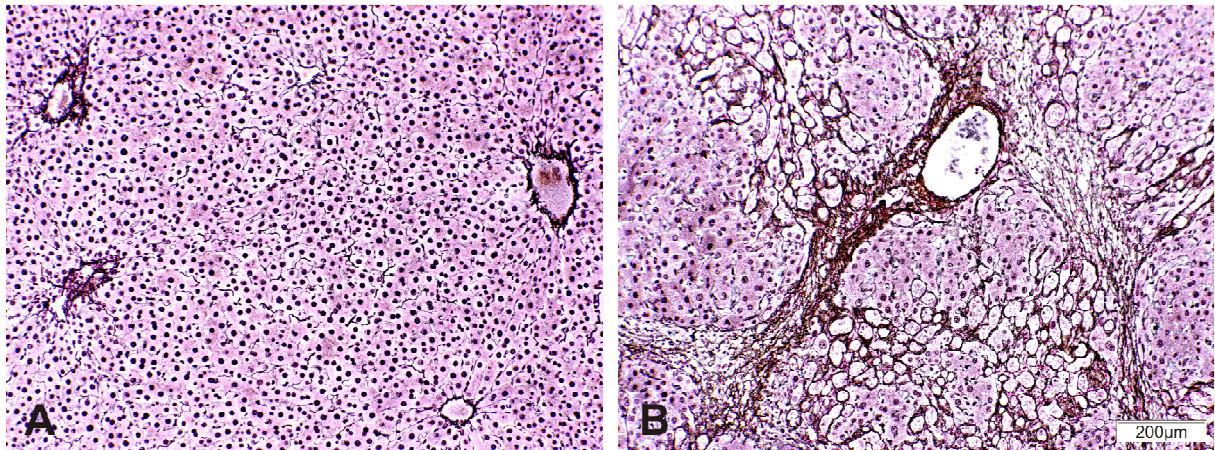


Abb. 26 Gomori-Färbung der Leber eines sham-operierten Tieres (A) sowie der Leber eines Tieres vier Wochen nach Gallengangsverschluss (B). Es sind eine ausgeprägte Septenbildung und schwarzbraune Ablagerungen von Kollagenfasern in der Leber des BDO-Tieres zu erkennen (beide Aufnahmen in 100-facher Vergrößerung).

Um eine quantitative Aussage über das Ausmaß der Fibrose treffen zu können wurde zudem der Hydroxyprolinegehalt der einzelnen Lebern bestimmt (siehe

2.2.6.1). Die Hydroxyprolinwerte sind in Abb. 27 als Boxplot zusammengefasst. Der ermittelte Gehalt an Hydroxyprolin in den Lebern der BDO-Tiere war dreimal so hoch wie in den sham-operierten Tieren. Dieser Unterschied im Hydroxyprolingehalt ist signifikant ($p < 0,0001$).

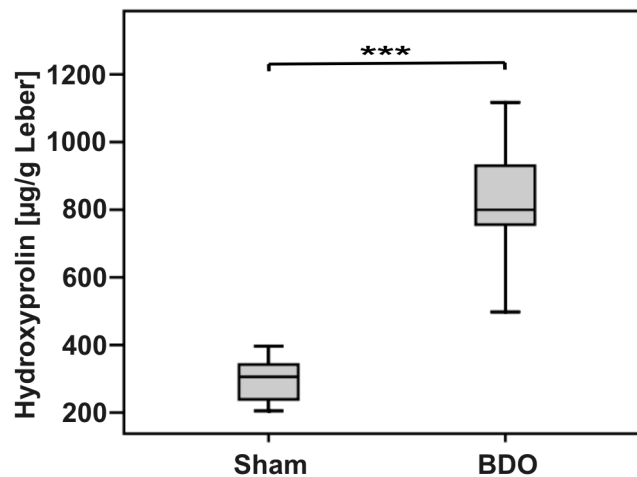


Abb. 27 Boxplot-Darstellung der Hydroxyprolinwerte. Ratten mit Gallengangsverschluss weisen im Durchschnitt einen dreifachen Hydroxyprolingehalt in ihren Lebern auf im Vergleich zu den Kontrolltieren. Die Signifikanz $p < 0,0001$ ist mit *** dargestellt.

Für die Untersuchungen der Expressionslevel verschiedener microRNAs bei den sham-operierten Tieren sowie bei denen mit Gallengangsverschluss wurden zunächst die Leberproben lysiert, Gesamt-RNA extrahiert und diese in cDNA umgeschrieben (siehe 2.2.2.3 und 2.2.2.6). Anschließend wurden die Proben mittels Real-Time PCR auf die entsprechenden microRNAs untersucht. Die Untersuchung der Expression von miR-122 in dem experimentellen Rattenmodell zeigte eine starke Herabregulation der miR-122 in den BDO-Ratten im Vergleich zu den sham-operierten Tieren. Der Expressionslevel in den sham-operierten Tieren lag bei dem Dreifachen der untersuchten BDO-Tiere. Die Ergebnisse sind in Abb. 28 als Boxplot zusammengefasst und waren signifikant ($p < 0,0001$).

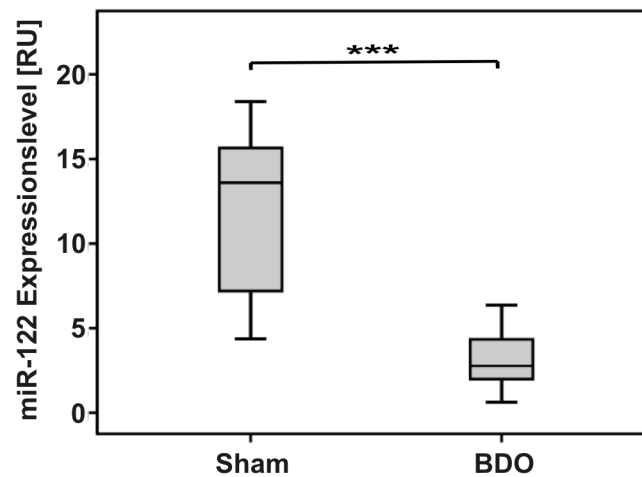


Abb. 28 Expression von miR-122 in sham-operierten und BDO-Ratten. Sham-operierte Tiere zeigten einen dreifachen Expressionslevel von miR-122 als BDO-Tiere. Die Signifikanz $p < 0,0001$ ist mit *** gekennzeichnet.

Um einen Zusammenhang zwischen microRNA-Expression und Leberschädigung zu evaluieren, wurde der Korrelationskoeffizient zwischen der miR-122 Expression und dem Hydroxyprolinegehalt berechnet. Dabei zeigte sich eine hohe negative Korrelation der miR-122 Expression und dem Hydroxyprolinegehalts der Lebern ($r = -0,786$). Je höher der Hydroxyprolinegehalt der Lebern im untersuchten experimentellen BDO-Modell, desto geringer ist die Expression der miR-122. Eine ähnlich hohe negative Korrelation konnte zwischen der miR-122 Expression und der Granulozyteninfiltration im Modell errechnet werden ($r = -0,715$). Die einzelnen Werte des Hydroxyprolinegehalts bzw. der Granulozyteninfiltration und der miR-122 Expression sind im Streudiagramm in Abb. 29 dargestellt.

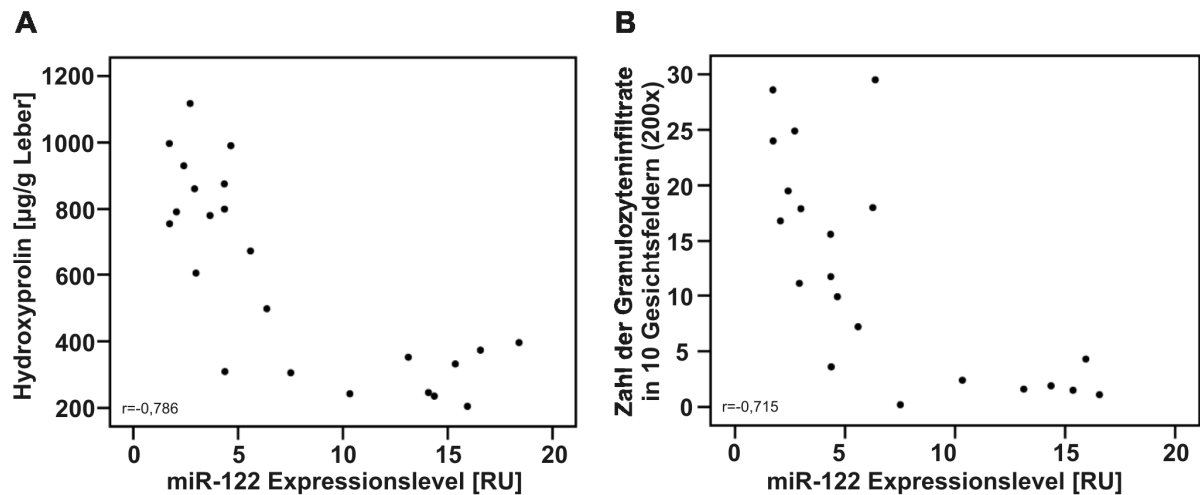


Abb. 29 Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen miR-122 Expression und Hydroxyprolinegehalt (A) bzw. Granulozyteninfiltration (B) im Ratten BDO-Modell. Es zeigte sich eine hohe negative Korrelation zwischen der miR-122 Expression und dem Hydroxyprolinegehalt ($r=-0,786$) sowie zwischen der miR-122 Expression und der Granulozyteninfiltration ($r=-0,715$).

3.2.1.2 Untersuchung der leberspezifischen miRNA-122 im humanen Hepatitis C Patientenkollektiv

Es handelt sich bei dem verwendeten Material um 84 paraffineingebettete Leberbiopsien von Hepatitis C positiven Patienten. Das Kollektiv wurde so zusammengestellt, dass von jedem Fibrosestadium ungefähr gleich viele Proben zur Verfügung standen. Lediglich vom Fibrosestadium 0 waren nur von zwei Patienten Proben vorhanden, da bei Erkennen der Erkrankung und der Leberbiopsie meist schon eine fortgeschrittene Fibrosierung der Leber vorliegt. Die Bestimmung des Fibrosestadiums erfolgte im Rahmen der Routinediagnostik im Institut für Pathologie der Uniklinik Köln nach dem Desmet-Score (S0=keine Fibrose, S1=minimal, S2=mild, S3=mäßig, S4=schwer) [84].

In Abb. 30 sind beispielhaft Gomori-Färbungen der Fibrosestadien S1–S4 dargestellt. Die Färbungen zeigen die verschiedenen Stadien einer portalen Fibrose mit Septenbildung bis hin zur Zirrhose.

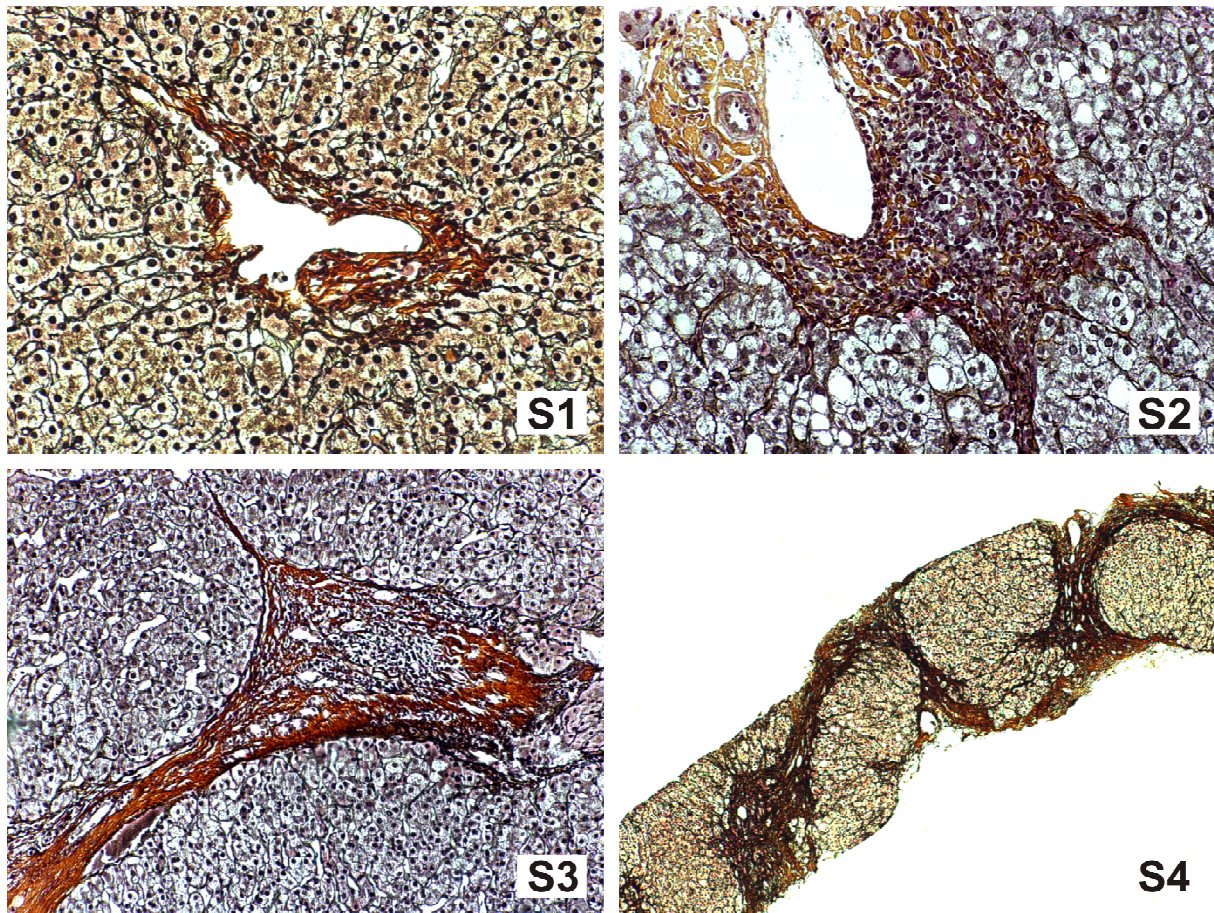


Abb. 30 Gomori-Färbungen von Leberbiopsien der Fibrosestadien S1-S4. Bei S4 handelt es sich um eine Übersichtsaufnahme der Portalfelder in einer Nadelstanzbiopsie. Die Färbungen wurden im Rahmen der Routinediagnostik angefertigt und freundlicherweise von Frau Dr. Uta Drebber zur Verfügung gestellt.

Die Bestimmung des Expressionslevels von miR-122 erfolgte wieder mittels Real-Time PCR. Die Ergebnisse der microRNA-Quantifizierung (2.2.2.5 und 2.2.3.3) zeigten in diesem Patientenkollektiv eine kontinuierliche Abnahme der miR-122 im Verlauf der Fibrose von Stadium 0 zu Stadium 4.

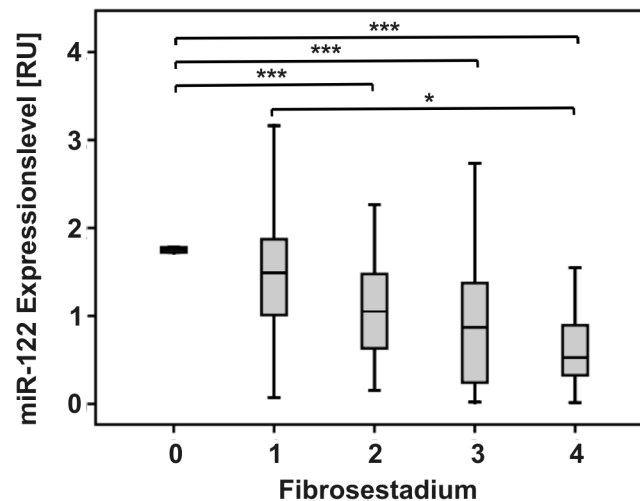


Abb. 31 Expressionslevel von miR-122 in Lebern von Hepatitis C Patienten mit verschiedenen Fibrosestadien S0-S4.

3.2.2 Die differentielle microRNA Expression während der myofibroblastischen Differenzierung und Fibrogenese

Um die microRNA Expression während der Fibrogenese besser untersuchen zu können, wurden Zellkulturversuche mit primären hepatischen Sternzellen durchgeführt.

3.2.2.1 Differentielle microRNA Expression während der myofibroblastischen Differenzierung

Die myofibroblastische Differenzierung von hepatischen Sternzellen (HSC) ist ein zentraler Prozess der sinusoidalen Fibrose, die nach chronischer Schädigung durch Alkohol oder durch virale Infektionen die häufigste Vernarbungsreaktion der Leber darstellt. In der Zellkultur kommt es durch das Ausplattieren der hepatischen Sternzellen auf Plastikware zu myofibroblastischen Veränderungen, die die *in vivo*-Transdifferenzierungsvorgänge repräsentieren. Daher wurden die microRNA-Muster ruhender und aktivierter hepatischer Sternzellen im fibroserepräsentativen Zellkultursystem (siehe 2.2.9.8) untersucht.

Dazu wurden aus Rattenlebern hepatische Sternzellen isoliert und diese auf 6-Well-Platten mit einer Anzahl von 2×10^6 Zellen pro Well ausplattiert. Die hepatischen Sternzellen wurden über einen Zeitraum von bis zu 9 Tagen kultiviert. Die durch die

Zellkultur induzierte myofibroblastische Differenzierung wurde zunächst auf die Ausprägung charakteristischer Merkmale, die während einer Leberfibrogenese auftreten, kontrolliert. Abb. 32 zeigt den Größenzuwachs der hepatischen Sternzellen und die Differenzierung in einen myofibroblastischen Zelltyp. Ebenfalls erkennbar ist der Fettverlust der hepatischen Sternzellen mit zunehmender Differenzierung (Abb. 32A-C). Außerdem konnte im Verlauf der *in vitro* Differenzierung die deutliche Zunahme der α -smooth muscle actin Expression immunzytochemisch nachgewiesen werden (Abb. 32D-E). Die GFAP-Antikörperfärbung hingegen zeigt nur einen sehr geringen GFAP-Verlust im Verlauf der Kultur (Abb. 32G-I).

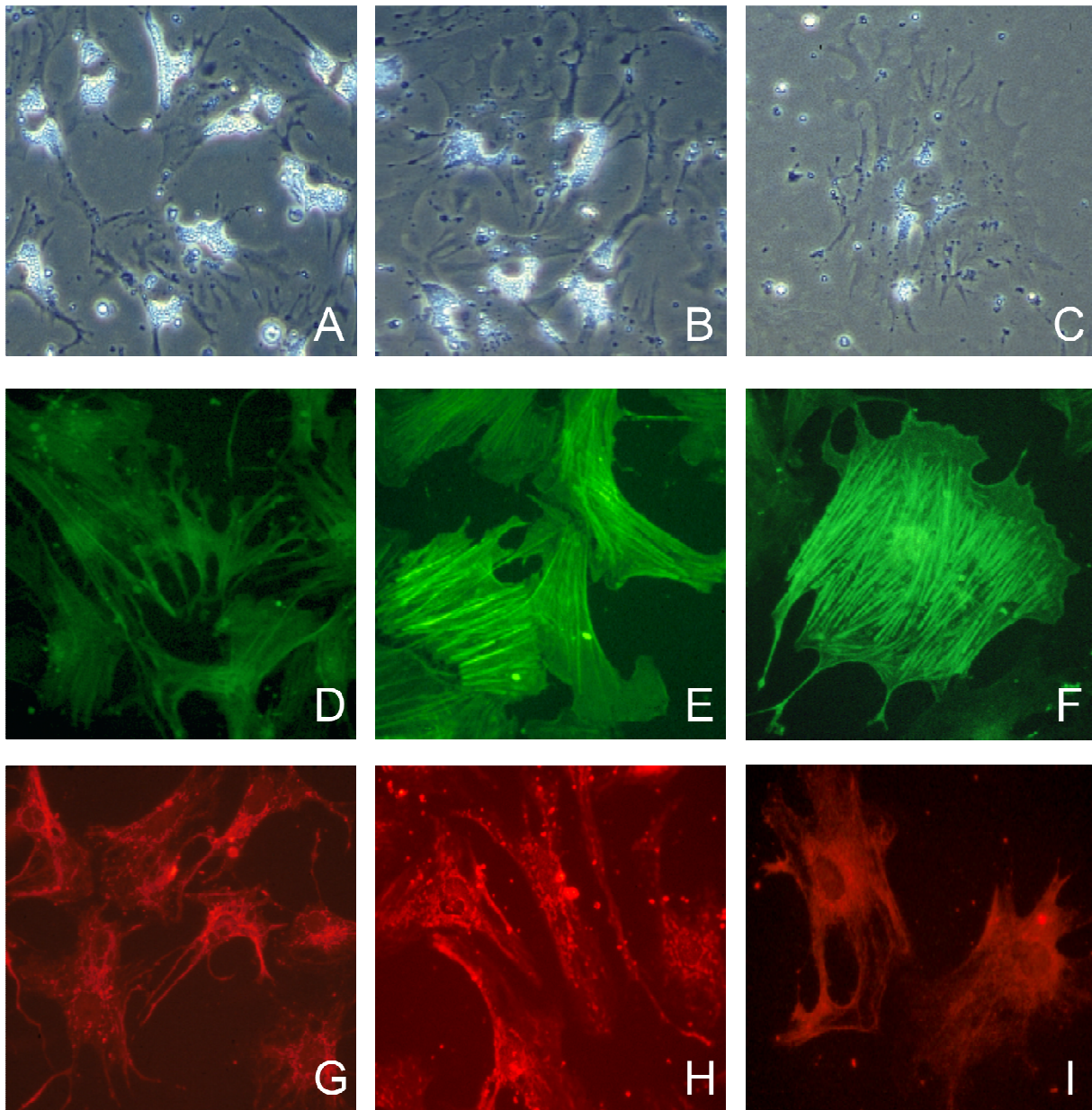


Abb. 32 Charakterisierung von primären hepatischen Sternzellen der Ratte. Phasenkontrastaufnahme der hepatischen Sternzellen am 3, 5 und 7 Tag (A-C). Es sind deutliche phänotypische Veränderung zu erkennen. Antikörperfärbung gegen α -smooth muscle actin der Zellen am 3., 5. und 7. Tag. Es zeigt sich eine Zunahme der Expression von α -SMA über den Zeitverlauf (D-F). GFAP-Antikörperfärbung am 3., 5. und 7. Tag der Zellkultur (G-I). Die GFAP-Färbung zeigt die Reinheit der isolierten hepatischen Sternzellen.

Die lichtmikroskopische und immunchemische Begutachtung der hepatischen Sternzellen sowie die PCR-Analysen auf zelltypspezifische Markerexpression wie die Expression von Hepatozytenspezifischem Albumin, Endothelspezifischem PECAM und Makrophagenspezifischem ED2 (Daten nicht gezeigt) belegten, dass die Kultur der hepatischen Sternzellen nach 3 Tagen zu mehr als 90 % rein war und die

charakteristischen fibrogenen und myofibroblastischen *in vivo*-Veränderungen auch *in vitro* durchliefen und daher für die microRNA-Analyse geeignet waren.

