

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

---

**Etablierung eines adenoviralen Vektorsystems  
zur spezifischen Genmanipulation von  
Myofibroblasten**

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

**vorgelegt von**

**Julia Hirschfeld geb. Wallraf  
aus Essen**

**Promoviert am 21. Oktober 2009**

Gedruckt mit Genehmigung  
der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln  
2009

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 14. Februar 2007

Julia Hirschfeld geb. Wallraf



Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimente sind nach entsprechender  
Anleitung durch Frau Priv.-Doz. 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.

Ganz besonders möchte ich Frau Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Margarete Odenthal für ihre sehr motivierende persönliche Einarbeitung, ihre geduldige und professionelle Vermittlung von Fachwissen und ständige Hilfsbereitschaft sowie vor allem für ihre ausgesprochen herzliche Betreuung und Begleitung meiner Arbeit danken.

Frau Margarete Odenthal ist mir durch ihre engagierte Art, wissenschaftlich zu arbeiten und Projekte zu leiten sowie auch durch ihren warmherzigen Umgang mit ihren Mitmenschen in vielerlei Hinsicht zum Vorbild geworden. Ich habe die Zusammenarbeit mit ihr und den Mitgliedern ihrer Arbeitsgruppe sehr genossen.

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. J. Fries danke ich für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung bei den Versuchen mit Mesangialzellen sowie für die anregenden interessanten Gespräche.

Des Weiteren gilt mein besonderer Dank Frau Melanie Scheffler, außerdem Frau Tanja Roth, Frau Priv.-Doz. Dr. med. U. Protzer, Frau Daniela Lohfink, Frau Elli Kühnen, Frau Marion Müller und Herrn Dr. med. André Oberthür für ihre Unterstützung und Anregungen während meiner Arbeiten am Institut.

Für seine Hilfsbereitschaft bei der Formatierung meiner Dissertation sowie für seine liebevolle Motivation, mit der er mich immer unterstützt hat, möchte ich meinem Mann Henning Hirschfeld danken.

Zuletzt möchte ich meiner lieben Freundin Frau Julia Löytved-Hardegg geb. Maurer für ihre hilfreiche und amüsante Gesellschaft während vieler schöner gemeinsam im Labor verbrachter Stunden danken.



Meinen Eltern gewidmet,  
die mir eine unvergessliche Studienzeit  
ermöglichten.



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Fibrotische Erkrankungen in Leber und Niere .....	1
1.2 Myofibroblasten und ihre Schlüsselrolle im Rahmen der Fibrogenese ....	4
1.3 Die Transdifferenzierung von HSC während der Leberfibrogenese.....	5
1.4 Strategien antifibrotischer Therapien durch genetische Manipulation.....	7
<b>2. Aufgabenstellung .....</b>	<b>10</b>
<b>3. Material und Methoden.....</b>	<b>11</b>
3.1 Allgemeines .....	11
3.2 Klonierungsarbeiten.....	11
3.2.1 Bakterienkultur.....	11
3.2.1.1 Medien, Antibiotika, E. coli Stämme .....	12
3.2.1.2 Herstellung kompetenter E. coli Zellen .....	13
3.2.1.3 Transformation.....	13
3.2.1.4 Lagerung von Bakterienzellen .....	14
3.2.2 Plasmidpräparation.....	14
3.2.2.1 Minipräparation .....	14
3.2.2.2 Midi- und Maxipräparation von Plasmid-DNA .....	15
3.2.2.3 Bestimmung der DNA- und RNA-Konzentration .....	15
3.2.3 Restriktion.....	16
3.2.4 Dimerisierung von Oligonukleotiden .....	16
3.2.5 Ligation.....	17
3.2.6 Gelelektrische Auftrennung von DNA-Fragmenten.....	18
3.2.6.1 Agarosegel.....	18

3. 2. 6. 2	Extraktion von DNA aus Agarosegelen.....	18
3. 3	Zellkultur .....	19
3. 3. 1	Allgemeines .....	19
3. 3. 2	Medien und Lösungen .....	19
3. 3. 3	Zelllinien .....	20
3. 3. 4	Kultivieren und Passagieren der Zellen .....	20
3. 3. 5	Bestimmung der Zellzahl .....	21
3. 3. 6	Kryokonservierung und Auftauen der Zellen.....	21
3. 4	Herstellung von rekombinanten Adenoviren Typ 5 .....	22
3. 4. 1	Rekombination des Shuttle-Vektors mit dem adenoviralen Backbone-Plasmid und Analyse der Rekombinanten.....	22
3. 4. 1. 1	Kotransformation von BJ5183-Zellen.....	22
3. 4. 1. 2	Rekombination mittels Cre Recombinase.....	23
3. 4. 2	Vorbereitung der adenoviralen Rekombinanten für die Transfektion von HEK293-Zellen.....	26
3. 4. 2. 1	Restriktion mit Pac I.....	26
3. 4. 2. 2	Phenol-Extraktion .....	26
3. 4. 3	Gewinnung von rekombinanten Adenoviren aus HEK293-Zellen..	27
3. 4. 3. 1	Transfektion .....	27
3. 4. 3. 2	Expansion und Virenpräparation.....	27
3. 4. 3. 3	Titerbestimmung .....	28
3. 5	Adenovirale Infektion eukaryontischer Zellen .....	28
3. 5. 1	Infektion .....	28
3. 5. 2	Stretching .....	29
3. 5. 3	Microfluidics-basierte zytometrische Reporterfluoreszenzmessung.....	29
3. 5. 4	Zellernte und RNA-Isolierung .....	30
3. 5. 5	Real time PCR.....	30
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>33</b>
4. 1	Herstellung von Adenoviren.....	33
4. 1. 1	Klonierung des Shuttle-Vektors .....	33

4. 1. 2	Rekombination des Shuttle-Vektors mit adenoviralen Sequenzen und Gewinnung adenoviraler pAdSMA-GFP-Vektoren.....	34
4. 1. 3	Titer der hergestellten pAdSMA-GFP-Adenoviren.....	36
4. 2	Zugänglichkeit von Myofibroblasten für adenovirale Infektionen .....	36
4. 3	Myofibroblasten-spezifische Kontrolle der Reporterexpression durch den $\alpha$ -SMA-Promotor.....	40
4. 3. 1	Zelltyp-spezifische Expression des Reporters unter der Kontrolle des $\alpha$ -SMA-Promotors .....	41
4. 3. 2	Differenzierungsabhängige Regulation der Genexpression durch pAdSMA-GFP .....	43
4. 4	Hemmung von TGF- $\beta$ durch RNA-Interferenz .....	45
4. 4. 1	Herstellung des Virus pAdsiAlk5.....	45
4. 4. 2	Infektionsversuche mit pAdsiAlk5 .....	48
<b>5.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>50</b>
5. 1	Genetische Manipulation von myofibroblastischen HSC mit Hilfe von Adenoviren Typ 5 .....	50
5. 2	Adenovirale Expression unter Kontrolle des $\alpha$ -SMA-Promotors .....	53
5. 3	Differenzierungsabhängige Expression von GFP unter Kontrolle des $\alpha$ -SMA-Promotors in humanen Mesangialzellen.....	56
5. 4	Nutzung des adenoviralen Gentransfers zum Einbringen von siRNA in Myofibroblasten .....	58
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>60</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>62</b>
<b>8.</b>	<b>Erklärung zu Vorabveröffentlichung von Ergebnissen .....</b>	<b>78</b>

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
A.	Arteria
Abb.	Abbildung
Alk 5	Activin-like kinase 5
bp	base pair
bzw.	beziehungsweise
cDNA	copy DNA
CMV	Cytomegalievirus
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco`s modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	fetales Kälberserum
g	Gramm
GFP	Green Fluorescent Protein
HPLC	High pressure liquid chromatography
HSC	Hepatic stellate cell
kb	Kilobasen
l	Liter
LB-Medium	Luria Bertanie-Medium
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOI	Multiplicity of Infection

n. b.	nicht bestimmt
nm	Nanometer
PBS	Phosphatgepuffertes Salz
PCR	Polymerase chain reaction
RNA	Ribonukleinsäure
s.	siehe
shRNA	small hairpin RNA
siRNA	short interfering RNA
Tab.	Tabelle
TE-Puffer	TRIS-EDTA-Puffer
TGF- $\beta$	Tissue growth factor $\beta$
TRIS	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
U	Unit (Enzymeinheit)
u.	und
UpM	Umdrehung pro Minute
UV	Ultraviolett
V.	Vena
vgl.	vergleiche
w / v	weight per volume
z. B.	zum Beispiel
$\alpha$ -SMA	alpha-Smooth Muscle Aktin



# 1. Einleitung

## 1.1 Fibrotische Erkrankungen in Leber und Niere

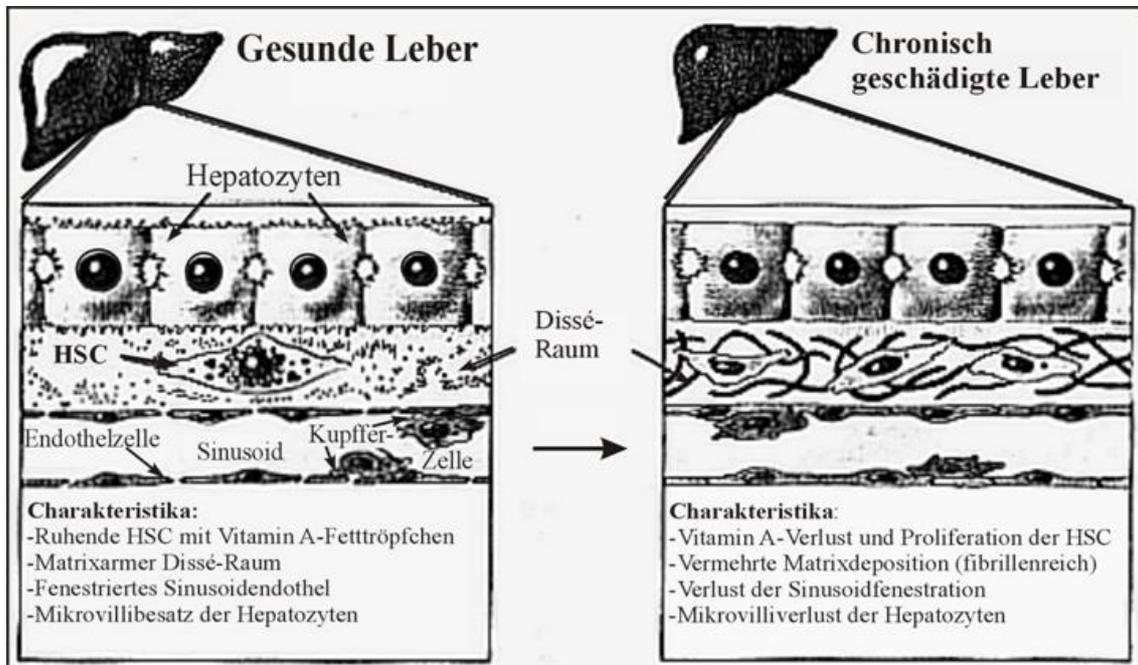
Die Pathogenese fibrotischer Erkrankungen ist durch die Vermehrung von Extrazellulärmatrix, Vernarbungsvorgänge durch Bindegewebevermehrung sowie die morphologische und funktionelle Veränderung sowohl von parenchymalen als auch von mesenchymalen Zellen gekennzeichnet. Dieser Umstrukturierungsprozess in der Gewebearchitektur des betroffenen Organs ist als Reaktion auf eine chronische Organschädigung zu sehen und wird in diversen Geweben beobachtet, darunter befinden sich zum Beispiel Niere, Lunge und Leber [30, 31].

Als Grundlage für die vorliegende Arbeit soll auf fibrotische Prozesse in Leber und Niere eingegangen werden.

Im Falle der Leber steht ätiologisch in den USA und Europa der Alkohol als schädigende Noxe mit ca. 60 % im Vordergrund. Des Weiteren sind chronische Virushepatitiden vom Typ B, C und D in ca. 30 % als Ursache zu sehen sowie andere Einflüsse wie zum Beispiel Autoimmunerkrankungen, hepatotoxische Medikamente und Chemikalien oder Stoffwechselerkrankungen wie der Morbus Wilson [23]. Die Leberfibrose wird als Vorstufe der Leberzirrhose betrachtet, die einen irreversiblen Organumbau mit fortschreitendem Funktionsverlust darstellt [30]. Die Leberzirrhose hat in Europa und den USA eine Inzidenz von 250/100.000/Jahr und geht aufgrund von diversen gravierenden Komplikationen mit einer schlechten Prognose einher [50].

Histopathologisch zeichnet sich die Leberfibrose insbesondere durch Veränderungen im Disse'schen Raum aus, der sich zwischen Hepatozyten und den blutführenden Lebersinusoiden befindet (vgl. Abb. 1). Die Hepatozyten verlieren ihre in den Disse'schen Raum hineinragenden Mikrovilli, die Fenestrierung des Sinusoidendothels nimmt ab, und vor allem durchlaufen die im Disse-Raum ansässigen hepatischen Sternzellen (auch Ito-Zellen, Lipo- oder Perizyten genannt), die in der gesunden Leber etwa 80 % des menschlichen Vitamin-A-Speichers darstellen, eine Transformation, die mit dem Verlust der Vitamin-A-Speicherkapazität, starker Proliferation und gesteigerter Produktion von

Extrazellulärmatrix in Form von Kollagen sowie auch diverser Wachstumsfaktoren und Zytokinen einhergeht (s. Abb. 1) [29].



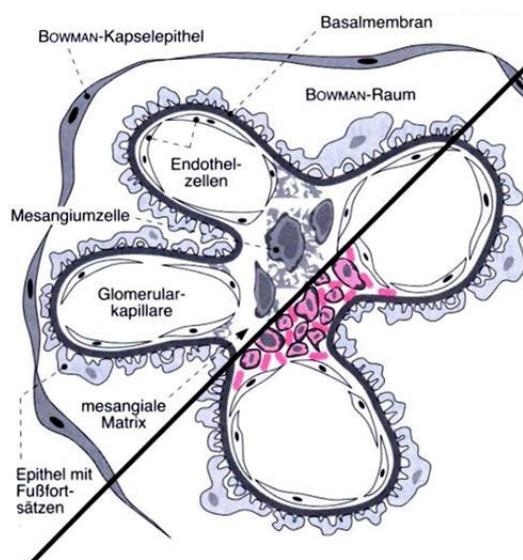
Veränderungen des Leberaufbaus während der Leberfibrose, die vor allem den Dissé'schen Raum betreffen: Aktivierung der HSC mit konsekutiver Veränderung und Verdichtung der Extrazellulärmatrix. Außerdem Verlust von sowohl der Fenestrierung des Sinusoidendothels als auch des Mikrovillibesatzes der Hepatozyten.

**Abb. 1:** Histologische Veränderungen in der Leber im Verlauf der Fibroseentstehung  
(aus: Friedman, S. L. [31] )

Die aktivierten hepatischen Sternzellen (HSC) im Disse'schen Raum verändern ihre Morphologie und wandeln sich in Myofibroblasten um. Myofibroblasten, die Extrazellulärmatrix synthetisieren können, kommt in der Pathogenese der Leberfibrose eine zentrale Bedeutung zu (vgl. Kapitel 1. 2 und 1. 3) [21, 31, 90, 105]. Zusammengenommen verursachen die genannten Veränderungen eine Behinderung des Stoffaustauschs zwischen Hepatozyten und Blut, was einen progredienten Funktionsverlust der Leber zur Folge hat.

Betrachtet man die progressive Nephropathie, so zeigt sich, dass chronische Nierenerkrankungen unabhängig von ihrem Auslöser beziehungsweise ihrer Pathogenese in eine Schädigung der parenchymalen Zellen münden, die mit bindegewebigen Umbauvorgängen, Narbenbildung und schließlich Insuffizienz des Organs einhergehen [8, 92]. Bei verschiedenen Nierenerkrankungen, die

vor allem den Glomerulus betreffen, wie der diabetischen Glomerulosklerose und diversen Glomerulonephritiden, konnte eine Transformation ortsständiger Zellen zu Myofibroblasten beobachtet werden. Im Rahmen glomerulärer Erkrankungen wurden die Mesangialzellen als diejenigen identifiziert, die sich, sei es durch hämodynamische Druckbelastung bei Hypertonus, entzündliche Vorgänge oder durch toxisch wirkende Stoffwechselprodukte wie Glucose beim Diabetiker, zu myofibroblastischen Zellen umwandeln, proliferieren und vermehrt Extrazellulärmatrix sowie Wachstumsfaktoren bilden (s. Abb. 2) [48, 55, 72].



**Abb. 2:** Schematische Darstellung der histologischen Veränderungen im Rahmen fibrotischer Nierenerkrankungen. Schnitt durch einen Glomerulus, der oben links den physiologischen Zustand zeigt und unten rechts myofibroblastisch umgewandelte, aktivierte Mesangialzellen mit Vermehrung und Verdichtung der Extrazellulärmatrix (aus: [13]).

Die Schlüsselrolle des Auftretens myofibroblastischer Zellen im Rahmen progressiver Nierenerkrankungen, die im Endstadium zu Nierenversagen führen, konnte sowohl in experimentellen Modellen als auch in Patientenkollektiven gezeigt werden [25, 97]. Klinisch geht die durch das Auftreten der Myofibroblasten bedingte zunehmende Sklerosierung und Matrixanreicherung mit fortschreitendem Funktionsverlust der Niere auf glomerulärer Ebene einher.

## 1.2 Myofibroblasten und ihre Schlüsselrolle im Rahmen der Fibrogenese

Ortsständige mesenchymale Zellen, die sich unter dem Einfluss chronischer Schädigung zu myofibroblastischen Zellen umwandeln, nehmen eine Schlüsselrolle in der Fibrogenese ein.

Myofibroblasten sind Zellen, die sowohl Eigenschaften von Fibroblasten als auch von glatten Muskelzellen aufweisen [35, 44]. Ihr Zytoskelett zeichnet sich durch eine heterogene Intermediärfilamentstruktur aus, wobei Sappino et al. vier Haupttypen (a)-(d) unterschieden haben, die folgende Strukturproteine exprimieren: (a) Vimentin, (b) Vimentin und Desmin, (c) Vimentin und  $\alpha$ -Smooth Muscle Aktin ( $\alpha$ -SMA) und (d) Vimentin, Desmin und  $\alpha$ -SMA [103]. Die Expression von Desmin unterscheidet Myofibroblasten von glatten Muskelzellen, mit denen sie die Expression von Vimentin und  $\alpha$ -SMA gemeinsam haben. Das  $\alpha$ -SMA verleiht ihnen die Fähigkeit zur Kontraktilität. Die Ähnlichkeit mit Fibroblasten zeigt sich in der Eigenschaft, Extrazellulärmatrix zu bilden [20, 90].

In der Charakterisierung von Myofibroblasten hat sich  $\alpha$ -SMA als der am besten geeignete Marker herausgestellt. Insbesondere da seine Expression die „Aktivierung“ der Zelle widerspiegelt - sofern es sich um mesenchymale Zellen handelt, die zum Beispiel aufgrund einer Schädigung eine Transformation zum myofibroblastischen Zelltyp durchmachen - ist er sehr nützlich, um den Ablauf der Fibrogenese zu untersuchen [19, 21, 29, 90, 98]. Es konnte gezeigt werden, dass bestimmte Abschnitte des  $\alpha$ -SMA-Promotors in der Lage sind, Myofibroblasten gezielt anzusprechen [58, 59, 63]. Dies eröffnet einen therapeutisch nutzbaren Weg, Myofibroblasten genetisch zu manipulieren.

Myofibroblasten treten ebenfalls temporär im Rahmen der Wundheilung auf, wo sie hauptverantwortlich für die Kollagensynthese und Kontraktion der Wunde sind. Nach Abschluss der Narbenbildung verschwinden sie oder gehen in eine ruhende Form über,  $\alpha$ -SMA ist nicht länger nachweisbar [19]. Anders verhält es sich bei chronischen Vernarbungsprozessen wie verschiedenen Fibroseerkrankungen. Hier sind Myofibroblasten dauerhaft nachweisbar und stellen zum Beispiel bei fibrosierenden Lungen-, Nieren- und Lebererkrankungen die

Hauptmatrixproduzenten dar [22, 35, 56, 61, 72, 90]. Während in der normalen Wundheilung Fibroblasten als Ursprungszellen der Myofibroblasten betrachtet werden, konnten in den verschiedenen Organfibrosen - wie zum Beispiel in Leber und Niere (s. o.) - spezifische mesenchymale Zellen als Vorläuferzellen identifiziert werden [30, 53, 56, 90, 99].

### **1.3 Die Transdifferenzierung von HSC während der Leberfibrogenese**

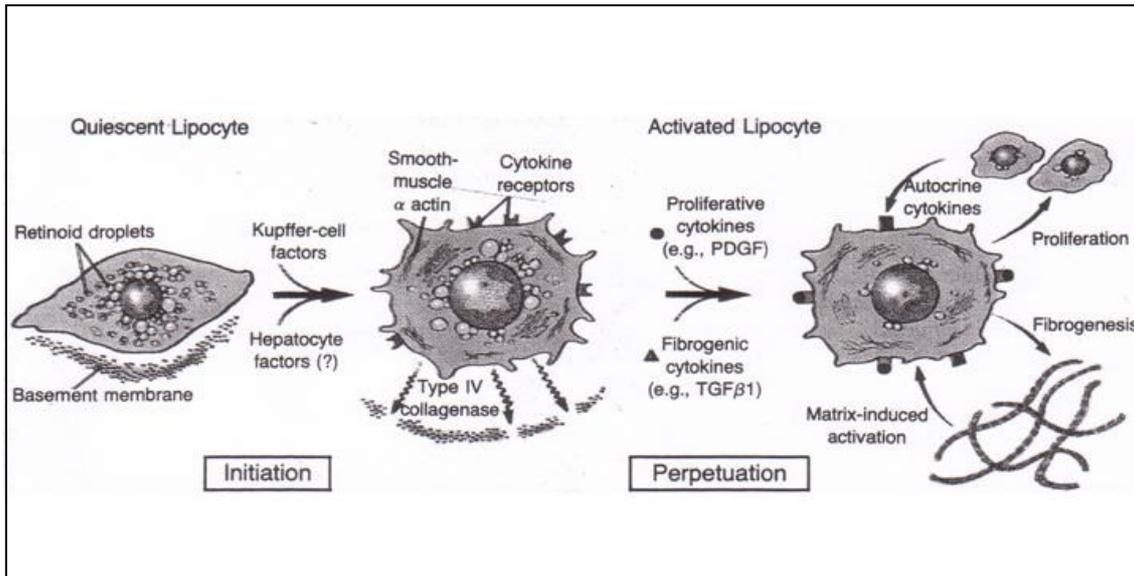
Der Mechanismus der "Aktivierung" oder Initiation dieser Transdifferenzierung war und ist seit Jahren Gegenstand intensiver Forschung. Am Beispiel der Leberfibrose soll hier näher darauf eingegangen werden.

Friedman hat für die Transdifferenzierung der hepatischen Sternzelle (HSC) ein zweistufiges Schema entwickelt. Hier beschreibt er die Phase der „Initiation“, in der die HSC ihren Phänotyp und Rezeptorstatus ändert und dadurch empfangsbereit für Mediatoren, Wachstumsfaktoren und Zytokine wird, die in der Phase der „Perpetuation“ ihre Wirkung entfalten [29, 31]. Die Einteilung in diese zwei Phasen erscheint etwas konstruiert, trägt aber zum Verständnis der komplexen Veränderungen im Laufe der myofibroblastischen Differenzierung bei.

Als auslösender Mechanismus werden diverse parakrine und endokrine Stimuli angesehen. So scheinen zum Beispiel hepatische Makrophagen (Kupferzellen) einen aktivierenden Effekt auf HSC zu haben und können die Initiation in Gang setzen [3, 32, 57]. Des Weiteren werden Effekte durch Entzündungsmediatoren wie Interleukine [29], PDGF und TGF- $\beta$  (teils von den Makrophagen sezerniert) [30, 39-41] sowie Einflüsse von Hepatozyten [42], Lymphozyten und Thrombozyten [4] für den Beginn der Transdifferenzierung verantwortlich gemacht.

Die Initiation kennzeichnet sich im folgenden durch Zellproliferation beziehungsweise -vergrößerung, die Expression von  $\alpha$ -SMA sowie die Induktion verschiedener Zytokinrezeptoren. Darüber hinaus geht die Differenzierung mit einer Reduktion der Lipidspeichertröpfchen sowie der frühzeitigen Veränderung

der Extrazellulärmatrix durch Sekretion von Kollagenase IV einher (s. Abb. 3) [31].



