

Bedeutung neuronaler microRNAs während der myofibroblastischen Transdifferenzierung hepatischer Sternzellen

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

vorgelegt von
Andrea Noetel
aus Freiburg/Breisgau

Köln 2012

Berichtersteller: Prof. Dr. P. Nürnberg
Prof. Dr. M. Paulsson

Tag der mündlichen Prüfung: 20.06.2012

Die Zeit verwandelt uns nicht,
sie entfaltet uns nur.

(Max Frisch)



...für diejenigen, die mich begleitet haben...

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1 LEBERFIBROSE	1
1.1.1 <i>Pathophysiologie der Leberfibrose</i>	1
1.1.2 <i>Hepatische Sternzellen als zentraler Zelltyp der Leberfibrose</i>	3
1.1.2.1 <i>Die myofibroblastische Transdifferenzierung der HSC während der Leberfibrose</i>	4
1.1.2.2 <i>Neuronale Eigenschaften</i>	7
1.2 DIE BEDEUTUNG VON MICRO-RNAS	8
1.2.1 <i>Biogenese und physiologische Bedeutung</i>	8
1.2.2 <i>Methodische Ansätze zur Zieldomänenbestimmung von miRNAs</i>	10
1.2.3 <i>Detektion von Zieldomänen der miRNAs durch in vitro-Ansätze</i>	11
1.2.4 <i>Neuronale miRNAs</i>	12
1.3 ZIEL DIESER ARBEIT	14
2. MATERIAL UND METHODEN	15
2.1 MATERIALIEN.....	15
2.1.1 <i>Chemikalien und Plastikwaren</i>	15
2.1.2 <i>Puffer und Lösungen</i>	15
2.1.2.1 <i>Puffer und Lösungen für die Bakterienkultur</i>	15
2.1.2.2 <i>Puffer und Lösungen für die Zellkultur</i>	16
2.1.3 <i>Antikörper</i>	17
2.1.4 <i>Oligonukleotide</i>	18
2.1.5 <i>Vektoren und Plasmidkonstrukte</i>	20
2.1.6 <i>Bakterienstamm und Zelllinien</i>	21
2.1.7 <i>Software</i>	22
2.2 ZELLKULTUR.....	23
2.2.1 <i>Isolierung primärer HSC aus der Ratte</i>	23
2.2.1.1 <i>Versuchstiere und Tierhaltung</i>	23
2.2.1.2 <i>Perfusion und Dichtegradienten-Zentrifugation</i>	23
2.2.2 <i>Kultivierung von immortalisierten Zelllinien</i>	27
2.2.3 <i>Passagieren von Zellen</i>	27

2.2.4 Bestimmung der Zellzahl	27
2.2.5 Transfektion von Zellen.....	27
2.2.6 Kryokonservierung von Zellen	28
2.2.7 Immunzytochemische Färbungen.....	28
2.3 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	29
2.3.1 RNA-Techniken	29
2.3.1.1 Präparation von Gesamt-RNA aus Gewebe.....	29
2.3.1.2 Präparation von Gesamt-RNA aus Zellen	29
2.3.1.3 Qualitätskontrolle und Konzentrationsbestimmung von RNA	30
2.3.1.4 Reverse Transkription zur Bestimmung von mRNA und miRNA ..	30
2.3.1.5 Real-Time PCR	31
2.3.1.6 Microarray-Analyse.....	33
2.3.2 DNA-Techniken	33
2.3.2.1 Restriktion von DNA	33
2.3.2.2 Gelelektrophorese nativer DNA.....	33
2.3.2.3 Isolierung von DNA aus Agarosegelen.....	34
2.3.2.4 DNA-Ligation	34
2.3.2.5 Dimerisierung von Oligonukleotiden.....	34
2.3.2.6 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	35
2.3.2.7 Phenol-Extraktion und Präzipitation nach Maniatis.....	35
2.3.2.8 Herstellung von Ccl2-cDNA zur Klonierung durch die Polymerase-Ketten-Reaktion	36
2.3.2.9 DNA-Sequenzierung.....	36
2.4 MIKROBIOLOGISCHE METHODEN ZUR KLONIERUNG	37
2.4.1 Bakterienkultur.....	37
2.4.2 Herstellung kompetenter <i>E.coli</i> zur Transformation	37
2.4.3 Transformation von <i>E.coli</i>	38
2.5 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN.....	38
2.5.1 Dualer Luziferase-Reporterassay	38
2.5.2 Ago2-Immunopräzipitation	38
2.5.2.1 Immunopräzipitation und RNA-Extraktion.....	39
2.5.2.2 cDNA-Synthese und Amplifikation.....	39
2.5.2.3 TOPO-TA Klonierung	40

2.5.2.4 Sequenzierung von möglichen Zieltranskripten.....	40
2.6 NEXT GENERATION SEQUENCING.....	41
2.6.1 Präamplifikation über NuGEN.....	41
2.6.2 cDNA-Fragmentierung und Adapter-Ligation.....	41
2.6.3 Brückenamplifikation und Sequenzierung.....	42
3. ERGEBNISSE	44
3.1 DIE MYOFIBROBLASTISCHE TRANSDIFFERENZIERUNG <i>IN VITRO</i>	44
3.1.1 Morphologie und Reinheit.....	45
3.1.2 Charakteristische Veränderungen während der Transdifferenzierung...	47
3.2 ERHÖHTE EXPRESSION NEURONALER MIRNAS IN HSC NACH MYOFIBROBLASTISCHER DIFFERENZIERUNG.....	49
3.3 <i>LIN28</i> UND <i>KLF4</i> SIND ZIELTRANSKRIPTE NEURONALER MIRNAS IN HSC..	50
3.3.1 <i>miR-9</i> , <i>miR-125b</i> und <i>miR-128</i> binden an die 3`-UTR von <i>Lin28</i>	52
3.3.2 Abnehmende Expression von <i>Lin28</i> während der myofibroblastischen Transdifferenzierung von HSC	55
3.3.3 <i>miR-128</i> bindet an die 3`-UTR von <i>Klf4</i>	55
3.3.4 Expression von <i>Klf4</i> während der myofibroblastischen Transdifferenzierung von HSC	56
3.4 MICROARRAY UND AGO2-IMMUNOPRÄZIPITATION.....	57
3.4.1 Expressionsprofil nach Manipulation des endogenen <i>miR-128</i> - Spiegels in myofibroblastischen HSC.....	57
3.4.1.1 Expressionsprofile	58
3.4.2 Identifizierung potenzieller Zieltranskripte aufgrund der „Ago2-Interaktion“	60
3.4.2.1 Charakterisierung der HSC-T6 Zelllinie für neuronale Marker....	61
3.4.2.2 Neue Zieltranskripte über Klonierung.....	63
3.4.2.3 Neue Zieltranskripte über Next Generation Sequencing	64
3.5 <i>CCL2</i> ALS MÖGLICHES ZIELTRANSKRIPT DER NEURONALEN <i>MIR-128</i>	67
3.5.1 <i>miR-128</i> bindet an die mRNA von <i>Ccl2</i>	67
3.5.2 <i>Ccl2</i> Expression während der myofibroblastischen Transdifferenzierung.....	68
3.6 <i>NOTCH1</i> ALS ZIELTRANSKRIPT	69
3.6.1 <i>miR-9</i> , <i>miR-125b</i> und <i>miR-128</i> binden an die 3`-UTR von <i>Notch1</i>	69

3.6.2 Einfluss der neuronalen miRNAs auf die Notch1 Expression	71
3.6.3 Notch1 Expression während der myofibroblastischen Transdifferenzierung.....	72
4. DISKUSSION	74
4.1 EXPRESSION NEURONALER MIRNAS IN HSC	74
4.2 EXPERIMENTELLE IDENTIFIZIERUNG VON MIRNA ZIELDOMÄNEN.....	76
4.3 MIR-128 BEEINFLUSST DIE EXPRESSION EINER VIELZAHL VON CHEMOKINEN UND CHEMOKIN-REZEPTOREN.....	78
4.4 NOTCH1 UND PLURIPOTENZFAKTOREN.....	80
4.5 SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK.....	84
5. ZUSAMMENFASSUNG	86
6. ABSTRACT	88
7. LITERATURVERZEICHNIS	90
8. ANHANG	97
8.1 ABBILDUNGEN	97
8.2 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	98
8.3 DANKSAGUNG	100
8.4 ERKLÄRUNG	101
8.5 LEBENS LAUF	102

1. Einleitung

1.1 Leberfibrose

Die Leberfibrose ist gekennzeichnet durch eine unkontrollierte Vernarbung der Leber bei chronischen Lebererkrankungen, unabhängig der Ursache der Schädigung. So führen chronische virale, hereditäre, alkohol- und medikamententoxische sowie fettmetabolische Lebererkrankungen zur Ansammlung von extrazellulärer Matrix (ECM) (Friedman 2003). Aus einer fortgeschrittenen Leberfibrose kann eine Zirrhose resultieren (Gines *et al.* 2004), die wiederum einen Risikofaktor für die Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms darstellt (Bataller *et al.* 2005).

1.1.1 Pathophysiologie der Leberfibrose

Im Hinblick auf den Umbau der Leberarchitektur und Anreicherung von kollagenreichem Gewebe wurde die Leberfibrose lange Zeit als ein passiver und irreversibler Prozess verstanden (Schaffner *et al.* 1968; Popper *et al.* 1970). Heutzutage ist bekannt, dass die Leberfibrose, unabhängig ihrer Ätiologie, eine Wundheilungsantwort zur Regeneration auf einen wiederholt erfahrenen Schaden darstellt, mit potenzieller Reversibilität (Soyer *et al.* 1976).

Im gesunden Lebergewebe machen hepatische Sternzellen (HSC) bis zu 15 % der in der Leber enthaltenen Zellen aus. Sie befinden sich im Disse'schen Raum, der im Sinusoid die Hepatozyten vom sinusoidalen Epithel trennt und eine membranähnliche Grundmatrix beinhaltet (siehe Abb. 1.1). Diese ECM ist für die Beibehaltung der differenziellen Funktionen der residenten Leberzellen von entscheidender Bedeutung (Friedman 2000). In der fibrotischen Leber kommt es zu entscheidenden Veränderungen in der Quantität und Zusammensetzung dieser ECM mit dramatischem Anstieg in nicht-kollagenen und kollagenen extrazellulären Matrixproteinen (Friedman 2003). Bei einem akuten Schaden herrscht zunächst ein Gleichgewicht zwischen der Gewebereparatur und der Narbenbildung in der Leber. Im fortgeschrittenen Status eines permanenten Schadens kommt es fortwährend zur

Infiltrierung inflammatorischer Lymphozyten ins hepatische Parenchym und zur Apoptose von Hepatozyten (Bataller *et al.* 2005). Eine chronisch geschädigte Leber weist bis zu sechs Mal mehr extrazelluläre Matrix gegenüber dem normalen Zustand auf. Diese setzt sich aus den fibrillären Kollagenen I und III, Proteoglykanen und Glykoproteinen zusammen (Schuppan *et al.* 2001). Die beschriebene Akkumulation der Matrix resultiert sowohl aus einer erhöhten Synthese als auch verringertem Abbau. Verantwortlich für den Abbau extrazellulärer Matrix sind die Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und für den Aufbau ihre Inhibitoren (*tissue inhibitors of metalloproteinases*, TIMPs). In der fibrotischen Leber ist ein signifikanter Anstieg in der Expression der TIMPs auf mRNA- und Proteinebene zu verzeichnen. Mit Ausnahme der Induktion von MMP-2 bleiben die Level der MMPs hingegen nahezu unverändert. Die Matrixmetalloproteinase-2 ist am Abbau der ECM bei normalen physiologischen Prozessen beteiligt (Arthur 2000). Sowohl als Hauptquelle der Produktion von extrazellulärer Matrix als auch als Quelle von MMPs und TIMPs spielt die hepatische Sternzelle nach ihrer Aktivierung in der fibrotischen Leber bei den meisten chronischen Schädigungen eine entscheidende Rolle (Guo *et al.* 2007).

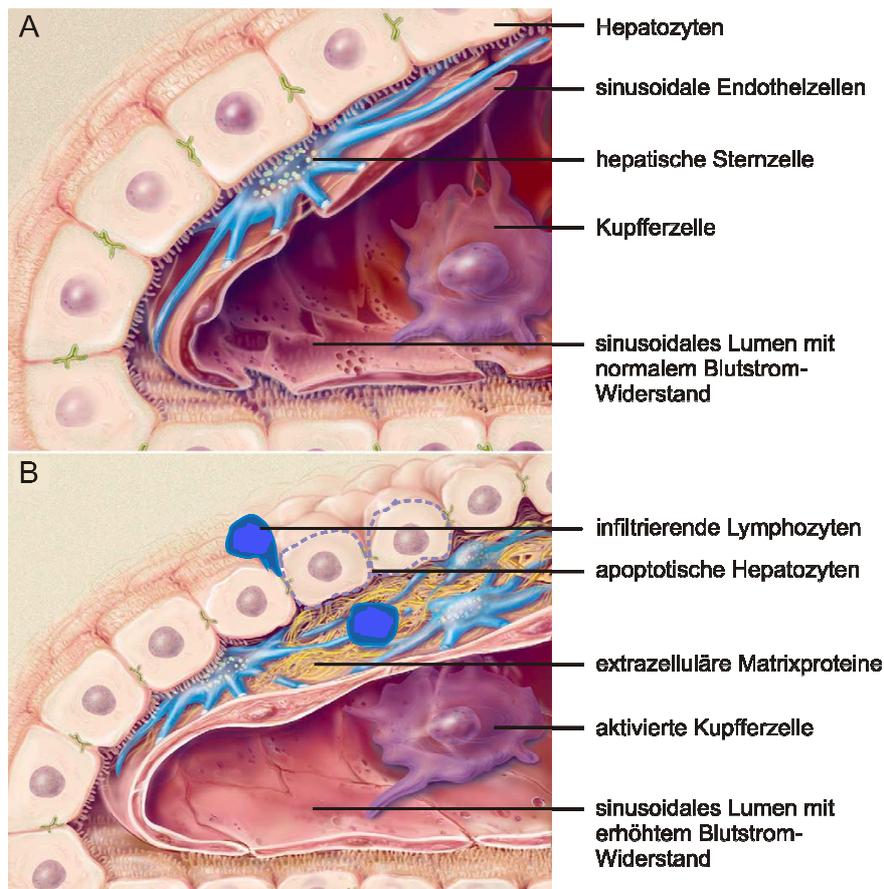


Abb. 1.1: Veränderungen in der Leberarchitektur mit fortschreitender Fibrose. Die normale Organisation der Leber (A) wird bei einem chronischen Leberschaden durch Infiltrierung inflammatorischer Lymphozyten ins Parenchym gekennzeichnet (B). Es finden sich apoptotische Hepatozyten sowie aktivierte Kupferzellen, die fibrogene Mediatoren entlassen. Hepatische Sternzellen (HSC) werden aktiviert und unterlaufen bei gesteigerter Proliferation eine myofibroblastische Transdifferenzierung mit gesteigerter Sezernierung extrazellulärer Matrixproteine. Verändert nach Friedman *et al.* 2002 in Anlehnung an Bataller *et al.* 2005.

1.1.2 Hepatische Sternzellen als zentraler Zelltyp der Leberfibrose

Die hepatische Sternzelle (HSC) wurde zuerst von Kupffer im 19. Jahrhundert als sternförmige Zelle beschrieben (Kupffer 1876). Die Übereinstimmung dieser Beschreibung mit der von T. Ito gefundenen fettspeichernden Zelle (Ito *et al.* 1952) wurde von Wake 1971 festgestellt (Wake 1971). Im Jahre 1996 erhielt diese Zelle ihre endgültige Namensgebung als hepatische Sternzelle (Ahern *et al.* 1996). HSC gehören zu den residenten Zellen der Leber und machen 15 % der Gesamtanzahl aus. Sie stellen in der normalen Leber den Hauptspeicherort von Vitamin A und

anderen Retinoiden dar (Wang 1999). Obgleich der funktionellen und anatomischen Ähnlichkeiten fasst man HSC als eine heterogene Gruppe von Zellen zusammen, abhängig von ihrer relativen Position (von periportal zu perizentral) in der Leber. HSC aus einem einzigen Organismus zeigen demnach Unterschiede in der Genexpression, ihrem Retinoid-Gehalt und ihrem Potenzial zur Produktion von extrazellulärer Matrix (Knittel *et al.* 1999; Geerts 2001). In der fibrotischen Leber durchlaufen HSC nach Aktivierung eine myofibroblastische Transdifferenzierung mit induzierter Expression von *alpha-smooth muscle actin* (α -SMA) und Proteinen der extrazellulären Matrix, hauptsächlich Kollagen Typ I. Diese myofibroblastischen HSC werden als Hauptquelle der Produktion und Deposition von ECM angesehen (Friedman 2008). Neben den HSC als fibrogene Zellen vermögen aber auch Zellen von portalen Fibroblasten, zirkulierenden Fibrozyten aus dem Knochenmark und epithelial-mesenchymaler Zelltransition an der Synthese und Restrukturierung des Bindegewebes mitzuwirken (Knittel *et al.* 1999; Kisseleva *et al.* 2006; Zeisberg *et al.* 2007).

1.1.2.1 Die myofibroblastische Transdifferenzierung der HSC während der Leberfibrose

Als Antwort auf einen Schaden der Leber erfahren HSC eine Aktivierung, wodurch eine Transdifferenzierung ruhender, Vitamin A-reicher HSC in proliferierende, fibrogene und kontraktile Myofibroblasten stattfindet. Dieser Vorgang ist auch bei primären HSC in Zellkultur zu beobachten (Ramadori *et al.* 1990; Geerts 2001; Friedman 2008). Die myofibroblastische Transdifferenzierung unterteilt man häufig in zwei zelluläre Abläufe, bestehend aus der Aktivierung durch proinflammatorische Mediatoren und die myofibroblastische Manifestation durch vor allem autokrine Stimulierung profibrogener Signalwege. Diesen beiden Abläufen folgen regenerative Abläufe zur Wiederherstellung der normalen Leberarchitektur. In der Aktivierungsphase werden HSC ansprechbar für Zytokine und andere lokale Stimuli durch benachbarte Zellen und eintretende Veränderungen in der ECM-Zusammensetzung (Friedman 2000; Friedman 2003). In dieser frühen Phase sind die erfolgenden Veränderungen noch reversibel. Die Beibehaltung dieses Zustands nach Aktivierung der HSC wird sowohl durch weitere parakrine und autokrine Stimuli als auch durch Umbau der ECM unterhalten. Es kommt zu verschiedenen

Veränderungen im Zellverhalten, darunter eine erhöhte Expression von Zellmembran-Rezeptoren. Letztlich haben alle im Folgenden beschriebenen und in Abbildung 1.2 dargestellten Ereignisse einen Anstieg in der Ansammlung extrazellulärer Matrix gemeinsam.

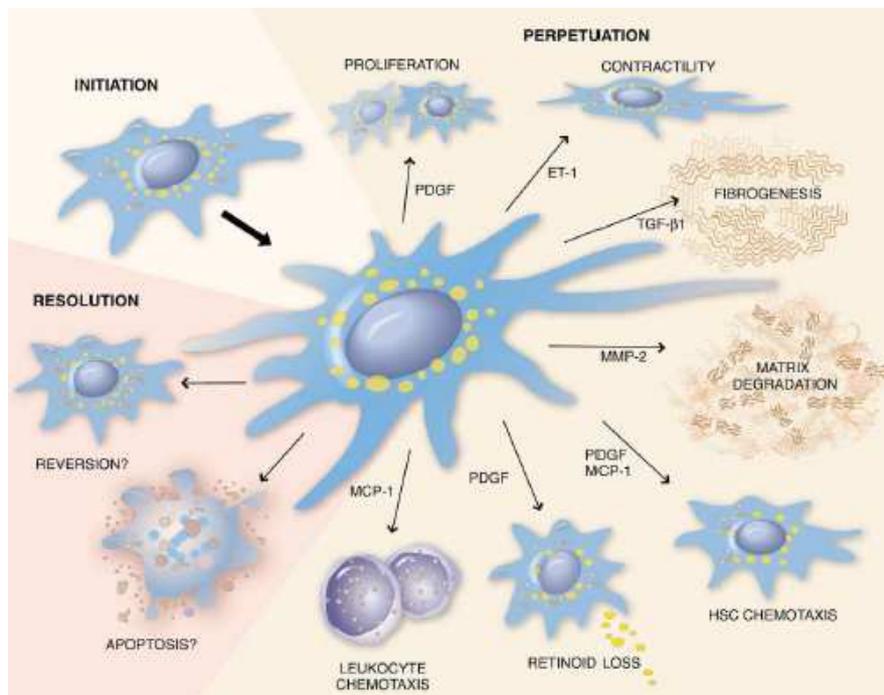


Abb. 1.2: Darstellung der phänotypischen Veränderungen von HSC während eines Leberschadens. In der Initiierungssphase erfolgt eine Aktivierung der HSC mit resultierender Transition von einer ruhenden, Vitamin A-reichen Zelle in einen proliferierenden, fibrogenen und kontraktilen Myofibroblasten. Die Phasen zur Beibehaltung des aktiven Zustands (Perpetuation) sowie die verantwortlichen Mediatoren sind im Text näher beschrieben. Abbildung aus Friedman 2003.

1. Proliferation: Eine erhöhte Anzahl an HSC ist auf promitogene Stimuli zurückzuführen. Hierbei stellt der *platelet-derived growth factor* (PDGF) das stärkste Mitogen gegenüber HSC dar. Bei einer Schädigung der Leber ist PDGF autokrin erhöht und auch der PDGF-Rezeptor zeigt eine Hochregulierung. Über Induktion des PDGF-Rezeptors werden intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert, die eine zelluläre Proliferation bewirken. Neben PDGF haben auch Endothelin-1 (ET-1), Thrombin, *fibroblast growth factor* (FGF), *epidermal growth factor* (EGF) und der *vascular endothelial growth factor* (VEGF) eine Bedeutung für die Proliferation der HSC.
2. Fibrogenese: Bei aktivierten HSC ist die erhöhte Matrix-Produktion stark durch den *transforming growth factor β1* (TGF-β1) beeinflusst. TGF-β1 spielt als profibrogener Mediator eine wichtige Rolle in der Leberfibrogenese. Nach parakriner Stimulierung

von HSC über TGF- β 1 erfolgt ein Aufrechterhalten ihrer Aktivierung mit Produktion extrazellulärer Matrix über autokrine TGF- β 1-Sezernierung von HSC.

3. Kontraktilität: Während der Transdifferenzierung der HSC kommt es zu einer Erhöhung ihrer Kontraktilität. Die bedingte Verengung der Sinusoide führt zu einem verringerten Blutstrom und Erhöhung des portalen Widerstandes. Endothelin-1 stellt den Hauptmediator zur Kontraktion der HSC dar. Sowohl ET-1 als auch das *endothelin-converting enzyme-1* zeigen in aktivierten HSC eine Hochregulierung in der Expression.

4. Matrix-Degradierung: Der Abbau von übermäßiger extrazellulärer Matrix zur Wiederherstellung einer normalen Leberarchitektur stellt einen wichtigen Prozess in der Fibrogenese dar. Die dafür notwendigen Regulatoren werden von HSC exprimiert. Sie stellen die Hauptquelle für die Matrixmetalloproteinase-2 und -3 dar, zeigen mit fortschreitender Fibrose aber auch einen deutlichen Anstieg in der Expression der entsprechenden Inhibitoren TIMP-1 und TIMP-2.

5. Chemotaxis: Eine Ansammlung von HSC in der geschädigten Region der Leber wird durch direkte Migration (Chemotaxis) erreicht. Ein wichtiger Mediator ist hierbei das *monocyte chemotactic protein-1* (MCP-1/Ccl2) als CC-Klassen-Mitglied der Chemokinfamilie. Es bewirkt eine Rekrutierung von aktivierten, nicht aber ruhenden HSC. Zusätzlich können PDGF, *insulin-like growth factor-1* (IGF-1) und Endothelin eine chemotaktische Wirkung auf aktivierte HSC ausüben.

6. Verlust von Vitamin A: HSC verlieren nach Aktivierung ihre Fähigkeit zur Speicherung von intrazellulärem Vitamin A. Ob dieser Verlust eine Bedeutung für den Aktivierungsprozess hat, ist bisher nicht bekannt.

7. Entlassung von Zytokinen und Einwanderung von Leukozyten: Für die Aufrechterhaltung der HSC-Aktivierung ist eine Produktion und Entlassung von proinflammatorischen, promitogenen und profibrogenen Zytokinen notwendig. HSC stellen eine Quelle dieser Zytokine dar, antworten aber ebenfalls auf diese Faktoren, weshalb auch die autokrine Ausschüttung von Zytokinen eine entscheidende Bedeutung hat. Das zuvor erwähnte chemotaktische Protein Ccl2 trägt zusätzlich zur Einwanderung von Entzündungszellen wie Monozyten oder Lymphozyten zum Ort der Schädigung bei.

Im Falle einer abklingenden Fibrose umfasst die Phase der Auflösung (Resolution) letztlich Signalwege, die eine Apoptose zur Verringerung der Zellzahl, oder einen Rückgang in einen mehr ruhenden Phänotyp der HSC bewirken. Auch Seneszenz

wurde beschrieben (zusammengefasst aus Friedman 2000; Friedman 2003; Friedman 2004; Lee *et al.* 2011).

1.1.2.2 Neuronale Eigenschaften

Da HSC Proteinexpressionsmuster verschiedener Zelltypen zeigen, wird ihr Ursprung sehr kontrovers diskutiert (Geerts 2001). Neben einer Abstammung vom Knochenmark (Baba *et al.* 2004) wird auch eine Abstammung von hämatopoetischen Stammzellen für möglich gehalten (Miyata *et al.* 2008). Darüber hinaus zeigen HSC der Ratte Charakteristika von Stamm- oder Progenitorzellen. Frisch isolierte Zellen exprimieren CD133, welches normalerweise in undifferenzierten Zellen gefunden wird. Ebenso konnte OCT4 nachgewiesen werden (Kordes *et al.* 2007). Dieser Transkriptionsfaktor wird mit Pluripotenz assoziiert und in embryonalen Stammzellen exprimiert (Niwa 2001). Es wurde sogar eine Differenzierung primärer HSC der Ratte in Hepatozyten-ähnliche und Endothelzell-ähnliche Zellen *in vitro* beobachtet (Kordes *et al.* 2007). Zusätzlich zu diesen Eigenschaften exprimieren HSC eine Anzahl intrazellulärer Marker, die aus neuronalen Zellen bekannt sind. Dazu zählen die Intermediärfilamente *glial fibrillaric acidic protein* (GFAP) (Neubauer *et al.* 1996) und Nestin (Niki *et al.* 1999). Des Weiteren exprimieren HSC Synaptophysin. Dieses Protein ist in der Exozytose von Neurotransmittern involviert und stellt einen neuroendokrinen Marker dar (Cassiman *et al.* 1999). Es ist auch eine Expression von Neurotrophinen und ihren korrespondierenden Rezeptoren für HSC bekannt. Bei nicht-neuronalem Gewebe stehen diese Proteine in Verbindung mit Gewebeumbau, Differenzierung, Proliferation und Migration von Zielzellen (Cassiman *et al.* 2001). Eine mögliche Rolle des *nerve growth factor* (NGF) als Neurotrophin und seinem Rezeptor in der myofibroblastischen Differenzierung wurde von Trim *et al.* näher untersucht (Trim *et al.* 2000). NGF übt seine Funktionen über zwei Rezeptoren aus, trkA und p75 NGF-Rezeptor, der zur Familie der Tumor-Nekrose-Rezeptorfamilie (TNF) gehört und neben NGF auch weitere Neurotrophine bindet (Meakin *et al.* 1992). Eine Bindung an den trkA-Rezeptor bewirkt Ausdifferenzierung und Wachstum neuronaler Zellen (Sofroniew *et al.* 2001). Über den p75-Rezeptor induziert NGF neben Zellerhalt und Zellwachstum ebenfalls Apoptose (Roux *et al.* 2002), abhängig von der Expression von trkA. Bei gleichzeitiger Expression beider Rezeptoren agiert der p75-Rezeptor als Co-Faktor für trkA-vermittelte Wege und

antiapoptotisch über den *nuclear factor kappa B* (NFκB). In Abwesenheit von trkA wirkt p75 dagegen über NFκB proapoptotisch (Kaplan *et al.* 2000). In HSC konnte durch die Wirkung von NGF über den p75-Rezeptor Apoptose dieser Zellen in späten Differenzierungsstadien ausgelöst werden. Dies bestätigt die Vermutung einer apoptotischen Wirkungsweise auch in nicht-neuronalen Geweben (Trim *et al.* 2000). Aufgrund dieser beschriebenen neuronalen Eigenschaften der HSC entstand die Annahme, dass HSC von der Neuralleiste abstammen könnten. Diese Hypothese wurde kürzlich widerlegt (Cassiman *et al.* 2006).

1.2 Die Bedeutung von microRNAs

MicroRNAs (miRNAs) sind kleine, nicht-kodierende, einzelsträngige RNA-Moleküle mit hoher evolutionärer Konservierung. Sie verfügen über die Fähigkeit, die Genexpression posttranskriptionell zu beeinflussen und spielen dadurch in der Zellbiologie eine entscheidende Rolle. Bei zellulären Prozessen wie Entwicklung, Differenzierung, Proliferation und Apoptose sind sie von großer Bedeutung (Bartel 2004). Die erste Entdeckung von miRNAs erfolgte im Nematoden *C. elegans*. Hier fanden sich die beiden miRNAs *lin-4* und *let-7* als wichtige Regulatoren von Genen bei der Larvenentwicklung (Lee *et al.* 1993). Man geht heutzutage davon aus, dass mehr als ein Drittel aller humanen Gene durch miRNAs reguliert werden (Lewis *et al.* 2005). Dysregulierungen in der miRNA Expression beeinflussen daher involvierte zelluläre Prozesse und haben auch während chronischer Lebererkrankungen verschiedener Ätiologie eine Bedeutung (Bala *et al.* 2009). Eine Beteiligung von miRNAs an einem veränderten Genexpressionsprofil myofibroblastischer HSC ist für die Forschung der Fibrogenese von besonderem Interesse (Guo *et al.* 2009; Ji *et al.* 2009; Kwiecinski *et al.* 2010; Kwiecinski *et al.* 2011).

1.2.1 Biogenese und physiologische Bedeutung

Die Transkription von miRNAs zu langen primären miRNA-Molekülen (pri-miRNAs) erfolgt hauptsächlich über die RNA-Polymerase II. Diese primären Transkripte enthalten sowohl eine 5`-Cap-Struktur als auch ein 3`-polyadenyliertes Ende. Durch

den Mikroprozessorkomplex, bestehend aus der nuklearen RNase III Drosha und dem Co-Faktor DGCR8, wird im Anschluss die Vorläufer miRNA (pre-miRNA) generiert. Pre-miRNAs werden über Exportin-5 ins Zytoplasma exportiert. Dort erfolgt eine weitere Prozessierung durch die zytoplasmatische RNase III Dicer zu einem ca. 22 Nukleotid langen miRNA-Duplex (Ruby *et al.* 2007). Der funktionelle, reife miRNA-Strang wird dann in den *RNA induced silencing complex* (RISC) als Effektor-Komplex integriert. In Verbindung mit miRNAs ist er auch bekannt als „miRNP“ (*miRNA-containing RNA-induced silencing complex*). Dieser Komplex beinhaltet Familienmitglieder der Argonaut(Ago)-Proteinfamilie. Sie spielen bei der Integration des reifen miRNA-Strangs als auch bei der Spaltung der assoziierten Ziel-mRNA eine wichtige Rolle (Kim 2005). Beim Menschen ist nur von Argonaut 2 eine Endonukleaseaktivität bekannt (Meister *et al.* 2004). Nachdem die reife miRNA in den RISC inkorporiert wurde, kann sie an die 3`-untranslatierte Region (3`-UTR) ihrer Ziel-mRNAs binden. Abhängig von der Komplementarität der miRNA und der mRNA unterscheidet man zwei Mechanismen: (1) eine vollständige komplementäre Bindung resultiert in RNA-Interferenz und dem direkten Transkriptabbau, (2) eine Bindung beschränkt auf die sogenannte *seed*-Region von 6-8 Nukleotiden der miRNA führt zu einer Inhibierung der mRNA-Translation an den Ribosomen (Bartel 2009). Über verschiedene Algorithmen kann für eine miRNA über ihre Bindungsregion eine Vielzahl an möglichen mRNA-Transkripten vorhergesagt werden. Im Umkehrschluss kann eine mRNA von einer breiten Anzahl an miRNA-Spezies angezielt werden (Doench *et al.* 2004; Lewis *et al.* 2005). Die beschriebenen Vorgänge der miRNA-Prozessierung und ihrer Funktion sind in Abbildung 1.3 graphisch dargestellt.

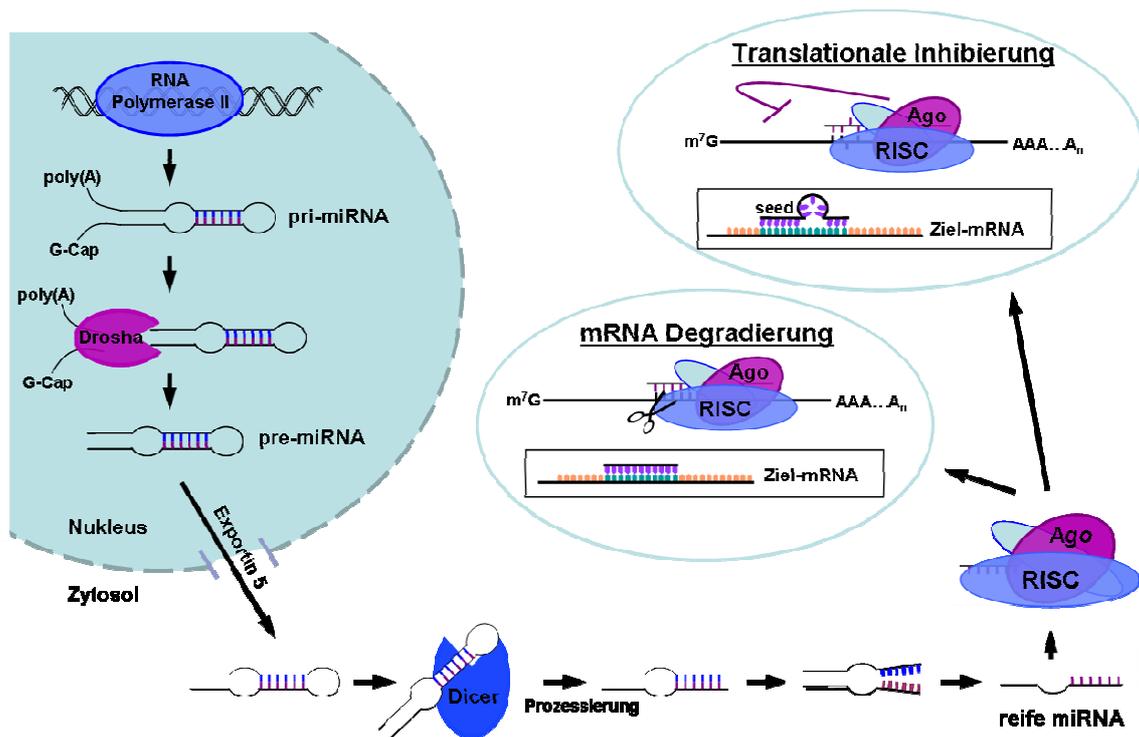


Abb. 1.3: Darstellung der Biogenese und Funktion von miRNAs. Nach Transkription der miRNA-Gene erfolgt eine Prozessierung zur reifen, einzelsträngigen miRNA, die ihre Funktion nach Einbau in den *RNA induced silencing complex* (RISC) hinsichtlich des mRNA-Abbaus oder der translationalen Hemmung der Ziel-mRNA ausüben kann. Zusammengestellt aus Bartel 2004; Bartels *et al.* 2009; Chen 2009.

