

Aus der Chirurgischen Klinik, Campus Charité Mitte | Campus Virchow-Klinikum
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

Dissertation

***In vitro* Untersuchungen Leberregenerations-spezifischer microRNAs in kultivierten Hepatozyten**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Natalie Benita Schlüter

aus Berlin

Datum der Promotion: 17.09.2021

Inhaltsverzeichnis

Seite

1. Abbildungsverzeichnis	6
2. Tabellenverzeichnis	7
3. Abkürzungsverzeichnis	8
4. Abstract.....	11
5. Abstract (<i>english</i>).....	13
6. Einleitung.....	15
6.1. Leberregeneration.....	15
6.1.1. Lebererkrankungen und Therapiemöglichkeiten	16
6.1.2. Leberzelltherapie	17
6.2. Leberregenerations-spezifische microRNAs.....	18
6.2.1. MicroRNAs in Klinik und Forschung.....	23
6.3. Zusammenfassende Zielsetzung	25
6.4. Studiendesign	26
7. Material und Methoden	28
7.1. Materialliste.....	28
7.1.1. Operationsmaterial, -instrumente und -geräte.....	28
7.1.2. Zellisolierung.....	29
7.1.3. Zellkultur	29
7.1.4. Transfektionsreagenzien.....	30
7.1.5. RNA-Isolierung und Real-Time-PCR	30
7.1.6. Western Blot und ELISA	31
7.1.7. Geräte/ Software.....	32
7.2. Pufferlösungen und Medien zur Leberzellisolierung	33
7.2.1. Stammlösungen	33

7.2.2.	Gebrauchslösungen	33
7.2.3.	Enzymlösung – Collagenase P	33
7.2.4.	Dichtegradienten.....	34
7.2.5.	Modifiziertes <i>Dulbecco's modified eagle Medium</i> (M-DMEM)	34
7.3.	Pufferlösungen und Enzymlösungen für Western Blot.....	34
7.3.1.	Stammlösungen	34
7.3.2.	Gebrauchslösungen.....	35
7.4.	Tierexperimentelle Eingriffe	35
7.4.1.	Versuchstiere und Tierhaltung	35
7.4.2.	Leberexplantation	36
7.5.	Leberzellisolierung.....	37
7.6.	Zellkultur	39
7.6.1.	Hepatozytenkultur	39
7.7.	Transfektion	40
7.7.1.	Etablierung der Transfektion in primären Rattenhepatozyten	40
7.7.2.	Licht- und Fluoreszenzmikroskopie.....	40
7.7.4	<i>In vitro</i> Depletion und Supplementierung	41
7.8.	Quantitative Real-Time PCR.....	42
7.8.1.	RNA/ microRNA Isolierung.....	43
7.8.2.	cDNA Synthese mRNA Proben.....	43
7.8.3.	cDNA Synthese der miRNA	43
7.8.4.	Real-Time-PCR der mRNA	43
7.8.5.	Real-Time-PCR der miRNA	44
7.9.	Western Blot	44
7.9.1.	Proteinisolierung	44
7.9.2.	Gesamtproteinbestimmung	44
7.9.3.	Etablierung verschiedener Antikörper	45

7.9.4.	Gelelektrophorese.....	45
7.9.5.	Blotting.....	45
7.9.6.	Antikörper und Darstellung der Proteine	46
7.10.	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	46
7.10.1.	TP53 und IGF-2.....	46
7.11.	Statistische Analyse.....	47
8.	Ergebnisse	48
8.1.	Zellisolierung.....	48
8.2.	Morphologie	48
8.2.1.	Zellzahlbestimmung	48
8.2.2.	Lichtmikroskopie nach Transfektion.....	49
8.2.3.	Fluoreszenzmikroskopie	51
8.3.	miR-125b-5p.....	54
8.4.	miR-26a	59
8.5.	Let-7e.....	62
9.	Diskussion	67
9.1.	Hauptergebnisse.....	67
9.2.	Kritische Diskussion.....	69
9.2.1.	Speziesabhängige variable Ziele von miRNAs	69
9.2.2.	Mögliche Beeinflussung von Housekeeping-Genen durch miRNAs.....	73
9.2.3.	Degradationsprozesse	77
9.2.4.	Mögliche Fehlerquellen im Studiendesign	78
9.2.5.	Schlussfolgerung	79
9.3.	Ausblick.....	81
10.	Literaturverzeichnis	83
11.	Eidesstattliche Versicherung	90

12.	Lebenslauf	91
13.	Danksagung.....	94

1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Canonicaler miRNA Syntheseweg	19
Abbildung 2: Versuchsaufbau	27
Abbildung 3: Darstellung der Rattenleber <i>in situ</i> unter dem Mikroskop	36
Abbildung 4: Aufbau der Isolierung primärer Hepatozyten. (Rattenstamm: Wistar)	37
Abbildung 5: Lichtmikroskopie primärer Rattenhepatozyten in Kultur nach 72 Stunden.	49
Abbildung 6: Morphologische Evaluierung der Zellvitalität nach Transfektion Anti-miR-125b-5p.....	51
Abbildung 7: Fluoreszenzmikroskopie primärer Rattenhepatozyten 24 Stunden nach Transfektion.	53
Abbildung 8: Expressionsänderung der miR-125p-5p im Zeitverlauf normiert auf native Zellen.	54
Abbildung 9: Expressionsänderung Tp53 mRNA im Verhältnis zu den Housekeeping-Genen ACTB und B2m 24 Stunden nach Transfektion normiert auf die native Zellen.	56
Abbildung 10: Western Blot Tp53 normiert auf native Zellen 48 Stunden nach Transfektion	57
Abbildung 11: Protein-Level IGF2 über den Zeitverlauf nach Transfektion.....	58
Abbildung 12: Expressionsänderung der miR-26a im Zeitverlauf normiert auf native Zellen.	59
Abbildung 13: Expressionsänderung CCND2 mRNA im Verhältnis zu den Housekeeping-Genen ACTB und B2m normiert auf native Zellen 24 Stunden nach Transfektion.	61
Abbildung 14: Expressionsänderung der let-7e im Zeitverlauf normiert auf native Zellen.	62
Abbildung 15: Expressionsänderung CCND2 mRNA im Verhältnis zu den Housekeeping-Genen ACTB und B2m normiert auf native Zellen 24 Stunden nach Transfektion.	64
Abbildung 16: Expressionsänderung CCND2 mRNA im Verhältnis zu den Housekeeping-Genen ACTB und B2m normiert auf native Zellen 24 Stunden nach Transfektion.	65

2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Transfektionsschema	40
Tabelle 2: TargetScan über miRNA.org.	73
Tabelle 3: Repräsentative PCR Zyklen (CT-Werte) von Tp53 und dem Kontrollgen GAPDH.	75
Tabelle 4: <i>TargetScan</i> innerhalb der Spezies <i>rattus norvegicus</i> (rno) der Housekeeping- Gene ACTB, B2m und GAPDH.	76

3. Abkürzungsverzeichnis

24h.....	24 Stunden
3'UTR.....	3' untranslatierten Region
ACTB.....	Beta-Actin
Akt.....	Protein kinase B
Anti-MiRs.....	micro RNA Inhibitoren
Aqua dest.....	destilliertes Wasser
B2m.....	Beta-2-Microglobulin
BAK1.....	BCI2 Antagonist
BCI2.....	B-cell lymphoma 2
BCLC.....	Barcelona Clinic Liver Cancer
Bcl-xl.....	B-cell lymphoma-extra large
BIRC3.....	Baculoviral IAP repeat-containing protein3
CCN.....	Cyclin
Cdc.....	cell division cycle (phosphatase)
CDK bzw. Cdk.....	Cyclin depended kinasen
c-myc bzw. MYC.....	Myelocytomatose Gen
DcR3.....	Decoy receptor 3
DGCR8.....	DiGeorge syndrom critical region8
DNA.....	Desoxyribonukleinsäure
DSO.....	Deutsche Stiftung für Organtransplantation
EDN1.....	Endothelin 1 Gen
EZH2.....	Enhancer of zeste homolog 2
EZM.....	extrazelluläre Matrix
G0/1-Phasen.....	Gap- bzw. Interphasen 0/1 des Zellzyklus
GAPDH.....	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Human Recombinant

GSK- 3b *Glykogen Synthase Kinase 3 Beta*
 HCC *Hepatozelluläres Karzinom*
 HCV/HBV *Hepatitis-C/B-Virus*
 HGF *hepatocytes groth factor*
 HLC.....*hepatocyte like cells*
 HMBS *Hydroxymethylbilane Synthase Human Recombinant*
 HPRT *Hypoxanthin- Phosphoribosyl-Transferase*
 hsa..... *homo sapiens*
 Huh-7 *Humane Hepatocarcinoma Zellinie 7*
 IGF..... *Insulin-like growth factor*
 IGFBP3..... *Insulin-like-growth-factor-binding-protein-3*
 IL-1-10 *Interleukine-1 bis 10*
 Itch..... *ubiquitin-conjugating enzyme*
 LNA.....*locked nucleic acid*
 LR *Leberregeneration*
 LTX *Lebertransplantation*
 MAP3K2.....*Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 2*
 MDM2 *Mouse double minute 2 homolog*
 MET *Thyrosin Protein Kinase Rezeptor (für HGF)*
 Mimic/ Mimics *imitierende Doppelstrang-microRNA*
 microRNA/ miRNA/ miR-..... *micro ribunucleic acid*
 mRNA *messenger ribunucleic acid*
 MTDH *Metadherin Gen*
 Myc *Myelocytomatose Gen (Protoonkogen)*
 NAFLD *nicht alkoholisch induzierte Fettleber Erkrankung*
 PEI..... *perkutane Ethanol-Injektion*
 PGK1 *Phosphoglycerate Kinase 1 Human Recombinant*

PH.....	<i>partielle Hepatektomie</i>
PI3K.....	<i>Phosphatidylinositol-3-Kinase</i>
PPP1CA.....	<i>Serine/threonine-protein phosphatase 1-alpha catalytic subunit</i>
pri-miRNA	<i>primäre microRNA</i>
Prkra	<i>Protein kinase, interferon-inducible double stranded RNA dependent activator</i>
PTEN	<i>Phosphatase und Tensin Homolog</i>
Puma	<i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>
RAS	<i>rat sarcoma protoonkogen</i>
RB1	<i>Retinoblastom Protein 1</i>
REH	<i>Human lymphoblastoide Leukemia (cell line)</i>
RISC	<i>RNA induced silencing complex</i>
RLC.....	<i>RNA loading complex</i>
RNA.....	<i>ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)</i>
rno	<i>rattus norvegicus</i>
Rpl	<i>Ribosomal Protein L</i>
Rps	<i>Ribosomal Protein S</i>
Sel1l.....	<i>Suppressor/Enhancer of Lin-12-like</i>
SIRT1.....	<i>Sirtuin-1</i>
SMAD1	<i>Mothers against decapentaplegic homolog 1 Gen</i>
snRNA	<i>small nuclear ribonucleic acid</i>
S-Phase	<i>Synthese Phase des Zellzyklus</i>
TACE	<i>Transarterielle Chemoembolisation</i>
TE	<i>Tissue Engineering</i>
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor-beta</i>
Tp53inp1.....	<i>tumor protein 53-induced nuclear protein 1</i>
UV-Strahlung	<i>Ultraviolette Strahlung</i>
Zac1.....	<i>zinc-finger protein regulator of apoptosis and cell-cycle arrest</i>

4. Abstract

Einleitung

Leberregenerations-assoziierte microRNAs (miRNAs) könnten die Basis für die Entwicklung innovativer Behandlungskonzepte für Patienten mit bestimmten Lebererkrankungen sein. Dabei ist die Stimulierung der Zell-eigenen proliferativen Kapazität der Hepatozyten im Kontext zellbasierter Therapiekonzepte ein möglicher Ansatz. Als Grundlage für die Etablierung derartiger Therapiekonzepte war das Ziel dieses Promotionsvorhabens die *in vitro* Untersuchung spezifischer miRNAs in Rattenhepatozyten und die Evaluierung ihrer Bedeutung für die Leberregeneration. Es wurde dabei die Hypothese aufgestellt, dass die Depletion bzw. Supplementierung der Leberregenerations-assoziiierter miRNAs miR-125b-5p, miR-26a und let-7e *in vitro* Einfluss auf die posttranskriptionelle Genexpression hat und der resultierende Effekt auf Zellzyklus-assoziierte Zielgene die Leberzellproliferation verstärken kann.

Material und Methoden

Es wurden primäre Rattenhepatozyten *in vitro* kultiviert und mit Inhibitoren und Mimics der Leberregenerations-assoziierten miRNAs miR-125b-5p, miR-26a und let-7e transfiziert. Die Zellkulturen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet und der Einfluss auf potenzielle Zielgene mittels quantitativer miRNA-RT-PCR, mRNA-RT-PCR, Western Blot und ELISA analysiert.

Ergebnisse

Es konnte gezeigt werden, dass eine *in vitro* Inhibition und Supplementierung endogener miRNAs in primären Hepatozyten möglich ist. Interessanterweise zeigte sich auf mRNA Ebene eine in Abhängigkeit des jeweils genutzten Housekeeping-Gens überraschend variable Expression der zum Zeitpunkt dieser Untersuchungen putativen Zielgene p53 und CCND2. Während die Ausschaltung (knockdown) bzw. die Überexpression der miR-125-5p, gemittelt auf Beta-2-Microglobulin, zu einem der Hypothese entsprechenden Anstieg bzw. Abfall des endogenen p53 mRNA Levels führte, zeigten die Ergebnisse, gemittelt auf Beta Actin, ausschließlich eine Expressionssteigerung. Auf Protein-Ebene war keine eindeutige Regulation beider Zielgene durch den miRNA-Eingriff erkennbar.

Diskussion

Zusammengefasst konnte durch den hier angewandten, artifiziellen Eingriff in den Regulationskreislauf der Regenerations-assoziierten microRNAs miR-125b-5p, miR-26a

und let-7e kein eindeutiger Effekt auf die vermuteten Zielgene p53 und CCND2 in Rattenhepatozyten erzielt werden. Ein möglicher Erklärungsansatz für dieses Ergebnis könnte die in der Literatur beschriebene speziesabhängige Expression und Variabilität der untersuchten Zielgene darstellen. Auch eine direkte Beeinflussung von Housekeeping-Genen durch die ausgewählten miRNAs wäre denkbar. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um zu überprüfen, ob mittels eines Eingriffs in den microRNA-Haushalt der Leberzelle eine gezielte Stimulierung der Proliferation als Grundlage für einen zukünftigen therapeutischen Ansatz erzielt werden kann.

5. Abstract (*english*)

Introduction

Regeneration-associated MicroRNAs (miRNAs) might serve as a promising basis for the development of innovative treatment concepts for patients with severe hepatic diseases. In particular, liver regeneration research is focused on the stimulation of the proliferative capacity of the liver, since cell-based therapy concepts for the liver depend on a specific proliferation stimulus. The aim of this study was to determine whether depletion or supplementation of specific liver regeneration-associated miRNAs miR-125b-5p, miR-26a and let-7e may influence the post-transcriptional expression of cell cycle associated target genes in vitro, thus finally leading to an increase of liver cell proliferation.

Material and Methods

For this purpose, primary rat hepatocytes were cultured and transfected with inhibitors and mimics of the liver regeneration related miRNAs miR-125b-5p, miR-26a and let-7e. The cell cultures were harvested at different time points and the impact of the knockdown or supplementation on regeneration related target genes was analyzed by miRNA-RT-PCR, mRNA-RT-PCR, Western blot and ELISA.

Results

The study confirmed that inhibition and supplementation of endogenous miRNAs in primary hepatocytes is technically feasible. However, on mRNA level, a surprisingly variable expression of the putative targets P53 and CCND2 was observed, depending on the respective housekeeping genes used in the analysis. While the knockdown and overexpression of the miR-125-5p, when calculated on beta-2-microglobulin, resulted in a hypothesis corresponding increase or decrease of the endogenous p53 mRNA level, the results computed on the basis of beta actin, only showed an increase of gene expression. At the protein level, no definite conclusion regarding the regulation of both targets could be drawn.

Discussion

In summary, the artificial intervention in the regulatory cycle of the liver regeneration associated microRNAs 125b-5p, miR-26a and let-7e did not show a significant influence on the suspected target genes p53 and CCND2 in rat hepatocytes. A possible explanation for this result could be the species-dependent expression and variability of the target genes also described in the literature. Moreover, a direct impact of the selected miRNAs on housekeeping genes is conceivable. Further studies are needed to determine whether a

targeted stimulation of proliferation as a basis for future therapeutic approaches can be achieved by intervention in microRNA processes of the liver cells.

6. Einleitung

6.1. Leberregeneration

Die Leber ist die größte Drüse des menschlichen Organismus und dient als exokrines und endokrines Organ. Ihre endokrine Aufgabe beinhaltet die Sekretion vieler Hormone, wie dem Insulin-like growth factor (IGF), Angiotensinogen und Thrombopoetin, während die wichtigste exkretorische Aufgabe die Gallensekretion darstellt. Die Leber dient als Glykogenspeicher, Entgiftungsort, kontrolliert Stoffwechselfvorgänge, ist an der Cholesterinsynthese bzw. dem -transport, der Regulierung des Harnstoffzyklus, und der Sekretion von Plasmaproteinen, wie Albumin und Apolipoproteinen beteiligt. Etwa 70% der Leberzellmasse besteht aus leberspezifischen Parenchymzellen, den Hepatozyten. Die aufgeführten metabolischen Aktivitäten sind überwiegend in den Hepatozyten lokalisiert.

Strukturelle Erkrankungen der Leber wie Fibrose oder Zirrhose und Erkrankungen wie die Hepatitis oder das akute Leberversagen gehen mit einer hohen Morbidität und Mortalität einher. Die hohe ökonomische Bedeutung und die gesundheitlichen Folgen von Lebererkrankungen bewirken ein stetig wachsendes Interesse an den Grundlagen der Physiologie der Leber (1-3).

Die Leber hat die einzigartige Fähigkeit, sich durch Proliferation differenzierter Zellen zu regenerieren. Normalerweise befinden sich die adulten humanen Hepatozyten in einem Ruhezustand und teilen sich weniger als ein bis zwei Mal pro Jahr. Kommt es jedoch durch einen Parenchymverlust, wie zum Beispiel durch eine Leberteilresektion, zu einem relativen Funktionsrückgang, resultiert daraus ein Proliferationsstimulus. Dieser führt zu einer Rekompensation der Leberfunktion durch ein kompensatorisches Wachstum der verbleibenden Leber. Dieses Wachstum wird durch die Proliferation vorher ruhender, adulter Hepatozyten vermittelt. Die Regeneration nach chronischer Schädigung erfolgt über die Metaplasie spezifischer Stammzellen. (4, 5)

Die Leberregeneration (LR) durch Proliferation adulter Hepatozyten kann in drei Phasen unterteilt werden. Die erste Phase ist die Induktionsphase, sie beinhaltet die Umwandlung von der G0 zur G1 Phase des Hepatozyten-Zellzyklus und startet innerhalb der ersten vier Stunden nach Leberteilresektion. Die zweite Phase, auch Progressionsphase genannt, bewerkstelligt den Übergang von der G1 Phase in die vollständige Mitose. Die letzte sogenannte Apoptosephase lässt die Zelle in die initiale G0 Phase zurückkehren. (6)

Viele dieser Prozesse werden von spezifischen Wachstumsfaktoren wie dem Hepatozytenwachstumsfaktor (HGF) oder Zytokinen wie IL-6, durch Umbau des Grundgewebes und durch eine Vielzahl anderer Stimulations- und Inhibitionsvorgänge ausgelöst und beeinflusst. Proliferationsfördernde Faktoren wirken als Motor der Leberregeneration, während Proliferationsinhibitoren die Zellproliferation stoppen, wenn die Restleber eine geeignete Größe erreicht hat. Antiproliferationsfaktoren kontrollieren die Geschwindigkeit der Proliferation, bestimmen den Endpunkt der Leberregeneration und steuern die Richtung des Regenerationsvorgangs. Somit sind Proliferationsinhibitoren ebenso wichtig wie proliferationsfördernde Faktoren, um eine sichere und stabile Leberregeneration zu gewährleisten. Zytokine, wie TGF- β und IL-1 sowie Tumorsuppressorgene, wie p53 und p21, sind wichtige Mitglieder der Proliferationsinhibitorfamilie der Leberregeneration. Trotz zahlreicher Kenntnisse über viele dieser Vorgänge ist die Regulation der LR noch nicht im Detail verstanden. Das spezifische Induzieren dieses hoch komplexen Prozesses erweist sich wissenschaftliche und therapeutisch als sehr anspruchsvoll. (7, 8)

6.1.1. Lebererkrankungen und Therapiemöglichkeiten

Eine akute und chronische Schädigung der Leber kann durch viele Faktoren bedingt sein. Verschiedene Formen der Hepatitis, angeborene oder erworbene Stoffwechselerkrankungen, eine alkoholisch und nicht alkoholisch bedingte Fettleber, andere exogene Noxen wie Aflatoxin oder Tabakrauch können zu einer Leberzirrhose und einem dadurch bedingten Funktionsverlust führen. Diese verschiedenen Formen von schwerer Leberschädigung haben unterschiedliche Pathomechanismen und erfordern daher spezifische Therapien. Unabhängig von den zugrundeliegenden Ätiologien stellt die Unterstützung der Leberregeneration bzw. die Überbrückung der Zeit bis zu einer Lebertransplantation (LTX) das gemeinsame therapeutische Ziel dar. (9, 10)

Pro Jahr sterben weltweit 300.000 bis 500.000 Menschen an den Folgen von Lebererkrankungen, welche durch das Hepatitis-C-Virus (HCV) verursacht wurden. Davon gehen 15-30% unbehandelt in eine chronische Form über, welche unter anderem mit einem erhöhten Risiko zur Entstehung eines Hepatozellulären Karzinoms (HCC) vergesellschaftet ist. Laut dem Bundesbericht „Gesundheit in Deutschland 2015“ zu Krebserkrankungen sind in Deutschland ca. 7500 Neuerkrankungen pro Jahr und ebenso viele Todesfälle zu verzeichnen. Mit über 70% ist das HCC die häufigste Form von Lebertumoren und obwohl es vorrangig in Ländern wie Afrika und Asien vergesellschaftet ist, steigt seine Inzidenz auch in Europa stetig. Es wird oft erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert und hat

eine sehr schlechte Prognose mit einer medianen Überlebenszeit von 6 bis 20 Monaten und einer 5-Jahres-Überlebensrate von ca. 3%. (9, 11, 12)

Basierend auf dem Konsens des *Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) Staging-Systems* ist die Leberresektion derzeit die beste Behandlungsoption für ein HCC in einer Leber mit ausreichender funktioneller Kapazität. Neben der Leberteilektomie werden die LTX oder ablativ Verfahren als weitere Behandlungsmöglichkeiten eingesetzt. Eine Therapie mit Chemotherapeutika, u.a. mit dem Proteinkinaseinhibitor Sorafenib, wird im fortgeschrittenen Stadium sowie ergänzend zur Palliativversorgung im Endstadium eingesetzt. (13)

Trotz aller erwähnten Behandlungsstrategien bietet die LTX oftmals die einzige kurative Therapie schwerer Lebererkrankungen. Ein fortwährendes Problem ist die Diskrepanz zwischen der Verfügbarkeit an geeigneten Spenderorganen und den Patienten auf der Warteliste. Die Spenderzahlen in Deutschland sind von 1296 Spendern im Jahre 2010 auf 797 Spender im Jahr 2017 zurückgegangen. Dies entspricht einer Reduktion von fast 40 % binnen acht Jahren. (14) Nur ein Drittel der Personen auf der Transplantationswarteliste werden weltweit ein Organ bekommen und die Nachfrage wird in den nächsten 20 Jahren voraussichtlich um weitere 23% steigen. Da das Organangebot die Anzahl der LTX und somit die Lebenserwartung vieler Patienten nachhaltig beschränkt, steigt das wissenschaftliche Interesse an der Entwicklung innovativer Therapien kontinuierlich an. Regenerative Therapien zielen darauf ab, die Lebergewebsreparatur und -regeneration zu unterstützen. (15, 16)

6.1.2. Leberzelltherapie

Alternative Therapiekonzepte wie die Leberzelltransplantation oder das *Tissue Engineering* wurden entwickelt, um das Problem des Organmangels in naher Zukunft zu adressieren. Hierfür sind Strategien erforderlich, welche eine suffiziente Anzahl qualitativ hochwertiger Hepatozyten bereitstellen können. Diese Konzepte basieren auf der Nutzung von Leberzellen, welche mittels enzymatischer Verfahren aus dem Gewebeverband isoliert werden. (17, 18)

Die metabolische Aktivität primärer humaner Hepatozyten wird nach Isolation und Kultivierung zügig auf ein Minimum herunterreguliert. Auch die Leber-spezifische Genexpression nimmt während dieser initialen Kulturphase zügig ab. Mit geeigneten Medien und im Zellverbund kann die metabolische Kapazität der primären Hepatozyten jedoch über einen gewissen Zeitraum aufrechterhalten werden, wie in primären Ratten- und humanen Hepatozyten gezeigt werden konnte. (19)

In vivo kehren adulte Hepatozyten ohne die Anwesenheit von spezifischen Proliferationsstimuli in die G0 Phase zurück. *In vitro* verharren die überlebenden kultivierten Zellen jedoch am G1 Übergangspunkt. Sie verlieren ihre Fähigkeit zu proliferieren, und sterben meist früh ab. Beide Zellreihen, primäre humane- sowie Rattenhepatozyten weisen somit in Kultur normalerweise kein spontanes Zellwachstum mehr auf. Auch trotz wachstumsfördernder Maßnahmen ist die Proliferationsrate sehr gering. Auf Grund dessen wurden verschiedene Strategien, wie unter anderem die Transduktion oder Transfektion der Hepatozyten mit bekannten immortalisierenden Genen entwickelt, um das längere Überleben der Zellen zu sichern. (20)

Die Hepatozytentransplantation stellt eine mögliche Alternative zur Organtransplantation für die Therapie von Lebererkrankungen dar. Zahlreiche Studien in Nagetieren zeigten, dass transplantierte isolierte Hepatozyten die Stoffwechselfängel der Leber korrigieren können. Das Verfahren der Zelltransplantation über die Leber oder Milz ist im Vergleich zur Organtransplantation weit weniger invasiv und könnte auch bei schwer kranken Patienten mit geringerem Risiko durchgeführt werden. Obwohl das Verfahren beim Menschen relativ sicher angewandt werden kann, begrenzen derzeit insbesondere das limitierte Angebot an Spenderorganen für die Leberzellisolierung und das limitierte *Engraftment* und Überleben der Hepatozyten die Effizienz dieses neuen Verfahrens. (21)

Die Leberzelltransplantation bietet zahlreiche konzeptuelle Vorteile im Vergleich zur Organtransplantation. Beispielsweise könnten durch ein Spenderorgan mehrere Empfänger mit humanen Hepatozyten versorgt werden. Es bestünde die Möglichkeit die isolierten Hepatozyten kryo zu konservieren oder zu kultivieren um sie im Notfall sofort bereitstellen zu können. Es existieren Studien, die sich ausschließlich mit der Optimierung der Isolierung und der Kulturbedingungen primärer Hepatozyten beschäftigen. Um das vorrangige Problem des Spendermangels auch für die Zelltransplantation zu adressieren sind daher neuere Konzepte zur Proliferationsstimulierung von Leberzellen dringend notwendig. (22)

6.2. Leberregenerations-spezifische microRNAs

MiRNAs sind kleine, endogene, nicht kodierende RNA Moleküle mit einer Länge von ca. ca. 22 Nukleotiden. Für die Entstehung von miRNAs gibt es mehrere Synthesewege. Der häufigste und am besten beschriebene ist der in Abbildung 1 dargestellte „canonical“ Signalweg. Folglich entsteht eine einzelsträngige miRNA, die über die Bindung der 3' untranslatierten Region (3'UTR) ihrer Target-mRNA die posttranskriptionelle Genexpression

regulieren kann. Somit kann eine reife miRNA in Form von Repression oder Degradation verschiedenste Gene regulieren und blockieren. (23)

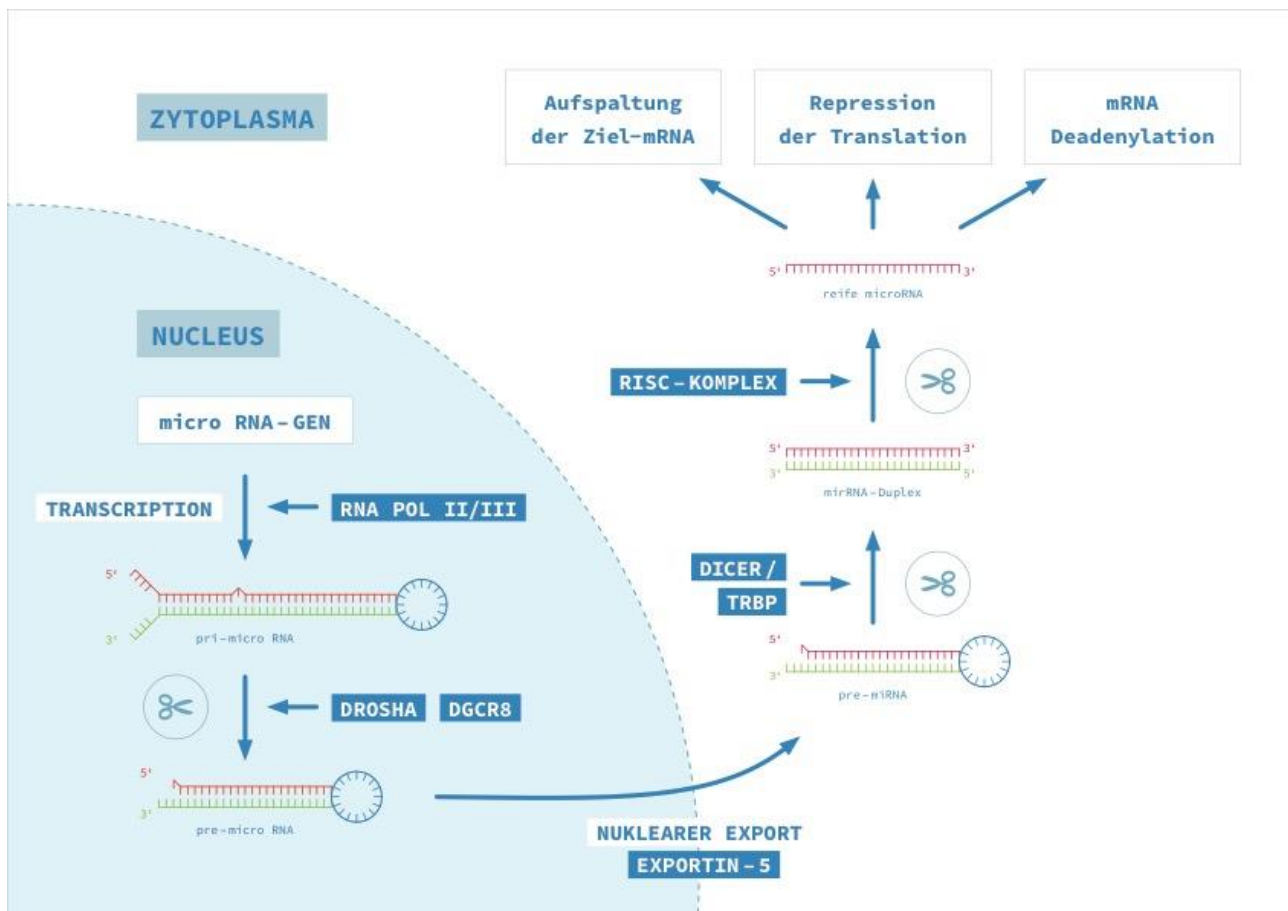


Abbildung 1: Canonicaler miRNA Syntheseweg – Es erfolgt die Transkription eines RNA-Moleküls durch die RNA- Polymerase II/III (RNA Pol II/III) im Zellkern. Ein unreifes Transkript (pri-miRNA) bildet eine Haarnadelstruktur die im Zellkern durch einen Mikroprozessor bestehend aus der RNase Drosha und seinem Coenzym DGCR8 (DiGeorge syndrom critical region8) zusammengesetzt ist und den miRNA Vorläufer (pre-miRNA) zurechtschneidet. Exportin-5 transportiert die pre-miR vom Kern ins Zytoplasma. Dort wird sie von einem Komplex aus Dicer und TAR-RNA Bindungsprotein (TRBP) gebunden und abermals zurechtgeschnitten, um eine doppelsträngige ca. 22 Nukleotid große RNA zu formen. Die entstandene Doppelstrang pre-miRNA wird wiederum gebunden um den RNA - *induced silencing complex* (RISC) bzw. *loading complex* (RLC) zu bilden. Nach erneutem Zurechtschneiden ist eine einzelsträngige reife miRNA entstanden, die durch Degradations- und Repressionsprozesse wie mRNA Target-Aufspaltung, Unterdrückung der Translation oder mRNA Deadenylation verschiedene Gene regulieren und blockieren kann. Die Abbildung und Beschreibung orientiert sich an den Angaben von Carraco, G. et al. (23)