**Abb. 3:** Modell der Aktivierung von HSC zu Myofibroblasten (aus: Friedman, S. L. [31])

Im Rahmen der Perpetuation erlangen die aktivierten HSC vollends ihre myofibroblastischen Eigenschaften. Funktionell werden sechs Ereignisse beziehungsweise Eigenschaften beschrieben (s. Abb. 3):

- Proliferation
- Kontraktilität
- Fibrogenese
- Zytokinfreisetzung
- Matrixproteasenfreesetzung/-aktivität
- Retinoidverlust

Die genannten Veränderungen werden verschiedenen Mediatoren zugeschrieben. Im Gegensatz zur Initiation, in der parakrine Einflüsse die Hauptrolle spielen, werden bei der Perpetuation auch autokrine Stimuli bedeutender [29]. Entscheidend für die Fibrogenese in diesem Zusammenhang ist die Wirkung des Mediators TGF- $\beta$  [5, 31, 43, 64, 73, 74], der initial von Nachbarzellen, im Laufe der Transdifferenzierung aber auch von den aktivierten HSC selbst sezerniert wird und den Mechanismus der Fibroseentwicklung unterhält.

Es gibt bereits *In vitro*- und *In vivo*-Untersuchungen, die zeigen, dass die Hemmung des TGF- $\beta$ -Effekts auf aktivierte HSC die fibrogene Aktivität deutlich herabsetzt. Dies wurde beispielsweise durch die Gabe von Antikörpern gegen TGF- $\beta$  [86], die Induktion eines löslichen TGF- $\beta$ -Rezeptors Typ II, der sezerniertes TGF- $\beta$  binden kann [18], oder durch Transduktion von Antisense-RNA, welche komplementär zu Abschnitten des TGF- $\beta$ -Rezeptors Typ I ist [1, 2], erreicht.

#### **1.4 Strategien antifibrotischer Therapien durch genetische Manipulation**

Betrachtet man die Therapieoptionen, die zur Behandlung fibrotischer Erkrankungen wie der Leberfibrose beziehungsweise –zirrhose zur Verfügung stehen, muss man feststellen, dass keine davon ein antifibrotisches Konzept darstellt, sondern sie sich entweder gegen die Noxe richten, die den Stimulus für die überschießenden Reparationsmechanismen bietet, die Reduktion der Entzündungsreaktion zum Ziel haben oder Symptom-gerichtet sind [30, 31, 49, 79]. Dies ist eine erfolgreiche Strategie im Falle einer Fibrose, die beispielsweise durch eine Schistosomeninfektion verursacht wurde. Hier kann durch die Gabe von Antibiotika kausal therapiert werden. Handelt es sich jedoch bei den zu Grunde liegenden Erkrankungen zum Beispiel um eine chronische Hepatitis C-Infektion, eine autoimmun bedingte Hepatitis oder eine progrediente Zirrhose in folge von Alkoholabusus, ist der chronisch schädigende Faktor nicht oder schlecht kausal therapierbar und somit nicht ausschaltbar.

Hier wird ein Therapiekonzept erforderlich, das in die Pathogenese der Organfibrose eingreift.

Ein mögliches Konzept, die Fibrogenese zu unterbinden beziehungsweise zu modulieren stellt die Manipulation von Myofibroblasten dar.

Da sie Hauptmatrixproduzenten im Rahmen der Fibroseentstehung sind, sowie durch Sekretion von inflammatorischen und fibrogenen Mediatoren erheblich zur Aufrechterhaltung beziehungsweise Progredienz der Krankheitsentwicklung

beitragen (vgl. Kapitel 1. 2), sind sie ein geeigneter Angriffspunkt für eine antifibrotische Therapie.

Es stellt sich nun die Frage, auf welche Art myofibroblastisch aktivierte HSC am besten genetisch ansprechbar sind.

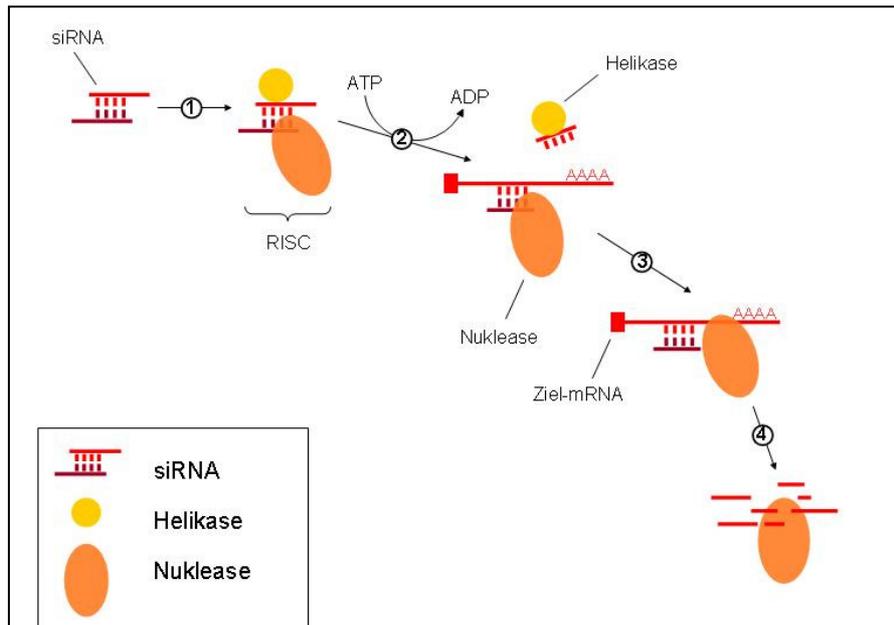
Sie lassen sich nur unzureichend mittels Transfektion genetisch manipulieren, was von Weiskirchen et al. 2000 in einer vergleichenden Studie am Beispiel von myofibroblastischen primären HSC aus der Ratte gezeigt wurde [118].

Hingegen sind sie mit Adenoviren leicht infizierbar, es kann eine 100%-ige Infektionsrate erzielt werden [11, 70, 118]. Isono et al. führten Versuche mit immortalisierten Zellen, so genannten Myofibroblasten-ähnlichen Zellen (MFBY2) aus fibrotischen Rattenlebern, durch und konnten ebenfalls sehr gute Infektionsraten erzielen [52]. Zum Einbringen genetischer Information hat sich folglich der adenovirale Transfer bewährt und wurde in der vorliegenden Arbeit näher untersucht.

Zur genetischen Manipulation von Myofibroblasten bedienen sich neuere Ansätze der Methode der RNA-Interferenz. RNA-Interferenz ist ein molekularer Mechanismus eukaryonter Organismen, der dazu dient, die Genexpression zu kontrollieren und das Genom durch Abbau fremder mRNA zu schützen. Dies geschieht mit Hilfe von small interfering RNA (siRNA), welche ursprünglich in Pflanzen- und Drosophilazellen synthetisiert wird.

SiRNAs sind 21-23 bp lange doppelsträngige RNA-Fragmente, deren Basensequenz hochspezifisch komplementär zu einer bestimmten Ziel-mRNA ist. Letztlich bindet die siRNA in einem Enzymkomplex an die komplementäre Ziel-mRNA und führt zu deren Degradation und Abbau (s. Abb. 4) [9, 46, 54, 65, 68, 85, 106, 124]. Auf diese Weise werden bestimmte Gene ausgeschaltet, man spricht vom so genannten „gene silencing“.

Ein antifibrotisches Therapiekonzept könnte also sein, die TGF- $\beta$ -Wirkung, die maßgeblich an der Fibroseentstehung beteiligt ist, in hepatischen Myofibroblasten zu hemmen, in dem man siRNA, die sich gegen den TGF- $\beta$ -Rezeptor Typ I richtet, per adenoviralem Transfer in die Zellen bringt.



**Abb. 4:** Posttranskriptionelles „gene silencing“ durch siRNA: siRNA bildet mit den Enzymen Helikase und Nuklease einen Komplex, der „RNA-Induced Silencing Complex“ (RISC) genannt wird (1). 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 (2). Die Nuklease des RIS-Komplexes bindet an die (Ziel-) mRNA (3), welche dann rasch von anderen zellulären Nukleasen abgebaut wird (4). (Nach [65])

## 2. Aufgabenstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein Zelltyp-spezifisches virales Vektorsystem zu etablieren, das in der Lage sein würde, gezielt Myofibroblasten genetisch zu manipulieren, um in die Fibrogenese im Rahmen chronisch entzündlicher Erkrankungen eingreifen zu können.

Dafür sollte in einem ersten Schritt die Infektion myofibroblastischer Zellen mit Hilfe universeller adenoviraler Vektoren etabliert werden.

Um Myofibroblasten spezifisch gentherapeutisch ansprechen zu können, sollte darüber hinaus der Promotor des myofibroblastischen Markergens  $\alpha$ -Smooth Muscle Aktin ( $\alpha$ -SMA) eingesetzt und auf sein Regulationsvermögen geprüft werden. In einem nächsten Schritt war es daher Aufgabe, die Promotorsequenz in ein adenovirales Vektorsystem zu integrieren und die Zelltyp-spezifische beziehungsweise zelldifferenzierungsabhängige Regulation anhand eines Reporters (GFP) abzulesen.

Nach der Etablierung eines Myofibroblasten-spezifischen viralen Vektorsystems sollte ein antifibrotischer Therapieansatz, nämlich die Hemmung fibrogener Signale an hepatischen Myofibroblasten durch RNA-Interferenz, vorbereitet werden. Ziel dieses Therapieansatzes ist es, den TGF- $\beta$ -Signalweg durch Repression des Alk5-Rezeptors zu hemmen. Hierfür sollte die entsprechende siRNA, die sich gegen den Alk5-Rezeptor richtet, in einen weiteren adenoviralen Vektor kloniert werden und erste Infektionsversuche mit immortalisierten hepatischen Sternzellen (HSC) unternommen werden. Zur Evaluierung der siRNA-Wirkung sollte nach Infektion der Alk5-Transkriptlevel bestimmt und mit dem nicht infizierter Zellen verglichen werden.

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

#### **3.1 Allgemeines**

Die Chemikalien und Lösungen wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) und Sigma (Dreisendorf) in Pro-Analysis-Qualität bezogen. Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße stammten von der Firma Biozym (Oldendorf). Die verwendeten 15 ml- und 50 ml-Polypropylenröhrchen sowie auch die Petrischalen und Einwegpipetten für die Bakterien- beziehungsweise Zellkultur wurden von der Firma Becton-Dickinson Laborware (Lincoln Park, NJ, USA) hergestellt.

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) synthetisiert und über HPLC aufgereinigt.

Alle übrigen Plastikwaren lieferte die Firma Eppendorf (Hamburg).

Der Ansatz aller Lösungen erfolgte, wenn nicht anders vermerkt, mit voll entsalztem Wasser aus der Millipore-Q Plus Anlage (Millipore, Molsheim, Frankreich). Lösungen und Materialien wurden im Autoklaven bei 121 °C und 1,2 bar in feuchter Hitze für 20 Minuten autoklaviert. Glas- und Metallgeräte wurden vor der Verwendung fünf Stunden im Trockenschrank bei 180 °C gebacken.

#### **3.2 Klonierungsarbeiten**

##### **3.2.1 Bakterienkultur**

Alle Bakterienarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Flaschenhalse und Drigalski-Spatel wurden abgeflammt, Impfösen ausgeglüht.

### 3. 2. 1. 1 Medien, Antibiotika, E. coli Stämme

**LB-Medium:** 1 % [w/v] Bacto-Trypton (Difco, Detroit, MI, USA)  
0,5 % [w/v] Bacto-Hefeextrakt (Difco)  
1 % [w/v] NaCl  
1 mM NaOH, pH wird mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt

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

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

**Kulturmedium:** LB-Medium mit Antibiotikum

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

#### Antibiotika:

	Stammlösung	Arbeitskonzentration
<b>Ampicillin:</b>	100 mg/ml in H <sub>2</sub> O	100 µg/ml
<b>Kanamycin:</b>	30 mg/ml in H <sub>2</sub> O	30 µg/ml
<b>Chloramphenicol:</b>	30 mg/ml in 80 % Ethanol	30 µg/ml

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

**DH5α:** F<sup>-</sup> φ80/*lacZ*ΔM15 Δ(*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17*  
(*r<sub>k</sub><sup>-</sup>*, *m<sub>k</sub><sup>+</sup>*) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 tonA*

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

### 3. 2. 1. 2 Herstellung kompetenter E. coli Zellen

<b>2xTSS:</b>	20 % [w/v] PEG 8000 (Sigma, Dreisendorf) 10 % [v/v] DMSO (Sigma) in LB-Medium
<b>1xTSS:</b>	50 % 2xTSS 50 % LB-Medium

Zunächst wurden die E. coli-Zellen über Nacht in 5 ml LB-Medium bei 37°C und 250 UpM (Bakterienschüttler, Braun) inkubiert. Je 250 µl dieser Übernachtskultur wurden in 25 ml LB-Medium überführt und wiederum bei 37°C und 250 UpM für 2-4 Stunden bebrütet bis sie die logarithmische Wachstumsphase OD<sub>600</sub> zwischen 0,3 und 0,4 erreicht hatten. Nachdem die Zellen für 15 min bei 5000 UpM und 4°C pelletiert (Minifuge GL, Heraeus, Hanau) wurden, wurde das Bakterienpellet in 1/10 des Volumens der Kultur (2,5 ml) 1xTSS gelöst. Von dieser Suspension wurden 100 µl-Aliquots in vorgekühlte Reaktionsgefäße pipettiert und sofort bei -70°C eingefroren und gelagert.

### 3. 2. 1. 3 Transformation

Für die Transformation wurden 10 µl eines Ligationsansatzes oder 100-2000 ng Plasmid-DNA vorsichtig mit 150 µl aufgetauten kompetenten Zellen vermischt und anschließend für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42°C für exakt 1 Minute wurde den Zellen 450 µl SOC-Medium zugegeben und der Ansatz für 1 Stunde bei 37°C in einen Schüttler (Braun) bei 200 UpM gegeben. Schließlich wurden 100 – 600 µl auf antibiotikumhaltige LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet.

Eine erste Selektion der Transformanten erfolgte über die mit dem Plasmid aufgenommene Antibiotikaresistenz. Anschließend wurden sie nach einer Mini-Plasmid-Präparation (s. u.) weiter analysiert.

### 3. 2. 1. 4 Lagerung von Bakterienzellen

Für die dauerhafte Lagerung von Bakterien wurden Glycerinstämme angelegt. Hierfür wurden 800 µl einer Bakterienkultur mit 150 µl Glycerin vorsichtig in einem Eppendorf-Gefäß gemischt und sofort bei -70°C eingefroren.

Zur erneuten Anzucht wurden 10 µl der Gefriersuspension in 5 ml Kulturmedium gegeben und über Nacht bei 37°C und 200 UpM inkubiert.

### 3. 2. 2 Plasmidpräparation

#### 3. 2. 2. 1 Minipräparation

**P<sub>1</sub>-Puffer:** 10 mM EDTA, pH 8,0; 50 mM TRIS-HCL; 100 µg/ml RNase

**P<sub>2</sub>-Puffer:** 0,2 M NaOH; 1 % [w/v] SDS

**P<sub>3</sub>-Puffer:** 3 M Kaliumacetat, pH 5,5

**TE-Puffer:** 10 mM TRIS, pH 8,0; 1 mM EDTA

Es wurde eine Bakterienkolonie in 3 ml mit Antibiotikum-versetztem LB-Medium über Nacht auf dem Bakterenschüttler (Braun) bei 250 UpM und 37°C inkubiert. Anschließend wurden 1,5 ml dieser Kultur in ein steriles Gefäß überführt und bei 9000 UpM (Eppendorf-Tischzentrifuge 5417C) eine Minute lang zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und 150 µl P<sub>1</sub>-Puffer zur Resuspension auf das Pellet gegeben und stark gevortext. Die Proben wurden dann auf Eis gestellt. Weitere 150 µl P<sub>2</sub>-Puffer wurden zum Lysieren der Zellen und Denaturieren der DNA zugefügt und vorsichtig gemischt. Es folgte nun eine Inkubation auf Eis für drei Minuten. In einem nächsten Schritt wurden 150 µl P<sub>3</sub>-Puffer, der die genomische DNA und Proteine präzipitieren lässt, zugegeben und vorsichtig mit dem Inhalt gemischt. Es folgte wieder eine Inkubation auf Eis für fünf Minuten. Um Zelltrümmer und Präzipitate zu eliminieren, wurden die Proben für fünf Minuten bei 14000 UpM (Eppendorf-Tischzentrifuge 5417C) abzentrifugiert. Der Überstand, der die Plasmid-DNA enthielt, wurde in ein

neues Gefäß überführt und mit 1 ml auf -20°C gekühltem 100%-igem Ethanol versetzt. Zum Fällen der DNA wurde der Ansatz für drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Proben fünf Minuten bei 14000 UpM abzentrifugiert und das Pellet einmal mit 70%-igem -20°C-kaltem Ethanol gewaschen. Nach Trocknen des Pellets wurde die DNA in 20 µl TE-Puffer gelöst.

### **3. 2. 2. 2 Midi- und Maxipräparation von Plasmid-DNA**

Um Plasmid-DNA in größeren Mengen zu isolieren wurden 50 bzw. 100 ml LB-Medium, das entsprechend der Resistenz des Plasmids mit Antibiotikum versetzt wurde, mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C und 250 UpM (Bakterienschüttler, Braun) inkubiert. Die Präparation der DNA wurde mit einem Kit der Firma Qiagen (Hilden) nach Angaben des Herstellers durchgeführt

### **3. 2. 2. 3 Bestimmung der DNA- und RNA-Konzentration**

Die Bestimmung der Konzentration der Nucleinsäuren erfolgte mittels eines Spektralphotometers (Hitachi U-2000 Spektrometer Colora, Ratingen) bei der Wellenlänge 260 nm. Die Proben wurden in Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm gemessen. Eine Extinktion  $E_{260}$  von 1,0 entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml DNA oder 40 µg/ml RNA. Die Konzentration in µg/µl ergab sich daher wie folgt:  $\mu\text{g}/\mu\text{l} = (\text{Extinktion } E_{260} \times 50 \text{ bzw. } 40 \mu\text{g/ml} \times \text{Verdünnung}) / 1000$ . Um eine Proteinverunreinigung zu beurteilen, wurde das Verhältnis der Absorptionen bei den Wellenlängen 260 und 280 nm gebildet. Nucleinsäurehaltige Lösungen gelten als rein, wenn der Quotient  $E_{260} / E_{280}$  zwischen 1,8 und 2,0 liegt.

### **3. 2. 3 Restriktion**

Im Rahmen der Klonierungsarbeiten wurde Plasmid-DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen enzymatisch hydrolysiert. Pro  $\mu\text{g}$  eingesetzter DNA wurden 3 U Enzym im entsprechenden Restriktionspuffer zugefügt und für mindestens drei Stunden im Temperaturoptimum der Endonuklease (meist  $37^\circ\text{C}$ ) inkubiert.

### **3. 2. 4 Dimerisierung von Oligonukleotiden**

Alternativ zu Restriktionsfragmenten wurden auch Oligodimere zur Ligation (s. 3. 2. 5) eingesetzt. Die Oligodimere (Sequenz s. Tabelle 1) wurden bei MWG Biotech AG (Ebersberg) bestellt. Für die Dimerisierung wurden die Oligonukleotidmonomere jeweils zunächst mit  $\text{H}_2\text{O}$  (Roth, Karlsruhe) resuspendiert und auf eine Konzentration von  $100\ \mu\text{M}$  verdünnt. Dann wurden die Oligonukleotide im Verhältnis 1:1 gemischt und für 30 Sekunden auf  $95^\circ\text{C}$  erhitzt, um die Sekundärstruktur aufzuheben. Anschließend wurde das Gemisch wie folgt bei absteigenden Temperaturen inkubiert:

2 Minuten	$72^\circ\text{C}$
2 Minuten	$37^\circ\text{C}$
2 Minuten	$25^\circ\text{C}$
Lagerung auf Eis	

Die dimerisierten Oligonukleotide konnten sofort verwendet oder bei  $-20^\circ\text{C}$  eingefroren werden.

**Tabelle 1:** Verwendete Oligonukleotide für die Dimerisierung

si Alk-5 F	5'- GAT CCG TCG CTC GAC GCT GTT CCA TTC AAG AGA TGG AAC AGC GTC GAG CGA TTT TTT AGG CCT G - 3'	si Alk-5
si Alk-5 R	5'- AAT TCA GGC CTA AAA AAT CGC TCG ACG CTG TTC CAT CTC TTG AAT GGA ACA GCG TCG AGC GAC G - 3'	

### 3. 2. 5 Ligation

Für die Ligation wurden 100 ng DNA-Insert mit einem Plasmidvektor in den Molaritätsverhältnissen 1:1 und 1:2,5 zusammengeführt. Um Religation zu vermeiden und damit die Effektivität der Reaktion zu erhöhen, wurden die DNA-Fragmente vorher dephosphoryliert. Dies erfolgte nach folgendem Ansatz:

6	µl	10x Dephosphorylierungspuffer
6	µl	SHRIMP Alkalische Phosphatase (Roche, Mannheim)
15	µl	DNA (Einsatz von 1 µg DNA)
ad 60	µl	dH <sub>2</sub> O

Zur Dephosphorylierung wurde der Ansatz für 30 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend zur Deaktivierung der Alkalischen Phosphatase 15 Minuten lang auf 60°C erhitzt. Die Ligation wurde dann in einem 10 µl-Ansatz durchgeführt:

1	µl	10x Ligationspuffer
1	µl	T <sub>4</sub> -Ligase (1 U/µl, MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania)
x	µl	dephosphorylierter Vektor
y	µl	Insert
ad 10	µl	dH <sub>2</sub> O

Als Vergleichskontrolle dienten Ansätze ohne Insert-DNA.

Das Reaktionsgemisch wurde für 3-12 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

### 3. 2. 6 Gelelektrische Auftrennung von DNA-Fragmenten

#### 3. 2. 6. 1 Agarosegel

<b>1 x TAE-Puffer:</b>	40	mM TRIS-Base
	20	mM Eisessig
	1,25	mM EDTA; pH 8, 0

**Ethidiumbromidlösung:** 10 mg/ml

Um DNA-Fragmente zu analysieren oder zu präparieren wurden sie mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Auftrennung erfolgte in 0,8 – 1%-igen Agarosegelen. Zur Herstellung der Gele wurden 0,8 g – 1 g Seakem Agarose (Biozym, Oldendorf) in 100 ml 1x-TAE-Puffer durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Nach Abkühlen der Agaroselösung auf circa 60°C wurden zum späteren Anfärben der DNA 5 µl Ethidiumbromidlösung hinzugefügt und der Ansatz in einen Gelschlitten gegossen. Nach Polymerisation des Gels wurde der Gelträger in eine mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gesetzt, und die zu trennenden DNA-Proben wurden, jeweils mit 1/6 Volumen Ladepuffer versetzt, in die Geltaschen pipettiert. 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.

Als Molekularstandard wurde Lambda-DNA-EcoRI-HindIII, Marker 3 (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania) verwendet.

#### 3. 2. 6. 2 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Die Isolierung eines DNA-Fragments wurde nach präparativer Gelelektrophorese mit Hilfe des DNA-Purification Kits Easy Pure (Biozym, Oldendorf)

durchgeführt. Die Bande des zu extrahierenden DNA-Fragmentes wurde mit einem Skalpell unter UV-Licht aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Die weitere Isolierung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

### 3.3 Zellkultur

#### 3.3.1 Allgemeines

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

#### 3.3.2 Medien und Lösungen

##### Lösungen:

**PBS:** 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)

**Grundmedium:** DMEM (Sigma): 4500 mg/l Glucose/L-Glutamin  
110 mg/l Sodium Pyruvate

**Kulturmedium:**

Grundmedium mit folgenden Zusätzen: 10 % [v/v] FCS

0,1 % [w/v] Penicillin / Streptomycin  
(Sigma, Dreisendorf)

**Einfriermedium:**

Grundmedium mit folgenden Zusätzen: 10 % [v/v] FCS

5 – 10 % [v/v] DMSO  
(Sigma, Dreisendorf)  
0,1 % [w/v] Penicillin / Streptomycin  
(Sigma, Dreisendorf)

**3.3.3 Zelllinien**

Es wurden die myofibroblastisch differenzierten Zellen der Leber, PAV I, verwendet, die freundlicherweise von Jean Rosenbaum (Universität Bordeaux, Frankreich) zur Verfügung gestellt wurden. Bei den PAV I-Zellen handelt es sich um immortalisierte hepatische Sternzellen (HSC) aus der Ratte [104]. Des Weiteren wurden LF-CL2A-Zellen von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen (Braunschweig) bezogen. Hierbei handelt es sich um Hepatomzellen aus der Ratte. Außerdem wurden in Zusammenarbeit mit Herrn PD Dr. med. J. Fries (Institut für Pathologie, Köln) Versuche mit primären humanen Mesangialzellen in der 8. Passage gemacht, die von der Firma Cell Systems (St. Katharinen) stammten. Zur Gewinnung von Viren wurden HEK293-Zellen (Stratagene, La Jolla, USA) verwendet.

