

**Aus dem Zentrum für Pathologie der Universität zu Köln  
Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie  
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. H. P. Dienes**

---

**Inhibierung der Signaltransduktion von  
Transforming Growth Factor beta im leberspezifischen  
Zellkultursystem durch RNA-Interferenz**

**Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Universität zu Köln**

**vorgelegt von  
Julia Johanna Maurer  
aus Hamburg**

**Promoviert am: 12. August 2009**







**Aus dem Zentrum für Pathologie der Universität zu Köln  
Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie  
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. H. P. Dienes**

---

**Inhibierung der Signaltransduktion von  
Transforming Growth Factor beta im leberspezifischen  
Zellkultursystem durch RNA-Interferenz**

**Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Universität zu Köln**

**vorgelegt von  
Julia Johanna Maurer  
aus Hamburg**

**Promoviert am: 12. August 2009**

Gedruckt mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln  
2009

Hundt Druck GmbH  
Zülpicher Straße 220  
50937 Köln

Dekan:                      Universitätsprofessor Dr. med. J. Klosterkötter  
1. Berichterstatter:    Universitätsprofessor Dr. med. H. P. Dienes  
2. Berichterstatter:    Universitätsprofessor Dr. med. T. Goeser

## **Erklärung**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts habe ich keine Unterstützungsleistung erhalten.

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und ist auch noch nicht veröffentlicht.

Köln, den 20. Juli 2007

(Julia J. Maurer)

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Frau Dr. rer. nat. M. Odenthal von mir selbst durchgeführt worden.

Herrn Universitätsprofessor Dr. med. H. P. Dienes möchte ich für die freundliche Überlassung der interessanten Aufgabenstellung sowie die großzügige Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit danken.

Ich danke im Besonderen Frau Dr. rer. nat. M. Odenthal für die sehr aufwendige, persönliche und geduldige Einarbeitung, ihre höchst wissenschaftliche, dabei überaus warmherzige, engagierte und motivierende Betreuung und unendliche Hilfs- und Diskussionsbereitschaft während der Durchführung dieser Arbeit. Sie ist mir in dieser Zeit in vielerlei Hinsicht zum wichtigen Vorbild geworden. Die Zeit der Zusammenarbeit in ihrer Arbeitsgruppe ist mir eine bleibende Freude.

Danken möchte ich auch meiner Laborkollegin und Kommilitonin Frau Julia Wallraf, die mich während der Durchführung dieser Arbeit mit ihrer freundschaftlichen Diskussions- und Hilfsbereitschaft stets begleitet hat.

Des Weiteren gilt mein Dank Frau Daniela Lohfink, Herrn Dr. rer. nat. Mario Zierden, Frau Melanie Scheffler, Herrn Frank Jankowiak, Frau Elli Kühnen und allen Mitarbeitern des Instituts für Pathologie der Universität zu Köln, die mich während dieser Arbeit auf vielfältige Weise, nicht zuletzt durch das freundliche Arbeitsklima, unterstützt haben.

Zum Abschluß möchte ich meiner Familie für ihre stets große Unterstützung danken.



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>1</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>5</b>
1.1. Fibrotische Erkrankungen der Leber .....	5
1.2. Die Leberzirrhose, Endstadium chronisch fibrotischer Leber- erkrankungen .....	8
1.3. Hepatische Sternzellen und Transforming Growth Factor beta (TGF $\beta$ ): zwei Hauptakteure der Leberfibrose .....	9
1.4. Transforming Growth Factor beta (TGF $\beta$ ) .....	12
1.5. Die TGF $\beta$ -Signaltransduktion .....	13
1.6. Therapieansätze zur Behandlung der Leberfibrose .....	17
1.7. RNA-Interferenz mit short interfering RNAs (siRNAs): eine Methode zur posttranskriptionellen Genstilllegung .....	19
<b>2. Aufgabenstellung .....</b>	<b>23</b>
<b>3. Material und Methoden .....</b>	<b>25</b>
3.1. Allgemeines .....	25
Vorbereitung steriler Arbeitsmaterialien .....	25
3.3. Geräte .....	25
3.4. Fertige Reagenzzusammenstellungen (Kits) .....	26
3.5. Design von siRNA .....	27
3.6. Zellkultur .....	29
3.6.1. Allgemeines .....	29
3.6.2. Verwendete Zelllinien .....	29
3.6.3. Medien und Lösungen .....	29
3.6.4. Passagieren der Zellen .....	31
3.6.5. Bestimmung der Zellzahl .....	31
3.6.6. Kryokonservierung der Zellen .....	32
3.6.7. Reaktivieren von kryokonservierten Zellen .....	32
3.6.8. Transfektion der Zellen .....	33
3.7. Etablierung der Transfektion und Wirkung von siRNA .....	34
3.7.1. Qualitative Analyse der GFP-Expression .....	35
3.7.2. Quantitative Auswertung mithilfe der FACS-Analyse .....	35

3.8.	Messung des TGF $\beta$ -R1-Transkriptes mittels Real-Time-PCR..	36
3.8.1.	Transfektion von HUH7- und HSC-T6-Zellen mit TGF $\beta$ -R1-siRNA .....	36
3.8.2.	Ernten der Zellen und Zelllysis .....	37
3.8.3.	RNA-Isolierung aus den transfizierten Zellen .....	37
3.8.4.	Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung der RNA .	38
3.8.5.	Reverse Transkription der RNA .....	38
3.8.6.	Primer- und Sondenauswahl für die Real-Time-PCR .....	40
3.8.7.	Testung der Primer mittels einer qualitativen PCR.....	42
3.8.8.	Gelelektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente .....	43
3.8.9.	Real-Time-PCR.....	44
3.8.9.1.	Erstellen der Standardreihe.....	48
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>51</b>
4.1.	RNA-Interferenz in HUH7 und HSC-T6-Zellen .....	51
4.1.1.	Verminderte GFP-Reporterexpression nach Transfektion von siRNA gegen GFP in HUH7- und HSC-T6-Zellen .....	52
4.1.1.1.	Fluoreszenzmikroskopische Beobachtungen .....	52
4.1.1.2.	FACS-Analyse.....	53
4.2.	Auswahl von siRNA-Sequenzen zur Inhibierung der TGF $\beta$ -R1-Expression des Menschen und der Ratte mittels RNA-Interferenz .....	56
4.2.1.	Eine siRNA gegen den humanen TGF $\beta$ -R1: Sequenz und Eigenschaften .....	56
4.2.2.	Eine siRNA gegen den TGF $\beta$ -R1 der Ratte: Sequenz und Eigenschaften .....	60
4.3.	Transfektion von HUH7 und HSC-T6-Zellen mit TGF $\beta$ -R1-siRNA und Evaluation der RNA-Interferenz mittels Real-Time-PCR ...	63
4.3.1.	Ergebnis der Primer Testung (s. Kap. 3.8.7. und 3.8.8.) .....	63
4.3.2.	Real-Time-PCR: verminderte TGF $\beta$ -R1-Transkriptlevel nach RNA-Interferenz .....	64
<b>5.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>69</b>
5.1.	RNA-Interferenz durch Transfektion von Zellen der Linien HUH7 und HSC-T6 mit TGF $\beta$ -R1-siRNA .....	69

5.2.	Inhibierung der TGF $\beta$ -Signaltransduktion durch Reduktion der TGF $\beta$ -R1-Expression mithilfe einer siRNA .....	74
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>83</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>85</b>
<b>8.</b>	<b>Erklärung zu Vorabveröffentlichung von Ergebnissen.....</b>	<b>95</b>
<b>9.</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>97</b>



## Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
Abb.	Abbildung
ALK 5	Activin Like Kinase 5
bp	Basenpaar (base pair)
BMPs	Bone Morphogenetic Proteins
°C	Grad Celsius
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
cDNA	copy DNA
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	DNA spaltendes Enzym
dNTP`s	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ECM	Extrazellulärmatrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFS	Eigenfluoreszenzschwelle
evtl.	eventuell
F	forward
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	fetales Kälberserum (Fetal Calf Serum)
FGF	Fibroblast Growth Factor
FI	Fluoreszenzintensität
g	Gramm
GDF	Growth and Differentiation Factors

GFP	Grünes Fluoreszierendes Protein (Green Fluorescent Protein)
GITC	Guanidiumthiozyanat
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
HSC	Hepatische Sternzelle, Itozelle (Hepatic Stellate Cell)
hu	human
IL10	Interleukin 10
ILGF	Insulin-Like-Growth-Factor
kb	Kilobasen
l	Liter
LAP	Latency-Associated Peptide
LSKL-Peptid	Leu-Ser-Lys-Leu-Peptid
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
m	Mittelwert
M.	Musculus
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinasen
MCP-1	Methyl-akzeptierende Chemotaxis- Proteine
MIS	Mullerian Inhibiting Substance
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MMP	Matrixmetalloproteinasen
NASH	Nicht-alkoholische Steatohepatitis
nm	Nanometer
nM	nanomolar
No.	Nummer
Nr.	Nummer
nt	Nucleotid
p. A.	pro Analysis

PBS	Phosphatgepuffertes Salz (Phosphate buffered Saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
pM	picomolar
Qty	Quantität (Quantity)
rat	Ratte
R	reverse
RNA	Ribonukleinsäure
RNAI	RNA-Interferenz
RNase	RNA-spaltendes Enzym
ROI	Reactive Oxygen Intermediates
RT-PCR	Real-Time-PCR
s.	siehe
siRNA	short interfering RNA
Tab.	Tabelle
TE-Puffer	TRIS-EDTA-Puffer
TGF $\beta$	Transforming Growth Factor beta
TGF $\beta$ -R1 bzw -R2	TGF $\beta$ -Rezeptor1 bzw. 2
TIMP	Tissue Inhibitor of Metallo Proteinases
T <sub>m</sub>	melting Temperature
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Enzymeinheit)
u.	und
u.a.	unter anderem
UpM	Umdrehung pro Minute
UV	Ultraviolett
V.	Vena
v.a.	vor allem
vgl.	vergleiche

v/v

volume per volume

w/v

weight per volume

z. B.

zum Beispiel

# **1. Einleitung**

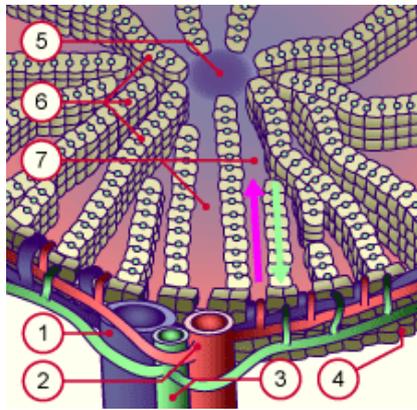
## **1.1. Fibrotische Erkrankungen der Leber**

Die Pathogenese der Leberfibrose ist durch die pathologische Akkumulation narbigen Bindegewebes und dadurch bedingte morphologische und funktionelle Veränderungen der Leber gekennzeichnet. Die Fibrose ist die Reaktion der Leber auf eine chronische Schädigung vielfacher Ursache. Entsprechend den Prinzipien der Wundheilung ist die Fibrose der Versuch einer Schadensbegrenzung durch Umkapselung und Auffüllung des schädigenden Prozesses bzw. des nekrotischen Parenchymdefektes mit narbigem Bindegewebe. Im Rahmen dieser Defektheilung kommt es durch die überschüssende entzündliche Produktion von Extrazellulärmatrix (ECM) und ihren gleichzeitig verminderten Abbau zur Vermehrung und zum Ausbau von Narbengewebe, dessen Ausmaß klinisch-funktionelle Bedeutung annehmen und lebensbedrohliche Pathologien nach sich ziehen kann [3, 22, 33, 39, 47, 59].

Die gesunde Leber ist mit ca. 1500 g das größte Organ des menschlichen Körpers und übernimmt vielfältige lebenswichtige Stoffwechsel- (Glukose- und Fettstoffwechsel), Synthese- (Gerinnungsfaktoren, Serumproteine), Speicher- (Glykogen, Triglyzeride, Vitamine, Eisen), Entgiftungs- und Ausscheidungsfunktionen (Galleproduktion, Abbau von Hormonen, Proteinen, Fremdstoffen). Anatomisch-histologisch ist sie durch ihre Läppchenstruktur charakterisiert, welche den funktionell notwendigen hohen Blutfluß (die Leber erhält ca. 25 % des Herzzeitvolumens, ihre Masse beträgt dagegen nur ca. 2,5 % des Körpergewichtes [57]) und den intensiven Stoffaustausch zwischen dem Blut und den Zellen der Leber ermöglicht [23].

Das einzelne Leberzellläppchen (s. Abb. 1) ist im Querschnitt von bienenwabenartiger Gestalt, in seiner Längsachse verläuft mittig eine Zentralvene, die das Blut aus den radiär in sie einmündenden Lebersinus ableitet. Zwischen den Lebersinus liegen - radiär balken- bzw. plattenartig angeordnet - die Hepatozyten; wo sie aneinandergrenzen, bilden sie die interzellulären Gallenkanälchen. Den Lebersinusoiden fließt aus Terminalästen

der V. portae nährstoffreiches Blut der V. portae sowie sauerstoffreiches der A. hepatica zu. Die interlobulären Äste der V. porta sowie der A. hepatica verlaufen zusammen mit je einem Gallengang in den Portalfeldern, die an den "Ecken" des bienenwabentartigen Leberläppchens gelegen sind.



- 1 V. interlobularis
- 2 A. interlobularis
- 3 Ductus interlobularis bilifer
- 1 – 3 Trias hepatica (Glisson) im Periportalfeld
- 4 Leberläppchen
- 5 V. centralis
- 6 Laminae hepaticae
- 7 Sinus hepaticus

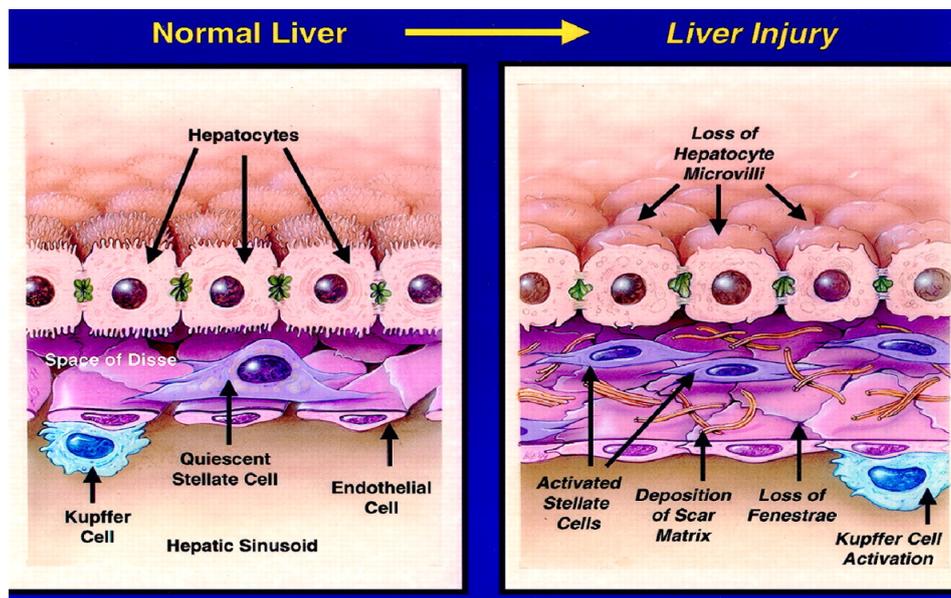
**Abbildung 1:** Anatomisch schematische Darstellung eines Leberläppchens  
 Übernommen aus: <http://www.embryology.ch/allemand/sdigestive/leber02.html>

Zwischen den Hepatozyten und den Lebersinusoiden befindet sich abgegrenzt durch ein fenestriertes Sinusendothel der sog. DISSE-Raum, in welchen die Mikrovilli der Hepatozyten hineinragen (s. Abb. 2). Eine deutliche Basallamina zwischen dem Endothel und den Hepatozyten fehlt, jedoch findet sich im DISSE-Raum eine zarte, basalmembranartige Matrix u.a. bestehend aus den Basalmembranproteinen Laminin und Fibronectin sowie den afibrillären Kollagentypen IV, VI und XIV. In losem Nachbarschaftskontakt mit den Sinusendothelzellen liegen die KUPFFER-Zellen, phagozytierende und eisenspeichernde Makrophagen des mononukleären Phagozytensystems. Des weiteren befinden sich im DISSE-Raum Fett- und Vitamin A-speichernde Zellen, die Hepatischen Sternzellen (HSC) [3, 26].

Gegenüber der gesunden Leber zeichnet sich die fibrotische Leber anatomisch-histologisch u.a. durch folgende morphologischen Veränderungen aus (s. Abb. 2):

1. Die epithelialen Hepatozyten büßen ihre in den subendothelialen DISSE-Raum hineinragenden Mikrovilli ein, deren große Oberfläche dem Stoffaustausch mit dem Blut dient.
2. Das sinusoidale Endothel verliert seine Fenestrierung.

- Die Hepatischen Sternzellen werden aktiviert und transdifferenzieren zu Myofibroblasten. Als solche produzieren sie große Mengen einer verändert zusammengesetzten Extrazellulärmatrix (ECM), die im DISSE-Raum akkumuliert. Fibrilläres Kollagen I und III tritt dabei an die Stelle der zarten Basalmembran aus Kollagen IV, VI und XIV und verstopft den Perisinuisoidalraum. Die Hepatischen Sternzellen sind die Hauptproduzenten extrazellulärer Matrix in der geschädigten Leber [3, 32, 36, 39, 59, 82].



**Abbildung 2:** Strukturelle Veränderungen der Leber bei chronischer Schädigung (übernommen aus [34])

Die Leberfunktion wird durch die Leistung der Leberzellen in Verbindung mit der Durchblutung bestimmt. Voraussetzung für eine gesunde Leberleistung ist neben quantitativer Ausgewogenheit der Leberkomponenten die intakte architektonische und damit die funktionelle Beziehung der Leberkomponenten zueinander. Die fibrotische Akkumulation von ECM und die fortschreitende Schädigung der Leberepithelien durch Entzündung, Nekrose und knotige Regeneration im Rahmen der Leberfibrose führt zur Zerstörung dieses funktionellen Gleichgewichts, so dass die Hepatozyten in ihren lebenswichtigen Stoffwechsel-, Synthese-, Speicher-, Entgiftungs- und Ausscheidungsfunktionen eingeschränkt werden [22, 23].

Die fibrotische Antwort der Leber auf eine chronische Schädigung ist - unabhängig vom auslösenden Stimulus - stets ähnlich und führt über das Stadium der Fibrose zum Endstadium der Leberzirrhose [3]. Die morphologische Verteilung der fibrotischen ECM im Leberläppchen hingegen variiert mit der Lokalisation und der Art der Schädigung. Die virale Hepatitis z.B. zieht eine v.a. periportal lokalisierte Fibrose nach sich, die alkoholische Hepatopathie hingegen setzt perizentrale Schäden und Fibrosen. Eine fortgesetzte Schädigung führt schließlich zur panlobulären Fibrose [3].

## **1.2. Die Leberzirrhose, Endstadium chronisch fibrotischer Lebererkrankungen**

Die prinzipiell reversible Leberfibrose geht bei andauernder Schädigung und steigender Matrixakkumulation in eine irreversible Leberzirrhose über, die schließlich zur Leberinsuffizienz und zum Tod durch Leberversagen führt [3, 22, 34].

Die definitive knotige Zerstörung der lobulären und vaskulären Architektur des Leberparenchyms durch Ausbildung von fibrotischen Bindegewebesepten und ungeordneten Parenchymregeneratknoten führt zur schweren funktionellen Beeinträchtigung der Leber und zieht zahlreiche klinische Komplikationen und eine schlechte Prognose nach sich [22]. Während die Einjahresüberlebensrate der Patienten nach der Child-Pugh-Klassifikation der Leberzirrhose im A-Stadium noch bei 100 % und im B-Stadium bei immerhin 85 % liegt, sinkt sie mit fortschreitendem Funktionsverlust auf 35 % im Stadium C [47]. Die häufigsten Todesursachen sind dabei das Leberversagen, die Varizenblutung sowie das sich auf dem Boden der Zirrhose entwickelnde Leberzellkarzinom [47]. Die Inzidenz der Leberzirrhose liegt in Europa und den USA bei ca. 250/100.000/Jahr [47]. Es sind mannigfaltige Ursachen der Leberfibrose und -zirrhose bekannt. An erster Stelle, da in Europa und den USA mit 60 % am häufigsten vorkommend, sei die Leberzirrhose alkoholtoxischer Ätiologie genannt. Darauf folgt mit einem Anteil von ca. 30 % die durch chronische Virushepatitiden vom Typ B, C und D verursachte Zirrhose [47]. Des weiteren

differenziert man ätiologisch infektiös, kryptogenetisch oder posthepatitisch, autoimmun, biliär, kardial sowie genetisch und medikamentös/toxisch bedingte Ursachen der Leberfibrose bzw. -zirrhose [47, 80] Als Teil des metabolischen Syndroms gewinnt die Nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH) als Ursache von Leberfibrose, -zirrhose und ihren Komplikationen zunehmend an Bedeutung [15, 60].

Die klinische Symptomatik und die Komplikationen der Leberzirrhose folgen aus den morphologischen Veränderungen der fibrotischen Umwandlung. Ihre Ausprägung ist eher abhängig vom Ausmaß der lebermorphologischen Schädigung, als von ihrer Ätiologie [80] und führt zur weitreichenden Schädigung des Organismus wie z.B. Kachexie, Aszites, Blutungs- und Infektneigung, Niereninsuffizienz sowie endokrinologischen und neurologischen Störungen [22, 47, 80].

Da derzeit keine spezifische Therapie der Leberzirrhose außer der Lebertransplantation zur Verfügung steht, beschränkt sich die Behandlung auf Allgemeinmaßnahmen (Vermeidung aller potentiell lebertoxischen Substanzen, regelmäßige Lebensführung, kalorisch ausreichende und ausgewogene Ernährung), die Behandlung der Grundkrankheit (soweit möglich) und der Komplikationen sowie eine regelmäßige Diagnostik zur Früherkennung eines hepatozellulären Karzinoms [47].

Angesichts der beschriebenen Krankheitsentität wird die Bedeutung der Erforschung fibrogenetischer Prozesse deutlich. Die Entwicklung effektiver Therapiemöglichkeiten zur Regeneration oder Progressionshemmung der Leberfibrose könnte das Endstadium der Leberzirrhose vermeiden bzw. hinauszögern und so die Lebenserwartung und Lebensqualität der betroffenen Patienten deutlich erhöhen [3].

### **1.3. Hepatische Sternzellen und Transforming Growth Factor beta (TGFβ): zwei Hauptakteure der Leberfibrose**

Im Verlauf einer chronischen Schädigung der Leber vollziehen die Hepatischen Sternzellen (HSC) eine phänotypische und funktionelle Transdifferenzierung

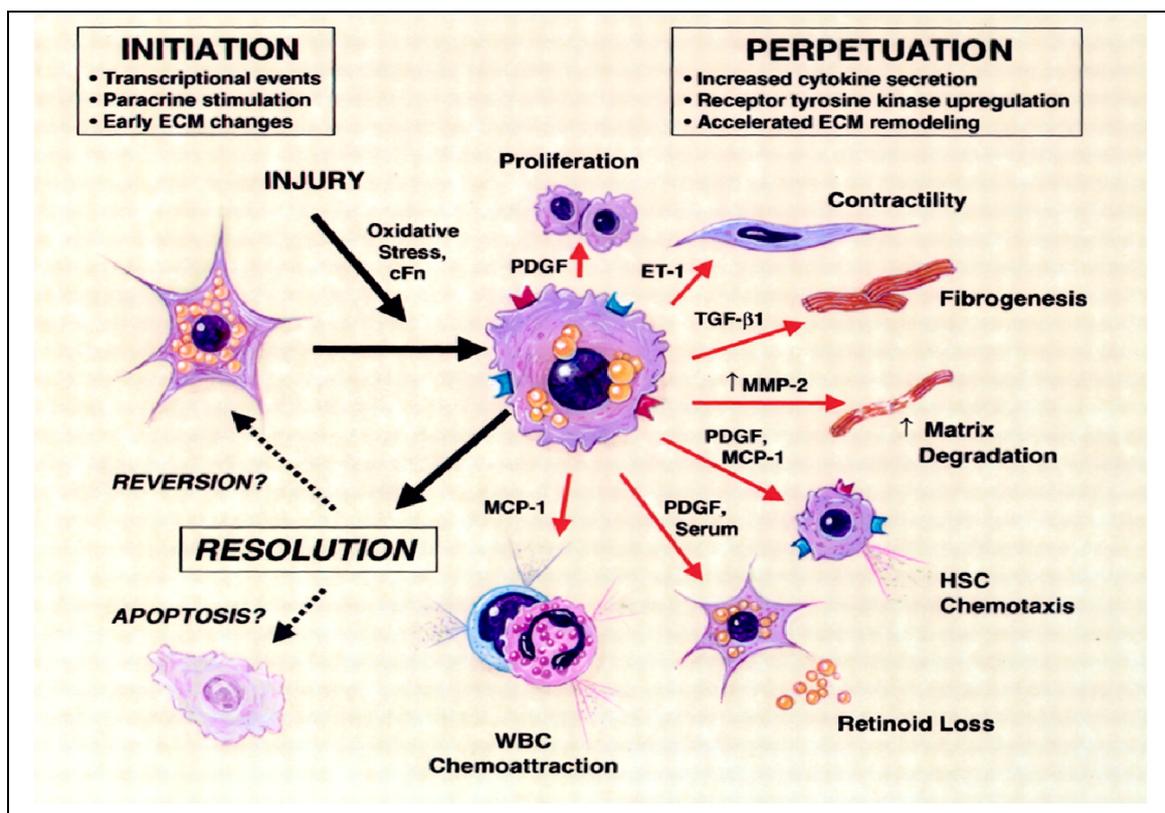
aus dem beschriebenen Ruhezustand hin zu stark proliferierenden, kontraktile Myofibroblasten. Diese sind charakterisiert durch den Verlust ihrer Vitamin-A-Speicher, eine verstärkte Proliferation, die Ausprägung von Kontraktilität, starker fibrogenetischer Aktivität, Chemotaxis von HSC und Leukozyten und die Sezernierung von hauptsächlich autokrinen Zytokinen [34, 38, 61, 75]. Scott L. Friedman unterscheidet dabei zwei Phasen der HSC-Aktivierung im Rahmen der Fibrogenese: die Initiation und die Perpetuation [32] (s. Abb. 3).

*Initiiert* wird die Aktivierung Hepatischer Sternzellen durch die parakrine Stimulation der HSCs aus den geschädigten umliegenden Hepatozyten, KUPFFER- und Endothelzellen sowie den Abbau von ECM durch MMPs.

Zentrale Mediatoren sind dabei die von Hepatozyten und KUPFFER-Zellen sezernierten Reactive Oxygen Intermediates (ROI), die als Antioxidantien die Hepatozyten schädigen, proinflammatorisch wirken und HSCs aktivieren. Des Weiteren tragen die E11A-Isoform, eine von geschädigten Endothelzellen sezernierte Fibronectinvariante, sowie Platelet Derived Growth Factor (PDGF), TGF $\beta$ -1, Fibroblast Growth Factor (FGF) u.a. zur Aktivierung der HSC bei.

Aufrechterhalten im Sinne der *Perpetuation* wird der aktivierte Phänotyp der Hepatischen Sternzellen autokrin und parakrin sowie indirekt durch die veränderte ECM. Der wichtigste proliferationsinduzierende Mediator ist dabei PDGF, daneben Endothelin1, Thrombin, FGF, Insulin-Like-Growth-Factor (ILGF) u.a. [37]. Der wichtigste fibrogenetische Mediator der HSC ist TGF $\beta$ -1, welcher von den HSCs hauptsächlich autokrin freigesetzt wird [37]. Die HSC akkumulieren nach chemotaxisinduzierter Migration durch PDGF und MCP1 am Ort der Schädigung, um dort ihre fibrogenetischen Wirkungen unter dem Einfluß von TGF $\beta$ -1 verstärkt zu entfalten. Die erhöhte Kontraktilität der myofibroblastisch transdifferenzierten HSCs wird durch Endothelin1 vermittelt und führt mit der Verengung von Sinusoiden zur Behinderung des Blutflusses und zur portalen Hypertension [3, 34]. Die verstärkte Freisetzung von MMP2 und 3 sowie von TIMP1 und 2 durch die aktivierten HSC fördert den Abbau der normalen ECM zugunsten von fibrillärem Kollagen und bereitet so den Boden für dessen Akkumulation zur Narbe. Durch die Chemotaxis von Neutrophilen und Monozyten wirken aktivierte HSCs proinflammatorisch, ein Effekt, der ebenso wie die Fibrogenese durch die gleichzeitige Sekretion von IL10 z.T. antagonisiert wird.

Aus dieser Beschreibung wird deutlich, dass die Aktivierung der Hepatischen Sternzellen von entscheidender Bedeutung für die Fibrogenese in der geschädigten Leber ist. Die fibrogene Funktion wird dabei wesentlich durch TGF $\beta$ -1 vermittelt. Im Sinne der Entwicklung effektiver Therapiemöglichkeiten für fibrotische Erkrankungen im Allgemeinen sowie der Leber im Besonderen ist das Verständnis und die Beeinflussung der Fibrogenese ein zentraler Ansatzpunkt. Das Ziel vieler Therapieansätze ist dabei die Inhibierung der fibrotischen Aktivität, welche schließlich durch die Akkumulation von veränderter ECM zur Fibrose der Leber führt. Als wichtigster Mediator der Fibrogenese in den HSC stellen TGF $\beta$  und seine Signalwirkung einen Kernpunkt des Interesses dar bezüglich der Entwicklung therapeutischer Strategien im Rahmen fibrotischer Erkrankungen [3].