Mittlerweile ist gut bekannt, dass MicroRNAs in eine Reihe biologischer Prozesse, wie der Karzinogenese, Zelldifferenzierung, Proliferation und Apoptose involviert sind. Die Dysregulation von miRNAs spielt bei einer Vielzahl von Erkrankungen eine entscheidende Rolle. (24) Es wird vermutet, dass miRNAs welche in unterschiedlichen Spezies gleichermaßen beobachtet werden, wichtige Funktionen in Hinblick auf die Modulierung der

Genexpression besitzen. Computeranalysen deuten darauf hin, dass ca. 5300 Gene Zielstrukturen von miRNAs enthalten. Damit könnten ca. 30% der menschlichen Gene unter die Translationsregulierung durch miRNAs fallen. Die Computerdatenbank miRBase enthält in ihrer 21. Version 35828 reife miRNA-Sequenzen von 223 Spezies, einschließlich 2588 und 1915 reife miRNAs für Mensch bzw. Maus. (25, 26)

Auch in Studien zur Leberforschung sind inzwischen Expressionsunterschiede von miRNAs beschrieben. Obwohl in den letzten Jahren vermehrt verschiedene leberregenerationsrelevante miRNA Expressionsmuster gezeigt wurden, ist bislang noch wenig über die funktionelle Rolle der miRNAs in Leberzellen bekannt. Aus diesem Grund steht mittlerweile die Charakterisierung der spezifischen Funktionen und Regulationsmechanismen von miRNAs in der Leberregeneration im Vordergrund. (27)

Eine einzelne miRNA kann in multiple Entwicklungsschritte der Leber involviert sein. So reguliert beispielsweise die miR-33 die Hepatozytenproliferation, den Fettstoffwechsel und die Gallensekretion, während die miR-122 die Hepatozytenspezifikation, Proliferation, den Fettstoffwechsel und den Eisenstoffwechsel reguliert. Zudem können diverse Stoffwechselwege nacheinander von verschiedenen miRNAs reguliert werden. Die Rolle einiger dieser miRNAs ist sogar in unterschiedlichen Spezies beschrieben. (28)

In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl von Micro-Array-basierten Studien durchgeführt, um globale miRNA Änderungen während der Leberregeneration zu identifizieren. Die Ergebnisse zeigten, dass die miRNA-Expressionsmuster während der Leberregeneration, insbesondere vor und nach erfolgter Leberteilresektion, erheblich verändert sind. Es wurden erste potentielle Ziele dieser miRNAs postuliert. So nimmt beispielsweise die miR-26a eine zentrale Rolle in der Leberregeneration ein: durch eine stark herabgesetzte Expression der miR-26a während der Regenerationsphase wird die Translation der Zellzyklusproteine Cyclin D2 und E2 und somit die Proliferation nach erfolgter Leberteilresektion begünstigt. Eine Überexpression der miR-26a hingegen führt zu einer Unterdrückung der Hepatozytenproliferation. (29)

Zykline und Cyclin-abhängige-Kinasen (Cdk) sind wichtige Regulatoren des Zellzyklus. Genau an dieser Stelle setzen viele miRNAs an. Es wurde schon mehrfach gezeigt, dass einige miRNAs wie die miR-26a, miR-221 und miR-195 die Cyclin-Komplexe D/CDK4/CDK6 und E/CDK2 in murinen Leberkrebs-Modellen regulieren. (9, 30)

Es konnte auch die Regulation der Hepatozytenproliferation über eine Blockierung des G1/S-Übergangs durch die miR-26a sowie die Unterdrückung des Tumorwachstums *in vivo* nachgewiesen werden. Eine Herunterregulierung der miR-26a korrelierte dabei signifikant

mit der Entstehung von Tumorrezidiven, mit Metastasierung und einer schlechten Prognose bei HCC-Patienten. Beschriebene Angriffsziele der miR-26a sind in diesem Zusammenhang IL-6, SMAD1, MTDH, CDK6, CCNE1, CCNE2, CCND2, EZH2, PTEN, RB1, MAP3K2 und GSK-3 β . (31)

Andere experimentelle Untersuchungen von miRNA-Expressionsprofilen während der Leberregeneration im Rattenmodell zeigten, dass zum Höhepunkt der DNA-Replikation, 24 Stunden nach Leberteilresektion zahlreiche miRNAs wie unter anderem Mitglieder der let-7 Familie (7b, 7c, 7e, f, i) sowie miR-26a, miR-125b-5p, miR-126, miR-107, miR-223, miR-352, miR-375 und miR-872 signifikant herunterreguliert waren. Es ist auffällig, dass viele dieser miRNAs insbesondere den Zellzyklus beeinflussen oder regulieren können. So begünstigt die bereits beschriebene miR-26a die Proliferation, während die let-7 Familienmitglieder den Zellzyklusprogress unterdrücken können. (7) Die let-7 Familie ist zudem als Tumorsuppressor in mehreren Krebsarten identifiziert worden und essentiell an der Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Hepatozyten ähnlichen Zellen beteiligt. Die let-7f wurde als negativer Regulator der Hepatozytendifferenzierung beschrieben, während die let-7e u.a. protektiv gegen die neuronale Apoptose wirkt. (32, 33)

Eine Überexpression verschiedener miRNAs, einschließlich der let-7, miR-17, miR-29, miR-30, und miR-424 reduziert die Zellproliferation und DNA-Synthese in Huh-7 Zellen und primären Hepatozyten. Interessanterweise waren nach 3, 12 und 18 Stunden nach Leberteilresektion ca. 40% der getesteten miRNAs hochreguliert. Im Gegensatz dazu waren 24 Stunden nach Leberteilresektion ca. 70% der miRNAs herunterreguliert. (34)

Bekannte Ziele der let-7 Familie sind auch Cyclin D, CDC25A, CDK2/4/6, MYC, E2F und CDC34, was die Vielfältigkeit der zellulären Einflüsse dieser miRNAs während der Leberregeneration erahnen lässt. Mittlerweile sind auch Tumorsuppressor miRNAs wie miR-34, miR-107 und miR-145 bekannt, die durch p53 induziert werden. Einige dieser miRNAs haben p53-negative Regulatoren als Ziel (MDM2 und SIRT1), die durch positives Feedback die p53 Stabilität und Aktivität verstärken. P53 repressive miRNAs (u.a. miR-125s, miR-504, miR-380-5p) reduzieren die p53-Expression durch die Bindung an eine Region des 3'-UTR der p53 mRNA und hemmen somit den Zellzyklusarrest sowie die Apoptose. (25)

Der erwähnte Tumorsuppressor p53 ist ein zentraler Akteur des Zellzyklus. Die Rolle von p53 in der Repression der Apoptose ist nicht vollständig geklärt. Die Bedeutung von p53 während der Leberregeneration wurde bereits 2005 im Rattenmodell anhand des erhöhten Expressionslevels der TP53 mRNA in mit Hepatozytenwachstumsfaktor (HGF) behandelten

kultivierten Hepatozyten beschrieben. Die Erhöhung des p53-Proteinspiegels begann nach 6 und erreichte ein Maximum nach 18 Stunden, während die DNA-Synthese bei 30 Stunden ihr Maximum erreichte. Es wurde somit gezeigt, dass die p53 Expression durch HGF hochreguliert werden kann und gleichzeitig auch die Hepatozytenproliferation fördert. (35, 36).

Andererseits ist bekannt, dass eine Überexpression von IGF2 in Tumoren zu einer p53 Inaktivierung führt. (37-39) In der Myogenese von Skelettmuskeln ist die miR-125b als negativer Regulator von IGF2 beschrieben und beeinflusst demzufolge die Differenzierung und Regeneration von Skelettmuskelzellen. (40) IGF2 reguliert durch wachstumsfördernde und metabolische Prozesse das Wachstum von Säugetieren. Es ist wahrscheinlich, dass eine Dysregulation dieses Signalweges an der Entstehung zahlreicher Tumorentitäten wie unter anderem dem HCC beteiligt sein kann. (41, 42)

MiR-125 beeinflusst bekanntermaßen mehrere Komponenten des p53 Netzwerkes, welche einerseits die Apoptose (BAK1, IGFBP3, Itch, Puma, Prkra, Tp53inp1 und Zac1) und andererseits den Zellzyklus (Cyclin C, Cdc25C, Cdkn2c, EDN1, PPP1CA und Sel1l) initiieren. Sie könnte durch die Regulation von proliferativen und apoptotischen Genen als Puffer und zur Feinabstimmung der Aktivität des p53-Netzwerkes dienen und somit das Gleichgewicht zwischen Proliferation und Apoptose kontrollieren. (43)

Die Regulation von miRNAs durch p53 sowie die Expressionsänderung von TP53 durch miRNAs eröffnen neue Wege und Möglichkeiten. Eine Beeinflussung des Zellzyklusarrest, der Apoptose und DNA-Reparatur auf molekularer Ebene könnte zukünftig supportiv zur Leberregeneration beizutragen. Es wurde erstmalig ein Diagnose-miRNA-Profil für HCC gezeigt, welches der miR-125b eine prädiktive Bedeutung für die Entstehung eines HCC zukommen lässt. (44) Zudem wurde gezeigt, dass die miR-125b einerseits den Zellzyklus in Leberzellkarzinomen unterdrückt, jedoch die Proliferation von Prostatakarzinomzellen fördert. Gleichzeitig fungiert sie als negativer Regulator von p53 sowohl im Menschen als auch im Zebrafisch. (45)

Neben ihrer Beteiligung an grundlegenden biologischen Prozessen wie der Proliferation, Apoptose, Migration und Differenzierung sind miRNAs ebenfalls an der Kontrolle von metabolischen Leberfunktionen, oxidativem Stress und Inflammation beteiligt. Der Identifizierung neuer miRNA Expressionsprofile und Regulationsmechanismen und ihrer technischen Modifizierungen sowie klinischen Anwendung wird daher künftig ein immer größeres wissenschaftliches Interesse zu Teil werden. (46-48)

6.2.1. MicroRNAs in Klinik und Forschung

Ein wichtiger Bestandteil aktueller miRNA basierter Studien sind Transfektionsversuche mit Einzelstrang-miRNA Inhibitoren (Anti-MiRs) oder imitierenden Doppelstrang-miRNAs (Mimics). Anti-MiRs und Mimics werden gegenwärtig in einer Vielzahl von Studien verwendet, um die Rolle spezifischer miRNAs besser beschreiben und verstehen zu können. Sie werden beispielsweise in Untersuchungen bei der Differenzierung embryonaler Stammzellen zu Hepatozyten oder im Hepatozytenstoffwechsel angewandt. Es ist bereits bekannt, dass die miR-122 die Differenzierung von pluripotenten Stammzellen in Hepatozyten fördert und *in vivo* eine leberprotektive Wirkung aufweist. (17, 49)

MiRNA-basierte Therapeutika stellen daher einen vielversprechenden Ansatz für die Entwicklung neuer regenerativer Konzepte für die Leber dar. Aufgrund des regulatorischen Potentials von miRNAs sind die Erkenntnisse aus der Forschung inzwischen weit fortgeschritten. Spezifische Anti-MiRs und Mimics werden verwendet um die endogenen Level spezieller miRNAs zu modulieren. Ganze miRNA-Familien können durch die Verwendung mehrerer spezifischer Anti-miRs inhibiert werden, weshalb miRNA-Inhibitoren bereits als potentielle Therapeutika untersucht wurden. Die bisher getesteten miRNA-Inhibitoren weisen eine hohe Affinität, Spezifität und Stabilität auf. Die Fähigkeit einer einzelnen miRNA mehrere Zielproteine möglicherweise sogar innerhalb desselben regulatorischen Netzwerkes zu beeinflussen, ist eine der bedeutendsten Angriffspunkte für einen zukünftigen therapeutischen Einsatz von miRNA Mimics. Die endogene miRNA Funktion kann entweder durch Verwendung viraler Vektoren oder synthetisch hergestellter Doppelstrang-miRNAs gesteigert werden. Bisher konnte die Wirkung von Adenoviren-assoziierten Vektoren zur Steigerung der Expression spezifischer miRNAs und Wiederherstellung der Aktivität bestimmter miRNAs *in vivo* im Mausmodell für das HCC sowie das Lungenkarzinom gezeigt werden. Die Verwendung spezifischer, auf synthetischen Oligonukleotiden basierenden Technologien ist weniger in der Literatur beschrieben. Um eine bessere Aufnahme in die Zellen sowie eine höhere Stabilität gegen Exonukleasen zu erreichen, werden synthetisch hergestellte Mimics chemisch modifiziert, so dass der RISC-Komplex den *antisense* Strang der Ziel-RNA noch erkennt und mit diesem gut interagieren kann. Somit sind Mimics allerdings weniger stabil als Anti-miRs und Dosierung und Anwendung müssen im Detail noch verbessert werden. Unter anderem auch, da die in den meisten Tierversuchen bisher verwendeten Dosen wahrscheinlich deutlich höher liegen als therapeutisch akzeptabel wäre. Ein sich noch in der ersten klinischen Phase befindliches Mimic ist das der miR-34a, eine Tumorsuppressor miRNA, die in verschiedenen

Krebsarten herunterreguliert ist. Die Firma Mirna Therapeutics hat ein Oligonukleotid Mimic der miR-34a entwickelt, welches Tumorpatienten als Ersatztherapie verabreicht werden könnte, um ein funktionelles Level der miR-34a wiederherzustellen. Auch die präklinisch therapeutische Anwendung eines Mimic der miR-29 führte zu einem Anstieg der endogenen miRNA und könnte somit ein potentes Therapeutikum in der Behandlung der Lungenfibrose darstellen, indem es Kollagen 1a1 als direktes Target in Fibroblasten und Epithelzellen reduziert. (50-52)

Miravirsen, ein miR-122-Antagonist befand sich bereits in den Jahren 2011-2012 in einer klinischen Phase-2a-Studie und wird bereits zur Behandlung von Hepatitis-C-Virus-Infektionen eingesetzt. TargoMiR, ein miR-16 Mimic, wird bei Patienten mit rezidivierendem malignem Pleuramesotheliom (MPM) und fortgeschrittenem nicht-kleinzelligem Lungenkrebs (NSCLC) in klinischen Studien verwendet. Die Erkenntnis, dass miRNAs auch eine wichtige Rolle im Rahmen der Entstehung und Prognose des HCC spielen, kann die Grundlage für die Entwicklung von spezifischen Mimics oder Antago-miRs als neuartige Therapeutika im Kampf gegen das HCC liefern. So hemmt beispielsweise das systemisch verabreichte Adenovirus-assoziierte Mimic der miR-26a Tumorwachstum und Progression des HCC im Mausmodell ohne zelltoxisch zu wirken, während die LNA-AntagomiR der miR-122 die HCV Replikation in Schimpansen unterdrückt. Eine ebenfalls auf der Anti-MiR-122-basierte Therapie gegen HCV der Firma Regulus Therapeutics befindet sich bereits in der klinischen Phase I. Des Weiteren kann die Wiederherstellung der miR-122 Expression im HCC zu einer Sensibilisierung gegenüber Chemotherapeutika wie Serafinib und Doxorubicin führen. Ein Vorteil der miRNA basierten Therapien ist ihre Eigenschaft selbst keine Proteine zu kodieren und nicht immunogen zu wirken. Zu bedenken ist jedoch ihr Einfluss auf zahlreiche Signalwege oder die Initiierung von Entzündungsreaktionen wodurch unvorhersehbare *off-Target* Effekte innerhalb eines klinischen Umfeldes auftreten könnten. Daher ist es wichtig, für die Entwicklung neuer Anwendungskonzepte unerwünschte Nebenwirkungen zu reduzieren, die gewebespezifische Abgabe sowie Aufnahme zu erhöhen und Transportsysteme zu modifizieren. (53-55)

Mittlerweile existieren weltweit zahlreiche Firmen, die neue Produkte für eine miRNA basierte Therapie auf den Markt bringen. Zahlreichen präklinische und klinische Studien bestätigen inzwischen die erfolgsversprechenden Aussichten einer miRNA-basierten Therapie und lassen deren klinischen Einsatz prospektiv immer realistischer erscheinen. (56-58)

6.3. Zusammenfassende Zielsetzung

In tierexperimentellen Studien mit einer Leberteileresektion in Nagetiermodellen wurden bereits einige der zugrundeliegenden Mechanismen der Leberregeneration beschrieben. Die frühe Phase ist durch die Expression verschiedener Zellzyklus-assoziiierter Proteine wie den Cyclinen charakterisiert und resultiert in der Proliferation der Hepatozyten. Es wurde bereits gezeigt, dass miRNAs sowohl Einfluss auf die frühe Phase der Proliferation als auch auf die Termination der Regeneration haben. (59)

Ziel dieses Promotionsvorhabens war die *in vitro* Untersuchung Leberregenerations-assoziiierter miRNAs in Rattenhepatozyten. Basierend auf den Ergebnissen vorangegangener Studien der Arbeitsgruppe und bereits bekannter Leberregenerations-assoziiierter miRNA-Profile wurden folgende Hypothesen aufgestellt:

- die Depletion bzw. Supplementierung der Leberregenerations-assoziierten miRNAs miR-125b-5p, miR-26a und let-7e *in vitro* beeinflusst die posttranskriptionelle Genexpression
- die hierdurch erreichte Herunterregulation / Interferenz bzw. Hochregulation / Anschaltung spezifischer Zielgene beeinflusst im Weiteren die Translation von Proteinen des Zellzyklus und verstärkt somit die Leberzellproliferation

Die Dynamik der miRNA-Expressionsänderungen korreliert mit der Dynamik der Leberregeneration. Die stärkste Expressionsänderung findet 24h nach Leberteileresektion statt. In Folge dessen wurden miRNAs gewählt, welche zu diesem Zeitpunkt am stärksten dereguliert waren. Interessanter Weise beeinflussen drei dieser deregulierten miRNAs, miR-125b-5p, miR-26a und let-7e, entscheidend die Regulation des Hepatozyten- Zellzyklus. Wie oben bereits erwähnt, begünstigt die miR-26a die Proliferation von Hepatozyten, während einige der let-7 Familienmitglieder die Zellzyklusprogression unterdrücken. (7) Die let-7 Familie ist zudem als Tumorsuppressor in verschiedenen Krebsarten identifiziert worden und essentiell an der Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Hepatozyten-ähnlichen Zellen beteiligt. Speziell let-7e wirkt nachweislich auch protektiv gegen neuronale Apoptose. (32, 33) U.a. sind D-Cycline als Ziele der let-7e beschrieben worden sowie CCND2 als Target der miR-26a. (25, 31)

Die miR-125b beeinflusst bekanntermaßen mehrere Komponenten des p53 Netzwerkes. Es befinden sich einerseits Apoptose-assoziierte Targets wie BAK1, IGFBP3, Itch, Puma, Prkra, Tp53inp1 und Zac1, andererseits Zellzyklus-assoziierte Targets wie Cyclin C, Cdc25C, Cdkn2c, EDN1, PPP1CA und Sel1l darunter. So wurde gezeigt, dass miR-125b in

Leberzellkarzinomen den Zellzyklus unterdrückt, während sie in Prostatakarcinomzellen die Proliferation fördert. Darüber hinaus wird miR-125b als negativer Regulator von p53, dem zentralen Akteur im Zellzyklus beschrieben. In HGF-stimulierten Hepatozyten steht das Expressionsniveau von TP53 in direktem Zusammenhang mit einer gesteigerten Hepatozytenproliferation. (35, 45)

Zweck dieser Arbeit war es, die Rolle der miRNAs miR-125b-5p, miR-26a und let-7e in der Leberregeneration durch Transfektion ihrer jeweiligen miRNA-Inhibitoren und Mimics in adulte Rattenhepatozyten *in vitro* zu untersuchen. Zur Zeit der Durchführung der Versuche in den Jahren 2011 bis 2013 basierten die Vorkenntnisse ausschließlich auf dem damaligen Stand der Literatur. Verschiedene Analyseverfahren wie die RT-PCR, der Western Blot und der ELISA sollten die Expression der vermuteten Zielgene zu unterschiedlichen Zeitpunkten nachweisen und die Hypothese der posttranslationalen Regulation der Zielgene durch die jeweiligen miRNAs bestätigen. Als putative Zielgene wurden p53 und IGF2 für die miR-125b-5p sowie CCND2 für die miR-26a und let-7e gewählt. Diese Untersuchungen sollten als Grundlage für die weitere Entwicklung von klinischen Konzepten zur Stimulierung transplanteder Leberzellen oder für eine pharmakologische Stimulierung der Leberzellproliferation vor oder nach Leberteilresektion dienen.

6.4. Studiendesign

Für die eigenen Versuche wurden Lebern von männlichen Wistar Ratten explantiert und die Hepatozyten nach einem in unserem Labor entwickelten Protokoll isoliert. Die aufbereiteten vitalen Hepatozyten wurden gezählt und in Kultur genommen. Nach Adhärenz wurden die primären Zellen in verschiedene Gruppen, mit unterschiedlichen Medien behandelt und im Anschluss mit den entsprechenden Inhibitoren (Anti-miRNAs) bzw. Mimics (pre-miRNAs) der miR-125b-5p, miR-26a und let-7e transfiziert. Es wurden zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultur Proben zur Quantifizierung und Analyse der Genexpression (RNA-Isolierung, qRT-PCR) und potenzieller Target-Proteine (Western Blot, ELISA) gewonnen. Anhand derer sollte die Expression der putativen Zielgene-/Proteine TP53, CCND2 und IGF2 nachgewiesen werden (Abb. 2).

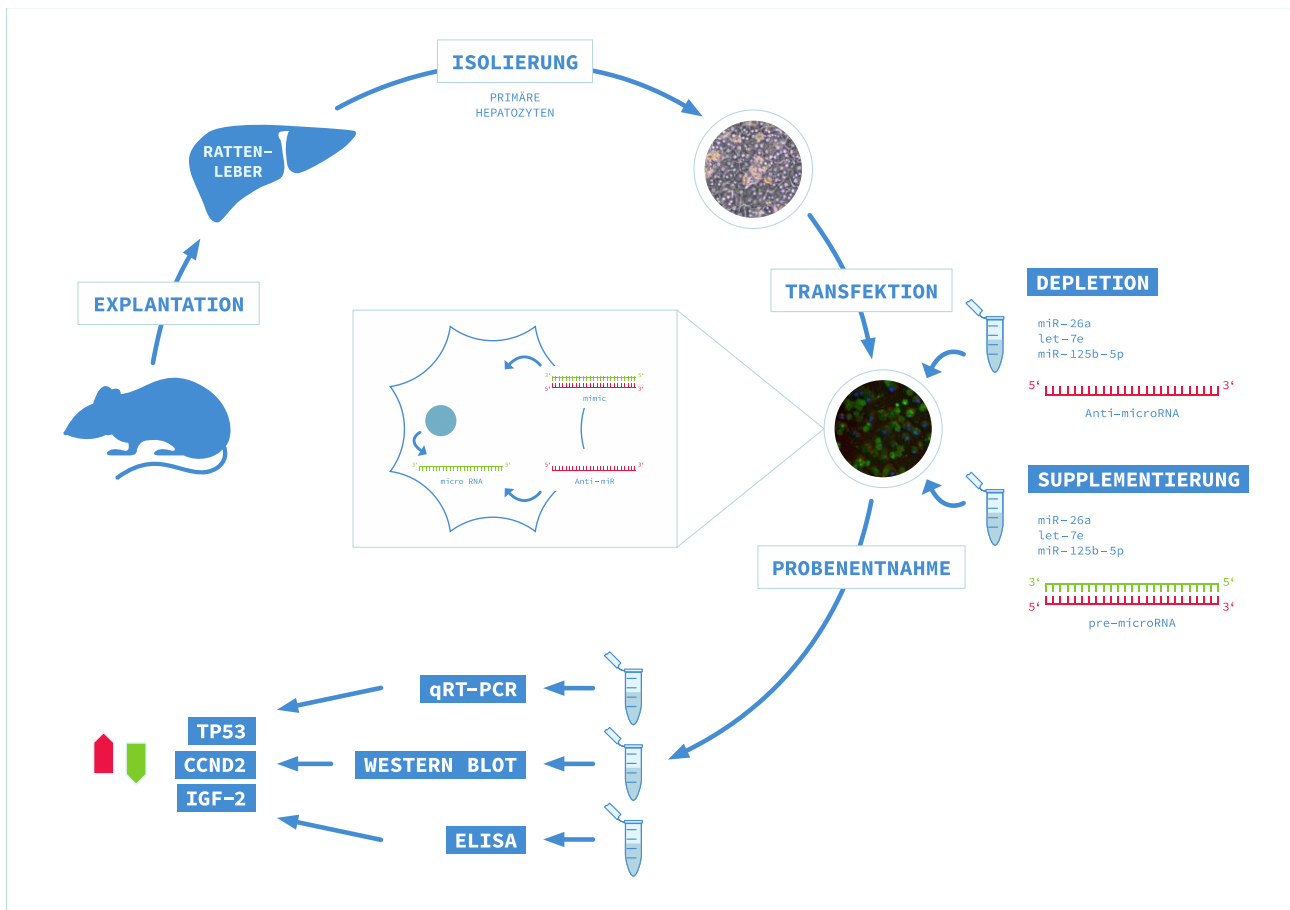


Abbildung 2: Versuchsaufbau – Schematische Darstellung des Versuchsaufbau in chronologischer Abfolge von der Explantation der Rattenleber über die Kultivierung und Transfektion der primären Hepatozyten bis hin zur Analyse der Proben zu den verschiedenen Zeitpunkten: Isolierung und *in vitro* Kultivierung von primären Hepatozyten aus der Rattenleber (Wistar). Transfektion von Anti-microRNAs und pre-microRNAs der miR-26a, let-7e und miR-125b-5p. Probenentnahme zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Analyse der prädictiven Targets TP53, CCND2 und IGF-2 durch qRT-PCR, Western Blot und ELISA.

7. Material und Methoden

7.1. Materialliste

7.1.1. Operationsmaterial, -instrumente und -geräte

Produkt	Hersteller
Luer-Lock 4-Wege-Hahn	Smiths Medical Deutschland GmbH, Grassbrunn
16 GA-Venenverweilkanüle (Venoflon™ Pro)	BD Biosciences, Heidelberg
20G-Kanülen (Microlance™ 3, 0,9 x 40 mm)	BD Biosciences, Heidelberg
24 GA Kanüle (Microlance™ 3)	BD Biosciences, Heidelberg
24 GA Teflonsplint (Neoflon™ Venenver.-kanüle)	BD Biosciences, Heidelberg
27G- Kanülen (Microlance™ 3, 0,4 x 19 mm)	BD Biosciences, Heidelberg
4-0 Vicryl* Plus	Ethicon, Norderstedt
6-0 Seidenfaden	Resorba, Nürnberg
Abdecktuch (Folidrape® 75 cm x 90 cm)	Paul-Hartmann AG, Heidenheim
Arterienklemme, fein, BH105R	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Babykonservenwärmer, BS19	Hartig&Helling GmbH, Bochum
Backhaus Tuckklemmen, 11095-09	FST GmbH, Heidelberg
Braunoderm-Alkohollösung	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Chirurgische Pinzette, 11023-14	FST GmbH, Heidelberg
Einwegskalpell (Disposable Scalpel No.20)	Feather Safety Razor Co., Ltd., Japan
Gentamicinpad (GENTA-COLLresorb®)	Resorba, Nürnberg
Gewebeklebeband (Durapore™)	3M Deutschland GmbH, Neuss
Heparin (Heparin-Natrium-25000-ratiopharm® Inj.)	Ratiopharm GmbH, Ulm
Infusionsbesteck, BD™ R 87 P, Infusionsgeräte für Druck- und Schwerkraftinfusionen	BD Biosciences, Heidelberg
Iris-Schere, 14058-11	FST GmbH, Heidelberg
Isofluran (Forene®)	Abbot, Wiesbaden
Mikrochirurgische (Strabismus-)schere, 11-740-11	KLS Martin GmbH + Co. KG, Tuttlingen
Mikrochirurgische Pinzette, gebogen, 11274-20	FST GmbH, Heidelberg
Mikrochirurgische Pinzette, gerade, 11254-20	FST GmbH, Heidelberg
Mikrogefäßclip (Federklemmchen)	B. Braun, Melsungen
Mullkompressen 8-fach, unsteril (10 x 10 cm)	Fuhrmann®, Much
Nadelhalter, makro, BM200R	B. Braun, Melsungen
Nadelhalter mikro, gebogen, FD079R	B. Braun, Melsungen
Operationsmikroskop	WILD HEERBRUGG AG, Gais, Schweiz
Schere, gerade, Mayo, 14010-15	FST GmbH, Heidelberg
Seide, 6/0	RESORBA Medical GmbH, Nürnberg
Sterile 10ml-Spritze (Discardit™ II)	BD Biosciences, Heidelberg
Sterile 1ml- Spritzen (Plastipak™)	BD Biosciences, Heidelberg
Urin-Cup (100mL)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Vapor	Völker GmbH, Kaltenkirchen
Wärmematte (Heating Pad Model-No. HK5510)	AEG, Nürnberg
Wattestäbchen (150 x 2,2 mm)	Assistent®, Karl Hecht KG, Sondheim/Rhön

7.1.2. Zellisolierung

2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl) Ethansulfonsäure (HEPES)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Alkohollösungen (vergällte Ethanol-Lösung)	Herbeta Arzneimittel, Berlin
Aqua dest. (gefiltertes destilliertes Leitungswasser)	Filtersystem Mill-Q® Reagent Water System, Fa. Millipore, Molsheim, Frankreich
Calciumchlorid-2-hydrat (CaCl ₂)	Merck KGaA, Darmstadt
Collagenase P	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Dulbecco's 1xPBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung ohne Calcium/ Magnesium)	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Easycoll Separating Solution (1,124g/ml)	Biochrom AG, Berlin
EGTA (Ethylenglycol-bis-Tetraessigsäure)	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
Fötales Bovines Serum (FBS Superior)	Biochrom AG, Berlin
Histoacryl	B. Braun, Melsungen
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA, Darmstadt
Konische Röhrchen (BD Falcon™ 15mL, 50mL)	BD Biosciences, Heidelberg
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Natriumacetat-Dihydrat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Natriumchlorid 0,9% (1L Spüllösung, Plastipur®)	Fresenius, Bad Homburg v. d. H.
Natriumhydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Perfusorspritze (Original-Perfusor® Syringe 50mL)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Pipetten (BD Falcon™ Serologische Pipetten 5mL, 10mL, 25mL)	BD Biosciences, Heidelberg
Pipetten (10µL, 200µL, 1000µL)	Sarstedt, Nümbrecht
Reagiergefäße (1,5ml, 2,0mL)	Sarstedt, Nümbrecht
Salzsäure-Lösung 1M (HCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
TBS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan -gepufferte Salzlösung, 10-fach)	Merck KGaA, Darmstadt
Trypan-Blau-Lösung	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Zählkammer (Neubauer improved)	BRAND GMBH+ CO KG, Wertheim

7.1.3. Zellkultur

6-Loch-Platte (BD Falcon™ 6-well Multiwell Plate)	BD Biosciences, Heidelberg
12-Loch-Platte (BD Falcon™ 12-well Multiwell Plate)	BD Biosciences, Heidelberg
Collagen Solution, Type 1, rat tail BioReagent	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
DAPI (antifading mounting medium)	Dianova GmbH, Hamburg
D-Glucose	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
Dexamethason (Fortecortin® Inject)	Merck KGaA, Darmstadt
DMEM-Medium low glucose	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Flüssigkeitssterilfilter (Minisart®)	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
Flüssigkeitssterilfilter (Nalgene® MF75™ Series)	Thermo Fisher Scientific, U.S.A.
Glucagon (GlucaGen®)	Novo Nordisk Pharma GmbH, Mainz
L- Glutamin/ L- Alanin	Biochrom AG, Berlin
Heidelberger Verlängerung (75cm)	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg

HGF (0,5mg/ml)	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
Insulin	Biochrom AG, Berlin
Laborflaschen (VWR Borosilikatglas 3.3 500mL, 1L, 2L)	VWR International GmbH, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin lyophilisiert	Biochrom AG, Berlin
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Schlauchverbindungen (Combifix® Adapter)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen

7.1.4. Transfektionsreagenzien

Opti-MEM (Minimal Essential Medium) reduced serum medium, Gibco®	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Lipofectamine RNAiMAX (RNAiMAX Reagent, Invitrogen®)	Life Technologies GmbH, Darmstadt
miCURY LNA Inhibitor hsa-miR-125b	Exiquon, Inc., Massachusetts, USA
miCURY LNA Inhibitor hsa-miR-26a	Exiquon, Inc., Massachusetts, USA
miCURY LNA Inhibitor hsa-let-7e	Exiquon, Inc., Massachusetts, USA
miCURY knockdown control probe Scramble-miR, negativ-control	Exiquon, Inc., Massachusetts, USA
Pre-miR hsa-miR-125b	Ambion®, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Pre-miR hsa-let-7e	Ambion®, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Pre-miR hsa-miR-26a	Ambion®, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Pre-miR Negativ control	Ambion®, Life Technologies GmbH, Darmstadt
RNAse/DNAse-free	Life Technologies GmbH, Darmstadt

7.1.5. RNA-Isolierung und Real-Time-PCR

75% Ethanol	Herbeta-Arzneimittel, Berlin
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Isopropanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf (Vertrieb Deutschland von Epicentre®)
TaqMan® Gene Expression Master Mix (miRNA)	Life Technologies GmbH, Darmstadt
TaqMan® GAPDH Control Reagents	Life Technologies GmbH, Darmstadt
TaqMan® High-Capacity cDNA reverse transcription Kit	Life Technologies GmbH, Darmstadt
TaqMan® Micro RNA Assay (hsa-miR-125b)	Life Technologies GmbH, Darmstadt
TaqMan® Micro RNA Assay (hsa-miR-26a)	Life Technologies GmbH, Darmstadt
TaqMan® Micro RNA Assay (hsa-let-7e)	Life Technologies GmbH, Darmstadt
TaqMan® Micro RNA Assay (U6)	Life Technologies GmbH, Darmstadt
TaqMan® Micro RNA Reverse Transkription Kit	Life Technologies GmbH, Darmstadt
TaqMan® Universal Master Mix II	Life Technologies GmbH, Darmstadt
TaqMan® Gene Expression Assay (rat, TP53)	Life Technologies GmbH, Darmstadt
TaqMan® Gene Expression Assay (rat, CCND2)	Life Technologies GmbH, Darmstadt
TaqMan® Gene Expression Assay (rat, beta-2-microglobulin, B2m)	Life Technologies GmbH, Darmstadt
TaqMan® Gene Expression Assay (rat, ACTB)	Life Technologies GmbH, Darmstadt
DNAse free- Spray	Life Technologies GmbH, Darmstadt

ReagiergefäÙe, RNase-/DNase frei (0,2ml, 0,5ml, 1ml, 1,5ml, 2mL Ambion® RNase-free Microfuge Tubes)

Life Technologies GmbH, Darmstadt

7.1.6. Western Blot und ELISA

Acrylamid

Serva Electrophoresis, Heidelberg

Ampuwa

Fresenius Kabi, Bad Homburg

APS (Amoniumpersulfat)

Serva Electrophoresis, Heidelberg

BCA Kit

Interchim, Mont Lucon, Frankreich

BCA Protein Assay

Pierce® Thermo Scientific, Illinois, USA

Blottingkammer (+ Zubehör)

Biorad, München

BSA (Bovines Serumalbumin)

Serva Electrophoresis, Heidelberg

ELISA Kit TP53

USCN Life Science Inc., Hubei, China

ELISA Assay KIT IGF2 rat

USCN Life Science Inc., Hubei, China

EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)

Serva Electrophoresis, Heidelberg

Elektrophoresekammer

Life Science Group Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Elektrophorese-Glasplatten

Life Science Group Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Elektrophorese-Glasscheiben

Life Science Group Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Elektrophorese Kämmе

Life Science Group Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Elektrophorese Gelvorrichtung

Life Science Group Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Glycin

Serva Electrophoresis, Heidelberg

Magermilch

Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Mercaptoethanol

Merck KGaA, Darmstadt

Milchpulver

Carl Roth GmbH, Karlsruhe

PhosSTOP Phosphatase- Inhibitor

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Pierce ECL Western Blotting Substrate

Pierce® Thermo Scientific, Illinois, USA

Pierce ECL Western Blotting Substrate intense

Pierce® Thermo Scientific, Illinois, USA

PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)

Serva Electrophoresis, Heidelberg

Ponceau-Rot

Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA

Primär AK p53 Mouse monoclonal

Abcam, Cambridge, UK

Primär AK Rabbit polyclonal to p53 (phospho S15)

Abcam, Cambridge, UK

Primär AK TP53 mouse monoclonal clone HR231

Abnova Coporation, Taipei City, Taiwan

Primär AK Cycline D1 Mouse monoclonal

Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA

Primär AK c-myc Mouse monoclonal

Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA

Primär AK Cycline D2 Mouse monoclonal

GeneTex Inc., California, USA

Primär AK Cycline D2 Mouse monoclonal

Abcam, Cambridge, UK

Primär AK Cycline A2 Rabbit polyclonal

Abcam, Cambridge, UK

Primär AK Cycline A2 Human polyclonal

GeneTex Inc., California, USA

Primär AK Cycline E2 Human polyclonal

GeneTex Inc., California, USA

Primär AK Cycline E2 Rabbit monoclonal

Abcam, Cambridge, UK

Primär AK Anti-alpha-Tubulin Mouse monoclonal

Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA

Protease- Inhibitor

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

PVDF (Polyvinylidene Difluoride) Membran

Millipore, Darmstadt

SDS (Natriumlaurylsulfat)	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Sekundär AK peroxidase-conjugated donkey-anti-mouse	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., Pennsylvania, USA
Sekundär AK peroxidase-conjugated donkey-anti-rabbit	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., Pennsylvania, USA
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	Serva Electrophoresis, Heidelberg
TP53 Cell Transient Overexpression Lysate (Denaturated)	Abnova Coporation, Taipei City, Taiwan
TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tris Glycin/SDS sample buffer	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Triton X	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, Deutschland
Tween	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
U2OS (Humanes Osteosarcoma Zelllysat)	United States (US-) Biological, Massachusetts, USA

7.1.7. Geräte/ Software

Blockthermostat, digital	VWR International GmbH, Darmstadt
Brutschrank	Heraeus Instruments GmbH, Berlin
Blotting/ Elektrophorese Kammer	Biorad, California, USA
Deltagraph	Version 5.0.1 for Apple Macintosh OS X
Excel	Microsoft Excel für Mac OS, Version 2012, V11.3.6. Microsoft Inc.
Feinwaage (Sartorius AC121s)	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 40CFL)	Carl Zeiss AG, Oberkochen
GraphPad Prism Version 6	La Jolla, California, USA
Photometer, FluoStar Galaxy	BMG Labtech, Ottenburg
Peltier Thermal Cycler PTC-200 (c-DNA-Synthese?)	MJ Research, Waltham, USA
Heiz-/Rührplatte (RCT basic IKAMAG® safety control)	IKA®, Staufen
iCycler iQ Real Time PCR system	Life Science Group Bio-Rad Laboratories GmbH, München
iCycler iQ Optical System Software Version 3.0a	Life Science Group Bio-Rad Laboratories GmbH, München
NanoDrop 1000 (Spektralfotometer)	NanoDrop Products by Thermo Scientific, Wilmington, USA
Objektträgerhalter (Dako REAL™ Slide Holder)	Dako, Hamburg
Open Source ImageJ 1.48 Software	National Institutes of Health, USA
Operations-Mikroskop	Leica WILD Heerbrugg
Pipetten (Eppendorf Reference® 0,5-10µL, 10-100µL, 100-1000µL)	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf
Pipettierhelfer (accu-jet® pro)	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim
QuantityOne	Life Science Group Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Sauger (Vacusafe Biosciences)	Integra Biosciences AG, Schweiz
Schlauchpumpe TU	Medorex, Nörten-Hardenberg
Schüttler (PMR-30 Compact Fixed-Angle Platform Rocker)	Grant Instruments (Cambridge) Ltd, U.K.
StepOnePlus Real-Time PCR System	Life Technologies GmbH, Darmstadt

Sterilwerkbank (Cleanbench)

Heraeus Instruments GmbH, Berlin

Vortex-Mixer

neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH,
Heidelberg

Wasserbad (Julabo TW20)

JULABO Labortechnik GmbH, Seelbach,
Deutschland

Zentrifuge (Multifuge® 3 SR)

Heraeus Instruments GmbH, Berlin

7.2. Pufferlösungen und Medien zur Leberzellisolierung

7.2.1. Stammlösungen

Die hochkonzentrierten Stammlösungen wurden im vier Wochen Rhythmus frisch hergestellt und steril filtriert. Nach Überschreiten der vier Wochen wurden nicht benutzte Lösungen verworfen, um das Risiko einer Kontamination so gering wie möglich zu halten. Anschließend wurden sie in sterilen Glasflaschen bei 4°C bis zum Verwendungszeitpunkt gelagert. Alle Stammlösungen wurden in 1-2 Liter Schottflaschen angesetzt, mit Aqua dest. Aufgefüllt und auf einen pH von 7,4 eingestellt.

10-fach Leffert's Puffer: 100mM HEPES (2-4-2-Hydroxyethyl-1-Piperazinyl-Ethansulfonsäure), 30mM KCL (Kaliumchlorid), 1,3M NaCl (Natriumchlorid), 10mM NaH₂PO₄ (Natriumdihydrogenphosphat), 100mM D-Glucose.

10-fach EGTA Puffer: 1,9g EGTA in 100mL 10-fach Leffert's gelöst und mit 800mL Aqua dest. aufgefüllt.

100-fach Calciumchlorid (CaCl₂ Lösung 2,79%ig): 27,9g CaCl₂ gelöst und mit Aqua dest. auf 1L aufgefüllt.

7.2.2. Gebrauchslösungen

Aus allen Stammlösungen wurden gebrauchsfertige Puffer am Vorabend des Versuchstages angesetzt und diese bei 4°C gelagert. Bei Nichtgebrauch am Folgetag wurden die Puffer verworfen. Aus den Stammlösungen wurden durch Verdünnung mit Aqua dest. jeweils 1-fach Lösungen hergestellt und diese erneut auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt und steril filtriert.

7.2.3. Enzymlösung – Collagenase P

Alle Enzymlösungen (Collagenase P-Lösung) wurden 10-20 min. vor Gebrauch angesetzt und steril filtriert. Es wurde der logistisch kürzeste realisierbare Zeitraum zwischen Ansatz und Verbrauch gewählt, um ein mögliches Autolyserisiko zu minimieren. Bei Nichtgebrauch innerhalb der angegebenen Zeitspanne wurden die Lösungen verworfen.

Die Collagenase P-Lösung wurde in eine 500mL Schottflasche gefüllt und in einem Wasserbad bei 37°C bis zum Gebrauch gelagert. Sie beinhaltete 30mg Collagenase P in 100mL 1-fach CaCl₂ bei 37°C.

7.2.4. Dichtegradienten

Alle Lösungen für die Dichtegradientenzentrifugation wurden am Verbrauchstag angesetzt und in 50mL Falcons® bei 4°C bis zum Verbrauch gelagert. Es wurden ausschließlich sterile Lösungen verwendet. Für die Herstellung einer 25%igen Easycoll-Lösung wurden 5mL der Easycoll Separating Solution zur Equilibrierung mit 15mL 1-fach Dulbecco's PBS aufgefüllt.

7.2.5. Modifiziertes *Dulbecco's modified eagle Medium* (M-DMEM)

Alle Medien wurden einen Tag vor Gebrauch angesetzt, steril filtriert und bei 4°C bis zum Gebrauch gelagert. Nach Abschluss des Versuchs bzw. spätestens nach 4 Tagen wurden diese verworfen.

Das gebrauchsfertige Medium wurde in sterile Plastikflaschen steril filtriert und bei 4°C gelagert. Es wurde mit M-DMEM I bzw. II gekennzeichnet. Die Bestandteile in 500ml DMEM low Glucose I waren: 50ml FCS superior, 100µl Fortecortin, 60µl Insulin, 5ml L- Ala/L- Glut, 14µl Glucagon, 5ml Pen strep (Penicillin-Streptomycin). Im Falle von M-DMEM II wurde kein Antibiotikum (Penicillin-Streptomycin) als Zusatz verwendet.

7.3. Pufferlösungen und Enzymlösungen für Western Blot

7.3.1. Stammlösungen

Die hochkonzentrierten Stammlösungen wurden im vier Wochen Rhythmus frisch hergestellt und steril filtriert. Nach überschreiten der vier Wochen wurden nicht benutzte Lösungen verworfen, um das Kontaminationsrisiko zu minimieren. Anschließend wurden sie in sterilen Glasflaschen bei 4°C bis zum Verwendungszeitpunkt gelagert.

Trenngelpuffer: Der Puffer wurde in 1L Schottflaschen angesetzt und auf pH=8,8 eingestellt. Hierzu wurde 1.5 M Tris base (=> 18.15g ad 100mL Aqua Dest.) mit Aqua dest. auf 1L aufgefüllt.

Sammelgelpuffer: Der Puffer wurde in 1L Schottflaschen angesetzt und auf pH=6,8 eingestellt. Hierzu wurde 1 M Tris base (=> 12 g ad 100mL Aqua Dest.) mit Aqua dest. auf 1L aufgefüllt.

5-fach Elektrophorese Puffer: Der Puffer wurde in 1L Schottflaschen angesetzt und auf pH=8,9 eingestellt. Vor Gebrauch wurde der Puffer im Verhältnis 1:5 mit Aqua dest.

verdünnt. Zur Herstellung wurden 15.1g Tris base, 94g Glycin und 10mL 10% SDS verwendet und mit Aqua dest. auf 1L aufgefüllt.

5-fach Blotting Puffer: Der Puffer wurde in 1L Schottflaschen angesetzt und auf pH=8,9 eingestellt. Hierzu wurden 72g Glycin und 15.15g Tris base mit Aqua dest. auf 1L aufgefüllt. Vor Gebrauch wurden zur Aktivierung 200ml des Puffers mit 200mL Methanol vermischt und auf 1L mit Aqua dest. aufgefüllt.

7.3.2. Gebrauchslösungen

Die Gebrauchslösungen wurden vor Versuchsbeginn frisch hergestellt und vor Zellkontakt steril filtriert. Nach Ende der Versuche wurden nicht benutzte Lösungen verworfen. Sie wurden in sterilen Glasflaschen oder Falcons bei 4°C bis zum Verwendungszeitpunkt gelagert.

RIPA Puffer zur Protein-Lyse: Zur Herstellung wurden 20 mmol/L Tris (pH 7,5), 150 mmol/L Natriumchlorid, 1 mmol/L Ethylendiamintetraacetat (EDTA), 1 mmol/L Ethylenglycol-bis-2-aminoethylether-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA) und 1% Triton, 1 mmol/L Phenylmethylsulfonylfluorid verwendet.

Trenngel 15% zwei Gele 1,5 mm: Zur Herstellung wurden 4,8mL AquaBiDest, 6mL 30% Acrylamid, 3,8mL Trenngel-Puffer, 150µL 10% SDS (Sodium dodecyl sulfate, C₁₂H₂₅NaO₄S), 30µL N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) und 93,5 µl 10% APS verwendet.

Sammelgel 5% zwei Gele 1,5mm: Zur Herstellung wurden 6,75mL Aqua dest., 1,215mL 30% Acrylamid, 2,85mL Sammelgel-Puffer, 112,5µL 10% SDS, 28,5µL N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) und 85,5µL 10% APS verwendet.

1-fach PBST: Der Puffer Dulbecco`s PBS wurde mit 0.1% Tween20 ergänzt.

7.4. Tierexperimentelle Eingriffe

7.4.1. Versuchstiere und Tierhaltung

Die Tierhaltung erfolgte in der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin (FEM) der Charité – Universitätsmedizin Berlin am Campus Virchow Klinikum. Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche waren unter der Nummer O 0125/11 von der zuständigen Behörde LaGeSo (Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin) genehmigt worden. Die Dokumentation über die Versuche an lebenden Tieren fand gemäß § 9a des Tierschutzgesetzes statt. Die Unterbringung der Tiere erfolgte zu 3-5 Tieren pro Käfig. Sie erhielten Nahrung und Wasser durch das Personal der Forschungseinrichtung ad libitum.

Es herrschten eine konstante Raumtemperatur von 22+/- 2 °C, die Luftfeuchtigkeit betrug zwischen 40-70% und ein 12h Tag-Nachtrhythmus wurde eingehalten. Der Gesundheitszustand der Tiere wurde in regelmäßigen Abständen vom Personal der Forschungseinrichtung überprüft.

7.4.2. Leberexplantation

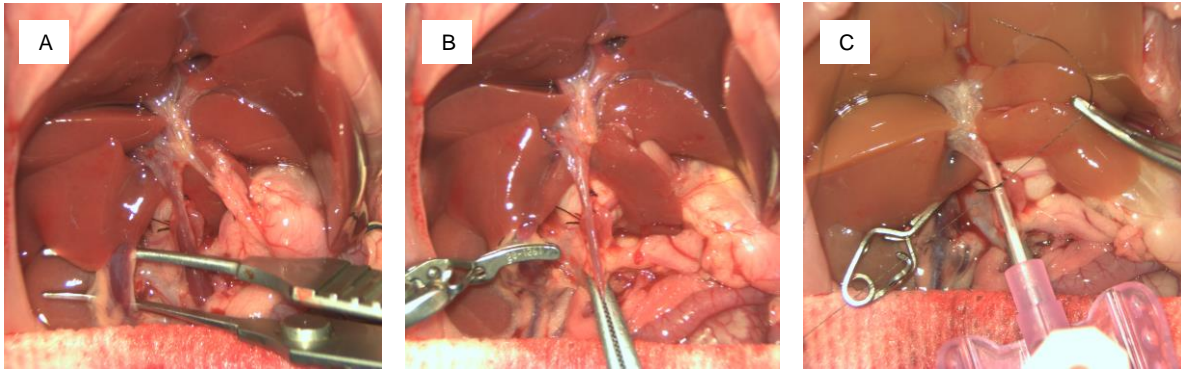


Abbildung 3: Darstellung der Rattenleber *in situ* unter dem Mikroskop – Freipräparation der Vena cava inferior (A), Klemmen der V. cava und Präparation V. porta (B). Klemmen der Pfortader. Einbringen und fixieren des Katheters in der Pfortader kurz vor Perfusion und endgültiger Explantation (C).

Es wurden Leberexplantationen von männlichen Wistar Ratten unter der Organentnahme-Anzeige Nummer O 0125/11 durchgeführt. Die Tiere wurden unter Isofluran-Inhalationsnarkose unter einem Mikroskop platziert und an den Extremitäten fixiert. Nach Längslaparotomie mit zusätzlich querer Oberbauchlaparotomie wurde zur besseren Übersicht der Darm mit Hilfe einer in 0,9% NaCl angewärmten Kompresse ausgelagert. Der Situs wurde in regelmäßigen Abständen mit warmer 0,9% NaCl-Lösung feucht gehalten. Zur Prophylaxe intrahepatischer Thromben wurden 1500 I.E. Natriumheparin über die Penisvene appliziert. Voraussetzung für die adäquate Isolierung der Leberzellen ist eine vollständig blutleere Leber. Daher erfolgte nach Darstellung des Leberhilus zunächst die exakte Präparation der Lebergefäße. Die V. Porta und A. hepatica com. wurden vom Hilus aus und die V. cava inf. kaudal der Leber 2,5 cm zurückverfolgt (Abb. 3 A). Es wurden jeweils Ligaturen vorgelegt. Mittels einer mikrochirurgischen Federklemme wurde die V. cava inf. und die Pfortader ca. 1,5-2 cm distal des Hilus ausgeklemmt (Abb. 3 B). Proximal der Pfortader-Klemme wurde inzidiert und eine Venenverweilkanüle in das Lumen eingebracht. Diese wurde mit 6-0 Seidenfäden sicher am Gefäß fixiert (Abb. 3 C). Anschließend erfolgte hierüber die zügige Perfusion mittels 1x EDTA Puffer bei 37°C; EDTA dient in seiner Eigenschaft als Ca²⁺-Komplexbildner in der Perfusionslösung zur Auflösung von Zell-Zell-Kontakten. Um eine Schädigung des Leberparenchyms und der Hepatozyten durch Druckerhöhung zu vermeiden und die Perfusionsgeschwindigkeit zu erhöhen wurde

die V. cava. inf. kaudal der vorgelegten Ligatur und Klemme eröffnet. Nach vollständiger Blutleere wurden die bereits vorgelegten Ligaturen verschlossen, die Klemmen entfernt sowie die restlichen Gewebeverbindungen gelöst und das Organ aus dem Situs entnommen. Die Perfusionsgeschwindigkeit wurde reduziert und das Abfließen der Perfusionslösung erfolgte fortan über die V. cava inf. proximal der Leber. Das entnommene Organ wurde zügig in einen sterilen Urinbecher überführt und unter stetiger Perfusion zur Sterilwerkbank transportiert wo im Anschluss die Isolierung der Hepatozyten erfolgte.

7.5. Leberzellisolierung

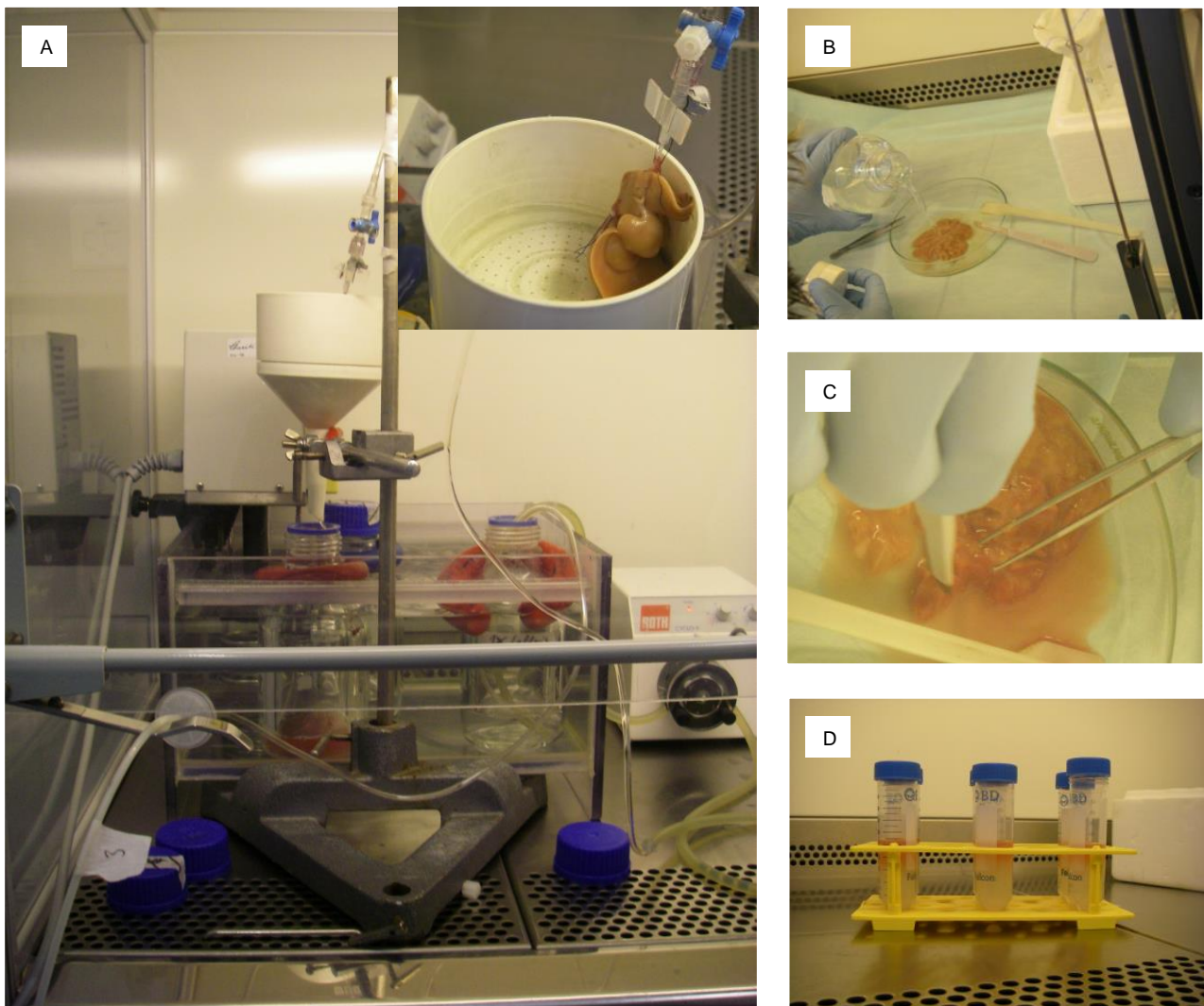


Abbildung 4: Aufbau der Isolierung primärer Hepatozyten. (Rattenstamm: Wistar) – Perfusionssystem nach Explantation der Leber. Perfusion zur Leberzellisolierung mittels EGTA- und Lefferts-Puffer und anschließender 4-7-minütiger Digestion mittels Kollagenase P (**A**). Beenden der Perfusion, Abstoppen der Kollagenasereaktion mit eiskalter CaCl_2 -Lösung und Herauslösen der Zellen aus dem Parenchym (**B/C**). Die gewonnenen Zellen werden anschließend mittels 25%-igem Easycoll-Dichtegradienten aufgereinigt. Die lebenden Zellen sammeln sich als Zellpellet am Boden des Gefäßes während sich die abgestorbenen Zellen darüber im Gradienten befinden (**D**).

Alle Arbeitsschritte der Leberzellisolierung fanden unter sterilen Bedingungen unter der Clean Bench statt. Der Transport, sowie die Zentrifugation der Zellsuspension außerhalb der Clean Bench erfolgte ausschließlich in steril verschlossenen konischen Laborgefäßen (Falcons®). Die zur Leberzellisolierung benötigten Gebrauchslösungen wurden in sterilen 500mL Glasflaschen in einem Wasserbad mit einer Temperatur von 39°C vorgewärmt und mit einem Gemisch aus 95% Sauerstoff und 5% Kohlendioxid begast.

Nach Überführung des explantierten Organs in die Clean Bench, wie in Schritt 2.4.2 beschrieben, wurde dieses frei hängend über einem sterilen Trichter platziert. Die Venenverweilkanüle wurde mit einer Heidelberger Verlängerung versorgt und mit einer Rollerpumpe verbunden. Die Perfusion mit 1x EGTA wurde für 1min kontinuierlich in einer Geschwindigkeit von 30-40 Tropfen/min über die Rollerpumpe gesteuert. Nach der anschließenden Perfusion mit 100ml 1x Leffert's-Puffer erfolgte der enzymatische Verdau. Hierzu wurde das Organ für 4-6min mit der steril vorbereiteten Collagenase P-Lösung durchspült. Bei durchschimmernder Marmorierung der Leberparenchymoberfläche, aber noch intakter Leberkapsel, wurde die Perfusion sofort beendet (Abb. 4 A). Der enzymatische Verdau wurde nach Überführung des Organs in eine sterile Petrischale mit dem Übergießen einer 4°C kalten 1x CaCl₂-Lösung gestoppt und das Lebergewebe mit Hilfe eines Skalpell mechanisch zerkleinert. Die Gewebereste wurden in der 1x CaCl₂-Lösung geschwenkt um auch die restlichen Zellen herauszulösen (Abb. 4 B/C).

Die so entstandene Gewebe-Zellsuspension wurde über eine Mullkomresse (Porengröße 200µm) filtriert und mittels einer Pipette auf mehrere 50mL Falcons® überführt. Nach anschließender 5-minütiger Zentrifugation bei 50g und 4°C bildeten sich am Boden der Falcons® Zellpellets aus. Die Überstände wurden verworfen, die Leberzellpellets wurden in M-DMEM I schonend resuspendiert. Ein Aliquot dieser Zellsuspension wurde in ein Eppendorf-Gefäß überführt und im Verhältnis 1:10 mit Trypan-Blau-Lösung für eine erste Zellzählung und Viabilitätsprüfung verdünnt. Die Bestimmung fand mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer statt. Vitale Zellen stellen sich unter dem Lichtmikroskop in Verbindung mit Trypan-Blau-Lösung hellblau-farblos dar, während abgestorbene Zellen aufgrund von Zellmembrandefekten dunkelblau erscheinen. Ausgezählt wurden die Zellen jeweils in vier Quadranten. Die Ermittlung der Gesamtzellzahl sowie der vitalen Zellen erfolgte unter Verwendung folgender Formel: Gesamtzellzahl = gezählte Zellen x 10⁴ x Volumen der Zellsuspension Vitalität [%] = Anzahl vitaler Zellen x 100/ Gesamtzellzahl.

Im nächsten Schritt wurde die Leberzellsuspension auf einen Dichtegradienten verteilt um vitale von abgestorbenen Zellen zu separieren. Hierfür wurden je 15mL Easycoll®-Lösung mit 5mL Zellsuspension überschichtet und bei 1474g für 20min zentrifugiert (Abb. 4 D). Der entstandene Überstand wurde verworfen. Die verbliebenen Zellpellets wurden in zwei Waschschritten vorsichtig mit je 30mL kaltem 1-fach Dulbecco`s PBS überschichtet und anschließend bei 50g für 5min zentrifugiert. Abschließend wurden die Zellpellets mit 30mL M-DMEM I resuspendiert und erneut gezählt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zellen in M-DMEM I auf Eis aufbewahrt.

7.6. Zellkultur

Die Kultivierung der primären Zellen erfolgte in einem Brutschrank unter Begasung mit 5% CO₂ (Kohlenstoffdioxid), 95% Luftfeuchtigkeit und 37°C. Sämtliche Arbeiten wurden unter der Sterilwerkbank durchgeführt. Alle Materialien für die Zellkultur waren steril verpackte Einmalartikel oder wurden zuvor unter 120°C unter Wasserdampf autoklaviert. Mittels einer Probe aus der Zellsuspension wurde die endgültige Zellzahl und die Zellvitalität durch Trypan-Blau-Färbung und Auszählung in einer Neubauer-Zählkammer nach oben genannter Formel bestimmt.

7.6.1. Hepatozytenkultur

Um die in Suspension befindlichen Hepatozyten zu kultivieren und anschließend zu untersuchen, wurden diese nach Etablierung der optimalen Zellzahlen in einer Konzentration von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml auf kollagenbeschichteten 6-Well-Platten ausgesät und zur gleichmäßigen Verteilung vorsichtig geschwenkt. Für die Beschichtung wurde jede Plattenvertiefung im Vorfeld mit steriler Rattenkollagenlösung in einer Verdünnung von 100 µg/ml (10µg/cm) bodendeckend gefüllt und für 30-60 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Als Kulturmedium wurde M-DMEM I verwendet. Anschließend wurden die adhärent wachsenden Hepatozyten bis zum ersten Zeitpunkt der Probenentnahme im Brutschrank inkubiert. Vor den jeweiligen Probeentnahmen zu den unterschiedlichen Zeitpunkten wurden die Mediumüberstände aller Gruppen abgenommen und bei -20°C gelagert. Anschließend wurden alle Zellkulturen mit zuvor bei 37°C angewärmtem sterilem PBS gewaschen und neues Medium zugegeben. Die Protein- und RNA-Proben vom Boden der wells der unterschiedlichen Gruppen wurden entnommen und bei -80°C für weitere Analysen gelagert.

7.7. Transfektion

7.7.1. Etablierung der Transfektion in primären Rattenhepatozyten

Für die Transfektion wurden synthetisch hergestellte LNAs (locked nucleic acid, miRNA-Inhibitoren) der Firma Exiquon verwendet. Diese spezifischen Inhibitoren (Anti-miRs), wurden gemeinsam mit einem geeigneten Transportmedium (Lipofectamine RNAiMAX) und speziellem Transfektionsmedium (Opti-MEM) der Firma Life Technologies GmbH verwendet. Analog dazu fand die Etablierung der Ambion Pre-miR miRNA Precursor (Mimics) statt. Es wurde steriles, Antibiotika freies Nährmedium, dessen Herstellung nach einem festen Standardprotokoll erfolgte (M-DMEM II), verwendet. Die Anti-miRs mit einem Molekulargewicht von 5nmol wurden bei -4°C und als Stocklösung mit sterilem DEPC-Wasser verdünnt und in einer Konzentration von 10pmol/µl im Gefrierschrank bei -20°C dunkel gelagert. Die Testtransfektion der kultivierten Rattenhepatozyten fand in 12-Well-Platten nach etabliertem Protokoll der Arbeitsgruppe mit 200.000 Zellen pro Well, nach 18 bis 24 Stunden Adhärenz unter sterilen Bedingungen unter der Clean Bench im Dunkeln statt. Um das optimale Verhältnis des Lipofectamine RNAiMAX zu den Anti-miRNAs zu evaluieren, wurden diese in unterschiedlichen Konzentrationen laut Herstellerangaben miteinander in sterilen Falcons® als Transfektionskomplex nach Transfektionsschema (Tabelle 1) angesetzt. Im Anschluss wurde das Opti-MEM im Verhältnis 1:5 ergänzt und nach 30 Minuten Inkubation unter Raumtemperatur der Transfektionskomplex der Hepatozytenkultur zugeführt. Die Analyse erfolgte nach 24 Stunden Inkubationszeit bei 37°C bildmorphologisch mittels Licht- und Fluoreszenzmikroskopie.