**3.3.4 Kultivieren und Passagieren der Zellen**

Alle Zelllinien wurden in einem Begasungsbrutschrank (Heraeus, Hanau) bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 100 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Nach mikroskopischer Beurteilung (Mikroskop Nikon Eclipse TE 300) der Zellqualität und Zelldichte

wurden die Zellen alle 2-5 Tage passagiert oder ein Mediumwechsel durchgeführt. Für einen Mediumwechsel wurde das Medium abgesaugt und nach zweimaligem Waschen des Zelllayers mit PBS frisches Medium hinzugefügt. Bei zu dichtem Wachstum wurden die Zellen gesplittet. Dazu wurde nach dem Waschen mit PBS eine Pasteurpipette Trypsinlösung auf die Zellen gegeben, wovon alles bis auf einen dünnen Film sofort wieder abgesaugt wurde. Nach circa zweiminütiger Einwirkzeit bei 37°C konnte das Ablösen der Zellen beobachtet werden, worauf die Trypsinierung durch Zugabe von 1-2 ml Kulturmedium gestoppt wurde. Die Zellen wurden nun resuspendiert und mit einer ausreichenden Menge frischem Medium auf neue Kulturgefäße verteilt.

### **3. 3. 5 Bestimmung der Zellzahl**

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

Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Hierzu wurden die trypsinisierten Zellen (s. Kapitel 3. 3. 4) in einem definierten Volumen Medium resuspendiert und hiervon wiederum steril ein Aliquot von 50 µl entnommen. Diese 50 µl wurden 1:1 mit Trypan-Blaulösung, welche tote Zellen anfärbt, versetzt und auf die Zählkammer gebracht. Hier wurden dann in vier Großquadraten (entspricht jeweils 16 Kleinquadraten) die nicht gefärbten Zellen 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:  $M \times 2 \times 10/\mu\text{l}$ .

### **3. 3. 6 Kryokonservierung und Auftauen der Zellen**

Um Zellen dauerhaft zu lagern, wurden diese eingefroren. Dazu wurde eine volle Zellkulturschale einmal mit PBS gewaschen und anschließend trypsinisiert. Die Zellen wurden dann in 4 ml Kulturmedium resuspendiert und in 50-ml-

Falcons für vier Minuten bei 900 UpM zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden pro trypsinierter Kulturschale 3 ml Einfriermedium zugegeben und nach Resuspension jeweils 1,5 ml der Zellsuspension in 2-ml-Röhrchen eingefroren. Nachdem die Zellen langsam, durch Isolierung der Gefäße mit Zellstoff, bei  $-70^{\circ}\text{C}$  für 24 Stunden eingefroren wurden, erfolgte die endgültige Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff.

Um kryokonservierte Zellen aufzutauen, wurden sie möglichst schnell in ein  $37^{\circ}\text{C}$ -warmes Wasserbad transferiert. Die aufgetaute Zellsuspension wurde dann sofort mit einer Pipette zu 10 ml Kulturmedium in eine Schale gegeben. Um DMSO-Reste zu entfernen, wurde am folgenden Tag ein Mediumwechsel durchgeführt.

### **3. 4 Herstellung von rekombinanten Adenoviren Typ 5**

#### **3. 4. 1 Rekombination des Shuttle-Vektors mit dem adenoviralen Backbone-Plasmid und Analyse der Rekombinanten**

Die Verbindung von Shuttle-Vektor und der adenoviralen DNA in Form eines Backbone-Plasmids wurde auf zwei verschiedene Weisen vorgenommen. Das Konstrukt *pAdSMA-GFP* wurde nach dem AdEasy<sup>TM</sup> Adenoviral Vector System-Kit von Stratagene (La Jolla, USA) hergestellt, bei dem die Rekombination mittels einer Kotransformation beider Plasmide erreicht wird, während beim Virus *pAdsiAlk-5* das Kit BD Adeno-X<sup>TM</sup> Expression Systems 2 der Firma BD Biosciences Clontech (Palo Alto, USA) eingesetzt wurde, welches die Methode der Cre-loxP-Klonierung anwendet.

##### **3. 4. 1. 1 Kotransformation von BJ5183-Zellen**

Nachdem der Shuttle-Vektor pShuttleSMA-GFP kloniert (s. Kapitel 4. 1. 1 in Ergebnisse) und durch eine Maxipräparation (s. 3. 2. 2. 2) in ausreichender Menge isoliert worden war, wurde das Plasmid für die Transfektion vorbereitet.

Hierzu wurden 4 µg des Plasmids in einem 40 µl-Restriktionsansatz mit dem Restriktionsenzym Pme I linearisiert, auf ein präparatives 0,8%-iges Agarosegel aufgetragen und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Anschließend erfolgte die Extraktion der linearisierten DNA aus dem Agarosegel (s. Kapitel 3. 2. 5. 2). Für die Transformation wurden rekombinationsaktive BJ5183-Zellen verwendet, die bereits mit dem adenoviralen Backbone-Plasmid transformiert worden waren, und uns freundlicherweise von Frau PD Dr. U. Protzer (Institut für Mikrobiologie der Universitätsklinik zu Köln) überlassen wurden. Für die Transformation (s. Kapitel 3. 2. 1. 3) wurden Agarplatten mit Kanamycin-Zusatz benutzt und jeweils 2 µg linearisierter pShuttleSMA-GFP eingesetzt.

Am folgenden Tag konnten aus den gewachsenen Kolonien Kulturen für DNA-Minipräparationen angeimpft werden (s. Kapitel 3. 2. 2. 1), wobei nach Angaben des Vektor-Herstellers (Stratagene) für die Rekombinanten winzige Kolonien typisch sein sollen. Zur Identifizierung der Rekombinanten wurde die präparierte DNA mit der Restriktionsendonuklease Pac I verdaut und auf einem 0,8%-igen Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Durch die Restriktion entstehen typischerweise ein großes Fragment von ungefähr 30 kb sowie ein kleines von entweder 3,0 oder 4,5 kb je nach Rekombinationsmechanismus.

Aus den angeimpften Kulturen ausgewählter Rekombinanten wurden nun wiederum Verdünnungsausstriche gemacht, woraus Kulturen für Midipräparationen angeimpft wurden (s. Kapitel 3. 2. 2. 2). Zur Sicherung der Klone wurden Glycerinstämme angelegt (s. Kapitel 3. 2. 1. 4). In weiteren Schritten wurden die rekombinationsinaktiven DH5α-Zellen mit 100 bzw. 500 ng des rekombinanten pAdSMA-GFP-Plasmids transformiert, woraus wiederum durch Minipräparation, Restriktion und analytische Gelelektrophorese die Transformanten bestimmt wurden. Hieraus wurden eine Maxipräparation der DNA vorgenommen sowie wiederum ein Glycerinstamm angelegt.

#### **3. 4. 1. 2 Rekombination mittels Cre Recombinase**

Für das zweite virale Konstrukt pAdsiAlk5 wurde das Prinzip der Cre-loxP-Klonierung herangezogen und eine Reagenzienzusammenstellung der Firma BD Biosciences (Clontech, Palo Alto, USA) genutzt, die das entsprechende

Klonierungssystem kommerziell anbietet. Ein doppelsträngiges (ds)DNA-Oligonukleotid, das für die anti-TGF- $\beta$ -Rezeptor I (Alk 5) small hairpin RNA-Sequenz (shRNA) kodiert, wurde in den Shuttle-Vektor pSIREN unter Kontrolle des Polymerase III U6-Promotors einkloniert. Die Zielsequenz für anti-Alk5-siRNA wurde mir freundlicherweise von Frau Julia Maurer (Institut für Pathologie der Universität zu Köln) zur Verfügung gestellt. In dem DNA-Oligonukleotid wurde eine Restriktionsschnittstelle für die Endonuklease Stu I integriert, anhand derer man die erfolgreiche Ligation überprüfen konnte (vgl. Kapitel 4. 4. 1, s. Abb. 17 und 19 in Ergebnisse). Die Klonierung des Shuttle-Vektors pSIRENsiAlk5 erfolgte nach Angaben des Herstellers (BD Biosciences). Die Sequenz des rekombinanten Klons, pSIRENsiAlk5, wurde durch Sequenzierung überprüft. Anschließend wurde der Shuttle-Vektor mit den adenoviralen Sequenzen (Adeno-X) durch die zyklische Rekombinase (Cre) rekombiniert. Als Akzeptor-Vektor wurde der pLP-Adeno-X-PRLS verwendet (BD Biosciences).

Gemäß dem Protokoll des Herstellers wurde für die Rekombination ein 20  $\mu$ l-Ansatz mit CreRekombinase hergestellt:

1 $\mu$ l	pSIRENsiAlk5 (200 ng)
1 $\mu$ l	Cre
18 $\mu$ l	BD Adeno-X LP Reaktionsgemisch

Der Ansatz wurde für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 5 Minuten auf 70°C erhitzt, um die Reaktion zu stoppen.

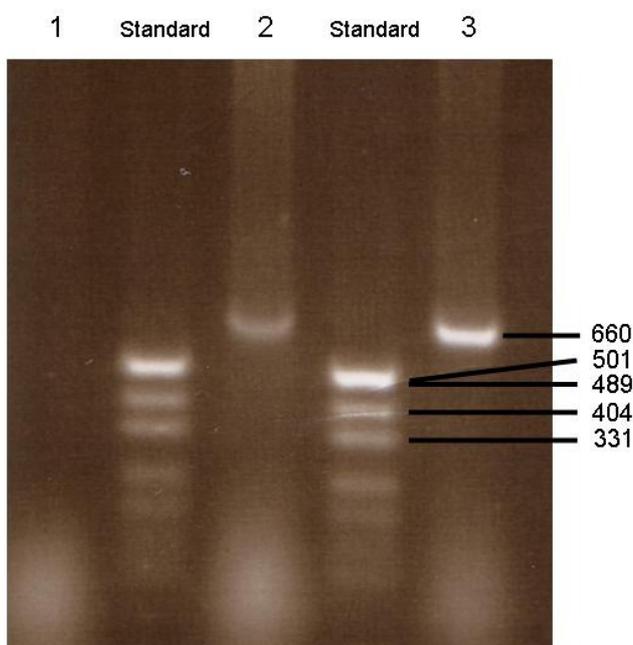
Im nächsten Schritt wurden kompetente DH5 $\alpha$ -Zellen mit dem Rekombinationsansatz transformiert. Hierbei wurden 10  $\mu$ l des Rekombinationsgemisches auf 100  $\mu$ l kompetente DH5 $\alpha$ -Zellen (s. 3. 2. 1. 2) gegeben. Die Kultivierung erfolgte auf Agarplatten, die 30  $\mu$ g/ml Chloramphenicol und 7 % Saccharose enthielten. Die Überprüfung der Rekombinanten erfolgte mit Hilfe einer PCR. Für die PCR wurde das im Kit BD Adeno-X<sup>TM</sup> Expression Systems 2 (BD Biosciences) mitgelieferte Primerset verwendet. Die Primerloci flankieren Sequenzbereiche in der Weise, dass die PCR im Falle der erfolgreichen Rekombination ein Amplifikat von 660 bp ergibt, andernfalls ist das Amplifikat 170 bp groß. Für den Ansatz wurden 100  $\mu$ l einer über Nacht angesetzten

Bakterienkultur der transformierten DH5 $\alpha$ -Zellen abzentrifugiert und sorgfältig vom Überstand befreit. Auf das Bakterienpellet wurden 11,5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O (Roth, Karlsruhe), 1  $\mu$ l Primerset (s. o.) sowie 12,5  $\mu$ l Multiplex-Mix mit Taq-DNA-Polymerase, Nukleotiden und Puffer der Firma Quiagen (Hilden) gegeben.

Die Amplifikationen erfolgten mit Hilfe des Gerätes OmnE-PCR (Hybaid, Middlesex, UK) nach folgendem Programm:

einmal	15 min	95 °C
30 Zyklen	30 sec	94 °C
	90 sec	64 °C
	90 sec	72 °C
einmal	10 min	72 °C

Anschließend wurden die Proben auf einem 1,8%-igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und die Rekombinanten konnten durch den Nachweis der 660 bp-Amplifikate identifiziert werden (s. Abb. 5 und 4. 4. 1).



**Abb. 5:** Bestätigung der erfolgreichen Rekombination durch Nachweis eines 660 bp-großen Amplifikats in der PCR bei Probe 2 und 3

## **3. 4. 2 Vorbereitung der adenoviralen Rekombinanten für die Transfektion von HEK293-Zellen**

### **3. 4. 2. 1 Restriktion mit Pac I**

Für die Transfektion wurden die rekombinanten Plasmide, pAdsiAlk5, mit dem Enzym Pac I verdaut. Dafür wurden in einem 50 µl-Ansatz 10 µg Plasmid-DNA mit 30 U Pac I im Pac-Reaktionspuffer geschnitten. Die Restriktion wurde durch eine analytische Gelelektrophorese nachvollzogen (s. Kapitel 3. 4. 1. 1).

### **3. 4. 2. 2 Phenol-Extraktion**

Zur Phenolextraktion wurden die Ansätze mit Wasser auf 100 µl erweitert und mit 100 µl Phenol-Chloroform (Roth, Karlsruhe) versetzt. Nach 30 Sekunden Mischen mit einem Vortex-Gerät wurde eine Minute abzentrifugiert und der wässrige Überstand abgenommen und in ein neues Safe-lock-Eppendorf-Gefäß überführt. Darauf wurden 100 µl Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (49+1) zugegeben, wiederum stark gemischt und der Überstand nach dem Abzentrifugieren in ein frisches Gefäß gegeben. Zum Fällern der DNA wurde 1/10 des Probenvolumens 3-M Natriumacetat sowie das 2-3-fache Volumen eiskaltes Ethanol zugesetzt und das Gemisch für 1-2 Stunden bei -20 °C inkubiert. Nun wurden die Proben für 15 Minuten abzentrifugiert, der Ethanol abgenommen und zweimal mit 70%-igem Ethanol gewaschen. In einem letzten Schritt wurde noch einmal 100%-iger Ethanol zugegeben. Nach erneutem Zentrifugieren wurde dann unter sterilen Bedingungen der Ethanol entfernt und das Pellet getrocknet. Letztlich wurde die DNA in 10 µl sterilem Wasser resuspendiert.

### **3. 4. 3 Gewinnung von rekombinanten Adenoviren aus HEK293-Zellen**

#### **3. 4. 3. 1 Transfektion**

Um aus der Plasmid-DNA Viren zu gewinnen, wurden HEK293-Zellen mit der beschriebenen Plasmid-DNA transfeziert (s. Kapitel 4. 1. 2 Ergebnisse). Die Zellen wurden am Vortag gesplittet und waren zum Zeitpunkt der Transfektion zu 90 – 95 % konfluent. Es wurden 12 µg rekombinante adenovirale DNA eingesetzt und gemäß den Angaben des Herstellers mit einem Ansatz aus Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Karlsruhe) und Optimem-Medium (Invitrogen, Karlsruhe) auf die Zellen gegeben.

#### **3. 4. 3. 2 Expansion und Virenpräparation**

Drei Tage nach Transfektion wurden die Zellen expandiert, um eine besonders hohe Virenausbeute zu erzielen. Hierfür wurden die Zellen trypsiniert und unter Zugabe frischer HEK293-Zellen auf zwei 20 cm-Kulturschalen ausplattiert. Das alte Medium wurde gesichert und wieder zusammen mit frischem Kulturmedium in die neuen Schalen gegeben. Die Zellen wurden nun für weitere 2-3 Tage kultiviert.

Die Viren wurden aus den geernteten infizierten Zellen durch abwechselndes Herunterkühlen und Erhitzen der Proben von jeweils 5 Minuten in einem Trockeneismethanol-Bad und einem Wasserbad von 37°C gewonnen. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll von Stratagene (La Jolla, USA) [109]. Die präparierte primäre Virussuspension wurde zur Lagerung bei -70°C eingefroren.

### 3. 4. 3. 3 Titerbestimmung

Die Bestimmung des Virentiters wurde mit Hilfe des Adeno-X™ Rapid Titer Kits (BD Biosciences, Clontech, Palo Alto, USA) vorgenommen. Alle Schritte wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

## 3. 5 Adenovirale Infektion eukaryontischer Zellen

### 3. 5. 1 Infektion

Alle Infektionen wurden in 6-Loch-Platten durchgeführt. Die jeweilige Infektionsdosis ergab sich aus der ausplattierten Zellzahl und dem eingesetzten Volumen der Virussuspension mit bekanntem Titer. Um reproduzierbare Ergebnisse liefern zu können, ist der Begriff der Multiplicity Of Infection (MOI) eingeführt worden. Er beschreibt die Anzahl Viren pro Zelle, die bei einer Infektion eingesetzt werden [110]. Das Volumen Virussuspension, das zugegeben werden muss, um 1 MOI zu erhalten, das heißt eine Infektion mit einer Viruslast von einem Virus pro Zelle, errechnet sich nach folgender Formel:

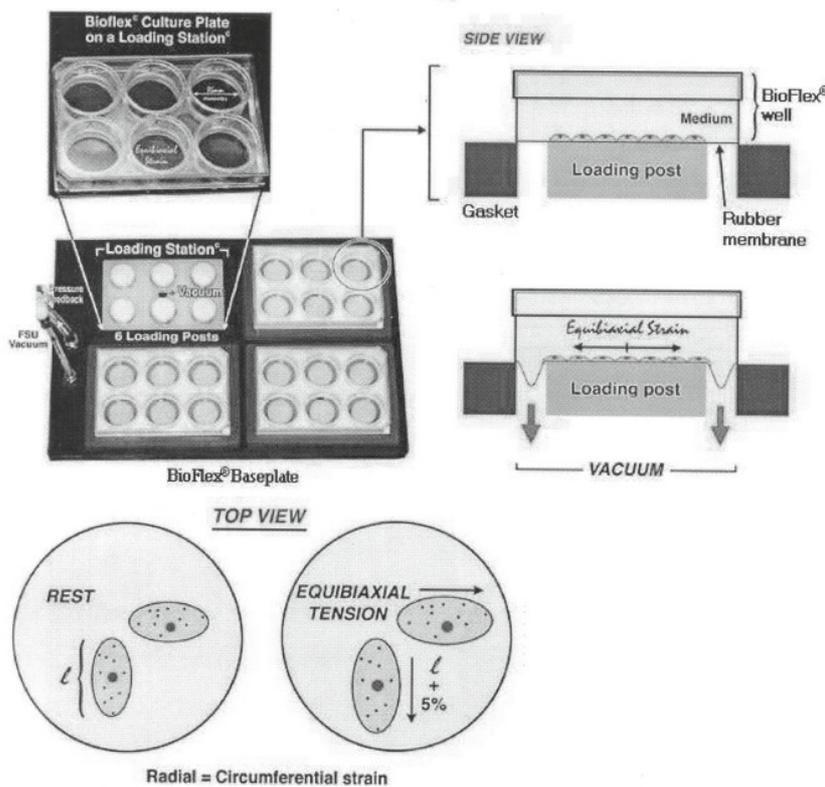
$$1 \text{ MOI entspricht } \frac{\text{ausplattierte Zellen / Loch}}{\text{Virustiter [ Virenzahl / ml]}}$$

Um die Zielzellen zu infizieren, wurden sie trypsiniert und in einer 6-Loch-Platte mit einer Dichte von  $2,5 \times 10^5$  Zellen pro Loch ausplattiert. Unmittelbar darauf wurden die Virussuspension sowie 1 ml Kulturmedium zugegeben. Nach vierstündiger Inkubation im Brutschrank wurde pro Loch ein weiterer ml Medium zugefügt. Die infizierten Zellen wurden an den folgenden sechs Tagen mikroskopisch beobachtet und die Ergebnisse dokumentiert.

### 3. 5. 2 Stretching

Um eine myofibroblastische Differenzierung bei humanen Mesangialzellen hervorzurufen, wurden diese auf speziellen 6-Loch-Platten mit kollagenbeschichteten elastischen Membranen (Bioflex, Dunn Labortechnik, Asbach) kultiviert und infiziert.

Die elastischen Membranen wurden dann über einen Zeitraum von 48 Stunden in einem festgelegten Rhythmus von 15 beziehungsweise 30 Zyklen pro Minute durch Anlegen eines Vakuums gedehnt (s. Abb. 6). Dieses Verfahren wurde in Zusammenarbeit mit Herrn PD Dr. med J. Fries (Institut für Pathologie, Köln) angewandt.



**Abb. 6:**

Prinzip der Erzeugung von mechanischem Stress durch Anlegen eines Vakuums.

(Das Gerät wurde nach dem Vorbild der von Banes et al. entwickelten Apparatur [6] in der Werkstatt des Instituts für vegetative Physiologie des Universitätsklinikums zu Köln, in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie hergestellt. Abb. aus: [www.flexcellint.com](http://www.flexcellint.com).)

### 3. 5. 3 Microfluidics-basierte zytometrische Reporterfluoreszenzmessung

In aktivierten Mesangialzellen wurde die rekombinante Expression des GFP-Reporters quantitativ im Bioanalyzer 2100 (Agilent, Palo Alto, USA) mit Hilfe eines Cell Assay Chips und des Fluorescence LabChip Kits bestimmt. Die

Zellen wurden nach Angaben des Herstellers geerntet, in Puffer aufgenommen und in einem Chip gemessen.

#### **3. 5. 4 Zellernte und RNA-Isolierung**

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

Für die Bestimmung des TGF- $\beta$ -Rezeptor-I-Transkriptlevels in mit pAdsiAlk5 infizierten Zellen, wurden die Zellen fünf Tage nach Infektion geerntet und ihre RNA isoliert, um den Effekt der siRNA zu quantifizieren.

Hierfür wurde das Zellmedium in den Wells der 6-Lochplatten abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden zur Lyse 100  $\mu$ l kalter GITC-Lösung in jedes Loch pipettiert, die Zellschicht abgeschabt und in ein 1,5 ml-Gefäß überführt. Das Loch der Zellkulturschale wurde ein weiteres Mal mit 100  $\mu$ l GITC-Lösung ausgespült, um noch verbliebene Zellen zu lösen. Da der Versuch parallel in zwei 6-Lochplatten durchgeführt worden war, wurden an dieser Stelle die jeweils gleichen Wells zusammengeführt. Sobald alle Zellen in dem 1,5 ml-Gefäß gesammelt waren, wurden sie bei -70 °C Schock-gefroren. Die RNA-Isolierung aus den geernteten Zellen erfolgte mit Hilfe des Kits NucleoSpin RNA II von Macherey Nagel (Düren) und wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Konzentrationsbestimmung der RNA-Proben erfolgte wie unter Kapitel 3. 2. 2. 3 beschrieben.

#### **3. 5. 5 Real time PCR**

Der TGF- $\beta$ -Rezeptor-I-Transkriptgehalt der infizierten PAV-I-Zellen wurde mit Hilfe einer Real time PCR bestimmt. Die Methode der Real time PCR zeichnet sich gegenüber der konventionellen PCR dadurch aus, dass sie

eine Messung und graphische Darstellung der Amplifikatmenge im gesamten Zeitverlauf der PCR erlaubt. Es wurde hierbei eine fluoreszenzmarkierte Sonde verwendet, die an die DNA-Zielsequenz bindet 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. Durch den Vergleich mit cDNA-Proben einer Standardverdünnungsreihe konnte auf den relativen Transkriptgehalt der Proben geschlossen werden. Um gleiche Einsatzmengen der zu untersuchenden Probe zu gewähren, wurden die Transkriptanteile des Zielgens gegen die eines House-Keeping-Gens normalisiert. Als House-Keeping-Gen wurde in dieser Arbeit das  $\beta$ -Aktin hinzugezogen [33].

Zunächst wurde die isolierte RNA mittels einer Reversen Transkription in cDNA umgeschrieben. Die Reverse Transkription wurde mit einem Kit der Firma Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) durchgeführt und erfolgte als Random-Primer-Ansatz in einem Gesamtvolumen von 50  $\mu$ l in 500  $\mu$ l-Reaktionsgefäßen. Die Zusammenstellung der Reagenzien wurde nach den Angaben des Herstellers vorgenommen. Anschließend wurden die Proben in einem PCR-Cycler (Biometra, Göttingen) unter dem folgenden Ablauf inkubiert:

10 min	25°C (Inkubation)
30 min	48°C (Reverse Transkription)
5 min	95°C (Inaktivierung d. MultiScribe Reverse Transkriptase)

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

Die Primer und Sonden wurden mir freundlicherweise von Frau Julia Maurer (Institut für Pathologie, Köln) zur Verfügung gestellt und waren von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) synthetisiert worden (s. Tabelle 2).

**Tabelle 2:** Sequenzen der verwendeten Primer und Sonde

Forward Primer (5 µM)	29 rat-hu-ALK5-forward 5' CCT TCA AAC GTG CTG ACA TCT ATG <sup>3'</sup>
	rat actin forward 1 5' CTA GAC TTC GAG CAA GAG ATG G <sup>3'</sup>
Reverse Primer (5 µM)	30 rat-ALK5-reverse 5' AAC GGA TGG ATC AGA AGG TAC AAG <sup>3'</sup>
	rat-actin-reverse 1 5' ATA GAG GTC TTT ACG GAT GTC AAC <sup>3'</sup>
Sonde (5 µM)	36 rat-ALK5-Sonde 5' AGT ATT CTG GGA AAT CGC TCG ACG CTG T <sup>3'</sup>

Es wurden Real-Time-PCRs der Versuchszell- und der Standard-cDNAs mit Hilfe des Kits qPCR core Eurogentec RT-QP73-05 (Liège, Belgien) in einem Real-Time-PCR-Cycler TaqMan der Firma Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) durchgeführt. In einem Real time PCR-Lauf wurden 10 ng der jeweils eingesetzten Versuchszell-cDNA gemessen und mit einer cDNA-Messreihe verglichen. Die cDNA-Standardreihe wurde aus cDNA-Verdünnungen (0,1 ng bis 50 ng) der Zelllinie Rat 2 erstellt.