1.2.2 Methodische Ansätze zur Zieldomänenbestimmung von miRNAs

Für eine Aussage über die genaue physiologische Funktion einer miRNA ist die Kenntnis ihrer Ziel-mRNAs im jeweiligen Gewebe beziehungsweise einem speziellen Zelltyp von unerlässlicher Bedeutung. Aufgrund der Tatsache, dass miRNAs über die kurze Sequenz ihrer *seed*-Region eine große Anzahl an Zieltranskripten angehen können, sind neue Strategien zum Nachweis spezifisch angezielter mRNAs *in vitro* von besonders hohem Interesse.

Zur theoretischen Bestimmung möglicher Zieltranskripte von miRNAs existieren verschiedene Datenbanken, die Berechnungen zur miRNA/mRNA-Interaktion durchführen. Hierzu zählen die frei nutzbaren Internetportale TargetScan (Friedman *et al.* 2009) oder miRanda (Betel *et al.* 2008). Ungeachtet unterschiedlicher Schwerpunkte in den Algorithmen dieser Vorhersage-Methoden sind ihnen folgende Hauptaussagen gemeinsam:

1. Es wird eine komplementäre Paarung nach Watson-Crick der Nukleotide 2-7 der sogenannten *seed*-Region zum 5`-Bereich der miRNA benötigt (Lewis *et al.* 2003). Die meisten miRNAs zeigen in diesen sieben Nukleotiden eine Übereinstimmung mit der Sequenz in der 3`-UTR ihrer Zieltranskripte. Weitere Möglichkeiten sind die Paarung der Nukleotide 2-8 (7mer-m8) oder 2-7 kombiniert mit einem A an Position 1 (7mer-A1). Die höchste Spezifität wird mit einer perfekten Paarung aller 8 Nukleotide erreicht (8mer). Zusätzlich zur *seed*-Übereinstimmung können weitere komplementäre Bereiche bei den Nukleotiden 13-16 in der Sequenz von miRNAs vorhanden sein (*3`-supplementary pairing*), mit Folge einer Verbesserung in der Spezifität und Affinität, sowie kompensatorische Bereiche zwischen Nukleotid 13-17 als Ausgleich bei Fehlpaarungen in der *seed*-Region (*3`-compensatory sites*) (Bartel 2009).
2. Die Bindungsregion der miRNA in der 3`-UTR ist zwischen den verschiedenen Spezies konserviert. Dadurch wird eine biologisch funktionelle Bedeutung unterstrichen (Lewis *et al.* 2005).
3. Zur thermodynamischen Stabilität wird die freie Energie (ΔG) des miRNA/mRNA-Duplex als Parameter miteinbezogen. Je geringer diese ausfällt, desto höher ist die Affinität der Bindung der miRNA an ihr Zieltranskript (Hofacker *et al.* 1994).

Obwohl diese Datenbanken Anhaltspunkte zum Auffinden von Zieltranskripten für miRNAs darstellen, fehlt ihnen dennoch die Sensitivität und Spezifität. Eine funktionell experimentelle Analyse zur Bestätigung einer tatsächlichen Interaktion ist daher unerlässlich (Bartel 2009).

1.2.3 Detektion von Zieldomänen der miRNAs durch *in vitro*-Ansätze

Für eine physiologische Analyse von miRNAs eignen sich *in vitro*-Versuche zur Bestimmung von Abweichungen in den Genexpressionsprofilen nach Veränderung des endogenen miRNA-Gehalts. Dafür werden kommerziell erwerbliche, synthetisch hergestellte, miRNA-nachahmende RNA-Duplex-Moleküle (miRNA Mimics) verwendet, welche nach Einbau in den RISC die funktionellen Eigenschaften der endogenen, reifen miRNA ausüben können. Als Gegenspieler gibt es sequenzgegenläufige, einzelsträngige RNAs zur Hemmung der endogen vorhandenen miRNA (miRNA Inhibitoren). Diese können über Transfektion in eine

gewünschte Zelllinie zur Ausübung ihrer physiologischen Funktion gebracht werden. Die anschließende Analyse der Transkriptprofile kann über Arrays basierend auf einer Hybridisierungs- oder Real-Time-PCR-Technologie durchgeführt werden. Eine sensitivere Möglichkeit bietet darüber hinaus die Methodik der aktuellen Sequenzierungstechniken der „nächsten Generation“ (*Next Generation Sequencing*).

Einen neuen Ansatz zur Analyse der direkten Interaktion zwischen miRNAs und ihren Ziel-mRNAs bietet die Immunopräzipitation mit Hilfe des Argonaut-Proteins als Hauptkomponente des RISC. Das Ago2 Protein bietet sich dafür an, da es ubiquitär exprimiert und in die RISC Aggregate eingebaut wird, die an der Interaktion von miRNA und mRNA beteiligt sind und zur anschließenden Repression des gebundenen Transkripts führen (Kim 2005).

Die gebundene RNA-Population kann dann als cDNA-Bibliothek kloniert und die Plasmid-Klone sequenziert werden. Die neuen PCR- und Sequenzieretechniken (*Next Generation Sequencing*, NGS) erlauben aber eine wesentlich umfangreichere Analyse der cDNA. Die in der heutigen Zeit zur Verfügung stehenden, verschiedenen NGS-Plattformen teilen sich eine gemeinsame technische Eigenschaft. Sie ermöglichen ein massives, paralleles Sequenzieren von einzelnen DNA-Molekülen, die in einer Durchflusszelle räumlich getrennt sind (Voelkerding *et al.* 2009). Dadurch zeigt sich eine enorme Verbesserung zur Sequenzierung der „ersten Generation“, die zuerst von Sanger beschrieben wurde (Maxam *et al.* 1977; Sanger *et al.* 1977). Die Methode der enormen parallelen Sequenzierung überwindet die Limitierung der traditionellen Sanger-Sequenzierung, indem die Notwendigkeit der Elektrophorese zur Auftrennung der Sequenzen hinfällig wird (Aparicio *et al.* 2010). Diese Technologie beinhaltet die Produktion einer adaptermodifizierten, zufälligen Kollektion an DNA-Fragmenten, die klonal amplifiziert wurden. Eine solche klonale Amplifikation kann über eine Emulsions-PCR oder Brückenamplifikation erreicht werden. Illumina stellt dabei mit der klonalen Amplifikation über Brückenamplifikation die bekannteste aller Plattformen dar (Natrajan *et al.* 2011).

1.2.4 Neuronale miRNAs

Über miRNA Expressionsprofile kann die Expression dieser kleinen RNA-Moleküle in verschiedenen Geweben untersucht werden. So wurde eine Reihe von miRNAs

beschrieben, die primär in neuronalen Geweben detektierbar sind (Juhila *et al.* 2011). Im zentralen Nervensystem der Vertebraten wird ihnen unter anderem eine Rolle in der Regulation neuronaler Entwicklung und Differenzierung sowie Ausbildung von Synapsen zugeschrieben (Krichevsky *et al.* 2003; Sempere *et al.* 2004; Fiore *et al.* 2007). Abbildung 1.4 zeigt einen graphischen Ausschnitt einer kürzlichen Studie zur Expression neuronaler miRNAs in zwei Bereichen des Gehirns. Im Hinblick auf die zuvor beschriebenen neuronalen Eigenschaften von HSC mit der Expression neuronaler Marker stellt sich die Frage nach einer möglichen Expression und Funktion neuronaler miRNAs in HSC.

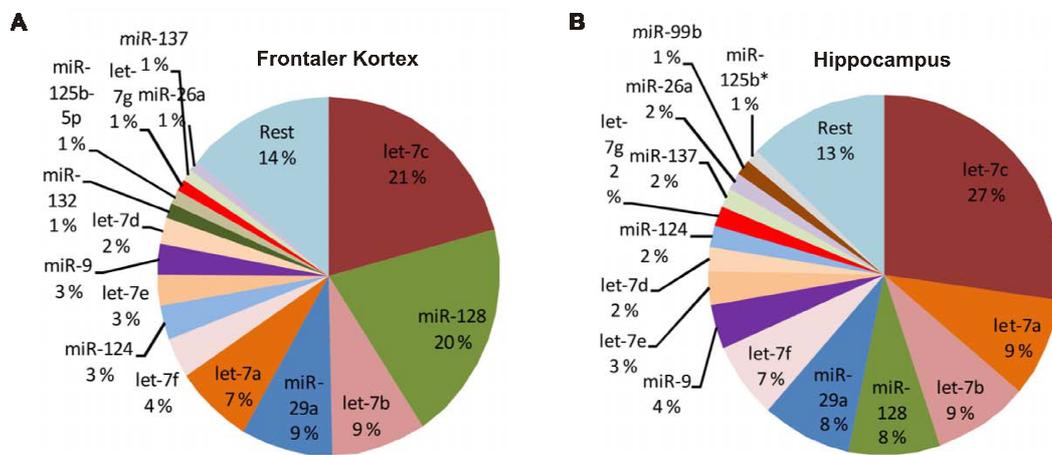


Abb. 1.4: Über miRNA-Sequenzierung (Illumina RNA-Seq) am häufigsten detektierte miRNAs im frontalen Kortex und Hippocampus. Abbildung entnommen aus Juhila *et al.* 2011.

1.3 Ziel dieser Arbeit

Da miRNAs posttranskriptionell die Expression von Genen inhibieren können, spielen sie bei vielen zellulären Prozessen wie Entwicklung und Differenzierung eine entscheidende Rolle. Aufgrund der zentralen Rolle von HSC in der Leberfibrogenese sind Veränderungen in der Genexpression während der myofibroblastischen Transdifferenzierung von großem Interesse. HSC weisen neben den phänotypischen Eigenschaften eines Myofibroblasten auch neuronale Eigenschaften auf. Die myofibroblastische Differenzierung während der Fibrogenese kann *in vitro* an isolierten HSC imitiert werden.

Das Ziel dieser Arbeit war daher, die Rolle der vorwiegend neuronal exprimierten miRNAs miR-9, miR-125b und miR-128 während der myofibroblastischen Transdifferenzierung von HSC zu untersuchen. Zunächst sollte dafür die Isolierungsmethode primärer HSC aus der Ratte etabliert werden. Dabei handelt es sich um ein sehr geeignetes Zellsystem zur Nachahmung der HSC-Transdifferenzierung *in vitro*. Im Anschluss daran sollten HSC auf die Expression von neuronalen miRNAs untersucht werden. Zur Klärung ihrer Funktion bei der Umwandlung der HSC in einen aktivierten Phänotyp sollten drei Ansätze zum Auffinden potenzieller Zieltranskripte der neuronalen miRNAs angegangen werden. Zunächst sollte eine Recherche verschiedener Datenbanken zum Auffinden von Ziel-mRNAs über Algorithmen-Berechnungen durchgeführt werden. In einem zweiten Ansatz sollte das differenzielle Genexpressionsprofil in primären HSC nach Veränderung des endogenen miRNA-Gehalts untersucht werden. Der dritte Versuchsansatz zielte auf die direkte Interaktion der miRNA mit ihrem Zieltranskript *in vitro*, wobei nach Ago2-Immunopräzipitation eine Sequenzierung potenzieller abgefangener mRNAs über NGS durchgeführt werden sollte.

Um gefundene Zieltranskripte neuronaler miRNAs zu validieren, sollten die entsprechenden Zieldomänen auf ihre Bindungsspezifität untersucht und ihre Bedeutung im Kontext der myofibroblastischen Transdifferenzierung geklärt werden.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien und Plastikwaren

Alle Standardchemikalien und -lösungen wurden, sofern nicht anders vermerkt, von folgenden Firmen bezogen: Merck (Darmstadt, Deutschland), Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) und Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Die verwendeten Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen stammten von den Firmen Eppendorf (Hamburg, Deutschland), Biozym (Oldendorf, Deutschland) und Labomedic (Bonn, Deutschland).

Die für die Zellkultur benötigten Plastikwaren wurden von den Firmen Becton-Dickinson Laborware (Lincoln Park, NJ, USA), Nunc (Wiesbaden, Deutschland) und TPP (Trasadingen, Schweiz) bezogen. Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen und die meisten Lösungen wurden vor Gebrauch in einem Autoklaven bei 121 °C, 1.2 bar Druck in feuchter Hitze für 20 min im Varioklav (H+P Labortechnik, Oberschleißheim, Deutschland) autoklaviert. Glas- und Metallwaren wurden 4 h im Heißluftsterilisator Typ T12 (Heraeus Instruments, Düsseldorf, Deutschland) bei 200 °C gebacken.

2.1.2 Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden, sofern nicht anders angegeben, mit vollentsalztem Wasser aus einer Wasseraufbereitungsanlage Elga Purelab (Elga Berkefeld, Celle, Deutschland) angesetzt. Die Zusammensetzungen der verwendeten Puffer und Lösungen sind bei den entsprechenden Methoden angegeben.

2.1.2.1 Puffer und Lösungen für die Bakterienkultur

Für die Bakterienarbeiten wurden folgende Puffer und Lösungen verwendet:

<u>LB-Medium</u>	1 % [w/v]	Trypton (Fluka, Seelze, Deutschland)
	0,5 % [w/v]	Hefeextrakt (Difco, Sparks, USA)
	1 % [w/v]	NaCl
		pH 7,5 mit NaOH
<u>SOC-Medium</u>	2 % [w/v]	Casein-Hydrolysat
	0,5 % [w/v]	Hefeextrakt
	10 mM	NaCl
	2,5 mM	KCl
	10 mM	MgSO ₄
	20 mM	Glukose
<u>Kultur-Medium</u>	LB-Medium mit Antibiotikum-Zusatz	
<u>Antibiotika</u>	Ampicillin	- Stammlösung: 50 mg/ml in H ₂ O - Arbeitskonzentration: 100 µg/ml
	Kanamycin	- Stammlösung: 10 mg/ml in H ₂ O - Arbeitskonzentration: 30 µg/ml
<u>LB-Agar</u>	Kultur-Medium mit 15 g/l Agar (Difco, Sparks, USA)	
<u>2x TSS</u>	20 % [w/v]	PEG 8000 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
	10 % [v/v]	DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
	70 mM	MgCl ₂
		in LB pH 6,5

2.1.2.2 Puffer und Lösungen für die Zellkultur

In der Zellkultur wurden nachstehende Puffer und Lösungen eingesetzt:

<u>1x PBS</u>	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, pH 7,4

Tab. 2.2: Sekundärer Antikörper

Antikörper	Anwendung	Verdünnung	Hersteller
Alexa488-konjugierter Esel anti-Ziege AK	IF	1:200	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)

2.1.4 Oligonukleotide

Die in Tabellen 2.3 und 2.4 aufgeführten Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) bezogen. Ihre Verwendung ist jeweils aus der Tabelle zu entnehmen.

Tabelle 2.3: Oligonukleotide der Spezies Ratte

Verwendung	Name	Sequenz (5' → 3')
Real-Time PCR zur Quantifizierung von mRNA-Transkripten	HPRT-F	GAC CGG TTC TGT CAT GTC G
	HPRT-R	ACC TGG TTC ATC ATC ACT AAT CAC
	Albumin rat-F	GAT TTG GAG AGA GAG CCT TCA A
	Albumin rat-R	CTG CGA ACT CAG CAT TGG
	PECAM rat-F	CTC AGT CGG CTG ACA AGA TG
	PECAM rat-R	AGG CTT GCA TAG AGC AGC AT
	Lin28-F	CAT GCA GAA ACG AAG ATC CA
	Lin28-R	TCC TTG GCA TGG TGG TCT A
	CD163 (ED2)-F	CTG GCG TGA CAT GTT CTG AT
	CD163 (ED2)-R	ATC TCC ACC TCC ACC ATC C
	Klf4-F	CCG TCC TTC TCC ACG TTC
	Klf4-R	GAG TTC CTC TCG CCA ACG
	Ccl2-F	AGC ATC CAC GTG CTG TCT C
	Ccl2-R	GAT CAT CTT GCC AGT GAA TGA G
	Ago2-F	CTC TGA GGG CCA GTT CCA G
	Ago2-R	GCT TTA TGC AGG CCT CTC TG
	Neuregulin1-F	GGC CTA CTG CAA AAC CAA GA
	Neuregulin1-R	TCC GTT CTG ACC GAA GAC TC
	p75 NGF-Rez.-F	GCT GAT GCT GAA TGC GAA G
p75 NGF-Rez.-R	GGT ACA AGG TCT TGC TCT GGA	
Synaptopodin-F	GTA GCC AGG TGA GCC AAG G	
Synaptopodin-R	TCC TTT TCT GTG AAG CTG GTG	
Notch1-F	GGC TGG CTA CAC GGG TCG CAA CTG	
Notch1-R	GCG TTG ACC CCG TCA GTG CAG GAA C	

Real-Time PCR zur Amplifikation der Ccl2-mRNA- Sequenz	Ccl2-mRNA-F	TAG CGC TCG AGG CAG AGA CAC AGA CAG AGG C
	Ccl2-mRNA-R	CGA TCA GCG GCC GCC CCA TTC ATC TCT CAT ACA TTG
Sequen- zierung	M13-F (Topo)	GTA AAA CGA CGG CCAG
	M13-R (Topo)	CAG GAA ACA GCT ATG AC
	psiCHECK-F	GCA ACT ACA ACG CCT ACC TTC GG
	psiCHECK-R	CGA AAA GGT CAC ACT CTG GGG CG

Folgende Oligonukleotide (Tab. 2.4) wurden dimerisiert zur anschließenden Insertion in den psiCHECK™-2 Reportervektor (Promega, Madison, WI, USA):

Tabelle 2.4: Oligonukleotide für Dimerisierung

Nr.	Name	Sequenz (5' → 3')
1	Lin28 miR-9 seed1	TCG AGA CTG CTA GAA ACC AAA GCT TGC
2	Lin28 miR-9 seed2	GGC CGC AAG CTT TGG TTT CTA GCA GTC
3	Lin28 miR-9 seed Mut1	TCG AGA CTG ATA GAA ATC AGA GCT TGC
4	Lin28 miR-9 seed Mut2	GGC CGC AAG CTC TGA TTT CTA TCA GTC
5	Lin28 miR-125b seed1	TCG AGC AGG TAC ATG AGC AAT CTC AGG GAT AGC
6	Lin28 miR-125b seed2	GGC CGC TAT CCC TGA GAT TGC TCA TGT ACC TGC
7	Lin28 miR-125b seed Mut1	TCG AGC AGG TAC ATG AGC AAT CGC AGA GAT AGC
8	Lin28 miR-125b seed Mut2	GGC CGC TAT CTC TGC GAT TGC TCA TGT ACC TGC
9	Lin28 miR-128 seed1	TCG AGC TCA TTC CTG CAC TGT GTT CGC
10	Lin28 miR-128 seed2	GGC CGC GAA CAC AGT GCA GGA ATG AGC
11	Lin28 miR-128 seed Mut1	TCG AGC TCA TTC CTG CGC TGC ATT CGC
12	Lin28 miR-128 seed Mut2	GGC CGC GAA TGC AGC GCA GGA ATG AGC
13	Klf4 miR-128 seed1	TCG AGG TCT GTT ATG CAC TGT GGT TTC GC
14	Klf4 miR-128 seed2	GGC CGC GAA ACC ACA GTG CAT AAC AGA CC
15	Klf4 miR-128 seed Mut1	TCG AGG TCT GTT ATG CGC TAT GGT TTC GC
16	Klf4 miR-128 seed Mut2	GGC CGC GAA ACC ATA GCG CAT AAC AGA CC
17	Notch1 miR-9 seed1	TCG AGC AGG ATG CTG GGG CGA CCA AAG GAG CGC
18	Notch1 miR-9 seed2	GGC CGC GCT CCT TTG GTC GCC CCA GCA TCC TGC
19	Notch1 miR-9 seed Mut1	TCG AGC AGG ATG ATG GGG CGA CTA ACG GAG CGC
20	Notch1 miR-9 seed Mut2	GGC CGC GCT CCG TTA GTC GCC CCA TCA TCC TGC
21	Notch1 miR-125b seed1	TCG AGG CAG CTG CCT ACC TCC TCA GGG CAG CGC
22	Notch1 miR-125b seed2	GGC CGC GCT GCC CTG AGG AGG TAG GCA GCT GCC
23	Notch1 miR-125b seed Mut1	TCG AGG CAG CTG CCT GCC TCC CCA GTG CAG CGC
24	Notch1 miR-125b seed Mut2	GGC CGC GCT GCA CTG GGG AGG CAG GCA GCT GCC
25	Notch1 miR-128 seed1	TCG AGA AGG GCT CCA ATG TGC ACT GTG AAC TGC

26	Notch1 miR-128 seed2	GGC CGC AGT TCA CAG TGC ACA TTG GAG CCC TTC
27	Notch1 miR-128 seed Mut1	TCG AGA AGG GCT CTA ATG TGC ATT GCG AAC TGC
28	Notch1 miR-128 seed Mut2	GGC CGC AGT TCG CAA TGC ACA TTA GAG CCC TTC

Für den Nachweis von miRNA-Transkripten wurden die Primer der folgenden Tabelle 2.5 in die quantitative Real-Time PCR eingesetzt:

Tabelle 2.5: Primer zur Detektion von miRNA

Name	Firma
miR-9	Qiagen, Hilden, Deutschland
miR-125b	Qiagen, Hilden, Deutschland
miR-128	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNU6B	Qiagen, Hilden, Deutschland
Universal Primer (UP)	Qiagen, Hilden, Deutschland

Zur RNA-Interferenz (RNAi) wurden die miRNA Mimics und Inhibitoren in nachfolgender Tabelle verwendet:

Tabelle 2.6: Primer zur RNA-Interferenz und Kontrolle

Name	Firma
miR-9 Mimic	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
miR-9 Inhibitor	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
miR-125b Mimic	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
miR-125b Inhibitor	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
miR-128 Mimic	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
miR-128 Inhibitor	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Negative Kontroll-siRNA (nk-siRNA)	Applied Biosystems Ambion, Carlsbad, CA, USA

2.1.5 Vektoren und Plasmidkonstrukte

Es wurden folgende Plasmide und Vektoren verwendet:

Tabelle 2.7: Plasmide und Vektoren

Name	Firma
psiCHECK™ - 2	Promega, Madison, WI, USA
TOPO 2.1	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

	Verwendung
psiCHECK-LIN28r-seed-miR-9	Insert: LIN28 seed-Region für miR-9
psiCHECK-LIN28r-seed-Mutante-miR-9	Insert: LIN28 seed-Region mit 2 Mutationen für miR-9
psiCHECK-LIN28r-seed-miR-125b	Insert: LIN28 seed-Region für miR-125b
psiCHECK-LIN28r-seed-Mutante-miR-125b	Insert: LIN28 seed-Region mit 2 Mutationen für miR-125b
psiCHECK-LIN28r-seed-miR-128	Insert: LIN28 seed-Region für miR-128
psiCHECK-LIN28r-seed-Mutante-miR-128	Insert: LIN28 seed-Region mit 2 Mutationen für miR-128
psiCHECK-KLF4r-seed-miR-128	Insert: KLF4 seed-Region für miR-128
psiCHECK-KLF4r-seed-Mutante-miR-128	Insert: KLF4 seed-Region mit 2 Mutationen für miR-128
psiCHECK-CCL2r-mRNA-miR-128	Insert: komplette mRNA-Sequenz CCL2
psiCHECK-Notch1r-seed-miR-9	Insert: Notch1 seed-Region für miR-9
psiCHECK-Notch1r-seed-Mutante-miR-9	Insert: Notch1 seed-Region mit 2 Mutationen für miR-9
psiCHECK-Notch1r-seed-miR-125b	Insert: Notch1 seed-Region für miR-125b
psiCHECK-Notch1r-seed-Mutante-miR-125b	Insert: Notch1 seed-Region mit 2 Mutationen für miR-125b
psiCHECK-Notch1r-seed-miR-128	Insert: Notch1 seed-Region für miR-128
psiCHECK-Notch1r-seed-Mutante-miR-128	Insert: Notch1 seed-Region mit 2 Mutationen für miR-128
TOPO 2.1	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

r = Ratte

2.1.6 Bakterienstamm und Zelllinien

Für die mikrobiologischen Methoden wurde der Genotyp des *Escherichia coli* (*E.coli*) Stamm DH5 α verwendet: F-f80/lacZDM15 D(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 tonA

Des Weiteren wurde innerhalb dieser Arbeit mit folgenden Zelllinien gearbeitet:

Tabelle 2.8: Zelllinien

Zelllinie	Typ	Spezies
HSC-T6	immortalisierte hepatische Sternzellen (Vogel <i>et al.</i> 2000)	Ratte
HEK-293	humane embryonale Nierenzelllinie (Graham <i>et al.</i> 1977)	Mensch

2.1.7 Software

Für diese Arbeit wurden die in Tabelle 2.9 aufgelisteten Software-Programme verwendet.

Tabelle 2.9: Software

Bezeichnung	Version	Hersteller
Redasoft Plasmid	1.1	Redasoft (Toronto, Kanada)
CLC Sequence Viewer	6	CLC bio (Aarhus, Dänemark)
DNASIS®MAX	2.0	Hitachi Software Engineering (Tokio, Japan)
NetPrimer	http://www.premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch/netprlaunch.html	Premier Biosoft (Palo Alto, CA, USA)
MxPro	4.00	Stratagene (La Jolla, CA, USA)
CFX Manager	1.6	BioRad (München, Deutschland)
Cell^P	2.5	Olympus Soft Imaging Solutions (Münster, Deutschland)
SPSS Statistic	17.0	SPSS Software (München, Deutschland)
MikroWin 2000	4.39	Mikrotek (Overath, Deutschland)
Partek Genomics Suite	6.6	Partek Incorporated (St. Louis, MO, USA)

2.2 Zellkultur

Die Zellkulturarbeiten fanden unter sterilen Bedingungen unter einer Sterilwerkbank (BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland) statt. Sämtliche Lösungen sowie Glas- und Plastikwaren wurden durch Heißluftsterilisation oder Autoklavierung sterilisiert und mit 70 % Isopropanol desinfiziert.

2.2.1 Isolierung primärer HSC aus der Ratte

Bei der Isolierung primärer HSC aus der Ratte (siehe Abb. 2.1) fanden die Arbeiten bis zur Entnahme der Leber aus dem Tier außerhalb der Sterilwerkbank mit sterilen Gerätschaften statt.

2.2.1.1 Versuchstiere und Tierhaltung

Bei den verwendeten Versuchstieren zur Isolierung primärer HSC handelte es sich um männliche „*retired breeder*“ Wistar-Ratten mit einem Gewicht zwischen 400–600 g. Sie wurden von der Firma Harlan Winkelmann (Borchen, Deutschland) bezogen. Die Haltung der Tiere erfolgte in der Tierhaltung der Physiologie mit Umzug in die Experimentelle Medizin.

2.2.1.2 Perfusion und Dichtegradienten-Zentrifugation

Zunächst wurde die Ratte mittels Isofluran und anschließend mit einer intraperitoneal applizierten Mischung aus 60 mg/kg Ketamin und 7,5 mg/kg Xylazin betäubt. Nach Öffnung des Abdomens wurde ein Zugang in die Pfortader gelegt und die Perfusion mit 200 ml der 37 °C warmen Perfusionslösung konnte erfolgen. Um eine Schädigung der Leber durch Überdruck zu verhindern wurde die Vena Cava direkt nach Beginn der Perfusion durchtrennt und ein Auslaufen der Perfusionslösung zum Ausspülen der Blutzellen ermöglicht. Im Anschluss folgte die Perfusion mit 150 ml der 37 °C warmen Enzymlösung I zum Aufschluss des Zellverbands der Leber. Nach Entnahme der Leber aus dem Tier wurde die Bindegewebskapsel wenn möglich entfernt und ein mechanisches „Ausstreichen“ der Leber durchgeführt. Für eine

weitere Lyse des Gewebes erfolgte eine Inkubation der Leber in 100 ml Enzymlösung II für 4-10 min bei 37 °C und 200 UpM.

Zur Trennung der Zellsuspension von noch vorhandenen Geweberesten wurde das Gemisch über ein 100 µm-Nylonnetz gegeben und die Enzyme durch Zugabe von 100 ml eines BSA-Puffers gestoppt. Zur Abtrennung der Parenchymzellen als Pellet wurde die Zellsuspension für 3-4 min bei 50 x g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand gesammelt. Danach wurden die Zellpellets erneut in BSA-Puffer resuspendiert und unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Die vereinigten Überstände wurden nun mit weiteren 100 ml BSA-Puffer versetzt und zum Erhalt der mesenchymalen Zellen für 10 min bei 350 x g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets nach erneuter Resuspension in BSA-Puffer zu halber Anzahl vereinigt und nochmals zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands wurden die Pellets über Aufnahme in ca. 30 ml BSA-Puffer vereinigt. Für die Aufreinigung der HSC aus dem mesenchymalen Zellgemisch folgte eine Dichtegradienten-Zentrifugation über einen 40 %igen OptiPrep-Gradienten. Hierbei wurden die resuspendierten Zellen zum Erhalt eines 11 %igen Gradienten mit entsprechendem Volumen an 40 %igem OptiPrep gemischt, auf vier 15 ml Falcons verteilt und mit 3 ml BSA-Puffer überschichtet. Die Auftrennung im Gradienten erfolgte für 20 min bei 950 x g und 4 °C (ohne Bremse). Anschließend konnten die HSC von der 11 %igen Schicht abgenommen werden. Zur Entfernung des OptiPreps wurden die Zellen mit RPMI-Kulturmedium versetzt mit 20 % FCS (nicht hitzeinaktiviert), 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin über Zentrifugation gewaschen. Das Pellet wurde dann in 10 ml dieses Kulturmediums aufgenommen und die Zellen ausgezählt (siehe 2.2.4). Das RPMI-Kulturmedium wurde für die Kultivierung der primären Zellen alle 24 h erneuert und ab Tag 1 nach der Isolierung auf 10 % FCS (nicht hitzeinaktiviert) reduziert.

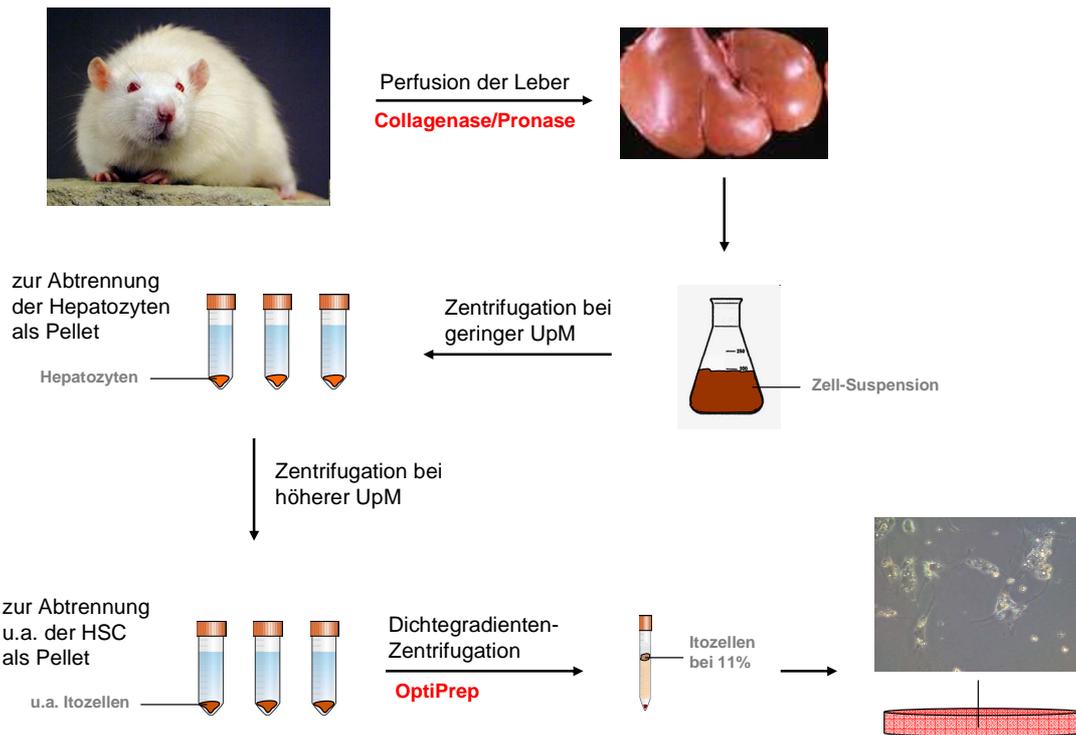


Abb. 2.1: Itozellisolierung aus der Ratte (siehe 2.2.1). Mit Hilfe eines Collagenase/Pronase-Enzymgemischs wurde das Lebergewebe zunächst aufgeschlossen. Über weitere Zentrifugationsschritte fand eine Auftrennung der Zellen statt, wobei HSC schließlich über eine Dichtegradienten-Zentrifugation isoliert wurden.

Nach dem gleichen Protokoll wurden humane HSC aus Teilresektaten menschlicher Leber isoliert. Hierbei erfolgte lediglich die Perfusion der Resektate durch frei zugängliche Gefäße an den Schnittflächen.

