

Inhaltsverzeichnis

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

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

5.2.	Inhibierung der TGF β -Signaltransduktion durch Reduktion der TGF β -R1-Expression mithilfe einer siRNA.....	74
6.	Zusammenfassung.....	83
7.	Literaturverzeichnis	85
8.	Erklärung zu Vorabveröffentlichung von Ergebnissen.....	95
9.	Lebenslauf	97