Jeder Ansatz wurde in Triplets bestimmt.

Die RT-PCR-Läufe waren von Frau Julia Maurer etabliert worden und wurden wie in Tabelle 3 dargestellt übernommen (s. Tabelle 3).

**Tabelle 3:** Real time PCR-Programm

Zyklen	Zeit [min]	Temperatur [°C]
1	10	95
60	0,5	95
	1	60

Normalisiert wurden die Real-Time-PCRs gegenüber dem in den Versuchszellen enthaltenen  $\beta$ -Aktin, um eventuelle Variabilitäten zwischen den Proben auszugleichen.

## 4. Ergebnisse

In der vorgelegten Arbeit wurde ein adenoviraler Vektor hergestellt, der durch den Einsatz eines  $\alpha$ -Smooth-Muscle-Aktin( $\alpha$ -SMA)-Promotorsegmentes die Genexpression myofibroblastischer Zellen steuern sollte. Das Regulationsvermögen des adenoviralen Vektors wurde mit Hilfe eines Reporterproteins auf Zelltypspezifität und Differenzierungsabhängigkeit getestet. Durch Konstruktion einer Expressionskassette zur Expression von siRNA wurden die grundlegenden Voraussetzungen geschaffen, die Genexpression fibrogener Mediatoren in Myofibroblasten zu inhibieren.

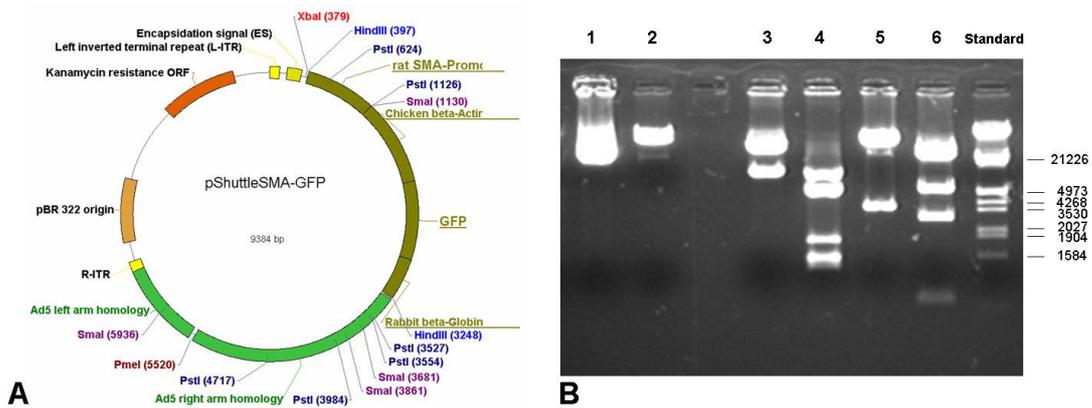
### 4.1 Herstellung von Adenoviren

#### 4.1.1 Klonierung des Shuttle-Vektors

Das erste Ziel war es, ein Adenovirus zu konstruieren, das ein Reporterprotein unter Kontrolle eines Myofibroblasten-spezifischen Promotors exprimieren kann. Dazu wurde ein 2970 bp großes Gensegment aus einem vorhandenen Plasmid SMA-GFP-700 ausgewählt. Diese Expressionseinheit enthielt einen 700 bp-langen 5'-nahen Abschnitt des  $\alpha$ -Smooth-Muscle-Aktin-Promotors ( $\alpha$ -SMA) aus der Ratte, ein  $\beta$ -Aktin Intron des Huhns, das Green Fluorescent Protein (GFP) als Reporter gen sowie eine  $\beta$ -Globin-Polyadenylierungsstelle aus dem Kaninchen (s. Abb. 7A).

Das Insert wurde von Restriktionsschnittstellen der Endonuklease Hind-III flankiert und mit Hilfe dieses Enzyms herausgeschnitten, aufgereinigt und in den Hind-III-linearisierten Shuttle-Vektor inseriert (s. Kapitel 3. 2 u. Abb. 9).

Nach Restriktionsanalyse des resultierenden pShuttleSMA-GFP (s. Abb. 7A) konnte die korrekte Insertion der  $\alpha$ -SMA-kontrollierten Expressionskassette belegt werden. Die gelelektische Auftrennung zeigte die erwarteten, für den pShuttleSMA-GFP-Klon charakteristischen Banden (s. Abb. 7B).



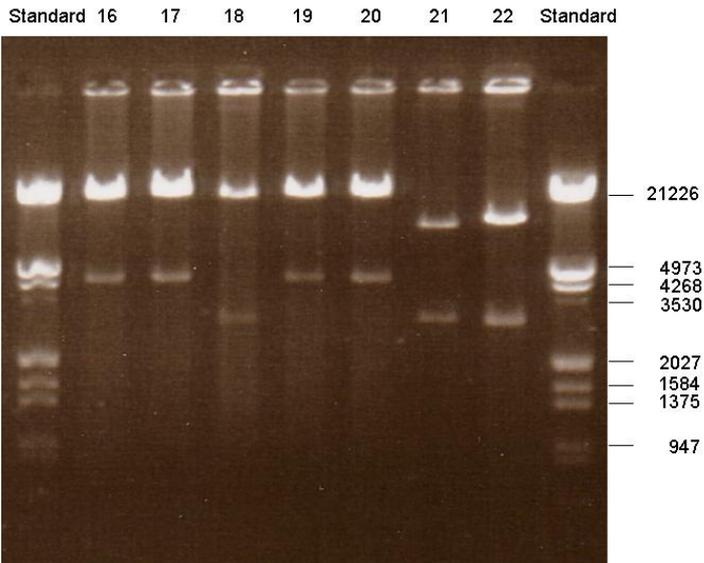
**Abb. 7A:** Vektorkarte des pShuttleSMA-GFP mit Markierung der verwendeten Restriktionsschnittstellen.

**Abb. 7B:** Gelelektrophoretische Auftrennung der pShuttleSMA-GFP-DNA: ohne (1, zirkulär) und nach Restriktion mit Pme I (2), Hind III (3), Pst I (4), Xba I (5) und Sma I (6).

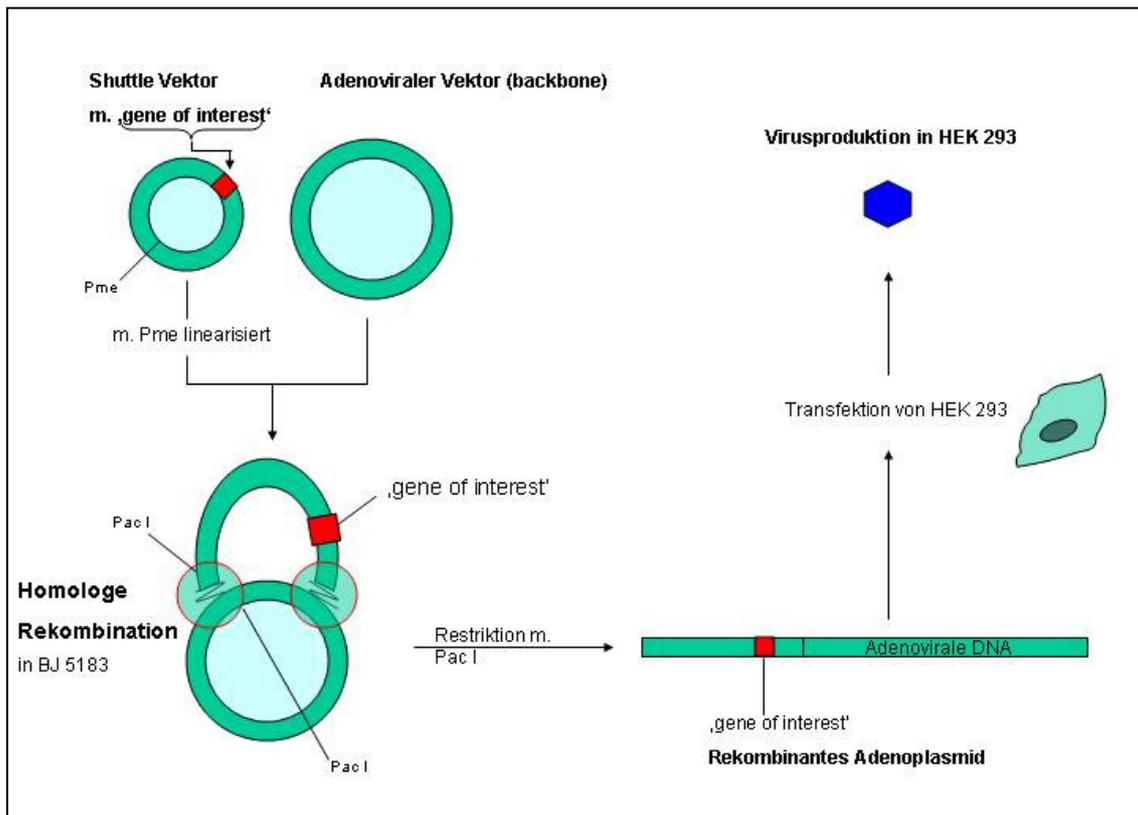
#### 4. 1. 2 Rekombination des Shuttle-Vektors mit adenoviralen Sequenzen und Gewinnung adenoviraler pAdSMA-GFP-Vektoren

Der pShuttleSMA-GFP-Vektor wurde nun durch Rekombination mit adenoviraler DNA verbunden (s. Kapitel 3. 4. 1 und Abb. 9). Die erfolgreiche Rekombination ließ sich wiederum durch eine Restriktionsanalyse mit dem Enzym Pac I und anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung nachvollziehen. Es zeigten sich zwei typische Banden, eine mit circa 30 kb und eine weitere mit je nach Rekombinationsmechanismus 3 kb beziehungsweise 4 kb (s. Abb. 8). Das rekombinierte adenovirale Plasmid erhielt den Namen pAdSMA-GFP.

Da im verwendeten Teil des adenoviralen Vektors die für die Replikation wichtigen Genorte E1 und E3 deletiert sind, wurden für die Virenampifikation HEK293-Zellen, die die zur Virenbildung fehlenden Gene im Genom tragen, herangezogen und mit dem adenoviralen pAdSMA-GFP-Vektor transfeziert (vgl. Kapitel 3. 4. 2 und 3. 4. 3 in Material und Methoden).



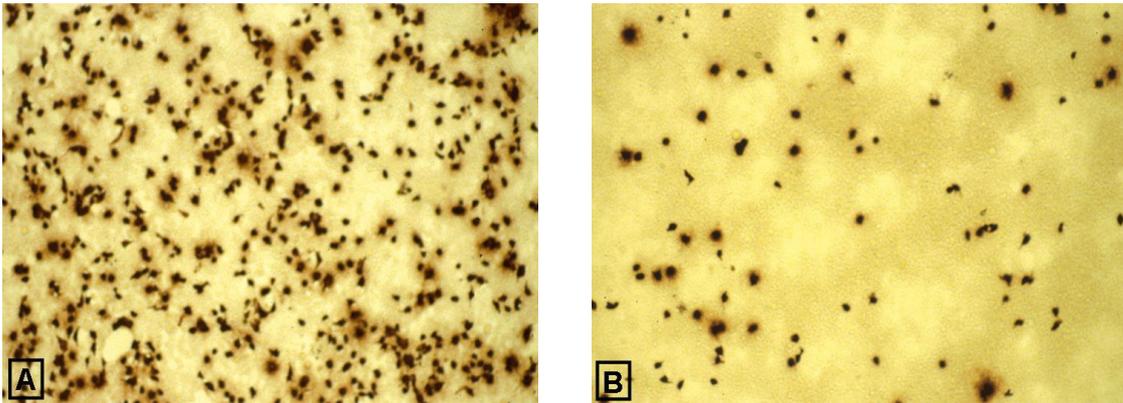
**Abb. 8:** Restriktionsanalyse mit Pac I nach Minipräparation der rekombinanten Klone. Auswahl von Klon 16 (30 und 4 kb-Bande) und 18 (30 und 3 kb-Bande) für nachfolgende Schritte.



**Abb. 9:** Schematische Darstellung der Virenkonstruktion (nach: [110]). Nach Klonierung und Linearisierung des Shuttle-Vektors wird er in BJ5183-Zellen mit der adenoviralen DNA rekombiniert. Anschließend wird das rekombinante Plasmid mit Pac-I geschnitten, aufgereinigt und in HEK293-Zellen transfeziert. In den HEK293-Zellen entstehen die rekombinanten Adenoviren, die im letzten Schritt geerntet werden (s. Kapitel 3. 4. 2 und 3. 4. 3 in Material und Methoden).

### 4. 1. 3 Titer der hergestellten pAdSMA-GFP-Adenoviren

Nach Amplifikation und Ernte der Viren aus den HEK293-Zellen wurde durch den immunologischen Nachweis von viralen Proteinen der Titer bestimmt (s. Abb. 10A und B). Die errechneten Titerwerte des pAdSMA-GFP lagen zwischen  $10^5$  und  $10^8$  Viren pro ml, die von pAdEasy-GFP (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Frau PD Dr. Protzer, Institut für Mikrobiologie des Universitätsklinikums zu Köln; vgl Kapitel 4. 2) zwischen  $10^7$  und  $10^8$  Viren pro ml.



**Abb. 10:** Exemplarische Darstellung einer Titerbestimmung des Konstruktes pAdSMA-GFP in den Verdünnungen  $10^{-2}$ (A) und  $10^{-3}$ (B). Immundetektion der Adenoviren im HEK293-Zellrasen durch anti-adenovirale Antikörper (BD Biosciences, Clontech, Palo Alto, USA) und Substratumsatz durch Peroxidase.

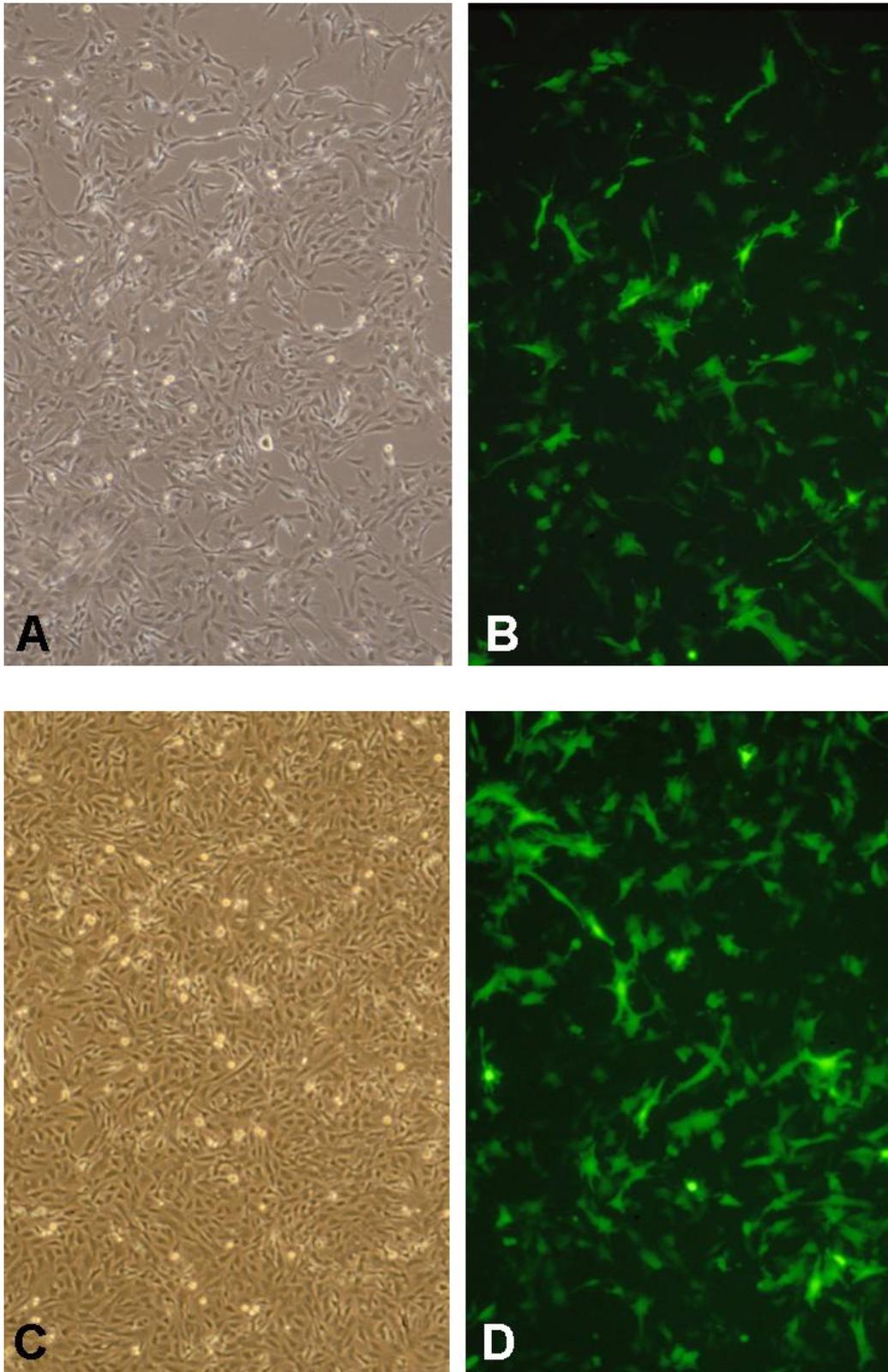
### 4. 2 Zugänglichkeit von Myofibroblasten für adenovirale Infektionen

Um die Empfänglichkeit von myofibroblastischen Zellen gegenüber Viren zu testen, wurden zunächst Versuche mit dem Konstrukt pAdEasy-GFP durchgeführt, bei dem das Reportergen für das GFP durch den ubiquitären CMV-Promotor reguliert wird. Dieses Konstrukt wurde uns freundlicherweise von Frau PD Dr. Protzer (Institut für Mikrobiologie des Universitätsklinikums zu Köln) überlassen. Als myofibroblastische Zellen wurden immortalisierte HSC aus der Ratte (PAV I-Zellen), sowie humane Mesangialzellen infiziert. Als Kontrolle dienten epitheliale Rattenhepatomzellen (LF-CL2A).

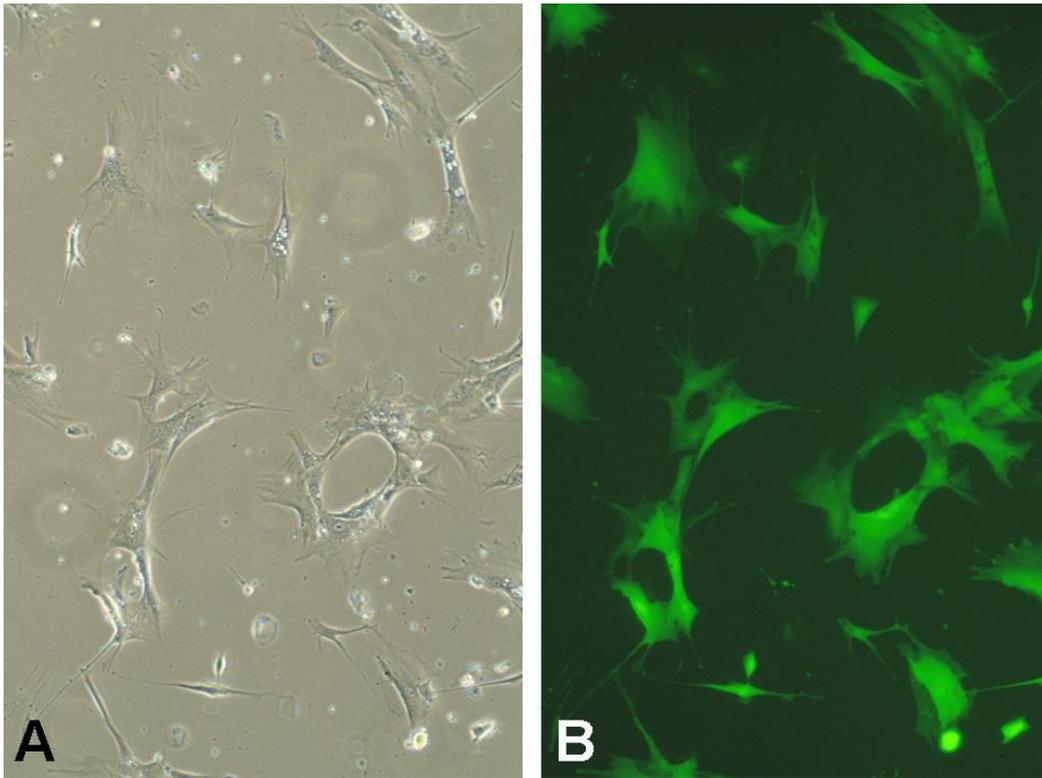
Zunächst wurden die Versuchsbedingungen bezüglich der Infektion mit PAV I-Zellen optimiert. Es erwies sich als sehr effektiv, die in 6-Lochplatten ausplattierten Zellen sofort nach dem Trypsinieren beziehungsweise

Ausplattieren und nicht erst am Folgetag zu infizieren. Die Zellen wurden für die Infektion in verschiedenen Dichten zwischen  $10^5$  und  $7,5 \times 10^5$  Zellen pro Loch ausplattiert, wobei sich eine Dichte von  $2 - 5 \times 10^5$  Zellen (je nach Zelltyp) als am geeignetsten erwies (s. Tabelle 4, S. 40). Dies ermöglichte ein weiteres Wachstum und somit eine längere Beobachtungsmöglichkeit der infizierten Zellen. Die Infektionsdosis wurde ebenfalls variiert, indem MOIs von 0,2 bis 500 eingesetzt wurden. Hierbei wurde beobachtet, dass sich die Fluoreszenz umso früher und stärker ausbildete je höher die verwendete MOI-Zahl gewesen war. Bei hoher Infektionsrate war jedoch der Beobachtungszeitraum aufgrund des stärkeren zytopathischen Effekts eingeschränkt. Für das Konstrukt pAdEasy-GFP konnten mit Werten zwischen 1 und 10 MOI gute Infektionsraten erzielt werden. Bereits einen Tag nach der Infektion wurde die Expression des Reporterproteins unter Fluoreszenzlicht sichtbar.

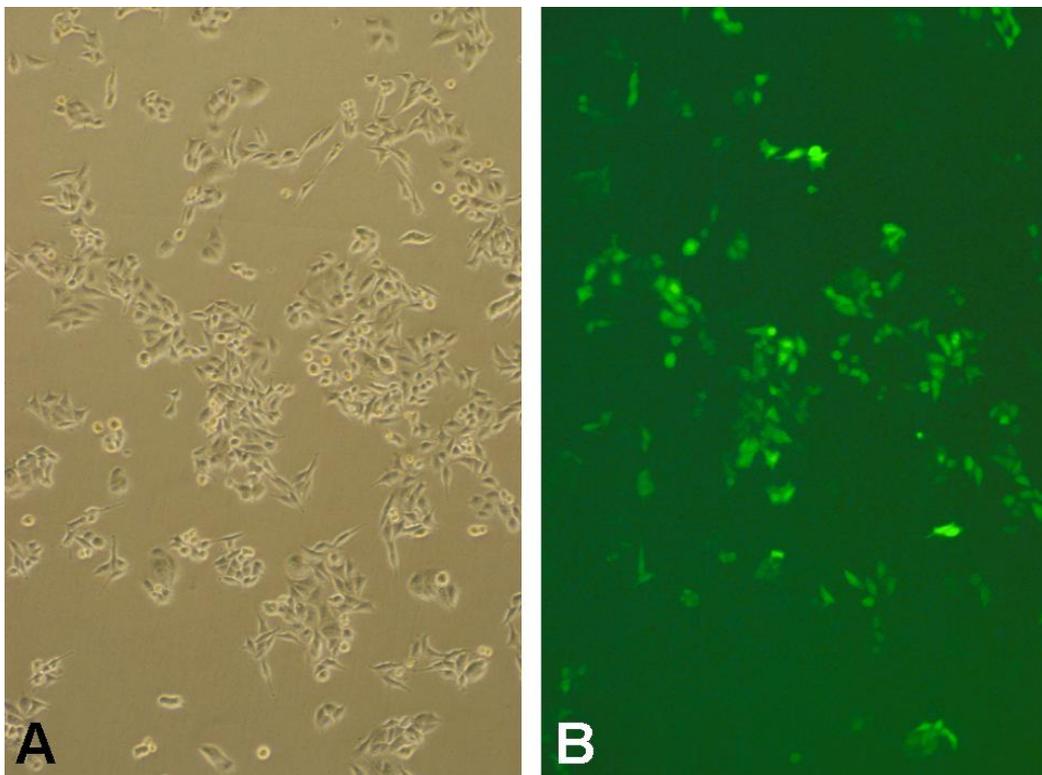
Bei der Infektion der PAV I-Zellen mit 5 MOI war am ersten Tag nach Infektion ungefähr die Hälfte der Zellen grün gefärbt (s. Abb. 11). Im Laufe von drei Tagen nahm sowohl die Anzahl der GFP-fluoreszierenden Zellen als auch die Fluoreszenzintensität zu. Am dritten Tag zeigten nahezu alle Zellen zumindest eine schwache grüne Fluoreszenz, jedoch waren auch vermehrt tote Zellen in der Kulturschale nachweisbar (s. Abb. 11). Dies war einerseits durch die inzwischen eingetretene vollständige Besiedelung der Platten zu erklären, ein beginnender zytopathischer Effekt durch das Virus wäre jedoch zu diskutieren. Auch die epithelialen LF-CL2A- und die Mesangialzellen ließen sich mit dem viralen Konstrukt infizieren. Ähnlich wie bei den HSC exprimierten die infizierten Zellen bereits einen Tag nach Infektion das GFP, wobei Intensität der Fluoreszenz und Menge der exprimierenden Zellen ebenfalls zunahmen (s. Abb. 12 u. 13).