Zur Untersuchung der differentiellen Expression von microRNAs während der myofibroblastischen Transdifferenzierung wurden die hepatischen Sternzellen nach 36 Stunden, 3, 5, 7 und 9 Tagen lysiert. Die Mikrofluidikanalyse der isolierten Gesamt-RNA zeigte eine völlig intakte RNA mit einem RIN (RNA Integritätsnummer) von 10, die für die microRNA-Sichtung durch Microarray-Hybridisierung geeignet war.

Die Auswertung des differentiellen microRNA Profilmusters in den ruhenden und myofibroblastischen hepatischen Sternzellen zeigte bei 107 der 360 untersuchten microRNAs Unterschiede. Von diesen 107 differentiell auftretenden microRNAs waren 65 nur geringfügig (1-1,24-fach) verändert, 26 microRNAs zeigten einen Unterschied zwischen dem 1,25-1,49-Fachen und 11 microRNAs waren zwischen 1,5-1,74-fach differentiell reguliert. Fünf microRNAs zeigten eine deutliche Veränderung in ihrer Regulation an beiden Untersuchungszeitpunkten von mehr als dem 2-fachen.

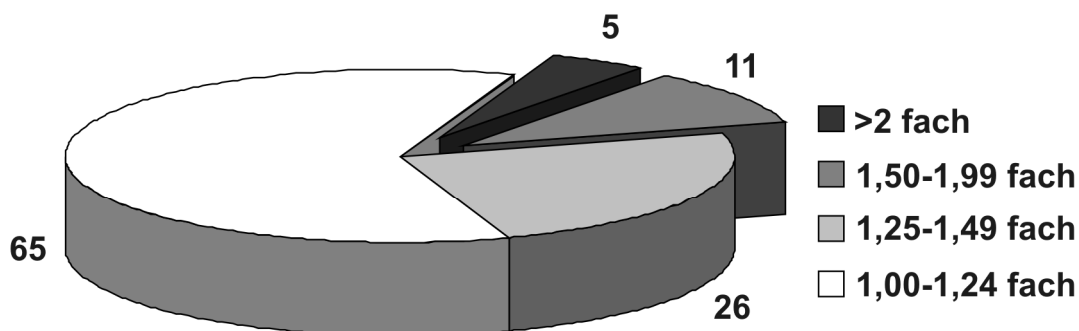


Abb. 33 Verteilung und n-fache Regulation der 107 differentiell regulierten microRNAs während der myofibroblastischen Transdifferenzierung von hepatischen Sternzellen der Ratte.

Den größten Unterschied mit einer 3,9-fachen Reduktion zeigte dabei miR_plus17869. Bei miR_plus microRNAs handelt es sich um microRNA-Typen, die bis zum jetzigen Zeitpunkt aus lizenzrechtlichen Gründen noch nicht in der miRBase-

Datenbank erfasst wurden. Die microRNAs miR-125b, miR-22, miR-143 sowie miR-31 waren mehr als zweifach erhöht in myofibroblastisch-aktivierten hepatischen Sternzellen gegenüber den ruhenden hepatischen Sternzellen. Die Regulation der 30 am stärksten veränderten microRNAs sind in Abb. 34 dargestellt.

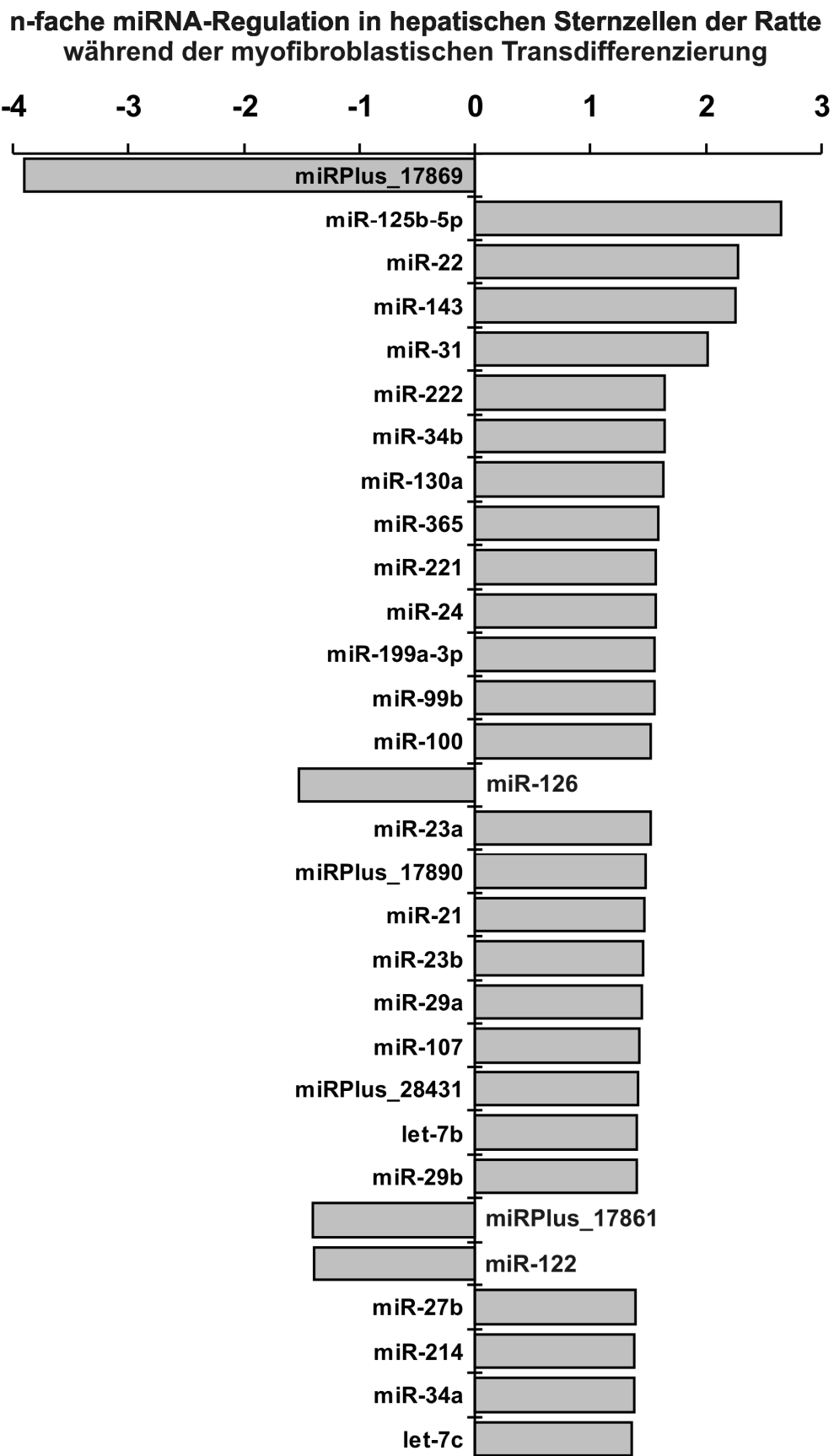


Abb. 34 Verteilungsmuster der 30 am höchsten differentiell exprimierten microRNAs in ruhenden und aktivierten hepatischen Sternzellen (Hybridisierung von qualitätskontrollierter Gesamt-RNA aus hepatischen Sternzellen an Tag 3 und Tag 7 der Kultur während der myofibroblastischen Transdifferenzierung auf LNA-basierten Microarrays (Kap. 2.2.2.8)).

Um die Ergebnisse der Microarrays zu bestätigen, wurden die Expressionsprofile von miR-125b, miR-22, miR-143, miR-222, miR-221 und miR-126 während der myofibroblastischen Transdifferenzierung durch quantitative Bestimmung mittels Real-Time PCR überprüft. Die PCR-Ergebnisse bestätigten die durch die Microarray-Analyse erhaltenen Daten. Es zeigte sich, wie in Abb. 35 dargestellt, eine signifikante Hochregulation von miR-125b, miR-22, miR-143, miR-221 sowie miR-222. Außerdem konnte eine Herunterregulation von miR-126 gezeigt werden (siehe Abb. 35).

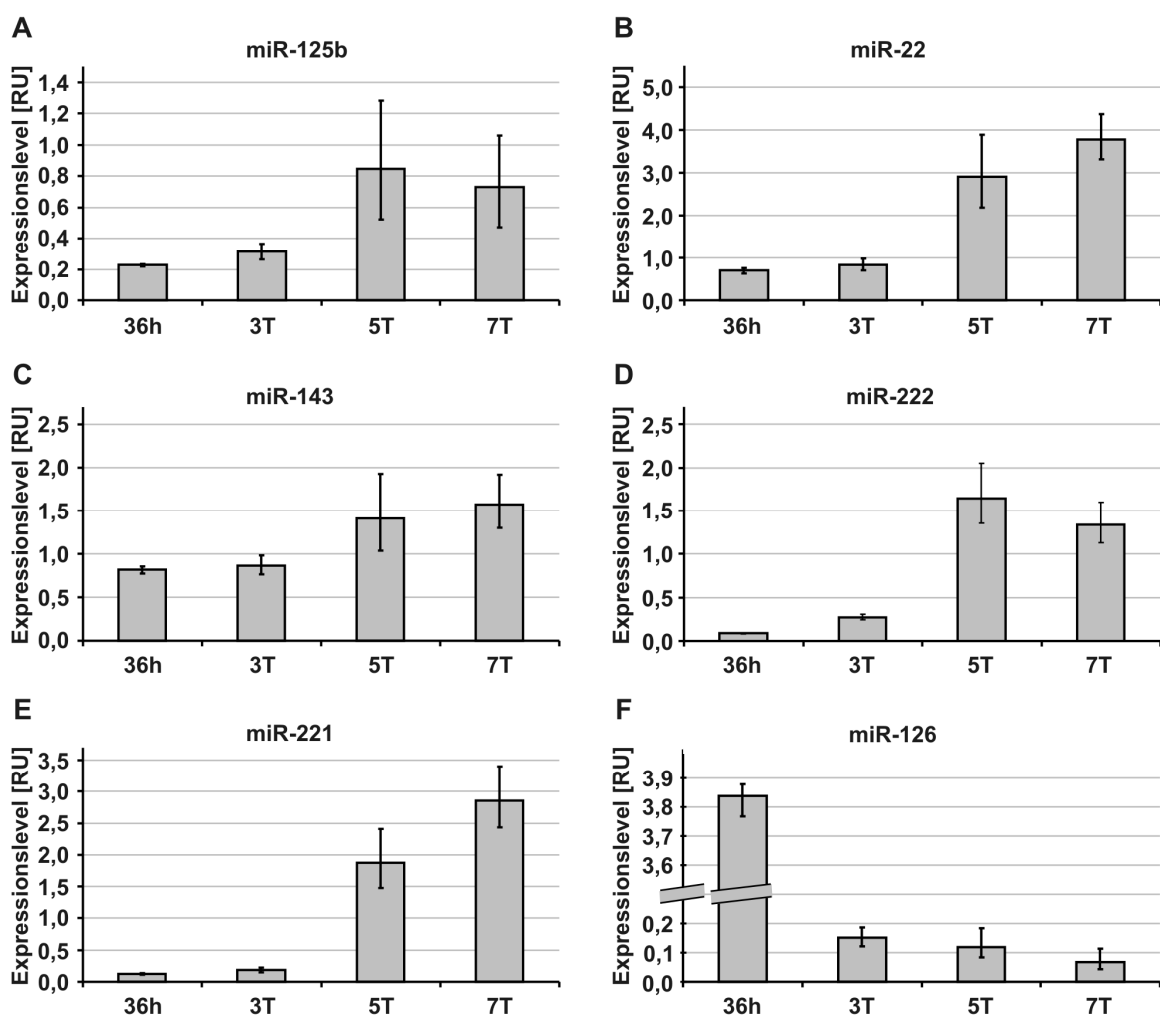


Abb. 35 Expressionsprofile der microRNAs miR-125b, miR-22, miR-143, miR-222, miR-221 sowie miR-126 während der myofibroblastischen Transdifferenzierung von hepatischen Sternzellen der Ratte nach 36 Stunden, 3, 5 und 7 Tagen (36h, 3T, 5T und 7T).

Die Expressionsprofile der microRNAs miR-125b, miR-22, miR-143, miR-222, miR-221 und miR-126 wurden anschließend speziesübergreifend während der

myofibroblastischen Transdifferenzierung von hepatischen Sternzellen der Maus überprüft. Die charakterisierten Mausproben wurde mir freundlicherweise von Dr. Leo van Grunsven, Vrije Universiteit Brussel, zur Verfügung gestellt. Auch hier zeigte sich das gleiche Expressionsmuster wie bei hepatischen Sternzellen der Ratte und eine signifikante Hochregulation von miR-125b, miR-22, miR-143, miR-222 und miR-221. Lediglich bei miR-126 war zunächst ein Anstieg der microRNA-Expression am ersten Tag der Kultur zu verzeichnen, bevor es zu einem starken Abfall der miR-126-Expression kam (siehe Abb. 36).

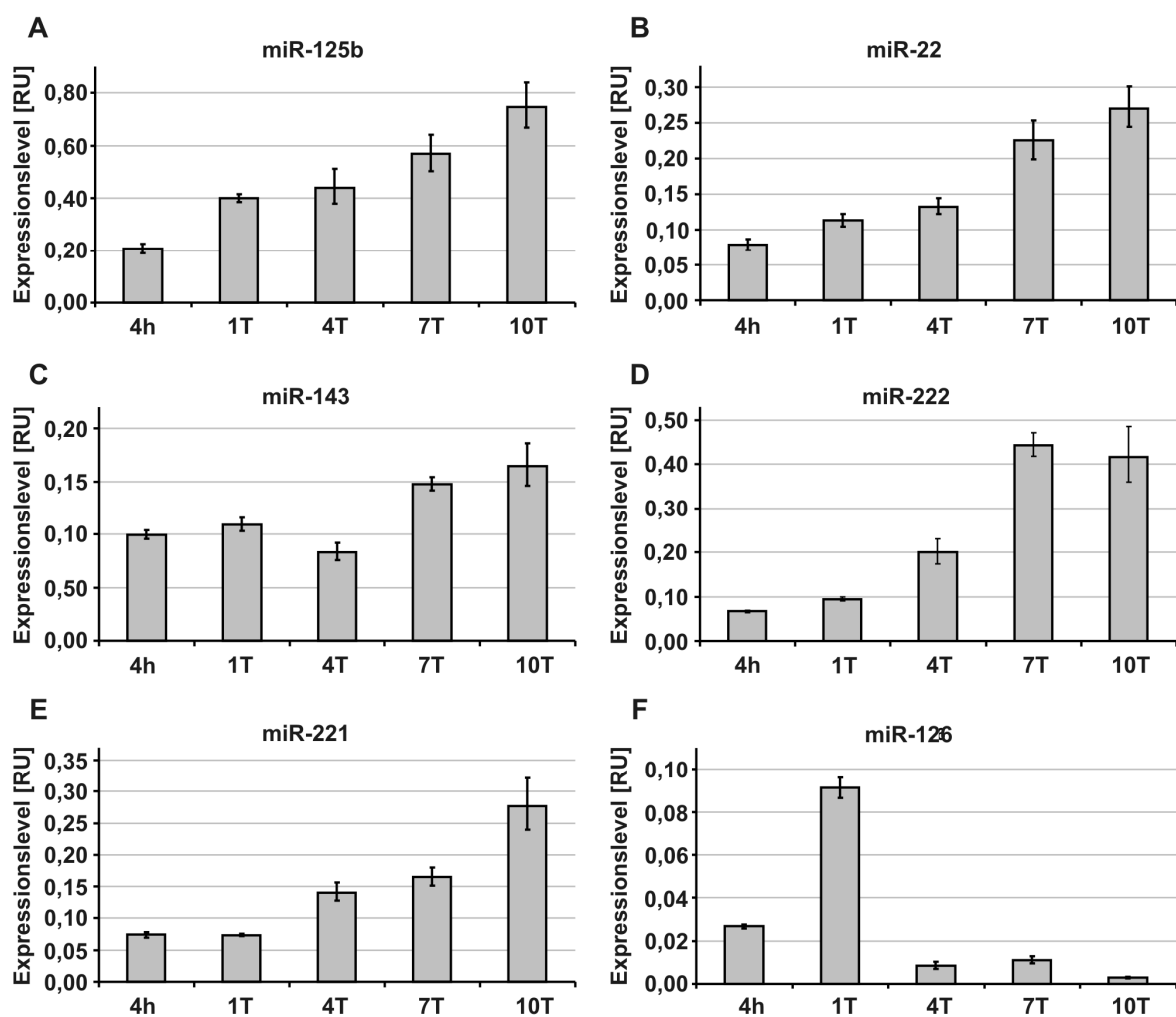


Abb. 36 Expressionsanalyse der microRNAs miR-125b, miR-22, miR-143, miR-222, miR-221 sowie miR-126 mittels Real-Time PCR während der myofibroblastischen Transdifferenzierung von hepatischen Sternzellen der Maus nach 4 Stunden, 1, 4, 7 und 10 Tagen (4h, 1T, 4T, 7T und 10 Tag).

Anschließend wurden aus einem Leberresektat humane hepatische Sternzellen isoliert. Die Überprüfung auf Reinheit erfolgte durch mikroskopische Begutachtung.

Die humane Sternzellpräparation zeigte nach 36 Stunden eine leichte Verunreinigung mit Endothelzellen, die aber durch Waschen mit Medium am dritten Tag nicht mehr zu erkennen war. Die Expression der zwei am stärksten regulierten microRNAs, miR-125b und miR-22, wurden dann auch während der myofibroblastischen Transdifferenzierung von humanen hepatischen Sternzellen getestet. miR-125b und miR-22 zeigten eine signifikante Hochregulation im Verlauf der myofibroblastischen Transdifferenzierung (siehe Abb. 37).

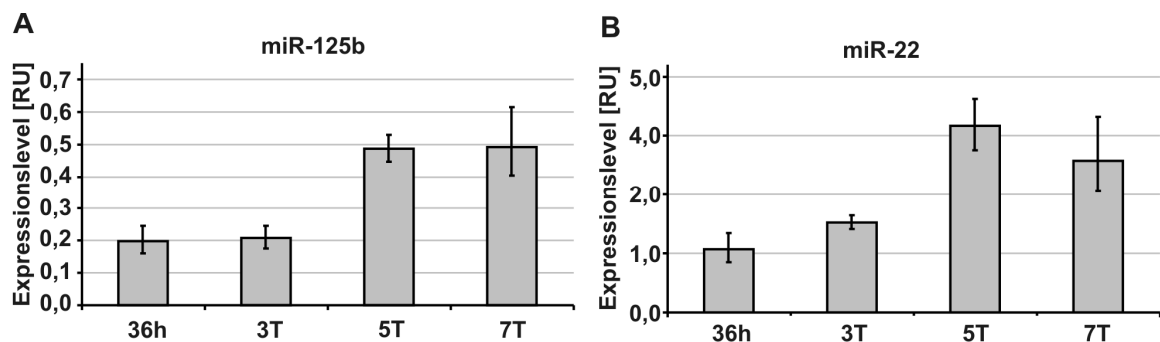


Abb. 37 Expression von miR-125b und miR-22 in humanen hepatischen Sternzellen während der myofibroblastischen Transdifferenzierung nach 36 Stunden, 3, 5 und 7 Tagen der Kultur (36h, 3T, 5T und 7T).

Auch hier konnten die auf Ratten- und Mauszellen sowie die auf Microarrays erhaltenen Ergebnisse bestätigt werden.

3.2.2.2 Untersuchung der während der myofibroblastischen Transdifferenzierung differenziell regulierten microRNAs in *in vivo* Modellen

Um zu untersuchen, wie sich die während der myofibroblastischen Differenzierung dysregulierten microRNAs in der Leberfibrogenese verhalten, wurde die Expression ausgewählter microRNAs in den zuvor beschriebenen Leberfibrose-Kollektiven (Kap. 3.2.1.1 und 3.2.1.2) untersucht.

3.2.2.2.1 MicroRNA Expression in der experimentellen Fibrose nach Gallengangsverschluss

Die Bestimmung der microRNA Expressionslevel mittels Real-Time PCR von miR-22 und miR-125b zeigte eine Repression der beiden microRNAs in den Tieren, die einer Gallengangsokklusion unterzogen worden waren im Vergleich zu den sham-operierten Tieren ($p < 0,0001$ bzw. $p < 0,05$). Die Untersuchung von miR-143 in beiden Gruppen ergab keinen Unterschied im Expressionsmuster (siehe Abb. 38).

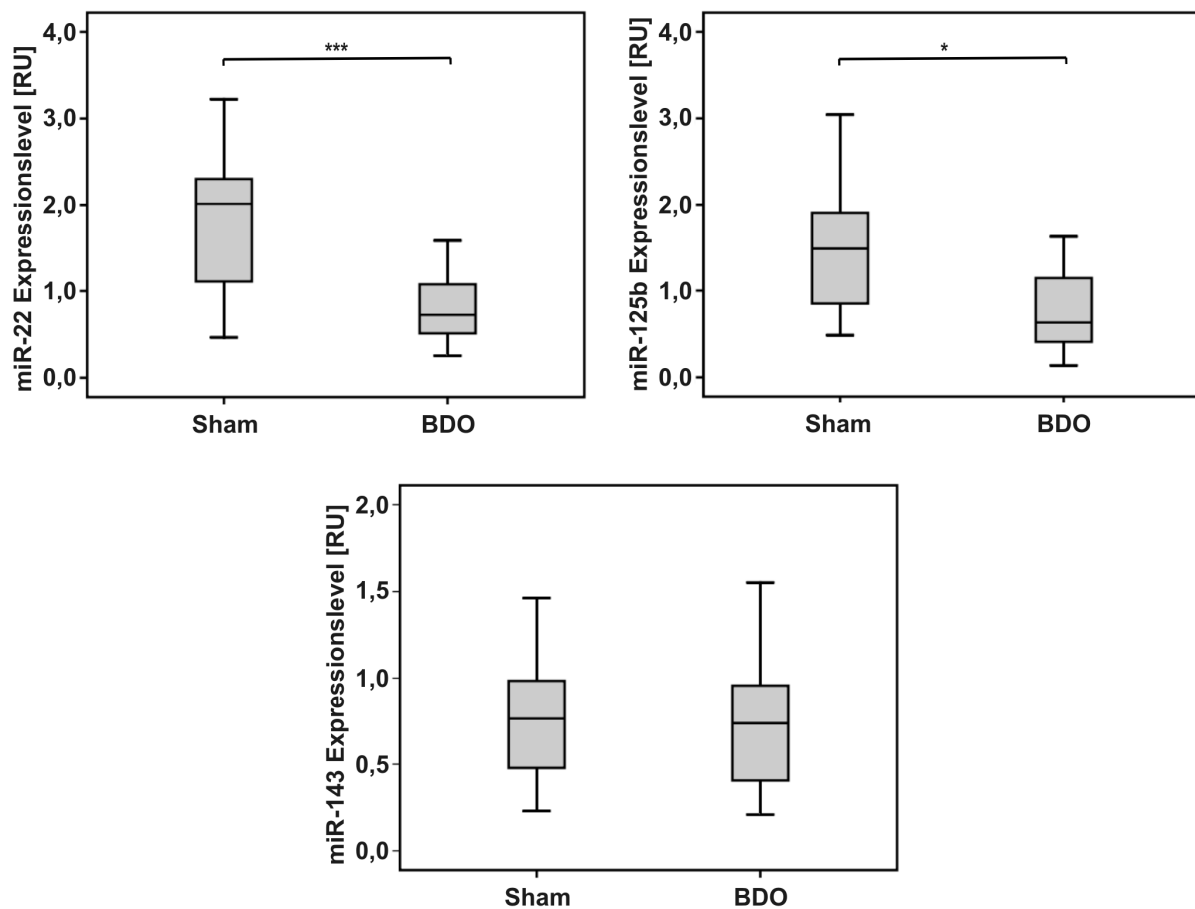


Abb. 38 Verminderte Expressionslevel von miR-22 und miR-125b in Ratten mit Gallengangsverschluss im Vergleich zu sham-operierten Tieren ($p < 0,0001$ (***) bzw. $p < 0,05$ (*)). Kein Unterschied zwischen beiden Gruppen bestand in der Expression von miR-143.