GBSS + Ca²⁺

137 mM	NaCl
5 mM	Glukose
0,5 mM	MgSO ₄
1 mM	MgCl ₂
2,7 mM	NaHCO ₃
0,1 mM	KH ₂ PO ₄
5 mM	KCl
1,5 mM	CaCl ₂
0,8 mM	Na ₂ HPO ₄
5 mM	HEPES (pH 7,4)

<u>GBSS - Ca²⁺</u>	137 mM	NaCl
	5 mM	Glukose
	0,5 mM	MgSO ₄
	1 mM	MgCl ₂
	0,8 mM	Na ₂ HPO ₄
	0,1 mM	KH ₂ PO ₄
	5 mM	KCl
	2,7 mM	NaHCO ₃
	5 mM	HEPES (pH 7,4)
<u>Perfusionslösung</u>	200 ml	GBSS - Ca ²⁺
	25 mM	EGTA
<u>Enzymlösung I</u>	150 ml	GBSS + Ca ²⁺
	55 mg	Collagenase A (Roche, Basel, Schweiz)
	70 mg	Pronase E (Merck, Deutschland)
		DNase (Roche, Basel, Schweiz)
<u>Enzymlösung II</u>	100 ml	GBSS + Ca ²⁺
	35 mg	Collagenase A (Roche, Basel, Schweiz)
	35 mg	Pronase E (Merck, Darmstadt, Deutschland)
		DNase (Roche, Basel, Schweiz)
<u>BSA-Puffer</u>	500 ml	GBSS + Ca ²⁺
	1,25 g	BSA
<u>OptiPrep 40 %</u>	60 %	OptiPrep
		verdünnt in 1x HBSS (2:3)
<u>1x HBSS</u>	100 ml	10x HBSS (Gibco, Karlsruhe, Deutschland)
	ad 1000 ml	dH ₂ O

2.2.2 Kultivierung von immortalisierten Zelllinien

Alle Zelllinien wurden, falls nicht anders aufgeführt, in DMEM, versetzt mit 10 % FCS, in einem Begasungsbrutschrank (HERAcell, Hanau, Deutschland) bei 37 °C, 100 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ kultiviert. Neben einem regelmäßigen Medienwechsel wurden die Zellen bei einer Konfluenz von mehr als 80 % passagiert.

2.2.3 Passagieren von Zellen

Zum Passagieren der Zellen wurde zunächst das Kulturmedium abgenommen und zum Entfernen von Serumresten die Zellen mit 1x PBS gewaschen. Durch Zugabe weniger Tropfen einer Trypsinlösung wurden adhärente Zellen für 2-5 Minuten bei 37 °C inkubiert, um sie von den Kulturplatten abzulösen. Nach sichtbarem Ablösen der Zellen wurde die Trypsinwirkung durch Zugabe von Kulturmedium gestoppt, die Zellen resuspendiert und entsprechend einer gewünschten Dichte auf neue Zellkulturplatten übertragen.

2.2.4 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Von der Zellsuspension wurde ein definiertes Volumen steril aliquotiert und mit entsprechender Menge Trypanblaulösung (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 1:1 vermischt. Diese Lösung färbt abgestorbene Zellen blau an. Die Auszählung aller nicht gefärbten Zellen erfolgte aus vier Großquadraten der Zählkammer, die jeweils 0,1 µl entsprechen.

2.2.5 Transfektion von Zellen

Für die Transfektion von Zelllinien wurden diese am Vortag trypsiniert und in entsprechender Zellzahl für eine Konfluenz von 80-90 % am Tag der Transfektion ausgesät. Die Durchführung der Transfektion mit Lipofectamin 2000 in OptiMem erfolgte nach Herstellerangaben (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Nach 4-6 Stunden fand ein Medienwechsel auf das ursprüngliche Kulturmedium statt, sofern nicht anders angegeben.

Im Falle der Transfektion primärer HSC wurden die Zellen nicht vor der Transfektion trypsiniert. Allerdings erfolgte am Vortag ein Wechsel auf Kulturmedium ohne Antibiotika.

2.2.6 Kryokonservierung von Zellen

Zur Aufbewahrung von Zellen, ohne sie in Kultur zu halten, können diese in flüssigem Stickstoff eingefroren werden. Hierzu wurden die Zellen bis zu einer Konfluenz von 80-90 % kultiviert, mit 1x PBS gewaschen und trypsiniert. Nach Resuspension der Zellen in Kulturmedium wurden sie für 5 min bei 900 UpM in 50 ml Falcons abzentrifugiert (Beckman GPR Zentrifuge, Krefeld, Deutschland) und nach Abnahme des Überstands erneut in 500 µl Kulturmedium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in ein 1,8 ml-Kryoröhrchen überführt und mit gleichem Volumen (1:1) DMEM + 20 % DMSO versetzt. Das Einfrieren der Zellen erfolgte über eine langsame Temperatursenkung mit Hilfe einer Schaumstoffisolierung für 24 h bei -70 °C. Die finale Kryokonservierung erfolgte danach in flüssigem Stickstoff.

Um kryokonservierte Zellen wieder aufzutauen, wurden sie möglichst schnell im Wasserbad bei 37 °C erwärmt. Der aufgetaute Inhalt wurde in eine Kulturplatte mit 9 ml vorbereitetem, 37 °C warmen Kulturmedium überführt. Zur Entfernung noch vorhandener DMSO-Reste erfolgte ein erneuter Medienwechsel am Folgetag.

2.2.7 Immunzytochemische Färbungen

Primäre HSC wurden für Färbungen zu 2×10^5 Zellen auf einer 24-well-Kulturplatte ausgesät und bis zu verschiedenen Zeitpunkten in der myofibroblastischen Transdifferenzierung inkubiert. Die Zellen wurden dann nach Abnahme des Mediums zweimal mit 1x PBS gewaschen und mit einem eiskalten Gemisch aus Methanol/Aceton (1:1 [v/v]) für 10 min bei -20 °C fixiert. Nach Abnahme und Trocknung erfolgte die Lagerung bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C.

Vor Beginn der immunzytochemischen Färbungen wurden die fixierten Zellen mit einer 5 %igen Milchpulverlösung in PBST (0,25 % Tween-20) für 30 min bei RT geblockt. Nach 3x Waschen mit 1x PBS wurden die verwendeten Antikörper wie in Tabelle 2.1 aufgeführt in Milchpulverlösung verdünnt, auf die Zellen gegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend erfolgten drei weitere Waschschr

und für primäre Antikörper mit fehlender Fluoreszenzmarkierung wurden die Zellen nochmals für 2 h mit einem sekundären fluoreszenzmarkierten Antikörper (siehe Tab. 2.2) in Milchpulverlösung versetzt. Daraufhin wurde noch dreimal mit 1x PBS gewaschen und eine weitere Inkubation der Zellen für 10 min bei RT mit einer DAPI-Lösung (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) zur Anfärbung der Zellkerne (Nukleinsäuren) durchgeführt. Die angefärbten Zellen wurden mit 1x PBS überschichtet bei 4 °C gelagert.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 RNA-Techniken

2.3.1.1 Präparation von Gesamt-RNA aus Gewebe

Zunächst wurde ca. 1 g des Gewebematerials in Trizol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) überführt und unter Verwendung eines Precellis Shredders (PegLab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland) sowie zugefügten Precellis Keramikkügelchen in zwei Zyklen von je 20 Sekunden mit 5 Sekunden Pause bei 6500 Schwingungen homogenisiert. Anschließend erfolgte die RNA-Isolierung nach Protokoll von Invitrogen. Die RNA wurde mit 50 µl RNase-freiem Wasser eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C gelagert.

2.3.1.2 Präparation von Gesamt-RNA aus Zellen

Die kultivierten Zellen wurden mit 1x PBS gewaschen und im Falle eines 6-wells mit 400 µl und bei einer 10 cm-Platte mit 1 ml Trizol Reagent lysiert. Nach Abschaben der Zellen von der Zellkulturplatte wurden diese in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Isolierung der RNA erfolgte nach Angaben des Protokolls von Invitrogen. Nach Aufnahme in 30 µl RNase-freiem Wasser wurde die RNA bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C gelagert.

2.3.1.3 Qualitätskontrolle und Konzentrationsbestimmung von RNA

Sowohl RNA- als auch DNA-Konzentrationen wurden mittels eines Nanodrop ND-1000 Spektralphotometers (Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland) bestimmt. Eine mögliche Proteinverunreinigung konnte dabei über das Absorptionsverhältnis OD_{260}/OD_{280} angezeigt werden. Bei einem Quotienten zwischen 1,8 und 2,0 handelt es sich um reine Nukleinsäurelösungen. Des Weiteren wurde die Integrität der RNA im Falle von Proben zur Verwendung für Array- oder *Next Generation Sequencing*-Experimente auf einen RNA Chip aufgetragen, bei welchem die Nukleinsäure-Auftrennung auf einer Mikrofluidik-Technologie basiert und eine Angabe zur RNA-Integrität (RIN) gibt (Kit von Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Analysiert wurde dieser Chip auf dem 2100 Bioanalyzer der Firma Agilent.

2.3.1.4 Reverse Transkription zur Bestimmung von mRNA und miRNA

Zur Analyse von mRNA-Transkripten mittels Real-Time PCR wurde die RNA mit Hilfe von Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Abhängig von der Isolierungsmethode und Probenqualität wurde entweder das „High Capacity cDNA Archive Kit“ der Firma Applied Biosystems (Carlsbad, CA, USA) oder das „miScript Reverse Transcription Kit“ (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die reverse Transkription zur Detektion von miRNAs wurde ebenfalls mit dem Qiagen-Kit durchgeführt. Durch den Mix an enthaltener poly(A) Polymerase und Reverser Transkriptase wird die miRNA zunächst polyadenyliert und im Anschluss über einen oligo-dT Primer mit angehängter Universalsequenz am 5'-Ende revers transkribiert, während mRNA-Transkripte gleichzeitig über oligo-dT und random Primer in cDNA umgeschrieben werden.

Aufgrund einer erhöhten Sensitivität wurde für miR-9 ebenfalls die TaqMan[®]-Methode angewandt. Die reverse Transkription erfolgte mit dem „TaqMan[®] MicroRNA Reverse Transcription Kit“ mit spezifischem RT-Primer (reverse Transkription) von Applied Biosystems (Carlsbad, CA, USA) nach Angaben des Herstellers. Bei dieser Strategie wird für die Umschreibung von miRNA in cDNA ein stem-loop Primer eingesetzt.

2.3.1.5 Real-Time PCR

Bei der Auswertung der Real-Time PCR ist der Ct-Wert (*cycle threshold* = Schwellenwert) maßgeblich. Dieser beschreibt den Zyklus, bei dem erstmalig ein Anstieg der Reporter-Fluoreszenz über der Hintergrund-Fluoreszenz zu verzeichnen ist. Der Ct-Wert kann zur Berechnung über die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode (Livak *et al.* 2001) verwendet werden oder mit einer Standardreihe bekannter Konzentration zur Bestimmung des relativen Transkriptgehaltes verglichen werden.

Bei der Erstellung von Standardreihen wurden die entsprechenden Referenzproben (Gehirn-Gewebe der Ratte, Leber-Gewebe der Ratte, Ratten-Fötus 10 Tage, HSC-T6 Zellen) in einer Verdünnungsreihe zwischen 0,37-25 ng eingesetzt. Zur Bestimmung von miRNA-Level wurde gegen das Molekül RNU6B und von mRNA-Transkripten gegen die Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) als sogenannte *housekeeping*- oder Referenzgene normalisiert.

Die Real-Time PCR wurde generell mit dem DNA interkalierenden Cyanin-Farbstoff SYBR[®]Green (SSO Fast[™] Eva Green Supermix, BioRad, München, Deutschland) durchgeführt. Aufgrund der Bindung dieses Farbstoffs an auch unspezifische doppelsträngige PCR-Produkte wurde eine Schmelzkurvenanalyse im Anschluss der PCR zur Überprüfung eines einheitlichen Amplifikats durchgeführt. Jede Probe wurde im Triplet auf dem Mx3000P der Firma Stratagene (La Jolla, CA, USA) oder auf dem C1000[™] Thermal Cycler von BioRad (München, Deutschland) gemessen.

<u>Reaktionsansatz</u>	1,0 μl cDNA (2 ng bei miRNA-Transkripten) (10 ng bei mRNA-Transkripten)
	0,8 μl <i>forward</i> Primer [10 μM]
	0,8 μl <i>reverse</i> Primer [10 μM]
	10,0 μl SYBR [®] Green Mix
	ad 20,0 μl H ₂ O

Temperaturprofil für miRNA-Transkripte

95 °C	10 min	
95 °C	15 sek	← 50 x
56-69 °C	30 sek	
72 °C	45 sek	
50-95 °C	Schmelzkurve	

Temperaturprofil für mRNA-Transkripte

95 °C	15 min	
95 °C	15 sek	← 50 x
55 °C	30 sek	
72 °C	45 sek	
50-95 °C	Schmelzkurve	

Im Falle der miR-9 wurde die Methode der Real-Time PCR auf TaqMan[®]-Sonden umgestellt. Diese fluoreszenzmarkierte Sonde ist sequenzspezifisch und erlaubt dadurch eine hoch sensitive Detektion. Eine Schmelzkurve im Anschluss an die PCR ist hier nicht erforderlich. In diesem Ansatz wurde der 5 Prime Master Mix (5 Prime, Hamburg, Deutschland) verwendet. Von der cDNA wurden auf einen Gesamtansatz von 15 µl jeweils 3 µl [10 ng] eingesetzt. Normalisiert wurde hierbei gegen den Ansatz mit einer Sonde für RNU6B.

Reaktionsansatz

3 µl	cDNA
0,9 µl	spezifischer Primer-Sonden-Mix
7,5 µl	5 Prime Master Mix
ad 15,0 µl	H ₂ O

Temperaturprofil

95 °C	10 min	
95 °C	15 sek	← 55 x
60 °C	60 sek	

2.3.1.6 Microarray-Analyse

Für die Durchführung eines GeneChip[®] Microarrays (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) wurden jeweils 1 µg Gesamt-RNA von primären HSC transfiziert mit miR-128 Mimic oder Inhibitor an Kulturtag 3 und 7 als Auftrag zum Gene Mapping Center in Berlin geschickt und die Proben auf einem GeneChip[®] Rat Gene 1.0 ST Array hybridisiert, wobei 27.342 Gene über diesen Array abgedeckt werden. Zuvor wurde die RNA-Qualität über einen RNA-Chip (siehe 2.3.1.3) überprüft. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Partek Genomic Suite Programms 6.6 (Partek Incorporated, St. Louis, MO, USA).

2.3.2 DNA-Techniken

2.3.2.1 Restriktion von DNA

Die innerhalb dieser Arbeit für Klonierungen verwendeten Restriktionsenzyme wurden von den Firmen New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland) und Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) erworben. Pro µg DNA wurde 1 Unit Enzym verwendet, wobei die enzymatische Hydrolyse von Plasmid-DNA nach Angaben des Herstellers durchgeführt wurde.

2.3.2.2 Gelelektrophorese nativer DNA

Die Gelelektrophorese wurde zur Analyse von DNA und Isolierung von DNA-Fragmenten angewendet. Die Auftrennung der DNA erfolgte über 1-3 %ige Agarosegele. Die entsprechende Menge an Agarose wurde in 1x TAE-Puffer durch Erhitzen gelöst, nach Abkühlung auf 50-60 °C mit 6 µl Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) versetzt und in einen Gelschlitten gegossen. Nach Erstarrung des Agarosegels zu einer homogenen Gelmatrix wurde der Schlitten in eine Elektrophoresekammer gesetzt und mit 1x TAE-Puffer überschichtet. Die DNA-Proben wurden mit 1/6 Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die Auftrennung erfolgte bei 100 Volt. Mittels UV-Bestrahlung wurden die aufgetrennten DNA-Fragmente durch die Fluoreszenz des Farbstoffs auf dem Gel visualisiert. Über

Marker (100 bp und 1 kb, Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) konnten die DNA-Fragmente in ihrer Größe abgeglichen werden.

1x TAE 40 mM Tris
 1,25 mM EDTA
 pH 8,0 mit HCl

2.3.2.3 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die DNA wurde für eine weitere Verwendung wieder aus dem Gel isoliert. Das entsprechende DNA-Fragment wurde aus dem präparativen Agarosegel ausgeschnitten und unter Verwendung des „Perfectprep® Gel Cleanup Kit“ (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) nach Herstellerprotokoll extrahiert.

2.3.2.4 DNA-Ligation

Für die Ligation von DNA-Fragmenten in einen Plasmidvektor über kovalente Verknüpfung wurde das Enzym T₄-Ligase der Firma Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) eingesetzt. Das Verhältnis von DNA-Insert zum Plasmidvektor betrug hierbei 3:1. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.3.2.5 Dimerisierung von Oligonukleotiden

Zur Dimerisierung komplementärer Oligonukleotide wurden diese in gleicher Konzentration gemischt und unter Zugabe desselben Volumens an Puffer für 10 min auf 95 °C erhitzt. Im Anschluss erfolgte eine langsame Abkühlung auf Raumtemperatur.

Dimerisierungs-Puffer 50 mM TRIS pH 7,4
 300 mM NaCl
 2 mM EDTA

2.3.2.6 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Die Plasmidpräparation zur analytischen Untersuchung erfolgte nach alkalischer Lyse. Zunächst wurde eine Bakterienkolonie in 3 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 UpM auf einem Bakterienschüttler (Gerhardt Thermoshake, Königswinter, Deutschland) kultiviert. Nach Überführung von 2 ml in ein Eppendorf-Gefäß wurden die Bakterien für 2 min bei 14000 Upm abzentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5417C, Hamburg, Deutschland) und mit 150 µl eisgekühltem Puffer 1 (Macherey Nagel, Düren Deutschland) resuspendiert. Durch weitere Zugabe von 150 µl Puffer 2 erfolgte die alkalische Lyse für 5 min bei Raumtemperatur. Zur Neutralisation und Ausfällung von Proteinen und genomischer DNA sorgte die Zugabe desselben Volumens von Puffer 3 mit anschließender Inkubation für 5 min auf Eis. Nach Zentrifugation bei 14000 UpM wurde die Plasmid-DNA im Überstand in ein neues Gefäß überführt, mit gleichem Volumen 100 %igem Isopropanol in einem weiteren Zentrifugationsschritt gefällt und in 2-fachem Volumen 70 %igem Ethanol über erneute Zentrifugation gewaschen. Anschließend wurde das Pellet getrocknet und in 30 µl DNase-freiem Wasser gelöst.

Zur Isolierung größerer Mengen an Plasmid-DNA wurde das Kit „NucleoBond PC 100“ von Macherey Nagel (Düren, Deutschland) entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet.

2.3.2.7 Phenol-Extraktion und Präzipitation nach Maniatis

Mittels Phenol-Chloroform unter Verwendung des „Phase-Lock Gel Heavy 2,0 Kit“ (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) nach Herstellerangaben erfolgte eine Aufreinigung von DNA. Die Fällung der DNA erfolgte nach Maniatis (Sambrook *et al.* 1989). Bei weiterer Verwendung der Plasmid-DNA für Transfektionen wurde die Präzipitation unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

2.3.2.8 Herstellung von *Ccl2*-cDNA zur Klonierung durch die Polymerase-Ketten-Reaktion

Zur Herstellung von *Ccl2*-cDNA mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wurden 50 ng cDNA aus Gesamt-RNA der Ratte eingesetzt. Für die PCR wurden jeweils 0,4 µM der entsprechenden Primer aus Tabelle 2.3 eingesetzt. Zur Amplifikationsreaktion in einem Peltier Thermal Cycler PTC 200 (MJ Research, MA, USA) wurde der Advantage 2 Polymerase Mix (Clontech, Mountain View, CA USA) nach Angaben des Herstellers und folgendem Temperaturprofil verwendet:

<u>Temperaturprofil</u>	95 °C	1 min	
	95 °C	30 sek	← 10x
	58 °C	30 sek	
	68 °C	1 min	
	95 °C	30 sek	
	68 °C	1 min	← 25x
	68 °C	1 min	

2.3.2.9 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierreaktion von Plasmid-DNA und PCR-Amplifikaten erfolgte nach der Didesoxymethode nach Sanger (Sanger *et al.* 1977) unter Verwendung des „BigDye Terminator-Sequencing Kit 3.1“ (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) nach Herstellerangaben. Die PCR wurde in einem Peltier Thermal Cycler PTC 200 (MJ Research, MA, USA) durchgeführt.

<u>Sequenzierungsansatz</u>	4,5 µl	Sequenzierungs-Puffer
	0,5 µl	BigDye Terminator Kit
	5 pmol	Primer
	150-300 ng	DNA
	ad 20 µl	H ₂ O

<u>Sequenzierprogramm</u>	96 °C	10 min	
	95 °C	30 sek	← 45 x
	50 °C	15 sek	
	60 °C	4 min	
	60 °C	10 min	

Die Sequenzierreaktionen wurden im Auftrag vom Institut für CCG durch Kapillarelektrophorese aufgetrennt und die erhaltenen Signalprofile anschließend durch den CLC Sequence Viewer ausgewertet.

2.4 Mikrobiologische Methoden zur Klonierung

2.4.1 Bakterienkultur

Bei den mikrobiologischen Arbeiten mit *E.coli* wurde unter einer Sterilwerkbank (Heto-Holten, Allerød, Dänemark) gearbeitet. Die Geräte und Lösungen wurden vor Gebrauch autoklaviert, sterilfiltriert, mit 70 % Alkohol desinfiziert oder abgeflämmt.

2.4.2 Herstellung kompetenter *E.coli* zur Transformation

Die Herstellung kompetenter *E.coli* erfordert eine spezielle Behandlung der Bakterienzellen. Dazu wurden 10 ml LB-Medium über Nacht mit DH-5 α (BJ 5183) *E.coli* Bakterien bei 37 °C und 200 UpM in einem Bakterien-schüttler (Gerhardt, Königswinter, Deutschland) inkubiert. Von dieser Kultur wurden am Folgetag 200 μ l in 100 ml LB-Medium überführt und so lange unter gleichen Bedingungen im Bakterien-schüttler inkubiert, bis sie eine logarithmische Wachstumsphase $OD_{600} = 0,4$ erreicht hatten. Die Bakterien wurden über Zentrifugation bei 5000 UpM für 15 min bei 4 °C (Modell J2-21, Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland) pelletiert, in 5 ml LB-Medium resuspendiert und nach Zugabe von gleichem Volumen 2x TSS zu 150 μ l aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur weiteren Verwendung wurden die kompetenten Bakterien bei -70 °C gelagert.

2.4.3 Transformation von *E.coli*

Zur Durchführung der Transformation wurden 150 µl der kompetenten Bakterien auf Eis aufgetaut und nach Zugabe von 10 µl eines Ligationsansatzes (siehe 2.3.2.4) oder bis zu 10 ng Plasmid-DNA für 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss erfolgten für 2 min ein Hitzeschock bei 42 °C und die Zugabe von 600 µl SOC-Medium. Die Bakterien wurden für eine Stunde zur Entwicklung der Antibiotikum-Resistenz bei 37 °C und 200 UpM im Bakterienrührer inkubiert. Daraufhin wurden von der Bakterienkultur 100-600 µl auf einer entsprechend antibiotikumhaltigen LB-Agarplatte ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.5.1 Dualer Luziferase-Reporterassay

Für die Durchführung des dualen Luziferase-Reporterassays wurde das „Renilla- bzw. Beetle-Juice Kit“ der Firma pjk (Kleinblittersdorf, Deutschland) nach Angaben des Herstellers verwendet. Zellen wurden mit einer Konfluenz von 90 % in einer 24-well-Platte ausgesät und mit 0,8 µg des entsprechenden Reporterplasmids und 50 nM einer miRNA Mimic in der Endkonzentration transfiziert. Die Zellyse erfolgte 24 h nach der Transfektion mit 100 µl Lysepuffer. Zur Bestimmung der Luziferase-Aktivität wurden jeweils 20 µl der Proben im Duplex auf eine Mikrotiterplatte pipettiert und im automatisierten System des Centro LB 960 DLReady Luminometers (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany) gemessen.

2.5.2 Ago2-Immunopräzipitation

Unter Anwendung der Ago2-Immunopräzipitation konnte eine Aufreinigung der an Ago2 gebundenen Ribonukleinsäuren über einen an Silica-*Beads* immobilisierten monoklonalen anti-Ago2 Antikörper *in vitro* erreicht werden (Abb. 2.2).

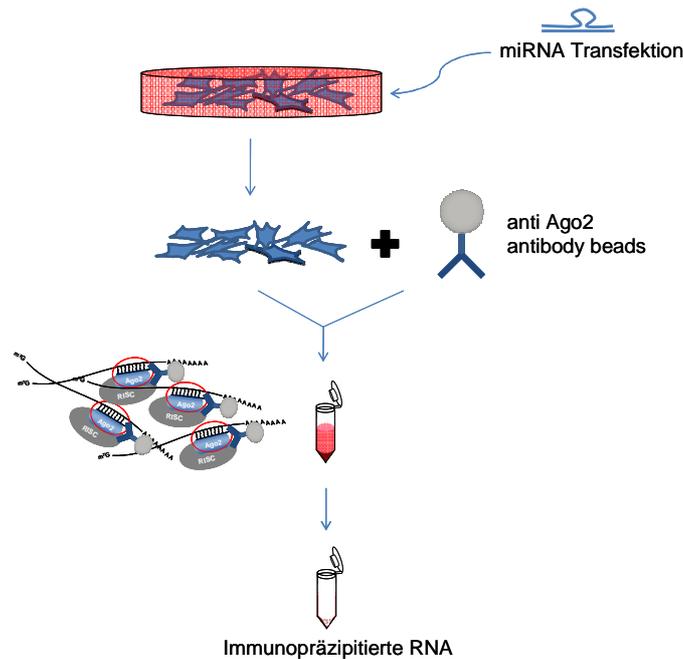


Abb. 2.2: Schematische Darstellung der Versuchsdurchführung zur Ago2-Immunopräzipitation mit dem „microRNA Isolation Kit Mouse Ago2“ (Wako, Richmond, VA, USA) (siehe 2.5.2).

2.5.2.1 Immunopräzipitation und RNA-Extraktion

Die Ago2-Immunopräzipitation wurde mit dem „microRNA Isolation Kit Mouse Ago2“ der Firma Wako (Richmond, VA, USA) durchgeführt. Die Vorgehensweise erfolgte dabei nach Angaben des Herstellers. Zunächst wurden Zellen auf einer 10 cm Platte so ausgesät, dass sie am Folgetag eine Konfluenz von 60-70 % aufwiesen (8×10^6). Die Zellen wurden mit einer miRNA Mimic oder dem korrespondierenden Inhibitor mit einer Endkonzentration von 50 nM transfiziert. Nach 10 Stunden wurden die Zellen trypsiniert und nach 3x Waschen mit 1x PBS mit Lysepuffer versetzt. Die Inkubation der Proben mit der anti-Ago2 *antibody bead solution* erfolgte für eine Dauer von 3-4 Stunden. Nach Präzipitation und Aufreinigung der zuvor über Ago2 an den *Beads* immobilisierten RNA wurde das Pellet schließlich in 10 µl RNase-freiem H₂O aufgenommen.

2.5.2.2 cDNA-Synthese und Amplifikation

Im ersten Versuch mit miR-128 wurde die anschließende cDNA-Synthese unter Anwendung des „Super SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit“ der Firma Clontech

(Mountain View, CA, USA) nach Herstellerangaben durchgeführt. Hinsichtlich der Inkubationszeiten wurden immer die höchsten Angaben ausgewählt. Dieses Kit beruht auf der Umschreibung von RNA in cDNA mit Hilfe eines 5`-RNA-Adaptormoleküls und oligo(dT) Primern, beide vorgesehen mit einer Adaptersequenz zur späteren Amplifikation mit komplementären Primern, und der reversen Transkriptase. Für die folgende cDNA Amplifikation per PCR wurde eine Versuchskopplung mit dem „Advantage 2 PCR Kit“ derselben Firma gewählt.

<u>Temperaturprofil</u>	95 °C	1 min	
	95 °C	15 sek	← 30 x
	65 °C	30 sek	
	68 °C	6 min	
	68 °C	6 min	
	70 °C	10 min	

2.5.2.3 TOPO-TA Klonierung

Im Anschluss an die PCR zur Amplifikation der cDNA wurde nach kurzer Inkubation auf Eis direkt eine weitere Inkubation für 10 min bei 72 °C mit dATPs und Polymerase zur Sicherstellung des Vorhandenseins der A-Überhänge an den PCR-Produkten angeschlossen. Die nachfolgende Klonierung in den 2.1 TOPO[®] mit Verwendung des „TOPO TA Cloning[®] Kits“ (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) erfolgte nach Angaben des Herstellers. Für die Klonierungsreaktion wurde der Ansatz für 30 min bei RT inkubiert. Positive Bakterienkolonien konnten über Blau-Weiß-Selektion identifiziert werden.

2.5.2.4 Sequenzierung von möglichen Zieltranskripten

Die Isolierung der Plasmid-DNA aus den positiven Bakterienklonen und anschließende Sequenzierung der inklonierten möglichen Zieltranskripte wurde der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) in Auftrag gegeben.

2.6 Next Generation Sequencing

Die Sequenzierung der nächsten Generation (*Next Generation Sequencing*, NGS) stellt ein innovatives Verfahren der beschleunigten Sequenzierung durch massiven parallelen Einsatz dar. Dabei handelt es sich um ein Verfahren, das nach der Sanger-Methode entwickelt wurde. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Genome Analyzer IIx mit der Technik von Illumina (San Diego, CA, USA) verwendet.

2.6.1 Präamplifikation über NuGEN

Aufgrund der Annahme einer geringen RNA-Transkriptmenge in der immunopräzipitierten RNA aus der Ago2-Immunopräzipitation (siehe 2.5.2) wurden die Proben vor Verwendung zum NGS nach Umschreibung in cDNA präamplifiziert. Hierfür wurde das „Ovation[®] RNA-Seq-System“ von NuGEN (San Carlos, CA, USA) nach Angaben des Herstellers verwendet. Zur Umschreibung in cDNA wird dabei ein Mix aus Random- und poly(T)-Primern eingesetzt. Das Probenvolumen wurde vor Beginn zunächst mit Hilfe einer Vakuum-Zentrifuge (SAVANT SPD111V SpeedVac Concentrator, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) auf 5 µl eingeeengt. Die Überprüfung der NuGEN amplifizierten cDNA erfolgte über Kapillarelektrophorese mit einem DNA 1000 Chip (Kit von Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Die Analyse dieses Chips erfolgte auf dem zugehörigen 2100 Bioanalyzer der Firma Agilent. Die Konzentrationen wurden mit dem „Qubit[®] BR Kit“ (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) nach Herstellerangaben bestimmt.

2.6.2 cDNA-Fragmentierung und Adapter-Ligation

Zur Herstellung der cDNA-Bibliothek (*library*) wurde die cDNA zunächst zu Längen von 150-250 bp geschert. Dieses erfolgte in einem Ultraschallbad (Covaris S220 / S220x, Woburn, MA, USA) unter Einsatz von 1 µg der cDNA für jede Probe. Folgende Einstellungen wurden verwendet:

Arbeitszyklus: 10 % / Intensität: 5 / Ladungsimpuls pro Sekunde: 200 / Modus: *frequency sweeping* / Stärke: 10 W / Temperatur: 4-6 °C / Behandlungszeit: 180 sek. Zur Überprüfung wurde die fragmentierte cDNA nach weiterer Aufreinigung durch Ampure *Beads* (Beckman Coulter Genomics, Danvers, MA, USA) auf einen *High*

Sensitivity DNA Chip (Kit von Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) aufgetragen. Im Anschluss erfolgte die End-Reparatur, Adenylierung der 3`-Enden und Ligation der Adapter unter Verwendung des „TruSeq™ DNA Sample Preparation Kit“ nach Angaben des Herstellers (Illumina, San Diego, CA, USA). Die Adapter beinhalten die Indices und ermöglichen ein multiplexes Sequenzieren.

2.6.3 Brückenamplifikation und Sequenzierung

Ein folgender Präamplifikationsschritt des „TruSeq™ Kit“ mit 8 PCR-Zyklen und 5 µl Probenvolumen diente zur Anreicherung von Fragmenten, an die eine Ligation der Adapter erfolgreich stattgefunden hatte. Danach wurde die so erstellte cDNA Bibliothek als Pool aus 6 Proben zu 9 nM auf eine Reihe (*lane*) der Durchflusszelle (*flowcell*) mit entsprechend immobilisierten Primern gegeben. Über die Adapter konnte eine Anheftung der Moleküle an die *flowcell*-Oberfläche stattfinden. Über das System der klonalen Amplifikation durch Brückenamplifikation, bestehend aus Elongations- und Denaturierungszyklen unter Zugabe von Enzymen und unmarkierten Nukleotiden, konnten die an entsprechende Primer hybridisierten Adapter-Fragmente in Clustern angereichert werden (siehe Abb. 2.3). Die Produkte wurden schließlich in einer Ansequenzierung von 36 bp zu beiden Seiten (*paired-end*) plus 7 bp für den Index auf einem Illumina GAIIx nach Herstellerangaben sequenziert. Die resultierenden Leseinheiten (*reads*) wurden gegen eine entsprechende Referenz-Sequenz verglichen (*rattus norvegicus* rn4).

Die Datenauswertung erfolgte mit Hilfe des Programms Partek® (Partek Incorporated, St. Louis, MO, USA).

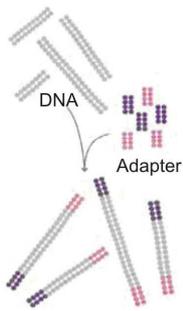
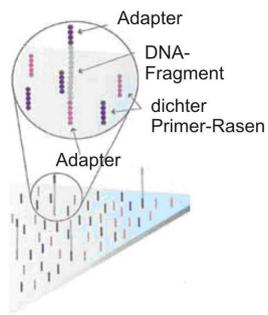
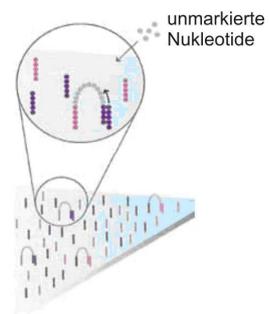
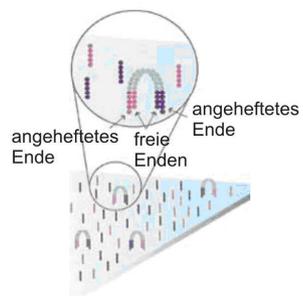
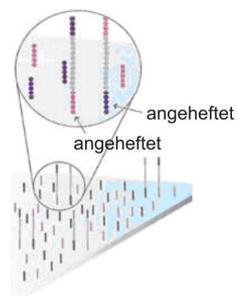
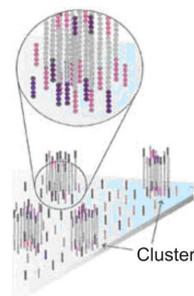
A. Vorbereitung der DNA Probe**B. Anheftung der DNA an die Oberfläche****C. Brücken-Amplifikation****D. Fragmente werden doppelsträngig****E. Denaturierung der Doppelstrang-Moleküle****F. Komplette Amplifikation**

Abb. 2.3: Prinzip der Brückenamplifikation (Illumina Technologie).
Erläuterungen im Text (2.6.2. und 2.6.3).