**Abb. 11:** PAV I-Zellen zwei Tage nach Infektion mit 5 MOI pAdEasy-GFP im Hell- (A) und Dunkelfeld (B). PAV I-Zellen drei Tage nach Infektion mit 5 MOI pAdEasy-GFP im Hell- (C) und Dunkelfeld (D) in 100facher Vergrößerung.



**Abb. 12:** Humane Mesangialzellen einen Tag nach Infektion mit 5 MOI pAdEasy-GFP im Hell- (A) und Dunkelfeld (B) in 400facher Vergrößerung.



**Abb. 13:** LF-CL2A-Zellen zwei Tage nach Infektion mit 10 MOI pAdEasy-GFP im Hell- (A) und Dunkelfeld (B) in 100facher Vergrößerung.

Damit konnten alle der eingesetzten Kulturen erfolgreich mit dem adenoviralen Vektor infiziert werden. Eine MOI-Zahl zwischen 1 –10 war sowohl für die mesenchymalen PAV I - und Mesangialzellen als auch für die epithelialen LF-CL2A optimal. Tabelle 4 fasst die Ergebnisse zur optimalen Zell- und MOI-Zahl für Infektionen mit pAdEasy-GFP zusammen.

**Tabelle 4:** Parameter für die Infektion mit pAdEasy-GFP in einer 6-Loch-Platte unter Berücksichtigung der verwendeten Zelltypen

	Zelldichte pro Loch einer 6-Loch-Platte	verwendete MOI-Zahlen mit pAdEasy-GFP
PAV I	$3 \times 10^5$ Zellen	1 – 10 MOI
Humane Mesangialzellen	$2 - 5 \times 10^4$ Zellen	1 – 10 MOI
LF-CL2A	$2 \times 10^5$ Zellen	1 – 10 MOI

#### **4. 3 Myofibroblasten-spezifische Kontrolle der Reporter-expression durch den $\alpha$ -SMA-Promotor**

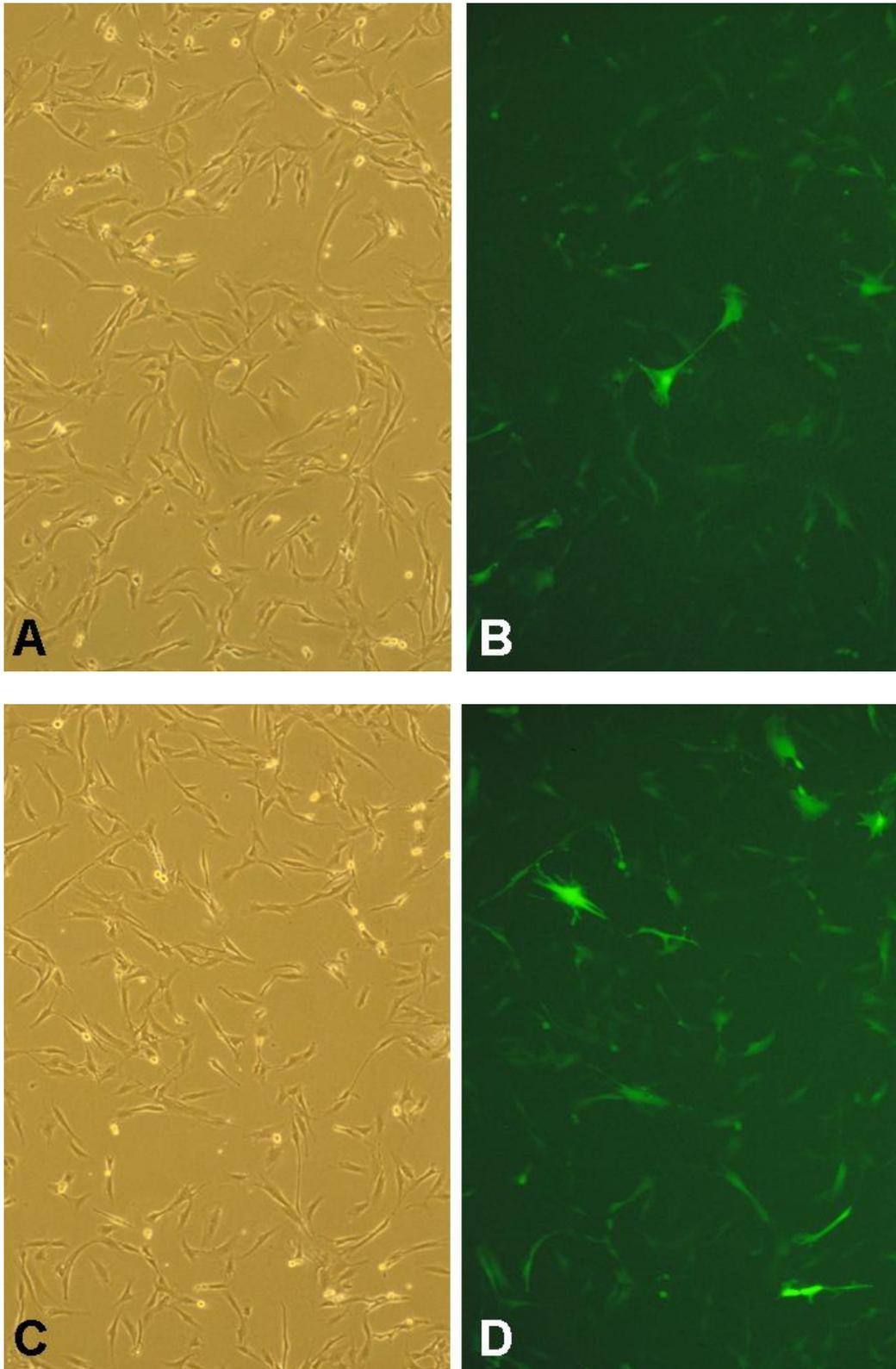
In weiteren Versuchen wurden die Infektionen mit dem in Kapitel 4. 1 beschriebenen viralen Konstrukt pAdSMA-GFP durchgeführt. Bei diesem Virus wird das Reporter-gen GFP durch einen 5´-Sequenzbereich des  $\alpha$ -SMA-Gens reguliert [59]. In zwei Ansätzen sollte das Konstrukt im Hinblick auf die Myofibroblasten-spezifische Direktion der Genexpression kontrolliert werden. In einem ersten Versuch wurde die  $\alpha$ -SMA-Promotor-gesteuerte Reporter-expression in infizierten myofibroblastischen Pav I-Zellen im Vergleich zu der Expression in infizierten epithelialen LF-CL2A auf Zelltypspezifität untersucht. In einem weiteren Ansatz wurde der Frage nachgegangen, ob der adenovirale  $\alpha$ -SMA-Reporter-Vektor auch eine differenzierungsabhängige Kontrolle der myofibroblastischen Genexpression leisten kann. Dazu wurden Mesangialzellen, die nach Infektion zunächst noch ruhten durch mechanischen Stress zur myofibroblastischen Differenzierung stimuliert und die Reporterexpression detektiert.

#### **4. 3. 1 Zelltyp-spezifische Expression des Reporters unter der Kontrolle des $\alpha$ -SMA-Promotors**

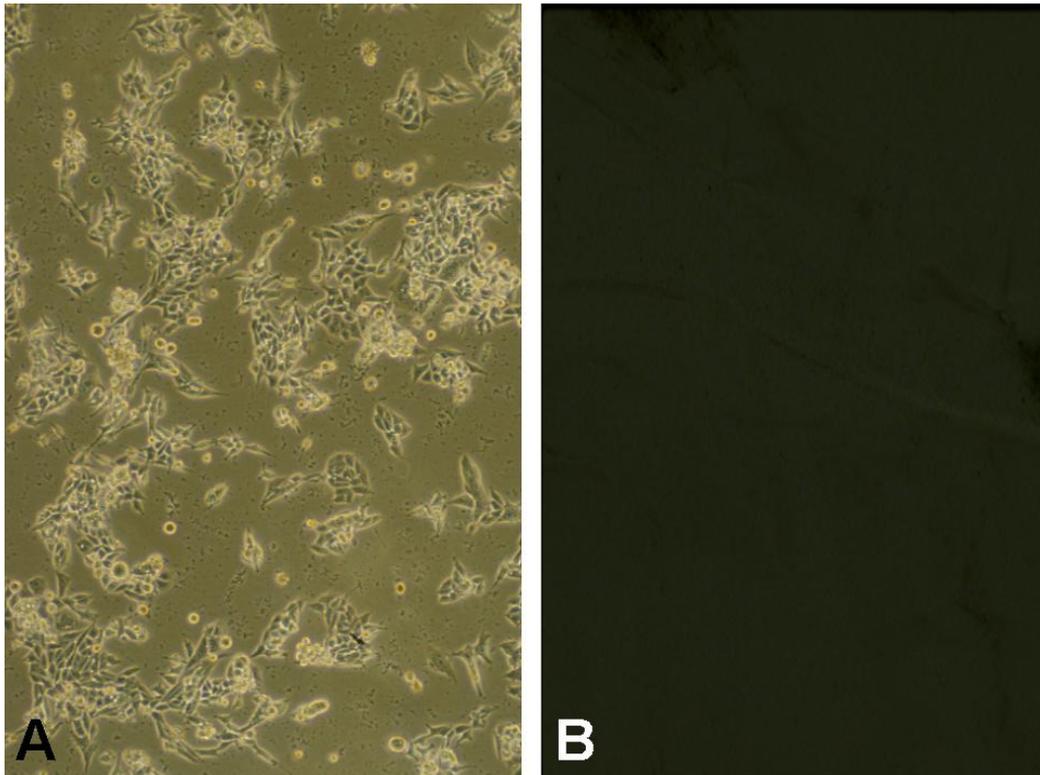
Für die Untersuchung, ob das adenovirale  $\alpha$ -SMA-Promotorkonstrukt Zelltyp-spezifisch die Genexpression in Myofibroblasten dirigieren kann, wurden PAV I-Zellen mit pAdSMA-GFP infiziert. Zunächst wurden 10 MOI eingesetzt (vgl. Tabelle 4), jedoch konnte bei Infektionen mit 10 MOI keine Reporterexpression erzielt werden. Daraufhin wurde die Viruslast erhöht, und die Infektionen wurden mit 40 beziehungsweise 80 MOI durchgeführt. Jetzt zeigten die PAV I zwei Tage nach Infektion erstmals die grüne Fluoreszenz. Diese war sowohl von der Viruslast als auch der Dauer der Viruseinwirkung abhängig (s. Abb. 14). Bei verdoppelter MOI-Zahl war auch eine stärkere Fluoreszenz sichtbar, die in den ersten Tagen nach Infektion weiter zunahm. Die Zellen wurden jeweils über sechs Tage beobachtet.

Die epithelialen LF-CL2A-Zellen wurden mit Werten zwischen 1 und 200 MOI pAdSMA-GFP infiziert, aber im Gegensatz zu den HSC zeigten sie auch nach Haltung über sechs Tage keine Fluoreszenz (s. Abb. 15). In der Positivkontrolle mit pAdEasy-GFP war bereits am ersten Tag nach Infektion eine Fluoreszenz nachweisbar (vgl. Kapitel 4. 2, Abb. 13).

Damit zeigte der adenovirale Vektor unter Kontrolle des  $\alpha$ -SMA-Promotor-fragmentes eine Zelltyp-spezifische Expressionssteuerung.



**Abb. 14:** PAV I-Zellen zwei Tage nach Infektion mit 40 MOI pAdSMA-GFP im Hell- (A) und Dunkelfeld (B). PAV I-Zellen zwei Tage nach Infektion mit 80 MOI pAdSMA-GFP im Hell- (C) und Dunkelfeld (D) in 100facher Vergrößerung.



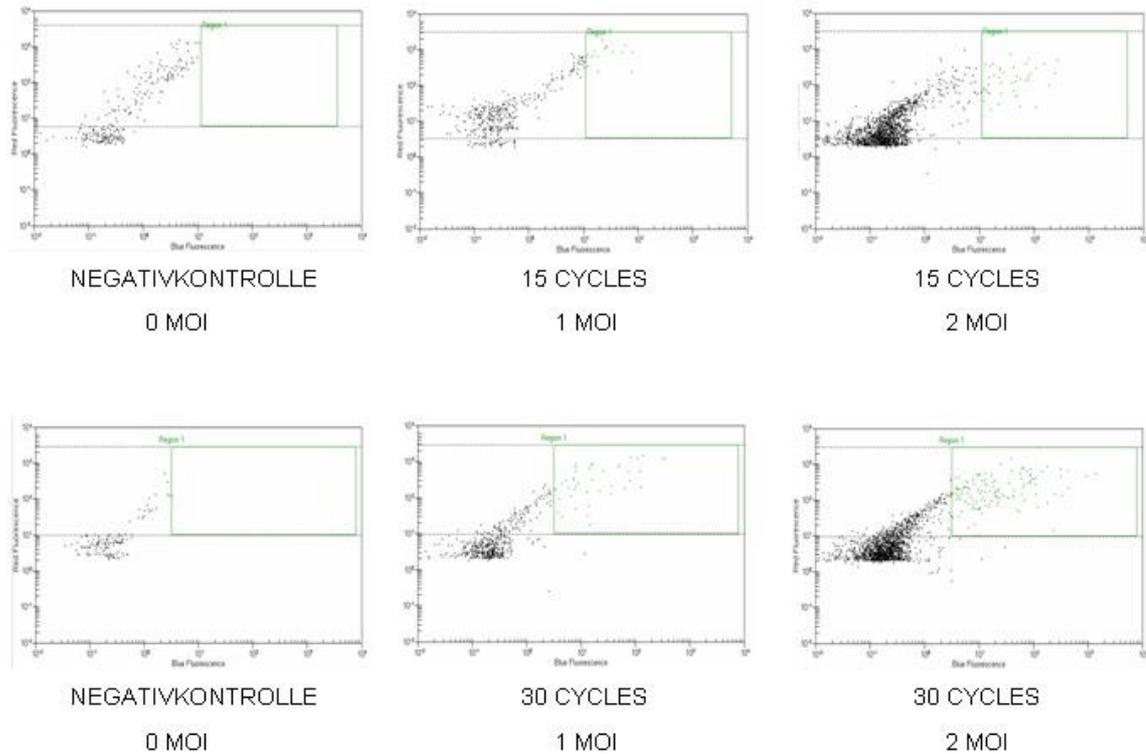
**Abb. 15:** LF-CL2A-Zellen drei Tage nach Infektion mit 100 MOI pAdSMA-GFP im Hell- (A) und Dunkelfeld (B) in 100facher Vergrößerung.

#### **4. 3. 2 Differenzierungsabhängige Regulation der Genexpression durch pAdSMA-GFP**

Die Versuche mit Mesangialzellen wurden in Zusammenarbeit mit Herrn PD Dr. med. Fries (Institut für Pathologie, Köln) durchgeführt.

Zur Induktion der myofibroblastischen Differenzierung wurden humane Mesangialzellen auf elastischen Membranen angezüchtet und mit 1 bzw. 2 MOI des Virus pAdSMA-GFP infiziert. Drei Tage nach Infektion zeigten sie keine Fluoreszenz und wurden dann über einen Zeitraum von 48 Stunden mechanischem Stress ausgesetzt, indem 15- bzw. 30-mal (15 bzw. 30 Zyklen) pro Minute ein Vakuum unter den Membranen erzeugt wurde (vgl. Kapitel 3. 5. 2 in Material u. Methoden). Nach der Stressbehandlung war eine Fluoreszenz nun deutlich sichtbar, und die Expression des GFP-Reporters, reguliert durch den  $\alpha$ -SMA-Promotor, wurde daraufhin quantitativ mit Hilfe eines Bioanalyzers durch Flusszytometrie bestimmt (s. Abb. 16).

Die gemessene GFP-Aktivität war umso höher je stärker der mechanische Stress gewesen war. Bei Verdopplung der Stresszyklen pro Minute auf 30 zeigte sich eine stark erhöhte Aktivität im Vergleich zu 15 Zyklen pro Minute (s. Tabelle 5).



**Abb. 16:** Auszüge der Flusszytometrie von mit pAdSMA-GFP infizierten Mesangialzellen nach 48 Stunden Stretching mit 15 bzw. 30 Stresszyklen pro Minute.

**Tabelle 5:** Reporterexpression (% of gated events) nach myofibroblastischer Differenzierung durch mechanischen Stress (15 bzw. 30 Dehnungszyklen pro Minute)

eingesetzte MOI pAdSMA-GFP	% of gated events (Prozent der registrierten fluoreszierenden Zellen an der Gesamtzellzahl)	
	15 Zyklen	30 Zyklen
0	0,00	0,00
1	6,40	n. b.
1	5,40	29,20
2	2,90	25,80
2	7,30	29,30

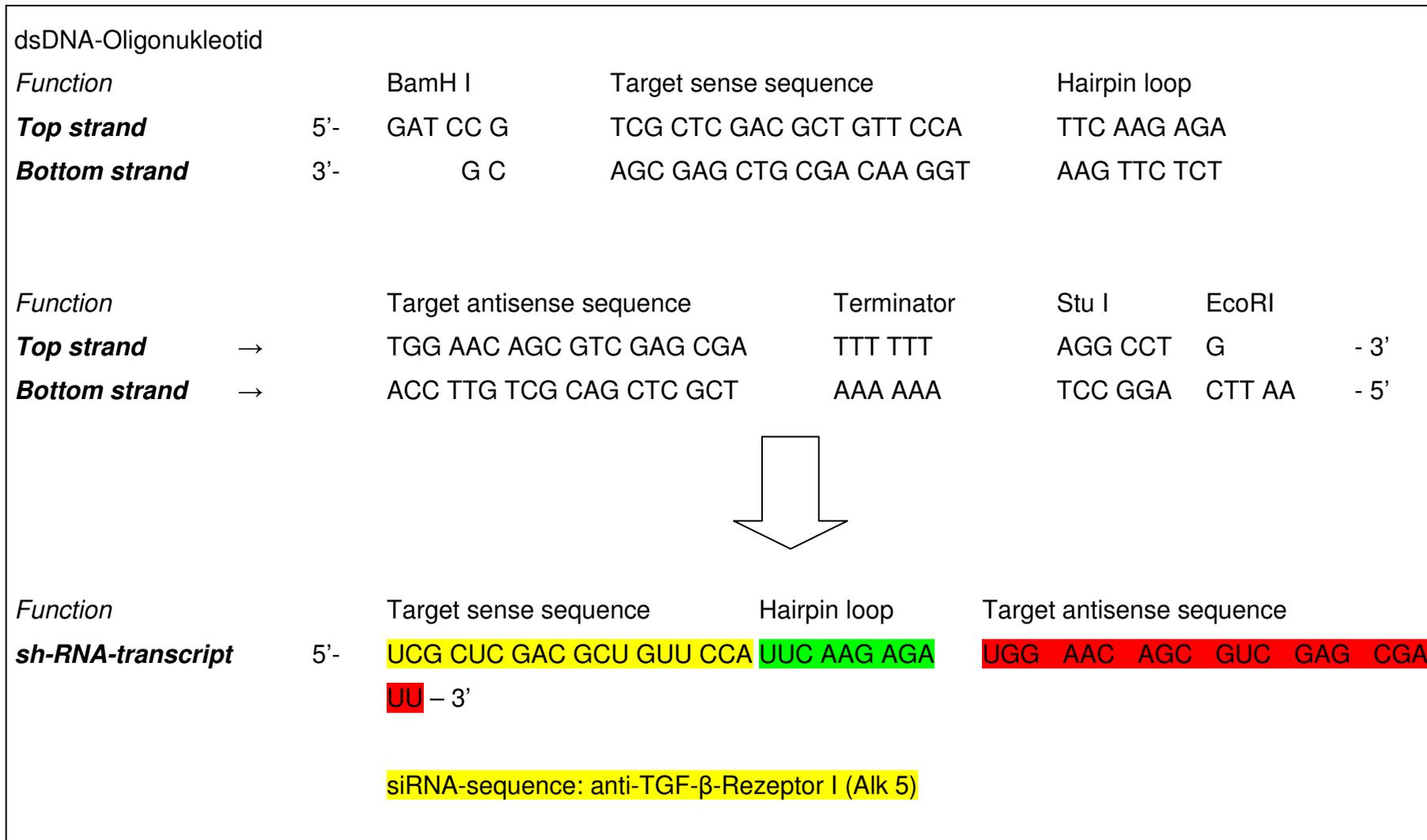
## **4. 4 Hemmung von TGF- $\beta$ durch RNA-Interferenz**

### **4. 4. 1 Herstellung des Virus pAdsiAlk5**

Im zweiten Teil der Arbeit wurde ein weiteres adenovirales Konstrukt geschaffen, mit dem Ziel, die Signalkaskade des fibrogenen Mediators TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor-beta) durch RNA-Interferenz zu hemmen. Die Klonierung des Vektors und Rekombination mit der adenoviralen DNA erfolgte wie unter Material und Methoden (s. Kapitel 3. 4. 1. 2) beschrieben.

Um die silencing RNA (siRNA) in den infizierten Zellen zu exprimieren, musste ein für die entsprechende Sequenz kodierendes Oligonukleotid entworfen werden (s. Abb. 17). Eine spezifische Zielsequenz des Alk5-TGF- $\beta$ -Rezeptors, die mit Hilfe chemisch-synthetisierter siRNA-Konstrukte bereits erfolgreich in RNA-Interferenz-Versuchen untersucht worden war, wurde freundlicherweise von Frau Julia Maurer (Institut für Pathologie der Universität zu Köln, s. Kapitel 3. 4. 1. 2) bereitgestellt. Die Alk5-siRNA-Sequenz war in sense- und antisense-Richtung in dem kodierenden Oligonukleotidstrang enthalten, wobei die komplementären Stränge durch eine Loop-Sequenz unterbrochen waren. So kodierte das Oligonukleotid für eine anti-Alk5 small hairpin (sh) RNA (s. Abb. 17 und 18). Flankierend zu der Alk5-shRNA-Sequenzregion wurden geeignete Restriktionsschnittstellen *Stu*I und *Bam*HI eingefügt, um eine Bestätigung der erfolgreichen Vektorklonierung durch anschließende Restriktion sowie gelelektrophoretische Analyse zu ermöglichen (s. Abb. 17 und 19).

Das entworfene Oligonukleotid wurde nun in einen Vektor kloniert, der einen U6-Promotor enthielt, an den die zelleigene RNA-Polymerase III binden und die shRNA synthetisieren konnte (s. Abb. 19 und Kapitel 3. 4. 1. 2).



**Abb. 17:** Sequenz des entworfenen dsDNA-Oligonukleotids, aus der die anti-TGF-β-Rezeptor I (Alk 5) small hairpin RNA-(shRNA) resultiert (siehe Text).