3.2.2.2 MicroRNA Expression in Patienten mit Leberfibrose nach Hepatitis C Infektion

Die Untersuchungen der Expressionslevel von miR-125b und miR-22 im Kollektiv der Hepatitis C infizierten Patienten legte eine leichte Verminderung von miR-125b während der Fibrogenese in Hepatitis C Patienten offen. Der Expressionslevel von miR-22 im gleichen Kollektiv zeigte aber nahezu gleiche microRNA-Spiegel in den Proben der Fibrosestadien S1 bis S4. Lediglich ein Absinken der Expression gegenüber dem Fibrosestadium S0 konnte beobachtet werden, wobei hier die geringe Fallzahl berücksichtigt werden muss. Die in Abb. 39 dargestellten Ergebnisse waren nicht signifikant.

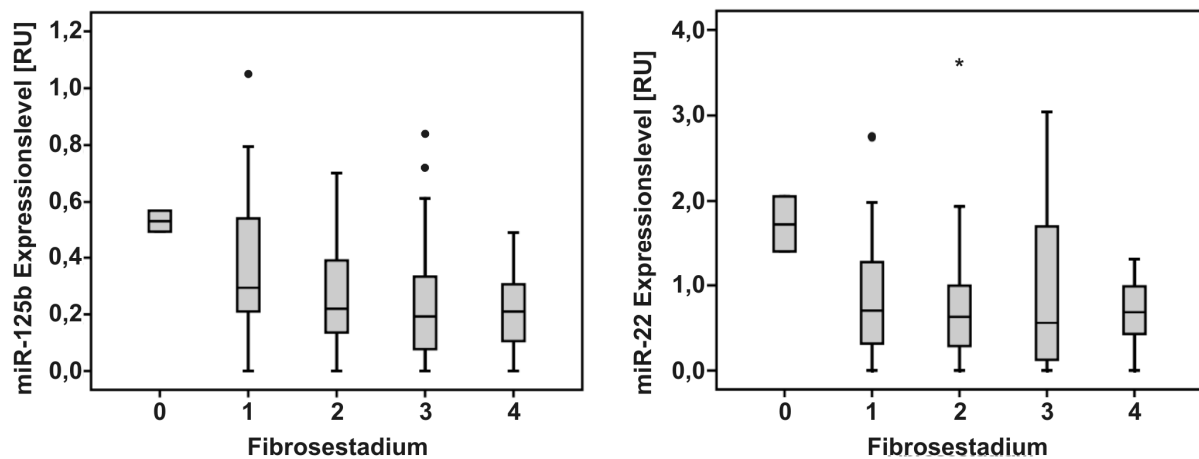


Abb. 39 Expressionslevel von miR-125b und miR-22 nach chronischer Hepatitis C Infektion in Abhängigkeit von der Fibroseprogression. Dargestellt sind die Expressionsspiegel der miR-125b und miR-22 in Nadelstanzbiopsien der Fibrosestadien S0, (n=2), S1 (n=23), S2 (n=26), S3 (n=22) und S4 (n=11) von Patienten mit Hepatitis C. Zu Erkennen ist eine leichte Abnahme der miR-125b während der Fibrogenese, wobei miR-22 nahezu unverändert vorliegt.

3.2.3 Sequenzhomologien der miRNA-125b und deren mögliche Zieldomänen in verschiedenen Spezies

Die Daten zu den Expressionsprofilen ausgewählter microRNAs während der myofibroblastischen Transdifferenzierung von hepatischen Sternzellen hatten dargelegt, dass sich die Gehalte von miR-125b, miR-22, miR-143, miR-126, miR-221 und miR-222 besonders ausgeprägt während der myofibroblastischen Transdifferenzierung von hepatischen Sternzellen veränderten. Ein Vergleich der Basensequenz von miR-125b in verschiedenen Spezies zeigt, dass es sich bei

miRNA-125b um eine hochkonservierte miRNA handelt. Die Basensequenz der microRNA ist in allen Wirbeltieren identisch. Zudem stimmt auch die für die Bindung an die mRNA wichtige seed-Region von miR-125b mit der Sequenz von *lin-4* des Nematoden *C.elegans* überein (Abb. 40). *lin-4* spielt im Larvenstadium bei der Entwicklung des Nematoden *C.elegans* eine entscheidende Rolle. Aufgrund der besonders konservierten Sequenz wurde die miR-125b auf ihre Rolle als Wirbeltierhomologes von *lin-4* überprüft.

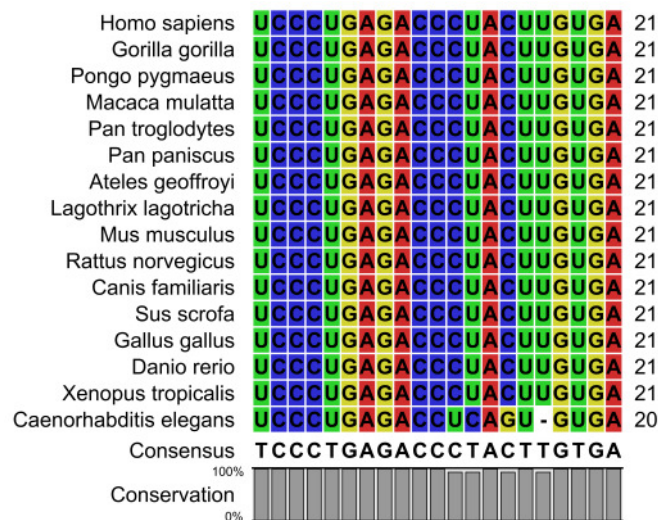


Abb. 40 Vergleich der Sequenz von miR-125b in einer Auswahl verschiedener Wirbeltiere und in *C.elegans*. Die Sequenzen der microRNAs wurden aus der miRBase Datenbank des Wellcome Trust Sanger Institute entnommen (<http://microrna.sanger.ac.uk>).

Aus der Homologie zu *lin-4* ergeben sich auch für miR-125b eine Reihe von möglichen Zielgenen, wie z.B. *lin-28* und die *let-7* miRNA, die als Zieldomäne für *lin-4* bereits identifiziert waren [62-64].

3.2.4 Homologe Funktion von miRNA-125b zur *lin-4* Funktion

Um zu untersuchen, ob miR-125b eine *lin-4* entsprechende Funktion in hepatischen Sternzellen haben könnte, wurden ein *lin-4*-Sensorplasmid und ein *lin-28*-Reporterplasmid herangezogen und Transfektionsversuche primärer hepatischer Sternzellen mit LNA-125b Antisense-Nukleotiden und miR-125b-Mimik

Oligonukleotiden durchgeführt. Zunächst wurde die Funktionalität der Oligonukleotide mit einem *lin-4*-Sensor getestet.

Vor der Durchführung des Reporterassays wurden verschiedene Zelltypen auf die Expression von miR-125b getestet. Die Ergebnisse sind in Abb. 53 im Anhang der Arbeit dargestellt. Zur Durchführung des Reporterassays wurden schließlich HEK293 Zellen verwendet, da diese keine miR-125b exprimieren und sich sehr einfach transfizieren lassen. Die Transfektion der Zellen erfolgte mit einem pEGFP-125b Sensor Plasmid. Wie in Abb. 41 A veranschaulicht, waren in dem Plasmid vier *lin-4* Bindungselemente aus der *lin-14*-3'UTR von *C.elegans* 3'-flankierend der enhanced GFP-Sequenz inkloniert [66]. Zusätzlich wurde eine miR-125b-Mimik, LNA-125b und siRNA-LUC-CY3 co-transfiziert und die Zellen für 48h kultiviert.

Kommt es zu einer Bindung von miR-125b an eine der Bindungsstellen, so wird die GFP-Expression in der Zelle unterdrückt. Liegt keine miR-125b in der Zelle vor, kommt es also zu keiner Bindung der microRNA, wird GFP in der Zelle exprimiert.

Die mikroskopische Auswertung des Reporter-Assays ergab eine schwache GFP-Expression in den mit miR-125b-Mimik transfizierten Zellen (Abb. 41 B). Die Transfektion der Zellen mit CY3-gelabelter siRNA zeigte eine deutliche GFP Expression (Abb. 41 D) und eine nahezu 100%ige Transfektion der Zellen mit den kleinen RNAs (Abb. 41 E). In den mit LNA-125b co-transfizierten Zellen konnte keine verstärkte GFP-Expression im Vergleich zu der Kontrolle festgestellt werden, da in HEK293 Zellen keine endogene miR-125b vorhanden ist (siehe Abb. 41 C).

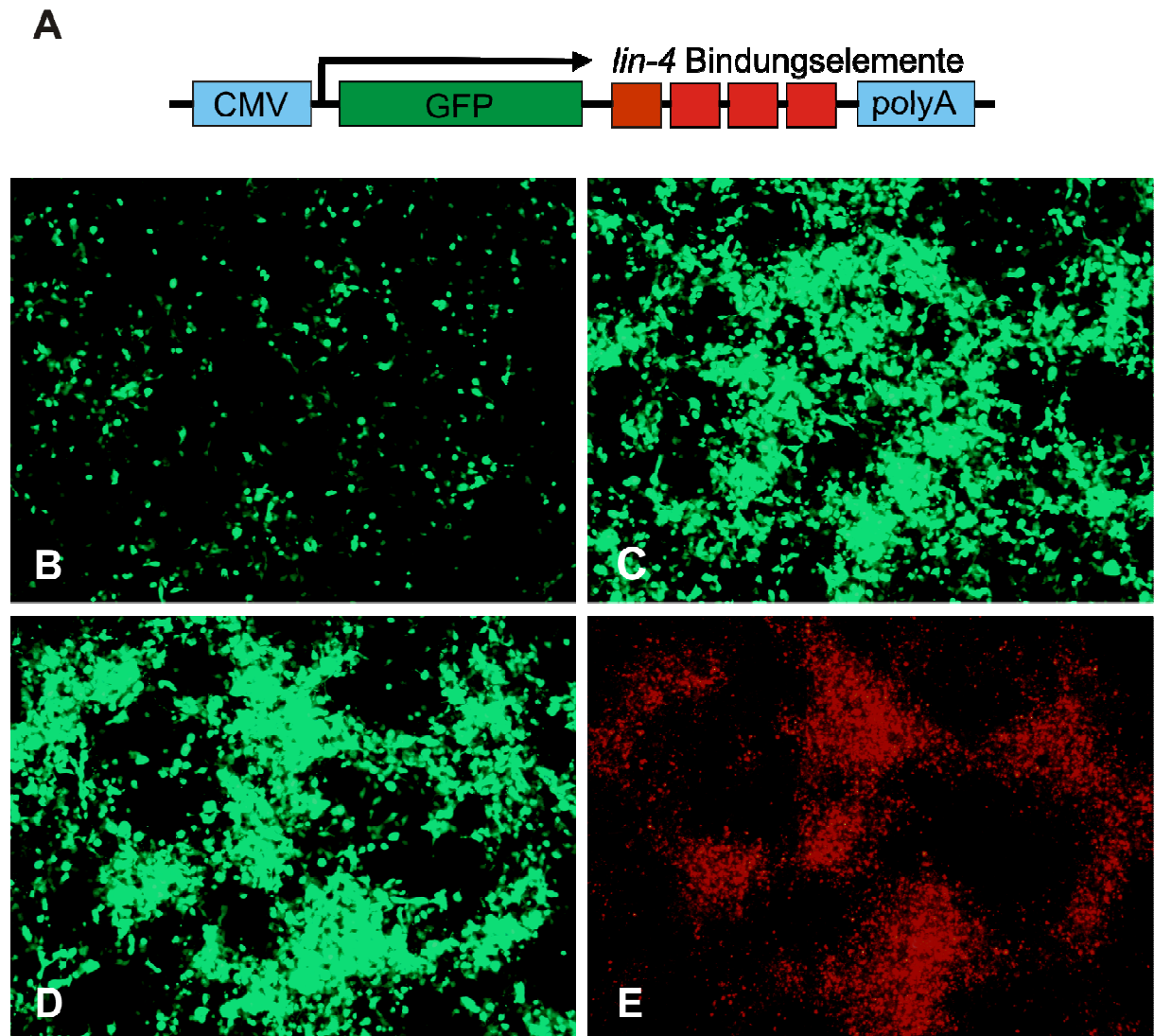


Abb. 41 Aufbau des Reporterplasmids pEGFP-125b Sensor (A). Das Konstrukt enthält vier *lin-4* Bindungselemente 3'-flankierend der eGFP-Sequenz. Transfektion von HEK293 Zellen mit pEGFP-125b Sensor sowie 125b-Mimik (B), LNA-125b (C) und siRNA-LUC-CY3 (D+E). Das Reporterplasmid pEGFP-125b Sensor wurde freundlicherweise von Dr. Gregory Wulczyn, Charité Berlin zur Verfügung gestellt [66].

3.2.4.1 Hohe miRNA-125b Abundanz in hepatischen Sternzellen durch miR-125b-Mimik

Zusätzlich wurde die Funktion von miR-125b-Mimik und LNA-125b mittels Real-Time PCR überprüft. Frische isolierte primäre hepatische Sternzellen wurden am dritten Tag der Kultur, wie in 2.2.9.9 beschrieben, mit miR-125b-Mimik, LNA-125b und LNA-Scrambled transfiziert und für 48 Stunden inkubiert. Nach RNA-Isolation und cDNA-Synthese wurde eine Real-Time PCR auf miR-125b durchgeführt. Dabei konnte eine sehr hohe Konzentration an miR-125b in den Zellen, die mit miR-125b-Mimik transfiziert wurden, nachgewiesen werden. In den LNA-125b transfizierten

Zellen hingegen war nahezu keine miR-125b mehr vorhanden. Außerdem zeigten die Ergebnisse der PCR keinen Unterschied im miR-125b Gehalt in den LNA-Scrambled transfizierten Zellen und der untransfizierten Kontrolle (siehe Abb. 42).

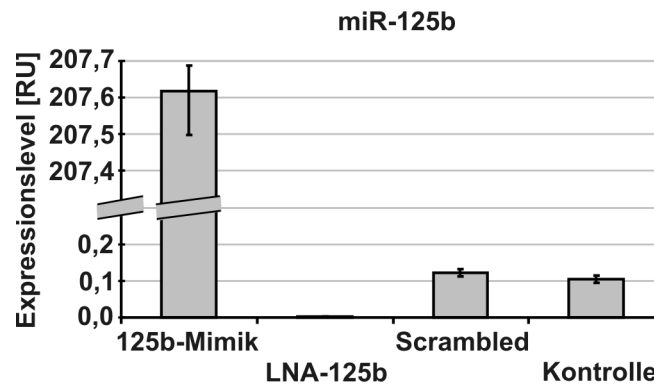


Abb. 42 Real-Time PCR Ergebnisse bezüglich miR-125b Gehalt bzw. Expression in miR-125b-Mimik, LNA-125b und LNA-Scrambled transfizierten primären hepatischen Sternzellen der Ratte.

3.2.5 *lin-28*: Eine Zieldomäne für miRNA-125b in Wirbeltieren

3.2.5.1 Homologie der miRNA-125b Bindestelle in den 3'-untranslatierten *lin-28* Bereichen verschiedener Spezies

Nachdem durch Vergleich der Sequenzen von *miR-125b* mit *lin-4* sowie durch funktionelle Tests die Homologie von miR-125b und *lin-4* gezeigt werden konnte, wurde als nächster Schritt der Sequenzbereich der 3'UTR von *lin-28* verschiedener Wirbeltiere, der das miR-125b Bindungselement enthält, mit dem Sequenzbereich von *lin-28* in *C.elegans* verglichen. Der Sequenzvergleich zeigte, dass die für die Bindung von miR-125b bzw. *lin-4* wichtige seed-region in allen verglichenen Spezies zu 100% konserviert ist (Abb. 43).

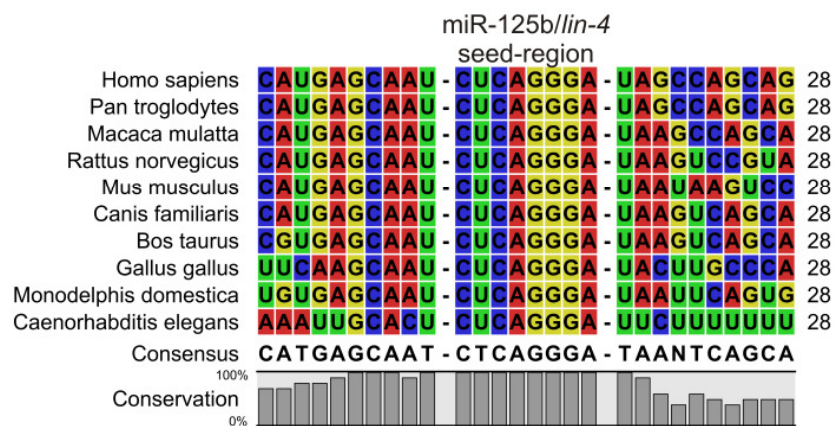


Abb. 43 Sequenzvergleich der 3'UTR von *lin-28* verschiedener Wirbeltiere mit der 3'UTR von *lin-28* in *C.elegans*. Die für die Bindung von miR-125b bzw. *lin-4* wichtige seed-region ist in allen verglichenen Spezies identisch. Die Sequenzen der *lin-28* 3'UTR wurden der miRBase Datenbank des Wellcome Trust Sanger Institute entnommen (<http://microrna.sanger.ac.uk>).

3.2.5.2 miRNA-125b bindet an die 3'UTR von *lin-28* Transkripten

Nach dem vorausgehenden Sequenzvergleich sollte nun gezeigt werden, dass es sich bei *lin-28* auch in Wirbeltieren um ein Ziel der miR-125b handelt. Deshalb wurden zunächst zwei Reporterplasmide, ausgehend vom psiCHECK-2 Vektor konstruiert, die eine funktionelle Interaktion der miR-125b mit der *lin-28* 3'UTR anzeigen. Es wurden, wie in Abb. 44 dargestellt und in Kapiteln 2.2.8.6 und 2.2.8.7 beschrieben, über die Restriktionsschnittstellen *XhoI* und *NotI* zwei verschiedene Oligodimere (siehe Tab. 3) in die „multiple cloning site“ des Vektors inkloniert. Die inklonierten Oligodimere enthalten das miR-125b Bindungselement aus der *lin-28* 3'UTR der Ratte bzw. ein Bindungselement mit zwei Basenaustauschen in der wichtigen seed-region.

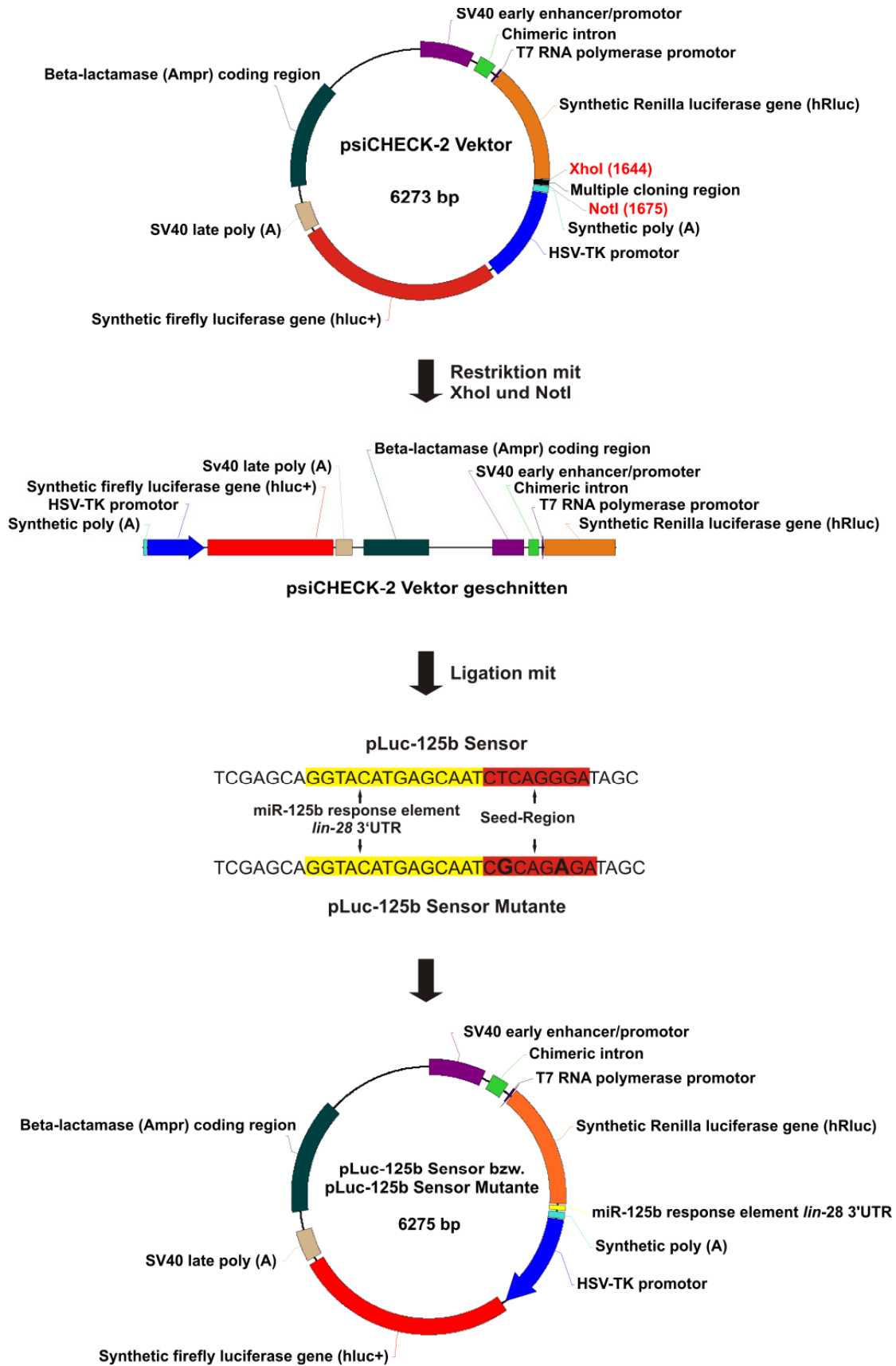


Abb. 44 Klonierungsschema der Plasmide pLuc-125b Sensor bzw. pLuc-125b Sensor Mutante. Nach Restriktion des psiCHECK-2 Vektors mit *XhoI* und *NotI* wurden die entsprechenden synthetisierten Oligonukleotide mit dem miR-125b Bindungselement der *lin-28* 3'UTR bzw. die Mutante in die „multiple cloning site“ 3'-flankierend der Renilla Luciferase Sequenz einkloniert. Bei Bindung von miR-125b an das Bindungselement vermindert sich die Renilla Luciferase Aktivität im Verhältnis zur Firefly Luciferase Aktivität.