**Abbildung 3:** Aktivierung der Hepatischen Sternzelle bei Leberschäden (aus [34])

#### 1.4. Transforming Growth Factor beta (TGF $\beta$ )

TGF $\beta$  ist Teil einer nach ihm benannten Familie von mehr als 30 weitverbreiteten Wachstumsfaktoren, deren vielfältige Funktionen in der Steuerung von Zelldifferenzierung, –proliferation, -migration und -adhäsion, der Gewebestrukturierung und –homeostase sowie des Zelluntergangs liegen. Die Familie umfasst neben TGF $\beta$  in seinen fünf Isoformen mehrere durch strukturelle und funktionelle Gemeinsamkeiten charakterisierte Untergruppen, u.a. die verschiedenen Gruppen der Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) und Growth and Differentiation Factors (GDFs), die Vg1-Familie, die Aktivine und die Inhibine sowie die Mullerian Inhibiting Substance (MIS) [62, 63]. Die Mitglieder der TGF $\beta$ -Familie werden evolutionär streng konserviert in vielen Spezies von der Fliege bis hin zum Menschen ubiquitär exprimiert [62-64, 66, 86].

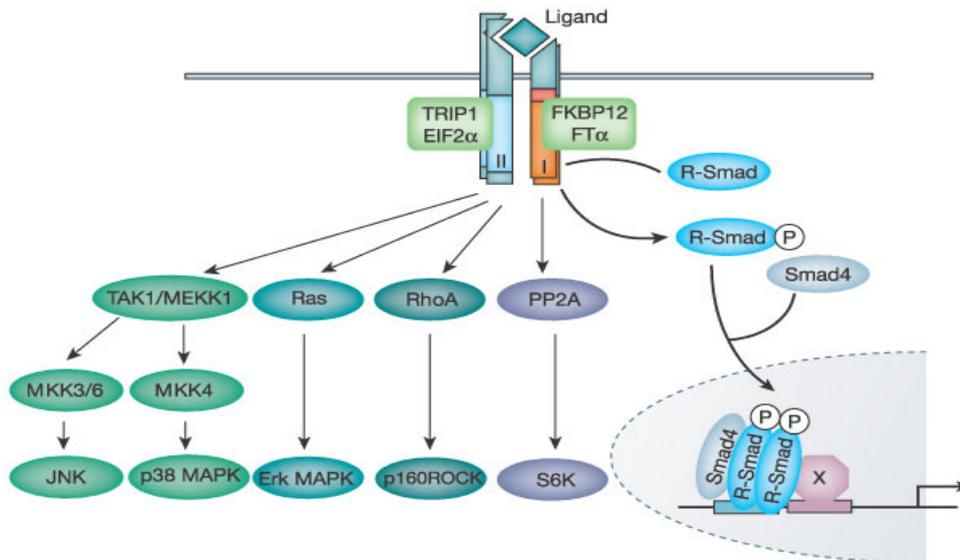
Von den fünf bekannten Isoformen des TGF $\beta$  sind beim Menschen die Isoformen eins bis drei vertreten [62]. In Abhängigkeit von der Art und dem Zustand der Zielzellen entwickelt TGF $\beta$  eingebettet in ein vielfältiges Gesamtnetzwerk verschiedener Signalwege ein breites, genau auf die zelluläre Situation abgestimmtes Wirkungsspektrum z.B. im Rahmen der Wundheilung, der Fibrogenese, der Immunantwort oder der Tumorsuppression [3, 49, 66, 86, 101]. So ist TGF $\beta$  u.a. als sehr potenter, reversibler Wachstumsinhibitor von epithelialen, endothelialen, fibroblastischen, neuronalen, lymphatischen und hämato-poetischen Zellen bekannt. Seine Wirkung entwickelt TGF $\beta$  dabei durch eine Verlängerung oder Unterbrechung der G1-Phase des Zellzyklus [62]. Des Weiteren fördert TGF $\beta$  in mesenchymalen, epithelialen, lymphoiden und vielen Tumorzellarten die Zelladhäsion (Integrin-Rezeptoren  $\uparrow$ ) und stimuliert v.a. die beiden erstgenannten Zelltypen zur gesteigerten Produktion extrazellulärer Matrixproteine. Die gleichzeitige TGF $\beta$ -vermittelte Hemmung der Gewebe-proteasen führt zu einer insgesamt Vermehrung der Extrazellulärmatrix. Diese Eigenschaften sowie seine angiogenetische und chemoattraktive Wirkung auf Monozyten u.a. begründen die bedeutende Rolle, die TGF $\beta$  bei Wundheilungs- und fibrotischen Prozessen aber auch bei der Immunsuppression und als Suppressor der Tumorgenese spielt [62].

Aufgrund seiner starken matrixinduzierenden, profibrogenen Wirkung auf mesenchymale Zellen wie die Hepatische Sternzelle, gilt TGF $\beta$  als ein zentraler Mediator der Leberfibrose [3, 32, 39, 40]. Der antiproliferative Effekt des TGF $\beta$  auf epitheliale Zellen wirkt gleichzeitig einer Regeneration der Leberepithelien entgegen [5, 6, 40]. Verschiedene Ansätze, die TGF $\beta$ -Synthese oder TGF $\beta$ -Signalwege zu unterbrechen, bewirkten eine Verminderung der Fibrose in experimentellen Modellen. Dabei ist jedoch genau darauf zu achten, die normalen, lebenswichtigen Funktionen von TGF $\beta$  nicht dergestalt zu beeinträchtigen, dass daraus wiederum andere Pathologien entstehen [85].

### **1.5. Die TGF $\beta$ -Signaltransduktion**

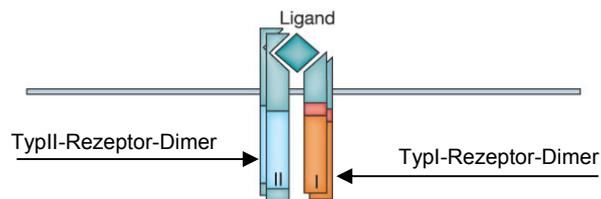
Die Zytokine der TGF $\beta$ -Familie vermitteln ihre Wirkung durch die Bindung an Rezeptorkomplexe aus unterschiedlichen Kombinationen von transmembranären Typ1- und Typ2-Rezeptoren (TGF $\beta$ -R1 und TGF $\beta$ -R2). In diesem Komplex aktiviert der Typ2- den Typ1-Rezeptor, welcher das spezifische Signal über unterschiedliche intrazelluläre Signalkaskaden wie z.B. die Smad-Proteine oder MAPK an die Zielstrukturen weitergibt (s. Abb. 4) [24, 86]. Die vielen unterschiedlichen Kombinationsmöglichkeiten der Liganden- und Rezeptor-expressionsmuster und der Rezeptoren untereinander, sowie die auf allen Ebenen komplexe Regulation der Signalwege erlauben die kontextabhängige Transduktion einer Vielfalt spezifischer Signale auch über den gleichen Liganden (s. Abb. 5) [24].

Es gibt verschiedene Typ1- und Typ2-Rezeptoren, die unterschiedliche Liganden binden (s. Abb. 5). Für die Signalweiterleitung von TGF $\beta$  gibt es einen Typ2- und drei Typ1-Rezeptoren, die jeweils bestimmte Smad-Proteine aktivieren (s. Abb. 5) [24]. Die Aktivin Like Kinase 5 (ALK 5) ist der dominante TGF $\beta$ -Typ1-Rezeptor, der die meisten TGF $\beta$ -spezifischen Signale, inklusive des profibrotischen überträgt [17]. Daneben gibt es noch die TGF $\beta$ -R1-Typen ALK 1 und 2. Die TGF $\beta$ -Wirkung, die über die ALK 1 ausgelöst wird, ist antagonistisch zu den ALK 5 vermittelten und bietet so eine der vielfältigen Regulierungsmöglichkeiten des TGF $\beta$ -Signales [16].



**Abbildung 4:** Smad-abhängige und unabhängige Wege der TGFβ-Signalweiterleitung von extra- nach intrazellulär (aus [24] )

Gemeinsam ist den TGFβ-Rezeptoren ihr prinzipieller Aufbau als transmembranäre Serin-Threonin-Kinasen mit einer extrazellulären Ligandenbindungsdomäne, einer transmembranären Region und einer intrazellulären Kinasedomäne zur Signalweiterleitung. Im Ruhezustand liegen die beiden Rezeptortypen meist als Dimere, gelegentlich bereits auch als Heterotetramere in der Zellmembran.



Type II	Type I	R-Smad
BMPRII	ALK-2 (ActRI) ALK-3 (BMP-RIA) ALK-6 (BMP-RIB)	Smad1, Smad5, Smad8
ActRII, ActRIIB ActRIIB	ALK-4 (ActRIB) ALK-7	Smad2 Smad2
TβRII	ALK-5 (TβRI) ALK-1 ALK-2	Smad2, Smad3 Smad1, Smad5
AMHR	ALK-3 ALK-2 ALK-6	Smad1, Smad5

**Abbildung 5:** Wachstumsfaktoren der TGFβ-Familie und ihre Rezeptoren. Kombinationen von Typ2- und Typ1-Rezeptoren bestimmen die Signalwirkung (aus [24])

Nach der Ligandenbindung erfolgt die Signalweiterleitung, indem der Typ2-Rezeptor den Typ1-Rezeptor in einem heterotetrameren Komplex, bestehend aus einem Typ2- und einem Typ1-Dimer durch Phosphorylierung aktiviert. Eine Signalweiterleitung alleine über den Typ2-Rezeptor in Abwesenheit des Typ1-Rezeptors wurde noch nicht beobachtet [24].

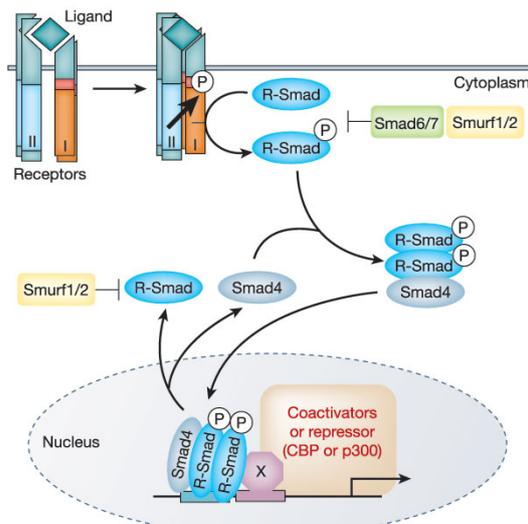
Die unterschiedlichen TGF $\beta$ -Isoformen bevorzugen unterschiedliche Rezeptorbindungskonstellationen. Während TGF $\beta$ 1 und 3 zunächst an das TGF $\beta$ -R2-Dimer binden, wodurch dann die Heterotetramerbildung induziert wird, kann TGF $\beta$ 2 nur an das bereits etablierte Heterotetramer binden. Die anschließende Aktivierung des Typ1-Rezeptors – im Fall von TGF $\beta$  besonders der ALK 5 – durch den Typ2-Rezeptor ist das zentrale Element dieser auf allen Ebenen sehr differenzierten und genau regulierten Signalübertragung zwischen extra- und intrazellulär [24].

Intrazellulär wird das TGF $\beta$ -Signal über verschiedene Wege weitergeleitet. Ein gut untersuchter Pfad ist dabei die Kaskade der Smad-Proteine. Man unterscheidet 8 verschiedene Smads, die in drei Typen mit unterschiedlichen Funktionen eingeteilt werden können:

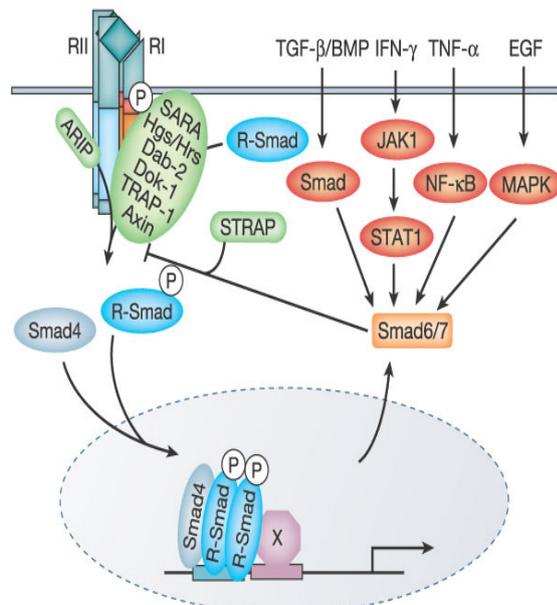
- a) Rezeptor-regulierte Smads (R-Smads: Smad 1, 2, 3, 5, 8)
- b) das Co-Mediator-Smad (Co-Smad: Smad 4)
- c) Inhibitorische Smads (I-Smads: Smad 6 und 7)

Die phosphorylierten ALK's aktivieren die Smad-Kaskade, indem sie in Kontakt mit den ihnen zugeordneten R-Smads treten und diese ihrerseits phosphorylieren. Das TGF $\beta$ -Signal wird, wie in den Abbildungen 5, 6 und 7 dargestellt, von der ALK 5 an die Smads 2 und 3 und von den ALK's 1 und 2 an die Smads 1 und 5 weitergegeben. Die so aktivierten R-Smads assoziieren daraufhin mit dem Co-Smad 4 zu einem Heterodimer oder –trimer aus je einem oder zwei R-Smads und dem Co-Smad und translozieren in dieser Form in den Nukleus, wo sie in Kooperation mit zahlreichen Cofaktoren die Transkription ihrer Zielgene regulieren. Das I-Smad 7 vollzieht einen auto-inhibitorischen Feedback-Mechanismus für TGF $\beta$ . Indem es an den aktivierten TGF $\beta$ -R1 bindet, verhindert es die Interaktion und Aktivierung der R-Smads und vermittelt durch Smurf-Proteine außerdem die Degradation beider Rezeptoren (TGF $\beta$ -R1 u. -R2). Die inhibitorischen Smads sind ein Beispiel der auf allen Ebenen (Liganden-, Rezeptoren-, Smad- und Transkriptionsebene) durch vielfältige

Interaktionen mit Regulationsfaktoren und mit anderen Signalwegen sehr differenziert regulierten TGF $\beta$ -Signaltransduktion (s. Abb. 4, 6, 7) [16, 24, 49, 63, 64, 66, 86]. Die vielfältigen Regulationsmöglichkeiten der TGF $\beta$ -Signaltransduktion und die Einbettung des TGF $\beta$ -Signals in das zelluläre Gesamtsignalnetzwerk ermöglichen eine zelltyp- und kontextspezifische Signalantwort auf den gleichen Liganden.



**Abbildung 6:** TGF $\beta$ -Rezeptoraktivierung und smad-Kaskade (aus [24])



**Abbildung 7:** Regulationsmechanismen der TGF $\beta$ -Signaltransduktion (aus [24])

Das zentrale Element der Signalweiterleitung ist stets der TGF $\beta$ -Rezeptorenkomplex, seine Ausschaltung ein interessanter Ansatzpunkt zum Studium der TGF $\beta$ -Funktionen und -signalwege sowie zur Entwicklung therapeutischer Strategien gegen eine Vielzahl von Erkrankungen. Die ALK 5 als dominanter Typ1-TGF $\beta$ -Rezeptor, die u.a. auch die fibrogenetische Wirkung von TGF $\beta$

vermittelt, bietet sich dabei als möglicher Interventionspunkt bei fibrotischen Erkrankungen wie z.B. der Leberfibrose an [56].

## **1.6. Therapieansätze zur Behandlung der Leberfibrose**

Die Therapie der chronischen, destruierenden Leberfibrose fußt zurzeit auf drei Prinzipien:

1. der kausalen Therapie, d.h. der Behandlung der jeweils zugrunde liegenden Erkrankung durch Beseitigung des schädigenden Stimulus,
2. der Hemmung der durch eine Leberschädigung hervorgerufenen Entzündungsreaktion,
3. der symptomorientierten Therapie, d.h. der Behandlung der durch die bestehende Krankheit hervorgerufenen Leiden.

Die genannten Therapieansätze der fibrogenetischen Lebererkrankungen können je nach Art der Erkrankung sehr effektiv sein und sogar zur Heilung oder zumindest zur Verlangsamung des fibrotischen Prozesses führen, sind aber leider bei einem großen Teil dieser Erkrankungen unwirksam bzw. unzureichend. Als Beispiel sei die Leberfibrose auf dem Boden einer Schistosomeninfektion genannt, die durch die Gabe von Antibiotika kausal therapiert werden kann. Eine chronische Hepatitis C-Infektion, eine autoimmun bedingte Hepatitis, eine alkoholtoxische Leberzirrhose oder eine wie auch immer verursachte fortgeschrittene Leberfibrose hingegen sind Erkrankungen, die weder kausal, noch antiinflammatorisch noch symptomorientiert zufriedenstellend therapiert werden können. Hier werden neue Therapieansätze erforderlich, zum Beispiel solche, die spezifisch in die Pathogenese der Organfibrose eingreifen.

Da die Fibrogenese auch eine physiologische und protektive Reaktion im Rahmen der Wundheilung darstellt, sollte eine antifibrotische Therapie nicht darauf zielen, diese komplett zu unterbinden. Vielmehr sollte sie den *circulus vitiosus* der chronischen Fibrose durchbrechen und die fibrotische Reaktion unter Kontrolle bringen [3, 7, 59]. Durch die Entwicklung von Methoden zur Milderung oder Verlangsamung der Fibrogenese, sowie zur Förderung des

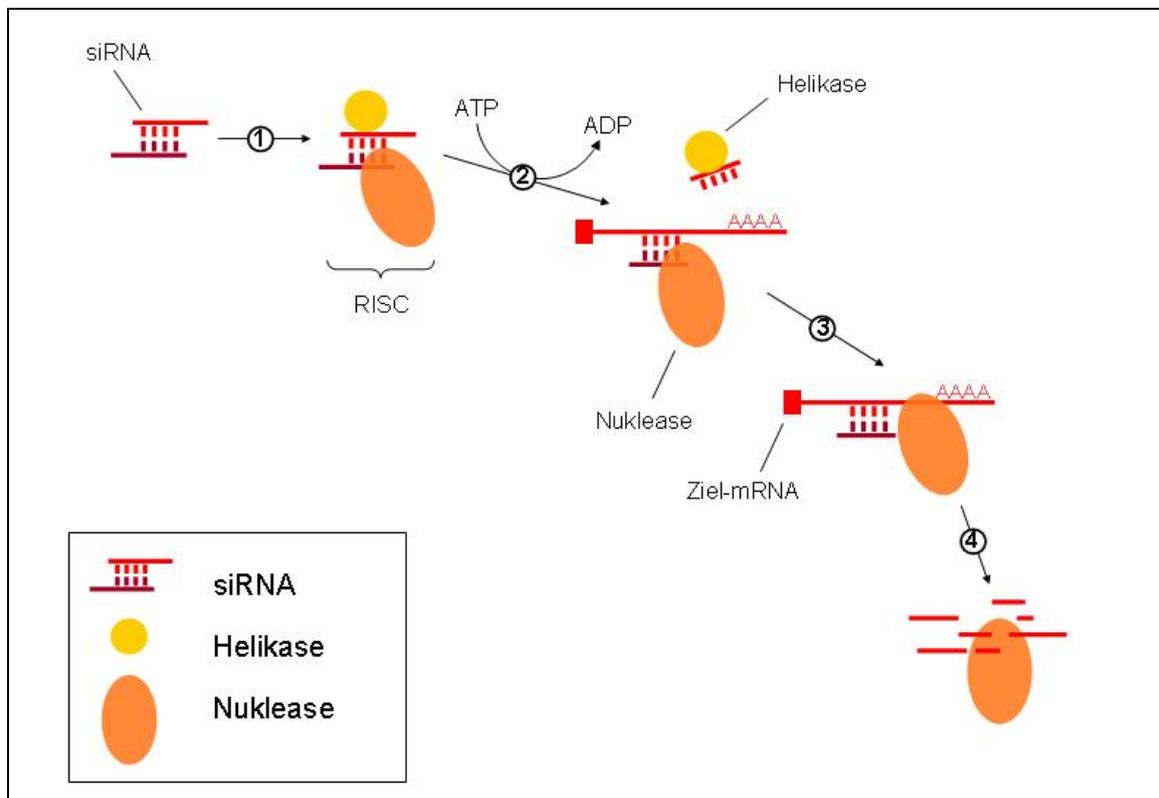
Matrixabbau und der Regenerationsfähigkeit der Leber könnte die Progression zur symptomatischen Leberzirrhose verzögert bzw. vermieden werden und so die Lebensqualität und –erwartung der Patienten gesteigert werden. Neuere Ansätze fokussieren dabei auf die Hauptprotagonisten der Fibrogenese selbst, die Hepatischen Sternzellen und die fibrogenetischen Zytokine [3]. Es gibt zahlreiche Ansatzpunkte und Strategien, die fibrogenetische Aktivität der HSC zu inhibieren. Darunter finden sich solche, die auf den Wachstumsfaktor TGF $\beta$  selbst zielen, um z.B. anhand von gegen TGF $\beta$  gerichteten Antikörpern die wirksame Konzentration des Faktors zu vermindern [35, 56] oder mithilfe des Proteaseinhibitors *Camostat Mesilate* die proteolytische Aktivierung von latentem TGF $\beta$  zu behindern [77]. *Yoshiji et al.* konnten zeigen, dass *Candesartan* und *Perindopril*, zwei wohlbekannte pharmakologische Substanzen und Modulatoren der Angiotensin II-Typ1-Rezeptorinteraktion, die steigende TGF $\beta$ -mRNA-Expression in aktivierten HSC blockieren und dadurch die Fibroseentwicklung im Rattenmodell signifikant mildern [103]. Auch einige z.T. sehr traditionsreiche pflanzliche Präparate sind bekannt, die zur Behandlung der Leberfibrose eingesetzt werden, darunter z.B. *Silvia milthiorrhiza* [48, 99] oder *Sho-saiko-to* [18, 19, 81]. Andere Ansätze zielen auf die Hemmung der TGF $\beta$ -Signaltransduktion an verschiedenen zellulären Gliedern der Signalkaskade [17, 21, 56, 58, 68]. Dabei richtet sich wachsendes Interesse auf gentechnische Methoden und deren gentherapeutisches Potential [70, 79], in den letzten Jahren insbesondere auf die vielseitig anwendbare Antisense-Technologie [91]. Das langfristige Ziel all dieser Versuchsansätze ist die Entwicklung einer effektiven, zellspezifischen, leicht anzuwendenden, nebenwirkungsarmen und gut verträglichen Methode zur Kontrolle und Einschränkung der überschießenden Fibrogenese in der Leber u.a. Organen. In der vorliegenden Arbeit richtet sich das Interesse dabei auf die short interfering RNA (siRNA)-vermittelte posttranskriptionelle Supprimierung des TGF $\beta$ -Rezeptors1, welchem eine Schlüsselfunktion innerhalb der TGF $\beta$ -Signaltransduktion zukommt.

### 1.7. RNA-Interferenz mit short interfering RNAs (siRNAs): eine Methode zur posttranskriptionellen Genstilllegung

RNA-Interferenz ist ein den meisten eukaryoten, so auch den Säugetierzellen endogener, evolutionär konservierter Mechanismus zur posttranskriptionellen Inaktivierung von Genen. Dabei wird die mRNA des betreffenden Genes abgebaut und dadurch inaktiviert. Die Effektormoleküle der RNA-Interferenz sind short interfering RNAs (siRNAs). SiRNAs sind kurze, 21 – 23 bp umfassende doppelsträngige RNA-Moleküle mit einem charakteristischen 3'-Überhang von zwei bis drei bp. Sie entstehen durch die enzymatische Spaltung langer RNA-Doppelstränge durch eine Enzymfamilie namens Dicer oder können exogen als synthetische siRNAs in die Zellen eingebracht werden. Die siRNAs assoziieren im Zytoplasma mit Helicase- und Nuklease-Molekülen zu einem Ribonukleoproteinkomplex, dem ‚RNA induced silencing complex‘, abgekürzt RISC. Innerhalb dieses Komplexes wird die siRNA entwunden, bindet als Einzelstrang an die ihr homologe Ziel-mRNA und initiiert so deren Degradation durch die RISC-Nuklease, was in der effektiven posttranskriptionellen Stilllegung des Zielgenes resultiert (s. Abb. 8) [8, 27, 29, 31, 42-44, 50, 53, 84, 94, 104]. *Andrew Z. Fire und Craig C. Mello* machten sich diesen Mechanismus zunutze, als sie 1998 bei Versuchen an *Caenorhabditis elegans* entdeckten, dass die zelluläre Injektion doppelsträngiger, spezifisch-homologer RNA die Expression von Genen mit höherer Effizienz inhibieren kann als die Injektion einzelsträngiger RNA-Fragmente [31].

Diese Inaktivierung von Genen durch RNA-Interferenz eröffnete vielversprechende neue technische Perspektiven bei der Erforschung von Genfunktionen und der Entwicklung gentherapeutischer Strategien und erlangte innerhalb weniger Jahre weltweite Anerkennung. Die beiden Forscher *Andrew Z. Fire und Craig C. Mello* erhielten als Auszeichnung für ihre Arbeit im Dezember 2006 den Nobelpreis für Medizin. Der Mechanismus der RNA-Interferenz wurde seither intensiv weiter erforscht und als Methode zur Genstilllegung technisch etabliert. Wie z.B. die Arbeitsgruppe Elbashir et al. zeigen konnte, sind auch synthetische siRNAs in der Lage, die Expression ihrer Zielgene in Zellen verschiedener Säugetiere und auch in menschlichen Zellen sehr effektiv und spezifisch zu inhibieren [30]. Die außerordentliche Effektivität

und Spezifität der siRNAs, auch im Vergleich mit anderen molekularbiologischen Techniken, ihre Robustheit, leichte Synthese und vielseitige gentechnische Anwendbarkeit, z.B. in Plasmiden und viralen Vektoren, haben in den letzten Jahren großes Interesse hervorgerufen [9, 41, 72, 73, 94, 98].



**Abbildung 8:** RNA-Interferenz: Posttranskriptionelles „gene silencing“ durch siRNAs  
 (1) Die siRNA bildet mit den Enzymen Helikase und Nuklease einen Komplex, der „RNA-Induced Silencing Complex“ (RISC) genannt wird.  
 (2) Die Helikase entwindet in diesem Komplex unter ATP-Verbrauch die siRNA, so dass der Antisense-Strang (dunkelrot) an die Ziel-messenger-RNA (langer hellroter Strang) binden kann.  
 (3) Die Nuklease des RISC-Komplexes bindet an die (Ziel-) mRNA,  
 (4) welche dann rasch von anderen zellulären Nukleasen abgebaut wird.  
 (Nach: [53], zur Verfügung gestellt von Frau Julia Wallraf, Institut für Pathologie der Universität zu Köln)

Obwohl die siRNA-Technologie auch einige Probleme und Herausforderungen in sich birgt, wie z.B. mögliche unspezifische Aktivitäten, die Induktion einer Interferonantwort durch siRNAs sowie das Problem der spezifischen Verabreichung von siRNAs, gibt es die realistische Aussicht und viele Ansätze, diese

zu überwinden und die besondere Effizienz und Spezifität der RNA-Interferenz (RNAi) nicht allein zum Studium von Genfunktionen, sondern auch therapeutisch nutzbar zu machen [72, 98]. Therapeutische *in vitro* und *in vivo* Versuche mit siRNAs wurden bis jetzt vor allem in der Forschung an Tumoren, viralen und erblichen Erkrankungen unternommen. So konnte z.B. mithilfe der Transfektion von siRNA gegen das ‚Multi Drug Resistance Gene‘ (MDR1) in kultivierte Brustkrebszellen, welche dieses Gen überexprimierten, die Resistenz dieser Zellen gegenüber Chemotherapeutika überwunden werden. Auch die Expression verschiedener Onkogene, die direkt mit einer schlechten Prognose einhergehen, konnte mittels siRNAs supprimiert werden [14, 72]. Im Mausmodell einer viral induzierten fulminanten Hepatitis verhinderte eine siRNA gegen den Fas-Rezeptor die Entzündung und den Tod der Versuchstiere [88]. In einer ähnlich aufgebauten Studie konnte gezeigt werden, dass die systemische Verabreichung von siRNA gegen die Caspase 8 deren Expression supprimierte und so die Fas-vermittelte Apoptose der Leberzellen im akuten Leberversagen verhinderte [105]. Auch für fibrotische Erkrankungen könnte die siRNA-Technologie neue gentherapeutische Möglichkeiten bereithalten. TGF $\beta$  und seine Signaltransduktion bieten dabei interessante Ansatzpunkte zum Studium und zur Hemmung des *circulus vitiosus* der Fibrose und Zirrhose.