	Lipofectamine RNAiMAX		
miRNA-26a	A: 15pmol + 1µl	B: 20pmol + 1µl	C: 25pmol + 1µl
	D: 15pmol + 2µl	E: 20pmol + 2µl	F: 25pmol + 2µl
	G: 15pmol + 3µl	H: 20pmol + 3µl	I: 25pmol + 3µl

Tabelle 1: Transfektionsschema – Unterschiedliche Konzentrationen des Inhibitors der miR-26a in pmol sowie des Lipofectamine RNAiMAX in µl, aufgetragen pro Well mit 200.000 Zellen in einer 12-Well-Platte in Duplexen.

7.7.2. Licht- und Fluoreszenzmikroskopie

Um die Zellviabilität und die Transfektionseffizienz zu evaluieren und die optimale Konzentration der Reagenzien zu bestimmen, wurden 5'Fluorescein-gekoppelte LNAs eingesetzt. Diese wurden licht- bzw. fluoreszenzmikroskopisch mit den Kontrollgruppen (Hepatozyten ohne Anti-miRs und der Negativ Kontrolle mit *nonsense* Anti-miRs)

verglichen. Die Anzahl der lebenden bzw. toten Zellen, sowie der intrazellulären Inhibitoren wurde bildmorphologisch ausgezählt.

Es wurden über die gesamte Dauer des Untersuchungszeitraumes repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen der jeweiligen Gruppen in einer 100-/ 200-fachen Vergrößerung angefertigt. Die morphologischen Unterschiede der verschiedenen Versuchsgruppen und Zeitpunkte wurden dokumentiert. Die Vitalitätsbestimmung erfolgte anhand der bildmorphologischen Unterscheidung der Kern-Plasma-Grenze der Zellen.

Zur intrazellulären Lokalisation der mit Fluoreszenzfarbstoffen gelabelten Inhibitoren wurden für die Fluoreszenzmikroskopie die Zellkerne zusätzlich mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol in 1:1000 mit PBS verdünnt) angefärbt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur (RT) im Dunkeln inkubiert. Dies erfolgte 24 Stunden nach Transfektion. Alle Aufnahmen wurden mit einem inversen Fluoreszenzmikroskop Axiovert 40CFL der Firma Zeiss durchgeführt.

7.7.4 *In vitro* Depletion und Supplementierung

***In vitro* Depletion endogener miRNAs**

Nach Ermittlung der optimalen Konzentration des Transfektionskomplexes wurde jeweils ein standardisiertes Protokoll für die Transfektion der Anti-miR-125b-5p, Anti-MiR-26a und let-7e angewandt. Es wurden 10µl Lipofectamine RNAiMAX mit 100pmol Anti-miR pro 1×10^6 Zellen und Opti-MEM im Verhältnis 1:5 zum späteren Gesamtvolumen zusammen als Transfektionskomplex in sterilen Falcons® angesetzt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Inzwischen wurden alle 24 Stunden nach Leberzellisolierung mit Rattenhepatozyten kultivierten Platten 3x mit PBS gewaschen und anschließend mit dem Transfektionskomplex sowie M- DMEM III/IV für weitere 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Kulturen wurden zu festgelegten Zeitpunkten nach Transfektion geerntet oder erneut mit PBS gewaschen und mit frischem Nährmedium (M-DMEM I/II) versorgt. Die Probenentnahmen erfolgten je nach Verwendungszweck der Proben nach festgelegtem Protokoll zu den jeweiligen Zeitpunkten.

Der Zeitraum der Probenentnahmen lag entsprechend der vermuteten Expressionsänderungen der Targets zwischen ein bis vier Tagen. Die genauen Zeitpunkte lagen bei 18, 24, 42, 48, 52 und 72 Stunden jeweils nach Transfektion. Die Vorgehensweise bei der Probenentnahme wurde je nach Proben-Analyse-Verfahren (RNA, Protein oder Mediumüberstand) variiert.

Die Versuchsgruppen bestanden aus einer Gruppe unbehandelter (nativer) Zellen und den jeweiligen Gruppen mit Anti-miRNAs bzw. der Negativkontrolle, einer nicht kodierenden miRNA (negativ control = NC) transfizierten Zellen.

Somit ergaben sich folgende Versuchsgruppen:

- unbehandelte Hepatozyten (native Zellen)
- anti-miR-125b-5p behandelte Knockdown Gruppe (KD)
- anti-miR-26a behandelte KD
- anti-miR-let7e behandelte KD
- Negativkontrolle (*negativ control* = NC)

***In vitro* Supplementierung von Mimics**

Die Transfektion der Ambion Pre-miR miRNA Precursor (Mimics) erfolgte äquivalent dem standardisierten Protokoll der Anti-miRs. Abweichend vom Standardprotokoll der Depletion wurde für die Transfektion der Pre-miRs Lipofectamine RNAiMAX in einer Konzentration von 5µl/1x10⁶ Zellen eingesetzt. Die Kulturen wurden entsprechend zu den festgelegten Zeitpunkten nach Transfektion geerntet bzw. erneut mit PBS gewaschen und mit frischem Nährmedium (M-DMEM I/II) versorgt.

Die Versuchsgruppen bestanden hier aus einer Gruppe unbehandelter (nativer) Zellen und den jeweiligen Gruppen mit pre-miRs (Mimics), bzw. der Negativkontrolle transfizierten Zellen. Somit ergaben sich folgende Versuchsgruppen:

- unbehandelte Hepatozyten (native Zellen)
- pre-miR-125b-5p behandelte Mimic Gruppe
- pre-miR-26a behandelte Mimic Gruppe
- pre-miR-let7e behandelte Mimic Gruppe
- Negativkontrolle (*negativ control* = NC)

7.8. Quantitative Real-Time PCR

Zur Bestimmung der Expressionsänderung der endogenen RNA wurde eine quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) durchgeführt. Die Gesamt-RNA wurde aus 3x10⁶ Zellen jeder Gruppe zu den jeweiligen Zeitpunkten isoliert.

7.8.1. RNA/ microRNA Isolierung

Die RNA Isolierung erfolgte nach dem Protokoll des MasterPure™ Complete DNA und RNA Purification Kit der Firma Epicentre®. (60) Bei Probenentnahme zu den jeweiligen Zeitpunkten wurde jeweils ein Proteinase- und Phosphataseinhibitor hinzugefügt (Roche Diagnostics). Die RNA Konzentration wurde mittels NanaDrop 1000 (Thermo Scientific) bestimmt. Die jeweiligen Proben wurden in einer Konzentration von 10ng/µl in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zunächst bei -80°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

7.8.2. cDNA Synthese mRNA Proben

Die Synthese der cDNA (complementary DNA) aus mRNA (messenger RNA) erfolgte mittels TaqMan High Capacity cDNA Archive Kit für RT-PCR (Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion) der Firma Life Technologies GmbH. Dieser Assay wurde für die reverse Transkription der RNA-Proben aller Gruppen zum Zeitpunkt 24 Stunden verwendet, da zu diesem Zeitpunkt mit der stärksten Änderung zu rechnen war. Für den Assay wurden die Proben gemäß des Herstellerprotokolls angesetzt. Zu diesem Ansatz wurde jeweils 1µg RNA, gelöst in 10µl DEPC-Wasser, zugegeben. Das Probengemisch wurde kurz zentrifugiert, um alle Flüssigkeit am Grund des Reaktionsgefäßes zu sammeln. Im Anschluss erfolgte die cDNA Synthese im ThermalCycler PTC-200 (MJ Research) unter Verwendung des für die cDNA Synthese spezifischen Protokolls. Die cDNA wurde bei -80°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

7.8.3. cDNA Synthese der miRNA

Die Synthese der cDNA aus den miRNA Proben der Untersuchungszeitpunkte 24, 42 und 54 Stunden erfolgte nach dem Protokoll des TaqMan miRNA Reverse Transcription KIT der Firma Life Technologies GmbH.

Nach Herstellung des Mastermix erfolgte die Zugabe von 1µl RNA Probe (10ng) und 3 µl des jeweiligen spezifischen Primers (hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-26a, hsa-let-7e; Firma Life Technologies GmbH). Nach kurzer Zentrifugation der Proben wurde die RNA anschließend im ThermalCycler unter Verwendung eines spezifischen Protokolls umgeschrieben. Für die Umschreibung wurde U6 snRNA als nicht reguliertes Referenzgen mitgeführt.

7.8.4. Real-Time-PCR der mRNA

Die cDNA wurde mit TaqMan Universal Master Mix und den spezifischen Primern für CCND2 und TP53 (oder p53), sowie den Housekeeping-Genen GAPDH, B2m und ACTB als Kontrollen (nicht-regulierte, konstitutiv exprimierte Referenzgene) quantifiziert. Alle

eingesetzte Assays/Primer der Firma Life Technologies GmbH wurden nach spezifischem Protokoll verwendet. Zum Pipettieren wurden 96-Loch-Platten verwendet. Die Quantifizierung erfolgte ebenfalls nach Protokoll mit dem StepOnePlus real-time PCR System (Life Science Group Bio-Rad Laboratories GmbH). Der C_t -Wert (threshold cycle) des Zielgens wurde auf den C_t -Wert der Kontrollgene (Housekeeping-Gene) bezogen ($2^{\Delta\Delta C_t}$). Anschließend wurde der Wert auf den 24 Stunden-Wert unbehandelter Hepatozyten (Nativkontrolle) normalisiert. Die Messung wurde in Triplikaten zwei bis drei Mal durchgeführt.

7.8.5. Real-Time-PCR der miRNA

Die cDNA wurde mit TaqMan Universal Master Mix II (plus Uracyl-N-Glycosylase zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen; UNG) und den spezifischen Primern der hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-26a, hsa-let-7e quantifiziert (Firma Life Technologies GmbH). Als Referenzgen wurde jeweils die U6-snRNA, als nicht reguliertes Referenzgen mitgeführt. Die Proben wurden nach Protokoll angesetzt und in eine 96-Loch-Platten pipettiert.

Es wurde für ein Triplet jeder Probe jeweils ein Vierfachansatz berechnet um den Pipettierverlust möglichst gering zu halten. Die Quantifikation und Analyse erfolgte mit dem StepOnePlus real-time PCR System nach spezifischem Protokoll. Der C_t -Wert des Zielgens wurde auf die U6 als Kontrollgen bezogen ($2^{\Delta\Delta C_t}$) und auf den Wert der 24 Stunden nativer Zellen normalisiert. Die Messung wurde in Triplikaten zwei bis drei Mal durchgeführt.

7.9. Western Blot

7.9.1. Proteinisolierung

Zu den jeweiligen Zeitpunkten erfolgte eine Lyse der Zellen mit 50 μ l RIPA Puffer auf 1×10^6 Zellen. Die lysierten Zellen wurden mit einem sterilen Zellschaber vorsichtig vom Boden der Wells gelöst. Sie wurden in ein steriles Eppi überführt. Nach 5-10min Ruhephase auf Eis wurden die Proben in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C aufbewahrt.

7.9.2. Gesamtproteinbestimmung

Die Gesamtproteinbestimmung erfolgte anhand der BCA (Bicinchoninsäure)-Methode. Diese Methode wurde von Smith et. al. 1985 entwickelt und beruht auf der Reduktion von Cu^{2+} - zu Cu^{1+} -Ionen durch Proteine in alkalischer Lösung. Anschließend erfolgt die kolorimetrische Bestimmung der Cu^{1+} -Ionen nach Komplexbildung mit BCA. (61) Die

Messung erfolgte nach dem Protokoll des BCA Protein Assay Kit (Pierce® Thermo Scientific). Die gemessene Gesamtproteinmenge wurde auf einen Proteingehalt von 20 und 30ng pro 10 µl Probe mit sterilem destilliertem Wasser verdünnt.

7.9.3. Etablierung verschiedener Antikörper

Die Etablierung der unterschiedlichen Antikörper (AK) erfolgte nach Protokoll und Literaturangaben der jeweiligen Hersteller. Es wurden verschiedene Blockingpuffer, wie 3% und 5% BSA, 5% Milchpulver und 5% Magermilch der Firmen Serva Electrophoresis und Carl Roth bei optimaler AK-Verdünnung eingesetzt. Es wurden je nach Hersteller Angaben positiv Kontrollen (TP53 Cell Transient Overexpression Lysate der Firma Abnova, unter UV-Licht bestrahlte Rattenhepatozyten und U2OS-Zelllysate der Firma US-Biologicals) mitgeführt. Es wurden folgende AK verwendet:

Tp53 (Abnova), p53 (Abcam), Phosp53-S15 (Abcam), CCND2 (Genetex), CCND1, c-myc Anti-alpha-Tubulin (Sigma-Aldrich).

7.9.4. Gelelektrophorese

Zur Analyse der Proteinexpressionsänderung wurden 20µg und 30µg Gesamtproteinmenge eingesetzt. Hierzu wurden die aliquotierten Proben im gleichem Volumenverhältnis mit Probepuffer (Serva Tris Glycin/ SDS *sample buffer* und Mercaptoethanol im Verhältnis 100:1) verdünnt und für fünf Minuten auf 95°C zur Denaturierung erhitzt. Durch das im Probenpuffer enthaltenen SDS bzw. im Gel werden die Proteine negativ aufgeladen und können somit in der Elektrophorese entsprechend dem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Im Anschluss wurden die Proteinproben nach standardisiertem Protokoll auf ein 15%iges SDS-PAGE-Gel aufgetragen und elektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt. Zur Bestimmung des Molekulargewichts wurde zusätzlich ein Protein-Marker (SERVA Recombinant SDS PAGE Protein Marker) mitgeführt, sowie eine entsprechende Positivkontrolle. Die Gel-Elektrophorese lief während der Sammelgelphase mit einer Spannung von 60 V und in der Trenngelphase von 100 V. Nach erfolgreicher Auftrennung der Proben wurde die Elektrophorese gestoppt und das Gel für das *Blotting* aus der Elektrophoresekammer entnommen.

7.9.5. Blotting

Der Transfer der Proteinbanden auf eine Membran wird als *Blotting* bezeichnet. Die Proteine wurden mittels des *Blotting*-Nassverfahrens aus dem SDS-PAGE-Gel auf eine Millipore PVDF Membran transferiert. Hierfür wurden im Vorfeld die Membranen 30 Sekunden in

Methanol unter einem Abzug aktiviert und anschließend für zwei Minuten in Aqua Dest. gewaschen. Das *Blotting* erfolgte für 60 Minuten bei 4°C mit einer Spannung von 100 V in dem dafür vorgesehenen *Blotting*-Puffer nach standardisiertem Protokoll. Die Membranen wurden nach Entnahme einige Minuten in Pouceau-Färbelösung (Sigma-Aldrich) inkubiert, somit konnte der Proteintransfer makroskopisch beurteilt werden.

7.9.6. Antikörper und Darstellung der Proteine

Zur Darstellung der entsprechenden Proteinkonzentration wurden die Membranen mit spezifischen primären Antikörpern inkubiert (Immundetektion). Die Detektion erfolgte über einen sekundären Antikörper, welcher mit einem fluoreszierenden Enzym der *Horseradish peroxidase* (HRP) gekoppelt ist. Um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern, wurde die Membran mit dem jeweiligen Blockingpuffer für 90 Minuten bei Raumtemperatur unter kontinuierlicher Bewegung (Schüttler) inkubiert. Als primäre Antikörper für die endgültigen Versuche wurde je nach Proben primär AK TP53 und CCND2 in der jeweils optimalen Verdünnung nach Protokoll verwendet und über Nacht bei 4°C unter Bewegung inkubiert. Als sekundäre AK dienten *donkey anti-mouse-HRP* und *donkey-anti-rabbit-HRP* der Firma *Jackson ImmunoResearch Laboratories*. Sie wurden jeweils in einer Verdünnung von 1:5000 für mindestens 2 h bei 4°C inkubiert. Die Expressionsänderung der zu untersuchenden Proteine wurde mittels Chemolumineszenz-Methode nach Protokoll des Pierce ECL-KITs bestimmt und anschließend in einem Entwicklungsgerät (VersaDoc™, Life Science Group Bio-Rad Laboratories) digital entwickelt. Im Folgenden wurden die sichtbar gemachten Banden durch Densometrie mit Hilfe der Open source ImageJ 1.48 Software quantifiziert. Um eine relative Vergleichbarkeit zu erreichen, wurden die Proteinwerte der zu untersuchenden Proteine auf ein Vergleichsprotein mit einheitlicher Expression bezogen, hierfür kam in vorliegendem Fall α -Tubulin (Verdünnung 1:20000) in Betracht. Die Messungen wurden mit Proben der verschiedenen Experimente drei Mal wiederholt.

7.10. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

7.10.1. TP53 und IGF-2

Es wurden die Proteinproben der unbehandelten (nativen) Zellen, sowie der mit der Anti-miR-125b-5p bzw. deren Negativkontrolle transfizierten Zellen zum Zeitpunkt 24 sowie 48 Stunden nach Protokoll des TP53 ELISA KIT (Uscnk Life science Ink.) im Duplex oder Triplet aufgetragen. Hierzu wurden die Proteinproben im Verhältnis 1:10 und 1:50 verdünnt. Die Proben der Mediumüberstände der unbehandelten (native) Zellen, sowie der mit der Anti-miR-125b-5p bzw. deren Negativkontrolle transfizierten Zellen zum Zeitpunkt 24, 42

und 54 Stunden wurden nach Protokoll des IGF-2 ELISA KIT (Uscnk Life science Ink.) im Duplex unverdünnt aufgetragen. Die Standardreihen wurden in zweifacher Ausführung mitgeführt. Im Anschluss wurde die Absorption am Photometer FluoStar Galaxy der Firma BMG Labtech bei 450nm gemessen und anhand linearer Regression analysiert.

7.11. Statistische Analyse

Die Daten wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) dargelegt. Die Signifikanz zwischen den einzelnen Gruppen wurde je nach Datenverteilung mit dem One-way analysis of variance (ANOVA), Two-way ANOVA, Mann-Whitney-U oder dem Student's t'test mittels der GraphPad Prism Version 6 (La Jolla, CA, USA) für OS MAC analysiert. Ein p-Wert \leq 0,05 wurde als signifikant festgelegt.

8. Ergebnisse

8.1. Zellisolierung

Für diese Arbeit wurden primäre Rattenhepatozyten aus männlichen Wistar Ratten isoliert. Die Viabilität der Zellen nach Isolation lag jeweils zwischen 75-95%. Durchschnittlich konnten aus einem Spendertier 80.000-140.000 Zellen gewonnen und in Kultur genommen werden. Die Operations- und Isolierungsbedingungen wurden streng nach den etablierten Protokollen durchgeführt, um möglichst reproduzierbare Bedingungen für die Zellkultur zu erzielen.

Je nach Versuchsgruppe erhielten die primären Hepatozyten das spezifische Nähr-/Transfektionsmedium (DMEM I-II) und wurden bis zur Adhärenz und Weiterbehandlung im Brutschrank bei 37°C nach Protokoll inkubiert. Es wurden jeweils nach Etablierung der Zellzahlen 1×10^6 Zellen pro 6-Well verwendet.

8.2. Morphologie

8.2.1. Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung erfolgte in Anlehnung an bereits etablierte Protokolle der Arbeitsgruppe. Es wurden zur optimalen Zellzahlbestimmung für die primäre Hepatozytenkultur jeweils drei unterschiedliche Zellzahlen (500.000, 1×10^6 und $1,5 \times 10^6$ Zellen pro Well) in Rattenkollagen-gecoateten 6-Well-Platten in Triplets ausgesät. Diese wurden über einen Zeitraum von 18, 24, 48 und 72 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Es wurden lichtmikroskopische Bilder aller Zellkulturen angefertigt. Die Triplets mit der höchsten vitalen Zellzahl und mit einer konstant stabilen Zellarchitektur über den gesamten Versuchszeitraum wurden bildmorphologisch als optimal gewertet. Die morphologische Vitalitätsbeurteilung erfolgte anhand der Kern-Plasma-Grenze. Vitale Zellen weisen eine klar sichtbare Kern-Plasma-Grenze auf, während sich abgestorbene Zellen rund und dunkel, ohne erkennbare Kern-Plasma-Grenze darstellen. Zudem weisen ausgeprägte Zell-Zell-Kontakte und ein dichter konfluenten Zellrasen auf eine gute Zellviabilität hin.

Morphologische Veränderungen innerhalb der Zellarchitektur sind deutlich erkennbar. Bei einer Zellzahl von 500.000 Zellen (Abb. 5 A) zeigen sich nur wenig Zell-Zell Kontakte und kein konfluenten Zellrasen. Die Hepatozyten-*Monolayer* haben ihre normale Zellarchitektur verloren und wirkten langgezogen. Bei einer Zellzahl von $1,5 \times 10^6$ Zellen (Abb. 5 C) ist

hingegen ein deutlicher Verlust der Zell-Zell-Kontakte mit Aufhebung der Zellarchitektur zu erkennen. Es finden sich wenig konfluente *Monolayer* und viele abgestorbene Zellen, die sich bereits aus dem Zellverbund herausgelöst haben. Diese progrediente Anzahl an abgestorbenen Hepatozyten wurde als Folge des Platzmangels der Zellen im Well interpretiert.

Eine Zellzahl von 1×10^6 Zellen pro Well (Abb. 5 B) wurde für den Versuchsaufbau als geeignet bewertet. Es zeigte sich ein konfluenter Zellrasen mit vitalen Hepatozyten, was sich durch ihre polygonale Form und einer stabilen Zellarchitektur auszeichnet. Es haben sich nur wenig tote Zellen aus dem Zellverbund herausgelöst.

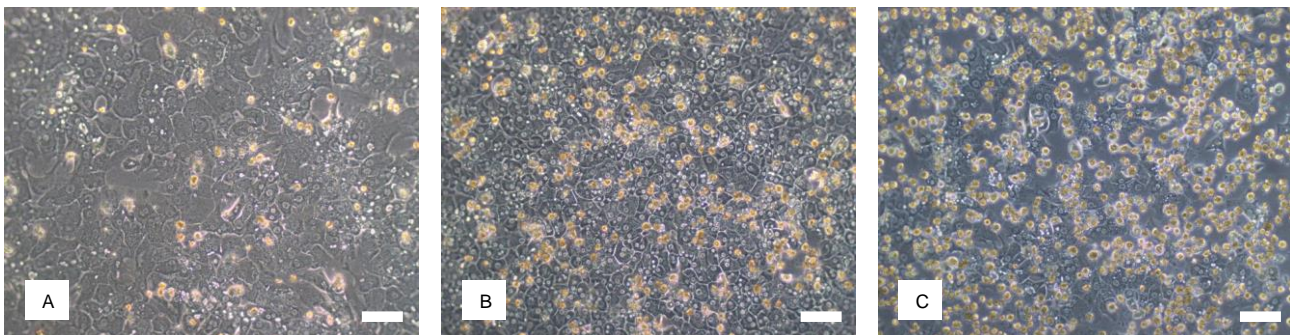


Abbildung 5: Lichtmikroskopie primärer Rattenhepatozyten in Kultur nach 72 Stunden – Die Abbildungen zeigen einen repräsentativen Bildausschnitt in 100-facher Vergrößerung. Darauf zu erkennen sind die morphologischen Veränderungen der Zellarchitektur bei unterschiedlichen Zellzahlen pro 6-Well. 500.000 Zellen (A), 1×10^6 Zellen (B), $1,5 \times 10^6$ Zellen (C). Maßstabsbalken: $50 \mu\text{m}$.

8.2.2. Lichtmikroskopie nach Transfektion

Ziel der Lichtmikroskopischen Beurteilung war die morphologische Evaluierung der Zellviabilität nach Transfektion. Es konnten nur geringe morphologische Unterschiede zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Transfektion zwischen den nativen und den transfizierten Zellen sowie deren Kontrollgruppen festgestellt werden. Die primären Rattenhepatozyten behielten über die Versuchsdauer ihre typische polygonale Form mit leicht granulärem Zytoplasma. Sie wiesen außerdem durchgehend ein konfluente Adhäsionsverhalten auf. Die insbesondere in den transfizierten Gruppen beobachtete Vakuolenbildung und progrediente zytoplasmatische Granulation wurden als Folge von Zellstress durch die Toxizität der Transfektionsreagenzien auf den Zellmetabolismus interpretiert. Im Vergleich zeigten native Zellen weniger häufig diese Veränderungen. Am zeitlichen Verlauf bemessen zeigten die Zellen eine progrediente Ausdünnung des Zellrasens. Die Zellarchitektur war zunehmend gestört umso länger sich die Zellen in Kultur befanden.

Native Zellen zeigten nach 24 Stunden ein konfluentes und stabiles Adhäsionsverhalten (Abb. 6 A). Bemessen am Versuchszeitraum über 42 und 54 Stunden konnte nach anfangs fortbestehendem Adhäsionsverhalten mit typischer polygonaler Form nur eine gering progrediente Ausdünnung des Zellrasens beobachtet werden (Abb. 6 B, C). Die mit der Negativkontrolle transfizierten Zellen zeigten 24 Stunden nach Transfektion ebenfalls einen konfluierenden Zellrasen mit leichter zytoplasmatischer Granulation (Abb. 6 D), welche 42 Stunden nach Transfektion wenig jedoch stetig zunahm (Abb. 6 E). Hinzukommend zeigte sich 54 Stunden nach Transfektion ein geringes jedoch fortschreitendes Ausdünnen des Zellrasens sowie eine progrediente zytoplasmatische Granulation mit leicht gestörter Zellarchitektur (Abb. 6 F). Die mit dem Inhibitor der miR-125b-5p transfizierten Zellen wiesen über den zeitlichen Verlauf ähnliche Veränderungen auf. Es zeigte sich ein dichter Zellrasen und leichte zytoplasmatische Granulation zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Transfektion (Abb. 6 G). 42 Stunden nach Transfektion war eine beginnende Ausdünnung und teilweise verstärkte zytoplasmatische Granulation zu erkennen (Abb. 6 H). Eine leicht gestörte Zellarchitektur bei progredienter zytoplasmatischer Granulation war 54 Stunden nach Transfektion deutlich erkennbar (Abb. 6 I).

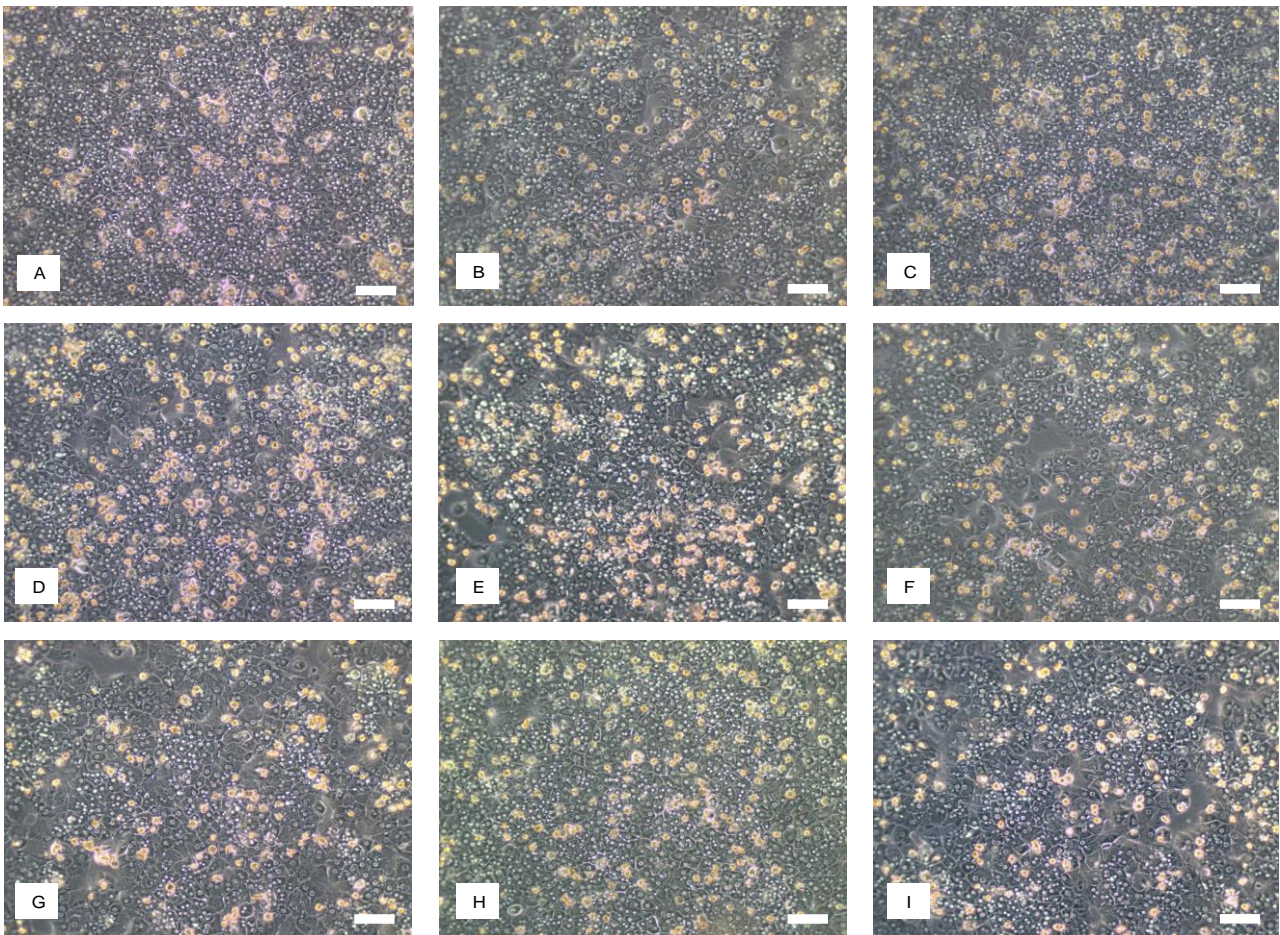


Abbildung 6: Morphologische Evaluierung der Zellvitalität nach Transfektion Anti-miR-125b-5p – Die Abbildungen zeigen die Lichtmikroskopie primärer Rattenhepatozyten nach Transfektion mit 1×10^6 Zellen pro Well bei einer 100-fachen Vergrößerung mit repräsentativem Bildausschnitt. Darstellung der Aufnahmen anhand der verschiedenen Gruppen und Zeitverlauf. Native Zellen 24 Stunden **(A)**, 42 Stunden **(B)** und 54 Stunden nach Transfektion **(C)**. Mit der Negativkontrolle transfizierte Zellen 24 Stunden **(D)**, 42 Stunden **(E)** und 54 Stunden nach Transfektion **(F)**. Mit der Anti-miR-125b-5p transfizierte Zellen 24 Stunden **(G)**, 42 Stunden **(H)** und 54 Stunden nach Transfektion **(I)**. Maßstabsbalken: 50 μ m.

8.2.3. Fluoreszenzmikroskopie

Zur Bestimmung des optimalen Transfektionskomplexes und um die Aufnahme der Anti-miRNAs in die Zellen zu veranschaulichen bzw. beurteilen zu können, wurden zu Beginn der Versuche repräsentative Aufnahmen mit unterschiedlicher Fluoreszenz angefertigt und bildmorphologisch ausgewertet. Die miRNA-Inhibitoren waren intrazellulär in der Nähe des Zellkerns gut zu erkennen. Zudem waren vitale und abgestorbene Zellen ebenfalls morphologisch gut abgrenzbar.

Bei Anwendung der geringsten Konzentration beider Reagenzien war nur eine sehr geringe kaum nachzuweisende Aufnahme der Inhibitoren in die Hepatozyten zu beobachten (Abb. 7 A). Die alleinige Steigerung der Konzentration an Inhibitoren bei gleichbleibender Konzentration an Lipofectamine RNAiMAX führte zu einer geringen Zunahme intrazellulärer

Inhibitoren bei großem extrazellulärem Anteil (Abb. 7 B, C). Erst mit steigender Konzentration beider Reagenzien zeigte sich eine progrediente Ansammlung der Inhibitoren in Zellkernnähe (Abb. 7 D), welche bei mittlerer Konzentration beider Reagenzien ihr Maximum erreichte (Abb. 7 E). Bei einer deutlich erhöhten Konzentration des Inhibitors kam es zu einer Verschiebung dieses Verhältnisses nach extrazellulär und zunehmend granulierendem Zytoplasma (Abb. 7 F). Bei niedriger Inhibitor- jedoch höherer Lipofectamine RNAiMAX Konzentration waren deutlich mehr Inhibitoren intra- sowie extrazellulär (Abb. 7 G). Bei steigender Lipofectamine RNAiMAX Konzentration kam es jedoch zu einer progredienten Ausdünnung des Zellrasens sowie Verlagerung des Inhibitorverhältnisses nach extrazellulär (Abb. 6 H, I).