Zur Durchführung des Luciferase-Assays wurden immortalisierte myofibroblastische hepatische Sternzellen (HSC-T6) mit den Reporterplasmiden transfiziert. Außerdem erfolgte eine Co-Transfektion mit miR-125b-Mimik, LNA-125b und LNA-Scrambled (siehe 2.2.9.11). Die Auswertung des Luciferase Assays (Abb. 45) ergab eine hohe Renilla Aktivität in den HSC-T6 Zellen, die mit pLuc-125b Sensor Mutante und miR-125b-Mimik sowie pLuc-125b Sensor und LNA-125b transfiziert wurden. Die HSC-T6 Zellen, die nur mit pLuc-125b Sensor oder mit pLuc-125b Sensor und miR-125b bzw. LNA-Scrambled transfiziert wurden, zeigten alle eine niedrige, nahezu identische Renilla Luciferase Aktivität. Die Ergebnisse des Assays waren signifikant ($p < 0,0001$).

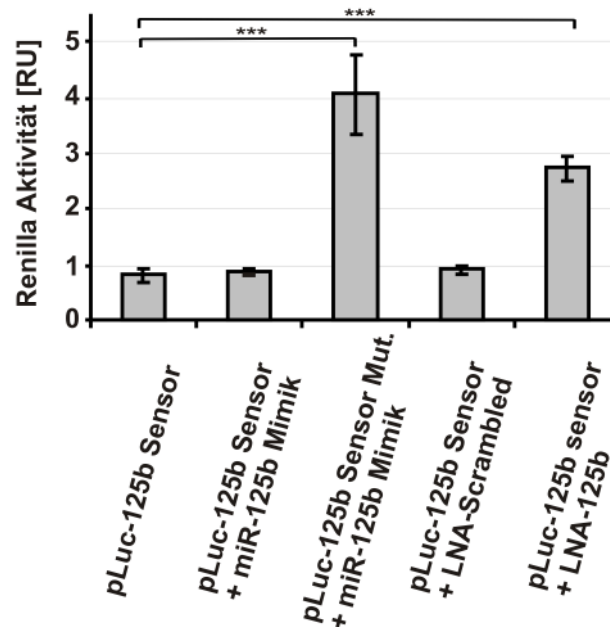


Abb. 45 Ergebnisse des dualen Luciferase-Reporter Assays. Co-Transfektion von pLuc-125b Sensor Mutante + miR-125b-Mimik sowie pLuc-125b Sensor + LNA-125b führten zu einer erhöhten Renilla Luciferase Aktivität in den HSC-T6 Zellen. Die Transfektionen mit pLuc-125b Sensor, pLuc-125b Sensor + miR-125b-Mimik und pLuc-125b Sensor + LNA Scrambled zeigten nur geringe Renilla Luciferase Aktivität.

3.2.5.3 Gegenläufige Expression von miRNA-125b und *lin-28* während der myofibroblastischen Transdifferenzierung von hepatischen Sternzellen

Um die Expression von *lin-28* während der myofibroblastischen Transdifferenzierung der hepatischen Sternzellen zu untersuchen, wurden die Transkriptlevel von *lin-28* an den entsprechenden Zeitpunkten mittels Real-Time PCR bestimmt. Die Auswertung der PCR ergab, wie in Abb. 46 dargestellt, eine kontinuierliche Abnahme der *lin-28*

Transkripte im Verlauf der myofibroblastischen Transdifferenzierung, während die Expression von miR-125b über den gleichen Zeitverlauf kontinuierlich zunimmt.

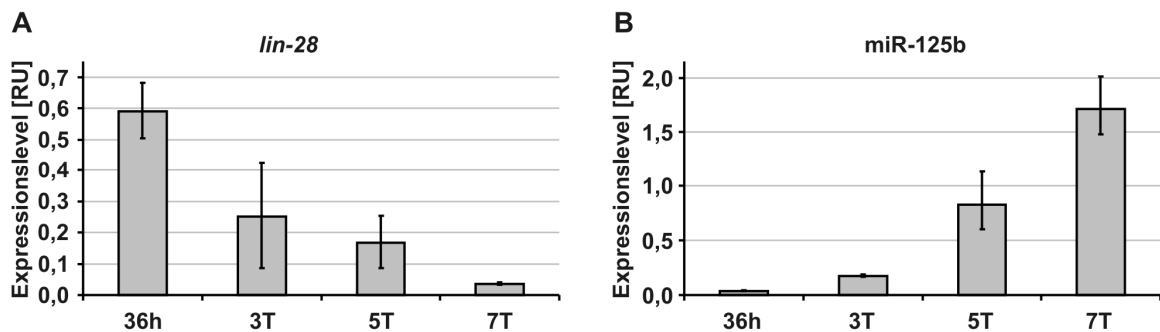


Abb. 46 Die Auswertung der Real-Time PCR zeigt die Abnahme der *lin-28* Transkripte im Verlauf der myofibroblastischen Differenzierung primärer hepatischer Sternzellen. Im Vergleich dargestellt ist die Zunahme der Expression von miR-125b.

3.2.5.4 Expression von Mitgliedern der *let-7* Familie während der myofibroblastischen Transdifferenzierung von hepatischen Sternzellen

In *C.elegans* ist nicht nur *lin-28* eine Zieldomäne von *lin-4* sondern auch *let-7*. Daher wurde in einem nächsten Schritt untersucht, ob sich auch *let-7* in negativer Korrelation zu miR-125b verändert. Mittels Real-Time PCR wurde die Expression von zwei Mitgliedern der *let-7* Familie, *let-7a* und *let-7g*, während der myofibroblastischen Transdifferenzierung von hepatischen Sternzellen untersucht. Wie in Abb. 47 dargestellt, kommt es zu einer Hochregulation der beiden microRNAs *let-7a* und *let-7g* im Verlauf der myofibroblastischen Transdifferenzierung.

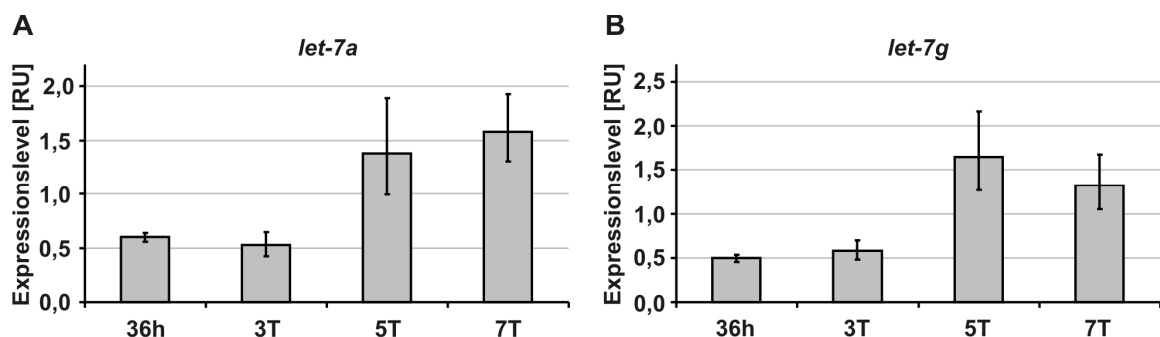


Abb. 47 Expression von *let-7a* und *let-7g* in hepatischen Sternzellen der Ratte während der myofibroblastischen Transdifferenzierung nach 36 Stunden, 3, 5 und 7 Tagen der Kultur.

4. DISKUSSION

Die Leberfibrose ist durch Akkumulation und Umstrukturierung von extrazellulärer Matrix gekennzeichnet und ist eine Wundheilungsantwort auf chronische Leberschädigungen. Sie kann vielfältige Ursachen haben und tritt bei unterschiedlichen chronischen Lebererkrankungen auf [2].

Es gibt bislang, außer dem Versuch, die schädigende Noxe auszuschalten, keine standardisierte einheitliche Therapie der Leberfibrose.

In der vorgelegten Arbeit wurde zum einen der Einfluss der β -Adrenozeptor-Blockade durch Propranolol als klassische Arzneimitteltherapie auf die Progression der Leberfibrose analysiert. Zum anderen wurde die Rolle und der Einfluss von microRNA für das fibrogene Expressionsmuster als möglicher zukünftiger therapeutischer Ansatz der Leberfibrose untersucht.

4.1 Die β -Blockade als mögliche Therapieform der Leberfibrose

In der hier vorgestellten Fragestellung zur Wirkung von β -Blockern auf die Entwicklung der PSC wurde das MDR2^{-/-} Mausmodell zur Behandlung einer Leberfibrose mit Propranolol herangezogen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine deutliche histologische Verbesserung des Fibrorestadiums und des Entzündungsgrades in den mit β -Blockern behandelten Tieren gegenüber unbehandelten Kontrolltieren. Frühere Arbeiten hatten dargelegt, dass ein möglicher Angriffspunkt der Therapie mit β -Blockern hepatische Sternzellen sind, die als Hauptproduzenten von extrazellulären Matrixproteinen bei einer sinusoidalen Leberfibrose gelten [85]. Daten der Arbeitsgruppe Diehl *et al.* belegen in Zellkulturexperimenten, dass Sternzellen sowohl α -1_B, α -1_D als auch β 1- und β 2-Adrenozeptoren exprimieren [86]. Des Weiteren besitzen hepatische Sternzellen Enzyme des Katecholamin-Biosynthesewegs. So sind sie in der Lage Noradrenalin sowie weitere Neurotransmitter zu sezernieren [57]. Zusätzlich konnte *in vitro* gezeigt werden, dass die Inkubation von primären hepatischen Sternzellen mit dem Neurotransmitter Noradrenalin zu einer Proliferation der Zellen führte [56]. Allerdings wird nur die sinusoidale Leberfibrose von hepatischen Sternzellen unterhalten. Bei der hier untersuchten PSC handelt es sich aber nicht um eine sinusoidale Fibrose,

sondern um eine Sklerosierung, die anfangs auf das Portalfeld begrenzt ist und sich dann periportal in Septen ausweitet. Ramadori und Saile stellen vor allem portale Myofibroblasten und Fibroblasten als weitere an der Ablagerung von extrazellulärer Matrix beteiligte Zellen in der periportalen Fibrose heraus [87]. In jüngsten Arbeiten von Oben *et al.* konnte auch im Tiermodell der Einfluss von Noradrenalin auf die Fibroseprogression dargestellt werden. Verwendung fanden das Leptin- und das Dbh-/- Mausmodell. Diese bisher herangezogenen Modelle zeichnen sich durch eine geringe Aktivität des sympathischen Nervensystems bzw. durch das Fehlen des Neurotransmitters Noradrenalin aus. Zusätzliche Gabe von Noradrenalin führte bei entsprechender Schädigung zu einer sinusoidalen Leberfibrose, während Tiere ohne Noradrenalingabe keine Fibrose zeigten [88]. Der Einfluss des sympathischen Nervensystems wird durch die Ergebnisse von Dubuisson *et al.* unterstrichen, die darlegten, dass die chemische Sympathektomie mit 6-Hydroxydopamin zu einer 60%igen Verringerung der Fibrose aufgrund einer CCL₄ Intoxikation führte [58]. Im Gegensatz zu den oben genannten Modellen mit sinusoidaler Fibrose wurde in der vorgelegten Arbeit eine PSC mit β -Blockern behandelt, die sich periportal ausbreitet. Entgegen der Darstellungen von Ramadori und Saile [87] zeigen die α -SMA-Antikörperfärbungen der experimentellen PSC nur eine sehr geringe Anzahl von myofibroblastischen hepatischen Sternzellen oder periportal Myofibroblasten in den fibrotischen Bereichen. Lediglich um die sklerosierenden Gallengänge konnten α -SMA-positive Zellen gezeigt werden. Diese Daten werden durch die Untersuchungen von Popov *et al.* am MDR2-/- Modell unterstützt, die zwar einen Anstieg von α -SMA-positiven aktivierten Myofibroblasten um die Gallengänge im frühen Alter von 4 Wochen sehen, im Alter von 8 Wochen aber eine Verminderung beschreiben [89]. Die hier durchgeführten immunhistologischen Studien (Abb. 12) zeigen aber nur ein geringfügiges Auftreten von Myofibroblasten unabhängig vom Alter und Fibrorestadium der Tiere. Somit müssen in dem hier verwendeten PSC Modell andere Zelltypen an der Ablagerung von extrazellulärer Matrix und Progression der periportal Fibrose beteiligt sein. Die starke Verbesserung der fibrotischen Umstrukturierung des Portalfeldes nach Propranolol-Behandlung belegt, dass auch auf diese Zelltypen eine Sympathikuswirkung möglich ist. Wie in Abb. 12 dargestellt, sind im frühen Stadium in den Portalfeldern sowie in späten Stadien in den fibrotischen, periportal Bereichen und Septen viele S100A4 positive Zellen zu finden. Bei S100A handelt es sich um das humane Homolog zum Fibroblast Specific

Protein 1 (FSP1) der Maus [90, 91]. Diese Färbung deutet auf eine starke Beteiligung von portalen Fibroblasten in diesem Fibrosemodell hin. Für die portalen Fibroblasten könnte der gleiche Mechanismus einer direkten Wirkung des β -Blockers auf Adrenozeptoren wie für die hepatischen Sternzellen in Betracht kommen, da Fibroblasten aus verschiedensten Geweben ebenfalls β -Adrenozeptoren exprimieren [92, 93].

Auch eine geringfügige Beteiligung aus dem Knochenmark stammender Fibrozyten an der Fibrose der MDR2^{-/-} Mäuse erscheint wahrscheinlich. Fibrozyten zeichnen sich durch eine positive Reaktion auf S100A4 aus und sind zudem auch noch CD45 positiv [94, 95]. Wie die Doppelfärbung in Abb. 13 zeigt, sind allerdings wenige doppelt positive Zellen in den fibrotischen Arealen der Leber zu erkennen.

Ebenso können auch Zellen, die durch epitheliale mesenchymale Transdifferenzierung (EMT) aus Cholangiozyten der Gallengänge hervorgegangen sind, an der Fibrose der hier untersuchten PSC beteiligt sein. Diese Zellen sind in verschiedenen Veröffentlichungen zur EMT zwar auch als S100A4 positiv beschrieben, allerdings sind sie zusätzlich noch α -SMA positiv [95-98]. Lediglich in einer Arbeit von Rygiel *et al.* wurde auf Schnitten von Lebern mit Primärer Sklerosierender Cholangitis die EMT anhand der typischen Marker dargestellt, jedoch waren auch hier die S100A4 positiven Zellen nicht α -SMA positiv [97].

Die in dieser Arbeit beschriebene deutliche histologische Verbesserung der Fibrose bei den behandelten MDR2^{-/-} Tieren kann also durch direkte Wirkung der Behandlung mit Propranolol auf drei verschiedene Zelltypen, portale Fibroblasten, Fibrozyten und durch EMT hervorgegangene mesenchymale Zellen, hervorgerufen werden.

4.1.1 Hemmung der Fibrose durch die β -Blockade

Da Myofibroblasten in dem verwendeten PSC Modell nicht an der Fibrose beteiligt sind, wurde in der vorgelegten Arbeit der Frage nachgegangen, durch welche Mechanismen eine Blockade des Sympathikus auf die Fibrose einwirkt. Deshalb wurden aus dem Gesamtleberextrakt die Transkriptlevel der Mediatoren CTGF, TNF- α und TGF- β bestimmt. Es zeigten sich jedoch keine Unterschiede in der Expression der Mediatoren zwischen den behandelten und unbehandelten Tieren.

Bei der Auswertung des Hydroxyprolin-Assays stellten sich ähnliche Ergebnisse dar, auch hier waren keine oder nur geringfügige Unterschiede zwischen der behandelten und der unbehandelten Gruppe zu erkennen, die aber im Bereich der Streubreite lagen. Eine Ursache hierfür könnten die großen interindividuellen Unterschiede in der Fibroseprogression der Mäuse dieses Modells sein, die trotz der deutlichen Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Tiere im Entzündungsgrad und im Fibrorestadium schon bei der histologischen Klassifikation beobachtet worden waren. Als weitere mögliche Ursache für die Ergebnisse würde aber auch die auf die Portalfelder beschränkte räumliche Ausdehnung der fibrotischen Areale in Betracht kommen. Die großen Anteile der Azinarzone II würden so zu einer Verschleierung der Ergebnisse führen. Über ähnliche Probleme einer Verschleierung von Expressionsunterschieden bei der Bearbeitung von Lungengewebs-homogenisaten berichten Fink et al. [99]. Eine Lösung des Problems versprach die Lasermikrodissektion der Portalfelder, bei der gezielt die betroffenen Bereiche untersucht werden konnten [100]. Durch die gezielte Untersuchung der definierten Bereiche wurden eine eingegrenzte Analyse der Fibroseareale und der Vergleich zum Leberparenchym erst möglich, und es konnten auswertbare und reproduzierbare Ergebnisse erarbeitet werden.

Die Auswertung der Expressionslevel von TGF- β , TNF- α und CTGF zeigte sehr deutliche Unterschiede zwischen den behandelten und unbehandelten Tieren. Die im Portalfeld behandelte Tiere um 50% verminderten Transkriptlevel des profibrogenen Mediators TGF- β und seines in der Aktivierungskaskade „downstream“ liegenden Mediators CTGF weisen auf eine stark reduzierte Aktivierung der an der Fibrose beteiligten Zellen hin. Auch die Kollagentranskripte sind in den Portalfeldern der behandelten Tiere um über 50% vermindert. Die geringere Entzündung, welche sich bereits auf histologischer Ebene darstellte, konnte anhand des verminderten Transkriptlevels des Entzündungsmarkers TNF- α in den Portalfeldern behandelte Tiere belegt werden. Damit konnte auch auf molekularer Ebene der interzellulären Kommunikation ein deutlicher Effekt der Propranolol-Behandlung im PSC-Modell gezeigt werden, der die bei histologischer Betrachtung erhaltenen Ergebnisse erklärt. Dies liefert jedoch keine Erklärung, über welchen Mechanismus die Propranolol-Behandlung eine Fibrose beeinflusst. Sowohl Angiotensin II als auch Endothelin-1 führen zu einer Induktion von TGF- β und CTGF in den Zellen. Weitere Arbeiten zur

Aufklärung des Wirkmechanismus und Einflusses einer Sympathikusblockade auf eine Leberfibrose sind also notwendig.

4.1.2 Das Renin-Angiotensin-System als ein möglicher Angriffspunkt der β -Adrenozeptor-Blockade bei einer Leberfibrose

Ein möglicher Mechanismus, der zur Verbesserung des Fibrorestadiums und des Entzündungsgrads führen könnte, ist neben einer direkten Wirkung des sympathischen Signalwegs auch ein indirekter Einfluss der β -Blockade auf das Renin-Angiotensin-System (RAS) oder das Endothelinsystem. Die nach Mikrodissektion erhaltenen Transkriptlevel für Angiotensinogen und den Angiotensin II Rezeptors AT-1 zeigen, dass beide in der gesamten Leber exprimiert werden. Wie von Bataller *et al.* und Paizis *et al.* beschrieben, ist die Angiotensinogen-, Renin- und ACE-Expression und damit auch die Umwandlung von Angiotensinogen zu Angiotensin II während der Leberfibrogenese stark erhöht [51, 101]. Die Behandlung mit Propranolol hat einen Einfluss auf die Expression von Angiotensinogen und dem AT-1 Rezeptor, wie die erniedrigten Transkriptlevel von ca. 18 bzw. 38% sowohl in den Portalfeldern als auch im Parenchym belegen.

In der Regulation des RAS spielt der Sympathikus eine übergeordnete Rolle. Eine Aktivierung des Sympathikus führt zur Reninausschüttung und zur Umwandlung von Angiotensinogen zu Angiotensin I. Durch das Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) wird dieses nun zu Angiotensin II umgewandelt und ist systemisch verfügbar (zusammengefasst in [55]). Es wird postuliert, dass die Behandlung der MDR2^{-/-}-Mäuse mit Propranolol zu einem verminderten Sympathikustonius und somit zu einer Herunterregulation der RAS-Kaskade führt. Die Konsequenz ist eine verminderte systemische Angiotensin II Freisetzung. Es ist bekannt, dass systemisches Angiotensin II zur Progression einer Fibrose beitragen kann. Dies wurde von Bataller *et al.* an gallengangsligierten Ratten gezeigt, welche eine verstärkte Fibrose und vermehrte Entzündung nach systemischer Infusion von Angiotensin II zeigten [102]. Die fibrogene Wirkung des Angiotensinsystems konnte in weiteren Arbeiten belegt werden. Eine systemische Gabe von Angiotensin II bei normalen Ratten führte lediglich zu Entzündungsprozessen, nicht aber zu der Entstehung einer Fibrose [103]. Die Bindung von Angiotensin II an den AT-1 Rezeptor von hepatischen

Sternzellen stimuliert dort die Expression von TGF- β , fördert die Kollagensynthese und induziert die Sekretion von inflammatorischen Zytokinen [104]. Da bei dem hier untersuchten PSC Modell hepatische Sternzellen keine Rolle spielen, müsste dieser Mechanismus über eine verminderte Aktivierung von Fibroblasten ablaufen. Wie in einer kürzlich erschienenen Arbeit von Gao *et al.* gezeigt wurde, reagierten kardiale Fibroblasten ebenfalls auf Inkubation mit Angiotensin II mit erhöhter Expression von TGF- β und Proteinen des TGF- β Signalweges sowie von Kollagenen [105]. Einen ähnlichen oder sogar identischen Mechanismus bei portalen Fibroblasten, wie bei den hepatischen Sternzellen, erscheint möglich. Bataller *et al.* berichten zudem von einem lokalen intrahepatischen RAS. Dabei exprimieren fibrotische Lebern im Gegensatz zu gesunden Lebern Komponenten des Renin-Angiotensin-Systems [51]. Auch Zellkulturversuche haben gezeigt, dass hepatische Sternzellen nach *in vitro* Aktivierung ebenfalls Hauptkomponenten des RAS wie Renin, Angiotensinogen, ACE und AT-1 Rezeptoren verstärkt exprimieren [51]. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine Expression von Angiotensinogen sowohl im Portalfeld als auch im Parenchym und deuten auf ein vorhandenes lokales RAS, auch ohne Beteiligung der aktivierten hepatischen Sternzellen hin.