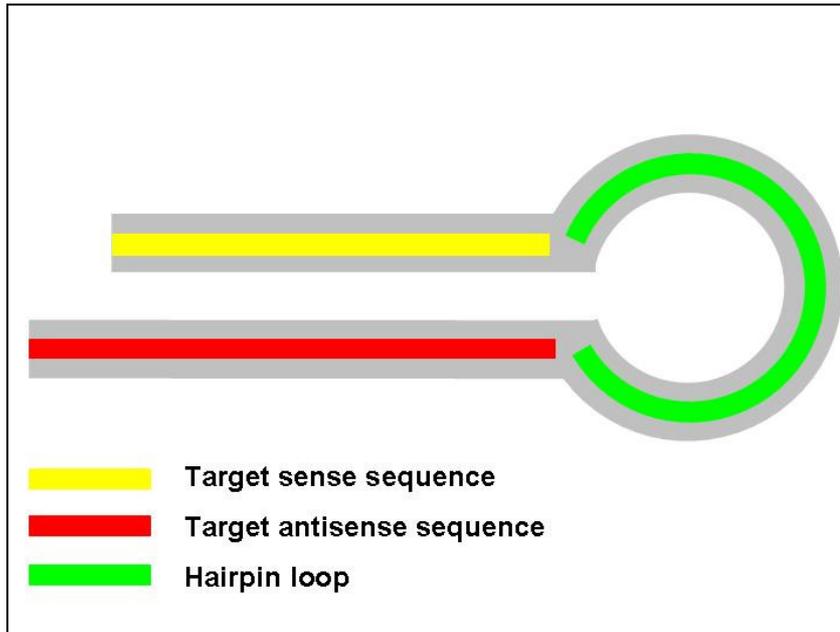


Abb. 18: Faltung des shRNA-Transkripts durch Basenpaarung mit Ausbildung des Hairpin loops. (Vgl. Abb. 17)

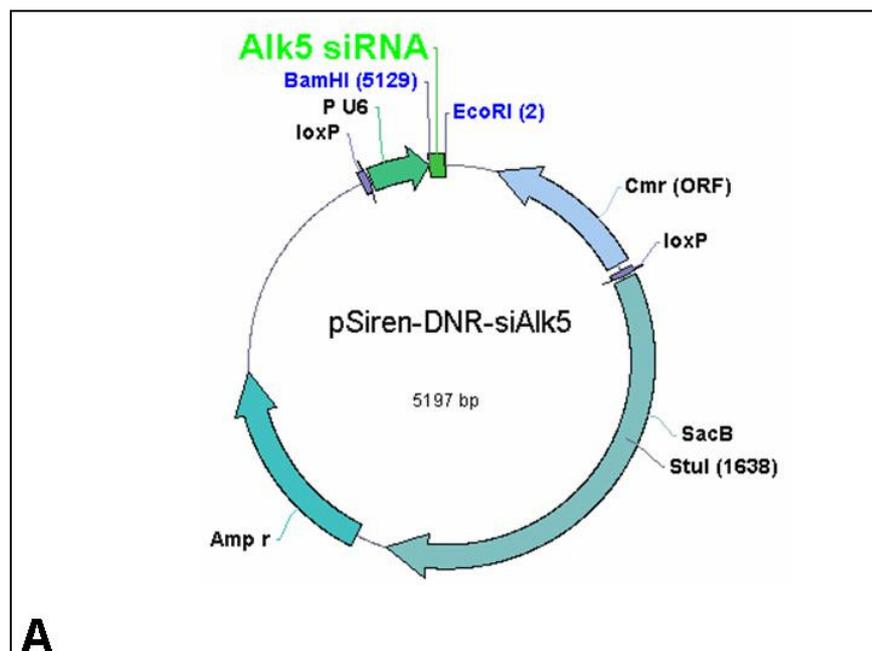


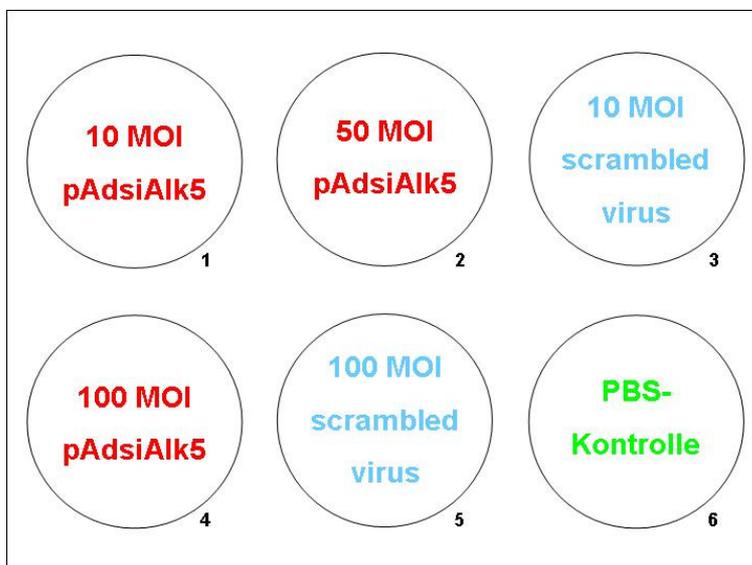
Abb.19: Vektorkarte des pSiren-DNR-siAlk5 mit Markierung der Insertionschnittstellen BamHI und EcoRI

Die erfolgreiche Klonierung wurde durch Sequenzierung verifiziert. Nach Rekombination mit dem adenoviralen Backbone konnten die korrekten Rekombinanten mittels PCR durch den Nachweis des 660 bp-großen Amplifikats identifiziert werden (s. 3. 4. 1. 2, s. Abb. 5).

Wie im Abschnitt Material und Methoden beschrieben, wurden aus dem rekombinanten adenoviralen Plasmid Viren angezüchtet. Es wurde hierbei ein Titer von  $10^9$  Viren pro ml erreicht.

#### 4. 4. 2 Infektionsversuche mit pAdsiAlk5

In ersten Infektionsversuchen mit pAdsiAlk5 wurden PAV-I-Zellen, die in 6-Loch-Platten mit jeweils 2,5 bzw.  $4 \times 10^5$  Zellen pro Loch ausplattiert worden waren, mit verschiedenen MOI-Werten infiziert. Der genaue Versuchsaufbau ist dem Schema in Abbildung 20 zu entnehmen. Zur Kontrolle wurde jeweils ein Loch nur mit PBS versehen, sowie Zellen zur Negativkontrolle mit einem scrambled Virus infiziert, der für eine Nonsense-siRNA kodiert, und mir freundlicherweise von Herrn Dr. A. Oberthür (Universitäts-Kinderklinik Köln) zur Verfügung gestellt wurde.

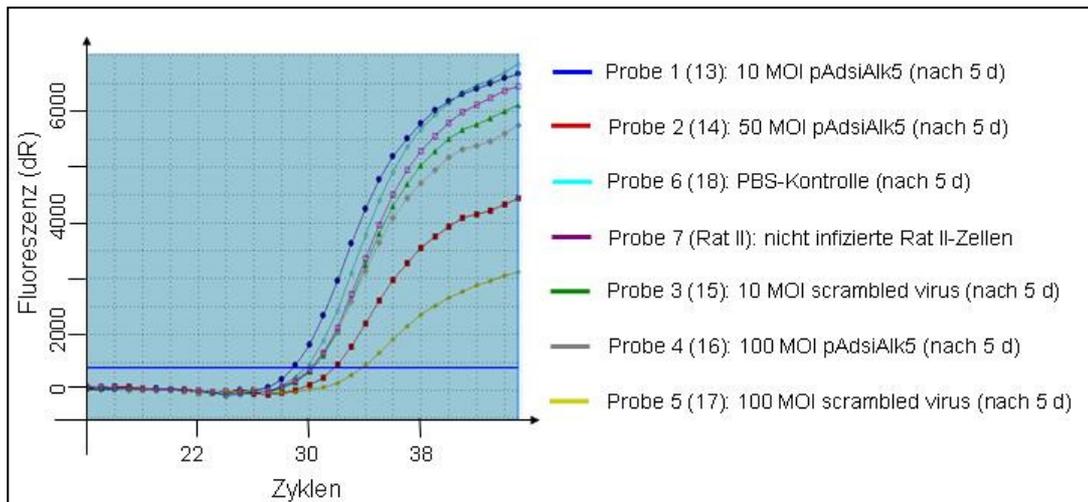


**Abb. 20:** Versuchsaufbau der pAdsiAlk5-Infektion von PAV-I-Zellen.

Der Versuch wurde parallel auf zwei 6-Loch-Platten durchgeführt. Die Zellernte erfolgte fünf Tage nach Infektion (vgl. Kapitel 3. 5. 5).

Die Ergebnisse der Infektionsversuche wurden durch eine PCR überprüft. Dafür wurden RNA isoliert und die Transkriptlevel von Alk-5 bestimmt.

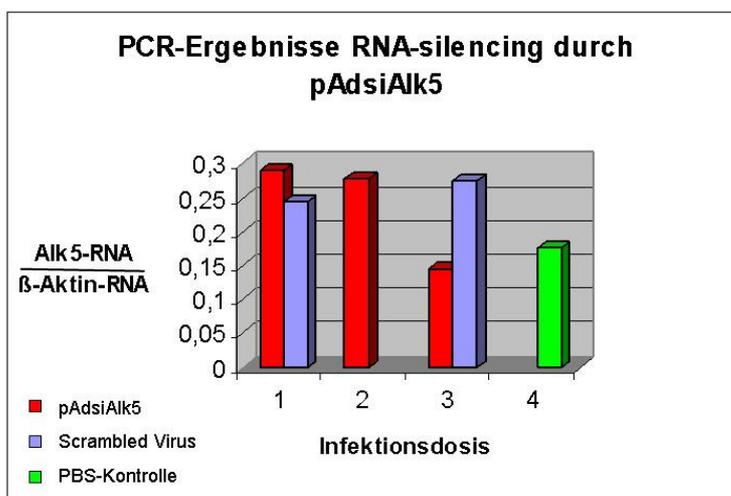
In der PCR zeigte sich bei den mit 10 MOI pAdsiAlk5 infizierten Zellproben keine verminderte Synthese des Alk5-Transkriptes im Vergleich mit der PBS-Kontrolle sowie der Negativkontrolle in Form von nicht infizierten Rat II-Zellen. Bei der 50 MOI-Probe zeigte sich hingegen eine stark verminderte siAlk5-Aktivität. Bei den mit 100 MOI pAdsiAlk5 infizierten Zellen zeigte sich kein weiterer Trend in Richtung eines erniedrigten Transkriptlevels. Auch unter Einfluss des scrambled Virus wurden sowohl beim Einsatz von 10 als auch besonders von 100 MOI eine spätere und geringere Amplifikation des Alk 5-Transkriptes beobachtet (s. Abb. 21).



**Abb. 21:** Ergebnisse der PCR mit Bestimmung von Alk5. Aufgetragen ist die Fluoreszenz in Abhängigkeit der PCR-Zyklen.

Zur Normalisierung wurde der  $\beta$ -Aktin-Transkriptlevel herangezogen (vgl. Kapitel 3. 5. 5). Nach Normalisierung gegen  $\beta$ -Aktin zeigte sich bei den mit pAdsiAlk5-infizierten Zellen (rot in Abb. 22) gegenüber den mit scrambled Virus behandelten (blau in Abb. 22) bei hoher Viruslast ein erniedrigter Transkriptlevel von Alk5 (s. Abb. 22). Bei Einsatz von 10 MOI pAdsiAlk5 (rot) und 50 MOI pAdsiAlk5 (rot) konnte keine Hemmung des Alk5-Transkriptes beobachtet werden, jedoch war nach Infektion mit 100 MOI pAdsiAlk5 der Transkriptlevel um fast 50 % erniedrigt.

In der PBS-Kontrolle (grün) wurden ebenfalls sehr niedrige Transkriptlevel bestimmt.



**Abb. 22:** Ergebnisse der PCR nach Normalisierung. Aufgetragen ist die relative Alk5-RNA in Abhängigkeit von der Infektionsdosis. Probe 1 entspricht hierbei einer Dosis von 10 MOI pAdsiAlk5 bzw. scrambled Virus. In Probe 2 wurden 50 MOI pAdsiAlk5 eingesetzt sowie in Probe 3 100 MOI pAdsiAlk5 bzw. scrambled Virus (vgl. Abb. 20).

## 5. Diskussion

### 5.1 Genetische Manipulation von myofibroblastischen HSC mit Hilfe von Adenoviren Typ 5

Mit der vorliegenden Arbeit wurde ein System für den Gentransfer mit Hilfe von Adenoviren Typ 5 etabliert.

Als myofibroblastische Zellreihe wurden PAV I-Zellen ausgewählt, eine immortalisierte Zelllinie von HSC aus der Ratte [104]. PAV I ließen sich mühelos mit den verwendeten adenoviralen Konstrukten infizieren, was sich durch die Expression des Reporterproteins GFP bereits einen Tag nach Infektion qualitativ zeigen ließ (s. Kapitel 4. 2).

Für die Infektion wurden MOIs von 1 bis 80 eingesetzt, um gute Infektionsergebnisse zu erzielen (s. Kapitel 4. 2 und 4. 3. 1 in Ergebnisse). Bezüglich der eingesetzten MOI-Zahlen finden sich in der Literatur unterschiedliche Angaben. So erreichten Weiskirchen et al. mit dem Einsatz von 10 MOI eine 100%-ige Infektionsrate [118], während Isono et al. 50 MOI einsetzen mussten [52]. In einer anderen Studie wurden mit 20 MOI über 95 % der HSC infiziert [70]. Dies könnte einerseits daran liegen, dass teils mit primären, teils mit immortalisierten Zellen gearbeitet wurde, andererseits wurden auch andere Expressionskassetten transduziert. In allen Fällen wurde die untersuchte Genexpression von einem Cytomegalievirus(CMV)-Promotor dirigiert [52, 118]. Es müssen jedoch viele Variablen wie z. B. Virustyp oder Intervall zwischen Infektion und Auswertung berücksichtigt werden, will man Gentransfer in verschiedenen Systemen mit verschiedenen Konstrukten vergleichen [123].

Bei den Versuchen mit dem Konstrukt pAdEasy-GFP, das ebenfalls einen CMV-Promotor enthält, reichten Werte zwischen 1 und 10 MOI für eine flächendeckende Infektion aus (vgl. Kapitel 4. 2). Um mit dem pAdSMA-GFP-Konstrukt ebenso gute Ergebnisse zu erreichen, mussten PAV I-Zellen jedoch mit höheren MOI-Zahlen (z. B. 40 MOI) infiziert werden. Da die Expression des untersuchten Gens abhängig von der Art des Promotors ist, muss dies bei den Infektionsdosen berücksichtigt werden. Eine derartige Fragestellung ist bereits von Teramoto et al. am Beispiel von humanen Lungenfibroblasten untersucht

worden. Hier wurden die Kinetik und Infektionseffizienz zweier adenoviraler Konstrukte mit unterschiedlichen Promotoren, dem CMV- und RSV LTR-Promotor, verglichen. Es konnte in diesem Fall kein Unterschied in der Kinetik beider Konstrukte festgestellt werden [112]. Vergleichbare Untersuchungen über die Kinetik des  $\alpha$ -SMA-Promotors, die die Beeinflussung des Gentransfers von dieser Seite aus beleuchten könnten, stehen zurzeit nicht zur Verfügung. Eine dosisabhängige Beziehung zwischen der eingesetzten MOI-Zahl und der Effizienz des Gentransfers konnte hingegen mehrfach belegt werden [18, 52, 112, 123]. Dass die Expressionsstärke des transduzierten Gens abhängig von der Viruslast respektive der eingesetzten MOI ist, konnte auch ich in Versuchsreihen beobachten, in denen die Zellen zeitgleich mit verschiedenen MOI infiziert wurden (s. Kapitel 4. 3. 1).

*In vitro* lassen sich HSC, wie gezeigt, sehr gut mit Adenoviren vom Typ 5 genetisch manipulieren. Ob Adenoviren jedoch auch für den gentherapeutischen Einsatz *in vivo* geeignet sind, ist noch fraglich. Es stellen sich hier grundsätzlich zwei Problemfelder dar. Zum einen ist der Hepatotropismus der Adenoviren zu erwähnen [69], zum anderen ist die durch Adenoviren hervorgerufene Immunantwort und Entzündungsreaktion zu berücksichtigen [12, 81, 82, 111]. In der Literatur finden sich diverse Studien über *In vivo*-Versuche mit Adenoviren an Rattenfibrosemodellen. Ein positiver Effekt des eingebrachten Gens, z. B. die Verminderung des Fibrosegrads, ist oftmals nachzuweisen [1, 11, 51, 60, 108]. Imuro et al. konnten z. B. durch ein adenovirales Konstrukt, das humane Matrix Metalloproteinase-1 transferierte, eine deutliche Milderung einer experimentellen Leberfibrose in Ratten bewirken. Im Rahmen derselben Studie wurde die Effizienz der adenoviralen Infektion durch einen Kontrollvektor mit einer LacZ-Expressionskassette nachverfolgt. Die X-gal-Färbung zeigte, dass 90 % der Hepatozyten, aber nur 25 % der nicht-parenchymalen Zellen, zu denen die HSC gehören,  $\beta$ -Galactosidase-positiv, das heißt infiziert waren [51]. In einer anderen Studie wurde explizit die Infizierbarkeit von Hepatozyten und nicht-parenchymalen Zellen der Leber (HSC, Endothelzellen) verglichen. Hier konnte *in vitro* eine bessere Infektionseffizienz für HSC als für Hepatozyten bei diversen Infektionsdosen gezeigt werden. *In vivo* verhielt es sich jedoch umgekehrt, so dass vermehrt Hepatozyten infiziert wurden. Wie in *In vitro*-Versuchen war die Effizienz umso besser, je höher der eingesetzte Titer war.

Des Weiteren wurde demonstriert, dass in geschädigtem Lebergewebe für alle Zelltypen die Infizierbarkeit erheblich herabgesetzt ist. Als Ursache hierfür werden morphologische Änderungen, die mit der Gewebsschädigung einhergehen und z. B. den Rezeptor für Adenoviren betreffen, diskutiert [123].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Leber gut von Adenoviren erreicht wird, es aber schwierig ist, nicht-parenchymale HSC, beziehungsweise Myofibroblasten im Besonderen, anzusprechen.

Zusätzlich stellt sich das Problem der immunologischen Reaktion auf Infektionen mit Adenoviren dar. Primaten (Affen) reagierten auf adenovirale Infektionen via Portalvene oder V. saphena magna mit akuter Hepatitis sowie mit einer Immunantwort sowohl gegen den Vektor als auch gegen das transgene Produkt. Wurden die Primaten zusätzlich mit Immunsuppressiva behandelt, konnte keine Entzündung nachgewiesen werden [111]. Yang et al. zeigten, dass virale Antigene eine große Rolle in der Immunreaktion spielen und z. B. dazu führen können, dass infizierte Leberzellen von zytotoxischen T-Lymphozyten eliminiert werden [121]. In weiteren Versuchen mit Primaten wurde versucht, die Behandlung durch gezieltes Applizieren der Viren in nur einen Leberlappen zu optimieren. Eine portale Entzündung wurde aber dennoch in der gesamten Leber gefunden. Eine weitere Beobachtung war, dass trotz intrahepatischer Infusion bei hohen Virusdosen adenovirale DNA sowohl in den Gonaden als auch in Hirngewebe durch PCR nachweisbar war [91]. Eine neuere Untersuchung hat ergeben, dass bei retrograder Infusion der Viren über den Ductus hepaticus communis eine effiziente Genexpression erzielt werden kann, ohne ernsthafte entzündliche Nebeneffekte hervorzurufen [67]. Prinzipiell ist festzuhalten, dass für einen wirkungsvollen Einsatz *in vivo* die Weiterentwicklung adenoviraler Vektoren erforderlich ist, um eine kontraproduktive Immunantwort zu umgehen [14, 121]. Überdies gibt es Ansätze, dass durch die Promotorwahl die Immunreaktion moduliert werden kann sowie der Einsatz von Helfervirus-abhängigen oder adeno-assoziierten Konstrukten immunologisch günstig sein kann [7, 77, 80, 81, 87-89, 113, 125]. Letztlich kann alternativ die Gentherapie mit Hilfe von Retroviren erwogen werden.

Abschließend kann gesagt werden, dass sich adenovirale Vektoren für *In vitro*-Versuche als äußerst brauchbares System erwiesen haben, um gentherapeu-

tische Ansätze zu untersuchen, beziehungsweise Konstrukte in Verbindung mit einem spezifischen Promotor wie im Fall meiner Arbeit zu evaluieren. Eine eventuelle Umklonierung in möglicherweise geeignetere virale Konstrukte für die Übertragung auf *In vivo*-Modelle kann nach Etablierung des Systems folgen.

## 5.2 Adenovirale Expression unter Kontrolle des $\alpha$ -SMA-Promotors

Ein wesentlicher Teil der vorgelegten Arbeit bestand darin, ein Konstrukt herzustellen, das eine durch den  $\alpha$ -SMA-Promotor gesteuerte Expressionskassette enthält. Grundlage für diesen experimentellen Ansatz ist die Notwendigkeit, eine möglichst Zelltyp-spezifische genetische Manipulation von myofibroblastischen HSC erreichen zu können.

Das kontraktile Protein  $\alpha$ -SMA wird sowohl in glatten (vaskulären) Muskelzellen [28, 36, 90], in bestimmten Tumorzellen [16], vorübergehend während der Entwicklung in Herz- und Skelettmuskelzellen [101, 119] als auch typischerweise in Myofibroblasten [26, 90, 100, 114] exprimiert.

Es ist bekannt, dass HSC im Rahmen der Fibrogenese eine Umdifferenzierung zu Myofibroblasten durchmachen, die durch Bildung extrazellulärer Matrix und typischer Strukturproteine, besonders  $\alpha$ -SMA, charakterisiert ist [21, 90, 98]. Bei Zunahme des Schweregrads der Leberschädigung wurde auch eine Zunahme in der Expressionsstärke des so genannten Markerproteins  $\alpha$ -SMA beobachtet [120].

Es hat sich gezeigt, dass regulatorische Bereiche des  $\alpha$ -SMA-Gens geeignet sind, myofibroblastische Zellen genetisch anzusprechen. Sanz et al. führten Versuche mit transgenen Mäusen bzw. daraus gewonnenen primären HSC durch, die Insulin-like growth factor unter der Direktion eines  $\alpha$ -SMA-Promotors exprimierten. Die Expression des Transgens konnte *in vitro* in aktivierten HSC nachgewiesen werden, nicht jedoch in ruhenden. Auch *in vivo* wurde das Transgen in der Leber gebildet, es war aber nicht möglich, die Expression genau zu lokalisieren [102]. Eine Induktion in anderen  $\alpha$ -SMA-bildenden Zellen, z. B. in den Lebergefäßen, ist folglich nicht auszuschließen, zumal es sich hier um den SMP8 handelte, ein Promotorkonstrukt, das aus glatten Muskelzellen

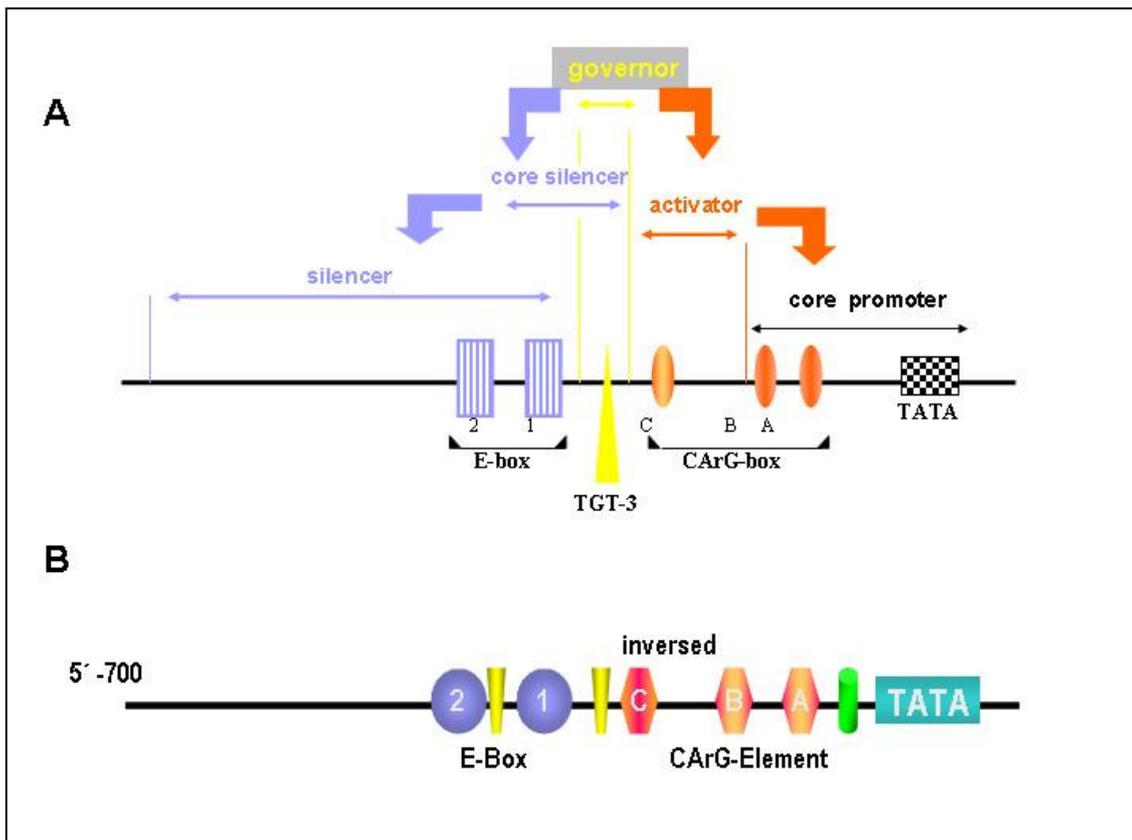
der Maus stammt und vor allem zur Manipulation dieser Zellen eingesetzt wurde [117].