## 2. Aufgabenstellung

Angesichts der Schlüsselfunktion des Transforming Growth Factor beta (TGF $\beta$ )-Rezeptors1 (TGF $\beta$ -R1) in der fibrogenetischen TGF $\beta$ -Signaltransduktion und der vielseitigen Anwendbarkeit von siRNAs erscheint die Entwicklung und Anwendung einer siRNA gegen diese zentrale Struktur der TGF $\beta$ -Signaltransduktion als ein interessanter Ansatzpunkt sowohl zum Studium der TGF $\beta$ -Funktion als auch zur Entwicklung spezifischer antifibrotischer Therapiekonzepte.

Ein solches spezifisches Therapiekonzept könnte zum Beispiel die Hemmung der TGF $\beta$ -Wirkung in hepatischen Myofibroblasten mithilfe einer viral vermittelten gegen den TGF $\beta$ -R1 gerichteten siRNA sein.

Ziel und Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, die TGF $\beta$ -Signaltransduktion im leberspezifischen Zellkultursystem durch RNA-Interferenz zu inhibieren.

Zu diesem Zweck sollte in einem ersten Schritt eine siRNA gegen den TGF $\beta$ -R1 gestaltet werden, um diese anschließend an epithelialen und mesenchymalen Leberzelllinien zu testen. Parallel sollte die Methode der RNA-Interferenz in den ausgewählten Zelllinien zunächst mithilfe eines optisch auswertbaren, universellen Versuchssystems etabliert werden. Die Zellen wurden dazu mit GFP-exprimierenden Vektoren und / oder GFP-siRNA transfeziert und das Ergebnis fluoreszenzmikroskopisch und FACS-analytisch ausgewertet. Anschließend sollte nun die TGF $\beta$ -R1-siRNA in die Zellen transfeziert und ihre Wirkung auf die TGF $\beta$ -Signaltransduktion evaluiert werden. Dies sollte durch die Messung und den Vergleich der TGF $\beta$ -R1-Transkriptmenge in den mit TGF $\beta$ -R1-siRNA transfezierten und nicht transfezierten Zellen mithilfe einer Real-Time-PCR geschehen. Die TGF $\beta$ -R1-mRNA sollte dazu aus den Versuchszellen isoliert, durch einen DNase-Verdau gereinigt und in cDNA umgewandelt werden, welche anschließend via Real-Time-PCR quantifiziert werden sollte.



### **3. Material und Methoden**

#### **3.1. Allgemeines**

Standardchemikalien und Lösungen wurden, so nicht anders vermerkt, von den Firmen Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe) und Sigma (Dreisendorf) in pro Analysis (p. A.) Qualität bezogen.

Die verwendeten Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße und andere Plastikwaren stammten von den Firmen Becton-Dickinson Laborware (Lincoln Park, NJ, USA), Biozym (Oldendorf) und Eppendorf (Hamburg). Zellkulturschalen sowie Polystyrene- und Polypropylenröhrchen wurden von der Firma Falcon (Heidelberg) hergestellt.

Alle Oligonukleotide einschließlich siRNAs wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) im Maßstab 0,01 bis 0,5 µmol hergestellt und über HPLC aufgereinigt.

#### **Vorbereitung steriler Arbeitsmaterialien**

Alle Lösungen und Kunststoffmaterialien wurden im Autoklaven bei 121 °C und 1,2 bar in feuchter Hitze 20 min autoklaviert. Glas- und Metallgeräte wurden vor der Verwendung sechs Stunden im Trockenschrank bei 180 °C gebacken.

Alle für RNA-Arbeiten verwendeten Lösungen [0,1 %] wurden mit DEPC behandelt und autoklaviert.

#### **3.3. Geräte**

Während der durchgeführten Arbeiten wurden folgende Geräte verwendet:

- Begasungsbrutschrank (Heraeus, Hanau)

- FACS Calibur (BD Bioscience, San Jose, Californien, USA)
- Feinwaagen (Sartorius, Göttingen)
- Fluoreszenzmikroskop Eclipse TE 3000 (Nikon, Düsseldorf)
- Digitalkamerasystem Gel Print 2000 (MWG, Ebersberg)
- Millipore-Q Plus Anlage (Millipore, Molsheim, Frankreich)
- PCR-Cycler (Biometra, Göttingen)
- Pipetten Biozym Precision (Biozym, Oldendorf)
- Photokamera Nikon F601 (Nikon, Japan)
- Real-Time-PCR-Cycler TaqMan (Applied Biosystems, Darmstadt)
- Spectrophotometer U-2000 (Hitachi, Japan)
- Sterilwerkbänke (Holten/BDK, Gütersloh)
- Stickstofftank
- UV-Kontaktlampe Chroma 43 (Vetter GmbH, Wiesloch)
- Vortex (Bender & Hobein, Schweiz)
- Wasserbad GFL (Dr.Hirtz & Co, Köln)
- Zählkammer nach Neugebauer
- Zentrifuge Beckmann J2-21 (Beckmann, Hamburg)
- Zentrifuge Eppendorf 5417 R (Eppendorf, Hamburg)
- Zentrifuge Rotor JA 20 (Beckmann, Hamburg)

### **3.4. Fertige Reagenzzusammenstellungen (Kits)**

- Gesamt RNA Isolierung NucleoSpin RNA II (Machery & Nagel, Düren)
- qPCR core Eurogentec RT-QP73-05 (Eurogentec, Liège, Belgien)
- Reverse Transkription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

### 3.5. Design von siRNA

#### Software:

- NCBI "Search: CoreNucleotide" ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/))
- NCBI-Blast ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/))
- DNASIS Max Version 2.0 (Hitachi, Life Science Software Engineering, (Berlin))
- Netprimer  
(<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch/netprlaunch.html>)

Es wurden siRNA-Sequenzen für den humanen und den murinen TGF $\beta$ -R1 gestaltet. Mithilfe des Internetprogrammes NCBI "Search: CoreNucleotide" ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)) wurden dafür aus der NCBI Genbank die cDNA-Sequenzen des TGF $\beta$ -R1 der Ratte (*NM\_012775, Rattus norvegicus transforming growth factor, beta receptor 1 (Tgfbr1), mRNA gi|77695934|ref|NM\_012775.2|[77695934]*) und des Menschen (*Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor 1 (activin A receptor type II-like kinase, 53kDa) (TGFB1), mRNA gi|66346739|ref|NM\_004612.2|[66346739]*) ermittelt. Diese cDNA-Sequenzen wurden nach möglichen Zielsequenzen für eine TGF $\beta$ -R1-siRNA durchsucht. Das Vorgehen wurde dabei bestimmt von den im folgenden aufgelisteten Kriterien zur Entwicklung einer siRNA, wie sie von Tuschl et al. in den letzten Jahren beschrieben wurden [1, 27-30, 46, 92]

1. Die Länge der siRNA sollte 19 - 21 Basenpaare betragen.
2. Die siRNA muss in der codierenden Region bzw. auf der mRNA des Zielgenes lokalisiert sein.
3. Die Sequenz der siRNA sollte keine „mismatches“ zu ihrer Zielsequenz aufweisen.
4. Regionen zwischen 50 - 100 bp Entfernung vom Start- bzw. Terminationscodon der mRNA sollten ausgeschlossen werden, um eine Störung der Interferenz zwischen der siRNA und ihrer korrespondierenden mRNA durch eine evtl. reichere Ausstattung dieser Regionen mit Bindungsstellen für Regulationsproteine zu vermeiden.

5. Sequenzbereiche mit Aneinanderreihungen von mehr als drei Guanosin- oder Cytosin-Basen hintereinander wurden vermieden, um Agglomerationen und „Hyperstack“ der siRNA zu verhindern.
6. Die GC-Rate der siRNA sollte möglichst nahe bei 50 % liegen.
7. Die Zielsequenz der siRNA sollte nach Möglichkeit mit dem Basenduplex AA beginnen, da so am 3'-Sequenzende der siRNA dTdT-Überhänge angebracht werden können, die das Molekül stabilisieren und seine Resistenz gegenüber Nukleasen erhöhen
8. Sekundärstrukturen der Sequenz sollten möglichst vermieden werden. Es ist allerdings nicht eindeutig geklärt, ob und wenn welche Sekundärstrukturen die Bindungseffizienz bzw. die Wirksamkeit der siRNA beeinträchtigen.
9. Die Sequenz der siRNA darf keine Homologie zu anderen Genen der Spezies aufweisen.

Die mit der Basenkombination AA beginnenden cDNA-Sequenzen der codierenden Region des TGF- $\beta$ -R1-Gens wurden mithilfe des Programms DNASIS und Netpremier auf die genannten strukturellen Eigenschaften hin untersucht; Homologien zu anderen zellulären Genen wurden anhand des Internetprogrammes NCBI-BLAST ausgeschlossen.

Die ausgewählte DNA-Sequenz wurde in die Sense- und Antisense-mRNA-Basenfolge übersetzt und zur Synthese der siRNA in Auftrag bei der Firma MWG Biotech (Ebersberg) gegeben.

## **3.6. Zellkultur**

### **3.6.1. Allgemeines**

Die Zellen wurden in einem Begasungsbrutschrank (Heraeus, Hanau) bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 100 % Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Alle Zellkulturarbeiten fanden unter sterilen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank der Klasse II (Holten/BDK, Gütersloh) mit sterilen Geräten und Lösungen statt.

### **3.6.2. Verwendete Zelllinien**

Die vorliegende Arbeit wurde an den in der Tabelle 1 vorgestellten Zellen eukaryotischer, immortalisierter Zelllinien durchgeführt.

**Tabelle 1:** Zelllinien

<b>Zelllinie</b>	<b>Typ</b>	<b>Species</b>
HUH-7	Humane Hepatomazellen	Homo sapiens
HSC-T6	Hepatische Sternzellen	Rattus norvegicus

Die HSC-T6-Zellen [97] wurden mir freundlicherweise von Prof. Dr. Scott L. Friedmann (The Mount Sinai School of Medicine, New York, NY 10029) zur Verfügung gestellt. Die HUH7-Zellen [69] konnte ich von der Arbeitsgruppe Dr. Ulrike Protzer (Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Universität zu Köln, Deutschland) übernehmen.

### **3.6.3. Medien und Lösungen**

Für die Zellkultur wurden die aufgeführten Medien, Zusätze und Lösungen verwendet.

## Medien:

### **Grundmedien:**

- **DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma, Deisendorf):**
  - 4500 mg/l D-Glukose/L-Glutamin
  - 110 mg/l Natrium Pyruvate
  
- **RPMI 1640 mit 2,0 g/l NaHCO<sub>3</sub> und stabilem Glutamin (Biochrom, Berlin)**

### **Kulturmedien:**

Grundmedien mit folgenden Zusätzen: - 10 % [v/v] FCS  
- 0,1 % [w/v] Penicillin/Streptomycin

### **Einfriermedien:**

Grundmedien mit folgenden Zusätzen: - 10 % [v/v] FCS  
- 10 % [v/v] DMSO (Sigma, Dreisendorf)  
- 0,1 % [w/v] Penicillin/Streptomycin

## Lösungen:

**PBS 1x:** 140 mM NaCl  
10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

**Trypsinlösung:** 0,05 % [w/v] Trypsin (Invitrogen, Karlsruhe)  
0,03 % [w/v] EDTA in PBS

**FCS:** 30 min bei 56 °C Hitze inaktiviert, Lagerung bei -20 °C  
(Sigma, Dreisendorf)

**Trypan-Blaulösung** 0,4 % [w/v] (Sigma, Dreisendorf)

Die verwendeten Zellen wurden unter den in der Tabelle 2 dargestellten spezifischen Bedingungen kultiviert. Nach mikroskopischer Beurteilung der

Zellqualität und –dichte wurden die Zellen alle zwei bis fünf Tage passagiert oder das Medium gewechselt.

**Tabelle 2:** Kulturprotokoll für Zellen der Linien HSC-T6 und HUH7

Zellart	Zellkultur-schale	Fläche/Loch in [cm <sup>2</sup> ]	Medium	Volumen des Kultur-mediums in [ml]	Passagierverhältnis u. -zeit	Zellzahl*: 80–95 % Konfluenz nach 1d
HUH7	10 cm	10	RPMI 1640	10	¼ alle 3–5 d	1,5x10 <sup>6</sup>
HSC-T6			DMEM		⅛ alle 2–4 d	3,5x10 <sup>6</sup>
HUH7	6-Loch-Platte	60	RPMI 1640	2	/	3-4x10 <sup>5</sup>
HSC-T6			DMEM			5,5-6x10 <sup>5</sup>

\*zu subkultivierende Zellzahl, um einen Tag nach Subkultur eine Zellkonfluenz von 80 – 90 % zu erreichen

#### 3.6.4. Passagieren der Zellen

Um die adhärennten Zellen von den Zellkulturplatten zu lösen, wurden diese mit Trypsinlösung behandelt. Hierzu wurde zunächst das Medium abgesaugt und die Zellen 2 x mit PBS-Puffer gewaschen. Der Überstand wurde abgesaugt und den Zellen anschließend die Trypsinlösung zugesetzt. Diese wurde sofort wieder abgenommen und nur ein die Zellen bedeckender Film bei 37 °C für ca. 3 min belassen. Unter mikroskopischer Kontrolle (Fluoreszenzmikroskop Eclipse TE 3000 [Nicon, Düsseldorf]) wurde bis zum Ablösen der Zellen gewartet, um dann das Trypsin durch Zugabe von FCS-haltigem Kulturmedium zu inaktivieren. Die Zellsuspension wurde anschließend auf neue Kulturschalen mit frischem Kulturmedium verteilt.

#### 3.6.5. Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mithilfe einer Zählkammer nach Neubauer. Hierzu wurde die Zellsuspension (siehe Kapitel 3.6.4.) gut

durchmischt und ein Aliquot (hier 50 µl) steril entnommen. Diese 50 µl wurden 1:1 mit Trypan-Blaulösung, welche tote Zellen anfärbt, verdünnt und anschließend auf die Zählkammer gebracht. Unter dem Mikroskop wurden dann die nicht gefärbten Zellen in vier Großquadraten (entspricht jeweils 16 Kleinquadraten) gezählt, woraus ein Mittelwert  $m$  gebildet wurde. Da ein Großquadrat ein Volumen von 0,1 µl abdeckt, die Zellsuspension aber auf die Hälfte durch die Färbelösung verdünnt worden war, ergab sich die Zellzahl pro µl aus der Formel:  $m \times 2/0,4 \mu\text{l}$ .

### **3.6.6 Kryokonservierung der Zellen**

Zur Langzeitlagerung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Dazu wurden die Zellen zunächst trypsiniert (siehe Kap. 3.6.4.), dann  $2 - 3 \times 10^6$  Zellen in 500 µl Kulturmedium resuspendiert (siehe Kapitel 3.6.4.) und die Zellsuspension in ein Kryoröhrchen überführt. Anschließend wurde im Verhältnis 1:1 Einfriermedium zugegeben und die Zellen bei einer Temperatursenkung von 1 °C/min bei -70 °C eingefroren. Nach 24 Stunden wurden die Zellen zur Kryokonservierung endgültig in den flüssigen Stickstoff überführt.

### **3.6.7. Rekultivieren von kryokonservierten Zellen**

Nach Entnahme der Kryoröhrchen aus dem flüssigen Stickstoff wurden die Zellen möglichst schnell in einem Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und die Zellsuspension jedes Röhrchens sofort tropfenweise in 10 ml Kulturmedium von 37 °C überführt. Nach 24 Stunden Inkubation im Begasungsbrutschrank (Heraeus, Hanau) erfolgte zum Entfernen von DMSO-Resten ein Mediumwechsel.

### 3.6.8. Transfektion der Zellen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden in den verschiedenen Versuchseinheiten *Transfektionsetablierung* und *Transfektion von TGF $\beta$ -R1-siRNA* Transfektionen mit den dargestellten Zelllinien durchgeführt. Die Methode soll hier im Allgemeinen beschrieben werden. Spezielle Aspekte einzelner Transfektionsansätze werden bei der Beschreibung der entsprechenden Versuchreihe erläutert.

#### Material

Transfektionsmittel:	Lipofectamine2000 (Invitrogen, Heidelberg)
Transfektionsmedium:	Opti-MEM (Invitrogen, Heidelberg)
Zellkulturschale:	6-Loch-Platte
transfezierte Nukleinsäuren:	<ol style="list-style-type: none"><li>1. <i>Transfektionsetablierung</i>:<ol style="list-style-type: none"><li>a) pEGFP-c1-Plasmid bzw. <math>\beta</math>-aktin-GFP-Plasmid</li><li>b) anti-GFP-siRNA</li></ol></li><li>2. <i>Transfektion von TGF<math>\beta</math>-R1-siRNA</i>: TGF<math>\beta</math>-R1<sub>homo sapiens bzw. rattus norvegicus</sub>-siRNA</li></ol>

#### Methode

Entsprechend dem Protokoll des Herstellers (Invitrogen, Heidelberg) wurden die zu transfezierenden Zellen 24 Stunden vor der Transfektion gezählt (s. Kap. 3.6.5.), nach dem in der Tabelle 2 gezeigten Schema passagiert und in 6-Loch-Schalen ausplattiert (s. Kap. 3.6.3 und 3.6.4.), so dass zum geplanten Zeitpunkt der Transfektion eine Zellkonfluenz von ca. 90 – 95 % erreicht wurde.

Vor Beginn der Transfektion wurden die Zellen zweimal mit dem auf 37 °C angewärmten OptiMEM-Kulturmedium gewaschen, um die in Verbindung mit dem Transfektionsmittel Lipofectamine2000 toxischen und den Transfektions-

erfolg mindernden Reste des serum- und antibiotikahaltigen Kulturmediums möglichst vollständig von den Zellen zu entfernen. Der zweite Waschgang wurde deswegen bis zum Abschluß aller Transfektionsvorbereitungen ausgedehnt. Inzwischen wurde der Nukleinsäure-Lipofectamine2000-Transfektionskomplex vorbereitet. Dazu wurden pro zu transfezierender 6-Loch-Zellschale zunächst bis zu 5,5 µg der Nukleinsäuren auf ein Gesamtvolumen von 250 µl mit Opti-MEM verdünnt und vermischt (vgl. Tab. 3). Dann wurden für jeden Ansatz 10 µl Lipofectamine2000 in 240 µl Opti-MEM verdünnt (s. Tab. 3) und bei Raumtemperatur 5min inkubiert. Anschließend wurden je 250 µl der Lipofectamine2000-OptiMEM-Lösung zu der Nukleinsäure-OptiMEM-Lösung pipettiert, vorsichtig gemischt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während aller Arbeitsschritte wurde mit Polycarbonat-Röhrchen und silanisierten Pipettenspitzen gearbeitet. Während der Inkubationszeit des Nukleinsäure-Lipofectamine2000-Transfektionskomplexes wurde die zweite OptiMEM-Waschung der Zellen abgeschlossen und jede Zellschale mit 2 ml 37 °C warmem Opti-MEM gefüllt. Zuletzt wurde der Nukleinsäure-Lipofectamine2000-Transfektionskomplex in die Zellschalen pipettiert, diese unmittelbar sowie nach ca. 10 min leicht geschüttelt und, so nicht anders angegeben, 24 Stunden im Begasungsbrutschrank inkubiert.

**Tabelle 3:** zusammenfassende Darstellung der Transfektionsansätze nach dem Protokoll ‚Lipofectamine2000‘ von Invitrogen

<b>Kultur-gefäß</b>	<b>Fläche pro Loch [m<sup>2</sup>]</b>	<b>relative Fläche (vs. 24-Loch)</b>	<b>Medium-volumen</b>	<b>DNA/RNA [µg] im Verdünnungsvolumen [µl]</b>	<b>Lipofectamine2000 [µl] im Verdünnungsvolumen [µl]</b>
6-Loch-Platte	10	5	2 ml	bis 5,5 µg in 250 µl	10 µl in 250 µl

### **3.7. Etablierung der Transfektion und Wirkung von siRNA**

Im Rahmen der Etablierung von siRNA-Transfektionen wurden Expressionskonstrukte namens pEGFP-c1-Plasmid oder β-aktin-GFP-Plasmid, welche die codierende Sequenz für ein grün fluoreszierendes Protein (GFP) tragen, als

Reporter benutzt. Die Reporterplasmide wurden zusammen mit siRNA, die gegen die Reportertranskripte gerichtet war (GFP-siRNA) nach dem in Tabelle 4 dargestellten Schema in HUH7- und HSC-T6-Zellen cotransfeziert (s. auch Kap. 3.6.8.). Alle Ansätze wurden als Triplets durchgeführt. Die höchste siRNA-Konzentration, die in den Transfektionsansätzen eingesetzt wurde war 25 nM (1000 ng/Loch).

Die Effizienz der Transfektion sowie der Wirkung der siRNA wurde anhand der zellulären GFP-Reporter-Expression zum einen qualitativ unter dem Fluoreszenzmikroskop (Eclipse TE 3000 [Nicon, Düsseldorf]) (s. Kap. 3.7.1.) und zum anderen quantitativ mittels einer FACS-Analyse (s. Kap.3.7.2.) untersucht.

**Tabelle 4:** Transfektionsschema für das  $\beta$ -aktin-GFP-Plasmid und die anti-GFP-siRNA

<b>GFP-siRNA (ng/Loch)</b>	0	0	10	50	100	500	1000
<b><math>\beta</math>-aktin-GFP-Plasmid bzw. pEGFP-c1-Plasmid (<math>\mu</math>g/Loch)</b>	0	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5
<b>Loch</b>	1-3	4-6	7-9	10-12	13-15	16-18	19-21

### 3.7.1. Qualitative Analyse der GFP-Expression

Nach einer Inkubationszeit von 24, 48 bzw. 72 Stunden wurde die GFP-Expression in den transfezierten Zellen (s. Kap. 3.7) unter dem Fluoreszenzmikroskop (Eclipse TE 3000 [Nicon, Düsseldorf]) optisch ausgewertet und photographisch dokumentiert.

### 3.7.2. Quantitative Auswertung mithilfe der FACS-Analyse

Zur quantitativen Abschätzung der GFP-Reporterfluoreszenz wurden die transfezierten Zellen (s. Kap. 3.7.) einer FACS-Analyse unterzogen. Es wurden nur vitale Zellen in die Messung eingeschlossen. Diese wurden zunächst durch die Analyse von Zellgröße und –granularität sowie die Färbung mit Propidiumiodid in zwei Schritten identifiziert und der Messbereich des FACS-Gerätes (FACS Calibur, BD Bioscience, San Jose, Californien, USA) auf die Größe, die

Granularität und das Propidiumiodidsignal der lebenden Zellen definiert, so dass tote Zellen von der Messung ausgeschlossen wurden. Zur Definition der Eigenfluoreszenzschwelle in den Experimenten diente die Negativkontrolle in Form von untransfezierten, nur mit Lipofectamine2000 behandelten HUH7-Zellen. Anschließend wurden die Zellen der verschiedenen Versuchsansätze bezüglich ihrer Größe und der Intensität ihrer GFP-Fluoreszenz im FACS-Gerät analysiert.

### **3.8. Messung des TGF $\beta$ -R1-Transkriptes mittels Real-Time-PCR**

Zur Bestimmung des TGF $\beta$ -R1-Transkriptgehaltes der mit TGF $\beta$ -R1-siRNA transfezierten Zellen wurde die Methode der Real-Time-PCR (RT-PCR) herangezogen.

HUH-7- und HSC-T6-Zellen wurden 24 h nach der Transfektion mit TGF $\beta$ -R1-siRNA (s. Kap. 3.8.1. und Tab. 5) geerntet und lysiert (s. Kap. 3.8.2.) und ihre Gesamt-RNA isoliert (s. Kap. 3.8.3.). Diese RNA wurde daraufhin mittels einer Reversen Transkription in cDNA umgeschrieben (s. Kap. 3.8.5.), um nun die Wirkung der TGF $\beta$ -R1-siRNA auf die TGF $\beta$ -R1-mRNA der Zellen mittels einer spezifischen Real-Time-PCR quantitativ zu messen.

#### **3.8.1. Transfektion von HUH7- und HSC-T6-Zellen mit TGF $\beta$ -R1-siRNA**

Zunächst wurden sowohl HUH-7- als auch HSC-T6-Zellen mit der jeweils speziesspezifischen siRNA nach dem im Kapitel 3.6.8. beschriebenen Transfektionsprotokoll und dem hier tabellarisch dargestellten Versuchsaufbau transfeziert (s.Tab. 5).

**Tabelle 5:** Transfektionsschema für HUH7 und HSC-T6

Zellart	siRNA [ $\mu\text{g}$ ]	0	0,1	0,5	1	1,5
HUH-7	hu-TGF $\beta$ -R1-siRNA [ $\mu\text{l}$ ] (20 $\mu\text{M}$ )	0	0,4	2	4	6
HSC-T6	Rat-TGF $\beta$ -R1-siRNA [ $\mu\text{l}$ ] (20 $\mu\text{M}$ )	0	0,42	2,1	4,2	6,3
Loch Nr.		1 & 2	3 & 4	5 & 6	7 & 8	9 & 10

Die maximale eingesetzte siRNA-Konzentration entsprach 50 nM.

### 3.8.2. Ernten der Zellen und Zelllysis

#### Material

GITC-Lösung: 4 M Guanidiniumthiozyanat (GITC)  
0,5 % [w/v] N-Lauroylsarcosinat  
25 mM Natriumcitrat, pH 7,0  
100 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol

#### Methode

Nach 24-stündiger Inkubationszeit wurden die Zellen geerntet und lysiert. Dazu wurden sie zunächst zweimal mit PBS gewaschen, dann 300  $\mu\text{l}$  einer 4 M GITC-Lösung pro Loch einer 6-Loch-Platte zugegeben und anschließend die adhären Zellen mit einem Schieber vom Boden der Kulturschale gelöst. Durch mehrfaches Auf- und Abziehen durch eine Kanüle (20 Gauge) und einen anschließenden "freeze and thaw"-Zyklus bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  bzw.  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  wurde die Zelllyse unterstützt.

### 3.8.3. RNA-Isolierung aus den transfizierten Zellen

Die Isolierung der RNA aus Zellen erfolgte mithilfe des RNA-Isolationskits „Total RNA Isolation - NucleoSpin RNA II“ von Machery & Nagel (Heidelberg).

Die lysierten Zellproben wurden dazu zunächst auf Eis aufgetaut, gemischt und kurz zentrifugiert (Zentrifuge Eppendorf 5417 R, Hamburg). Da die Zelllyse

bereits erfolgt war (s. Kap. 3.8.2.), konnte daraufhin gleich mit Schritt 3 des Herstellerprotokolls begonnen werden.

Im letzten Schritt wurde die isolierte RNA abweichend vom Herstellerprotokoll in 50 µl statt in 60 µl RNase-freiem H<sub>2</sub>O aus der Säule gespült, um eine höhere Konzentration der RNA zu erreichen. Die RNA-Eluate wurden anschließend bei -70 °C eingefroren und gelagert.

#### **3.8.4. Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung der RNA**

Die RNA-Konzentrationen wurden durch eine Extinktionsmessung im Spektrometer (Hitachi U-2000UV-Spektrometer [Colora, Rattigen]) bei einer Wellenlänge von 260 nm in einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 1 cm ermittelt. Die Messung erfolgte nach 100-facher Verdünnung der RNA-Proben mit autoklaviertem Wasser nach Eichung des Spektrophotometers mit dem gleichen Wasser.

Anschließend wurde die DNA-Konzentration nach folgender Formel ermittelt:

$$\text{RNA-Gehalt } \mu\text{g}/\mu\text{l} = \text{Extinktion } E_{260} \times \text{RNA-Extinktionskoeffizient} \times \text{Verdünnung}$$

Dabei ist der RNA-Extinktionskoeffizient  $E_{\text{RNA}} = 40 \mu\text{g/ml}$ , was einer Konzentration von 40 µg RNA/ml bei einer Extinktion  $E_{260} = 1,0$  entspricht. Um mögliche Proteinverunreinigungen der DNA zu prüfen, wurde das Verhältnis der Absorptionen bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm gebildet, wobei nukleinhaltige Lösungen als sauber angesehen wurden, wenn der  $E_{260}/E_{280}$ -Quotient zwischen 1,8 und 2,0 lag.

#### **3.8.5. Reverse Transkription der RNA**

Um die TGFβ-R1-mRNA in den RNA-Proben quantitativ mit Hilfe einer RT-PCR vergleichen zu können, musste zunächst die isolierte RNA durch eine Reverse Transkription in cDNA umgeschrieben werden. Dabei synthetisiert das Enzym Reverse Transkriptase mit Hilfe von Primern anhand der Basensequenz der RNA eine ihr komplementäre DNA, genannt cDNA.

Die Reverse Transkription der RNA erfolgte als Random-Primer-Ansatz in einem Gesamtvolumen von 50 µl in 500 µl-Reaktionsgefäßen. Die Reagenzien zur Reversen Transkription stammten aus einer Zusammenstellung der Firma Applied Biosystems (s. Kap. 3.4. und Tab. 6). Der Ansatz für die Reverse Transkription wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt und ist in Tabelle 6 dargestellt.