Es ist insgesamt gut zu erkennen, dass die Zellarchitektur weitestgehend erhalten blieb und die Zellen ein konfluentes Adhäsionsverhalten aufwiesen. Die größte Anzahl aufgenommener Inhibitoren ließ sich in der Kombination der mittleren Konzentrationen beider Reagenzien nachweisen. Bei stetig ansteigender Konzentration insbesondere des Lipofectamine RNAiMAX kam es zu einem progredienten Ausdünnen des Zellrasens, zunehmend granulierendem Zytoplasma und einer Ansammlung der meisten Inhibitoren extrazellulär. Es konnte somit davon ausgegangen werden, dass höhere Konzentrationen beider Reagenzien für die primären Zellen stark toxisch sind.

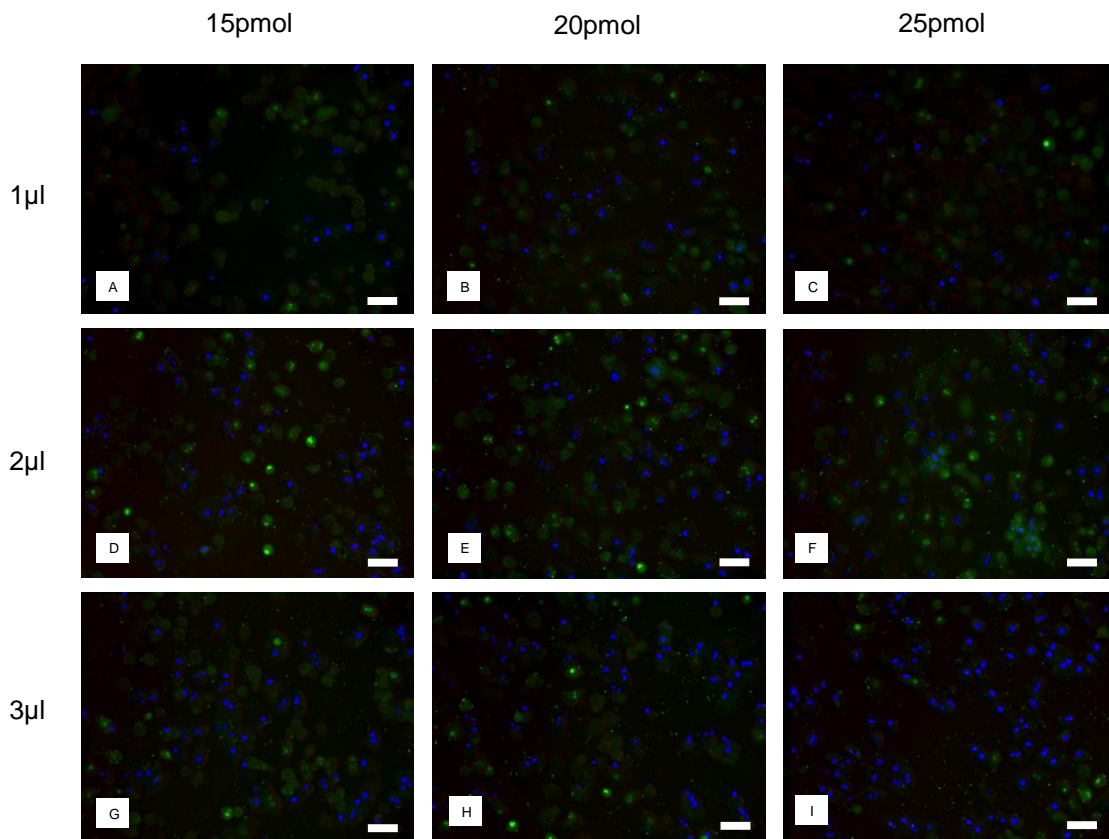


Abbildung 7: Fluoreszenzmikroskopie primärer Rattenhepatozyten 24 Stunden nach Transfektion – Verwendung verschiedener Konzentrationen des Transfektionskomplexes (Lipofectamine RNAiMAX bzw. Anti-miR-26a) jeweils auf 200.000 Zellen im 12-Well. Verteilung der Konzentrationen der Reagenzien anhand des Transfektionsschemas Tabelle 1 in Punkt 2.7.1. Linksbündig ist die Konzentration an Lipofectamine RNAiMAX in µl angegeben, oberhalb der Bilder die jeweilige Konzentration der Anti-miR-26a in pmol. Die Inhibitoren fluoreszieren grün, die Zellkerne blau, Zell-Grenzen sind dezent rötlich hinterlegt. Somit kann eine Aussage über die intra- oder extrazelluläre, sowie Zellkern-nahe oder -ferne Lage der Inhibitoren getroffen werden. Die obere Reihe enthält die geringste Konzentration an Lipofectamine RNAiMAX bei steigender Inhibitorkonzentration von links nach rechts (**A/B/C**). Darunter dargestellt ist die mittlere (**E/F/G**) und die höchste Konzentration an Lipofectamine RNAiMAX (**G/H/I**). Maßstabsbalken: 25µm.

Nach bildmorphologischer Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen erwies sich eine Konzentration von 2µl Lipofectamine RNAiMAX mit 20pmol Anti-miR pro 200.000 Zellen bzw. 10 µl pro 1×10^6 Zellen als geeignet. Die Zellen sind vital und gegenüber den anderen Gruppen befinden sich die meisten Inhibitoren intrazellulär in Zellkernnähe. Diese Ergebnisse bildeten die Grundlage für alle weiteren Untersuchungen.

8.3. miR-125b-5p

In der RealTime PCR wurde die Expressionsänderung der endogenen miR-125b-5p nach Transfektion mit dem spezifischen Inhibitor nach einem Inkubationszeitraum von 24, 42 und 54 Stunden untersucht. Die gemessenen Ct-Werte wurden auf native Zellen normiert und mit der Negativkontrolle (NC) verglichen.

Zum Zeitpunkt 24 Stunden konnte eine signifikante Depletion ($p=0.0159$) der endogenen miR-125b-5p mit einer Expressionsänderung von $0,066 \pm 0,041$ (Ratio) gegenüber der Negativkontrolle von $0,98 \pm 0,34$ gemessen werden. Demzufolge konnte eine Inhibition von fast 100% der endogenen miR125b-5p nach 24 Stunden in Rattenhepatozyten erfolgreich nachgewiesen werden (Abb. 8 A). Nach einem Zeitraum von 42h bzw. 54h war weiterhin eine deutliche Inhibition zu erkennen, jedoch war diese bezogen auf die NC nicht mehr statistisch signifikant ($p=0,114$, $p=0.0571$) auch wenn der prozentuale Knockdown mit Werten von $0,15 \pm 0,07$ und $0,16 \pm 0,11$ noch immer deutlich über 60% betrug (Abb. 8 B, C).

Eine Inhibition der endogenen miRNA war somit erfolgreich durchgeführt worden. Der Effekt der Inhibition scheint jedoch nach 24h nachzulassen.

Testtransfektionen und Vorversuche mit Mimics zeigten zudem eine Überexpression im Vergleich zur Negativkontrolle und dem KD und bestätigten, dass auch die Supplementierung der endogenen miRNA erfolgreich durchgeführt werden kann.

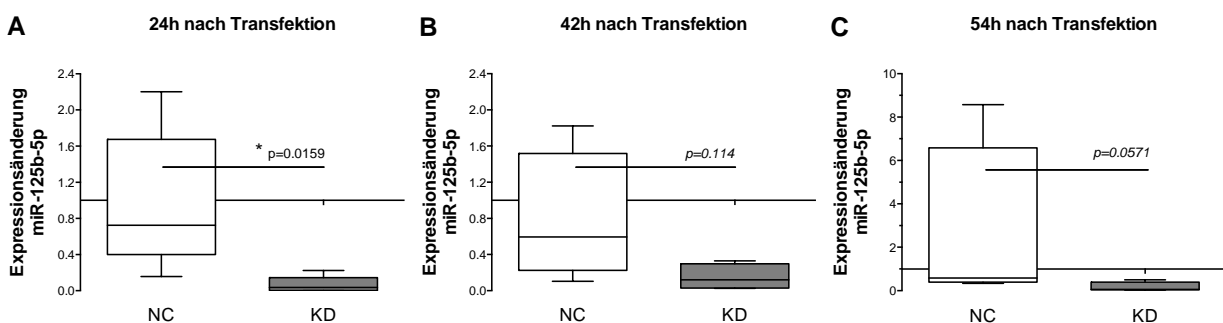


Abbildung 8: Expressionsänderung der miR-125p-5p im Zeitverlauf normiert auf native Zellen – Ratio der miR-125b-5p im Verhältnis zur Kontrolle U6. NC = Negativkontrolle; KD = Knockdown Gruppe miR-125b-5p. * $p < 0.05$. Werte sind als Mittelwerte und SEM (*Standard Error of Mean*) angegeben. Es ist eine signifikante Depletion der miR-125b-5p ($n=5$; KD = $0,066 \pm 0,041$) im Vergleich zu der Negativkontrolle ($0,98 \pm 0,34$) 24 Stunden nach Transfektion zu sehen (A). Diese scheint im zeitlichen Verlauf über 42 und 54 Stunden langsam abzunehmen und nicht mehr signifikant nachweisbar zu sein ($n=4$; KD = $0,15 \pm 0,07$ und $0,16 \pm 0,11$; NC = $0,78 \pm 0,37$ und $2,52 \pm 2,01$) (B/C).

Nach Evaluierung des Knockdowns sollte nun der unmittelbare Einfluss der Depletion und Supplementierung auf das Gens TP53 untersucht werden, da dieses wie bereits

beschrieben als Ziel der miR-125b-5p bekannt ist. (45) Hierzu wurde die Expressionsänderung von TP53 zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Transfektion gemessen. Zu diesem Zeitpunkt wurde die stärkste Inhibition der endogenen miR-125b-5p detektiert. Es wurden die Housekeeping-Gene Beta-2-Microglobulin (B2m) und Beta-Actin (ACTB) als Referenzgene eingesetzt, nachdem die Messungen mit dem Housekeeping-Gen GAPDH zu keinen reproduzierbaren Ergebnissen führten. Die zu untersuchenden Gruppen (KD, MIMIC, NC) wurden auf native Zellen normiert und statistisch untereinander verglichen.

Zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Transfektion zeigte sich im Vergleich zum Housekeeping-Gen B2M nach Knockdown der miR-125-5p ein leichter, jedoch nicht statistisch signifikanter Expressionsanstieg der TP53 mRNA (KD = $1,38 \pm 0,07$, NC = $1,15 \pm 0,14$, Abb. 9 A). Dieser stellte sich statistisch jedoch nicht signifikant dar ($p=0.33$). Nach Einbringung artifizieller Mimics war eine stark signifikante Herunterregulierung des Targetgens TP53 (mimic = $0,66 \pm 0,09$, NC = $1,34 \pm 0,13$) nachzuweisen ($p=0.0079$, Abb. 9 B).

Im Vergleich dazu konnte überraschenderweise eine signifikant verstärkte Expression mit einem Wert von $2,61 \pm 0,31$ ($p=0.0079$) von TP53 nach Knockdown der miR-125-5p verglichen mit der Negativkontrolle ($1,28 \pm 0,06$) im Verhältnis zu ACTB (Abb. 9 C) beobachtet werden. Es war ebenfalls eine signifikant gesteigerte Expression ($p=0.0317$) nach Mimic-Transfektion (mimic = $2,16 \pm 0,21$, NC = $1,29 \pm 0,13$) erkennbar (Abb. 9 D). Dies deutet darauf hin, dass ein Einfluss durch oder auf das Housekeeping-Gen bestehen könnte, da sowohl eine Depletion der endogenen miRNA als auch die Ergänzung artifizieller Mimics zu einer Hochregulation der TP53 mRNA führten.

Das komplementäre Expressionsverhalten von TP53 nach Zugabe der Inhibitoren bzw. der Mimics scheint die Annahme zu bestätigen, dass B2M als Housekeeping-Gen geeignet war. Gleichzeitig stellte die Messung einen Zusammenhang zwischen der Messung der endogenen miRNA mit dem Targetgen dar. ACTB verhielt sich wie bereits beschrieben kontrovers dazu. Sowohl die KD als auch die Mimic Gruppe zeigten eine signifikante Hochregulierung der TP53 mRNA. ACTB erwies sich somit als nicht geeignet.

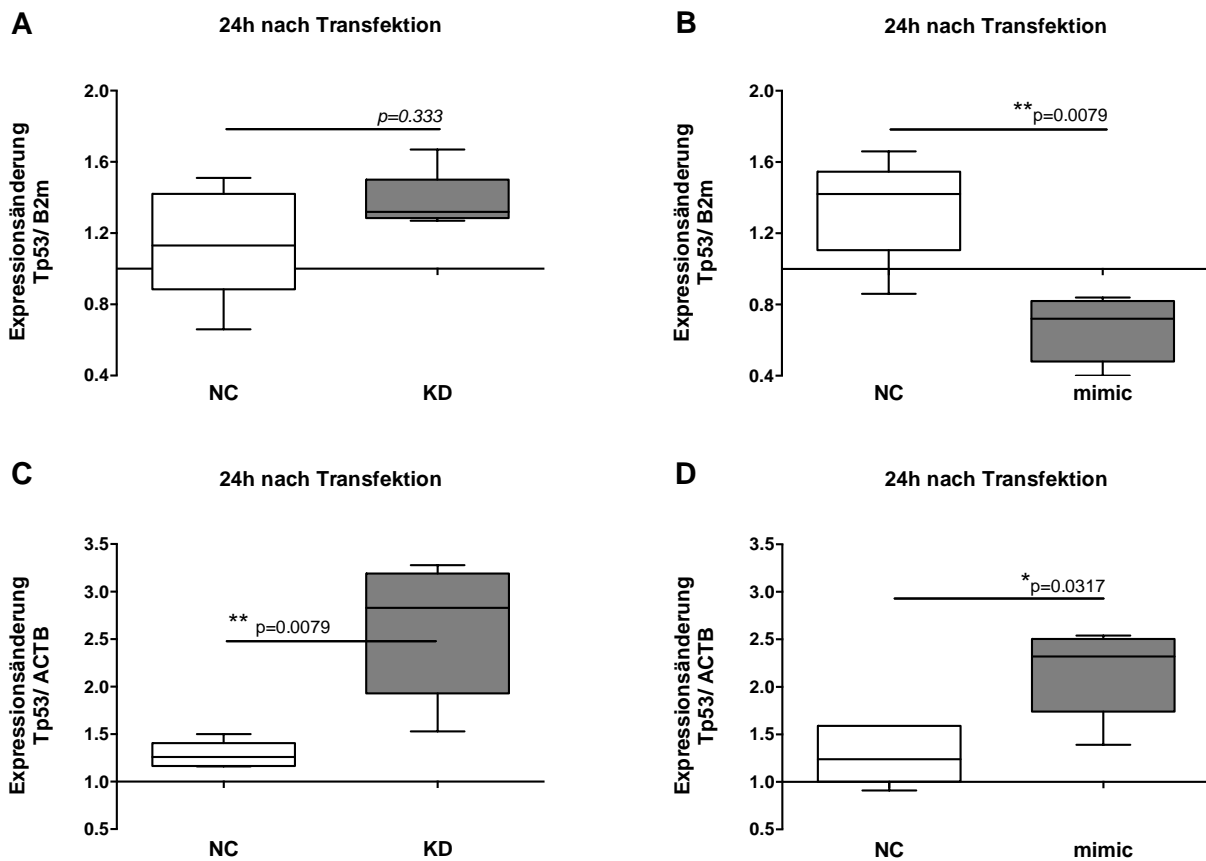


Abbildung 9: Expressionsänderung Tp53 mRNA im Verhältnis zu den Housekeeping-Genen ACTB und B2m 24 Stunden nach Transfektion normiert auf die nativen Zellen – NC = Negativkontrolle; KD = Knockdown der Anti-miR-125b-5p; mimic = pre-miR-125b-5p. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. $n = 5$. Werte sind als Mittelwerte und SEM (*Standard Error of Mean*) angegeben. Im Verhältnis zu B2m ist in der KD Gruppe (KD = $1,38 \pm 0,07$; NC = $1,15 \pm 0,14$) nur eine tendenzielle Expressionserhöhung zu sehen (A), während die mimic Gruppe (mimic = $0,66 \pm 0,09$) eine stark signifikante Herunterregulierung ($p = 0.0079$) der Tp53 mRNA gegenüber der Negativkontrolle (NC = $1,34 \pm 0,13$) aufweist (B). Im Verhältnis zu ACTB kommt es zu einer deutlich signifikanten Expressionssteigerung der Tp53 mRNA (** $p=0.0079$) in der KD Gruppe (KD = $2,61 \pm 0,31$; NC = $1,28 \pm 0,06$) (C) sowie einem ebenfalls signifikanten Anstieg (* $p = 0.0317$) in der mimic Gruppe (D) im direkten Vergleich zu der Negativkontrolle (mimic = $2,16 \pm 0,21$; NC = $1,29 \pm 0,13$).**

Nach Bestimmung der Expressionsänderung des Zielgens, sollte im Weiteren die Veränderung des p53 auf Proteinebene untersucht werden. Es wurde davon ausgegangen, dass die Expressionsänderung auf Proteinebene zeitlich erst nach der Expressionsänderung auf mRNA Ebene nachzuweisen ist. Daher wurde der Zeitpunkt 48h nach Transfektion gewählt. Es wurden mehrere primäre Antikörper des p53 getestet (u.a. Mouse monoclonal, rabbit polyclonal to p53 S15 der Firma Abcam), jedoch konnte nur einer, dass TP53 (Mouse monoclonal clone HR231 der Firma Abnova), erfolgreich etabliert werden und in die Auswertung mit eingehen. Die Expression von TP53 wurde zunächst auf native Zellen normiert und mit der Negativkontrolle verglichen. Das Housekeeping-Gen α -Tubulin diente als Referenzgen.

Hinsichtlich der Proteinexpression war keine signifikante Änderung zu erkennen. Während in der KD Gruppe eine leichte Herunterregulierung von TP53 ($p=0,2$) erkennbar war (Abb. 10 A), verhielt sich die Mimic Gruppe kontrovers dazu. Die Mimic Gruppe wies eine tendenziell gesteigerte Proteinexpression ($p=0,6$) gegenüber der NC-Gruppe auf (Abb. 10 B). Zusammenfassend waren keine signifikanten Expressionsänderungen, nur geringfügige Tendenzen oder ein nahezu gleichbleibendes Proteinlevel zu erkennen.

Die Ergebnisse verhalten sich somit entgegen der Hypothese. Es konnte keine negative Regulation von TP53 auf Proteinebene durch die Mimics und Inhibitoren der miR-125b-5p verifiziert werden. Die Ergebnisse der mRNA Messung konnten nicht bestätigt werden.

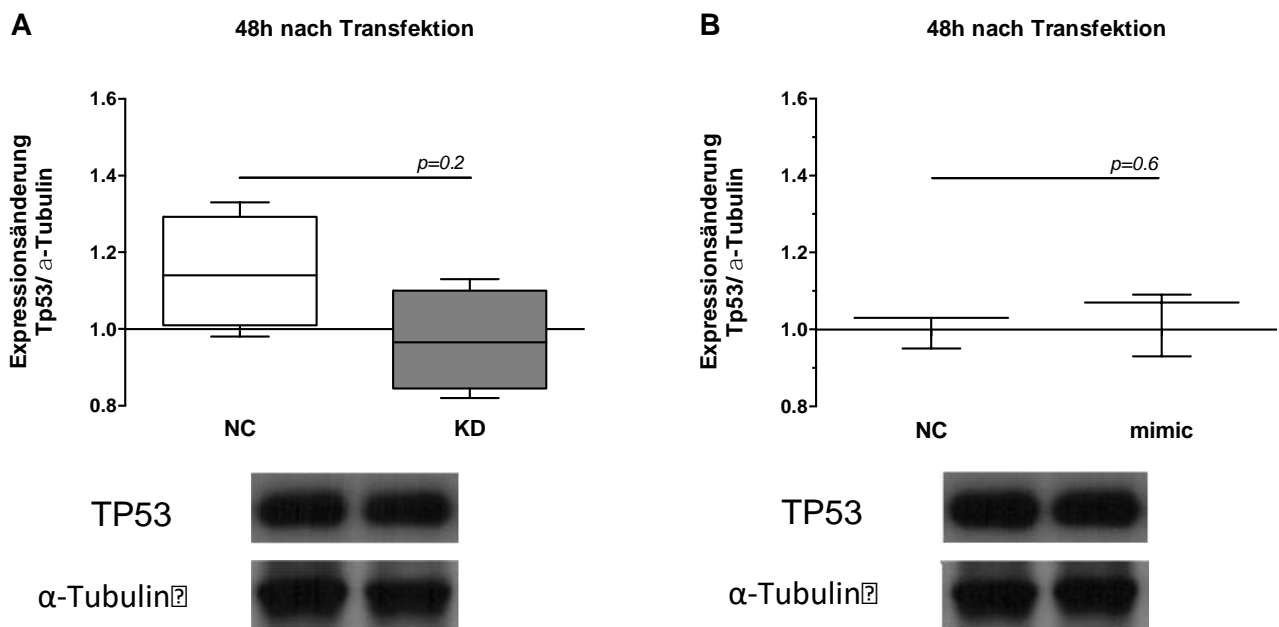


Abbildung 10: Western Blot TP53 normiert auf native Zellen 48 Stunden nach Transfektion – α-Tubulin dient hierbei als Referenzgen. NC = Negativkontrolle; KD = knockdown der Anti-miR-125b-5p; mimic = premiR-125b-5p. * $p < 0.05$. Darunter die jeweiligen Bildausschnitte der Blots. Tendenzielle Herunterregulierung von p53 in der KD Gruppe verglichen mit der Negativkontrolle ohne signifikante Expressionsunterschiede ($n=5$, $p=0.2$) **(A)**. Ähnliche Expression von mimic Gruppe und Negativkontrolle ohne signifikante Expressionsunterschiede mit einer Tendenz der TP53 Expressionssteigerung ($n=3$) **(B)**.

Im Anschluss an den Western Blot wurde ein standardisierter TP53 ELISA der Firma USCN Life Science Inc. nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Hierfür wurden die genormten Proteinproben der unterschiedlichen Gruppen verwendet. Die Ergebnisse des TP53 ELISA waren nicht verwertbar. Die Messungen wiesen mehrfach eine sehr hohe Standardabweichung auf und folgten nicht der Standardkurve. Der TP53 ELISA wurde daher eingestellt.

Interessanterweise wird die Überexpression von *Insulin-like growth factor 2* (IGF2) in Tumoren auch über die Regulierung durch p53 beeinflusst. Zudem gilt die miR-125b als erster negativer Regulator von IGF2 in Skelettmuskelzellen. Eine Dysregulation des mitogenen oder apoptotischen Signalweges kann unter anderem an der Entstehung von HCC beteiligt sein. Es wurde daher IGF2 ebenfalls als putatives Ziel der miR-125b-5p auf Proteinebene im ELISA untersucht. (37, 38, 40-42, 62)

Für die Untersuchung der Proteinexpression von IGF2 (anhand eines standardisierten IGF2-ELISA Protokolls der Firma USCN Life Science Inc.) zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden die Medium-Überstände der unterschiedlichen Gruppen verwendet. Das Proteinlevel von IGF2 war zum Zeitpunkt 24 Stunden im Vergleich zu nativen Zellen ($1588 \pm 625,6$) in der Negativkontrolle sowie in der Knockdown Gruppe der miR-125b-5p geringfügig vermindert exprimiert (KD = $1381 \pm 537,6$ und NC = $1361 \pm 538,6$) (Abb. 11 A). Im zeitlichen Verlauf über 48 und 54 Stunden schien das Proteinlevel in allen Gruppen progredient abzunehmen. Die Menge des zu messenden Proteins war dabei um mehr als die Hälfte erniedrigt (Abb. 11 B, C). Insgesamt zeigten sich hohe Standardabweichungen.

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Proteinexpression zu den Zeitpunkten 24, 42 und 54 Stunden. Zudem schien eine leichte Herunterregulierung des IGF2 Levels am zeitlichen Verlauf bemessen entgegengesetzt der Hypothese einer Expressionssteigerung zu bestehen.

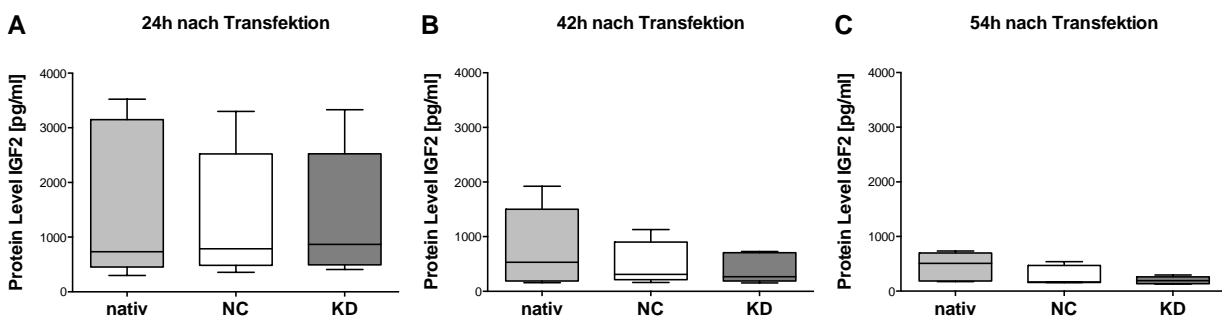


Abbildung 11: Protein-Level IGF2 über den Zeitverlauf nach Transfektion – Nativ = unbehandelte (native) Zellen; NC = Negativkontrolle; KD = Knockdown mit Anti-miR-125b-5p. n=5. Werte sind als Mittelwerte und SEM (*Standard Error of Mean*) angegeben. Das Proteinlevel von IGF2 ist 24 Stunden nach Transfektion in der NC ($1361 \pm 538,6$) und KD ($1381 \pm 537,6$) Gruppe im Vergleich zur nativen Gruppe ($1588 \pm 625,6$) tendenziell erniedrigt (A). Im Zeitlichen Verlauf über 42 Stunden (Nativ = $783,6 \pm 328,6$; NC = $508,8 \pm 177,4$; KD = $411,6 \pm 122,1$) (B) bzw. 54 Stunden nach Transfektion (Nativ = $454,1 \pm 116$; NC = $285,4 \pm 78,4$; KD = $195,1 \pm 29,6$) nimmt die Expression tendenziell weiter ab (C). Es ist kein signifikanter Expressionsunterschied zwischen den Gruppen zu sehen.

8.4. miR-26a

Für die Untersuchung des Einfluss' der miR-26a auf die kultivierten Rattenhepatozyten wurde zunächst in der RealTime PCR der Einfluss des Inhibitors auf die endogene miRNA zu den Zeitpunkten 24, 42 und 54 Stunden nach Transfektion gemessen. Die gemessenen Ct-Werte wurden auf native Zellen normiert und mit der Negativkontrolle (NC) verglichen.

Bezüglich der Expressionsänderung der miR-26a zeigte sich zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Transfektion in der Knockdown Gruppe eine deutliche Herunterregulierung der endogenen miR-26a im Vergleich zu der Negativkontrolle. Der Expressionsunterschied stellte sich aufgrund der Standardabweichung innerhalb der Negativkontrolle (NC = $0,81 \pm 0,32$) nicht signifikant dar. Es war jedoch ein deutlicher Trend zu erkennen ($p=0.0571$) bei einer Inhibition von nahezu 100% (KD = $0,010 \pm 0,008$, Abb. 12 A).

Nach 42h und 54h war ebenfalls eine Inhibition zu erkennen, es ließ sich jedoch kein signifikanter Unterschied nachweisen (Abb. 12 B, C). Die Ergebnisse lassen stark vermuten, dass auch nach 24h der Effekt der herunterregulierten miRNA Expression konstant bestehen bleibt. Testtransfektionen mit Mimics zeigten zudem eine Überexpression im Vergleich zur NC und KD Gruppe. Sie bestätigten, dass auch die Supplementierung der endogenen miRNA erfolgreich durchgeführt werden kann.

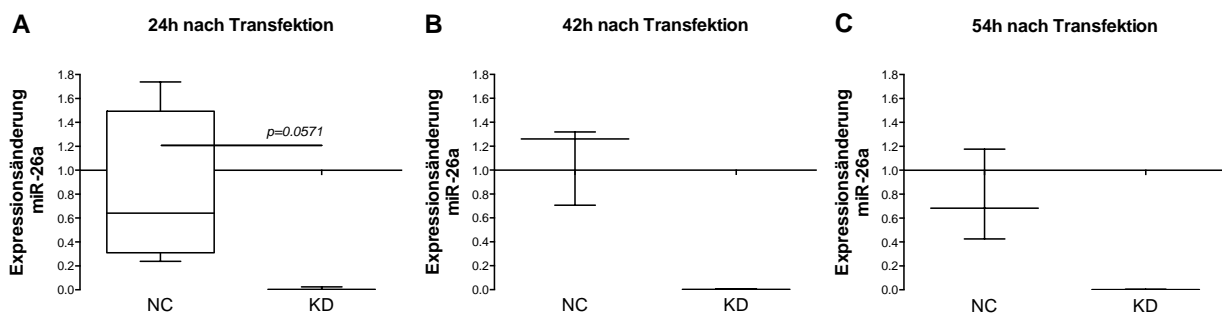


Abbildung 12: Expressionsänderung der miR-26a im Zeitverlauf normiert auf native Zellen – Ratio der miR-26a im Verhältnis zur Kontrolle U6. NC = Negativkontrolle; KD = Knockdown Anti-miR-26a. * $p < 0.05$. Werte sind als Mittelwerte und SEM (*Standard Error of Mean*) angegeben. Es ist eine beinahe signifikante Depletion ($p=0.057$) der miR-26a ($n=4$; KD = $0,010 \pm 0,008$) im Vergleich zu der Negativkontrolle (NC = $0,81 \pm 0,32$) 24 Stunden nach Transfektion zu sehen (A). Zum Zeitpunkt 42 und 54 Stunden ist ebenfalls eine Inhibition ($n=3$; KD = $0,004 \pm 0,002$ und $0,003 \pm 0,001$) im Vergleich zur Negativkontrolle (NC = $1,096 \pm 0,195$ und $0,76 \pm 0,22$) zu sehen jedoch ist diese nicht signifikant nachweisbar (B/C).

Das Zellzyklusprotein CCND2 wird in der Literatur als Zielprotein der miR-26a beschrieben. (9, 31, 63, 64) Demzufolge sollte in den nachfolgenden Untersuchungen der unmittelbare Einfluss der Depletion und Supplementierung der miR-26a auf die CCND2 Expression untersucht werden. Hierzu wurde die Expressionsänderung von CCND2 zum Zeitpunkt 24

Stunden nach Transfektion gemessen. Es wurden die Housekeeping-Gene Beta-2-Microglobulin (B2m) und Beta-Actin (ACTB) als Referenzgene eingesetzt, nachdem die Messungen mit dem Housekeeping-Gen GAPDH zu keinen eindeutigen Ergebnissen führten. Die zu untersuchenden Gruppen (KD, MIMIC, NC) wurden auf native Zellen normiert und statistisch untereinander verglichen.

Die CCND2 Expression zum Zeitpunkt 24 Stunden zeigte im Verhältnis zu B2m in der Knockdown Gruppe ($1,10 \pm 0,12$) verglichen mit der Negativkontrolle ($1,21 \pm 0,31$) eine leichte jedoch nicht signifikante ($p=0.82$) Herunterregulierung (Abb. 13 A). Die Einbringung artifizierender Mimics zeigte ebenfalls keine signifikante Veränderung und einen Trend zur Herunterregulierung von CCND2 (Abb. 13 B). ACTB verhielt sich in der KD Gruppe analog dazu (Abb. 13 C). Nur in der Mimic Gruppe im Verhältnis zu ACTB zeigte sich eine leicht verstärkte CCND2 Expression (Abb. 13 D). Ein Zusammenhang der Regulation von CCND2 durch die miR-26a konnte nicht nachgewiesen werden. Das Expressionsverhalten von CCND2 nach Zugabe der Inhibitoren bzw. der Mimics der miR-26a zeigte keine Parallelen zu den Untersuchungen der miR-125b-5p und dem dazugehörigen Zielgen p53.