4.1.3 Einfluss der Propranolol-Behandlung auf das Endothelin-System

Neben einer veränderten Angiotensinogen Expression in den behandelten Tieren wurde auch ein verändertes Endothelin-1 und Endothelin-Rezeptor Muster in den mikrodissektierten fibrotischen Arealen beobachtet.

Der Expressionslevel von Endothelin-1 in den Portalfeldern der behandelten Tiere war um 66% gegenüber den Portalfeldern unbehandelter Tiere gesenkt. Eine Expression des Endothelin-1 im Parenchym wurde nicht beobachtet. Auch auf die Expression der Endothelin-Rezeptoren im Portalfeld hatte die Propranolol-Behandlung einen Einfluss. Während beim ET_B-Rezeptor eine geringfügige Erhöhung der Expression zu erkennen war, die jedoch im Streubereich lag, war die Expression des ET_A-Rezeptors sowohl im Portalfeld als auch im Parenchym erniedrigt. Daher könnte ein anderer Mechanismus der Verbesserung der Fibrose über die Beeinflussung des Endothelinsystems ablaufen. Die Endotheline sind als potente vasokonstriktorische Substanzen und Mitogene bekannt [106, 107]. Ihre Wirkung erzielen die Endotheline durch Bindung an die Endothelin-Rezeptoren ET_A

und ET_B, die auf vielen verschiedenen Zellen der Leber exprimiert werden [50]. Durch Bindung an beide Rezeptoren, wobei der ET_B-Rezeptor auf hepatischen Sternzellen der dominierende ist, führen sie zur Aktivierung und Kontraktion der Zellen [48, 108, 109]. Aber auch Effekte auf Fibroblasten, die ebenfalls beide Rezeptoren exprimieren, sind beschrieben. Bindung von Endothelin-1 führt zu deren Proliferation, verstärkter Kollagen I und III sowie Fibronectin Synthese und induziert die Expression von CTGF, der wie oben beschrieben, nach β -Blockade supprimiert wurde [110]. Die erzielte Wirkung könnte also über Bindung des Propranolols an β -Rezeptoren zustande kommen und über eine in den Zellen ablaufende, nicht näher bekannte Signalkaskade die Expression von Endothelin-1 und dessen Rezeptoren indirekt beeinflussen. Andererseits wird von Hong *et al.* über eine Induzierung der Endothelin-1 Genexpression durch Angiotensin II über den ERK-Signalweg in glatten Muskelzellen berichtet [111]. Eine indirekte Beeinflussung der Endothelin-1 Expression über einen verminderten Angiotensin II Spiegel erscheint also auch hier denkbar. Beides würde jedoch zu einer verminderten Ausschüttung von Endothelin-1 und somit auch geringeren auto- bzw. parakrinen Stimulation der Zellen durch Endothelin-1 führen und so zur langsameren Fibroseprogression in den behandelten Tieren beitragen.

4.1.4 Möglichkeiten und Grenzen einer Fibrosetherapie durch eine β -Blockade

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigen die positiven Effekte einer frühen Therapie mit dem β -Adrenozeptor-Antagonisten Propranolol auf die Progression einer periportalen Leberfibrose, unabhängig von der Beteiligung von hepatischen Sternzellen. Die Therapie einer Leberfibrose mit Propranolol bietet zudem einige Vorteile. Zum einen ist Propranolol mit nur geringen Nebenwirkungen im Allgemeinen gut verträglich. Dies wurde in vielen Studien und durch jahrelange Anwendung am Patienten belegt. Zum anderen handelt es sich sowohl um ein günstiges als auch einfach und sicher zu verabreichendes Medikament. Ein Einfluss einer Behandlung bei sinusoidalen Leberfibrosen mit Beteiligung anderer Zelltypen wie zum Beispiel hepatischer Sternzellen müsste noch untersucht werden. Eine durchgeführte späte Therapie mit Propranolol führte nicht mehr zu einer Verbesserung der Fibrose und der Entzündung. Eine mögliche Erklärung ist der zu

kurze Behandlungszeitraum bei einer schon zu weit fortgeschrittenen Fibrose, die sich bei einem genetischen Modell wie dem MDR2-/- Modell nicht durch Ausschaltung der auslösenden Noxe verbessern lässt. Es kann aber postuliert werden, dass ein längerer Behandlungszeitraum oder eine Anpassung der verwendeten Dosis durchaus zu einer Verbesserung auf histologischer Ebene hätte führen können. Auch über eine Kombinationstherapie mit anderen antifibrotischen Substanzen sollte diskutiert werden. In vielen verschiedenen Arbeiten, zusammengefasst in Moreno et al. [52], wurden über positive Ergebnisse der Behandlung von Leberfibrosen mit ACE-Hemmern und AT-1 Rezeptor-Antagonisten berichtet. Die Behandlung mit Endothelin-Antagonisten zeigte in verschiedenen Modellen ebenfalls Verbesserungen der Fibrose [49, 110]. Auch hier könnte möglicherweise eine Verstärkung der Effekte durch eine Kombination von Wirkstoffen erzielt werden. Allerdings muss kritisch betrachtet werden, dass es sich bei allen Substanzen um hochpotente Wirkstoffe handelt, die einen erheblichen Einfluss auf das Blutdrucksystem des Tieres oder eines Patienten haben können. Neben Versuchen zur bestmöglichen Wirksamkeit einer Kombinationstherapie sind daher zusätzlich noch aufwendige Dosisstudien notwendig.

4.2 Die differentielle microRNA-Expression als Grundlage neuer strategischer Ansätze in der Leberfibrogenese bei chronischer Hepatitis

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Screening von 360 verschiedenen microRNAs während der myofibroblastischen Transdifferenzierung von primären hepatischen Sternzellen der Ratte durchgeführt. Die Ergebnisse des LNA-basierten Microarrays legen ein divergentes Expressionsmuster der microRNAs während der myofibroblastischen Transdifferenzierung offen. Die am stärksten divergent regulierten microRNAs waren miR_plus17869, miR-125b, miR-22, miR-143 und miR-31. MicroRNAs wird eine entscheidende Rolle in der Genregulation durch post-transkriptionelle Hemmung von mRNA-Transkripten zugeschrieben [112]. Arbeiten jüngster Vergangenheit beschäftigten sich mit der Analyse des veränderten Genexpressionsprofils mittels Microarray-Analyse während der myofibroblastischen Transdifferenzierung von hepatischen Sternzellen [59, 113]. Jedoch sind bis zum jetzigen Zeitpunkt sind nur zwei Arbeiten bekannt, die sich auch mit einem microRNA-Screening auf hepatischen Sternzellen während der späten Phase der

myofibroblastischen Differenzierung beschäftigen, nicht aber die frühe Phase der myofibroblastischen Differenzierung untersuchen.

So unterscheiden sich diese Arbeiten sowohl in der Art der Durchführung als auch durch die gewählten Zeitpunkte von dieser Arbeit. Ji *et al.* nutzen in ihren Arbeiten RNA von hepatischen Sternzellen am Tag 3 und 10 nach Isolierung und beschreiben die unterschiedliche Regulation von lediglich 32 microRNAs durch Real-Time PCR Analyse [114]. Die Auswahlkriterien der 32 microRNAs werden von den Autoren nicht näher erläutert. Von diesen 32 getesteten microRNAs waren drei hochregulierte microRNAs unter den 50 am stärksten regulierten miRNAs der hier durchgeführten Assays zu finden. Diese waren miR-130a an neunter Stelle und die microRNAs 27a und 27b an 42. bzw. 27. Stelle des hier durchgeführten Arrays. Die Autoren beschreiben für die Mitglieder der miR-27-Familie ein Eingreifen in die Fettspeicherung und eine mögliche Interaktion mit der mRNA des retinoid X receptor α . Von Guo *et al.* wurde ebenfalls ein Microarray-Screening auf 279 miRNAs während der myofibroblastischen Differenzierung von hepatischen Sternzellen durchgeführt. Hier werden die microRNA Profile an Tag 2 und Tag 14, also einem späten Zeitpunkt der myofibroblastischen Transdifferenzierung, verglichen [115]. Es finden sich vier miRNAs (miR-143, miR-126, miR-122 und miR-193) unter den 50 am stärksten regulierten miRNAs des hier durchgeführten Assays wieder. Die Daten von Guo *et al.* unterstreichen die Bedeutung der hier identifizierten microRNAs miR-143, miR-126 und miR-122, die ebenfalls in den späten Stadien der myofibroblastischen Differenzierung stark induziert sind. Guo *et al.* beschreiben diese jedoch nicht näher und fokussieren sich auf miR-15 und miR-16, die bekannterweise auf das Apoptosegen BCL-2 zielen [116]. In der vorliegenden Arbeit wurde also erstmals ein microRNA-Screening während der frühen myofibroblastischen Transdifferenzierung primärer hepatischer Sternzellen an den Tagen 3 und 7 nach Isolierung durchgeführt. Die Validierung einer Auswahl an miRNAs mittels Real-time PCR konnte die Ergebnisse der Microarrays bestätigen und zeigen damit die Zuverlässigkeit der LNA-basierten Microarrays. Die Vorteile der verwendeten LNA-basierten Microarrays liegen in der hohen Spezifität durch die eingefügten LNAs, so dass auch eine Differenzierung der sich oft nur in einem Nukleotid unterscheidenden microRNAs möglich ist [117]. Zusätzlich zeichnen sich die LNAs durch eine erhöhte Thermostabilität aus. So kann trotz der Kürze und der unterschiedlichen Schmelztemperatur der zu detektierenden microRNAs durch Einfügen von LNAs eine

einheitliche Schmelz-temperatur für einen genomweiten Assay geschaffen werden [117, 118]. Zudem zeigte die erstmalig durchgeführte Untersuchung der divergent exprimierten microRNAs auf humanen hepatischen Sternzellen und Sternzellen der Maus, dass diese microRNAs in allen untersuchten Spezies während der myofibroblastischen Differenzierung divergent reguliert vorliegen. Dies unterstreicht die Wichtigkeit dieser microRNAs in der frühen Phase der myofibroblastischen Differenzierung hepatischer Sternzellen.

Die nach myofibroblastischer Aktivierung hoch exprimierte miR-22 wurde von Illiopoulos *et al.* als induzierte microRNA bei Osteoarthritis beschrieben und hat als Ziele den PPARA-Rezeptor, der bei inflammatorischen Prozessen beteiligt ist. Die Hochregulation von miR-22 führt zu einer Herunterregulation von PPARA mit der Konsequenz einer Hochregulation von ILB1 und MMP-13, dem wichtigsten Mediator der Knorpelzerstörung durch Abbau von Typ II Kollagenen [119]. In einer Arbeit von Pandey *et al.* wurde der Östrogen-Rezeptor α (ER α) als Ziel der miR-22 identifiziert. ER α -Expression ist ein wichtiges Klassifizierungsmerkmal bei Brustkrebs. miR-22 reguliert die ER α Expression und somit die Östrogen-Signalwirkung [120].

Auch für die in der frühen myofibroblastischen Differenzierung stark hochregulierten microRNAs miR-221 und miR-222, die zusammen als Cluster auf dem kurzen Arm des X-Chromosoms kodiert sind [121], werden im Zusammenhang mit Brustkrebs beschrieben, und der Östrogen-Rezeptor α wurde als Ziel nachgewiesen. Die beiden microRNAs wurden häufig in ER α -negativen Krebszelllinien und Tumoren hochreguliert vorgefunden. Ihre Überexpression trägt so zur Tamoxifenresistenz durch negative Regulation von ER α bei [122]. Als weiteres Ziel der miR-221 und miR-222 sowohl bei Brustkrebs als auch bei Prostatakarzinomen wurde der zellwachstumssuppressive Cyclin-abhängige Kinaseinhibitor p27 (p27^{Kip1}) gezeigt [121, 123, 124]. p27^{Kip1} bindet an die Cyclin-abhängige Kinase 2 (CDK2) und Cyclin E und verhindert das Fortschreiten des Zellzyklus von der G1 zur S Phase. Die Überexpression von miR-221 und miR-222 führt zu einer Herunterregulation von p27^{Kip1} und so zu verstärkter Proliferation [125, 126]. Die hier gezeigte Hochregulation von miR-221 und miR-222 während der myofibroblastischen Transdifferenzierung von hepatischen Sternzellen könnte durchaus zu einer Erniedrigung von p27^{Kip1} führen und so zur Proliferation der Sternzellen während der myofibroblastischen Transdifferenzierung beitragen. Des Weiteren spielten miR-221 und miR-222 durch post-transkriptionelle Hemmung des Rezeptors c-Kit und

indirekte Hemmung der endothelialen NO-Synthase eNOS in der Angiogenese eine wichtige Rolle [127-129].

Die miR-126, die während der myofibroblastischen Differenzierung deutlich reprimiert wird, wird ebenfalls hauptsächlich mit der Angiogenese in Verbindung gebracht und gilt als Endothelzellen-spezifisch. Die Arbeitsgruppen von Olson und Srivastava zeigten zeitgleich, dass miR-126 das Sprouty-related EVH1 domain-containing protein 1 (SPREAD1) und PI3KR2, auch bekannt als p85- β , als direkte Ziele besitzen. Diese steuern als negative Regulatoren der MAP Kinase- und PI3 Kinase-Signalwege die Signale des Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und des Fibroblast Growth Factor (FGF) und somit die Angiogenese [130, 131]. Da die miR-126 als eine Endothelzellen-spezifische microRNA beschrieben wird, könnte der hohe miR-126 Spiegel auf die Endothelzellverunreinigungen, die die Sternzellkulturen bis zum dritten Tag charakterisieren, zurückzuführen sein. Allerdings prägen hepatische Sternzellen auch eine ganze Reihe an Genen aus, die primär in Endothelzellen gefunden werden [132].

Für miR-143 wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen eine Reduktion bei Kolonkarzinomen beschrieben [133, 134]. Dabei wird miR-143 eine anti-onkogene Wirkung durch post-transkriptionelle Hemmung des ERK5 Gens zugeschrieben [134]. ERK5 ist als Promotor des Zellwachstums und der Proliferation bekannt. Während der myofibroblastischen Differenzierung wird miR-143 allerdings induziert und, wie Esau *et al.* berichten, kommt es ebenfalls zu einer Hochregulation von miR-143 in differenzierenden Adipozyten und zu einer möglichen Wirkung über ERK5 [135]. Die Hochregulation von miR-143 während der myofibroblastischen Transdifferenzierung der hepatischen Sternzellen könnte einen ähnlichen Einfluss haben wie von Esau *et al.* auf Adipozyten beschrieben und über ERK5 vermittelt sein. Die Untersuchung der divergent regulierten microRNAs in dem humanen Hepatitis C Kollektiv sowie in dem experimentellen Rattenfibrose-Modell zeigte ein abweichendes Ergebnis von der Regulation der microRNAs während der myofibroblastischen Differenzierung. In beiden Kollektiven war miR-125b, die am stärksten hochregulierte microRNA während der myofibroblastischen Transdifferenzierung, herunterreguliert. Eine mögliche Ursachen hierfür könnte eine generell unterschiedliche Regulation der miR-125b *in vivo* im Vergleich zur Zellkultur sein. Wie von De Minicis *et al.* auf Transkriptebene beschrieben, unterscheiden sich die Genexpressionsprofile von *in vitro* und *in vivo* aktivierten hepatischen Sternzellen

deutlich [59]. Zum anderen kann durch miR-125b Expression anderer Zellen der Leber das Ergebnis verändert sein. Gleiches gilt auch für die divergente Regulation von miR-22 bzw. miR-143 *in vivo*.

4.2.1 Die Induktion von miRNA-125b in der frühen Phase der myofibroblastischen Differenzierung hepatischer Sternzellen

In dieser Arbeit konnte die miR-125b als am stärksten hochregulierte microRNA während der frühen myofibroblastischen Transdifferenzierung der hepatischen Sternzellen gezeigt werden. Die Hochregulation der miR-125b wurde sowohl in hepatischen Sternzellen der Maus und Ratte als auch in humanen Zellen gezeigt. Die miR-125b wird sowohl als onkogene als auch als tumorsuppressive microRNA beschrieben [136-139]. Le *et al.* stellten kürzlich den Tumorsuppressor p53 als Ziel der miR-125b heraus [140]. Die Funktion und Regulation der miR-125b microRNA ist stark vom Gewebe- oder Zelltyp abhängig. Guo *et al.* zeigen, dass miR-125b auch in der Leber nach Karzinogenese in Folge von chronischer Schädigung herunterreguliert vorliegt [141]. Auch in der Leberfibrose, als Vorstufe zur Karzinogenese, zeigte sich eine Herunterregulation von miR125b. Sowohl in dem humanen Hepatitis C Kollektiv als auch in dem experimentellen Rattenfibrose-Modell war miR-125b herunterreguliert, obwohl eine Hochregulation der miR-125b während der myofibroblastischen Transdifferenzierung beobachtet wurde. Eine ähnliche abweichende Regulation gilt auch für die Regulation von miR-22 bzw. miR-143 *in vivo*. Eine weitere wichtige Rolle wird der miR-125b bei der neuronalen Differenzierung und der Gehirnentwicklung zugeschrieben [142]. Der Einfluss von miR-125b bei der neuronalen Differenzierung ist deswegen interessant, da der embryologische Ursprung von hepatischen Sternzellen bis heute noch nicht geklärt wurde, diese aber neuronale Markerproteine und im ruhenden Zustand eine dendritische, Astrozyten-ähnliche Morphologie zeigen und neuroektodermalen Ursprungs sein könnten [143]. Auch Smirnova *et al.* zeigen eine Hochregulation von miR-125b bei der Entwicklung des Mausgehirns in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium sowie eine Expression von miR-125b in neuronalen Zellen [66].

4.2.2 Die Bedeutung der miRNA-125b als *lin-4* Homolog des Nematoden *C. elegans* in hepatischen Sternzellen

Es wird konnte gezeigt werden, dass miR-125b das Wirbeltierhomolog zu *lin-4* des Nematoden *C.elegans* ist. Wie der hier durchgeführte Sequenzvergleich in Abb. 40 von miR-125b in verschiedenen Spezies mit *lin-4* zeigt, ist die Sequenz von miR-125b in allen Wirbeltieren konserviert und weist eine große Homologie zu *lin-4* von *C.elegans* auf. Die wichtige Seed-Region ist dabei in allen untersuchten Spezies identisch. Die durchgeführten Transfektionsversuche zeigen, dass miR-125b ebenfalls *lin-14* erkennt und angeht. Mit diesen Versuchen konnte die Homologie von *lin-4* und miR-125b und die Wirksamkeit der für die Transfektionen verwendeten synthetischen microRNAs nachgewiesen werden. Ein weiteres wichtiges Ziel von *lin-4* im Nematoden *C.elegans* ist *lin-28*. Mit Hilfe von Reporter Assays konnte *lin-28* als Zieldomäne für miR-125b in HSC-T6 Zellen nachgewiesen werden. Wurde der endogene miR-125b Spiegel durch antagonisierende miR-125b-LNA Oligonukleotide erniedrigt, zeigte sich eine stark verminderte Interaktion am *lin-28* 3'UTR-Reporter-konstrukt. Das beweist auch funktionell, dass miR-125b das Homolog von *lin-4* ist und dessen Ziele, wie z.B *lin-28*, angeht.

Das *lin-28* Gen ist einer der Hauptregulatoren im ersten Abschnitt der Larvenentwicklung von *C.elegans*. Es codiert für ein hauptsächlich cytoplasmatisch vorhandenes 25 kDa großes Protein mit zwei verschiedenen Arten von RNA-Bindestellen, einer sogenannten „cold shock domain und einem Paar Zinkfinger-Motiven [144]. Moss *et al.* berichten außerdem über das Vorkommen von LIN-28 Proteinen in verschiedenen Zelllinien von Wirbeltieren, darunter embryonalen Stammzellen (ES) der Maus und pluripotenten Keimzelltumorklinien des Menschen und der Maus, nicht aber in ausdifferenzierten Zellen wie z.B. Fibroblasten. Die Autoren postulieren, dass sich LIN-28 abundant in undifferenzierten Zellen findet und die verminderte Regulation notwendig bzw. eine Konsequenz der Zelldifferenzierung sei [145].

Yu et al. gelang es kürzlich, humane somatische Fibroblasten durch Expression der vier Transkriptionsfaktoren OCT-4, SOX-2, NANOG und LIN-28 in induzierte pluripotente Stammzellen (IPS) mit Eigenschaften embryonaler Stammzellen (ES) umzuprogrammieren. Dabei war LIN-28 nicht absolut notwendig für die initiale Umprogrammierung der Zellen, erhöhte aber die Häufigkeit der Umprogrammierung [146]. Andere Arbeiten zeigten die Umprogrammierung von somatischen Zellen in

IPS durch verschiedene Kombinationen der Faktoren OCT-3/4, SOX-2, KLF4 und c-MYC [147-149], wobei die Faktoren KLF4 und besonders c-MYC für eine Therapie problematisch sind, da sie auch onkogene Wirkung haben [150]. Da LIN-28 nicht absolut notwendig für die Umprogrammierung von somatischen Zellen in IPS ist, scheint LIN-28 eine Art Promotor der Pluripotenz für Wirbeltierzellen zu sein. Die in dieser Arbeit untersuchten primären hepatischen Sternzellen exprimieren ebenfalls, wie in 3.2.5.3 dargestellt, *lin-28*. Die Expression von *lin-28* nimmt jedoch im Verlauf der myofibroblastischen Differenzierung und mit Zunahme der miR-125b Expression kontinuierlich ab. Die relativ starke Expression von *lin-28* in frisch isolierten ruhenden hepatischen Sternzellen deutet darauf hin, dass hepatische Sternzellen nicht unbedingt Stammzellcharakter besitzen, aber durchaus Progenitorzell-Eigenschaften besitzen könnten, wie von Kordes *et al.* beschrieben [151]. Diese zeigten, dass eine Fraktion primärer hepatischer Sternzellen den Stamm-/ Progenitorzellmarker CD133 des hämatopoetischen Systems exprimieren. Desweiteren konnten sie auf den CD133 positiven Zellen die Markerproteine pluripotenter Stammzellen OCT4 und NANOG nachweisen.