**Tabelle 6:** Versuchsansatz für die Reverse Transkription

<b>Lösung</b>	<b>Volumen/Gefäß (µl)</b>	<b>eingesetzte Menge</b>
RNA-Lösung	X µl	1 µg
10 X Taq Man Puffer	5 µl	1 X
25 mM Magnesiumchlorid	11 µl	5,5 mM
Desoxy-NTP's mixture	10 µl	500 µM
Random Hexamer Primer	2,5 µl	2,5 µM
RNAse Inhibitor *	1 µl	0,4 U/µl
MultiScribe Reverse Transkriptase (50 U/µl) *	1,5 µl	1,25 U/µl
RNAse free H <sub>2</sub> O ad 50 µl	19 µl	
Gesamtvolumen	50 µl	

\*auf Eis gehalten

Die fertigen Ansätze wurden im PCR-Cycler (Biometra, Göttingen) plaziert, welcher dem in Tabelle 7 gezeigten Plan entsprechend programmiert wurde und so die ebenfalls in Tabelle 7 dargestellten Reaktionsschritte in Gang setzte.

**Tabelle 7:** Temperaturprofil bei der Inkubation zur Reversen Transkription

<b>Temperaturfolge</b>	<b>Temperatur [°C]</b>	<b>Vorgang</b>	<b>Zeitdauer [min]</b>
Temperatur 1	25 °C	Inkubation	10 min
Temperatur 2	48 °C	Reverse Transkription	30 min
Temperatur 3	95 °C	Inaktivierung der MultiScribe Reverse Transkriptase	5 min

Nach Abschluss der Reversen Transkription wurden die cDNA-Ansätze bei -20 °C gelagert.

### 3.8.6. Primer- und Sondenauswahl für die Real-Time-PCR

#### Software

- NCBI "Search: CoreNucleotide"(www.ncbi.nlm.nih.gov/):
  - *NM\_004612, Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor I (activin A receptor type II-like kinase, 53kDa) (TGFB1), mRNA gi|66346739|ref|NM\_004612.2|[66346739]*
  - *NM\_012775, Rattus norvegicus transforming growth factor, beta receptor 1 (Tgfr1), mRNA gi|77695934|ref|NM\_012775.2|[77695934]*
- NCBI-Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)
- DNASIS Max Version 2.0 (Hitachi, Life Science Software Engineering, Berlin)
- Netprimer  
(<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch/netprlaunch.html>)

Die quantitative Bestimmung der TGF $\beta$ -R1-mRNA in den Versuchszellen mittels einer RT-PCR erforderte zunächst die Auswahl geeigneter Primer sowie einer jeweils spezifischen Sonde zur Detektion der Amplifikate.

Die Primersequenzen wurden mithilfe der genannten Software nach der Darstellung des Herstellers sowohl für die humanen (*NM\_004612, Homo sapiens transforming growth factor, beta receptor I (activin A receptor type II-like kinase, 53kDa) (TGFB1), mRNA gi|66346739|ref|NM\_004612.2|[66346739]*) wie auch für die Rattenzellen (*NM\_012775, Rattus norvegicus transforming growth factor, beta receptor 1 (Tgfr1), mRNA gi|77695934|ref|NM\_012775.2|[77695934]*) unter Berücksichtigung folgender gängiger Kriterien ausgewählt [10]:

1. Um eine möglichst genaue und unmittelbare Messung zu erreichen, sollten die Primer so lokalisiert sein, dass sie die Schnittstelle der siRNA auf der mRNA umfassen.

2. Die Gesamtlänge des Amplifikates sollte möglichst kurz sein (50–200 bp), die Primer die Sonde also möglichst nahe umfassen.
3. Die Länge der Primer beträgt zwischen 22 und 26 nt.
4. Das Verhältnis von Guanosin zu Cytosin sollte 30 – 80 % betragen.
5. Die Primer sollten am 3'-Ende die Base Guanosin oder Cytosin tragen.
6. Die letzten 5 Basen am 3'-Ende sollte nicht mehr als zwei G und / oder C enthalten.
7. Aneinanderreihungen von identischen Nukleotiden sollten vermieden werden.
8. Die Primersequenz sollte möglichst wenige Sekundärstrukturen aufweisen, um die Bindung an die Matrize nicht zu erschweren.
9. Die Schmelztemperatur der Primer sollte 58 – 60 °C betragen. Sowohl die  $T_m$  der Sonde als auch die der Primer muss >55 °C liegen.
10. Die annealing-Temperatur der Primer sollte ca. 5 °C unter der  $T_m$  liegen.
11. Die Primer dürfen keine Homologien zu anderen zellulären Genen aufweisen.

Für die Auswahl der TaqMan-Sonde gelten folgende Kriterien [10]:

1. Die Sonde muss innerhalb der Primer lokalisiert sein und sollte die Schnittstelle der siRNA auf der mRNA überspannen.
2. Die Länge der Sonde beträgt zwischen 25 und 30 bp.
3. Die Sondensequenz sollte kein G am 5'-Ende tragen, da dieses die Fluoreszenz des Reporters (FAM) auch nach der Abspaltung vom eigentlichen Quencher (TAMRA) hemmt.
4. Der G-C-Gehalt der Sonde sollte zwischen 30 und 80 % betragen. Die Sonde, die mehr C enthält funktioniert besser.
5. Die Sonde muss den Reporter am 5'-Ende und den Quencher am 3'-Ende tragen, da das Quenching nur unterbrochen wird, wenn die Sonde zwischen Reporter und Quencher durch die 5'-3'-Nuklease-Aktivität der DNA-Polymerase gespalten wird. Die Platzierung von Reporter und Quencher am Anfang bzw. am Ende der Sonde gewährleistet so die größte Sensitivität.
6. Die Sequenz sollte möglichst wenige Sekundärstrukturen und keine Homologien mit sich selbst oder den Primern aufweisen, um die

Effektivität der Hybridisierung und des Quenching nicht potentiell zu erschweren.

7. Aus denselben Gründen sollten Aneinanderreihungen von mehr als drei Basen, vor allem von Guanosin, vermieden werden.
8. Die Sondensequenz sollte keine Homologien im zellulären Genom haben.
9. Die  $T_m$  der Sonde sollte 10 °C über der  $T_m$  der Primer liegen.
10. Die annealing Temperatur der Sonde soll der Synthesetemperatur der AmpliTaqGold™ Polymerase möglichst entsprechen (70 – 72 °C).

Mögliche Primer- und Sondensequenzen in den TGFβ-R1-Sequenzen der Ratte (*Accession No. NM\_012775*) und des Menschen (*Accession No. NM\_004612*) (vergleiche Kapitel 3.5.) wurden mit NetPremier auf ihre strukturellen Eigenschaften und im NCBI-Blast bezüglich ihrer Homologien überprüft und die den genannten Kriterien am besten entsprechenden Sequenzen (siehe Tabelle 11) bei der Firma MWG Biotech (Ebersberg) zur Synthese in Auftrag gegeben.

### 3.8.7. Testung der Primer mittels einer qualitativen PCR

Um die ausgewählten Primer zu überprüfen, wurden sie primär in einer qualitativen PCR getestet.

Die Ansätze zur PCR-Amplifikation der humanen und murinen TGFβ-R1–cDNA-Abschnitte wurden dazu vorbereitet wie in Tabelle 8 dargestellt.

**Tabelle 8:** PCR-Ansätze zur Testung der Primer

<b>Lösung</b>	<b>eingesetzte Menge</b>	<b>Volumen/Gefäß (µl)</b>
cDNA aus HEP-G2- bzw. Rat2-Zellen	1 µg	1 µl
29 rat-hu-ALK 5-F	10 µM	0,5 µl
30 rat-ALK 5-R bzw. 31 hu-ALK 5-R	10 µM	0,5 µl
dNTP's (1 mM)	1 mol	2,5 µl
10 X Puffer	1 X	2,5 µl
Sigma Taq-Polymerase 5 U/µl	0,5 U	0,1 µl
H <sub>2</sub> O		ad 25 µl

Die vorbereiteten Ansätze wurden dann im PCR-Cycler (Biometra, Göttingen) platziert und durchliefen 30 x die in der Tabelle 9 angegebenen Temperaturschritte. Der Hybridisierungsschritt wurde mit drei verschiedenen Temperaturen, 58 °C, 60 °C und 62 °C ausgetestet. Nach Abschluß der PCR wurden die Ansätze bei -20 °C zwischengelagert.

**Tabelle 9:** PCR-Cycler-Programmierung

Temperaturfolge	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklen
Temperatur 1	94	5	30
Temperatur 2	94	1	30
Temperatur 3	58/60/62	1	30
Temperatur 4	72	1	30
Temperatur 5	72	5	1

### 3.8.8. Gelelektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente

#### Material

- 1 X TAE (Tris Acetat EDTA)-Puffer: 40 mM TRIS-Base  
20 mM Eisessig  
1,25 mM EDTA; pH 8,0
- Ethidiumbromidlösung: 10 mg/ml
- Elektrophoretische Gelkammer + Kämme
- Agarosegel
- Ladepuffer
- Standard-DNA (Puc19-Plasmid-DNA-MspI-geschnitten, Marker 23, Fermentas life sciences, St. Leon-Rot)
- Dokumentationssystem: UV-Kontaktlampe (Chroma 43, Vetter GmbH, Wiesloch) + Digitalkamerasystem (Gel Print 2000i, MWG, Ebersberg)

#### Methode

Die Auswertung der PCR erfolgte durch die Auftrennung und Identifizierung der in den Ansätzen enthaltenen DNA mittels einer Gelelektrophorese im Agarosegel. Entsprechend der Anzahl ihrer Basenpaare wandern die DNA-Fragmente im elektrophoretischen Feld unterschiedlich weit, Sequenzen gleicher Länge

bilden Banden. Durch die Färbung der DNA und den Vergleich mit dem Laufverhalten eines DNA-Standards lässt sich die ungefähre Anzahl der Basenpaare einer Bande bestimmen, so dass das erwartete Fragment identifiziert werden kann.

#### *Vorbereitung der Gele*

Zur Herstellung eines 3 %igen Agarosegels, wie es sich für die Auftrennung von DNA-Fragmenten bis zu einer Länge von 300 bp eignet, wurden 3 g Seakem Agarose (Biozym, Oldendorf) mit 100ml TAE 1 X –Puffer durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Das flüssige Gel wurde unter dem Abzug und gelegentlichem Schwenken auf 60 °C abgekühlt. Nun wurden ca. 8 µl Ethidiumbromidlösung zur Färbung der DNA zugegeben, gut umgeschwenkt und die Agaroselösung in den Gelschlitten gegossen.

#### *Beladen des Gels und Gelelektrophorese*

Nach dem Abkühlen wurde das Agarosegel mit den aufzutrennenden DNA-Proben beladen. Dazu wurden je 10 µl der Proben zunächst mit je 1 µl Ladepuffer vermischt und dann in die Geltaschen pipettiert. Von der Standard-DNA wurde 1 µl mit 4 µl TEA-1 X-Puffer und 1 µl Ladepuffer gemischt und ebenso in eine Geltasche geladen. Als Standard-DNA wurde Puc19-Plasmid-DNA, MspI-geschnitten (Marker 23, Fermentas life sciences, St. Leon-Rot) verwendet. Die Elektrophorese wurde nun bei 100 Volt bis zur deutlichen Trennung der Fragmente durchgeführt. Die aufgetrennten DNA-Banden wurden im UV-Licht (UV-Kontaktlampe Chroma 43, Vetter GmbH, Wiesloch) sichtbar gemacht und mit einem Digitalkamerasystem (Gel Print 2000i, MWG, Ebersberg) dokumentiert.

### **3.8.9. Real-Time-PCR**

Die Methode der Real-Time-PCR zeichnet sich gegenüber der konventionellen PCR dadurch aus, dass sie eine Messung und graphische Darstellung der Amplifikatmenge während des gesamten Zeitverlaufs der PCR erlaubt.

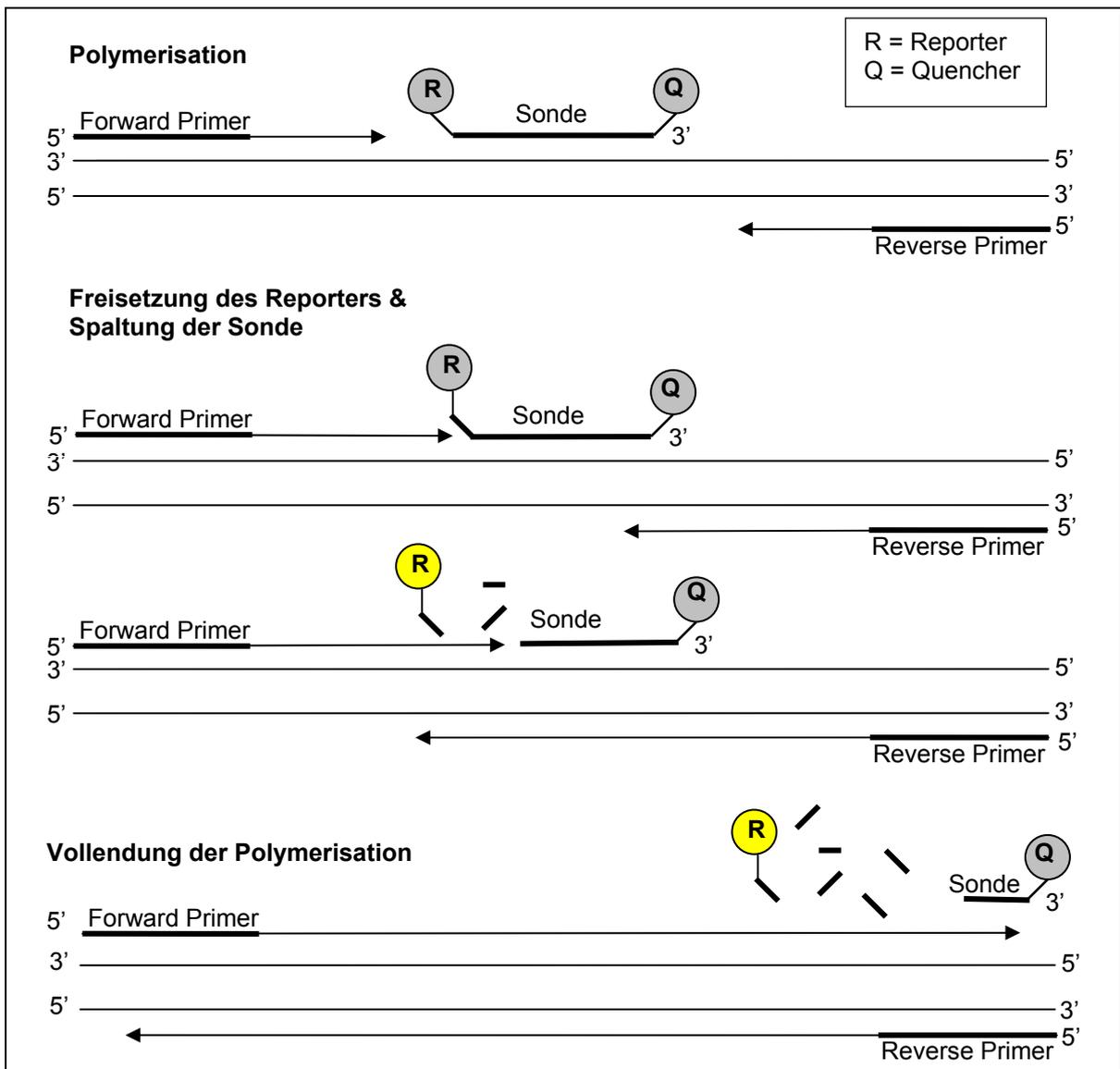
Bei dem gewählten Vorgehen wurde dies durch den Einsatz einer fluoreszenzmarkierten Sonde möglich, die an die DNA-Zielsequenz hybridisiert und deren Fluoreszenzsignal durch die Amplifikation der DNA-Sequenz aktiviert und dadurch messbar wird. Während der exponentiellen Phase der DNA-Amplifikation verhält sich das Fluoreszenzsignal direkt proportional zu den steigenden Amplifikatkonzentrationen (vergl. Abb. 9) [10]. Durch den Vergleich mit Standard-cDNA-Proben bekannter Konzentration kann auf den Transkriptgehalt der Proben geschlossen werden.

Es wurden Real-Time-PCRs der Versuchszell- und der Standard-cDNAs durchgeführt. In einem Real-Time-PCR-Lauf wurden jeweils die eingesetzte Versuchszellen-cDNA und die Standard-cDNA gemessen. Die Versuchsansätze wurden mit dem Reaktionskit ‚qPCR core Eurogentec RT-QP73-05‘ von Eurogentec (Liège, Belgien) nach dem folgenden Schema pro Ansatz vorbereitet (siehe Tabelle 10):

**Tabelle 10:** Real-Time-PCR-Ansätze

<b>Lösung</b>	<b>eingesetzte Menge</b>	<b>Volumen</b>
10 X Taq Man RT-Puffer	1 X	2,5 µl
50 mM MgCl <sub>2</sub>	2,5 mM	2,5 µl
dNTP's (1 mM)	80 µM	2 µl
forward Primer (5 µM) (siehe Tabelle 11) - 29 rat-hu-ALK 5-forward - hu-β-actin-forward - rat-β-actin-forward	0.3 µM	1,5 µl
reverse Primer (5 µM) (siehe Tabelle 11) - 30 rat-ALK 5-reverse - 31 hu-ALK 5-reverse - hu-β-actin-reverse - rat-β-actin-reverse	0.3 µM	1,5 µl
Sonde (5 µM) (siehe Tabelle 11) - 36 rat-ALK 5-Sonde - 32 hu-ALK 5-Sonde - hu-β-actin-Sonde - rat-β-actin-Sonde	0.3 µM	1µl
AmpliTaQGold™ Polymerase (5 U/µL)	0,025 U/µl	0,125 µl
H <sub>2</sub> O		ad 25 µl
cDNA der Versuchszellen bzw. des Standards aus HepG2- bzw. Rattenmuskelzellen	s. Kap. 3.9.1. u. Tab. 12	1 µl

Jeder Ansatz wurde in Triplets bestimmt.



**Abbildung 9:** Funktionsweise der TaqMan-Sonde, übernommen aus [10]:

Die Lokalisation und die strukturellen Eigenschaften der hier eingesetzten TaqMan-Sonde wurden bereits im Kapitel 3.8.6. anlässlich der Auswahl der Sonde beschrieben. Ihre Funktionsweise soll hingegen hier näher erläutert werden.

Die TaqMan-Sonde trägt kovalent gebunden an ihrem 5'-Ende ein fluoreszierendes Reporter-molekül namens FAM, an ihrem 3'-Ende dagegen - ebenfalls kovalent gebunden - ein sogenanntes Quencher- Molekül namens TAMRA. Solange die Sonde intakt ist, unterdrückt der Quencher die Fluoreszenz des Reportermoleküls (mittels Energietransfer vom Förster-Typ). Während der PCR hybridisieren der Forward- und der Reverse-Primer sowie die dazwischen gelegene Sonde mit der zu amplifizierenden DNA-Sequenz, so dass die AmpliTaqGold<sup>TM</sup>-Polymerase sich anlagern kann und die 5'-3'-DNA-Amplifikation beginnt. Erreicht die AmpliTaqGold<sup>TM</sup>-Polymerase das 5'-Ende der TaqMan-Sonde entwickelt sie gleichzeitig zu ihrer DNA-Synthese eine 5'-3'-Nuklease-Aktivität, die die Spaltung der TaqMan-Sonde bewirkt. Durch die Spaltung der TaqMan-Sonde in ihre Einzelteile werden das Reporter- und sein Quencher-molekül getrennt, der Reporter entzieht sich der inhibierenden Wirkung seines Quenchers und fluoresziert nun verstärkt. Dieser Prozess wiederholt sich während jedes Amplifikationszyklus. Die verstärkte Fluoreszenz wird mittels eines Lasers gemessen und daraus durch Vergleich mit einem bekannten Standard auf die Amplifikatmenge geschlossen [10].

**Tabelle 11:** RT-PCR- Primer und Sonden

<b>Forward Primer</b>	<b>29 rat-hu-ALK 5-forward</b> 5' CCT TCA AAC GTG CTG ACA TCT ATG <sup>3'</sup>
	<b>hu-β-actin-forward</b> 5' TTG GCA ATG AGC GGT TCC GCT G <sup>3'</sup>
	<b>rat-β-actin-forward</b> 5' CTA GAC TTC GAG CAA GAG ATG G <sup>3'</sup>
<b>Reverse Primer</b>	<b>30 rat-ALK 5-reverse</b> 5' AAC GGA TGG ATC AGA AGG TAC AAG <sup>3'</sup>
	<b>31 hu-ALK 5-reverse</b> 5' CAA CTG ATG GGT CAG AAG GTA CAA G <sup>3'</sup>
	<b>rat-β-actin-reverse 1</b> 5' ATA GAG GTC TTT ACG GAT GTC AAC <sup>3'</sup>
	<b>hu-β-actin-reverse</b> 5' CAC GTC ACA CTT CAT GAT GGA G <sup>3'</sup>
<b>Sonde</b>	<b>36 rat-ALK 5-Sonde</b> FAM- <sup>5'</sup> AGT ATT CTG GGA AAT CGC TCG ACG CTG T <sup>3'</sup> -TAMRA
	<b>32 hu-ALK 5-Sonde</b> FAM- <sup>5'</sup> TAT TCT GGG AAA TTG CTC GAC GAT GTT C <sup>3'</sup> -TAMRA
	<b>hu-β-actin-Sonde</b> FAM- <sup>5'</sup> CTGAGGCACTCTTCCAGCCTTCCTTCC <sup>3'</sup> -TAMRA
	<b>rat-β-actin-Sonde</b> FAM- <sup>5'</sup> AGT ATT CTG GGA AAT CGC TCG ACG CTG T <sup>3'</sup> -TAMRA

### 3.8.9.1. Erstellen der Standardreihe

Die cDNA-Standardverdünnungsreihe wurde ausgehend von Zellen der Linien HepG2 und Rattenfibroblasten (Rat2-Zellen) erstellt. Dazu wurde die cDNA der humanen HepG2- bzw. der Rattenfibroblasten wie folgt schrittweise mit t-RNA (Roche Applied Science, Mannheim) [c = 50 ng/μl] verdünnt.

Die Ausgangskonzentration der HepG2-cDNA entsprach c = 1 μg/ 50 μl = 20 ng/μl (s. Tab. 12). Analog wurden cDNA-Verdünnungen der Rattenmuskelzellen aus von 0,25 ng bis 20 ng erstellt.

**Tabelle 12:** Verdünnungsreihe der Standardkonzentrationen

Standard Nr.	Standardkonzentration [ng/μl]	cDNA [μl] +		t-RNA [μl]
1	20	100	+	100
2	10	100	+	100
3	5	100	+	100
4	2,5	80	+	120
5	1	100	+	100
6	0,5	100	+	100
7	0,25	80	+	120
8	0,1			

Zwischen allen Verdünnungsschritten wurde gut gemischt und zentrifugiert. Die Standardreihen wurden bei -20 °C gelagert.

Die Real-Time-PCR-Zyklen liefen nach dem folgenden, in Tabelle 13 dargestellten Temperaturschema ab:

**Tabelle 13:** Programmierung des Real-Time-PCR-Cyclers

Temperaturfolge	Temperatur [°C]	Zeit	Zyklen
Temperatur 1	50	2 min	1
Temperatur 2	95	10 min	1
Temperatur 3	95	15 sec	40
Temperatur 4	60	1 min	40

Gemessen wurde im exponentiellen Abschnitt der PCR, da hier die Fluoreszenz linear mit der Amplifikatkonzentration zunimmt.

Normalisiert wurden die Real-Time-PCRs gegenüber dem in den Versuchszellen enthaltenen β-actin, um eventuelle Variabilitäten zwischen den Läufen auszugleichen.



## **4. Ergebnisse**

Transforming Growth Factor beta (TGF $\beta$ ) ist aufgrund seines matrix-induzierenden, fibrogenen Einflusses auf mesenchymale Zellen ein zentraler Mediator der Leberfibrose. Daneben übt TGF $\beta$  eine antiproliferative Wirkung auf die epithelialen Leberzellen aus und wirkt so leberregenerierenden Prozessen entgegen.

In der vorgelegten Arbeit wurde zunächst die Methode der RNA-Interferenz im leberspezifischen Zellkultursystem etabliert. Anschließend wurde mittels ausgewählter siRNA-Sequenzen die TGF $\beta$ -R1-Expression dieser mesenchymalen und epithelialen Leberzellen durch RNA-Interferenz gehemmt und so die TGF $\beta$ -Signalwirkung unterbrochen.

### **4.1. RNA-Interferenz in HUH7 und HSC-T6-Zellen**

Die Inhibierung der TGF $\beta$ -Wirkung durch RNA-Interferenz im leberspezifischen Zellkultursystem wurde in dieser Arbeit an epithelialen Hepatomazellen der Linie HUH7 sowie mesenchymalen, von hepatischen Sternzellen abgeleiteten Zellen der Linie HSC-T6 entwickelt.

Zur Etablierung und Überprüfung der Transfektionsmethode für die siRNA und der RNA-Interferenz in den Leberzellen wurde zunächst ein fluoreszenzoptisch auswertbares Versuchskonzept angewendet. Sowohl HUH7- als auch HSC-T6-Zellen wurden dazu mit einem GFP-Expressionsvektor, dessen rekombinante GFP-Reporterexpression als grüne Fluoreszenz sichtbar wird, transient transfiziert. Nach der Cotransfektion einer gegen das GFP gerichteten siRNA konnte die expressionshemmende Wirkung dieser siRNA fluoreszenzmikroskopisch an der Verminderung der GFP-Reporterexpression d. h. der grünen Fluoreszenz gemessen werden.

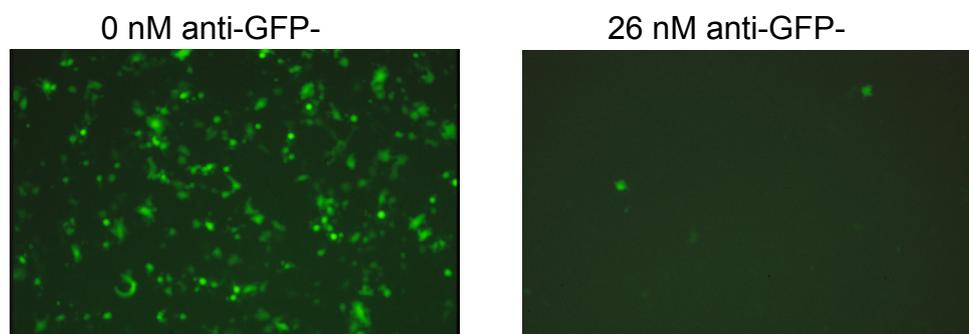
#### 4.1.1. Verminderte GFP-Reporterexpression nach Transfektion von siRNA gegen GFP in HUH7- und HSC-T6-Zellen

Die GFP-Reporterexpression in HUH7- und HSC-T6-Zellen vor und nach der Transfektion von GFP-siRNA wurde zum einen fluoreszenzmikroskopisch, zum anderen mittels einer FACS-Analyse ausgewertet.

##### 4.1.1.1. Fluoreszenzmikroskopische Beobachtungen

Die Transfektion von gegen das GFP-Reportertranskript gerichteter siRNA führte nach 24 h zu einer im Fluoreszenzmikroskop zum Teil sehr eindrücklich sichtbaren, dosisabhängigen Inhibierung der rekombinanten GFP-Expression in beiden Zellarten verglichen mit der jeweiligen Negativkontrolle.

In der Negativkontrolle der HUH7-Zellen wurde der Anteil der erfolgreich mit dem GFP-Reporter transfezierten, grün fluoreszierenden Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop in verschiedenen Versuchen stark schwankend auf zwischen 10 % und 80 % der Zellen geschätzt. Nach der Cotransfektion von GFP-siRNA in 2,6 nM Konzentration konnte nach 24 h stets eine bereits deutliche Verminderung der GFP-Reporterexpression beobachtet werden. Beim Einsatz von 26 nM war in den meisten HUH7-Zellen nur noch eine sehr geringe, kaum erkennbare grüne Fluoreszenz zu beobachten (s. Abb. 10).



**Abbildung 10:** HUH7 transfeziert mit pEGFP-c1-Plasmid und GFP-siRNA, Vergrößerung 10 x:  
Es zeigt sich eine deutlich sichtbare Hemmung der GFP-Reporterexpression in den mit GFP-siRNA transfezierten Zellen.

Die HSC-T6-Zellen hingegen zeigten in der Negativkontrolle eine wesentlich geringere GFP-Reporterexpression, der Anteil grün fluoreszierender Zellen war deutlich kleiner als in der Vergleichsgruppe der HUH7-Zellen. Nach dem Einsatz von 2,6 nM siRNA verschwand diese GFP-Fluoreszenz ebenfalls fast vollständig innerhalb von 24 h.

Beide Zellarten zeigten sich mikroskopisch durch die Transfektion deutlich strapaziert. Während die Transfektion auch im HUH7-Zelllayer zu Zellschädigung und -tod führte, war dieser Effekt unter den HSC-T6-Zellen noch stärker ausgeprägt zu beobachten. Die HUH7-Zellen erholten sich rasch innerhalb der ersten drei Tage nach der Transfektion, der HSC-T6-Zelllayer hingegen erschien noch zwei Tage nach der Transfektion sehr stark ausgedünnt.