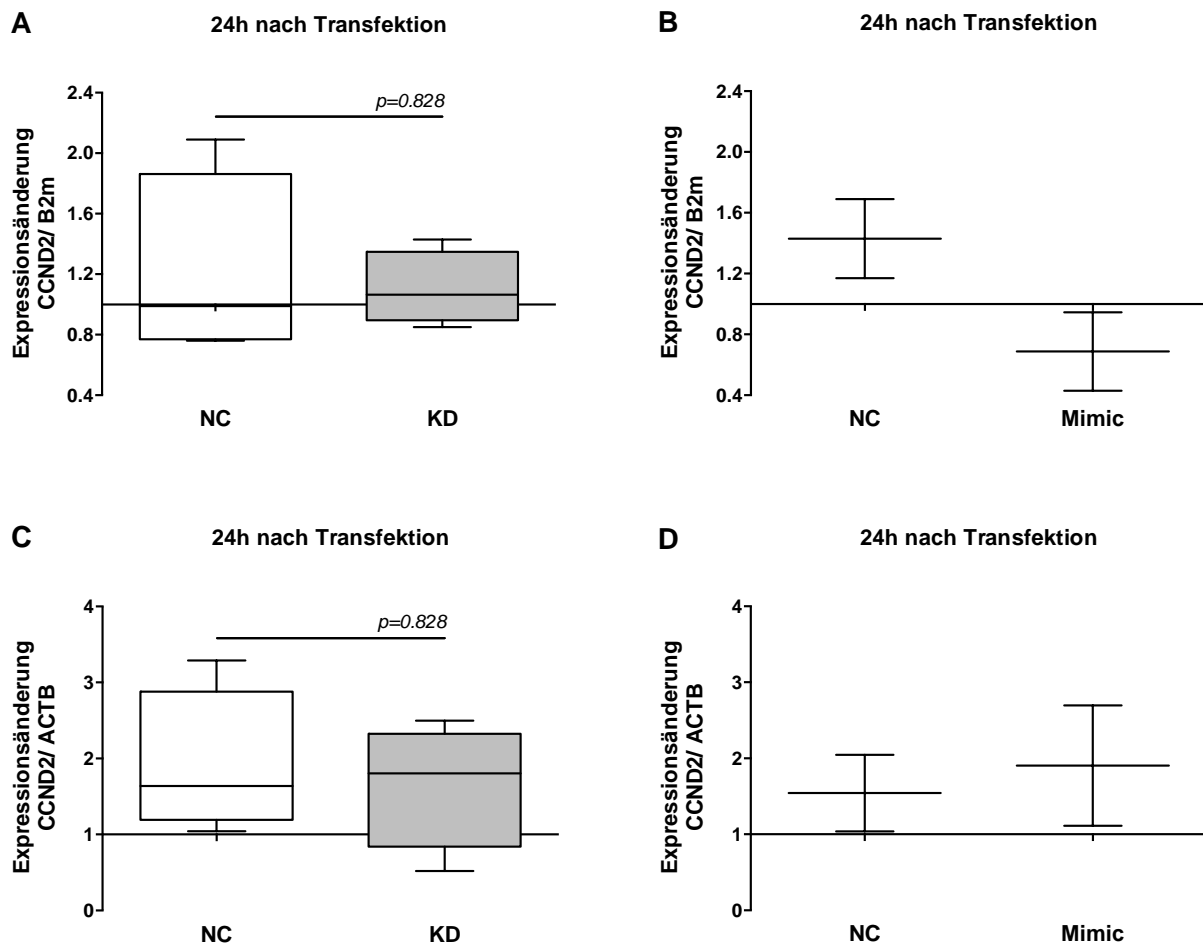


Abbildung 13: Expressionsänderung CCND2 mRNA im Verhältnis zu den Housekeeping-Genen ACTB und B2m normiert auf native Zellen 24 Stunden nach Transfektion – NC = Negativkontrolle; KD = Knockdown der Anti-miR-26a; Mimic = pre-miR-26a. * $p < 0.05$. Werte sind als Mittelwerte und SEM (*Standard Error of Mean*) angegeben. Im Verhältnis zu B2m zeigt sich eine tendenzielle Expressionsabnahme der CCND2 mRNA ($p=0.828$) in der Knockdown Gruppe ($n=4$; KD = $1,10 \pm 0,12$) (**A**) sowie eine ebenfalls nicht signifikante Abnahme in der Mimic Gruppe ($n=3$; Mimic = $0,67 \pm 0,26$) (**B**) im Vergleich zu der Negativkontrolle ($1,21 \pm 0,31$ und $1,43 \pm 0,26$). Verglichen mit ACTB ist in der Knockdown Gruppe (KD = $1,90 \pm 0,4$; NC = $1,66 \pm 0,41$) eine verringerte CCND2 Expression zu sehen (**C**) während in der Mimic Gruppe ($1,90 \pm 0,79$) eine minimale Expressionssteigerung der CCND2 mRNA gegenüber der Negativkontrolle ($1,54 \pm 0,50$) zu beobachten ist (**D**).

Der Western Blot mit CCND2 zeigte bei mehrfacher Durchführung ebenfalls stark variable und keine signifikanten Ergebnisse, weshalb diese nicht in die Auswertung mit eingingen. Eine Beeinflussung von CCND2 durch die miR-26a konnte somit weder auf mRNA noch auf Proteinebene bestätigt werden. Die Arbeitshypothese wurde wiederlegt und es folgten keine weiterführenden Untersuchungen.

8.5. Let-7e

Für die Untersuchung des 'Einfluss' der let-7e auf die kultivierten Rattenhepatozyten wurde zunächst in der RealTime PCR der Einfluss des Inhibitors auf die endogene miRNA zu den Zeitpunkten 24, 42 und 54 Stunden nach Transfektion gemessen. Die gemessenen Ct-Werte wurden auf native Zellen normiert und mit der Negativkontrolle (NC) verglichen.

Zum Zeitpunkt 24 Stunden zeigt sich verglichen mit der NC Gruppe eine deutliche Verminderung der endogenen miRNA Expression. Es konnte eine Depletion der endogenen miRNA von nahezu 100% erzielt werden ($KD = 0,006 \pm 0,006$). Ein signifikanter Expressionsunterschied ist aufgrund der hohen Standardabweichung innerhalb der NC Gruppe jedoch nicht nachzuweisen (Abb. 14 A). Auch nach 42 und 54 Stunden ist eine nahezu 100%ige Inhibition ($KD = 0,004 \pm 0,002$ und $0,003 \pm 0,001$) im Vergleich zu Negativkontrolle ($1,22 \pm 0,44$ und $1,39 \pm 0,44$) erkennbar, auch wenn diese nicht signifikant nachzuweisen ist (Abb. 14 B, C). Der Effekt der Depletion der endogenen miRNA Expression scheint auch nach 24 Stunden bestehen zu bleiben. Testtransfektionen mit Mimics zeigten zudem eine Überexpression im Vergleich zur NC und KD Gruppe und bestätigten, dass auch die Supplementierung der endogenen miRNA erfolgreich durchgeführt werden kann.

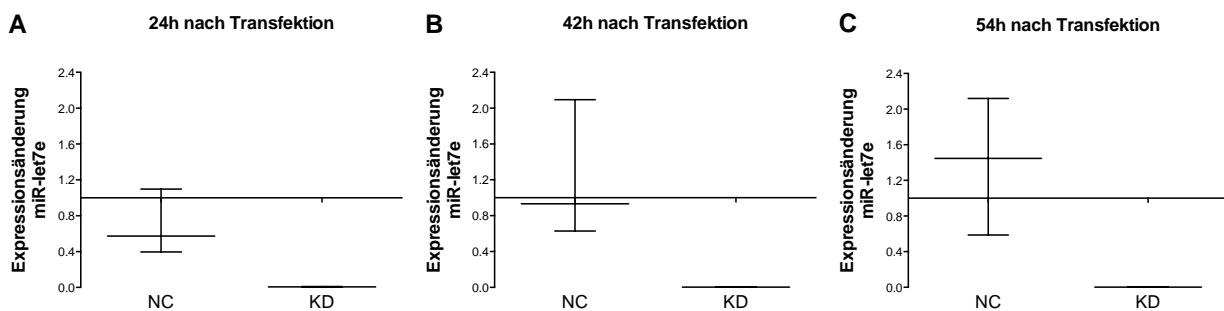


Abbildung 14: Expressionsänderung der let-7e im Zeitverlauf normiert auf native Zellen – Ratio der let-7e im Verhältnis zur Kontrolle U6. NC = Negativkontrolle; KD = Knockdown Anti-let-7e. * $p < 0.05$. ($n=3$). Werte sind als Mittelwerte und SEM (*Standard Error of Mean*) angegeben. Es ist eine nicht signifikante jedoch deutlich verminderte Expression der let-7e ($0,006 \pm 0,006$) im Vergleich zu der Negativkontrolle ($0,69 \pm 0,36$) 24 Stunden nach Transfektion zu sehen (A). Diese scheint im zeitlichen Verlauf über 42 und 54 Stunden konstant zu bleiben ($0,004 \pm 0,002$ und $0,003 \pm 0,001$) jedoch weiterhin gegenüber der Negativkontrolle ($1,22 \pm 0,44$ und $1,39 \pm 0,44$) nicht signifikant nachweisbar zu sein (B/C).

Aus der Literatur ist bekannt, dass die let-7 Familie und darunter insbesondere die let-7e eine bedeutende Rolle im Zellzyklus spielt und unter anderem an der Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Hepatozyten ähnlichen Zellen (HLC) beteiligt ist. Auch Cycline sind als Zielgene der let-7 Familie bekannt. (7, 25, 32, 33, 65) Daher wurde für diese

miRNA ebenfalls die Expression von CCND2 auf mRNA Ebene untersucht. Hierzu wurde die Expressionsänderung von CCND2 zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Transfektion gemessen. Es wurden die Housekeeping-Gene Beta-2-Microglobulin (B2m) und Beta-Actin (ACTB) als Referenzgene eingesetzt, nachdem die Messungen mit dem Housekeeping-Gen GAPDH zu keinen eindeutigen Ergebnissen führten. Die zu untersuchenden Gruppen (KD, MIMIC, NC) wurden auf native Zellen normiert und statistisch untereinander verglichen. Hinsichtlich der CCND2 Expression zeigte sich im Verhältnis zu B2m eine signifikante ($p=0.0286$) Herunterregulierung innerhalb der KD Gruppe ($0,68 \pm 0,03$) sowie eine tendenzielle Expressionsabnahme in der Mimic Gruppe ($0,95 \pm 0,23$) im Vergleich zu der Negativkontrolle (Abb. 15 A, B). Die Messungen im Verhältnis zu ACTB schienen sich analog zu verhalten. Es konnte eine deutliche Herunterregulierung ($p=0.057$) in der KD Gruppe ($0,73 \pm 0,197$) und ein Trend zur Expressionsabnahme in der Mimic Gruppe beobachtet werden (Abb. 15 C, D). In allen Gruppen wurde somit ausschließlich eine Herunterregulierung gesehen. Die Ergebnisse im Verhältnis zu den beiden Housekeeping-Genen ähnelten sich stark ließen jedoch nur in der KD Gruppe im Verhältnis zu B2m eine Signifikanz der let-7e in Hinblick auf die CCND2 Expression erkennen.

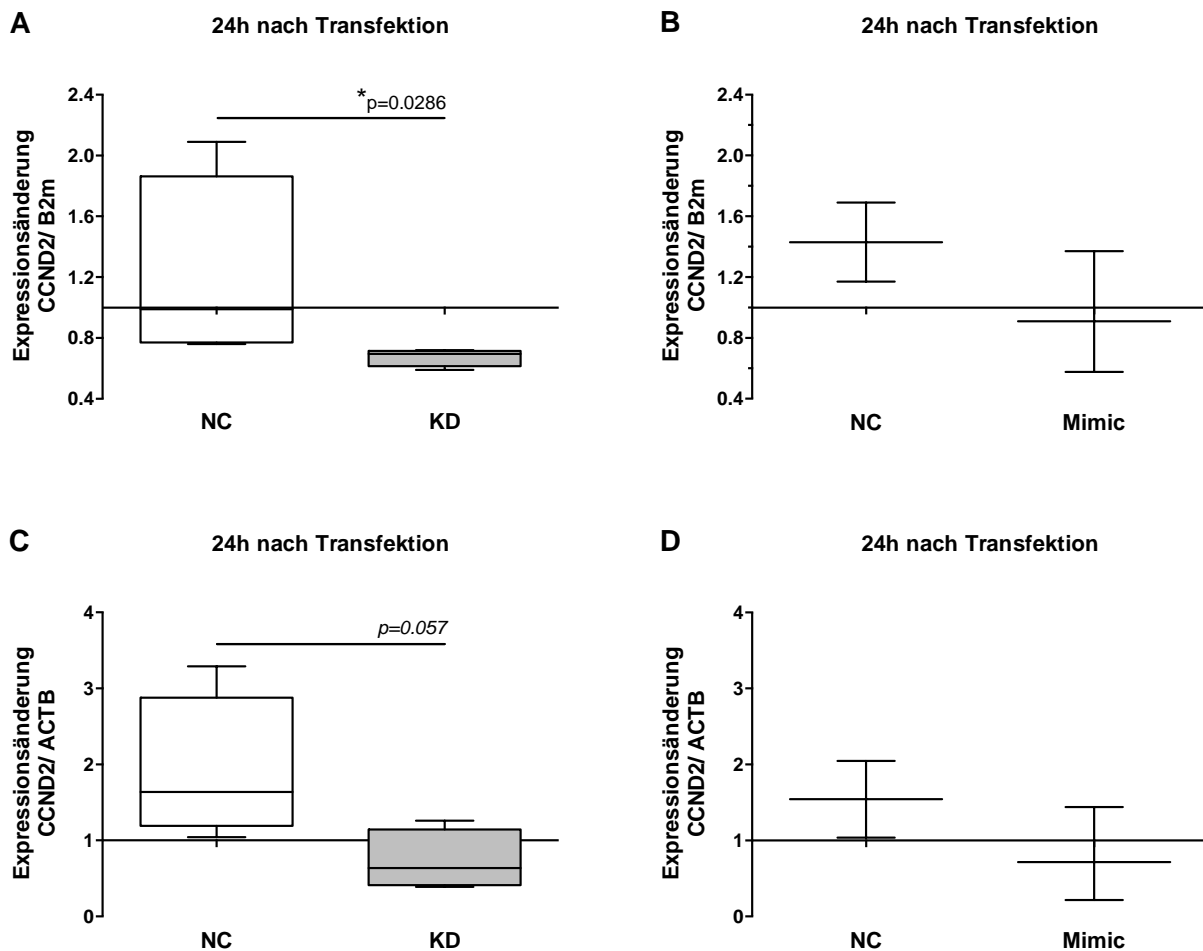


Abbildung 15: Expressionsänderung CCND2 mRNA im Verhältnis zu den Housekeeping-Genen ACTB und B2m normiert auf native Zellen 24 Stunden nach Transfektion – NC = Negativkontrolle; KD = Knockdown let-7e; Mimic = pre-let-7e. *p < 0.05. Werte sind als Mittelwerte und SEM (*Standard Error of Mean*) angegeben. Im Verhältnis zu B2m kommt es zu einer signifikanten Herunterregulierung der CCND2 mRNA (*p=0.0286) in der Knockdown Gruppe (n=4; KD = 0,68 ± 0,03) **(A)** sowie einer tendenziell verminderten Expression in der Mimic Gruppe (n=3; Mimic = 0,95 ± 0,23) **(B)** im direkten Vergleich zu der Negativkontrolle (1,21 ± 0,31 und 1,43 ± 0,26). Die CCND2 Expression im Verhältnis zu ACTB zeigt in der KD Gruppe (0,73 ± 0,196) eine tendenzielle Expressionsabnahme (p= 0.057) der CCND2 mRNA gegenüber der Negativkontrolle (1,90 ± 0,48) **(C)**. Auch in der Mimic Gruppe (0,79±0,35) kann eine tendenzielle Herunterregulierung gegenüber der Negativkontrolle (1,54 ± 0,50) beobachtet werden **(D)**.

Basierend auf der Grundlage, dass verschiedene miRNAs häufig in Klustern vielfältige Signalkaskaden beeinflussen bzw. in Stoffwechselwegen nacheinander geschaltet sind (28) wurde zudem die Überlegung getroffen, ob die Kombination zweier den Zellzyklus regulierender miRNAs eventuell den Effekt der Inhibition oder Überexpression auf die putativen Ziele verstärken könnte. Hierzu wurde die Transfektion der jeweiligen miRNA Inhibitoren und mimics der beiden miRNAs miR-26a und let-7e miteinander kombiniert. Interessanterweise waren die Ergebnisse der CCND2 Expression bei Kombination der miR-26a und let-7e ebenso stark variabel und nicht signifikant. Während die Expression von

CCND2 im Verhältnis zu B2m in der Knockdown und mimic Gruppe verglichen mit der Negativkontrolle tendenziell herunterreguliert war (Abb. 16 A, B) wurde in der Mimic Gruppe im Verhältnis zu ACTB eine leichte Expressionssteigerung der CCND2 mRNA beobachtet (Abb. 16 C). Anders verhielt sich die Expression von CCND2 In der KD Gruppe im Verhältnis zu ACTB. Hier wurde eine annähernd signifikante ($p=0,057$) Herunterregulierung von CCND2 ($0,84 \pm 0,19$) nachgewiesen (Abb.16 D). Somit war die Expression von CCND2 normalisiert auf ACTB bei Einbringung beider artifizieller miRNAs tendenziell analog den Expressionsergebnissen von CCND2 bei Inhibition und Supplementierung der miR-26a allein. Dies könnte bedeuten, dass der Effekt der miR-26a oder eine Beeinflussung der Housekeeping-Gene stärker ist als durch die let-7e. Eine Regulierung von CCND2 konnte durch die Kombination beider miRNAs nicht nachgewiesen werden.

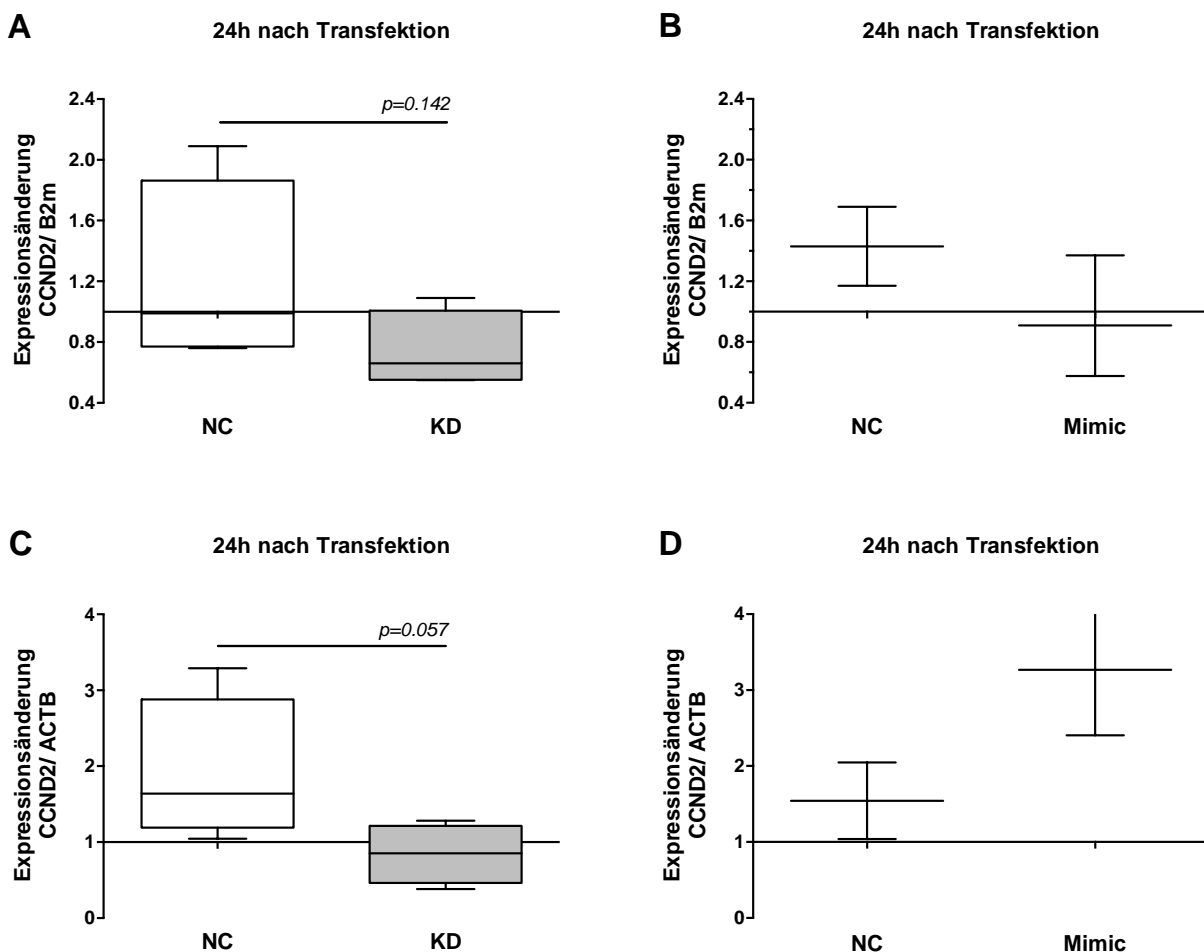


Abbildung 16: Expressionsänderung CCND2 mRNA im Verhältnis zu den Housekeeping-Genen ACTB und B2m normiert auf native Zellen 24 Stunden nach Transfektion – NC = Negativkontrolle; KD = Knockdown Anti-miR-26a + let-7e; mimic = pre-miR-26a + pre-let-7e. * $p < 0.05$. Werte sind als Mittelwerte und SEM (Standard Error of Mean) angegeben. Im Verhältnis zu B2m kommt es zu einer nicht signifikanten Herunterregulierung der CCND2 mRNA in der Knockdown Gruppe ($n=4$; $KD = 0,74 \pm 0,13$) (A) sowie in der mimic Gruppe ($n=3$; $Mimic = 01,04 \pm 0,21$) (B) im direkten Vergleich zu der Negativkontrolle ($1,21 \pm 0,31$ und

1,43 ± 0,26). Im Verhältnis zu ACTB kann in der Knockdown Gruppe (0,84 ± 0,19) **(C)** eine annähernd signifikante Expressionsabnahme (p=0.057) und in der mimic Gruppe (0,79 ± 0,35) **(D)** eine tendenzielle Heraufregulierung der CCND2 Expression gegenüber der Negativkontrolle (1,90 ± 0,48 und 1,54 ± 0,50) gemessen werden.

Da auch die Zellzyklusproteine CCND1 und c-myc bekannte Ziele der let-7 Familie darstellen, (7) wurde zusätzlich nach Etablierung des Western Blots für diese beiden Proteine versucht, in den unterschiedlichen Gruppen auch einen Expressionsunterschied dieser bekannten Zellzyklusproteine nachzuweisen. Der Western Blot der Proteinexpression von CCND1 und c-myc lieferte jedoch ebenfalls keine eindeutigen Ergebnisse und wurde aufgrund nicht reproduzierbarer Ergebnisse eingestellt.

9. Diskussion

9.1. Hauptergebnisse

Das Thema der vorliegenden Promotionsschrift umfasste die *in vitro* Untersuchungen von Leberregenerations-assoziierten miRNAs in Rattenhepatozyten. Hierbei sollten aus der Literatur bekannte prädiktive Zielproteine der miR-125b-5p, der mir-26a und der let-7e *in vitro* untersucht werden. Für diese miRNAs wird ein direkter Einfluss auf den Zellzyklus während der Leberregeneration postuliert. Es sollte deren Einfluss auf die posttranskriptionelle Genexpression nach liposomaler Transfektion von spezifischen Inhibitoren und Mimics anhand verschiedener Analyseverfahren verifiziert und verglichen werden. Diesen Experimenten liegt die Annahme zugrunde, dass über diesen miRNA-basierten Mechanismus ein positiver Effekt auf die Leberregeneration, insbesondere eine Proliferationssteigerung, ausgelöst werden könnte. Die Auswahl der genannten miRNAs orientierte sich an den Ergebnissen vorangegangener Studien unserer Arbeitsgruppe. Die Auswahl der Zielproteine richtete sich nach den bereits publizierten Ergebnissen und der Datenbank miRanda-miRSVR. Es wurde drei miRNAs ausgewählt, die miR-26a, let-7e und miR-125b-5p, da diese zum Höhepunkt der Leberregeneration 24 Stunden nach PH am stärksten herunterreguliert waren. (7) Die Untersuchungen erfolgten im Zeitraum von 2011-2013.

Im Rahmen der Studie konnte gezeigt werden, dass endogene miRNAs mittels liposomaler Transfektion in primären Rattenhepatozyten erfolgreich inhibiert und supplementiert werden konnten. In beinahe allen Versuchsgruppen konnte eine tendenziell oder signifikante Expressionsminderung bzw. Expressionssteigerung der jeweiligen endogenen miRNA nachgewiesen werden. Die Inhibition war mit nahezu 100% auch über einen Zeitraum von 54 Stunden noch konstant nachzuweisen. In der bildmorphologischen Auswertung der Lichtmikroskopie schien ein Großteil der Zellen die anti-miRs bzw. pre-miRs problemlos aufzunehmen. Nach langer Kultivierungsphase über 54 Stunden zeigte sich eine leicht gestörte Zellarchitektur, welche als Toxizität der Transfektionsreagenzien interpretiert werden konnte.

Entgegen unserer Hypothese zeigte sich auf mRNA Ebene in Abhängigkeit der unterschiedlichen Housekeeping-Gene eine überraschend variable Expression der vermuteten Zielgene. Während der Knockdown und die Überexpression der miR-125-5p im direkten Vergleich mit der Kontrollgruppe gemittelt auf Beta-2-Microglobulin unserer Hypothese folgte und einen tendenziellen Anstieg bzw. signifikanten Abfall des endogenen

mRNA Levels von TP53 aufwies, zeigten die Ergebnisse gemittelt auf Beta Actin ausschließlich eine signifikante Expressionssteigerung in der KD und mimic Gruppe. Aufgrund der hohen Abweichung in den Ct Werten, schien Beta Actin somit nicht als Housekeeping-Gen geeignet. Unerwartet war jedoch, dass die Untersuchung von TP53 auf Proteinebene im Western Blot und ELISA ebenfalls keine eindeutigen und reproduzierbaren Unterschiede zeigte. Die Hypothese, dass die Inhibition der miR-125-5p zum Anstieg der Proteinkonzentration von TP53-Expression führt oder durch Supplementierung der miR-125b-5p ein verminderter Proteinlevel erzielt werden kann, konnten somit nicht bestätigt werden. Ein negativer Regulationsmechanismus zwischen der miR-125b-5p und p53 konnte in dieser Arbeit nicht gezeigt werden. Auch die ELISA-Quantifizierung des Proteins IGF2, eines weiteren vermuteten Zielproteins der miR-125b-5p, welches ebenfalls im Zusammenhang mit der Regulation von TP53 in anderen Spezies steht, konnten keine Regulation durch die miR-125b-5p validieren. Proliferationstests zum Nachweis einer durch die Anti-miR-125b-5p und damit TP53- oder IGF2-induzierte Proliferationssteigerung der Rattenhepatozyten *in vitro* wurden aufgrund dessen nicht angeschlossen.

Interessanterweise schienen auch die anderen untersuchten miRNAs dieser Variabilität der Ergebnisse zu folgen. Bei den Untersuchungen der miR-26a und let-7e konnte trotz mehrfach in der Literatur beschriebener Regulation während des Zellzyklus kein eindeutiger Einfluss auf die mRNA Expression von CCND2 nachgewiesen werden. Es war ebenfalls eine stark variable Expression in Abhängigkeit der Housekeeping-Gene zu beobachten. Die CCND2 Expression der let-7e Versuchsgruppen waren im Verhältnis zu den Housekeeping-Genen ACTB und B2m sowohl in der Mimic als auch in der KD Gruppe herunterreguliert. In der KD Versuchsgruppe war der Expressionsunterschied im Verhältnis zu B2m sogar signifikant ($p=0,02$). Jedoch zeigten sich in der miR-26s Versuchsgruppe keine signifikanten Expressionsunterschiede hinsichtlich der CCND2 Expression. In der miR-26a Mimic Gruppe im Verhältnis zu ACTB fand sich sogar eine tendenziell gesteigerte Expression. Auch in der Kombination der Inhibitoren und Mimics der miR-26a und let7e war keine eindeutige Regulation von CCND2 zu erkennen. Die kombinierte Transfektion wurde durchgeführt unter der Vorstellung durch ein miRNA-Kluster den putativen Effekt auf die Zielgene zu verstärken. Die Ergebnisse einer kombinierten Transfektion beider miRNA-Inhibitoren bzw. Mimics glich jedoch stark den Ergebnissen der Messungen der miR-26a Versuchsgruppen alleine. Dies könnte bedeuten, dass der Einfluss der miR-26a insgesamt stärker war als der der let-7e. In den Western Blots zum Nachweis der Zellzyklusproteinen c-myc und CCND1 war ebenfalls keine negative Regulation durch die let-7e erkennbar. Ebenso konnte keine

Regulation von CCND2 durch die miR-26a in Rattenhepatozyten im Western Blot nachgewiesen werden.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Untersuchungen, dass die in der Literatur mehrfach als Ziele der artifiziell regulierten miRNAs miR-125b-5p, miR-26a, und let-7 beschriebenen Gene, wie u.a. TP53, IGF-2 und CCND2, in unserem Modell nicht eindeutig reguliert wurden. Dies geht einher mit einer überraschenden und teilweise starken Variabilität der Ergebnisse in Abhängigkeit der genutzten Housekeeping Gene einher.

Retrospektiv stellte sich die Frage, warum es zu solch variablen Ergebnissen gekommen war. Spielen die für die hier untersuchten drei miRNAs drei miRNAs vermuteten Zielgene für den Zellzyklus von primären Rattenhepatozyten eventuell keine Rolle? Welche möglichen anderen Ursachen könnten für die Resultate verantwortlich sein?

Einige mögliche Ursachen werden im Folgenden kritisch im Vergleich mit der aktuellen Literatur diskutiert.