Bei der Untersuchung des  $\alpha$ -SMA-Gens wurde festgestellt, dass die Sequenzen, die für die transkriptionelle Aktivierung des  $\alpha$ -SMA-Promotors Voraussetzung sind, in Abhängigkeit von Differenzierungsstadium und Zelltyp variieren [10, 15, 27, 76, 78, 84]. Owens et al. haben *in vivo* mit einem Promotorkonstrukt, das 2600 bp des 5'- $\alpha$ -SMA-Bereiches und das erste Intron enthält, in glatten Gefäßmuskelzellen eine hochgradige  $\alpha$ -SMA-Expression erreichen können, die sich in ihrem Muster anscheinend wie die endogene verhielt. Außerdem exprimierten in adultem Gewebe keine anderen Muskelzellen oder allgemein keine „nicht glatten Muskelzellen“ das durch diesen Promotor dirigierte Transgen [71].

Da im Gegensatz hierzu in der Fibrosebehandlung nun Myofibroblasten Ziel des gentherapeutischen Ansatzes sind, wurde für die vorliegende Arbeit ein Promotorabschnitt gewählt, der *in vitro* unter den  $\alpha$ -SMA-bildenden Zellen spezifisch in Myofibroblasten aktiviert wird. Es handelt sich hierbei um ein Konstrukt mit einer Länge von 700 bp im 5'-Bereich des Genes. Odenthal und Jung haben diesen Abschnitt charakterisiert und gezeigt, dass er in der Lage ist, Expressionskassetten, die mit ihm operativ verknüpft sind, in Myofibroblasten oder Myofibroblasten-ähnlichen Zellen zu dirigieren [58, 59]. In diesem 700-bp-Konstrukt sind sowohl aktivierende als auch inhibierende Elemente enthalten, die die Transkription des Gens regulieren (s. Abb. 23) [58]. *In vivo* konnte die Funktion der Promotorsequenz in Myofibroblasten ebenfalls anhand eines Mausmodells gezeigt werden, jedoch war die Promotoraktivität auch in anderen Zellpopulationen wie viszeralen glatten Muskelzellen nachweisbar [63]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das beschriebene 700 bp-Konstrukt des  $\alpha$ -SMA-Promotors operativ mit dem Reporterprotein GFP verknüpft und erstmals in einen adenoviralen Vektor integriert. Auch mittels adenoviraler Infektion konnte die Expression des Transgens, dirigiert durch den  $\alpha$ -SMA-Promotor-700, in myofibroblastischen HSC induziert werden.

PAV I-Zellen wurden mit pAdSMA-GFP infiziert und zwei Tage später wurde das GFP in der Fluoreszenzmikroskopie sichtbar. Demgegenüber wurde das Reporterprotein in Hepatomzellen nicht exprimiert (s. Kapitel 4. 3. 1).

Hiermit ist nun ein praktikables Werkzeug geschaffen, um das Promotor-konstrukt auch *in vivo* testen zu können, damit die genregulatorische Funktion dieses Bereiches verifiziert werden kann. Des Weiteren wird es möglich sein, mit dem Promotor kombinierte mögliche therapeutische Transgene in ihrer Wirkung zu untersuchen.



**Abb. 23:** Schematischer Aufbau des Myofibroblasten-spezifischen Basenabschnitts -700 bis + 22 des  $\alpha$ -SMA-Promotor mit aktivierenden (rot) und inhibierenden (blau) Elementen (A). Vereinfachte Darstellung (B).  
(Freundlich überlassen von Frau Priv.Do. Dr. M. Odenthal)

### 5.3 Differenzierungsabhängige Expression von GFP unter Kontrolle des $\alpha$ -SMA-Promotors in humanen Mesangialzellen

Nachdem die Zelltyp-spezifische Regulation des Konstruktes nachgewiesen worden war, wurde in einem zweiten Schritt die differenzierungsabhängige, nach myofibroblastischer Transformation aktivierte Steuerung in Mesangialzellen gezeigt.

Mesangialzellen sind im Glomerulus der Niere lokalisiert und spielen eine große Rolle in der Pathogenese glomerulärer Nierenerkrankungen. Wie die HSC in der Leber können sich auch Mesangialzellen in pathologischen Situationen unter dem Einfluss bestimmter Signalstoffe zu Myofibroblasten umwandeln. Im Rahmen dessen bilden sie folglich ebenfalls das  $\alpha$ -SMA [37, 48, 116].

Die in der vorgelegten Arbeit gezeigte gute Infizierbarkeit von Mesangialzellen bestätigt die Ergebnisse anderer Studien [38, 45, 83, 115]. *In vitro* konnte sowohl in humanen Zellen als auch in solchen aus der Ratte eine Infektionsrate von bis zu 100 % erzielt werden [45, 83]. Des Weiteren konnte auch gezeigt werden, dass infizierte Zellen *per se* gegenüber Wildtypzellen keine Änderungen in Morphologie, Phänotyp und Metabolismus aufwiesen [83].

Auch in der vorgelegten Arbeit konnten humane Mesangialzellen unter *In vitro*-Bedingungen mit adenoviralen Konstrukten nachweislich infiziert werden. Einen Tag nach Infektion mit pAdEasy-GFP wurde das Reporterprotein bereits exprimiert (s. Kapitel 4. 2).

Bezüglich der Übertragung auf *In vivo*-Versuche stellt sich wiederum die Notwendigkeit der Zelltyp-spezifischen Direktion der Transgenexpression dar. Nach Infusion der Adenoviren über die *A. renalis in vivo* sowie in *Ex vivo*-Versuchen mit Transplantaten konnte das Transgen sowohl in Mesangialzellen als auch in Fibroblasten, Podozyten und Tubulusepithelzellen nachgewiesen werden.

Darüber hinaus wurde in *Ex vivo*-Versuchen eine starke Genexpression in der Leber beobachtet [34].

In pathophysiologischen Zuständen kann man sich hier wiederum die  $\alpha$ -SMA-Expression aktivierter Mesangialzellen zu Nutze machen. Es liegen bereits Untersuchungen zum  $\alpha$ -SMA-Promotor in Mesangialzellen vor, die die Aktivierung unter pathologischen Bedingungen beschreiben [62]. *In vitro* konnte mit

einem circa 900 bp-langen Promotorkonstrukt eine starke Transkription der nachgeschalteten Expressionskassette erreicht werden [107]. Kitamura und Kawachi konnten zeigen, dass *in vivo* Transgene unter Kontrolle des  $\alpha$ -SMA-Promotors in Nieren mit Glomerulonephritis exprimiert wurden, während in gesundem Nierengewebe keine Expression induziert wurde [66].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden humane Mesangialzellen mit dem in Kapitel 4. 2 beschriebenen pAdSMA-GFP-Konstrukt infiziert und drei Tage später für 48 Stunden mechanischem Stress durch ein Vakuum-Stretch-System ausgesetzt. Es ist bekannt, dass Mesangialzellen unter mechanischer Stress-Belastung ihre Morphologie, Wachstumseigenschaften und metabolische Aktivität ändern. Sie bilden z. B. vermehrt Kollagene und ihre Proliferationsrate wird gesteigert [17, 47, 93-96, 122]. In unserem Versuch wurde festgestellt, dass der  $\alpha$ -SMA-Promotor in den Zellen unter mechanischem Stress aktiviert wird. Als Positivkontrolle wurden die Mesangialzellen gleichzeitig mit dem CMV-Konstrukt pAdEasy-GFP infiziert. Hier konnte das GFP auch vor Beginn des Stretchings detektiert werden, während die pAdSMA-GFP-infizierten Zellen noch keine Fluoreszenz zeigten. Nach 48 Stunden Stretching mit einmal 15 und einmal 30 Zyklen pro Minute wurden die Zellen geerntet und die Fluoreszenz flusszytometrisch bestimmt. Jetzt war das Transgen auch unter Kontrolle des  $\alpha$ -SMA-Promotors exprimiert worden. Darüber hinaus konnte bei stärkerem Stretching auch eine stärkere Expression festgestellt werden (s. Kapitel 4. 3. 2). Ähnliche Beobachtungen konnten von Efendy und Campbell in *In vivo*- / *In vitro*-Versuchen mit peritonealem Narbengewebe gemacht werden. Hier wurde durch Einbringen eines Röhrchens in die Peritonealhöhle die Entstehung von Granulationsgewebe induziert, welches daraufhin in die Aorta transplantiert beziehungsweise entnommen und in einem Gerät mechanischem Stress durch Stretching unterzogen wurde. Sowohl unter Einfluss der hämodynamischen als auch unter dem der mechanischen Belastung konnte eine Transdifferenzierung in Myofibroblasten beobachtet werden [24].

Um noch mehr über die  $\alpha$ -SMA-kontrollierte Reporterexpression unter mechanischem Stress aussagen zu können, müsste der Versuch noch expandiert werden und unter stabileren Bedingungen durchgeführt werden, da z. B. nicht immer die gleiche Zellzahl pro Ansatz analysiert wurde. Jedoch ist gezeigt worden, dass das beschriebene  $\alpha$ -SMA-Promotorkonstrukt auch dazu geeignet

ist, in Mesangialzellen Transgene zu dirigieren und außerdem auch in einem differenzierungsabhängigen Modus. Des Weiteren ist zu erwähnen, dass offensichtlich auch der verwendete  $\alpha$ -SMA-Promotor, der aus der *Ratte* stammt (s. 4. 1. 1), in den *humanen* Mesangialzellen die Transkription des Transgens regulieren kann, obwohl dieser Genbereich in Mensch und Ratte nicht zu 100 % homolog ist [58].

#### **5. 4 Nutzung des adenoviralen Gentransfers zum Einbringen von siRNA in Myofibroblasten**

Im zweiten Abschnitt meiner Arbeit sollte gezeigt werden, dass ein adenovirales Konstrukt in der Lage ist, inhibierende RNA (siRNA) in myofibroblastischen Zellen zu exprimieren, und dadurch in den Zellmetabolismus einzugreifen.

Dafür wurde ein weiteres Adenovirus geschaffen, das - zunächst unter einem universellen Promotor - für eine siRNA kodiert (s. Kapitel 4. 4. 1), die in der Lage ist, *in vitro* in den fibrotischen Zellstoffwechsel durch Unterdrückung des TGF- $\beta$ -I-Rezeptors einzugreifen [75].

Nach Infektion von myofibroblastischen HSC mit pAdsiAlk5, in den die Sequenz für siRNA, die sich gegen das Alk5-Mitglied der TGF- $\beta$ -Rezeptorfamilie richtet, integriert worden war, zeigte sich nach Transkriptlevelbestimmung von Alk5 eine hemmende Wirkung des Virus, wobei sich die Ergebnisse teils nicht ganz einheitlich darstellten. Ein möglicher Erklärungsansatz könnte die Überlagerung des siRNA-Effektes durch eine zytotoxische Wirkung der Viren sein, durch die die RNA-Isolierung der Zellen beeinträchtigt worden sein könnte.

Die Transkriptlevelbestimmung des Alk5 zeigte eine breite Streuung der Ergebnisse. Nach Normalisierung gegen  $\beta$ -Aktin ließ sich ein hemmender Effekt des pAdsiAlk5 gegenüber den mit dem scrambled Virus infizierten Kontrollzellen erkennen (s. Abb. 22 in Kapitel 4. 4. 2). Im Gegensatz zu den mit dem scrambled-siRNA-Virus infizierten Zellen, die als Vergleichsgröße fungierten und in denen keine Transkripte durch die scrambled siRNA gehemmt werden sollten, zeigten die Zellen nach Infektion mit pAdsiAlk5 einen niedrigeren Alk5-Transkriptlevel bei hoher Infektionsdosis. Im Vergleich mit Kontrollzellen ohne

Virusinfektion (PBS-Kontrolle) ließ sich der Effekt nicht bestätigen, da auch hier ein niedriger Transkriptlevel bestimmt wurde.

Die Experimente wurden im Rahmen der Arbeit noch zweimal wiederholt, wobei sich die Daten in Bezug auf die Vergleichsgrößen, d. h. Zellen, die mit dem scrambled Virus beziehungsweise ohne Viren kultiviert wurden (PBS-Kontrolle), weiterhin heterogen darstellten. Es handelt sich somit um primäre Ergebnisse, die eine funktionierende Hemmung der Alk5-Synthese durch pAdsiAlk5 nur trendweise erkennen lassen. Inwieweit technische Probleme wie fehlerhafte Virus-Titerbestimmungen, die letztendlich keinen Vergleich der Versuchsgruppen zuließen, heterogene RNA-Konzentrationsbestimmungen oder cDNA-Umschreibungen oder aber zytotoxische Einflüsse bei zu hoher Viruslast für die noch nicht klaren Ergebnisse verantwortlich gemacht werden müssen, soll in zukünftigen Studien gezeigt werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im ersten Teil der Arbeit der  $\alpha$ -SMA-Promotor als geeignetes Promotorkonstrukt, um Myofibroblasten adenoviral anzusprechen, dargestellt wurde, während im zweiten Teil eine Möglichkeit aufgezeigt wurde, den myofibroblastischen Zellstoffwechsel durch adenoviral-medierte RNA-Interferenz zu manipulieren.

In der Zusammenschau wurden in der vorgelegten Arbeit Voraussetzungen geschaffen und die Vorarbeiten bereitgestellt für einen möglichen Zelltyp-gerichteten Transfer therapeutischer Gene in myofibroblastische Zellen als eine zukünftige spezifische Therapiemethode.

## 6. Zusammenfassung

Myofibroblasten nehmen in der Pathogenese fibrotischer Organerkrankungen eine entscheidende Rolle ein, da sie die Hauptmatrixproduzenten sind und durch Sekretion von Wachstumsfaktoren und fibrogenen Mediatoren den Prozess der Fibrogenese unterhalten. Es handelt sich hierbei um Zellen, die sowohl Eigenschaften von Fibroblasten als auch von glatten Muskelzellen aufweisen und aus verschiedenen Vorläuferzellen hervorgehen können.

$\alpha$ -Smooth Muscle Aktin ( $\alpha$ -SMA) gilt als Markerprotein für Myofibroblasten.

Während der Leber- und Nierenfibrose differenzieren sich organspezifische mesenchymale Zellen nach chronischer Schädigung in Myofibroblasten um und sind auf diese Weise an der Fibroseentstehung und -progression beteiligt. In der Leber sind dies im Besonderen die hepatischen Sternzellen (HSC), die sich im Disse'schen Raum befinden, während bei glomerulären Erkrankungen in der Niere Mesangialzellen Vorläuferzellen für Myofibroblasten sind.

Für die Stimulation von Myofibroblasten ist der fibrogene Mediator TGF- $\beta$  hauptverantwortlich. Experimentelle therapeutische Ansätze antifibrotischer Art zielen darauf ab, die Wirkung des TGF- $\beta$  auf Myofibroblasten zu hemmen.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen adenoviralen Myofibroblastenspezifischen Vektor (pAdSMA-GFP) zu etablieren, der unter der Kontrolle des (Myofibroblastenspezifischen)  $\alpha$ -SMA-Promotors ein Reporterprotein (GFP) induzieren sollte. Es sollte die Zelltyp-abhängige Regulation des Promotors in myofibroblastisch umdifferenzierten HSC gezeigt werden sowie die differenzierungsabhängige Reporterexpression in infizierten Mesangialzellen im Verlauf der Umdifferenzierung.

Ein weiteres Ziel bestand darin, einen adenoviralen Vektor (pAdsiAlk5) zu konstruieren, der in der Lage ist, in HSC siRNA zu exprimieren, die durch RNA-Interferenz für eine Expressionshemmung eines TGF- $\beta$ -Rezeptors sorgt.

Nach Konstruktion des pAdSMA-GFP, Etablierung und Optimierung der adenoviralen Infektionstechnik konnte gezeigt werden, dass nach Infektion von myofibroblastisch aktivierten HSC mit pAdSMA-GFP das Reporterprotein GFP exprimiert wurde, während in Hepatomzellen kein GFP detektiert werden

konnte. Ruhende Mesangialzellen waren zunächst nicht in der Lage, das GFP unter Kontrolle des  $\alpha$ -SMA-Promotors zu synthetisieren, nach myofibroblastischer Aktivierung durch mechanischen Stress wurde das Reporterprotein jedoch exprimiert. Damit führte die virale Expression unter Kontrolle des  $\alpha$ -SMA-Promotors zu einer Zelltyp-spezifischen und differenzierungsabhängigen rekombinanten Genexpression.

Darüber hinaus erfolgte der Entwurf eines Oligonukleotids, das für eine siRNA, die small hairpin RNA (shRNA), zur Stilllegung des TGF- $\beta$ -Rezeptor-I (Alk5)-Gens kodiert. Dieses Oligonukleotid wurde erfolgreich in einen weiteren adenoviralen Vektor integriert.

Zusammenfassend zeigen die *In-vitro*-Versuche, dass die genetische Manipulation von Myofibroblasten mittels Adenoviren unter Kontrolle des  $\alpha$ -SMA-Promotors eine sehr effiziente Methode darstellt. Eine Übertragung auf *In-vivo*-Modelle könnte durch eventuelle immunologische Reaktionen beziehungsweise die mangelnde Steuerbarkeit des viralen Transfers erschwert werden. Mit der hier gezeigten Einschaltung eines spezifischen Promotors könnte jedoch ein praktikables Werkzeug zur Verfügung stehen, um Myofibroblasten gezielt anzusprechen.

Die Nutzung eines spezifisch direktionierten Vektors für den Transfer eines therapeutischen Gens, wie zum Beispiel einer Expressionskassette, die den TGF- $\beta$ -Rezeptor durch RNA-Interferenz stilllegen kann, könnte neue Perspektiven für eine antifibrotische Therapie eröffnen.

## 7. Literaturverzeichnis

1. **Arias, M, Sauer-Lehnen, S, Treptau, J, Janoschek, N, Theuerkauf, I, Buettner, R, Gressner, AM, and Weiskirchen, R,** *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.
2. **Arias, M, Lahme, B, Van de Leur, E, Gressner, AM, and Weiskirchen, R,** *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.
3. **Armendariz-Borunda, J, Greenwel, P, and Rojkind, M,** *Kupffer cells from CC1(4)-treated rat livers induce skin fibroblast and liver fat-storing cell proliferation in culture.* Matrix, 1989. 9(2): p. 150-8.
4. **Bachem, MG, Melchior, R, and Gressner, AM,** *The role of thrombocytes in liver fibrogenesis: effects of platelet lysate and thrombocyte-derived growth factors on the mitogenic activity and glycosaminoglycan synthesis of cultured rat liver fat storing cells.* J Clin Chem Clin Biochem, 1989. 27(9): p. 555-65.
5. **Bachem, MG, Meyer, D, Melchior, R, Sell, KM, and Gressner, AM,** *Activation of rat liver perisinusoidal lipocytes by transforming growth factors derived from myofibroblastlike cells. A potential mechanism of self perpetuation in liver fibrogenesis.* J Clin Invest, 1992. 89(1): p. 19-27.
6. **Banes, AJ, Gilbert, J, Taylor, D, and Monbureau, O,** *A new vacuum-operated stress-providing instrument that applies static or variable duration cyclic tension or compression to cells in vitro.* J Cell Sci, 1985. 75: p. 35-42.

7. **Barjot, C, Hartigan-O'Connor, D, Salvatori, G, Scott, JM, and Chamberlain, JS**, *Gutted adenoviral vector growth using E1/E2b/E3-deleted helper viruses*. J Gene Med, 2002. 4(5): p. 480-9.
8. **Benigni, A and Remuzzi, G**, *Mechanism of progression of renal disease: growth factors and related mechanisms*. J Hypertens Suppl, 1998. 16(4): p. S9-12.
9. **Bernstein, E, Caudy, AA, Hammond, SM, and Hannon, GJ**, *Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference*. Nature, 2001. 409(6818): p. 363-6.
10. **Blank, RS, McQuinn, TC, Yin, KC, Thompson, MM, Takeyasu, K, Schwartz, RJ, and Owens, GK**, *Elements of the smooth muscle alpha-actin promoter required in cis for transcriptional activation in smooth muscle. Evidence for cell type-specific regulation*. J Biol Chem, 1992. 267(2): p. 984-9.
11. **Borkham-Kamphorst, E, Stoll, D, Gressner, AM, and Weiskirchen, R**, *Antisense strategy against PDGF B-chain proves effective in preventing experimental liver fibrogenesis*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. 321(2): p. 413-23.
12. **Bowen, GP, Borgland, SL, Lam, M, Libermann, TA, Wong, NC, and Muruve, DA**, *Adenovirus vector-induced inflammation: capsid-dependent induction of the C-C chemokine RANTES requires NF-kappa B*. Hum Gene Ther, 2002. 13(3): p. 367-79.
13. **Bühling, K, Lepenies, J, Witt, K**, *Intensivkurs Allgemeine und spezielle Pathologie*. 2004, Urban und Fischer GmbH und Co. KG. p. 304.
14. **Cao, H, Koehler, DR, and Hu, J**, *Adenoviral vectors for gene replacement therapy*. Viral Immunol, 2004. 17(3): p. 327-33.

15. **Carroll, SL, Bergsma, DJ, and Schwartz, RJ**, *A 29-nucleotide DNA segment containing an evolutionarily conserved motif is required in cis for cell-type-restricted repression of the chicken alpha-smooth muscle actin gene core promoter*. Mol Cell Biol, 1988. 8(1): p. 241-50.
16. **Cintorino, M, Bellizzi de Marco, E, Leoncini, P, Tripodi, SA, Xu, LJ, Sappino, AP, Schmitt-Graff, A, and Gabbiani, G**, *Expression of alpha-smooth-muscle actin in stromal cells of the uterine cervix during epithelial neoplastic changes*. Int J Cancer, 1991. 47(6): p. 843-6.
17. **Cortes, P, Zhao, X, Riser, BL, and Narins, RG**, *Role of glomerular mechanical strain in the pathogenesis of diabetic nephropathy*. Kidney Int, 1997. 51(1): p. 57-68.
18. **Cui, X, Shimizu, I, Lu, G, Itonaga, M, Inoue, H, Shono, M, Tamaki, K, Fukuno, H, Ueno, H, and Ito, S**, *Inhibitory effect of a soluble transforming growth factor beta type II receptor on the activation of rat hepatic stellate cells in primary culture*. J Hepatol, 2003. 39(5): p. 731-7.
19. **Darby, I, Skalli, O, and Gabbiani, G**, *Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing*. Lab Invest, 1990. 63(1): p. 21-9.
20. **Desmouliere, A**, *Factors influencing myofibroblast differentiation during wound healing and fibrosis*. Cell Biol Int, 1995. 19(5): p. 471-6.
21. **Desmouliere, A, Tuchweber, B, and Gabbiani, G**, *Role of the myofibroblast differentiation during liver fibrosis*. J Hepatol, 1995. 22(2 Suppl): p. 61-4.
22. **Desmouliere, A and Gabbiani, G**, *Myofibroblast differentiation during fibrosis*. Exp Nephrol, 1995. 3(2): p. 134-9.

23. **Dietel M, SN, Zeitz M, Kasper DL, Braunwald E, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL,** *Harrisons Innere Medizin.* 2005, ABW Wissenschaftsverlag GmbH: Berlin. p. 2000-2011.
24. **Efendy, JL, Campbell, GR, and Campbell, JH,** *The effect of environmental cues on the differentiation of myofibroblasts in peritoneal granulation tissue.* J Pathol, 2000. 192(2): p. 257-62.
25. **Essawy, M, Soylemezoglu, O, Muchaneta-Kubara, EC, Shortland, J, Brown, CB, and el Nahas, AM,** *Myofibroblasts and the progression of diabetic nephropathy.* Nephrol Dial Transplant, 1997. 12(1): p. 43-50.
26. **Estes, JM, Vande Berg, JS, Adzick, NS, MacGillivray, TE, Desmouliere, A, and Gabbiani, G,** *Phenotypic and functional features of myofibroblasts in sheep fetal wounds.* Differentiation, 1994. 56(3): p. 173-81.
27. **Foster, DN, Min, B, Foster, LK, Stoflet, ES, Sun, S, Getz, MJ, and Strauch, AR,** *Positive and negative cis-acting regulatory elements mediate expression of the mouse vascular smooth muscle alpha-actin gene.* J Biol Chem, 1992. 267(17): p. 11995-2003.
28. **Franke, WW, Schmid, E, Vandekerckhove, J, and Weber, K,** *Permanently proliferating rat vascular smooth muscle cell with maintained expression of smooth muscle characteristics, including actin of the vascular smooth muscle type.* J Cell Biol, 1980. 87(3 Pt 1): p. 594-600.
29. **Friedman, SL,** *Hepatic stellate cells.* Prog Liver Dis, 1996. 14: p. 101-30.
30. **Friedman, SL,** *Molecular mechanisms of hepatic fibrosis and principles of therapy.* J Gastroenterol, 1997. 32(3): p. 424-30.
31. **Friedman, SL,** *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.