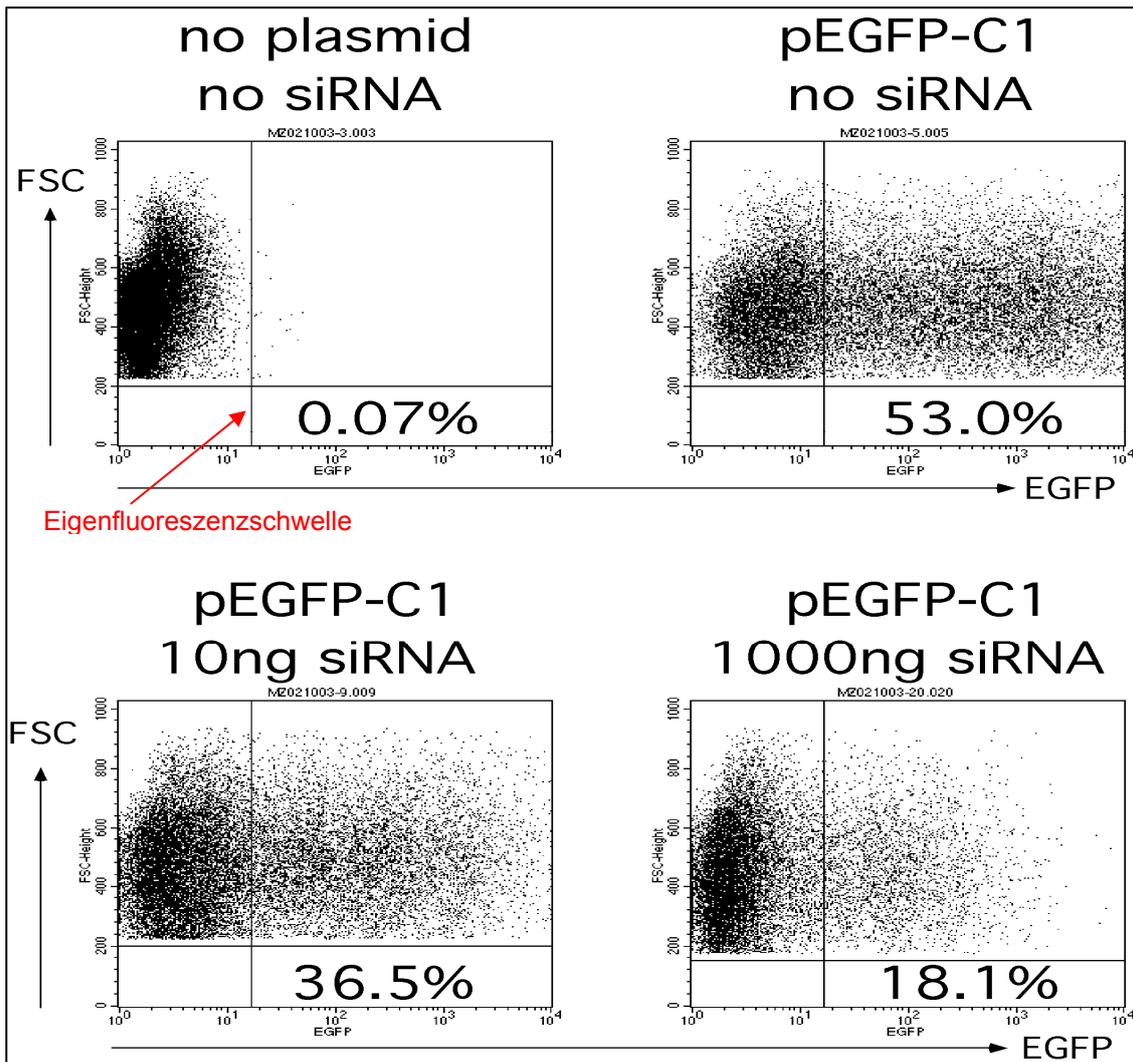
Da die Wirkung der siRNA bereits nach 24 h deutlich zum Tragen kam und eine Ausdehnung der siRNA-Einwirkzeit auf bis zu drei Tage keine deutlichere Wirkung sondern tendenziell eher einen Wirkungsverlust der siRNA zeigte, wurde auch in zukünftigen Experimenten die Wirkung der siRNA stets nach 24 h gemessen.

#### **4.1.1.2. FACS-Analyse**

Zur quantitativen Bestimmung der siRNA-Wirkung und Optimierung der einzusetzenden siRNA-Konzentrationen wurde die siRNA-abhängige GFP-Reporterfluoreszenz in HUH7-Zellen mithilfe einer FACS-Analyse gemessen. Die so bestimmte Anzahl und Fluoreszenzintensität der mit einem GFP-Reporterplasmid und GFP-siRNA cotransfizierten HUH7-Zellen führte zu den im Folgenden dargestellten Ergebnissen (s. Abb. 11 u. 12).

In allen Probenansätzen wurde die Eigenfluoreszenzschwelle anhand der Negativkontrolle (Abb.11: Quadrant oben links; Abb. 12: Ansatz 1, 2 u. 3) bestehend aus HUH7-Zellen, denen im Transfektionsansatz weder das GFP-Reporterplasmid noch GFP-siRNA zugesetzt worden war, so gewählt, dass nur ein unwesentlich kleiner Teil dieser Zellen ( $m = 0,1 \%$ ) mit seiner Eigenfluoreszenz darüber lag.

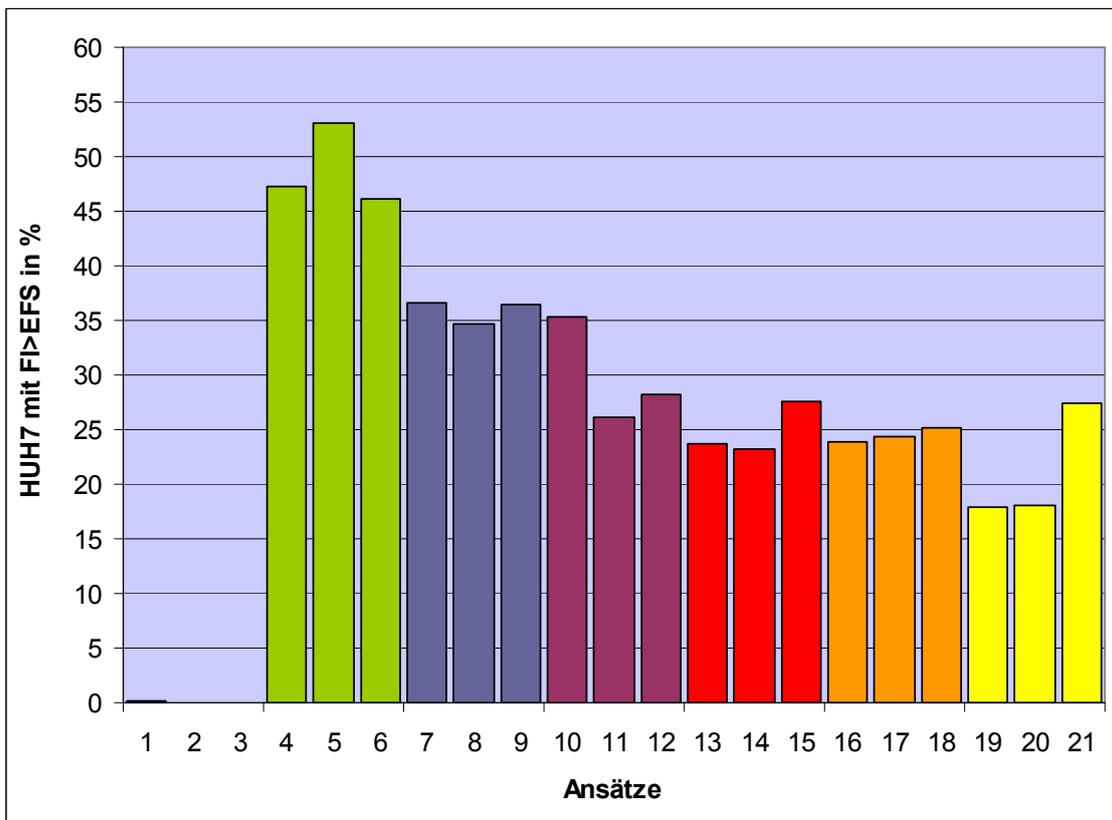
Die rekombinante GFP-Reporterexpression führte in der Positivkontrolle (s. Abb. 11: Quadrant oben rechts; s. Abb. 12: Ansatz 4, 5 u. 6), bestehend aus HUH7-Zellen, die zwar mit dem GFP-Reporterplasmid, nicht aber mit der dagegen gerichteten siRNA behandelt wurden, bei durchschnittlich 48,8 % der Zellen zu einer intensiveren Fluoreszenz als die den Zellen immanente Eigenfluoreszenz.



**Abbildung 11:** Exemplarische FACS-Bilder von HUH7 transfiziert mit dem pEGFP-c1-Plasmid und GFP-siRNA: mit steigender Konzentration der siRNA fällt der Anteil der Zellen, die stärker als die Eigenfluoreszenzschwelle fluoreszieren. FSC = forward scatter (Zellgröße) EGF= Intensität der grünen Fluoreszenz

In den mit dem GFP-Reporterplasmid und steigenden Mengen GFP-siRNA cotransfiziertem Versuchsansätzen (s. Abb. 11, untere Reihe; s. Abb. 12, Ansätze 7 bis 21) zeigte sich dagegen eine mit steigender Menge der

eingesetzten siRNA zunehmende Verminderung des Anteils intensiv fluoreszierender Zellen. Während in der Positivkontrolle ca. 49 % der Zellen eine stärkere Fluoreszenz ausprägten, als durch ihre Eigenfluoreszenz bedingt, waren es nach der Transfektion von 0,3 nM GFP-siRNA durchschnittlich nur noch 35,9 % und nach der Zugabe der Maximalkonzentration von 26 nM siRNA im Durchschnitt nur mehr 21,1 % (wobei der als Ausreißer anzusehende Ansatz 21 den Mittelwert beträchtlich anhub).



**Abbildung 12:** FACS-Analyse von HUH7, transfeziert mit pEGFP-c1-Reporter und GFP-siRNA: Ca. 50 % der HUH7-Zellen aus der Positivkontrolle (Ansätze Nr. 4, 5 u. 6) fluoreszieren stärker als die der Negativkontrolle (Ansatz Nr. 1, 2 u. 3). Mit steigender Konzentration der GFP-siRNA sinkt der Anteil der über der Eigenfluoreszenzschwelle fluoreszierenden Zellen.

Legende:

Ansätze 1 - 3:	0 µg pEGFP-c1-Reporter + 0 nM anti-GFP -siRNA
" 4 - 6:	5 µg " + 0 nM "
" 7 - 9:	" " + 0,3 nM "
" 10 - 12:	" " + 1,3 nM "
" 13 - 15:	" " + 2,6 nM "
" 16 - 18:	" " + 13 nM "
" 19 - 21:	" " + 26 nM "

FI = Fluoreszenzintensität  
EFS = Eigenfluoreszenzschwelle

Zusammenfassend zeigt sich also eine von der Menge der eingesetzten GFP-siRNA abhängige deutliche Abnahme des Anteils rekombinant grün fluoreszierender Zellen, und zwar um maximal ca. 30 % gegenüber der Positivkontrolle.

Dieser Effekt lässt im Bereich einer siRNA-Konzentration zwischen 1,3 nM und 13 nM eine Sättigungstendenz erahnen, wodurch sich eine ungefähre Orientierung über die für zukünftige, wirkungsvolle Anwendungen minimal benötigte siRNA-Konzentration ergibt.

#### **4.2. Auswahl von siRNA-Sequenzen zur Inhibierung der TGF $\beta$ -R1-Expression des Menschen und der Ratte mittels RNA-Interferenz**

Um die TGF $\beta$ -R1-Expression in humanen epithelialen (HUH7) und mesenchymalen Rattenleberzellen (HSC-T6) mittels RNA-Interferenz zu inhibieren, wurde nach den im Kapitel 3.5. beschriebenen Methoden und Kriterien, ausgehend von den publizierten cDNA-Sequenzen der Ratte und des Menschen, jeweils eine mögliche TGF $\beta$ -R1-siRNA-Sequenz gesucht (s. Kap. 3.5.).

##### **4.2.1. Eine siRNA gegen den humanen TGF $\beta$ -R1: Sequenz und Eigenschaften**

Die Suche nach möglichen humanen TGF $\beta$ -R1-siRNA-Sequenzen erfolgte auf der Basis der unter der Accession No. NM\_004612 publizierten cDNA-Sequenz des TGF $\beta$ -R1 im humanen Genom [2]. Im codierenden Sequenzbereich zwischen Position +77 bis +1576 fanden sich 25 Sequenzabschnitte (s. Tab. 14), welche die im Kapitel 3.5. bezüglich Länge, Lokalisation und Basenzusammensetzung beschriebenen Kriterien einer siRNA erfüllen [27-30, 45, 46, 92]. Die ausgesuchten cDNA-Sequenzen wurden nun im Hinblick auf evtl. störende Sekundärstrukturen analysiert, wobei insbesondere Agglomerat- und Schleifenbildungen vermieden wurden. Hierzu sei allerdings angemerkt, dass der Einfluss der Sekundärstrukturen einer Sequenz auf die Wirksamkeit einer

siRNA nach wie vor umstritten ist [11, 27, 29, 45, 46, 55, 96]. Anhand der NCBI-Gendatenbank [2] wurden diese 25 potentiellen siRNA-Zielsequenzen nun im NCBI-Blast ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)) nach Homologien zum humanen Genom durchsucht (s. Kap. 3.5.). Dabei fielen besonders zwei Sequenzen auf, deren Struktur und Spezifität den Anforderungen an eine siRNA am nächsten kommen:

1. die Sequenz  $5' \text{AAT TGC TCG ACG ATG TTC CAT} 3'$

(s. Tab. 14, Nr. 22, gelb unterlegt) und

2. die Sequenz  $5' \text{AAT TGC TCG ACG ATG TTC C} 3'$

(Tabelle 14, Nr. 23, grau unterlegt).

Von diesen beiden wiederum erschien die Sequenz  $5' \text{AAT TGC TCG ACG ATG TTC CAT} 3'$  (Nr. 22) aus mehreren Gründen besser als siRNA geeignet als die Sequenz  $5' \text{AAT TGC TCG ACG ATG TTC C} 3'$  (Nr. 23): Nach den Erkenntnissen von Tuschl et al. entwickeln siRNAs ihr Effektivitätsoptimum mit einer Länge von 21 Basenpaaren [27, 29]. Das minimal ungünstigere GC-Verhältnis sowie die größere Anzahl an Dimerbildungen der Sequenz Nr. 22 im Vergleich zur Sequenz Nr. 23 rücken dabei angesichts der stärkeren Bindungsenergie der Sequenz Nr. 22 zu ihrer mRNA ( $\Delta G_{(\text{Sequenz Nr.22})} = -41,13 \text{ kcal/mol}$ ,  $\Delta G_{(\text{Sequenz Nr.23})} = -37,7 \text{ kcal/mol}$ ) in den Hintergrund.

Dies bedingt, dass schließlich die Sequenz  $5' \text{AAT TGC TCG ACG ATG TTC CAT} 3'$  (Nr. 22) als siRNA gegen den humanen TGF $\beta$ -R1 ausgewählt wurde.

Die ausgewählte siRNA-Zielsequenz ist am 3'-Ende der Kinaseregion des humanen TGF $\beta$ -R1 lokalisiert (s. Abb. 13), welche für die Weiterleitung des TGF $\beta$ -Signals in das Zellinnere wesentlich ist.

**Tabelle 14:** Primär- & Sekundärstrukturen sowie Homologien der potentiellen hu-TGF- $\beta$ -R1 siRNA-Sequenzen

Nr.	Basensequenz	Länge (in bp)	ab bp-No.	bp vom Startcodon	bp zum Terminationcodon	G/C in %	$\geq$ CCC $\geq$ GGG	Hairpins $\Delta$ G (kcal/mol)	Dimere $\Delta$ G (kcal/mol)	Homologien*
1	AACAGCATGTGTATAGCTGA	20	278	198	1278	40	-	-3,49	-7,69 -7,34 -5,38 -3,4	+
2	AATTCCTCGAGATAGGCCGT	20	307	228	1249	50	-	-0,37	-10,28 -9,96 -5,36	+
3	AACTGGGTCTGTGACTACAACAT	23	359	280	1194	43,5	+	-0,2	-4,3	+
4	AACATATTGCTGCAATCAGGACC	23	367	289	1186	43,5	-	-0,17	-8,51 -7,05 -3,91	+
5	AAGTCATCACCTGGCCTTGGTC	22	422	343	1132	54,6	-	-1,31	-9,28 -5,41	+
6	AACTGGCAGCTGTCATTGCTG	21	450	371	1105	52,4	-	-3,59 -1,99	-10,24 -7,69 -6,09	+
7	AACCGCACTGTCATTCACCAT	21	524	445	1031	47,6	-	-	-	+
8	AACCGCACTGTCATTCACCA	20	524	445	1032	50	-	-	-	+
9	AAGAGGACCCTTCATTAGATCGC	23	558	479	995	47,8	+	-	-5,62	+
10	AACGTCAGTTCTGGCTCAGGT	22	631	552	923	54,6	-	-	-6,3 -4,55	+
11	AACGTCAGTTCTGGCTCA	19	631	552	926	52,6	-	-	-6,3	+
12	AAGAAAGCATTGGCAAAGTCCG	22	699	620	855	45,5	-	-	-	+
13	AAGTTTGAGAGGAAAGTGGCG	22	729	650	825	50	-	-	-	+
14	AAGAACGTTTCGTGGTTCCGT	20	789	710	767	50	-	-1,76 -1,65	-13,33 -5,95 -5,86	+
15	AACGTTTCGTGGTTCCGTGA	19	792	713	765	52,6	-	-1,65	-10,18 -5,95	+
16	AATGGTACTTGGACTCAGC	19	884	805	673	47,4	-	-	-3,65	-
17	AATGGTACTTGGACTCAGCTC	21	884	805	671	53,5	-	-	-7,34 -3,65	+
18	AAGGAAAGCCAGCCATTGCT	20	1047	968	509	50	-	-1,64 -1,24	-5,74 -5,74	+
19	AAGCCAGCCATTGCTCATAG	20	1052	973	504	50	-	-0,64 -0,24	-	+
20	AATCCTTCAAACGTGCTGAC	20	1257	1178	299	45	-	-0,43	-6,3 -4,53	+
21	AACGTGCTGACATCTATGC	19	1266	1187	291	47,4	-	-	-6,3 -4,43	+
22	AATTGCTCGACGATGTTCCAT	21	1306	1226	249	42,9	-	-	-6,76 -5,36 -4,43	-
23	AATTGCTCGACGATGTTCC	19	1306	1226	251	47,4	-	-	-6,76 -5,36	-
24	AACAGATGGCAGAGCTGTG	19	1442	1363	115	52,6	-	-1,69	-7,34 -5,89 -4,55	+
25	AAGCCTTGAGAGTAATGGC	19	1461	1382	96	47,4	-	-2,71	-7,21	+

\*Homologien der Sequenz im Genom des Homo sapiens

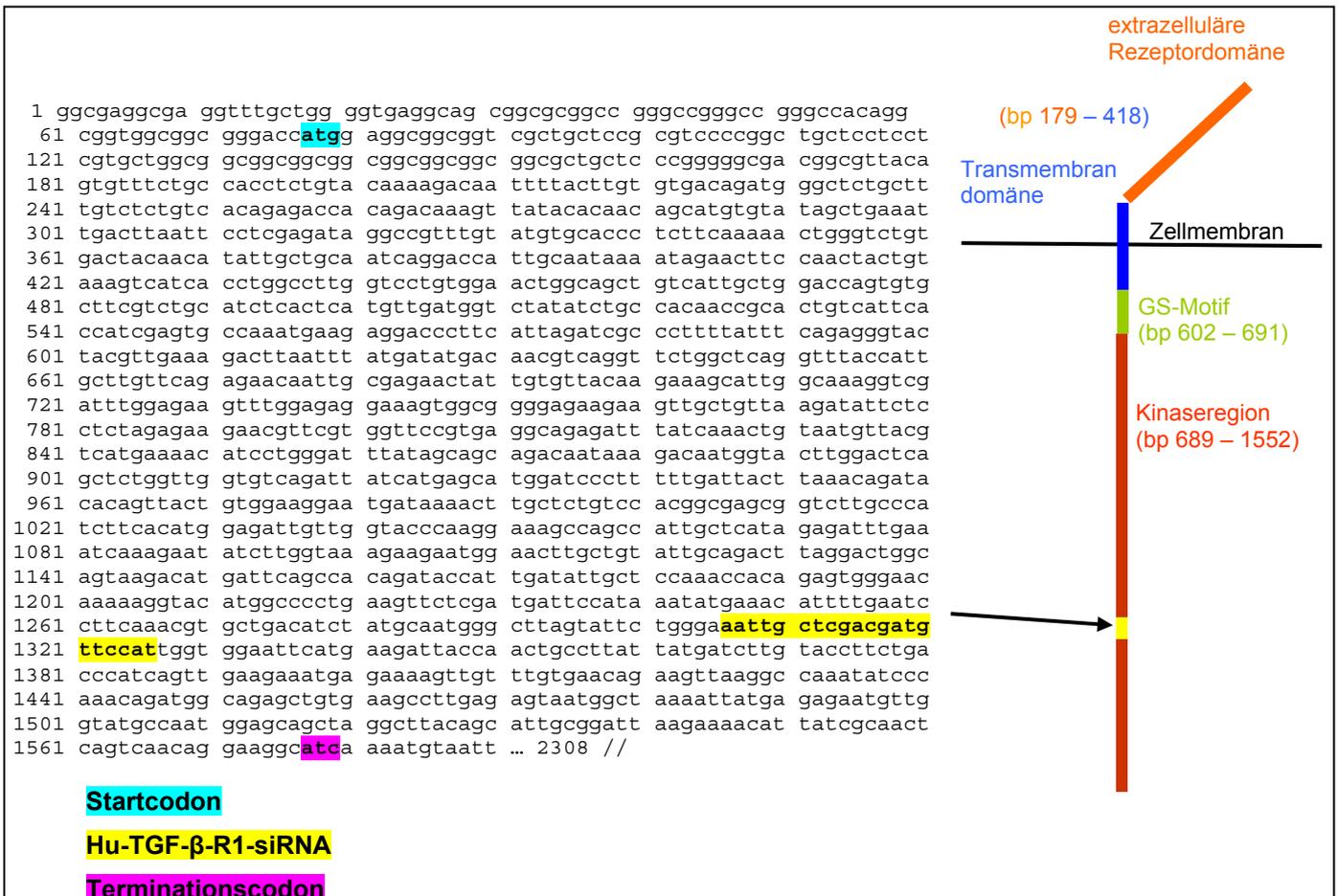


Abbildung 13: Lokalisation der hu-TGFβ-R1-siRNA auf der humanen TGFβ-R1-cDNA (Accession No. NM\_004612)

#### 4.2.2. Eine siRNA gegen den TGFβ-R1 der Ratte: Sequenz und Eigenschaften

Anhand der unter der Accession No. NM\_012775 publizierten Sequenz des TGFβ-R1 des *Rattus norvegicus* wurde entsprechend dem in Kapitel 3.5. und 4.2.1. beschriebenen Vorgehen wiederum zunächst eine Vorauswahl möglicher rat-TGFβ-R1-siRNA-Zielsequenzen getroffen. Es fanden sich im codierenden Sequenzbereich (Position +40 bis +1542 des murinen TGFβ-R1-Gens) 21 Zielsequenzen, welche die in Kapitel 3.5. genannten Voraussetzungen für eine siRNA erfüllen.

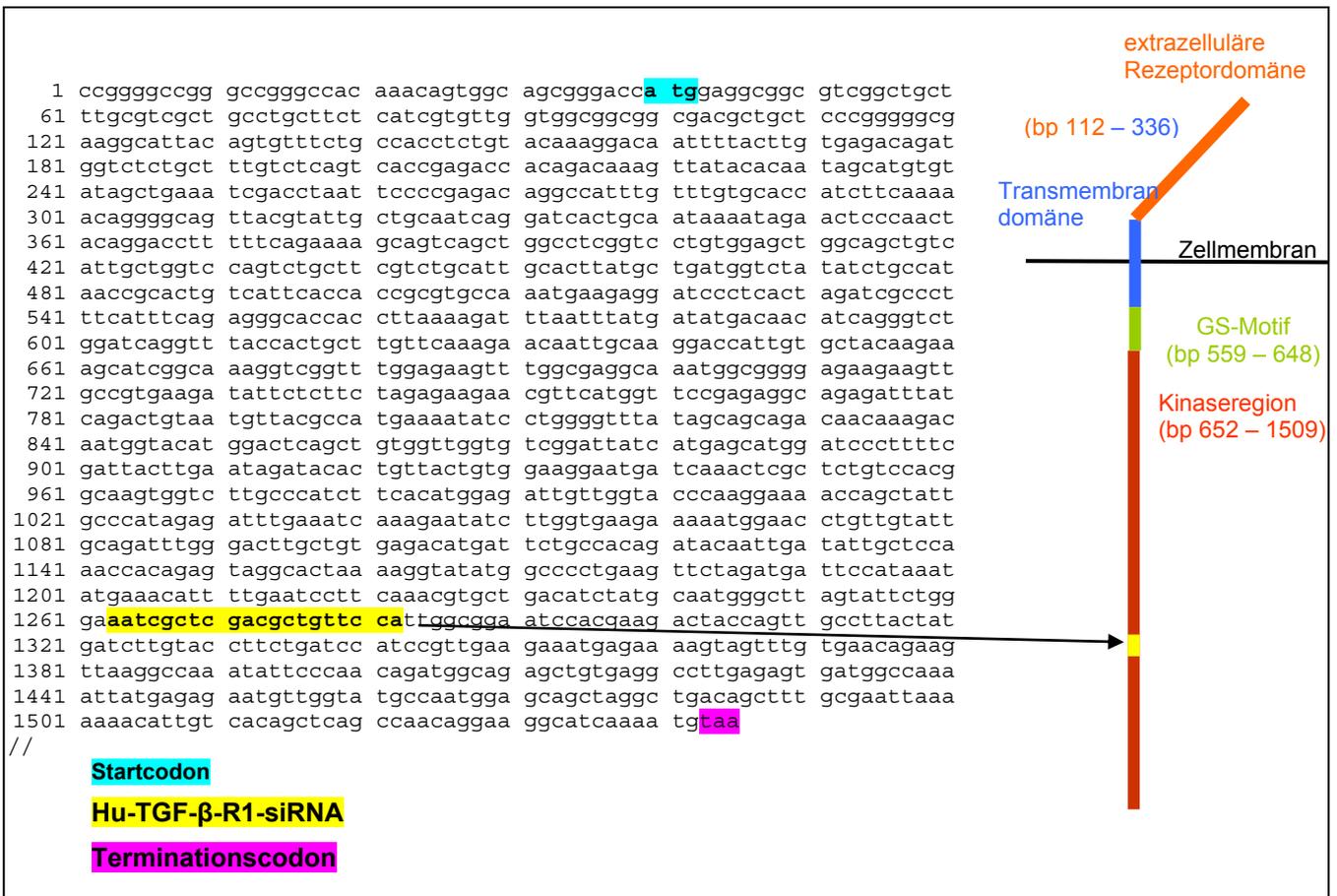
Diese 21 Sequenzen wurden hinsichtlich ihrer Sekundärstrukturen und Homologien mit dem Genom des *Rattus norvegicus* analysiert. Auch hier lag das Hauptaugenmerk auf Aggregatbildungen und Schleifenstrukturen. In Folge dessen verringerte sich die Zahl der in Frage kommenden Sequenzen auf insgesamt fünf, welche den geforderten strukturellen Kriterien einer siRNA sowie dem Gebot der Spezifität weitgehend entsprechen: <sup>5'</sup>AAC CGC ACT GTC ATT CAC CA<sup>3'</sup>, <sup>5'</sup>AAG AAA GCA TCG GCA AAG GT<sup>3'</sup>, <sup>5'</sup>AAG GTC GGT TTG GAG AAG TT<sup>3'</sup>, <sup>5'</sup>AAT CGC TCG ACG CTG TTC CA<sup>3'</sup> und <sup>5'</sup>AAT CGC TCG ACG CTG TTC CAT<sup>3'</sup> (s. Tab. 15, Sequenz Nr. 6, 13, 14, 18 und 19, gelb bzw. grau unterlegt).

Obwohl unter den genannten geeigneten Sequenzen sich vor allem diese <sup>5'</sup>AAC CGC ACT GTC ATT CAC CA<sup>3'</sup> mit der Nr. 6 durch sehr geeignete strukturelle Eigenschaften für eine siRNA auszeichnet, wurde aufgrund der besseren Vergleichbarkeit ihrer Lokalisation mit derjenigen der humanen TGFβ-R1-siRNA, die Sequenz <sup>5'</sup>AAT CGC TCG ACG CTG TTC C<sup>3'</sup> (Tabelle 15, Nr.18, gelb unterlegt) als siRNA gegen den TGFβ-R1 der Ratte ausgewählt. Beide Sequenzen liegen im Ratten- wie auch im menschlichen Genom am Ende des die Kinaseregion des TGFβ-R1 kodierenden cDNA-Abschnittes: beim Menschen ab bp 1306, bei der Ratte ab bp 1263 (siehe Abbildung 13 und 14).