9.2. Kritische Diskussion

9.2.1. Speziesabhängige variable Ziele von miRNAs

Bei erneut detaillierter Analyse der aktuellen Literatur decken sich die Ergebnisse der eigenen, in den Jahren 2011-2013 durchgeführten Versuchsreihen, zum Teil mit einigen Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen in Hinblick auf die verschiedenen Spezies der Zellreihen, die verwendet wurden. Beispielsweise wurde nachgewiesen, dass die miR-125b zwar als negativer Regulator von p53 in humanen Lungenfibroblasten und Zebrafischembryonen wirkt und ihr somit eine zentrale Rolle im p53-Netzwerk während Proliferation und Apoptose zukommt. Eine Regulierung von p53 in Mäusen konnte jedoch nicht bestätigt werden. Die Autoren nannten als einen möglichen Erklärungsansatz die Vielfalt der Genexpression in den verschiedenen Spezies. Jede Spezies besitzt bekanntermaßen eine andere miRNA Bindungsstelle am 3'UTR Ende der endogenen mRNA. Die miR-125b scheint in allen drei benannten Spezies das p53-Netzwerk durch eine inkohärente Vorwärtsschleife zu modulieren. Beobachtungen legen nahe, dass zumindest innerhalb der Wirbeltiere, die 3' UTR-Sequenzen jedes Genziels sich rasch über einen neutralen genetischen Drift weiterentwickeln kann. Die Hoch- oder Herunterregulierung einer einzelnen miR-125b-Bindungsstelle an der 3' UTR der meisten Gene könnte somit eine relativ unbedeutende Wirkung auf den Organismus im Ganzen haben. (45, 66)

Es ist also davon auszugehen, dass nicht in jeder Zellreihe die Targets der verschiedenen miRNAs übereinstimmen oder aber diese trotz Bindung an die 3' UTR des Zielgens keine Wirkung auf den Zellmetabolismus haben. Diese Überlegung könnte man auf den Ausgang der eigenen Versuchsreihen übertragen. Somit wäre zwar der endogene Knockdown, wie es auch die Ergebnisse der drei untersuchten miRNAs zeigten, nachweisbar, der Effekt auf mRNA- und Proteinebenen jedoch unter Umständen nicht validierbar oder sogar abweichend. Tatsächlich konnten diese Beobachtungen auch in anderen Zellreihen bestätigt werden. Beispielsweise konnte in hämatopoetischen Stammzellen der fetalen Mäuseleber (Progenitorzellen) keine Expressionsveränderungen von p53 beobachtet werden. Überraschenderweise hatte auch ein Knockdown in humanen Leukämiezelllinien REH keine Expressionsänderung von p53 oder p21 zur Folge, obwohl diese häufig für andere Zellreihen beschrieben wurde. Die Autoren kamen daher zu dem Schluss, dass p53 in diesen Zellen kein Ziel der miR-125b darstellt. In einer anderen Studie wurde die Wirkung der miR-125b anhand der Marker-Expression der Epithelial-mesenchymalen Transition in HCC Zelllinien gemessen. Es wurde beobachtet, dass verschiedene HCC Zelllinien unterschiedlich auf die miR-125b reagierten. Als einen möglichen Grund nannten die Autoren die Unterschiede im miR-125b Expressionsniveau der Zellreihen. In einer anderen Arbeit zum Nasopharyngealem Karzinom konnte lediglich eine Regulation von p53 durch die miR-125a nachgewiesen werden, jedoch nicht durch die miR-125b. Die Regulation von p53 war nur auf Protein-, nicht aber auf mRNA Ebene nachweisbar. (67-69)

Die miR-125b wurde in der Literatur als erster negativer Regulator von IGF2 in Skelettmuskelzellen mit der daraus resultierenden Beeinflussung der Differenzierung und Regeneration beschrieben. (40) Ebenso ist bekannt, dass die Überexpression von IGF2 in Tumoren auch in Zusammenhang mit der Regulierung durch p53 steht. (37, 38) Daher wurde in der vorliegenden Arbeit auch die IGF2 Proteinexpression in primären Rattenhepatozyten betrachtet. Es fand sich keine eindeutige Regulation. Obwohl IGF2 mit der Pathogenese des HCC schon mehrfach in Zusammenhang gebracht wurde, wird auch in bisherigen Arbeiten nur eine Regulation durch die miR-155, miR-615-5p oder miR-483 in Leberzellen beschrieben. Eine Regulierung von IGF2 durch die miR-125b in Rattenhepatozyten konnte bisher nicht bestätigt werden. (70-72)

Obwohl für die miR-26a in der Literatur mehrfach das Zellzyklusprotein CCND2 als Zielgen beschrieben wird, kam es in den untersuchten primären Rattenhepatozyten zu keinem eindeutigem Expressionsunterschied innerhalb der Versuchsgruppen. Bisher sind die Zellzyklusproteine CCND2 und CCNE2 in verschiedenen Tumorzelllinien, humanen und

Mäusehepatozyten als direkte Targets der miR-26a nachgewiesen. Kota et al. beschreiben als erste, dass die miR-26a eingebracht in HepG2 Zellen die Expression von CCND2 und CCNE2 unterdrückt und somit zu einem Arrest des Zellzyklus Progresses führt. Es ist bekannt, dass CCND2 und CCNE2 eine vorhergesagte Einzelstrang-Bindungsstelle für die miR-26a an der 3'UTR in vielen Säugetieren enthalten. Obwohl z.B. die miR-26a nach PH im Rattenmodell deutlich herunterreguliert ist, werden in vielen nachfolgenden Studien humane Tumorzelllinien oder Mäusehepatozyten zum Nachweis der negativen Regulation dieser Targets verwendet oder zitiert. (28, 63, 64, 73-78)

MiRNAs der let-7 Familie sind bekannte Tumor Suppressoren, die in vielen Karzinomen herunterreguliert sind und es wurden bereits zahlreiche Zielgene nachgewiesen. Viele von ihnen beeinflussen den Zellzyklus und steigern die Zellproliferation. Als Beispiele hierfür sind Zellzyklusproteine, wie die Cycline D1, D2, D3, A2 oder myc zu nennen. Es wird von einer großen Anzahl von mRNA Zielen in Mäusen und im Menschen berichtet. (79-81) Es konnte auch gezeigt werden, dass die let-7e in Retinoblastomzellen signifikant reduziert ist. Ebenso führte eine let-7e Supprimierung zur Cisplatinresistenz bei epithelialen Ovarialkarzinomzellen. Des Weiteren wurde beschrieben, dass sie in Gliomgeweben und Gliomastammzellen herunterreguliert ist. Eine Überexpression der let-7e unterdrückte die Proliferation, Migration und Invasion und förderte die Apoptose von Gliomastammzellen, während die Hemmung der let-7e die bösartige Progression der Zellen erleichterte. Auch in dieser Untersuchung wurden nur humane Tumorzelllinien verwendet. (82) Eine Regulation des Zellzyklusregulators CCND2 durch die let-7e konnte in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden. Es wurde in der Literaturrecherche keine vergleichbare Studie unter Verwendung primärer Rattenhepatozyten gefunden.

Die Ergebnisse eines 2016 durchgeführten *Target-Scans* über miRNA.org bestätigten diese erneute Literaturrecherche (Tabelle 2). Bis dahin fanden sich für die von uns untersuchten Targets scheinbar keine Sequenzen innerhalb der Spezies Ratte (*rattus norvegicus*= rno). In der nachfolgenden Tabelle ist das Auftreten der drei ausgewählten miRNAs in den Spezies Ratte und Mensch (*homo sapiens*= hsa) aufgelistet. Demnach scheint TP53 in der Ratte kein Target der miR-125b-5p darzustellen. Es existieren jedoch für alle drei von uns gewählten miRNAs Sequenzen im humanen TP53. Insgesamt wurden 107 miRNA-komplementäre Sequenzen in der humanen TP53 mRNA gefunden. Der Target-Scan der humanen CCND2 mRNA ergab 199 potentielle miRNAs, worunter sich auch einige Mitglieder der let-7 Familie befanden, sowie die miR-26a und miR-125b. Unter den 22

miRNAs als potentiell Target von CCND2 innerhalb der Ratte fand sich keine dieser miRNAs.

TP53-hsa	TP53-hsa	TP53-rno
<i>hsa-let-7 a/b/c/d/e/f/g/h/i</i>	hsa-miR-329	rno-miR-31
hsa-miR-10a/b	hsa-miR-330-5p	rno-miR-34c
hsa-miR-18a/b	hsa-miR-335	rno-miR-34a
hsa-miR-19a	hsa-miR-340	rno-miR-124
hsa-miR-19b	hsa-miR-338-3p	rno-miR-138
hsa-miR-22	hsa-miR-342-3p	rno-miR-141
hsa-miR-24	hsa-miR-363	rno-miR-153
hsa-miR-25	hsa-miR-362-3p	rno-miR-183
<i>hsa-miR-26a/b</i>	hsa-miR-365	rno-miR-184
hsa-miR-27a/b	hsa-miR-367	rno-miR-185
hsa-miR-29a/b/c	hsa-miR-375	rno-miR-190b
hsa-miR-30 a/b/c/d/e	hsa-miR-371-5p	rno-miR-190
hsa-miR-32	hsa-miR-378	rno-miR-200a
hsa-miR-92a/b	hsa-miR-381	rno-miR-203
hsa-miR-98	hsa-miR-382	rno-miR-214
hsa-miR-101	hsa-miR-410	rno-miR-224
hsa-miR-103	hsa-miR-421	rno-miR-338
hsa-miR-107	hsa-miR-422a	rno-miR-340-5p
<i>hsa-miR-125b</i>	hsa-miR-431	rno-miR-378
hsa-miR-128	hsa-miR-454	rno-miR-410
hsa-miR-125a-3p	hsa-miR-455-5p	rno-miR-431
hsa-miR-125a-5p	hsa-miR-485-5p	rno-miR-448
hsa-miR-130a/b	hsa-miR-490-3p	rno-miR-449a
hsa-miR-132	hsa-miR-495	rno-miR-485
hsa-miR-137	hsa-miR-491-5p	rno-miR-487b
hsa-miR-138	hsa-miR-504	rno-miR-539
hsa-miR-141	hsa-miR-539	rno-miR-873
hsa-miR-143	hsa-miR-543	
hsa-miR-144	hsa-miR-653	
hsa-miR-148a/b	hsa-miR-1297	
hsa-miR-150	hsa-miR-217	
hsa-miR-152	hsa-miR-218	
hsa-miR-183	hsa-miR-223	
hsa-miR-185	hsa-miR-219-5p	
hsa-miR-186	hsa-miR-296-3p	
hsa-miR-190	hsa-miR-300	
hsa-miR-190a	hsa-miR-301a/b	
hsa-miR-196a/b	hsa-miR-299-3p	
hsa-miR-197	hsa-miR-326	
hsa-miR-200a	hsa-miR-329	
hsa-miR-202	hsa-miR-330-5p	
hsa-miR-203	hsa-miR-335	
hsa-miR-199a/b-5p	hsa-miR-340	

hsa-miR-212	hsa-miR-338-3p
hsa-miR-214	hsa-miR-342-3p
hsa-miR-217	hsa-miR-363
hsa-miR-218	hsa-miR-362-3p
hsa-miR-223	hsa-miR-365
hsa-miR-219-5p	hsa-miR-367
hsa-miR-296-3p	hsa-miR-375
hsa-miR-300	hsa-miR-371-5p
hsa-miR-301a/b	hsa-miR-378
hsa-miR-299-3p	hsa-miR-381
hsa-miR-326	hsa-miR-382

Tabelle 2: TargetScan über miRNA.org – Alle beobachteten miRNAs mit allen miRSVR scores. (*All conserved miRNAs with all miRSVR scores.*) Die ersten beiden Spalten zeigen alle miRNAs mit komplementären Sequenzen im humanen TP53. Darunter sind unter anderem die miR- 125b, 26a und let-7e enthalten und farblich (rot) hervorgehoben. Die rechte Spalte zeigt die miRNAs mit komplementären Sequenzen in der Ratte. Unter diesen finden sich keine der zuvor erwähnten miRNAs.

Die erneute Targetrecherche unterstützt die These einer vermuteten Vielfalt der Genexpression in unterschiedlichen Spezies. Der Erklärungsansatz, dass eventuell die vermuteten Zielgene in den Versuchsreihen mit primären Rattenhepatozyten keine Ziele der genannten miRNAs darstellen, liegt somit nahe.

Es bleibt kritisch abzuwägen, ob eine Spezies übertragende Anwendung von putativen miRNA Zielen umsetzbar und sinnvoll ist. Prospektiv werden jedoch nur durch das Überprüfen der multiplen vorhergesagten Ziele miRNA Expressionsmuster bestätigt. Diese Untersuchungen sollten daher sogar in unterschiedlichen Organismen und Zellreihen stattfinden um miRNA-Expressionsmuster sowie deren Regulationskreisläufe validieren zu können. Nur so kann die Weiterentwicklung in Hinblick auf die klinische Anwendung vorangetrieben werden.

9.2.2. Mögliche Beeinflussung von Housekeeping-Genen durch miRNAs

Einen weiteren Erklärungsansatz für die Variabilität der Expressionen in unseren Versuchsreihen könnte die Auswahl der potentiellen Housekeeping-Gene geben. Beta Actin und Beta2 Microglobulin werden in aktuellen Studien häufig verwendet und gelten als sichere Kontrollgene bei der RT-PCR. (83) Eine Beeinflussung der endogenen Level der jeweiligen Kontrollgene durch die Transfektionsversuche per se ist jedoch nicht vollständig auszuschließen.

Es ist wohlbekannt, dass Genexpressionslevel mit sorgfältig ausgewählten und durchaus stabilen internen Kontrollgenen normalisiert werden. Allerdings haben bereits mehrfach

Studien belegt, dass die Expression von Housekeeping Genen, welche typischer Weise als interne Kontrolle verwendet werden, unterschiedlich sein kann. B2m ist beispielsweise in Gewebeproben des Kolorektalen Karzinom gering exprimiert. In mit Virus infizierten Leberzellen wird es jedoch hochreguliert. Während GAPDH und HMBS als optimale Referenzen beim Vergleich von HCC und normalem Lebergewebe beschrieben wurden, stellte eine Kombination verschiedener Referenzgene die beste Auswahl zur Normalisierung beim Vergleich verschiedener Lebertumorzelllinien dar. Die Instabilität der verschiedenen Referenzgene scheint somit unter anderem an der Veränderung dynamischer pathophysiologischer Prozesse mit verantwortlich zu sein. (84-86)

Einige häufig verwendete Referenzgene, wie unter anderem auch ACTB und GAPDH, können nachweislich je nach Gewebeart, Geschlecht, Entwicklungsstadium und experimentellen Bedingungen stark variieren. Eine Studie zeigte, dass in einer Gruppe von männlichen Ratten, welche postpartal zwei verschiedenen toxikologischen Substanzen ausgesetzt wurden, das Leber-, Fett- und Hodengewebe eine bedeutsame Instabilität einiger Referenzgene aufweist. In der Leber wurden die größten Zyklusabweichungen der CT-Werte beschrieben. Teilweise wurden Abweichungen von über einem Zyklus bei bekannten Referenzgenen wie GAPDH, HPRT, PGK1, Rps29, Rpl13a und Rps18, im Fall der beiden letzteren sogar mit über 2,6 und 3,1 Zyklen gesehen. Auch eine Beeinflussung von Housekeeping-Genen durch den Östrogenzyklus in der Brustdrüse wurde bereits beschrieben. (87, 88)

Die aktuell mehrfach kontrovers diskutierte Stabilität der Housekeeping-Gene und deren Beeinflussung durch verschiedene Faktoren, wie das Alter oder das experimentelle *Setting* verdeutlicht abermals die Relevanz der sorgfältigen Auswahl geeigneter Referenzgene. Um den Normalisierungsprozess der qRT-PCR zu verbessern und eine Co-Regulation mit dem Zielgen zu vermeiden wird daher von einigen Autoren die Kombination zweier oder mehrerer Housekeeping-Gene empfohlen. (89, 90)

Auf der Grundlage dieser Erkenntnisse wurden die anfänglichen Ergebnisse in Hinblick auf das Housekeeping-Gen GAPDH, welches aufgrund zu starker Zyklusvarianzen auch nach mehrfachen Messungen aus der Auswertung dieser Arbeit anfänglich ausgeschlossen wurde, erneut betrachtet (Tabelle 3). Ausschnitte aus der PCR-Zyklusanalyse nach Transfektion mit der Anti-miR-125b bestärken die Vermutung der Beeinflussung durch Housekeeping-Gene. Die Ct Werte von TP53 und GAPDH sind innerhalb der verschiedenen Gruppen (Native Zellen, Negativkontrolle und der Anti-miR-125b) gegenübergestellt. Insbesondere bei der Negativkontrolle, einer nicht kodierenden miRNA, wurden die

stärksten Zyklusvarianzen beobachtet. Es waren Zyklusvarianzen von bis zu 7 Zyklen zu erkennen, während die TP53 Zyklen um maximal ein bis zwei Zyklen schwankten. Eine eindeutige Regulierung ist daher nicht validierbar.

	Ct Tp53	Ct GAPDH
Native Zellen	24,91877365	22,77582741
	24,48950958	22,55279922
	24,33090401	22,11733437
Negativkontrolle	23,22833633	18,74758339
	23,17942047	18,91402817
	23,28816223	18,97191811
Anti-miR-125b	25,05633163	24,03012085
	24,46922302	24,172472
	24,79527664	25,08249474

Tabelle 3: Repräsentative PCR Zyklen (CT-Werte) von Tp53 und dem Kontrollgen GAPDH – Hervorgehoben (rot) sind die stärksten Zyklusabweichungen. Während die Zyklen von Tp53 maximale Schwankungen von 1-2 Zyklen aufweisen, zeigen sich bei GAPDH Varianzen bis zu beinahe 7 Zyklen insbesondere in der Negativkontrolle.

Es wäre gut denkbar, dass funktionelle miRNA Versuche beispielsweise durch komplexes Eingreifen in zelluläre Signalkaskaden die gewählten Housekeeping-Gene beeinflussen, Diese Housekeeping-Gene würden in vergleichbarem Gewebe unter reliablen Versuchsbedingungen stabile Kontrollen darstellen. Eine Interferenz von Kontrollgenen könnte zu falsch positiven oder falsch negativen Ergebnissen führen. Auch eine Wechselwirkung der Housekeeping-Gene durch Bestandteile von Transfektionsmedien wäre vorstellbar.

In einer Studie von Gosh et al. wurde erstmalig die Heterogenität in ACTB-Gen Transkripten beschrieben. Es wurde gezeigt, dass die miR-34, welche unter anderem dafür bekannt ist p53 abhängige Signalwege zu induzieren, am langen 3'UTR Endes des ACTB bindet und dieses somit regulieren kann. (91) Auch andere Autoren berichten darüber, dass Housekeeping-Gene potentielle Targets von miRNAs darstellen. So ist ACTB ebenfalls als Target der miR-145 und miR-205 sowie GAPDH als Target der miR-138, miR18a/b und Beta-Tubulin als Target der miR-200b/c und miR-429 beschrieben. Diese Beobachtungen wurden von den Autoren mit funktionellen miRNA-Studien belegt. Ebenso wurde davor gewarnt, GAPDH und ACTB in funktionellen Studien der miR-644 einzusetzen und die Auswahl der Referenzgene bei der Normalisierung von putativen miRNA Targets sehr bedacht zu treffen. (92, 93) Auch in der Proteomanalyse einer dieser Arbeit nachfolgenden

Studie unserer Arbeitsgruppe wurde ACTB als putatives Target der an einen Partikel gekoppelten miR-let7g vorhergesagt. (94)

Eine ebenfalls 2016 erneut durchgeführte Datenbank Recherche über miRNA.org inklusive *TargetScan* sollte Aufschluss über miRNA-Sequenzen innerhalb der genannten Housekeeping-Gene geben (Tabelle 4). Es konnte gezeigt werden, dass sich in der ACTB mRNA komplementäre Sequenzen für 8 miRNAs finden. In der B2m mRNA zeigten sich sogar für 21 miRNAs komplementäre Sequenzen. Auch in der GAPDH mRNA wurden komplementäre Sequenzen für 16 miRNAs innerhalb der Spezies Ratte (*rno*) gesehen. Unter den bereits beschriebenen Gen-Sequenzen für ACTB befindet sich auch ein Vertreter der let-7 Familie, die let-7i.

ACTB	B2m	GAPDH
rno-miR-201	rno-miR-764	rno-miR-362
rno-miR-132	rno-miR-465	rno-miR-323
rno-miR-212	rno-miR-871	rno-miR-325-3p
rno-miR-194	rno-miR-322	rno-miR-201
rno-miR-802	rno-miR-448	rno-miR-206
rno-miR-291a-5p	rno-miR-494	rno-miR-30b-3p
rno-let-7i	rno-miR-153	rno-miR-219-2-3p
rno-miR-186	rno-miR-376b-5p	rno-miR-292-5p
	rno-miR-190	rno-miR-363
	rno-miR-190b	rno-miR-501
	rno-miR-219-2-3p	rno-miR-615
	rno-miR-218	rno-miR-193
	rno-miR-294	rno-miR-143
	rno-miR-300-5p	rno-miR-204
	rno-miR-291a-5p	rno-miR-758
	rno-miR-127	rno-miR-219-1-3p
	rno-miR-22	
	rno-miR-141	
	rno-miR-200a	
	rno-miR-136	

Tabelle 4: *TargetScan* innerhalb der Spezies *rattus norvegicus* (*rno*) der Housekeeping-Gene ACTB, B2m und GAPDH – *TargetScan* von allen Target Seiten aller *miRSVR* scores. Rot hervorgehoben ein Mitglied der let-7 Familie, die let-7i. Es finden sich keine passenden Sequenzen der miR-26a, miR-125b-5p oder let-7e.

Auch wenn zum Zeitpunkt der Recherche keine der drei gewählten miRNAs bekannt dafür war ACTB, B2m oder GAPDH direkt zu regulieren, so ist es insbesondere anhand der aktuellen Studienlage dennoch denkbar. Es könnten beispielsweise nicht bekannte Transkriptome, Target-Seiten oder *Pathway*-Regulationsmechanismen zu der beobachteten

variablen Expression der jeweiligen Housekeeping-Gene in den Versuchsreihen geführt haben. Eventuell war aus diesem Grund keine direkte Expressionsänderung des Zellzyklusregulators p53 und von CCND2 durch die von uns ausgewählten miR-125b, miR-26a und let-7e auf mRNA- und Proteinebene nachweisbar.

9.2.3. Degradationsprozesse

In den vergangenen Jahrzehnten wurde mehrfach belegt, dass p53 ein Kernprotein ist, welches eine äußerst kurze Halbwertszeit von ca. 20-30 Minuten besitzt, während der Export ins Zytoplasma Stunden erfordert. Die Dauer der Halbwertszeit wird unter anderem durch Proteine wie beispielsweise Mdm2, aber auch durch exogene Prozesse wie Stress, UV- Bestrahlung, Mutation oder auch Phosphorylierung, die auf die Zelle und die Aktivität von p53 wirken, beeinflusst und variiert bei den verschiedenen p53-Typen. (95-98)

Die Proteinstabilität spielt eine wichtige Rolle bei der Regulierung von p53 und u.a. trägt die niedrige Schmelztemperatur von 45° zu dieser Instabilität bei. Dass die Halbwertszeit von Proteinen beim Prozess der Probengewinnung oder durch Veränderungen des Zellmetabolismus beeinträchtigt werden kann ist also bekannt. (99, 100) Aufgrund der beschriebenen kurzen Halbwertszeiten für Zellzyklusproteine und einer Einflussnahme auf den Zellmetabolismus durch exogene Prozesse wäre es also denkbar, dass in den eigenen Versuchen sowohl die Probenentnahme als auch die Transfektion, obwohl diese schnell und streng nach Protokoll erfolgten, während der Versuche zu einem verstärktem Zellstress und einem hieraus resultierenden verstärkten Zellmetabolismus führten. Somit könnten die Zellzyklusproteine p53 und auch CCND2 trotz erfolgreicher Depletion bzw. Supplementierung durch die miRNAs vermehrt oder schneller abgebaut worden sein. Aufgrund dieser Instabilität wäre ein Nachweis folglich nicht mehr gegeben.

Auch die Verzerrung von Ergebnissen der miRNA Expression durch deren oder eine RNA Degradation wird in neueren Studien beschrieben und könnte zur fehlerhaften Auswahl sowie vorzeitigem Abbau der miRNAs geführt haben. Im Gegensatz zu mRNAs gelten miRNAs als sehr stabil. Trotzdem unterscheidet sich ihre Halbwertszeit von teilweise nur bis zu 24 Stunden und der Abbauprozess entzieht sich bisher unseren Kenntnissen. Interessanterweise wurde erst kürzlich zur Datenbank miRbase die RNA-Integrität hinzugefügt. In der Leber sind bereits miRNAs gefunden worden, deren Expression signifikant mit der RNA-Integrität, der Lagerzeit bei Raumtemperatur bzw. bei 4°C korreliert. Somit könnten in unterschiedlichen Studien identifizierte miRNAs auch Artefakte aufgrund von Abbauprodukten von RNAs sein. Es existiert zudem auch eine Debatte um die Stabilität von miRNAs in Lösungen wie Serum oder Plasma oder in Gewebeproben, sowie deren

Verwertbarkeit für miRNA-Expressionsprofile. Es ist nicht klar welches Level an RNA-Abbau noch für die Verwendung von miRNA-Expressionsprofilen akzeptabel ist und ist zudem abhängig von den jeweiligen Analysemethoden. Da die RNA-Qualität miRNA Expressionsprofile scheinbar beeinflusst, sollte insbesondere bei Microarrays die RNA-Integrität und die Zeit bis zum Einfrieren der Proben sorgfältig berücksichtigt werden. Für die Identifizierung zukünftiger Biomarker und therapeutischer Ziele sollte die Authentizität von miRNAs mit gesteigerter Expression in degradierten Gewebeproben auch kritisch in Frage gestellt werden. (26)

9.2.4. Mögliche Fehlerquellen im Studiendesign

In der vorliegenden Arbeit wurde die Transfektion mittels miRNA Inhibitoren und Mimics erfolgreich in Rattenhepatozyten durchgeführt. Es sollten die in anderen Zelllinien bereits bekannten Targets der gewählten miRNAs in Rattenhepatozyten bestätigt und deren Einfluss auf die Regeneration der Leber nachgewiesen werden. Aufgrund unvorhersehbarer variabler Expressionsmuster ließ sich weder auf mRNA noch auf Proteinebene ein eindeutiger Effekt nachweisen. Die Arbeitshypothese konnte somit nicht bestätigt werden. Einige mögliche Erklärungsansätze für die Resultate der Versuchsreihen wurden im Vorfeld bereits ausführlich diskutiert.

Im Folgenden werden retrospektiv die Methode und die Durchführung der Versuchsreihen insbesondere bezüglich vermeidbarer Fehlerquellen kritisch geprüft und somit Stärken und Schwächen des Studiendesigns diskutiert. Anhand von ausführlichen Vorversuchen wurden verschiedene Protokolle etabliert und ausschließlich Nachweisverfahren angewandt, welche in der Literatur bereits standardisiert eingesetzt und gut beschrieben waren. Sämtliche der angewandten Methoden orientierten sich an den zu Beginn der Versuche aktuellsten wissenschaftlichen Erkenntnissen. Die präzise Durchführung nach Protokoll war gewährleistet. Die Wahl von primären Rattenhepatozyten für die Versuche basierte auf Vorarbeiten und Ergebnissen vergangener Studien innerhalb der eigenen Arbeitsgruppe war sehr naheliegend. Auch die Auswahl der miRNAs entsprechend ihrem detektierten Expressionsprofil in der Rattenleber nach erfolgter Leberteileresektion schien optimal. Nach Bestätigung der prädiktiven Ziele sollten Proliferationstests sowie *in vivo* Modelle zum Nachweis des regenerativen Effektes angeschlossen werden. Im nächsten Schritt sollte auch eine Anwendung auf humane adulte Hepatozyten erfolgen.

Zu diskutieren bleiben die Auswahl der prädiktiven Ziele und die Verwendung gewählter spezifischer Antikörper. Die Auswahl der Zielgene orientierte sich an Literaturangaben ähnlicher Studiendesigns welche teilweise in anderen Spezies durchgeführt worden waren.

Grunde hierfür war eine oft beschriebenen Spezies-übergreifenden Regulierung verschiedener miRNAs und derer Expressionsprofile. Diese in anderen wissenschaftlichen Modellen mehrfach publizierte indirekten und direkten Ziele sollten trotz bisher fehlender Evidenz im Rattenmodell bestätigt werden. Auch wenn eine Übertragbarkeit der Ergebnisse auf andere Modelle wünschenswert und sinnvoll erschien, könnte, wie bereits zuvor geschildert, genau diese speziesabhängige Varianz den fehlenden Nachweis der gewählten Zielgene erklären.

Eine weitere mögliche Fehlerquelle könnte in der Auswahl der spezifischen Antikörper für den Proteinnachweis liegen, da die Expression verschiedener Proteintypen und Untergruppen Zelllinien-assoziiert sein kann. Es ist bekannt, dass für viele Zellproteine unterschiedliche Subtypen existieren, die beispielsweise phosphoryliert, nicht phosphoryliert, methyliert oder auch als Wildtyp vorliegen. Synthetisch hergestellte Antikörper müssen jeweils passend dazu gewählt werden. In vielen Studien, die für die Auswahl der hier eingesetzten Antikörper herangezogen wurden, sind Zelllinien verwendet worden die beispielsweise dafür bekannt sind TP53 oder dessen Wildtyp zu exprimieren. In diesen Studien wurden allerdings keine primären Rattenhepatozyten verwendet. (101) Eine speziesübergreifende Anwendung war auch hier denkbar. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen jedoch vermuten, dass in den von uns gewählten Rattenhepatozyten wenig bis kein TP53 oder ein anderer Subtyp vorhanden war, so dass die verwendeten Antikörper wirkungslos waren. In Folge dessen konnte weder der *knockdown* noch die Überexpression zu einer Expressionsänderung führen.

9.2.5. Schlussfolgerung

Die Ergebnisse der Versuche, mögliche Ursachen und kritisch diskutierte Fehlerquellen machen deutlich, wie wenig noch über die Regulationskreisläufe von miRNAs bekannt ist. Es unterstreicht die Komplexität ihrer zellulären Aufgaben und deren Auswirkungen innerhalb verschiedener Zellreihen. Zudem weisen die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, wie eingeschränkt die Übertragbarkeit von Studienergebnissen auf andere Modelle und Versuchsreihen sein kann. Die Einsetzbarkeit von miRNA Expressionsmustern und Regulationskreisläufen sollte mit Bedacht gewählt und erst nach mehrfacher Bestätigung übertragen werden.

Da die eigenen Versuche in den Jahren 2011-2013 durchgeführt wurden und auf dem damaligen Kenntnisstand basierten konkretisieren die diskutierten Sachverhalte die fortschreitende Innovation in der Forschung und die Vielschichtigkeit miRNA basierter Studien.

Trotz des steigenden wissenschaftlichen Interesses und der mittlerweile großen Datenlage bezüglich miRNAs in den letzten Jahrzehnten, bestehen noch zahlreiche Hürden bis zur Anwendbarkeit. Auch wenn einige miRNAs, wie z.B. miR-125b-5p in der Frühdiagnose von HBV, als möglicher nicht invasiver diagnostischer Biomarker identifiziert wurde (44) und bereits miRNA Therapeutika wie Miravirsen in klinischen Studien getestet wurden (53), bleiben noch viele Fragen offen. Die ausschließliche Nutzung von miRNA-Expressionsprofilen zur Diagnostik ohne Nachweis der Mechanismen (z.B. in Knockdown- oder Supplementierungsversuchen), beinhaltet viele Fehlerquellen. Aus diesem Grund wird weiterhin versucht, die Verwendung von miRNAs auch als effiziente Biomarker oder Zelltherapeutika weiterhin zu optimieren und u.a. spezifische Algorithmen für eine sichere Anwendung dieser miRNA-Ergebnisse zu entwickeln. (102)

Die eigenen Erfahrungen zeigen, dass unerwartete Ergebnisse von Untersuchungen sowie die daraus resultierenden Fragen wissenschaftlich kritisch diskutiert werden sollten. Insbesondere um die Forschung in Hinblick auf funktionelle und klinische Studien weiter voranzutreiben und um Fehleinschätzungen- bzw. -Interpretationen in zukünftigen Studien zu vermeiden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass miRNAs ein attraktives Werkzeug zur Stimulierung der Hepatozytenproliferation und Lebergeweberegeneration darstellen, auch wenn in der vorliegenden Arbeit mit den gewählten miRNAs keine eindeutige Regulierung nachzuweisen war. Die Leberregeneration bleibt ein komplexer Prozess bei dem die Koordination von miRNAs, Wachstumsfaktoren, Zytokinen und verschiedenen Proteinen eine wesentliche Rolle spielt. Dies wird von neueren in der Zwischenzeit publizierten Arbeiten belegt. So zeigen z.B. Daten von Gupta et. al., dass *Augmenter of liver regeneration (ALR)*, ein wichtiger Regulator der Leberregeneration, die Expression von miR-26a induziert und in der Folge die Proliferation von Hepatozyten gesteigert wird. (103, 104) Neuste Studien beschreiben sogar ein Netzwerk von lncRNA-miRNA-mRNA während der proliferativen Phase der Leberregeneration. Andere Arbeitsgruppen zeigten die nicht-invasive kontrollierte Verabreichung und verstärkte Anreicherung von miRNA-beladenen Nanopartikel im Zielorgan mit dem Zweck den Effekt therapeutischer miRNAs am Zielort zu verstärken. (105, 106)

MiRNA-basierte Therapeutika könnten die Proliferation primärer autologer oder allogener Hepatozyten unterstützen, die Differenzierung von Vorläufer- oder Stammzellen zu reifen Hepatozyten beeinflussen, immunmodulatorisch und regenerativ wirksam sein und somit das Zellverhalten einzigartig modifizieren. Allerdings bleiben die ersten erfolgreichen

therapeutischen Anwendungen von miRNAs bisher nur auf Zellkulturversuche und Tiermodelle begrenzt. Vor Translation in die klinische Praxis müssen noch viele offene Fragen beantwortet werden. Selbst wenn ausreichend viele Hepatozytenressourcen bereitgestellt werden könnten und ein erfolgreiches Anwachsen der transplantierten Zellen dauerhaft gewährleistet wäre, so müssten immer noch die Langzeitüberlebensrate, die Proliferation und die Stressresistenz der Zellen deutlich verbessert werden. Außerdem fehlen noch detaillierte miRNA-basierte- sowie Tissue Engineering- Konzepte für die Differenzierung des cholangiozellulären Systems, um weiteren grundlegenden Ansprüchen an das Leberparenchym gerecht zu werden. Aufgrund noch fehlender Erkenntnisse ist eine vorsichtige schrittweise Umsetzung und ein sensibler Umgang mit dieser äußerst spannenden innovativen Technologie empfehlenswert. (107)

Trotz zahlreicher offener Fragen, nicht vollständig ausgereifter Konzepte und vieler Kritiken bietet vielleicht gerade die Zelltherapie in Kombination mit miRNA-Therapeutika langfristig eine innovative adäquate Alternative zur Lebertransplantation. Solche, auf einem gesteigerten Proliferationsstimulus basierende, miRNA-modifizierten Hepatozyten könnten in Kombination mit dem Tissue Engineering Konzepten als Therapeutika in der Klinik Anwendung finden.