3. Ergebnisse

Um die physiologische Rolle von neuronalen miRNAs in HSC aufzuklären, sind ihre Zieltranskripte von entscheidender Bedeutung. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde als Grundlage der Untersuchungen zunächst die Isolierung von primären HSC etabliert. Die Fragestellung nach der Bedeutung von neuronalen miRNAs während der myofibroblastischen HSC-Transdifferenzierung wurde anschließend über verschiedene Ansätze zur Zielsuche ihrer spezifischen Transkripte angegangen.

3.1 Die myofibroblastische Transdifferenzierung *in vitro*

Die myofibroblastische Transdifferenzierung der sinusoidalen HSC stellt den zentralen Vorgang in der Leberfibrose dar. Bringt man primäre HSC in Kultur auf Plastikware, so spiegeln sie die phänotypischen Veränderungen der *in vivo*-Vorgänge wider. Deshalb stellt dieses Zellsystem in der Zellkultur ein gutes Modell zur Entwicklung von Fibrose *in vitro* dar (Ramadori *et al.* 1990; Geerts 2001; Friedman 2008).

Zunächst wurde die Methode der Isolierung primärer HSC aus der Ratte (siehe 2.2.1) im eigenen Labor durch Veränderung verschiedener Parameter etabliert. So fand ein Herabsetzen der Enzymkonzentrationen von 110 mg auf 55 mg Collagenase sowie von 140 mg auf 70 mg Pronase E in der Enzymlösung I statt. Des Weiteren wurden auch die Konzentrationen in der Enzymlösung II auf jeweils 35 mg reduziert. Die Inkubationszeit der Zellsuspension in der zweiten Enzymlösung wurde je nach Perfusionserfolg auf maximal 5 Minuten festgesetzt. Der Dichtegradient mit OptiPrep wurde von 10,5 % auf 11 % verändert. Diese Etablierung führte zu einer erhöhten Ausbeute in der Zellzahl von 8 auf bis zu 20 Millionen Zellen in einer Isolierung. Auch hinsichtlich der Zelladhärenz ließen sich Verbesserungen in der Anheftung der Zellen an die Zellkultur-Plastikschalen feststellen.

3.1.1 Morphologie und Reinheit

Im Anschluss an die Zellisolierung primärer HSC wurde die myofibroblastische Transdifferenzierung dieser Zellen in Kultur zunächst anhand verschiedener Merkmale charakterisiert. Morphologisch konnte nach Adhärenz der Zellen die typische sternähnliche Form in den ersten Tagen beobachtet werden. Die Differenzierung der HSC begann umgehend in Kultur und konnte ab Tag 3 mit Verlust der Fettvakuolen und Veränderung der morphologischen Gestalt in einen myofibroblastenähnlichen Zelltyp endgültig an Tag 7 mit einhergehender Größenzunahme verfolgt werden (Abb. 3.1).

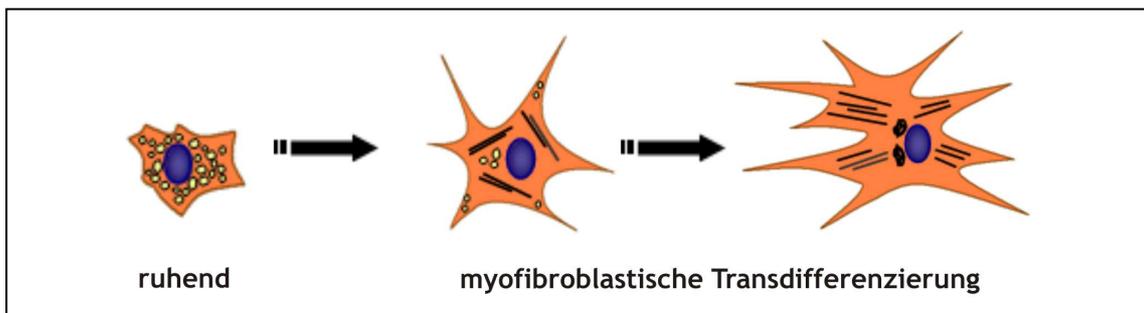


Abb. 3.1: Schematische Darstellung der myofibroblastischen Transdifferenzierung von HSC. Der Verlust von Vitamin A-haltigen Fettvakuolen (gelb) sowie eine erhöhte Expression von extrazellulären Matrixproteinen (schwarz) sind typische Charakteristika während der Differenzierung aktivierter HSC.

Zusätzlich zu den phänotypischen Eigenschaften wurden die HSC hinsichtlich der Expression zelltypspezifischer Marker auf ihre Reinheit überprüft. Abbildung 3.2 zeigt PCR-Analysen, in denen die HSC-Isolierungen auf das hepatozytenspezifische Albumin, das endothelzellspezifische PECAM/CD31, das makrophagenspezifische ED2/CD163, sowie die HSC typischen Marker Desmin und α -SMA kontrolliert wurden.

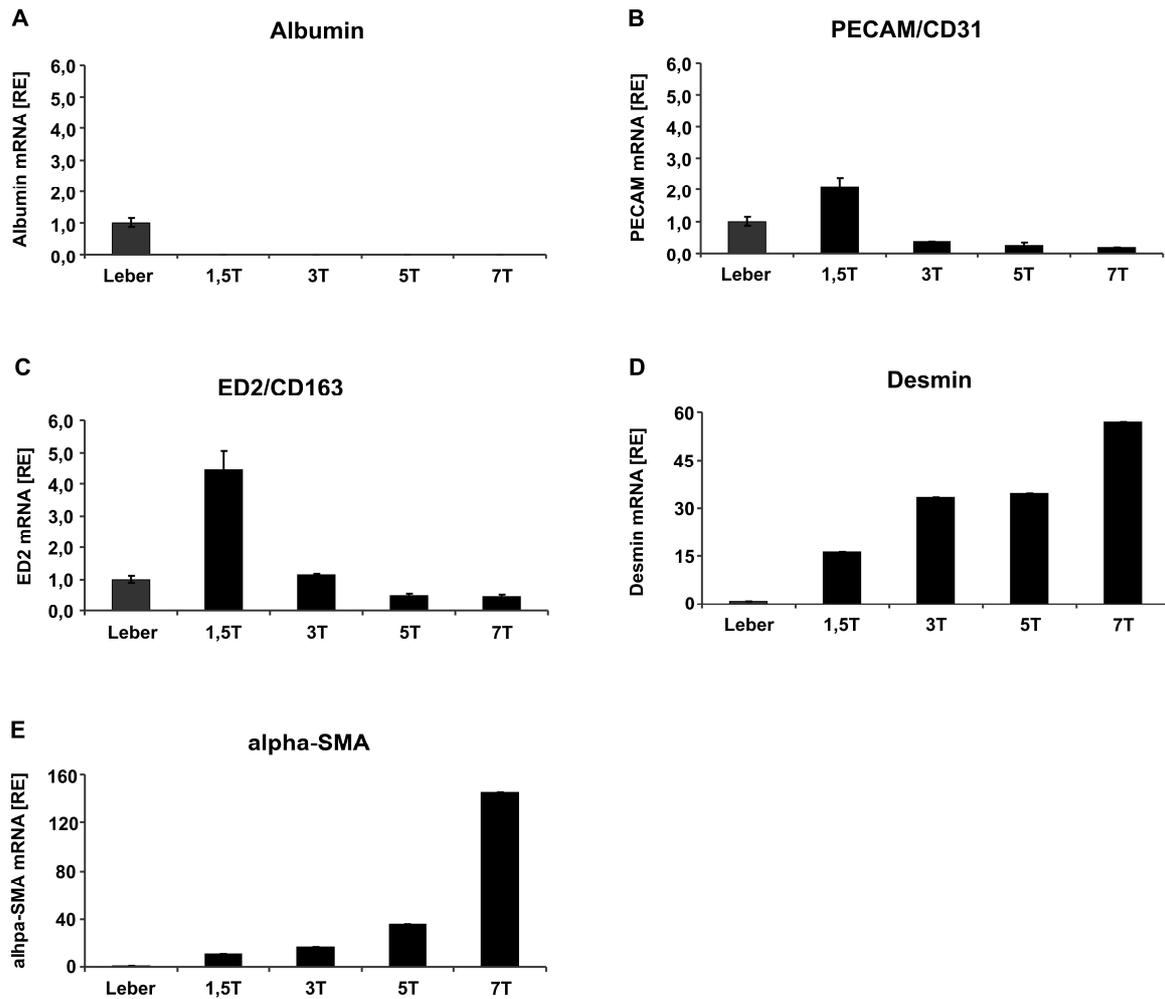


Abb. 3.2: Hohe Reinheitsgrade der isolierten HSC nach dem dritten Kulturtag. Die isolierten primären HSC aus der Ratte wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (1,5T, 3T, 5T, 7T) der myofibroblastischen Transdifferenzierung auf die zelltypspezifischen Marker Albumin (A), PECAM (B), ED2 (C), Desmin (D) und α -SMA (E) mittels Real-Time PCR untersucht. Als Referenz diente hierbei Gewebe der gesamten Leber. Die Normalisierung erfolgte gegen HPRT. RE = relative Einheiten. (Exemplarische Darstellung einer HSC Isolierung).

Durch diese Ergebnisse konnte gewährleistet werden, dass die isolierten und kultivierten HSC nach 3 Tagen eine zu ca. 90 % reine Population darstellten. Diese Aussage der Reinheit konnte auch über Eigenfluoreszenz des Vitamin A in den Primärkulturen bestätigt werden (Abb. 3.3).

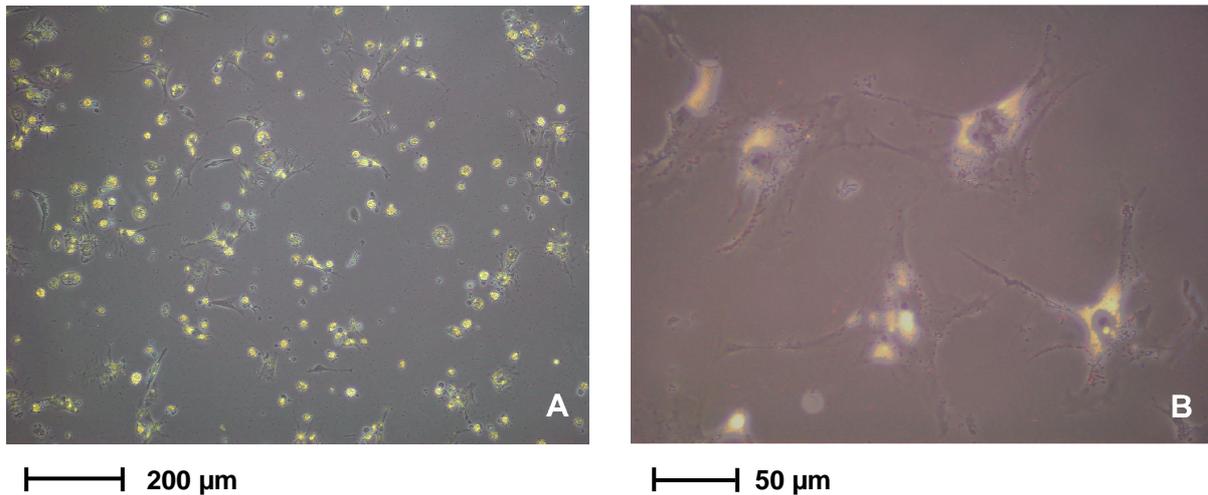


Abb. 3.3: Eigenfluoreszenz des Vitamin A in UV-Licht. Primäre HSC der Ratte an Tag 3 stellten sich in UV-Licht über die Eigenfluoreszenz des in Fettröpfchen enthaltenen Vitamin A dar (in gelblicher Farbe überlagert). (A) pHSCr in einer 100-fachen Vergrößerung. (B) pHSCr in einer 400-fachen Vergrößerung.

3.1.2 Charakteristische Veränderungen während der Transdifferenzierung

Weitere kennzeichnende Charakteristika während der myofibroblastischen Transdifferenzierung stellen die erhöhte Expression von extrazellulären Matrix-Proteinen wie den Kollagenen dar (Daten nicht gezeigt), sowie die induzierte Expression von *alpha smooth muscle actin* (α -SMA). Die lichtmikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 3.4 zeigen den zuvor erwähnten Verlust der Fettvakuolen mit Fortschreiten der Differenzierung in Kultur (A-C). Mittels Antikörperfärbung konnte die Zunahme der α -SMA Expression in HSC während der myofibroblastischen Transdifferenzierung sehr deutlich dargestellt werden (D-F). Der Nachweis zur Expression von GFAP in den kultivierten HSC erfolgte ebenfalls auf immunzytochemischer Ebene (G-I).

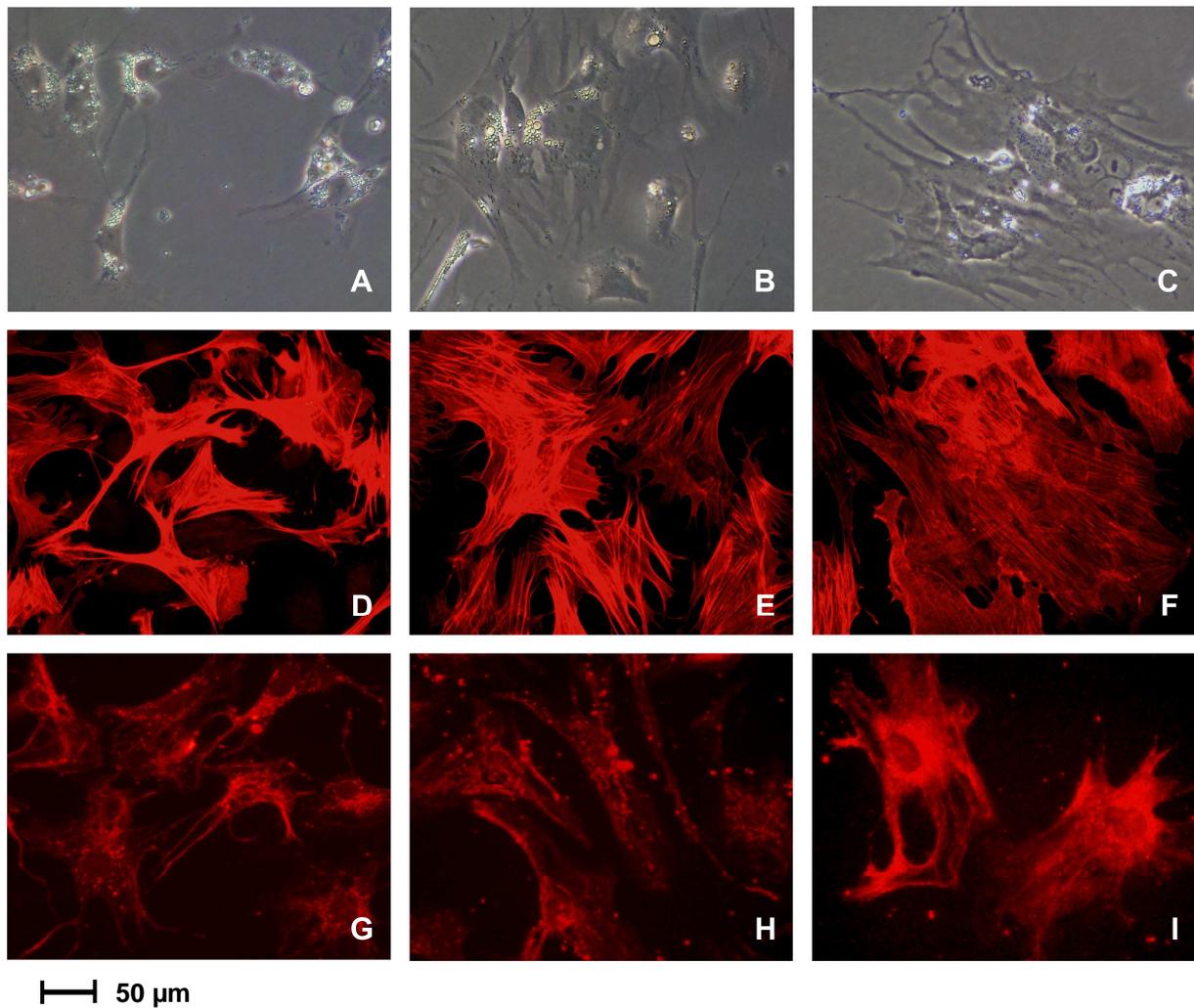


Abb. 3.4: Charakterisierung der myofibroblastischen Transdifferenzierung von primären HSC *in vitro*. Die HSC wiesen nach 3, 5 und 7 Tagen in der lichtmikroskopischen Darstellung die kennzeichnenden phänotypischen Veränderungen und den Verlust der Fettvakuolen auf (A-C). In der immunzytochemischen Antikörperfärbung gegen α -SMA nach 3, 5 und 7 Tagen zeigte sich die Zunahme von α -SMA im Zeitverlauf (D-F). Die Antikörperfärbung gegen GFAP in der Primärkultur nach 3, 5 und 7 Tagen belegte die Reinheit der isolierten Kultur (G-I).

Die isolierten HSC wiesen demnach *in vitro* die charakteristischen fibrogenen und myofibroblastischen Veränderungen einer *in vivo*-Transdifferenzierung aktivierter, HSC auf und konnten als geeignetes Zellkultursystem für die Fragestellung zur Expression neuronaler miRNAs während der myofibroblastischen Differenzierung verwendet werden.

3.2 Erhöhte Expression neuronaler miRNAs in HSC nach myofibroblastischer Differenzierung

Für die Untersuchung der Expression neuronaler miRNAs in HSC wurden die isolierten primären HSC aus der Ratte verwendet. Die kultivierten Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten während der myofibroblastischen Transdifferenzierung lysiert (nach 5, 7 und 11 Tagen) und über quantitative Real-Time PCR wurde das Expressionsprofil fünf beschriebener neuronaler miRNAs analysiert. Für drei der neuronalen miRNAs, miR-9, miR-125b und miR-128, zeigte sich eine starke Hochregulierung während der myofibroblastischen Transdifferenzierung der HSC *in vitro* (Abb. 3.5).

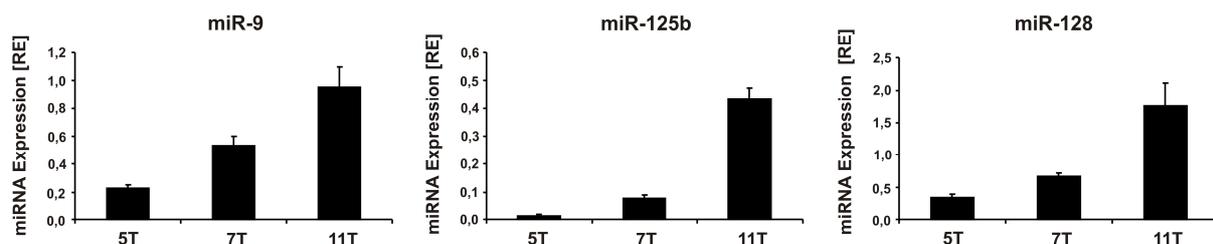


Abb. 3.5: Expressionsprofile der neuronalen miR-9, miR-125b und miR-128 während der myofibroblastischen Transdifferenzierung primärer HSC der Ratte. Die neuronalen miRNAs zeigten eine Hochregulierung mit fortschreitender HSC-Differenzierung. Die Bestimmung der Expression an den Tagen 5, 7 und 11 erfolgte über quantitative Real-Time PCR. Normalisiert wurde gegen RNU6B. RE = relative Einheiten

Um die Expression auch im humanen System nachzuweisen, wurden aus einem Leberresektat ebenfalls humane HSC isoliert und die neuronalen miRNAs untersucht. Die Reinheit der Isolierung wurde über eine mikroskopische Begutachtung und Quantifizierung zelltypspezifischer Marker beurteilt. Am dritten Tag in Primäkultur enthielt die Population zu mehr als 90 % HSC (Daten nicht gezeigt). Die in Abbildung 3.6 dargestellten Ergebnisse der quantitativen Bestimmung der Expressionslevel über Real-Time PCR zeigten auch bei den primären humanen HSC eine deutliche Hochregulierung der neuronalen miR-9, miR-125b und miR-128 während der myofibroblastischen Transdifferenzierung *in vitro*. Allerdings kam es bei der miR-9 an Tag 11 der Kultur zu einem Abfall. Für eine

Bestätigung der Ergebnisse während der myofibroblastischen Differenzierung humaner HSC standen keine humanen Leberresektate zur Verfügung.

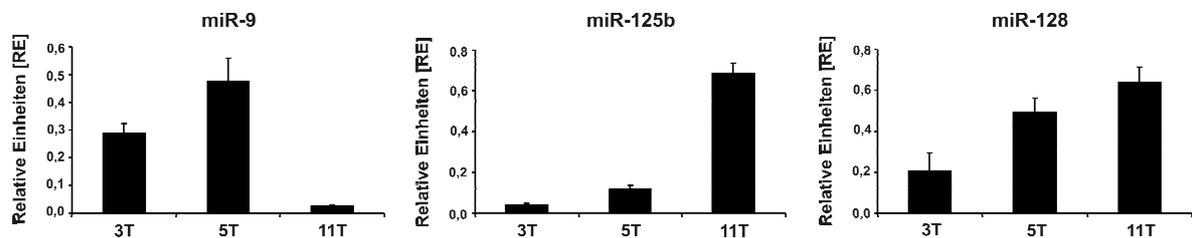


Abb. 3.6: Expressionsprofile der neuronalen miR-9, miR-125b und miR-128 während der myofibroblastischen Transdifferenzierung von kultivierten primären humanen HSC. Für alle drei neuronalen miRNAs zeigte sich ein Anstieg in der Expression, mit Ausnahme von Tag 11 für miR-9. Die Bestimmung der Expression an den Tagen 3, 5 und 11 erfolgte über quantitative Real-Time PCR. Normalisiert wurde gegen RNU6B. RE = relative Einheiten.

3.3 *Lin28* und *Klf4* sind Zieltranskripte neuronaler miRNAs in HSC

Um nun näher zu untersuchen, welche Bedeutung die hochregulierten, neuronalen miRNAs während der myofibroblastischen Transdifferenzierung haben, wurden verschiedene Ansätze zum Auffinden möglicher Zieltranskripte angegangen.

Im ersten Versuchsansatz wurden unterschiedliche Datenbanken gesichtet (Betel *et al.* 2008; Friedman *et al.* 2009). Die in den verschiedenen Portalen verwendeten Algorithmen legen dabei auf bestimmte beeinflussende Faktoren, wie Anzahl der Bindungsstellen oder ihre Konserviertheit und die Interaktions-Affinität ($-\Delta E$) einen Schwerpunkt (Bartel 2004). Beim Vergleich potenzieller Zieltranskripte für miR-9, miR-125b und miR-128 zeigten sich Übereinstimmungen in den aufgeführten mRNAs für diese drei neuronalen miRNAs, wie in Abbildung 3.7 und Tabelle 3.1 dargestellt.

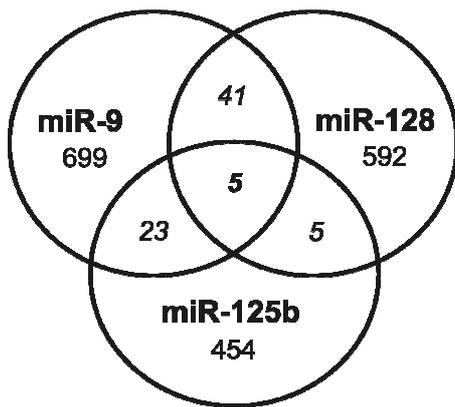


Abb. 3.7: VENN-Diagramm potenzieller Zieltranskripte der neuronalen miRNAs. Für jede neuronale miRNA wurden in der TargetScan Datenbank zwischen 450-700 Zieltranskripte vorhergesagt. Bei diesen mRNAs waren dabei Überschneidungen vorhanden, wobei fünf Zieltranskripte der miR-9, miR-125b und miR-128 gemeinsam waren (siehe auch Tabelle 3.1).

Unter diesen 450–700 Transkripten konnten fünf gemeinsame Ziel-mRNAs ermittelt werden. Zusätzlich zeigten sich auch zwischen miR-9 und miR-125b (23) sowie miR-9 und miR-128 (41) Übereinstimmungen in den Zieltranskripten, wie in Tabelle 3.1 auszugsweise dargestellt. Für miR-125b und miR-128 zeigten sich nur die fünf bei allen gemeinsam vorhandenen mRNAs.

Tab. 3.1: Potenzielle Zieltranskripte der neuronalen miRNAs ermittelt aus TargetScan (Friedman et al. 2009)

Zieltranskripte von			
<i>miR-9 & miR-125b & miR-128</i>	<i>miR-9 & miR-125b**</i>	<i>miR-9 & miR-128**</i>	<i>miR-128*</i>
<i>Lin28</i>	<i>Prtg</i>	<i>Myocd</i>	<i>Klf4</i>
<i>Onecut2</i>	<i>Hk2</i>	<i>Vav3</i>	<i>Zfp827</i>
<i>Rasa2</i>	<i>Prdm1</i>	<i>Mesdc1</i>	<i>Zfp462</i>
<i>Lifr</i>	<i>Dnajc14</i>	<i>Galnt3</i>	<i>Slc8a1</i>
<i>Notch1</i>	<i>Sort1</i>	<i>Ikzf5</i>	<i>Tmem91</i>
	<i>Gls</i>	<i>Runx1</i>	
	<i>D1ertd53e</i>	<i>Ikzf2</i>	<i>miR-125b*</i>
	<i>Smarcd2</i>	<i>Furin</i>	<i>Cdc216</i>
	<i>St8sia4</i>	<i>Foxp2</i>	<i>Zfp691</i>
	<i>St6gal1</i>	<i>Traf3</i>	<i>Zfp523</i>
	<i>Scn2b</i>	<i>Col27a1</i>	<i>Zfp704</i>
	<i>Gdnf</i>	<i>Unkl</i>	
	<i>Tmem136</i>	<i>Nptx1</i>	<i>miR-9*</i>
	<i>Slc7a6</i>	<i>Map3k2</i>	<i>Onecut3</i>
	<i>Pacsin1</i>	<i>Cdc14b</i>	<i>Klf12</i>
	<i>Rnf144a</i>	<i>Arid1b</i>	<i>Cdc25a</i>
	<i>Zfp395</i>	<i>Ube2z</i>	<i>Slc9a1</i>
	<i>Zbtb34</i>	<i>Sos1</i>	<i>Zfp354a</i>

* Es sind hier nur wenige ausgewählte, potenzielle Zieltranskripte für miR-9, miR-125b oder miR-128 aufgelistet. Als Auswahlkriterium wurde die Tatsache herangezogen, dass die neuronalen miRNAs auch weitere Mitglieder der Transkriptfamilien erkannten.

** Aufgrund der Anzahl ist hier nur ein Auszug der gemeinsamen potenziellen Zieltranskripte dargestellt.

3.3.1 miR-9, miR-125b und miR-128 binden an die 3'-UTR von *Lin28*

Bei der Suche in den Datenbanken stellte sich *Lin28* als gemeinsames potenzielles Ziel der neuronalen miRNAs heraus (Abb. 3.8). *Lin28* besitzt die Funktion eines RNA-bindenden Proteins und gilt unter anderem als pluripotenzfördernder Faktor (Yu *et al.* 2007).

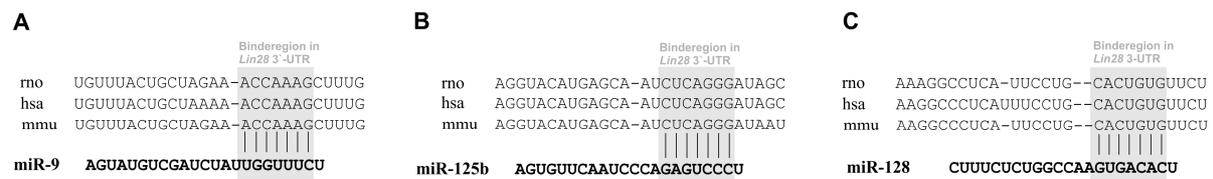


Abb. 3.8: Bindungsregionen der jeweiligen miRNAs in der 3'-UTR von *Lin28*. Für die neuronale miR-9 (A), miR-125b (B) und miR-128 (C) sind die potenziellen miRNA Interaktionsbereiche in der 3'-UTR von *Lin28* dargestellt, an welche die miRNA über ihre *seed*-Region binden kann (grau hinterlegt). rno = rattus norvegicus; hsa = homo sapiens; mmu = mus musculus. Datenbank: TargetScan 5.2 (www.targetscan.org).

Um zu zeigen, dass es sich bei *Lin28* um ein Ziel dieser miRNAs handelt, wurde ein Luziferase-Reporterassay durchgeführt. Über Einklonierung der jeweiligen potenziellen Bindungsregion der drei neuronalen miRNAs in der 3'-UTR von *Lin28* sowie derselben Sequenz mit zwei Punktmutationen in dem *seed*-Sequenz interagierendem Bereich, sollte eine direkte Interaktion bewiesen werden. Die Herstellung des Reportervektors ist in Abbildung 3.26 (im Anhang) dargestellt.

Für den Nachweis der Bindung der miRNAs an die Reporterplasmide wurden leicht transfizierbare, humane, embryonale Nierenzellen (HEK-293) verwendet. Für die Durchführung des Luziferase-Reporterassays wurden die Zellen mit den jeweiligen Reporterplasmiden transfiziert. Zusätzlich fand eine Co-Transfektion mit der jeweiligen miRNA Mimic (miR-9, miR-125b oder miR-128) oder einer nicht-kodierenden miRNA (nk-siRNA) statt (siehe Abb. 3.9). Nach Auswertung der Luziferase-Signale zeigte sich für die HEK-293 Zellen, die mit der miRNA Mimic und dem nicht mutierten Reporterplasmid transfiziert wurden, eine Reduktion der Renilla-Luziferase-Aktivität. Bei Transfektion dieses Reporterplasmids mit der nk-siRNA blieb die Aktivität der Renilla-Luziferase unverändert. Auch im Falle der Co-Transfektion

mit dem mutierten Reporterplasmid und der jeweiligen miRNA Mimic zeigte sich eine unverändert hohe Reporter-Aktivität. Es handelt sich demnach um eine spezifische Interaktion sowohl der miR-9, miR-125b als auch miR-128 mit dem jeweiligen *seed*-Sequenzbereich in der 3`-UTR von *Lin28*. Für diese Ergebnisse ergab sich eine Signifikanz ($p < 0,0001$).

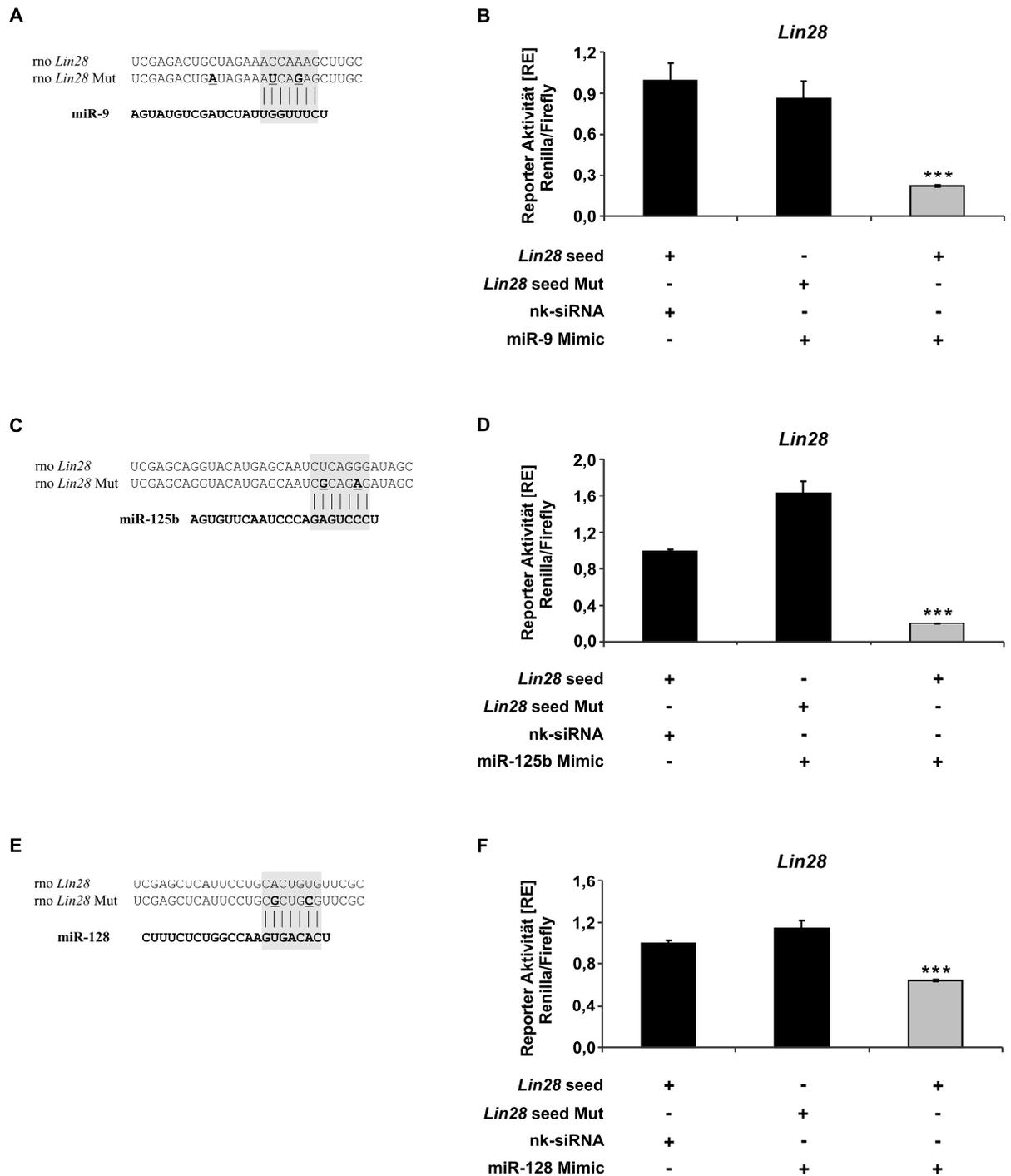


Abb. 3.9: Ergebnisse des dualen Luziferase-Reporterassays für *Lin28*. Im Reportervektor wurde entweder die Bindungsregion aus der *Lin28* 3'-UTR oder die zwei Punktmutationen enthaltende Sequenz (ausgetauschte Nukleotide fett und unterstrichen dargestellt) der miR-9 (A), miR-125b (C) oder miR-128 (E) in HEK-293 Zellen transfiziert. Im Falle einer Co-Transfektion von Reporterplasmid und nk-siRNA sowie mutiertem Reporterplasmid und einer miRNA Mimic zeigte sich eine hohe Renilla-Luziferase-Aktivität. Transfektion von Reporterplasmid und entsprechender miRNA führte bei allen drei miRNAs zu einer verringerten Luziferase-Aktivität (B, D, F). RE = relative Einheiten.