**Tabelle 15:** Primär- & Sekundärstrukturen sowie Homologien der potentiellen TGF $\beta$ -R1-siRNA Sequenzen

Nr.	Basensequenz	Länge (bp)	ab bp - No.	bp vom Start-codon	bp zum Terminationscodon	G/C in %	$\geq$ GGG $\geq$ CCC	Hairpins $\Delta$ G (kcal/mol)	Dimere $\Delta$ G (kcal/mol)	Homologien*
1	AATCGACCTAATTCCCCGAG	20	249	209	1273	50	1	-1,69	-6,76 -6,19 -5,36	-
2	AATTCCCCGAGACAGGCCAT	20	258	216	1264	55	1	-	10,28 -5,36	-
3	AACAGGGGCAGTTACGTATT	20	300	260	1222	45	1	-	-9,22	-
4	AAGCAGTCAGCTGGCCTCGG	20	379	339	1143	65	0	-0,34	-10,24 -9,28	+
5	ATTGCTGGTCCAGTCTGCTT	20	421	381	1101	50	0	-	-6,62 -4,55	-
6	AACCGCACTGTCATTCACCA	20	481	441	1041	50	0	-	-	-
7	AATGAAGAGGATCCCTCACT	20	511	471	1011	45	0	-2,04 -0,23	-10,76 -7,24 -4,53	+
8	AAGAGGATCCCTCACTAGAT	20	515	475	1007	45	0	-1,04	10,76 -6,24 -5,16 -4,05	-
9	AACATCAGGGTCTGGATCAG	20	588	548	934	50	0	-	-5,62 -4,55 -4,05	+
10	AAGAACAATTGCAAGGACCA	20	627	587	895	40	0	-	10,94 -9,27	-
11	AATTGCAAGGACCATTGTGC	20	632	592	890	45	0	-1,79 -0,6	10,94 -6,09 -5,36 -4,9	-
12	AAGGACCATTGTGCTACAAG	20	639	599	883	45	0	-1,04	-6,24	-
13	AAGAAAGCATCGGCAAAGGT	20	656	616	866	45	0	-	-	-
14	AAGGTCGGTTTGAGAAGTT	20	671	631	851	45	0	-	-	-
15	AAGTTTGGCGAGGCAAATGG	20	686	646	836	50	0	-2,54	-6,84	-
16	AACCACAGAGTAGGCACTAA	20	1141	1101	381	45	0	-	-3,94 -3,56	+
17	AACGTGCTGACATCTATGCA	20	1223	1183	293	45	0	-1,79	-8,05 -6,3 -6,09 -4,43	-
18	AATCGCTCGACGCTGTTCCA	20	1263	1221	259	55	0	-	-6,76	-
19	AATCGCTCGACGCTGTTCCAT	21	1263	1221	258	52,3 8	0	-	-6,76	-
20	AATGGAGCAGCTAGGCTGAC	20	1465	1425	57	55	0	-2,49 -1,44	-7,69 -6,34 -5,74 -4,16	+
21	AACATTGTCACAGCTCAGCC	20	1503	1463	19	50	0	-	-6,34 -5,74	-

\*Homologien zum Genom des Rattus norvegicus



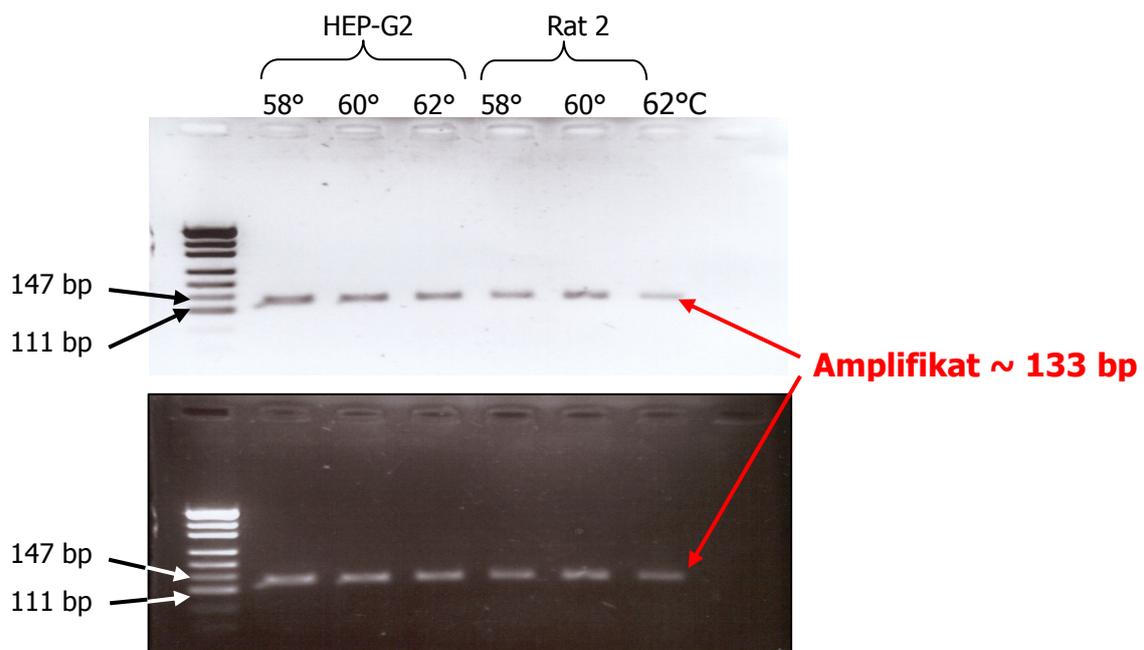
**Abbildung 14:** Lokalisation der rat-TGFβ-R1-siRNA auf dem murinen TGFβ-R1 bzw. auf seiner cDNA (Accession No. NM\_012775): Die Lokalisation rat-TGFβ-R1-siRNA-Sequenz ist vergleichbar der Lage der humanen TGFβ-R1-siRNA-Zielsequenz am 3'-Ende der Kinase region des TGFβ-R1.

#### 4.3. Transfektion von HUH7 und HSC-T6-Zellen mit TGF $\beta$ -R1-siRNA und Evaluation der RNA-Interferenz mittels Real-Time-PCR

Die Inhibierung der TGF $\beta$ -R1-Translation in Leberepithelzellen und mesenchymalen Hepatischen Sternzellen mittels RNA-Interferenz wurde durch die Transfektion der ausgewählten TGF $\beta$ -R1-siRNA-Sequenzen in Zellen der Linien HUH7 und HSC-T6 initiiert. Es wurden siRNA-Mengen zwischen 0 und 50 nM eingesetzt. Der Effekt der siRNA auf die TGF $\beta$ -R1-Translation wurde quantitativ auf der Transkriptebene durch eine Real-Time-PCR bestimmt.

##### 4.3.1. Ergebnis der Primer Testung (s. Kap. 3.8.7. und 3.8.8.)

Die ausgewählten Primer wurden primär in einer qualitativen PCR getestet (s. Kap. 3.8.7.). Die Gelelektrophorese des Amplifikates (s. Kap. 3.8.8.) zeigte sowohl in den humanen wie auch den murinen Proben eine saubere Auftrennung und ein-deutige Bande bei einer Amplifikatgröße von ca. 133 bp (s. Abb. 15). Diese entsprach sehr genau der erwarteten Amplifikatlänge (s. Abb. 16) und bewies damit die gute und spezifische Funktion der ausgewählten Primer.



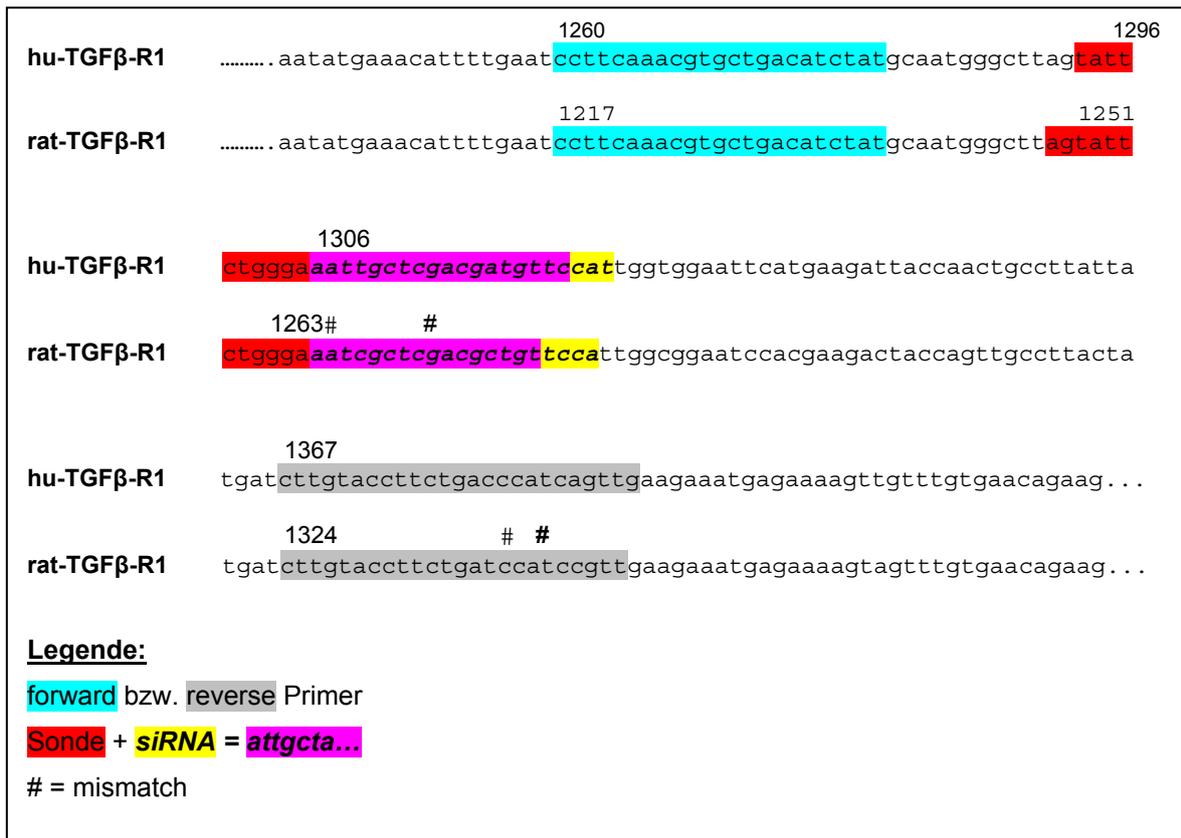
**Abbildung 15:** Gelelektrophoretische Auftrennung des TGF $\beta$ -R1-Amplifikates im Rahmen der Prüfung der Real-Time-PCR-Primer

#### **4.3.2. Real-Time-PCR: verminderte TGF $\beta$ -R1-Transkriptlevel nach RNA-Interferenz**

Nach der Transfektion (s. Kap. 3.8.1.) von TGF $\beta$ -R1-siRNA in HUH7- und HSC-T6-Zellen wurde die zelluläre RNA isoliert (s. Kap. 3.8.2. u. 3.8.3.), einer Reversen Transkription unterzogen (s. Kap. 3.8.5) und die gewonnene cDNA zur Bestimmung der Wirkung der TGF $\beta$ -R1-siRNA auf die TGF $\beta$ -R1-Transkriptmenge einer Real-Time-PCR (s. Kap. 3.8.9) unterzogen. Die u.a. einer sorgfältigen Primer- und Sondenauswahl (siehe Kapitel 3.8.6, 3.8.7. u. 3.8.8.) zu verdankende hohe Spezifität dieser Methode erlaubt eine quantitative Messung des TGF $\beta$ -R1-Transkriptlevels. Normalisiert wurde die Real-Time-PCR dabei gegen das von beiden Zelllinien exprimierte Protein  $\beta$ -actin.

Es wurde eine möglichst unmittelbare direkte Untersuchung des Effektes der siRNA auf das TGF $\beta$ -R1-Amplifikat angestrebt. Deshalb wurden die Primer so plaziert, dass sie die Schnittstelle der siRNA, die sich etwa in der Mitte der Zielsequenz befindet [29], möglichst eng umfassen, und die Sonde diese überspannt. Ein möglichst kurz gehaltenes PCR-Produkt ist *per se* weniger fehleranfällig. Dazu kann die schnittstellenübergreifende Sonde nur an die intakte, nicht durch den RISC abgebaute Zielsequenz binden. Beides gewährleistet also eine genaue Detektion des Amplifikates.

Sowohl die Sonden wie auch die Primer und die siRNAs wurden an vergleichbarer Stelle im humanen bzw. murinen Genom lokalisiert, um lagebedingte Unterschiede bei der Bindung und Wirkung der siRNA bzw. bei der Real-Time-PCR-Analyse zu vermeiden. Abbildung 16 illustriert die Lage der TGF $\beta$ -R1-Primer und -Sonden auf der cDNA des humanen bzw. murinen TGF $\beta$ -R1. Es zeigte sich in der Real-Time-PCR bereits nach 24-stündiger Behandlung mit hu-TGF $\beta$ -R1-siRNA eine deutliche, mit steigender Menge der eingesetzten siRNA zunehmende Verminderung der Transkriptmenge des TGF $\beta$ -R1 in den HUH7-Zellen (s. Abb. 17). Diese Wirkung ließ sich auch in den mit rat-TGF $\beta$ -R1-siRNA transfezierten HSC-T6-Zellen beobachten, allerdings in wesentlich schwächerer Ausprägung (s. Abb. 18). Dargestellt sind die Mittelwerte der TGF $\beta$ -R1-Amplifikatmenge je Ansatz, welche gegenüber den Mittelwerten der  $\beta$ -actin-Amplifikatmenge je Ansatz normalisiert wurden.



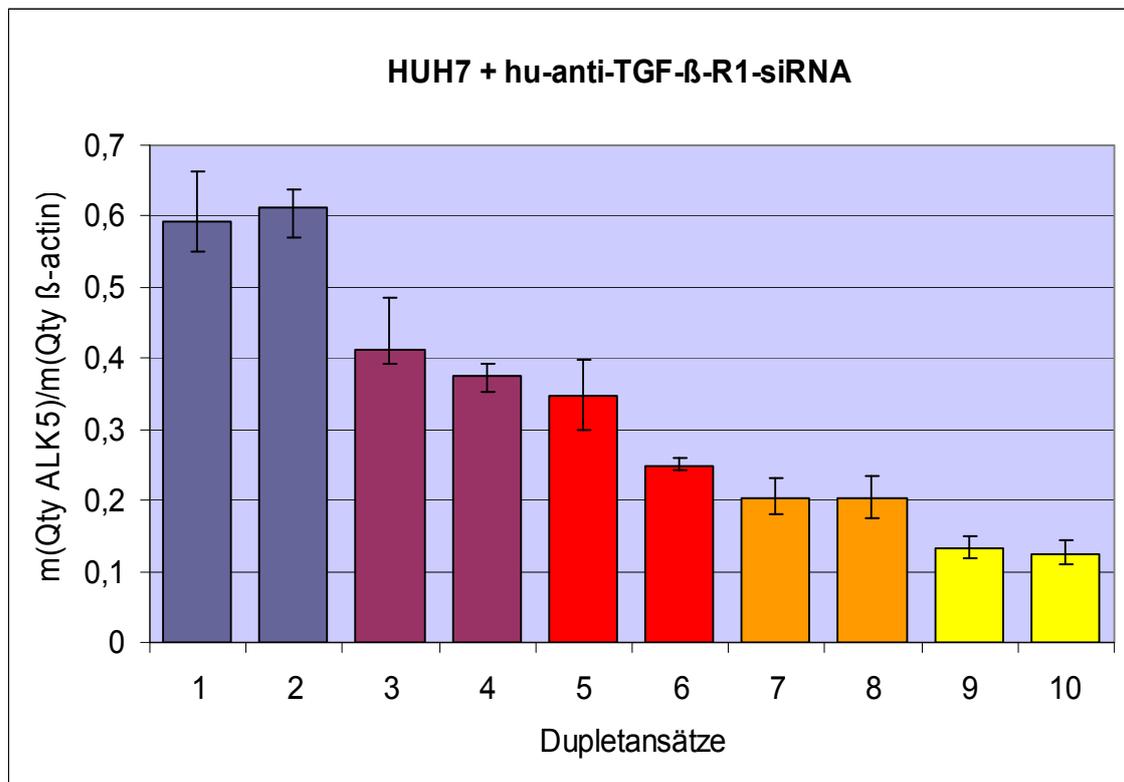
**Abbildung 16:** Lage der siRNA, der Primer sowie der Sonde auf der humanen und murinen TGFβ-R1-cDNA-Sequenz

Das so normalisierte TGFβ-R1-Transkriptmenge lag (s. Abb. 17) in den HUH7-Zellen der Negativkontrolle, denen im Transfektionsansatz keine TGFβ-R1-siRNA beigefügt worden war, bei 60 % der β-actin-Menge. Im Vergleich dazu zeigte sich nach der Transfektion von 3 nM hu-TGFβ-R1-siRNA eine deutliche Abnahme der TGFβ-R1-Transkriptmenge in den HUH7-Zellen um bis zu 35 % auf ca. 40 % des β-actin-Amplifikates. Nach Behandlung der Zellen mit einer Höchstmenge von 48 nM siRNA verstärkte sich dieser Effekt bis zu einer Reduktion der TGFβ-R1-Transkriptmenge um insgesamt 80 %. Die stärkste Abnahme der hu-TGFβ-R1-Transkriptmenge um gerundet 35 % erfolgte dabei bereits nach dem Einsatz der Mindestmenge von 3 nM siRNA.

Die Spannweite der Einzelwerte in den Ansätzen (s. Abb. 17) bestätigt das anhand der Mittelwerte dargestellte Ergebnis. Sie schwankt um maximal 0,19 über den Mittelwert, um max. 0,13 nach unten und unterstreicht mit ihren Mini- und Maximalwerten die beschriebene Wirkung der hu-TGFβ-R1-siRNA.

In den HSC-T6-Zellen ließ sich nach 24-stündiger Behandlung mit rat-TGFβ-

R1-siRNA in der Real-Time-PCR ebenfalls eine Abnahme der TGFβ-R1-Transkriptmenge nachweisen (s. Abb. 18). Diese zeigte im Vergleich zu den HUH7-Zellen allerdings eine deutlich geringere Ausprägung (s. Abb. 17 und 18).



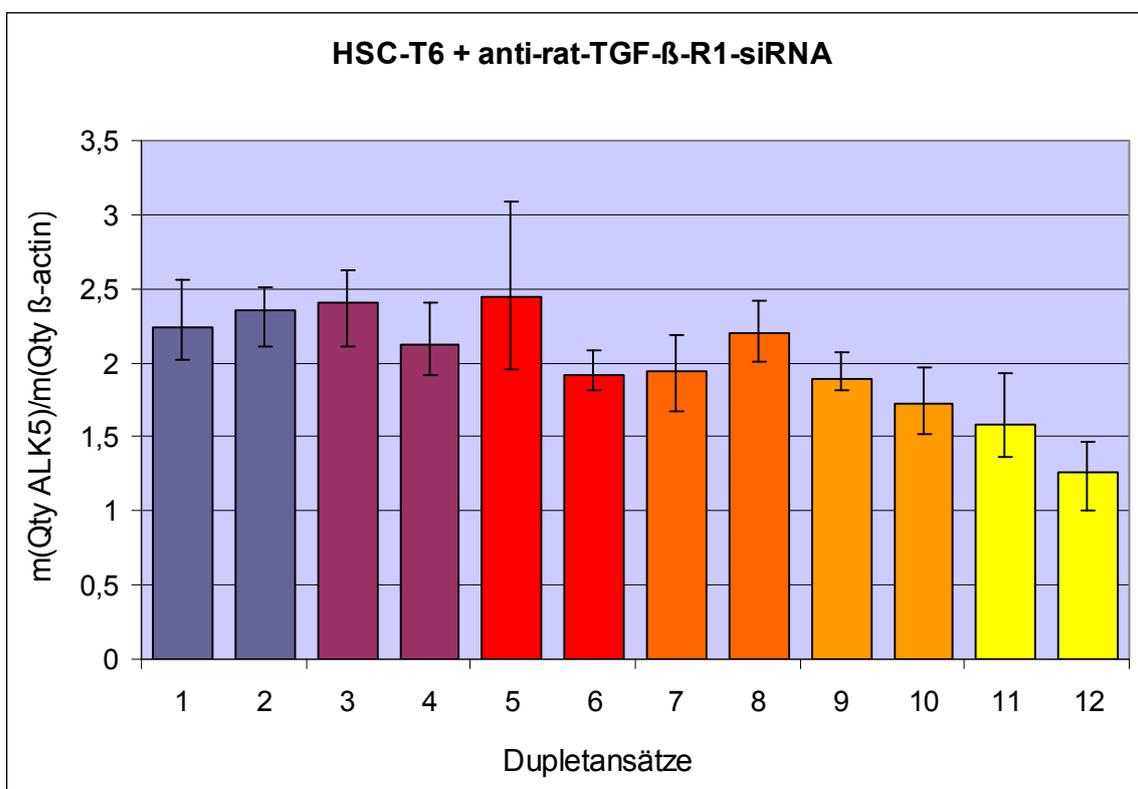
**Abbildung 17:** Exemplarische Darstellung der Real-Time-PCR des TGFβ-R1 aus HUH7-Zellen, die mit steigenden Molaritäten hu-TGFβ-R1-siRNA transfiziert wurden. Es zeigt sich eine mit der Menge der eingesetzten siRNA zunehmende Abnahme des TGFβ-R1-Transkriptes.

**Legende:** Ansätze 1 + 2: + 0 nM hu-TGFβ-R1-siRNA  
 " 3 + 4: + 3 nM "  
 " 5 + 6: + 16 nM "  
 " 7 + 8: + 32 nM "  
 " 9 + 10: + 48 nM "

I = Spannweite Qty ALK 5/Qty β-actin

Auszugehen ist in den HSC-T6-Zellen der Negativkontrolle von einer normalisierten TGFβ-R1-Amplifikatmenge, die dem 2,3-fachen des β-actin-Amplifikates entspricht. Nach der Transfektion von 3,4 nM rat-TGFβ-R1-siRNA entwickelte sich eine Abnahme des TGFβ-R1-Transkriptes um durchschnittlich 5,5 %. Der Einsatz von 34 nM siRNA bestätigte diese Tendenz und bewirkte

eine gemittelte Verminderung des TGFβ-R1-Transkriptlevels um 21,5 %. Durch die Transfektion einer Maximalmenge von 50 nM rat-TGFβ-R1-siRNA konnte der TGFβ-R1-Gehalt der HSC-T6 Zellen um insgesamt durchschnittlich 33,2 % gegenüber der Negativkontrolle gesenkt werden. Die Spannweite der Einzelwerte begleitet den gemittelten Kurvenverlauf abgesehen von dem Ausreißerduplet Nr. 5 recht harmonisch und bestätigt so die dargestellte Kurvenneigung. Auffällig ist allerdings, dass die siRNA-bedingte Abnahme der TGFβ-R1-Amplifikatmenge im Vergleich zum humanen Versuchsmodell in den HUH7-Zellen deutlich zögerlicher verläuft.



**Abbildung 18:** Exemplarische Darstellung der RT-PCR des TGFβ-R1 aus HSC-T6-Zellen, die mit steigenden Molaritäten rat-TGFβ-R1-siRNA transfeziert wurden. Es zeigt sich eine mit der Menge der eingesetzten siRNA steigende Verminderung des TGFβ-R1Transkriptes.

**Legende:**

Ansatz	1 + 2 : + 0	nM rat-TGFβ-R1-siRNA
"	3 + 4 : + 1,7	nM
"	5 + 6 : + 3,4	nM
"	7 + 8 : + 16,7	nM
"	9 + 10 : + 33,5	nM
"	11 + 12 : + 50,2	nM

I = Spannweite Qty ALK 5/Qty β-actin

Verglichen mit den transfizierten HSC-T6-Zellen entwickelte die hu-TGF $\beta$ -R1-siRNA in den HUH7-Zellen eine wesentlich stärkere Wirkung. Während der maximale Einsatz von 50 nM rat-TGF $\beta$ -R1-siRNA in den HSC-T6-Zellen zu einer Abnahme des TGF $\beta$ -R1 Transkriptes um durchschnittlich höchstens 33 % führte, bewirkte eine vergleichbare Menge von 48 nM hu-TGF $\beta$ -R1-siRNA in den HUH7-Zellen eine mittlere Verminderung des TGF $\beta$ -R1-Amplifikates um ca. 80 % gegenüber der Negativkontrolle. Der Kurvenverlauf des TGF $\beta$ -R1-Transkriptes bezogen auf die Menge der eingesetzten siRNA zeigt in den HUH7-Zellen eine mit steigender Menge der siRNA deutliche Senkung; schon nach Transfektion der Minimaldosis von 3 nM hu-TGF $\beta$ -R1-siRNA sinkt die Transkriptmenge um durchschnittlich 35 %. Derselbe Kurvenverlauf bezogen auf die HSC-T6-Zellen zeigt ebenfalls eine insgesamt stetige Abnahme des TGF $\beta$ -R1-Transkriptlevels, allerdings in geringerem Ausmaß. So führt der vergleichbare Einsatz von 3,4 nM rat-TGF $\beta$ -siRNA zu einer Verminderung des TGF $\beta$ -R1-Transkriptes um durchschnittlich nur 5,5 %.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Ergebnisse dieser Real-Time-PCR die während den Etablierungsversuchen (s. Kap. 4.1) beobachteten Tendenzen bestätigt. Dem entspringt natürlich die Frage nach den Ursachen für die geringere Effektivität der siRNA in den HSC-T6-Zellen und nach den Wegen, die Effektivität der siRNA-Wirkung in beiden Zellarten zu steigern.

## 5. Diskussion

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass durch die Transfektion der ausgewählten TGF $\beta$ -R1-siRNA-Sequenzen in Zellen der Linien HUH7 und HSC-T6 die TGF $\beta$ -R1-mRNA-Expression inhibiert werden kann. Dieser Effekt der RNA-Interferenz war in den verschiedenen Zellarten unterschiedlich stark ausgeprägt.

### 5.1. RNA-Interferenz durch Transfektion von Zellen der Linien HUH7 und HSC-T6 mit TGF $\beta$ -R1-siRNA

Mithilfe von RNA-Interferenz wurde die Expression des fibrogenen und antiregenerativen TGF $\beta$ -R1-Rezeptors (ALK 5) in epithelialen Leberzellen und aktivierten mesenchymalen Hepatischen Sternzellen gehemmt. Durch die Transfektion von TGF $\beta$ -R1-siRNA in epitheliale Zellen der Linie HUH7 konnte eine starke Reduktion der TGF $\beta$ -R1-mRNA um bis zu durchschnittlich 80 % erreicht werden. Die mesenchymalen Zellen der Linie HSC-T6 beantworteten die Transfektion von TGF $\beta$ -R1-siRNA mit einer Verminderung der TGF $\beta$ -R1-Transkriptmenge im Mittel um bis zu 33 %. In beiden Zelllinien fand sich eine deutliche Dosisabhängigkeit der TGF $\beta$ -R1-Expression von der Menge der eingesetzten TGF $\beta$ -R1-siRNA. Die Inhibierung des TGF $\beta$ -R1-Transkriptlevels war in den HUH7-Zellen bei vergleichbarem Mengeneinsatz an siRNA hingegen deutlich größer als in den HSC-T6-Zellen. Die möglichen Ursachen für den erheblichen Unterschied der Wirkungseffizienz der eingesetzten siRNA in HUH7- und HSC-T6-Zellen sind vielfältig.

Zunächst stellt sich die Frage nach der Transfektionseffizienz der siRNA, denn laut *Tuschl et al.* sind geringe Transfektionseffizienzen die häufigste limitierende Ursache für Experimente mit RNA-Interferenz [46, 92].

Die inhibierende Wirkung der siRNA ist in den beiden Zelllinien grundsätzlich vorhanden und stellt sich in der graphischen Auswertung der RT-PCR dar (s. Abb. 17 u. 18). Der entscheidende Unterschied liegt in der Ausprägung des Inhibierungseffektes. Die geringere Effizienz der siRNA in den HSC-T6-Zellen

gegenüber den HUH7-Zellen könnte also durch eine geringere Menge wirksamer siRNA im Zytoplasma der HSC-T6-Zellen verursacht sein. Als Grund hierfür wäre eine zelltypspezifische schlechtere Transfektionseffizienz der HSC-T6-Zellen verglichen mit der HUH7-Zelllinie denkbar, denn neben den spezifischen Zellkulturbedingungen, wie der geeigneten Passagenummer und der Zellkonfluenz (s. Herstellerprotokoll) hängt die erreichbare Transfektionseffizienz maßgeblich vom Zelltyp selbst ab [46]. In der Literatur findet sich weitverbreitet die Erfahrung, dass primäre Hepatische Sternzellen - wie primäre und differenzierte Zellen überhaupt - regelmäßig nur sehr geringe Transfektionsraten erfahren [74, 100]. Nach *XU et al.* liegt die Transfektionseffizienz primärer Hepatischer Sternzellen typischerweise unter 1 % [102]. Über die Transfezierbarkeit speziell der hier verwendeten Zelllinie HSC-T6, liegen keine Erfahrungsberichte vor, jedoch ist es vorstellbar, dass auch diese von primären Hepatischen Sternzellen abstammenden Zellen [97] *per se* schwer zu transfezieren sein könnten.

Dafür spricht auch der myofibroblastisch-aktivierte Phänotyp kultivierter HSC-T6-Zellen [97], denn die starke Produktion extrazellulärer Matrix dieser Zellen führt zur mechanischen Abschirmung der bindegewebig eingebetteten Zellen gegen das Transfektionsmittel [100].