9.3. Ausblick

Die Stimulierung der Leberregeneration ist aufgrund immer häufig auftretender Lebererkrankungen in der Bevölkerung auch weiterhin von großer wissenschaftlicher Bedeutung. Die Hepatozytentransplantation (HT) wird weltweit als vielversprechende Alternative zur Lebertransplantation bei einer Vielzahl von Indikationen wie dem akutem Leberversagen oder metabolischen Leberstörungen gesehen. In den letzten 30 Jahren wurde die HT in zahlreichen Studien intensiv untersucht und weiterentwickelt. (108, 109)

Auch in der eigenen Arbeitsgruppe existieren inzwischen Nachfolgestudien zur Modifizierung der Leberzelltransplantation. Hierzu wurde mit fluoreszierenden miRNAs, die zuvor an speziell entwickelte Partikel gekoppelt wurden, gearbeitet. Im Vorfeld wurden die verwendeten Partikel in Huh-7 Zellen umfangreich getestet und es konnte eine Akkumulation der Partikel in Zellkernnähe nachgewiesen werden. Das Studiendesign orientierte sich in einigen Abschnitten an den in dieser Dissertation beschriebenen Versuchen. Zielsetzung war auch hier durch eine therapeutische Manipulation mittels miRNA-*Targeting* einen Stimulus für die Hepatozytenproliferation zu setzen. Zusätzlich sollte mit Hilfe der verwendeten Partikel eine erhöhte Stabilität und die Detektierbarkeit der

miRNAs erreicht werden. Diese neue Methode ermöglicht *in vitro* und *in vivo* eine nicht-invasive Nachverfolgung der Zellen im MRT. Ohne Verwendung von Transfektionsreagenzien konnte eine Transfektion allein durch die Kurzzeitinkubation erreicht werden und eine Manipulation auf zellulärer Ebene durch miRNA-Targeting möglich machen. Es wurden humane und Rattenhepatozyten verwendet. Interessanterweise konnte hier gezeigt werden, dass die an Partikel gekoppelte Let-7g in humanen Hepatozyten die Targets CCND1 und c-Myc und somit die Proliferation signifikant beeinflusst. Auch eine nachfolgende Proteomanalyse bestätigte weitere Zellzyklus-Zielgene der Let-7g. *In vivo* Versuche mit transplantierten Rattenhepatozyten welche mit einem speziellen Mikropartikel, dem *silica based micron-sized iron oxide-containing particles* (sMPIO)-alpha-Let-7e, markiert waren, konnten problemlos mittels Magnetresonantomographie (MRT) in den Zielorganen (Lebern) detektiert werden. Allerdings zeigten sich hier keine signifikanten Proliferationsunterschiede im Vergleich zu Lebern nach Transplantation von nativen Zellen. Ähnlich der Ergebnisse der vorliegenden Studie unterstützt dieses Ergebnis die Vermutung, dass die Let-7e keinen Stimulus der Leberzellproliferation bewirkt obwohl u.a. die Let-7g einen guten Nachweis erbrachte. Folglich beeinflussen auch hier die verschiedenen Familienmitglieder der let-7 Familie nicht gleichermaßen die Wirkung auf die Zellzyklusgene. Weitere *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen zur Leberzellproliferation nach miRNA-Targeting scheinen daher unerlässlich. (94, 110)

10. Literaturverzeichnis

1. Löffler GP, P.E.; Heinrich, P.C. Biochemie und Pathobiochemie. 2007, 8. Auflage.
2. Si-Tayeb K, Lemaigre FP, Duncan SA. Organogenesis and development of the liver. *Dev Cell*. 2010;18(2):175-89.
3. Preziosi ME, Monga SP. Update on the Mechanisms of Liver Regeneration. *Seminars in liver disease*. 2017;37(2):141-51.
4. Song G, Sharma AD, Roll GR, Ng R, Lee AY, Blelloch RH, et al. MicroRNAs control hepatocyte proliferation during liver regeneration. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2010;51(5):1735-43.
5. Zafarnia S, Mrugalla A, Rix A, Doleschel D, Gremse F, Wolf SD, Buyel JF, Albrecht U, Bode JG, Kiessling F, Lederle W. Non-invasive Imaging and Modeling of Liver Regeneration After Partial Hepatectomy. *Frontiers in physiology*. 2019;10:904.
6. Cienfuegos JA, Rotellar F, Baixauli J, Martinez-Regueira F, Pardo F, Hernandez-Lizoain JL. Liver regeneration--the best kept secret. A model of tissue injury response. *Rev Esp Enferm Dig*. 2014;106(3):171-94.
7. Raschzok N, Werner W, Sallmon H, Billecke N, Dame C, Neuhaus P, Sauer IM. Temporal expression profiles indicate a primary function for microRNA during the peak of DNA replication after rat partial hepatectomy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2011;300(6):R1363-72.
8. Liu M, Chen P. Proliferationinhibiting pathways in liver regeneration (Review). *Mol Med Rep*. 2017.
9. Yang N, Ekanem NR, Sakyi CA, Ray SD. Hepatocellular carcinoma and microRNA: new perspectives on therapeutics and diagnostics. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015;81:62-74.
10. Gerth HU, Pohlen M, Thölking G, Pavenstädt H, Brand M, Wilms C, Hüsing-Kabar A, Görlich D, Kabar I, Schmidt HHJ. Molecular adsorbent recirculating system (MARS) in acute liver injury and graft dysfunction: Results from a case-control study. *PLoS One*. 2017;12(4):e0175529.
11. BUNDES GD, DESTATIS GGVRU. Gesundheit in Deutschland. Robert Koch Institut; 2015.
12. Bundes Gd, der EgVdRK-lu, e. GdeKiD, V. Krebs in Deutschland 2007/2008. 2012.
13. Sukowati CH, El-Khobar KE, Ie SI, Anfuso B, Muljono DH, Tiribelli C. Significance of hepatitis virus infection in the oncogenic initiation of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2016;22(4):1497-512.
14. Moosburner S, Ritschl PV, Wiering L, Gassner J, Öllinger R, Pratschke J, Sauer IM, Raschzok N. [High donor age for liver transplantation : Tackling organ scarcity in Germany]. *Der Chirurg; Zeitschrift für alle Gebiete der operativen Medizin*. 2019;90(9):744-51.
15. Collin de l'Hortet A, Takeishi K, Guzman-Lepe J, Handa K, Matsubara K, Fukumitsu K, et al. Liver Regenerative-Transplantation: Regrow and Reboot. *Am J Transplant*. 2015.
16. DSO. Leber Warteliste und Vermittlung 2015 [Available from: <https://www.dso.de/organspende-und-transplantation/warteliste-und-vermittlung/leber.html>].
17. Möbus S, Yang D, Yuan Q, Lüdtko TH, Balakrishnan A, Sgodda M, Rani B, Kispert A, Arauzo-Bravo MJ, Vogel A, Manns MP, Ott M, Cantz T, Sharma AD. MicroRNA-199a-5p inhibition enhances the liver repopulation ability of human embryonic stem cell-derived hepatic cells. *J Hepatol*. 2015;62(1):101-10.
18. Major RD, Kluge M, Jara M, Nosser M, Horner R, Gassner J, Struecker B, Tang P, Lippert S, Reutzel-Selke A, Geisel D, Denecke T, Stockmann M, Pratschke J, Sauer IM, Raschzok N. The Predictive Value of the Maximal Liver Function Capacity Test for the

- Isolation of Primary Human Hepatocytes. *Tissue engineering Part C, Methods*. 2018;24(3):179-86.
19. Broeders JJ, Parmentier C, Truisi GL, Josse R, Alexandre E, Savary CC, Hewitt PG, Mueller SO, Guillouzo A, Richert L, van Eijkeren JCH, Hermens JLM, Blaauboer BJ. Biokinetics of chlorpromazine in primary rat and human hepatocytes and human HepaRG cells after repeated exposure. *Toxicol In Vitro*. 2014.
 20. Ramboer E, De Craene B, De Kock J, Vanhaecke T, Berx G, Rogiers V, Mathieu V. Strategies for immortalization of primary hepatocytes. *J Hepatol*. 2014;61(4):925-43.
 21. Soltys KA, Soto-Gutierrez A, Nagaya M, Baskin KM, Deutsch M, Ito R, Shneider BJ, Squires R, Vockley J, Guha C, Roy-Chowdhury J, Strom SC, Platt JL, Fox IJ. Barriers to the successful treatment of liver disease by hepatocyte transplantation. *J Hepatol*. 2010;53(4):769-74.
 22. Na GH, Kim DG, Kim YH, Han JH, Jung ES. Effects of glucose concentration in the medium on rat hepatocyte culture. *Ann Surg Treat Res*. 2014;87(2):53-60.
 23. Carraco G, Goncalves AN, Serra C, Andrade RP. MicroRNA processing machinery in the developing chick embryo. *Gene Expr Patterns*. 2014;16(2):114-21.
 24. Zhang Y, Takahashi S, Tasaka A, Yoshima T, Ochi H, Chayama K. Involvement of microRNA-224 in cell proliferation, migration, invasion, and anti-apoptosis in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*. 2013;28(3):565-75.
 25. Otsuka K, Ochiya T. Genetic networks lead and follow tumor development: microRNA regulation of cell cycle and apoptosis in the p53 pathways. *Biomed Res Int*. 2014;2014:749724.
 26. Ludwig N, Becker M, Schumann T, Speer T, Fehlmann T, Keller A, Meese Eckart. Bias in recent miRBase annotations potentially associated with RNA quality issues. *Scientific reports*. 2017;7(1):5162.
 27. Yan-nan B, Zhao-yan Y, Li-xi L, jiang Y, Qing-jie X, Yong Z. MicroRNA-21 accelerates hepatocyte proliferation in vitro via PI3K/Akt signaling by targeting PTEN. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;443(3):802-7.
 28. Chen Y, Verfaillie CM. MicroRNAs: the fine modulators of liver development and function. *Liver Int*. 2014.
 29. Finch ML, Marquardt JU, Yeoh GC, Callus BA. Regulation of microRNAs and their role in liver development, regeneration and disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2014;54:288-303.
 30. Hu W, Nevzorova YA, Haas U, Moro N, Sicinski P, Geng Y, Barbacid M, Trautwein C, Liedtke C. Concurrent deletion of cyclin e1 and cyclin-dependent kinase 2 in hepatocytes inhibits DNA replication and liver regeneration in mice. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2013.
 31. Yang X, Liang L, Zhang XF, Jia HL, Qin Y, Zhu XC, Gao XM, Qiao P, Zheng Y, Sheng YY, Wei JW, Zhou HJ, Ren N, Ye QH, Dong QZ, Qin LX. MicroRNA-26a suppresses tumor growth and metastasis of human hepatocellular carcinoma by targeting interleukin-6-Stat3 pathway. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2013;58(1):158-70.
 32. Davoodian N, Lotfi AS, Soleimani M, Mola SJ, Arjmand S. Let-7f microRNA negatively regulates hepatic differentiation of human adipose tissue-derived stem cells. *J Physiol Biochem*. 2014;70(3):781-9.
 33. Peng G, Yuan Y, He Q, Wu W, Luo BY. MicroRNA let-7e regulates the expression of caspase-3 during apoptosis of PC12 cells following anoxia/reoxygenation injury. *Brain Res Bull*. 2011;86(3-4):272-6.
 34. Shu J, Kren BT, Xia Z, Wong PY, Li L, Hanse EA, Min MX, Li B, Albrecht JH, Zeng Y, Subramanian S, Steer CJ. Genomewide microRNA down-regulation as a negative feedback mechanism in the early phases of liver regeneration. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2011;54(2):609-19.

35. Inoue Y, Tomiya T, Yanase M, Arai M, Ikeda H, Tejima K, Ogata I, Kimura S, Omata M, Fujiwara K. p53 May positively regulate hepatocyte proliferation in rats. *Hepatology* (Baltimore, Md). 2002;36(2):336-44.
36. Speidel D. The role of DNA damage responses in p53 biology. *Arch Toxicol*. 2015.
37. Stegmaier P, Voss N, Meier T, Kel A, Wingender E, Borlak J. Advanced computational biology methods identify molecular switches for malignancy in an EGF mouse model of liver cancer. *PLoS One*. 2011;6(3):e17738.
38. Hoshida Y. Molecular signatures and prognosis of hepatocellular carcinoma. *Minerva Gastroenterol Dietol*. 2011;57(3):311-22.
39. Clermont F, Nittner D, Marine JC. IGF2: the Achilles' heel of p53-deficiency? *EMBO molecular medicine*. 2012;4(8):688-90.
40. Ge Y, Sun Y, Chen J. IGF-II is regulated by microRNA-125b in skeletal myogenesis. *J Cell Biol*. 2011;192(1):69-81.
41. Tybl E, Shi FD, Kessler SM, Tierling S, Walter J, Bohle RM, Wieland S, Zhang J, Tan EM, Kiemer AK. Overexpression of the IGF2-mRNA binding protein p62 in transgenic mice induces a steatotic phenotype. *J Hepatol*. 2011;54(5):994-1001.
42. Breuhahn K. [Molecular mechanisms of progression in human hepatocarcinogenesis]. *Pathologe*. 2010;31 Suppl 2:170-6.
43. Rokavec M, Li H, Jiang L, Hermeking H. The p53/microRNA connection in gastrointestinal cancer. *Clin Exp Gastroenterol*. 2014;7:395-413.
44. Giray BG, Emekdas G, Tezcan S, Ulger M, Serin MS, Sezgin O, Altintas E, Tiftik EN. Profiles of serum microRNAs; miR-125b-5p and miR223-3p serve as novel biomarkers for HBV-positive hepatocellular carcinoma. *Mol Biol Rep*. 2014;41(7):4513-9.
45. Le MT, Teh C, Shyh-Chang N, Xie H, Zhou B, Korzh V, Lodish HF, Lim B. MicroRNA-125b is a novel negative regulator of p53. *Genes Dev*. 2009;23(7):862-76.
46. Xiao J, Bei Y, Liu J, Dimitrova-Shumkovska J, Kuang D, Zhou Q, Li J, Yang Y, Xiang Y, Wang F, Yang C, Yang W. miR-212 downregulation contributes to the protective effect of exercise against non-alcoholic fatty liver via targeting FGF-21. *J Cell Mol Med*. 2016;20(2):204-16.
47. Chen X, Song M, Chen W, Dimitrova-Shumkovska J, Zhao Y, Cao Y, Song Y, Yang W, Wang F, Xiang Y, Yang C. MicroRNA-21 Contributes to Liver Regeneration by Targeting PTEN. *Med Sci Monit*. 2016;22:83-91.
48. Lu C, Zhang J, Nie Z, Chen J, Zhang W, Ren X, Yu W, Liu L, Jiang C, Zhang Y, Guo J, Wu W, Shu J, Lv Z. Study of microRNAs related to the liver regeneration of the whitespotted bamboo shark, *Chiloscyllium plagiosum*. *Biomed Res Int*. 2013;2013:795676.
49. Chien Y, Chang YL, Li HY, Larsson M, Wu WW, Chien CS, Wang CY, Chu PY, Chen KH, Lo WL, Chiou SH, Lan YT, Huo TL, Lee SD, Huang PI. Synergistic effects of carboxymethyl-hexanoyl chitosan, cationic polyurethane-short branch PEI in miR122 gene delivery: Accelerated differentiation of iPSCs into mature hepatocyte-like cells and improved stem cell therapy in a hepatic failure model. *Acta Biomater*. 2015;13:228-44.
50. Campbell K, Booth SA. MicroRNA in neurodegenerative drug discovery: the way forward? *Expert Opin Drug Discov*. 2015;10(1):9-16.
51. Montgomery RL, Yu G, Latimer PA, Stack C, Robinson K, Dalby CM, Kaminski N, van Rooij E. MicroRNA mimicry blocks pulmonary fibrosis. *EMBO molecular medicine*. 2014;6(10):1347-56.
52. Natoli R, Fernando N. MicroRNA as Therapeutics for Age-Related Macular Degeneration. *Advances in experimental medicine and biology*. 2018;1074:37-43.
53. Kwekkeboom RF, Lei Z, Doevendans PA, Musters RJ, Sluijter JP. Targeted delivery of miRNA therapeutics for cardiovascular diseases: opportunities and challenges. *Clin Sci (Lond)*. 2014;127(6):351-65.

54. Kouri FM, Ritner C, Stegh AH. miRNA-182 and the regulation of the glioblastoma phenotype - toward miRNA-based precision therapeutics. *Cell Cycle*. 2015;14(24):3794-800.
55. Li X, Yang W, Lou L, Chen Y, Wu S, Ding G. microRNA: A Promising Diagnostic Biomarker and Therapeutic Target for Hepatocellular Carcinoma. *Digestive Diseases and Sciences*. 2014;59(6):1099-107.
56. Hydring P, Badalian-Very G. Clinical applications of microRNAs. *F1000Res*. 2013;2:136.
57. van Rooij E, Kauppinen S. Development of microRNA therapeutics is coming of age. *EMBO molecular medicine*. 2014;6(7):851-64.
58. Mollaei H, Safaralizadeh R, Rostami Z. MicroRNA replacement therapy in cancer. *Journal of cellular physiology*. 2019.
59. Salehi S, Brereton HC, Arno MJ, Darling D, Quaglia A, O'Grady J, Heaton N, Aluvihare VR, . Human liver regeneration is characterized by the coordinated expression of distinct microRNA governing cell cycle fate. *Am J Transplant*. 2013;13(5):1282-95.
60. Epicentre® Madison W, USA; Vertrieb Deutschland: Biozym Scientific GmbH Germany. MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit.
61. Pierce™ TTS. BCA Protein Assay Kit [Available from: https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/protein-biology/protein-assays-analysis/protein-assays/colorimetric-protein-assays/bca-protein-assays.html?gclid=CKGZxZiF98oCFeUV0wodFIgPEA&s_kwcid=AL!3652!3!68921977574!b!!g!!%2Bbca%20%2Bassays&ef_id=LMJNtw8iTjoAAE0a:20160214102551:s].
62. Alison MR, Islam S, Lim S. Stem cells in liver regeneration, fibrosis and cancer: the good, the bad and the ugly. *J Pathol*. 2009;217(2):282-98.
63. Kota J, Chivukula RR, O'Donnell KA, Wentzel EA, Montgomery CL, Hwang HW, Chang TC, Vivekanandan P, Torbenson M, Clark KR, Mendell JR, Mendell JT. Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model. *Cell*. 2009;137(6):1005-17.
64. Chen L, Zheng J, Zhang Y, Yang L, Wang J, Ni J, Cui D, Yu C, Cai Z. Tumor-specific expression of microRNA-26a suppresses human hepatocellular carcinoma growth via cyclin-dependent and -independent pathways. *Mol Ther*. 2011;19(8):1521-8.
65. Peng G, Yuan Y, Wu S, He F, Hu Y, Luo B. MicroRNA let-7e Is a Potential Circulating Biomarker of Acute Stage Ischemic Stroke. *Transl Stroke Res*. 2015.
66. Le MT, Shyh-Chang N, Khaw SL, Chin L, Teh C, Tay J, O'Day E, Korzh V, Yang H, Lal A, Lieberman J, Lodish HF, Lim B. Conserved regulation of p53 network dosage by microRNA-125b occurs through evolving miRNA-target gene pairs. *PLoS Genet*. 2011;7(9):e1002242.
67. Gefen N, Binder V, Zaliova M, Linka Y, Morrow M, Novosel A, Edry L, Hertzberg L, Shomron N, Williams O, Trka J, Borkhardt A, Izraeli S. Hsa-mir-125b-2 is highly expressed in childhood ETV6/RUNX1 (TEL/AML1) leukemias and confers survival advantage to growth inhibitory signals independent of p53. *Leukemia*. 2010;24(1):89-96.
68. Zhou JN, Zeng Q, Wang HY, Zhang B, Li ST, Nan X, Cao N, Fu CJ, Yan XL, Jia YL, Wang JX, Zhao AH, Li ZW, Li YH, Kie XY, Zhang XM, Dong Y, Xu YC, He LJ, Yue W, Pei XT. MicroRNA-125b attenuates epithelial-mesenchymal transitions and targets stem-like liver cancer cells through small mothers against decapentaplegic 2 and 4. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2015;62(3):801-15.
69. Chen J, Ouyang H, An X, Liu S. miR-125a is upregulated in cancer stem-like cells derived from TW01 and is responsible for maintaining stemness by inhibiting p53. *Oncology letters*. 2019;17(1):87-94.
70. Ma N, Li F, Li D, Hui Y, Wang X, Qiao Y, Zhang Y, Xiang Y, Zhou J, Zhou L, Zheng X, Gao X. Igf2-derived intronic miR-483 promotes mouse hepatocellular carcinoma cell proliferation. *Mol Cell Biochem*. 2012;361(1-2):337-43.

71. El Tayebi HM, Hosny KA, Esmat G, Breuhahn K, Abdelaziz AI. miR-615-5p is restrictedly expressed in cirrhotic and cancerous liver tissues and its overexpression alleviates the tumorigenic effects in hepatocellular carcinoma. *FEBS Lett.* 2012;586(19):3309-16.
72. El Tayebi HM, Waly AA, Assal RA, Hosny KA, Esmat G, Abdelaziz AI. Transcriptional activation of the IGF-II/IGF-1R axis and inhibition of IGFBP-3 by miR-155 in hepatocellular carcinoma. *Oncology letters.* 2015;10(5):3206-12.
73. Chen X, Murad M, Cui YY, Yao LJ, Venugopal SK, Dawson K, Wu J. miRNA regulation of liver growth after 50% partial hepatectomy and small size grafts in rats. *Transplantation.* 2011;91(3):293-9.
74. Zhou J, Ju W, Wang D, Wu L, Zhu X, Guo Z, He X. Down-regulation of microRNA-26a promotes mouse hepatocyte proliferation during liver regeneration. *PLoS One.* 2012;7(4):e33577.
75. Zhu Y, Lu Y, Zhang Q, Liu JJ, Li TJ, Yang JR, Zeng C, Zhuang SM. MicroRNA-26a/b and their host genes cooperate to inhibit the G1/S transition by activating the pRb protein. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(10):4615-25.
76. Li X, Liu L, Shen Y, Wang T, Chen L, Xu D, Wen FQ. MicroRNA-26a modulates transforming growth factor beta-1-induced proliferation in human fetal lung fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2014;454(4):512-7.
77. Liang G, Li G, Wang Y, Lei W, Xiao Z. Aberrant miRNA expression response to UV irradiation in human liver cancer cells. *Mol Med Rep.* 2014;9(3):904-10.
78. Zhou J, Li Z, Huang Y, Ju W, Wang D, Zhu X, He X. MicroRNA-26a targets the mdm2/p53 loop directly in response to liver regeneration. *International journal of molecular medicine.* 2019.
79. Schultz J, Lorenz P, Gross G, Ibrahim S, Kunz M. MicroRNA let-7b targets important cell cycle molecules in malignant melanoma cells and interferes with anchorage-independent growth. *Cell Res.* 2008;18(5):549-57.
80. Wang Y, Hu X, Greshock J, Shen L, Yang X, Shao Z, Liang S, Tanyi JL, sood AK, Zhang L. Genomic DNA copy-number alterations of the let-7 family in human cancers. *PLoS One.* 2012;7(9):e44399.
81. Wu L, Nguyen LH, Zhou K, de Soysa TY, Li L, Miller JB, Tian J, Locker J, Zhang S, Shinoda G, Seligson MT, Zeitels LR, Acharya A, Wang SC, Mendell JT, He X, Nishino J, Morrison SJ, Siegwart DJ, Daley GQ, Shyh-Chang N, Zhu H. Precise *let-7* expression levels balance organ regeneration against tumor suppression. *Elife.* 2015;4.
82. Gong W, Zheng J, Liu X, Ma J, Liu Y, Xue Y. Knockdown of NEAT1 restrained the malignant progression of glioma stem cells by activating microRNA let-7e. *Oncotarget.* 2016;7(38):62208-23.
83. Urbanek-Olejniak K, Liszewska M, Kostka G. The effect of phenobarbital on gene expression levels of p53 and Dnmt1 in the liver of Wistar rats. *Rocz Panstw Zakl Hig.* 2014;65(3):199-203.
84. Nihon-Yanagi Y, Terai K, Murano T, Kawai T, Kimura S, Okazumi S. beta-2 microglobulin is unsuitable as an internal reference gene for the analysis of gene expression in human colorectal cancer. *Biomed Rep.* 2013;1(2):193-6.
85. Yamaguchi H, Matsumoto S, Ishibashi M, Hasegawa K, Sugitani M, Takayama T, Esumi M. beta-Glucuronidase is a suitable internal control gene for mRNA quantitation in pathophysiological and non-pathological livers. *Exp Mol Pathol.* 2013;95(2):131-5.
86. Cicinnati VR, Shen Q, Sotiropoulos GC, Radtke A, Gerken G, Beckebaum S. Validation of putative reference genes for gene expression studies in human hepatocellular carcinoma using real-time quantitative RT-PCR. *BMC Cancer.* 2008;8:350.
87. Hvid H, Ekstrom CT, Vienberg S, Oleksiewicz MB, Klopffleisch R. Identification of stable and oestrus cycle-independent housekeeping genes in the rat mammary gland and other tissues. *Vet J.* 2011;190(1):103-8.

88. Svingen T, Letting H, Hadrup N, Hass U, Vinggaard AM. Selection of reference genes for quantitative RT-PCR (RT-qPCR) analysis of rat tissues under physiological and toxicological conditions. *PeerJ*. 2015;3:e855.
89. Timaru-Kast R, Herbig EL, Luh C, Engelhard K, Thal SC. Influence of age on cerebral housekeeping gene expression for normalization of quantitative PCR after acute brain injury in mice. *J Neurotrauma*. 2015.
90. Zhang S, An S, Li Z, Wu F, Yang Q, Liu Y, Cao J, Zhang H, Zhang Q, Liu X. Identification and validation of reference genes for normalization of gene expression analysis using qRT-PCR in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Gene*. 2015;555(2):393-402.
91. Ghosh T, Soni K, Scaria V, Halimani M, Bhattacharjee C, Pillai B. MicroRNA-mediated up-regulation of an alternatively polyadenylated variant of the mouse cytoplasmic {beta}-actin gene. *Nucleic Acids Res*. 2008;36(19):6318-32.
92. Ma N, Gao X. beta-Actin is predicted as one of the potential targets of miR-145: choose internal control gene in verification of microRNA target. *Carcinogenesis*. 2013;34(1):236.
93. Ma N, Xiang Y, Zhang Y, Gao X. A microRNA "target pools" remains mysterious. *J Cell Biochem*. 2012;113(1):1-2.
94. Leder A, Raschzok N, Schmidt C, Arabacioglu D, Butter A, Kolano S, de Sousa Lisboa L, Werner W, Polenz D, Reutzel-Selke A, Pratschke J, Sauer IM. Micron-sized iron oxide-containing particles for microRNA-targeted manipulation and MRI-based tracking of transplanted cells. *Biomaterials*. 2015;51:129-37.
95. Giaccia AJ, Kastan MB. The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes Dev*. 1998;12(19):2973-83.
96. Stommel JM, Wahl GM. Accelerated MDM2 auto-degradation induced by DNA-damage kinases is required for p53 activation. *The EMBO Journal*. 2004;23(7):1547-56.
97. Lukashchuk N, Vousden KH. Ubiquitination and Degradation of Mutant p53. *Molecular and Cellular Biology*. 2007;27(23):8284-95.
98. Soong R-S, Trieu J, Lee SY, He L, Tsai Y-C, Wu TC, Hung CF. Xenogeneic Human p53 DNA Vaccination by Electroporation Breaks Immune Tolerance to Control Murine Tumors Expressing Mouse p53. *PLoS ONE*. 2013;8(2):e56912.
99. Brandt T, Kaar JL, Fersht AR, Veprintsev DB. Stability of p53 Homologs. *PLoS ONE*. 2012;7(10):e47889.
100. Khoo KH, Andreeva A, Fersht AR. Adaptive evolution of p53 thermodynamic stability. *J Mol Biol*. 2009;393(1):161-75.
101. Ferraiuolo M, Di Agostino S, Blandino G, Strano S. Oncogenic Intra-p53 Family Member Interactions in Human Cancers. *Front Oncol*. 2016;6:77.
102. Sehgal V, Seviour EG, Moss TJ, Mills GB, Azencott R, Ram PT. Robust Selection Algorithm (RSA) for Multi-Omic Biomarker Discovery; Integration with Functional Network Analysis to Identify miRNA Regulated Pathways in Multiple Cancers. *PLoS One*. 2015;10(10):e0140072.
103. Gupta P, Sata TN, Ahamad N, Islam R, Yadav AK, Mishra A, Nithyananthan S, Thirunavukkarasu C, Sanal MG, Venugopal SK. Augmenter of liver regeneration enhances cell proliferation through the microRNA-26a/Akt/cyclin D1 pathway in hepatic cells. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology*. 2019.
104. Wang Y, Wang LW, Gong ZJ. [Research progress on the relationship between non-coding RNA and liver failure]. *Zhonghua gan zang bing za zhi = Zhonghua ganzangbing zazhi = Chinese journal of hepatology*. 2019;27(5):397-400.
105. Bai H, Guo J, Chang C, Guo X, Xu C, Jin W. Comprehensive analysis of lncRNA-miRNA-mRNA during proliferative phase of rat liver regeneration. *Journal of cellular physiology*. 2019;234(10):18897-905.

106. Di Ianni T, Bose RJC, Sukumar UK, Bachawal S, Wang H, Telichko A, Herickhoff C, Robinson E, Baker S, Vilches-Moure JG, Felt SA, Gambhir SS, Paumurugan R, Dahl JD. Ultrasound/microbubble-mediated targeted delivery of anticancer microRNA-loaded nanoparticles to deep tissues in pigs. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2019;309:1-10.
107. Raschzok N, Sallmon H, Pratschke J, Sauer IM. MicroRNAs in liver tissue engineering - New promises for failing organs. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015;88:67-77.
108. Ibars EP, Cortes M, Tolosa L, Gomez-Lechon MJ, Lopez S, Castell JV, Mir J. Hepatocyte transplantation program: Lessons learned and future strategies. *World J Gastroenterol*. 2016;22(2):874-86.
109. Yamaguchi T, Matsuzaki J, Katsuda T, Saito Y, Saito H, Ochiya T. Generation of functional human hepatocytes in vitro: current status and future prospects. *Inflammation and regeneration*. 2019;39:13.
110. Raschzok N, Langer CM, Schmidt C, Lerche KH, Billecke N, Nehls K, Schlüter NB, Leder A, Rohn S, Mogl MT, Lüdemann L, Stelter L, Teichgräber UK, Neuhaus P, Sauer IM. Functionalizable silica-based micron-sized iron oxide particles for cellular Magnetic Resonance Imaging. *Cell Transplant*. 2013.

11. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Natalie Benita Schlüter, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *In vitro* Untersuchungen Leberregenerations-spezifischer microRNAs in kultivierten Hepatozyten (In vitro studies of liver specific microRNAs in cultured hepatocytes), selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum 17.09.2021

Unterschrift

12. Lebenslauf

"Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht."

13. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. I. M. Sauer und PD Dr. med. N. Raschzok für die wohlwollende Unterstützung meiner wissenschaftlichen Tätigkeit und das Vertrauen in meine Person. Darüber hinaus danke ich den aktiven und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. I. M. Sauer die mich fachlich und moralisch zu jeder Zeit unterstützt haben.

Für die Vermittlung eines umfangreichen Wissens möchte ich mich insbesondere bei Frau Dr. Anne-Kathrin Leder bedanken, die mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Für den reibungslosen Ablauf und die kompetente Unterstützung im Labor möchte ich mich bei Frau Dr. Susanne Rohn, Herrn Dr. Jan Schröder, Frau Luisa De Sousa-Lisboa, Frau Kerstin Nehls, Herrn Steffen Lippert und allen anderen Mitgliedern der Forschungsgruppe bedanken. Diese haben meinen wissenschaftlichen Arbeitsalltag zu jederzeit bereichert und angenehm gestaltet.

Des Weiteren möchte ich mich bei Frau Dr. Anja Reutzel-Selke und Herrn Dietrich Polenz für die Unterstützung bei organisatorischen und fachlichen Fragen, sowie für methodische Hilfestellungen bedanken.

Mein herzlicher Dank gilt außerdem meiner Familie, die mich auf meinem bisherigen Weg stets begleitet und moralischen Rückhalt gegeben haben und meinen Freunden, die mir mit größter Zuversicht zur Seite standen.