Eine weitere wichtige microRNA in der Entwicklung des Nematoden *C.elegans* ist *let-7* bzw. die *let-7* Familie (*let-7a* bis *let-7g*). Diese spielen hauptsächlich im späten Stadium der Larvenentwicklung und bei Ausdifferenzierung von Zellen eine wichtige Rolle (Abb. 48) [152].

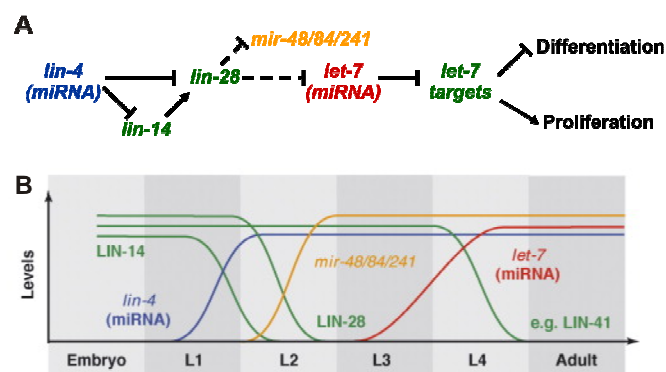


Abb. 48 (A) Wechselwirkungen der unterschiedlichen Gene und microRNAs in der Entwicklung von *C.elegans*. (B) Schematische Darstellung der zeitlichen Expressionsmuster der verschiedenen Gene und microRNAs während der Larvenentwicklung von *C.elegans* [152].

Post-transkriptionelle Regulatoren der *let-7* Familie sind LIN-28 und LIN-28B, die eine endständige Uridinylierung von *let-7* Vorläufern (*pre-let-7*) induzieren und so die

weitere Prozessierung durch Dicer verhindern [153]. Während der myofibroblastischen Transdifferenzierung von hepatischen Sternzellen kommt es in Analogie zu dem Regulationsschema während der Larvenentwicklung bei *C.elegans* zu einer *lin-28* gegenläufigen Hochregulation von *let-7a* und *let-7g* (siehe Abb. 46 und Abb. 47).

Fasst man die Daten zur Expression von miR125b zusammen, so ergibt sich für die myofibroblastische Transdifferenzierung von hepatischen Sternzellen das in Abb. 49 dargestellte Schema. Die Expression von miR-125b, *lin-28* und *let-7* scheint bei der Differenzierung von hepatischen Sternzellen *in vitro* also durchaus ein identisches Muster aufzuweisen wie im Nematoden *C.elegans* und zuvor in Abb. 48 gezeigt.

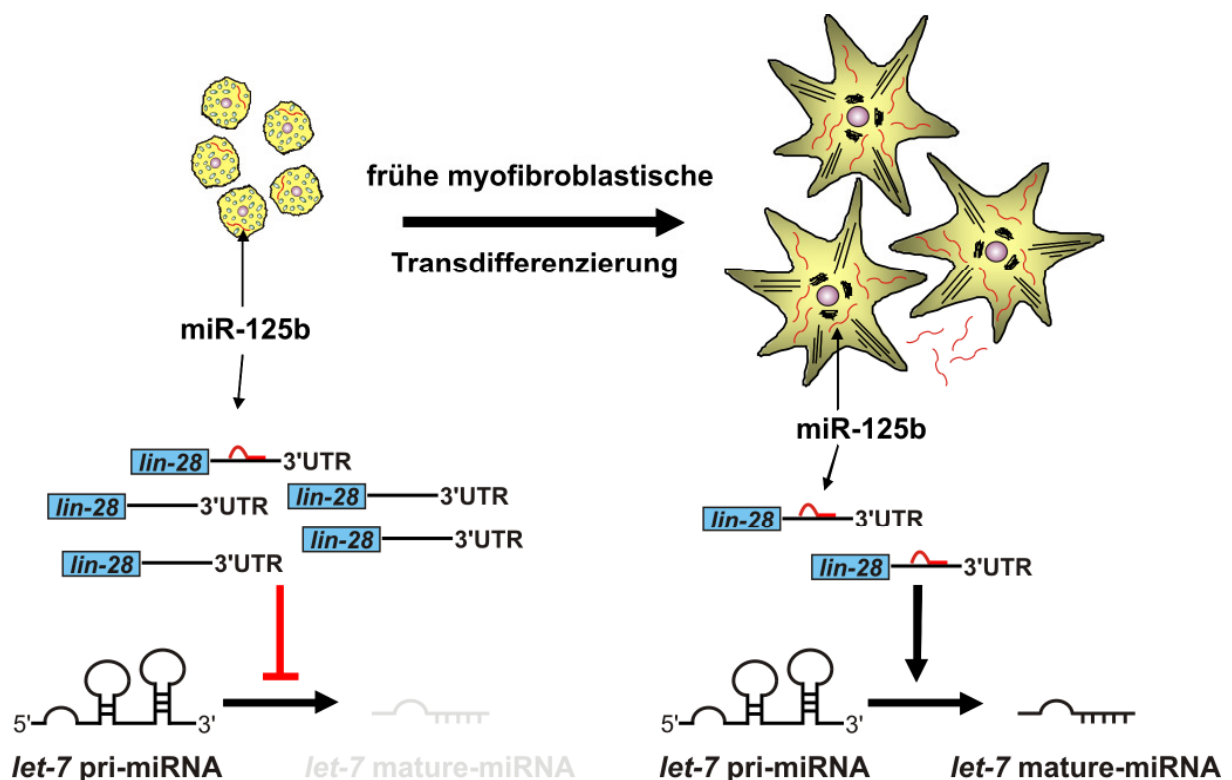


Abb. 49 Schema der Wirkungsweise von miR-125b während der myofibroblastischen Transdifferenzierung von hepatischen Sternzellen.

Daher kann postuliert werden, dass miR-125b in hepatischen Sternzellen in Homologie zu *C. elegans* eine wichtige Funktion in der Steuerung des myofibroblastischen Transdifferenzierungsprozesses besitzt.

Die Rolle des in myofibroblastischen hepatischen Sternzellen divergent regulierten microRNA-Profiles wird in zukünftigen Studien aufgeschlüsselt werden. Diese stellen

potenzielle Ziele einer möglichen antifibrotischen Therapie dar. Eine besondere Rolle könnte hierbei der miR-125b zu kommen.

Durch die Identifizierung des in myofibroblastischen hepatischen Sternzellen divergent regulierten microRNA-Profiles wurden in der vorliegenden Arbeit die grundlegenden Voraussetzungen geschaffen, ihre Bedeutung während der Leberfibrogenese weiter aufzuschlüsseln und als neue therapeutische Zieldomänen in zukünftigen Studien zu untersuchen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Chronische Lebererkrankungen, mit dem Endstadium der Leberzirrhose, gehören weltweit zu den häufigsten Todesursachen. Im Verlauf der Erkrankung, unabhängig von der Art der Schädigung, kommt es zu einer Akkumulation von extrazellulärer Matrix und einem Umbau der Leberarchitektur. Dieser Prozess wird als Fibrose bezeichnet. Bis zum heutigen Tage steht keine spezifische Therapie zur Verfügung. Bislang beschränkt sich die Behandlung chronischer Lebererkrankungen auf die Ausschaltung der schädigenden Noxe.

Im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit wurden die Auswirkungen einer klassischen Arzneimitteltherapie mit dem unselektiven β -Adrenozeptor-Antagonisten Propranolol auf die Fibroseprogression der Primären Sclerosierenden Cholangitis (PSC), die als besonders schwerwiegende chronische Lebererkrankung gilt, untersucht. Für die Behandlung der PSC wurde das MDR2^{-/-} Mausmodell charakterisiert und verwendet. Um den möglichen Erfolg der Behandlung abschätzen zu können, wurden zunächst histochemische und immunhistochemische Färbungen der Lebern angefertigt. Die histologische Begutachtung der Lebern zeigte eine signifikante Verbesserung der Fibrose ($p < 0,05$) und der Entzündung ($p < 0,05$) in den behandelten Tieren gegenüber den unbehandelten Kontrollen. Die Bestimmung der Transkriptlevel profibrogener und vasokonstriktorischer Mediatoren aus dem Gesamtleberextrakt mittels Real-Time PCR konnte die positiven Ergebnisse der histologischen Begutachtung nicht bestätigen, da keine Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Tieren zu erkennen waren. Deshalb wurden mit Hilfe der Lasermikrodissektion gezielt portale Bereiche der Acinarzone I und Bereiche des Parenchyms (Acinarzone II und III) herausgelasert und zunächst die Transkriptlevel von Procollagen 1A1 als dominantes extrazelluläres Matrixprotein des fibrotischen Prozesses sowie von den profibrogenen Mediatoren, TGF- β , TNF- α und CTGF untersucht. In den Portalfeldern der behandelten Tiere waren die Transkriptlevel von Procollagen 1A1, TGF- β , CTGF und TNF- α um über 50% gegenüber den unbehandelten Tieren erniedrigt. Zusätzlich wurden die Expression der profibrogenen und vasokonstriktorisches Mediatoren Angiotensinogen und Endothelin-1 sowie deren Rezeptoren bestimmt. Die deutlichsten Unterschiede konnten bei Endothelin-1 und dem Endothelin-Rezeptor A beobachtet werden. Die Transkriptlevel des Rezeptors waren bei den behandelten Tieren sowohl in den

Portalfeldern als im Parenchym um 50% vermindert. Der größte Unterschied war jedoch bei der Betrachtung der Expressionslevel von Endothelin-1 zu verzeichnen, dieser war in den Portalfeldern der behandelten Tiere um 66% erniedrigt.

Die Ergebnisse der histologischen Begutachtung sowie der deutliche Rückgang der Transkriptlevel profibrogener Mediatoren in den Portalfeldern von behandelten MDR2^{-/-} Mäusen zeigen den positiven Effekt einer Propranolol-Behandlung auf die Progression einer Leberfibrose im experimentellen PSC Modell.

In einem weiteren Ansatz wurde die Rolle von microRNAs während der Fibrogenese untersucht, um diese als mögliche neue therapeutische Ziele zur Behandlung einer Leberfibrose zu identifizieren. Aufgrund der unbekanntem Funktion der microRNAs in der Fibrogenese wurde zunächst die Expression der leberspezifischen miR-122 in einem experimentellen Gallengangsverschlussmodell (BDO) und einem Hepatitis C Patientenkollektiv untersucht. Auf beiden Kollektiven war eine signifikante Verminderung der miR-122 Expression mit zunehmender Fibrose zu beobachten. Zudem konnte eine hohe negative Korrelation zwischen miR-122 Expression und Hydroxyprolinegehalt der Lebern ($r=-0,786$) bzw. Granulozyteninfiltration ($r=-0,715$) im BDO-Modell festgestellt werden. Da bei vielen chronischen Lebererkrankungen Myofibroblasten den zentralen Zelltyp der Leberfibrogenese darstellen, wurden, um weitere wichtige microRNAs in der Fibrogenese zu identifizieren, *in vitro* Versuche mit primären hepatischen Sternzellen durchgeführt. Mittels Mikroarray-Analyse und Real-Time PCR der RNA-Populationen hepatischer Sternzellen wurde erstmals ein divergentes microRNA-Expressionsprofil nach myofibroblastischer Transdifferenzierung identifiziert. Die stärkste Induktion in Myofibroblasten zeigten die microRNAs miR-125b, miR-22, miR-143, miR-222, miR-221, während miR-126 stark reprimiert vorlag.

Bei der Suche möglicher Ziele von miR-125b wurde durch Sequenzvergleich und mit Hilfe eines Reporterassays die Homologie zu *lin-4* gezeigt, einer microRNA, die eine entscheidende Rolle in der Larvenentwicklung des Nematoden *C.elegans* spielt. Ein bekanntes Ziel von *lin-4* in *C.elegans* ist *lin-28*. Der Sequenzvergleich der 3'UTR in verschiedenen Spezies und durch Konstruktion eines Reporters, mit einem miR-125b Bindungselement aus der 3'UTR von *lin-28*, konnte gezeigt werden, dass *lin-28* auch in Wirbeltieren ein Ziel von miR-125b darstellt. Die Expression von *lin-28* verhielt sich gegenläufig zur hochregulierten miR-125b. Mit der Abnahme von *lin-*

28 wurden *let-7* microRNAs hochreguliert. Damit wurde mit miR-125b eine microRNA gefunden, die eine entscheidende Rolle bei Differenzierungsprozessen einnimmt und deren Charakterisierung eine grundlegende Voraussetzung für neue Therapiestrategien geschaffen hat.

Veröffentlichungen, Kongressbeiträge:

Folgende Manuskripte zur Publikation von Daten der vorliegenden Dissertation sind in Vorbereitung:

Strack, I.; Schulte, S.; Varnholt, H.; Schulze, F.; Töx, U.; Schievenbusch, S.; Wendland, K.; Drebber, U.; Steffen, H. M.; Dienes, H.P.; Odenthal O.

“BETA-ADRENOCEPTOR BLOCKADE IN PRIMARY SCLEROSING CHOLANGITIS OF MDR2 KNOCKOUT MICE: ANTIFIBROTIC EFFECTS IN A MODELL OF NON-SINUSOIDAL FIBROSIS” Journal of Hepatology

Strack, I.; Noetel, A.; Schievenbusch, S.; van Grunsven, L.; Mannaerts, I.; Riemer, J.; Geerts, A.; Dienes, H.P.; Odenthal M.

“MICRORNA-125B REPRESSES THE PROMOTING FACTOR OF PLURIPOTENCY LIN-28 IN HEPATIC STELLATE CELLS” Hepatology

Daten der vorliegenden Arbeit wurden auf folgenden Kongressen vorgestellt:

92. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie e.V.,
15.–18. Mai 2008, Berlin (Vortrag)

Strack, I.; Scheffler, M.; Konze, E.; Wendland, K.; Varnholt, H.; Schulte, S.; Dienes, H.P.; Odenthal, M

“BETA-ADRENERGIC BLOCKADE DECELERATES PERIportal FIBROSIS IN ABCB4 KNOCKOUT MICE”

44th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver,
22.-26. April 2009, Kopenhagen (Vortrag)

Strack, I.; Scheffler, M.; Schievenbusch, S.; Riemer, J.; Noetel, A.; Kwiecinski, M.;
Wedemeyer, I.; Dienes, H.P.; Odenthal, M.

*"IMPACT OF DIFFERENTIALLY EXPRESSED MICRORNAS ON
MYOFIBROBLASTIC TRANSDIFFERENTIATION OF HEPATIC STELLATE CELLS"*

23. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber,
26.-27. Januar 2007, Göttingen (Poster)

Strack, I.; Scheffler, M.; Petmecky, K.; Schulte, S.; Lammert, F.; Dirsch, O.;
Dienes, H.P.; Odenthal, M.

*"BLOCKADE OF THE SYMPATHICUS BY INHIBITION OF BETA-
ADRENORECEPTORS RESULTS IN DELAYED FIBROSIS IN MDR2 KNOCKOUT
MICE"*

42th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver,
11.-15. April 2007, Barcelona (Top 10 Poster)

Strack, I.; Petmecky, K.; Scheffler, M.; Schulte, S.; Lammert, F.; Varnholt, H.;
Dienes, H.P.; Odenthal, M.

*"INHIBITION OF BETA-ADRENORECEPTORS RESULTS IN DELAYED FIBROSIS
IN ABCB4 KNOCKOUT MICE"*

62. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und
Stoffwechselkrankheiten mit Sektion für gastroenterologische Endoskopie,
12.-15. September 2007, Bochum (Poster)

Schulte, S.; **Strack, I.**; Odenthal, M.; Dienes, H.P.; Lammert, F.; Goeser, T.; Töx, U.;
Steffen, H.-M.

*„ANGIOTENSIN II REZEPTOR TYP 1 BLOCKADE IM MDR2 KNOCKOUT MODELL:
EIN ANTIFIBROTISCHER THERAPIEANSATZ FÜR DIE PRIMÄR
SKLEROSIERENDE CHOLANGITIS?“*

24. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber,
25.-26. Januar 2008, Frankfurt (Poster)

Strack, I.; Scheffler, M.; Konze, E.; Wendland, K.; Varnholt, H.; Schulte, S.;
Dienes, H.P.; Odenthal, M.

*“BETA-ADRENERGIC BLOCKADE OF THE SYMPATHETIC NERVOUS SYSTEM
DECELERATES PERIportal FIBROSIS IN ABCB4 KNOCKOUT MICE”*

24. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber,
25.-26. Januar 2008, Frankfurt (Poster)

Schulte, S.; **Strack, I.**; Odenthal, M.; Mezger, V.; Dienes, H. P.; Goeser, T.; Töx, U.;
Steffen, H. M.

*“UPREGULATION OF AT1 RECEPTOR IN MDR2 KNOCKOUT MICE AFTER LOW
DOSE ANTIFIBROTIC THERAPY WITH TELMISARTAN”*

43th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver,
23.-27. April 2008, Mailand (Top 10 Poster)

Strack, I.; Scheffler, M.; Konze, E.; Wendland, K.; Varnholt, H.; Schulte, S.;
Dienes, H.P.; Odenthal, M.

*“BETA-ADRENERGIC BLOCKADE OF THE SYMPATHETIC NERVOUS SYSTEM
DECELERATES PERIportal FIBROSIS IN MDR2 KNOCKOUT MICE”*

63. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und
Stoffwechselkrankheiten mit Sektion für gastroenterologische Endoskopie,
01.-04. Oktober 2008, Berlin (Poster)

Schulte, S.; **Strack, I.**; Odenthal, M.; Dienes, H.P.; Goeser, T.; Töx, U.; Steffen H.-M.
*„REDUKTION DER FIBROSE UNTER LANGZEIT THERAPIE MIT DEM AT1-
REZEPTOR TYP 1 INHIBITOR TELMISARTAN IM MDR 2 KNOCKOUT MODELL
DER MAUS“*

The 59th Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases:
The Liver Meeting, 31. Oktober - 04. November 2008, San Francisco (Presidential
Poster of Distinction)

Strack, I.; Scheffler, M.; Töx, U.; Dienes, H.P.; Odenthal, M.

*“DIFFERENTIALLY EXPRESSED MICRORNAS DURING MYOFIBROBLASTIC
TRANSDIFFERENTIATION OF HEPATIC STELLATE CELLS”*

FALK Research Workshop 2009: Translational Research in Chronic Liver Diseases,
29.-30. Januar 2009, Heidelberg (Poster)

Scheffler, M.; Manav, A.; **Strack, I.**; Töx, U.; Drebber, U.; Wedemeyer, I.;
Dienes, H.P.; Odenthal, M.

*“MICRORNA INVOLVED IN CHRONIC LIVER DISEASE OF HEPATITIS C
INFECTED PATIENTS”*

25. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber,
30.-31. Januar 2009, Heidelberg (Poster)

Strack, I.; Scheffler, M.; Schievenbusch, S.; Riemer, J.; Noetel, A.; Töx, U.;
Kwieceński, M.; Wedemeyer, I.; Dienes, H.P.; Odenthal, M.

*“DIFFERENTIALLY EXPRESSED MICRORNAS DURING MYOFIBROBLASTIC
TRANSDIFFERENTIATION OF HEPATIC STELLATE CELLS”*

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Bataller, R. and D.A. Brenner, *Liver fibrosis*. J Clin Invest, 2005. **115**(2): p. 209-18.
2. Friedman, S.L., *Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury*. J Biol Chem, 2000. **275**(4): p. 2247-50.
3. Wallace, K., A.D. Burt, and M.C. Wright, *Liver fibrosis*. Biochem J, 2008. **411**(1): p. 1-18.
4. Lai, C.L. and M.F. Yuen, *Chronic hepatitis B--new goals, new treatment*. N Engl J Med, 2008. **359**(23): p. 2488-91.
5. WHO. *Hepatitis B Fact sheet No.204*. 2009 [cited; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/print.html>].
6. Elgouhari, H.M., T.I. Abu-Rajab Tamimi, and W.D. Carey, *Hepatitis B virus infection: understanding its epidemiology, course, and diagnosis*. Cleve Clin J Med, 2008. **75**(12): p. 881-9.
7. Perz, J.F., et al., *The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide*. J Hepatol, 2006. **45**(4): p. 529-38.
8. Lai, C.L. and M.F. Yuen, *The natural history and treatment of chronic hepatitis B: a critical evaluation of standard treatment criteria and end points*. Ann Intern Med, 2007. **147**(1): p. 58-61.
9. WHO. *Hepatitis C Fact sheet No.164*. 2009 [cited; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/print.html>].
10. Hoofnagle, J.H., *Course and outcome of hepatitis C*. Hepatology, 2002. **36**(5 Suppl 1): p. S21-9.
11. Antonelli, A., et al., *HCV infection: pathogenesis, clinical manifestations and therapy*. Clin Exp Rheumatol, 2008. **26**(1 Suppl 48): p. S39-47.
12. RKI. *Epidemiologisches Bulletin - Zur Situation bei wichtigen Infektionskrankheiten in Deutschland*
Virushepatitis B, C und D im Jahr 2008. 2009 [cited; Available from: [http://www.rki.de/cln_100/nn_468102/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/20_09,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/20_09.pdf](http://www.rki.de/cln_100/nn_468102/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2009/20_09,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/20_09.pdf)].
13. Weigand, K., W. Stremmel, and J. Encke, *Treatment of hepatitis C virus infection*. World J Gastroenterol, 2007. **13**(13): p. 1897-905.
14. Day, C.P., *Treatment of alcoholic liver disease*. Liver Transpl, 2007. **13**(11 Suppl 2): p. S69-75.
15. Bergheim, I., C.J. McClain, and G.E. Arteel, *Treatment of alcoholic liver disease*. Dig Dis, 2005. **23**(3-4): p. 275-84.
16. Vidali, M., S.F. Stewart, and E. Albano, *Interplay between oxidative stress and immunity in the progression of alcohol-mediated liver injury*. Trends Mol Med, 2008. **14**(2): p. 63-71.
17. Preiss, D. and N. Sattar, *Non-alcoholic fatty liver disease: an overview of prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment considerations*. Clin Sci (Lond), 2008. **115**(5): p. 141-50.
18. Jou, J., S.S. Choi, and A.M. Diehl, *Mechanisms of disease progression in nonalcoholic fatty liver disease*. Semin Liver Dis, 2008. **28**(4): p. 370-9.
19. Manns, M.P. and A. Vogel, *Autoimmune hepatitis, from mechanisms to therapy*. Hepatology, 2006. **43**(2 Suppl 1): p. S132-44.
20. Teufel, A., P.R. Galle, and S. Kanzler, *Update on autoimmune hepatitis*. World J Gastroenterol, 2009. **15**(9): p. 1035-41.
21. Kumagi, T. and E.J. Heathcote, *Primary biliary cirrhosis*. Orphanet J Rare Dis, 2008. **3**: p. 1.