Weiter spielt die Proliferationsrate der Zelllinie eine wichtige Rolle im Hinblick auf ihre Transfezierbarkeit, da eine hohe Proliferationsrate regelhaft mit einer hohen Transfektionseffizienz assoziiert zu sein scheint [100]. Die in dieser Arbeit verwendeten immortalisierten HSC-T6-Zellen weisen allerdings eine sehr hohe Proliferationsrate auf.

Ebenfalls zur Beeinträchtigung der Transfektionseffizienz könnte die konstitutionelle Fragilität der HSC-T6 Zellen im Vergleich zu den HUH7-Zellen beigetragen haben. Diese Fragilität der HSC-T6-Zellen, die während der durchgeführten Transfektionen beobachtet wurde, ist bereits bei den primären murinen HSC-Zellen aufgefallen [100]. Unterstützt wird diese These auch durch eine Arbeit von *S. Spagnou et al.*, die zeigen konnten, dass das verwendete Transfektionsmittel Lipofectamine2000 in den benötigten Dosen zytotoxisch wirkt [89]. Um das bekannte Problem der zelltyp-, zeitpunkt- und methodenabhängigen Transfektionseffizienz differenzierter Zellen zu umgehen, richtet sich in letzter Zeit das Interesse immer mehr auf virale Vektorsysteme, die

durch Infektion der Zellen die Auslieferung von siRNA und anderen RNA-Oligonukleotiden in Zellen *in vitro* sowie *in vivo* bewerkstelligen [5, 6, 100]. Mithilfe eines adenoviralen Vektorsystems, das ein CMV/EGFP-Transgen enthielt, erreichte die Gruppe *Weiskirchen et al.* sowohl in kultivierten primären Hepatischen Sternzellen der Ratte als auch in den davon abstammenden aktivierten Myofibroblasten eine Infektionseffizienz von 100 % gegenüber einer Transfektionseffizienz von nur 6 bzw. 0 % mit chemischen Transfektionsmethoden [100]. Diese Ergebnisse erscheinen vielversprechend auch für die adenovirale Transfektion von (TGF $\beta$ -R1-)siRNA in Myofibroblasten.

Eine andere Erklärung für die relativ zu den HUH7-Zellen geringere Effizienz der siRNA in den Zellen der Linie HSC-T6 könnte sich in Stoffwechselunterschieden der beiden Zelllinien finden. Ein erhöhter Umsatz der siRNA bzw. eine höhere Aktivität von zellulären RNAsen in den HSC-T6-Zellen würde zu einer Effektivitätsminderung der TGF $\beta$ -R1-siRNA beitragen. Allerdings gelten siRNAs im Vergleich mit Antisense-Oligonukleotiden als ausgesprochen langlebig und stabil gegenüber zellulären Nukleasen [9, 94]. Laut *Nesterova et al.* ist der Wirkungsverlust einer siRNA eher durch Verdünnung als durch Degradation bedingt [73]. *Y. Takatabe et al.* beobachteten in eigenen Versuchen eine sehr unterschiedliche Wirkungsdauer der eingesetzten siRNA zwischen einigen Tagen und mehreren Wochen in Abhängigkeit von ihrer Lokalisation. Diese lokalen Unterschiede der Dauer von RNA-Interferenz lassen sich durch die variable Expression von siRNAsen in den unterschiedlichen Zellarten erklären [91]. Auch *Harborth et al.* sehen in zelltypspezifischen Unterschieden der Expression von Proteinen, die mit siRNA interagieren oder an die Ziel-mRNA binden und so die Bildung bzw. die Funktion des RISC-Komplexes beeinträchtigen könnten, eine Ursache für die insgesamt eingeschränkte Effizienz von RNA-Interferenz in bestimmten Zelllinien. Ebenso ist es möglich, dass endogene microRNAs mit den transfizierten siRNAs um Proteine des RISC-Komplexes konkurrieren und so die RNA-Interferenz beeinträchtigen [46].

Des Weiteren könnten auch starke Expressionsunterschiede des TGF $\beta$ -R1 in HUH7- und HSC-T6-Zellen die Unterschiede bei der siRNA-vermittelten Inhibierung der TGF $\beta$ -R1-Transkriptmenge begründen [30, 94]. Die verstärkte Expression des TGF $\beta$ -R1 in aktivierten HSC und Myofibroblasten (wie den

aktivierten HSC-T6) [25, 101] im Vergleich zu den epithelialen HUH7-Zellen könnte dazu führen, dass bei gleicher Einsatzmenge an TGF $\beta$ -R1-siRNA in beiden Zellarten die siRNA in den HSC-T6-Zellen verhältnismäßig weniger TGF $\beta$ -R1-mRNA neutralisieren kann als in den Zellen der Linie HUH7. Demgegenüber steht die Beobachtung, dass RNA-Interferenz mittels siRNA eine extrem effiziente Methode zur postranskriptionellen Genstilllegung ist. Schon beim Einsatz geringster siRNA-Molaritäten kann eine starke und spezifische Wirkung erzielt werden [20]. So fanden auch *Elbashir et al.* nach Transfektionen verschiedener Säugetierzelllinien mit siRNA unterschiedlicher Molaritäten, dass 25 nM siRNA eine ebenso gute inhibitorische Wirkung erzielten wie 1,5 nM siRNA, und dass eine Steigerung der siRNA-Konzentration auf 100 nM keine Steigerung der Wirksamkeit der siRNA bewirkte, dabei aber eine nachlassende Transfektionseffizienz zu beobachten war [30]. Die in der vorgelegten Arbeit etablierte Transfektion von HUH7- und HSC-T6-Zellen mit TGF $\beta$ -R1-siRNA in Molaritäten zwischen 0 und 50 nM zeigte hingegen eine stetige Steigerung der siRNA-Effektivität mit der Erhöhung der transfizierten siRNA-Konzentration. Die größte inhibitorische Wirkung in den HUH7-Zellen fand sich dabei auch bereits nach der Transfektion einer Minimaldosis von 3 nM siRNA. Dies konnte mit den HSC-T6-Zellen jedoch nicht nachvollzogen werden konnte. Insgesamt ergeben sich daher aus der in Abbildung 17 und 18 vorgestellten siRNA-Dosis-Abhängigkeit Hinweise darauf, dass unterschiedliche Zieltranskriptmengen das Resultat der RNA-Interferenz beeinflussen könnten.

Nicht nur das Transfektionsmittel Lipofectamine2000, auch die siRNA selbst kann in hohen Konzentrationen eine zytotoxische Wirkung entfalten. *S. Spagnou et al.* stellten 2004 fest, dass die eingesetzte siRNA ab einer Dosis von mehr als 30 nM zur Ablösung der verwendeten HeLa- und IGROV1-Zellen von der Kulturplatte führte. Die Transfektion von 150 nM siRNA zog in dieser Studie außerdem erhebliche unspezifische Effekte auf die Genregulation der Zellen nach sich [89]. Unspezifische Hoch – und Herunterregulation der Expression zellulärer Gene, die keinerlei Homologien zu der eingesetzten siRNA aufwiesen, sogenannte *Off-Target*-Aktivitäten, beobachteten auch *S. Persengiev et al.* nach der Transfektion von mehr als 20 nM einer hochspezifischen siRNA [78]. Das genaue Ausmaß der *Off-target*-Aktivität ist

noch unklar, allerdings weisen die genannten Arbeiten darauf hin, dass sie durch die Minimierung der eingesetzten siRNA-Mengen reduziert werden kann [50, 51, 78, 89]. Aufgrund der hohen Wirksamkeit der RNA-Interferenz bereits bei äußerst geringen Dosierungen, kann der als kritisch bzgl. der Spezifität beurteilte Mengenbereich jedoch leicht vermieden werden. In der vorgelegten Arbeit wurden TGF $\beta$ -R1-siRNA-Molaritäten zwischen 1,7 und 50,2 nM eingesetzt, so dass in der maximalen Konzentration trotz der hohen Spezifität der ausgewählten siRNA-Sequenzen *Off-Target*-Aktivitäten auftreten konnten. Neben der schon genannten Toxizität und geringeren Spezifität in höheren Konzentrationen beeinflussen auch ihre strukturellen Eigenschaften die Wirksamkeit einer siRNA. Bei der Auswahl der siRNA-Sequenzen wurden die aktuell gängigen strukturellen Anforderungen an siRNAs zugrundegelegt (s. Kap. 3.5.). Neben der geforderten hohen Spezifität der Sequenzen wurde auf ihre vergleichbare Lage auf der humanen bzw. murinen mRNA geachtet und Basenwiederholungen sowie andere Sekundärstrukturen möglichst vermieden. Allerdings wird die Annahme, dass die Zugänglichkeit der Zielsequenz einer siRNA durch Sekundärstrukturen oder assoziierte Proteine eingeschränkt werden könnte [30], in jüngster Zeit vermehrt angezweifelt. So halten *Harborth et al.* die Sekundärstrukturen der siRNA-Zielsequenz für nicht sehr relevant im Hinblick auf die Effektivität einer siRNA-Sequenz. Sie sind der Meinung, dass eher die der siRNA assoziierten Proteine zur Behinderung der RNA-Interferenz führen könnten als die Zugänglichkeit der Zielsequenz selbst [45]. In Versuchen mit siRNAs gleicher Sequenz, die gegen homologe murine bzw. humane Sequenzabschnitte mit unterschiedlicher Sekundärstruktur gerichtet waren, zeigte sich trotz der unterschiedlichen Sekundärstrukturen kein wesentlicher Unterschied in der Effizienz der siRNAs. Des Weiteren konnte die Verschiebung einer siRNA-Sequenz um 1 bp bereits eine deutliche Veränderung der Wirksamkeit der Sequenz verursachen, so dass bei der Untersuchung der Regeln von RNA-Interferenz eher von der Struktur der siRNA selbst als von der Zielsequenz ausgegangen werden muss [46]. Die genauen Regeln der Interferenzeffizienz von siRNAs sind noch ungeklärt und so kann die Wirksamkeit einer gewissen Sequenz noch nicht vorhergesagt werden, sondern muß empirisch erprobt werden [45, 50]. Eine Beeinträchtigung der RNA-Interferenz in den HSC-T6-Zellen im Vergleich zu den HUH7-Zellen aufgrund

struktureller Unterschiede der sehr ähnlichen, aber nicht ganz homologen siRNA-Sequenzen kann daher nicht ausgeschlossen werden.

## **5.2. Inhibierung der TGF $\beta$ -Signaltransduktion durch Reduktion der TGF $\beta$ -R1-Expression mithilfe einer siRNA**

In der vorliegenden Arbeit wurde siRNA gegen den TGF $\beta$ -R1 eingesetzt und so mittels RNA-Interferenz die Expression des Rezeptors im leberspezifischen Zellkultursystem bestehend aus Hepatischen Sternzellen der Linie HSC-T6 sowie Leberepithelzellen der Linie HUH7 supprimiert.

TGF $\beta$  ist aufgrund seines matrixinduzierenden, profibrogenen Einflusses auf mesenchymale Zellen u.a. ein zentraler Mediator der Leberfibrose (s. Kap. 1.3. u. 1.4.) [37]. Die Transdifferenzierung von Hepatischen Sternzellen zu Myofibroblasten führt dabei durch die verstärkte Bildung extrazellulärer Matrixproteine sowie deren verminderten Abbau zum fibrotischen Umbau des Lebergewebes. Neben der fibrogenen übt TGF $\beta$  auch eine antiproliferative Wirkung auf die epithelialen Leberzellen aus und wirkt so der Leberregeneration entgegen (s. Kap. 1.4.) [5, 6, 40]. Die Beeinflussung der TGF $\beta$ -Funktion ist daher ein vielversprechender und viel bearbeiteter Ansatz zum Studium und der Therapie TGF $\beta$ -assoziiierter Wirkungen und Erkrankungen, hier im Besonderen der Leberfibrose bzw. -zirrhose.

In den letzten Jahren wurden zahlreiche molekularbiologische und genetische Methoden zur effektiven Hemmung der TGF $\beta$ -Wirkung auf verschiedenen Ebenen in unterschiedlichen Zellen und mit verschiedenen Ansatzpunkten entwickelt. In Ansätzen mit Antikörpern gegen TGF $\beta$  sowie andere TGF $\beta$ -bindende Proteine wird das Zytokin bereits extrazellulär abgefangen und so eine Aktivierung der TGF $\beta$ -Rezeptoren auf der Zelloberfläche verhindert. Durch die Unterbrechung des profibrogenen Signals konnten so verschiedene Arbeitsgruppen die Akkumulation von Extrazellulärmatrix bei der Nierenfibrose im Tierversuch hemmen [5, 35, 56]. *H. Kondou et al.* zeigten, dass auch das Leu-Ser-Lys-Leu (LSKL) -Peptid, welches vom Latency-Associated (LAP) -Peptid abstammt, durch molekulares Mimikry mit der Bindungsstelle des LAP

an TGF $\beta$ 1 die Aktivierung von latentem TGF $\beta$ 1 verhindert und so die Entwicklung einer Leberfibrose im DMN-Modell an Ratten hemmt [54]. Einen ähnlichen Ansatzpunkt hat der Protease-Inhibitor *Camostat Mesilate*, der die proteolytische Aktivierung von latentem TGF $\beta$  behindert [77].

Auch einige endogen vorkommende Moleküle wie z.B. die HtrA1-Serinprotease [76], das Alpha2-Macroglobulin [83] und das Proteoglykan Decorin [12, 56] weisen TGF $\beta$ -bindende Eigenschaften auf und können zur Supprimierung der TGF $\beta$ -Wirkung und der damit verbundenen Matrixakkumulation eingesetzt werden.

Neben den Ansätzen, die TGF $\beta$ -Rezeptoraktivierung zu inhibieren, wurde direkt in die Signalkaskade von TGF $\beta$  eingegriffen, um eine fibrosehemmende Wirkung zu erzielen. So verhindern z. B. Kinaseinhibitoren die TGF $\beta$ -Signaltransduktion durch die Ausschaltung bestimmter, intrazellulärer Kinasen. *SB 431542* zum Beispiel ist ein wirkungsvoller und spezifischer Inhibitor der TGF $\beta$ -Signaltransduktion, indem er die Aktivierung der Smads durch die ALK's 4, 5 und 7 verhindert [17, 68]. Ebenso auf Smad-Ebene wirkt das Antioxidans *Nordihydroguaiaretic Acid*, welches die Phosphorylierung und dadurch die Translokation von Smad2 in den Nukleus behindert [58]. *Laping et al.* hingegen erzielten eine effektive Hemmung der TGF $\beta$ -induzierten Bildung von Extrazellulärmatrix durch die Intervention des MAP-Kinase-Signalweges mithilfe von *SB-202190*, einem Inhibitor der p38-MAP-Kinaseaktivität [56]. Die aus der Pharmakologie bekannten Wirkstoffe *Candesartan* (AT1-Rezeptorblocker) und *Perindopril* (ACE-Hemmer), beides Modulatoren der AngiotensinII-Typ1-Rezeptorinteraktion, mildern im Rattenmodell signifikant die Fibroseentwicklung durch den Verlust der AngiotensinII-induzierten TGF $\beta$ -mRNA-Expression in aktivierten HSC [93, 103]. Auch *Imatinib Mesylate*, ein Hemmstoff der c-Abl-Kinase, welche durch TGF $\beta$  stimuliert wird und unabhängig von PDGF oder Smad2/3 zur Fibroblastenaktivierung führt, bewirkt eine Inhibierung der ECM-Genexpression, der morphologischen Transformation sowie der Proliferation von Fibroblasten. Im Mausmodell konnte so die Entwicklung einer durch Bleomycin induzierten Lungenfibrose deutlich abgeschwächt werden [21].

Der Ansatz der vorliegenden Arbeit möchte zur Untersuchung der Grundlagen von RNA-Interferenz im Einsatz zur Kontrolle der fibrogenen TGF $\beta$ -Signaltransduktion beitragen. Genetischen Methoden und deren gentherapeu-

tischem Potential wurde in den letzten Jahren vermehrte Aufmerksamkeit zuteil. Vielfaches Interesse richtete sich dabei – wie auch in der vorliegenden Arbeit – auf die genetische Modulation der TGF $\beta$ -Rezeptoren, welche von zentraler Bedeutung bei der Vermittlung der TGF $\beta$ -Wirkungen sind (s. Kap. 1.5.). Auch TGF $\beta$  selbst, die Smad-Proteine, die MAP-Kinasen, sowie die posttranskriptionellen Regulationsfaktoren der Kollagen- $\alpha$ 1(I)-Expression waren Ziele interessanter sowie effektiver Methoden zur molekulargenetischen Regulation der TGF $\beta$ -Wirkung. Ähnlich dem hier vorgestellten Ansatz, die Expression des TGF $\beta$ -R1 zu hemmen, wurde in der Vergangenheit mit spezifischen Antisense-Oligonukleotiden zur Regulation der TGF $\beta$ -Expression experimentiert. Die Arbeitsgruppe um *Merrilees et al.* konnten im Jahr 2000 mithilfe eines Antisense-Oligonukleotids den Anstieg der TGF $\beta$ -mRNA in der Neointima der A. carotis von Ratten nach einer Ballon-Katheter-Verletzung reduzieren und so die Synthese und Akkumulation von Matrixproteoglykanen und die darauf folgende Verdickung der Intima abschwächen [67].

Mithilfe der adenoviralen Expression einer dominant-negativ-wirkenden TGF $\beta$ -R2-Deletionsmutante konnten *Nakamura et al.* die Progression der Leberfibrose in DMN-behandelten Ratten verhindern. Im Gegensatz zur Kontrollgruppe überlebten die behandelten Ratten die Versuchsdauer. Die elektronenmikroskopische Untersuchung ihrer Leber zeigte eine im Vergleich zur Kontrollgruppe geringere extrazelluläre Matrixakkumulation, regenerierte Hepatozyten und ruhende Itozellen [70]. In einer ähnlichen Arbeit kamen *Zeh Qui et al.* 1999 zu dem Ergebnis, dass die adenoviral vermittelte lokale Expression eines dominant negativen TGF $\beta$ -R2 eine DMN-induzierte Leberfibrose in Ratten verhindern und die Leberfunktion erhalten kann [79]. Die Arbeitsgruppe um *Ueno et al.* erzielte eine solche Wirkung durch die adenovirale Expression eines löslichen TGF $\beta$ -R2. Dieser lösliche TGF $\beta$ -R2 war mindestens drei Wochen im Blut der DMN-behandelten Ratten nachweisbar und verhinderte die Leberfibrose und –dysfunktion wahrscheinlich durch die bereits *in vitro* gezeigte Blockade der TGF $\beta$ -Signaltransduktion [95]. Einen adenoviralen Expressionsvektor machten sich auch *Arias et al.* zunutze, um mithilfe einer Antisense-mRNA gegen TGF $\beta$ 1 die fibrogene Aktivität kultivierter Hepatischer Sternzellen sowie die durch eine Gallengangsligatur in Ratten induzierte Leberfibrose zu verhindern [5, 6]. *Nakoa et al.* setzen an der

intrazellulären Übertragung des TGF $\beta$ -Signals durch Smad-Proteine an. Sie konnten zeigen, dass die adenovirale Überexpression des inhibitorisch auf Smad2 und 3 wirkenden Smad7 die Entwicklung einer Bleomycin-induzierten Lungenfibrose in Mäusen verhindert [71]. Auch die dominant negative Expression der MAP-Kinase 3 zeigte Wirkung bei der Verhinderung der TGF $\beta$ -induzierten Akkumulation extrazellulärer Matrix [56]. Die Gruppe *Stefanovic et al.* machte sich dagegen das Prinzip des molekularen Mimikry zunutze, um eine starke Supprimierung der Kollagen-Alpha1(I)-Expression zu induzieren. Sie benutzten einen adenoviralen Expressionsvektor, um die posttranskriptionellen Aktivierungsfaktoren der Kollagen $\alpha$ 1-mRNA-Expression durch die Imitation des 5'stem-loops - ihrer Bindungsstruktur an der Kollagen-Alpha1(I)-mRNA - zu neutralisieren [90].

In der vorliegenden Arbeit richtete sich das Interesse auf die siRNA vermittelte Inhibierung der TGF $\beta$ -Signaltransduktion durch die posttranskriptionelle Supprimierung des TGF $\beta$ -R1. Laut *J. Massagué et al.* ist die TGF $\beta$ -Rezeptoraktivierung der gemeinsame Mittelpunkt der TGF $\beta$ -Signalvermittlung [65, 66] (vgl. Abb. 4, 6 u. 7). Auf der extrazellulären Seite wird die Ligandenbindung an den Rezeptor und so auch das Signal selbst durch vielfältige Konstellationen wie z.B. die Ligandenkonzentration, Regulationsproteine der Liganden und Rezeptoren sowie verschiedene Rezeptorkombinationen, -verteilungen und -ratios bestimmt. Auf der intrazellulären Seite sind die TGF $\beta$ -Signalweitergabe und -verarbeitung u.a. über Smad-Proteine und die MAP-Kinasen in zahlreichen kontextabhängigen Regulationskreisen ebenfalls dicht verwoben und weit verzweigt. Gemeinsam zugrunde liegt der TGF $\beta$ -Signaltransduktion von extra- nach intrazellulär das Prinzip der Ligandenbindung an einen TGF $\beta$ -R2 / R1-Rezeptorkomplex, in dem der TGF $\beta$ -R2 den TGF $\beta$ -R1 aktiviert, welcher das Signal über verschiedene intrazelluläre Kaskaden weiterleitet (s. Kap. 1.5. u. Abb. 4, 5, 6 u.7) [16, 24, 63-66, 86, 101]. Der dabei vorherrschende TGF $\beta$ -R1-Typ ist die ALK 5, aber auch ALK 1 und 2 können am TGF $\beta$ -R2 / R1-Komplex beteiligt sein und z.T. antagonistische zelluläre Antworten vermitteln [16, 56]. Dem TGF $\beta$ -R2 / R1(ALK 5)-Komplex kommt eine Schlüsselposition bei der Vermittlung der profibrogenen TGF $\beta$ -Wirkung zu und die Hemmung dieses Komplexes hat sich auch in vorausgehenden Arbeiten - wie z.T. bereits dargestellt - als effektiv bei der

Inhibierung der Fibrogenese erwiesen. So konnten *Jiang et al.* 2004 nach der Blockade der TGF $\beta$ -R1 und -R2 durch rekombinante Antisense-Plasmide eine gleichmäßige signifikante Verminderung des mRNA- und Proteinexpressionsniveaus beider Rezeptoren sowie eine Hemmung der experimentellen Leberfibrose im Rattenmodell feststellen [52].

Über die isolierte Supprimierung des TGF $\beta$ -R1 / ALK 5, wie in der vorliegenden Arbeit, gibt es in der bisherigen Literatur keine Erfahrungsberichte. Aufgrund der zentralen Rolle des TGF $\beta$ -R1 / ALK 5 als Nadelohr der TGF $\beta$ -Signalweiterleitung bietet sie weitere Möglichkeiten zum differenzierten Studium der TGF $\beta$ -Signalwege und -wirkungen u.a. im Hinblick auf fibrotische Prozesse wie der Leberfibrose und deren Therapie. Die Methode der RNA-Interferenz bietet sich dabei an als eine hoch effiziente und spezifische, robuste und vielseitig anwendbare Methode der posttranskriptionellen Supprimierung der Genexpression [9, 27, 30, 41, 46, 73, 94]. Gegenüber den schon länger bekannten und auch therapeutisch weiter etablierten Ansätzen mit Antisense-Oligonukleotiden oder Ribozymen zeichnet sich die Angehensweise mit siRNAs durch eine größere Wirksamkeit und geringere benötigte Mengen aus [9, 30, 41, 73]. Auch können Antisense-Oligonukleotide unspezifische Effekte nach sich ziehen, besonders ihre Affinität zu zellulären Proteinen schafft laut S. Spagnou Probleme bei der Anwendbarkeit und Ergebnisinterpretation [89]. Allerdings wurden in den letzten Jahren – wie bereits im ersten Diskussionsteil (s. Kap. 5.1) dargestellt - auch bei der Anwendung von siRNAs unspezifische und toxische Wirkungen, sog. *Off-Target*-Aktivitäten beobachtet, deren Ausmaß noch ungeklärt ist. Dazu zählen auch neuere Berichte über die Aktivierung des zellulären Interferonsystems durch siRNAs [13, 87]. Durch den Einsatz minimaler Mengen der hocheffizienten siRNA könnten *Off-Target*-Aktivitäten vermieden bzw. reduziert werden [50, 51, 78, 89]. Beweisend für die Spezifität einer siRNA können jedoch nur breite Analysen wie MicroArrays oder Proteomic Screens sein [50]. Weitere Vorteile von siRNAs gegenüber Antisense-Oligonukleotiden sind ihre Langlebigkeit und Stabilität gegenüber der Degradation durch zelluläre Nukleasen [9, 94]. Der Wirkungsverlust einer siRNA ist laut *Nesterova et al.* eher durch Verdünnung als durch Degradation bedingt [73]. *Y. Takatabe et al.* berichten diesbezüglich von einem Wiederanstieg der Spiegel eines durch RNA-Interferenz inhibierten Proteins

fünf bis sieben Tage nach der Transfektion einer siRNA. In eigenen *in vivo* Experimenten in der Niere von Ratten beobachteten sie eine Wirkungsdauer von GFP-siRNA sowie einer vektorexprimierten siRNA gegen GFP von zwei Wochen und sogar von über 90 Tagen im *M. tibialis anterior*. Diese lokalen Unterschiede der Dauer von RNA-Interferenz lassen sich durch die variable Expression von siRNAsen in den unterschiedlichen Zellarten erklären [91].

Angesichts einer längerdauernden Wirkung von siRNAs tauchen Fragen nach einer Sensibilisierung und Kompensationsmechanismen der Zelle für das supprimierte Protein und einem dadurch bedingten Wirkungsverlust der siRNA auf, sowie anderen Langzeiteffekten von RNA-Interferenz wie z.B. Selektionsvorteilen nicht supprimierter Zellen [50]. Langzeit-Anwendungen von RNA-Interferenz werden Aufschluss darüber geben.

Aus den dargestellten Gründen scheint man sich in der Literatur insgesamt weitgehend darüber einig und zuversichtlich zu sein, dass die Entdeckung und Entwicklung der RNA-Interferenz mittels siRNA vielversprechende Möglichkeiten bei der Analyse von Genfunktionen sowie der Entwicklung neuer Medikamente und therapeutischer Strategien gegen eine Vielzahl von Erkrankungen eröffnet. Dabei erfordert die Methode allerdings weiterführende Forschungen und Strategien im Hinblick auf ihre gezielte Effektivität, ihre Spezifität und ihre Sicherheit [4, 44, 72, 98].

Auch in dieser Arbeit bestätigte sich die Effektivität der Methode; es zeigten sich allerdings auch Schwierigkeiten, wie im ersten Diskussionsenteil näher erörtert. Durch den Einsatz einer einzigen siRNA konnte eine maximale Verminderung des TGF $\beta$ -R1-Transkriptes um 80 % in HUH7-Zellen erreicht werden. In den HSC-T6-Zellen wurde eine max. Verminderung um 33 % bewirkt (vgl. Abb. 17 u. 18, Kap. 4.3.2.). Um die Wirkung der siRNA in den unterschiedlichen Leberzellen genauer nachvollziehen und beweisen zu können, sind weitere Versuche von Nöten, die die Verminderung des TGF $\beta$ -R1-Proteins sowie deren funktionelle Auswirkungen darstellen [50].

Erfahrungen mit RNA-Interferenz an Elementen der TGF $\beta$ -Signaltransduktion im Rahmen der Leberfibrose sind zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht in der Literatur auffindbar. In der Niere jedoch hat die Arbeitsgruppe um Y. Takabatake den Einsatz von siRNA gegen TGF $\beta$ 1 im Rattenmodell der experimentellen Glomerulonephritis erprobt [91]. Zunächst konnten sie in

Versuchen an kultivierten Mesangialzellen zeigen, dass synthetische siRNA die Luciferase-Transgenexpression spezifisch und sehr effektiv im Vergleich zu einem gleichgerichteten Antisense-Oligodesoxynukleotid, nämlich 1000 fach wirksamer, hemmen konnte. Auch *in vivo* fand sich nach der elektroporetischen Cotransfektion von Luciferase-exprimierenden Plasmiden und Luciferase-siRNA in die Nieren der Ratten in eine 70 %ige Verminderung der glomerulären Luciferase-Expression im Vergleich zur Negativkontrolle. Im Rattenmodell einer experimentellen Glomerulonephritis bewirkte die Injektion von TGF $\beta$ 1-siRNA in die Nierenarterie der Tiere eine deutliche Verminderung der glomerulären TGF $\beta$ 1-mRNA- und Proteinexpression, wodurch die ECM-Überproduktion im Rahmen der experimentellen Glomerulonephritis gehemmt wurde. Weiterführend wurde eine shRNA gegen dieselbe TGF $\beta$ 1-Sequenz in ein Expressionsvektorsystem integriert und zeigte *in vitro* wie *in vivo* eine ebenso effektiv verminderte TGF $\beta$ 1-Expression der glomerulären Zellen.