3.3.2 Abnehmende Expression von *Lin28* während der myofibroblastischen Transdifferenzierung von HSC

Um eine Aussage über die Expression von *Lin28* während der myofibroblastischen Transdifferenzierung primärer HSC machen zu können, wurde der *Lin28*-Level mittels Real-Time PCR zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht. Wie in Abbildung 3.10 dargestellt, zeigte sich für *Lin28* eine deutliche Abnahme (A) in der Expression mit fortschreitender Transdifferenzierung. Dieses Expressionsprofil von *Lin28* stellt sich invers zu dem Profil der neuronalen miRNAs dar (B-D).

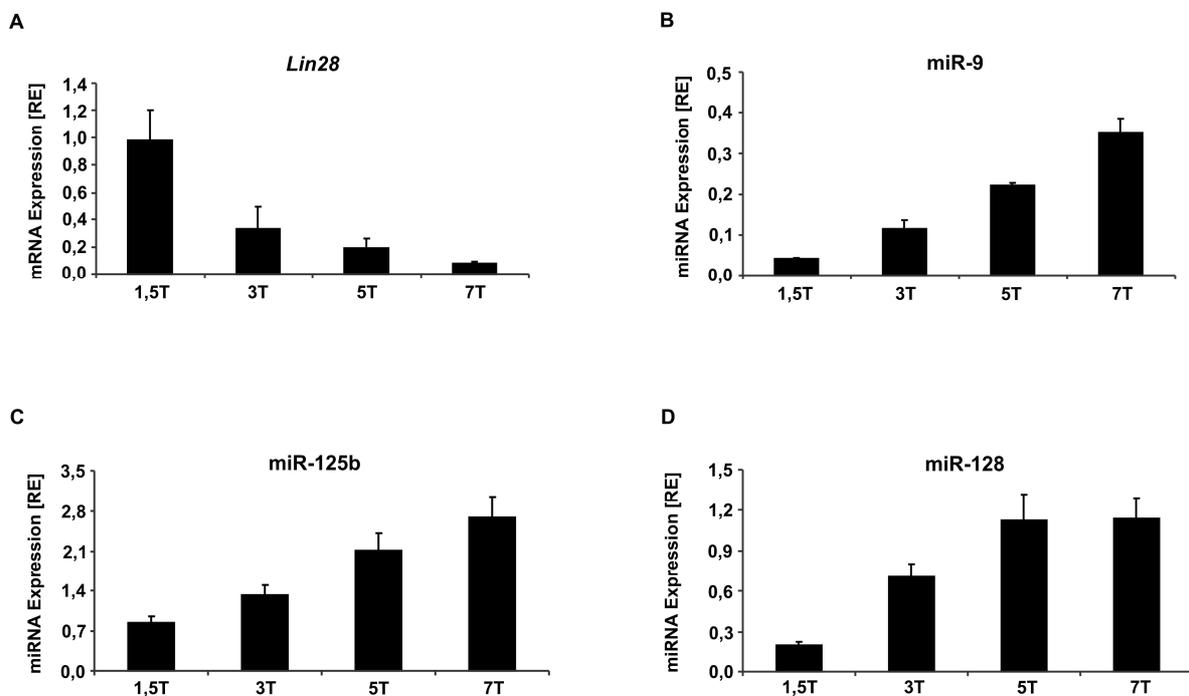


Abb. 3.10: Expressionslevel während der Transdifferenzierung primärer HSC. Das Ergebnis der Real-Time PCR zeigte eine starke Abnahme der *Lin28*-Transkripte im Zeitverlauf (A). Demgegenüber lag bei den miRNA-Level für miR-9 (B), miR-125b (C) und miR-128 (D) invers ein Anstieg vor. Normalisiert wurde gegen HPRT bzw. RNU6B. RE = relative Einheiten.

3.3.3 miR-128 bindet an die 3'-UTR von *Klf4*

Bei weiterer Durchsicht der Datenbanken stellte sich für die miR-128 in Anlehnung an die gefundene Ziel-mRNA *Lin28* ein weiteres Transkript heraus, das in Zusammenhang mit Pluripotenz und Stammzeleigenschaften steht: *Krüppel-like*

factor 4 (Klf4) (Takahashi *et al.* 2007) (siehe Tabelle 3.1). Um *Klf4* diesbezüglich näher zu untersuchen, wurde der duale Luziferase-Reporterassay durchgeführt. Wie in Abbildung 3.11 verdeutlicht, resultierte nur die Transfektion des Reporterplasmids und der miR-128 Mimic in einer signifikant, obwohl nur moderat verringerten Aktivität der Renilla-Luziferase ($p < 0,0001$). Daher konnte die Interaktion von miR-128 mit der *seed*-Region entsprechenden Sequenz in der 3'-UTR von *Klf4* bestätigt werden.

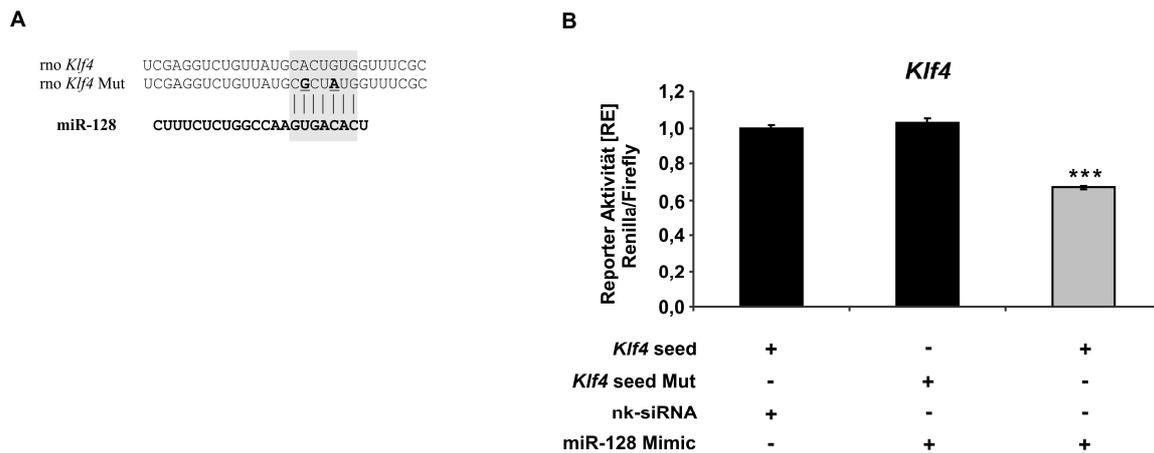


Abb. 3.11: Ergebnis des dualen Luziferase-Assays für *Klf4*. Im Reportervektor wurde entweder die Bindungsregion aus der *Klf4* 3'-UTR oder die Sequenz mit zwei Punktmutationen (ausgetauschte Nukleotide fett und unterstrichen dargestellt) der miR-128 (A) in HEK-293 Zellen transfiziert. Nur die Transfektion von Reporterplasmid und miR-128 Mimic weist eine verringerte Luziferase-Aktivität auf (B). RE = relative Einheiten.

3.3.4 Expression von *Klf4* während der myofibroblastischen Transdifferenzierung von HSC

Nachdem *Klf4* als Zieltranskript für die miR-128 bestätigt werden konnte, wurde daraufhin das Expressionsverhalten von *Klf4* zu verschiedenen Zeitpunkten der Transdifferenzierung von primären HSC mittels Real-Time PCR analysiert. Hierbei zeigte sich eine deutliche Zunahme des *Klf4*-Expressionslevels (Abb. 3.12). Eine reduzierte Expression aufgrund der Zunahme von miR-128 wurde nicht beobachtet.

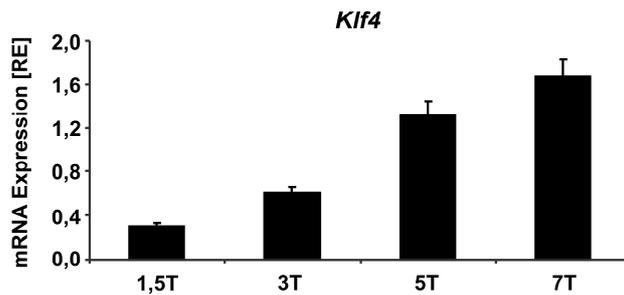


Abb. 3.12: Expressionslevel während der Transdifferenzierung primärer HSC. Im Verlauf der Differenzierung zeigte sich eine Zunahme in der Expression von KLF4. Normalisiert wurde gegen HPRT. RE = relative Einheiten.

3.4 Microarray und Ago2-Immunopräzipitation

Zum Auffinden möglicher Zieltranskripte der neuronalen miRNAs *in vitro* wurden zwei weitere Versuchsansätze durchgeführt. Bei beiden Untersuchungen wurde der endogene miRNA-Level in den verwendeten Zellsystemen zum Erhalt einer höheren miRNA-Präsenz verändert. Über einen Hybridisierungs-Microarray wurden nachfolgend veränderte Genexpressionslevel untersucht. Mittels der Methodik der Ago2-Immunopräzipitation konnten anhand der direkten Interaktion der miRNA mit ihren Ziel-mRNAs solche Transkripte über Sequenzierung identifiziert werden.

3.4.1 Expressionsprofil nach Manipulation des endogenen miR-128-Spiegels in myofibroblastischen HSC

Um mögliche Zieltranskripte von miRNAs besser analysieren zu können, wurde eine Erhöhung des endogenen miRNA-Spiegels durch Transfektion primärer HSC mit einer miRNA Mimic erreicht. Es besteht die Annahme, dass ein vermehrtes Vorhandensein der miRNA mit einer erhöhten Funktion in der posttranskriptionellen Inhibition der entsprechenden Zieltranskripte einhergeht. Im Gegensatz dazu konnte der miRNA-Level mittels Transfektion eines miRNA Inhibitors nahezu ausgelöscht werden. Abbildung 3.13 zeigt diese beschriebenen Ergebnisse für die ausgewählte neuronale miR-128 Mimic und den entsprechenden Inhibitor. Die Transfektion erfolgte zu zwei verschiedenen Zeitpunkten (3T, 7T) der HSC-Differenzierung von einer Primärkultur (siehe 2.2.5). Die Zellen wurden nach 24 Stunden lysiert und der miRNA-Level über Real-Time PCR bestimmt.

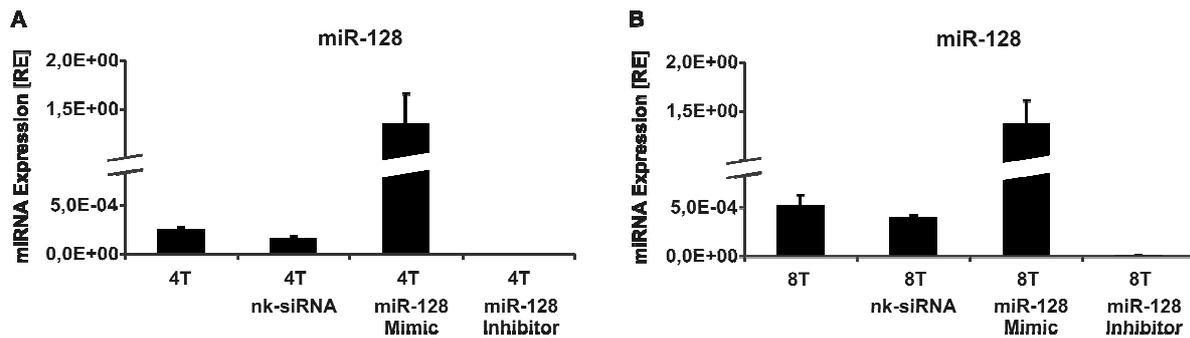


Abb. 3.13: Level der miR-128 nach Transfektion in primären HSC. Primärkulturen wurden jeweils an Tag 3 und Tag 7 mit miR-128 Mimic, miR-128 Inhibitor oder nk-siRNA transfiziert. Im Anschluss an die Zellyse nach 24 Stunden (4T) und 8T) wurde die RNA isoliert und der miR-128-Spiegel in den primären HSC mittels Real-Time PCR untersucht. Zu beiden Zeitpunkten war ein deutlicher Anstieg des miR-128-Level in miRNA Mimic behandelten HSC festzustellen. Ein gegenteiliger Effekt zeigte sich bei dem miR-128 Inhibitor. Normalisiert wurde gegen RNU6B. RE = relative Einheiten.

Zur Untersuchung resultierender differenzieller Genexpressionsmuster wurde dieser Versuch wie beschrieben wiederholt und die isolierte Gesamt-RNA aller Proben mittels Mikrofluidikanalyse auf ihre Intaktheit überprüft. Der RIN-Wert (RNA Integritätsnummer) von 9-10 bestätigte eine ausreichende Qualität für einen Hybridisierungs-Microarray zur Analyse der Expressionsprofile.

3.4.1.1 Expressionsprofile

Die Auswertung der Expressionsprofile in den miRNA behandelten, ruhenden und myofibroblastischen primären HSC zeigte „Cluster“ von dysregulierten mRNAs in den miR-128 behandelten Zellen im Vergleich zu den Kontrollen mit miR-128 Inhibitor und nk-siRNA (Abb. 3.14). Dabei waren als mögliche Zieltranskripte die herunterregulierten mRNAs (dargestellt in blau) von besonderem Interesse.

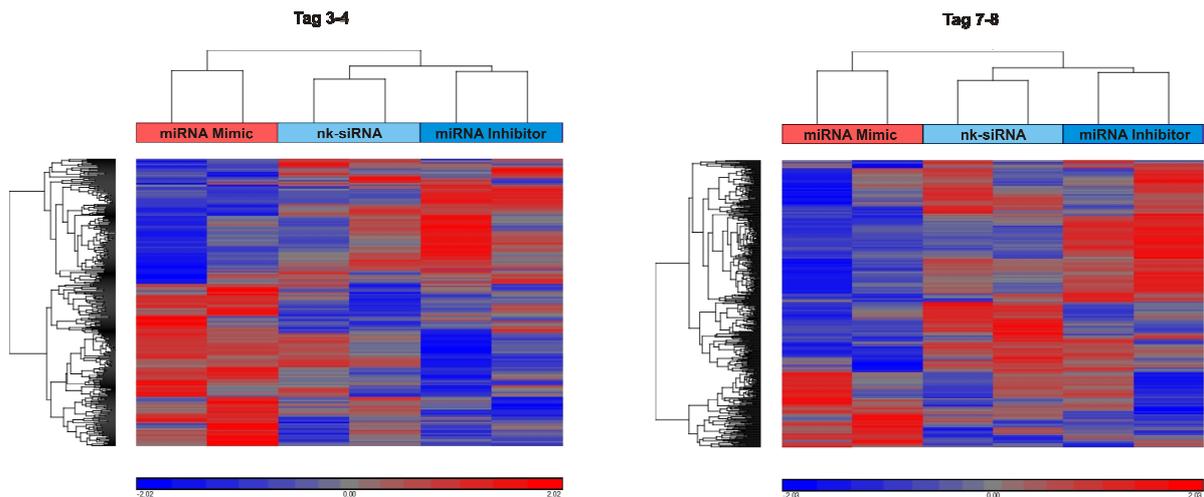


Abb. 3.14: „Cluster“-Analyse dysregulierter Transkripte nach miR-128 Transfektion. Nach miR-128 Transfektion zu zwei verschiedenen Zeitpunkten (Tag 4, Tag 8) der myofibroblastischen Transdifferenzierung von primären HSC aus der Ratte zeigte sich ein verändertes Expressionsmuster im Vergleich zu den Kontrollen (miR-128 Inhibitor, nk-siRNA). Dargestellt sind hochregulierte Transkripte in rot, herunterregulierte in blau. Der Filter lag bei einer 1,5-fachen Regulierung. Die Auswertung erfolgte über das Programm Partek (Partek Incorporated, St. Louis, MO, USA).

Die Auswertung des Microarrays zeigte eine hohe Anzahl an Mitgliedern der Chemokinfamilie, wie in Abbildung 3.15 dargestellt. Dabei lag sowohl bei Mitgliedern der CC- als auch der CXC-Familie zu beiden Zeitpunkten (3-4 und 7-8) der myofibroblastischen Differenzierung in den miR-128 überexprimierenden HSC eine Herunterregulierung vor.

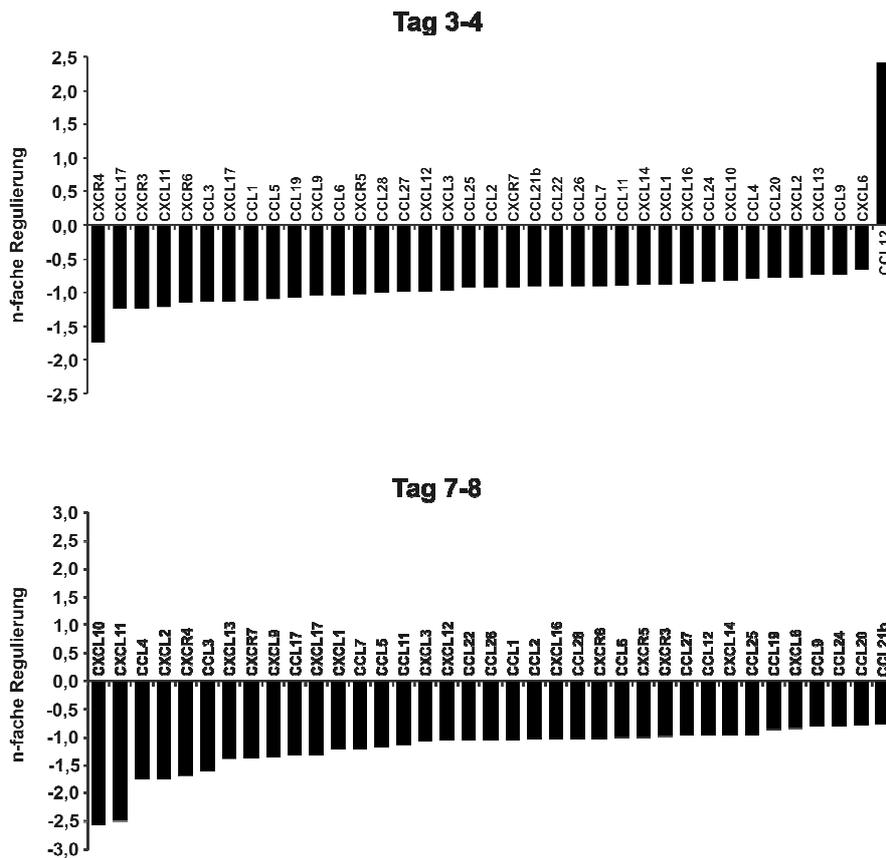


Abb 3.15: Chemokine als potenzielle Zieltranskripte von miR-128 (n-fache Regulierung). In der Auswertung zeigten die gefundenen Chemokine (bis auf *Ccl12*) sowohl an Tag 4 als auch Tag 8 eine negative Regulierung in den miR-128 Mimic behandelten, primären HSC im Vergleich zur Inhibitor-Kontrolle.

Von besonderem Interesse war, dass sich das bei der Datenbankanalyse aufgefallene Ziel *Klf4* (siehe Tab. 3.1) ebenfalls unter den herunterregulierten Transkripten für miR-128 befand, mit einer n-fachen Regulierung von -1,87 an Tag 4 und -5,11 an Tag 8.

3.4.2 Identifizierung potenzieller Zieltranskripte aufgrund der „Ago2-Interaktion“

Die reife einzelsträngige miRNA wird über das Ago-Protein in den *RNA-induced silencing complex* (RISC) inkorporiert und ist dann in der Lage, mit ihrem entsprechenden Zieltranskript zu interagieren. Argonaut 2 (Ago2) besitzt als einziges Protein der Argonaut-Familie eine Endonuklease-Aktivität. Bei der Ago2-Immunopräzipitation wurde diese Interaktion zwischen dem Ago-Protein, der miRNA

und assoziierter mRNA ausgenutzt, um den gebundenen RNA-Teil mit Hilfe eines Ago2-Antikörpers zu erhalten und aufzureinigen.

3.4.2.1 Charakterisierung der HSC-T6 Zelllinie für neuronale Marker

Zur Anwendung der Immunopräzipitation ist eine hohe Zellzahl erforderlich. Aus diesem Grund konnte dieser Versuch nicht mit primären myofibroblastischen Zellen, in welchen die neuronalen miRNAs miR-9, miR-125b und miR-128 stark exprimiert vorliegen (siehe Abb. 3.5), durchgeführt werden. Die immortalisierten HSC der Zelllinie HSC-T6 weisen typische Charakteristika gleich dem myofibroblastischen Zustand primärer HSC auf (Vogel *et al.* 2000; Kwiecinski *et al.* 2011) und konnten als myofibroblastische HSC verwendet werden. Da neuronale Eigenschaften an den HSC-T6 bisher nicht gezeigt wurden, sollten sie zunächst auf neuronale Marker untersucht werden. In der Vergangenheit wurden die Expressionsmuster von Synaptopodin, Neuregulin 1 und p75 NGF-Rezeptor für die Überprüfung an humanen HSC-Zelllinien herangezogen (Xu *et al.* 2005). Diese neuronalen Gene sollten hinsichtlich ihrer Expression in HSC-T6 über Real-Time PCR bestätigt werden. Die in Abbildung 3.16 dargestellten Ergebnisse zeigten das Vorhandensein der neuronalen Transkripte in den HSC-T6. Somit erfüllte diese immortalisierte Sternzelllinie die Voraussetzung zum Auffinden von Zieltranskripten neuronaler miRNAs über die Ago2-Immunopräzipitation.

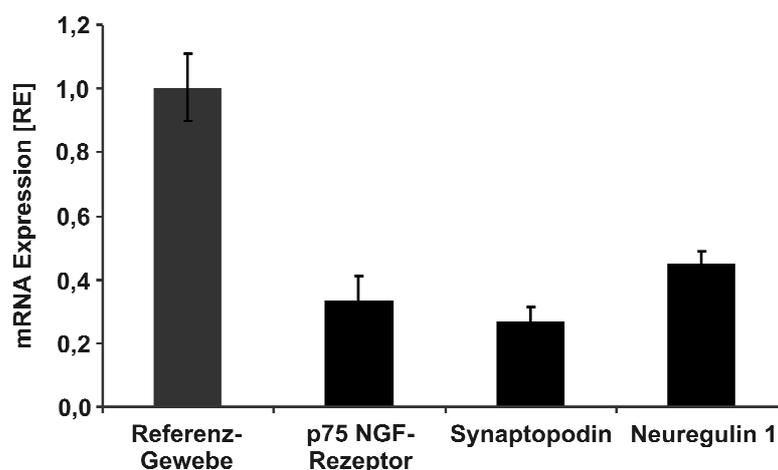


Abb. 3.16: Charakterisierung von HSC-T6 für neuronale Gene. Das Ergebnis der Real-Time PCR zeigte eine Expression von bestimmten neuronalen Genen in der myofibroblastischen Zelllinie HSC-T6 aus der Ratte. Als Referenz wurde Gesamtgewebe aus dem ZNS der Ratte verwendet. Zur Normalisierung diente HPRT. RE = relative Einheiten.

Um den geeigneten Zeitpunkt der Interaktion von Ago2, miRNA und mRNA für die Lyse der Zellen mit anschließender Transkriptanalyse annähernd bestimmen zu können, wurde ein Zeitverlauf zur Untersuchung des miRNA-Spiegels nach miRNA Mimic Transfektion durchgeführt. Hierbei wurden HSC-T6 Zellen mit der miR-128 Mimic oder der nk-siRNA transfiziert, sowie untransfizierte Zellen als Kontrolle verwendet. Diese wurden nach 2 h, 8 h, 24 h und 48 h lysiert und auf den miRNA-Spiegel mittels Real-Time PCR untersucht. Das Ergebnis stellte sich in Abbildung 3.17 wie folgt dar:

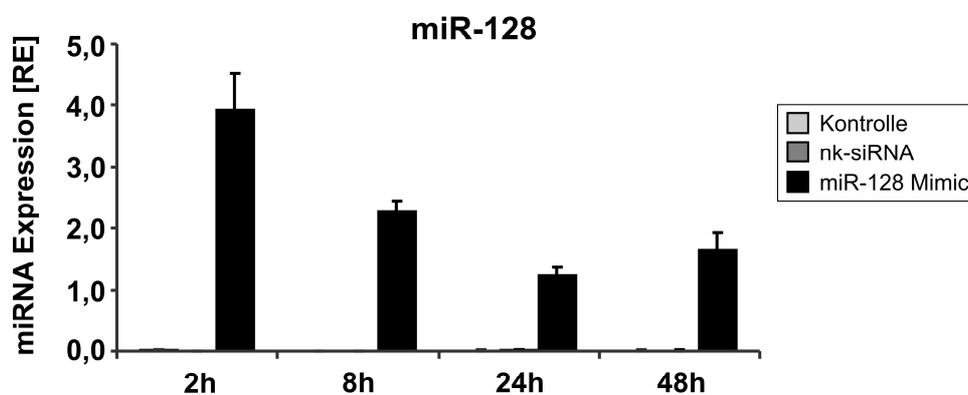


Abb. 3.17: Zeitverlauf nach miR-128 Mimic Transfektion. HSC-T6 Zellen wurden mit der miR-128 Mimic oder der nk-siRNA als Kontrolle transfiziert. Zusätzlich wurden untransfizierte Zellen als weitere Negativkontrolle verwendet. Im Laufe der Zeit zeigt sich eine Abnahme des miRNA-Level um fast 50 %. Normalisiert wurde gegen RNU6. RE = relative Einheiten.

In den miR-128 Mimic behandelten HSC-T6 Zellen zeigte sich nach zwei Stunden ein hoher miRNA-Spiegel, der sich im Verlauf nahezu auf die Hälfte reduzierte und sich bis zu 48 Stunden kaum veränderte. Die Expression sowohl in den nk-siRNA behandelten als auch den unbehandelten Zellen war demgegenüber verschwindend gering. Unter der Annahme, dass die transfizierte miRNA in den RISC zunächst inkorporiert werden muss und genau dieser Zustand der Interaktion von besonderem Interesse ist, wurde ein Zeitpunkt von 12 Stunden (s.o.) zur Lyse der Zellen nach Transfektion zur Durchführung der Immunopräzipitation ausgewählt. Spätere Zeitpunkte könnten einen schon stattgefundenen Abbau des Transkripts widerspiegeln, wobei der jeweilige „turnover“ der Transkripte vermutlich variiert.

3.4.2.2 Neue Zieltranskripte über Klonierung

In einem ersten Versuchsansatz sollten mit miRNA Mimic oder Inhibitor behandelte Zellen für die Ago2-Immunopräzipitation eingesetzt werden. Co-immunopräzipitierte RNA sollte aufgereinigt, als cDNA in Plasmide kloniert und anschließend die Plasmid-Klone durch direkte Sanger-Sequenzierung analysiert werden. Dafür wurden HSC-T6 Zellen zunächst bei einer Zellzahl von 8×10^6 mit der miR-128 Mimic oder dem Inhibitor als Negativkontrolle transfiziert. Die Wahl des Inhibitors als Kontrolle beruht bei diesem Ansatz auf einer angestrebten kompletten Inhibition auch endogen vorhandener miR-128 zum Erhalt einer höheren Differenz im Vergleich der resultierenden Transkriptmuster. Der Hintergrundlevel anderer endogener miRNAs, die möglicherweise an Ago2 der HSC binden, wird ebenfalls in der Inhibitor-Kontrolle berücksichtigt. Die transfizierten Zellen wurden nach 12 Stunden lysiert und mit einem anti-Ago2 Antikörper immobilisiert an Silica-*Beads* inkubiert. Im Anschluss an die Immunopräzipitation wurde die isolierte RNA mittels poly(T)-Primern revers transkribiert, um eine ausschließliche Umschreibung der polyadenylierten Transkripte zu erreichen. Diese wurden zur Anreicherung und besseren Detektion über PCR zunächst amplifiziert und nach Klonierung in den 2.1 TOPO[®] Vektor sequenziert (siehe 2.5.2). Zur Austestung der Methode wurden 100 Klone sowohl der miR-128 Mimic als auch miR-128 Inhibitor behandelten Zellen über Sequenzierung analysiert. In beiden Ansätzen konnten beim Abgleich der erhaltenen Sequenzen mit Sequenzdatenbanken (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov) ausschließlich mRNA-Sequenzen identifiziert werden. Beim Vergleich der beiden erstellten Transkriptprofile zeigten sich 67 mRNAs, die mindestens eine 1,5-fache Veränderung aufwiesen oder nur in den miR-128 Mimic behandelten Zellen vorlagen (Abb. 3.18). Unter diesen abgefangenen Zieltranskripten befanden sich für miR-128 auch bei diesem Versuchsansatz Mitglieder der Chemokin-Familie: *Ccr5* (1,7-fach), *Cxcl10* (3-fach) und *Ccl2* (5-fach).

Damit kann festgehalten werden, dass durch die Ago2-Immunopräzipitation erfolgreich RISC gebundene Transkripte kloniert und analysiert werden können. Da von der Plasmid-Bibliothek nur eine limitierte Anzahl von Klonen analysiert werden konnten, sollte der Ansatz im Weiteren durch klonale Analyse mit Hilfe des NGS durchgeführt werden.

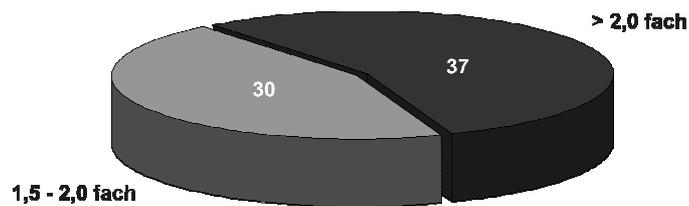


Abb. 3.18: Verteilung der 67 identifizierten Transkripte mit einer Regulierung > 1,5 oder > 2,0. Über die Ago2-Immunopräzipitation nach miR-128 Transfektion in HSC-T6 Zellen wurden Zieltranskripte mittels Klonierung und anschließender Sequenzierung analysiert. Dabei zeigten 30 Transkripte eine 1,5 – 2-fache Veränderung, sowie 37 Transkripte eine > 2-fache Regulierung in den miR-128 behandelten Zellen im Vergleich zu den Inhibitor behandelten Kontrollzellen.

3.4.2.3 Neue Zieltranskripte über *Next Generation Sequencing*

Nachdem durch den ersten Versuchsansatz gezeigt werden konnte, dass Mitglieder der Chemokinfamilie an Ago2 aus miR-128 behandelten Zellen assoziiert waren, wurden nun die Ago2 interagierenden Transkripte nicht kloniert, sondern durch NGS untersucht. Hierfür wurden HSC-T6 Zellen mit der Mimic oder der Inhibitor miRNA der miR-9, miR-125b und miR-128 in drei unabhängigen Versuchen transfiziert. Mögliche Zieltranskripte sollten dann über klonale Amplifikation mit Hilfe des NGS ermittelt werden. Da in diesen Ansätzen von einer sehr geringen präzipitierten RNA-Menge ausgegangen wurde, fand nach reverser Transkription zunächst ein Präamplifikationsschritt statt. Die im Anschluss hergestellte Adapter-cDNA-Bibliothek wurde dann in einem Multiplex-Ansatz mit Hilfe der Illumina-Plattform sequenziert (siehe 2.6). Als Ergebnis konnten für jeden der miRNA-Versuchsansätze um die 250 Transkripte identifiziert werden, wobei die Verteilungen der normalisierten RPKM-Werte (*reads per kilobase per million mapped reads*) eine leichte Varianz zwischen den jeweiligen Experimenten (I, II und III) in der graphischen Darstellung aufwiesen (siehe Abb. 3.27 im Anhang).

Die Auswertung der Versuche für jede der miRNAs zeigte ein einheitliches „*Cluster*“ von Transkripten, die in den miRNA Mimic transfizierten Zellen im Vergleich zu den Inhibitor transfizierten Zellen erhöht vorlagen. Es wurden über diese Methode für die miR-9, miR-125b und miR-128 zwischen 80-120 Zieltranskripte abgefangen, die eine Regulierung $> 1,5$ und Signifikanz mit unangepasstem p-Wert $< 0,05$ aufwiesen (Abb. 3.19).