22. Kaplan, M.M. and M.E. Gershwin, *Primary biliary cirrhosis*. N Engl J Med, 2005. **353**(12): p. 1261-73.
23. Gershwin, M.E. and I.R. Mackay, *The causes of primary biliary cirrhosis: Convenient and inconvenient truths*. Hepatology, 2008. **47**(2): p. 737-45.
24. Angulo, P. and K.D. Lindor, *Primary sclerosing cholangitis*. Hepatology, 1999. **30**(1): p. 325-32.
25. Fickert, P., T. Moustafa, and M. Trauner, *Primary sclerosing cholangitis--the arteriosclerosis of the bile duct?* Lipids Health Dis, 2007. **6**: p. 3.
26. Saich, R., et al., *Characterization of pro-apoptotic effect of liver failure plasma on primary human hepatocytes and its modulation by molecular adsorbent recirculation system therapy*. Artif Organs, 2007. **31**(9): p. 732-42.
27. Maggs, J.R. and R.W. Chapman, *An update on primary sclerosing cholangitis*. Curr Opin Gastroenterol, 2008. **24**(3): p. 377-83.
28. Vacca, M., et al., *Current treatments of primary sclerosing cholangitis*. Curr Med Chem, 2007. **14**(19): p. 2081-94.
29. Narumi, S., et al., *Liver transplantation for sclerosing cholangitis*. Hepatology, 1995. **22**(2): p. 451-7.
30. Smit, J.J., et al., *Homozygous disruption of the murine mdr2 P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease*. Cell, 1993. **75**(3): p. 451-62.
31. Fickert, P., et al., *Ursodeoxycholic acid aggravates bile infarcts in bile duct-ligated and Mdr2 knockout mice via disruption of cholangioles*. Gastroenterology, 2002. **123**(4): p. 1238-51.
32. Elferink, R.P., G.N. Tytgat, and A.K. Groen, *Hepatic canalicular membrane 1: The role of mdr2 P-glycoprotein in hepatobiliary lipid transport*. FASEB J, 1997. **11**(1): p. 19-28.
33. Lammert, F., et al., *Spontaneous cholecysto- and hepatolithiasis in Mdr2-/- mice: a model for low phospholipid-associated cholelithiasis*. Hepatology, 2004. **39**(1): p. 117-28.
34. Mauad, T.H., et al., *Mice with homozygous disruption of the mdr2 P-glycoprotein gene. A novel animal model for studies of nonsuppurative inflammatory cholangitis and hepatocarcinogenesis*. Am J Pathol, 1994. **145**(5): p. 1237-45.
35. Fickert, P., et al., *Regurgitation of bile acids from leaky bile ducts causes sclerosing cholangitis in Mdr2 (Abcb4) knockout mice*. Gastroenterology, 2004. **127**(1): p. 261-74.
36. Katzenellenbogen, M., et al., *Molecular mechanisms of liver carcinogenesis in the mdr2-knockout mice*. Mol Cancer Res, 2007. **5**(11): p. 1159-70.
37. Guo, J. and S.L. Friedman, *Hepatic fibrogenesis*. Semin Liver Dis, 2007. **27**(4): p. 413-26.
38. Iredale, J.P., et al., *Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 messenger RNA expression is enhanced relative to interstitial collagenase messenger RNA in experimental liver injury and fibrosis*. Hepatology, 1996. **24**(1): p. 176-84.
39. Benyon, R.C. and M.J. Arthur, *Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells*. Semin Liver Dis, 2001. **21**(3): p. 373-84.
40. Nieto, N., S.L. Friedman, and A.I. Cederbaum, *Stimulation and proliferation of primary rat hepatic stellate cells by cytochrome P450 2E1-derived reactive oxygen species*. Hepatology, 2002. **35**(1): p. 62-73.
41. Urtasun, R. and N. Nieto, *[Hepatic stellate cells and oxidative stress]*. Rev Esp Enferm Dig, 2007. **99**(4): p. 223-30.
42. Galli, A., et al., *Oxidative stress stimulates proliferation and invasiveness of hepatic stellate cells via a MMP2-mediated mechanism*. Hepatology, 2005. **41**(5): p. 1074-84.

43. Guicciardi, M.E. and G.J. Gores, *Apoptosis: a mechanism of acute and chronic liver injury*. Gut, 2005. **54**(7): p. 1024-33.
44. Canbay, A., et al., *Kupffer cell engulfment of apoptotic bodies stimulates death ligand and cytokine expression*. Hepatology, 2003. **38**(5): p. 1188-98.
45. Canbay, A., et al., *Apoptotic body engulfment by a human stellate cell line is profibrogenic*. Lab Invest, 2003. **83**(5): p. 655-63.
46. Wake, K., *"Sternzellen" in the liver: perisinusoidal cells with special reference to storage of vitamin A*. Am J Anat, 1971. **132**(4): p. 429-62.
47. Moreira, R.K., *Hepatic stellate cells and liver fibrosis*. Arch Pathol Lab Med, 2007. **131**(11): p. 1728-34.
48. Shao, R. and D.C. Rockey, *Effects of endothelins on hepatic stellate cell synthesis of endothelin-1 during hepatic wound healing*. J Cell Physiol, 2002. **191**(3): p. 342-50.
49. Rockey, D.C. and J.J. Chung, *Endothelin antagonism in experimental hepatic fibrosis. Implications for endothelin in the pathogenesis of wound healing*. J Clin Invest, 1996. **98**(6): p. 1381-8.
50. Rockey, D.C., et al., *Cellular localization of endothelin-1 and increased production in liver injury in the rat: potential for autocrine and paracrine effects on stellate cells*. Hepatology, 1998. **27**(2): p. 472-80.
51. Bataller, R., et al., *Activated human hepatic stellate cells express the renin-angiotensin system and synthesize angiotensin II*. Gastroenterology, 2003. **125**(1): p. 117-25.
52. Moreno, M. and R. Bataller, *Cytokines and renin-angiotensin system signaling in hepatic fibrosis*. Clin Liver Dis, 2008. **12**(4): p. 825-52, ix.
53. Warner, F.J., et al., *Liver fibrosis: a balance of ACEs?* Clin Sci (Lond), 2007. **113**(3): p. 109-18.
54. Tox, U., et al., *Expression of angiotensin II receptor type 1 is reduced in advanced rat liver fibrosis*. Dig Dis Sci, 2007. **52**(8): p. 1995-2005.
55. Atlas, S.A., *The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition*. J Manag Care Pharm, 2007. **13**(8 Suppl B): p. 9-20.
56. Oben, J.A., et al., *Norepinephrine and neuropeptide Y promote proliferation and collagen gene expression of hepatic myofibroblastic stellate cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **302**(4): p. 685-90.
57. Oben, J.A. and A.M. Diehl, *Sympathetic nervous system regulation of liver repair*. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol, 2004. **280**(1): p. 874-83.
58. Dubuisson, L., et al., *Inhibition of rat liver fibrogenesis through noradrenergic antagonism*. Hepatology, 2002. **35**(2): p. 325-31.
59. De Minicis, S., et al., *Gene expression profiles during hepatic stellate cell activation in culture and in vivo*. Gastroenterology, 2007. **132**(5): p. 1937-46.
60. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. Cell, 2004. **116**(2): p. 281-97.
61. Chen, X.M., *MicroRNA signatures in liver diseases*. World J Gastroenterol, 2009. **15**(14): p. 1665-72.
62. Lee, R.C. and V. Ambros, *An extensive class of small RNAs in Caenorhabditis elegans*. Science, 2001. **294**(5543): p. 862-4.
63. Lau, N.C., et al., *An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in Caenorhabditis elegans*. Science, 2001. **294**(5543): p. 858-62.
64. Lagos-Quintana, M., et al., *Identification of novel genes coding for small expressed RNAs*. Science, 2001. **294**(5543): p. 853-8.
65. Bartels, C.L. and G.J. Tsongalis, *MicroRNAs: novel biomarkers for human cancer*. Clin Chem, 2009. **55**(4): p. 623-31.
66. Smirnova, L., et al., *Regulation of miRNA expression during neural cell specification*. Eur J Neurosci, 2005. **21**(6): p. 1469-77.

67. Dries, V., et al., *Detection of hepatitis C virus in paraffin-embedded liver biopsies of patients negative for viral RNA in serum*. Hepatology, 1999. **29**(1): p. 223-9.
68. Varnholt, H., et al., *MicroRNA gene expression profile of hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma*. Hepatology, 2008. **47**(4): p. 1223-32.
69. Qiagen. *miScript System Handbook*. 2004 [cited; Available from: <http://www1.qiagen.com/products/miRNA/miScriptSystem.aspx#Tabs=t2>.
70. Applied Biosystems. *Essentials of Real Time PCR*. [cited; Available from: http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_042485.pdf.
71. Woessner, J.F., Jr., *The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid*. Arch Biochem Biophys, 1961. **93**: p. 440-7.
72. Stegemann, H. and K. Stalder, *Determination of hydroxyproline*. Clin Chim Acta, 1967. **18**(2): p. 267-73.
73. Goodman, Z.D., *Grading and staging systems for inflammation and fibrosis in chronic liver diseases*. J Hepatol, 2007. **47**(4): p. 598-607.
74. Farazi, P.A., et al., *Chronic bile duct injury associated with fibrotic matrix microenvironment provokes cholangiocarcinoma in p53-deficient mice*. Cancer Res, 2006. **66**(13): p. 6622-7.
75. Chung, C.T., S.L. Niemela, and R.H. Miller, *One-step preparation of competent Escherichia coli: transformation and storage of bacterial cells in the same solution*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(7): p. 2172-5.
76. Vogel, S., et al., *An immortalized rat liver stellate cell line (HSC-T6): a new cell model for the study of retinoid metabolism in vitro*. J Lipid Res, 2000. **41**(6): p. 882-93.
77. Nakabayashi, H., et al., *Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium*. Cancer Res, 1982. **42**(9): p. 3858-63.
78. Graham, F.L., et al., *Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5*. J Gen Virol, 1977. **36**(1): p. 59-74.
79. Sauvant, P., et al., *PAV-1, a new rat hepatic stellate cell line converts retinol into retinoic acid, a process altered by ethanol*. Int J Biochem Cell Biol, 2002. **34**(8): p. 1017-29.
80. Bartel, D.P., *MicroRNAs: target recognition and regulatory functions*. Cell, 2009. **136**(2): p. 215-33.
81. Girard, M., et al., *miR-122, a paradigm for the role of microRNAs in the liver*. J Hepatol, 2008. **48**(4): p. 648-56.
82. Elmen, J., et al., *LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates*. Nature, 2008. **452**(7189): p. 896-9.
83. Jopling, C.L., et al., *Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA*. Science, 2005. **309**(5740): p. 1577-81.
84. Desmet, V.J., et al., *Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging*. Hepatology, 1994. **19**(6): p. 1513-20.
85. Friedman, S.L., et al., *Hepatic lipocytes: the principal collagen-producing cells of normal rat liver*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(24): p. 8681-5.
86. Oben, J.A., et al., *Hepatic fibrogenesis requires sympathetic neurotransmitters*. Gut, 2004. **53**(3): p. 438-45.
87. Ramadori, G. and B. Saile, *Portal tract fibrogenesis in the liver*. Lab Invest, 2004. **84**(2): p. 153-9.
88. Oben, J.A., et al., *Norepinephrine induces hepatic fibrogenesis in leptin deficient ob/ob mice*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **308**(2): p. 284-92.

89. Popov, Y., et al., *Mdr2 (Abcb4)-/- mice spontaneously develop severe biliary fibrosis via massive dysregulation of pro- and antifibrogenic genes*. J Hepatol, 2005. **43**(6): p. 1045-54.
90. Cabezon, T., et al., *Expression of S100A4 by a variety of cell types present in the tumor microenvironment of human breast cancer*. Int J Cancer, 2007. **121**(7): p. 1433-44.
91. Strutz, F., et al., *Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1*. J Cell Biol, 1995. **130**(2): p. 393-405.
92. Anesini, C. and E. Borda, *Modulatory effect of the adrenergic system upon fibroblast proliferation: participation of beta 3-adrenoceptors*. Auton Autacoid Pharmacol, 2002. **22**(3): p. 177-86.
93. Leicht, M., N. Greipel, and H. Zimmer, *Comitogenic effect of catecholamines on rat cardiac fibroblasts in culture*. Cardiovasc Res, 2000. **48**(2): p. 274-84.
94. Kisseleva, T. and D.A. Brenner, *Fibrogenesis of parenchymal organs*. Proc Am Thorac Soc, 2008. **5**(3): p. 338-42.
95. Kisseleva, T. and D.A. Brenner, *Mechanisms of fibrogenesis*. Exp Biol Med (Maywood), 2008. **233**(2): p. 109-22.
96. Xia, J.L., et al., *Hepatocyte growth factor attenuates liver fibrosis induced by bile duct ligation*. Am J Pathol, 2006. **168**(5): p. 1500-12.
97. Rygiel, K.A., et al., *Epithelial-mesenchymal transition contributes to portal tract fibrogenesis during human chronic liver disease*. Lab Invest, 2008. **88**(2): p. 112-23.
98. Kalluri, R. and E.G. Neilson, *Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis*. J Clin Invest, 2003. **112**(12): p. 1776-84.
99. Fink, L., et al., *Laser-microdissection for cell type- and compartment-specific analyses on genomic and proteomic level*. Exp Toxicol Pathol, 2006. **57 Suppl 2**: p. 25-9.
100. Bonner, R.F., et al., *Laser capture microdissection: molecular analysis of tissue*. Science, 1997. **278**(5342): p. 1481,1483.
101. Paizis, G., et al., *Up-regulation of components of the renin-angiotensin system in the bile duct-ligated rat liver*. Gastroenterology, 2002. **123**(5): p. 1667-76.
102. Bataller, R., et al., *Systemic infusion of angiotensin II exacerbates liver fibrosis in bile duct-ligated rats*. Hepatology, 2005. **41**(5): p. 1046-55.
103. Bataller, R., et al., *Prolonged infusion of angiotensin II into normal rats induces stellate cell activation and proinflammatory events in liver*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2003. **285**(3): p. G642-51.
104. Bataller, R., et al., *Liver fibrogenesis: a new role for the renin-angiotensin system*. Antioxid Redox Signal, 2005. **7**(9-10): p. 1346-55.
105. Gao, X., et al., *Angiotensin II increases collagen I expression via transforming growth factor-beta1 and extracellular signal-regulated kinase in cardiac fibroblasts*. Eur J Pharmacol, 2009. **606**(1-3): p. 115-20.
106. Luscher, T.F., *Endothelin*. J Cardiovasc Pharmacol, 1991. **18 Suppl 10**: p. S15-22.
107. Goto, K. and T.D. Warner, *Molecular pharmacology. Endothelin versatility*. Nature, 1995. **375**(6532): p. 539-40.
108. Housset, C., D.C. Rockey, and D.M. Bissell, *Endothelin receptors in rat liver: lipocytes as a contractile target for endothelin I*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(20): p. 9266-70.
109. Mallat, A., et al., *Growth inhibitory properties of endothelin-1 in human hepatic myofibroblastic Ito cells. An endothelin B receptor-mediated pathway*. J Clin Invest, 1995. **96**(1): p. 42-9.
110. Clozel, M. and H. Salloukh, *Role of endothelin in fibrosis and anti-fibrotic potential of bosentan*. Ann Med, 2005. **37**(1): p. 2-12.

111. Hong, H.J., et al., *Angiotensin II induces endothelin-1 gene expression via extracellular signal-regulated kinase pathway in rat aortic smooth muscle cells*. Cardiovasc Res, 2004. **61**(1): p. 159-68.
112. Thomson, J.M., et al., *Extensive post-transcriptional regulation of microRNAs and its implications for cancer*. Genes Dev, 2006. **20**(16): p. 2202-7.
113. Woo, S.W., et al., *Gene expression profiles during the activation of rat hepatic stellate cells evaluated by cDNA microarray*. Arch Pharm Res, 2007. **30**(11): p. 1410-8.
114. Ji, J., et al., *Over-expressed microRNA-27a and 27b influence fat accumulation and cell proliferation during rat hepatic stellate cell activation*. FEBS Lett, 2009. **583**(4): p. 759-66.
115. Guo, C.J., et al., *miR-15b and miR-16 are implicated in activation of the rat hepatic stellate cell: An essential role for apoptosis*. J Hepatol, 2009. **50**(4): p. 766-78.
116. Cimmino, A., et al., *miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(39): p. 13944-9.
117. Castoldi, M., et al., *A sensitive array for microRNA expression profiling (miChip) based on locked nucleic acids (LNA)*. RNA, 2006. **12**(5): p. 913-20.
118. Castoldi, M., et al., *miChip: a microarray platform for expression profiling of microRNAs based on locked nucleic acid (LNA) oligonucleotide capture probes*. Methods, 2007. **43**(2): p. 146-52.
119. Iliopoulos, D., et al., *Integrative microRNA and proteomic approaches identify novel osteoarthritis genes and their collaborative metabolic and inflammatory networks*. PLoS ONE, 2008. **3**(11): p. e3740.
120. Pandey, D.P. and D. Picard, *miR-22 inhibits estrogen signaling by directly targeting the estrogen receptor {alpha} mRNA*. Mol Cell Biol, 2009.
121. Galardi, S., et al., *miR-221 and miR-222 expression affects the proliferation potential of human prostate carcinoma cell lines by targeting p27Kip1*. J Biol Chem, 2007. **282**(32): p. 23716-24.
122. Zhao, J.J., et al., *MicroRNA-221/222 negatively regulates estrogen receptor alpha and is associated with tamoxifen resistance in breast cancer*. J Biol Chem, 2008. **283**(45): p. 31079-86.
123. Miller, T.E., et al., *MicroRNA-221/222 confers tamoxifen resistance in breast cancer by targeting p27Kip1*. J Biol Chem, 2008. **283**(44): p. 29897-903.
124. Sun, T., et al., *The role of microRNA-221 and microRNA-222 in androgen-independent prostate cancer cell lines*. Cancer Res, 2009. **69**(8): p. 3356-63.
125. le Sage, C., et al., *Regulation of the p27(Kip1) tumor suppressor by miR-221 and miR-222 promotes cancer cell proliferation*. EMBO J, 2007. **26**(15): p. 3699-708.
126. Medina, R., et al., *MicroRNAs 221 and 222 bypass quiescence and compromise cell survival*. Cancer Res, 2008. **68**(8): p. 2773-80.
127. Poliseno, L., et al., *MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HUVECs*. Blood, 2006. **108**(9): p. 3068-71.
128. Kuehbacher, A., C. Urbich, and S. Dimmeler, *Targeting microRNA expression to regulate angiogenesis*. Trends Pharmacol Sci, 2008. **29**(1): p. 12-5.
129. Kuehbacher, A., et al., *Role of Dicer and Drosha for endothelial microRNA expression and angiogenesis*. Circ Res, 2007. **101**(1): p. 59-68.
130. Fish, J.E., et al., *miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity*. Dev Cell, 2008. **15**(2): p. 272-84.
131. Wang, S., et al., *The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis*. Dev Cell, 2008. **15**(2): p. 261-71.
132. Corpechot, C., et al., *Hypoxia-induced VEGF and collagen I expressions are associated with angiogenesis and fibrogenesis in experimental cirrhosis*. Hepatology, 2002. **35**(5): p. 1010-21.

133. Michael, M.Z., et al., *Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia*. Mol Cancer Res, 2003. **1**(12): p. 882-91.
134. Akao, Y., Y. Nakagawa, and T. Naoe, *MicroRNAs 143 and 145 are possible common onco-microRNAs in human cancers*. Oncol Rep, 2006. **16**(4): p. 845-50.
135. Esau, C., et al., *MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation*. J Biol Chem, 2004. **279**(50): p. 52361-5.
136. Iorio, M.V., et al., *MicroRNA signatures in human ovarian cancer*. Cancer Res, 2007. **67**(18): p. 8699-707.
137. Volinia, S., et al., *A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(7): p. 2257-61.
138. Bloomston, M., et al., *MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis*. JAMA, 2007. **297**(17): p. 1901-8.
139. Shi, X.B., et al., *An androgen-regulated miRNA suppresses Bak1 expression and induces androgen-independent growth of prostate cancer cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(50): p. 19983-8.
140. Le, M.T., et al., *MicroRNA-125b is a novel negative regulator of p53*. Genes Dev, 2009. **23**(7): p. 862-76.
141. Guo, Y., et al., *Identification and characterization of lin-28 homolog B (LIN28B) in human hepatocellular carcinoma*. Gene, 2006. **384**: p. 51-61.
142. Krichevsky, A.M., et al., *A microRNA array reveals extensive regulation of microRNAs during brain development*. RNA, 2003. **9**(10): p. 1274-81.
143. Geerts, A., *History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells*. Semin Liver Dis, 2001. **21**(3): p. 311-35.
144. Moss, E.G., R.C. Lee, and V. Ambros, *The cold shock domain protein LIN-28 controls developmental timing in C. elegans and is regulated by the lin-4 RNA*. Cell, 1997. **88**(5): p. 637-46.
145. Moss, E.G. and L. Tang, *Conservation of the heterochronic regulator Lin-28, its developmental expression and microRNA complementary sites*. Dev Biol, 2003. **258**(2): p. 432-42.
146. Yu, J., et al., *Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells*. Science, 2007. **318**(5858): p. 1917-20.
147. Nakagawa, M., et al., *Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts*. Nat Biotechnol, 2008. **26**(1): p. 101-6.
148. Takahashi, K., et al., *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors*. Cell, 2007. **131**(5): p. 861-72.
149. Park, I.H., et al., *Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors*. Nature, 2008. **451**(7175): p. 141-6.
150. Huangfu, D., et al., *Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2*. Nat Biotechnol, 2008. **26**(11): p. 1269-75.
151. Kordes, C., et al., *CD133+ hepatic stellate cells are progenitor cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **352**(2): p. 410-7.
152. Bussing, I., F.J. Slack, and H. Grosshans, *let-7 microRNAs in development, stem cells and cancer*. Trends Mol Med, 2008. **14**(9): p. 400-9.
153. Heo, I., et al., *Lin28 mediates the terminal uridylation of let-7 precursor MicroRNA*. Mol Cell, 2008. **32**(2): p. 276-84.