Die Alteration eines Genes zieht Veränderungen des gesamten Zellstoffwechsels nach sich [73]. Um das gesamte Wirkungsfeld der in dieser Arbeit eingesetzten siRNAs zu erschließen und weitere Erkenntnisse zur TGF $\beta$ -Signaltransduktion und -wirkung sowie zur antifibrogenen und evtl. therapeutischen Wirkung dieser Sequenzen zu gewinnen, sind zahlreiche *in vitro* wie *in vivo* Versuche notwendig. Von entscheidender Bedeutung ist dabei zunächst die Entwicklung einer zuverlässigen, stabilen und effektiven Transfektions- und auch dauerhaften Expressionsmethode der siRNA in den Versuchszellen und –tieren. Ein entscheidender Vorteil der siRNAs ist, dass sie durch virale Vektoren exprimiert werden können. Diese Methode erlaubt die endogene und voraussichtlich lokalspezifische Expression der Sequenzen in den Zielzellen und überwindet die bereits geschilderte Transfektionsproblematik. Erfahrungen auf diesem Gebiet konnte bereits die Arbeitsgruppe um A. Gressner / R. Weiskirchen sammeln, die mithilfe eines adenoviralen Vektorsystems, das eine Antisense-mRNA gegen TGF $\beta$ 1 exprimiert, eine Infektionseffizienz von 100 % der kultivierten primären Hepatischen Sternzellen sowie davon abstammenden aktivierten Myofibroblasten erreichten [100]. In weiterführenden Versuchen gelang ihnen u.a. die Suppression der direkt TGF $\beta$ 1-induzierten fibrogenen Markerproteine Kollagen- und  $\alpha$ -Smooth-Muscle-Actin sowohl *in vitro* als auch im Rattenmodell der beginnenden Leberfibrose *in vivo* [5, 6]. Dies sind

interessante Entwicklungen auf der Suche nach geeigneten und effizienten gentechnischen Therapiemöglichkeiten pathologischer fibrotischer Prozesse. Fortgeschrittene fibrotische Erkrankungen erfordern weitere Therapieansätze, z.B. solche zur Förderung der Leberregeneration und des Matrixabbaus. Die Physiologie und Regulation der Wirkungen von TGF $\beta$  wirft auch im Hinblick auf die damit verbundenen therapeutischen Möglichkeiten noch Fragen auf. Die Modifikation der TGF $\beta$ -Signaltransduktion durch die siRNA-vermittelte Inhibierung des TGF $\beta$ -R1 ist ein vielversprechender Beitrag zur Beantwortung einiger dieser Fragen und verlangt weitere Aufmerksamkeit.



## 6. Zusammenfassung

Transforming Growth Factor beta (TGF $\beta$ ) ist aufgrund seines matrixinduzierenden, fibrogenen Einflusses auf mesenchymale Zellen ein zentraler Mediator der Leberfibrose. Neben der fibrogenen Funktion übt TGF $\beta$  eine antiproliferative Wirkung auf die epithelialen Leberzellen aus und wirkt so leberregenerierenden Prozessen entgegen. Angesichts der Schlüsselfunktion des TGF $\beta$ -Rezeptors1 in der fibrogenetischen TGF $\beta$ -Signaltransduktion und der vielseitigen Anwendbarkeit von siRNAs erscheint die Entwicklung und Anwendung einer siRNA gegen diese zentrale Struktur der TGF $\beta$ -Signaltransduktion als ein interessanter Ansatzpunkt sowohl zum Studium der TGF $\beta$ -Funktion als auch zur Entwicklung spezifischer antifibrotischer Therapiekonzepte.

Das Ziel dieser Arbeit war die Hemmung der TGF $\beta$ -Signalwirkung durch die RNA-Interferenz-vermittelte Inhibierung der TGF $\beta$ -Rezeptor1-Expression im leberspezifischen Zellkultursystem mesenchymaler (HSC-T6) und epithelialer Zellen (HUH7).

Das Ergebnis dieser Arbeit zeigt, dass die Transfektion von siRNA gegen den TGF $\beta$ -Rezeptor1 in HUH7- und HSC-T6-Zellen eine dosisabhängige Hemmung der Genexpression des TGF $\beta$ -Rezeptor1 bewirkt. Beim Einsatz von 50 nM siRNA kam es zu einer 80 %igen Verminderung der TGF $\beta$ -Rezeptor1-Expression in epithelialen humanen Hepatomazellen (HUH7). In den mesenchymalen Hepatischen Sternzellen (HSC-T6) hingegen wurde die TGF $\beta$ -Rezeptor1-Expression zwar ebenfalls deutlich reduziert, allerdings war der Effekt im Vergleich zu den inhibierten HUH7-Zellen wesentlich geringer ausgeprägt, wofür u.a. eine geringere Transfektionseffizienz in den HSC-T6-Zellen als Ursache in Frage käme. Das Ergebnis dieser Arbeit erlaubt die Schlussfolgerung, dass die siRNA vermittelte posttranskriptionelle Inhibierung der TGF $\beta$ -Rezeptor1-Expression eine weitere Möglichkeit eröffnet, die Wirkung der TGF $\beta$ -Signaltransduktion zu hemmen und schafft so neue Ansatzpunkte für die zukünftige Erforschung TGF $\beta$ -vermittelter fibrotischer Prozesse *in vitro* wie *in vivo*.



## 7. Literaturverzeichnis

- [1] [http://www.ambion.com/techlib/guides/Ambion\\_RNAi\\_res.pdf](http://www.ambion.com/techlib/guides/Ambion_RNAi_res.pdf).
- [2] <http://www.pubmed.de/data/nlm.link.html>, NCBI.
- [3] Albanis, E. and S.L. Friedman, *Hepatic fibrosis. Pathogenesis and principles of therapy*. Clin Liver Dis, 2001. 5(2): p. 315-34, v-vi.
- [4] Alisky, J.M. and B.L. Davidson, *Towards therapy using RNA interference*. Am J Pharmacogenomics, 2004. 4(1): p. 45-51.
- [5] Arias, M., B. Lahme, E. Van de Leur, A.M. Gressner, and R. Weiskirchen, *Adenoviral delivery of an antisense RNA complementary to the 3' coding sequence of transforming growth factor-beta1 inhibits fibrogenic activities of hepatic stellate cells*. Cell Growth Differ, 2002. 13(6): p. 265-73.
- [6] Arias, M., S. Sauer-Lehnen, J. Treptau, N. Janoschek, I. Theuerkauf, R. Buettner, A.M. Gressner, and R. Weiskirchen, *Adenoviral expression of a transforming growth factor-beta1 antisense mRNA is effective in preventing liver fibrosis in bile-duct ligated rats*. BMC Gastroenterol, 2003. 3(1): p. 29.
- [7] Bataller, R. and D.A. Brenner, *Liver fibrosis*. J Clin Invest, 2005. 115(2): p. 209-18.
- [8] Bernstein, E., A.A. Caudy, S.M. Hammond, and G.J. Hannon, *Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference*. Nature, 2001. 409(6818): p. 363-6.
- [9] Bertrand, J.R., M. Pottier, A. Vekris, P. Opolon, A. Maksimenko, and C. Malvy, *Comparison of antisense oligonucleotides and siRNAs in cell culture and in vivo*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. 296(4): p. 1000-4.
- [10] Biosystems, P.A., *User Bulletin#2, ABI PRISM 7700 Sequence Detection System*. December 11, 1997.
- [11] Bohula, E.A., A.J. Salisbury, M. Sohail, M.P. Playford, J. Riedemann, E.M. Southern, and V.M. Macaulay, *The efficacy of small interfering RNAs targeted to the type 1 insulin-like growth factor receptor (IGF1R) is influenced by secondary structure in the IGF1R transcript*. J Biol Chem, 2003. 278(18): p. 15991-7.
- [12] Border, W.A., N.A. Noble, T. Yamamoto, J.R. Harper, Y. Yamaguchi, M.D. Piersbacher, and E. Ruoslahti, *Natural inhibitor of transforming growth factor-beta protects against scarring in experimental kidney disease*. Nature, 1992. 360(6402): p. 361-4.

- [13] Bridge, A.J., S. Pebernard, A. Ducraux, A.L. Nicoulaz, and R. Iggo, *Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells*. Nat Genet, 2003. 34(3): p. 263-4.
- [14] Brummelkamp, T.R., R. Bernards, and R. Agami, *Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference*. Cancer Cell, 2002. 2(3): p. 243-7.
- [15] Brunt, E.M., *Nonalcoholic steatohepatitis*. Semin Liver Dis, 2004. 24(1): p. 3-20.
- [16] Byfield, S.D. and A.B. Roberts, *Lateral signaling enhances TGF-beta response complexity*. Trends Cell Biol, 2004. 14(3): p. 107-11.
- [17] Callahan, J.F., J.L. Burgess, J.A. Fornwald, L.M. Gaster, J.D. Harling, F.P. Harrington, J. Heer, C. Kwon, R. Lehr, A. Mathur, B.A. Olson, J. Weinstock, and N.J. Laping, *Identification of novel inhibitors of the transforming growth factor beta1 (TGF-beta1) type 1 receptor (ALK5)*. J Med Chem, 2002. 45(5): p. 999-1001.
- [18] Chen, M.H., J.C. Chen, C.C. Tsai, W.C. Wang, D.C. Chang, C.C. Lin, and H.Y. Hsieh, *Sho-saiko-to prevents liver fibrosis induced by bile duct ligation in rats*. Am J Chin Med, 2004. 32(2): p. 195-207.
- [19] Chen, M.H., J.C. Chen, C.C. Tsai, W.C. Wang, D.C. Chang, D.G. Tu, and H.Y. Hsieh, *The role of TGF-beta 1 and cytokines in the modulation of liver fibrosis by Sho-saiko-to in rat's bile duct ligated model*. J Ethnopharmacol, 2005. 97(1): p. 7-13.
- [20] Chi, J.T., H.Y. Chang, N.N. Wang, D.S. Chang, N. Dunphy, and P.O. Brown, *Genomewide view of gene silencing by small interfering RNAs*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(11): p. 6343-6.
- [21] Daniels, C.E., M.C. Wilkes, M. Edens, T.J. Kottom, S.J. Murphy, A.H. Limper, and E.B. Leof, *Imatinib mesylate inhibits the profibrogenic activity of TGF-beta and prevents bleomycin-mediated lung fibrosis*. J Clin Invest, 2004. 114(9): p. 1308-16.
- [22] Denk, H., *32.8 Folgezustände von Lebererkrankungen*, in *Pathologie*, D. Böcker, Heitz, Editor. 2001, Urban & Fischer. p. 726 - 729.
- [23] Denk, H., *32.1 Anatomische und physiologische Vorbemerkungen*, in *Pathologie*, D. Böcker, Heitz, Editor. 2001, Urban & Fischer. p. 702 - 703.
- [24] Derynck, R. and Y.E. Zhang, *Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling*. Nature, 2003. 425(6958): p. 577-84.
- [25] Dooley, S., B. Delvoux, B. Lahme, K. Mangasser-Stephan, and A.M. Gressner, *Modulation of transforming growth factor beta response and*

- signaling during transdifferentiation of rat hepatic stellate cells to myofibroblasts*. Hepatology, 2000. 31(5): p. 1094-106.
- [26] Drenckhahn D., F.D., Fleischhauer K., *12.9 Leber und Gallenblase*, in *Benninghoff Anatomie*, Z.W. Drenckhahn D., Editor. 1994. p. 901 - 925.
- [27] Elbashir, S.M., W. Lendeckel, and T. Tuschl, *RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs*. Genes Dev, 2001. 15(2): p. 188-200.
- [28] Elbashir, S.M., J. Harborth, K. Weber, and T. Tuschl, *Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs*. Methods, 2002. 26(2): p. 199-213.
- [29] Elbashir, S.M., J. Martinez, A. Patkaniowska, W. Lendeckel, and T. Tuschl, *Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in Drosophila melanogaster embryo lysate*. Embo J, 2001. 20(23): p. 6877-88.
- [30] Elbashir, S.M., J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, and T. Tuschl, *Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells*. Nature, 2001. 411(6836): p. 494-8.
- [31] Fire, A., S. Xu, M.K. Montgomery, S.A. Kostas, S.E. Driver, and C.C. Mello, *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans*. Nature, 1998. 391(6669): p. 806-11.
- [32] Friedman, S.L., *Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies*. N Engl J Med, 1993. 328(25): p. 1828-35.
- [33] Friedman, S.L., *Molecular mechanisms of hepatic fibrosis and principles of therapy*. J Gastroenterol, 1997. 32(3): p. 424-30.
- [34] Friedman, S.L., *Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury*. J Biol Chem, 2000. 275(4): p. 2247-50.
- [35] Fukasawa, H., T. Yamamoto, H. Suzuki, A. Togawa, N. Ohashi, Y. Fujigaki, C. Uchida, M. Aoki, M. Hosono, M. Kitagawa, and A. Hishida, *Treatment with anti-TGF-beta antibody ameliorates chronic progressive nephritis by inhibiting Smad/TGF-beta signaling*. Kidney Int, 2004. 65(1): p. 63-74.
- [36] Gabele, E., D.A. Brenner, and R.A. Rippe, *Liver fibrosis: signals leading to the amplification of the fibrogenic hepatic stellate cell*. Front Biosci, 2003. 8: p. d69-77.
- [37] Gressner, A.M., *Cytokines and cellular crosstalk involved in the activation of fat-storing cells*. J Hepatol, 1995. 22(2 Suppl): p. 28-36.

- [38] Gressner, A.M., *Transdifferentiation of hepatic stellate cells (Ito cells) to myofibroblasts: a key event in hepatic fibrogenesis*. *Kidney Int Suppl*, 1996. 54: p. S39-45.
- [39] Gressner, A.M., *The cell biology of liver fibrogenesis - an imbalance of proliferation, growth arrest and apoptosis of myofibroblasts*. *Cell Tissue Res*, 1998. 292(3): p. 447-52.
- [40] Gressner, A.M., R. Weiskirchen, K. Breitkopf, and S. Dooley, *Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis*. *Front Biosci*, 2002. 7: p. d793-807.
- [41] Grunweller, A., E. Wyszko, B. Bieber, R. Jahnel, V.A. Erdmann, and J. Kurreck, *Comparison of different antisense strategies in mammalian cells using locked nucleic acids, 2'-O-methyl RNA, phosphorothioates and small interfering RNA*. *Nucleic Acids Res*, 2003. 31(12): p. 3185-93.
- [42] Hammond, S.M., E. Bernstein, D. Beach, and G.J. Hannon, *An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells*. *Nature*, 2000. 404(6775): p. 293-6.
- [43] Hannon, G.J., *RNA interference*. *Nature*, 2002. 418(6894): p. 244-51.
- [44] Hannon, G.J. and J.J. Rossi, *Unlocking the potential of the human genome with RNA interference*. *Nature*, 2004. 431(7006): p. 371-8.
- [45] Harborth, J., S.M. Elbashir, K. Bechert, T. Tuschl, and K. Weber, *Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs*. *J Cell Sci*, 2001. 114(Pt 24): p. 4557-65.
- [46] Harborth, J., S.M. Elbashir, K. Vandeburgh, H. Manninga, S.A. Scaringe, K. Weber, and T. Tuschl, *Sequence, chemical, and structural variation of small interfering RNAs and short hairpin RNAs and the effect on mammalian gene silencing*. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 2003. 13(2): p. 83-105.
- [47] Herold, G., *Leberzirrhose*, in *Innere Medizin*. 2005.
- [48] Hsu, Y.C., Y.L. Lin, Y.T. Chiu, M.S. Shiao, C.Y. Lee, and Y.T. Huang, *Antifibrotic effects of Salvia miltiorrhiza on dimethylnitrosamine-intoxicated rats*. *J Biomed Sci*, 2005. 12(1): p. 185-95.
- [49] Hu, P.P., M.B. Datto, and X.F. Wang, *Molecular mechanisms of transforming growth factor-beta signaling*. *Endocr Rev*, 1998. 19(3): p. 349-63.
- [50] Huppi, K., S.E. Martin, and N.J. Caplen, *Defining and assaying RNAi in mammalian cells*. *Mol Cell*, 2005. 17(1): p. 1-10.
- [51] Jackson, A.L., S.R. Bartz, J. Schelter, S.V. Kobayashi, J. Burchard, M. Mao, B. Li, G. Cavet, and P.S. Linsley, *Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi*. *Nat Biotechnol*, 2003. 21(6): p. 635-7.

- [52] Jiang, W., C.Q. Yang, W.B. Liu, Y.Q. Wang, B.M. He, and J.Y. Wang, *Blockage of transforming growth factor beta receptors prevents progression of pig serum-induced rat liver fibrosis*. World J Gastroenterol, 2004. 10(11): p. 1634-8.
- [53] Kitabwalla, M. and R.M. Ruprecht, *RNA interference-a new weapon against HIV and beyond*. N Engl J Med, 2002. 347(17): p. 1364-7.
- [54] Kondou, H., S. Mushiake, Y. Etani, Y. Miyoshi, T. Michigami, and K. Ozono, *A blocking peptide for transforming growth factor-beta1 activation prevents hepatic fibrosis in vivo*. J Hepatol, 2003. 39(5): p. 742-8.
- [55] Kretschmer-Kazemi Far, R. and G. Sczakiel, *The activity of siRNA in mammalian cells is related to structural target accessibility: a comparison with antisense oligonucleotides*. Nucleic Acids Res, 2003. 31(15): p. 4417-24.
- [56] Laping, N.J., *ALK5 inhibition in renal disease*. Curr Opin Pharmacol, 2003. 3(2): p. 204-8.
- [57] Lauth, W.W. and C.V. Greenway, *Conceptual review of the hepatic vascular bed*. Hepatology, 1987. 7(5): p. 952-63.
- [58] Lee, C.H., Y.S. Jang, S.J. Her, Y.M. Moon, S.J. Baek, and T. Eling, *Nordihydroguaiaretic acid, an antioxidant, inhibits transforming growth factor-beta activity through the inhibition of Smad signaling pathway*. Exp Cell Res, 2003. 289(2): p. 335-41.
- [59] Li, D. and S.L. Friedman, *Liver fibrogenesis and the role of hepatic stellate cells: new insights and prospects for therapy*. J Gastroenterol Hepatol, 1999. 14(7): p. 618-33.
- [60] Ludwig, J., T.R. Viggiano, D.B. McGill, and B.J. Oh, *Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease*. Mayo Clin Proc, 1980. 55(7): p. 434-8.
- [61] Marra, F., *Hepatic stellate cells and the regulation of liver inflammation*. J Hepatol, 1999. 31(6): p. 1120-30.
- [62] Massague, J., *The transforming growth factor-beta family*. Annu Rev Cell Biol, 1990. 6: p. 597-641.
- [63] Massague, J., *TGF-beta signal transduction*. Annu Rev Biochem, 1998. 67: p. 753-91.
- [64] Massague, J. and D. Wotton, *Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system*. Embo J, 2000. 19(8): p. 1745-54.
- [65] Massague, J. and Y.G. Chen, *Controlling TGF-beta signaling*. Genes Dev, 2000. 14(6): p. 627-44.

- [66] Massague, J., S.W. Blain, and R.S. Lo, *TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders*. Cell, 2000. 103(2): p. 295-309.
- [67] Merrilees, M., B. Beaumont, L. Scott, V. Hermanutz, and P. Fennessy, *Effect of TGF-beta(1) antisense S-oligonucleotide on synthesis and accumulation of matrix proteoglycans in balloon catheter-injured neointima of rabbit carotid arteries*. J Vasc Res, 2000. 37(1): p. 50-60.
- [68] Mori, Y., W. Ishida, S. Bhattacharyya, Y. Li, L.C. Plataniias, and J. Varga, *Selective inhibition of activin receptor-like kinase 5 signaling blocks profibrotic transforming growth factor beta responses in skin fibroblasts*. Arthritis Rheum, 2004. 50(12): p. 4008-21.
- [69] Nakabayashi, H., K. Taketa, K. Miyano, T. Yamane, and J. Sato, *Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium*. Cancer Res, 1982. 42(9): p. 3858-63.
- [70] Nakamura, T., R. Sakata, T. Ueno, M. Sata, and H. Ueno, *Inhibition of transforming growth factor beta prevents progression of liver fibrosis and enhances hepatocyte regeneration in dimethylnitrosamine-treated rats*. Hepatology, 2000. 32(2): p. 247-55.
- [71] Nakao, A., M. Fujii, R. Matsumura, K. Kumano, Y. Saito, K. Miyazono, and I. Iwamoto, *Transient gene transfer and expression of Smad7 prevents bleomycin-induced lung fibrosis in mice*. J Clin Invest, 1999. 104(1): p. 5-11.
- [72] Nakata, Y., T.K. Kim, S. Shetzline, and A.M. Gewirtz, *Nucleic acid modulation of gene expression: approaches for nucleic acid therapeutics against cancer*. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 2005. 15(2): p. 163-82.
- [73] Nesterova, M. and Y.S. Cho-Chung, *Killing the messenger: antisense DNA and siRNA*. Curr Drug Targets, 2004. 5(8): p. 683-9.
- [74] Nicholson, L.J., M. Philippe, A.J. Paine, D.A. Mann, and C.T. Dolphin, *RNA interference mediated in human primary cells via recombinant baculoviral vectors*. Mol Ther, 2005. 11(4): p. 638-44.
- [75] Oberthür, C.A., *Expression der Smad-Proteine in Hepatischen Sternzellen während der myofibroblastischen Transdifferenzierung*, in *Zentrum für Pathologie der Universität zu Köln, Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie*. 2001, Universität zu Köln: Köln. p. 1 - 91.
- [76] Oka, C., R. Tsujimoto, M. Kajikawa, K. Koshiba-Takeuchi, J. Ina, M. Yano, A. Tsuchiya, Y. Ueta, A. Soma, H. Kanda, M. Matsumoto, and M. Kawaichi, *HtrA1 serine protease inhibits signaling mediated by Tgfbeta family proteins*. Development, 2004. 131(5): p. 1041-53.
- [77] Okuno, M., K. Akita, H. Moriwaki, N. Kawada, K. Ikeda, K. Kaneda, Y. Suzuki, and S. Kojima, *Prevention of rat hepatic fibrosis by the protease*

- inhibitor, camostat mesilate, via reduced generation of active TGF-beta. Gastroenterology, 2001. 120(7): p. 1784-800.*
- [78] Persengiev, S.P., X. Zhu, and M.R. Green, *Nonspecific, concentration-dependent stimulation and repression of mammalian gene expression by small interfering RNAs (siRNAs)*. *Rna*, 2004. 10(1): p. 12-8.
- [79] Qi, Z., N. Atsuchi, A. Ooshima, A. Takeshita, and H. Ueno, *Blockade of type beta transforming growth factor signaling prevents liver fibrosis and dysfunction in the rat*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(5): p. 2345-9.
- [80] Raymond T.Chung, D.K.P., Herbert Lochs, *Leberzirrhose und ihre Komplikationen*, in *Harrisons Innere Medizin*, J.D. Manfred Detel, Norbert Suttorp, Editor.
- [81] Sakaida, I., K. Hironaka, T. Kimura, S. Terai, T. Yamasaki, and K. Okita, *Herbal medicine Sho-saiko-to (TJ-9) increases expression matrix metalloproteinases (MMPs) with reduced expression of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) in rat stellate cell*. *Life Sci*, 2004. 74(18): p. 2251-63.
- [82] Sato, M., S. Suzuki, and H. Senoo, *Hepatic stellate cells: unique characteristics in cell biology and phenotype*. *Cell Struct Funct*, 2003. 28(2): p. 105-12.
- [83] Schuftan, G.G. and M.G. Bachem, *Alpha2-macroglobulin reduces paracrine- and autocrine-stimulated matrix synthesis of cultured rat hepatic stellate cells*. *Eur J Clin Invest*, 1999. 29(6): p. 519-28.
- [84] Sharp, P.A., *RNA interference-2001*. *Genes Dev*, 2001. 15(5): p. 485-90.
- [85] Shek, F.W. and R.C. Benyon, *How can transforming growth factor beta be targeted usefully to combat liver fibrosis?* *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2004. 16(2): p. 123-6.
- [86] Shi, Y. and J. Massague, *Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus*. *Cell*, 2003. 113(6): p. 685-700.
- [87] Sledz, C.A., M. Holko, M.J. de Veer, R.H. Silverman, and B.R. Williams, *Activation of the interferon system by short-interfering RNAs*. *Nat Cell Biol*, 2003. 5(9): p. 834-9.
- [88] Song, E., S.K. Lee, J. Wang, N. Ince, N. Ouyang, J. Min, J. Chen, P. Shankar, and J. Lieberman, *RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis*. *Nat Med*, 2003. 9(3): p. 347-51.
- [89] Spagnou, S., A.D. Miller, and M. Keller, *Lipidic carriers of siRNA: differences in the formulation, cellular uptake, and delivery with plasmid DNA*. *Biochemistry*, 2004. 43(42): p. 13348-56.

- [90] Stefanovic, B., B. Schnabl, and D.A. Brenner, *Inhibition of collagen alpha 1(I) expression by the 5' stem-loop as a molecular decoy*. J Biol Chem, 2002. 277(20): p. 18229-37.
- [91] Takabatake, Y., Y. Isaka, M. Mizui, H. Kawachi, F. Shimizu, T. Ito, M. Hori, and E. Imai, *Exploring RNA interference as a therapeutic strategy for renal disease*. Gene Ther, 2005. 12(12): p. 965-73.
- [92] Tom Tuschl, S.E., Jens Harborth, Klaus Weber, *The siRNA user guide (revised May 6, 2004)*  
<http://www.rockefeller.edu/labheads/tuschl/sirna.html>. 2004, TUSCHL LAB.
- [93] Tox, U. and H.M. Steffen, *Impact of inhibitors of the Renin-Angiotensin-aldosterone system on liver fibrosis and portal hypertension*. Curr Med Chem, 2006. 13(30): p. 3649-61.
- [94] Tuschl, T. and A. Borkhardt, *Small interfering RNAs: a revolutionary tool for the analysis of gene function and gene therapy*. Mol Interv, 2002. 2(3): p. 158-67.
- [95] Ueno, H., T. Sakamoto, T. Nakamura, Z. Qi, N. Astuchi, A. Takeshita, K. Shimizu, and H. Ohashi, *A soluble transforming growth factor beta receptor expressed in muscle prevents liver fibrogenesis and dysfunction in rats*. Hum Gene Ther, 2000. 11(1): p. 33-42.
- [96] Vickers, T.A., S. Koo, C.F. Bennett, S.T. Crooke, N.M. Dean, and B.F. Baker, *Efficient reduction of target RNAs by small interfering RNA and RNase H-dependent antisense agents. A comparative analysis*. J Biol Chem, 2003. 278(9): p. 7108-18.
- [97] Vogel, S., R. Piantedosi, J. Frank, A. Lalazar, D.C. Rockey, S.L. Friedman, and W.S. Blaner, *An immortalized rat liver stellate cell line (HSC-T6): a new cell model for the study of retinoid metabolism in vitro*. J Lipid Res, 2000. 41(6): p. 882-93.
- [98] Wall, N.R. and Y. Shi, *Small RNA: can RNA interference be exploited for therapy?* Lancet, 2003. 362(9393): p. 1401-3.
- [99] Wasser, S., J.M. Ho, H.K. Ang, and C.E. Tan, *Salvia miltiorrhiza reduces experimentally-induced hepatic fibrosis in rats*. J Hepatol, 1998. 29(5): p. 760-71.
- [100] Weiskirchen, R., J. Kneifel, S. Weiskirchen, E. van de Leur, D. Kunz, and A.M. Gressner, *Comparative evaluation of gene delivery devices in primary cultures of rat hepatic stellate cells and rat myofibroblasts*. BMC Cell Biol, 2000. 1(1): p. 4.
- [101] Wells, R.G., *Fibrogenesis. V. TGF-beta signaling pathways*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2000. 279(5): p. G845-50.

- [102] 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, *Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis*. Gut, 2005. 54(1): p. 142-51.
- [103] Yoshiji, H., S. Kuriyama, J. Yoshii, Y. Ikenaka, R. Noguchi, T. Nakatani, H. Tsujinoue, and H. Fukui, *Angiotensin-II type 1 receptor interaction is a major regulator for liver fibrosis development in rats*. Hepatology, 2001. 34(4 Pt 1): p. 745-50.
- [104] Zamore, P.D., T. Tuschl, P.A. Sharp, and D.P. Bartel, *RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals*. Cell, 2000. 101(1): p. 25-33.
- [105] Zender, L., S. Hutker, C. Liedtke, H.L. Tillmann, S. Zender, B. Mundt, M. Waltemathe, T. Gosling, P. Flemming, N.P. Malek, C. Trautwein, M.P. Manns, F. Kuhnel, and S. Kubicka, *Caspase 8 small interfering RNA prevents acute liver failure in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(13): p. 7797-802.



## 8. Erklärung zu Vorabveröffentlichung von Ergebnissen

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden bereits in Form von Postern und einer Kurzfassung (Abstract) auf der 21. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber (GASL) in Ulm (1/2005) und dem Symposium der French and German Connective Tissue Societies in Köln (First Joint Meeting of French and German Connective Tissue Societies, 2005) veröffentlicht. Die Kurzfassung wurde veröffentlicht unter:

2005 Maurer J, Lohfink D, Wallraf J, Dienes HP und Odenthal M.  
*Hemmung der Signalwirkung von Transforming Growth Factor  $\beta$  durch RNA-Interferenz.* Zeitschrift Z Gastroenterol 43, 2005.



## **9. Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus Gründen des Datenschutzes in der elektronischen Fassung meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