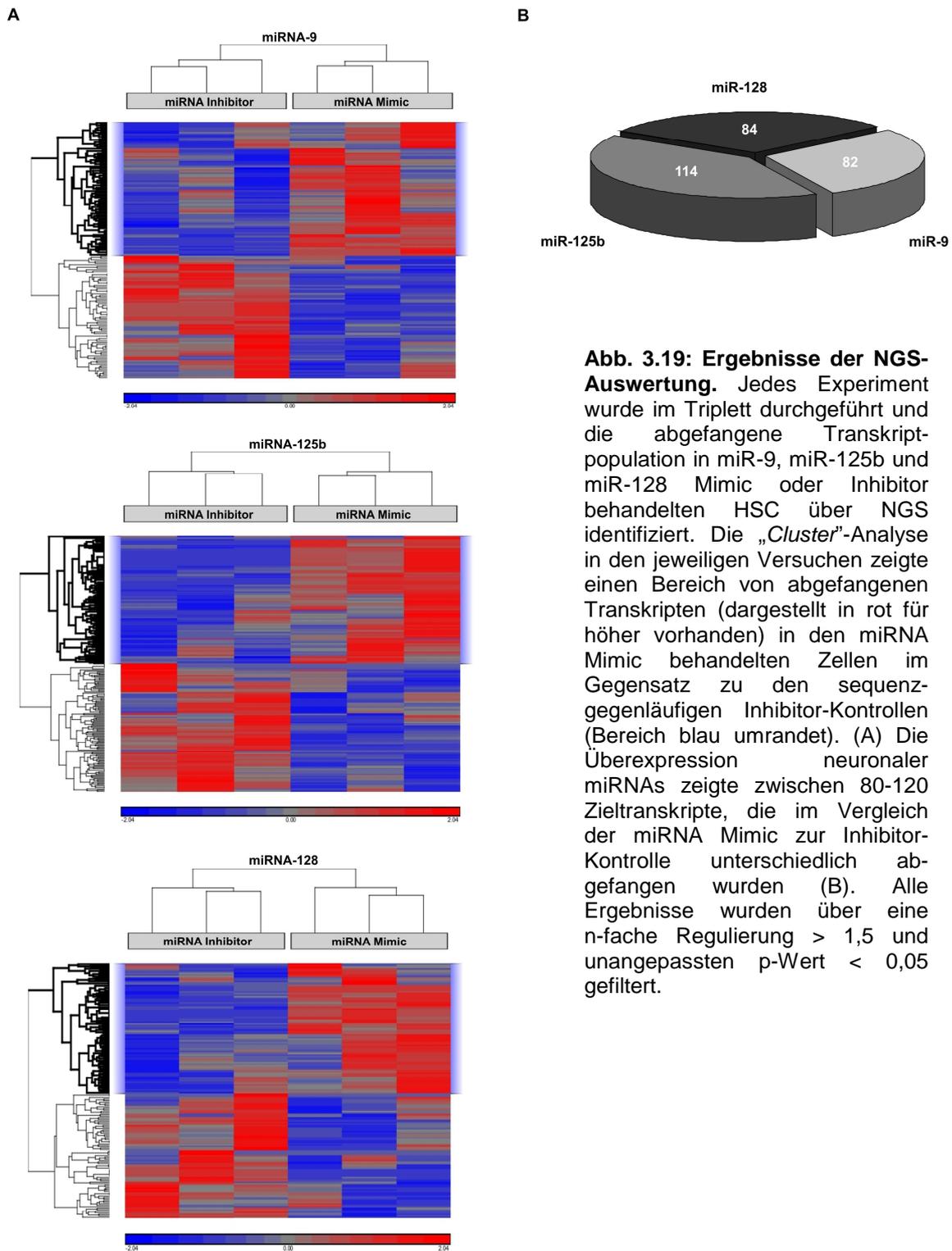


Abb. 3.19: Ergebnisse der NGS-Auswertung. Jedes Experiment wurde im Triplet durchgeföhrt und die abgefängene Transkriptpopulation in miR-9, miR-125b und miR-128 Mimic oder Inhibitor behandelten HSC über NGS identifiziert. Die „Cluster“-Analyse in den jeweiligen Versuchen zeigte einen Bereich von abgefängenen Transkripten (dargestellt in rot für höher vorhanden) in den miRNA Mimic behandelten Zellen im Gegensatz zu den sequenzgegenläufigen Inhibitor-Kontrollen (Bereich blau umrandet). (A) Die Überexpression neuronaler miRNAs zeigte zwischen 80-120 Zieltranskripte, die im Vergleich der miRNA Mimic zur Inhibitor-Kontrolle unterschiedlich abgefängene wurden (B). Alle Ergebnisse wurden über eine n-fache Regulierung > 1,5 und unangepassten p-Wert < 0,05 gefiltert.

Beim Vergleich der gefundenen mRNAs aus der Immunopräzipitation mit den in der Datenbank TargetScan gelisteten Transkripten für miR-9, miR-125b und miR-128 zeigten sich zum einen Übereinstimmungen, zum anderen aber auch eine Vielzahl

neu gefundener Zieltranskripte. Unter Berücksichtigung einer Signifikanz $< 0,2$ konnten erneut Chemokin-Mitglieder als Ziele der neuronalen miRNAs gefunden werden. Dabei handelte es sich vor allem um Mitglieder der CXC-Familie. Einen Überblick darüber verschafft Tabelle 3.2.

Tab. 3.2: Mitglieder der Chemokin-Familie unter den abgefangenen Zieltranskripten

miRNA	Transkript	n-fache Regulierung	p-Wert
<i>miR-9</i>	<i>Cxcr5</i>	3,74E+16	0,06
	<i>Cxcl6</i>	1,31E+16	0,19
<i>miR-125b</i>	<i>Cxcl2</i>	2,69	0,13
	<i>Cxcl1</i>	1,98	0,03
<i>miR-128</i>	<i>Cxcl2</i>	1,80	0,16
	<i>Ccl5</i>	1,78	0,14
	<i>Cxcl11</i>	1,75	0,16
	<i>Ccl4</i>	1,61	0,18

3.5 *Ccl2* als mögliches Zieltranskript der neuronalen miR-128

Obwohl *Ccl2* bei der Analyse mittels NGS nicht vorkam, wurde es häufig bei der klonalen Sequenzierung und dem Microarray gefunden. Da die Chemokine generell über diese Versuchsansätze als Zieltranskripte identifiziert wurden, sollte *Ccl2* als prädominantes Chemokin der Leber weiter untersucht werden (Friedman 2000; Friedman 2003).

3.5.1 miR-128 bindet an die mRNA von *Ccl2*

Um eine Interaktion zwischen der miR-128 und dem Chemokin-Liganden *Ccl2* zu untersuchen, wurde ein Luziferase-Reporterassay durchgeführt. Aufgrund fehlender Information aus Datenbanken wurde die gesamte mRNA auf mögliche Interaktionsstellen mit der *seed*-Region von miR-128 überprüft. Dabei zeigten sich auch in der kodierenden Sequenz der *Ccl2*-mRNA mögliche Bindungsstellen, weshalb die komplette mRNA dieses potenziellen Zieltranskripts über spezifische

Primer aus Lebergewebe der Ratte mittels PCR amplifiziert und nach Prüfung der Sequenz in den Reportervektor kloniert wurde. Das Ergebnis nach Transfektion des Reporterplasmids und der miR-128 Mimic in HEK-293 Zellen deutete auf eine Interaktion der miR-128 mit der *Ccl2*-Sequenz hin, wobei der Effekt moderat, aber signifikant war ($p < 0,005$) (Abb. 3.20). Das Chemokin konnte funktionell als Zieltranskript der miR-128 dargestellt werden. Die genaue Bestimmung zur Lage der Bindungsregion wurde dabei nicht weiter verfolgt.

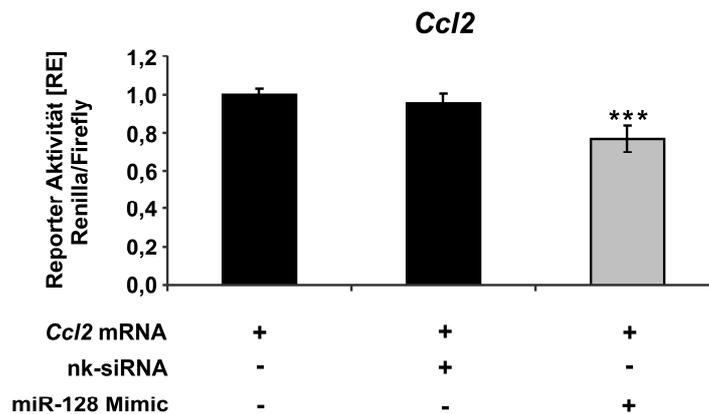


Abb. 3.20: Ergebnis des dualen Luziferase-Assays für *Ccl2*. Die mRNA-Sequenz von *Ccl2* wurde in den Reportervektor kloniert und dieser in HEK-293 Zellen transfiziert. Nur die Transfektion von Reporterplasmid und miR-128 Mimic weist eine verringerte Luziferase-Aktivität auf. Bei Co-Transfektion von Reporter und nk-siRNA konnte kein Effekt festgestellt werden. RE = relative Einheiten.

3.5.2 *Ccl2* Expression während der myofibroblastischen Transdifferenzierung

Um eine Aussage zur *Ccl2* Expression während der myofibroblastischen Transdifferenzierung von primären HSC machen zu können, wurde der Expressionslevel mittels Real-Time PCR zu verschiedenen Zeitpunkten der *in vitro*-Primärkultur bestimmt. Wie in Abbildung 3.21 dargestellt, zeigte sich eine deutliche Abnahme der Expression von *Ccl2* auf fast ein Zehntel während der Differenzierung.

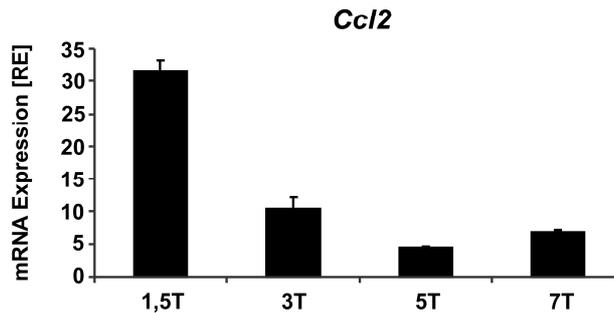


Abb. 3.21: Expressionslevel von *Cc12* während der Transdifferenzierung primärer HSC. Im Verlauf der Differenzierung zeigte sich in der Real-Time PCR eine deutliche Abnahme in der Expression von *Cc12*. Normalisiert wurde gegen HPRT. RE = relative Einheiten.

3.6 *Notch1* als Zieltranskript

Mit Hilfe des NGS konnten abgefangene Zieltranskripte aus der Ago2-Immunopräzipitation identifiziert werden. Dabei stellte sich in den miR-9 und miR-128 behandelten Zellen der Transmembranrezeptor *Notch1* als gemeinsame Ziel-mRNA heraus. Ein Abgleich mit der TargetScan Datenbank bekräftigte diese potenzielle Interaktion und gab auch für miR-125b eine Bindungsregion in der 3'-UTR von *Notch1* an (siehe auch Tab. 3.1).

3.6.1 miR-9, miR-125b und miR-128 binden an die 3'-UTR von *Notch1*

Zur Überprüfung dieses Ergebnisses wurden die in TargetScan angegebenen *seed*-Regionen in der 3'-UTR von *Notch1* für die neuronalen miRNAs unverändert und mit zwei eingefügten Punktmutationen im Bereich der Bindungsregion als Oligodimere in den Reportervektor kloniert (Abb. 3.22 A, C, E). Die in Abbildung 3.22 dargestellten Ergebnisse des Luziferase-Reporterassays zeigten bei Transfektion der jeweiligen miRNA Mimic mit dem Reporterplasmid für miR-9 (B), miR-125b (D) und miR-128 (F) eine deutliche Verringerung der Lumineszenz.

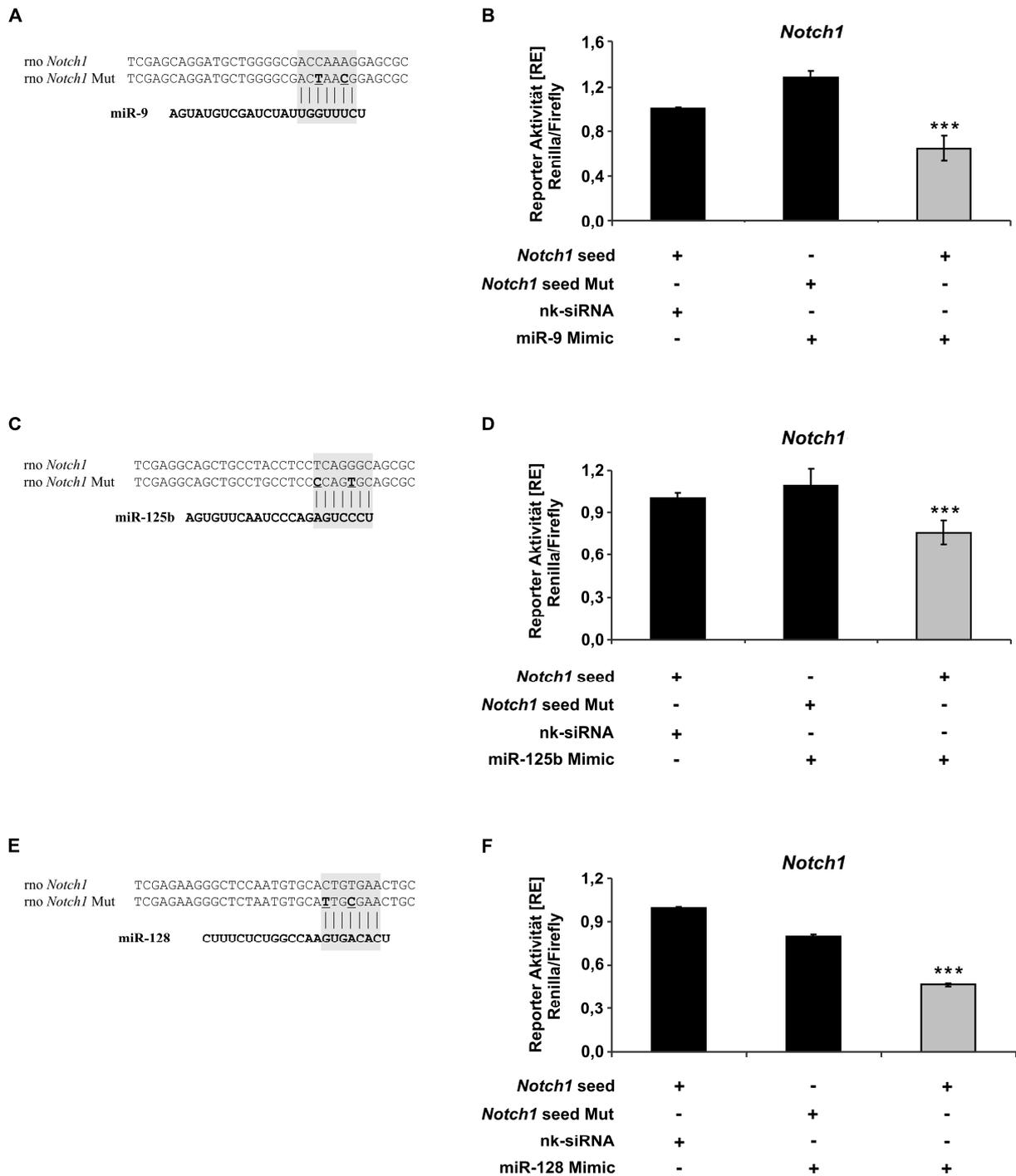


Abb. 3.22: Ergebnisse des dualen Luziferase-Reporterassays für *Notch1*. Im Reportervektor wurde entweder die Bindungsregion aus der *Notch1* 3'-UTR oder die gleiche Sequenz mit zwei eingefügten Punktmutationen (ausgetauschte Nukleotide fett und unterstrichen dargestellt) für miR-9 (A), miR-125b (C) oder miR-128 (E) in HEK-293 Zellen transfiziert. Es zeigte sich im Falle einer Co-Transfektion von Reporterplasmid und nk-siRNA sowie mutiertem Reporterplasmid und einer miRNA Mimic eine vorhandene Renilla-Luziferase-Aktivität. Transfektion von Reporterplasmid und entsprechender miRNA führte bei allen drei miRNAs zu einer verringerten Luziferase-Aktivität (B, D, F). RE = relative Einheiten.

3.6.2 Einfluss der neuronalen miRNAs auf die *Notch1* Expression

Des Weiteren wurde die *Notch1* Expression nach Manipulation der endogenen miRNA-Level von miR-9, miR-125b und miR-128 untersucht. Die zuvor erhaltenen Daten zeigten eine Interaktion der miRNAs mit dem *Notch1* Transkript über entsprechende Regionen in der 3'-UTR. Dieser Effekt wurde nach Transfektion der drei neuronalen miRNAs als Mimic oder Inhibitor sowohl in getrennten als auch einem gemeinsamen Ansatz in frisch isolierten HSC auf mögliche Veränderungen des *Notch1*-Levels überprüft. Hierzu wurden primäre HSC an Tag 2 transfiziert und der *Notch1*-Transkriptlevel nach 24 Stunden (Tag 3) über Real-Time PCR ermittelt. Das Ergebnis zeigt Abbildung 3.23. Mit Ausnahme der miR-9 war bei der Behandlung von HSC mit dem miRNA Inhibitor ein deutlicher Anstieg in der *Notch1* Expression zu verzeichnen. Gleiches war bei der gemeinsamen Einbringung aller drei Inhibitoren von miR-9, miR-125b und miR-128 in die primären HSC erkennbar. Sowohl die Transfektion der jeweiligen miRNA Mimic als auch die Kombination aus allen schien jedoch keinen inhibierenden Einfluss auf die *Notch1* Expression in der Primärkultur auszuüben.

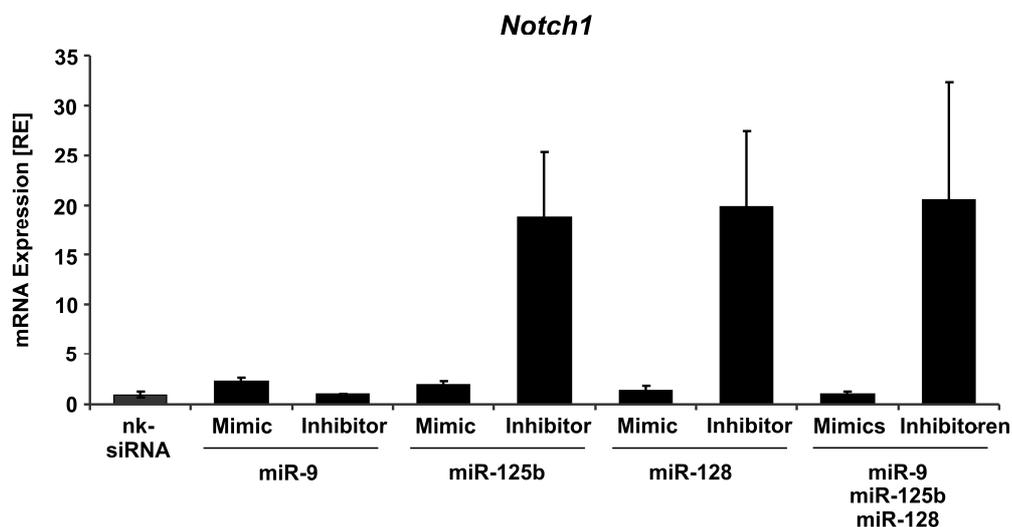


Abb. 3.23: *Notch1* Expression nach Transfektion der neuronalen miRNA Mimics oder Inhibitoren in primäre HSC. Die Transfektion erfolgte an Tag 2 der Primärkultur und die Detektion des *Notch1*-Level 24 Stunden später an Tag 3. Über quantitative Real-Time PCR konnte ein positiver Effekt auf den *Notch1*-Transkriptspiegel nach Transfektion des miR-125b oder miR-128b Inhibitors dargestellt werden. Normalisiert wurde gegen HPRT. RE = relative Einheiten.

3.6.3 *Notch1* Expression während der myofibroblastischen Transdifferenzierung

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die neuronalen miRNAs mit der 3'-UTR von *Notch1* interagieren, sollte die Expression von *Notch1* während der myofibroblastischen Transdifferenzierung untersucht werden. Falls es sich bei *Notch1* um ein Zieltranskript der neuronalen miRNAs handelt, sollte es entsprechend der Zunahme von miR-9, miR-125b und miR-128 während der Transdifferenzierung in der Expression abnehmen. Um das zu überprüfen, wurde der Expressionslevel von *Notch1* zu vier Zeitpunkten von 1,5 bis zu 7 Tagen in einer Primärkultur mittels Real-Time PCR untersucht. Die Abbildung 3.24 zeigt eine sehr deutliche Abnahme in der Expression von *Notch1* im Zeitverlauf der Differenzierung auf nahezu 10 %.

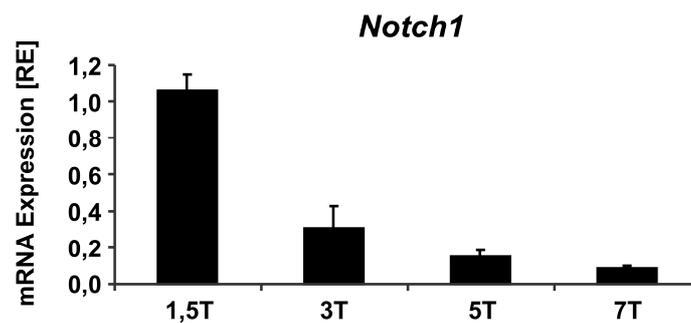
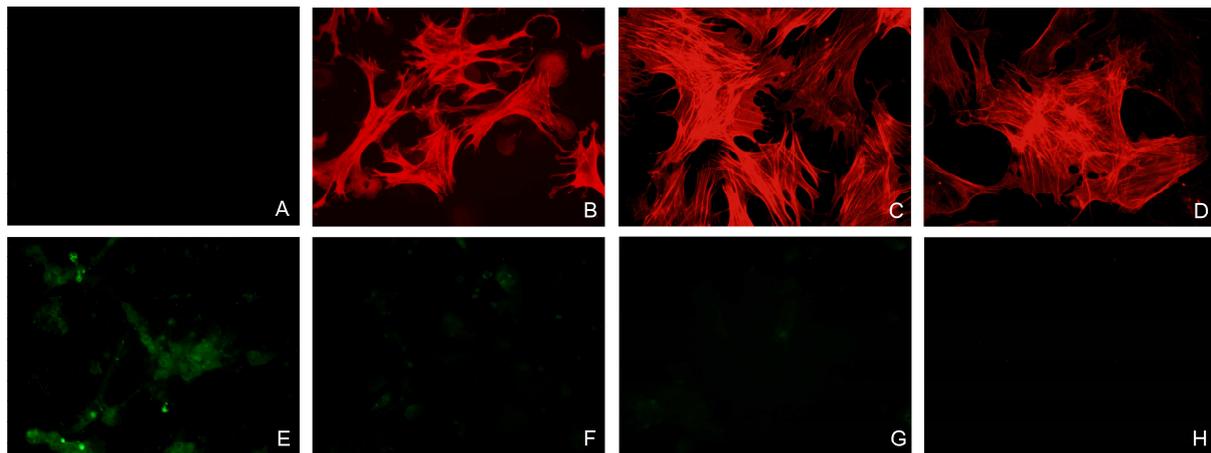


Abb. 3.24: Expressionslevel von *Notch1* während der Transdifferenzierung primärer HSC. Als Ergebnis der Real-Time PCR zeigte sich eine starke Abnahme von *Notch1* von Tag 1,5 auf Tag 7. Normalisiert wurde gegen HPRT. RE = relative Einheiten.

Um die Abnahme von *Notch1* ebenfalls auf Proteinebene zu untersuchen, wurden immunzytochemische Färbungen an Tag 1,5 (A; E), 3 (B; F), 5 (C; G) und 9 (D; H) einer primären HSC-Kultur durchgeführt (Abb. 3.25). Zum Nachweis der *in vitro* induzierten, myofibroblastischen Transdifferenzierung der Zellen wurde ein SMA-Antikörper verwendet. Die Zunahme der α -SMA Expression nach myofibroblastischer HSC Aktivierung war deutlich erkennbar (A-D). Die Notch1-Antikörperfärbung zeigte das Notch1 Protein in ruhenden, aber nicht myofibroblastischen HSC (E-H).



┃ 50 μ m

Abb. 3.25: Immunzytochemische Färbungen primärer HSC aus der Ratte. Antikörperfärbungen gegen α -SMA an den Tagen 1,5, 3, 5 und 9 der myofibroblastischen Transdifferenzierung einer Primärkultur *in vitro* zeigten eine deutliche Zunahme in der Expression und spiegelten darüber hinaus den Differenzierungsstatus wider (A-D). Über immunzytochemische Färbungen mit einem Notch1-Antikörper war eine Expression des Proteins an Tag 1,5 sehr gut erkennbar, die im Zeitverlauf bis Tag 9 abklang (E-H).

4. Diskussion

HSC stellen in der Leberfibrogenese nach ihrer Aktivierung aufgrund der Deposition extrazellulärer Matrix den zentralen Zelltyp dar. Zu ihren zahlreichen phänotypischen Eigenschaften zählt auch die Expression neuronaler Marker während der Transdifferenzierung in Myofibroblasten.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine erhöhte Expression von drei miRNAs, miR-9, miR-125b und miR-128, die vorwiegend neuronal vorkommen, während der myofibroblastischen Differenzierung von HSC nachgewiesen. Für die Identifizierung von Zieltranskripten dieser neuronalen miRNAs wurde neben einer *in silico*-Sichtung ein neuer Ansatz gewählt, in dem die RISC assoziierten Transkripte durch Ago2-Immunopräzipitation angereichert und anschließend durch NGS analysiert wurden. Mit Hilfe dieser unterschiedlichen strategischen Ansätze wurde erstmals der regulatorische Einfluss neuronaler miRNAs auf die Expression eines weiten Spektrums an Chemokinen und Chemokin-Rezeptoren, aber auch von Mediatoren wie Lin28, Klf4 und Notch1, die an der Ausprägung von pluripotenten Eigenschaften beteiligt sind, dargelegt.

4.1 Expression neuronaler miRNAs in HSC

Für die hier vorgestellte Analyse zur Expression neuronaler miRNAs in HSC wurde ein primäres Zellsystem verwendet. Durch eine umfangreiche Profilanalyse von *in vitro* und *in vivo* myofibroblastisch differenzierter HSC konnte nachgewiesen werden, dass die Expressionsmuster kultivierter, myofibroblastischer HSC mit denen von myofibroblastischen Zellen in der Fibrogenese weitgehend übereinstimmen (Liu *et al.* 2004). Daher gilt die Kultur von isolierten HSC über eine Spanne von 12-14 Tagen als ein geeignetes Zellkultursystem, um Abläufe der Fibrogenese *in vitro* nachzuahmen.

Die im Labor etablierte Zellisolierungsmethode zeigte, in Übereinstimmung zu anderen Arbeitsgruppen, bei den isolierten HSC entsprechende Charakteristika während der *in vitro* induzierten myofibroblastischen Transdifferenzierung wie z.B.

einen Anstieg in der Expression von α -SMA und GFAP (Abb. 3.4) (Ramadori *et al.* 1990; Neubauer *et al.* 1996). Die Analyse von zelltypspezifischen Markern machte deutlich, dass nach dem dritten Kulturtag eine Kontamination von anderen Leberzelltypen geringer als 10 % vorlag. Daher waren alle notwendigen Voraussetzungen geschaffen worden, um die Expression der neuronalen miRNAs *in vitro* während der myofibroblastischen Differenzierung zu messen.

Die Ergebnisse zeigten eine deutliche Zunahme in der Expression von drei bekannten neuronalen miRNAs, miR-9, miR-125b und miR-128, während der myofibroblastischen Transdifferenzierung von primären HSC sowohl der Ratte (Abb. 3.5) als auch des Menschen (Abb. 3.6). Aus anderen Arbeiten ist eine Beteiligung dieser neuronalen miRNAs vor allem in der neuronalen Transdifferenzierung bekannt. So zeigten Studien an Vorläufer- oder Stammzellen, dass diese miRNAs die neuronale Differenzierung durch Hemmung von Zielgenen wie neuronalen Transkriptionsfaktoren oder Signaltransduktoren fördern (Zhang *et al.* 2009; Zhao *et al.* 2009; Edbauer *et al.* 2010; Shibata *et al.* 2011). Ein Zieltranskript stellt dabei *Lin28* dar. Die Arbeit von Eda *et al.* zeigte in embryonalen Karzinomzellen der Mauszelllinie P19 eine durch miR-125b und miR-9 vermittelte Reduktion in der *Lin28* Expression (Eda *et al.* 2009). Da *Lin28* vor allem die Expression von *let-7* beeinflusst, kommt es durch den Verlust von *Lin28* zur erhöhten *let-7* Expression. *Let-7* ist wiederum verantwortlich für die Inhibierung eines weiteren transkriptionsregulierenden Faktors (*Hmga2*), wodurch die neuronale Differenzierung in den P19-Zellen ermöglicht wurde. Der Nachweis der zunehmenden Expression dieser neuronalen miRNAs während der Transdifferenzierung von HSC stellt daher einen interessanten Hinweis dar, dass sie möglicherweise auch an phänotypischen Veränderungen der HSC während der myofibroblastischen Differenzierung beteiligt sind. Denn auch den HSC wurden in der Vergangenheit, zusätzlich zu ihrer astrozytenähnlichen Morphologie im ruhenden Zustand, neuronale Eigenschaften zugeschrieben (Geerts 2001). Im Jahre 1996 wurde als erstes über die Expression von GFAP in HSC berichtet (Neubauer *et al.* 1996). Drei Jahre darauf entdeckte Niki *et al.* die Expression von Nestin, ein bekanntes Intermediärfilamentprotein aus Nervenzellen, in HSC (Niki *et al.* 1999). Des Weiteren dokumentierte Cassiman *et al.* in seinen Arbeiten die Expression von Neutrophinen und ihren entsprechenden Rezeptoren in HSC (Cassiman *et al.* 2001). Zusätzlich fand er Synaptophysin als

neuronalen Marker in diesen Zellen (Cassiman *et al.* 1999). Die Bedeutung dieser neuronalen Eigenschaften von HSC während der myofibroblastischen Differenzierung ist bisher noch ungeklärt.

4.2 Experimentelle Identifizierung von miRNA Zieldomänen

Neben der *in silico*-Vorhersage zur Sichtung oder Identifizierung von Zieltranskripten der neuronalen miRNAs wurden zwei weitere methodische Ansätze zur *in vitro*-Analyse angewendet.

Einen ersten Ansatz zur Zielsuche stellte das Durchsuchen verschiedener Datenbanken dar, die potenzielle Transkripte über Algorithmen-Berechnungen darstellen (*in silico*). Sie sind in ihrer Aussagekraft jedoch ohne funktionelle Analysen meist nicht verlässlich, wie in Reporteranalysen *in vitro* nachgewiesen werden konnte (Bartel 2004). Die innerhalb dieser Arbeit vorgestellten *in vitro*-Ansätze wurden nach Modifizierung des endogenen miRNA-Gehalts durch Transfektion mit der entsprechenden Mimic- oder Inhibitor-miRNA durchgeführt. Auf diese Weise können direkte oder indirekte Einflüsse auf den Transkriptspiegel einer Vielzahl von Genen nachgewiesen werden. Die resultierenden Expressionsprofile wurden mittels Hybridisierungsarray-Analyse untersucht, um miRNA bedingte Veränderungen im Transkriptlevel zu analysieren.

Zum Nachweis einer direkten Interaktion der neuronalen miRNAs mit ihren Zieltranskripten wurde erstmals die Ago2-Immunopräzipitation mit einer anschließenden Analyse durchgeführt. In diesem Ansatz wurden die endogenen miRNA-Level der myofibroblastischen Sternzelllinie HSC-T6 zuvor durch Transfektion der miRNA Mimic oder dem Inhibitor manipuliert. HSC-T6 Zellen repräsentieren den myofibroblastischen Phänotyp von HSC (Kwiecinski *et al.* 2011) und weisen gleich den Primärkulturen eine Expression neuronaler Gene auf (Abb. 3.16). Die in dieser Arbeit angewendete Methode der Ago2-Immunopräzipitation wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen beschrieben. Sie zeigten, dass mittels Verwendung von Antikörpern gegen Mitglieder der Argonaut-Proteinfamilie ebenfalls die an Ago-gebundenen miRNA/mRNA-Komplexe co-immunopräzipitiert werden

können (Beitzinger *et al.* 2007; Easow *et al.* 2007). Die abgefangenen Zieltranskripte können dann, wie von Beitzinger *et al.* beschrieben, über cDNA-Klonierung und folgender Sequenzierung einer limitierten Anzahl von Klonen analysiert werden. Andere Arbeiten untersuchten die miRNA/Transkript-Interaktion über Hybridisierungsanalysen der Ago2-präzipitierten Transkripte nach vorheriger Transfektion der zu untersuchenden miRNA in einen geeigneten Zelltyp, wie es auch in dieser Arbeit durchgeführt wurde (Karginov *et al.* 2007; Hendrickson *et al.* 2008; Wang *et al.* 2010). Insgesamt ermöglicht die Ago2-Immunopräzipitation demnach eine direkte Identifizierung physiologischer Zieltranskripte von miRNAs über den Ago2-miRNA/Transkript-Komplex.

Zunächst wurden immunopräzipitierte mRNAs in Anlehnung an die Arbeit von Beitzinger *et al.* über Klonierung und Transformation in *E. coli* sequenziert (Beitzinger *et al.* 2007). Die von hundert Klonen identifizierten 67 mRNAs, die nach Transfektion mit miR-128 angereichert vorlagen, zeigten, dass durch diesen Ansatz Zieltranskripte identifiziert werden können. Jedoch konnten nur begrenzte Zahlen an Klonen analysiert werden. Auch von Beitzinger *et al.* wurde nach Klonierung nur eine begrenzte Anzahl an Klonen untersucht. Daher wurde von anderen Arbeitsgruppen die Analyse von Ago2-co-präzipitierten Transkripten mit Hilfe eines Microarrays beschrieben (Karginov *et al.* 2007; Hendrickson *et al.* 2008; Wang *et al.* 2010). Diese Vorgehensweise hat den Nachteil, dass große Mengen an RNA mit hoher Qualität benötigt werden. Bei einer Hybridisierung im Microarray sind immobilisierte Sonden nur in der Lage, die ihnen entsprechenden Sequenzbereiche abzufangen. cDNA-Bruchstücke können hierbei verloren gehen.

Aus diesem Grund wurde ein neuer Ansatz durchgeführt. Hierbei wurde die Methode des *Next Generation Sequencing* (NGS) zur Identifizierung von Zieltranskripten nach Transfektion der neuronalen miRNAs in myofibroblastische HSC und folgender Ago2-Immunopräzipitation angewendet. Im Vergleich zur Sequenzierung von Plasmid-Klonen bietet NGS die Generierung einer viel größeren Datenmenge, so dass die direkt an den RISC gebundenen Transkripte umfangreich erfasst werden können. Durch diese höhere Quantität und auch Sensitivität, aufgrund vorgeschalteter klonaler Amplifikation über Brückenamplifikation, birgt diese Methode sowohl gegenüber der Bakterienklon-Sequenzierung als auch dem Microarray enorme Vorteile. Des Weiteren können die erhaltenen Datenmengen im Anschluss nach n-facher Regulierung und Signifikanz zur Übersicht gefiltert werden.