7. ANHANG

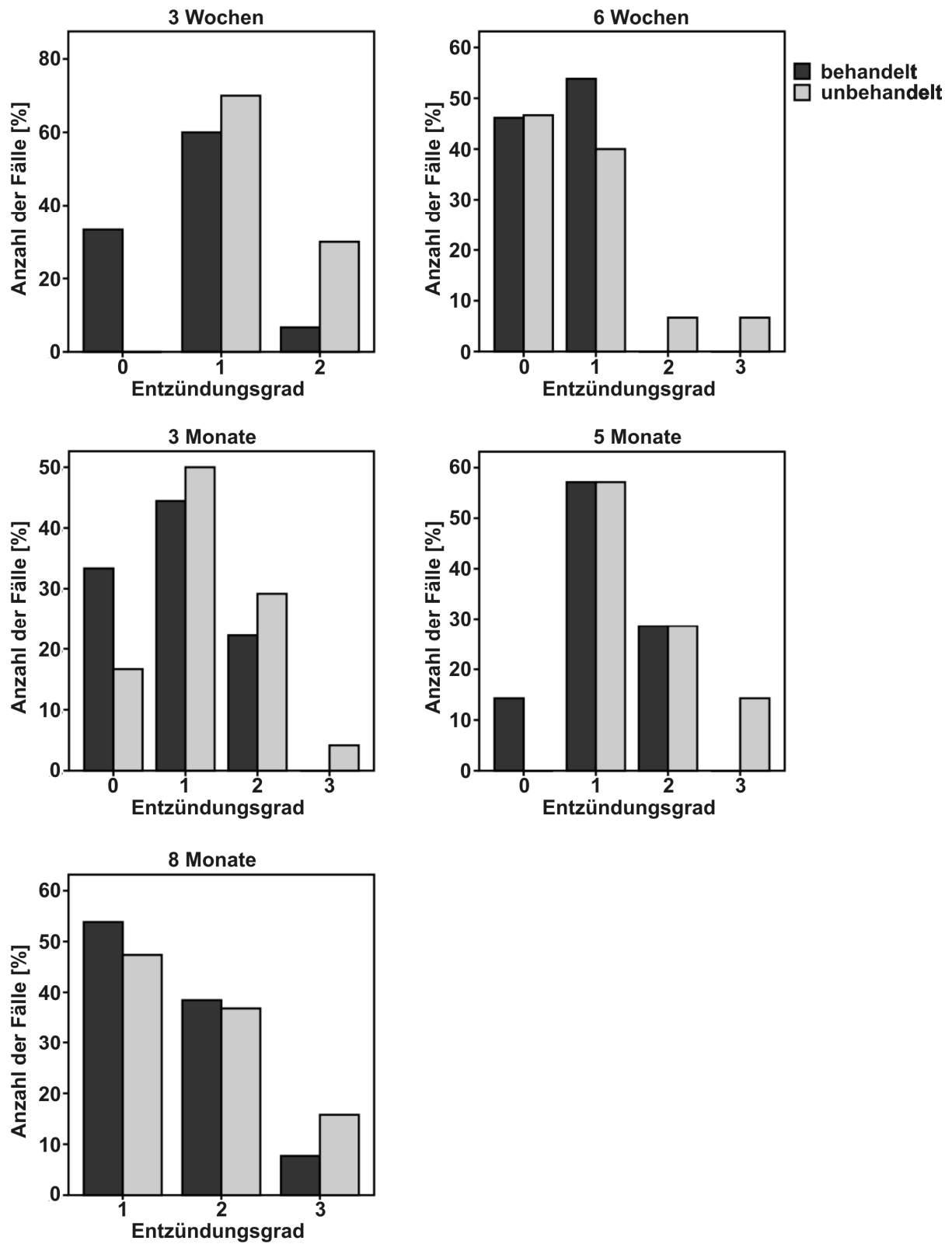


Abb. 50 Entzündliche Veränderungen im MDR2^{-/-} Modell nach einer Behandlung von 3 und 6 Wochen sowie 3, 5 und 8 Monaten mit Propranolol im Vergleich zu unbehandelten Tieren.

Tab. 13 Entzündungsgrad in Abhängigkeit von der Propranolol-Behandlung aufgeschlüsselt nach Behandlungsdauer

Behandlung 3 Wochen					
		Propranolol		Gesamt	
		behandelt	unbehandelt		
Entzündungs- grad	0	Anzahl	5	0	5
		%	33,3%	0%	14,3%
	1	Anzahl	9	14	23
		%	60,0%	70,0%	65,7%
	2	Anzahl	1	6	7
		%	6,7%	30,0%	20,0%
Gesamt	Anzahl	15	20	35	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	
p<0,05					

6 Wochen					
		Behandlung		Gesamt	
		behandelt	unbehandelt		
Entzündungs- grad	0	Anzahl	6	7	13
		%	46,2%	46,7%	46,4%
	1	Anzahl	7	6	13
		%	53,8%	40,0%	46,4%
	2	Anzahl	0	1	1
		%	0%	6,7%	3,6%
	3	Anzahl	0	1	1
		%	0%	6,7%	3,6%
Gesamt	Anzahl	13	15	28	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	
n.s.					

3 Monate					
		Behandlung		Gesamt	
		behandelt	unbehandelt		
Entzündungs- grad	0	Anzahl	6	4	10
		%	33,3%	16,7%	23,8%
	1	Anzahl	8	12	20
		%	44,4%	50,0%	47,6%
	2	Anzahl	4	7	11
		%	22,2%	29,2%	26,2%
	3	Anzahl	0	1	1
		%	0%	4,2%	2,4%
Gesamt	Anzahl	18	24	42	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	
n.s.					

5 Monate					
		Behandlung		Gesamt	
		behandelt	unbehandelt		
Entzündungs- grad	0	Anzahl	2	0	2
		%	14,3%	0%	7,1%
	1	Anzahl	8	8	16
		%	57,1%	57,1%	57,1%
	2	Anzahl	4	4	8
		%	28,6%	28,6%	28,6%
	3	Anzahl	0	2	2
		%	0%	14,3%	7,1%
Gesamt	Anzahl	14	14	28	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	
n.s.					

8 Wochen					
		Behandlung		Gesamt	
		behandelt	unbehandelt		
Entzündungs- grad	1	Anzahl	7	9	16
		%	53,8%	47,4%	50,0%
	2	Anzahl	5	7	12
		%	38,5%	36,8%	37,5%
	3	Anzahl	1	3	4
		%	7,7%	15,8%	12,5%
Gesamt		Anzahl	13	19	32
		%	100,0%	100,0%	100,0%
					n.s.

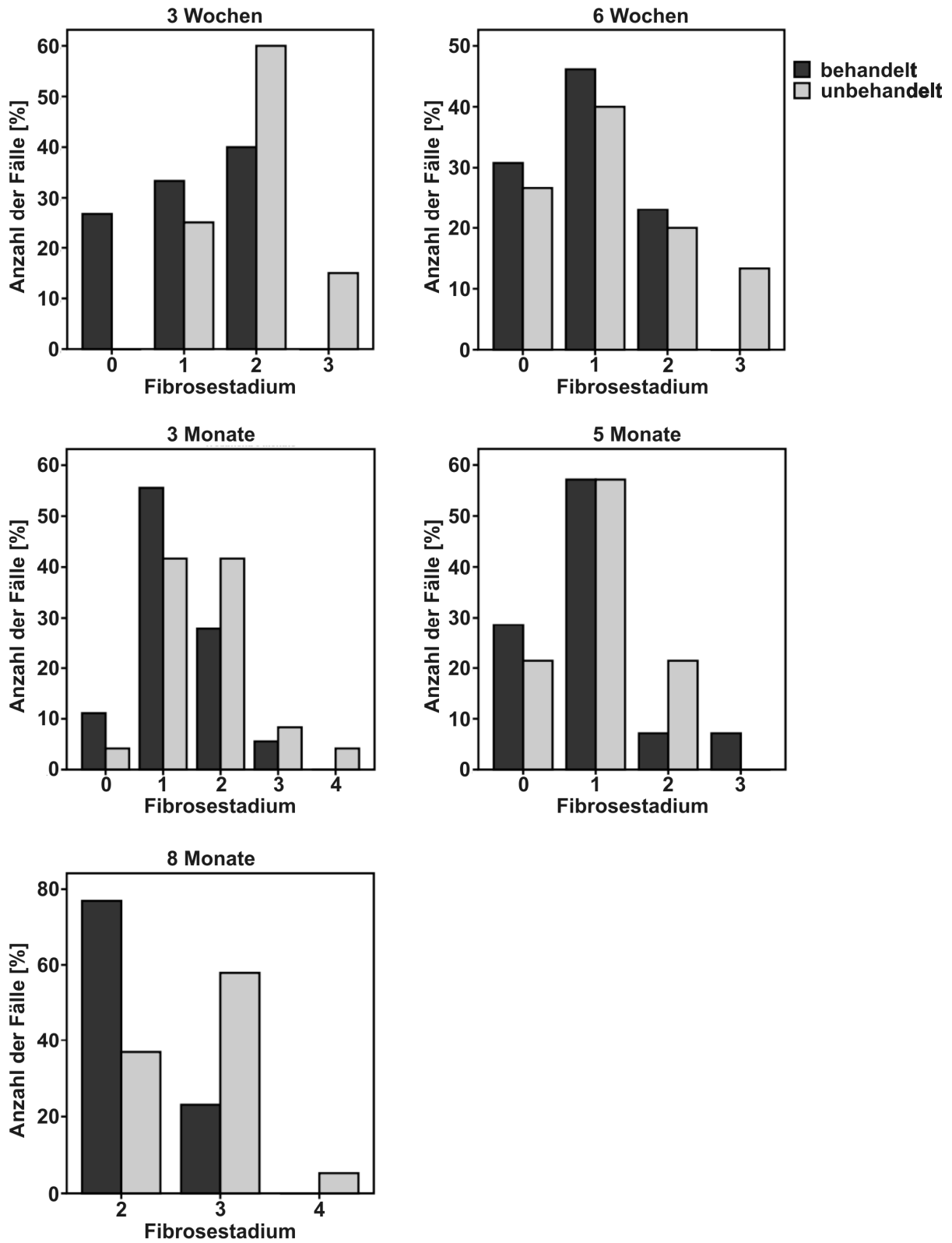


Abb. 51 Fibrosestadien im MDR2^{-/-} Modell nach einer Behandlung von 3 und 6 Wochen sowie 3, 5 und 8 Monaten mit Propranolol im Vergleich zu unbehandelten Tieren.

Tab. 14 Fibrorestadium in Abhängigkeit von der Propranolol-Behandlung aufgeschlüsselt nach Behandlungsdauer

3 Wochen				
		Behandlung		Gesamt
		behandelt	unbehandelt	
Fibrorestadium 0	Anzahl	4	0	4
	%	26,7%	0%	11,4%
1	Anzahl	5	5	10
	%	33,3%	25,0%	28,6%
2	Anzahl	6	12	18
	%	40,0%	60,0%	51,4%
3	Anzahl	0	3	3
	%	0%	15,0%	8,6%
Gesamt	Anzahl	15	20	35
	%	100,0%	100,0%	100,0%

p<0,05

6 Wochen				
		Behandlung		Gesamt
		behandelt	unbehandelt	
Fibrorestadium 0	Anzahl	4	4	8
	%	30,8%	26,7%	28,6%
1	Anzahl	6	6	12
	%	46,2%	40,0%	42,9%
2	Anzahl	3	3	6
	%	23,1%	20,0%	21,4%
3	Anzahl	0	2	2
	%	0%	13,3%	7,1%
Gesamt	Anzahl	13	15	28
	%	100,0%	100,0%	100,0%

n.s.

3 Monate				
		Behandlung		Gesamt
		behandelt	unbehandelt	
Fibrorestadium 0	Anzahl	2	1	3
	%	11,1%	4,2%	7,1%
1	Anzahl	10	10	20
	%	55,6%	41,7%	47,6%
2	Anzahl	5	10	15
	%	27,8%	41,7%	35,7%
3	Anzahl	1	2	3
	%	5,6%	8,3%	7,1%
4	Anzahl	0	1	1
	%	0%	4,2%	2,4%
Gesamt	Anzahl	18	24	42
	%	100,0%	100,0%	100,0%
				n.s.

5 Monate				
		Behandlung		Gesamt
		behandelt	unbehandelt	
Fibrorestadium 1	Anzahl	4	3	7
	%	28,6%	21,4%	25,0%
2	Anzahl	8	8	16
	%	57,1%	57,1%	57,1%
3	Anzahl	1	3	4
	%	7,1%	21,4%	14,3%
4	Anzahl	1	0	1
	%	7,1%	0%	3,6%
Gesamt	Anzahl	14	14	28
	%	100,0%	100,0%	100,0%
				n.s.

8 Monate				
		Behandlung		Gesamt
		behandelt	unbehandelt	
Fibrosestadium 2	Anzahl	10	7	17
	%	76,9%	36,8%	53,1%
	3 Anzahl	3	11	14
	%	23,1%	57,9%	43,8%
	4 Anzahl	0	1	1
	%	0%	5,3%	3,1%
Gesamt	Anzahl	13	19	32
	%	100,0%	100,0%	100,0%
				p<0,05

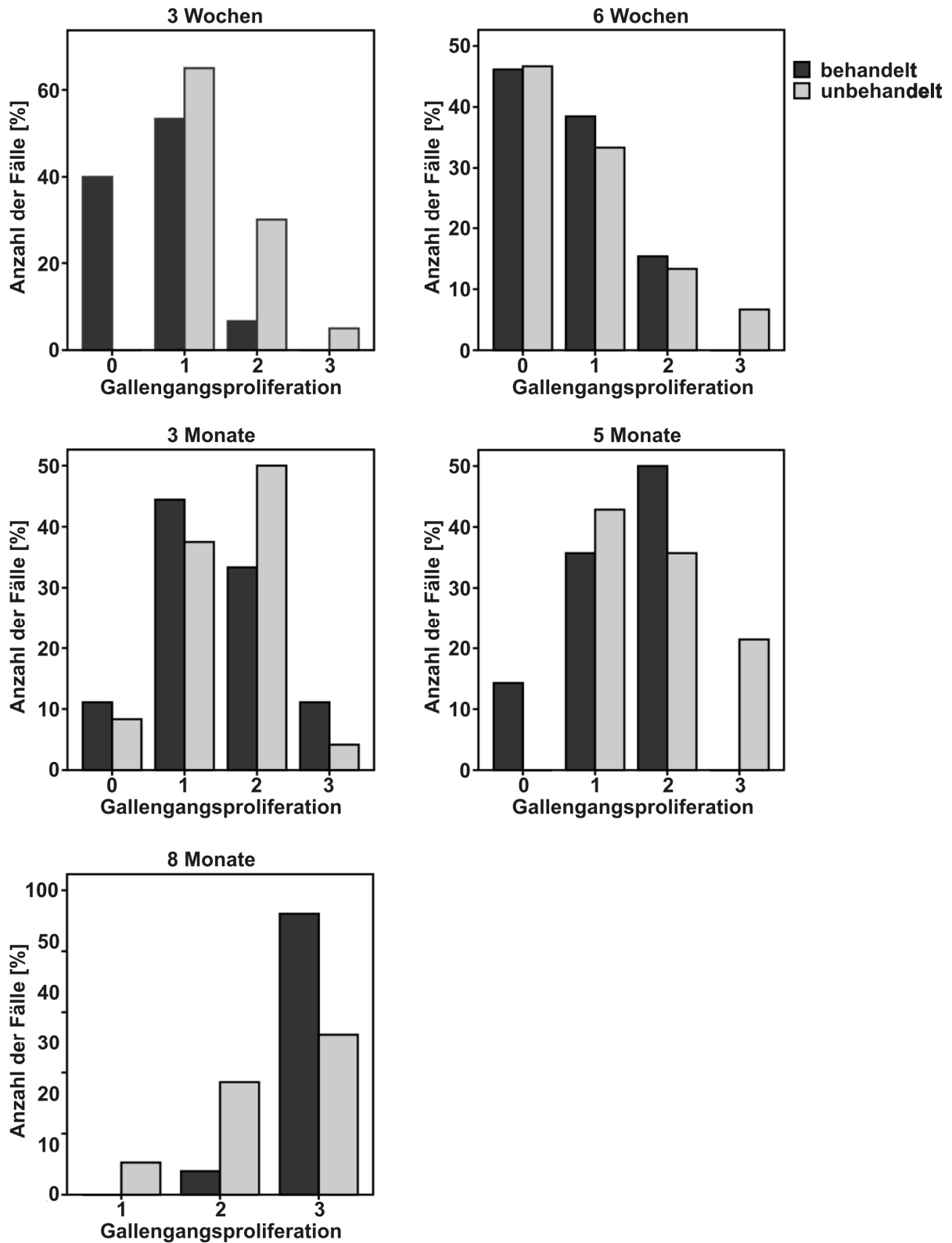


Abb. 52 Gallengangsproliferation im MDR2^{-/-} Modell nach einer Behandlung von 3 und 6 Wochen sowie 3, 5 und 8 Monaten mit Propranolol im Vergleich zu unbehandelten Tieren.

Tab. 15 Gallengangsproliferation in Abhängigkeit von der Propranolol-Behandlung aufgeschlüsselt nach Behandlungsdauer

3 Wochen					
		Behandlung		Gesamt	
		behandelt	unbehandelt		
Gallengangs- proliferation	0	Anzahl	6	0	6
		%	40,0%	0%	17,1%
	1	Anzahl	8	13	21
		%	53,3%	65,0%	60,0%
	2	Anzahl	1	6	7
		%	6,7%	30,0%	20,0%
	3	Anzahl	0	1	1
		%	0%	5,0%	2,9%
Gesamt	Anzahl	15	20	35	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	

p>0,005

6 Wochen					
		Behandlung		Gesamt	
		behandelt	unbehandelt		
Gallengangs- proliferation	0	Anzahl	6	7	13
		%	46,2%	46,7%	46,4%
	1	Anzahl	5	5	10
		%	38,5%	33,3%	35,7%
	2	Anzahl	2	2	4
		%	15,4%	13,3%	14,3%
	3	Anzahl	0	1	1
		%	0%	6,7%	3,6%
Gesamt	Anzahl	13	15	28	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	

n.s.

3 Monate					
		Behandlung		Gesamt	
		behandelt	unbehandelt		
Gallengangs- proliferation	0	Anzahl	2	2	4
		%	11,1%	8,3%	9,5%
	1	Anzahl	8	9	17
		%	44,4%	37,5%	40,5%
	2	Anzahl	6	12	18
		%	33,3%	50,0%	42,9%
	3	Anzahl	2	1	3
		%	11,1%	4,2%	7,1%
Gesamt	Anzahl	18	24	42	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	
n.s					

5 Monate					
		Behandlung		Gesamt	
		behandelt	unbehandelt		
Gallengangs- proliferation	0	Anzahl	2	0	2
		%	14,3%	0%	7,1%
	1	Anzahl	5	6	11
		%	35,7%	42,9%	39,3%
	2	Anzahl	7	5	12
		%	50,0%	35,7%	42,9%
	3	Anzahl	0	3	3
		%	0%	21,4%	10,7%
Gesamt	Anzahl	14	14	28	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	
n.s.					

8 Monate					
		Behandlung		Gesamt	
		behandelt	unbehandelt		
Gallengangs- proliferation	1	Anzahl	0	2	2
		%	0%	10,5%	6,3%
	2	Anzahl	1	7	8
		%	7,7%	36,8%	25,0%
	3	Anzahl	12	10	22
		%	92,3%	52,6%	68,8%
Gesamt	Anzahl	13	19	32	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	
n.s.					

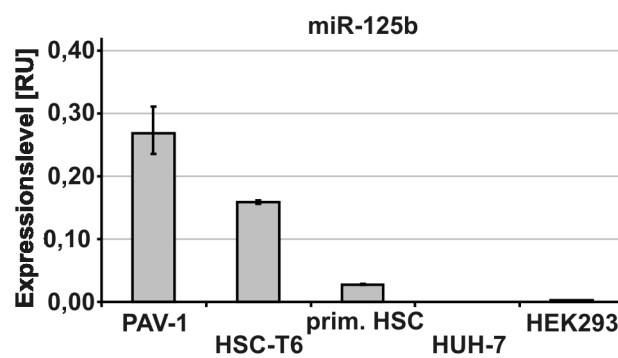


Abb. 53 Evaluierung endogener Expressionslevel der miR-125b mittels Real-Time PCR in verschiedenen Zelltypen.

8. DANKSAGUNG

Ich möchte mich vielmals bei Herrn Professor Dr. Dienes dafür bedanken, dass ich diese Dissertation unter seiner Leitung am Institut für Pathologie der Uniklinik Köln durchführen konnte.

Ein ganz besonders herzlicher Dank gebührt Frau PD Dr. Margarete Odenthal für die Bereitstellung der interessanten Thematik sowie für die stets freundliche und hervorragende Betreuung und die Bereitschaft zu jeder Zeit auftretende Probleme zu diskutieren.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Professor Dr. Petersen vom Institut für pharmazeutische Biologie der Universität Marburg bedanken, die diese Arbeit als externe Promotion des Fachbereiches Pharmazie betreut und begutachtet hat.

Mein Dank gilt auch den Kellerkindern des Instituts für Pathologie Melanie Scheffler, Stephanie Schievenbusch, Andrea Noetel, Monika Kwiecinski, Natalia Elfimova und Jasmin Riemer für die Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der Arbeit sowie die schöne Zeit außerhalb des Instituts. Besonders danken möchte ich Melanie Scheffler und Stephanie Schievenbusch, die mich während der gesamten Zeit begleitet haben.

Ich bedanke mich auch bei allen weiteren und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts, insbesondere bei Katharina Wendland, Elisabeth Konze, Elisabeth Kühnen, Dr. Heike Varnholt und Dr. Mario Zierden für die großartige Unterstützung, Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit.

Außerdem danke ich Rebecca Schmidt für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Ferner möchte ich allen meinen Freunden, besonders Christian, Sebastian, Ingo, Bastian, Ioannis, Stephan und Torsten für ihre Unterstützung und die schöne Zeit herzlich bedanken, die für den nötigen Ausgleich und Motivation gesorgt haben.

Mein ganz persönlicher Dank gilt meiner Familie, meiner Mutter Irmhild Strack und ihrem Lebensgefährten Wolfgang Springer sowie meiner, während der

Promotionszeit verstorbenen, Großmutter Helene Strack. Ohne ihre Zuwendung und bedingungslose Unterstützung während meiner gesamten Ausbildung wäre diese Arbeit so nicht entstanden.

Vielen Dank!

9. TABELLARISCHER LEBENS LAUF

Personalien:

Name: Strack

Vorname: Ingo

Geburtsdatum: 31. Mai 1977

Geburtsort: Siegen

Wohnort: Siegen, Hans-Kruse-Strasse 10

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

Eltern: Rolf Strack, verstorben am 19.03.1996

Irmhild Strack geb. Irle

Schulbildung:

1983 - 1987 Spandauer Grundschule Siegen

1987 - 1997 Gymnasium am Löhrtor Siegen

Wehrdienst:

1997 - 1998 5./ Wachbataillon beim Bundesministerium der
Verteidigung, Siegburg

Studium:

1999 - 2004 Studium der Pharmazie
Philipps-Universität Marburg
Abschluss: Approbation zum Apotheker (12/2004)

Dissertation:

06/2005 - 07/2009 Dissertation am Institut für Pathologie unter Anleitung von
Herrn Professor Dr. Dienes,
Klinikum der Universität zu Köln

ERKLÄRUNG

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

**„Molekulare Mechanismen der Leberfibrogenese als Grundlage für neue
Therapiestrategien der chronischen Hepatitis“**

selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als
der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner
anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen
Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 10.08.2009

.....
Ingo Strack