- 32. Friedman, SL and Arthur, MJ,** *Activation of cultured rat hepatic lipocytes by Kupffer cell conditioned medium. Direct enhancement of matrix synthesis and stimulation of cell proliferation via induction of platelet-derived growth factor receptors.* J Clin Invest, 1989. 84(6): p. 1780-5.
- 33. Fries, JW, Roth, T, Dienes, HP, Weber, M, and Odenthal, M,** *A novel evaluation method for paraffinized human renal biopsies using quantitative analysis of microdissected glomeruli and VCAM-1 as marker of inflammatory mesangial cell activation.* Nephrol Dial Transplant, 2003. 18(4): p. 710-6.
- 34. Fujishiro, J, Takeda, S, Takeno, Y, Takeuchi, K, Ogata, Y, Takahashi, M, Hakamata, Y, Kaneko, T, Murakami, T, Okada, T, Ozawa, K, Hashizume, K, and Kobayashi, E,** *Gene transfer to the rat kidney in vivo and ex vivo using an adenovirus vector: factors influencing transgene expression.* Nephrol Dial Transplant, 2005. 20(7): p. 1385-91.
- 35. Gabbiani, G,** *Modulation of fibroblastic cytoskeletal features during wound healing and fibrosis.* Pathol Res Pract, 1994. 190(9-10): p. 851-3.
- 36. Gabbiani, G, Schmid, E, Winter, S, Chaponnier, C, de Ckhashtonay, C, Vandekerckhove, J, Weber, K, and Franke, WW,** *Vascular smooth muscle cells differ from other smooth muscle cells: predominance of vimentin filaments and a specific alpha-type actin.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. 78(1): p. 298-302.
- 37. Gabbiani, G,** *The cellular derivation and the life span of the myofibroblast.* Pathol Res Pract, 1996. 192(7): p. 708-11.
- 38. Gore-Hyer, E, Shegogue, D, Markiewicz, M, Lo, S, Hazen-Martin, D, Greene, EL, Grotendorst, G, and Trojanowska, M,** *TGF-beta and CTGF have overlapping and distinct fibrogenic effects on human renal cells.* Am J Physiol Renal Physiol, 2002. 283(4): p. F707-16.

39. **Gressner, AM**, *Liver fibrosis: perspectives in pathobiochemical research and clinical outlook*. Eur J Clin Chem Clin Biochem, 1991. 29(5): p. 293-311.
40. **Gressner, AM and Bachem, MG**, *Cellular communications and cell-matrix interactions in the pathogenesis of fibroproliferative diseases: liver fibrosis as a paradigm*. Ann Biol Clin (Paris), 1994. 52(3): p. 205-26.
41. **Gressner, AM**, *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.
42. **Gressner, AM, Lotfi, S, Gressner, G, and Lahme, B**, *Identification and partial characterization of a hepatocyte-derived factor promoting proliferation of cultured fat-storing cells (parasinusoidal lipocytes)*. Hepatology, 1992. 16(5): p. 1250-66.
43. **Gressner, AM**, *Transdifferentiation of hepatic stellate cells (Ito cells) to myofibroblasts: a key event in hepatic fibrogenesis*. Kidney Int Suppl, 1996. 54: p. S39-45.
44. **Grinnell, F**, *Fibroblasts, myofibroblasts, and wound contraction*. J Cell Biol, 1994. 124(4): p. 401-4.
45. **Hanada, S, Terada, Y, Inoshita, S, Sasaki, S, Lohmann, SM, Smolenski, A, and Marumo, F**, *Overexpression of protein kinase G using adenovirus inhibits cyclin E transcription and mesangial cell cycle*. Am J Physiol Renal Physiol, 2001. 280(5): p. F851-9.
46. **Hannon, GJ**, *RNA interference*. Nature, 2002. 418(6894): p. 244-51.
47. **Harris, RC, Haralson, MA, and Badr, KF**, *Continuous stretch-relaxation in culture alters rat mesangial cell morphology, growth characteristics, and metabolic activity*. Lab Invest, 1992. 66(5): p. 548-54.

48. **Hattori, M, Horita, S, Yoshioka, T, Yamaguchi, Y, Kawaguchi, H, and Ito, K,** *Mesangial phenotypic changes associated with cellular lesions in primary focal segmental glomerulosclerosis.* Am J Kidney Dis, 1997. 30(5): p. 632-8.
49. **Heidelbaugh, JJ and Sherbondy, M,** *Cirrhosis and chronic liver failure: part II. Complications and treatment.* Am Fam Physician, 2006. 74(5): p. 767-76.
50. **Herold, G,** *Innere Medizin.* 2006, Herold: Köln. p. 478.
51. **Imuro, Y, Nishio, T, Morimoto, T, Nitta, T, Stefanovic, B, Choi, SK, Brenner, DA, and Yamaoka, Y,** *Delivery of matrix metalloproteinase-1 attenuates established liver fibrosis in the rat.* Gastroenterology, 2003. 124(2): p. 445-58.
52. **Isono, M, Soda, M, Inoue, A, Akiyoshi, H, and Sato, K,** *Reverse transformation of hepatic myofibroblast-like cells by TGFbeta1/LAP.* Biochem Biophys Res Commun, 2003. 311(4): p. 959-65.
53. **Iwano, M, Plieth, D, Danoff, TM, Xue, C, Okada, H, and Neilson, EG,** *Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis.* J Clin Invest, 2002. 110(3): p. 341-50.
54. **Jacque, JM, Triques, K, and Stevenson, M,** *Modulation of HIV-1 replication by RNA interference.* Nature, 2002. 418(6896): p. 435-8.
55. **Johnson, RJ, Floege, J, Yoshimura, A, Iida, H, Couser, WG, and Alpers, CE,** *The activated mesangial cell: a glomerular "myofibroblast"?* J Am Soc Nephrol, 1992. 2(10 Suppl): p. S190-7.
56. **Johnson, RJ, Iida, H, Alpers, CE, Majesky, MW, Schwartz, SM, Pritzl, P, Gordon, K, and Gown, AM,** *Expression of smooth muscle cell phenotype by rat mesangial cells in immune complex nephritis. Alpha-smooth muscle actin is a marker of mesangial cell proliferation.* J Clin Invest, 1991. 87(3): p. 847-58.

57. **Johnson, SJ, Hines, JE, and Burt, AD**, *Macrophage and perisinusoidal cell kinetics in acute liver injury*. J Pathol, 1992. 166(4): p. 351-8.
58. **Jung, D**, *Transkriptionelle Regulation des alpha-Smooth-Muscle-Actin-Gens*, Inaugural-Dissertation, Institut für Pathologie. 2000, Universität zu Köln.
59. **Jung, D, Odenthal, M.**, *Patentanmeldung DPA, PCT: Gene expression and reporter expression in myofibroblasts and myofibroblast-like cells*. WO 02/04509. 2000.
60. **Kamada, Y, Tamura, S, Kiso, S, Matsumoto, H, Saji, Y, Yoshida, Y, Fukui, K, Maeda, N, Nishizawa, H, Nagaretani, H, Okamoto, Y, Kihara, S, Miyagawa, J, Shinomura, Y, Funahashi, T, and Matsuzawa, Y**, *Enhanced carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice lacking adiponectin*. Gastroenterology, 2003. 125(6): p. 1796-807.
61. **Kapanci, Y, Ribaux, C, Chaponnier, C, and Gabbiani, G**, *Cytoskeletal features of alveolar myofibroblasts and pericytes in normal human and rat lung*. J Histochem Cytochem, 1992. 40(12): p. 1955-63.
62. **Kawada, N, Moriyama, T, Ando, A, Koyama, T, Hori, M, Miwa, T, and Imai, E**, *Role of intron 1 in smooth muscle alpha-actin transcriptional regulation in activated mesangial cells in vivo*. Kidney Int, 1999. 55(6): p. 2338-48.
63. **Khimji, A**, *In vivo-Untersuchungen zur transkriptionellen Regulation durch den Promoter des Smooth Muscle a-Aktin-Gens*, Institut für Pathologie. 2004, Universität zu Köln. p. 56-61, 67-68.
64. **Kingsley, DM**, *The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms*. Genes Dev, 1994. 8(2): p. 133-46.

65. **Kitabwalla, M and Ruprecht, RM**, *RNA interference - a new weapon against HIV and beyond*. N Engl J Med, 2002. 347(17): p. 1364-7.
66. **Kitamura, M and Kawachi, H**, *Creation of an In vivo cytosensor using engineered mesangial cells. Automatic sensing of glomerular inflammation controls transgene activity*. J Clin Invest, 1997. 100(6): p. 1394-9.
67. **Kuriyama, S, Yoshiji, H, Nakai, S, Deguchi, A, Uchida, N, Kimura, Y, Inoue, H, Kinekawa, F, Ogawa, M, Nonomura, T, Masaki, T, Kurokohchi, K, and Watanabe, S**, *Adenovirus-mediated gene transfer into rat livers: comparative study of retrograde intrabiliary and antegrade intraportal administration*. Oncol Rep, 2005. 13(1): p. 69-74.
68. **Lee, NS, Dohjima, T, Bauer, G, Li, H, Li, MJ, Ehsani, A, Salvaterra, P, and Rossi, J**, *Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells*. Nat Biotechnol, 2002. 20(5): p. 500-5.
69. **Li, Q, Kay, MA, Finegold, M, Stratford-Perricaudet, LD, and Woo, SL**, *Assessment of recombinant adenoviral vectors for hepatic gene therapy*. Hum Gene Ther, 1993. 4(4): p. 403-9.
70. **Lin, Y, Xie, WF, Chen, YX, Zhang, X, Zeng, X, Qiang, H, Chen, WZ, Yang, XJ, Han, ZG, and Zhang, ZB**, *Treatment of experimental hepatic fibrosis by combinational delivery of urokinase-type plasminogen activator and hepatocyte growth factor genes*. Liver Int, 2005. 25(4): p. 796-807.
71. **Mack, CP and Owens, GK**, *Regulation of smooth muscle alpha-actin expression in vivo is dependent on CArG elements within the 5' and first intron promoter regions*. Circ Res, 1999. 84(7): p. 852-61.
72. **MacPherson, BR, Leslie, KO, Lizaso, KV, and Schwarz, JE**, *Contractile cells of the kidney in primary glomerular disorders: an immunohistochemical study using an anti-alpha-smooth muscle actin monoclonal antibody*. Hum Pathol, 1993. 24(7): p. 710-6.

- 73. Massague, J**, *The transforming growth factor-beta family*. Annu Rev Cell Biol, 1990. 6: p. 597-641.
- 74. Matsuoka, M and Tsukamoto, H**, *Stimulation of hepatic lipocyte collagen production by Kupffer cell-derived transforming growth factor beta: implication for a pathogenetic role in alcoholic liver fibrogenesis*. Hepatology, 1990. 11(4): p. 599-605.
- 75. Maurer J, LD, Wallraf J, Dienes HP und Odenthal M**, *Hemmung der Signalwirkung von Transforming Growth Factor  $\beta$  durch RNA-Interferenz*. Zeitschrift Z Gastroenterol 43, 2005.
- 76. McNamara, CA, Thompson, MM, Vernon, SM, Shimizu, RT, Blank, RS, and Owens, GK**, *Nuclear proteins bind a cis-acting element in the smooth muscle alpha-actin promoter*. Am J Physiol, 1995. 268(5 Pt 1): p. C1259-66.
- 77. Mian, A, McCormack, WM, Jr., Mane, V, Kleppe, S, Ng, P, Finegold, M, O'Brien, WE, Rodgers, JR, Beudet, AL, and Lee, B**, *Long-term correction of ornithine transcarbamylase deficiency by WPRE-mediated overexpression using a helper-dependent adenovirus*. Mol Ther, 2004. 10(3): p. 492-9.
- 78. Min, BH, Foster, DN, and Strauch, AR**, *The 5'-flanking region of the mouse vascular smooth muscle alpha-actin gene contains evolutionarily conserved sequence motifs within a functional promoter*. J Biol Chem, 1990. 265(27): p. 16667-75.
- 79. Moradpour, D and Blum, HE**, *[Therapy of chronic hepatitis C]*. Schweiz Rundsch Med Prax, 2006. 95(38): p. 1451-7.

80. **Morral, N, O'Neal, W, Rice, K, Leland, M, Kaplan, J, Piedra, PA, Zhou, H, Parks, RJ, Velji, R, Aguilar-Cordova, E, Wadsworth, S, Graham, FL, Kochanek, S, Carey, KD, and Beaudet, AL,** *Administration of helper-dependent adenoviral vectors and sequential delivery of different vector serotype for long-term liver-directed gene transfer in baboons.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. 96(22): p. 12816-21.
81. **Morsy, MA, Gu, M, Motzel, S, Zhao, J, Lin, J, Su, Q, Allen, H, Franlin, L, Parks, RJ, Graham, FL, Kochanek, S, Bett, AJ, and Caskey, CT,** *An adenoviral vector deleted for all viral coding sequences results in enhanced safety and extended expression of a leptin transgene.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. 95(14): p. 7866-71.
82. **Muruve, DA, Barnes, MJ, Stillman, IE, and Libermann, TA,** *Adenoviral gene therapy leads to rapid induction of multiple chemokines and acute neutrophil-dependent hepatic injury in vivo.* Hum Gene Ther, 1999. 10(6): p. 965-76.
83. **Nahman, NS, Jr., Clark, KR, Sferra, TJ, Urban, KE, Troike, AE, Kronenberger, J, and Sedmak, DD,** *Successful DNA transfer in cultured human mesangial cells using replication deficient recombinant adenovirus.* J Investig Med, 1998. 46(5): p. 204-9.
84. **Nakano, Y, Nishihara, T, Sasayama, S, Miwa, T, Kamada, S, and Kakunaga, T,** *Transcriptional regulatory elements in the 5' upstream and first intron regions of the human smooth muscle (aortic type) alpha-actin-encoding gene.* Gene, 1991. 99(2): p. 285-9.
85. **Novina, CD, Murray, MF, Dykxhoorn, DM, Beresford, PJ, Riess, J, Lee, SK, Collman, RG, Lieberman, J, Shankar, P, and Sharp, PA,** *siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection.* Nat Med, 2002. 8(7): p. 681-6.

- 86. Parkes, JG and Templeton, DM**, *Modulation of stellate cell proliferation and gene expression by rat hepatocytes: effect of toxic iron overload*. *Toxicol Lett*, 2003. 144(2): p. 225-33.
- 87. Parks, R, Eveleigh, C, and Graham, F**, *Use of helper-dependent adenoviral vectors of alternative serotypes permits repeat vector administration*. *Gene Ther*, 1999. 6(9): p. 1565-73.
- 88. Parks, RJ, Bramson, JL, Wan, Y, Addison, CL, and Graham, FL**, *Effects of stuffer DNA on transgene expression from helper-dependent adenovirus vectors*. *J Virol*, 1999. 73(10): p. 8027-34.
- 89. Pastore, L, Morral, N, Zhou, H, Garcia, R, Parks, RJ, Kochanek, S, Graham, FL, Lee, B, and Beaudet, AL**, *Use of a liver-specific promoter reduces immune response to the transgene in adenoviral vectors*. *Hum Gene Ther*, 1999. 10(11): p. 1773-81.
- 90. Ramadori, G, Veit, T, Schwogler, S, Dienes, HP, Knittel, T, Rieder, H, and Meyer zum Buschenfelde, KH**, *Expression of the gene of the alpha-smooth muscle-actin isoform in rat liver and in rat fat-storing (ITO) cells*. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, 1990. 59(6): p. 349-57.
- 91. Raper, SE, Haskal, ZJ, Ye, X, Pugh, C, Furth, EE, Gao, GP, and Wilson, JM**, *Selective gene transfer into the liver of non-human primates with E1-deleted, E2A-defective, or E1-E4 deleted recombinant adenoviruses*. *Hum Gene Ther*, 1998. 9(5): p. 671-9.
- 92. Remuzzi, G and Bertani, T**, *Pathophysiology of progressive nephropathies*. *N Engl J Med*, 1998. 339(20): p. 1448-56.
- 93. Riser, BL, Cortes, P, Zhao, X, Bernstein, J, Dumler, F, and Narins, RG**, *Intraglomerular pressure and mesangial stretching stimulate extracellular matrix formation in the rat*. *J Clin Invest*, 1992. 90(5): p. 1932-43.

94. Riser, BL, Cortes, P, Yee, J, Sharba, AK, Asano, K, Rodriguez-Barbero, A, and Narins, RG, *Mechanical strain- and high glucose-induced alterations in mesangial cell collagen metabolism: role of TGF-beta*. J Am Soc Nephrol, 1998. 9(5): p. 827-36.
95. Riser, BL, Ladson-Wofford, S, Sharba, A, Cortes, P, Drake, K, Guerin, CJ, Yee, J, Choi, ME, Segarini, PR, and Narins, RG, *TGF-beta receptor expression and binding in rat mesangial cells: modulation by glucose and cyclic mechanical strain*. Kidney Int, 1999. 56(2): p. 428-39.
96. Riser, BL, Cortes, P, and Yee, J, *Modelling the effects of vascular stress in mesangial cells*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2000. 9(1): p. 43-7.
97. Roberts, IS, Burrows, C, Shanks, JH, Venning, M, and McWilliam, LJ, *Interstitial myofibroblasts: predictors of progression in membranous nephropathy*. J Clin Pathol, 1997. 50(2): p. 123-7.
98. Rockey, DC, Boyles, JK, Gabbiani, G, and Friedman, SL, *Rat hepatic lipocytes express smooth muscle actin upon activation in vivo and in culture*. J Submicrosc Cytol Pathol, 1992. 24(2): p. 193-203.
99. Rockey, DC and Chung, JJ, *Endothelin antagonism in experimental hepatic fibrosis. Implications for endothelin in the pathogenesis of wound healing*. J Clin Invest, 1996. 98(6): p. 1381-8.
100. Roy, SG, Nozaki, Y, and Phan, SH, *Regulation of alpha-smooth muscle actin gene expression in myofibroblast differentiation from rat lung fibroblasts*. Int J Biochem Cell Biol, 2001. 33(7): p. 723-34.
101. Ruzicka, DL and Schwartz, RJ, *Sequential activation of alpha-actin genes during avian cardiogenesis: vascular smooth muscle alpha-actin gene transcripts mark the onset of cardiomyocyte differentiation*. J Cell Biol, 1988. 107(6 Pt 2): p. 2575-86.

- 102. Sanz, S, Pucilowska, JB, Liu, S, Rodriguez-Ortigosa, CM, Lund, PK, Brenner, DA, Fuller, CR, Simmons, JG, Pardo, A, Martinez-Chantar, ML, Fagin, JA, and Prieto, J, *Expression of insulin-like growth factor I by activated hepatic stellate cells reduces fibrogenesis and enhances regeneration after liver injury.* Gut, 2005. 54(1): p. 134-41.**
- 103. Sappino, AP, Schurch, W, and Gabbiani, G, *Differentiation repertoire of fibroblastic cells: expression of cytoskeletal proteins as marker of phenotypic modulations.* Lab Invest, 1990. 63(2): p. 144-61.**
- 104. Sauvant, P, Sapin, V, Abergel, A, Schmidt, CK, Blanchon, L, Alexandre-Gouabau, MC, Rosenbaum, J, Bommelaer, G, Rock, E, Dastugue, B, Nau, H, and Azais-Braesco, V, *PAV-1, a new rat hepatic stellate cell line converts retinol into retinoic acid, a process altered by ethanol.* Int J Biochem Cell Biol, 2002. 34(8): p. 1017-29.**
- 105. Schmitt-Graff, A, Chakroun, G, and Gabbiani, G, *Modulation of perisinusoidal cell cytoskeletal features during experimental hepatic fibrosis.* Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol, 1993. 422(2): p. 99-107.**
- 106. Sharp, PA, *RNA interference-2001.* Genes Dev, 2001. 15(5): p. 485-90.**
- 107. Simonson, MS, Walsh, K, Kumar, CC, Bushel, P, and Herman, WH, *Two proximal CArG elements regulate SM alpha-actin promoter, a genetic marker of activated phenotype of mesangial cells.* Am J Physiol, 1995. 268(4 Pt 2): p. F760-9.**
- 108. Song, YH, Chen, XL, Kong, XJ, Liu, NZ, Li, W, Wu, XL, Lin, JS, and Jin, YX, *Ribozymes against TGFbeta1 reverse character of activated hepatic stellate cells in vitro and inhibit liver fibrosis in rats.* J Gene Med, 2005. 7(7): p. 965-76.**
- 109. Stratagene, *AdEasy Adenoviral Vector System Instruction Manual.* p. 24.**

110. **Stratagene**, *AdEasy Adenoviral Vector System Instruction Manual*. p. 25.
111. **Sullivan, DE, Dash, S, Du, H, Hiramatsu, N, Aydin, F, Kolls, J, Blanchard, J, Baskin, G, and Gerber, MA**, *Liver-directed gene transfer in non-human primates*. *Hum Gene Ther*, 1997. 8(10): p. 1195-206.
112. **Teramoto, S, Matsuse, T, Ohga, E, Nagase, T, Fukuchi, Y, and Ouchi, Y**, *Kinetics of adenovirus-mediated gene transfer to human lung fibroblasts*. *Life Sci*, 1997. 61(9): p. 891-7.
113. **Uchida, Y, Maeda, Y, Kimura, E, Yamashita, S, Nishida, Y, Arima, T, Hirano, T, Uyama, E, Mita, S, and Uchino, M**, *Effective repetitive dystrophin gene transfer into skeletal muscle of adult mdx mice using a helper-dependent adenovirus vector expressing the coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) and dystrophin*. *J Gene Med*, 2005. 7(8): p. 1010-22.
114. **Valentich, JD, Popov, V, Saada, JI, and Powell, DW**, *Phenotypic characterization of an intestinal subepithelial myofibroblast cell line*. *Am J Physiol*, 1997. 272(5 Pt 1): p. C1513-24.
115. **van der Wouden, EA, Sandovici, M, Henning, RH, de Zeeuw, D, and Deelman, LE**, *Approaches and methods in gene therapy for kidney disease*. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2004. 50(1): p. 13-24.
116. **Waldherr, R, Cuzic, S, and Noronha, IL**, *Pathology of the human mesangium in situ*. *Clin Investig*, 1992. 70(9): p. 865-74.
117. **Wang, J, Niu, W, Nikiforov, Y, Naito, S, Chernausek, S, Witte, D, LeRoith, D, Strauch, A, and Fagin, JA**, *Targeted overexpression of IGF-I evokes distinct patterns of organ remodeling in smooth muscle cell tissue beds of transgenic mice*. *J Clin Invest*, 1997. 100(6): p. 1425-39.

- 118. Weiskirchen, R, Kneifel, J, Weiskirchen, S, van de Leur, E, Kunz, D, and Gressner, AM,** *Comparative evaluation of gene delivery devices in primary cultures of rat hepatic stellate cells and rat myofibroblasts.* BMC Cell Biol, 2000. 1: p. 4.
- 119. Woodcock-Mitchell, J, Mitchell, JJ, Low, RB, Kieny, M, Sengel, P, Rubbia, L, Skalli, O, Jackson, B, and Gabbiani, G,** *Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed in embryonic rat cardiac and skeletal muscles.* Differentiation, 1988. 39(3): p. 161-6.
- 120. Yamaoka, K, Nouchi, T, Marumo, F, and Sato, C,** *Alpha-smooth-muscle actin expression in normal and fibrotic human livers.* Dig Dis Sci, 1993. 38(8): p. 1473-9.
- 121. Yang, Y, Jooss, KU, Su, Q, Ertl, HC, and Wilson, JM,** *Immune responses to viral antigens versus transgene product in the elimination of recombinant adenovirus-infected hepatocytes in vivo.* Gene Ther, 1996. 3(2): p. 137-44.
- 122. Yasuda, T, Kondo, S, Homma, T, and Harris, RC,** *Regulation of extracellular matrix by mechanical stress in rat glomerular mesangial cells.* J Clin Invest, 1996. 98(9): p. 1991-2000.
- 123. Yu, Q, Que, LG, and Rockey, DC,** *Adenovirus-mediated gene transfer to nonparenchymal cells in normal and injured liver.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2002. 282(3): p. G565-72.
- 124. Zamore, PD, Tuschl, T, Sharp, PA, and Bartel, DP,** *RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals.* Cell, 2000. 101(1): p. 25-33.
- 125. Zhou, HS, Zhao, T, Rao, XM, and Beaudet, AL,** *Production of helper-dependent adenovirus vector relies on helper virus structure and complementing.* J Gene Med, 2002. 4(5): p. 498-509.

## 8. Erklärung zu Vorabveröffentlichung von Ergebnissen

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden bereits in Form von Postern oder Kurzfassungen (Abstracts) im Rahmen der Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Nephrologie in Basel (2004), dem Symposium der French and German Connective Tissue Societies in Köln (2005) sowie des Europäischen Kongresses für Pathologie in Paris (2005) veröffentlicht. Die Kurzfassungen wurden veröffentlicht unter:

1. Odenthal M, Wallraf J, Roth T, Licht C, Dienes H-P, Fries JWU.  
Adenovirus-mediated infection of promoter GFP construct in mesangial cells as model system for monitoring experimental glomerulosclerosis. *Kidney Blood Press Res* 27: 406, 2004.
2. Odenthal M, Wallraf J, Roth T, Licht C, Dienes H-P, Fries JWU.  
An adenovirus-promoter-construct to study renal myofibroblast formation in vitro and in vivo. *European Society of Pathology, Paris, (ID 814); 2005.*



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