4.3 miR-128 beeinflusst die Expression einer Vielzahl von Chemokinen und Chemokin-Rezeptoren

Anhand der Profilanalyse nach Überexpression von miR-128 konnten Veränderungen in der Genexpression festgestellt werden. Davon waren im späteren Stadium der myofibroblastischen Differenzierung 397 mRNAs herunterreguliert, im früheren Stadium lag die Anzahl bei 157. Als auffälligste Gruppe stellten sich Mitglieder der Chemokinfamilie dar. Ihr Transkriptlevel war besonders nach der miRNA Überexpression zu einem späteren Zeitpunkt der Transdifferenzierung (Tag 7-8) *in vitro* verringert (Abb. 3.15). Die Chemokine bestätigten sich des Weiteren in den Ergebnissen der Immunopräzipitation als Zieltranskripte für miR-128 und auch miR-9 und miR-125b. Es konnte eine Bindung von miR-128 an den Chemokin-Liganden *Ccl2* nachgewiesen werden (Abb. 3.20), obgleich *Ccl2* in den Datenbanken nicht als Ziel-mRNA für miR-128 aufgeführt ist. Während der myofibroblastischen Differenzierung von HSC konnte für *Ccl2* eine deutlich abnehmende Expression gezeigt werden (Abb. 3.21), wohingegen miR-128, wie zuvor beschrieben, gegenläufig ansteigt. In Übereinstimmung zu diesem Ergebnis zeigte sich auch für weitere Familienmitglieder, wie *Cxcl10*, *Cxcr4* und *Cxcr7*, eine Inhibierung durch erhöhte miR-128-Level in myofibroblastischen HSC (Noetel *et al.* 2012). Aus vorherigen Studien ist bereits bekannt, dass HSC eine Rolle in der Immunantwort der geschädigten Leber spielen. Sie exprimieren den Rezeptor *Cxcr3* und reagieren auf eine Stimulierung mit dem Liganden *Cxcl10* mit einer erhöhten Migration (Bonacchi *et al.* 2001). Demgegenüber bewirkt eine Stimulierung mit *Cxcl9*, einem weiteren Liganden von *Cxcr3*, einen antifibrotischen Effekt durch Hemmung der Kollagen Expression. Diese antifibrogene Wirkung konnte in *Cxcr3* knockout-Mäusen mit einer assoziierten, erhöhten Fibrose bestätigt werden (Wasmuth *et al.* 2009). Für die Chemokin-Rezeptoren *Ccr1* und *Ccr5* werden in HSC verschiedener Spezies unterschiedliche Rollen beschrieben. Während nach Aktivierung des *Ccr5* bei humanen HSC ihre Migration und Proliferation gefördert wird (Schwabe *et al.* 2003), kommt es bei den HSC der Maus nur zu einer geringen Antwort (Seki *et al.* 2009). Im Widerspruch zu den *in vivo*-Daten (Holt *et al.* 2009; Hong *et al.* 2009) legt die Expressionsanalyse von *Ccl2* (Abb. 3.21) nahe, dass *Ccl2* während der *in vitro* induzierten, myofibroblastischen Differenzierung herunterreguliert wird. *Ccl2* liegt in der Fibrose allgemein vermehrt vor (Marra *et al.* 1993). Daneben berichteten

Arbeitsgruppen, dass die Ccl2-Sezernierung und HSC-Migration durch proinflammatorische Zytokine wie TNF- α gefördert werden konnten (Marra *et al.* 1993; Sprenger *et al.* 1999). In *Ccr2* knockout-Mäusen wurde darüber hinaus gezeigt, dass die über Ccl2 bewirkte Migration aktivierter HSC nicht über den bisher bekannten *Ccr2*-Rezeptor vermittelt wird (Marra *et al.* 1993). Eine Erklärung für die Diskrepanz der *Ccl2*-Abnahme während der in Kultur bewirkten myofibroblastischen HSC-Aktivierung und dem Anstieg während der Fibrogenese könnte durch eine umgebungsabhängige Antwort der HSC *in vivo* erklärt werden. Zusätzlich stellen auch andere Zelltypen neben den HSC eine nennenswerte Quelle an Ccl2 dar, wie es für Hepatozyten (Ramm *et al.* 2009), Kupfferzellen (Yamaguchi *et al.* 1998), oder biliäre Epithelzellen (Kruglov *et al.* 2006) gezeigt wurde. In Übereinstimmung mit den hier vorgelegten *in vitro*-Ergebnissen beschreibt Nischalke *et al.* eine signifikante Ccl2-Abnahme in fibrotischen, humanen Lebern von Patienten mit einer viralen Hepatitis C-Infektion (Nischalke *et al.* 2004).

Das komplexe Chemokin-Signalnetzwerk hat für die Entzündung und Fibrose der Leber eine sehr große Bedeutung, indem es die Infiltrierung von Immunzellen und Aktivierung von Zellprozessen in der geschädigten Leber vermittelt (Wasmuth *et al.* 2010). Die genaue Aufklärung spezifischer biologischer Funktionen von Chemokinen bei chronisch inflammatorischen Lebererkrankungen wird durch die Tatsache erschwert, dass residente und in die Leber infiltrierende Zellen sowohl eine Quelle als auch ein Ziel der Chemokine darstellen können. Darüber hinaus können Chemokine, in Abhängigkeit von der Ätiologie des Leberschadens, ihrer lokalen Konzentration und ihrer Fähigkeit, Multi- und Heterodimere zu bilden, unterschiedliche Effekte auslösen (Sahin *et al.* 2010). Mausmodelle eines akuten Leberschadens weisen erhöhte Level an Ccl2, Ccl3, Ccl5 und Cxcl9 auf, um hauptsächlich chemotaktische Effekte über *Ccr1* und *Ccr5* zu vermitteln (Seki *et al.* 2009; Berres *et al.* 2010). Sogenannte „Scavenger“-Rezeptoren, wie D6 oder *Cxcr7*, regulieren Chemokine auf posttranslationalem Level durch Internalisierung und Degradierung (Graham 2009). Diese Regulierung konnte in der Arbeit von Berres *et al.* für Ccl2, Ccl3 und Ccl5 in D6 knockout-Mäusen bestätigt werden (Berres *et al.* 2009). Aufgrund der Expression von *Cxcr2* nicht nur auf HSC, sondern auch auf Neutrophilen und Hepatozyten, werden ihm unterschiedliche Eigenschaften zugeschrieben (Bone-Larson *et al.* 2001; Hu *et al.* 2010), wodurch die Komplexität des Chemokin-Netzwerks nochmals unterstrichen wird. Eine Beteiligung der

neuronalen miRNAs, besonders miR-128, an der Regulierung einer Vielzahl sowohl der Chemokin-Liganden als auch -Rezeptoren, verdeutlicht ihre Bedeutung in der entzündlichen Abwehrreaktion von HSC.

4.4 *Notch1* und Pluripotenzfaktoren

Von besonderem Interesse war die in der hier vorliegenden Arbeit gezeigte Interaktion von neuronalen miRNAs mit dem *Notch1*-Transkript. Der Transmembranrezeptor *Notch1* wurde als Zieltranskript in miR-9 und miR-128 behandelten HSC durch Interaktion mit dem RISC *in vitro* identifiziert. Dieses Ergebnis stimmt mit den *in silico*-Analysen der Datenbanken überein (siehe Tab. 3.1). Ferner ist *Notch1* bei den TargetScan-Algorithmen zusätzlich als Ziel-mRNA für miR-125b postuliert. Diese Interaktion der neuronalen miRNAs mit dem *seed*-Bereich in der 3'-UTR von *Notch1* konnte in den funktionellen Reporter-Analysen bestätigt werden (Abb. 3.22). Die stark abnehmende Expression von *Notch1* während der myofibroblastischen Transdifferenzierung in Kultur ist, wie erwartet, in Übereinstimmung mit dem gegenläufigen Anstieg der Level für miR-9, miR-125b und miR-128. Für den direkten Einfluss der neuronalen miRNAs auf die Expression von *Notch1* sprechen auch die hier durchgeführten Experimente, in denen der endogene Level der neuronalen miRNAs in HSC verändert wurde. Die Inhibierung der neuronalen miRNAs in primären HSC führte zu einem klaren Anstieg des *Notch1*-Transkriptlevels, mit Ausnahme der miR-9 (Abb. 3.23). Allerdings konnte durch eine miRNA Überexpression kein Einfluss auf den *Notch1*-Spiegel nachgewiesen werden. Dieser Umstand spricht dafür, dass der hohe endogene Level der neuronalen miRNAs in HSC bereits für die Inhibierung von *Notch1* ausreicht.

Notch1 spielt im Stammzell-Signalnetzwerk zur Beibehaltung der Pluripotenz von Stammzellen eine Rolle (Duncan *et al.* 2005). Diese Funktion passt zu den Faktoren *Lin28* und *Klf4*, die ebenfalls in der *in silico*-Recherche gefunden wurden (siehe Tab. 3.1). *Lin28* konnte als gemeinsames Zieltranskript der neuronalen miRNAs über Reporter-Analysen *in vitro* experimentell bestätigt werden (Abb. 3.9). Gleiches galt für die Bindung der miR-128 an die 3'-UTR von *Klf4* (Abb. 3.11) Sowohl *Lin28* als auch *Klf4* zählen zu den pluripotenzfördernden Faktoren. Für die Umprogrammierung

somatischer Zellen in sogenannte induzierte pluripotente Stammzellen (iPS) sind dabei Kombinationen bestimmter Transkriptionsfaktoren nötig. Takahashi *et al.* zeigte eine Reprogrammierung von Maus-Fibroblasten in iPS nach Überexpression von *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* und *c-Myc* (Takahashi *et al.* 2006). Es wird angenommen, dass *c-Myc* und *Klf4* die Chromatinstruktur so modifizieren, dass *Oct4* und *Sox2* an ihre Ziele binden können (Yamanaka 2007). Einen vergleichbaren Erfolg verzeichnete Yu *et al.* mit Hilfe von *Oct4*, *Sox2*, *Nanog* und *Lin28* in humanen Fibroblasten. Obwohl *Lin28* für die initiale Reprogrammierung nicht absolut notwendig war, trug es als Pluripotenz-Promotor zur Frequenz der Reprogrammierung bei (Yu *et al.* 2007). In Säugetier-Zelllinien ist *Lin28* in undifferenzierten Zellen präsent, wie in embryonalen Stammzellen (ES) der Maus oder pluripotenten Keimzelltumor-Zelllinien der Maus und des Menschen. Im Laufe der terminalen Zelldifferenzierung wird *Lin28* herunterreguliert und ist beispielsweise in Fibroblasten nicht mehr detektierbar (Moss *et al.* 2003). Diese Beobachtung geht mit einer konservierten Funktion dieses Proteins in der zeitlichen Entwicklungsabfolge einher. Es ist ein entscheidender Regulator in frühen Stadien der larvalen Entwicklung von *C. elegans* (Moss *et al.* 1997). Hierbei stellt *Lin28* ein Zieltranskript von *lin-4* dar, der ersten entdeckten miRNA im Nematoden *C. elegans* (Lee *et al.* 1993; Moss *et al.* 1997). Gleichzeitig ist *Lin28* in der Lage, miRNAs zu regulieren. Im frühen Entwicklungsstadium des Nematoden kommt es zu einer Hemmung von *let-7* durch *Lin28*. Mit steigender Expression von *lin-4* wird *Lin28* gehemmt und die miRNAs *lin-4* und *let-7* führen zum Fortschritt der späteren Entwicklungsschritte (Büssing *et al.* 2008). Im Hinblick auf eine neuronale Differenzierung fand Sempere *et al.* eine Abnahme in der *Lin28* Expression bei differenzierenden P19-Zellen der Maus, welches auch den hier gezeigten Daten zur HSC-Differenzierung entspricht. Aufgrund vorhandener Bindungsstellen neuronaler miRNAs in der 3'-UTR von *Lin28* vermutete er eine Beteiligung von miRNAs, die in der neuronalen Differenzierung anstiegen, wie miR-9 und miR-125b. Dabei stellte miR-125b das *lin-4* Homolog in Vertebraten dar (Sempere *et al.* 2004). Diese vermutete Interaktion konnte in der vorliegenden Arbeit in Übereinstimmung mit Zhong *et al.* sowohl für miR-9 und miR-125b als auch erstmals für miR-128 belegt werden. Dies bestärkt die Annahme einer Involvierung dieser miRNAs in der Differenzierung von HSC durch Regulierung von Stammzellfaktoren (Zhong *et al.* 2010). Der beobachtete kontroverse Anstieg des pluripotenten Transkriptionsfaktors *Klf4* (Abb. 3.12) während der myofibroblastischen

HSC-Transdifferenzierung schließt miR-128 jedoch trotz vorhandener Bindungsstelle in der 3'-UTR als Hauptinhibitor dieses Transkripts aus. Eine Bedeutung für Klf4 als pluripotenzinduzierender Faktor in HSC bleibt daher fraglich. In HSC ist bisher nur die Hochregulierung von Klf6 im aktivierten Zustand bekannt, wobei dieser Transkriptionsfaktor die Transaktivierung von Kollagen I induziert (Ratziu *et al.* 1998).

Die hohe Expression von *Lin28* in frisch isolierten HSC mit starker Abnahme zu Beginn der Transdifferenzierung deutet auf Eigenschaften dieser Zellen hin, die auch bereits Kordes *et al.* beschrieben wurden. Sie stellen HSC als pluripotente und mögliche Progenitor-Zellen dar und zeigten die Expression des hämatopoetischen Stamm-/Progenitorzellmarkers CD133 auf HSC-Populationen. Darüber hinaus konnten sie die Expression pluripotenter Stammzellmarker wie Oct4 und Nanog auf den CD133-positiven HSC nachweisen. Nach Behandlung dieser Zellen mit entsprechenden Medien konnte ihre Fähigkeit zur Differenzierung in endothelial- und hepatozytenähnliche Zellen *in vitro* festgestellt werden (Kordes *et al.* 2007). Eine weitere Arbeit von Sawitza *et al.* greift den Aspekt von HSC als Stamm- oder Progenitor-Zellen erneut auf und postuliert den Disse'schen Raum als eine Art Stammzell-Nische für HSC (Sawitza *et al.* 2009). Das Konzept der Stammzell-Nische wurde zuerst für hämatopoetische Stammzellen als spezielle Mikroumgebung beschrieben, in der adulte Stammzellen ihre charakteristischen Eigenschaften bewahren können (Schofield 1978). Benachbarte differenzierte Zellen bilden über lösliche Faktoren und direkte physikalische Interaktionen ein Milieu, das den undifferenzierten Zustand der Stammzellen fördert und sie innerhalb dieser Nische hält, oft eingebettet in einer Basallamina (Fuchs *et al.* 2004).

Auch der Notch1-vermittelte Signalweg scheint zur Beibehaltung des ruhenden Zustands von HSC entscheidend zu sein. In Übereinstimmung zur Hypothese von Sawitza *et al.* (Sawitza *et al.* 2009) konnte innerhalb dieser Arbeit eine Herunterregulierung von Notch1 sowohl auf mRNA- als auch Proteinlevel während der myofibroblastischen Transdifferenzierung primärer HSC in Kultur dargestellt werden (Abb. 3.24 und 3.25). Der Transmembranrezeptor Notch1 ist im inaktivierten Zustand auf der Zelloberfläche als Heterodimer vorzufinden, bestehend aus einer extra- und einer intrazellulären Domäne. Die Bindung seiner ebenfalls membranständigen Liganden, den Unterfamilien Delta und Serrate/Jagged, erfolgt über einen direkten Zell-Zell-Kontakt und führt zu einer induzierten, extrazellulären

Spaltung. Auf diese folgt eine weitere, ligandenunabhängige, intrazelluläre Spaltung. Die frei gewordene, intrazelluläre Domäne von Notch1 wandert in den Zellkern und assoziiert mit einem DNA-bindenden Protein, welches dadurch vom Zustand eines Repressors in einen Transkriptionsaktivator wechselt und Notch1 Zielgene induziert (Artavanis-Tsakonas *et al.* 1999; Tanigaki *et al.* 2007). Der Notch1-Signalweg gehört mit zum Stammzell-Netzwerk, das für die Beibehaltung und Homöostase pluripotenter Stammzellen von großer Bedeutung ist (Duncan *et al.* 2005; Katoh 2007). Die Arbeitsgruppe von Jing *et al.* berichtete kürzlich von einer Interaktion der miR-9 mit *Notch1* in mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks in der Maus. Hier förderte miR-9 die Differenzierung der Zellen in Neurone über Hemmung von Notch1 (Jing *et al.* 2011).

Im Hinblick auf die Daten dieser Arbeit ergibt sich für die neuronalen miRNAs miR-9, miR-125b und miR-128 durch ihre Interaktion mit *Notch1* in HSC die folgende Wirkungsweise (Abb. 4.1): der Notch1-Signalweg ist in HSC der gesunden Leber aktiv und hält sie in einem ruhenden Zustand. Im Zuge der Leberfibrogenese kommt es zur myofibroblastischen Differenzierung und zur Hochregulierung der neuronalen miRNAs. Der Anstieg der miR-9, miR-125b und miR-128 bewirkt durch eine direkte Interaktion mit der *Notch1* 3'-UTR eine Reduktion des Notch1-Spiegels in HSC. Diese Hochregulierung der neuronalen miRNAs und die resultierende Repression von Notch1 könnten an der Initiierung und Manifestierung des myofibroblastischen Zelltyps beteiligt sein.

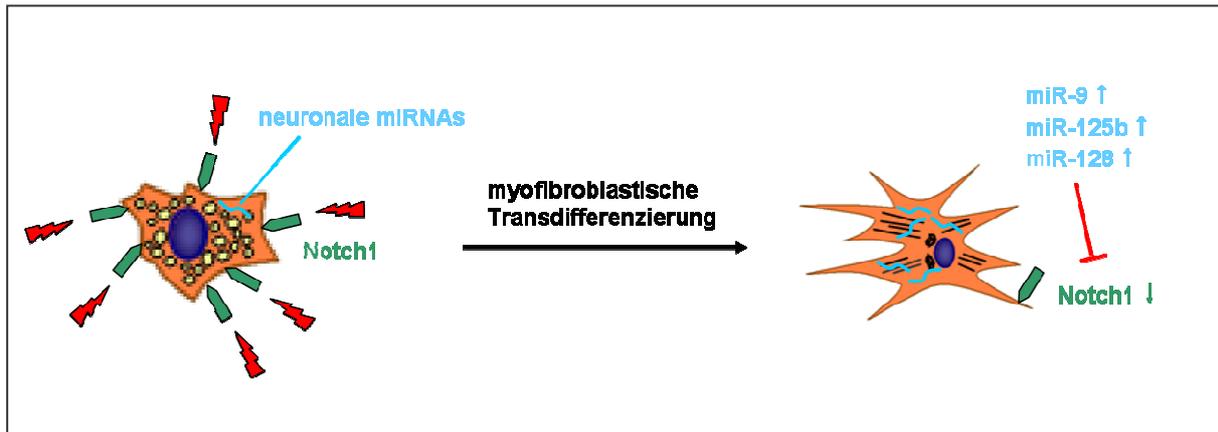


Abb. 4.1: Schematische Darstellung der Wirkung neuronaler miRNAs (miR-9, miR-125b, miR-128) auf Notch1 während der myofibroblastischen Transdifferenzierung von HSC. (Beschreibung im Text).

Aus diesem Grund kann postuliert werden, dass die neuronalen miRNAs über Notch1 mit an der Kontrolle der myofibroblastischen Transdifferenzierung von HSC in der Leberfibrogenese beteiligt sind.

4.5 Schlussfolgerungen und Ausblick

Durch die in dieser Arbeit erfolgte Identifizierung neuronaler miRNAs in HSC und ihre mögliche Bedeutung in der Differenzierung zu Myofibroblasten wurde die Grundvoraussetzung geschaffen, ihre Rolle sowie die Rolle ihrer pluripotenzinvolvierten Zieltranskripte im Zusammenhang der HSC-Stammzell-Nische weiter aufzuklären. Diese Grundlage stellt den Ansatz einer möglichen Reprogrammierung aktivierter HSC in einen mehr ruhenden Sternzell-Typ dar. Vertiefende Untersuchungen zum Mechanismus, wie Notch1 und Lin28 an der Ruhigstellung und an der Initiierung der myofibroblastischen Differenzierung nach Induktion von miR-9, miR-125b und miR-128 beteiligt sind, werden durch den frühen Verlust dieser Faktoren im primären HSC-Zellkultursystem erschwert. Mittelpunkt zukünftiger Arbeiten wird sein, die Notch1-Funktion bei der myofibroblastischen Differenzierung zu überprüfen und dessen Interaktion mit möglichen anderen Faktoren, die vor allem an der Pluripotenz beteiligt sind, zu untersuchen. Dafür sollen

in Zusammenarbeit mit Dr. Dr. Sarić (Institut für Neurophysiologie, Klinikum der Universität zu Köln) lentivirale Vektoren, die entsprechende Expressionskassetten für Pluripotenzfaktoren und Notch1 tragen, eingesetzt werden. Durch die lentivirale Überexpression der Zielproteine Notch1, Lin28 und Klf4 in primären HSC kann so in zukünftigen Arbeiten die neuronale miRNA-vermittelte Reduktion aufgehoben und die Wirkung auf die HSC Differenzierung studiert werden.

5. Zusammenfassung

Chronische Lebererkrankungen, unabhängig von ihrer Ätiologie, münden in der Leberfibrose. Die Leberfibrose ist gekennzeichnet durch einen unkontrollierten Vernarbungsprozess, der mit einer deutlichen Akkumulation von extrazellulärer Matrix im interstitiellen Raum verbunden ist. Hepatische Sternzellen (HSC) stellen dabei den zentralen Zelltyp in der Deposition extrazellulärer Matrix dar, indem sie nach Aktivierung eine myofibroblastische Transdifferenzierung durchlaufen. Neben den Eigenschaften als Myofibroblast wurden in der Vergangenheit auch neuronale Marker für diese Zellen beschrieben. MicroRNAs spielen eine Rolle in diversen Zellprozessen, wie Entwicklung, Differenzierung und Apoptose. Diese kleinen, einzelsträngigen RNA-Moleküle haben die Funktion, Gene posttranskriptionell zu regulieren. Für die primär in neuronalen Geweben vorkommenden microRNAs miR-9, miR-125b und miR-128 ist eine Beteiligung in der neuronalen Differenzierung bekannt. Innerhalb der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung neuronaler miRNAs während der myofibroblastischen Transdifferenzierung von HSC untersucht. Dafür wurde zunächst die Isolierung primärer HSC etabliert, da dieses Zellsystem die *in vivo* ablaufenden Vorgänge während der Differenzierung auch *in vitro* widerspiegelt. Durch Real-Time-PCR-Quantifizierung konnte nachgewiesen werden, dass die Expression der neuronalen microRNAs miR-9, miR-125b und miR-128 während der *in vitro*-Transdifferenzierung primärer HSC hochreguliert wurde. Um vertiefend eine Bedeutung dieser microRNAs in HSC zu untersuchen, wurden verschiedene Ansätze zur Bestimmung der Zieltranskripte angegangen. Durch *in silico*-Analysen mit Hilfe von Datenbanken zeigten sich für miR-9, miR-125b und miR-128 Übereinstimmungen beim Vergleich ihrer potenziellen Ziel-mRNAs. Dabei konnten für das Transkript *Lin28* in dessen 3'-untranslatierten Region (UTR) für miR-9, miR-125b, und miR-128 mögliche Bindungsstellen gefunden werden. Deshalb wurden die potenziellen Bindungssequenzen der einzelnen miRNAs sowohl als Wildtyp als auch als Mutante an das 3'-Ende eines Luziferase-Reporters flankierend kloniert und nach Co-Transfektion mit der miRNA in Reporterassays eingesetzt. Diese zeigten eine Interaktion der neuronalen miRNAs mit der 3'-UTR der *Lin28* mRNA. Während der myofibroblastischen Differenzierung nahm die Expression von *Lin28* stark ab. Dieser inverse Expressionsverlauf von *Lin28* zu den neuronalen miRNAs spricht ebenfalls für

einen direkten Einfluss von miR-9, miR-125b und miR-128 auf die *Lin28* Expression. Zusätzlich zu *Lin28* zeigte die Datenbankrecherche *Klf4*, einen weiteren Pluripotenzfaktor, als potenzielles Zieltranskript für miR-128. Die spezifische Interaktion von miR-128 mit der 3'-UTR von *Klf4* konnte ebenfalls erfolgreich über einen Reporterassay dargestellt werden.

In zwei weiteren Ansätzen zur Identifizierung möglicher Zieltranskripte *in vitro* wurde sowohl ein Hybridisierungs-Microarray als auch erstmals die Methode der Ago2-Immunopräzipitation eingesetzt. In den miR-128 behandelten HSC zeigten sich vor allem in der Microarray-Analyse viele Mitglieder der CC- und CXC-Chemokinfamilie als neue, nicht in den Datenbanken vorkommende Ziel-mRNAs für miR-128. Mit Hilfe der Ago2-Immunopräzipitation konnte eine direkte Interaktion der microRNA mit ihrem Zieltranskript im *RNA induced silencing complex* (RISC) in HSC analysiert werden. Die im RISC von den neuronalen miRNAs gebundenen Transkripte wurden primär durch Klonierung der cDNA mit direkter Sequenzierung und des Weiteren in einer umfangreichen Analyse durch *Next Generation Sequencing* identifiziert. In diesen Ansätzen wurden für miR-9, miR-125b, aber vor allem für die miR-128 erneut die Mitglieder der Chemokinfamilie als Bindungspartner der neuronalen miRNAs gefunden. Das in der Leberfibrose prädominante Chemokin *Ccl2*, das bereits durch die Expressionsprofilanalyse nach Überexpression von miR-128 durch eine verringerte Expression aufgefallen war, wurde auf seine direkte Interaktion mit miR-128 durch Reporterassays überprüft. Dabei konnte *Ccl2* als Ziel-mRNA für diese neuronale microRNA bestätigt werden. In der myofibroblastischen Transdifferenzierung von HSC ist *Ccl2* gegenläufig zur miR-128 Induktion reprimiert. Mit Hilfe des *Next Generation Sequencing* wurde in Übereinstimmung zu den *in silico*-Daten zusätzlich *Notch1* als Zieltranskript für die neuronalen microRNAs identifiziert. In jüngster Vergangenheit wurde *Notch1* als ein wesentlicher Faktor, der die myofibroblastische Transdifferenzierung von HSC hemmt, diskutiert. In der vorgestellten Arbeit wurde für die drei neuronalen microRNAs eine spezifische Interaktion mit der 3'-UTR von *Notch1* dargelegt. Mit der Hochregulierung von miR-9, miR-125b und miR-128 während der Transdifferenzierung von HSC konnte umgekehrt eine Herunterregulierung von *Notch1* auf Transkript- und Proteinebene veranschaulicht werden. Daher hat die hier gezeigte Interaktionsachse von neuronalen miRNAs und *Notch1* eine besonders hohe Bedeutung für den Initiierungsmechanismus der myofibroblastischen Transdifferenzierung.

6. Abstract

Chronic liver diseases, independent of their etiology, are leading to liver fibrosis, that is characterized by an uncontrolled scarring process and an enormous accumulation of extracellular matrix in the interstitial space. Hepatic stellate cells (HSC) are the main cell type responsible for the deposition of extracellular matrix after inflammatory induced myofibroblastic activation. Despite their myofibroblastic features HSC are also reported to exhibit expression of neuronal structural proteins and signaling mediators. MicroRNAs play an important role in diverse cellular processes such as development, differentiation, and apoptosis. These small single-stranded RNA molecules regulate gene expression on the post-transcriptional level. The miRNAs miR-9, miR-125b, and miR-128, prevalently expressed in neuronal tissue are known to be involved in neuronal differentiation. In the present thesis work, the relevance of neuronal miRNAs was analyzed during myofibroblastic transdifferentiation of HSC. First, the isolation procedure of primary HSC was established. This *in vitro* cell system of primary HSC reflects the the cellular mechanisms of fibrogenesis *in vivo*. In the present study the upregulation of the neuronal miR-9, miR-125b, and miR-128 was shown during *in vitro* induced transdifferentiation of primary HSC by real-time PCR. To analyze the impact of these miRNAs in HSC, different approaches were performed to identify potential target transcripts. *In silico* analyses of databases revealed identification of common potential targets probably recognized by all three miR-9, miR-125b, and miR-128. Thus, the *Lin28* transcript was found to have putative binding sites for miR-9, miR-125b, and miR-128 in the 3'-untranslated region (UTR). Therefore, the potential binding sequences of each neuronal miRNA and corresponding sequences including two point mutations were cloned into a luciferase reporter plasmid and used for reporter assays after miRNA co-transfection. Reporter assays showed that all neuronal miRNAs interact with the 3'-UTR of the *Lin28* mRNA. During myofibroblastic transdifferentiation the expression of *Lin28* was markedly decreased. This contrary expression of *Lin28* and the neuronal miRNAs also illustrates the direct effect of miR-9, miR-125b, and miR-128 on the *Lin28* expression. Additionally, *Klf4* as another factor of pluripotency was listed as putative target transcript of miR-128 in the databases. The specific interaction of miR-128 with the 3'-UTR of *Klf4* was also demonstrated by a reporter assay.

For identification of putative target transcripts *in vitro* two further approaches were performed, a hybridization microarray and an Ago2 immunoprecipitation assay, approached for the first time in the present thesis work. Interestingly, in miR-128 treated HSC, members of the CC- and CXC-chemokine families, not yet listed in the databases, were identified as new target mRNAs of miR-128, in particular by the microarray analysis. By Ago2 immunoprecipitation the direct interaction of the miRNA with its target transcript, taking place in the RNA-induced silencing complex (RISC) of HSC, was analyzed. Transcripts, bound by neuronal miRNAs in the RISC, were identified first by cloning of the corresponding cDNA followed by a direct sequencing and second by an extensive next generation sequencing analysis. By these approaches, members of the chemokine family were confirmed as binding partners for miR-9, miR-125b, and especially for miR-128. *Ccl2*, as the predominant chemokine in fibrosis, showed a reduced expression in the expression profile analysis of miR-128 treated HSC and a direct interaction of miR-128 with the *Ccl2* transcript was proven by reporter assays. Whereas miR-128 is induced, *Ccl2* is repressed during myofibroblastic transdifferentiation of HSC. By means of next generation sequencing, *Notch1* was identified as an additional target transcript of the neuronal miRNAs, in agreement with the *in silico* data. Recently, Notch1 was discussed as a main factor inhibiting the myofibroblastic transdifferentiation. In my thesis work, a specific interaction of the three neuronal miRNAs with the 3'-UTR of *Notch1* was now demonstrated. While miR-9, miR-125b, and miR-128 were upregulated during myofibroblastic transdifferentiation of HSC, *Notch1* is reduced, shown on transcript and protein level. Therefore, the here shown interaction between the neuronal miRNAs and Notch1 emphasizes the high relevance of this post-transcriptionally regulatory miRNA/Notch axis in the initiation mechanism of the myofibroblastic transdifferentiation.

7. Literaturverzeichnis

- Ahern, M., P. Hall, J. Halliday and e. al. (1996). "Hepatic stellate cell nomenclature." Hepatology 23(1): 193.
- Aparicio, S. A. and D. G. Huntsman (2010). "Does massively parallel DNA resequencing signify the end of histopathology as we know it?" J Pathol 220(2): 307-15.
- Artavanis-Tsakonas, S., M. D. Rand and R. J. Lake (1999). "Notch signaling: cell fate control and signal integration in development." Science 284(5415): 770-6.
- Arthur, M. J. (2000). "Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 279(2): G245-9.
- Baba, S., H. Fujii, T. Hirose, K. Yasuchika, H. Azuma, T. Hoppo, M. Naito, T. Machimoto and I. Ikai (2004). "Commitment of bone marrow cells to hepatic stellate cells in mouse." J Hepatol 40(2): 255-60.
- Bala, S., M. Marcos and G. Szabo (2009). "Emerging role of microRNAs in liver diseases." World J Gastroenterol 15(45): 5633-40.
- Bartel, D. P. (2004). "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function." Cell 116(2): 281-97.
- Bartel, D. P. (2009). "MicroRNAs: target recognition and regulatory functions." Cell 136(2): 215-33.
- Bartels, C. L. and G. J. Tsongalis (2009). "MicroRNAs: novel biomarkers for human cancer." Clin Chem 55(4): 623-31.
- Bataller, R. and D. A. Brenner (2005). "Liver fibrosis." J Clin Invest 115(2): 209-18.
- Beitzinger, M., L. Peters, J. Y. Zhu, E. Kremmer and G. Meister (2007). "Identification of human microRNA targets from isolated argonaute protein complexes." RNA Biol 4(2): 76-84.
- Berres, M. L., R. R. Koenen, A. Rueland, M. M. Zaldivar, D. Heinrichs, H. Sahin, P. Schmitz, K. L. Streetz, T. Berg, N. Gassler, R. Weiskirchen, A. Proudfoot, C. Weber, C. Trautwein and H. E. Wasmuth (2010). "Antagonism of the chemokine Ccl5 ameliorates experimental liver fibrosis in mice." J Clin Invest 120(11): 4129-40.
- Berres, M. L., C. Trautwein, M. M. Zaldivar, P. Schmitz, K. Pauels, S. A. Lira, F. Tacke and H. E. Wasmuth (2009). "The chemokine scavenging receptor D6 limits acute toxic liver injury in vivo." Biol Chem 390(10): 1039-45.
- Betel, D., M. Wilson, A. Gabow, D. S. Marks and C. Sander (2008). "The microRNA.org resource: targets and expression." Nucleic Acids Res 36(Database issue): D149-53.
- Bonacchi, A., P. Romagnani, R. G. Romanelli, E. Efsen, F. Annunziato, L. Lasagni, M. Francalanci, M. Serio, G. Laffi, M. Pinzani, P. Gentilini and F. Marra (2001). "Signal transduction by the chemokine receptor CXCR3: activation of Ras/ERK, Src, and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt controls cell migration and proliferation in human vascular pericytes." J Biol Chem 276(13): 9945-54.
- Bone-Larson, C. L., C. M. Hogaboam, H. Evanhoff, R. M. Strieter and S. L. Kunkel (2001). "IFN-gamma-inducible protein-10 (CXCL10) is hepatoprotective during acute liver injury through the induction of CXCR2 on hepatocytes." J Immunol 167(12): 7077-83.
- Büssing, I., F. J. Slack and H. Grosshans (2008). "let-7 microRNAs in development, stem cells and cancer." Trends Mol Med 14(9): 400-9.

- Cassiman, D., A. Barlow, S. Vander Borcht, L. Libbrecht and V. Pachnis (2006). "Hepatic stellate cells do not derive from the neural crest." J Hepatol 44(6): 1098-104.
- Cassiman, D., C. Deneff, V. J. Desmet and T. Roskams (2001). "Human and rat hepatic stellate cells express neurotrophins and neurotrophin receptors." Hepatology 33(1): 148-58.
- Cassiman, D., J. van Pelt, R. De Vos, F. Van Lommel, V. Desmet, S. H. Yap and T. Roskams (1999). "Synaptophysin: A novel marker for human and rat hepatic stellate cells." Am J Pathol 155(6): 1831-9.
- Chen, X. M. (2009). "MicroRNA signatures in liver diseases." World J Gastroenterol 15(14): 1665-72.
- Doench, J. G. and P. A. Sharp (2004). "Specificity of microRNA target selection in translational repression." Genes Dev 18(5): 504-11.
- Duncan, A. W., F. M. Rattis, L. N. DiMascio, K. L. Congdon, G. Pazianos, C. Zhao, K. Yoon, J. M. Cook, K. Willert, N. Gaiano and T. Reya (2005). "Integration of Notch and Wnt signaling in hematopoietic stem cell maintenance." Nat Immunol 6(3): 314-22.
- Easow, G., A. A. Teleman and S. M. Cohen (2007). "Isolation of microRNA targets by miRNP immunopurification." RNA 13(8): 1198-204.
- Eda, A., Y. Tamura, M. Yoshida and H. Hohjoh (2009). "Systematic gene regulation involving miRNAs during neuronal differentiation of mouse P19 embryonic carcinoma cell." Biochem Biophys Res Commun 388(4): 648-53.
- Edbauer, D., J. R. Neilson, K. A. Foster, C. F. Wang, D. P. Seeburg, M. N. Batterton, T. Tada, B. M. Dolan, P. A. Sharp and M. Sheng (2010). "Regulation of synaptic structure and function by FMRP-associated microRNAs miR-125b and miR-132." Neuron 65(3): 373-84.
- Fiore, R. and G. Schratt (2007). "MicroRNAs in vertebrate synapse development." ScientificWorldJournal 7: 167-77.
- Friedman, R. C., K. Kai-How Farh, C. B. Burge and D. P. Bartel (2009). "Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs." Genome Res. 19: 92-105.
- Friedman, S. L. (2000). "Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury." J Biol Chem 275(4): 2247-50.
- Friedman, S. L. (2003). "Liver fibrosis -- from bench to bedside." J Hepatol 38 Suppl 1: S38-53.
- Friedman, S. L. (2004). "Mechanisms of disease: Mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications." Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol 1(2): 98-105.
- Friedman, S. L. (2008). "Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver." Physiol Rev 88(1): 125-72.
- Friedman, S. L. and M. J. Arthur (2002). "Reversing hepatic fibrosis." Science Medicine 8: 194-205.
- Fuchs, E., T. Tumber and G. Guasch (2004). "Socializing with the neighbors: stem cells and their niche." Cell 116(6): 769-78.
- Geerts, A. (2001). "History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells." Semin Liver Dis 21(3): 311-35.
- Gines, P., A. Cardenas, V. Arroyo and J. Rodes (2004). "Management of cirrhosis and ascites." N Engl J Med 350(16): 1646-54.
- Graham, F. L., J. Smiley, W. C. Russell and R. Nairn (1977). "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5." J Gen Virol 36(1): 59-74.

- Graham, G. J. (2009). "D6 and the atypical chemokine receptor family: novel regulators of immune and inflammatory processes." Eur J Immunol 39(2): 342-51.
- Guo, C. J., Q. Pan, T. Cheng, B. Jiang, G. Y. Chen and D. G. Li (2009). "Changes in microRNAs associated with hepatic stellate cell activation status identify signaling pathways." FEBS J 276(18): 5163-76.
- Guo, J. and S. L. Friedman (2007). "Hepatic fibrogenesis." Semin Liver Dis 27(4): 413-26.
- Hendrickson, D. G., D. J. Hogan, D. Herschlag, J. E. Ferrell and P. O. Brown (2008). "Systematic identification of mRNAs recruited to argonaute 2 by specific microRNAs and corresponding changes in transcript abundance." PLoS One 3(5): e2126.
- Hofacker, I. L., W. Fontana, P. F. Stadler, L. S. Bonhoeffer, M. Tacker and P. Schuster (1994). "Fast folding and comparison of RNA secondary structures " Monatshefte für Chemie / Chemical Monthly 125(2): 167-188.
- Holt, A. P., E. L. Haughton, P. F. Lalor, A. Filer, C. D. Buckley and D. H. Adams (2009). "Liver myofibroblasts regulate infiltration and positioning of lymphocytes in human liver." Gastroenterology 136(2): 705-14.
- Hong, F., A. Tuyama, T. F. Lee, J. Loke, R. Agarwal, X. Cheng, A. Garg, M. I. Fiel, M. Schwartz, J. Walewski, A. Branch, A. D. Schecter and M. B. Bansal (2009). "Hepatic stellate cells express functional CXCR4: role in stromal cell-derived factor-1alpha-mediated stellate cell activation." Hepatology 49(6): 2055-67.
- Hu, B. and L. M. Colletti (2010). "CXC receptor-2 knockout genotype increases X-linked inhibitor of apoptosis protein and protects mice from acetaminophen hepatotoxicity." Hepatology 52(2): 691-702.
- Ito, T. and J. Nemoto (1952). "Über die Kupfferschen Sternzellen und die "Fettspeicherungszellen" ("fat-storing cells") in der Blutkapillarenwand der menschlichen Leber." Okajimas Folia Anat. 24: 243-258.
- Ji, J., J. Zhang, G. Huang, J. Qian, X. Wang and S. Mei (2009). "Over-expressed microRNA-27a and 27b influence fat accumulation and cell proliferation during rat hepatic stellate cell activation." FEBS Lett 583(4): 759-66.
- Jing, L., Y. Jia, J. Lu, R. Han, J. Li, S. Wang and T. Peng (2011). "MicroRNA-9 promotes differentiation of mouse bone mesenchymal stem cells into neurons by Notch signaling." Neuroreport 22(5): 206-11.
- Juhila, J., T. Sipila, K. Icaý, D. Nicorici, P. Ellonen, A. Kallio, E. Korpelainen, D. Greco and I. Hovatta (2011). "MicroRNA expression profiling reveals miRNA families regulating specific biological pathways in mouse frontal cortex and hippocampus." PLoS One 6(6): e21495.
- Kaplan, D. R. and F. D. Miller (2000). "Neurotrophin signal transduction in the nervous system." Curr Opin Neurobiol 10(3): 381-91.
- Karginov, F. V., C. Conaco, Z. Xuan, B. H. Schmidt, J. S. Parker, G. Mandel and G. J. Hannon (2007). "A biochemical approach to identifying microRNA targets." Proc Natl Acad Sci U S A 104(49): 19291-6.
- Kato, M. (2007). "WNT signaling pathway and stem cell signaling network." Clin Cancer Res 13(14): 4042-5.
- Kim, V. N. (2005). "MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing." Nat Rev Mol Cell Biol 6(5): 376-85.
- Kisseleva, T., H. Uchinami, N. Feirt, O. Quintana-Bustamante, J. C. Segovia, R. F. Schwabe and D. A. Brenner (2006). "Bone marrow-derived fibrocytes participate in pathogenesis of liver fibrosis." J Hepatol 45(3): 429-38.

- Knittel, T., D. Kobold, B. Saile, A. Grundmann, K. Neubauer, F. Piscaglia and G. Ramadori (1999). "Rat liver myofibroblasts and hepatic stellate cells: different cell populations of the fibroblast lineage with fibrogenic potential." Gastroenterology 117(5): 1205-21.
- Kordes, C., I. Sawitza, A. Muller-Marbach, N. Ale-Agha, V. Keitel, H. Klonowski-Stumpe and D. Haussinger (2007). "CD133+ hepatic stellate cells are progenitor cells." Biochem Biophys Res Commun 352(2): 410-7.
- Krichevsky, A. M., K. S. King, C. P. Donahue, K. Khrapko and K. S. Kosik (2003). "A microRNA array reveals extensive regulation of microRNAs during brain development." RNA 9(10): 1274-81.
- Kruglov, E. A., R. A. Nathanson, T. Nguyen and J. A. Dranoff (2006). "Secretion of MCP-1/CCL2 by bile duct epithelia induces myofibroblastic transdifferentiation of portal fibroblasts." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 290(4): G765-71.
- Kupffer, K. (1876). "Über Sternzellen der Leber. Briefliche Mitteilung an Professor Waldeyer." Arch Mikrosk Anat 12: 353-358.
- Kwieceński, M., N. Elfimova, A. Noetel, S. Schievenbusch, I. Strack, U. Töx, U. Drebber, H. M. Steffen, H. P. Dienes and M. Odenthal (2010). "Mir-29, Inhibiting Synthesis of Profibrogenic Mediators, Is Released into the Blood Stream after Chronic Hepatitis C Infection, Indicating Progression of Fibrosis." Hepatology.
- Kwieceński, M., A. Noetel, N. Elfimova, J. Trebicka, S. Schievenbusch, I. Strack, L. Molnar, M. von Brandenstein, U. Tox, R. Nischt, O. Coutelle, H. P. Dienes and M. Odenthal (2011). "Hepatocyte growth factor (HGF) inhibits collagen I and IV synthesis in hepatic stellate cells by miRNA-29 induction." PLoS One 6(9): e24568.
- Kwieceński, M., A. Noetel, N. Elfimova, J. Trebicka, S. Schievenbusch, I. Strack, L. Molnar, M. von Brandenstein, U. Töx, R. Nischt, O. Coutelle, H. P. Dienes and M. Odenthal (2011). "Mir-29, Inhibiting Synthesis of Profibrogenic Mediators, Is Released into the Blood Stream after Chronic Hepatitis C Infection, Indicating Progression of Fibrosis." Hepatology.
- Lee, R. C., R. L. Feinbaum and V. Ambros (1993). "The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*." Cell 75(5): 843-54.
- Lee, U. E. and S. L. Friedman (2011). "Mechanisms of hepatic fibrogenesis." Best Pract Res Clin Gastroenterol 25(2): 195-206.
- Lewis, B. P., C. B. Burge and D. P. Bartel (2005). "Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets." Cell 120(1): 15-20.
- Lewis, B. P., I. H. Shih, M. W. Jones-Rhoades, D. P. Bartel and C. B. Burge (2003). "Prediction of mammalian microRNA targets." Cell 115(7): 787-98.
- Liu, X. J., L. Yang, F. M. Luo, H. B. Wu and Q. Qiang (2004). "Association of differentially expressed genes with activation of mouse hepatic stellate cells by high-density cDNA microarray." World J Gastroenterol 10(11): 1600-7.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods 25(4): 402-8.
- Marra, F., A. J. Valente, M. Pinzani and H. E. Abboud (1993). "Cultured human liver fat-storing cells produce monocyte chemotactic protein-1. Regulation by proinflammatory cytokines." J Clin Invest 92(4): 1674-80.
- Maxam, A. M. and W. Gilbert (1977). "A new method for sequencing DNA." Proc Natl Acad Sci U S A 74(2): 560-4.

- Meakin, S. O. and E. M. Shooter (1992). "The nerve growth factor family of receptors." Trends Neurosci 15(9): 323-31.
- Meister, G., M. Landthaler, Y. Dorsett and T. Tuschl (2004). "Sequence-specific inhibition of microRNA- and siRNA-induced RNA silencing." RNA 10(3): 544-50.
- Miyata, E., M. Masuya, S. Yoshida, S. Nakamura, K. Kato, Y. Sugimoto, T. Shibasaki, K. Yamamura, K. Ohishi, K. Nishii, F. Ishikawa, H. Shiku and N. Katayama (2008). "Hematopoietic origin of hepatic stellate cells in the adult liver." Blood 111(4): 2427-35.
- Moss, E. G., R. C. Lee and V. Ambros (1997). "The cold shock domain protein LIN-28 controls developmental timing in *C. elegans* and is regulated by the *lin-4* RNA." Cell 88(5): 637-46.
- Moss, E. G. and L. Tang (2003). "Conservation of the heterochronic regulator Lin-28, its developmental expression and microRNA complementary sites." Dev Biol 258(2): 432-42.
- Natrajan, R. and J. S. Reis-Filho (2011). "Next-generation sequencing applied to molecular diagnostics." Expert Rev Mol Diagn 11(4): 425-44.
- Neubauer, K., T. Knittel, S. Aurisch, P. Fellmer and G. Ramadori (1996). "Glial fibrillary acidic protein--a cell type specific marker for Ito cells in vivo and in vitro." J Hepatol 24(6): 719-30.
- Niki, T., M. Pekny, K. Hellemans, P. D. Bleser, K. V. Berg, F. Vaeyens, E. Quartier, F. Schuit and A. Geerts (1999). "Class VI intermediate filament protein nestin is induced during activation of rat hepatic stellate cells." Hepatology 29(2): 520-7.
- Nischalke, H. D., J. Nattermann, H. P. Fischer, T. Sauerbruch, U. Spengler and F. L. Dumoulin (2004). "Semiquantitative analysis of intrahepatic CC-chemokine mRNAs in chronic hepatitis C." Mediators Inflamm 13(5-6): 357-9.
- Niwa, H. (2001). "Molecular mechanism to maintain stem cell renewal of ES cells." Cell Struct Funct 26(3): 137-48.
- Noetel, A., N. Elfimova, J. Altmüller, C. Becker, D. Becker, W. Lahr, P. Nürnberg, A. Teufel, R. Büttner, H. P. Dienes and M. Odenthal (2012). "Next generation sequencing of the Ago2 interacting transcriptome identified the members of the chemokine family as novel targets of neuronal miRNAs in hepatic stellate cells." J Hepatol in Review.
- Popper, H. and S. Uenfriend (1970). "Hepatic fibrosis. Correlation of biochemical and morphologic investigations." Am J Med 49: 707-21.
- Ramadori, G., T. Veit, S. Schwogler, H. P. Dienes, T. Knittel, H. Rieder and K. H. Meyer zum Buschenfelde (1990). "Expression of the gene of the alpha-smooth muscle-actin isoform in rat liver and in rat fat-storing (ITO) cells." Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol 59(6): 349-57.
- Ramm, G. A., R. W. Shepherd, A. C. Hoskins, S. A. Greco, A. D. Ney, T. N. Pereira, K. R. Bridle, J. D. Doecke, P. J. Meikle, B. Turlin and P. J. Lewindon (2009). "Fibrogenesis in pediatric cholestatic liver disease: role of taurocholate and hepatocyte-derived monocyte chemotaxis protein-1 in hepatic stellate cell recruitment." Hepatology 49(2): 533-44.
- Ratziu, V., A. Lalazar, L. Wong, Q. Dang, C. Collins, E. Shaulian, S. Jensen and S. L. Friedman (1998). "Zf9, a Kruppel-like transcription factor up-regulated in vivo during early hepatic fibrosis." Proc Natl Acad Sci U S A 95(16): 9500-5.
- Roux, P. P. and P. A. Barker (2002). "Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor." Prog Neurobiol 67(3): 203-33.

- Ruby, J. G., C. H. Jan and D. P. Bartel (2007). "Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing." Nature 448(7149): 83-6.
- Sahin, H., C. Trautwein and H. E. Wasmuth (2010). "Functional role of chemokines in liver disease models." Nat Rev Gastroenterol Hepatol 7(12): 682-90.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis (1989). in Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY 2nd Edition.
- Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A 74(12): 5463-7.
- Sawitzka, I., C. Kordes, S. Reister and D. Haussinger (2009). "The niche of stellate cells within rat liver." Hepatology 50(5): 1617-24.
- Schaffner, F. and F. M. Klion (1968). "Chronic hepatitis." Annu Rev Med 19: 25-38.
- Schofield, R. (1978). "The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell." Blood Cells 4(1-2): 7-25.
- Schuppan, D., M. Ruehl, R. Somasundaram and E. G. Hahn (2001). "Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis." Semin Liver Dis 21(3): 351-72.
- Schwabe, R. F., R. Bataller and D. A. Brenner (2003). "Human hepatic stellate cells express CCR5 and RANTES to induce proliferation and migration." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 285(5): G949-58.
- Seki, E., S. De Minicis, G. Y. Gwak, J. Kluwe, S. Inokuchi, C. A. Bursill, J. M. Llovet, D. A. Brenner and R. F. Schwabe (2009). "CCR1 and CCR5 promote hepatic fibrosis in mice." J Clin Invest 119(7): 1858-70.
- Sempere, L. F., S. Freemantle, I. Pitha-Rowe, E. Moss, E. Dmitrovsky and V. Ambros (2004). "Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation." Genome Biol 5(3): R13.
- Shibata, M., H. Nakao, H. Kiyonari, T. Abe and S. Aizawa (2011). "MicroRNA-9 regulates neurogenesis in mouse telencephalon by targeting multiple transcription factors." J Neurosci 31(9): 3407-22.
- Sofroniew, M. V., C. L. Howe and W. C. Mobley (2001). "Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair." Annu Rev Neurosci 24: 1217-81.
- Soyer, M. T., R. Ceballos and J. S. Aldrete (1976). "Reversibility of severe hepatic damage caused by jejunoileal bypass after re-establishment of normal intestinal continuity." Surgery 79(5): 601-4.
- Sprenger, H., A. Kaufmann, H. Garn, B. Lahme, D. Gemsa and A. M. Gressner (1999). "Differential expression of monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) in transforming rat hepatic stellate cells." J Hepatol 30(1): 88-94.
- Takahashi, K., K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda and S. Yamanaka (2007). "Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors." Cell 131(5): 861-72.
- Takahashi, K. and S. Yamanaka (2006). "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors." Cell 126(4): 663-76.
- Tanigaki, K. and T. Honjo (2007). "Regulation of lymphocyte development by Notch signaling." Nat Immunol 8(5): 451-6.
- Trim, N., S. Morgan, M. Evans, R. Issa, D. Fine, S. Afford, B. Wilkins and J. Iredale (2000). "Hepatic stellate cells express the low affinity nerve growth factor receptor p75 and undergo apoptosis in response to nerve growth factor stimulation." Am J Pathol 156(4): 1235-43.
- Voelkerding, K. V., S. A. Dames and J. D. Durtschi (2009). "Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics." Clin Chem 55(4): 641-58.

- Vogel, S., R. Piantedosi, J. Frank, A. Lalazar, D. C. Rockey, S. L. Friedman and W. S. Blaner (2000). "An immortalized rat liver stellate cell line (HSC-T6): a new cell model for the study of retinoid metabolism in vitro." J Lipid Res 41(6): 882-93.
- Wake, K. (1971). "Sternzellen in the liver: perisinusoidal cells with special reference to storage of vitamin A." Am J Anat 132: 429-462.
- Wang, W. X., B. R. Wilfred, Y. Hu, A. J. Stromberg and P. T. Nelson (2010). "Anti-Argonaute RIP-Chip shows that miRNA transfections alter global patterns of mRNA recruitment to microribonucleoprotein complexes." RNA 16(2): 394-404.
- Wang, X. D. (1999). "Chronic alcohol intake interferes with retinoid metabolism and signaling." Nutr Rev 57(2): 51-9.
- Wasmuth, H. E., F. Lammert, M. M. Zaldivar, R. Weiskirchen, C. Hellerbrand, D. Scholten, M. L. Berres, H. Zimmermann, K. L. Streetz, F. Tacke, S. Hillebrandt, P. Schmitz, H. Keppeler, T. Berg, E. Dahl, N. Gassler, S. L. Friedman and C. Trautwein (2009). "Antifibrotic effects of CXCL9 and its receptor CXCR3 in livers of mice and humans." Gastroenterology 137(1): 309-19, 319 e1-3.
- Wasmuth, H. E., F. Tacke and C. Trautwein (2010). "Chemokines in liver inflammation and fibrosis." Semin Liver Dis 30(3): 215-25.
- Xu, L., A. Y. Hui, E. Albanis, M. J. Arthur, S. M. O'Byrne, W. S. Blaner, P. Mukherjee, S. L. Friedman and F. J. Eng (2005). "Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis." Gut 54(1): 142-51.
- Yamaguchi, Y., F. Matsumura, M. Takeya, O. Ichiguchi, J. I. Kuratsu, T. Horiuchi, E. Akizuki, T. Matsuda, K. Okabe, H. Ohshiro, J. Liang, K. Mori, S. Yamada, K. Takahashi and M. Ogawa (1998). "Monocyte chemoattractant protein-1 enhances expression of intercellular adhesion molecule-1 following ischemia-reperfusion of the liver in rats." Hepatology 27(3): 727-34.
- Yamanaka, S. (2007). "Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells." Cell Stem Cell 1(1): 39-49.
- Yu, J., M. A. Vodyanik, K. Smuga-Otto, J. Antosiewicz-Bourget, J. L. Frane, S. Tian, J. Nie, G. A. Jonsdottir, V. Ruotti, R. Stewart, Slukvin, II and J. A. Thomson (2007). "Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells." Science 318(5858): 1917-20.
- Zeisberg, M., C. Yang, M. Martino, M. B. Duncan, F. Rieder, H. Tanjore and R. Kalluri (2007). "Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition." J Biol Chem 282(32): 23337-47.
- Zhang, Y., T. Chao, R. Li, W. Liu, Y. Chen, X. Yan, Y. Gong, B. Yin, B. Qiang, J. Zhao, J. Yuan and X. Peng (2009). "MicroRNA-128 inhibits glioma cells proliferation by targeting transcription factor E2F3a." J Mol Med (Berl) 87(1): 43-51.
- Zhao, C., G. Sun, S. Li and Y. Shi (2009). "A feedback regulatory loop involving microRNA-9 and nuclear receptor TLX in neural stem cell fate determination." Nat Struct Mol Biol 16(4): 365-71.
- Zhong, X., N. Li, S. Liang, Q. Huang, G. Coukos and L. Zhang (2010). "Identification of microRNAs regulating reprogramming factor LIN28 in embryonic stem cells and cancer cells." J Biol Chem 285(53): 41961-71.

8. Anhang

8.1 Abbildungen

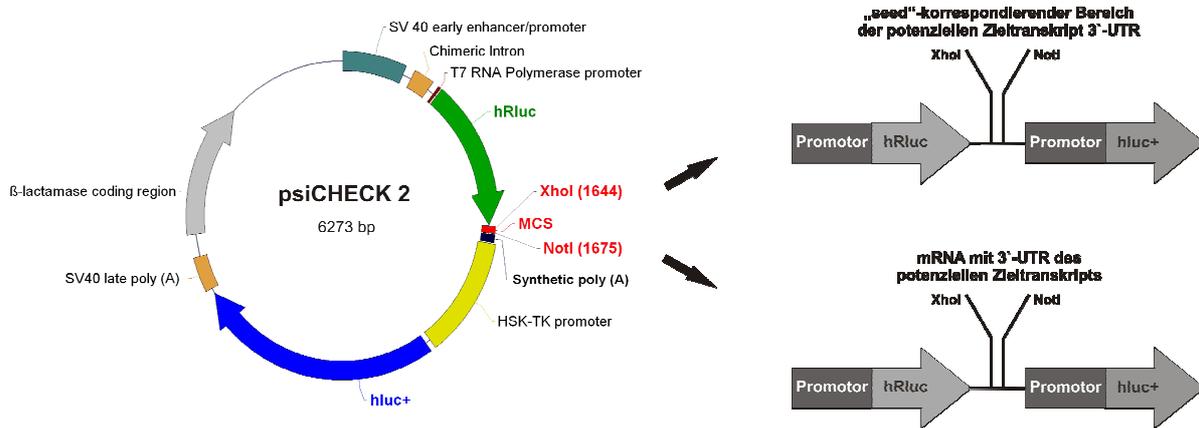


Abb. 3.26: Klonierungsstrategien für den Luciferase-Reporterassay. Als Reportervektor diente der psiCHECK™-2. Über die Schnittstellen XhoI und NotI wurden die auf miRNA-Interaktion zu testenden Sequenzen in den Vektor kloniert. Bei bekannter Bindungsregion wurden Oligodimere der *seed*-Bereich entsprechenden Sequenz als normale oder mutierte Sequenz einkloniert. Bei unbekannter Bindungsstelle in der 3'-UTR wird die komplette mRNA-Sequenz über die genannten Schnittstellen in den Vektor gebracht.

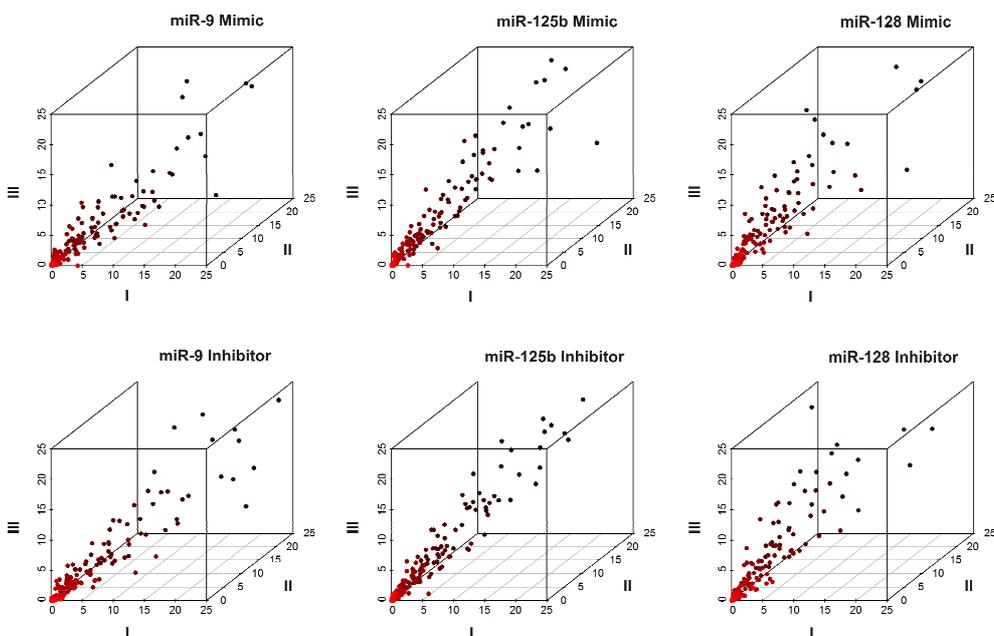


Abb. 3.27: Unterschiede in experimentellen Triplikaten in der Transkriptanalyse. Dreidimensionale *Scatter Plots* der RPKM (*reads per kilobase per million mapped reads*) Werte nach NGS aus den drei unterschiedlichen Experimenten (I, II und III) mit miRNA Mimics oder Inhibitoren für jeweils miR-9, miR-125b oder miR-128.

8.2 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ad	auf (lat.)
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
ca.	circa
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
cm ²	Quadratcentimeter
C-Terminal	carboxyterminal
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco`s Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2´-Desoxy-Nukleosid- 5`-Triphosphat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
ET-1	Endothelin-1
et al.	und andere (lat.)
EtOH	Ethanol
FCS	fötales Kälberserum
GFAP	<i>glial fibrillaric acidic protein</i>
GBSS	<i>gey`s balanced salt solution</i>
HEK-293	<i>human embryonic kidney cells 293</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- ethansulfonsäure
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i>
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
<i>hsa</i>	<i>homo sapiens</i>
HSC	hepatische Sternzelle
g	Gramm
h	Stunde
iPS	<i>induced pluripotent stem cell</i>
KAc	Kaliumacetat
kb	Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton
kg	Kilogramm
Klf4	<i>krüppel-like factor 4</i>
l	Liter
LB-Medium	<i>luria bertanie Medium</i>
M	Molar
max.	maximal
MCS	<i>multiple cloning site</i>
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mmu	<i>mus musculus</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
miRNA	MicroRNA

n	Anzahl
ng	Nanogramm
NGF	<i>nerve growth factor</i>
nk-siRNA	negative Kontroll- siRNA
nm	Nanometer
nt	Nukleotide
N-Terminal	aminoterminal
nt	Nukleotide
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i>
Ori	Startpunkt der Replikation
p.A.	pro Analysis
PBS	phosphatgepuffertes Salz
PBST	phosphatgepuffertes Salz mit Tween 20
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
pH	potentia hydrogenii
pmol	Pikomol
pre-miRNA	Vorläufer-miRNA
pri-miRNA	primäre miRNA
qPCR	quantitative Real-Time PCR
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure
<i>rno</i>	<i>rattus norvegicus</i>
Upm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	<i>Rooswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
RV	Reportervektor
siRNA	<i>silencing RNA</i>
sek	Sekunde
SOC	Nährmedium mit Glukose
SV40	<i>Simian-Virus 40</i>
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
TBST	Tris gepuffertes salziges Tween
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TGF- β	<i>tissue growth factor β</i>
Tris	Tris-(hydroxymethy-) aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylen-Sorbitanmonolaurat
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
UV	ultraviolett
v/v	Volumenprozent (<i>volume per volume</i>)
V	Volumen
w/v	Gewichtsprozent (<i>weight per volume</i>)
z.B.	zum Beispiel
3'-UTR	3'-untranslatierter Bereich
°C	Grad Celsius
α -SMA	<i>alpha-smooth muscle actin</i>
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromolar
μ m	Mikrometer
Gen/DNA/RNA	Schreibweise: Anfangsbuchstabe groß und kursiv
Protein	Schreibweise: Anfangsbuchstabe groß

8.3 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. P. Nürnberg für die Betreuung dieser Arbeit und Möglichkeit der Durchführung im *Cologne Center for Genomics* bedanken. Bei Frau Dr. M. Odenthal möchte ich mich besonders für die hervorragende Unterstützung, produktiven Gespräche und fachlichen Anregungen bedanken. Für die Übernahme des Zweitgutachters gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. M. Paulsson und Herrn Prof. Dr. E. Schierenberg für die Funktion als Prüfungsvorsitz.

Ein ganz großer Dank geht an die übriggebliebenen Kellerkinder, insbesondere Nadine Winkel, Natalia Elfimova, Marion Kopp, Hannah Eischeid und Ulrike Koitzsch. Marion Kopp bin ich dabei sehr dankbar für das finale Korrekturlesen. In diesem Zusammenhang seien auch die fertigen Doktoren aus dem Keller erwähnt, vor allem Dr. Ingo Strack und Dr. Stephanie Schievenbusch und als ehemaliges Kellermittglied Melanie Ruhrländer. Danke für die tolle Zeit besonders am Anfang meiner Arbeit. Für die freundliche Unterstützung danke ich auch Dr. Janine Altmüller und Christian Becker.

In besonderem Maße danke ich meinen langjährigen alten, vor allem aber auch in dieser Zeit neu gewonnenen Freunden für den nötigen Ausgleich außerhalb des Labors. Evelyn und Jasmin, was hätte ich nur ohne euch und eure Ablenkungsprogramme oder aufbauenden Abende speziell in der Endphase gemacht.

Zum guten Schluss gilt ein ganz persönlicher Dank meiner Familie. Denn ohne die Liebe, Kraft und Unterstützung meiner Eltern wäre ich nicht so weit gekommen. Dabei weiß ich die Geduld und Herzenswärme meiner Mutter ganz besonders zu schätzen. Ich bin auch sehr froh, diese Zeit mit meiner Schwester Sandra erlebt zu haben. Danke für die Unterstützung in jeder Lebenslage und dass du immer da warst. Lieben Dank auch an meinen Bruder Thomas, seine Frau Peggy und meine Oma.

8.4 Erklärung

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

Köln, den 23. April

Andrea Noetel

Nachfolgende Teilpublikationen liegen vor:

Noetel A, Elfimova N, Altmüller J, Becker C, Becker D, Lahr W, Nürnberg P, Teufel A, Büttner R, Dienes HP, Odenthal M (2012). „Next generation sequencing of the Ago2 interacting transcriptome identified chemokine family members as novel targets of neuronal microRNAs in hepatic stellate cells". J Hepatol, in Review

8.5 Lebenslauf

Name	Andrea Noetel
Geburtsdatum	18. September 1982
Geburtsort	Freiburg/Breisgau
Nationalität	Deutsch

Dissertation

2008 - 2012	Cologne Center for Genomics - Universität zu Köln <i>Thema: „Bedeutung neuronaler microRNAs während der myofibroblastischen Trans-differenzierung hepatischer Sternzellen“</i>
-------------	---

Studium

2002 - 2007	Studium Biologie - Universität zu Köln Abschluss: Diplom
-------------	---

Schule

1993 - 2002	Kopernikus-Gymnasium Niederkassel-Lülsdorf Abschluss: Abitur
1989 – 1993	Grundschule Porz-Langel

Publikationen

Noetel A, Elfimova N, Altmüller J, Becker C, Becker D, Lahr W, Nürnberg P, Teufel A, Büttner R, Dienes HP, Odenthal M (2012). „Next generation sequencing of the Ago2 interacting transcriptome identified chemokine family members as novel targets of neuronal microRNAs in hepatic stellate cells“. J Hepatol, in Review

Noetel A, Kwiecinski M, Elfimova N, Huang J, Odenthal M. (2012). „MicroRNA are central players in anti- and profibrotic gene regulation during liver fibrosis“. Front Physiol

Kwiecinski M, Elfimova N, **Noetel A**, Töx U, Steffen HM, Hacker U, Nischt R, Dienes HP, Odenthal M (2012). „*Expression of platelet-derived growth factor-c and insulin-like growth factor I in hepatic stellate cells is inhibited by miR-29*”. Lab Invest

Kwiecinski M, **Noetel A***, Elfimova N, Trebicka J, Schievenbusch S, Strack I, Molnar L, von Brandenstein M, Töx U, Nischt R, Coutelle O, Dienes HP, Odenthal M. (2011). „*Hepatocyte growth factor (HGF) inhibits collagen I and IV synthesis in hepatic stellate cells by miRNA-29 induction*”. Plos One.

*gleichberechtigter Erstautor

Rey JW, **Noetel A***, Hardt A, Canbay A, Alakus H, Zur Hausen A, Dienes HP, Drebber U, Odenthal M. (2010). „*Pro12Ala polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor γ 2 in patients with fatty liver diseases*”. World J Gastroenterol

*gleichberechtigter Erstautor

Batsch A, **Noetel A**, Fork C, Urban A, Lazic D, Lucas T, Pietsch J, Lazar A, Schömig E, Gründemann D. (2008). „*Simultaneous fitting of real-time PCR data with efficiency of amplification modeled as Gaussian function of target fluorescence*”. BMC Bioinformatics